



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de São José do Rio Preto



Izabela Karolina Costa Zilli

**Cultivo e avaliação da degradação de lignina por *Pycnoporus sanguineus* e *Phlebia* sp. e
caracterização de lacases para descoloração de corantes sintéticos**

São José do Rio Preto

2023

Izabela Karolina Costa Zilli

Cultivo e avaliação da degradação de lignina por *Pycnoporus sanguineus* e *Phlebia* sp. e caracterização de lacases para descoloração de corantes sintéticos

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em microbiologia, junto ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de São José do Rio Preto

Financiadora: CAPES

Orientador:

Prof. Dr. Gustavo Orlando Bonilla Rodriguez

Co-orientadora:

Prof^a Dr^a Eleni Gomes

São José do Rio Preto

2023

Z69c

Zilli, Izabela Karolina Costa

Cultivo e avaliação da degradação de lignina por *Pycnoporus sanguineus* e *Phlebia* sp. e caracterização de lacases para descoloração de corantes sintéticos / Izabela Karolina Costa Zilli. -- São José do Rio Preto, 2023

96 f. : il., tabs., fotos

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto

Orientador: Gustavo Orlando Bonilla Rodriguez

Coorientadora: Eleni Gomes

1. Lignina. 2. Lacases. 3. Corantes. 4. *Pycnoporus sanguineus*. 5. *Phlebia* sp.. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

Izabela Karolina Costa Zilli

Cultivo e avaliação da degradação de lignina por *Pycnoporus sanguineus* e *Phlebia* sp. e caracterização de lacases para descoloração de corantes sintéticos

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em microbiologia, junto ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de São José do Rio Preto.

Financiadora: CAPES

Comissão Examinadora

Prof. Dr. Gustavo Orlando Bonilla Rodriguez
UNESP – Câmpus de São José do Rio Preto
Orientador

Dr. Gabriel Zazeri
UNICAMP

Dr^a. Natália Sarmanho Monteiro Lima
UNESP – Câmpus de Jaboticabal

São José do Rio Preto
06 de outubro de 2023

Dedico este trabalho ao meu grande amigo Guilherme de P. Pretto que diariamente me fez companhia e me proporcionou as melhores risadas.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço profundamente ao meu orientador Prof. Dr. Gustavo Orlando Bonilla Rodriguez, que se manteve presente em todas as etapas deste projeto, me auxiliando de todas maneiras possíveis.

Agradeço também a Profa. Dra. Eleni Gomes, minha coorientadora, por disponibilizar o laboratório de Bioquímica e Microbiologia Aplicada e seus equipamentos para o desenvolvimento deste trabalho.

À minha família sou imensamente grata a todos por todo o apoio e suporte emocional que me permitiram continuar na carreira acadêmica, mesmo com todos desafios a serem percorridos.

Aos meus amigos agradeço por tornarem essa jornada mais leve e proveitosa, me lembrando que a vida não se resume em um currículo. Aos meus grandes amigos Guilherme Pretto, Layse Arian e Vitória Hidemi, toda minha gratidão pelos momentos vividos, sem vocês esta experiência não teria sido a mesma.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Por fim, agradeço a todos professores e funcionários do Ibilce que de algum modo colaboraram para a minha formação como profissional.

“A obrigação de suportar nos dá o direito de saber”

Jean Rostand (1894-1977)

RESUMO

Com a necessidade de reduzir a emissão global de gases responsáveis pelo efeito estufa, é esperado que o desenvolvimento de novas metodologias para a produção de energia e de substâncias químicas produzidas a partir de fontes renováveis, como a biomassa, se torne cada vez maior. Sendo a lignina um material recalcitrante, e procurando alternativas sustentáveis e que diminuam o impacto ao meio ambiente, este projeto teve por objetivo cultivar dois isolados de fungos filamentosos: *Phlebia* sp. e *Pycnoporus sanguineus* em fermentação submersa e semissólida, em licor proveniente da hidrólise alcalina do bagaço de cana-de-açúcar e farelo de trigo, respectivamente, a fim de obter extratos enzimáticos ricos em lacases, para então avaliarmos a sua capacidade de degradar a lignina, além de selecionar e purificar a lacase proveniente da espécie com sua maior produção, caracterizando-a quanto aos seus parâmetros cinéticos e de termoestabilidade para posteriormente testar sua eficiência na degradação dos corantes azul de bromofenol, Brilliant Blue G e R-250, verde malaquita e vermelho congo. Os resultados obtidos demonstram que ambas as espécies foram capazes de crescer nas duas condições de fermentação, onde *P. sanguineus* se destacou pela maior produção de lacases e degradação da lignina. Ambas as isoformas purificadas (LacI e LacII) apresentaram valores de pH ótimo de 4,0 para os substratos ABTS e Guaiacol, com temperaturas ótimas similares de 50°C. LacI manteve 50% de sua atividade relativa após 60 minutos incubada a 60°C, sendo a atividade relativa da LacII de 29,6% em mesmas condições. A solução contendo as duas isoformas apresentou idênticas condições de pH ótimo com temperatura ótima de 40°C, mantendo sua atividade relativa de 19% após incubação em 60°C por 60 minutos, esta também demonstrou valores similares de K_m para os substratos ABTS e Guaiacol (0,55 e 0,60 Mm, respectivamente). LacI apresentou para ABTS valores de K_m 0,94 e LacII 0,17 mM. Diferentemente do esperado, em ambas isoformas concentrações acima de 10 mM de guaiacol apresentaram um efeito inibitório nas mesmas. As lacases aqui estudadas apresentaram somente um pico de absorção próximo de 280nm, diferenciando-se das lacases azuis. LacI se demonstrou a mais eficaz entre as isoformas para a degradação dos corantes sintéticos, em especial Azul de Bromofenol, verde malaquita e vermelho congo.

Palavras-chave: Lignina. Lacases. Corantes. *Pycnoporus sanguineus*. *Phlebia* sp.

ABSTRACT

With the need to reduce global emissions of greenhouse gases, it is expected that the development of new methodologies for energy production and the production of chemicals from renewable sources, such as biomass, will become increasingly important. Since lignin is a recalcitrant material, and in search of sustainable alternatives that reduce environmental impact, this project aimed to cultivate two isolates of filamentous fungi, *Phlebia* sp. and *Pycnoporus sanguineus*, in submerged and semi-solid fermentation, using liquor derived from the alkaline hydrolysis of sugarcane bagasse and wheat bran, respectively, in order to obtain enzyme-rich laccase extracts. Subsequently, we evaluated their ability to degrade lignin, selected and purified the laccase from the species with the highest production, characterizing it in terms of its kinetic and thermostability parameters, and then tested its efficiency in degrading the dyes bromophenol blue, Brilliant Blue G and R-250, malachite green, and congo red. The results obtained demonstrate that both species were able to grow under both fermentation conditions, with *P. sanguineus* standing out for its higher production of laccases and lignin degradation. Both purified isoforms (LacI and LacII) showed optimal pH values of 4.0 for the substrates ABTS and Guaiacol, with similar optimal temperatures of 50°C. LacI maintained 50% of its relative activity after 60 minutes of incubation at 60°C, while the relative activity of LacII was 29.6% under the same conditions. The solution containing both isoforms had identical optimal pH conditions with an optimal temperature of 40°C, maintaining its relative activity at 19% after incubation at 60°C for 60 minutes. It also showed similar Km values for the substrates ABTS and Guaiacol (0.55 and 0.60 mM, respectively). LacI had Km values of 0.94 for ABTS, and LacII had Km values of 0.17 mM. Contrary to expectations, both isoforms showed inhibitory effects at concentrations above 10 mM of guaiacol. The laccases studied here exhibited only one absorption peak near 280nm, distinguishing them from blue laccases. LacI proved to be the most effective among the isoforms for degrading synthetic dyes, especially bromophenol blue, malachite green, and congo red.

Keywords: Lignin. Laccase. Synthetic Dyes. *Pycnoporus sanguineus*. *Phlebia* sp.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura da parede celular vegetal.	18
Figura 2. Fragmento de lignina indicando suas ligações β -O-4 e 5-5.	19
Figura 3. Mecanismo redox da lacase (SH: substrato reduzido; S: substrato oxidado)	23
Figura 4. Mecanismo lacase-mediador.	24
Figura 5. Aspecto das culturas após 21 dias de inóculo (à esquerda <i>Phlebia</i> sp.; à direita <i>P. sanguineus</i>).	33
Figura 6. Formação do pellet com intensa pigmentação do sobrenadante. (à esquerda pellet formado logo após o armazenamento do extrato bruto extraído da fermentação; à direita pellet formado após processo de Salting-out, com seu sobrenadante mantendo coloração intensa).	34
Figura 7. Atividade enzimática de <i>P. sanguineus</i> ao longo dos 20 dias de fermentação.	43
Figura 8. Atividade enzimática de <i>Phlebia</i> sp. ao longo dos 20 dias de fermentação.	44
Figura 9. pH ótimo da lacase produzida por <i>P. sanguineus</i>	45
Figura 10. Atividade enzimática em função aos dias e valores de pH.	46
Figura 11. pH ótimo da lacase produzida por <i>Phlebia</i> sp.	47
Figura 12. Espectros de absorção na faixa de 200 – 400 nm do Controle abiótico.	49
Figura 13. Espectros de absorção na faixa de 200 – 400 nm de <i>P. sanguineus</i>	49
Figura 14. Espectros de absorção na faixa de 200 – 400 nm de <i>Phlebia</i> sp.	50
Figura 15. Absorbância a 540 nm ao longo dos dias para as duas espécies fúngicas.	52
Figura 16. Perfil cromatográfico da filtração em gel. A linha azul representa o perfil de proteínas medido em 280 nm, a linha vermelha a condutividade, e a preta a atividade de lacase. No eixo x superior são representadas as frações coletadas.	53
Figura 17. Primeiro perfil cromatográfico obtido pela cromatografia de Troca iônica. A linha azul representa o perfil de proteínas medido em 280 nm, a linha vermelha a atividade de lacase, a verde o gradiente entre os tampões inicial e final e a marrom a condutividade. No eixo x são representadas as frações coletadas.	54
Figura 18. Zimograma corado com ABTS. I) Extrato Bruto com apenas uma banda; II) Fração coletada da cromatografia de troca iônica; III) Extrato bruto de <i>P. sanguineus</i> com duas bandas aparentes.	55
Figura 19. Perfil de atividade de lacase I) Filtração em gel; II) Troca iônica.	56
Figura 20. Perfil cromatográfico Troca Iônica com concentração inicial de 30%. A linha azul escura representa o perfil de proteínas medido em 280 nm, a linha azul clara a atividade enzimática, a marrom a condutividade e a cinza clara o gradiente. No eixo x são representadas as frações coletadas.	57
Figura 21. Zimograma corado com ABTS/Guaiacol. I) 20° Fração eluída; II) 23° Fração eluída; III) 33°; IV) 36; V) 40° Frações eluídas.	58
Figura 22. Eletroforese SDS-PAGE (1: Marcador; 2: Extrato bruto; 3: Fração da gel filtração; 4: Albumina sérica bovina – 66Kda; M: solução com ambas isoformas; L1: Lac1; L2: Lac2).	58
Figura 23. pH ótimo em diferentes substratos ABTS (à esquerda) e Guaiacol (à direita) para a solução contendo as duas isoformas.	61
Figura 24. pH ótimo em diferentes substratos ABTS (à esquerda) e Guaiacol (à direita) para LacI.	62

Figura 25. pH ótimo em diferentes substratos ABTS (à esquerda) e Guaiacol (à direita) para LacII.....	62
Figura 26. Temperatura ótima da LacI.	64
Figura 27. Temperatura ótima da LacII.....	65
Figura 28. Temperatura ótima solução com isoformas diluídas.....	65
Figura 29. Estabilidade térmica solução contendo as duas isoformas diluídas.	67
Figura 30. Estabilidade térmica da LacI.....	68
Figura 31. Estabilidade térmica da LacII.	69
Figura 32. I. Cinética da solução com ambas as isoformas diluídas (à esquerda: ABTS; à direita: Guaiacol). II. Cinética das isoformas em ABTS (à esquerda: LacI; à direita: LacII).	71
Figura 33. Inibição da atividade enzimática de LacI por guaiacol.....	72
Figura 34. Inibição da atividade enzimática de LacII por guaiacol.	73
Figura 35. Absorbância das lacases estudadas (I. Solução contendo ambas isoformas; II. LacI; III; LacII).	75
Figura 36. Degradação de corantes sintéticos pelo extrato bruto de <i>P. sanguineus</i> após 24 horas em pH 4,0 e temperatura ambiente. (BB: Azul de Bromofenol; VM: Verde Malaquita; VC: Vermelho Congo; BG: Brilliant Blue G).....	78
Figura 37. Degradação de corantes sintéticos por LacI e II em pH 4 (BB: Azul de Bromofenol; VM: Verde Malaquita; VC: Vermelho Congo; BG: Brilliant Blue G; BR: Brilliant Blue R-250) após 24 e 48 horas.	79
Figura 38. Degradação de corantes sintéticos por LacI e II em pH 3 (BB: Azul de Bromofenol; VM: Verde Malaquita; BG: Brilliant Blue G; BR: Brilliant Blue R-250) após 24 e 48 horas.	80
Figura 39. Degradação de corantes sintéticos por LacI e II em pH 5,5 (BB: Azul de Bromofenol; VM: Verde Malaquita; VC: Vermelho Congo; BG: Brilliant Blue G; BR: Brilliant Blue R-250) após 24 e 48 horas.	81
Figura 40. Varredura licor pH 4 (I. 30 minutos; II. 60 minutos; III. 24 horas).....	82
Figura 41. Varredura licor pH 5,5 (I. 30 minutos; II. 60 minutos; III. 24 horas).....	83
Figura 42. Varredura licor pH 7 (I. 30 minutos; II. 60 minutos; III. 24 horas).....	84

LISTA DE TABELAS E QUADROS

Tabela 1. Composição do gel nativo.....	40
Tabela 2. Medidas do pH do meio de cultura ao longo da fermentação.	48
Tabela 3. Tabela de Purificação.....	60
Quadro 1. Espécies isoladas pela Dra. Solange X. dos Santos, capazes de produzir Lacase.	29
Quadro 2. Compostos utilizados na preparação do meio de cultura.	31

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO	15
2.REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
2.1. Lignina	17
2.2. Degradação da lignina	20
2.3. Descoloração de corantes sintéticos	24
2.4. Fungos lignocelulolíticos	26
3.OBJETIVOS	28
4.METODOLOGIA.....	29
4.1. Isolamento dos microrganismos.....	29
4.2. Pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar	30
4.2.1. Padronização do bagaço de cana-de-açúcar	30
4.2.2. Hidrólise alcalina.....	30
4.3. Cultivo e inóculo dos microrganismos.....	31
4.4. Avaliação da degradação da lignina	32
4.5. Determinação de açúcares redutores no meio de fermentação	32
4.6. Fermentação semi-sólida	32
4.7. Purificação das lacases.....	33
4.8. Ensaio enzimáticos.....	35
4.9. Ensaio enzimáticos em tubos de ensaio.....	36
4.10. Ensaio enzimáticos em microplacas	37
4.11. Determinação do pH ótimo.....	37
4.12. Determinação da temperatura ótima	37
4.13. Parâmetros cinéticos	37
4.14. Estabilidade térmica	38
4.15. Análises eletroforéticas	39
4.15.1. SDS-PAGE.....	39
4.15.2. Zimograma	39

4.16. Quantificação de proteínas totais.....	40
4.17. Espectrofotometria das lacases	40
4.18. Análise da degradação de corantes sintéticos	41
4.19. Degradação do licor	42
4.20. Análise dos dados coletados.....	42
5.RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	43
☐ Fermentação submersa em estado líquido em licor.....	43
5.1. Perfil enzimático da fermentação submersa em estado líquido	43
5.2. pH ótimo das Lacases produzidas em fermentação submersa em estado líquido	44
5.3. Avaliação da degradação da lignina	48
5.4. Determinação dos açúcares redutores do meio.....	51
☐ Purificação e caracterização enzimática de isoformas obtidas por fermentação semi-sólida de <i>Pycnoporus sanguineus</i> e sua aplicação na degradação de corantes.....	53
5.5. Purificação	53
5.6. Determinação do pH ótimo.....	61
5.7. Temperatura ótima e termoestabilidade	63
5.8. Parâmetros Cinéticos	70
5.9. Propriedades espectrofotométricas das lacases	73
5.10. Análise da degradação de corantes sintéticos	77
5.11. Degradação do licor	82
6.CONCLUSÕES.....	85
REFERÊNCIAS.....	86

1.INTRODUÇÃO

É estimado que em 80% da base do crescimento econômico moderno a energia seja proveniente de combustíveis fósseis, como carvão, petróleo e gás natural. A extração, processamento, transporte e seu uso final possuem diversos impactos negativos no meio ambiente, tais como derramamentos e a poluição atmosférica, contribuindo com a liberação de gases responsáveis pelo efeito estufa (BARBIR; VEZIROĞLU; PLASS, 1990; ARMAROLI; BALZANI, 2011). Estas atividades também impactam negativamente a economia mundial, onde temos registrado que a poluição atmosférica causada pela queima de combustíveis não renováveis é responsável pela perda de 8 bilhões de dólares por dia e 2.9 trilhões de dólares por ano, representando 3,3% do PIB global (FARROW; MILLER; MYLLYVIRTA, 2020).

Devido à diminuição do interesse por recursos fósseis não renováveis como matéria prima para a síntese de produtos de alto valor agregado e a necessidade de reduzir a emissão global de gases responsáveis pelo efeito estufa, é esperado que a produção de energia e de substâncias químicas geradas a partir de fontes renováveis, como a biomassa, dentro do conceito de biorrefinarias, aumente em um futuro próximo (ZAKZESKI, 2010; BUGG; RAHMANPOUR, 2015; DEVI et. al., 2022).

Em virtude da sua abundância e renovabilidade, a biomassa lignocelulósica pode ser utilizada de forma eficiente para o desenvolvimento sustentável, sendo considerada uma fonte alternativa para a produção de artigos de alto valor comercial. Contudo, a sua característica recalcitrante, proveniente da lignina, dificulta a utilização da biomassa como matéria-prima para a síntese de compostos químicos e biocombustíveis (KAMIMURA et al., 2019; ABDEL-HAMID; SOLBIATI; CANN, 2013).

Segundo dados publicados pela Companhia Nacional de Abastecimento, estima-se que na safra de 2021/2022 sejam colhidas 568,4 milhões de toneladas de cana-de-açúcar, sendo a região sudeste, principal produtora de cana-de-açúcar no país, responsável pela colheita de 63%

do total (CONAB, 2021). Com tamanha produção, o bagaço de cana-de-açúcar é um dos principais subprodutos lignocelulósicos produzidos em nosso país (MOREIRA, 2013), sendo este material uma ótima matéria-prima pelo fato de um terço da energia da cana-de-açúcar estar contida no seu bagaço (GOLDEMBERG, 2011).

Com isso, se fazem necessários estudos que utilizem estes resíduos agroindustriais de modo que estes sejam aproveitados da forma mais eficiente possível. As aplicações práticas de microrganismos produtores de enzimas capazes de degradar não somente a biomassa lignocelulósica, mas também remediar substâncias tóxicas ou indesejáveis no ambiente se torna imprescindível para o avanço biotecnológico. Dentre estas substâncias temos os corantes, que são amplamente utilizados nas mais diversas indústrias, com aproximadamente mais de 10.000 tipos de corantes e pigmentos sendo fabricados mundialmente, com mais de 7×10^5 toneladas sendo produzidas anualmente (BANAT et al., 1996; MEYER, 1981; IRACHETA-CÁRDENAS et al., 2016; ZOLLINGER, 1987).

Sendo a cor ser o primeiro contaminante a ser identificado em águas residuais, afetando não somente o aspecto estético, mas também a transparência e solubilidade de gases nos corpos de água, a remoção destes tende a ser priorizada em detrimento das substâncias orgânicas solúveis e incolores, sendo muitos destes corantes contaminantes conhecidos por serem sintetizados a partir de carcinogênicos, como a benzidina e outros compostos aromáticos (BANAT et al., 1996; DONG et al., 2003; AYED et al., 2011). O tratamento destas águas residuais contaminadas com corantes são convencionalmente processos físico-químicos, contudo, já são descritos por estes processos problemas de efluentes secundários (SLOKAR, MARECHAL, 1998; DONG et al., 2003).

Desta forma, o uso de microrganismos e seus derivados para degradar contaminantes e poluentes dentro do conceito de biorremediação, garante uma degradação mais eficiente e específica destes poluentes a partir da grande diversidade genética deste grupo, resultando em

uma alternativa promissora para complementar ou até mesmo substituir os processos até então descritos para a remoção de corantes (DONG et al., 2003).

Com isso, este estudo tem como objetivo principal o cultivo das espécies *Pycnoporus sanguineus* e *Phlebia* sp. em diferentes meios de fermentação para a obtenção de extratos ricos em lacase, para assim selecionar a espécie com maior atividade e dar sequência à sua purificação, caracterização e aplicação na descoloração de corantes sintéticos. Tendo em vista que a purificação e o estudo das características bioquímicas destas proteínas servem como um meio de avaliar se estas são aptas a serem utilizadas em processos biotecnológicos, visto que estes processos necessitam de enzimas resistentes a fatores como pH e temperatura. Características essas que já foram descritas nas últimas décadas por lacases produzidas pelo gênero *Pycnoporus*, que além de produzirem lacases com um alto potencial redox, também apresentam um nível de estabilidade térmica e de pH (UZAN et al., 2010; WANG et al., 2010; TROVASLET et al., 2007; RAMÍREZ-CAVAZOS, 2014). Portanto podemos ressaltar a importância de caracterizar estas enzimas, visto que diferentes espécies dentro de um mesmo gênero podem produzir enzimas com diferentes características, que podem torná-las mais ou menos apropriadas para diferentes processos industriais.

2.REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

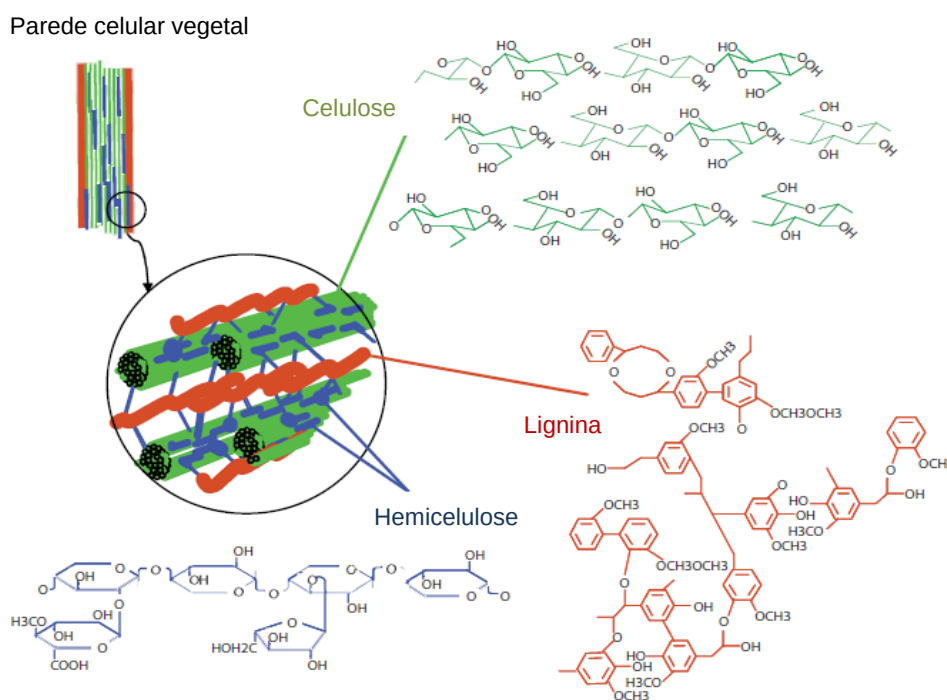
2.1. Lignina

A biomassa vegetal é, de forma geral, composta principalmente por dois polissacarídeos: a celulose (35-50%) e a hemicelulose (20-35%), tendo também na sua constituição a lignina (15-20%) (MOOD et al., 2013). Podemos ainda destacar a composição da biomassa lignocelulósica do bagaço de cana-de-açúcar, no qual a celulose representa 43,1%

da biomassa, seguida pela hemicelulose (31,1%) e a lignina (11,4%) (MARTÍN; KLINKE; THOMSEN, 2007).

A lignina, que eventualmente pode representar até 25% da biomassa lignocelulósica total produzida, é encontrada nos tecidos responsáveis pelo suporte mecânico e naqueles relacionados ao transporte de solutos, sendo polímeros amorfos com ligações cruzadas e de alta massa molecular, caracterizados pela sua natureza fenólica devido às suas estruturas aromáticas (FARINAS, 2011). Os precursores monoméricos que compõem a molécula da lignina são os álcoois trans-coniferílico, trans-p-cumarílico e trans-sinapílico (FENGEL; WEGENER, 1989). Desta forma, os componentes constituintes da biomassa vegetal interagem entre si formando uma matriz, onde a lignina se associa covalentemente com a hemicelulose e intimamente à celulose (BUGG et. al., 2011). Essa matriz, dentre outras funções, atua na manutenção da forma da parede celular vegetal (Figura 1).

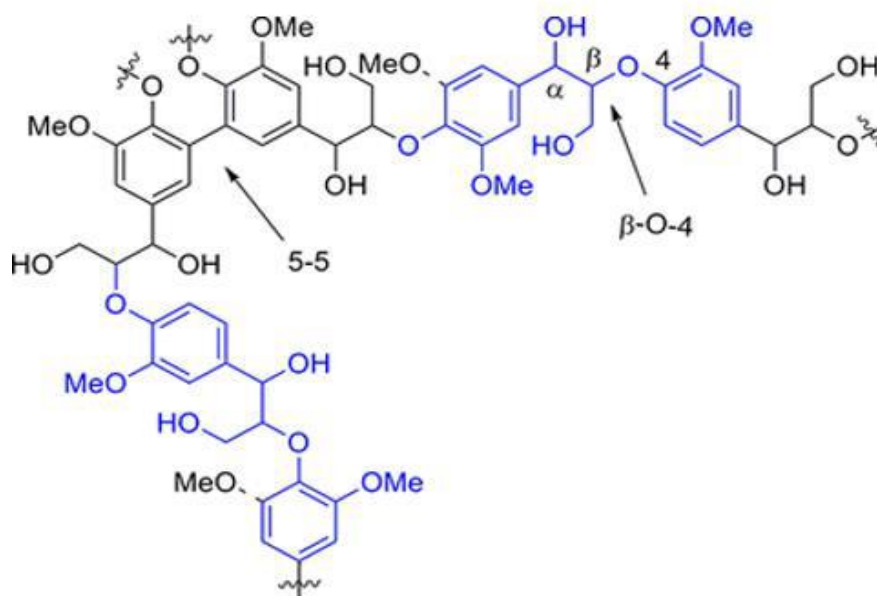
Figura 1. Estrutura da parede celular vegetal.



Fonte: Modificado de <http://www.biofuel.webgarden.com/sections/blog/pictures-for-lignocellulose>.

A lignina pode apresentar diferentes ligações entre carbonos: (β -5, 5-5, β -1 e β - β) e ligações entre moléculas de carbono e oxigênio (β -O-4), (Figura 2), sendo estas as mais comuns (ANDERSON et al., 2019). Esta estrutura complexa e insolúvel em água apresenta uma grande quantidade de moléculas de carbono e um menor número de moléculas de oxigênio quando comparadas com os outros polissacarídeos que compõem a biomassa vegetal, tornando esta uma matéria-prima interessante para a síntese de biocombustíveis e compostos químicos de importância comercial, os quais podem ser obtidos a partir de um sistema integrado de vias de reação, nas chamadas biorrefinarias (RINALDI et al., 2016). Estas podem ser definidas como instalações que convertem a biomassa em produtos químicos ou biocombustíveis, utilizando matérias-primas renováveis, como a biomassa lignocelulósica e seus resíduos para a produção por rota biotecnológica ou química de diversas substâncias e energia (BASTOS, 2007; DEVI et al., 2022).

Figura 2. Fragmento de lignina indicando suas ligações β -O-4 e 5-5.



Fonte: Adaptado de RAHIMI et. al., 2013

2.2. Degradação da lignina

Enzimas são catalisadores biológicos que apresentam uma complexa estrutura tridimensional composta de cadeias polipeptídicas, realizando diversos processos metabólicos que sustentam a vida. Estas proteínas têm se tornado cada vez mais importantes nos setores de tecnologia sustentável e na chamada química verde, sendo este termo descrito por Anastas e Warner (1991) como a geração de produtos químicos sustentáveis e processos que eliminem ou pelo menos reduzam o emprego ou produção de substâncias consideradas perigosas (ANASTAS; WARNER, 1991; CHOUDHURY, 2020).

Devido à heterogeneidade de suas ligações químicas, a lignina não pode ser clivada por enzimas hidrolíticas, como ocorre para os demais componentes da parede celular vegetal, sendo necessária a ação sinérgica de diversas enzimas (ABDEL-HAMID; SOLBIATI; CANN, 2013). Uma variedade de microrganismos, como fungos filamentosos e bactérias, são capazes de degradar a estrutura da lignina a partir de diferentes modos de ação, sendo a degradação bacteriana lenta e restrita quando comparada à degradação realizada pelos fungos filamentosos (SIGOILLOT et al., 2012). Os fungos que possuem esta capacidade de degradação de paredes lignificadas são agrupados nos filos Ascomycota e Basidiomycota, sendo conhecidos como fungos da podridão branca, podridão parda e podridão mole, de acordo com as propriedades da madeira que é degradada e as características do material lignocelulósico derivado (SIGOILLOT et al., 2012), sendo os fungos da podridão branca os mais efetivos no processo de deslignificação devido à produção de enzimas oxidativas extracelulares ligninolíticas (ABDEL-HAMID; SOLBIATI; CANN, 2013). Devido à sua interação com as celuloses e hemiceluloses, a lignina age como uma barreira, impedindo o acesso de enzimas hidrolíticas, como celulasas e β -glicosidases, a estes polímeros (ACHYUTHAN et al., 2010), deste modo, a degradação da lignina permite a ação destas enzimas sobre estes substratos e sua consequente liberação de açúcares.

Assim, a degradação da lignina inclui um consórcio de diversas enzimas que, na presença de oxigênio ou hidrogênio, são capazes de despolimerizar o substrato formando intermediários com radicais reativos, sendo estes intermediários capazes de atravessar as paredes celulares vegetais, os quais interagem com a lignina de modo a oxidar sua estrutura, gerando diversos compostos tóxicos (FABBRINI; GALLI; GENTILI, 2002; GARCIA, 2019). Alguns dos passos envolvidos na oxidação da lignina por enzimas fúngicas extracelulares incluem a oxidação das ligações β -O-4 em compostos arilgliceróis, a clivagem dos anéis aromáticos (geralmente seguindo a via do β -cetoadipato), que se acoplam às ligações oxidadas de maneira a formar estruturas de carbonato cíclico (JAVOID; SABIR; SHEIKH; FERHAN, 2018; HARWOOD; PARALES, 1996).

A degradação da lignina pode gerar uma série de bioprodutos de alto valor agregado além daqueles já listados, como lipídeos, ácido mucônico, PHA (biopoliésteres), vanilina, ácido p-hidroxibenzóico, entre outros (XU et. al., 2019). Com isso, a aplicação de enzimas microbianas para a diminuição do grau de polimerização da lignina e a conversão de compostos aromáticos derivados da mesma é utilizada como uma ferramenta bioquímica para uma utilização mais eficiente da biomassa lignocelulósica (KAMIMURA et. al., 2019), além de possuírem o benefício da especificidade enzimática nas reações, a qual não está presente em processos físico-químicos (JAVOID; SABIR; SHEIKH; FERHAN, 2018).

Entre as enzimas ligninolíticas temos uma ação sinérgica de diversas enzimas oxidativas: a lignina-peroxidase (LiP) e a peroxidase-dependente de manganês (MnP) ou manganês-peroxidase, capazes de oxidar subestruturas da lignina na presença de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), e de uma oxidase, como a lacase, que catalisa a redução de O_2 para H_2O levando à oxidação de subunidades fenólicas da lignina (KIRK; CULLEN, 1998).

2.3. Lacases

Dentre as enzimas oxidativas, as lacases se tornam atrativas como sujeito de pesquisa nos últimos anos por suas características intrínsecas e, dentre elas, sua baixa especificidade de substrato, podendo ser alternativas para a substituição ou diminuição de processos prejudiciais ao meio ambiente. Por este motivo as lacases são consideradas “catalisadores verdes”, sendo biocatalisadores de diversos substratos usando oxigênio e tendo como único subproduto de sua ação a água (RIVA, 2006; PEDROSO, 2011).

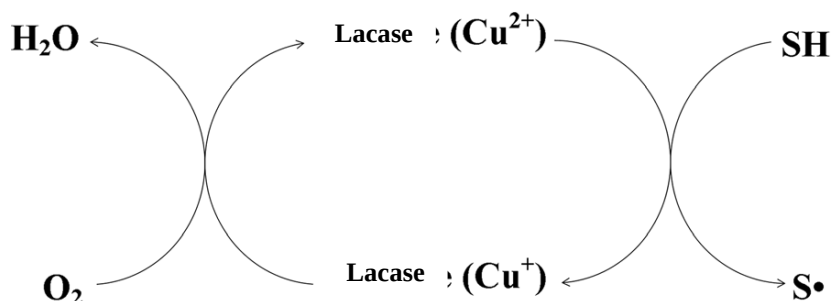
As lacases (EC 1.10.3.2) são amplamente distribuídas entre os seres vivos, sendo descritas em bactérias, fungos, plantas e insetos. Estas enzimas são oxidases contendo quatro átomos de cobre, capazes de oxidar diversas substâncias através da clivagem do oxigênio, formando água como subproduto (GIARDINA et. al., 2010; FERNANDES, 2020). Frequentemente, lacases de origem fúngica são descritas como glicoproteínas de aproximadamente 60-70 kDa, com ponto isoelétrico por volta do pH 4,0 (BALDARIAN, 2006), ocorrendo normalmente como isoenzimas com estruturas proteínicas monoméricas ou oligoméricas, apresentando uma arquitetura similar que compreende três domínios arranjados sequencialmente de estruturas do tipo Barril β (PERALTA et al., 2017).

Por possuírem cobre em sua estrutura, são conhecidas como proteínas azuis, pertencendo ao grupo das multicobre oxidases (MAYER; STAPLES, 2002). Os átomos de cobre presentes em seu sítio catalítico podem ser classificados em três grupos, cobre Tipo I (T1), que é responsável pela cor azul intensa da enzima, com sua faixa de absorção em torno de 600 nm, cobre Tipo II (T2) e um par de átomos de cobre do Tipo III (T3), sendo os três últimos localizados próximos um do outro, formando um centro trinuclear, também envolvidos no mecanismo catalítico da proteína (PERALTA et al., 2017). Existem ainda exceções neste perfil conformacional, onde lacases podem não apresentar o sítio T1, sendo chamadas de

“lacases amarelas” ou “lacases falsas” por não possuírem a absorção em 600 nm garantida por este átomo de cobre (BALDRIAN, 2006; LEONTIEVSKY et al., 1997)

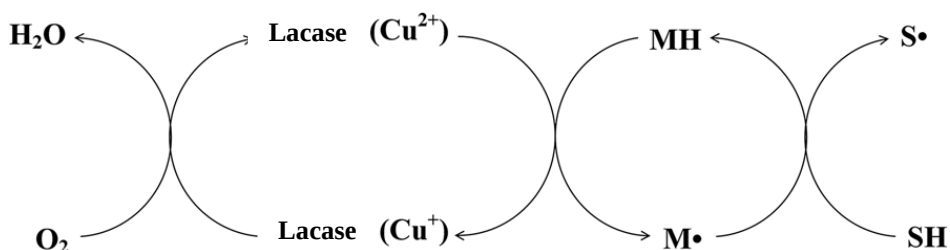
Deste modo, o sítio T1 é responsável pela oxidação do substrato, agindo como um aceptor primário de elétrons, sendo estes transferidos para os sítios T2 e T3, onde ocorre a redução do oxigênio molecular à água (Figura 5) (MESSERSCHMIDT, 1997; RIVERA-HOYOS et al., 2013).

Figura 3. Mecanismo redox da lacase (SH: substrato reduzido; S: substrato oxidado)



Fonte: Modificado de PLÁCIDO; CAPAREDA, 2015.

Devido ao seu baixo potencial redox ($< 0,8 \text{ V}$), comparado às peroxidases ($> 1 \text{ V}$), estas enzimas oxidam somente os compostos fenólicos da lignina, contudo, o espectro de substratos catalisados por estas proteínas pode ser aumentado a partir da participação de mediadores redox, que são moléculas de baixa massa molecular facilmente oxidadas por estas enzimas, produzindo radicais catiônicos reativos capazes de oxidar compostos complexos, incluindo moléculas não fenólicas (PERALTA et al., 2017; TORRES et al. 2003; RIVERA-HOYOS et al., 2013) Os mediadores se comportam então como transportadores de elétrons, de forma a permitir a oxidação de uma vasta gama de substratos poliméricos, que sozinhas estas enzimas não seriam capazes de catalisar (Figura 4) (RIVERA-HOYOS et al., 2013).

Figura 4. Mecanismo lacase-mediador.

Fonte: Modificado de PLÁCIDO; CAPAREDA, 2015.

São descritas na literatura diversas aplicações industriais para as enzimas responsáveis pela degradação da lignina, dentre elas, as lacases possuem um importante papel nas indústrias têxteis, onde foram implementadas no tingimento e branqueamento das fibras. Estas também têm se mostrado uma alternativa para a preservação das fibras ao agente clareador peróxido de hidrogênio, além de serem parte da biorremediação dos efluentes gerados por esta indústria (TZANOV et al., 2003; PEREIRA et al., 2005; PEZZELA; GUARINO; PISCITELLI, 2015).

Na indústria alimentícia, as lacases podem ser empregadas para a modificação de parâmetros de textura e sensoriais, agindo de forma a alterar a deterioração físico-química de produtos alimentícios e evidenciando os sabores e suas propriedades. As lacases podem ainda ser utilizadas para a determinação de compostos em bebidas e no aumento da vida útil de alimentos (PEZZELA; GUARINO; PISCITELLI, 2015).

Dentre as suas demais aplicações industriais, estas enzimas podem catalisar a síntese de antimicrobianos, antibióticos e drogas anticancerígenas, já que muitos dos substituintes aromáticos de cefalosporinas e penicilinas são substratos naturais de lacases, sendo demonstrada a utilidade destas na introdução de grupos amina em novos antibióticos (PEZZELA; GUARINO; PISCITELLI, 2015).

2.3. Descoloração de corantes sintéticos

Corantes sintéticos são utilizados em um número extensivo de processos de manufatura, principalmente na indústria têxtil, alimentícia, produção de papel, fármacos e produtos de cuidado pessoal. Com mais de 10.000 corantes disponíveis no mercado, entre 10 e 15% destes compostos podem ser encontrados em efluentes industriais (VAIDYA, 1982; LIU et al., 2004).

Corantes sintéticos causam efeitos negativos no ambiente mesmo em baixas concentrações, sendo eles em sua maioria moléculas recalcitrantes bioacumulativas, tóxicas, carcinogênicas e mutagênicas (LELLIS et al., 2019; ARDILA- LEAL et al., 2021). Contudo, o emprego destas moléculas é altamente vantajoso para as indústrias, visto que estes componentes são quimicamente estáveis ao longo do tempo e resistentes à degradação química e biológica, além de apresentarem um custo baixo (ARDILA- LEAL et al., 2021; ZUCCA et al., 2016; PAZ et al., 2017).

A parte responsável pela absorção de luz nas moléculas dos corantes é chamado de grupo cromóforo, que possui heteroátomos como N, O e S, com ligações $-N=N-$ (azo), $=C=O$ (carbonil), NO ou N-OH (nitroso), $-NO_2$ ou NO-OH (nitro) e C=S (enxofre), influenciando na classificação de cada corante (ARDILA-LEAL et al., 2021; PEREIRA; ALVES, 2012).

Corantes do tipo azo e trifenilmetano são extensivamente utilizados na indústria, contudo eles não são facilmente degradados (POINTING; VRIJMOED, 2000). Corantes da classe dos trifenilmetanos são altamente tóxicos para microrganismos e humanos, com isso organismos capazes de degradá-los são de grande interesse (MURUGESAN et al., 2009).

Verde Malaquita é um corante trifenilmetano, sendo o mais abundante na coloração de tecidos e muito utilizado para prevenir infecções fúngicas em incubatórios de peixes (GUPTA et al, 2004, FERNANDES et al., 1991; YANG et al., 2015), além de ser altamente tóxico e considerado um potencial carcinogênico (HENDERSON et al., 1997). O corante azul de bromofenol também se enquadra na classe dos trifenilmetanos (ARDILA- LEAL et al., 2021), sendo muito utilizado para fins laboratoriais, como marcador para o processo de migração de moléculas em géis de eletroforese, assim como os corantes Brilliant Blue G e R-250, sendo a diferença entre os dois últimos o acréscimo de dois grupos metil no Brilliant Blue R-250.

Corantes classificados como Azo são considerados tóxicos, mutagênicos e carcinogênicos, sendo o vermelho congo enquadrado neste grupo. Este corante apresenta dois grupos $N=N$, sendo empregado nas indústrias têxtil, farmacêutica, alimentícia, entre outras (SIDDIQUI et al., 2023). Para o vermelho congo são documentados diversos efeitos deletérios para humanos, levando a doenças fatais quando em altas concentrações, apresentando citotoxicidade, neurotoxicidade, genotoxicidade, hemotoxicidade, além de ser carcinogênico e mutagênico (SIDDIQUI et al., 2023; NASEEM et al., 2018).

Com o uso tão abundante dos corantes sintéticos e tamanhos perigos por eles causados são necessárias maneiras de diminuir o impacto destes compostos no ambiente. Embora existam diversos tratamentos utilizados para a remoção destes compostos, tratamentos físicos e químicos geram efluentes secundários, além de serem custosos e necessitarem de grandes áreas de tratamento (ROUTOULA; PATWARDHAN, 2020; ARDILA- LEAL et al., 2021). Desta forma, métodos biológicos para a remoção destes componentes causam menores impactos ambientais, visto que eles podem levar à completa mineralização dos contaminantes com um menor custo, sendo reconhecidas diversas espécies de microrganismos capazes de degradar e até mesmo mineralizar corantes sintéticos, como fungos, bactérias, leveduras e algas (PANDEY et al., 2007; YANG et al., 2015). Sendo enzimas biocatalisadores com uma ampla variedade em especificidade ao substrato, o seu emprego na biodegradação destes contaminantes se torna promissor.

Os processos industriais envolvendo as lacases são benéficos ecologicamente por principalmente não necessitarem do peróxido de hidrogênio, como ocorre para as ligninas peroxidases e manganês peroxidases, também não sendo necessários coenzimas como NAD⁺ ou FAD (LEGERSKÁ et al., 2016; ARDILA-LEAL et al., 2021), além de sua capacidade de oxidar substratos fenólicos e não fenólicos, já sendo descritas diversas lacases capazes de degradar corantes sintéticos, como as lacases produzidas por *P. sanguineus* que foram capazes de descolorir parcialmente corantes azo e trifenilmetano (POINTING; VRIJMOED, 2000).

2.4. Fungos lignocelulolíticos

Os fungos são microrganismos que desempenham papel essencial para o ciclo de carbono, atuando como decompositores da matéria orgânica, além de agirem como simbioses de plantas e animais. É estimado que pelo menos 100.000 espécies fúngicas foram descritas e que, através de métodos de sequenciamento, suponha-se que existam 5.1 milhões de espécies (BLACKWELL, 2011; PERALTA et al., 2017). Dentre estes temos como seus principais representantes os Ascomycetos (com mais de 60.000 espécies descritas) e os Basidiomycetos (com mais de 30.000 espécies descritas) (PERALTA et al., 2017).

Com o intuito de utilizar materiais lignocelulósicos como substratos, estes organismos precisaram se adaptar e desenvolver diferentes mecanismos que permitiram o seu sucesso ecológico, dentre estes mecanismos podemos destacar suas especializações metabólicas e enzimáticas, os quais também dependem das condições ambientais as quais estes organismos

estão inseridos, como a umidade, temperatura e disponibilidade de nutrientes. Com base na degradação da lignina, acompanhada ou não com a degradação da celulose e hemicelulose, eles são então convencionalmente divididos em fungos da podridão branca (*White-rot fungi*) e da podridão marrom (*Brown-rot fungi*) (PERALTA et al., 2017). O termo “podridão branca” se refere à forma como a madeira é degradada por estes fungos, adquirindo uma consistência esponjosa e fibrosa, resultando em uma coloração esbranquiçada, enquanto os fungos da podridão marrom são capazes de degradar somente a celulose e hemicelulose da parede celular vegetal, carregando este nome pela coloração escura apresentada na madeira em seus estágios finais de degradação (GIMENES; ROBERTO, 2010; HERNÁNDEZ-ORTEGA; FERREIRA; MARTÍNEZ, 2012; MARTÍNEZ et al., 2005; PEREIRA, 2018)

Fungos pertencentes aos filos Basidiomicetos e Ascomicetos são os principais causadores da podridão branca da madeira, sendo que a maioria dos seus exemplares degradam tanto a lignina quanto a celulose, contudo algumas espécies possuem a capacidade de degradar seletivamente a lignina, restando somente a celulose, desta forma, estes organismos são capazes de degradar a complexa e recalcitrante estrutura da lignina (CARLILE; WATKINSON, 1996; PINTO, 2006). Portanto, fungos da podridão branca podem degradar a celulose, hemicelulose e lignina à água e CO₂, assim, podem ser denominados fungos lignocelulósicos. Dentre as características acima mencionadas, espécies como *Ceriporiopsis subvermispora*, *Phlebia* spp., e *Physisporinus rivulosus* são alguns dos espécimes que possuem a habilidade de degradar a lignina de forma seletiva, enquanto *T. versicolor*, *P. chrysosporium*, e *I. lacteus* conseguem afetar concomitantemente todos os componentes presentes na parede celular vegetal (MACIEL et al., 2012; PERALTA et al., 2017).

As famílias mais comumente estudadas classificadas como fungos da podridão branca são: Poliporaceae (eg, *Trametes versicolor* e *Pycnoporus sanguineus*), Phanerochaetaceae (eg, *Phanerochaete chrysosporium*), Ganodermataceae (e.g., *Ganoderma lucidum* e *Ganoderma applanatum*), Marasmiaceae (eg, *Lentinula edodes*), Pleurotaceae (*Pleurotus ostreatus* e *Pleurotus pulmonarius*), Hymenochaetaceae (eg, *Inonotus hispidus* e *Phellinus igniarius*), e Meruliaceae (eg, *Bjerkandera adusta*, *Irpex lacteus*, e *Phlebia radiata*) (PERALTA et al., 2017).

Pycnoporus sanguineus é um basidiomiceto caracterizado como um fungo da podridão branca, sendo também conhecido como *Polyporus sanguineus*, *Polystictus sanguineus*, *Trametes sanguinea* ou *Coriolus sanguineus* (GILBERTSON; RYVARDEN, 1987; NOBLES; FREW, 1962; PEREIRA, 2018), estes fungos possuem coloração vermelha podendo ser divididos em quatro espécies, *P. cinnabarinus* nativos da zona temperada norte, *P. coccineus*

que se distribui majoritariamente em países que fazem fronteira com o oceano Pacífico e Índico, *P. puniceus* encontrados na África e Índia e *Pycnoporus sanguineus*, que ocorre em regiões tropicais e subtropicais dos hemisférios norte e sul (RYVARDEN et al., 1980; UZAN et al., 2010).

Assim como o *Pycnoporus sanguineus*, espécies do gênero *Phlebia* sp. também são consideradas fungos da podridão branca, como a espécie *Phlebia radiata* (NIKU-PAAVOLA, 1988), este gênero inclui espécies com consistências que variam entre subgelatinosas e cartilaginosas (COOKE, 1956).

3.OBJETIVOS

O presente estudo teve como objetivo geral analisar a degradação de lignina utilizando espécies fúngicas descritas pela Dra. Solange Xavier dos Santos (SANTOS, 2003) e Dra. Josiane Pereira de Cássia (PEREIRA, 2018): *Pycnoporus sanguineus* e *Phlebia* sp., e realizar o estudo das lacases expressas, fazendo para isso o seu cultivo em diferentes tipos de fermentação.

Como objetivos específicos, temos:

- Realizar a fermentação submersa em estado líquido das duas espécies fúngicas (*Pycnoporus sanguineus* e *Phlebia* sp.) em licor obtido a partir do pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar a fim de obter extratos enzimáticos ricos em lacases para a avaliação da degradação da lignina presente no licor.
- Selecionar a espécie com maior atividade enzimática de lacase para prosseguir a sua purificação e caracterização dos seus parâmetros cinéticos e de termoestabilidade.
- Delinear um protocolo de purificação para lacases obtidas através da fermentação semi-sólida e a caracterização de parâmetros bioquímicos das lacases purificadas.
- Analisar a eficácia destas enzimas quanto à degradação de corantes, sendo eles Verde malaquita, Azul de Bromofenol, Brilliant Blue G e R-250 e Vermelho Congo.
- Avaliar a degradação da lignina presente no licor obtido através da hidrólise alcalina do bagaço de cana-de-açúcar.

4.METODOLOGIA

4.1. Isolamento dos microrganismos

O quadro 1 indica as espécies armazenadas pela Dra. Solange Xavier dos Santos (SANTOS, 2003) na coleção de fungos do Laboratório de Microbiologia e Bioquímica Aplicada do UNESP/IBILCE, que apresentaram produção da enzima Lacase. Dessa listagem, o isolado de *Phlebia* sp. foi utilizado para o presente projeto, enquanto o espécime de *Pycnoporus sanguineus* MCA 16 foi obtido a partir do isolado armazenado pela Dra. Josiani de Cássia Pereira (PEREIRA, 2018).

Quadro 1. Espécies isoladas pela Dra. Solange X. dos Santos, capazes de produzir Lacase.

Posição	Código	Espécie
1º	SXS 169	<i>Corioloopsis byrsina</i>
2º	SXS 385	<i>Schizophyllum commune</i>
3º	SXS 23	<i>Corioloopsis byrsina</i>
4º	SXS 306	<i>Pycnoporus sanguineus</i>
5º	SXS 159	<i>Psilocybe subcoprophila</i>
6º	SXS 358	<i>Perenniporia medulla-panis</i>
7º	SXS 139	<i>Phlebia</i> sp.
8º	SXS 112	<i>Corioloopsis byrsina</i>
9º	SXS 16	<i>Corioloopsis byrsina</i>
10º	SXS 21	<i>Corioloopsis byrsina</i>

Fonte: Adaptado de Santos, 2003.

O isolado de *Phlebia* sp., encontrava-se armazenado em óleo mineral à temperatura de 4°C, enquanto o isolado de *Pycnoporus sanguineus* MCA 16 estava preservado em criotubos, congelados a -80°C. Para a reativação do isolado de *Phlebia* sp., este foi incubado em meio líquido (0,5% de glicose; 0,5% peptona; 0,2% de extrato de levedura). Após seu crescimento, foi inoculado em meio de aveia (Av.D.A- 4g de farinha de aveia; 4g de Dextrose; 5g de ágar; 200ml de água destilada) e em meio PDA (Potato Dextrose Ágar) em placas de Petri, enquanto

a reativação do *Pycnopus sanguineus* foi realizada em meio ágar com malte (PEREIRA, 2018), sendo em todos os casos mantidos em crescimento pelo período de 7 dias em incubadora B.O.D. (Marconi MA 415). Todos os meios de cultura e os recipientes utilizados para cultivar os microrganismos foram previamente autoclavados a 121°C por 20 minutos.

Procedimentos de repique de manutenção foram realizados com o mesmo meio de crescimento, sendo todos os inóculos realizados mantidos a 28° C em incubadora B.O.D. até seu crescimento.

4.2. Pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar

4.2.1. Padronização do bagaço de cana-de-açúcar

O bagaço-de-cana foi lavado cinco vezes em água corrente com o intuito de remover os açúcares residuais derivados da moagem e posteriormente seco em temperatura ambiente por aproximadamente três dias ou até secagem total do material.

Após isso, o bagaço-de-cana passou por uma triagem em um conjunto de peneiras para padronização do tamanho das partículas, entre 1,41 e 2,83 mm (DOS SANTOS et al., 2021).

4.2.2. Hidrólise alcalina

O bagaço-de-cana devidamente padronizado e seco foi submetido a um processo de hidrólise alcalina para extração do licor, que possui majoritariamente lignina e hemicelulose. O processo consiste em adicionar bagaço-de-cana e uma solução de hidróxido de sódio 0,5 M em uma proporção de 1:10 (1 g de bagaço-de-cana para 10 mL de NaOH 0,5 M). A mistura foi então submetida a uma temperatura de 120°C e 1 atm por 1 hora em autoclave. Após esse período, a mistura foi filtrada a vácuo para obtenção do licor alcalino, o qual foi posteriormente ajustado o pH para valores próximos de 6,0 com ácido sulfúrico (H₂SO₄) 0,5 M, com o intuito de aproximar o pH ao valor ótimo das enzimas lignocelulósicas (IDRIS et al., 2019).

4.3. Cultivo e inóculo dos microrganismos

As espécies previamente selecionadas e isoladas foram incubadas em Placas de Petri contendo 5% de licor, 5% de uma solução mineral enriquecida com os nutrientes nitrogênio, potássio, fósforo e magnésio (Quadro 2) e 3% de ágar, sendo então posteriormente mantidos em estufa na temperatura de 30°C pelo período de 7 dias (WIEGNANT; LETTINGA, 1985 apud DANIEL, 2014), com o intuito de estimular a produção de um arcabouço enzimático eficiente para a degradação da lignina, sendo em seguida inoculados em meios de fermentação submersa em estado líquido.

Após esse período de 7 dias em meio sólido, 2 fragmentos de micélio de 1 cm de diâmetro cada foram inseridos em Erlenmeyers sob fermentação submersa em estado líquido em meio contendo 5% de licor e 1% de meio mineral. A fermentação ocorreu em triplicata durante 20 dias e foram coletadas alíquotas de 2 e 10 mL a cada 48 horas, além do controle abiótico feito com o meio de cultura sem o inóculo dos microrganismos. Com as alíquotas coletadas foram ainda aferidos os seus valores de pH com medidor Digimed DM-22 para se traçar um perfil desta variável ao longo da fermentação.

A porção sobrenadante foi então submetida à centrifugação para a avaliação da eficiência da degradação da lignina por Espectrofotometria de UV-VIS (ThermoScientific Evolution201) no comprimento de onda de 280 a 400nm. (ZHU et al., 2017).

Quadro 2. Compostos utilizados na preparação do meio de cultura.

Composto químico	Concentração
Macronutrientes (g.L⁻¹)	
CaCl ₂	0,058
KCl	0,025
NH ₄ Cl	0,017
MgCl ₂	0,011
NaH ₂ PO ₄	0,037
Micronutrientes (1 mg.L⁻¹)	
Na ₂ HPO ₄	4,0
NaH ₂ PO ₄	0,46
Ca(OH) ₂	0,1
Na ₂ S.9H ₂ O	0,05
Glicose (Fonte de carbono e energia)	1,8

Fonte: Adaptado de DANIEL, 2014.

4.4. Avaliação da degradação da lignina

Para a análise da degradação da lignina, 50 μ L do sobrenadante das alíquotas previamente centrifugadas foram diluídos em 950 μ L de água deionizada para serem analisadas por Espectrometria de ultravioleta-visível (UV-Vis) em varredura de 200 a 400 nm, observando o pico correspondente a 280 nm, comprimento de onda na qual a lignina possui maior absorbância (IDRIS et al., 2019; SEESURIYACHAN et al., 2015; ZHU et al., 2017).

Com isso, foi possível elaborar o perfil de degradação de lignina para cada espécie de microrganismo em função do tempo (de 0 até 20 dias).

4.5. Determinação de açúcares redutores no meio de fermentação

A concentração de açúcares redutores foi determinada utilizando o reagente 3.5-ácido dinitrossalicílico (DNS) e uma curva padrão correspondente de glicose. Neste método adaptado, 500 μ L de amostra foram adicionados a igual volume de DNS em tubos eppendorf e submetida ao aquecimento a 95°C por 10 min e posteriormente resfriada. Na sequência, foi medida a absorbância a 540 nm em espectro de UV-Vis (GUSAKOV; KONDRATYEVA; SINITSYN, 2011).

4.6. Fermentação semi-sólida

Para ambas as espécies foram realizadas fermentações semi-sólidas como descrito em Santos (2003), em frascos Erlenmeyer de 300 mL, sendo utilizado como principal substrato o farelo de trigo. Para isso, foram usados 5g de farelo de trigo, 10 mL de solução de sulfato de amônia 1% e 10 mL de solução de sulfato de magnésio a 0,01%, sendo ambas soluções empregadas para suplementar o meio de cultura, previamente autoclavados a 120°C por 20 minutos. Para a inoculação dos microrganismos foram utilizados 3 discos de cultura miceliada em BDA (*Pheblia* sp.) e em Extrato de Malte (*Pycnoporus sanguineus*), que foram inoculados no meio. As culturas foram realizadas em triplicatas e mantidas à 27°C pelo período de três semanas (Figura 5).

Após finalizado o período de fermentação, o material foi suspenso em 40 mL de água destilada e agitado em 180 rpm (Incubadora Shaker Marconi MA-420) por uma hora, sendo posteriormente filtrados manualmente com o auxílio de tecidos de nylon e centrifugados por 15 minutos à $17.917 \times g$ em centrífuga Jouan CR3. O sobrenadante foi então armazenado em eppendorf de 2 mL e congelados a -20°C para futuramente ser utilizado como solução enzimática bruta para os testes de atividade enzimática.

Figura 5. Aspecto das culturas após 21 dias de inóculo (à esquerda *Phlebia* sp.; à direita *P. sanguineus*).



Fonte: Autoria própria.

4.7. Purificação das lacases

Para a purificação do extrato bruto obtido a partir da fermentação semi-sólida, primeiramente foram centrifugados todos os tubos eppendorf anteriormente armazenados sob refrigeração, sendo este processo feito a $17.146 \times g$ rpm por 25 minutos. O precipitado resultante não foi utilizado (Figura 6), sendo estes resíduos do meio de cultura e conglomerados de células, somente a porção sobrenadante foi utilizada para os próximos passos de purificação.

O primeiro passo do processo de purificação se deu com a precipitação do extrato bruto em sulfato de amônio, sendo este método também conhecido como Salting-out (CURTIS et al., 2002; DUONG-LY; GABELLI, 2014) com saturação final de 75% 4°C , com a solução mantida sob agitação por 45 minutos após a sua total dissolução.

Após o Salting-out, a solução foi novamente centrifugada por 45 minutos a $17.146 \times g$, sendo o pellet formado (Figura 6) ressuspensão com tampão acetato 0,1M pH 4,0 + 0,15M de NaCl (1,4 mL), sendo este processo de ressuspensão realizado com quatro tubos eppendorf a fim de aumentar a concentração proteica, mantendo o valor final a ser aplicado no sistema de cromatografia de 1,4 mL. A solução foi mais uma vez centrifugada por 20 minutos a $15.900 \times g$ com a finalidade de remover partículas em suspensão, antes de aplicá-la no equipamento cromatográfico.

Figura 6. Formação do pellet com intensa pigmentação do sobrenadante. (à esquerda pellet formado logo após o armazenamento do extrato bruto extraído da fermentação; à direita pellet formado após processo de Salting-out, com seu sobrenadante mantendo coloração intensa).



Fonte: Autoria própria.

O próximo passo da purificação proteica se deu com a Cromatografia de Filtração em Gel, que consiste na exclusão das moléculas a partir de sua massa molecular através de diferentes resinas contidas em colunas de cromatografia, em sistema cromatográfico Bio-Rad BioLogic Duo Flow, sendo a resina utilizada Sephadex® G-75, previamente equilibrada com tampão acetato 0,1M pH 4,0 + 0,15 M de NaCl e montada em coluna de 1,6 x 70 cm dotada de adaptador de fluxo, tendo a resina um volume de 120 mL. A coleta das frações começou após 30 mL de eluente, com 1,5 mL por tubo.

Todas as frações coletadas foram submetidas a ensaios enzimáticos, sendo as frações com maior atividade unidas para o próximo passo da purificação e confeccionados gráficos para delinear um perfil cromatográfico para esta etapa da purificação.

A etapa final da purificação se deu a partir da Cromatografia de troca aniônica, sendo a troca iônica um processo de separação de moléculas polares em função da sua interação eletrostática com a resina utilizada. Para esse fim foi utilizada resina Q Sepharose® Hitrap 5mL, previamente equilibrada com tampão Tris 0,02 M pH 8,0 em sistema cromatográfico ÄKTA purifier 10 (GE Healthcare Life Sciences, EUA).

Antes de aplicar as frações previamente obtidas, a condutividade da amostra foi ajustada com água deionizada para ser menor daquela observada no segundo tampão utilizado para esta metodologia (Tris 0,02M pH 8,0 + 0,5M de NaCl), para que as proteínas diluídas na solução efetivamente se adsorvam à resina utilizada, sendo posteriormente eluídas a partir do aumento da concentração salina do segundo tampão.

Primeiramente, para a troca iônica foi delineado um gradiente linear partindo de 0% a 100% tampão final. Contudo, após análises eletroforéticas determinou-se que seria necessária uma alteração, pois as frações com atividade não eluíam no início saindo nesses volumes contaminantes, o que permitiu um aumento inicial de 30% até atingir a concentração final de 80% do tampão final com maior quantidade de sal, resultando em uma melhor separação das proteínas desejadas.

4.8. Ensaios enzimáticos

A atividade enzimática foi quantificada através da oxidação do substrato ABTS (2,2-azino-bis-etilbentiazolina) na concentração de 0,03% m/v, como descrito em Santos (2003), e foi medida a partir da leitura de absorbância feita no comprimento de onda de 420 nm em cubeta de vidro em Espectrofotômetro de Ultravioleta-Visível (BUSWELL; CAI; CHANG, 1995; MENEZES et al., 2010), sendo definida que uma unidade de atividade enzimática corresponde à quantidade de enzima necessária para oxidar 1 micromol de substrato por minuto, usando o coeficiente de extinção molar (ϵ) do ABTS de $3.6 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (BOURBONNAIS; PAICE, 1988).

Para a leitura das reações foram necessárias diluições devido ao volume mínimo de leitura do espectrofotômetro utilizado, sendo pipetados 200 μL do ensaio enzimático em 800 μL de água deionizada, em caso de leitura com valores maiores que 1, a solução foi novamente

diluída em mesma proporção, sendo as diluições contabilizadas na absorção obtida ao final das diluições.

Além de reações com o substrato ABTS, também foi utilizado o Guaiacol 2 mM como substrato para reações enzimáticas em mesmas proporções, visto que a oxidação do Guaiacol também foi descrita para lacases (ABD EL MONSSEF et al., 2016), resultando em uma cor marrom/avermelhada após a sua oxidação, que foi medida através da leitura de sua absorbância em comprimento de onda de 450 nm em Espectrofotômetro de Ultravioleta-Visível, sendo adotado o valor de 0,6740 $\mu\text{M}/\text{cm}$ como o coeficiente de extinção molar (ϵ) deste substrato (ABD EL MONSSEF et al., 2016).

A atividade enzimática foi expressa em unidade de atividade enzimática (U) a partir do cálculo apresentado na equação 1 (EISENTHAL; DANSON, 2002).

Equação 1:

$$\left[\frac{\frac{dA}{dT}}{\epsilon} \right] * Vf * \left(\frac{Vt}{Vs} \right) * 1000$$

Onde:

dA: Absorbância da amostra

dT: Tempo de incubação

ϵ : Coeficiente de extinção molar

V_f : Volume final do ensaio

V_s : Volume da alíquota usada no ensaio

4.9. Ensaios enzimáticos em tubos de ensaio

Nesta metodologia descrita em Santos (2003), 100 μL de extrato enzimático são adicionados a 900 μL de tampão acetato 0,1M de pH 4,0 para as análises com extrato obtido de *P. sanguineus* e tampão ácido maleico 0,1 M pH 1,5 para as análises com extrato proveniente de *Phlebia sp.* e 100 μL de solução de ABTS (0,03% m/v) 0,55 mM aquecendo-se a 33°C a 10 minutos, em triplicata.

4.10. Ensaio enzimáticos em microplacas

Para os ensaios posteriores à fermentação as reações enzimáticas foram conduzidas em microplacas de 96 poços em termociclador Gene-Explorer (Bio-Gener Technology), sendo utilizados 110 μL de tampão, 85 μL de substrato e 10 μL de enzima.

Ao final da reação foram adicionados 5 μL de ácido tricloroacético (TCA) 50% para interromper a reação (SUWANNAWONG, 2010). Controles foram feitos como acima, com a enzima substituída por 10 μL de água deionizada.

4.11. Determinação do pH ótimo

Para a determinação do pH ótimo das enzimas estudadas, foram utilizadas as seguintes soluções tampão para certificar uma capacidade tamponante adequada: ácido maleico 0,1M (pH 1,5, 2 e 2,5), ácido cítrico 0,1M (pH 3 e 4), acetato 0,1M (pH 4, 5, e 5,5) e MES 0,1M (pH 6), sendo os produtos das reações quantificados como já descrito nos itens anteriores. Os controles foram feitos com solução tampão, ABTS (2,2-azino-bis-etilbentiazolina) e água deionizada. Para maior conhecimento do perfil das enzimas estudadas, também foram realizadas reações com o substrato Guaiacol, que seguiram nas mesmas proporções antes descritas com o diferencial de serem mantidas por 30 minutos em reação (HU, et al., 2014).

. 4.12. Determinação da temperatura ótima

A determinação quanto à temperatura ótima da enzima se deu através de reações enzimáticas com 190 μL de substrato ABTS diluído em tampão com pH ótimo previamente estabelecido, 10 μL de enzima e 5 μL de TCA, conforme a variação da temperatura em intervalos de 10°C entre 20 e 90°C.

4.13. Parâmetros cinéticos

A velocidade inicial da reação (V_0) foi calculada em $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ para cada concentração, analisando em primeiro lugar a linearidade da liberação do produto em função

do tempo, para determinação do tempo de incubação. A constante de Michaelis (K_m) e a velocidade máxima da reação (V_{max}) foram calculadas no programa Origin versão 2018 para Windows, através do ajuste não linear de parâmetros, usando como referência a equação de Michaelis-Menten (MICHAELIS; MENTEN, 1913).

Para a definição dos parâmetros cinéticos foram utilizadas diferentes concentrações de substrato ABTS, sendo elas: 0,01; 0,03; 0,05; 0,1; 0,4; 1; 2,5; 5; 7,5; 10 mmol, sendo utilizadas as mesmas concentrações para o Guaiacol, com a adição das concentrações 20, 50 e 100 mmol. Para o guaiacol a reação foi mantida por 30 minutos (HU, et al., 2014) na temperatura ótima previamente descrita. Reações para definir o tempo de incubação de enzima ao substrato foram feitos para determinar o tempo da reação para ABTS, sendo então definido que 5 minutos para este ensaio enzimático.

4.14. Estabilidade térmica

Para a análise do efeito da temperatura na desnaturação térmica da enzima, esta foi incubada em diferentes temperaturas, sendo elas: 30, 40, 50, 60 e 70°C, por diferentes tempos de incubação (10, 30, 60, 90 120 e 150 minutos), seguida por banho de gelo para a restauração de dobramentos reversíveis em suas estruturas terciárias e secundárias (SAQIB et al., 2010; SAQIB et al., 2012; SIDDIQUI, 1997). Posteriormente, a atividade enzimática foi determinada através do ensaio enzimático com ABTS em sua temperatura ótima previamente descrita por 10 minutos e comparada com uma amostra não exposta à incubação térmica, sendo feito o cálculo de sua atividade residual (Equação 2). Com os valores obtidos pelos procedimentos descritos foi construído um gráfico da atividade residual no eixo y e o tempo de incubação no eixo x.

Equação 2:

$$\left(\frac{atv\ final}{atv\ inicial} \right) \cdot 100 = atv\ relativa\ (\%)$$

4.15. Análises eletroforéticas

4.15.1. SDS-PAGE

Para a análise do perfil das proteínas foram realizados diversos géis de eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) (RHODES; BOSSIO; LAUE, 2009; SEE; JACKOWSKI, 1990), sendo o gel de empilhamento confeccionado na concentração de 5% e o gel de separação na concentração de 10%. Para a preparação da amostra foi utilizado tampão de amostra contendo azul de bromofenol 0,1%, glicerol 20% e SDS 10%, em proporção de 1:1 (v/v) de solução enzimática e tampão de amostra, sendo o gel posteriormente corado com Coomassie Blue R-250.

A corrida foi realizada com fonte de corrente elétrica Bio-Rad (PowerPac™Universal) iniciando à 90V e após o deslocamento das proteínas do gel de empilhamento, a corrente elétrica foi alterada para 110V. Para melhor comparação, foram utilizados marcadores de massa molecular 6,500- 200,000 Da (SigmaMarker™).

4.15.2. Zimograma

Para corroborar a presença de isoformas após o processo de purificação, foram feitos zimogramas. Para isto, foram realizadas eletroforeses em condições nativas, com a concentração do gel de empilhamento de 4% e gel de corrida a 7% (Tabela 1), sendo a corrida realizada sob refrigeração a 4°C, com a posterior lavagem do gel em tampão ácido cítrico 0,1M em pH 4,0 e submersão do gel em substrato ABTS 1mmol a 40°C na ausência de luz até as bandas se tornarem visíveis, sendo esta metodologia adaptada de Castillejos Márquez e colaboradores (2015).

Tabela 1. Composição do gel nativo.

	Gel de corrida (7%)	Gel de empilhamento (4%)
Acrilamida 30% - Bis acrilamida 0,8 %	1,25 ml	0,446 ml
Tampão Tris-HCl 1,5M pH 8,8	1,25 ml	-
Tampão Tris-HCl 0,5M pH 6,8	-	0,833 ml
Água destilada	2,1 ml	2,033 ml
Persulfato de amônio 10%	0,033 ml	0,0166 ml
TEMED	0,005 ml	0,033 ml

Fonte: CASTILLEJOS MÁRQUEZ, et al. (2015)

Além da coloração com ABTS, foi utilizado também Guaiacol 40 mmol pH 5,5 para uma melhor visualização das bandas.

4.16. Quantificação de proteínas totais

Para a quantificação de proteínas presentes na solução purificada para a confecção da tabela de purificação e posteriores cálculos, foi utilizado o método de Bradford (BRADFORD, 1976). Com este propósito, foi utilizada como padrão para a confecção da curva de calibração a Albumina sérica bovina em diferentes concentrações (0; 0,25; 0,5; 1; 1,4; 2 e 10 mg/L), sendo o ensaio realizado como descrito em He (2011).

4.17. Espectrofotometria das lacases

O espectro de Absorbância das lacases foram medidos entre 200-800 nm com Espectrofotômetro de UV-Vis (ThermoScientific) para analisar sua estrutura quanto à presença de átomos de cobre (CEN, et al., 2022; RAMÍREZ-CAVAZOS, 2014), sendo diluídos 200 µL da solução enzimática em 800 µL de tampão ácido cítrico 0,1M pH 4,0.

4.18. Análise da degradação de corantes sintéticos

Para a análise da degradação de corantes sintéticos pelas lacases foram adaptadas a metodologias descritas em Zimbardi e colaboradores (2016) e Forootanfar e colaboradores (2012).

Soluções estoque dos corantes Verde Malaquita, Vermelho Congo, Azul de Bromofenol, Brilliant Blue G e R-250 foram preparadas com concentração final de 100 mg/L. Para a análise da degradação pelas isoformas purificadas foram utilizadas microplacas de 96 poços, com 10 µL de enzima, 110 µL de cada corante correspondente e 80 µL de tampão ácido cítrico 0,1 M pH 3,0 e 4,0 e tampão ácido acético 0,1 M pH 5,5, sendo posteriormente incubadas por 24 horas e 48 horas em temperatura ambiente (29-34°C). A fim de evitar a evaporação desta solução, os ensaios foram realizados dentro de caixas vedadas e forradas, contendo no interior algodão umedecido, colocando as caixas em agitador a 120 rpm.

Ao final do tempo de incubação, 200 µL da reação foram diluídos em 800 µL de água deionizada, para completar o volume mínimo de leitura em espectrofotômetro UV-Vis, sendo realizado a leitura em varredura de 200-800nm.

Para o extrato bruto de *P. sanguineus* e *Phlebia* sp. as reações foram feitas em tubos de ensaio com volume final de 1 mL, com as proporções de 100 µL de extrato bruto, 300 µL de tampão ácido cítrico 0,1M pH 4 e 600 µL dos corantes correspondentes, inoculados por 24 horas, seguindo os mesmos métodos de leitura acima citados.

Com os resultados obtidos foram confeccionados gráficos que demonstram a degradação dos corantes. Cálculos para determinar a porcentagem da degradação de cada corante se deram a partir da Equação 3, usando como o pico de absorbância máxima para cada corante de 585 e 592 nm para Brilliant Blue G e R-250, respectivamente (LIU et al., 2004; SHARMA et al., 2015), 618 nm para Verde Malaquita (ZHUO, et al., 2011), 514 nm para Vermelho congo (FOROOTANFAR, et al., 2012) e 592 nm para Azul de Bromofenol FOROOTANFAR, et al., 2012).

Equação 3:

$$Descoloração (\%) = \left[\frac{A_i - A_t}{A_i} \right] * 100$$

Onde:

A_i: Absorbância Inicial do corante (controle sem enzima) no pico

A_t: Absorbância do corante nos diferentes intervalos de tempo no pico

4.19. Degradação do licor

Para analisar a possível degradação do licor obtido através da hidrólise alcalina como descrito no capítulo anterior e ajustado para pH 7, foram adicionados 10 µL da enzima, em 50 µL de licor e 950 µL de soluções tampão pH 4, 5,5 e 7 e posteriormente incubados a 40°C em banho maria por 30 minutos, 1 hora e 24 horas. Sendo então realizada a varredura em Espectrofotômetro de UV-Vis entre 200-400 nm para análise da degradação.

Os ensaios envolvendo a degradação do licor se deram com os extratos brutos obtidos através da fermentação semi-sólida de ambas as espécies (*P. sanguineus* e *Phlebia* sp.), além da solução contendo ambas as isoformas diluídas.

4.20. Análise dos dados coletados

Os dados gerados são coletados a partir dos softwares dos respectivos equipamentos utilizados. O tratamento estatístico dos dados é feito a partir da elaboração de planilhas e gráficos nos softwares Origin2018 e Microsoft Excel.

Todos os experimentos são realizados em triplicatas, com seus resultados dispostos em planilhas. Os valores obtidos são apresentados contendo sua média aritmética e desvio padrão dos valores das triplicatas, para assegurar uma maior precisão nos resultados obtidos.

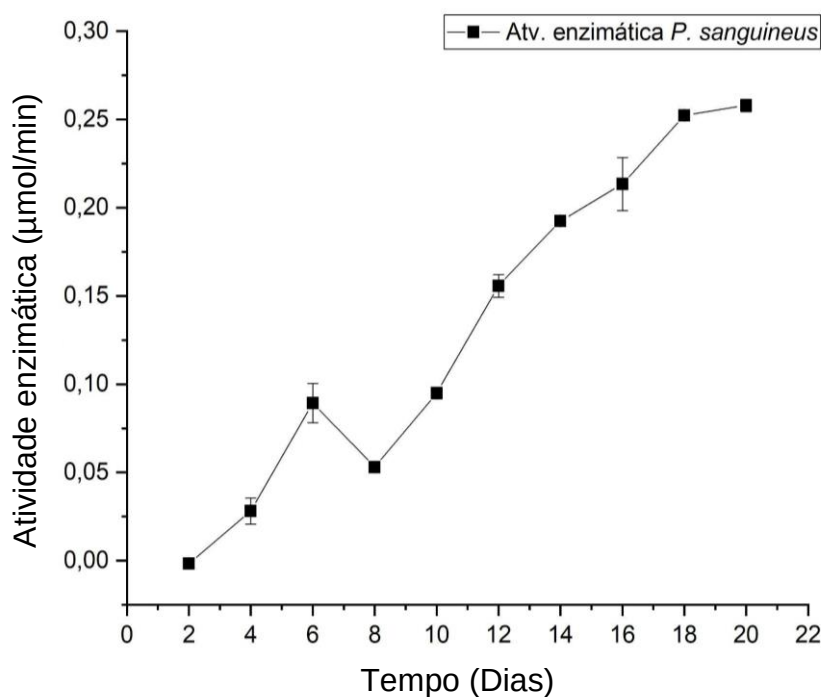
5.RESULTADOS E DISCUSSÕES

- Fermentação submersa em estado líquido em licor

5.1. Perfil enzimático da fermentação submersa em estado líquido

A partir dos resultados alcançados (Figura 7) é possível observar que *P. sanguineus* apresenta sua maior taxa de atividade catalítica no 20º dia de incubação. Este resultado pode ser associado aos dados obtidos em Arora e Rampal (2002), onde *Trametes versicolor*, grupo que apresenta grau de parentesco ao *P. sanguineus*, exibe sua mais alta taxa de atividade específica (unidades/mg de proteína) no 18º dia de inóculo.

Figura 7.Atividade enzimática de *P. sanguineus* ao longo dos 20 dias de fermentação.

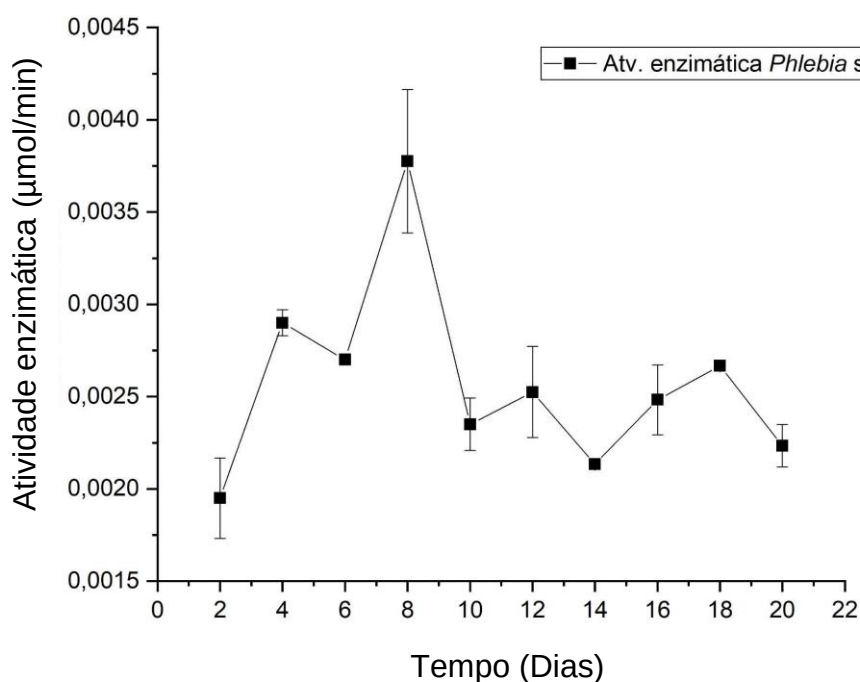


Fonte: Autoria própria.

Arora e Rampal (2002) descrevem para *P. fascicularia*, *P. floridensis* e *P. radiata*, sua maior atividade específica no 6º dia, 9º dia e novamente 9º dia de incubação, o que condiz com

os resultados observados na Figura 8, onde temos o maior pico de atividade enzimática no oitavo dia de cultivo do *Phlebia* sp, embora bem inferior ao obtido para *P. sanguineus*.

Figura 8. Atividade enzimática de *Phlebia* sp. ao longo dos 20 dias de fermentação.



Fonte: Autoria própria.

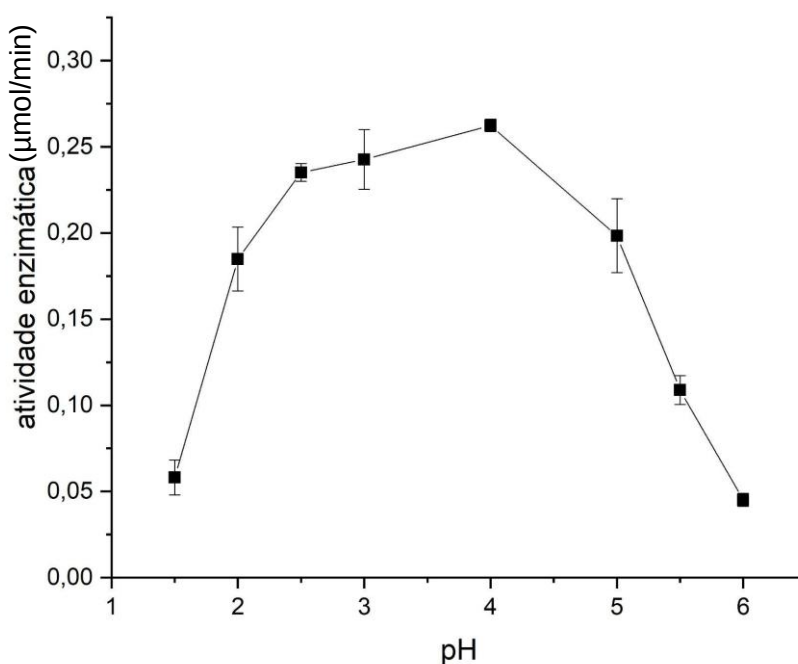
5.2. pH ótimo das Lacases produzidas em fermentação submersa em estado líquido

A faixa de pH na qual se tem a maior atividade enzimática do extrato estudado é conhecida como pH ótimo. Desta forma, é possível otimizar a reação catalítica enzimática a partir da determinação das suas condições ótimas de funcionamento. O pH ótimo de lacases costuma ser ácido (BOLLAG; LEONOWICZ, 1984, POINTING et al., 2000), assim como

descrito em Pointing e colaboradores (2000) com uma lacase de *P. sanguineus* apresentando pH ótimo de 3 para o fungo cultivado em fermentação líquida submersa.

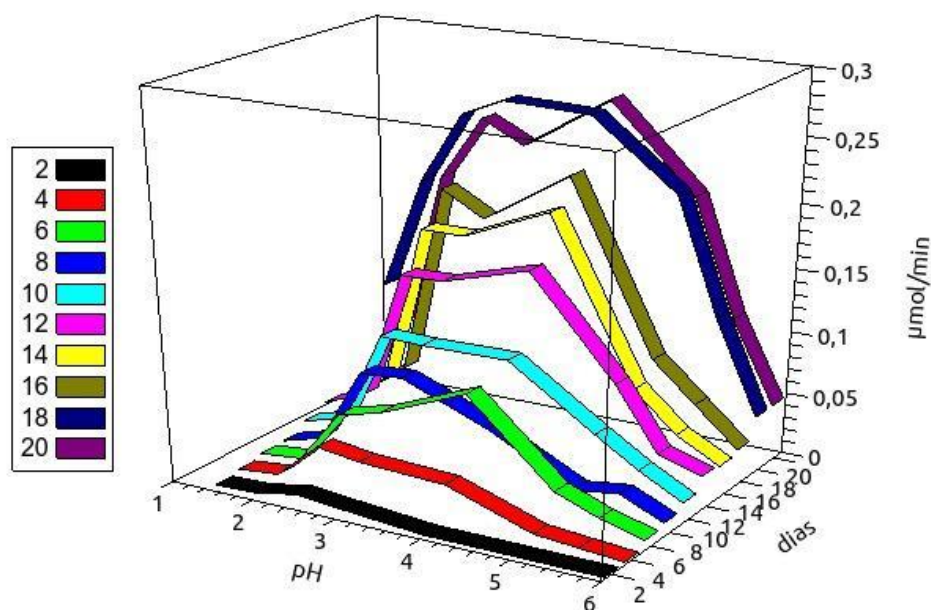
Como podemos observar na Figura 9, o valor observado de pH ótimo para esta enzima está de acordo com aquele observado em Pereira (2018), onde o maior valor de atividade catalítica obtido pela lacase de *P. sanguineus* MCA 16 foi em pH 4,5, assim como Garcia e colaboradores (2007) descreveram o pH ótimo de 4,2 e 4,8 para isoformas de lacases produzidas por esta espécie induzidas com 2,5-xilidina. Como podemos observar na Figura 10, a lacase de *P. sanguineus* também apresentou grande atividade catalítica na faixa de pH 3-5, corroborando os resultados obtidos com estudos citados, sendo possível constatar novamente o aumento gradual da atividade catalítica em relação ao tempo de inóculo, demonstrando que, caso fosse continuada a fermentação, sua produção enzimática iria aumentar até atingir um platô, correspondente ao esgotamento da fonte de carbono do meio.

Figura 9. pH ótimo da lacase produzida por *P. sanguineus*.



Fonte: Autoria própria.

Figura 10.Atividade enzimática em função aos dias e valores de pH.

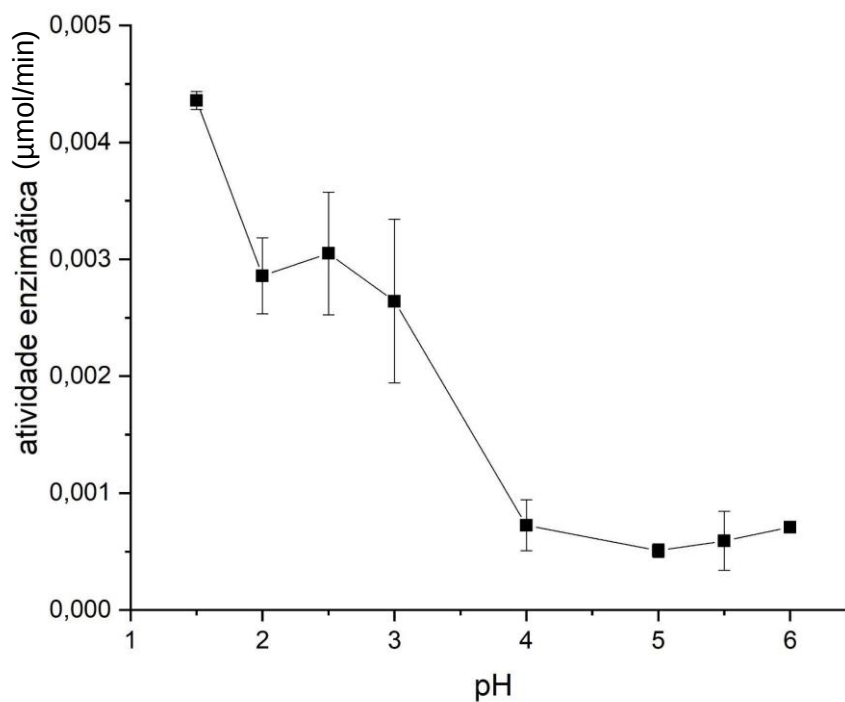


Fonte: Autoria própria.

Na Figura 11, podemos observar que o pH ótimo obtido para *Phlebia* sp. foi 1,5, resultado este que difere daquele encontrado em Arora e Rampal, 2002, onde diferentes espécies do gênero apresentaram um pH ótimo entre 4-4,5. Uma hipótese para o decréscimo de atividade catalítica em pH alcalinos é a inibição causada pela ligação do íon hidróxido com o cobre da lacase (JOLIVALT et al., 1999), sendo também possível relacionar a queda da sua atividade à influência dos íons do tampão com a ação enzimática (ARORA; RAMPAL, 2002).

Estudos apontam que a atividade enzimática em faixas de pH ácidos podem ser dependentes do hábitat onde estes fungos produtores de ligninases estão se desenvolvendo, sendo estes capazes de crescer em madeira ou ambientes inóspitos, assim, aqueles que crescem em ambientes ácidos podem entrar em contato com fenóis ácidos de plantas, com isso, o pH ótimo da lacase sendo mais baixo permite uma oxidação mais eficiente destes compostos tóxicos, desempenhando assim o importante papel de agente desintoxicante (LENOWICZ et al., 1978).

Figura 11. pH ótimo da lacase produzida por *Phlebia* sp.



Fonte: Autoria própria.

Durante o processo da fermentação submersa líquida, foram aferidos os valores de pH ao longo dos 20 dias de fermentação. Com essa mensuração, podemos perceber que o pH do meio de cultura se torna mais básico com o decorrer dos dias (Tabela 2), sendo possível presumir que esta diferença ocorre devido à liberação de radicais livres altamente reativos que faziam parte da estrutura da lignina e que por conta da sua degradação são liberados no meio causando a alcalinização do mesmo. Esta característica pode interferir na atividade catalítica das lacases produzidas em ambas as espécies, visto que estas enzimas apresentam uma faixa mais ácida de atuação.

Tabela 2.Medidas do pH do meio de cultura ao longo da fermentação.

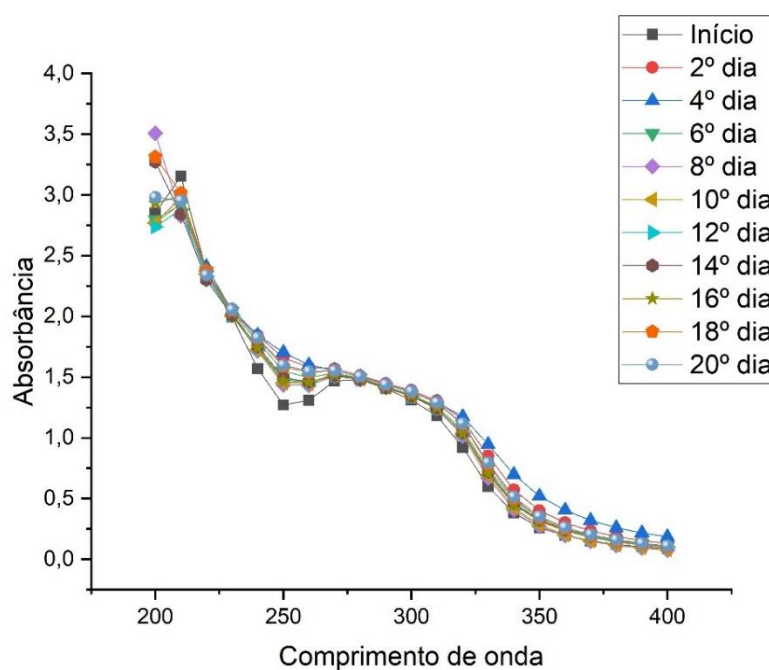
	Controle abiótico	<i>P. sanguineus</i>	<i>Phlebia</i> sp.
Início da fermentação	6,74	6,66	6,64
2º dia	6,75	7,06	7,29
4º dia	6,74	7,28	7,68
6º dia	6,75	7,77	8,01
8º dia	6,65	7,85	7,81
10º dia	6,77	8,0	8,30
12º dia	6,78	8,09	8,32
14º dia	6,77	8,15	8,30
16º dia	6,77	8,22	8,39
18º dia	6,63	8,23	8,51
20º dia	6,73	8,17	8,63

Fonte: Autoria própria.

5.3. Avaliação da degradação da lignina

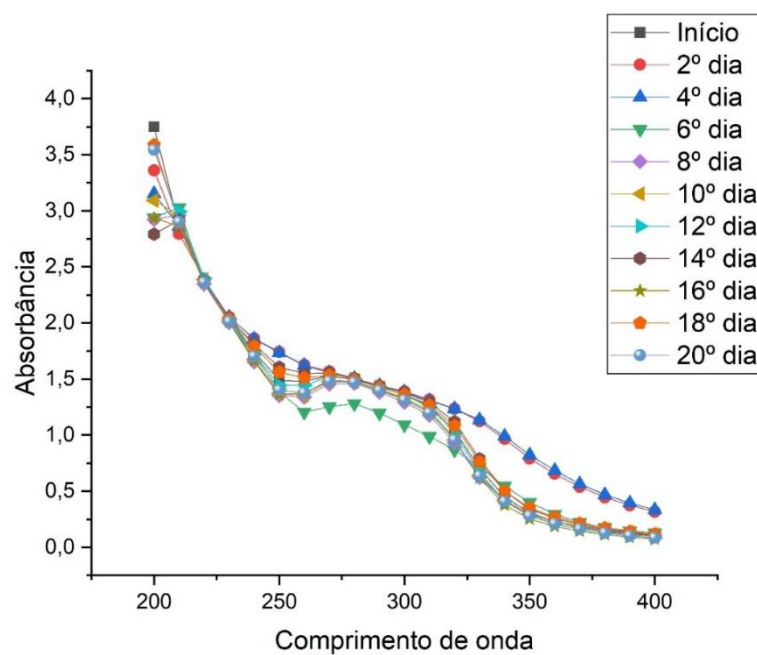
As análises de Espectros de varredura UV-Vis das alíquotas coletadas das fermentações líquidas contendo licor e meio mineral são representadas nas figuras abaixo.

Figura 12. Espectros de absorção na faixa de 200 – 400 nm do Controle abiótico.



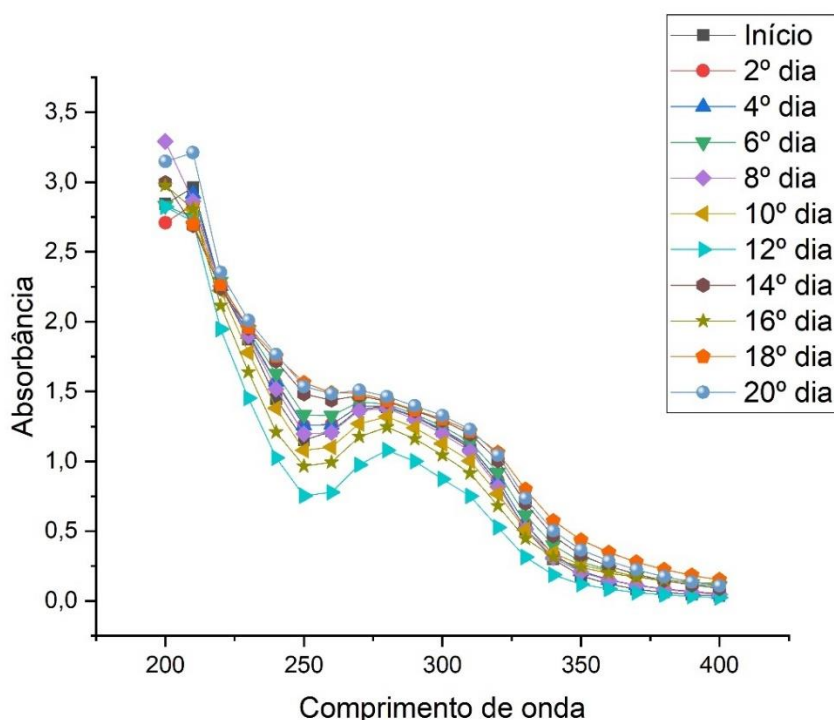
Fonte: Autoria própria.

Figura 13. Espectros de absorção na faixa de 200 – 400 nm de *P. sanguineus*.



Fonte: Autoria própria.

Figura 14. Espectros de absorção na faixa de 200 – 400 nm de *Phlebia* sp.



Fonte: Autoria própria.

A partir destas análises é possível observar que a absorbância correspondente à banda próxima de 280 nm tende a diminuir levemente no decorrer do processo fermentativo enriquecido com meio mineral, o que sugere degradação dos compostos fenólicos derivados da lignina no licor. O controle abiótico teve pouca alteração da banda próxima de 280 nm (Figura 12).

Em *P. sanguineus* (Figura 13) conseguimos constatar uma maior queda do pico de absorbância principalmente no 6º de incubação, enquanto em *Phlebia* sp. (Figura 14) obtivemos uma maior degradação da lignina no 12º dia de inóculo.

A baixa queda da absorbância nos tratamentos com os microrganismos pode ser explicada por algumas hipóteses. A partir do momento que a enzima age na estrutura da lignina, realizando a sua degradação, suas ligações conjugadas são expostas, o que pode acarretar o

aumento da absorbância, visto que o feixe de luz emitido pelo espectrofotômetro pode penetrar nestas ligações. Além disso, os aminoácidos presentes na composição da enzima podem interferir na leitura, visto que aminoácidos como a tirosina e o triptofano absorvem a luz nesta mesma faixa de 280-300 nm, podendo ser um indício de que as proteínas secretadas por estes fungos apresentam estes aminoácidos aromáticos. Análises por HPLC podem ser realizadas para averiguar de forma mais precisa a degradação deste substrato.

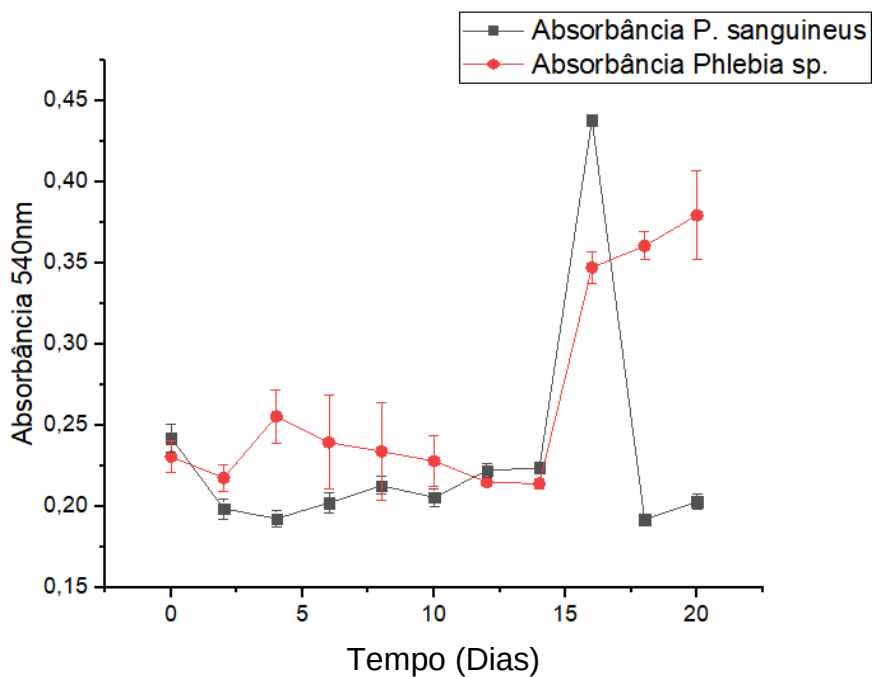
Devido à grande oscilação dos valores de absorbância obtidos a 280 nm, não foi possível implementar a fórmula proposta para determinar o percentual de lignina degradada, sendo necessários estudos mais aprofundados para melhor compreender as particularidades dos microrganismos estudados.

5.4. Determinação dos açúcares redutores do meio

O meio mineral utilizado para enriquecimento da cultura contém 1,8 mg. L de glicose como fonte de carbono, deste modo, os microrganismos estudados podem utilizar desta fonte de energia além dos açúcares presentes na hemicelulose do licor, visto que aproximadamente 70% da massa seca do bagaço-de cana é composto por açúcares como a xilana, ramnose e ácido galacturônico (MÄKI-ARVELA et al., 2011; WIERZBICKI et al., 2019). Desta forma, os microrganismos podem consumir os açúcares derivados da hemicelulose como uma fonte primária de energia, para se dar início ao seu crescimento e produção do seu arcabouço enzimático para a posterior degradação da lignina.

Os açúcares redutores foram medidos pela reação com o ácido 3,5-dinitrossalicílico, cujo produto tem um pico de absorbância em 540 nm. A figura 15 mostra o perfil para as duas espécies.

Figura 15. Absorbância a 540 nm ao longo dos dias para as duas espécies fúngicas.



Fonte: Autoria própria.

O pico apresentado na absorbância de *P. sanguineus* no 16º dia indica que neste ponto uma maior quantidade de açúcares redutores foi liberada no meio de cultura, sendo estes açúcares produto da degradação do substrato no qual ele está inserido, assim como demonstrado em *Phlebia sp.*, que também apresentou picos nos últimos dias da fermentação, mas em menor quantidade quando comparado ao *P. sanguineus*, visto que a lacase produzida por *Phlebia sp.* apresentou uma menor atividade catalítica.

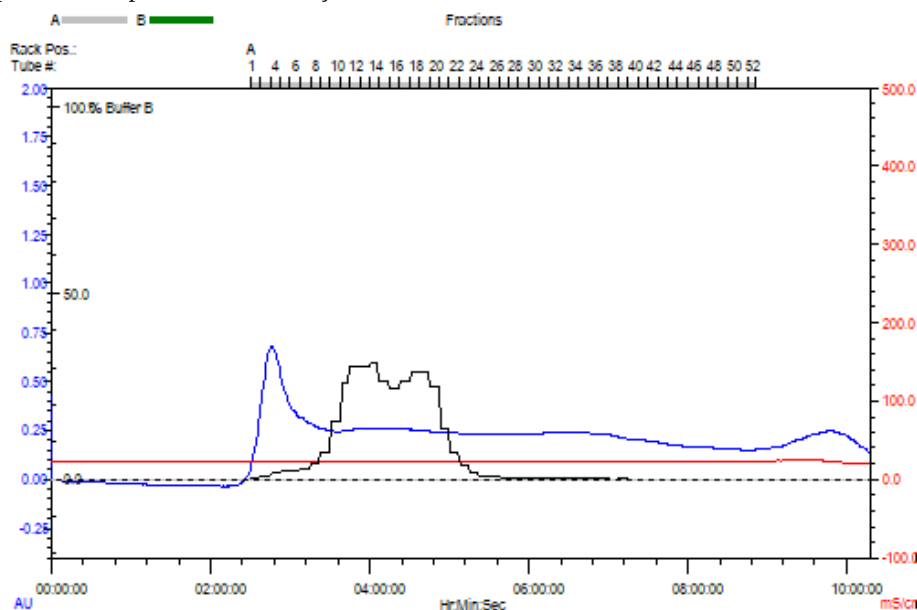
- **Purificação e caracterização enzimática de isoformas obtidas por fermentação semi-sólida de *Pycnoporus sanguineus* e sua aplicação na degradação de corantes.**

5.5. Purificação

Para delinear e definir um protocolo eficiente para a purificação das lacases provenientes do fungo lignocelulósico *Pycnoporus sanguineus*, foram necessárias diversas tentativas para alcançar este objetivo. Devido à baixa atividade enzimática obtida do extrato bruto proveniente da fermentação semi-sólida de *Phlebia* sp., decidimos não proceder à purificação da lacase.

Com isso, foi possível definir um perfil cromatográfico que se repetiu ao longo de todas as vezes que foram realizadas as cromatografias de filtração em gel (Figura 16).

Figura 16. Perfil cromatográfico da filtração em gel. A linha azul representa o perfil de proteínas medido em 280 nm, a linha vermelha a condutividade, e a preta a atividade de lacase. No eixo x superior são representadas as frações coletadas.

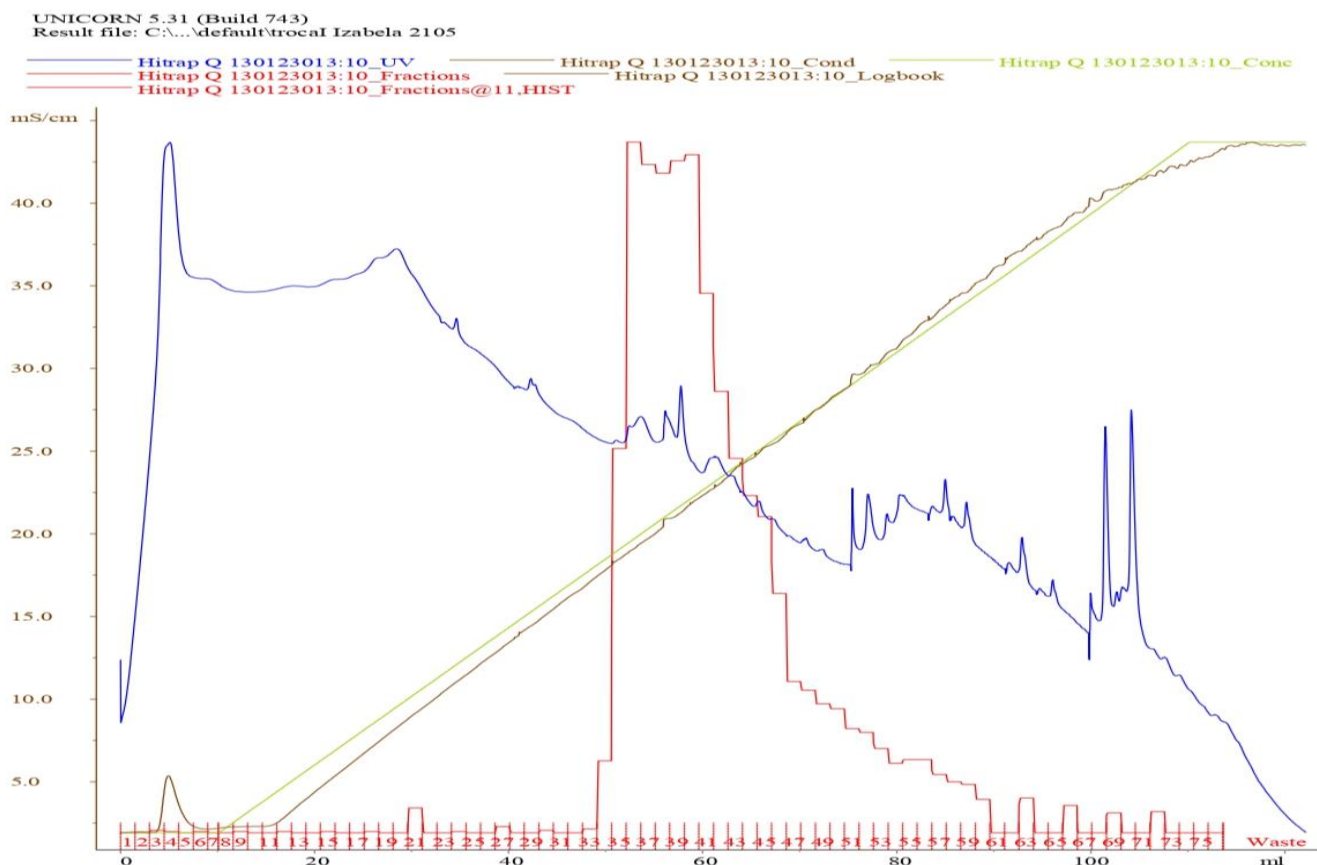


Fonte: Autoria própria.

Este perfil cromatográfico nos indicou dois picos acentuados de atividade enzimática, sugerindo que o extrato bruto possui duas isoformas funcionais da enzima lacase. Com isso em mente se sucederam os esforços para separá-las da forma mais eficaz.

Após definidas as condições para a filtração em gel, prosseguimos para o próximo passo da purificação, que se deu através da cromatografia de troca iônica. Esta cromatografia foi primeiramente realizada com o tampão inicial sem cloreto de sódio (tampão inicial), aumentando até a sua concentração máxima (100%), o que gerou um perfil cromatográfico (Figura 17) que ainda apresentava dois picos muito próximos de atividade enzimática, nos indicando que ainda estavam presentes na solução eluída as duas formas ativas de lacases sem uma separação adequada.

Figura 17. Primeiro perfil cromatográfico obtido pela cromatografia de Troca iônica. A linha azul representa o perfil de proteínas medido em 280 nm, a linha vermelha a atividade de lacase, a verde o gradiente entre os tampões inicial e final e a marrom a condutividade. No eixo x são representadas as frações coletadas.

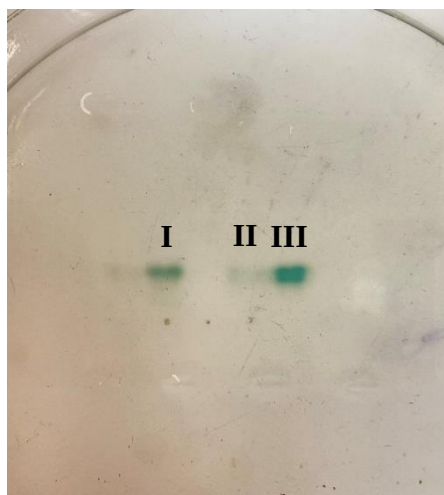


Fonte: Autoria própria.

Foram então observadas duas bandas no zimograma corado com ABTS (Figura 18), corroborando a hipótese de que a cromatografia realizada não havia sido capaz de separar as

duas isoformas presentes no extrato bruto proveniente da fermentação em farelo de trigo. Mesmo havendo a mistura das duas isoformas nesta eluição, a fração coletada foi ainda caracterizada quanto seus parâmetros bioquímicos, a fim de conhecer melhor o comportamento da isoforma predominante na mistura. Apesar de muito difícil observação, a banda II (Figura 18) apresentou mesma espessura da I, que, quando comparada com um extrato sem isoformas, nos indica a presença de duas lacases ativas na solução, se alinhando com o perfil cromatográfico obtido após a cromatografia de troca iônica (Figura 17).

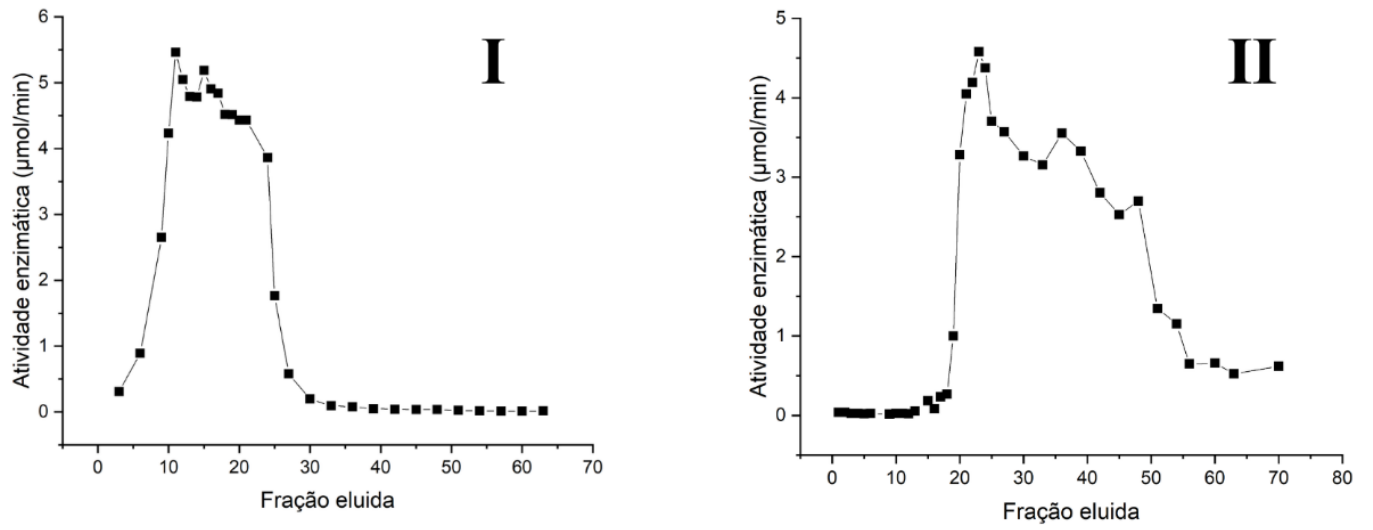
Figura 18. Zimograma corado com ABTS. I) Extrato Bruto com apenas uma banda; II) Fração coletada da cromatografia de troca iônica; III) Extrato bruto de *P. sanguineus* com duas bandas aparentes.



Fonte: Autoria própria.

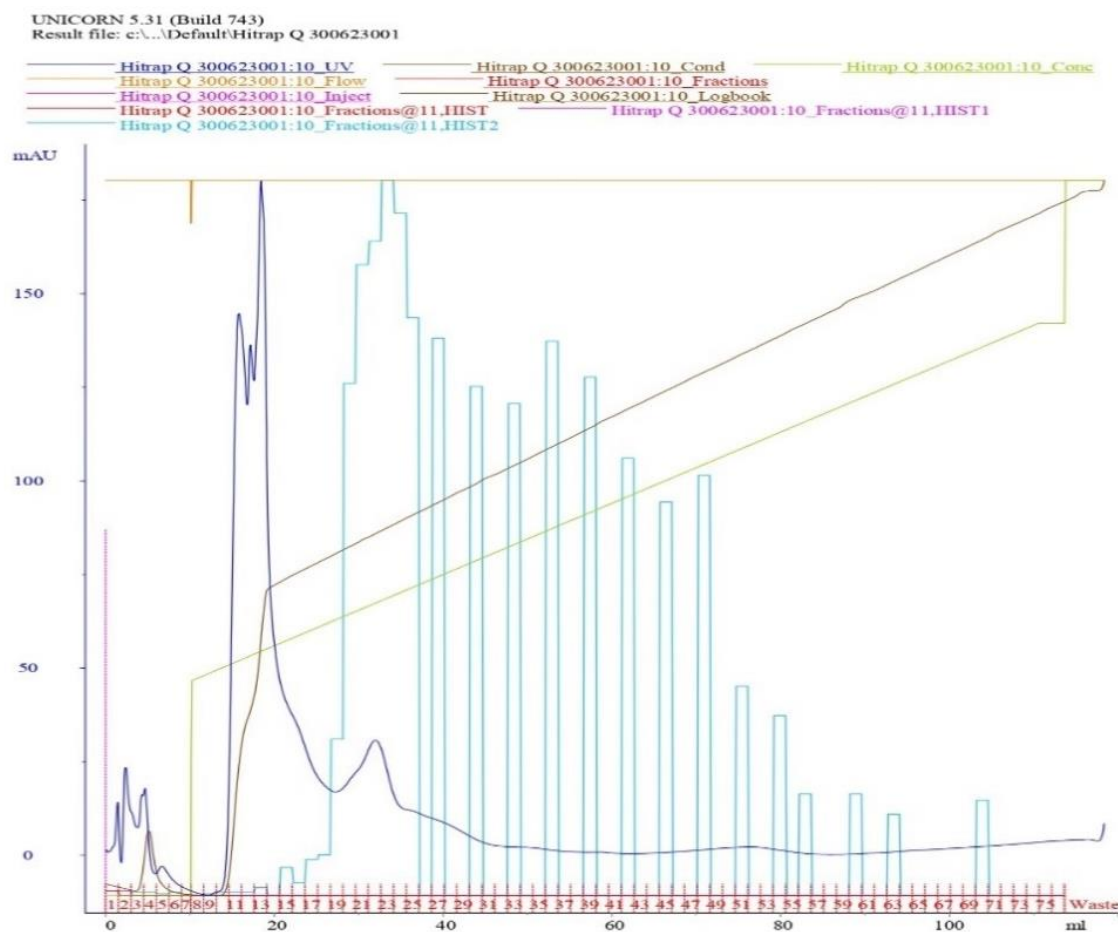
Após o zimograma, novas cromatografias foram realizadas, resultando em perfis cromatográficos condizentes com a separação das lacases presentes no extrato bruto (Figura 19). Para este fim, foram necessárias alterações na metodologia da cromatografia de troca iônica, com a concentração do tampão rico em sais iniciando-se em 30% e terminando em 80% (Figura 20), de modo a segregar de forma mais espaçada as isoformas já observadas, sendo possível então separar as frações eluídas em suas respectivas isoformas.

Figura 19. Perfil de atividade de lacase I) Filtração em gel; II) Troca iônica.



Fonte: Autoria própria.

Figura 20. Perfil cromatográfico Troca Iônica com concentração inicial de 30%. A linha azul escura representa o perfil de proteínas medido em 280 nm, a linha azul clara a atividade enzimática, a marrom a condutividade e a cinza clara o gradiente. No eixo x são representadas as frações coletadas.



Fonte: Autoria própria.

Após a determinação deste método, novamente foi confeccionado um gel de poliacrilamida em condições nativas a fim de comprovar que as respectivas isoformas haviam sido eluídas separadamente, como visto na Figura 21. Com isso, verificamos a migração diferencial das frações eluídas, com os pontos finais da eluição apresentando uma migração diferente dos pontos iniciais, sugerindo novamente que estas são duas isoformas.

Figura 21. Zimograma corado com ABTS/Guaiacol. I) 20° Fração eluída; II) 23° Fração eluída; III) 33°; IV) 36; V) 40° Frações eluídas.

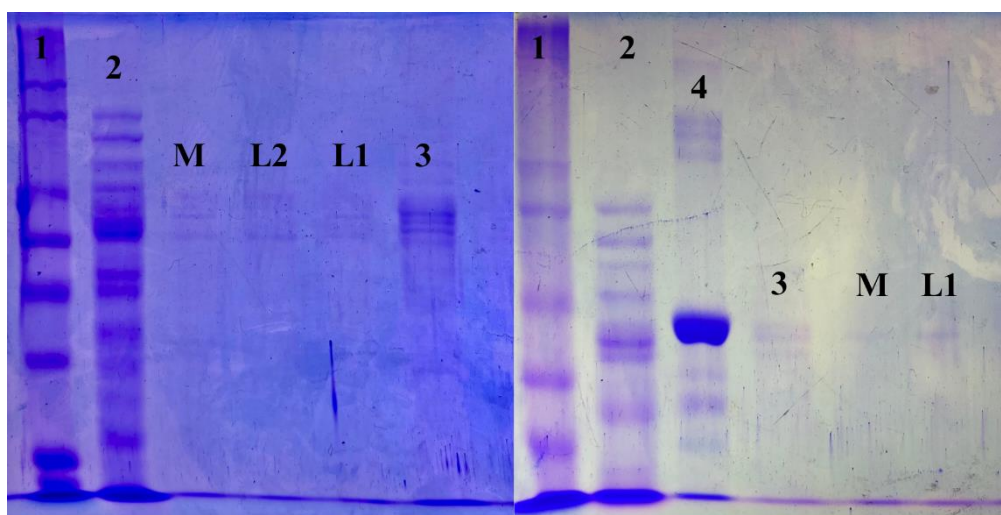


Fonte: Autoria própria.

Posteriormente à observação dos resultados alcançados, as frações eluídas foram unidas quanto à separação no gel nativo e os perfis cromatográficos obtidos, sendo unidos os pontos coletados do 18-27, correspondendo à LacI, e dos pontos 36-54 a LacII, eliminando os pontos intermediários que teriam mistura significativa das duas isoformas.

A presença de duas isoformas de lacases para fungos da espécie *Pycnoporus sanguineus* já vem sendo documentada ao longo dos anos, como descrito em Ramírez-Cavazos e colaboradores (2014) e Garcia e colaboradores (2006), sendo encontradas até três isoformas para lacases desta mesma espécie fúngica (POINTING, 2000).

Figura 22. Eletreforese SDS-PAGE (1: Marcador; 2: Extrato bruto; 3: Fração da gel filtração; 4: Albumina sérica bovina – 66Kda; M: solução com ambas isoformas; L1: Lac1; L2: Lac2).



Fonte: Autoria própria.

Como observado na Figura 22, é possível notar uma pequena diferença na massa molecular da LacI e LacII, ambas possivelmente possuindo entre 60-70 kDa, a partir de comparações com o marcador utilizado (BSA). A solução contendo as duas isoformas diluídas apresentou maior semelhança visual em sua banda com a LacI, indicando que estava predominante na solução. Sendo muito difícil a observação das lacases no gel de poliacrilamida por sua baixa concentração, não tendo sido eficientes métodos de precipitação com TCA (ácido tricloroacético) para uma melhor resolução nos géis.

Vale ressaltar que um dos motivos da dificuldade em corar as lacases aqui descritas se dá pela característica já descritas das lacases de degradar corantes sintéticos, incluindo aqueles utilizados para esta metodologia (Azul de Bromofenol e Brilliant Blue).

Para determinar se estas isoformas são transcritas por diferentes genes ou resultado de mudanças pós-transcrição são necessários estudos mais aprofundados quanto à sua biologia molecular e estrutura, sendo assim importante ressaltar a importância das condições de crescimento e da variabilidade genética de cada cepa estudada para a produção de diferentes arcabouços enzimáticos.

Tabela 3. Tabela de Purificação.

Fração da purificação	Volume (mL)	Proteína total (mg)	Atividade total (U)	Atividade específica (U/mg)	Rendimento (%)	Purificação
Extrato bruto	39,0	14,17	241,17	17,01	100,00	1
Solução com as duas isoformas diluídas						
Gel filtração	18,5	0,587	106,24	180,83	44,1	10,63
Troca iônica	21,5	0,00947	94,93	10029,19	39,4	589,38
LacI						
Gel filtração	22,0	1,20322	81,311	67,578	33,5	3,95
Troca iônica	14,5	0,01262	46,785	3707,502	19,3	216,45
LacII						
Gel filtração	22,0	1,20322	81,311	67,578	33,5	3,95
Troca iônica	28,0	0,04038	2,506	62,056	1,0	3,62

Fonte: Autoria própria.

Com os resultados alcançados (Tabela 3) podemos concluir que o maior rendimento (39,4%) foi apresentado na primeira metodologia empregada, que não resultou na separação das isoformas presentes na eluição, sendo o menor rendimento apresentado na eluição da LacII, com apenas 1%.

O rendimento obtido através da purificação da LacI foi relativamente alto (19,3%), com a maior atividade específica entre as isoformas (3707,502 U), resultado este maior do que aquele encontrado para a produção ótima induzida de lacase produzida por *P. sanguineus* descrito em Pointing e colaboradores (2000), que apresentou valores de 1368 U L^{-1} de atividade específica.

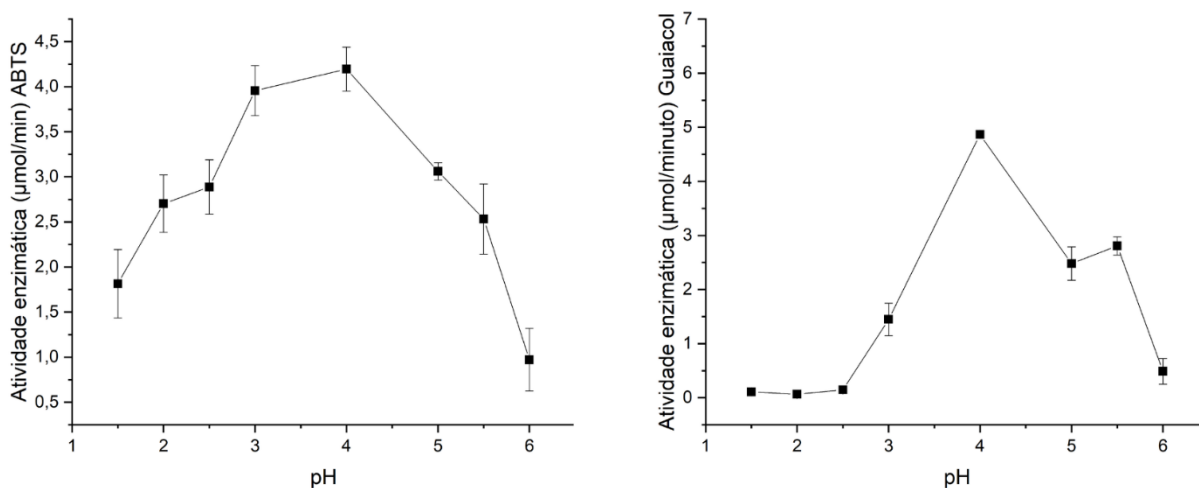
Os valores apresentados de atividade específica e rendimento de LacI e a solução contendo as duas isoformas demonstram um grande potencial da cepa de *P. sanguineus* utilizada no presente estudo para a produção de lacases.

5.6. Determinação do pH ótimo

Como descrito anteriormente, não somente as isoformas LacI e LacII foram caracterizadas quanto aos seus parâmetros bioquímicos, sendo também realizadas estas mesmas análises para mistura destas duas isoformas obtida na primeira metodologia realizada na cromatografia de troca iônica.

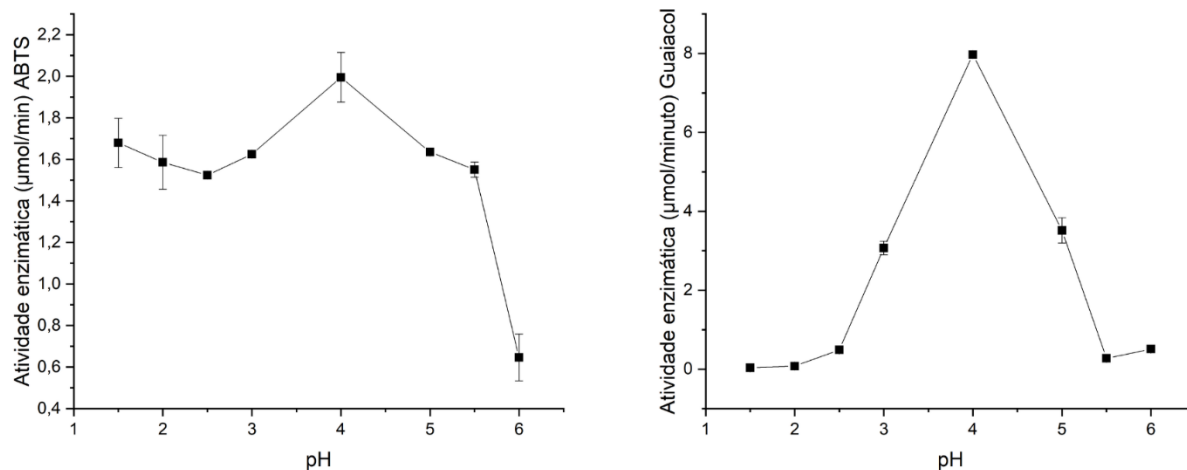
A partir dos ensaios realizados com estas enzimas, foi possível observar um comportamento similar entre estas quanto à sua atividade em diferentes faixas de pH (Figura 23).

Figura 23. pH ótimo em diferentes substratos ABTS (à esquerda) e Guaiacol (à direita) para a solução contendo as duas isoformas.



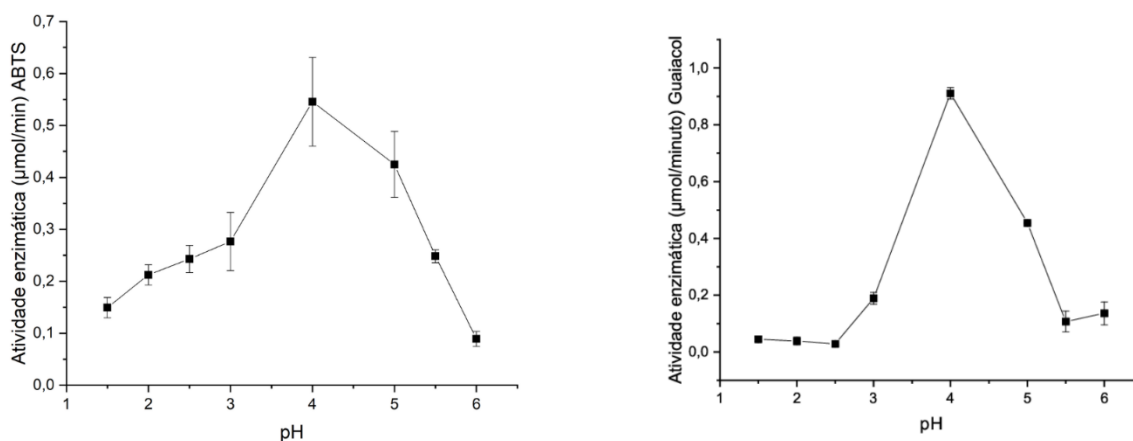
Fonte: Autoria própria.

Figura 24. pH ótimo em diferentes substratos ABTS (à esquerda) e Guaiacol (à direita) para LacI.



Fonte: Autoria própria.

Figura 25. pH ótimo em diferentes substratos ABTS (à esquerda) e Guaiacol (à direita) para LacII.



Fonte: Autoria própria.

Os resultados obtidos condizem com aqueles esperados, levando em consideração que lacases fúngicas exibem seu pH ótimo em faixas de pH ácidas (BALDRIAN, 2006). Como demonstrado nas figuras 23, 24 e 25, em todos os substratos estudados, foram obtidos valores de pH ótimo semelhantes, com o pH 4,0 sendo o de maior atividade catalítica em todos os casos, com alta atividade catalítica na faixa de pH 3-5.

Estes valores se assemelham de certa forma com aqueles descritos em Wang e colaboradores (2010), onde duas isoformas provenientes do gênero *Pycnoporus* foram também caracterizadas e se obtiveram valores de pH ótimo 3 (ABTS) e 4 (Guaiacol) para LacI e pH ótimo de 2,5 (ABTS) e 3,5 (Guaiacol) para LacII, além dos dados descritos em Ramírez-Cavazos e colaboradores (2014), onde os valores de pH ótimo para duas isoformas isoladas e purificadas também foram demonstrados na faixa de pH ácida (2-4) para espécies de *P. sanguineus*. Garcia e colaboradores (2007) também descreve para lacase produzida pela mesma espécie fúngica aqui estudada valores de pH ótimo de 4,4 o substrato guaiacol.

Sendo uma característica interessante nas isoformas aqui estudadas os seus valores de pH ótimo idênticos para ambos os substratos estudados, até mesmo na solução contendo as duas isoformas diluídas na solução (Figura 23), sendo neste último caso observado uma amplitude maior na faixa de atividade enzimática para o substrato ABTS.

A similaridade entre os valores de pH ótimo de isoformas de lacases provenientes de *P. sanguineus* também foi relatada em Garcia e colaboradores (2006), onde Lac I apresentou pH ótimo de 4,8 e Lac II 4,2.

Em todos os resultados obtidos, é possível constatar uma diminuição brusca na atividade enzimática em pH 6, o que pode resultar de uma inibição pela espécie OH^- nos sítios T2 e T3 de cobre presentes nas estruturas das lacases, de forma a descontinuar o transporte de elétrons do sítio T1 para os centros T2 e T3 na molécula da lacase (CEN, et al., 2022; XU, 1997).

5.7. Temperatura ótima e termoestabilidade

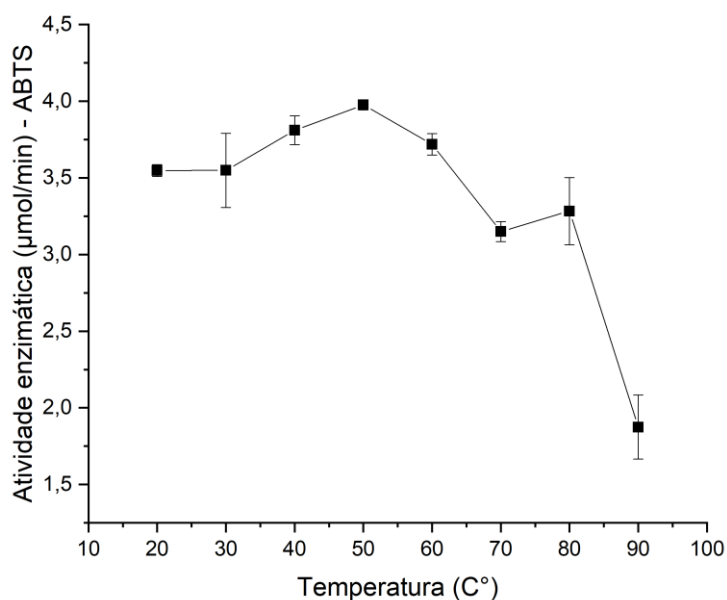
É de conhecimento geral que as enzimas atuam em faixas específicas de temperatura, sendo a temperatura correspondente à sua maior taxa de atividade catalítica chamada de temperatura ótima. Por se tratar de uma característica que influencia fortemente na produtividade das enzimas, determinar este parâmetro se torna importante para sua utilização com maior eficiência.

Tendo em vista que altas taxas de reação enzimática são observadas em condições de temperatura elevada, que levam à aceleração das reações e períodos de conversão menores, é gerada uma economia no tempo completo de processamentos industriais, podendo ser

considerada uma desvantagem a necessidade de maiores temperaturas para inativação no final destes processos (HILDÉN et al., 2009; GODFREY; WEST, 1996).

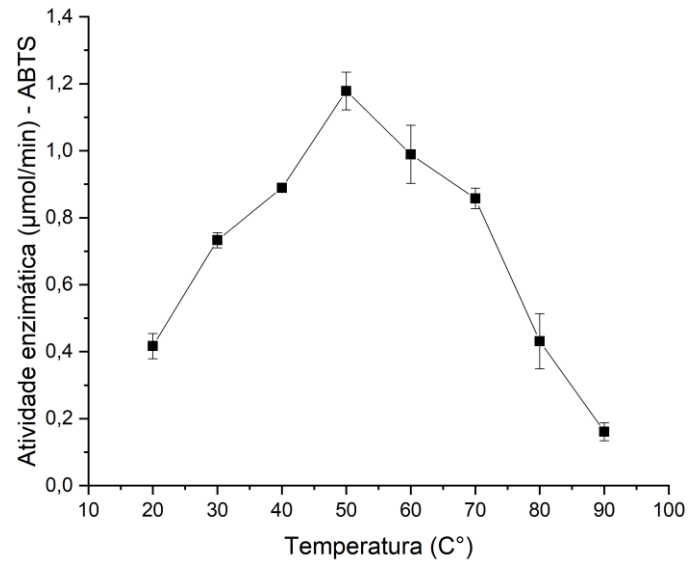
Como demonstrado nas figuras 26 e 27, as isoformas aqui presentes também não apresentaram diferença quanto a sua temperatura ótima, sendo ambas 50°C, contudo, é possível notar que a LacI tem menor diminuição da atividade em torno do valor máximo em comparação com a LacII, e um formato mais semelhante ao apresentado pela mistura de isoformas, embora 40°C tenha sido a temperatura ótima nessas condições (Figura 28).

Figura 26. Temperatura ótima da LacI.



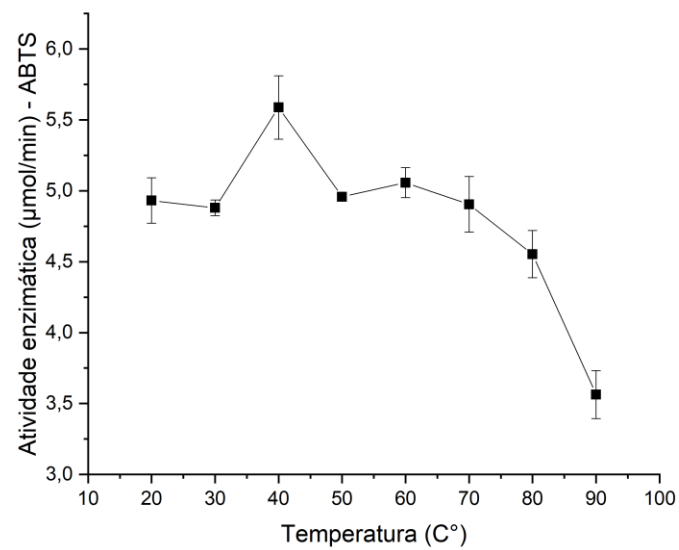
Fonte: Autoria própria.

Figura 27. Temperatura ótima da LacII.



Fonte: Autoria própria.

Figura 28. Temperatura ótima solução com isoformas diluídas.



Fonte: autoria própria.

Estes resultados são semelhantes àqueles descritos em Litthauer e colaboradores (2007), onde a temperatura ótima registrada para uma lacase purificada de *P. sanguineus* foi 55°C, além de ser descrito 50°C para uma isoforma da enzima da mesma espécie fúngica em Trovaslet e colaboradores (2007). Garcia e colaboradores (2006), também descrevem uma temperatura ótima de 50°C para isoforma LacII produzida por *P. sanguineus* induzida por 2,5-xilidina.

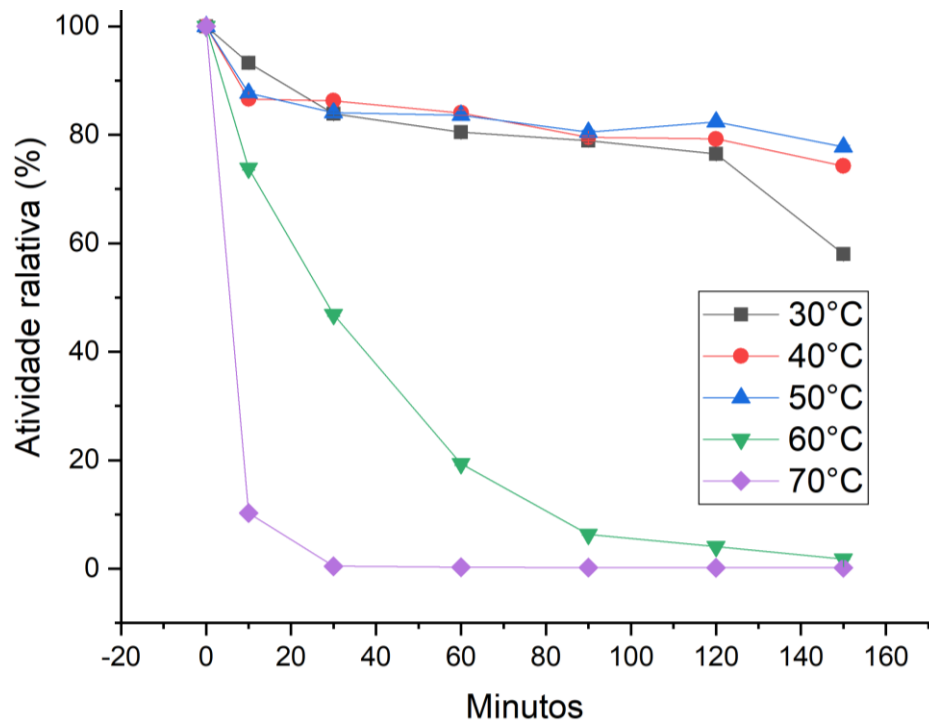
Enquanto em Wang e colaboradores (2010) é registrado para isoformas provenientes de *Pycnoporus* sp. para o substrato ABTS a temperatura ótima de 65°C para a isoforma LacI e 70°C para LacII, sendo possível observarmos a grande diversidade entre enzimas produzidas em um mesmo gênero fúngico. Com as temperaturas ótimas para lacases variando, de modo geral, entre 30° a 55°C (HILDÉN et al., 2009), os resultados aqui obtidos se mantêm na faixa do esperado.

Devido aos desafios presentes nos processos industriais, são necessárias enzimas resistentes para seu melhor funcionamento e eficiência catalítica, tornando um dos requisitos para uma enzima ser aplicada nestes processos a sua estabilidade térmica, sendo esta relacionada à sua resistência à desnaturação térmica. A desnaturação térmica causa o desenovelamento de suas estruturas proteicas, que são essenciais para sua atividade catalítica.

A termoestabilidade em lacases é altamente variável, podendo se correlacionar com a temperatura de crescimento do seu organismo de origem (HILDÉN et al., 2009), sendo até mesmo descritas duas lacases termoestáveis isoladas de *Pycnoporus* sp. com alta atividade em temperaturas baixas, com uma de suas isoformas exibindo cerca de 45% de atividade catalítica de sua atividade máxima a 0°C, implicando que estas enzimas apresentam características de adaptação a temperaturas baixas (WANG et al., 2010).

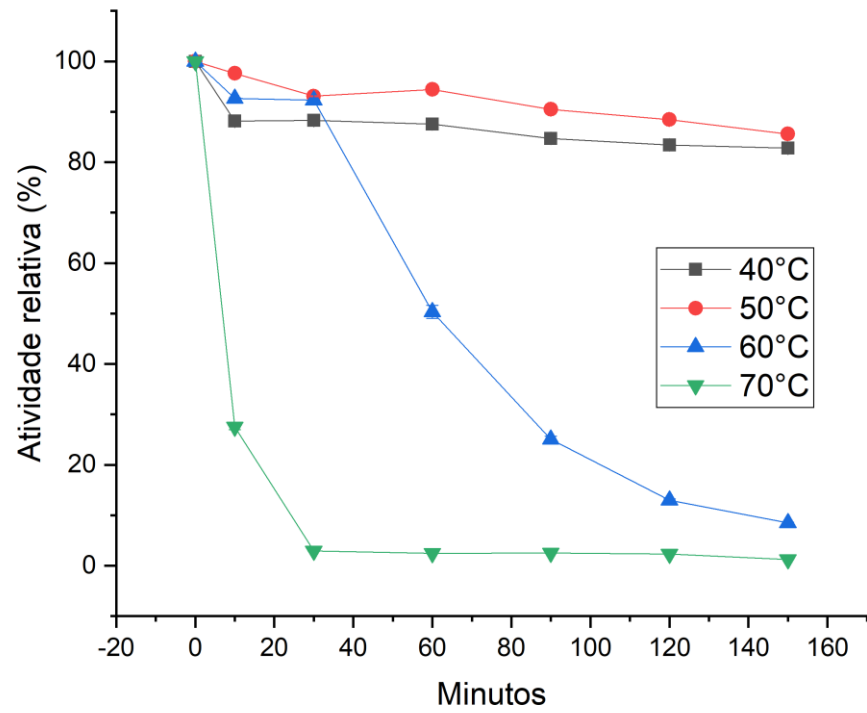
Lacases fúngicas, de maneira geral, apresentam uma rápida queda em sua atividade enzimática em temperaturas acima de 60°C (BALDRIAN, 2006; HILDÉN et al., 2009), corroborando os dados obtidos (Figura 29, 30 e 31), onde em temperaturas de 60 e 70 °C todas as lacases apresentaram um decréscimo em sua atividade relativa.

Figura 29. Estabilidade térmica solução contendo as duas isoformas diluídas.

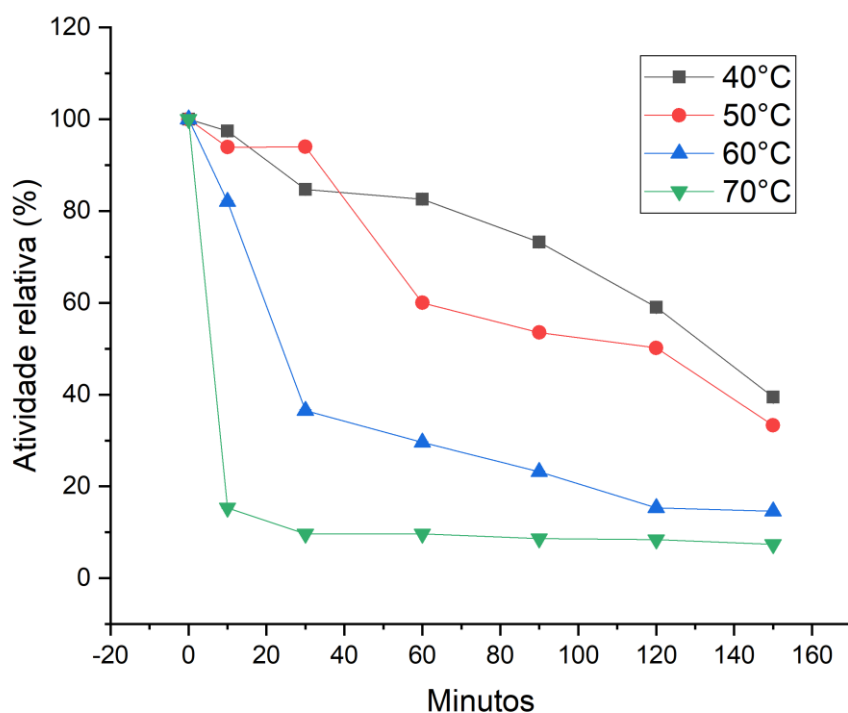


Fonte: autoria própria.

Figura 30. Estabilidade térmica da LacI.



Fonte: autoria própria.

Figura 31. Estabilidade térmica da LacII.

Fonte: autoria própria.

Como demonstrado nas figuras 30 e 31, ambas isoformas apresentaram atividades relativas altas nas temperaturas de 40 e 50 e 60°C após 10 minutos de incubação, o que também pode ser observado para a solução contendo as duas isoformas diluídas.

As figuras 29 e 30 demonstram que tanto na solução contendo as duas isoformas, quanto na LacI, ambas mostraram alta atividade catalítica após expostas as temperaturas de 40 e 50°C por 150 minutos, confirmando, mais uma vez, que a forma predominante na solução contendo as duas isoformas seria a LacI.

Ambas isoformas mantiveram taxas consideráveis de atividade catalítica após 150 minutos de incubação à 40 e 50°C, com destaque a LacI que manteve 82% e 85%, respectivamente. LacII também permaneceu ativa mesmo após 150 minutos de incubação a 60°C restando sua atividade residual de 14,5% e 7,3% para 70°C em mesmo período de incubação.

Os resultados aqui apresentados demonstram que ambas isoformas apresentam características interessantes quanto a sua estabilidade térmica, mantendo sua atividade catalítica após exposição por um intervalo considerável de tempo à temperaturas de 50 e 60°C, destacando-se principalmente LacI, que apresentou atividade relativa de 85,5% após exposição por 150 minutos a 50 °C e 8,5% após mesmo período de incubação térmica a 60°C, similar ao que foi descrito em Orlikowska e colaboradores (2018), onde duas isoformas de lacases de *P. sanguineus* apresentaram alta estabilidade térmica a 60 e 50°C.

Por fim, a termoestabilidade e termotolerância são o resultado da ação de diferentes fatores, como características internas das proteínas, tal como a presença de ligações iônicas (pontes salinas) e densas redes de ligações de hidrogênio, além da presença de metais e cofatores, como os quatro íons de cobre nas lacases (HILDÉN et al., 2009), com isso, são necessários estudos de nível estrutural destas enzimas para melhor compreender as características responsáveis ou não pela sua estabilidade térmica.

5.8. Parâmetros Cinéticos

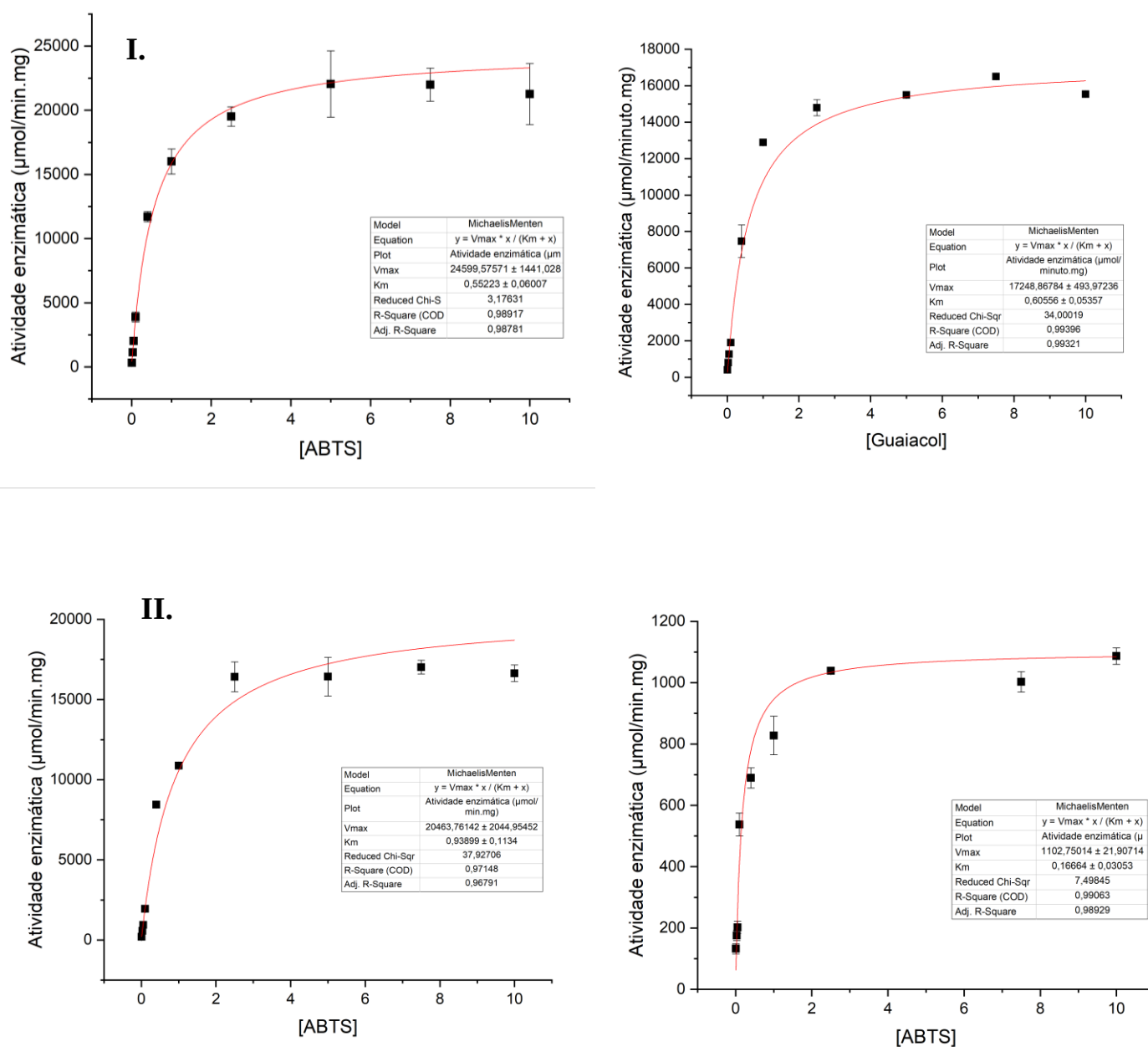
A partir dos resultados obtidos, podemos observar que as lacases aqui estudadas apresentaram comportamento semelhante ao proposto por Michaelis e Menten (MICHAELIS; MENTEN, 1913) para as concentrações de substrato estudadas, resultando em uma curva hiperbólica.

Na figura 32, podemos observar que a mistura contendo ambas isoformas apresentou valores de K_m de $0,55 \pm 0,06$ mM e V_{max} de $24.599,57 \pm 1.441$ $\mu\text{mol}/\text{min.mg}$ para ABTS, com K_m de $0,61 \pm 0,05$ mM e V_{max} $17248,86 \pm 493,97$ $\mu\text{mol}/\text{min.mg}$ para guaiacol. Ou seja, os valores de K_m são semelhantes dentro da margem de erro.

Sendo K_m uma medida aproximada de afinidade da enzima ao substrato, temos que quanto menor o seu valor maior será sua afinidade pelo substrato estudado. Inversamente, valores altos de K_m indicariam baixa afinidade ao substrato estudado, resultando na necessidade de uma maior concentração do mesmo para alcançar metade da V_{max} .

O resultado alcançado difere de estudos feitos em Ramírez-Cavazos e colaboradores (2010), onde duas isoformas (LacI e LacII) de lacases produzidas por *P. sanguineus* apresentaram maior afinidade ao ABTS, com seus valores de K_m sendo 0,069 e 0,012 mM, respectivamente. Este mesmo trabalho apresentou valores de K_m para guaiacol das isoformas estudadas de 1,485 mM para LacI e 1,100 mM para LacII, sendo o guaiacol o substrato com menor afinidade dentre aqueles testados (ABTS; 2,6-dimetoxifenol e Guaiacol).

Figura 32. I. Cinética da solução com ambas as isoformas diluídas (à esquerda: ABTS; à direita: Guaiacol). II. Cinética das isoformas em ABTS (à esquerda: LacI; à direita: LacII).



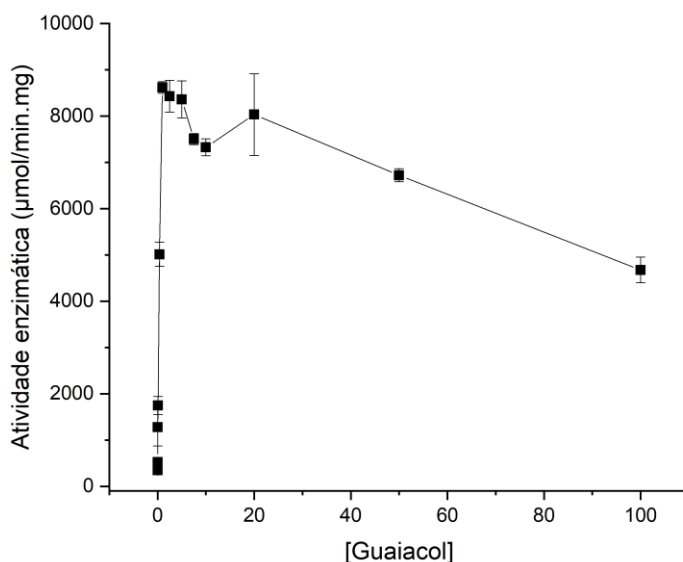
Fonte: Autoria própria.

A figura 32, representa a velocidade da reação pela concentração do substrato ABTS para as isoformas LacI e LacII. Neste caso, LacI apresentou valores maiores para ambas as variáveis estudadas (K_m : $0,938 \pm 0,11$ mM e $V_{m\acute{a}x}$: $20463,76 \pm 2044,95$ $\mu\text{mol/min.mg}$) quando comparado com LacII (K_m : $0,166 \pm 0,03$ mM e $V_{m\acute{a}x}$: $1102,750 \pm 21,907$ $\mu\text{mol/min.mg}$).

Esta diferença entre os valores de K_m para isoformas de lacase de *P. sanguineus* já foi descrita em Garcia e colaboradores (2006), com LacI também apresentando valor maior à LacII (10 e 8 μM , respectivamente).

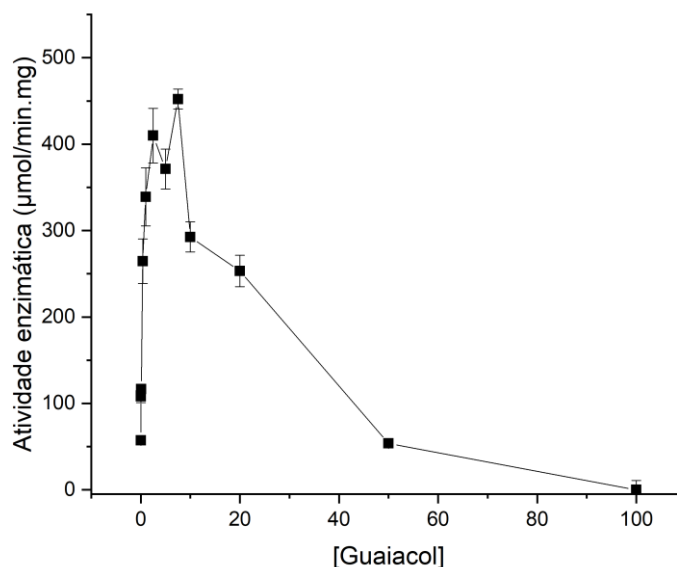
Quando estavam sendo feitos os ensaios enzimáticos para o substrato Guaiacol, percebeu-se que em concentrações maiores do mesmo havia um decréscimo nas taxas de reação enzimática, sendo a partir disto feitos testes em concentrações mais altas (20, 50 e 100 mM), que demonstraram uma queda ainda mais brusca na atividade enzimática em ambas as isoformas (Figura 33 e 34). Este comportamento não é comum para lacases, não sendo descritos efeitos inibitórios do guaiacol sobre estas enzimas.

Figura 33. Inibição da atividade enzimática de LacI por guaiacol.



Fonte: Autoria própria.

Figura 34. Inibição da atividade enzimática de LacII por guaiacol.



Fonte: Autoria própria.

Este efeito é ainda mais pronunciado em LacII, com sua taxa de atividade enzimática em $\mu\text{mol/min.mg}$ chegando à zero na concentração de 100 mM. Para comprovar se o Guaiacol realmente possui este efeito sobre estas enzimas em altas concentrações, mais testes devem ser realizados. A inibição do substrato ocorre em aproximadamente um quarto das enzimas conhecidas, sendo atribuído em geral à formação de um complexo enzima-substrato improdutivo após a ligação simultânea de duas ou mais moléculas de substrato ao sítio ativo (KOKKONEN et al., 2021).

5.9. Propriedades espectrofotométricas das lacases

As lacases são, de maneira geral, proteínas que contêm quatro átomos de cobre localizados em três diferentes sítios redox (T1, T2e T3), que podem ser identificados usando métodos de espectrofotometria Ultravioleta/Visível e ressonância magnética eletrônica (EPR), sendo T1 responsável pela intensa coloração azul destas enzimas, com absorbância máxima em aproximadamente 600 nm, podendo ser também detectável através de EPR, por outro lado, T2 não apresenta absorção na faixa UV/Visível, sendo incolor mas identificável através de EPR. Por fim, o par de átomos de cobre T3 não são detectáveis por EPR, mas apresentam valores de

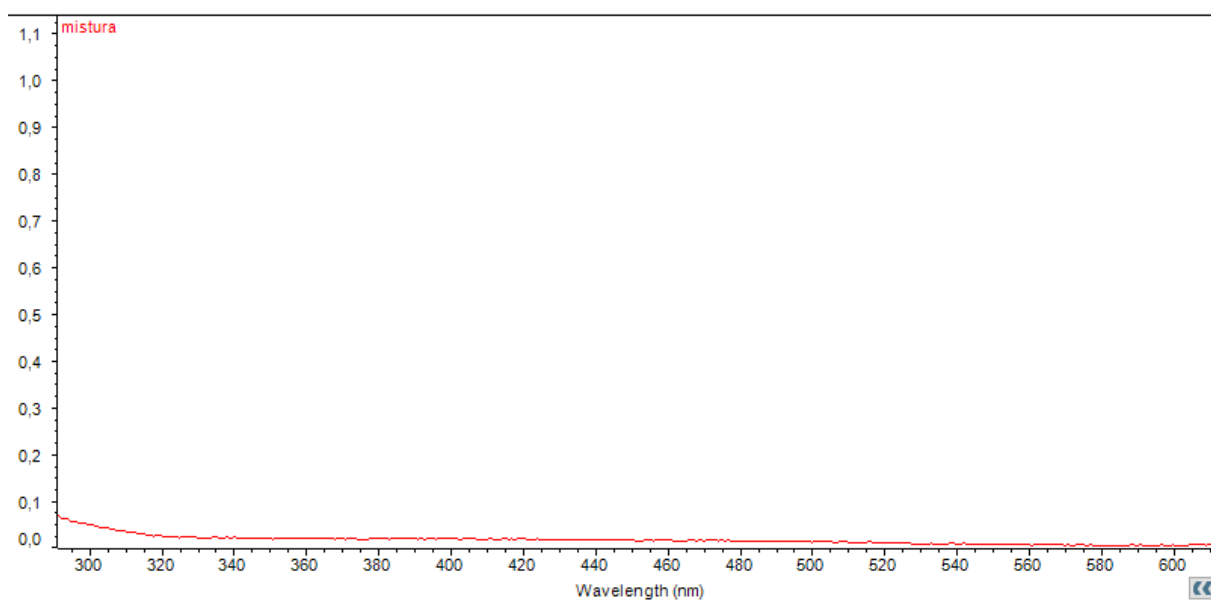
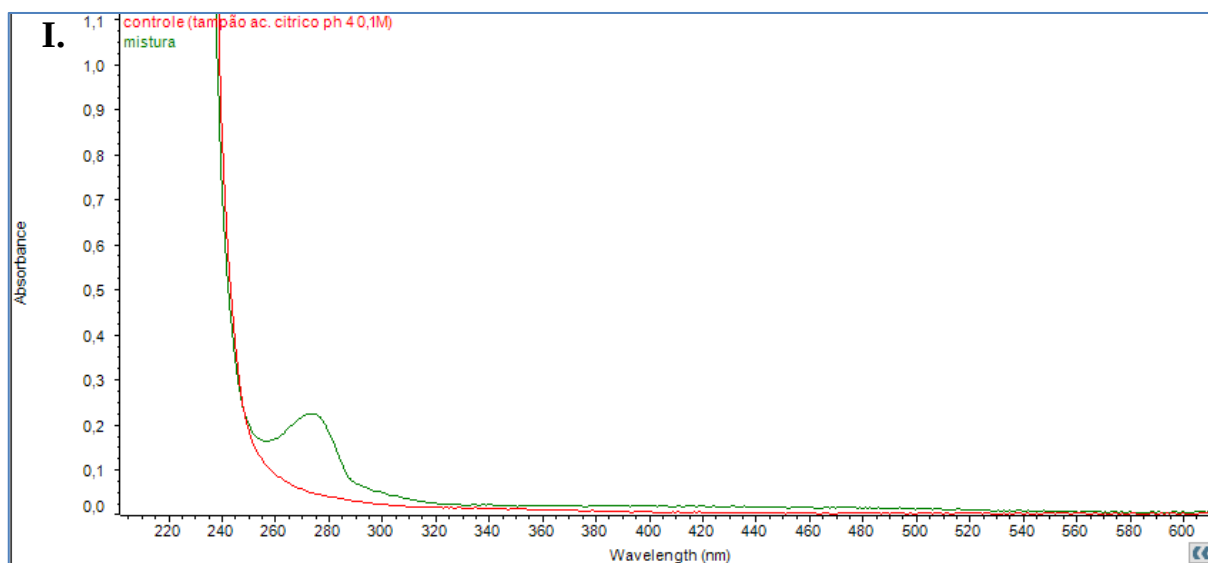
absorbância em faixas de 330 nm (PERALTA et al., 2017; PIONTEK, et al., 2002; SINGH et al., 2020). Deste modo, lacases podem ser ainda classificadas como “amarelas” ou ‘brancas”, quando não possuem um espectro de absorbância próximo de 600-610 nm, característico das lacases azuis (LEONTIEVSKY et al., 1997; CHAURASIA et al., 2013). Com isso, análises com espectroscopia são empregadas para ensaios com lacases a fim de se ter uma noção de sua estrutura sem a realização de estudos moleculares.

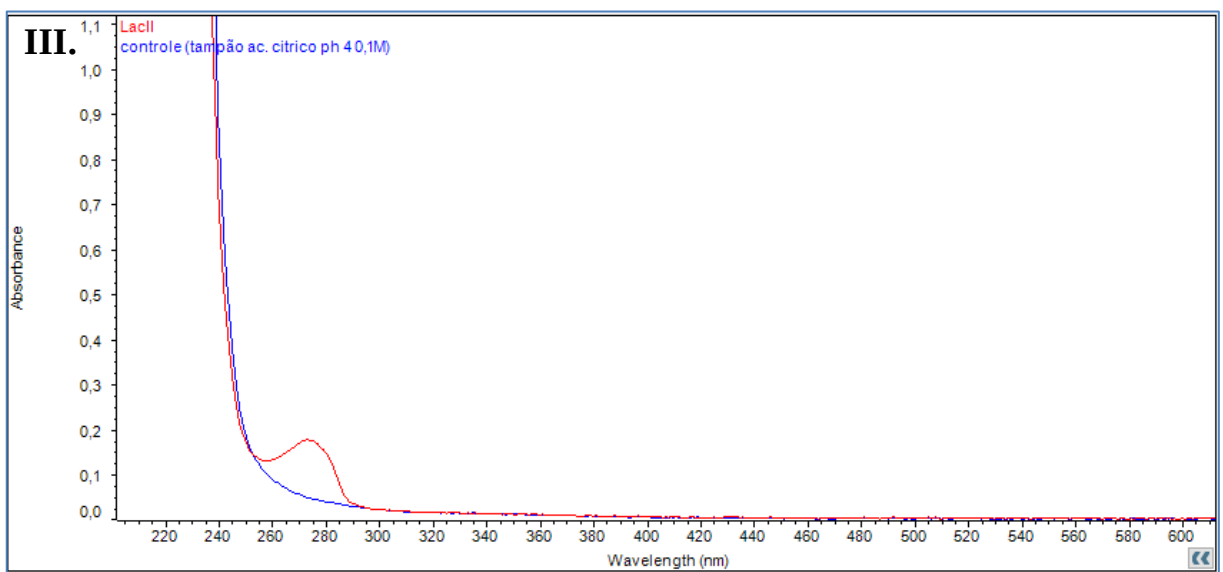
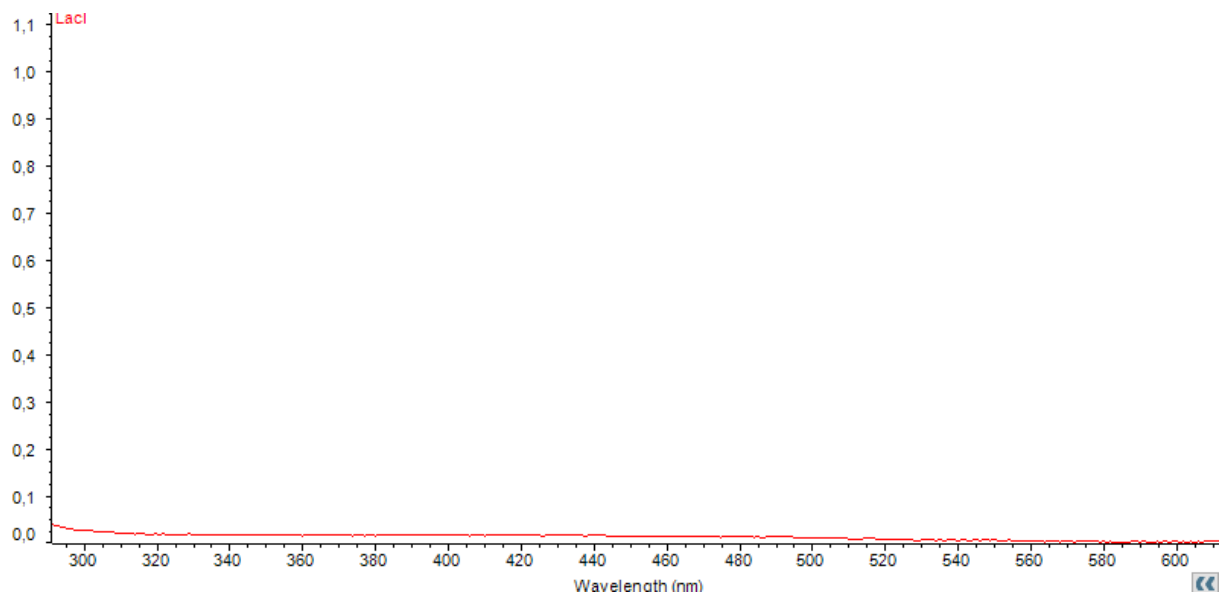
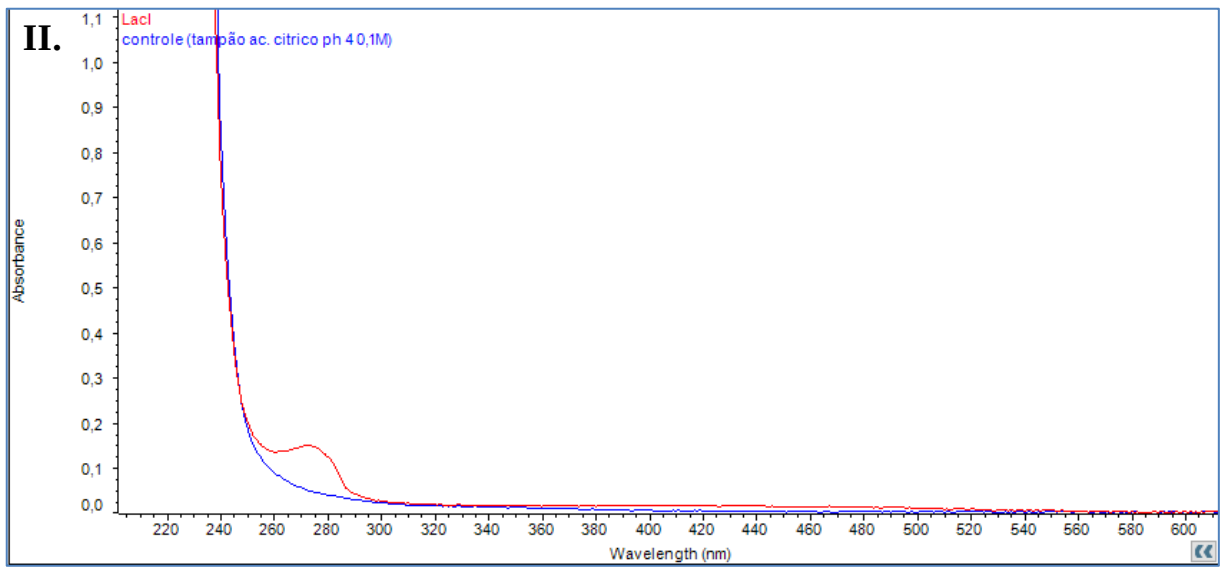
Na figura 35, podemos observar que nenhuma das lacases estudadas apresentam absorbância em faixas de 600 ou 330 nm, mas sim em picos de leitura próximos de 280 nm, exibindo comportamento diferente do esperado a partir das informações previamente descritas, sugerindo que estas lacases sejam lacases amarelas ou brancas, ao contrário do que se normalmente espera. Este comportamento já foi também observado em lacases produzidas por fungos da espécie *Coriolopsis gallica* (CEN et al., 2022), que apresentaram maior absorbância próxima a 280 nm.

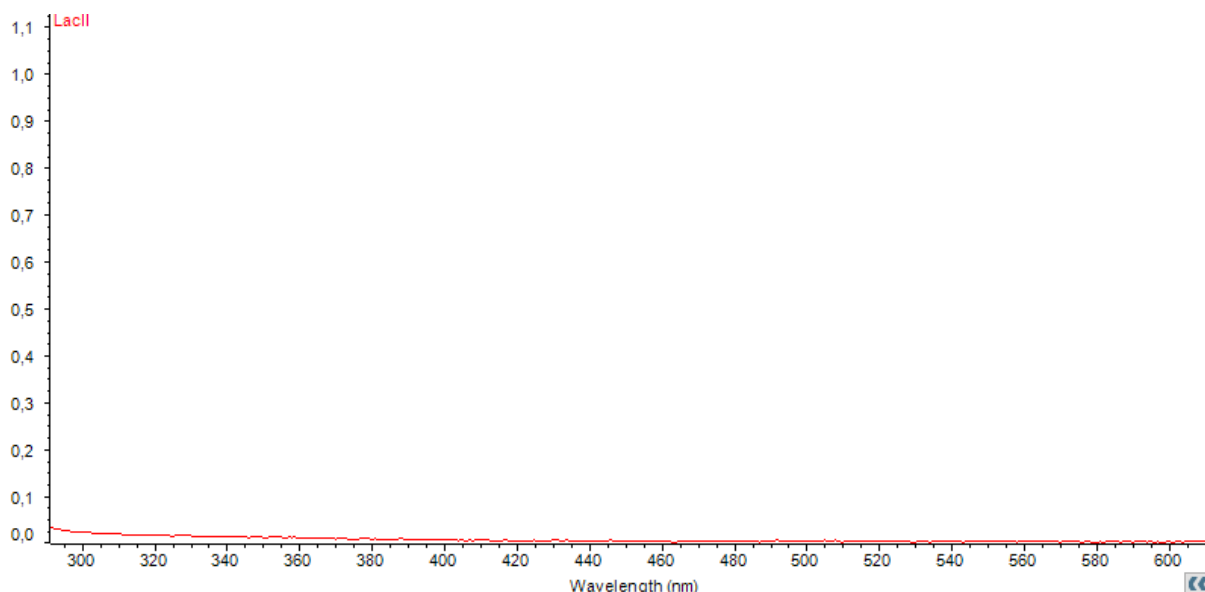
A ausência de T1 já foi relatada para lacases de *Pycnoporus* sp. em Wang e colaboradores (2010), onde ambas as isoformas estudadas apresentaram picos de absorbância próximos de 330 nm, assim como em Lu e colaboradores (2007), onde a lacase purificada desta mesma espécie não apresentou absorbância em 610 nm, mas sim em faixas próximos de 330 nm.

Lacases amarelas/brancas são capazes de oxidar substratos não fenólicos na ausência de mediadores, que são necessários para as lacases azuis, podendo estas serem consideradas melhores catalisadores (LEONTIEVSKY et al., 1997; CHAURASIA et al., 2013). Essa característica é, portanto, muito vantajosa para suas aplicações industriais, visto que são capazes de degradar substratos não fenólicos na ausência de mediadores, que costumam ter preços elevados.

Figura 35. Absorbância das lacases estudadas (I. Solução contendo ambas isoformas; II. LAcI; III; LacII).







Fonte: Autoria própria.

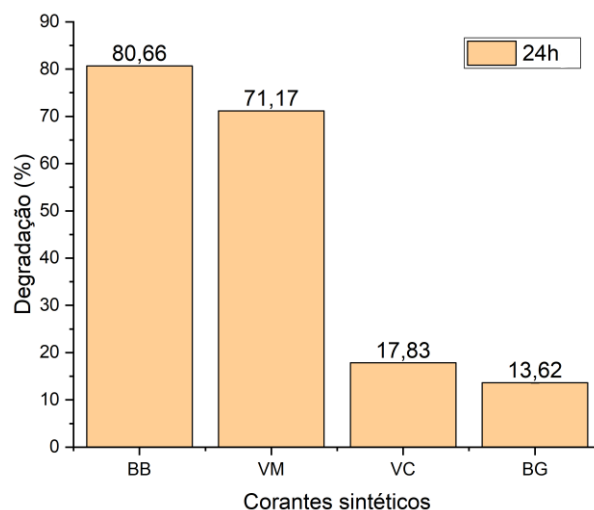
Estes resultados indicam que as lacases aqui estudadas sejam amarelas/brancas, sendo necessários estudos estruturais posteriores para comprovar este achado.

5.10. Análise da degradação de corantes sintéticos

Sabe-se que o grupo de microrganismos mais eficientes na degradação dos corantes sintéticos são os fungos da podridão-branca, sendo estes capazes de produzir enzimas capazes de decompor corantes em condições aeróbicas (COUTO, 2009; ALI et al., 2010). Dentre estas enzimas temos as lacases, que, por sua vez, possuem características essenciais para a decomposição destes corantes, como por exemplo, a sua capacidade de oxidar uma vasta gama de compostos.

Contudo, os tratamentos com lacases para a remoção destes corantes podem ser influenciados por algumas variáveis, afetando a porcentagem de descoloração. Além do tipo e concentração do corante, já foram demonstrados que diferentes isoenzimas originadas de um mesmo organismo podem apresentar diferentes taxas de descoloração (ZHUO et al., 2019; GU et al., 2014; ARDILA-LEAL et al., 2021). Esta característica também pode ser observada para as lacases aqui estudadas, com LacI apresentando maiores valores de degradação entre as isoformas (Figura 37 e 38).

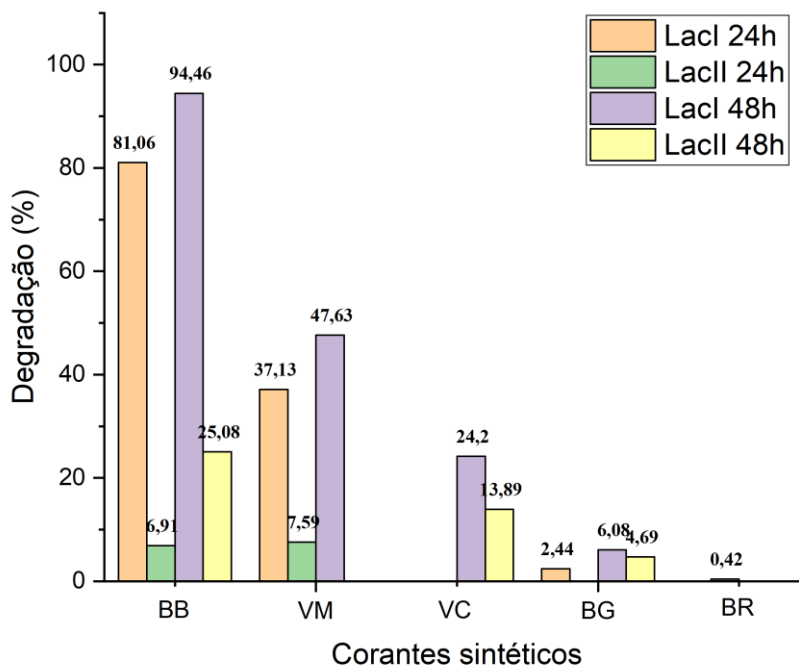
Figura 36. Degradação de corantes sintéticos pelo extrato bruto de *P. sanguineus* após 24 horas em pH 4,0 e temperatura ambiente. (BB: Azul de Bromofenol; VM: Verde Malaquita; VC: Vermelho Congo; BG: Brilliant Blue G).



Fonte: Autoria própria.

Como observado na figura 36, os tratamentos com o extrato bruto de *P. sanguineus* apresentaram valores altos de degradação para Azul de Bromofenol (80%), Verde malaquita (71%), vermelho congo (17%) e Brilliant Blue G (13%), mas não foi capaz de degradar significativamente o corante Brilliant Blue R-250 (BR). Estes valores foram obtidos após 24 horas de incubação. Por outro lado, o extrato proveniente de *Phlebia sp.* não demonstrou sucesso na degradação dos corantes estudados, com valores <5%.

Figura 37. Degradação de corantes sintéticos por LacI e II em pH 4 (BB: Azul de Bromofenol; VM: Verde Malaquita; VC: Vermelho Congo; BG: Brilliant Blue G; BR: Brilliant Blue R-250) após 24 e 48 horas.

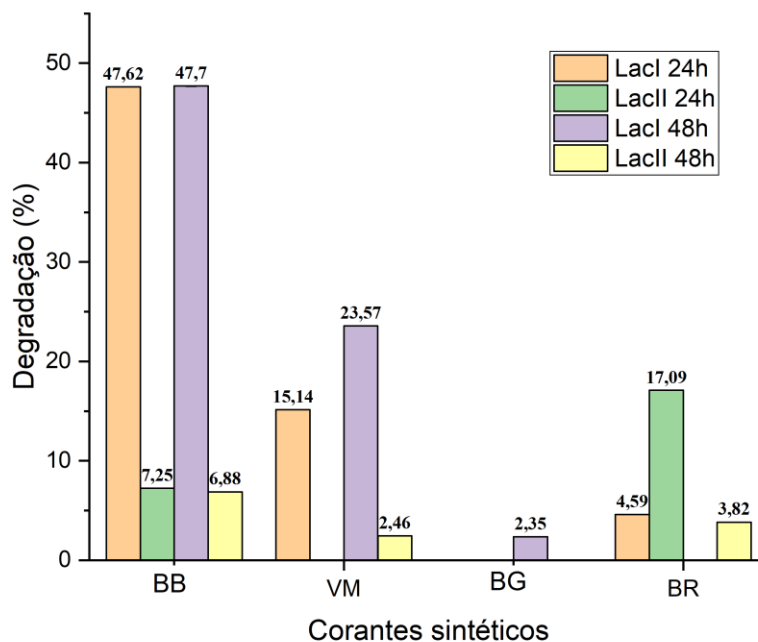


Fonte: Autoria própria.

Além dos fatores acima citados, o pH também pode influenciar as taxas de degradação, sendo necessário levar este fator em consideração para a melhor otimização deste processo. Nozaki e colaboradores (2008), após analisarem a descoloração de 27 corantes por 21 basidiomicetos, constatou que o pH ótimo para a descoloração destes corantes foi de 3-5. Sendo justamente na faixa ácida a maior atuação das lacases.

A figura 37, mostra a taxa de degradação dos corantes em pH 4, onde LacI se destaca alcançando 94% da degradação de BB após 48hrs de incubação, seguida pela degradação de 47% de verde malaquita, estes valores demonstram que incubações por maiores períodos podem levar à sua degradação completa. Dentre os corantes estudados nesta faixa de pH, LacII também degradou com mais sucesso o BB (25%).

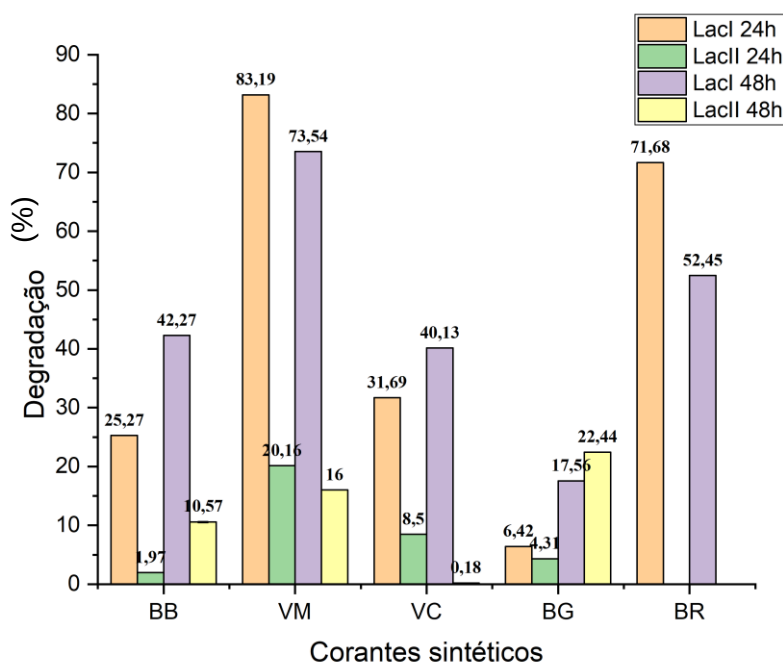
Figura 38. Degradação de corantes sintéticos por LacI e II em pH 3 (BB: Azul de Bromofenol; VM: Verde Malaquita; BG: Brilliant Blue G; BR: Brilliant Blue R-250) após 24 e 48 horas.



Fonte: Autoria própria.

A figura 38 nos mostra que em pH 3, LacI manteve sua taxa de degradação de BB em 47% em ambas incubações, com LacII degradando 17% de BR após 48 horas de reação.

Figura 39. Degradação de corantes sintéticos por LacI e II em pH 5,5 (BB: Azul de Bromofenol; VM: Verde Malaquita; VC: Vermelho Congo; BG: Brilliant Blue G; BR: Brilliant Blue R-250) após 24 e 48 horas.



Fonte: Autoria própria.

Na figura 39 é demonstrado que em pH 5,5 a taxa de degradação de BR aumenta bruscamente, o que não foi observado nos demais tratamentos. A degradação de vermelho congo é apresentada em 40% após 48 horas, sendo a melhor taxa de descoloração para este corante, junto com Brilliant Blue R-250.

Um fator interessante é a queda na degradação de verde malaquita após 48 horas (73%), quando comparada com 24 horas (83%), sendo possível levantar a hipótese de que após períodos longos nesta solução com pH 5,5 a enzima perdeu um pouco de seu potencial redox.

Como pode-se observar, diferentes faixas de pH favoreceram a degradação de certos corantes. Em geral, os corantes menos degradados foram ambos Brilliant Blue (G e R-250), enquanto os com maiores taxas de degradação foram azul de bromofenol e verde malaquita, sendo estes resultados corroborados por achados de Pointing e Vrijmoed (2000), que descreveram 98% e 100%, respectivamente, de descoloração dos mesmos por lacases produzidas por *P. sanguineus*.

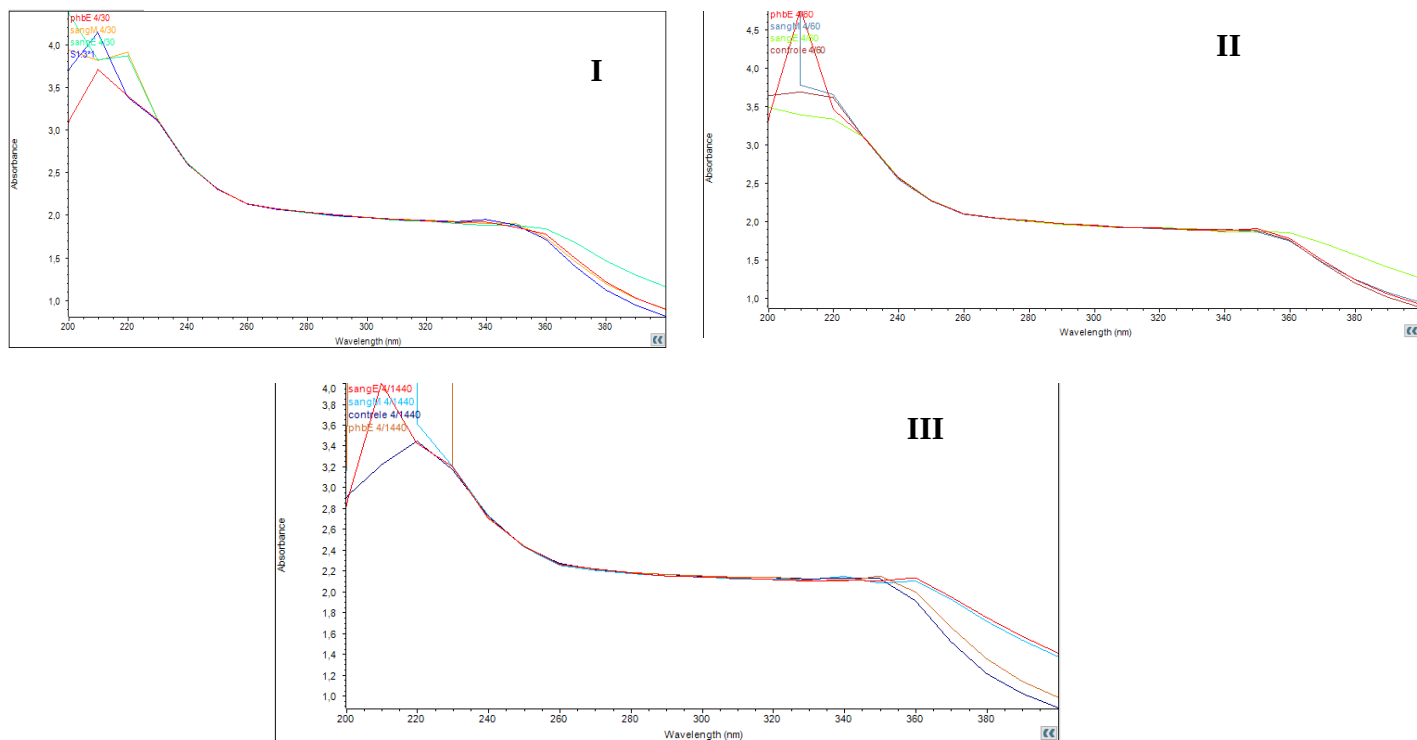
Os resultados aqui apresentados demonstram o grande potencial das lacases produzidas por *P. sanguineus* em condições de fermentação semi-sólida em farelo de trigo, sendo estes

resultados alcançados sem o uso de mediadores, tornando este achado ainda mais interessante do ponto de vista biotecnológico.

5.11. Degradação do licor

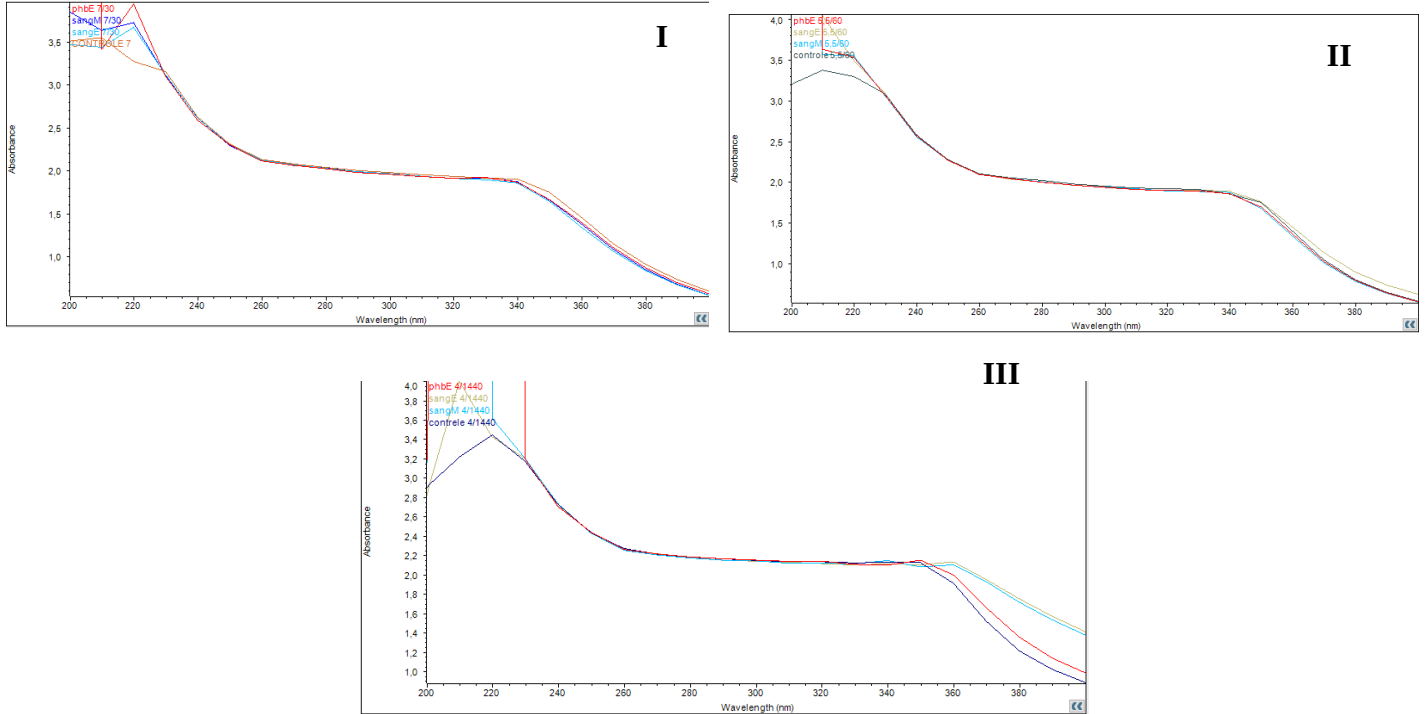
Como podemos observar nas Figuras 40, 41 e 42, a degradação do licor pela metodologia escolhida não foi eficiente, não sendo verificado o pico correspondente a 280 nm, comprimento de onda na qual a lignina possui maior absorbância (IDRIS et al., 2019; SEESURIYACHAN et al., 2015; ZHU et al., 2017). Além disso, poucas diferenças podem ser notadas na faixa de 320-380 nm.

Figura 40. Varredura licor pH 4 (I. 30 minutos; II. 60 minutos; III. 24 horas).



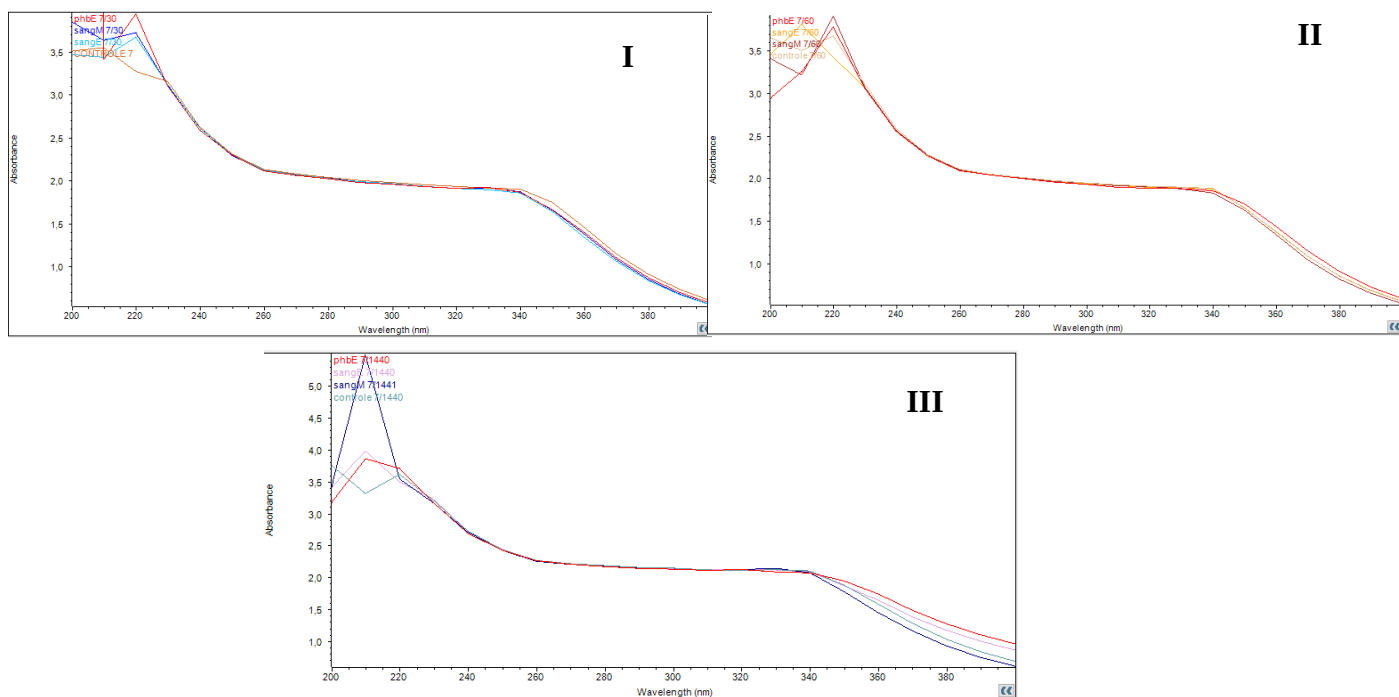
Fonte: Autoria própria.

Figura 41. Varredura licor pH 5,5 (I. 30 minutos; II. 60 minutos; III. 24 horas).



Fonte: Autoria própria.

Figura 42. Varredura licor pH 7 (I. 30 minutos; II. 60 minutos; III. 24 horas).



Fonte: Autoria própria.

Pelo método utilizado não foram observadas diferenças significativas, sendo necessário aprimorar esta metodologia ou buscar uma mais refinada que atender as particularidades do substrato estudado.

6.CONCLUSÕES

A partir dos resultados alcançados, podemos concluir que o bagaço de cana-de-açúcar pode representar uma alternativa sustentável para o crescimento e produção enzimática dos fungos filamentosos aqui estudados. O licor extraído através da hidrólise alcalina deste resíduo agroindustrial se mostra um substrato promissor, mesmo sendo muito complexo e de difícil degradação. O emprego destes resíduos agroindustriais é uma alternativa para o desenvolvimento sustentável de bioprodutos e reaproveitamento desta biomassa lignocelulósica que por muitas vezes é queimada para a produção de energia.

O farelo de trigo também apresentou grande potencial a produção de lacases a partir do crescimento das espécies aqui estudadas, principalmente para *P. sanguineus*. Embora *Phlebia* sp. também tenha demonstrado crescimento miceliar ao final da fermentação, este apresentou pouca atividade para lacases, indicando que outras enzimas possam estar sendo produzidas pelo seu arcabouço enzimático, como manganês peroxidase e/ou lignina peroxidase.

A purificação das lacases de *P. sanguineus* se mostrou eficaz em especial para LacI, que apresentou maior nível de rendimento entre as isoformas. Contudo, a purificação sem a separação das isoformas também se mostrou uma alternativa mais rápida e menos trabalhosa se obter uma lacase funcional e com características interessantes do ponto de vista biotecnológico.

Da mesma forma, a aplicação das isoformas na degradação de corantes sintéticos também se mostrou eficiente para este fim, em especial a sua descoloração dos corantes Azul de Bromofenol e Verde malaquita, com valores consideráveis para Vermelho congo, sendo a LacI a mais eficaz para este procedimento.

Por fim, podemos inferir que, das duas espécies estudadas, *P. sanguineus* se mostrou um grande produtor de lacases com potencial para aplicações em processos biotecnológicos.

REFERÊNCIAS

- ABD EL MONSSEF, R. A.; HASSAN, E. A.; RAMADAN, E. M. Production of laccase enzyme for their potential application to decolorize fungal pigments on aging paper and parchment. **Annals of Agricultural Sciences**, v. 61, n. 1, p. 145-154, 2016.
- ABDEL-HAMID, A. M.; SOLBIATI, J. O.; CANN, I. K. O. Insights into lignin degradation and its potential industrial applications. In: **Advances in applied microbiology**. Academic Press, p. 1-28, 2013.
- ACHYUTHAN, K. E. et al. Supramolecular Self-Assembled Chaos: Polyphenolic Lignin's Barrier to Cost-Effective Lignocellulosic Biofuels. **Molecules**, v. 15, n. 12, p. 8641–8688, 29 nov. 2010.
- ALI, H. Biodegradation of synthetic dyes—a review. **Water, Air, & Soil Pollution**, v. 213, p. 251-273, 2010.
- ANASTAS, P. T.; WARNER, J. C. Principles of green chemistry. **Green chemistry: Theory and practice**, v. 29, p. 14821-42, 1998.
- ANDERSON, E. M.; STONE, M. L.; KATAHIRA, R.; REED, M.; MUCHERO, W.; RAMIREZ, K. J.; BECKHAM, G. T.; ROMÁN-LESHKOV, Y. **Differences in S/G ratio in 14 natural poplar variants do not predict catalytic depolymerization monomer yields**. Nature communications, v.10, 2019.
- ARDILA-LEAL, L. D. et al. A brief history of colour, the environmental impact of synthetic dyes and removal by using laccases. **Molecules**, v. 26, n. 13, p. 3813, 2021.
- ARMAROLI, N.; BALZANI, V. The legacy of fossil fuels. **Chemistry—An Asian Journal**, v. 6, n. 3, p. 768-784, 2011.
- ARORA, D. S.; RAMPAL, P. Laccase production by some *Phlebia* species. **Journal of Basic Microbiology: An International Journal on Biochemistry, Physiology, Genetics, Morphology, and Ecology of Microorganisms**, v. 42, n. 5, p. 295-301, 2002.
- AYED, L. et al. Decolorization and degradation of azo dye Methyl Red by an isolated *Sphingomonas paucimobilis*: biotoxicity and metabolites characterization. *Desalination*, v. 274, n. 1-3, p. 272-277, 2011.
- BALDRIAN, P. Fungal laccases—occurrence and properties. **FEMS microbiology reviews**, v. 30, n. 2, p. 215-242, 2006.
- BANAT, I. M. et al. Microbial decolorization of textile-dyecontaining effluents: a review. *Bioresource technology*, v. 58, n. 3, p. 217-227, 1996.

BARBIR, F.; VEZIROĞLU, T. N.; PLASS JR, H. J. Environmental damage due to fossil fuels use. **International journal of hydrogen energy**, v. 15, n. 10, p. 739-749, 1990.

BASTOS, V. D. Etanol, álcoolquímica e biorrefinaria. BNDES Setorial, Rio de Janeiro, n. 25, p. 5-38, mar. 2007.

BLACKWELL, M. The Fungi: 1, 2, 3... 5.1 million species?. *American journal of botany*, v. 98, n. 3, p. 426-438, 2011.

BOLLAG, J.; LEONOWICZ, A. Comparative studies of extracellular fungal laccases. **Applied and environmental microbiology**, v. 48, n. 4, p. 849-854, 1984.

BUGG, T. D .H.; RAHMANPOUR, R. Enzymatic conversion of lignin into renewable chemicals. **Current opinion in chemical biology**, v. 29, p. 10-17, 2015.

BUGG, T. D. H. et al. Pathways for degradation of lignin in bacteria and fungi. **Natural product reports**, v. 28, n. 12, p. 1883-1896, 2011.

CARLILE, M. J., WATKINSON, S. C. *The Fungi* academic press, 3º edição, p.87, 251-252, 264-266, 269-274, 1996.

CASTILLEJOS MÁRQUEZ, S. et al. Producción de lacasa a partir de hongos ligninolíticos utilizando vinazas y bagaso de origen mezcalero. **REPOSITORIO NACIONAL CONACYT**, 2015.

CEN, Q. et al. Green production of a yellow laccase by *Corioloropsis gallica* for phenolic pollutants removal. **AMB Express**, v. 12, n. 1, p. 96, 2022.

CHAUURASIA, P. K.; BHARATI, S. L.; SINGH, S. K. Comparative studies on the blue and yellow laccases. **Res Plant Sci**, v. 1, n. 2, p. 32-7, 2013.

CHOUDHURY, A. K. R. Introduction to enzymes. In: **Sustainable technologies for fashion and textiles**. Woodhead Publishing, 2020. p. 75-90.

CHUI, M.; METZKER, G.; BERNT, C. M.; TRAN, A. T.; BURTOLOSO, A. C. B.; FORD, P. C. **Probing the Lignin Disassembly Pathways with Modified Catalysts Based on Cu-Doped Porous Metal Oxides**. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, v.5, p. 3158 – 3169, 2017.

CONAB - Geadas e estiagem impactam a produção de cana-de-açúcar e derivados no país. **Conab Companhia Nacional de Abastecimento**, 2021. Disponível em <https://www.conab.gov.br/ultimas-noticias/4377-geadas-e-estiagem-impactam-a-producao-de-cana-de-acucar-e-derivados-no-pais> Acesso em: 10, fev. 2022.

COOKE, Wm Bridge. The genus *Phlebia*. **Mycologia**, v. 48, n. 3, p. 386-405, 1956.

COUTO, S. R. Dye removal by immobilised fungi. **Biotechnology advances**, v. 27, n. 3, p. 227-235, 2009.

CURTIS, R. A. et al. Protein-protein interactions in concentrated electrolyte solutions. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 79, n. 4, p. 367–380, 20 ago. 2002.

DANIEL, D. E. **Biodegradação anaeróbia de compostos derivados de lignina e xenobióticos**. 2014. Tese de Doutorado. Universidade da Beira Interior (Portugal).

DELLAMATRICE, P. M. et al. Decolourization of municipal effluent and sludge by *Pleurotus sajor-caju* and *Pleurotus ostreatus*. **World journal of microbiology and Biotechnology**, v. 21, p. 1363-1369, 2005.

DEVI, A., BAJAR, S., KOUR, H. et al. Lignocellulosic Biomass Valorization for Bioethanol Production: a Circular Bioeconomy Approach. *Bioenerg. Res.* (2022).

DONG, X.; ZHOU, J.; LIU, Y. Peptone-induced biodecolorization of reactive brilliant blue (KN-R) by *Rhodocyclus gelatinosus* XL-1. *Process Biochemistry*, v. 39, n. 1, p. 89-94, 2003.

DOS SANTOS, M. B. C.; SCARPASSA, J. A.; MONTEIRO, D. A.; LADINO-ORJUELA, G.; DA SILVA, R.; BOSCOLO, M.; GOMES, E. Evaluation of the tolerance and biotransformation of ferulic acid by *Klebsiella pneumoniae* TD 4.7. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.52, n.3, p.1181-1190, 2021.

DUONG-LY, K. C.; GABELLI, S. B. Salting out of proteins using ammonium sulfate precipitation. In: **Methods in enzymology**. Academic Press, 2014. p. 85-94.

EISENTHAL, R.; DANSON, M. J. (Ed.). Enzyme assays: a practical approach. Practical Approach (Paperback), 2002

FABBRINI, M.; GALLI, C.; GENTILI, P. **Comparing the catalytic efficiency of some mediators of laccase**: Journal Of Molecular Catalysis B: Enzymatic. 16: 231-240 p. 2002.

FARINAS, C. S. A parede celular vegetal e as enzimas envolvidas na sua degradação. **Embrapa Instrumentação-Documentos (INFOTECA-E)**, 2011.

FARROW, A.; MILLER, K.A.; MYLLYVIRTA, L. **Toxic air: The price of fossil fuels**. Greenpeace Southeast Asia, p.44, 2020.

FENGEL, D.; WEGENER, G. **Wood Chemistry, Ultrastructure, Reactions**. Berlin: Walter de Gruyter, 1989.

FERNANDES, C.; LALITHA, V. S.; RAO, K. V. K. Enhancing effect of malachite green on the development of hepatic pre-neoplastic lesions induced by N-nitrosodiethylamine in rats. **Carcinogenesis**, v. 12, n. 5, p. 839-845, 1991.

FERNANDES, I.B.R. et al. As enzimas negligenciadas associadas a degradação da lignina em fungos. 2020.

FOROOTANFAR, H. et al. Synthetic dye decolorization by three sources of fungal laccase. *Iranian journal of environmental health science & engineering*, v. 9, p. 1-10, 2012.

GARCIA, M. B. Culturas enriquecidas para degradação de lignina: diversidade microbiana e triagem de biblioteca metagenômica. Dissertação (Mestrado). Universidade Católica de Brasília, Brasília, 2019.

GARCIA, T. A.; SANTIAGO, M. F.; ULHOA, C. J. Properties of laccases produced by *Pycnoporus sanguineus* induced by 2, 5-xylydine. **Biotechnology letters**, v. 28, n. 9, p. 633-636, 2006.

GARCIA, T. A.; SANTIAGO, Mariângela Fontes; ULHOA, Cirano José. Studies on the *Pycnoporus sanguineus* CCT-4518 laccase purified by hydrophobic interaction chromatography. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 75, p. 311-318, 2007.

GIARDINA, P. et al. Laccases: a never-ending story. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 67, n. 3, p. 369-385, 2010.

GILBERTSON, R.L.; RYVARDEN, L. North American Polypores, p. 1-885, 1987.

GIMENES, L. J.; ROBERTO, D. Fungos Basidiomicetos. **Apostila do Curso de Capitação de Monitores e Educadores**, 2010.

GODFREY, T.; REICHEL, J. R. Introduction to industrial Enzymology. 1983.

GOLDEMBERG, J. The Role of Biomass in the World's Energy System. In: BUCKERIDGE, M. S. e GOLDMAN, G. H. (Ed.). **Routes to Cellulosic Ethanol: Springer New York**, 2011. cap. 1, p.3-14.

GU, C. et al. Engineering the Expression and Characterization of Two Novel Laccase Isoenzymes from *Coprinus comatus* in *Pichia pastoris* by Fusing an Additional Ten Amino Acids Tag at N-Terminus. **PloS one**, v. 9, n. 4, p. e93912, 2014.

GUPTA, V. K. et al. Adsorption kinetics and column operations for the removal and recovery of malachite green from wastewater using bottom ash. **Separation and purification technology**, v. 40, n. 1, p. 87-96, 2004.

HARWOOD, C. S.; PARALES, R. E. The β -ketoadipate pathway and the biology of self-identity. **Annual review of microbiology**, v. 50, n. 1, p. 553-590, 1996.

HE, F. Bradford protein assay. **Bio-protocol**, p. e45-e45, 2011.

HENDERSON, A. L. et al. Reduction of malachite green to leucomalachite green by intestinal bacteria. **Applied and environmental microbiology**, v. 63, n. 10, p. 4099-4101, 1997.

HERNÁNDEZ-ORTEGA, A.; FERREIRA, P.; MARTÍNEZ, A. T. Fungal arylalcohol oxidase: A peroxide-producing flavoenzyme involved in lignin degradation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 93, n. 4, p. 1395– 1410, 2012.

HILDÉN, K.; HAKALA, T. K.; LUNDELL, T. Thermotolerant and thermostable laccases. **Biotechnology letters**, v. 31, p. 1117-1128, 2009.

HU, X. et al. Influence of temperature, pH and metal ions on guaiacol oxidation of purified laccase from *Leptographium qinlingensis*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 30, p. 1285-1290, 2014.

HUANG, D.; ZENG, G.; FENG, C.; HU, S.; LAI, C.; ZHAO, M.; SU, F.; TANG, L.; LIU, H. **Changes of microbial population structure related to lignin degradation during lignocelulosic waste composting**. *Bioresource Technology*, v. 101, p. 4062-4067, 2010.

IRACHETA-CÁRDENAS, M. M. et al. A *Pycnoporus sanguineus* laccase for denim bleaching and its comparison with an enzymatic commercial formulation. **Journal of environmental management**, v. 177, p. 93-100, 2016.

JAVAID, R.; SABIR, A.; SHEIKH, N.; FERHAN, M. **Recent Advances in Applications of Acidophilic Fungi to Produce Chemicals**. *Molecules*, v.24, p. 786, 2018.

KAMIMURA, N. et al. Advances in microbial lignin degradation and its applications. **Current opinion in biotechnology**, v. 56, p. 179-186, 2019.

KIRK, T. K.; CULLEN, D. Enzymology and molecular genetics of wood degradation by white-rot-fungi. *Environmentally Friendly Technologies for the Pulp and Paper Industry*, New York, p.273-308, 1998.

KOKKONEN, P. et al. Substrate inhibition by the blockage of product release and its control by tunnel engineering. **RSC chemical biology**, v. 2, n. 2, p. 645-655, 2021.

LEGERSKÁ, B.; CHMELOVÁ, D.; ONDREJOVIČ, M. Degradation of synthetic dyes by laccases—a mini-review. **Nova Biotechnol. Chim**, v. 15, n. 1, p. 90-106, 2016.

LELLIS, B. et al. Effects of textile dyes on health and the environment and bioremediation potential of living organisms. **Biotechnology Research and Innovation**, v. 3, n. 2, p. 275-290, 2019.

LEONTIEVSKY, A. et al. Yellow' laccase of *Panus tigrinus* oxidizes non-phenolic substrates without electron-transfer mediators. **FEBS letters**, v. 413, n. 3, p. 446-448, 1997.

LITTHAUER, D. et al. Purification and kinetics of a thermostable laccase from *Pycnoporus sanguineus* (SCC 108). **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, n. 4, p. 563-568, 2007.

LIU, W. et al. Biodecolorization of azo, anthraquinonic and triphenylmethane dyes by white-rot fungi and a laccase-secreting engineered strain. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 31, n. 3, p. 127-132, 2004.

LU, L. et al. Purification and characterization of laccase from *Pycnoporus sanguineus* and decolorization of an anthraquinone dye by the enzyme. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 74, p. 1232-1239, 2007.

MACIEL, G. M. et al. Fundamentals, diversity and application of white-rot fungi. Fungi: Types, Environmental Impact and Role in Disease. New York: Nova Science Publishers, v. 1, p. 1-52, 2012.

MÄKI-ARVELA, P.; SALMI, T.; HOLMBOM, B.; WILLFÖR, S.; MURZIN, D. Y. Synthesis of Sugars by Hydrolysis of Hemicelluloses- A Review. **Chemical Reviews**, v. 111, n. 9, p. 5638-5666, 2011.

MARTÍN, C.; KLINKE, H. B.; THOMSEN, A. B.. Wet oxidation as a pretreatment method for enhancing the enzymatic convertibility of sugarcane bagasse. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, n. 3, p. 426-432, 2007.

MARTINEZ, A. T. et al. Biodegradation of lignocellulosics : microbial, chemical, and enzymatic aspects of the fungal attack of lignin. **International Microbiology**, v. 8, p. 195–204, 2005.

MAYER, A. M.; STAPLES, R. C. Laccase: new functions for an old enzyme. **Phytochemistry**, v. 60, n. 6, p. 551-565, 2002.

MENEZES, C. B.; BONUGLI-SANTOS, R. C.; MIQUELETTTO, P. B.; PASSARINI, M. R.; SILVA, C. H.; JUSTO, M. R.; LEAL, R. R.; FANTINATTI-GARBOGGINI, F.; OLIVEIRA, V. M.; BERLINCK, R. G.; SETTE, L. D. Microbial diversity associated with algae, ascidians and sponges from the north coast of São Paulo state, Brazil. **Microbiol Res**, v. 165, n. 6, p. 466-482, 2010.

MESSERSCHMIDT, A. (Ed.). **Multi-copper oxidases**. World Scientific, 1997.

MEYER, U. Biodegradation of synthetic organic colorants. **Microbial degradation of xenobiotics and recalcitrant compounds**, p. 371-385, 1981.

MOOD, S. H. et al. Lignocellulosic biomass to bioethanol, a comprehensive review with a focus on pretreatment. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 27, p. 77-93, 2013.

MOREIRA, L. R. D. S. **Xilanases produzidas por *Aspergillus terreus***: Caracterização, degradação de biomassa lignocelulósica e efeito de compostos fenólicos. 2013. 272 p. Dissertação de Mestrado em Biologia Molecular, Universidade de Brasília, Brasília, 2013.

MURUGESAN, K. et al. Enhanced transformation of malachite green by laccase of *Ganoderma lucidum* in the presence of natural phenolic compounds. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 82, p. 341-350, 2009.

NASEEM, K. et al. Removal of Congo red dye from aqueous medium by its catalytic reduction using sodium borohydride in the presence of various inorganic nano-catalysts: a review. **Journal of cleaner production**, v. 187, p. 296-307, 2018.

NIKU-PAAVOLA, M. L. et al. Ligninolytic enzymes of the white-rot fungus *Phlebia radiata*. **Biochemical Journal**, v. 254, n. 3, p. 877-884, 1988.

NOBLES, M.K.; FREW, B.P. Studies in wood-inhabiting Hymenomycetes V. The genus *Pycnoporus* Karst. **Canadian Journal of Botany**, p. 987-1016, 1962.

NOZAKI, K. et al. Screening and investigation of dye decolorization activities of basidiomycetes. **Journal of bioscience and bioengineering**, v. 105, n. 1, p. 69-72, 2008.

ORLIKOWSKA, M. et al. Structural studies of two thermostable laccases from the white-rot fungus *Pycnoporus sanguineus*. **International journal of biological macromolecules**, v. 107, p. 1629-1640, 2018.

PANDEY, A.; SINGH, P.; IYENGAR, L. Bacterial decolorization and degradation of azo dyes. **International biodeterioration & biodegradation**, v. 59, n. 2, p. 73-84, 2007.

PAZ, A. et al. Biological treatment of model dyes and textile wastewaters. **Chemosphere**, v. 181, p. 168-177, 2017.

PEDROSO, D. D. **Enzimas oxidorreduções do fungo *Pestalotiopsis* sp.** 2011. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

PERALTA, R. M. et al. Enzymes from basidiomycetes—peculiar and efficient tools for biotechnology. In: *Biotechnology of microbial enzymes*. Academic Press, 2017.

PEREIRA, J. C. Estudo da produção de ligninases e celulases pelo fungo *Pycnoporus sanguineus* MCA 16 e uso dos extratos enzimáticos na sacarificação do bagaço de cana-de-açúcar para produção de bioetanol, 2018.

PEREIRA, L. et al. Environmentally friendly bleaching of cotton using laccases. **Environmental Chemistry Letters**, v. 3, n. 2, p. 66-69, 2005.

PEREIRA, L.; ALVES, M. Dyes—environmental impact and remediation. **Environmental protection strategies for sustainable development**, p. 111-162, 2012.

PEZZELLA, C.; GUARINO, L.; PISCITELLI, A. How to enjoy laccases. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 72, n. 5, p. 923-940, 2015.

PINTO, F. F. Degradação de madeiras por fungos: aspectos biotecnológicos e de biorremediação. 2006.

PIONTEK, K.; ANTORINI, M.; CHOINOWSKI, T. Crystal structure of a laccase from the fungus *Trametes versicolor* at 1.90-Å resolution containing a full complement of coppers. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 40, p. 37663-37669, 2002.

PLÁCIDO, J.; CAPAREDA, S. Ligninolytic enzymes: a biotechnological alternative for bioethanol production. **Bioresources and Bioprocessing**, v. 2, n. 1, p. 1-12, 2015.

POINTING, S. B.; JONES, E. B. G.; VRIJMOED, L. L. P. Optimization of laccase production by *Pycnoporus sanguineus* in submerged liquid culture. **Mycologia**, v. 92, n. 1, p. 139-144, 2000.

POINTING, S. Bx; VRIJMOED, L. L. P. Decolorization of azo and triphenylmethane dyes by *Pycnoporus sanguineus* producing laccase as the sole phenoxidase. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 16, p. 317-318, 2000.

RAHMINI, A., AZARPIRA, A., KIM, H., RALPH, J., STAHL, S. S. **Chemoselective Metal-Free Aerobic Alcohol Oxidation in Lignin**. Journal of The American Chemical Society, v. 135, n. 17, p. 6415-6418, 2013.

RAMÍREZ-CAVAZOS, L. I. et al. Purification and characterization of two thermostable laccases from *Pycnoporus sanguineus* and potential role in degradation of endocrine disrupting chemicals. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 108, p. 32-42, 2014.

RHODES, D. G.; BOSSIO, R. E.; LAUE, T. M. Determination of size, molecular weight, and presence of subunits. **Methods Enzymol**, v. 463, p. 691-723, 2009.

RINALDI, R. et al. Paving the way for lignin valorization: recent advances in bioengineering, biorefining and catalysis. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 55, n. 29, p. 8164-8215, 2016.

RIVA, S. Laccases: blue enzymes for green chemistry. **TRENDS in Biotechnology**, v. 24, n. 5, p. 219-226, 2006.

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

ROUTOULA, E.; PATWARDHAN, S. V. Degradation of anthraquinone dyes from effluents: a review focusing on enzymatic dye degradation with industrial potential. **Environmental science & technology**, v. 54, n. 2, p. 647-664, 2020.

RYVARDEN, L. et al. A preliminary polypore flora of East Africa. **A preliminary Polypore flora of East Africa.**, 1980.

SANTOS, S. X. Diversidade, isolamento em cultura e perfil enzimático de fungos decompositores de madeira da Estação Ecológica do Noroeste Paulista - São José do Rio Preto-Mirassol, SP. 222 f. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" Instituto de Biociências (Campus de Rio Claro). Rio Claro. (98/10858-0), 2003.

SAQIB, A. A. N. et al. A thermostable crude endoglucanase produced by *Aspergillus fumigatus* in a novel solid state fermentation process using isolated free water. **Enzyme Research**, v. 2012, 2012.

SAQIB, A. A. N. et al. Thermostability of crude endoglucanase from *Aspergillus fumigatus* grown under solid state fermentation (SSF) and submerged fermentation (SmF). **Process Biochemistry**, v. 45, n. 5, p. 641–646, 2010.

SEE, Y. P.; JACKOWSKI, G. Estimating molecular weight of polypeptides by SDS gel electrophoresis. In: (Ed.). Protein Structure: A practical approach. Oxford: IRL Press, 1990. p.1-22.

SHARMA, D. et al. A novel laccase from newly isolated *Cotylidia pannosa* and its application in decolorization of synthetic dyes. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 4, n. 4, p. 661-666, 2015.

SIDDIQUI, K. S. et al. Thermostabilization of carboxymethylcellulase from *Aspergillus niger* by carboxyl group modification. **Biotechnology Letters**, v. 19, n. 4, p. 325–330, 1997.

SIDDIQUI, S. I. et al. Investigation of Congo Red Toxicity towards Different Living Organisms: A Review. **Processes**, v. 11, n. 3, p. 807, 2023.

SIGOILLOT, J-C. et al. Fungal strategies for lignin degradation. **Advances in botanical research**, v. 61, p. 263-308, 2012.

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

SLOKAR, Y. M.; LE MARECHAL, A. M. Methods of decoloration of textile wastewaters. Dyes and pigments, v. 37, n. 4, p. 335-356, 1998.

SUWANNAWONG, P.; KHAMMUANG, S.; SARNTHIMA, R. Decolorization of rhodamine B and congo red by partial purified laccase from *Lentinus polychrous* Lév. **Journal of Biochemical Technology**, v. 2, n. 3, p. 182-186, 2010.

TAKADA, D.; EHARA, K.; SAKA, S. **Gas chromatographic and mass spectrometric (GC-MS) analysis of lignina-derived products from Cryptomeria japonica treated in supercritical water**. Journal of Wood Science, v.50, p. 253-259, 2004.

TORRES, E.; BUSTOS-JAIMES, I.; LE BORGNE, S. Potential use of oxidative enzymes for the detoxification of organic pollutants. **Applied Catalysis B: Environmental**, v. 46, n. 1, p. 1-15, 2003.

TROVASLET, M. et al. Potential of a *Pycnoporus sanguineus* laccase in bioremediation of wastewater and kinetic activation in the presence of an anthraquinonic acid dye. **Enzyme and microbial technology**, v. 41, n. 3, p. 368-376, 2007.

TZANOV, T. et al. Laccases to improve the whiteness in a conventional bleaching of cotton. **Macromolecular materials and engineering**, v. 288, n. 10, p. 807-810, 2003.

UZAN, Eva et al. High redox potential laccases from the ligninolytic fungi *Pycnoporus coccineus* and *Pycnoporus sanguineus* suitable for white biotechnology: from gene cloning to enzyme characterization and applications. **Journal of Applied Microbiology**, v. 108, n. 6, p. 2199-2213, 2010.

VAIDYA, A. A. Environmental pollution during chemical processing of synthetic fibers. **Colourage**, v. 14, p. 3-10, 1982.

VARGAS, J.; MORELATO, L. H. T.; ORTEGA, J. O.; BOSCOLO, M.; METZKER, G. **Upgrading 1-butanol to unsaturated, carbonyl and aromatic compounds: a new synthesis approach to produce important organic building blocks**. *Green Chemistry*, v.22, p. 2365-2369, 2020.

WANG, Z.-X. et al. Purification and characterization of two thermostable laccases with high cold adapted characteristics from *Pycnoporus* sp. SYBC-L1. **Process Biochemistry**, v. 45, n. 10, p. 1720-1729, 2010.

WIERZBICKI, M. P.; MALONEY, V.; MIZRACHI, E.; MYBURG, A. A. Xylan in the Middle: Understanding Xylan Biosynthesis and Its Metabolic Dependencies Toward Improving Wood Fiber for Industrial Processing. v. 10, n. 176, p., 2019.

WOOD, T. M.; BHAT, K. M. Methods for measuring cellulase activities. In: **Methods in Enzymology**. [s.l.] Elsevier, 1988. v. 160p. 87–112.

XU, F. Effects of redox potential and hydroxide inhibition on the pH activity profile of fungal laccases. **Journal of biological chemistry**, v. 272, n. 2, p. 924-928, 1997.

XU, Z.; LEI, P.; ZHAI, R.; WEN, Z.; JIN, M. **Recent advances in lignin valorization with bacterial cultures: microorganism, metabolic pathway, and bio-products**. *Biotechnology for Biofuels*, v.12, p. 19, 2019.

YANG, H. et al. Potential of acetylacetone as a mediator for *Trametes versicolor* laccase in enzymatic transformation of organic pollutants. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, p. 10882-10889, 2015.

ZAKZESKI, J. et al. The catalytic valorization of lignin for the production of renewable chemicals. **Chemical reviews**, v. 110, n. 6, p. 3552-3599, 2010.

ZHUO, R. et al. Decolorization of different dyes by a newly isolated white-rot fungi strain *Ganoderma* sp. En3 and cloning and functional analysis of its laccase gene. **Journal of hazardous materials**, v. 192, n. 2, p. 855-873, 2011.

ZHUO, R. et al. The roles of *Pleurotus ostreatus* HAUCC 162 laccase isoenzymes in decolorization of synthetic dyes and the transformation pathways. **Chemosphere**, v. 234, p. 733-745, 2019.

ZIMBARDI, A. LRL et al. A high redox potential laccase from *Pycnoporus sanguineus* RP15: potential application for dye decolorization. **International journal of molecular sciences**, v. 17, n. 5, p. 672, 2016.

ZOLLINGER, H. Azo dyes and pigments. **Colour Chemistry-Synthesis, Properties and Applications of Organic Dyes and Pigments**, p. 92-100, 1987.

ZUCCA, P. et al. Fungal laccases as tools for biodegradation of industrial dyes. **Biocatalysis**, v. 1, n. 1, p. 82-108, 2016.