

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**IDENTIFICAÇÃO DE NOVAS ENZIMAS DE BIBLIOTECAS
METAGENÔMICAS COM APLICAÇÃO BIOTECNOLÓGICA
PARA A AGROINDÚSTRIA**

Natália Sarmanho Monteiro Lima
Engenheira Agrônoma

2022

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**IDENTIFICAÇÃO DE NOVAS ENZIMAS DE BIBLIOTECAS
METAGENÔMICAS COM APLICAÇÃO BIOTECNOLÓGICA PARA A
AGROINDÚSTRIA**

Natália Sarmanho Monteiro Lima
Orientadora: Prof^a. Dr^a. Eliana G. de Macedo Lemos

Tese apresentada à Faculdade de
Ciências Agrárias e Veterinárias –
UNESP, Câmpus de Jaboticabal, como
parte das exigências para obtenção do
título de Doutor em Microbiologia
Agropecuária

2022

L732i Lima, Natalia Sarmanho Monteiro
Identificação de novas enzimas de bibliotecas metagenômicas com
aplicação biotecnológica para a agroindústria / Natalia Sarmanho
Monteiro Lima. -- Jaboticabal, 2022
112 p.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp),
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal
Orientadora: Eliana Gertrudes de Macedo Lemos

1. Enzimas. 2. Proteínas Recombinantes. 3. Biorremediação. 4.
Lacase. 5. Biomassa vegetal. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de
Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: IDENTIFICAÇÃO DE NOVAS ENZIMAS DE BIBLIOTECAS METAGENÔMICAS COM APLICAÇÃO BIOTECNOLÓGICA PARA A AGROINDÚSTRIA

AUTORA: NATÁLIA SARMANHO MONTEIRO LIMA

ORIENTADORA: ELIANA GERTRUDES DE MACEDO LEMOS

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em MICROBIOLOGIA AGROPECUÁRIA, pela Comissão Examinadora:



Profa. Dra. ELIANA GERTRUDES DE MACEDO LEMOS (Participação Virtual)
Departamento de Tecnologia / FCAV - UNESP - Jaboticabal



Dr. LUIZ ALBERTO COLNAGO (Participação Virtual)
Embrapa Instrumentação / Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - São Carlos



Profa. Dra. LUCIANA MARIA SARAN (Participação Virtual)
Departamento de Tecnologia / FCAV / UNESP - Jaboticabal



Prof. Dr. ACACIO APARECIDO NAVARRETE (Participação Virtual)
UFMS - Campus de Chapadão do Sul / Chapadão do Sul/MS



Prof. Dr. GUSTAVO ORLANDO BONILLA RODRIGUEZ (Participação Virtual)
Departamento de Química e Ciências Ambientais / UNESP/Câmpus de São José do Rio Preto

Jaboticabal, 18 de março de 2022

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Natália Sarmanho Monteiro Lima – Nascida em 19 de dezembro de 1991, em Parnaíba, Piauí. Iniciou sua graduação em março de 2010 no curso de Agronomia pela Universidade Federal do Amazonas, na cidade de Manaus, AM, concluindo-o em Julho de 2015. Em agosto de 2015 ingressou no curso de Mestrado em Microbiologia Agropecuária, na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – FCAV/UNESP, na cidade de Jaboticabal sob a orientação da Prof^a. Dr^a. Eliana G. de Macedo Lemos e obteve o título de mestre em 2017. No mesmo ano foi aprovada no curso de Doutorado em Microbiologia Agropecuária sob a orientação da Prof^a. Dr^a. Eliana G. de Macedo Lemos e em março de 2022 obteve o título de Doutora em Microbiologia Agropecuária.

Dos nossos medos nascem as nossas coragens e nas nossas dúvidas vivem as nossas certezas. Os sonhos anunciam outra realidade possível e os delírios, outra razão. Nas perdas, nos esperamos os encontros, porque é preciso perder-se para se encontrar.

Eduardo Galeano

DEDICATÓRIA

Dedico primeiramente a **Deus!** Gratidão sempre!

Aos meus pais, vocês são as pessoas que mais amo nesse mundo. Meus maiores exemplos, meus melhores amigos e meus amores. Agradeço imensamente o incentivo, esforço e apoio, sem vocês isso não teria o menor sentido. Essa é a realização de um sonho que sonhei com vocês.

Mainha/Mãezinha, à senhora todo meu amor, pois nós duas sabemos que o caminho não foi fácil.

Pai/Papai, o senhor é meu maior exemplo de honestidade e trabalho, tenha toda certeza de que foi de tanto te admirar que escolhi esse caminho. Te amo!

Aos meus irmãos **Mariana, Emiliano e Otávio**, apesar da distância meu amor por vocês é gigantesco. Essa conquista também é de vocês.

As famílias **de Oliveira Monteiro e Sarmanho da Costa Lima**, os meus mais sinceros agradecimentos pela compreensão nos momentos que estive ausente e pelo amor que sempre recebi de vocês. Dedico à **Marilda, Alfredo, Venilton, Lenisa, Manuel, Tereza, Laurimar, Lincoln e Verônica. Para todos os meus tios e primos.**

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora **Prof^a. Dr^a. Eliana Lemos** pela confiança, apoio, exemplo e por ter me recebido com tanto amor e carinho.

À **Dr^a. Elisângela Gomes-Pepe**, por todo apoio e confiança. Aprendi e aprendo muito com você.

Ao **Dr. João Carlos Capanharo**, pela alegria, amizade e carinho que recebi todos os dias. Com você o trabalho se torna mais divertido.

À **Michelli Funnicelli, Bárbara Bonfá, Tatiane Leonel e Pâmela Maldaner** pela companhia diária, dentro e fora do laboratório, o apoio nos momentos de desespero e as diversas risadas compartilhadas.

À toda **equipe do LBMP**, pelo convívio diário, amizade, carinho e troca de conhecimento. Vocês contribuíram muito para o meu crescimento pessoal e profissional.

À **Vanessa Santos (minha irmã da vida), Roberta Mendes, Luan Adames, Gabriela Cabral, Milena Constâncio, Gabriella Cavazzini, Stéfane Faria e Laiana Bentes** pela companhia, os abraços sinceros, apoio e pelas diversas vezes que nos reunimos para chorar e no fim acabávamos rindo (e muito). Vocês foram minha família e guardo cada momento no meu coração.

Ao professor **Dr. João Martins Pizauro Júnior** e ao **LEIA** pelo apoio técnico.

Ao **Dr. Luis Alberto Colnago – EMBRAPA Instrumentação** e **Dr. Flávio Kock** pela realização das análises de RMN e auxílio nas interpretações dos dados.

Ao **Ebson Silva**, por ter sido minha companhia, meu amigo e muitas vezes meu auxiliar de laboratório (risos). Por todas as vezes que quis chorar e você me deu a mão para continuar. Muito obrigada. Te amo!

Ao programa de **Pós - Graduação em Microbiologia Agropecuária** da UNESP/FCAV.

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

Enfim, a todos que de alguma forma contribuíram para essa jornada o meu muito obrigada!

SUMÁRIO

RESUMO	iv
ABSTRACT	v
LISTA DE ABREVIATURAS	vi
Capítulo 1- Considerações Gerais.....	1
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1 Utilização de enzimas microbianas na indústria	3
2.2 Controle Biológico e uso de enzimas	4
2.2.1 Lipases (E.C 3.1.1.3)	6
2.2.2 Quitinase (EC 3.2.1.14)	6
2.2.3 Betaglucanase (EC 3.2.1)	7
2.2.4 Peptidase (E.C 3.4)	7
2.3 Contaminação por pesticidas agrícolas e biorremediação	7
2.3.1 Enzimas envolvidas na biorremediação de pesticidas	9
2.4 Biorrefinaria e produção de etanol de segunda geração.....	12
2.4.1 Enzimas envolvidas na degradação da biomassa vegetal	13
2.5 Metagenômica associada a descobertas de novas enzimas funcionais para agricultura	15
3. REFERÊNCIAS.....	18
Capítulo 2 – Dinâmica da atuação de LacMeta na degradação completa e detoxificação do verde de malaquita.....	24
1. INTRODUÇÃO	26
1.1 Verde de Malaquita (VM).....	26
1.2 Biorremediação	28
2. MATERIAL E MÉTODOS	30
2.1 Expressão enzimática, purificação da LacMeta e restituição da atividade (holoenzima)	30
2.2 Análise de UV-Visível e descoloração do verde de malaquita	31
2.3 Ensaio enzimático.....	31
2.3.1 Efeito do pH e da temperatura na descoloração do verde de malaquita	31
2.3.2 Efeitos de aditivos na descoloração do Verde de Malaquita	32
2.3.3 Ensaio de Fitotoxicidade	32
2.3.4 Ensaio de citotoxicidade.....	32
2.3.4 Análise de Ressonância Magnética Nuclear (H-RMN).....	33

2.3.5 Análise Estatística	33
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
3.1 LacMeta apresenta melhor atividade de descoloração em meio levemente ácido (pH 5-6,5) e temperaturas relativamente elevadas (50-60 °C)	33
3.2 O processo de descoloração enzimática por LacMeta apresenta resistência a solventes, detergentes, íons e NaCl.....	35
3.3 Capacidade da LacMeta em detoxificar o verde de malaquita.....	40
3.4 Potencial de descoloração/degradação enzimática de LacMeta	44
3.5 Espectros de H-RMN	46
4. CONCLUSÕES	47
5. REFERÊNCIAS.....	48
Capítulo 3 –Biodegradação de hidróxido de fentina e imazapic por LacMeta.....	54
1. INTRODUÇÃO	55
2. MATERIAL E MÉTODOS	58
2.1 Fluxograma de trabalho	58
2.2 Forma de aplicação de LacMeta para o tratamento dos pesticidas	58
2.2.1 Hidróxido de fentina – Mertin 400®	58
2.2.2 Imizapic – Plateau®	59
2.3 Ensaio de biodegradação.....	59
2.3.1 Detoxificação do hidróxido de fentina por LacMeta	59
2.3.2 Efeito do herbicida Imazapic sobre o crescimento da E.coli + lacmeta.....	61
2.3.3 Atividade enzimática da LacMeta sob efeito do Imazapic	61
2.3.4 Avaliação da degradação dos pesticidas por espectroscopia molecular U.V visível.....	61
3. Resultados e discussão	62
3.1 Hidróxido de fentina.....	62
3.3 Atividade enzimática de lacase exposta a hidróxido de fentina e Imazapic.....	66
3.4 Análise de U. V visível da degradação de hidróxido de fentina e Imazapic.....	71
4. CONCLUSÕES	76
5. REFERÊNCIAS.....	77
INTRODUÇÃO	81
1.1 Feruloil esterase.....	81
1.2 Utilização das feruloil esterases para produção de etanol de segunda geração	81
2.1 Prospecção de genes de putativas feruloil esterases.....	82
2.2 Análises da sequência ORF FaeC7.....	83
2.4 Ensaio de expressão, super expressão e extração das proteínas recombinantes	84

2.5 Atividade de esterase em placa	85
2.6 Análise por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) e zimograma ...	85
2.7 Atividade de esterase e tanase	85
3. RESULTADOS e DISCUSSÃO	86
3.1 Análise da sequência e predição de características de FaeC7.....	86
3.2 Expressão, obtenção dos extratos solúveis e <i>screening</i> de atividade de Fae07	90
3.3 Atividade enzimática de tanase.....	91
4. CONCLUSÕES	94
5. REFERÊNCIAS.....	95
Capítulo 5 – Considerações finais	98

IDENTIFICAÇÃO DE NOVAS ENZIMAS DE BIBLIOTECAS METAGENÔMICAS COM APLICAÇÃO BIOTECNOLÓGICA PARA A AGROINDÚSTRIA

RESUMO

O desenvolvimento de novas tecnologias e novas abordagens para aumento da produtividade e melhoria das áreas cultivadas é uma busca constante. A utilização de enzimas de microrganismos é uma alternativa para alguns problemas encontrados no agronegócio, como utilização de resíduos agrícolas, controle biológico de pragas e doenças e biorremediação de defensivos agrícolas/pesticidas. As lacases e feruloil esterases são enzimas de grande importância biotecnológica. A metagenômica tem se mostrado bastante eficiente na busca de novos genes codificadores de proteínas/enzimas e a tecnologia do DNA recombinante facilita o acesso a esses genes. LacMeta é uma lacase metagenômica, que possui potencial para degradação de corantes, conforme resultados preliminares obtidos. Neste trabalho resolvemos aprofundar o estudo da aplicação biotecnológica desta enzima para biorremediação de outros compostos xenobióticos, visando determinar os parâmetros ótimos de reação bem como avaliar o potencial de detoxificação dos resíduos tratados. Para esta abordagem foram escolhidos o verde de malaquita (VM), amplamente utilizado na aquicultura apesar de proibições vigentes por diversas normas ambientais; o hidróxido de fentina (fungicida) e o imazapic (herbicida), ambos defensivos agrícolas largamente utilizados em monoculturas, visando verificar o potencial catalítico e mecanismos bioquímicos de atuação da LacMeta. Os resultados obtidos comprovaram a eficiência da LacMeta na detoxificação dos xenobióticos, sobretudo no que diz respeito a sua atuação na degradação completa do VM em 48 h, resultando em metabólitos inertes de acordo com os resultados de fitotoxicidade e citotoxicidade. Além disso, visando fomentar novos estudos de aplicação na degradação de resíduos agrícolas, prospectamos uma feruloil esterase (FAE) em bancos de dados metagenômicos. Esta enzima atua na degradação de ácidos hidroxinâmicos presentes na biomassa lignocelulósica. A nova FAE foi identificada como do tipo C. Análises preliminares da enzima em extrato celular solúvel bruto indicaram que a FeaC7 apresentou atividade enzimática positiva para esterase e tanase. Em conjunto, os resultados deste trabalho demonstram que, as enzimas metagenômicas LacMeta e FaeC7 possuem elevado potencial biotecnológico para aplicação na agroindústria, uma vez que podem atuar na degradação de resíduos agrícolas e na biorremediação de pesticidas.

Palavras-chaves: lacase, feruloil esterase, biorrefinaria, biorremediação

IDENTIFICATION OF NEW ENZYMES FROM METAGENOMIC LIBRARIES WITH BIOTECHNOLOGICAL APPLICATION FOR AGRIBUSINESS

ABSTRACT

The development of new technologies and new approaches to increase productivity and improve cultivated areas is a constant search. The use of enzymes from microorganisms is an alternative for some problems encountered in agribusiness, such as the use of agricultural residues, biological control of pests and diseases and bioremediation of agricultural pesticides/pesticides. Laccases and feruloyl esterases are enzymes of great biotechnological importance. Metagenomics has proved to be quite efficient in the search for new genes encoding proteins/enzymes, and recombinant DNA technology facilitates access to these genes. LacMeta is a metagenomic laccase, which has the potential for dye degradation, according to preliminary preliminary results obtained in my master's thesis. In this work we decided to deepen the study of the biotechnological application of this enzyme for the bioremediation of other xenobiotic compounds, aiming to determine the optimal reaction parameters as well as to evaluate the detoxification potential of the treated residues. Malachite green (VM) was chosen for this approach, widely used in aquaculture despite bans in force by various environmental authorities; fentin hydroxide (fungicide) and imazapic (herbicide), both pesticides widely used in monocultures with high persistence of environmental residues, aiming to verify the catalytic potential and biochemical mechanisms of action of LacMeta. The results obtained proved the efficiency of LacMeta in the detoxification of xenobiotics, especially with regard to its action in the complete degradation of VM in 48 h, resulting in inert metabolites according to the phytotoxicity and cytotoxicity results. Furthermore, in order to promote new application studies in the degradation of agricultural residues, we prospected a feruloyl esterase (FAE) in metagenomic databases, an enzyme that acts on the degradation of hydroxynamic acids present in lignocellulosic biomass. The new FAE was identified as type C. Preliminary analysis of the enzyme in crude soluble cell extract indicated that FeaC7 showed positive enzymatic activity for esterase and tannase. Together, the results of this work demonstrate that the metagenomic enzymes LacMeta and FeaC7 have a high biotechnological potential for application in the agroindustry, since they can act in the degradation of agricultural residues and in the bioremediation of pesticides.

Keywords: laccase, feruloyl esterase, biorefinery, bioremediation

LISTA DE ABREVIATURAS

ABTS: 2,2-Azino-bis-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato)
Bis-tris: 2,2-Bis(hidroximetil)-2,2',2"-nitrilotrietanol
DNA: ácido desoxirribonucleico
DO: densidade óptica
DTT: ditionitrito
EC: "Enzyme Commission"
IPTG: isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo
IUBMB: União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular
kDa: kilodaltons
LB: Luria Bertani
NCBI: "National Center for Biotechnology Information"
ORF: Open Reading Frame
m/v: peso por volume
pb: pares de bases
PCR: reação em cadeia da polimerase
PDB: Protein Data Bank
PEG: polietilenoglicol
pH: potencial hidrogeniônico - $\log [H^+]$
pI: ponto isoelétrico
pNP: p-nitrofenol
RMN: Ressonância Magnética Nuclear
rpm: rotações por minuto
SDS: dodecil sulfato de sódio
SDS-Page: eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato
SEC: cromatografia por exclusão de tamanho
SLAC: "small laccase"
Tris: tris(hidroximetil)aminometano
 μ g: micrograma
 μ L: microlitro
v/v: volume por volume

Capítulo 1- Considerações Gerais

1. INTRODUÇÃO

Parte do setor industrial está se tornando cada vez mais dependente do uso de enzimas como catalisadores, como por exemplo, as proteases, lipases e celulasas, entre outras. A descoberta de novas enzimas pode contribuir para o aumento do rendimento dos sistemas agrícolas e, para isso, a utilização de técnicas como a metagenômica e a tecnologia do DNA recombinante, são essenciais.

Os sistemas agrícolas consistem em um conjunto diverso de ecossistemas complexos e a demanda por uma abordagem mais sustentável, vem tornando constante a busca por novos métodos aplicados a sistemas agrícolas. Entre os problemas que podem ser encontrados relacionados a agricultura, podemos citar a contaminação do solo e da água por pesticidas, a ocorrência de pragas e doenças que afetam os cultivos agrícolas e a produção de resíduos agrícolas. Dentre as soluções possíveis para amenizar estes problemas está a substituição de parte destes pesticidas por práticas de controle biológico, a utilização de resíduos agrícolas e desenvolvimento de abordagens eficientes de tratamento de resíduos químicos, como utilizando a biorremediação.

Entre os principais pesticidas, também denominados defensivos agrícolas, encontram-se os herbicidas, inseticidas e fungicidas que, a despeito de sua importância para a produtividade, muitas vezes por uso indiscriminado e até mesmo recorrência de aplicação, podem contaminar o ambiente de forma severa. A biorremediação desses compostos por microrganismos tem sido bastante estudada, porém poucos são os trabalhos que demonstram a degradação completa desses pesticidas.

A biomassa lignocelulósica é a principal fonte para a produção de bioetanol, além disso, pode ser encontrada facilmente em resíduos de agroindústrias. Diversas enzimas estão envolvidas neste processo, como as glicosil hidrolases, lacases e feruloil esterases. Uma vez que a agroindústria produz toneladas de resíduos como bagaço de cana-de-açúcar, casca de arroz, casca de feijão, casca de amendoim, entre outros. A utilização de enzimas/coquetéis enzimáticos seria uma excelente alternativa para a geração

de produtos como bioetanol e até insumos que poderiam ser utilizados na indústria cosmética, como o ácido ferúlico.

Considerando a necessidade de abordagens mais sustentáveis, o uso de microrganismos na agricultura e no beneficiamento de produtos, vem aumentando cada vez mais, a exemplo do uso de *Bacillus thuringiensis* que é um dos maiores agentes de controle biológico encontrados atualmente, com efeito em diversas pragas e doenças como *Spodoptera frugiperda*, antracnose e broca da cana-de-açúcar (*Diatraea saccharalis*). Outro microrganismo interessante é o *Trichoderma* sp. que possui alto potencial para controle biológico, biorremediação e para degradação de resíduos agrícolas. Grande parte desse potencial deve-se ao maquinário enzimático presente nesses fungos, como quitinases (Mohiddin *et al.*, 2021), proteases (Sun *et al.*, 2021), β -glicosidases, xilases (Bahaman *et al.*, 2021), lacases (Ranimol *et al.*, 2018), β -xiloxidases (Marlene *et al.*, 2021) e lipases (Qin *et al.*, 2012), entre outras.

É notável a importância do uso direto de microrganismos para realização desses processos, porém a utilização de suas enzimas pode ser ainda mais vantajosa, uma vez que a atuação pode ocorrer de maneira mais específica e a produção de produtos/metabólitos oriundos da catálise enzimática é mais previsível. Um dos fatores que facilitaria a utilização prática e viável dessas enzimas microbianas para aplicação na agricultura, é a otimização de metodologias de produção heteróloga em larga escala, o que proporcionaria a produção e a possibilidade de manejar os parâmetros de indução para obtenção de maiores rendimentos. Para isso é necessário que sejam realizados estudos com intuito de rastrear enzimas que possam ser utilizadas em ambientes hostis e se adaptem bem a abordagens de escalonamento. Considerando a morosidade dos estudos bioquímicos *in vitro*, para que essa abordagem de rastreio seja efetiva, são fundamentais abordagens *in silico* por bioinformática, que juntamente com o acesso a banco de dados gênicos, incluindo os metagenômicos, permitiram acesso ao potencial metabólico de microrganismos incultiváveis, facilitando a descoberta de novas enzimas com mecanismos de catálise diferentes. Algumas empresas como a Basf Enzymes LLC (<https://www.basf.com>) comercializam enzimas de origem metagenômica, como fitase, xilanase, amilase e celulase (Berini *et al.*, 2017).

Esses fatores impulsionam para um futuro promissor, de novas enzimas sendo aplicadas em novas funções na agroindústria, ocasionando maior aproveitamento dos resíduos, controle mais amigável de pragas e doenças, uma vez que poderia diminuir a contaminação do meio por pesticidas. Assim estudos de cunho aplicado são fundamentais para elucidar o potencial de enzimas candidatas para utilização biotecnológica.

Considerando a importância da biorremediação de compostos tóxicos provenientes de práticas agropecuárias, neste trabalho, aprofundamos nossos estudos voltados para aplicação biotecnológica da enzima metagenômica LacMeta, previamente caracterizada bioquimicamente por nós em um estudo anterior (Lima, 2017; Lima *et al.*, 2022), visando mapear seu potencial de uso para biorremediação dos seguintes xenobióticos: corante Verde de Malaquita (Cap. 2); fungicida hidróxido de fentina e herbicida imazapic (Cap. 3), obtendo excelentes resultados de detoxificação. Além disso, visando fomentar novos estudos de aplicação enzimática na degradação de resíduos agrícolas, prospectamos uma feruloil esterase (FAE) em bancos de dados metagenômicos, enzima essa que atua na degradação de ácido hidroxinâmicos presentes na biomassa lignocelulósica, e os primeiros estudos *in vitro* indicam enzima funcional para atividade como tanase e esterase (Cap. 4).

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Utilização de enzimas microbianas na indústria

Os microrganismos apresentam uma ampla gama de genes que desempenham as mais variadas funções, sendo a função enzimática uma das mais importantes para biotecnologia (Gravina *et al.*, 2017). Segundo a União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (IUBMB), a classificação de enzimas com base em suas atividades catalíticas as reúne em 6 classes (Cornish-Bowden, 2014):

- E.C 1- Oxidorredutases: ocorre a doação de um ou mais elétrons para um aceptor, que é denominado reduzido.
- E.C 2- Transferases: um grupo é transferido de um substrato doador para outro aceptor.
- E.C 3- Hidrolases: uma ligação do substrato é hidrolisada

- E.C 4- Liases: Adição de grupos funcionais a dupla ligação ou formação de dupla ligação pela remoção de grupos.
- E.C 5- Isomerases: Transferência de grupos dentro da mesma molécula formando isômeros.
- E.C 6- Ligases: união de duas ou mais moléculas acopladas à hidrólise de ATP ou um análogo molécula. Podem ser chamadas de sintetases.

A utilização de enzimas em bioprocessos é conhecida há milhares de anos e atualmente dentre as milhares de enzimas conhecidas, 200 são utilizadas comercialmente. A produção dessas enzimas tem se tornado cada vez mais acessível devido ao conhecimento bioquímico e tecnologias como a engenharia de proteínas (Mondal *et al.*, 2016). Hoje, a indústria de enzimas que conhecemos só foi possível com o avanço da biotecnologia (Kirk, Borchert e Fuglsang, 2002).

2.2 Controle Biológico e uso de enzimas

Entre os fatores que mais afetam a produtividade agrícola, são doenças, infestações de insetos e de plantas daninhas e por isso o uso de defensivos agrícolas se faz necessário. Porém o aumento do uso juntamente com a capacidade desses compostos em persistirem no ambiente, podem gerar efeitos contrários, como indução de resistência de pragas e doenças. Uma alternativa para esse problema seria o controle biológico (biopesticidas) (Sehrawat, Sindhu e Glick, 2022). O controle biológico é uma abordagem que ocorre naturalmente no meio ambiente, uma vez que a destruição total ou parcial de patógenos presentes em determinado ambiente por outros organismos é comum na natureza (Akrami e Yousefi, 2015).

Atualmente o controle biológico em sua maioria é voltado para controle de pragas (insetos, ácaros e nematoides) e doenças. Os insetos são capazes de se alimentar de praticamente todos os tipos de plantas, além de provocarem deterioração em produtos armazenados, causando perdas e danos na qualidade dos alimentos (Rai e Ingle, 2012). Desde o início da agricultura as doenças de plantas estão presentes, e com a expansão de áreas cultivadas e do monocultivo, ocorreu também o aumento da pressão seletiva sobre doenças e patógenos. Embora a aplicação de pesticidas proporcione proteção a essas áreas, a ruptura do equilíbrio ecológico pode gerar danos por doenças mesmo

em áreas protegidas (Lewis e Papavizas, 1991). Quando falamos de controle de fitopatógenos fúngicos, merece destaque o uso de enzimas que sejam capazes de degradar as paredes celulares de hifas, clamidósporos, oósporos, conídios, esporângios e zoósporos, além das enzimas que atuam na liberação de oligossacarídeos especiais, que funcionam como sinalizadores indutores dos mecanismos de defesa vegetal (O'Brien, 2017).

A utilização de microrganismos com potencial antagonista às pragas e doenças tem sido bastante abordado nas últimas quatro décadas (Janisiewicz, Tworowski e Sharer, 2000; Sehrawat, Sindhu e Glick, 2022). Alguns dos mecanismos utilizados por esses microrganismos são produção de metabolitos voláteis, toxina e enzimas (Figura 1) (Coelho *et al.*, 2011; Guetsky *et al.*, 2002; Sehrawat, Sindhu e Glick, 2022).

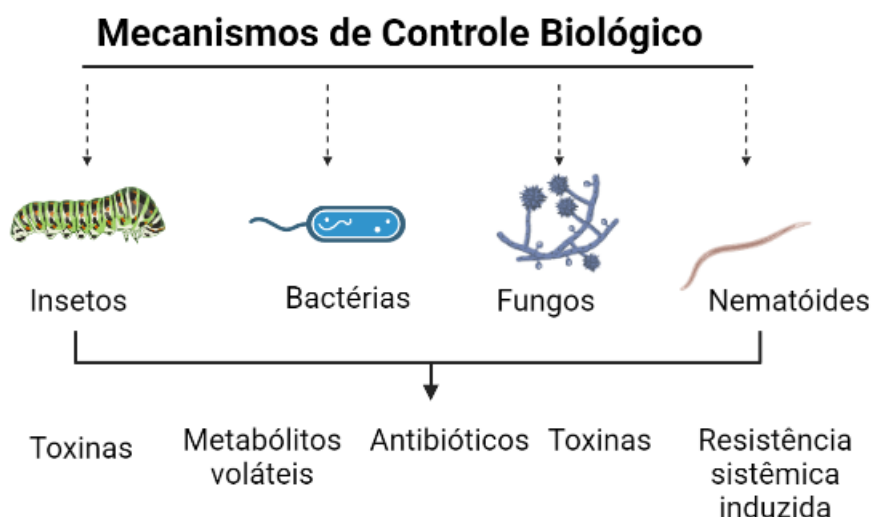


Figura 1. Mecanismos utilizados por agente de controle biológico de pragas e doenças. Adaptado de (Sehrawat, Sindhu e Glick, 2022).

O número de patentes de controle biológico com utilização/cooperação de enzimas, obteve um aumento significativo de 2013 para 2021 (Figura 2.A), indicando que nos próximos anos essa abordagem possa ser a temática de interesse de grandes empresas voltadas ao agronegócio e que há crescente demanda por novas tecnologias de controle biológico de pragas e doenças. Além disso, entre as empresas com maior número de patentes, encontram-se multinacionais de renome, como Bayer, Basf e Syngenta, essa última com o maior número de patentes publicadas relacionadas ao assunto (Figura 2.B). A

seguir enumeramos as principais classes de enzimas utilizadas no controle biológico.

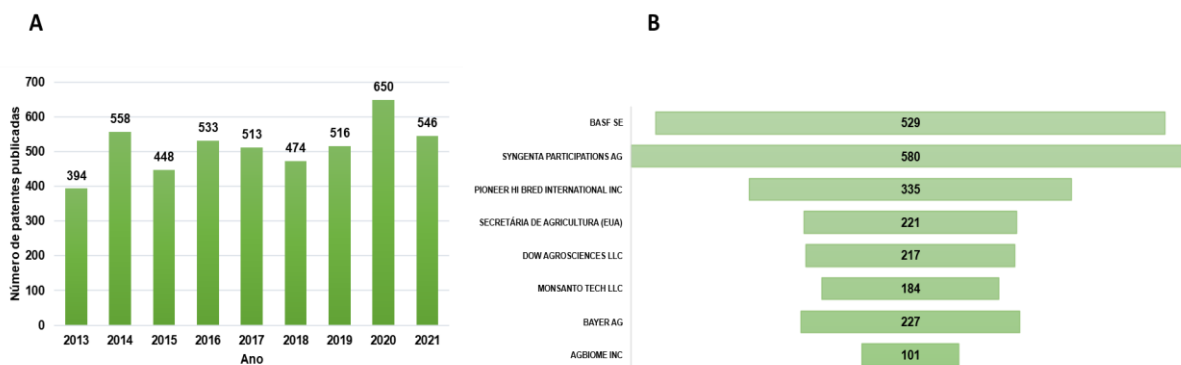


Figura 2. Número de patentes relacionadas a Controle Biológico de pragas e doenças com enzimas entre 2013-2021. B) Principais depositantes de patentes (2013-2021) Fonte: (Plataforma World Intellectual Property Organization – WIPO) Termos de busca: biological control OR biocontrol AND microbial OR enzyme OR enzymatic. Acesso em: 06/02/2022.

2.2.1 Lipases (E.C 3.1.1.3)

Em insetos a camada externa, denominada epicutícula, é impermeável, pois é coberta por uma mistura de lipídios, alcenos, ésteres e ácidos graxos (Butt *et al.*, 2016). Supakdamrongkul e colaboradores (2010) indicam que a produção de lipase por fungos agentes de controle biológico é uma importante estratégia de colonização utilizada por esses microrganismos. Assim a busca por cepas e até a melhoria da expressão enzimática seria responsável pelo aprimoramento do agente.

2.2.2 Quitinase (EC 3.2.1.14)

A quitina é um dos principais constituintes do exoesqueleto dos insetos, parede celular de fungos e até ovos de nematoides, por essa razão as quitinases são as enzimas mais importantes para o controle biológico de pragas e doenças. As quitinases são enzimas que dependendo do organismo de origem apresentam propriedades enzimáticas diferentes, em suma são responsáveis

por degradar a quitina em unidades monoméricas ou oligoméricas (Swiontek e Urszula, 2012).

2.2.3 Betaglucanase (EC 3.2.1)

Assim como as lipases, as betaglucanases também são agentes enzimáticos de controle biológico, que podem ser aprimorados usando aditivos, co-fatores e outros, a fim de melhorar a ação da enzima contra o patógeno. A parede celular de fungos é composta por quitina, glucanos e proteínas (Borkovich e Ebbole, 2010). As betaglucanases, juntamente com as quitinases e proteases, são enzimas essenciais para que ocorra o micoparasitismo (Mukherjee *et al.*, 2021).

2.2.4 Peptidase (E.C 3.4)

As peptidases estão entre as enzimas mais utilizadas na indústria, uma vez que podem atuar em várias aplicações. São divididas de acordo com a natureza da hidrólise, por exemplo, serina proteases que atuam sobre as hidroxilas da serina (Rawlings e Bateman, 2021). Essas enzimas são produzidas pelos principais agentes de controle biológico, os fungos (Saqib *et al.*, 2022) e as bactérias (Liu *et al.*, 2022).

2.3 Contaminação por pesticidas agrícolas e biorremediação

O crescimento populacional acelerado, em paralelo com o crescimento industrial e a alta demanda por alimentos e insumos agrícolas, são os maiores responsáveis pela contaminação do meio ambiente com xenobióticos, que vão desde antibióticos utilizados para garantir saúde humana à pesticidas que buscam melhorar e conservar a produtividade agrícola.

A maioria desses compostos são moléculas aromáticas, sendo que os que mais se acumulam no ambiente são os hidrocarbonetos clorados, esteróides (fénois) e corantes, além de organocianetos, compostos alifáticos de cadeia longa, herbicidas e inseticidas representados por organofosforados e piretróides (Ufarté *et al.*, 2015).

Os pesticidas agrícolas são divididos em herbicidas, nematicidas, acaricidas, inseticidas, bactericidas e fungicidas. Estes compostos se tornaram

extremamente essenciais pois foram responsáveis pelo aumento e qualidade da produção agrícola em todo mundo e devido aos problemas com pragas e culturas infestantes serem recorrentes, o uso destes não pode ser descontinuado (Rao, Scelza e Gianfreda, 2014; Verma e Chatterjee, 2021).

Outro fator é que esses compostos muitas vezes são recalcitrantes devido a sua afinidade com a matéria orgânica e coloides do solo sem alterar a estrutura química da molécula do pesticida (Hassen *et al.*, 2020; Kaur *et al.*, 2021). Entre os pesticidas utilizados na agricultura os herbicidas representam a maioria, entre 40-60% (Singh e Singh, 2016).

A remoção de pesticidas do ambiente geralmente é feita por métodos tradicionais tais como tratamento químico e incineração. Porém estes métodos apresentam elevado custo para aplicação e geralmente podem ocasionar riscos secundários de exposição. Sendo assim, a utilização de microrganismos que possuam potencial de biorremediação tem se tornado uma alternativa mais sustentável e econômica (Verma e Chatterjee, 2021). A eficiência da biorremediação vai depender do potencial metabólico do microrganismo e de transformação de compostos contaminantes via maquinaria enzimática (Hassen *et al.*, 2020).

A degradação de pesticidas presentes no solo vai depender de fatores como pH, quantidade de matéria orgânica presente no solo, temperatura, umidade e até mesmo da cobertura vegetal (Erguven e Demirci, 2020). A biorremediação enzimática pode ocorrer *in situ*, causando menor perturbação no ambiente, onde a enzima pode ser usada livre ou imobilizada e adicionada ao solo; ou *ex situ*, mais utilizada para solos altamente contaminados ou quando necessita de uma ação rápida (Mousavi *et al.*, 2021), ou seja, sendo essa a principal via de detoxicação (Kaur *et al.*, 2021). A degradação de pesticidas ocorre em etapas e cada etapa é catalisada por uma enzima (extracelular ou intracelular), a ausência de alguma enzima específica parará todo o processo, e esse é um dos fatores mais comuns para a persistência de pesticidas ou de seus derivados ainda tóxicos no ambiente (Singh, 2008).

A busca por novos microrganismos, novas enzimas e novas funções tem estimulado as publicações voltadas para a biorremediação, e novas invenções/aplicações vem sendo descobertas. Segundo o “World Intellectual Property Organization” - WIPO, o uso de parâmetros de busca para

biorremediação com enzimas, resulta em um dos maiores índices de publicação de patentes, com 21.099 patentes somente em 2021 (Figura 3). No tópico seguinte (2.3.1) descrevemos as principais enzimas correlacionadas à biorremediação de pesticidas.

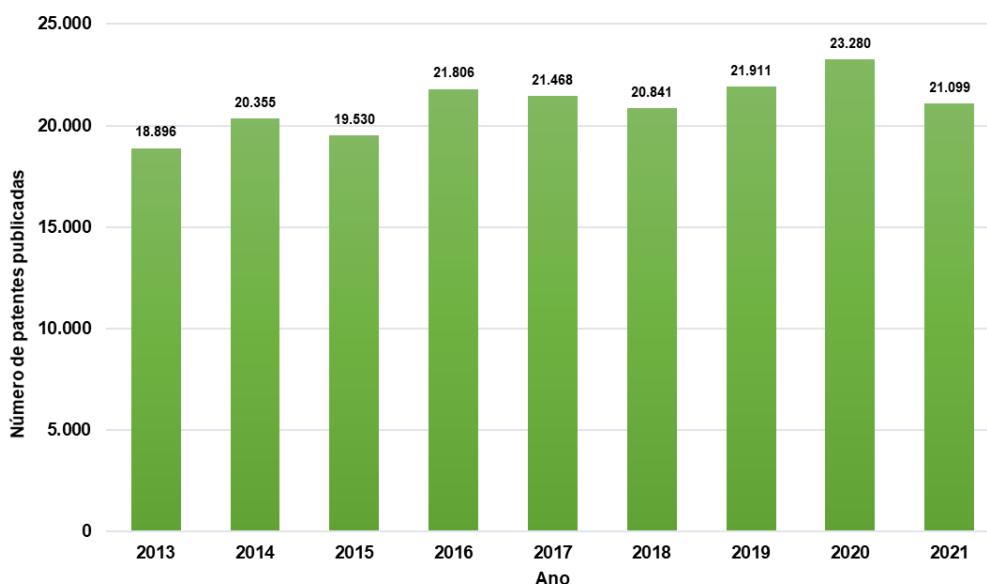


Figura 3. Número de patentes publicadas relacionadas a biorremediação e enzimas de 2013-2021. Fonte: (Plataforma World Intellectual Property Organization – WIPO). Termos de busca: bioremediation OR waste treatment OR biodegradation AND microbial OR enzyme OR enzymatic. Acesso em: 05/02/2022.

2.3.1 Enzimas envolvidas na biorremediação de pesticidas

2.3.1.1 Lacases (E.C. 1.10.3.2)

As lacases são enzimas oxidativas que atuam sobre os mais variados substratos e essa versatilidade facilita sua utilização nas mais variadas aplicações. Entre os substratos encontram-se os orto e para-difenóis, polifenóis, aminofenóis e aminas aromáticas ou alifáticas (Limaye *et al.*, 2017). Na biorremediação, é uma das enzimas mais estudadas (Kaur *et al.*, 2021). São enzimas extremamente versáteis para biorremediação de compostos, como a tetraciclina (antibiótico) (Wen *et al.*, 2019), e pesticidas agrícolas, como isoproturon (herbicida) (Zeng, Qin e Xia, 2017), carbofuran (inseticida) (Liu, Deng

e Yang, 2021), imazalil (fungicida) (Maruyama *et al.*, 2007) e clorofenois, que são utilizados em acaricidas, herbicidas e em inseticidas (Liu, Deng e Yang, 2021).

2.3.1.2 Esterases (E.C 3.1.1)

As esterases carboxílicas (CEs) podem ser classificadas em outras subclasses de acordo com sua especificidade com vários grupos de substratos (Bhatt *et al.*, 2021). As esterases atuam nas ligações éster em diferentes produtos químicos, como herbicidas e pesticidas organofosforados (Mousavi *et al.*, 2021). Uma nova esterase de *Hyphomicrobium* sp. foi capaz de detoxicar estrobilurinas (Jiang *et al.*, 2021). Além disso a ruptura de ligações ésteres por esterases envolvidas na biorremediação de pesticidas químicas torna esses compostos menos tóxicos (Bhandari *et al.*, 2021; Kaur *et al.*, 2021).

2.3.1.3 Manganase-peroxidase (E.C. 1.11.1.13)

As manganases-peroxidases (MnP) são enzimas relativamente pequenas, com massa molecular de 38 kDa ou a 62 kDa e ponto isoelétrico de 2,9-7,1 (Dhagat e Jujjavarapu, 2022). A MnP é uma oxigenase que catalisa fenóis aromáticos e corantes aromáticos, porém é extremamente dependente do manganês bivalente (Durán e Esposito, 2000; Hofrichter, 2002). Juntamente com lacase e outras enzimas lignolíticas, a MnP é apontada como responsável pela degradação do herbicida paraquat (Camacho-Morales *et al.*, 2017).

2.3.1.4 Citocromo P450 (E.C 1.14)

Essas monooxigenases estão entre as enzimas mais estudadas atualmente, uma vez que podem catalisar inúmeras reações, como hidroxilação, epoxidação, peroxidação, dehalogenação, oxidações de álcoois e até mesmo a clivagem da ligação C-C (Roes-Hill, Le e Prins, 2016). As citocromos P450 são amplamente encontradas em bactérias, fungos e arqueias, possuem várias funções, como metabolismo de drogas nos sistemas vivos e na transformação de produtos químicos no meio ambiente (Rathore *et al.*, 2022). A citocromo P450 de basidiomiceto foi identificada como o principal agente de biorremediação do diuron (Henn *et al.*, 2020).

2.3.1.5 Organofosforado Hidrolase (EC 3.1.8.2)

A fosfotriesterase, também denominada como organofosforado hidrolase, é uma das enzimas envolvidas na biorremediação de compostos organofosforados (Mousavi *et al.*, 2021). Os organofosforados representam a classe de inseticidas mais utilizada na agricultura. São representantes dessa classe os monocrotofós, cloropirifós, paration, metil paration, diazinon e coumafós (Singh *et al.*, 1999). A organofosforado hidrolase de *Pseudomonas* sp. foi capaz de hidrolisar o organofosfato (acefato) (Pinjari *et al.*, 2013).

2.3.1.6 Nitrilases (EC 3.5.5.1) e Amidases (E.C. 3.5.1.4)

As nitrilases e as amidases atuam em co-metabolismo para degradação de pesticidas (Raffa e Chiampo, 2021). Geralmente, o processo de catálise da nitrilase acaba gerando a isonicotinamida e então a amidase atua sobre o produto, degradando a amida indesejada (Vejvoda *et al.*, 2006). Existem alguns estudos que indicam o uso de amidases para a degradação de poluentes presentes no ambiente, entre eles pesticidas (Zhao *et al.*, 2021). As nitrilases atuam diretamente nas ligações triplas entre carbono e nitrogênio (grupo nitrila) de pesticidas (Mousavi *et al.*, 2021).

2.3.1.7 Lignina peroxidase (E.C. 1.11.1.14)

As ligninas peroxidases (LiP) (diaril propano oxigenase) são enzimas com grupamento heme que catalisa a degradação da lignina dependente de peróxido de hidrogênio (Falade *et al.*, 2017). As enzimas classificadas como lignolíticas possuem diversas aplicações em biorremediação de compostos (Mousavi *et al.*, 2021). Juntamente com as lacases e as tirosinases, as ligninas peroxidases também são utilizadas na biorremediação de compostos xenobióticos presentes no solo (Zdarta *et al.*, 2018), e atuam em conjunto com a citocromo P450 na degradação do herbicida diuron (Coelho-Moreira *et al.*, 2013) e com outras enzimas lignolíticas na degradação do glifosato (Pizzul, Castillo e Stenström, 2009).

2.4 Biorrefinaria e produção de etanol de segunda geração

Resíduos oriundos da produção agrícola como sabugo de milho, casca de arroz e bagaço de cana-de-açúcar, são produzidos em milhões de toneladas em todo o mundo, por isso vem sendo considerados potenciais substitutos dos combustíveis fósseis, e enzimas envolvidas na degradação de biomassa vegetal têm sido cada vez mais procuradas (Nieter *et al.*, 2016; Wu *et al.*, 2017). A lignocelulose é o principal componente estrutural de todas as plantas e é composta por celulose, hemicelulose e lignina (Dashtban *et al.*, 2010). A quebra enzimática da lignocelulose é um processo difícil, uma vez que a hemicelulose e a celulose são envolvidas por uma matriz de lignina, o que impede que enzimas (hemi) celulolíticas acessem esses componentes (Figura 4) (Poidevin *et al.*, 2014), que são também fortemente estabilizados por outras ligações entre hemicelulose e lignina através de ligações com galactose, arabinose e os ácidos hidroxicinâmicos (Gopalan *et al.*, 2015; Ribeiro *et al.*, 2016) (Figura 4).

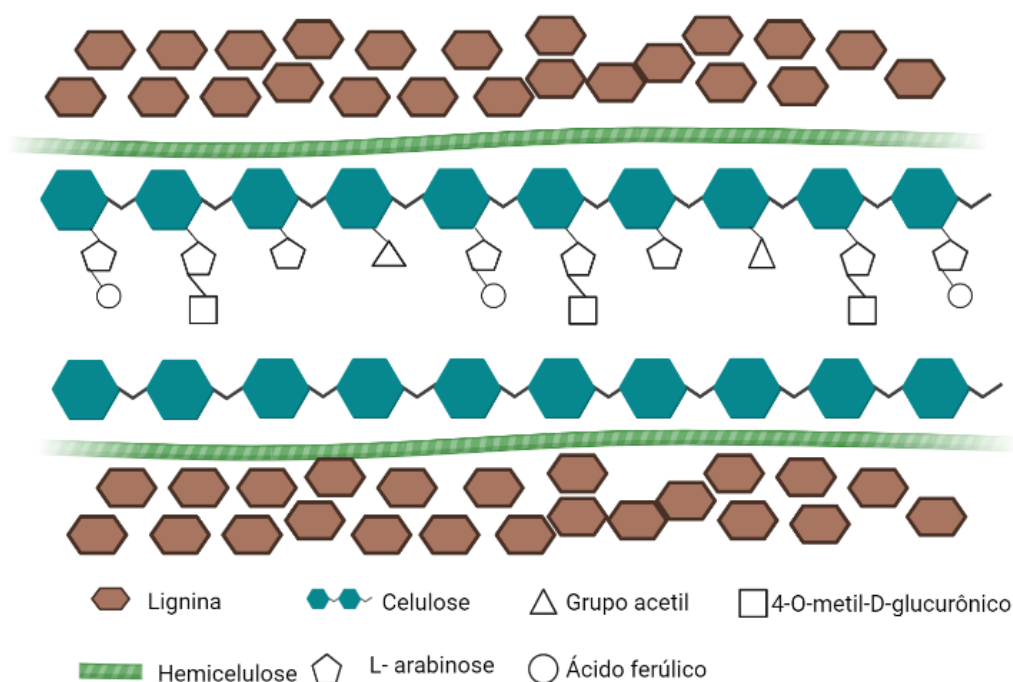


Figura 4. Representação da composição da biomassa lignocelulósica. Fonte: O autor.

O sistema de classificação CAZymes (Carbohydrate-Active enZymes Database) é baseado na similaridade de sequências e mecanismos enzimáticos, sendo atualmente composto por mais de 300 famílias de proteínas/enzimas,

subdivididas nas classes: glicosídeo hidrolases (GH), glicosiltransferases (GT), polissacarídeo liases (PL), carboidrato esterases (CE), de atividade auxiliares (AA) e módulos de ligação a carboidratos (CBM) (Levasseur *et al.*, 2013). Diversas enzimas podem ser utilizadas para a degradação da biomassa vegetal, atuando em regiões diferentes da biomassa e até mesmo em produtos da degradação de outras enzimas. Entre as enzimas essenciais para o processo encontram-se as xilanases, lacases e as celulases (Limaye *et al.*, 2017).

2.4.1 Enzimas envolvidas na degradação da biomassa vegetal

2.4.1.1 Xilanases (EC 3.2.1.8)

O principal polímero da hemicelulose é o xilano. As xilanases catalisam a endoidrólise de ligações 1,4- β -D-xilosídicas em xilano (Collins, Gerday e Feller, 2005). São enzimas hidrolíticas importantes, pois catalisam a quebra da estrutura de β -1,4-xilanos por ligações de β -1,4 glicosídicos (Thapa *et al.*, 2020). Endoxilanases e exoxilanases atuam diretamente na quebra de hemiceluloses reticuladas (Sindhu, Binod e Pandey, 2016). Foram classificadas como glicosil hidrolases (GH) 5, 8, 10, 11, 30, 43, 62 e 98, sendo as que fazem parte das GHs 10 e 11 as mais caracterizadas (Mkabayi *et al.*, 2020).

2.4.1.2 β - xilosidases (EC 3.2.1.37)

A β - xilosidases hidrolisam xilooligossacarídeos liberando monômeros de xilose e são essenciais para decomposição de xilanas (Dodd e Cann, 2009; Poutanen e Puis, 1988). Possuem dois subsítios para ligação de açúcar, o que indica que ao hidrolisar açúcares com mais de dois resíduos, o restante acaba sendo liberado na solução (Dodd e Cann, 2009). São classificadas nas famílias GH 3, 39, 43, 52 e 54.

2.4.1.3 β - glicosidase (EC 3.2.1.21)

As β - glicosidases são um grupo de glicosil hidrolases que atuam na hidrólise de dímeros de oligossacarídeos (Mhuantong *et al.*, 2015), permitem a transferência do grupo glicosil entre os nucleófilos de oxigênio (Tiwari *et al.*, 2018). De acordo com o CAZy elas são classificadas como GH1 e GH3 (Gomes-

Pepe *et al.*, 2016). São enzimas que apresentam alta variedade estrutural e podem estar localizadas em meio intra e extracelular (Baldrian e Val, 2008).

2.4.1.4 Lacase (E.C. 1.10.3.2) e Feruloil esterase (E.C 3.1.1.73)

No processo de detoxicação do hidrolisado lignocelulósico, as lacases são de grande importância uma vez que são capazes de remover por completo os compostos fenólicos presentes (Fang *et al.*, 2015). As lacases atuam juntamente com as ligninas peroxidases e a manganês peroxidases levando à degradação completa da lignina (Sindhu, Binod e Pandey, 2016). As feruloil esterases (FAE), possuem o poder de catalisar a hidrólise de ligações ésteres entre ácido ferúlico ou ácidos cinâmicos da parede celular vegetal (Nieter *et al.*, 2016). As FAE são enzimas acessórias das hemicelulases, uma vez que não são capazes de liberar açúcares, porém, agem de forma a torná-los disponíveis da melhor forma (Gopalan *et al.*, 2015). Lacases são capazes de degradar o ácido ferúlico, produto da degradação de feruloil esterases sobre materiais vegetais (Nieter *et al.*, 2014) (Figura 5). Além disso, estas duas classes de enzimas já são usadas sinergicamente na indústria de papel e celulose (Record *et al.*, 2003). Segundo o banco de dados para carboidrases, as feruloil esterases são classificadas como carboidrato esterases (CE1) e as lacases como enzimas acessórias (AA1), estas atuam como auxiliadoras no processo de degradação da parede celular vegetal (LEVASSEUR e colab., 2013).

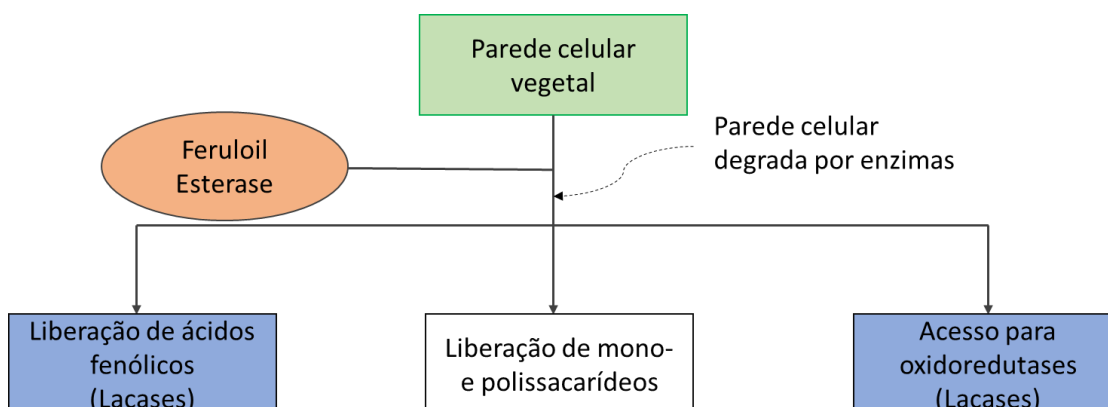


Figura 5. Representação diagramática de aplicações industriais de feruloil esterases e lacases. Adaptado de Benoit, 2008.

Já é sabido que a utilização de enzimas para degradação de biomassa vegetal é um tema bastante trabalhado e de interesse mundial. E essa busca constante por novas enzimas e novos métodos (coquetéis) de degradação enzimática reflete na produção de inovação. Como exemplo, só no ano passado cerca de 800 patentes relacionadas a degradação enzimática foram publicadas (Figura 6).

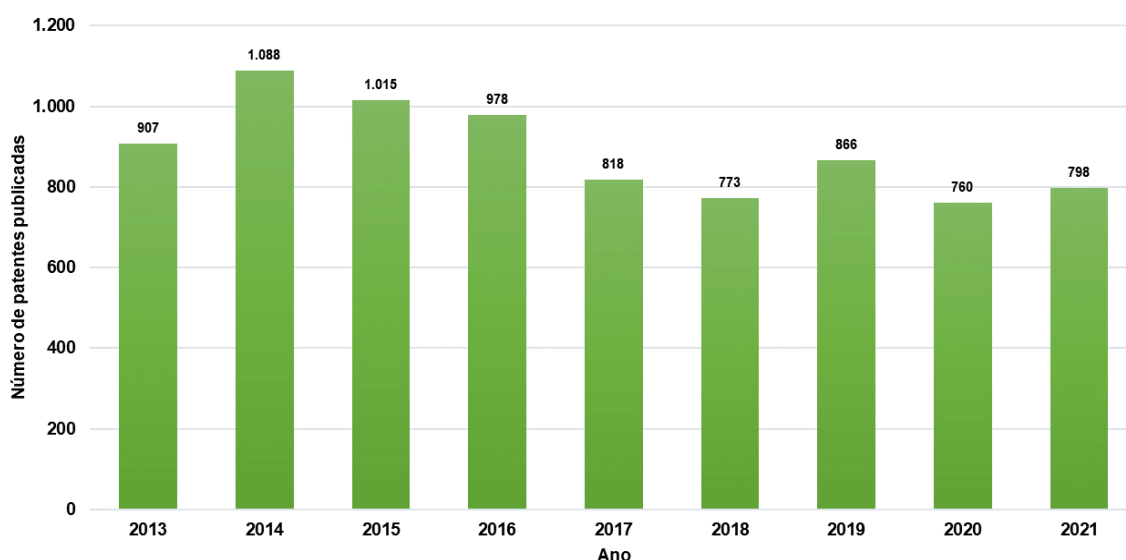


Figura 6. Número de patentes relacionadas a biorrefinaria e enzimas entre 2013 e 2021. Fonte: (Plataforma World Intellectual Property Organization – WIPO). Termos de busca: biorefinary OR biofuel OR lignocellulosic AND microbial OR enzyme OR enzymatic. Acesso em: 06/02/2022.

2.5 Metagenômica associada a descobertas de novas enzimas funcionais para agricultura

A descoberta de novas sequências genômicas e também a utilização da metagenômica, principalmente de fontes extremófilas, facilitam a descoberta de novas enzimas (Littlechild, 2015). A metagenômica é basicamente uma abordagem de estudar comunidades de microrganismos a partir da análise do DNA obtido de uma amostra ambiental, sem a necessidade de cultivo ou de culturas puras, permitindo caracterizar a vida microbiana associada a um determinado ambiente (Coughlan *et al.*, 2015). Uma técnica que pode ser aliada a todas as aplicações supracitadas é a engenharia de proteínas, uma vez que

se tem a anotação do gene advindo de um genoma ou metagenoma. A engenharia de proteínas pode ser obtida a partir de um desenho racional dos mecanismos de catálise da enzima para alterar de maneira pontual resíduos com potencial de melhorar a performance enzimática (Antonopoulou *et al.*, 2018). Essas novas tecnologias permitiram o acesso a diversas informações que auxiliaram no entendimento das bases genéticas e moleculares envolvidas nos processos bioquímicos (Ufarté *et al.*, 2015).

Singh e Singh (2016), relatam que é necessária uma triagem de microrganismos e enzimas para esse processo, e que o conhecimento a partir da montagem de metagenomas fornece informações sobre as vias de biodegradação e favorecem o recrutamento de novas enzimas promiscuas, ou seja, com atuação em mais de um substrato/ composto, gerando assim a possibilidade da utilização de enzimas e não mais microrganismos. Além disso a combinação de técnicas, juntamente com a combinação de estudos de anotação de metagenomas ambientais com análises laboratoriais como prospecção de novas enzimas com substratos específicos, é essencial para alcançar ainda mais a caracterização, e conservação dos recursos genéticos (Tiwari *et al.*, 2018). Poder acessar essas informações e caracterizar esses genes permite o conhecimento mais profundo sobre essas enzimas e quais as suas funções no ambiente. Muitas enzimas possuem aplicações em mais de um nicho na indústria e na agricultura (Figura 7), o que demonstra o quão rico são os nossos recursos microbianos e o quanto ainda precisamos compreender a fim de alcançarmos uma maior estabilidade nos nossos sistemas agrícolas.

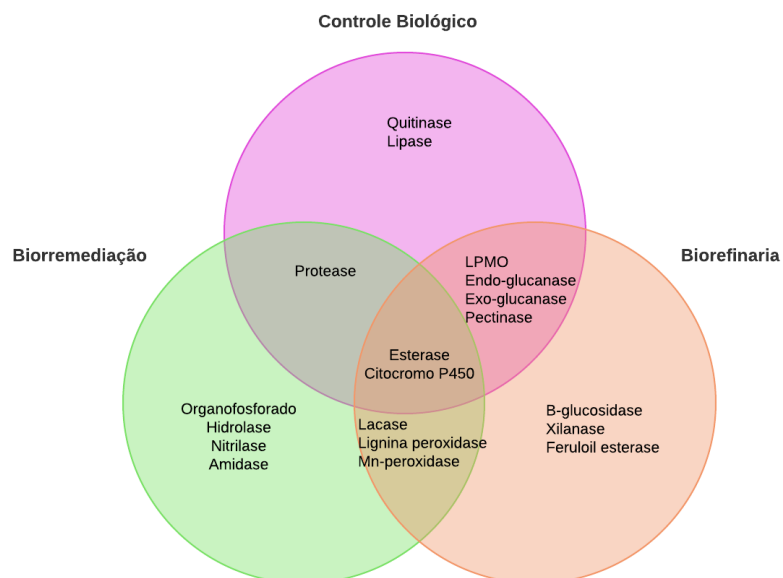


Figura 7. Diagrama de Venn das enzimas utilizadas na biorrefinaria da biomassa, biorremediação de pesticidas e controle biológico.
Fonte: o autor

3. REFERÊNCIAS

AKRAMI, M.; YOUSEFI, Z. Biological Control of Fusarium wilt of Tomato (*Solanum lycopersicum*) by *Trichoderma* spp. as Antagonist Fungi. **Biological forum-An International Journal**, v. 7, n. 1, p. 887–892, 2015.

AMARESAN, N.; PATEL, P.; AMIN, D. **Practical Handbook on Agricultural Microbiology**. [s.l: s.n.].

ANTONOPOULOU, I. *et al.* Tailoring the specificity of the type C feruloyl esterase FoFaeC from *Fusarium oxysporum* towards methyl sinapate by rational redesign based on small molecule docking simulations. **PLoS ONE**, v. 13, n. 5, p. 1–20, 2018.

BAHAMAN, A. H. *et al.* Molecular docking and molecular dynamics simulations studies on β -glucosidase and xylanase *Trichoderma asperellum* to predict degradation order of cellulosic components in oil palm leaves for nanocellulose preparation. **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics**, v. 39, n. 7, p. 2628–2641, 2021.

BALDRIAN, P.; VAL, V. Degradation of cellulose by basidiomycetous fungi. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 28, n. December, p. 501–521, 2008.

BERINI, F. *et al.* Metagenomics: Novel enzymes from non-culturable microbes. **FEMS Microbiology Letters**, v. 364, n. 21, p. 1–19, 2017.

BHANDARI, S. *et al.* Microbial Enzymes Used in Bioremediation. **Journal of Chemistry**, v. 2021, p. 1–17, 2021.

BHATT, P. *et al.* Characterization of the role of esterases in the biodegradation of organophosphate, carbamate, and pyrethroid pesticides. **Journal of Hazardous Materials**, v. 411, n. December 2020, p. 125026, 2021.

BORKOVICH, K.; EBBOLE, D. **Cellular and Molecular Biology of Filamentous Fungi**. [s.l: s.n.].

BUTT, T. M. *et al.* Entomopathogenic Fungi: New Insights into Host-Pathogen Interactions. **Advances in Genetics**, v. 94, p. 307–364, 2016.

CAMACHO-MORALES, R. L. *et al.* Ligninolytic enzyme production by white rot fungi during paraquat (herbicide) degradation. **Revista Argentina de Microbiologia**, v. 49, n. 2, p. 189–196, 2017.

COELHO-MOREIRA, J. D. S. *et al.* Degradation of diuron by *phanerochaete chrysosporium*: Role of ligninolytic enzymes and cytochrome P450. **BioMed Research International**, v. 2013, n. Figure 1, 2013.

COELHO, A. R. *et al.* Avaliação do potencial antagônico de leveduras, visando biocontrole de deterioração por *penicillium expansum*. **Semina:Ciencias Agrarias**, v. 32, n. SUPPL. 1, p. 1879–1892, 2011.

COLLINS, T.; GERDAY, C.; FELLER, G. Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 29, n. 1, p. 3–23, 2005.

CORNISH-BOWDEN, A. Current IUBMB recommendations on enzyme nomenclature and kinetics. **Perspectives in Science**, v. 1, n. 1–6, p. 74–87,

2014.

COUGHLAN, L. M. *et al.* Biotechnological applications of functional metagenomics in the food and pharmaceutical industries. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, n. June, p. 1–22, 2015.

DASHTBAN, M. *et al.* Fungal biodegradation and enzymatic modification of lignin. v. 1, n. 1, p. 36–50, 2010.

DHAGAT, S.; JUJJAVARAPU, S. E. Utility of lignin-modifying enzymes: a green technology for organic compound mycodegradation. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 97, n. 2, p. 343–358, 2022.

DODD, D.; CANN, I. K. O. Enzymatic deconstruction of xylan for biofuel production. **GCB Bioenergy**, v. 1, n. 1, p. 2–17, 2009.

DURÁN, N.; ESPOSITO, E. Potential applications of oxidative enzymes and phenoloxidase-like compounds in wastewater and soil treatment: a review. **Applied Catalysis B: Environmental**, v. 28, n. 2, p. 83–99, 2000.

ERGUVEN, G. O.; DEMIRCI, U. Statistical evaluation of the bioremediation performance of *Ochrobactrum thiophenivorans* and *Sphingomonas melonis* bacteria on Imidacloprid insecticide in artificial agricultural field. **Journal of Environmental Health Science and Engineering**, v. 18, n. 2, p. 395–402, 2020.

FALADE, A. O. *et al.* Lignin peroxidase functionalities and prospective applications. n. June 2016, p. 1–14, 2017.

FANG, Z. *et al.* Identification of a laccase Glac15 from *Ganoderma lucidum* 77002 and its application in bioethanol production. **Biotechnology for Biofuels**, v. 8, n. 1, p. 1–12, 31 dez. 2015.

GOMES-PEPE, S. *et al.* Bg10 : A novel metagenomics alcohol-tolerant suitable for lactose-free milk preparation. **PLOS ONE**, v. 11, n. 12, p. 1–25, 21 dez. 2016.

GOPALAN, N. *et al.* Review on technological and scientific aspects of feruloyl esterases: A versatile enzyme for biorefining of biomass. **Bioresource technology**, v. 193, p. 534–544, out. 2015.

GRAVINA, F. *et al.* Metabolic Interference of *sod* gene mutations on catalase activity in *Escherichia coli* exposed to Gramoxone® (paraquat) herbicide. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 139, n. January, p. 89–96, 2017.

GUETSKY, R. *et al.* Improving Biological Control by Combining Biocontrol Agents Each with Several Mechanisms of Disease Suppression. **Biological Control**, n. 33, 2002.

HASSEN, W. *et al.* Rhizobacteria and their metabolites as a promising green approach for the treatment of pesticide contaminated agricultural soils. **MOJ Ecology & Environmental Sciences**, v. 5, n. 6, 2020.

HENN, C. *et al.* Degradation of the Organochlorinated Herbicide Diuron by Rainforest Basidiomycetes. **BioMed Research International**, v. 2020, p. 1–9, 2020.

HOFRICHTER, M. Review : lignin conversion by manganese peroxidase (MnP). v. 30, p. 454–466, 2002.

JANISIEWICZ, W. J.; TWORKOSKI, T. J.; SHARER, C. Characterizing the Mechanism of Biological Control of Postharvest Diseases on Fruits with a Simple Method to Study Competition for Nutrients. **Biological Control**, n. 16, p. 1196–1200, 2000.

JIANG, W. *et al.* Detoxification Esterase StrH Initiates Strobilurin Fungicide. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 87, n. 11, p. 1–13, 2021.

KAUR, R. *et al.* Pesticide residues degradation strategies in soil and water: a review. **International Journal of Environmental Science and Technology**, p. 1–24, 2021.

KIRK, O.; BORCHERT, T. V.; FUGLSANG, C. C. Industrial enzyme applications. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 13, n. 4, p. 345–351, 2002.

LEVASSEUR, A. *et al.* Expansion of the enzymatic repertoire of the CAZY database to integrate auxiliary redox enzymes. p. 1–14, 2013.

LEWIS, J. A.; PAPAIVIZAS, G. C. Biocontrol of plant-diseases - the approach for tomorrow. **Crop Protection**, v. 10, n. 2, p. 95–105, 1991.

LIMA, N. S. M. Busca de biomoléculas com potencial biotecnológico em database metagenômico por sequence-driven. **Dissertação (Microbiologia Agropecuária)**, p. 69, 2017.

_____. Broad thermal spectrum metagenomic laccase with action for dye decolorization and fentin hydroxide treatment. **AMB Express**, v. 12, n. 1, 2022.

LIMAYE, L. *et al.* Application of Potent Actinomycete Strains for Bio-Degradation of Domestic Agro-Waste by Composting and Treatment of Pulp-Paper Mill Effluent. **Advances in Microbiology**, v. 07, n. 01, p. 94–108, 2017.

LITTLECHILD, J. A. Enzymes from Extreme Environments and Their Industrial Applications. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 3, n. October, p. 1–9, 2015.

LIU, X. *et al.* Effect of Clp protease from *Corynebacterium glutamicum* on heterologous protein expression. **Protein Expression and Purification**, v. 189, n. July 2021, p. 1–8, 2022.

LIU, X.; DENG, W.; YANG, Y. Characterization of a novel laccase lac-yang1 from white-rot fungus *pleurotus ostreatus* strain yang1 with a strong ability to degrade and detoxify chlorophenols. **Molecules**, v. 26, n. 2, p. 1–31, 2021.

MARLENE, C. *et al.* Production of Hemicellulolytic Enzymes by a Novel *Trichoderma koningiopsis* 2OI2A1M and Its Application in the Saccharification of Barley Bagasse. **Waste and Biomass Valorization**, v. 12, n. 11, p. 5949–5958, 2021.

MARUYAMA, T. *et al.* Laccase-mediated degradation and reduction of toxicity of the postharvest fungicide imazalil. **Process Biochemistry**, v. 42, n. 3, p. 459–461, 2007.

MHUANTONG, W. *et al.* Comparative analysis of sugarcane bagasse metagenome reveals unique and conserved biomass-degrading enzymes among lignocellulolytic microbial communities. **Biotechnology for biofuels**, v. 8, p. 16,

jan. 2015.

MKABAYI, L. *et al.* Evaluating feruloyl esterase-xylanase synergism for hydroxycinnamic acid and xylo-oligosaccharide production from untreated, hydrothermally pre-treated and dilute-acid pre-treated corn cobs. **Agronomy**, v. 10, n. 5, 2020.

MOHIDDIN, F. A. *et al.* Phylogeny and optimization of trichoderma harzianum for chitinase production: Evaluation of their antifungal behaviour against the prominent soil borne phyto-pathogens of temperate india. **Microorganisms**, v. 9, n. 9, p. 1–20, 2021.

MONDAL, S. *et al.* Journey of enzymes in entomopathogenic fungi. **Pacific Science Review A: Natural Science and Engineering**, v. 18, n. 2, p. 85–99, 2016.

MOUSAVI, S. M. *et al.* **Recent Advances in Enzymes for the Bioremediation of Pollutants** *Biochemistry Research International*, 2021.

MUKHERJEE, P. K. *et al.* Mycoparasitism as a mechanism of Trichoderma - mediated suppression of plant diseases. **Fungal Biology Reviews**, v. 39, p. 15–33, 2021.

NIETER, A. *et al.* Feruloyl esterases from Schizophyllum commune to treat food industry side-streams. **Bioresource Technology**, v. 220, p. 38–46, 2016.

O'BRIEN, P. A. Biological control of plant diseases. **Australasian Plant Pathology**, v. 46, n. 4, p. 293–304, 2017.

PINJARI, A. B. *et al.* Expression and subcellular localization of organophosphate hydrolase in acephate-degrading Pseudomonas sp. strain Ind01 and its use as a potential biocatalyst for elimination of organophosphate insecticides. **Letters in Applied Microbiology**, v. 57, n. 1, p. 63–68, 2013.

PIZZUL, L.; CASTILLO, M. DEL P.; STENSTRÖM, J. Degradation of glyphosate and other pesticides by ligninolytic enzymes. **Biodegradation**, v. 20, n. 6, p. 751–759, 2009.

POIDEVIN, L. *et al.* Comparative analyses of Podospora anserina secretomes reveal a large array of lignocellulose-active enzymes. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 98, n. 17, p. 7457–7469, 3 set. 2014.

POUTANEN, K.; PUIS, J. Characteristics of Trichoderma reesei p-xylosidase and its use in the hydrolysis of solubilized xylans. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 28, p. 425–432, 1988.

QIN, L. *et al.* Improved production of heterologous lipase in Trichoderma reesei by RNAi mediated gene silencing of an endogenic highly expressed gene. **Bioresource Technology**, v. 109, p. 116–122, 2012.

RAFFA, C. M.; CHIAMPO, F. Bioremediation of agricultural soils polluted with pesticides: A review. **Bioengineering**, v. 8, n. 7, p. 1–29, 2021.

RAI, M.; INGLE, A. Role of nanotechnology in agriculture with special reference to management of insect pests. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 94, n. 2, p. 287–293, 2012.

RANIMOL, G. *et al.* Production of laccase from *Trichoderma harzianum* and its application in dye decolourisation. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 16, n. September, p. 400–404, 2018.

RAO, M. A.; SCENZA, R.; GIANFREDI, L. Enzymes in Agricultural Sciences. **Enzymes in Agricultural Sciences**, n. February, p. 1–21, 2014.

RATHORE, S. *et al.* An innovative approach of bioremediation in enzymatic degradation of xenobiotics. **Biotechnology and Genetic Engineering Reviews**, v. 00, n. 00, p. 1–32, 2022.

RIBEIRO, G. O. *et al.* Mining the rumen for fibrolytic feed enzymes. **Animal Frontiers**, v. 6, n. 2, p. 20–26, 2016.

ROES-HILL, M. LE; PRINS, A. Biotechnological Potential of Oxidative Enzymes from Actinobacteria. . 11 fev. 2016.

SAQIB, M. *et al.* Biological control of fungal pathogens of tomato (*Lycopersicon esculentum*) by chitinolytic bacterial strains. **Journal of Basic Microbiology**, v. 62, p. 48–62, 2022.

SEHRAWAT, A.; SINDHU, S. S.; GLICK, B. R. Hydrogen cyanide production by soil bacteria: Biological control of pests and promotion of plant growth in sustainable agriculture. **Pedosphere**, v. 32, n. 1, p. 15–38, 2022.

SINDHU, R.; BINOD, P.; PANDEY, A. Biological pretreatment of lignocellulosic biomass - An overview. **Bioresource Technology**, v. 199, p. 76–82, 2016.

SINGH, B. K. *et al.* Biochemical and molecular basis of pesticide degradation by microorganisms. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 19, n. 3, p. 197–225, 1999.

SINGH, B.; SINGH, K. Microbial degradation of herbicides. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 42, n. 2, p. 245–261, 2016.

SINGH, D. K. Biodegradation and bioremediation of pesticide in soil : concept , method and recent developments. n. March, p. 35–40, 2008.

SUN, Y. *et al.* Extracellular protease production regulated by nitrogen and carbon sources in *Trichoderma reesei*. **Journal of Basic Microbiology**, v. 61, n. 2, p. 122–132, 2021.

SUPAKDAMRONGKUL, P.; BHUMIRATANA, A.; WIWAT, C. Characterization of an extracellular lipase from the biocontrol fungus , *Nomuraea rileyi* MJ , and its toxicity toward *Spodoptera litura*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 105, n. 3, p. 228–235, 2010.

SWIONTEK, M.; URSZULA, B. Production of Antifungal Chitinase by *Aspergillus niger* LOCK 62 and Its Potential Role in the Biological Control. **Current Microbiology**, v. 65, p. 666–672, 2012.

THAPA, S. *et al.* Microbial cellulolytic enzymes: diversity and biotechnology with reference to lignocellulosic biomass degradation. **Reviews in Environmental Science and Biotechnology**, v. 19, n. 3, p. 621–648, 2020.

TIWARI, R. *et al.* Bioprospecting of functional cellulases from metagenome for second generation biofuel production: a review. **Critical Reviews in**

Microbiology, v. 44, n. 2, p. 244–257, 2018.

UFARTÉ, L. *et al.* Metagenomics for the discovery of pollutant degrading enzymes. **Biotechnology Advances**, v. 33, n. 8, p. 1845–1854, dez. 2015.

VEJVODA, V. *et al.* Immobilization of fungal nitrilase and bacterial amidase - Two enzymes working in accord. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 24, n. 6, p. 414–418, 2006.

VERMA, S.; CHATTERJEE, S. Biodegradation of profenofos, an acetylcholine esterase inhibitor by a psychrotolerant strain *Rahnella* sp. PFF2 and degradation pathway analysis. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 158, n. December 2020, p. 1–10, 2021.

WEN, X. *et al.* Immobilized laccase on bentonite-derived mesoporous materials for removal of tetracycline. **Chemosphere**, v. 222, p. 865–871, 2019.

WU, H. *et al.* High efficiency co-production of ferulic acid and xylooligosaccharides from wheat bran by recombinant xylanase and feruloyl esterase. **Biochemical Engineering Journal**, v. 120, p. 41–48, 2017.

ZDARTA, J. *et al.* Developments in support materials for immobilization of oxidoreductases: A comprehensive review. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 258, p. 1–20, 2018.

ZENG, S.; QIN, X.; XIA, L. Degradation of the herbicide isoproturon by laccase-mediator systems. **Biochemical Engineering Journal**, v. 119, p. 92–100, 2017.

ZHAO, Y. X. *et al.* Biodegradation of the pyridinecarboxamide insecticide flonicamid by *Microvirga flocculans* and characterization of two novel amidases involved. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 220, p. 1–11, 2021.

Capítulo 2 – Dinâmica da atuação de LacMeta na degradação completa e detoxificação do verde de malaquita

RESUMO

Este estudo relata a ação metabólica da LacMeta, uma lacase recombinante metagenômica extremamente promissora na degradação e detoxificação do corante verde de malaquita (VM). LacMeta foi capaz de degradar efetivamente os anéis aromáticos do corante (análise espectral por H-RMN), ao contrário do que é frequentemente relatado na literatura para outros tratamentos, em que a descoloração é resultante da formação do seu composto análogo, leucomalaquita (LCM), xenobiótico igualmente tóxico. Quando realizada a caracterização cinética utilizando o VM como substrato os valores ótimos de pH e temperatura foram 5,0 e 50°C, respectivamente. Além disso, quando comparado ao controle sem aditivos obteve-se 91,7% de descoloração, correspondente ao meio reacional contendo apenas a enzima pré-incubada com cobre para adição de cofatores. LacMeta mostrou-se tolerante ao EDTA até a concentração de 10 mmol/L⁻¹ (74-82% de descoloração), a despeito de sua condição de forte dependência por cofatores metálicos, denotando elevada estabilidade. A enzima também não foi fortemente afetada pelos solventes propanona (5% com 91% de descoloração) e metanol (2% com 81,6 % de descoloração), bem como apresentou elevada tolerância à grande maioria dos íons avaliados, sofrendo apenas efeito inibitório severo por parte do Fe³⁺. Mesmo em condições de alta salinidade (1 mol/L de NaCl), a atividade residual de descoloração do corante manteve-se em 61% sendo superior a 75% de descoloração até 500 mmol/L. O produto da descoloração do verde de malaquita (50 mg/mL) por ação da LacMeta, não apresentou efeito inibitório sobre a germinação das sementes de sorgo e tomate, sendo também inerte sobre as estruturas vegetativas das plântulas germinadas. O tratamento também foi extremamente eficaz em diminuir o efeito citóxico do corante sobre microrganismos, avaliado para efeito de inibição do crescimento das bactérias *Escherichia coli* e *Azospirillum brasilense*. Em suma, os resultados expostos demonstram extrema eficiência da LacMeta para degradação na biorremediação do VM em elevada concentração, o que é bastante relevante para a biorremediação deste xenobiótico de importância médica e ambiental.

PALAVRAS-CHAVES: corante trifenilmetano; halotolerância; detoxificação de xenobióticos

1. INTRODUÇÃO

Os processos de industrialização e o crescimento populacional têm sido responsáveis por produzir grande parte das águas residuais mundiais, e estas muitas vezes apresentam compostos tóxicos em sua composição, que podem contaminar os ambientes aquáticos. Cerca de 280 mil toneladas por ano de corantes são despejados em corpos hídricos, causando impactos severos ao meio ambiente e à saúde pública (Jiang *et al.*, 2018). Como exemplo, podemos citar diversos corantes utilizados em grande quantidade em processos industriais, sendo que, muito do que é usado acaba contaminando águas residuais, seja pelo tratamento incorreto/ineficaz, seja por descarte clandestino diretamente no meio ambiente (Arunprasath *et al.*, 2019; Saleh Bashanaini, 2019). Dentre os problemas ambientais causados pelo descarte incorreto de efluentes contendo altas concentrações de corante podemos citar a contaminação de águas superficiais, causando perturbações ecológicas como, redução da penetração de luz e consequente redução da atividade fotossintética, causando a deficiência de oxigênio do corpo hídrico (Zablocka-Godlewska, Przystas e Grabinska-Sota, 2015). Outro fator de extrema importância é a toxicidade dessas moléculas, que podem induzir mutações e apresentam potencial carcinogênico (Saravanakumar e Kathiresan, 2014; Zablocka-Godlewska, Przystas e Grabinska-Sota, 2015). Os corantes são classificados de acordo com a estrutura química do cromóforo como azo, antraquinonas, trifenilmetanos, heterocíclicos e poliméricos. Entre estes os mais versáteis são os corantes azo e trifenilmetanos, que representam a maioria dos corantes (Yang *et al.*, 2009). Neste sentido, a classe de corantes trifenilmetano, reconhecida por possuir o grupamento trifenil em sua estrutura, se constitui em compostos xenobióticos aromáticos que têm sido amplamente utilizados nas indústrias têxteis e na aquicultura, e por isso a sua presença em efluentes industriais tem se tornando preocupante (Mishra e Maiti, 2018).

1.1 Verde de Malaquita (VM)

O verde de malaquita (VM) é o nome popular para o composto químico 4-[(4-dimetilaminofenil)-fenil-metil]-N,N-dimetil-anilina pertencente à classe dos trifenilmetanos, os quais contêm em sua estrutura dois grupamentos amino. Trata-se de um corante de caráter básico que ao se dissolver na água se ioniza

em cátions coloridos (Mnif, Fendri e Ghribi, 2015). Este corante é amplamente utilizado como ectoparasiticida, fungicida, corante alimentar, aditivo alimentar, desinfetante médico, corante industrial e na indústria têxtil é usado para tingir seda, lã e algodão (Barapatre, Aadil e Jha, 2017; Mnif, Fendri e Ghribi, 2015). No entanto, existem controvérsias quanto ao seu uso, pois pode gerar efeitos negativos nos sistemas imunológico e reprodutivo, bem como potenciais efeitos carcinogênicos e mutagênicos em humanos e animais (Jasińska *et al.*, 2015; Lv *et al.*, 2013; Srivastava, Sinha e Roy, 2004). O VM pode causar danos irreversíveis aos olhos, irritação na pele e erupções cutâneas, além de causar irritação em todo o aparelho gastrointestinal, caso ingerido (Morales-Álvarez *et al.*, 2017). Outro fator importante é que ele é um composto de difícil degradação, permanecendo na água e em organismos aquáticos como os peixes, por um longo espaço de tempo (Xu, Ma, *et al.*, 2020) podendo chegar a persistir por 100 dias em tecidos de peixes (brânquias, vísceras, fígado e músculos) (Zhijun, Lihong e Mengmeng, 2011).

O VM é encontrado em meio aquoso em duas formas: catiônica (Figura 1A), que é a forma responsável pela coloração, na forma incolor do carbinol (Figura 1B) e leucomalaquita (Figura 1C) (Mitrowska, Posyniak e Zmudzki, 2008). Quando em solução com pH 4, os dois grupamentos amino do corante estão protonados (coloridos), porém em pH 10,00, ocorre a desprotonação, tornando as moléculas incolores (Mitrowska, Posyniak e Zmudzki, 2008). Em 1991 a “US Food and Drug Administration” proibiu o uso do VM na piscicultura devido à associação desse composto ao aumento do risco de câncer de bexiga em humanos (Dowling *et al.*, 2007). Além disso, na União Europeia, Brasil e China foi proibido como insumo para piscicultura destinada ao consumo humano, mas ainda é usado para fins ornamentais (Amador *et al.*, 2021). Quando o VM entra no tecido de peixes, ele é rapidamente metabolizado para leucomalaquita (LCM), um composto incolor (Bilandžić *et al.*, 2012). Entretanto, apesar do LCM ser um metabólito residual, possui características iguais ou mais tóxicas do que o VM (Culp *et al.*, 1999). Apesar disso, mesmo com diversos estudos apontando as características mutagênicas e carcinogênicas do VM e do LCM, esses compostos ainda são largamente utilizados industrialmente, de forma que estudos os detectaram em corpos hídricos (Wang *et al.*, 2020) e tecidos de peixes em várias regiões do mundo, como Croácia (Bilandžić *et al.*, 2012),

Tailândia (Teepoo, Wongtongdee e Phapugrangkul, 2020) e Malásia (Kwan *et al.*, 2018).

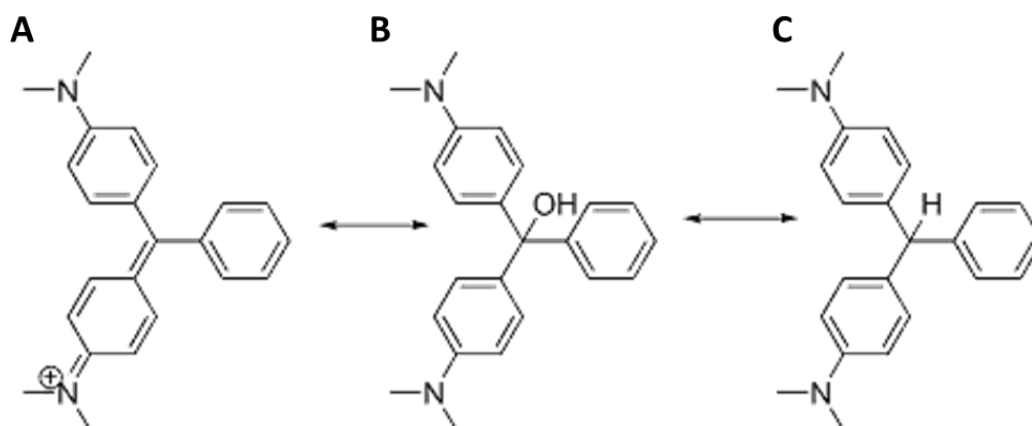


Figura 1. A) Verde de Malaquita, B) Carbinol (incolor) e C) Leucomalaquita.

1.2 Biorremediação

Os métodos físico-químicos para remoção de corantes, apesar de serem frequentemente utilizados, têm alto custo e formam agregados complexos que dificultam a reciclagem dos compostos químicos utilizados no tratamento. O que também pode acontecer é que quando degradados por estes métodos alguns corantes liberam produtos como aminas aromáticas e compostos fenólicos, os quais apresentam maior toxicidade e menor biodegradabilidade do que o composto original (Barapatre, Aadil e Jha, 2017). Assim novos métodos mais eficientes, economicamente viáveis e amigáveis ao ambiente estão sendo estudados (Vignesh *et al.*, 2020). Alternativas biológicas a estes tratamentos tem sido estudadas, sobretudo envolvendo o uso de microrganismos e enzimas. Diante disto, alguns microrganismos foram avaliados quanto a sua capacidade de degradação do VM: *Planococcus* sp. (Chanwala *et al.*, 2019), *Streptomyces chrestomyceticus* (Vignesh *et al.*, 2020), *Trametes* spp. (Yan *et al.*, 2014), *Deinococcus radiodurans* (Lv *et al.*, 2013) e *Pseudomonas* sp. (Du *et al.*, 2011). Contudo, apesar de serem excelentes agentes de biorremediação de diferentes compostos, nem sempre os microrganismos são capazes de atuar de forma satisfatória, sendo que muitas vezes, estes produtos metabolizados por bactérias não necessariamente vão possuir menor toxicidade, tornando necessário investigar se o composto foi degradado de forma irreversível e se o

metabólito gerado é tóxico ou não. Estudos apontam que algumas bactérias capazes de descolorir VM o metabolizaram em LCM, atuando sobre as cargas do composto, não de fato na degradação dos grupos funcionais tais como os grupamentos fenólicos (Henderson *et al.*, 1997). Em contraste, o uso de enzimas ao invés de microrganismos pode ser mais vantajoso, considerando uma maior previsibilidade dos produtos devido a especificidade enzimática e preferência por determinados substratos, tornando mais simples o rastreio de metabólitos. Como exemplo, enzimas como as lacases, devido ao seu poder de oxirredução, possuem a capacidade de clivar estruturas aromáticas e fenólicas (Barapatre, Aadil e Jha, 2017). Assim, o estudo de lacases para degradação do VM tem sido avaliado como uma nova forma de biorremediação de xenobióticos aromáticos. A expressão heteróloga de genes de lacase gerou relativa facilidade na compreensão das naturezas bioquímica e funcionais dessas enzimas (Yang, Ng, *et al.*, 2015), tornando muitas vezes o processo de obtenção da enzima recombinante de forma mais eficiente do que a fermentação do microrganismo selvagem, podendo facilitar a otimização enzimática por engenharia molecular. Como exemplo, podemos citar a CotA de *Bacillus pumilus* que por meio de mutagênese sitio dirigida conseguiu aumentar a porcentagem de descoloração de quase todos os corantes avaliados, dentre eles o VM, com o mutante S208G/F227A (Xu, Wang, *et al.*, 2020).

Em razão da persistência da toxicidade do VM, sobretudo quando o mesmo é degradado por métodos tradicionais resultando em LCM (ainda tóxico), este trabalho investigou o potencial de LacMeta, uma enzima que já havia sido identificada pelo nosso grupo de pesquisa em experimentos preliminares como capaz de promover a descoloração de corantes de diferentes classes (Lima, 2017), incluindo o VM. O presente estudo teve como foco ampliar a avaliação das características reacionais da descoloração/degradação enzimática sobre o VM, identificando parâmetros ótimos de reação como pH, temperatura, íons e salinidade, bem como investigando a toxicidade do produto gerado da ação enzimática sobre corante. Sendo assim, demonstramos que LacMeta foi extremamente eficaz na descoloração e efetiva degradação do VM, sendo um excelente agente de biorremediação.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Expressão enzimática, purificação da LacMeta e restituição da atividade (holoenzima)

Foi utilizada a enzima recombinante previamente descrita denominada LacMeta (Gomes, 2015; Lima, 2017). Para a produção da enzima LacMeta, 50 mL de Luria-Bertani (LB) líquido suplementando com 50 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ de canamicina foram utilizados para o cultivo de uma colônia isolada de *E. coli* BL21(DE3) + pET28-lacmeta sob agitação em 180 rpm por 16 h a 37 °C para o preparo do pré-inóculo. O inóculo foi preparado com 1 L de meio LB e com 10 mL do pré-inóculo, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de canamicina e induzido (após D.O. 0,4-0,6) com 0,1 mmol/L de isopropil β -D-1-tiogalactopiranosida (IPTG), e cultivado em 150 rpm, por 20 h, a 30 °C. Após isso, as células foram centrifugadas a 6.837 x g (Sorvall RC5C; Kendro Lab Products, Ashville, NC, USA) a 4 °C por 30 min, ressuspendidas em tampão tris- HCl 50 mmol/L, pH 7,5; NaCl 300 mmol/L, 5 mmol/L de imidazol e 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de lisozima, e incubadas por 1 h. Posteriormente, as células foram rompidas por ultrasonicação (Branson Sonifier 250, Branson, Connecticut, USA), com razão cíclica de 20 % com 10 ciclos de 10 pulsos e intervalos de 10 s. As células rompidas foram centrifugadas por 30 min a 6.837 x g a 4°C para a obtenção dos extratos. O primeiro passo de purificação foi feito por cromatografia de afinidade utilizando resina Ni^{2+} -NTA (Qiagen, Hilden, Germany) e tampão tris- HCl 50 mM, NaCl, 500 mM de imidazol e pH 7,5, posteriormente concentrada utilizando concentrador Amicon com limite de retenção superior à 30kDa. A cromatografia em gel por exclusão de tamanho molecular foi feita utilizando uma coluna Hiloal 16/600 Superdex column 200 (GE Healthcare Bio-Sciences, Uppsala, Sweden). Os picos purificados da cromatografia em gel foram utilizados para restauração da holoenzima ativa através da adição de 1mmol/L de CuSO_4 e incubada sobre agitação suave (agitador rotativo Revolver Labnet, 20 rpm) em temperatura ambiente por 6 h. A quantificação da concentração de proteína dos extratos e frações purificadas foi realizada utilizando o espectrofotômetro Nanodrop ND-1000 (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA), adicionando o coeficiente de extinção molar da proteína predito pela da ferramenta ProtParam (<http://web.expasy.org/protparam/>). A quantificação da holoenzima foi feita por método de Bradford (Bradford, 1976).

2.2 Análise de UV-Visível e descoloração do verde de malaquita

O espectro de UV-Vis foi determinado para amostras de holoenzima no intervalo de 200-900 nm com intervalo de 5 nm, utilizando o espectrofotômetro UV-vis Multiscan GO (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). O ensaio foi realizado medindo a atividade de LacMeta na descoloração de VM com e sem 0,1 mmol/ L⁻¹ de ABTS, usado como mediador redox da reação. As amostras foram incubadas a 37 °C, agitação de 150 rpm por 48 h, a concentração do corante foi 50 mg/L e as leituras foram feitas a cada 24 h.

Os testes de descoloração foram realizados em microplacas de fundo chato de polipropileno de 96 poços, com volume reacional de 100 µL adicionando 0,1 mmol/L de ABTS, como mediador redox e 13,2 ng/µL de enzima. O tempo de reação foi de 1h e a absorbância mensurada em comprimento de onda igual a 620 nm. A porcentagem de descoloração foi calculada de acordo com a equação:

$$\text{Descoloração (\%)} = [(A_i - A_t) / A_i] * 100$$

onde A_i é a absorbância inicial do corante e A_t é a absorbância final após o tratamento com a enzima.

2.3 Ensaio enzimático

2.3.1 Efeito do pH e da temperatura na descoloração do verde de malaquita

A avaliação do efeito do pH na descoloração do VM foi realizada a 37 °C usando 20 mmol/L dos seguintes tampões: citrato de sódio (pH 4,0, 4,5 e 5,5-6,5); acetato de sódio (pH 4,5-5,5); fosfato de sódio (pH 6,5-7,0); HEPES (pH 7,5-8,5); tris-HCl (pH 7,0, 7,5 e 8,5, 9,0); bicarbonato de sódio (pH 9,0 e 9,5).

O teste de temperatura ótima foi realizado no melhor pH obtido no teste anterior e avaliado nas temperaturas de 20 à 80 °C. A termoestabilidade foi avaliada incubando previamente a enzima por 1, 2 e 3 h a 40, 50 e 60 °C, e depois a enzima foi empregada para verificar a capacidade de descoloração do VM utilizando os parâmetros otimizados de reação.

2.3.2 Efeitos de aditivos na descoloração do Verde de Malaquita

Para avaliar o efeito de alguns compostos sobre a descoloração do VM, ensaios foram realizados adicionando: inibidores enzimáticos em potencial (EDTA, SDS, DTT, propanona e metanol); íons (Fe^{3+} , Ca^{2+} , Co^{2+} , Zn^{2+} , Li^{+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} e Cu^{2+}) e NaCl (10 – 2000 mmol/L). Os ensaios foram realizados nas condições ideais previamente estabelecidas.

2.3.3 Ensaio de Fitotoxicidade

O ensaio de fitotoxicidade foi realizado com sementes de sorgo (*Sorghum bicolor* L. Moench) e tomate (*Solanum lycopersicum* L.). As sementes foram submetidas aos seguintes tratamentos: VM 50mg/mL (controle positivo de inibição), VM 50mg.mL⁻¹ tratado com LacMeta (condições descritas no item 2.2) e água (controle negativo de inibição). O teste foi conduzido em incubadora com fotoperíodo de 12h e temperatura de 25 °C. A porcentagem de germinação foi avaliada após sete dias para sorgo e dez dias para tomate, bem como foram realizadas as medidas do comprimento da raiz e da parte aérea.

2.3.4 Ensaio de citotoxicidade

Para verificar se o tratamento do corante com a enzima possuía caráter citotóxico, foram realizados ensaios utilizando *Azospirillum brasilense* e *E. coli* DE3. A avaliação de inibição de crescimento foi feita em placa de petri de meio LB sólido e inoculado com as bactérias (na fase de crescimento exponencial). Foram feitos três poços de 5 mm de diâmetros e em cada um foram inoculados 10 µL de cada amostra: água ultrapura, VM 50 mg/mL e VM 50 mg/L tratado com LacMeta. Após três dias os cultivos foram avaliados para verificar a presença de halo de inibição.

O efeito no desenvolvimento e forma da célula foram verificados cultivando as bactérias nas mesmas condições supracitadas para os halos de inibição, só que utilizando cultivos líquidos, sendo que o acompanhamento da curva de crescimento da cultura foi feito por medidas de densidade óptica em 600 nm em biofotômetro Eppendorf. As células foram analisadas utilizando a

microscopia eletrônica de varredura (MEV-FEG JEOL modelo 7500F) com tensão de aceleração de 2 kV, corrente de emissão de 10 μ A, sonda de corrente de 9, distância de trabalho 5,0 mm, 500 x de ampliação.

2.3.4 Análise de Ressonância Magnética Nuclear (H-RMN)

As amostras de VM tratadas enzimaticamente foram incubadas a 37 °C, agitação de 150 rpm por 48 h e em seguida foram submetidas à análises por RMN de hidrogênio, em alta resolução, em solução de água deuterada, utilizando um espectrômetro Bruker Avance III, 600 (14 T) do Laboratório de RMN da Embrapa Instrumentação, usando-se sondas de 5 mm BBI, com gradiente em Z e à 25 °C. Os espectros foram processados no *software* Topspin (Bruker) onde os sinais foram filtrados com filtro exponencial de linha de 0,5 Hz. Depois da transformada de Fourier, os espectros tiveram a fase e a linha de base corrigidos manualmente.

2.3.5 Análise Estatística

Todos os experimentos foram realizados com réplicas estatísticas (triplicatas). Os dados foram analisados por análise de variância (ANOVA) com teste de comparações múltiplas de Tukey.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 LacMeta apresenta melhor atividade de descoloração em meio levemente ácido (pH 5-6,5) e temperaturas relativamente elevadas (50-60 °C)

Compreender as características ótimas relacionadas a degradação de compostos é indispensável quando se busca a eficiência desse processo, pois assim pode-se melhorar/compreender a dinâmica da enzima utilizada. Sendo assim, realizamos a caracterização enzimática de LacMeta na descoloração do VM. Em relação ao efeito do pH, estudado sob condição inicial de temperatura de 37 °C a maior porcentagem de descoloração foi no tampão acetato de sódio pH 5 com 72,62 % de descoloração (Figura 2 A), porém não ocorreram diferenças significativas na porcentagem de descoloração na faixa de pHs de 5,0 - 6,5, sendo o pH 5,0 escolhido para as análises seguintes. Para a lacase de

esporo de *Bacillus amyloliquefaciens* CotA obteve-se 80% de descoloração do cristal violeta (outro trifenilmetano) em pH 5,5 (Yang *et al.*, 2020). Em análises prévias utilizando ABTS como substrato, a LacMeta também apresentou pH ótimo em meio ácido, sendo que sua atividade foi bruscamente afetada em pH superior a 5,0 (Lima *et al.*, 2022); A preferência por meio ácido também foi observada para a lacase de *Aspegillus flavus*, o pH que apresentou a maior porcentagem de descoloração foi 5,8 (Barapatre, Aadil e Jha, 2017).

O efeito da temperatura sobre a atividade da LacMeta foi avaliado para a faixa de 20-80 °C, e a melhor temperatura foi 50 °C (91,7% de descoloração) seguida da temperatura 60 °C (85% de descoloração) (Figura 2 B). LCC3, uma lacase heteróloga de *Trametes trogii* BAFC463 foi caracterizada quanto aos seus parâmetros ótimos de reação avaliados para cinco corantes, entre eles o VM, e a temperatura ótima para a descoloração foi 50 °C, semelhante a LacMeta (Campos, Levin e Wirth, 2016). Uma vez que os testes de temperatura para descoloração foram realizados no pH ótimo, o resultado obtido para a temperatura 50 °C foi considerado como parâmetro otimizado para as demais reações. Com uma hora de tratamento (tempo máximo estipulado para as reações), LacMeta foi capaz de descolorir acima de 50% do VM, a 35 e 60°C. As características ótimas da descoloração do Cristal Violeta pela lacase de *Dictyopanus pusillus* foram pH 5 e 45 °C, sendo essa temperatura a máxima avaliada, esses parâmetros otimizados alcançaram 81% de descoloração (Rueda-Villabona *et al.*, 2021).

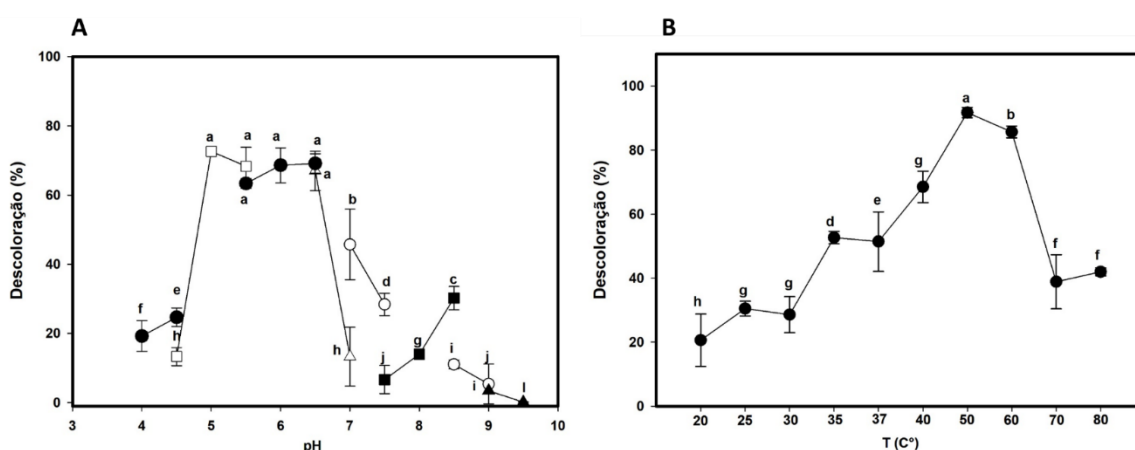


Figura 2. Efeito do pH e da temperatura na descoloração do verde de malaquita (VM). A) Efeito do pH: Citrato de sódio (círculo preto); acetato de sódio (quadrado branco); fosfato de sódio (triângulo branco); HEPES (quadrado preto); tris-HCl

(círculo branco); bicarbonato de sódio (triângulo preto); B) Efeito da temperatura. Os ensaios foram realizados com 50mg/L de VM e 1h de reação.

A determinação da termoestabilidade foi realizada incubando-se a enzima por 60 min a 37, 50, 60 e 70 °C e depois medindo-se a capacidade de descoloração para cada tempo de incubação. LacMeta demonstrou ser termoestável nas temperaturas 37, 50 e 70 °C (Figura 3). A 50 °C a meia vida de inativação pelo calor só foi alcançada após 4h (240 min) de incubação. Quando incubada por 60 min a 70 °C, a porcentagem de descoloração foi aproximadamente 50 %, porém ao longo do ensaio a porcentagem de descoloração manteve-se > 60%. O mesmo aconteceu com 37 °C, e apesar de ter ocorrido diminuição nos tempos iniciais (<60%), manteve-se até o fim dos ensaios com 80% de descoloração.

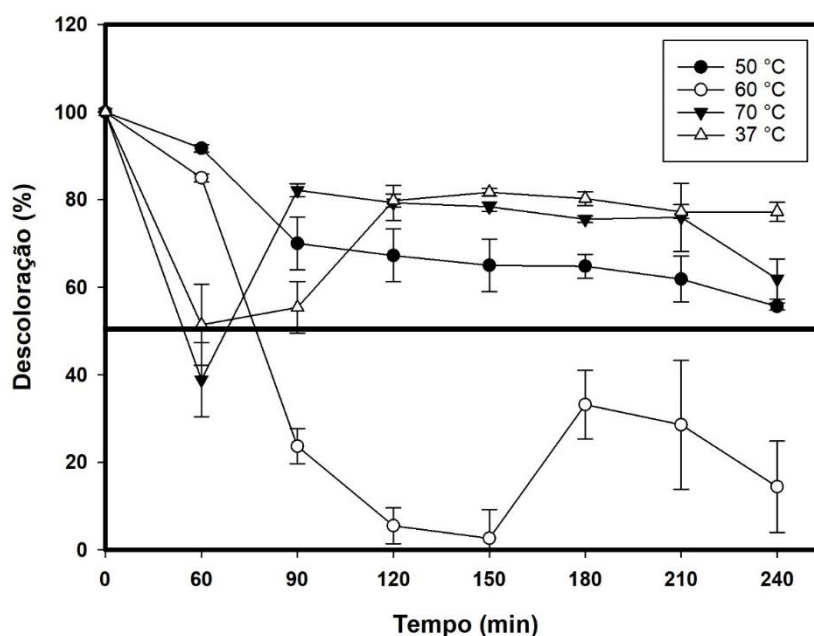


Figura 3. Termoestabilidade da LacMeta e seu efeito sobre a descoloração do verde de malaquita (50mg/mL). Os testes foram realizados medindo a porcentagem de descoloração a cada 60 min.

3.2 O processo de descoloração enzimática por LacMeta apresenta resistência a solventes, detergentes, íons e NaCl

Além dos parâmetros ótimos de temperatura e pH, outras características são importantes na busca de um processo de descoloração/degradação eficiente, tais como a presença de detergentes, solventes, íons metálicos e halotolerância, entre outros, que podem afetar significativamente a atividade

enzimáticas e fazer parte da composição do efluente que se pretende tratar. Foram avaliados cinco compostos diferentes, SDS, propanona, metanol, EDTA e DTT (Tabela 1). A atividade de descoloração de LacMeta sobre VM não foi afetada pela maioria destes compostos, sendo que os efeitos inibitórios mais significativos foram observados para os reagentes SDS, DTT e propanona, sendo essa última curiosamente inibidora apenas na menor concentração (1%).

Tabela 1. Avaliação de inibidores na descoloração do verde de malaquita

Inibidor	Concentração	Descoloração (%)	
SDS	1 %	35,48 ± 0,83	h
	2 %	0,0 ± 0,0	i
Propanona	1 %	57,96 ± 6,94	g
	2 %	81,35 ± 1,03	c
	5 %	91,08 ± 4,64	b
Metanol	1 %	81,60 ± 4,23	c
	2 %	81,66 ± 4,34	c
	5 %	71,41 ± 2,51	f
EDTA	1 mmol/L	77,37 ± 2,88	d
	5 mmol/L	74,56 ± 4,27	e
	10 mmol/L	82,87 ± 2,70	c
DTT	1 mmol/L	58,15 ± 5,32	g
	5 mmol/L	39,80 ± 11,53	h
	10 mmol/L	30,50 ± 2,83	h
Controle		91,74 ± 0,85	a

A presença de íons metálicos em águas residuais contendo corante é bastante comum, por isso é importante estudar essa relação, pois estes podem inibir a atividade enzimática e assim a descoloração do corante (Du *et al.*, 2018). A descoloração do corante não foi grandemente afetada pela maioria dos íons avaliados, e a maioria das concentrações resultou em valores de descoloração maiores que 80% (Tabela 2). O efeito inibitório foi observado apenas para Li⁺ nas menores concentrações (1 e 3 mmol/L), e para íons Fe³⁺ nas maiores concentrações (5 e 10 mmol/L), sendo que o ferro foi responsável pela inibição mais severa (com cerca de 3,5% de atividade residual de descoloração). A estabilidade encontrada para LacMeta em relação a maioria dos íons metálicos é uma característica realmente relevante, considerando que dados da literatura indicam um forte efeito de íons sobre a atividade enzimática, como é esperado para multicopper oxidases, que são enzimas dependentes de cofatores metálicos. Como exemplo, pode-se citar o estudo de Du e colaboradores (2011), onde Co²⁺ (5 mmol/L) inibiu fortemente a descoloração do VM por parte da lacase

de *Pseudomonas* sp. DY1 assim como para LacMeta, Fe^{3+} também teve efeito deletério na descoloração do VM por *Klebsiella pneumoniae*, porém a concentração utilizada ($1,0 \times 10^{-6}$ mmol/L) foi menor do que a avaliada nesse trabalho (Li *et al.*, 2020). Outro resultado semelhante foi com *Aeromonas* sp., onde Fe^{3+} (1 - 3 mmol/L) praticamente bloqueou a descoloração (Du *et al.*, 2018).

Tabela 2. Avaliação de íons metálicos na descoloração do verde de malaquita

Ion	Concentração (mmol L ⁻¹)	Descoloração (%)	
Fe^{3+}	1	85,86 ± 0,72	f
	3	79,26 ± 1,24	l
	5	3,42 ± 1,32	r
	10	3,52 ± 1,02	q
Li^{+}	1	16,00 ± 3,13	p
	3	63,63 ± 2,82	j
	5	81,28 ± 1,24	o
	10	88,02 ± 0,54	d
Zn^{2+}	1	87,17 ± 1,04	e
	3	88,89 ± 0,62	d
	5	87,17 ± 0,35	c
	10	90,13 ± 0,92	c
Co^{2+}	1	77,41 ± 1,19	n
	5	91,31 ± 0,84	a
	10	91,94 ± 0,27	a
Ca^{2+}	1	90,21 ± 1,82	c
	3	82,93 ± 1,14	i
	5	85,82 ± 0,70	f
	10	91,13 ± 0,70	a
Cu^{2+}	1	83,22 ± 0,51	h
	3	88,98 ± 0,35	c
	5	88,95 ± 0,54	d
	10	86,96 ± 0,59	d
Mg^{2+}	1	84,44 ± 0,75	g
	3	90,58 ± 0,61	b
	5	89,69 ± 0,17	c
	10	85,90 ± 0,95	f
Mn^{2+}	1	78,46 ± 5,9	i
	3	86,68 ± 6,60	e
	5	91,18 ± 2,8	a
	10	91,63 ± 0,78	a
Controle*		91,74 ± 0,85	a

*Realizado com a enzima + cofator

O processo de industrialização produz grande quantidade de águas residuais contendo alta concentração de sais, o que gera um problema quando espécies de bactérias não extremófilas são utilizadas no processo de biorremediação destes efluentes, pois a alta salinidade afeta diretamente o

metabolismo, diminuindo a eficiência do biotratamento (Song *et al.*, 2017), sendo que o mesmo ocorre quando se utilizam enzimas não halotolerantes. A capacidade de descoloração da LacMeta sobre o VM não foi bruscamente afetada quando submetida a várias concentrações de NaCl (Figura 4). Até 50 mmol L⁻¹ a descoloração foi mantida acima de 80%, apresentando queda somente nas concentrações seguintes, e mesmo assim a única concentração que resultou em descoloração menor que 50% foi 2 mol L⁻¹, demonstrando que a enzima tolera altas concentrações de sal. A halotolerância é uma característica fortemente desejada em enzimas destinadas a biorremediação, e concentrações elevadas de sais podem apresentar um efeito ativador sobre a atividade de algumas enzimas. Como exemplo, a descoloração do VM por estirpes selvagem e o mutante de *Synechococcus elongatus*, estas tiveram a sua atividade aumentada a partir de 900 mmol L⁻¹ de NaCl, sendo que ambas enzimas (selvagem e mutante) tiveram atividades de descoloração igualmente eficientes (Han *et al.*, 2020).

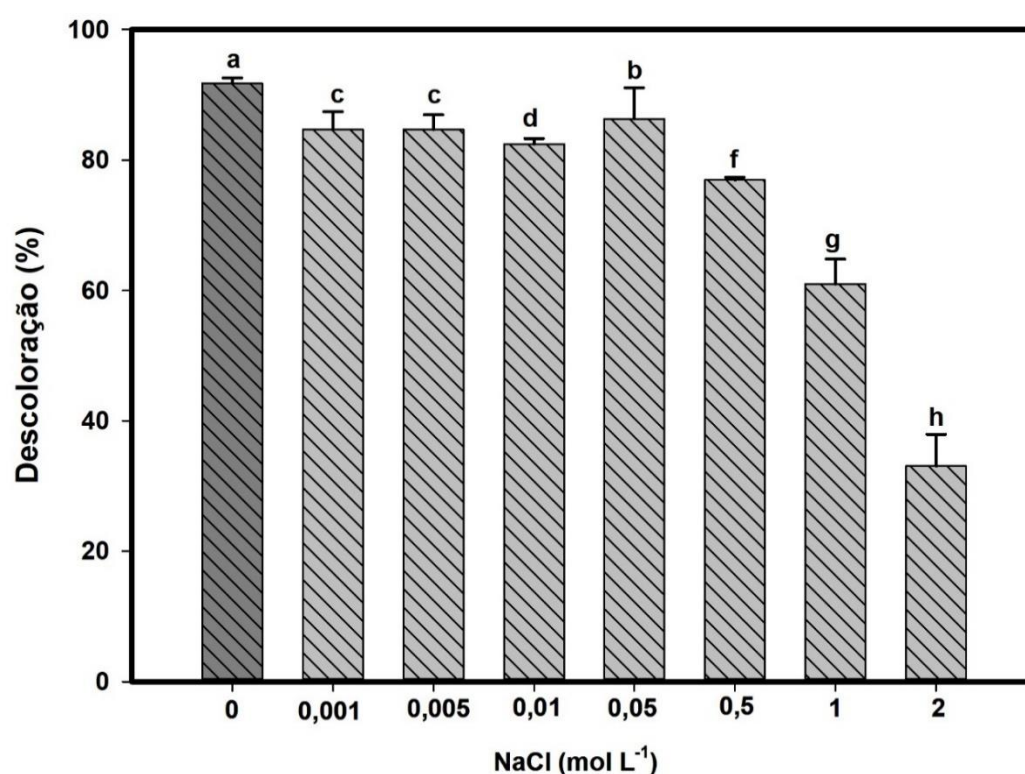


Figura 4. Efeito do NaCl (0,001 – 2 mol L⁻¹) na descoloração do verde de malaquita. As letras minúsculas no topo de cada coluna indicam a diferença estatística entre cada condição utilizada no experimento, de acordo com ANOVA e teste de Tukey a 5% de probabilidade

Alguns efluentes podem apresentar-se como sistemas complexos, envolvendo diversos compostos concomitantemente, como corantes, íons, solventes, detergentes, pesticidas e antibióticos, entre outros. Para estas situações, o fator “tempo de reação”, aliado ao pH e temperatura, devem ser substancialmente otimizados para que a atuação enzimática seja efetiva. Buscando mimetizar um efluente complexo, e verificar a eficiência de reação por LacMeta na descoloração do VM neste meio reacional adverso, os seguintes aditivos foram acrescidos ao meio reacional: 1 mmol.L⁻¹ de cada um dos íons previamente avaliados incluindo o Na⁺ (todos na forma de cloreto) e 1 % (v/v) de metanol e acetona. Apesar da complexidade da amostra, no tempo máximo de reação (1h), a descoloração foi 87% (Figura 5 A), valor que não é distante do obtido nas condições ótimas (controle, 91,7%, Tab.2). Além disso, o valor obtido foi substancialmente maior do que o valor de Li⁺(16%), e relativamente maior para Co²⁺ (77,4%) e Mn²⁺ (78,5%), quando avaliados sozinhos e na mesma concentração. Um dos grandes problemas de efluentes com excesso de corantes é a coloração excessiva, impedindo a fotorrespiração dos organismos aquáticos. Mesmo na presença dos íons, solventes e sal, é notável a descoloração do VM (50 mg mL⁻¹) (Figura 5 B), o que demonstra o potencial da LacMeta como um excelente agente de biorremediação. Apesar de não ter na literatura teste de descoloração de VM parecido com o realizado neste trabalho para efluente complexo, Liu et al. (2021) utilizaram metodologia similar quando avaliaram a degradação de dois compostos clorofenólicos por LAC-Yang1, uma lacase de *Pleurotus ostreatus*, e perceberam que a degradação dos compostos não foi prejudicada com a mistura, demonstrando o quanto pode ser vantajoso a utilização de enzimas ao invés de microrganismos na biorremediação destes ambientes.

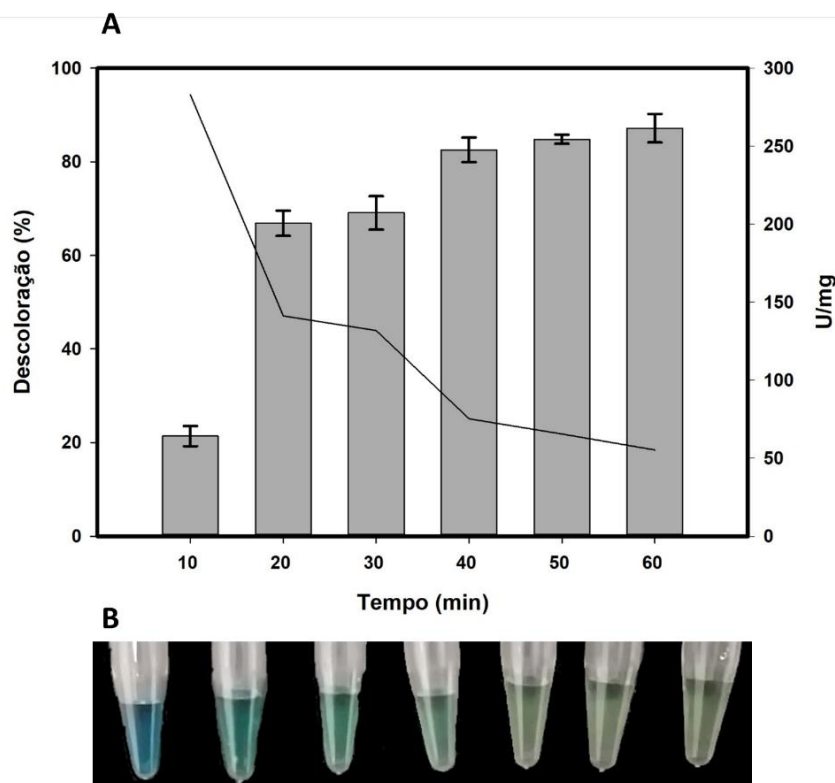


Figura 5. Efeito da ação dos aditivos (íons e solventes) na descoloração do Verde de Malaquita. A) Porcentagem de descoloração (barras) e U/mg (linhas). B) Perfil de descoloração do corante sob efeito dos aditivos (propanona, metanol, NaCl, Fe^{3+} , Li^+ , Zn^{2+} , Co^{2+} , Ca^{2+} , Cu^{2+} , Mg^{2+} e Mn^{2+} (0 - 60 min) nas concentrações de 1% (v/v) (propanona e metanol), $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ (NaCl) e 1 mmol L^{-1} para os íons metálicos.

3.3 Capacidade da LacMeta em detoxificar o verde de malaquita

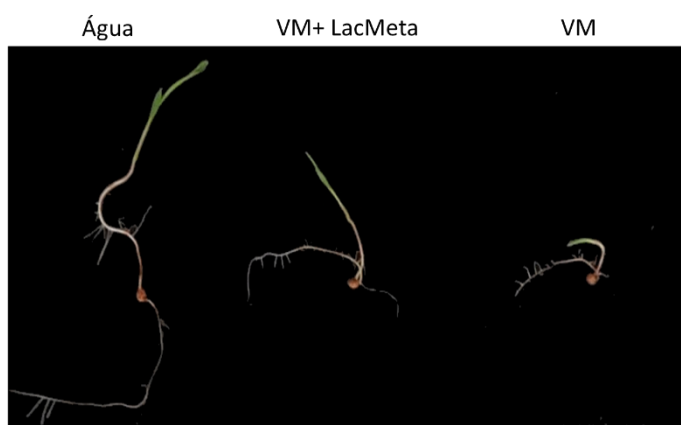
Efluentes contendo corantes quando não tratados corretamente podem causar sérios problemas ambientais e de saúde, entre estes, a fitotoxidade, uma vez que estes efluentes podem ser utilizados para irrigação em outros usos agrícolas, afetando o desenvolvimento das plantas e a fertilidade do solo (Ayed *et al.*, 2010; Barapatre, Aadil e Jha, 2017). A avaliação da fitotoxidade foi realizada utilizando o metabólito gerado após 24h de tratamento do corante sem ABTS. Para ambas as culturas avaliadas, *S. bicolor* (sorgo) e *S. lycopersicum* (tomate), o corante VM (50 mg L^{-1}) inibiu a germinação das sementes em, 66,7 e 50 %, respectivamente, indicando forte toxidade para as culturas quando comparado ao controle negativo (água destilada, 100% de germinação) (Figura 6 A). Essa inibição da germinação foi eliminada (Sorgo, 100% de germinação) ou reduzida (Tomate, 80% de germinação) por ação do tratamento enzimático

do VM pela LacMeta. Avaliando as partes vegetativas, o tratamento enzimático também diminui o efeito deletério do corante de forma visível. Nas sementes de sorgo, a diferença do comprimento da radícula e do comprimento da parte aérea entre o controle negativo e o produto da degradação for relativamente baixa, com valores próximos a 5 mm de diferença (Figura 6 B e C). Quando sementes de *Vigna radiata* foram inoculadas com 50 mg nmL⁻¹ de VM, o desenvolvimento das partes vegetativas foi afetado em praticamente 50%, principalmente a parte área, porém o tratamento do corante com *Bacillus vietnamensis* sp. MSB17 foi eficaz na detoxificação e as sementes inoculadas não apresentaram sinal de toxicidade (Kabeer, John e Abdulla, 2019). O produto metabólico do tratamento do VM utilizando LacMeta reduziu a toxicidade para as culturas avaliadas, o que indica a eficiência da enzima na degradação do corante gerando um composto menos tóxico, quando comparado ao controle positivo (corante não tratado).

A

	<i>Sorghum bicolor</i>			<i>Solanum lycopersicum</i>		
	Água Destilada	VM +LacMeta	VM	Água Destilada	VM +LacMeta	VM
% germinação	100±1,0	100±0,5	66,7±2,5	100±0	80±0,5	50±1,5
Comp. radícula (mm)	84,3±2,1	59,4±8,0	19,9±2,3	48,9±9,0	42,2±0,3	26,7±5,7
Comp. parte aérea (mm)	52,1±2,8	51,8±4,3	19,5±7,8	36,8±3,0	30,3±3,8	21,4±3,0

B



C

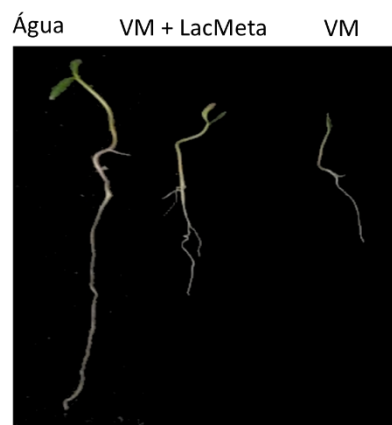


Figura 6. A) Porcentagem de germinação e desenvolvimento das sementes. B) Sementes de sorgo. C) Sementes de tomate. Os testes foram realizados com 50 mg/mL do corante e do metabólito produzido, sendo o controle água destilada. Os experimentos foram realizados em triplicata. ± desvio padrão.

O corante VM possui potencial genotóxico e citotóxico para microrganismos do solo (Gopinathan, Kanhere e Banerjee, 2015). Foram avaliadas duas bactérias para verificar o efeito do metabólito gerado pelo tratamento enzimático sobre elas e se esse tratamento foi capaz de diminuir a citotoxicidade do VM. Quando avaliada a antibiose em *E.coli* (DE3), observou-se um halo de inibição de crescimento para o corante, o que não ocorreu com o tratamento enzimático e nem com o controle (água ultrapura) (Figura 7 A). Murkherjee et al. (2014), utilizaram *Enterobacter asburiae* para degradar o VM, porém o teste de citotóxicidade com sete microrganismos demonstrou que o tratamento não foi totalmente eficiente na detoxificação do corante devido ao aparecimento de halos de inibição em quatros microrganismos, *E.coli*, *B. subtilis*, *Staphylococcus aureus* e *Saccharomyces cerevisiae*. Quando *A. brasilense* foi testado contra o corante e o produto do tratamento enzimático, não foi possível visualizar halos de inibição nem no tratamento nem no controle positivo de inibição (VM não tratado), indicando que a antibiose não se mostrou um ensaio eficiente para este microrganismo, considerando ausência de letalidade na condição avaliada (Figura 7 B). No entanto, conforme revelado pelos estudos de curva de crescimento em cultura líquida, o corante provocou alterações no crescimento bacteriano de ambas as espécies. Conforme pode ser observado na Figura 7 C, o corante não tratado (controle positivo de inibição) não afetou de forma marcante o desempenho da cultura de *A. brasilense* no início da fase logarítmica, mas causou forte reversão na curva de crescimento a partir de 6 h de cultivo, quando a cultura iniciou uma fase de declínio. A eficiência do tratamento enzimático é evidenciada ao observar que o corante tratado atingiu o mesmo desempenho de crescimento do observado para o controle negativo (sem nenhum aditivo), atingindo cerca de 2,5 X maior crescimento do que o observado para o controle positivo de inibição.

O efeito do corante na fase inicial de cultivo se mostrou mais expressivo em *E. coli*, causando um prolongamento da fase lag até 6 horas de cultivo, sendo posteriormente observada uma curta fase logarítmica com apenas uma hora de duração, seguida por uma fase estacionária simultânea à observada para o controle negativo e do tratamento, embora tenha atingido uma taxa máxima de crescimento logarítmico cerca de 3x menor do que observado para estes (Figura

7 D), sendo que o desempenho do metabolito gerado pelo tratamento se equiparou ao controle negativo, indicando eficiente detoxificação.

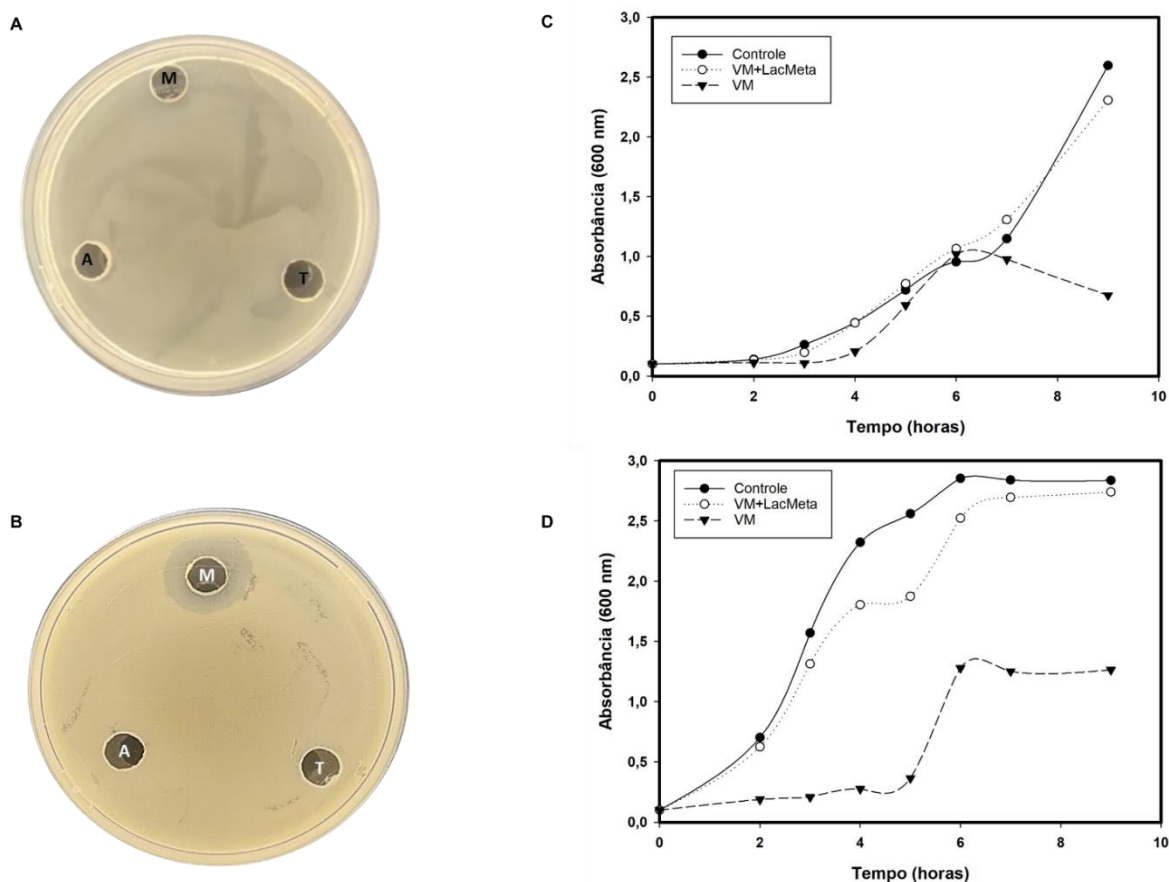


Figura 7. Impacto do tratamento enzimático do verde malaquita (VM) sobre crescimento bacteriano: teste de inibição em placa (A e B) e avaliação de efeito sobre curva de crescimento em meio líquido (C e D) para respectivas culturas de *A. brasilense* e *E. coli*. A: controle negativo: sem adição de VM; M: controle positivo (VM 50 mg mL⁻¹); T: VM tratado enzimaticamente com LacMeta.

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) permitiu visualizar o efeito do VM sobre as bactérias avaliadas, de forma que observou-se que o corante alterou a morfologia celular de *A. brasilense* e foi extremamente nocivo para *E. coli* alterando completamente a morfologia celular bacteriana (Figura 8 C e F). A integridade da membrana celular é essencial para a sobrevivência microbiana, dessa forma o VM apresentou citotoxicidade à estrutura celular, causando deformação, alteração de tamanho das células, destruição da superfície e muitas

vezes lise celular (Gopinathan, Kanhere e Banerjee, 2015). Apesar de não ter apresentado halo de inibição, *A. brasilense* apresentou outras duas características que denotam citotoxicidade, alteração no crescimento e morfologia celular. O metabólito gerado pelo tratamento enzimático não demonstrou nenhum efeito deletério sobre as cepas bacterianas, sendo assim um excelente agente de biorremediação (Figura 8 B e E).

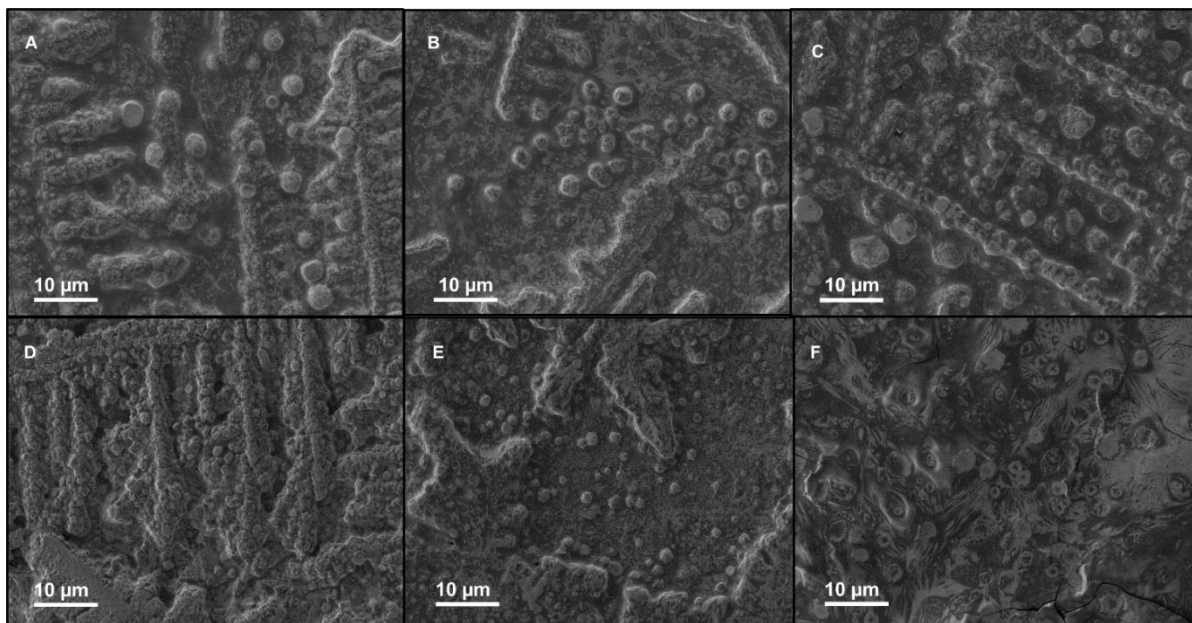


Figura 8. Microscopia eletrônica de varredura da *A. brasilense* e *E. coli* em meio LB (A e D), meio LB com Verde de Malaquita (50 mg/L) + LacMeta (B e E); meio LB + Verde de Malaquita 50 mg/L (C e F), respectivamente.

3.4 Potencial de descoloração/degradação enzimática de LacMeta

Os espectros de UV-Vis da descoloração do VM tratado com LacMeta, com e sem mediador redox, em água ultrapura a 37 °C apontam a eficácia do tratamento enzimático de descoloração em relação ao espectro do corante não tratado (Figura 9). O pico de 620 nm (λ max do VM) diminuiu drasticamente após 24 e 48h, sendo que para ambos os tratamentos (com e sem mediador redox), a absorbância de início, referente ao corante não tratado no tempo zero, que estava em torno de 2,5 foi reduzida para menos de 0,25 de absorbância já em 24h de tratamento, reduzindo ligeiramente ainda mais após 48h. Além disso, apesar do uso do mediador redox ser significativo para o aumento da atividade de muitas lacases (Mani *et al.*, 2018; Parra Guardado *et al.*, 2019), os espectros

não foram desproporcionais na descoloração entre os tratamentos, atingindo descoloração em torno de 95%, o que indica um notável grau de eficiência mesmo na ausência do mediador redox, favorecendo processo de menor custo.

No espectro do corante antes do tratamento, além do maior pico (620 nm) é possível observar ainda a existência de dois outros picos nos comprimentos de onda 420 e 315 nm, os quais são característicos do verde malaquita, sendo observados também nos espectros presentes em outros trabalhos (Barapatre, Aadil e Jha, 2017; Du *et al.*, 2018; Yang, Yang, *et al.*, 2015). A diminuição destes picos após o tratamento enzimático, sobretudo o pico em 420 nm, indica que a enzima foi capaz de degradar conjugados do corante na forma de cátions protonados $VM+H^+$, forma química do VM que é colorida (Du *et al.*, 2013; Elaziouti e Laouedj, 2010; Yang *et al.*, 2016) e que juntamente com os comprimentos de onda 620 e 315 nm, representam as absorbâncias responsáveis pela coloração do VM (Yong *et al.*, 2015).

Do ponto de vista das mudanças químico-estruturais, refletido nas mudanças do perfil espectral, a comparação de regiões específicas do espectro entre amostras tratadas e não tratadas de VM oferecem indícios de que a degradação foi efetiva. Nesse sentido, o pico em 200-280 nm corresponde a estrutura de um único anel de benzeno. Já a região 315 nm corresponde a estrutura com dois anéis benzênicos (Barapatre, Aadil e Jha, 2017; Navarro *et al.*, 2019) o que indica que o processo enzimático foi capaz de degradar estruturas tri-aromáticas (620 nm e 420 nm) (Figura 9 * e **) descomplexando a molécula em estruturas di-aromáticas (315 nm) para estruturas mais simples (200-280 nm). A utilização de mediadores redox, como o ABTS em conjunto com a enzima, na descoloração do VM pode propiciar a produção de leuco formas, alterando o espectro do corante em torno do maior pico (617-620 nm) aumentando o comprimento de onda para 637 nm (Bibi, Bhatti e Asgher, 2011), porém quando adicionado ABTS no tratamento com LacMeta, não ocorreu mudanças no comprimento de onda relatado, indicando que não ocorreu a formação de compostos leuco.

Após o tratamento, o espectro mostra ainda a presença de dois picos pequenos, correspondentes aos comprimentos de onda de 600 e 300 nm. A presença destes picos residuais na amostra tratada indica, aparentemente, se tratar da absorção radiação nestes comprimentos de ondas causada pela

presença da própria enzima LacMeta utilizada no tratamento, considerando que LacMeta faz parte do grupo de Multicopper oxidases, caracterizadas por apresentar grupamentos que absorvem radiação eletromagnética nos comprimentos de onda explicitados graças, a formação de núcleos de ligação ao cobre, sendo que o comprimento de 600 nm corresponde ao sítio T1 de ligação ao cobre, enquanto que a banda em 300 nm corresponde ao sítio T3, característicos de lacases.

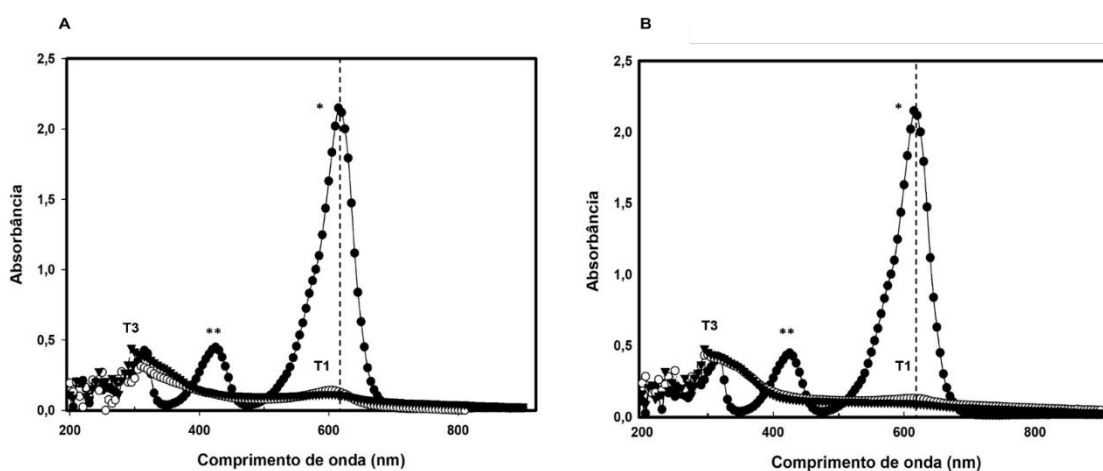


Figura 9. Espectro de U.V Visível do corante VM e do metabólito produzido pelo tratamento enzimático com LacMeta sem adição de ABTS (A) e com 0,1mmol L⁻¹ de ABTS (B). Leituras feitas de 200-900 nm. Círculos pretos representam o corante (50 mg/L) sem adição da enzima (controle). Círculos brancos representam o corante (50 mg/L) tratado com LacMeta após 24 h, triângulos pretos após 48h, * 620 nm (VM) e ** (VM+H⁺).

3.5 Espectros de H-RMN

Os espectros de H-RMN da figura 9 reforçam a alta eficácia da LacMeta em degradar o corante após 48 horas de tratamento. O espectro de H-RMN do VM comumente apresenta sinais aromáticos, três dubletos (7,05, 7,37, 7,44 ppm) (Figura 10.2) e dois tripletos (7,74 e 7,60 ppm) (Figura 10.1), e o LCM três dubletos (6,70, 6,91, 7,06 ppm) e dois tripletos (7,13 e 7,22 ppm) (Moe *et al.*, 2015), mostrando que o tratamento do VM com LacMeta realmente não formou LCM. O desaparecimento dos sinais resultantes de grupos aromáticos revela que surpreendentemente o tratamento enzimático atuou sobre estes, sendo assim, trata-se de um dos mais eficazes tratamentos de biorremediação desse

corante, e que ainda pode atuar na degradação de outros biocidas que tenham estruturas químicas parecidas com o do VM e/ou apresentem estruturas aromáticas.

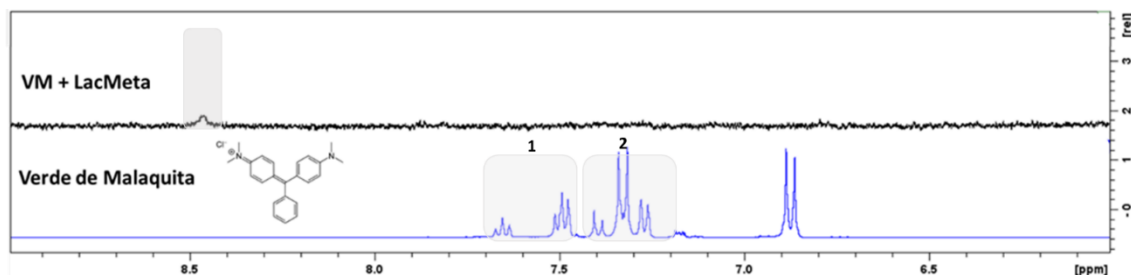


Figura 10. Espectros de H-RMN do Verde de Malaquita (50mg/L); 1. tripletos, 2. dubletos, e o metabólito gerado do tratamento com LacMeta após 24h.

4. CONCLUSÕES

A descoloração do VM por tratamento enzimático com LacMeta foi eficaz em 24h, mesmo sem a presença de um mediador redox. A caracterização da descoloração obtidos dos parâmetros enzimáticos, mostrou que a LacMeta foi tolerante a propanona, metanol, íons cálcio, manganês e cobalto e ao NaCl. Quando esses foram testados em uma única solução a descoloração não foi fortemente afetada. Além disso, o tratamento com LacMeta mostrou-se extremamente eficiente em reduzir ou mesmo eliminar o efeito tóxico do corante sobre as sementes e bactérias avaliadas, indicando que o produto gerado é significativamente menos tóxico, e o espectro de H-RMN indicou total degradação dos grupos aromáticos da estrutura do VM e a não formação de LCM.

5. REFERÊNCIAS

- AMADOR, V. S. *et al.* Direct coupling of paper spray mass spectrometry and four-phase electroextraction sample preparation. **Analyst**, v. 146, n. 3, p. 1057–1064, 2021.
- ARUNPRASATH, T. *et al.* Biodegradation of triphenylmethane dye malachite green by a newly isolated fungus strain. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 17, n. January, p. 672–679, 2019.
- AYED, L. *et al.* Biodegradation and decolorization of triphenylmethane dyes by *Staphylococcus epidermidis*. **Desalination**, v. 260, n. 1–3, p. 137–146, 2010.
- BARAPATRE, A.; AADIL, K. R.; JHA, H. Biodegradation of malachite green by the ligninolytic fungus *Aspergillus flavus*. **CLEAN - Soil, Air, Water**, v. 45, n. 9999, p. 1–12, 2017.
- BIBI, I.; BHATTI, H. N.; ASGHER, M. Comparative study of natural and synthetic phenolic compounds as efficient laccase mediators for the transformation of cationic dye. **Biochemical Engineering Journal**, v. 56, n. 3, p. 225–231, 2011.
- BILANDŽIĆ, N. *et al.* Malachite green residues in farmed fish in Croatia. **Food Control**, v. 26, n. 2, p. 393–396, 2012.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1–2, p. 248–254, 1976.
- CAMPOS, P. A.; LEVIN, L. N.; WIRTH, S. A. Heterologous production, characterization and dye decolorization ability of a novel thermostable laccase isoenzyme from *Trametes trogii* BAFC 463. **Process Biochemistry**, v. 51, n. 7, p. 895–903, 2016.
- CHANWALA, J. *et al.* Process optimization and enhanced decolorization of textile effluent by *Planococcus* sp. isolated from textile sludge. **Environmental Technology and Innovation**, v. 13, p. 122–129, 2019.
- CULP, S. J. *et al.* Toxicity and metabolism of malachite green and leucomalachite green during short-term feeding to Fischer 344 rats and B6C3F1 mice. **Chemico-Biological Interactions**, v. 122, n. 3, p. 153–170, 1999.

DOWLING, G. *et al.* Confirmatory analysis of malachite green, leucomalachite green, crystal violet and leucocrystal violet in salmon by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 586, n. 1- 2 SPEC. ISS., p. 411–419, 2007.

DU, L. N. *et al.* Biodegradation of malachite green by *Pseudomonas* sp. strain DY1 under aerobic condition: Characteristics, degradation products, enzyme analysis and phytotoxicity. **Ecotoxicology**, v. 20, n. 2, p. 438–446, 2011.

_____. Biodegradation of malachite green by *Micrococcus* sp. strain BD15: Biodegradation pathway and enzyme analysis. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 78, p. 108–116, 2013.

_____. Efficient degradation of malachite green by *aeromonas* sp. Strain dh-6. **Applied Environmental Biotechnology**, v. 3, n. 2, p. 2–8, 2018.

ELAZIOUTI, A.; LAOUEDJ, N. Comparison study on the removal of cationic dyes from aqueous suspension of maghnia montmorillonite. **Journal of the Korean Chemical Society**, v. 54, n. 3, p. 300–309, 2010.

GOMES, E. S. **Análise E Expressão De Genes De Pks li E De Carboidrases Provenientes De Bibliotecas Metagenômicas**. [s.l: s.n.].

GOPINATHAN, R.; KANHERE, J.; BANERJEE, J. Effect of malachite green toxicity on non target soil organisms. **Chemosphere**, v. 120, p. 637–644, 2015.

HAN, S. *et al.* Bioremediation of malachite green by cyanobacterium *Synechococcus elongatus* PCC 7942 engineered with a triphenylmethane reductase gene. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 104, n. 7, p. 3193–3204, 2020.

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.

JASIŃSKA, A. *et al.* Malachite green decolorization by the filamentous fungus *Myrothecium roridum* - Mechanistic study and process optimization. **Bioresource Technology**, v. 194, p. 43–48, 2015.

JIANG, M. *et al.* Conventional Ultrafiltration As Effective Strategy for Dye/Salt

Fractionation in Textile Wastewater Treatment. **Environmental Science and Technology**, v. 52, n. 18, p. 10698–10708, 2018.

KABEER, F. A.; JOHN, N.; ABDULLA, M. H. Biodegradation of malachite green by a newly isolated *Bacillus vietnamensis* sp. MSB17 from continental slope of the Eastern Arabian Sea: Enzyme analysis, degradation pathway and toxicity studies. **Bioremediation Journal**, v. 23, n. 4, p. 334–342, 2019.

KHAN, M.; MOOKAMBIKAY, R. Cloning and characterization of two functionally diverse lipases from soil metagenome. **Journal of General and Applied Microbiology**, v. 59, n. 1, p. 21–31, 2013.

KWAN, P. P. *et al.* Quantitative analysis of malachite green and leucomalachite green residues in fish purchased from the markets in Malaysia. **Food Control**, v. 92, p. 101–106, 2018.

LI, CHUNSHENG *et al.* Efficient biodegradation of malachite green by a newly isolated *Klebsiella pneumoniae* strain WA-1. **Environmental Progress and Sustainable Energy**, v. 39, n. 4, p. 1–9, 2020.

LIMA, N. S. M. Busca de biomoléculas com potencial biotecnológico em database metagenômico por sequence-driven. **Dissertação (Microbiologia Agropecuária)**, p. 69, 2017.

____. Broad thermal spectrum metagenomic laccase with action for dye decolorization and fentin hydroxide treatment. **AMB Express**, v. 12, n. 1, 2022.

LIU, X.; DENG, W.; YANG, Y. Characterization of a novel laccase lac-yang1 from white-rot fungus *pleurotus ostreatus* strain yang1 with a strong ability to degrade and detoxify chlorophenols. **Molecules**, v. 26, n. 2, p. 1–31, 2021.

LV, G. Y. *et al.* Biological decolorization of malachite green by *Deinococcus radiodurans* R1. **Bioresource Technology**, v. 144, p. 275–280, 2013.

MANI, P. *et al.* The role of natural laccase redox mediators in simultaneous dye decolorization and power production in microbial fuel cells. **Energies**, v. 11, n. 12, p. 1–12, 2018.

MISHRA, S.; MAITI, A. The efficacy of bacterial species to decolourise reactive azo, anthroquinone and triphenylmethane dyes from wastewater: a review.

Environmental Science and Pollution Research, v. 25, n. 9, p. 8286–8314, 2018.

MITROWSKA, K.; POSYNIK, A.; ZMUDZKI, J. Determination of malachite green and leucomalachite green residues in water using liquid chromatography with visible and fluorescence detection and confirmation by tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1207, n. 1–2, p. 94–100, 2008.

MNIF, I.; FENDRI, R.; GHRIBI, D. Malachite green bioremoval by a newly isolated strain *Citrobacter sedlakii* RI11; Enhancement of the treatment by biosurfactant addition. **Water Science and Technology**, v. 72, n. 8, p. 1283–1293, 2015.

MOE, N. K. T. *et al.* Isolation and characterization of malachite green-removing yeast from a traditional fermented fishery product. **Fisheries Science**, v. 81, n. 5, p. 937–945, 2015.

MORALES-ÁLVAREZ, E. D. *et al.* Decolorization and Detoxification of Malachite Green by *Ganoderma lucidum*: Key Operating Parameters and Adsorption Studies. **Journal of Environmental Engineering**, v. 143, n. 4, p. 04016093, 2017.

MUKHERJEE, T.; DAS, M. Degradation of malachite green by enterobacter asburiae strain XJUH-4TM. **Clean - Soil, Air, Water**, v. 42, n. 6, p. 849–856, 2014.

NAVARRO, P. *et al.* Degradation of malachite green by a pulsed light/H₂O₂ process. **Water Science and Technology**, v. 79, n. 2, p. 260–269, 2019.

PARRA GUARDADO, A. L. *et al.* Effect of redox mediators in pharmaceuticals degradation by laccase: A comparative study. **Process Biochemistry**, v. 78, n. December 2018, p. 123–131, 2019.

RUEDA-VILLABONA, J. D. *et al.* Crude enzymatic extract from *Dictyopanus pusillus* LMB4 as a biotechnological tool for crystal violet biodegradation. **Bioresource Technology Reports**, v. 15, n. January, p. 1–10, 2021.

SALEH BASHANAINI, M. Removal of Malachite Green Dye from Aqueous Solution by Adsorption Using Modified and Unmodified Local Agriculture Waste. **Science Journal of Analytical Chemistry**, v. 7, n. 2, p. 42, 2019.

SARAVANAKUMAR, K.; KATHIRESAN, K. Bioremoval of the synthetic dye malachite green by marine *Trichoderma* sp. **SpringerPlus**, v. 3, n. 1, p. 1–12, 2014.

SONG, L. *et al.* Performance of a newly isolated salt-tolerant yeast strain *Pichia occidentalis* G1 for degrading and detoxifying azo dyes. **Bioresource Technology**, v. 233, p. 21–29, 2017.

SRIVASTAVA, S.; SINHA, R.; ROY, D. Toxicological effects of malachite green. **Aquatic Toxicology**, v. 66, n. 3, p. 319–329, 2004.

TEEPOO, S.; WONGTONGDEE, U.; PHAPUGRANGKUL, P. Development of qualitative and quantitative immunochromatographic strip test assay for rapid and simple detection of leucomalachite green residual in aquatic animals. **Food Chemistry**, v. 320, n. March, p. 126613, 2020.

VIGNESH, A. *et al.* Microbial degradation, spectral analysis and toxicological assessment of malachite green by *Streptomyces chrestomyceticus* S20. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 43, n. 8, p. 1457–1468, 2020.

WANG, X. T. *et al.* A stable LnMOF as a highly efficient and selective luminescent sensor for detecting malachite green in water and real samples. **RSC Advances**, v. 10, n. 11, p. 6129–6134, 2020.

XU, K. Z.; MA, H.; *et al.* Extracellular expression of mutant CotA-laccase SF in *Escherichia coli* and its degradation of malachite green. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 193, n. December 2019, p. 110335, 2020.

XU, K. Z.; WANG, H. R.; *et al.* Enhancement in catalytic activity of CotA-laccase from *Bacillus pumilus* W3 via site-directed mutagenesis. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 129, n. 4, p. 405–411, 2020.

YAN, J. *et al.* Screening of *Trametes* strains for efficient decolorization of malachite green at high temperatures and ionic concentrations. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 87, p. 109–115, 2014.

YANG, J.; NG, T. B.; *et al.* A novel laccase from basidiomycete *Cerrena* sp.: Cloning, heterologous expression, and characterization. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 77, p. 344–349, 2015.

YANG, J.; YANG, X.; *et al.* Laccase-catalyzed decolorization of malachite green: Performance optimization and degradation mechanism. **PLoS ONE**, v. 10, n. 5, p. 1–14, 2015.

YANG, J. *et al.* Biodegradation of crystal violet mediated by CotA from *Bacillus amyloliquefaciens*. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 130, n. 4, p. 347–351, out. 2020.

YANG, X. *et al.* Degradation and detoxification of the triphenylmethane dye malachite green catalyzed by crude manganese peroxidase from *Irpex lacteus* F17. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 23, n. 10, p. 9585–9597, 2016.

YANG, X. Q. *et al.* Decolorization of azo, triphenylmethane and anthraquinone dyes by a newly isolated *Trametes* sp. SQ01 and its laccase. **Process Biochemistry**, v. 44, n. 10, p. 1185–1189, 2009.

YONG, L. *et al.* Photodegradation of malachite green under simulated and natural irradiation: Kinetics, products, and pathways. **Journal of Hazardous Materials**, v. 285, p. 127–136, 2015.

ZABLOCKA-GODLEWSKA, E.; PRZYSTAS, W.; GRABINSKA-SOTA, E. **Dye decolourisation using two *Klebsiella* strains** *Water, Air, and Soil Pollution*, 2015.

ZHIJUN, T. A. N.; LIHONG, X.; MENG MENG, G. U. O. Persistence of malachite green and leucomalachite green in perch (*Lateolabrax japonicus*)*. v. 29, n. 3, p. 647–655, 2011.

Capítulo 3 –Biodegradação de hidróxido de fentina e imazapic por LacMeta

RESUMO

A agricultura moderna requer a utilização de vários insumos bem como pesticidas para manutenção de um sistema produtivo e rentável. Porém, a complexidade e recorrência de aplicação de defensivos agrícolas frequentemente tem potencial de ocasionar a contaminação/persistências desses pesticidas no solo e em corpos hídricos. Este trabalho teve como objetivo avaliar a atuação da enzima LacMeta, uma lacase eficaz para degradação de corantes aromáticos trifenilmetanos, na degradação de dois pesticidas aromáticos, o fungicida hidróxido de fentina e o herbicida imazapic, frequentemente usados na agricultura. Considerando a necessidade de desenvolvimento de tecnologias de biorremediação eficazes e viáveis do ponto de vista de custo operacional, duas estratégias foram avaliadas: a utilização da enzima recombinante purificada e a utilização do próprio microrganismo hospedeiro heterólogo *Escherichia coli* BL21 DE3 transformado com o vetor recombinante contendo a LacMeta. Os testes de degradação do hidróxido de fentina mostraram ser eficientes (redução de potencial fungicida e diminuição do sinal espectrofotométrico do pico principal do composto). Para imazapic, além da redução do pico no perfil espectrofotométrico, os ensaios indicaram que LacMeta foi induzida positivamente pelo herbicida resultando no aumento da atividade específica da enzima. Este trabalho é pioneiro em relação ao estudo da degradação desses dois compostos utilizando uma enzima. Sendo assim, novas pesquisas podem ser direcionadas futuramente para desvendar os mecanismos metabólicos intrínsecos visando otimizar estratégias de biorremediação.

Palavras-chaves: fungicida; herbicida; pesticidas; biorremediação

1. INTRODUÇÃO

O uso de defensivos agrícolas (pesticidas) é extremamente importante para a conservação da sanidade de áreas cultivadas e de subprodutos, auxiliando no aumento da produtividade. Esses compostos podem ser degradados naturalmente por conversão física, química e bioquímica, porém devido à estabilidade e a solubilidade de alguns pesticidas, estes podem permanecer no ambiente por um longo período de tempo (Narayanan *et al.*, 2020). A contaminação por pesticidas pode ocorrer em três regiões: superfície do solo, zona vadosa e água subterrânea ou zona saturada (Singh, 2008). Em razão da complexidade do solo, a degradação de pesticidas vai depender de uma série de fatores como, pH, temperatura, umidade e cobertura vegetal (Erguven e Demirci, 2020). A biodegradação de pesticidas por microrganismos é uma forma eficiente de remoção de compostos tóxicos do ambiente, uma vez que esses organismos possuem a capacidade de transformar e produzir produtos finais com baixa ou nenhuma toxicidade (Ramadass e Thiagarajan, 2017). O uso de enzimas para biorremediação tem se tornado cada vez mais comum, uma vez que alguns destes catalizadores possuem caráter de maior promiscuidade em relação à ação sobre seus substratos o que permite a atuação em diferentes moléculas com semelhanças estruturais (Mousavi *et al.*, 2021).

As lacases são enzimas encontradas nos mais diversos organismos, possuem íons de cobre na sua estrutura e conhecidamente podem atuar na degradação dos mais diversos compostos, como corantes, fenóis em geral e aminas aromáticas (Jin *et al.*, 2016). Atualmente são denominadas “catalisadores verdes”, uma vez que não necessitam do uso de peróxido de hidrogênio para reação de oxidação, usando o oxigênio molecular como acceptor de elétrons e o transformando em água (Jin *et al.*, 2016; Levin *et al.*, 2019). Essas enzimas são bastante conhecidas, uma vez que possuem comprovado potencial para degradação de vários pesticidas, como tecunonazole (fungicida) (Artigas *et al.*, 2017), paraquat (herbicida) (Jaszek *et al.*, 2006) e para clorpirifos (inseticida) (Das, Singh e Yogalakshmi, 2017).

O hidróxido de fentina (Figura 1A), também conhecido como hidróxido de trifenilestanho, pertencente a classe organoestânicos, é um fungicida agrícola, utilizados nas culturas da batata e beterraba (Grote *et al.*, 2006). Os compostos organoestânicos são amplamente utilizados na agricultura, principalmente como

fungicidas e acaricidas, além disso são conhecidos por serem utilizados em tintas de embarcações como anti-incrustantes causando a contaminação de portos e rotas marítimas (Sakultantimetha *et al.*, 2011; Sarpa *et al.*, 2010). O hidróxido de fentina é um dos principais causadores de infertilidade em ratos (Gaines e Kimbrough, 1968). Compostos trifenilestânicos apresentam baixa solubilidade em água em complexidade estrutural que muitas vezes dificulta a ação de microrganismos que possam biodegradar esses compostos (Huang *et al.*, 2014). Apesar de muito complexos, Finnegan *et al.* (2018) apontam a eficiência de microrganismos na biorremediação de compostos organotin enquanto, é possível encontrar estudos sobre para outros trifenilestânicos com microrganismos envolvidos na degradação desses, como *Brevibacillus brevis* (Ye *et al.*, 2014), *Pseudomonas putida* (Visoottiviseth *et al.*, 1995), e *Stenotrophomonas maltophilia* (Gao *et al.*, 2014), este último atuando tanto na biodegradação quanto na biosorção.

A presença de resíduos de herbicidas, principalmente os pré-emergentes, uma vez que esses são necessário para o controle de plantas daninhas da cultura de interesse, pode prejudicar as colheitas subsequentes, semelhante ao que acontece com os herbicidas imidazolinonas que são persistentes no solo e muitas vezes acabam afetando cultivos rotativos (Gehrke *et al.*, 2021). Os imidazolinonas atuam na inibição da acetolactato sintetase (ALS), responsável por catalisar a biossíntese de valina, leucina e isoleucinas (Vasconcelo *et al.*, 2020). Os herbicidas dessa classe apresentam baixas taxas de aplicação e seletividade para uma ampla variedade de culturas, porém essas baixas taxas prejudicam a detecção dos seus resíduos no solo (Ramezani *et al.*, 2009). Por apresentarem baixo coeficiente de adsorção e baixa degradação em condições de anaerobiose, estes herbicidas podem permanecer por longos períodos no meio ambiente e podem contaminar corpos hídricos (Bundt *et al.*, 2015).

O ácido imazapic(±)-2-(4-isopropil-4-metil-5-oxo-2-imidazolin-2-il)-5-metilnicotínico (Figura 1 B) é um dos representantes dessa classe, o qual tem sido utilizado na cultura do amendoim em todo mundo devido a sua alta eficiência no controle de plantas daninhas relacionadas a essa cultura (Su *et al.*, 2019). Porém, a sua utilização em culturas sucessivas tem revelado, impactos negativos na produtividade da cultura posterior, além de já ter sido comprovada a presença de resíduos de imazapic no solo e em corpos hídricos, sendo assim

estudos relacionados a remoção/degradação do imazapic são de grande importância (Vasconcelo *et al.*, 2020). Alguns estudos envolvendo microrganismos para biorremediação de imidazolinones foram realizados e obtiveram resultados satisfatórios, como a utilização de *Acinetobacter baumannii* para tratamento do Imazanox (LIU *et al.*, 2016) e *Botryosphaeria rhodina* para Imazaquin (Rezende *et al.*, 2005), e nesse último estudo foi relatado que lacases podem estar envolvidas no tratamento desse herbicida.

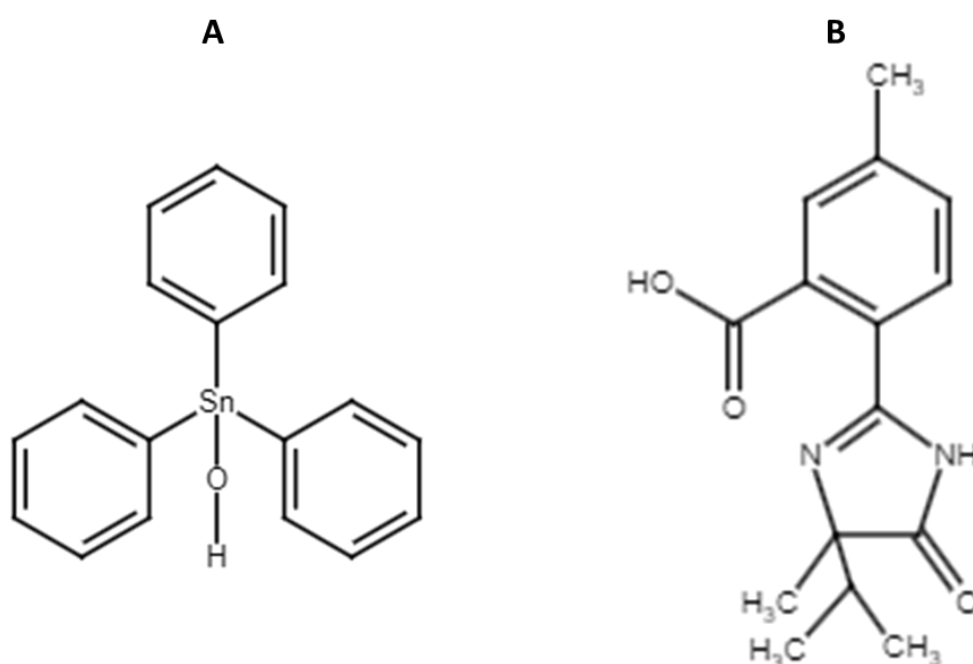


Figura 1. Estrutura química do hidróxido de fentina (A) e imazapic (B). Fonte: https://ec.europa.eu/food/plants/pesticides/eu-pesticides-database_en.

Estudos preliminares indicaram potencial da lacase LacMeta na degradação de corantes trifenilmetanos (manuscrito em preparação). Sendo assim, o objetivo desse trabalho foi verificar o potencial dessa enzima na degradação de hidróxido de fentina e imazapic, dois importantes defensivos agrícolas.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Fluxograma de trabalho

Para esse trabalho foram seguidos os seguintes passos metodológicos (Figura 2), sendo que os testes, em sua maioria foram realizados com os produtos comerciais, Mertin 400 (hidróxido de fentina) e Plateau (imazapic).

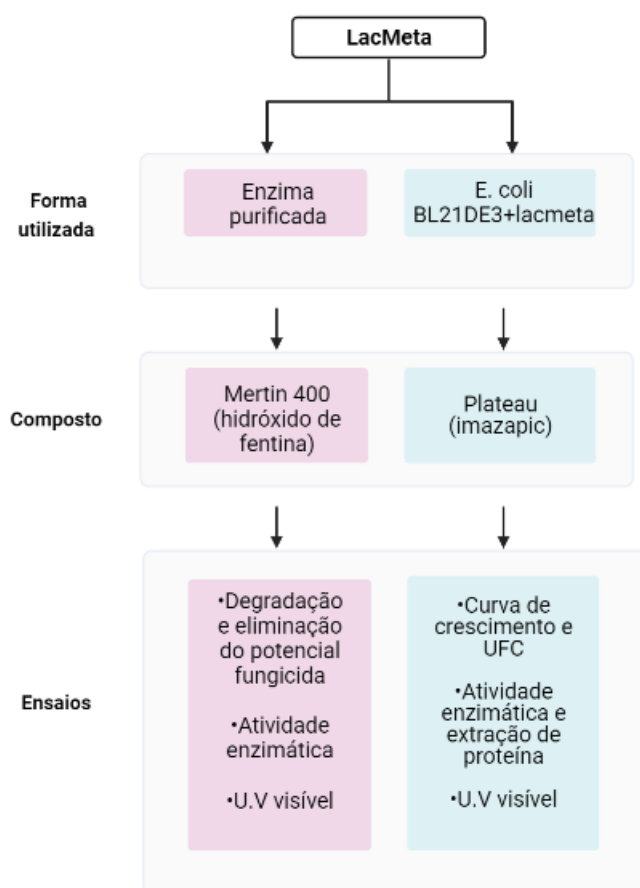


Figura 2. Fluxograma metodológico da pesquisa

2.2 Forma de aplicação de LacMeta para o tratamento dos pesticidas

2.2.1 Hidróxido de fentina – Mertin 400®

2.2.1.1 Expressão e purificação da LacMeta

Os testes foram feitos com a enzima superexpressada em 1L de meio LB com $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ de IPTG por 16 h a 30°C . Após a extração da proteína, dois passos de purificação foram realizados: cromatografia por afinidade com metal e cromatografia por exclusão de tamanho molecular ou filtração em gel. A

atividade enzimática foi restituída conforme Machczynsk e colaboradores (2004) com modificações. A quantificação da concentração de proteína dos extratos e frações purificadas foi realizada utilizando o espectrofotômetro Nanodrop ND-1000 (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA), adicionando o coeficiente de extinção molar da proteína predito através da ferramenta ProtParam (<http://web.expasy.org/protparam/>). A quantificação da holoenzima foi feita por método de Bradford (Bradford, 1976).

2.2.2 Imizapic – Plateau®

2.2.2.1 Obtenção do inóculo e expressão da LacMeta

As células de *E. coli* DE3 contendo o gene da LacMeta foram mantidas em ultrafreezer -80 °C contendo 20% de glicerol. Para o preparo do pré-inóculo, uma colônia isolada a partir do cultivo feito em meio LB sólido foi inoculada em meio 50 mL de LB líquido e cultivada por 16 horas, 37 °C e 200 rpm. O inóculo foi feito utilizando 5% de pré-inóculo adicionando em 1L de LB líquido suplementado com 50 µg/ml de canamicina e a indução com 0,25 mmol L⁻¹ de CuSO₄ foi feita após alcançar a D.O 600 na faixa de 0,4-0,6.

2.3 Ensaios de biodegradação

2.3.1 Detoxificação do hidróxido de fentina por LacMeta

Para verificar a eficiência de LacMeta em degradar o hidróxido de fentina, foi avaliado a capacidade da enzima em minimizar o potencial fungicida do composto. Foram realizados ensaios com três concentrações do produto comercial – Mertin 400®: 1, 0,5 e 0,325 L/há, referentes a dose do princípio ativo (hidróxido de fentina) 0,5, 0,25 e 0,16 mg/L em volume reacional de 30 mL. As reações foram realizadas diluindo o produto comercial em água ultrapura e adicionando 17 µg/µl de enzima. As amostras foram incubadas 30 °C, agitação de 150 rpm por 14 dias. Após os 14 dias, uma alíquota de 20 µl de cada tratamento e controle, foram inoculados em meio Batata-Dextrose-Ágar (BDA) juntamente com discos de 5mm dos fungos *Colletotrichum* sp. e *Alternaria* sp. (Figura 3). A eficiência do tratamento foi verificada observando halos de inibição, sendo o composto sem tratamento enzimático como controle positivo (presença

de halos) e o controle negativo água ultrapura (sem a presença de halos). A porcentagem de eficiência do tratamento foi calculada de acordo com a metodologia adaptada de Rahman e colaboradores (2016) com a seguinte equação:

$$\% \text{ de eficiência} = \frac{C-T}{C} \times 100$$

onde C = é o diâmetro de inibição com o fungicida e T = é o diâmetro de inibição do tratamento.

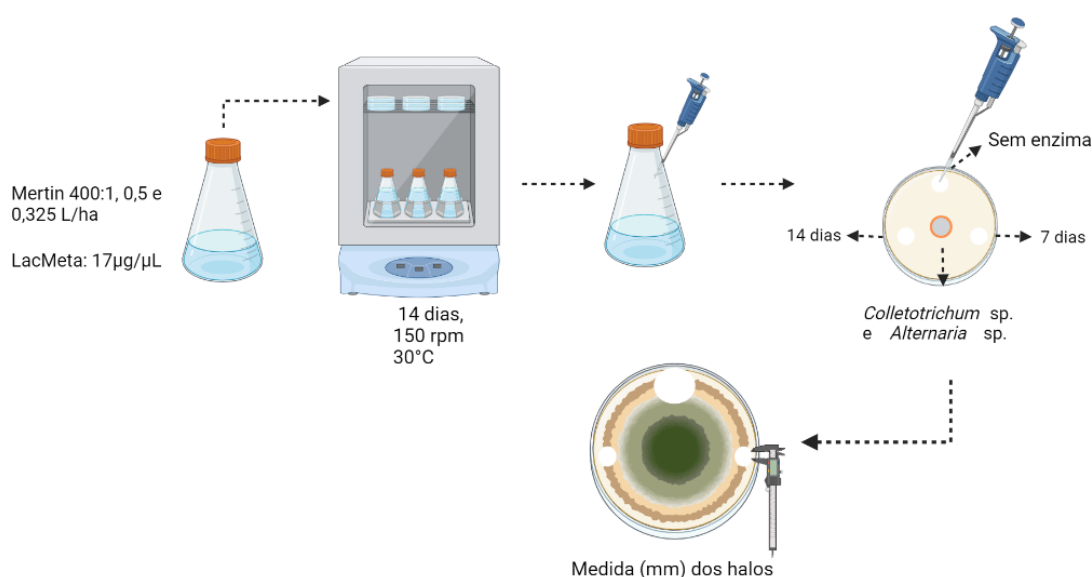


Figura 3. Processo para avaliação da detoxificação do hidróxido de fentina contra *Colletotrichum* sp. e *Alternaria* sp.

Para verificar se a enzima estava na forma ativa até o fim dos experimentos, a atividade enzimática de lacase foi mensurada utilizando 1 mmol L⁻¹ de ABTS (λ 420 nm), tampão citrato de sódio pH 4,0 na temperatura de 37 °C. Uma unidade de atividade de lacase foi definida como a quantidade de lacase capaz de oxidar 1 µmol de ABTS por minuto nas condições do ensaio.

2.3.2 Efeito do herbicida Imazapic sobre o crescimento da E.coli + lacmeta

Após a indução com o CuSO_4 foi adicionada em cada inóculo as concentrações equivalentes a 350, 175 e 150 kg/ha de Imazapic (Plateau®-BASF). A cada 24 horas foi medido a D.O 600 nm e as Unidades Formadoras de Colônias (UFC). O teste foi conduzido em câmara de crescimento com rotação de 150 rpm a 37 °C durante 15 dias.

2.3.3 Atividade enzimática da LacMeta sob efeito do Imazapic

A fim de verificar o efeito das concentrações testadas sob a atividade da enzima, foram retiradas alíquotas de cada concentração durante os 15 dias de tratamento. Para cada alíquota foi realizada a extração de proteína com tampão tris-HCl 20 mmol L⁻¹, 300 mM de NaCl e pH 7,5, as células foram rompidas por ultrasonicação (Branson Sonifier 250, Branson, Connecticut, USA), com razão cíclica de 20 %, com ciclos de 10s. A atividade enzimática de lacase foi mensurada utilizando 1mmol.L⁻¹ de ABTS, tampão citrato de sódio pH 4,0 na temperatura de 37 °C. A quantificação de proteína foi feita por método de Bradford (Bradford, 1976). Todos os experimentos foram realizados em triplicata, e os controles foram submetidos aos mesmos parâmetros sem adição da enzima. Para verificar o padrão de expressão da LacMeta sob essas concentrações foi realizada a eletroforese de proteínas com gel de SDS-PAGE.

2.3.4 Avaliação da degradação dos pesticidas por espectroscopia molecular U.V visível

Para a análise dos possíveis espectros de degradação foram utilizados o Imazapic e o ingrediente ativo do Mertin 400, hidróxido de fentina (Sigma Aldrich, Saint Louis, Missouri, EUA). As concentrações usadas foram de acordo com a porcentagem do princípio ativo dentro do produto comercial. As leituras foram feitas a cada 7 dias até completar os 14 dias de tratamento. O espectro de UV-Vis foi empregado na faixa de leitura espectrofotométrica de 200-900 nm com intervalo de 5 nm, utilizando o espectrofotômetro UV-Vis Multiscan GO (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA).

3. Resultados e discussão

3.1 Hidróxido de fentina

Para definir a melhor concentração de enzima e tempo de tratamento foram realizados ensaios com quatro concentrações, 68, 34, 17 e 8,5 µg/µL de enzima ao longo de um intervalo de tempo de incubação de 23 dias. Alíquotas foram tiradas nos dias, 1,3, 7,10, 14, 19 e 23 e inoculadas contra *Alternaria* sp.. Para determinação do melhor valor de concentração e tempo de incubação foram observados os tratamentos que resultaram na diminuição dos halos de inibição de crescimento fúngico, ou seja, em que o tratamento foi eficaz na degradação do potencial fungicida do composto, reduzindo sua letalidade. Sendo assim, os parâmetros escolhidos foram de 17 µg/µL e 14 dias de tratamento (dados não mostrados). Após esse *screening* inicial, um novo teste foi realizado e alíquotas referentes aos dias 7 e 14 foram separadas e depois inoculadas ao fim do experimento (14 dias) contra *Alternaria* sp. e *Colletotrichum* sp., dois fungos que o hidróxido de fentina possui efeito letal (Figura 4). Para *Alternaria* sp. todas as concentrações do fungicida foram avaliadas, porém para *Colletotrichum* sp. somente a concentração de 0,5 mg/L foi realizada, uma vez que somente essa concentração demonstrou potencial fungicida contra este fungo. A concentração de 0,16 mg/L, 7 dias de tratamento foi eficiente contra a degradação potencial fungicida contra *Alternaria* sp., porém o tempo de 14 dias foi escolhido para o tratamento, uma vez que foi eficiente para todas as concentrações testadas. Normalmente as avaliações de degradação de compostos como fungicidas, envolvem técnicas cromatográficas (Sarker *et al.*, 2020), espectrofotométricas, teste de citotoxicidade contra bactérias (Pacholak *et al.*, 2022), com algas (Jiang *et al.*, 2021) e crustáceos (Zhang *et al.*, 2020). A nossa abordagem buscou verificar se o hidróxido de fentina perdia o potencial fungicida após o tratamento com LacMeta, o que indicaria em que momento o composto possivelmente estaria degradado, assim seguiríamos para as análises com espectrofotômetros (U.V Visível) e de identificação dos compostos (H-NMR) com mais propriedade de que o tratamento foi eficiente na degradação.

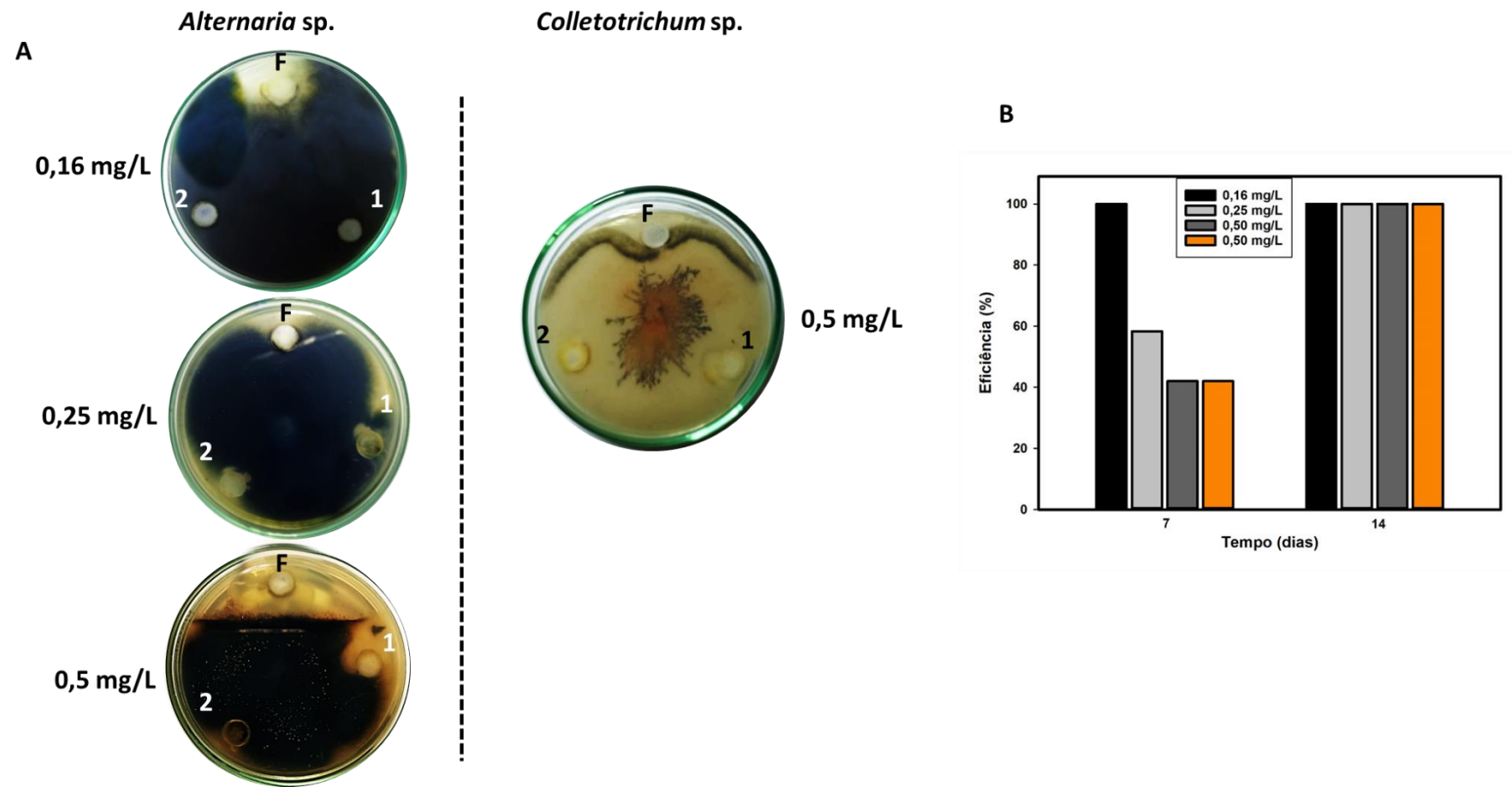


Figura 4. A) Teste de inibição do produto comercial Mertin 400- princípio ativo hidróxido de fentina (0,16, 0,25 e 0,5 mg/L) tratado com LacMeta contra *Alternaria sp.* e *Colletotrichum sp.* B) Porcentagem de eficiência das concentrações do hidróxido de fentina com 7 e 14 dias. Barra laranja corresponde ao teste com *Colletotrichum sp.*

3.2 Imazapic

Uma das principais vantagens da produção heteróloga de proteínas é a alta produtividade da enzima de interesse, porém muitas vezes para a obtenção desta são necessários alguns passos de purificação, bem como utilização de insumos que acabam tornando o processo relativamente mais demorado e caro. Por isso, para esse teste foi utilizado o clone de *E.coli* BL21 DE3 contendo o gene de LacMeta. Um ensaio prévio para identificar o método de expressão mais eficiente foi feito, onde a expressão de LacMeta foi realizada utilizando dois indutores, o IPTG ($0,1 \text{ mmol L}^{-1}$), indutor mais comum de proteínas heterólogas e o CuSO_4 ($0,25 \text{ mmol L}^{-1}$), que também atua como indutor da LacMeta e outras lacases (Patente depositada BR 10 2020 026200 9) (Tabela 1). Quando comparada a atividade enzimática da lacase em cada indutor os valores foram de 83,9 para 319 U, quatro vezes mais atividade com o CuSO_4 do que o observado para o IPTG, sendo assim a indução por cobre a escolhida para os demais testes (Tabela 1).

Tabela 1. Eficiência dos compostos de indutores

Indução	Atividade enzimática (U)
IPTG	83,9
CuSO_4	319

A despeito do acompanhamento da densidade óptica (DO 600 nm) ser uma das maneiras mais fáceis de acompanhar a toxicidade de certos compostos para no desenvolvimento de células bacterianas, a análise por unidade formadora de colônia (UFC) é considerada a metodologia mais adequada para comprovar essa toxicidade, uma vez que permite a detecção do número de indivíduos vivos e viáveis restantes na amostra ao longo do tempo, sendo mais fidedigna para detecção do efeito letal de diferentes tratamentos (Xiao *et al.*, 2015). Em relação aos dados obtidos de absorbância, os valores do tratamento não foram distantes do controle (Figura 5A), indicando que ocorreu a multiplicação celular mesmo em concentrações altas de Imazapic (350 g/ha). Resultados semelhantes foram obtidos em relação a UFC/mL, apesar de nas primeiras 24 horas (um dia) o controle apresentar maior quantidade de células viáveis, ao final do experimento com 15 dias os valores do controle e da maior

concentração foram exatamente os mesmos (7,7 log UFC/mL), valores que não foram distantes dos obtidos pelas outras concentrações de 150 e 175 g/ha, com 7,3 e 7,2 log UFC/mL, respectivamente (Figura 5B). Sabe-se que a *E.coli* é um organismo modelo e que pode ou não possuir capacidade para sobreviver em meios adversos e até mesmo enzimas que auxiliam na degradação de xenobióticos aumentando a sobrevivência dessas bactéria. Alguns estudos como de Botelho e colaboradores (2012), que testaram 13 herbicidas e seu efeito no crescimento da *E.coli* ATCC 25922, indicaram que essa cepa possuía resistência para a maioria dos herbicidas menos para o Gramoxone® (paraquat). Olchanheski et al. (2014) também avaliaram o efeito do Mesotrione® sob *E. coli* DH5α, porém com 6 horas já é possível observar uma diminuição da viabilidade das células. Um fator comum nesses trabalhos é que a concentração utilizada é menor do que a recomendada para aplicação no campo e o tempo de avaliação do efeito sobre as cepas é consideravelmente menor do que o avaliado por nós. Os resultados encontrados neste trabalho demonstram que as concentrações de Imazapic não apresentaram efeitos significativamente deletérios sob as células de *E.coli* + lacmeta.

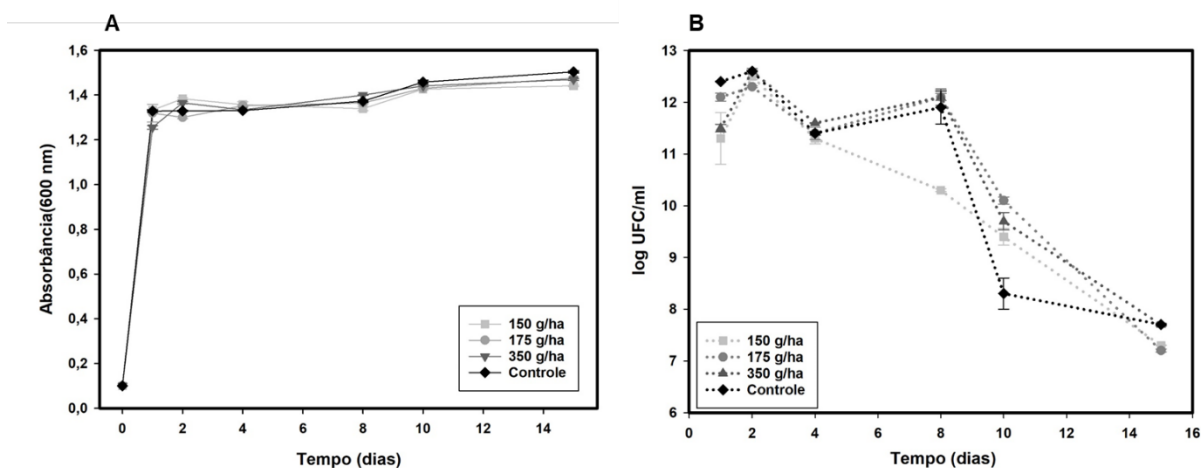


Figura 5. Efeito do imazapic no crescimento celular de *E.coli* + lacmeta. A) Curva de crescimento bacteriano (D.O 600 nm); B) UFC/mL (unidades formadoras de colônia por mililitro). Tempo de tratamento: 15 h.

3.3 Atividade enzimática de lacase exposta a hidróxido de fentina e Imazapic

Um fator crucial para a eficiência da degradação, é verificar se o composto xenobiótico não atua como inibidor da atividade enzimática do microrganismo, ou até mesmo, se a proteína heteróloga apresenta estabilidade na sua atividade ao longo do tratamento. Para o pesticida hidróxido de fentina, uma vez que o experimento ocorreu durante 14 dias, era verificar se LacMeta encontrava-se ativa no decorrer de todo o ensaio (Figura 6). A atividade de LacMeta não foi substancialmente afetada por hidróxido de fentina ao longo dos dias, em nenhum dos tratamentos o valor foi menor que 50%, somente no sétimo dia que as concentrações de 0,25 mg/L e 0,5 mg/L obtiveram valores próximos de 51%, porém ao final do experimento a atividade foi maior que 60% para ambas as concentrações, provavelmente indicando que a inibição ocasionada não era irreversível.

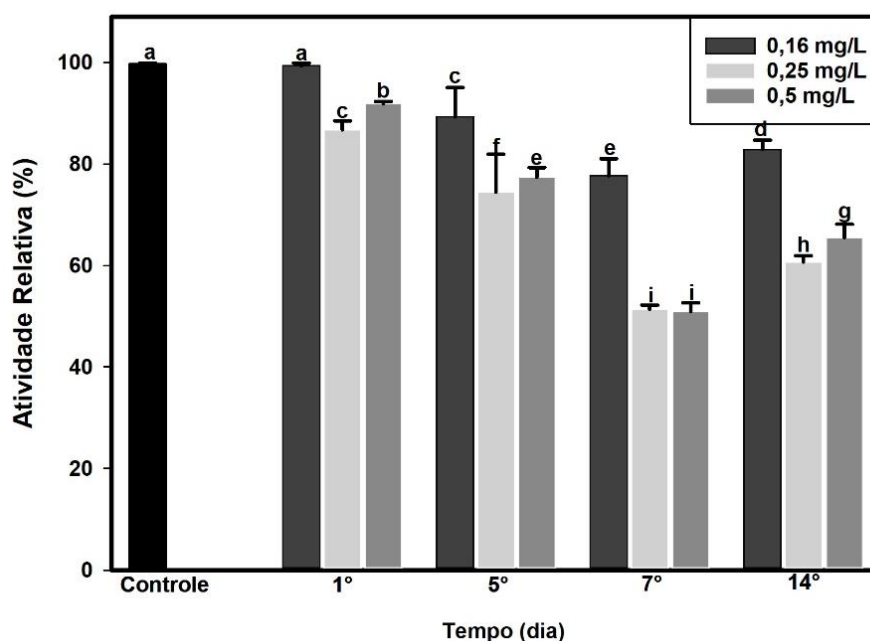


Figura 6. Efeito do fungicida hidróxido de fentina na atividade residual de LacMeta com o substrato ABTS (1 mmol L^{-1}), 20 mmol L^{-1} tampão citrato de sódio, pH 4,0, 37°C por 30 min.

A literatura ainda é escassa em relação a trabalhos com hidróxido de fentina, ainda mais relacionados a atividade enzimática, porém as lacases por serem enzimas de elevado poder biotecnológico, já foram investigadas na biorremediação de diversos outros compostos, incluindo fungicidas (Tabela 2).

Tabela 2. Atividade de lacases quando utilizadas para degradação de fungicidas

Fungicida	Enzima	Outras informações	Referência
Pentaclorofenol	Livre/Purificada	Sistema Mediador de Lacase	(Torres-Duarte <i>et al.</i> , 2009)
Imazalil	Lacase comercial/ Livre	Sistema Mediador de Lacase	(Maruyama <i>et al.</i> , 2007)
Tecubecanozole	Célula de <i>Alatospora acuminata</i>	Colonização de <i>Alnus glutinosa</i>	(Artigas <i>et al.</i> , 2017)
Clorotonil e pirimetanil	Lacase comercial/ Livre/Purificada	Sistema Mediador de Lacase	(Jin <i>et al.</i> , 2016)
Ciprodinil	Lacase comercial/ Livre/Purificada	Sistema Mediador de Lacase (ácidos húmicos)	(Kang <i>et al.</i> , 2002)

No teste com o herbicida Imazapic, para cada ponto de leitura avaliando anteriormente (Figura 5), foi realizado a atividade enzimática com ABTS e quantificação de proteínas totais. Nas primeiras 24 horas pode-se perceber que aos tratamentos de 350 e 175 g/ha obtiveram atividade específica maior que o do controle, principalmente a concentração de 350 g/ha com praticamente o triplo de atividade do controle (Tabela 3). Este fator de estimulação da atividade enzimática é muito interessante, uma vez que alguns compostos, como pesticidas podem atuar com inibidores enzimáticos, o que não ocorreu nesta

situação, onde justamente a maior concentração foi a responsável pelo maior valor de atividade específica, e mesmo ao final do tratamento foi possível observar que mesmo com a presença do Imazapic a amostra com 150 g/ha foi a mais ativa enzimaticamente. A atividade catalase foi afetada quando *E. coli* K-12 (estirpe selvagem e mutantes) foram inoculadas juntamente com Gramoxone® após 9 h de tratamento (Gravina *et al.*, 2017).

Tabela 3. Concentração de proteína e atividade de lacase ao longo do tratamento com imazapic com o substrato ABTS (1 mmol L^{-1}), 20 mmol L^{-1} tampão citrato de sódio, pH 4,0, 37°C por 30 min.

Amostras												
Controle				350 g/ha			175 g/ha			150 g/ha		
Temp o (h)	Proteína (mg)	Atividade total (U)	Atividade específica (U/mg)	Proteína (mg)	Atividade total (U)	Atividade específica (U/mg)	Proteína (mg)	Atividade total (U)	Atividade específica (U/mg)	Proteína (mg)	Atividade total (U)	Atividade específica (U/mg)
24	17,2	11,1	0,6	14,8	26,9	1,8	11,6	9,4	0,8	11,6	19,1	1,0
48	10,2	12,2	1,2	15,3	26,0	1,7	14,4	13,6	0,9	14,4	18,3	1,8
96	16,4	8,2	0,5	16,7	12,8	0,7	17,3	9,8	0,6	17,3	10,0	0,5
192	16,2	10,9	0,7	16,8	8,7	0,5	17,7	22,1	1,3	17,7	13,9	0,8
240	20,2	9,7	0,5	28,1	9,4	0,3	22	9,4	0,4	22	9,9	0,5
360	14	7,6	0,5	19,3	9,9	0,5	18,8	9,9	0,5	18,8	11,6	0,6

A análise utilizando SDS-PAGE, mostra que LacMeta continuou superexpressando ao longo de todo o teste, o que reforça ainda mais a capacidade dessa enzima ser utilizada no tratamento/biorremediação desse composto (Figura 7).

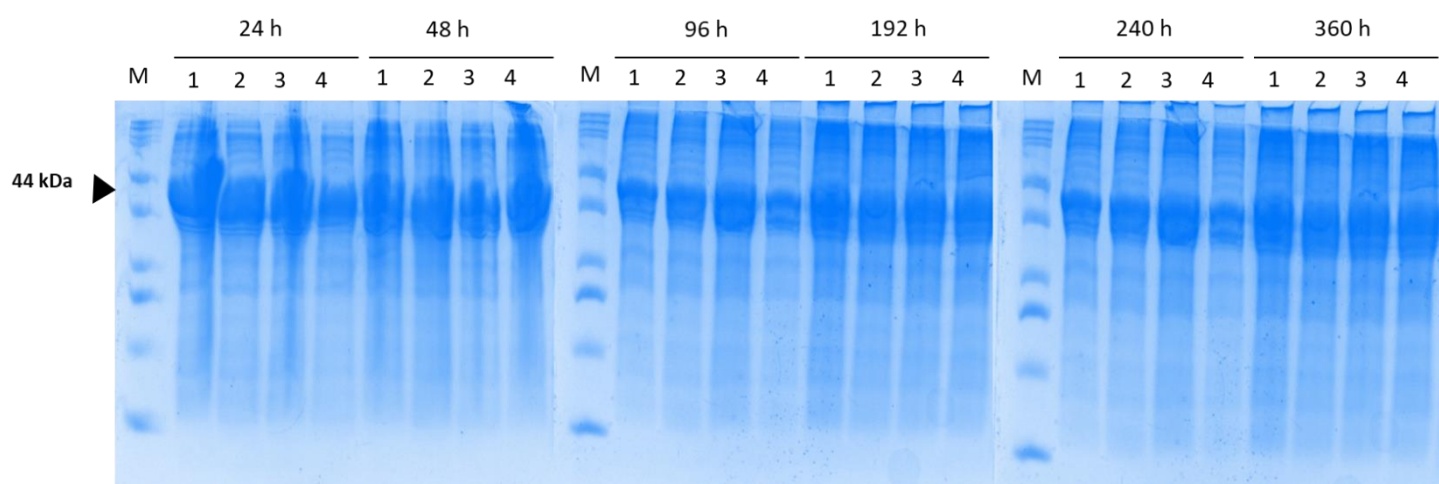


Figura 7. Análise em gel de SDS-PAGE 10 % das amostras de E.coli + lacmeta coinoculadas com imazapic. 1) Controle; 2) 350 g/ha; 3) 175 g/ha; 4) 150 g/ha. M = marcador de peso molecular.

Na literatura, outros herbicidas têm apresentado resultados de potenciais indutores de lacases, inclusive outros do grupo Imidazolinone (Tabela 4). O que indica um forte potencial dessas enzimas para a remoção e transformação desses compostos (Silva Coelho, da *et al.*, 2010).

Tabela 4. Efeito de herbicidas sob a atividade lacases microbianas e de plantas

Organismo /Origem	Herbicida	Grupo químico	Estrutura	Efeito na atividade	Ref.
Metagenoma	Plateau® (Imazapic)	Imidazolinona	$C_{14}H_{17}N_3O_3$	+	Este estudo
<i>Botryosphaeria rhodina</i>	Specter® (Imazaquin)	Imidazolinona	$C_{17}H_{17}N_3O_3$	+	(Rezende <i>et al.</i> , 2005)
<i>Ganoderma lucidum</i>	Bentazon (Basagran®) e Diuron	Benzotidiazole e Feniluréia	$C_{10}H_{12}N_2O_3S$ e $C_9H_{10}Cl_2N_2O$	+	(Silva Coelho, da <i>et al.</i> , 2010)
<i>Trametes versicolor</i>	Isoproturon	Ureia	$C_{12}H_{18}N_2O$	+	(Zeng, Qin e Xia, 2017)
<i>Abortiporus biennis</i>	Paraquat	Bipiridilo	$C_{12}H_{14}Cl_2N_2$	+	(Jaszek <i>et al.</i> , 2006)
<i>Oryza Sativa</i> #	Atrazina	Triazina	$C_8H_{14}ClN_5$	+	(Huang <i>et al.</i> , 2016)

planta

3.4 Análise de U. V visível da degradação de hidróxido de fentina e Imazapic

Com a análise de U.V vis do hidróxido de fentina foi possível observar que o pico mais proeminente foi no comprimento de onda de 300 nm (Figura 8), valor esse que é próximo de outros compostos trifenilestânicos, que é o acetato de fentina que possui o λ_{max} de 350 nm (Kurniasih *et al.*, 2015). Nos testes com as menores concentrações, é possível verificar que o espectro obtido com sete dias

de tratamento ultrapassou o do composto sem tratamento, o que indica houve a formação de um produto que emite sinal maior do que o grupamento químico original, conforme visto nos testes de inibição contra os fungos, que ao sétimo dia de tratamento as concentrações de 0,5 mg/L e 0,25mg/L ainda apresentavam efeito fungicida (Figura 4). Além disso, é possível verificar que a concentração de enzima utilizada foi eficiente degradar o hidróxido de fentina da menor à maior concentração, pois ambos atingiram valores de absorbância parecidos após 14 dias de tratamento

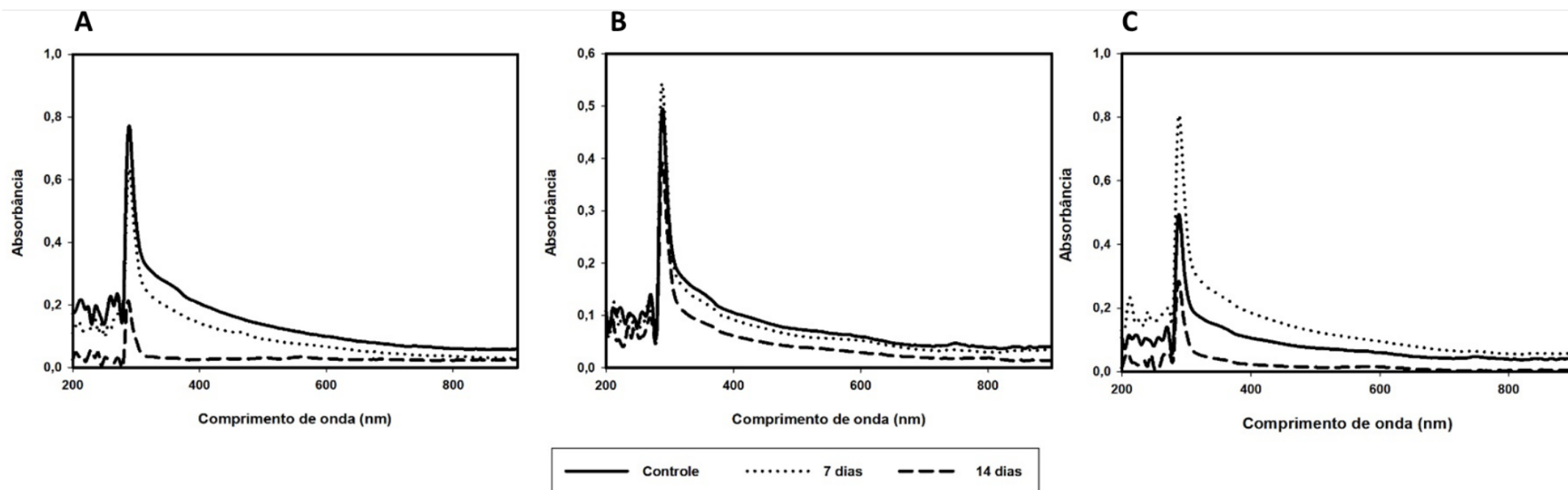


Figura 8. Espectro de U.V visível do hidróxido de fentina nas concentrações A) 0,5 mg/L B) 0,25 mg/L C) 0,16 mg/L e de seus metabolitos gerados quando tratadas com LacMeta por 14 dias. Leituras feitas de 200-900 nm.

O espectro de U.V vis do herbicida Imazapic apresenta picos característicos nas regiões de 200-280 nm (Christiansen *et al.*, 2015; Harir *et al.*, 2007; Pintado, Montoya e Rodríguez Mellado, 2011). Moreno e colaboradores (2018) observaram que após 20 h de tratamento os espectro entre 270-300 nm aumentaram substancialmente, gerando o um novo pico nessa região. O mesmo ocorreu quando o Imazapic foi degradado por LacMeta, porém após os 15 dias de tratamento esse pico desapareceu, indicando assim que os produtos formados pela degradação com absorbância nessa região foram também degradados (Figura 9). Outro fator interessante, são os picos após 280 nm e próximos a 300 nm que demonstram a relação dos imidazolinonas com íons de cobre e que geram absorbância exatamente nessa região (Moreno *et al.*, 2018; Rajamoorthi *et al.*, 1997), e uma vez que os resíduos desses herbicidas vão sendo cada vez mais degradados essa absorbância diminui. Ambas as concentrações testadas neste trabalho tiveram o mesmo comportamento onde os valores de absorbância dessas regiões (200-280 nm) diminuíram a partir dos 10 dias, e com 15 dias as a região representava a maior incidência de picos praticamente desapareceu para todos tratamentos, aparecendo picos de baixa absorbância somente na maior concentração do herbicida e juntamente com os dados do crescimento, demonstram que a *E. coli* + lacmeta foi capaz de continuar degradando o Imazapic ao longo dos 15 dias.

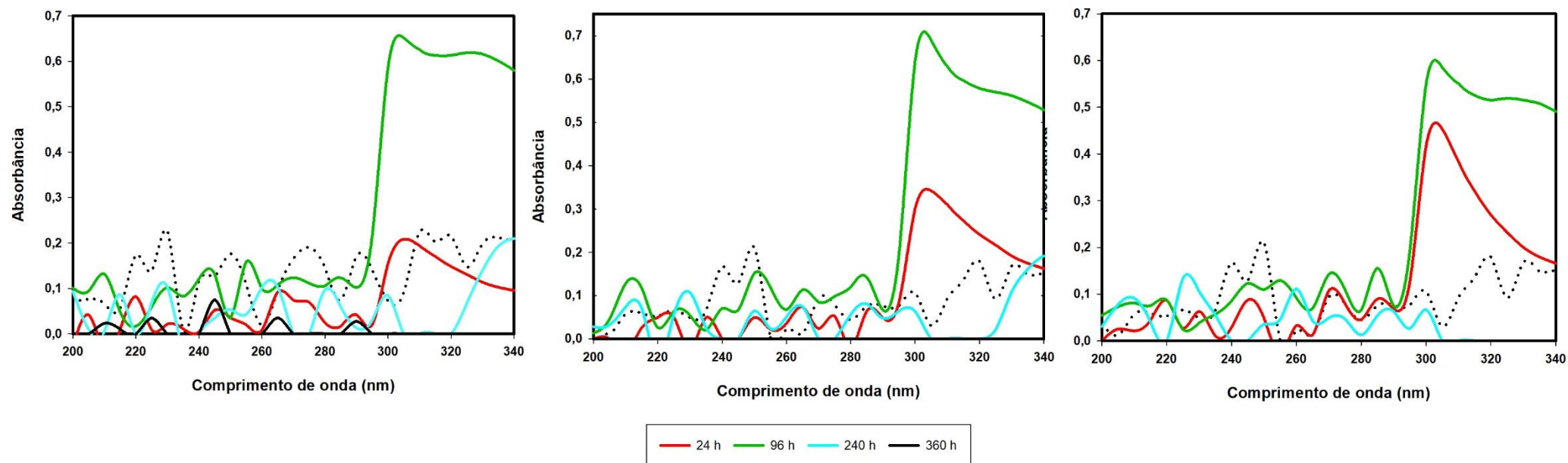


Figura 8. Espectro de U.V visível do herbicida imazapic nas concentrações de 350 g/ha, 175 g/ha e 150 g/ha e seus metabólitos tratados com LacMeta por 15 dias. Leituras feitas de 200-900 nm.

4. CONCLUSÕES

Os testes iniciais com os dois compostos consolidaram as propriedades da LacMeta como excelente agente biorremediador. Para hidróxido de fentina, o tratamento com a enzima foi capaz de transformá-lo em um composto que não apresentava mais o efeito fungicida. Para imazapic a atividade de lacase foi induzida pela presença do herbicida. Os espectros de U.V visível de ambos compostos indicaram que os picos que possivelmente correspondiam aos compostos, diminuíram após o tratamento com a enzima, entretanto o tempo de tratamento foi um fator bastante importante a medida que degradações em tempos intermediários aparentemente geraram compostos mais tóxicos que somente foram completamente degradados no final do tratamento (14 dias).

5. REFERÊNCIAS

- ARTIGAS, J. *et al.* Sensitivity of laccase activity to the fungicide tebuconazole in decomposing litter. **Science of the Total Environment**, v. 584–585, p. 1084–1092, 2017.
- BOTELHO, R. G.; FROES, C. M.; SANTOS, J. B. Toxicidade de herbicidas sobre o crescimento de *Escherichia coli*. **Brazilian Journal of Biology**, v. 72, n. 1, p. 141–146, 2012.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1–2, p. 248–254, 1976.
- BUNDT, A. C. *et al.* Imidazolinone degradation in soil in response to application history. **Planta Daninha**, v. 33, n. 2, p. 341–349, 2015.
- CHRISTIANSEN, A. *et al.* Analysis of the Photodegradation of the Imidazolinone Herbicides Imazamox, Imazapic, Imazaquin, and Imazamethabenz-methyl in Aqueous Solution. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 63, n. 50, p. 10768–10777, 2015.
- DAS, A.; SINGH, J.; YOGALAKSHMI, K. N. Laccase immobilized magnetic iron nanoparticles: Fabrication and its performance evaluation in chlorpyrifos degradation. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 117, p. 183–189, 2017.
- ERGUVEN, G. O.; DEMIRCI, U. Statistical evaluation of the bioremediation performance of *Ochrobactrum thiophenivorans* and *Sphingomonas melonis* bacteria on Imidacloprid insecticide in artificial agricultural field. **Journal of Environmental Health Science and Engineering**, v. 18, n. 2, p. 395–402, 2020.
- FINNEGAN, C. *et al.* Microbes a Tool for the Remediation of Organotin Pollution Determined by Static Headspace Gas. 2018.
- GAINES, T. B.; KIMBROUGH, R. D. Toxicity of fentin hydroxide to rats. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 12, n. 3, p. 397–403, 1968.
- GAO, J. *et al.* Biosorption and biodegradation of triphenyltin by *Stenotrophomonas maltophilia* and their influence on cellular metabolism. **Journal of Hazardous Materials**, v. 276, p. 112–119, 2014.
- GEHRKE, V. R. *et al.* Understanding the opportunities to mitigate carryover of imidazolinone herbicides in lowland rice. **Agriculture (Switzerland)**, v. 11, n. 4, p. 1–17, 2021.
- GRAVINA, F. *et al.* Metabolic Interference of sod gene mutations on catalase activity in *Escherichia coli* exposed to Gramoxone® (paraquat) herbicide. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 139, n. January, p. 89–96, 2017.
- GROTE, K. *et al.* Effects of fentin hydroxide on reproduction of the Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*). **Environmental Research**, v. 101, n. 1, p. 81–88, 2006.
- HARIR, M. *et al.* Photolysis pathway of imazapic in aqueous solution: Ultrahigh resolution mass spectrometry analysis of intermediates. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 24, p. 9936–9943, 2007.
- HUANG, J. *et al.* Triphenyltin biosorption, dephenylation pathway and cellular responses during triphenyltin biodegradation by *Bacillus thuringiensis* and tea saponin. **Chemical Engineering Journal**, v. 249, p. 167–173, 2014.
- HUANG, M. T. *et al.* Rice (*Oryza sativa*) Laccases Involved in Modification and

Detoxification of Herbicides Atrazine and Isoproturon Residues in Plants. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 64, n. 33, p. 6397–6406, 2016.

JASZEK, M. *et al.* Enhanced extracellular laccase activity as a part of the response system of white rot fungi: *Trametes versicolor* and *Abortiporus biennis* to paraquat-caused oxidative stress conditions. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 85, n. 3, p. 147–154, 2006.

JIANG, W. *et al.* Detoxification Esterase StrH Initiates Strobilurin Fungicide. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 87, n. 11, p. 1–13, 2021.

JIN, X. *et al.* Conditions Optimizing and Application of Laccase-mediator System (LMS) for the Laccase-catalyzed Pesticide Degradation. **Scientific Reports**, v. 6, n. May, p. 1–7, 2016.

KANG, K. *et al.* Transformation of the fungicide cyprodinil by a laccase of *Trametes villosa* in the presence of phenolic mediators and humic acid. **Water Research**, v. 36, p. 4907–4915, 2002.

KURNIASIH, H. *et al.* The synthesis, characterization and comparative anticorrosion study of some organotin(IV) 4-chlorobenzoates. **Oriental Journal of Chemistry**, v. 31, n. 4, p. 2377–2383, 2015.

LEVIN, L. N. *et al.* Decolorization and detoxification of synthetic dyes by mexican strains of *trametes* sp. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 16, n. 23, p. 1–14, 2019.

LIU, C. GUANG *et al.* Imazamox microbial degradation by common clinical bacteria: *Acinetobacter baumannii* IB5 isolated from black soil in China shows high potency. **Journal of Integrative Agriculture**, v. 15, n. 8, p. 1798–1807, 2016.

MACHCZYNSKI, M. C. *et al.* Characterization of SLAC: a small laccase from *Streptomyces coelicolor* with unprecedented activity. **Protein science: a publication of the Protein Society**, v. 13, n. 9, p. 2388–97, set. 2004.

MARUYAMA, T. *et al.* Laccase-mediated degradation and reduction of toxicity of the postharvest fungicide imazalil. **Process Biochemistry**, v. 42, n. 3, p. 459–461, 2007.

MORENO, M. T. *et al.* Imidazolinone and triazine herbicides in soils in relation to the complexes formed with Cu(II) ions. **Comptes Rendus Chimie**, v. 21, n. 9, p. 884–889, 2018.

MOUSAVI, S. M. *et al.* **Recent Advances in Enzymes for the Bioremediation of Pollutants** *Biochemistry Research International*, 2021.

NARAYANAN, M. *et al.* Enzyme and metabolites attained in degradation of chemical pesticides β Cypermethrin by *Bacillus cereus*. **Materials Today: Proceedings**, n. xxxx, 2020.

OLCHANHESKI, L. R. *et al.* Mechanisms of Tolerance and High Degradation Capacity of the Herbicide Mesotrione by *Escherichia coli* Strain DH5- a. **PLoS ONE**, v. 9, n. 6, p. 1–8, 2014.

PACHOLAK, A. *et al.* Azole fungicides: (Bio)degradation, transformation products and toxicity elucidation. **Science of the Total Environment**, v. 802, p. 1–13, 2022.

PINTADO, S.; MONTOYA, M. R.; RODRÍGUEZ MELLADO, J. M. Imidazolinone herbicides in strongly acidic media: Speciation and electroreduction. **Comptes Rendus Chimie**, v. 14, n. 10, p. 957–962, 2011.

RAHMAN, M. M. E. *et al.* Suppressive effects of *Bacillus* spp. on mycelia, apothecia and

sclerotia formation of *Sclerotinia sclerotiorum* and potential as biological control of white mold on mustard. **Australasian Plant Pathology**, v. 45, n. 1, p. 103–117, 2016.

RAJAMOORTHY, K. *et al.* Differential metal binding interactions of the imidazolinones revealed by NMR and UV spectroscopy. **Pesticide Science**, v. 49, n. 1, p. 17–28, 1997.

RAMADASS, M.; THIAGARAJAN, P. Effective pesticide nano formulations and their bacterial degradation. **IOP Conf. Ser.: Mater. Sci. Eng.**, v. 263, 2017.

RAMEZANI, M. *et al.* Improved extraction and clean-up of imidazolinone herbicides from soil solutions using different solid-phase sorbents. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, n. 26, p. 5092–5100, 2009.

REZENDE, M. I. *et al.* Growth and production of laccases by the ligninolytic fungi, *Pleurotus ostreatus* and *Botryosphaeria rhodina*, cultured on basal medium containing the herbicide, Scepter® (imazaquin). **Journal of Basic Microbiology**, v. 45, n. 6, p. 460–469, 2005.

SAKULTANTIMETHA, A. *et al.* Chemosphere Bioremediation of tributyltin contaminated sediment: Degradation enhancement and improvement of bioavailability to promote treatment processes. **Chemosphere**, v. 83, n. 5, p. 680–686, 2011.

SARKER, A. *et al.* Comparative catalytic degradation of a metabolite 3,5-dichloroaniline derived from dicarboximide fungicide by laccase and MnO₂ mediators. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 196, n. December 2019, p. 110561, 2020.

SARPA, M. *et al.* Postnatal development and fertility of offspring from mice exposed to triphenyltin (fentin) hydroxide during pregnancy and lactation. **Journal of Toxicology and Environmental Health - Part A: Current Issues**, v. 73, n. 13–14, p. 965–971, 2010.

SILVA COELHO, J. DA *et al.* Effect of the herbicides bentazon and diuron on the production of ligninolytic enzymes by *Ganoderma lucidum*. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 64, n. 2, p. 156–161, 2010.

SINGH, D. K. Biodegradation and bioremediation of pesticide in soil: concept, method and recent developments. n. March, p. 35–40, 2008.

SU, W. *et al.* Adsorption and degradation of imazapic in soils under different environmental conditions. **PLoS ONE**, v. 14, n. 7, p. 1–11, 2019.

TORRES-DUARTE, C. *et al.* Halogenated pesticide transformation by a laccase-mediator system. **Chemosphere**, v. 77, n. 5, p. 687–692, 2009.

VASCONCELO, S. M. A. *et al.* Selection of tolerant species to imazapic for potential use in phytoremediation. **Revista Brasileira de Ciencias Agrarias**, v. 15, n. 2, 2020.

VISOOTTIVISETH, P. *et al.* Isolation of bacterial culture capable of degrading triphenyltin pesticides. **Applied Organometallic Chemistry**, v. 9, n. 1, p. 1–9, 1995.

XIAO, Y. *et al.* Toxicity measurement in biological wastewater treatment processes: A review. **Journal of Hazardous Materials**, v. 286, p. 15–29, 2015.

YE, J. *et al.* Triphenyltin biodegradation and intracellular material release by *Brevibacillus brevis*. **Chemosphere**, v. 105, p. 62–67, 2014.

ZENG, S.; QIN, X.; XIA, L. Degradation of the herbicide isoproturon by laccase-mediator systems. **Biochemical Engineering Journal**, v. 119, p. 92–100, 2017.

ZHANG, C. *et al.* Ecotoxicology of strobilurin fungicides. **Science of the Total Environment**, v. 742, p. 140611, 2020.

Capítulo 4 – Expressão, extração e atividade em gel de uma feruloil esterase

RESUMO

As feruloil esterases (FAE) (EC 3.1.1.73) pertencem à uma subclasse de esterases carboxílicas que atuam sobre o ácido ferúlico presente na parede celular vegetal, sendo classificadas em quatro classes distintas (A-D). O objetivo deste estudo foi prospectar e predizer funcionalmente por análises *in silico* as características da ORF *faec7* e proteína putativa para FAE, com o propósito de expressão heteróloga da enzima recombinante putativa em diferentes cepas de *Escherichia coli* e verificar possível atividade enzimática. Dentre as bibliotecas metagenômicas existentes no Laboratório de Bioquímica de Microrganismos e Plantas- LBMP, foi encontrado um gene correspondente a feruloil esterase a partir do metagenoma do solo de plantação de cana-de-açúcar, localizada no município de Santa Rita do Passa Quatro, São Paulo. Segundo as predições feitas, a putativa feruloil esterase apresentou 37 kDa de massa molecular e um domínio para de feruloil esterase/tanase, apresentado predição *in silico* para uma nova FAE do tipo C. Sendo assim, o clone C42₂, foi o que apresentou atividade para esterase em placas contendo Tween 20 e a maior atividade de tanase. Neste estudo de caráter preliminar, os parâmetros de expressão enzimática foram otimizados e com 6 h de indução foi o tempo que obteve maior atividade estereolítica. Estudos futuros poderão ser importantes para obtenção da nova FAE metagenômica na sua forma purificada, bem como possibilitarão a caracterização dos parâmetros enzimáticos e cinéticos para melhor avaliação de seu potencial de aplicação biotecnológica.

Paravras-chaves: FAE-C, tanase, metagenômica

INTRODUÇÃO

1.1 Feruloil esterase

As feruloil esterases (FAE) (EC 3.1.1.73) (hidrolases de ácido cinâmico, p-cumaroil esterases, hidroxicinamoil esterases) pertencem à uma subclasse de esterases carboxílicas (EC 3.1.1.-), também conhecidas como ácido ferúlico esterases, FAE e cianamoil esterases, e são enzimas capazes de degradar o ácido ferúlico presente na parede celular vegetal (Abokitse *et al.*, 2010; Borkar, 2015; Wong, 2006). Podem ser utilizadas na indústria de papel e celulose, além de processos de produção de bioetanol, alimentos e cosméticos (Benoit *et al.*, 2008).

Feruloil esterases microbianas foram classificadas de acordo com a similaridade entre as sequências e especificidade de substrato em quatro tipos: A, B, C e D (Crepin, Faulds e Connerton, 2004a). O tipo A possui preferência pela parte fenólica dos substratos, principalmente o carbono 3 e 5 dos ácidos ferúlicos e sinápicos e possuem similaridades com lipases. As do tipo B possuem similaridade com as acetil-xilana-esterases, liberam éster de ácido ferúlico ligado a C-2 de arabinose ou C-6 de resíduos de galactose complexadas com feruloil, e atuam em substrato como metil ferulato. As do tipo C atuam sobre metil ferulato, metil sinapato, metil p-coumarato e metil cafeato, e tem similaridade com as tanases. As do tipo D são similares com as xilanases, e atuam sobre os mesmos substratos das do tipo C (Crepin, Faulds e Connerton, 2004a).

1.2 Utilização das feruloil esterases para produção de etanol de segunda geração

A biomassa lignocelulósica é considerada uma das fontes mais promissoras para a geração de energia (Mkabayi *et al.*, 2020). Ela é formada basicamente por celulose (40-60%) hemicelulose (20-40%) e lignina (10-25%) (Kang *et al.*, 2014; Welker *et al.*, 2015). Além desses, outros componentes fazem parte da biomassa, como o ácido ferúlico (ácido 4-hidroxi-3-metoxi-cinâmico), que é um composto fenólico, pertencente a classe do ácido hidroxicinâmico, e presente na maioria das plantas (Levasseur *et al.*, 2005). A degradação enzimática da lignocelulose é um processo difícil, pois os polissacarídeos celulose e hemicelulose da parede celular da planta são incorporados em uma matriz de lignina que impede que as enzimas celulolíticas obtenham acesso aos seus

substratos (Poidevin *et al.*, 2014). As FAE são de grande importância na biodegradação de lignocelulose, pois hidrolisam as ligações éster entre hidroxicinamato e arabino-xilanos, que ligam o ácido ferúlico (FA), ácido cafeico (CA), ácido sinápico (SA) e ácido p-cumárico (pCA) aos polissacarídeos da parede celular vegetal, além disso podem atuar sobre certas pectinas em hemicelulose (Antonopoulou *et al.*, 2018; Levasseur *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2013). A presença de FAE permite que enzimas celulolíticas e hemicelulolíticas possam atuar na degradação parcial dos tecidos vegetais, o que ocasionou na grande procura destas enzimas para a produção de biocombustíveis (Udatha *et al.*, 2011), sendo muitas vezes combinadas com lacases, que são enzimas capazes de degradar o ácido ferúlico derivado da degradação de feruloil esterases sobre materiais vegetais (Nieter *et al.*, 2014), de forma que formulações comerciais destas duas classes de enzimas já são usadas sinergicamente na indústria de papel e celulose (Record *et al.*, 2003).

Sendo assim, este trabalho descreve os resultados preliminares da análise *in silico* e caracterização bioquímica de uma FAE/Tanase recombinante proveniente de amostras metagenômicas de solo sob cana de açúcar, visando contribuir na busca de novas enzimas voltadas para melhoria da eficiência da hidrólise da biomassa para diversas aplicações biotecnológicas como a biorrefinaria da biomassa e produção de etanol de segunda geração

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Prospecção de genes de putativas feruloil esterases

A busca por genes de putativas feruloil esterases foi feita utilizando os bancos de dados metagenômicos do Laboratório de Bioquímica de Microrganismos e Plantas (Figura 1) (Fernandes *et al.*, 2018; Gomes, 2015; Jesus, de *et al.*, 2015; Nascimbém *et al.*, 2021; Paixão *et al.*, 2010; Weiss *et al.*, 2021). A busca foi feita na base de dados utilizando a técnica de *sequence-based* que tem como base a similaridade de sequências. Os genes prospectados foram preditos como possíveis feruloil esterases utilizando a ferramenta Pfam (Finn *et al.*, 2016) que é um banco de dados online de famílias de proteínas.

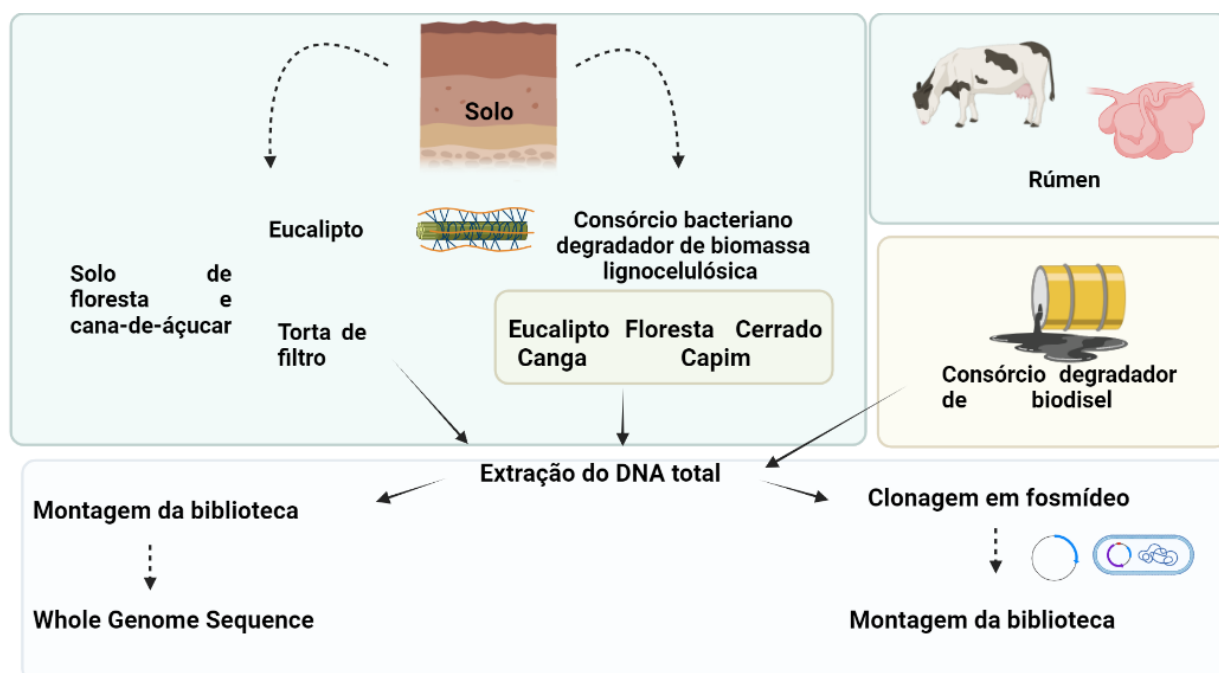


Figura 1. Representação dos ambientes e abordagens de montagem das bibliotecas metagenômicas do Laboratório de Bioquímica de Microrganismos e Plantas (LBMP).

2.2 Análises da sequência ORF FaeC7

O grau de similaridade compartilhado entre as sequências e enzimas previamente caracterizadas na base de dados americana do “National Center for Biotechnology Information” NCBI (coleção “Non-redundant UniProtKB/SwissProt sequences”), foi obtido utilizando a ferramenta BLAST (“Basic Local Alignment Search Tool”). Os alinhamentos múltiplos foram realizados com a ferramenta Clustal Omega versão 1.0.3 e a ferramenta online ESPript 3.0 (<http://espript.ibcp.fr/ESPript/ESPript/>). Os dendrogramas fenéticos foram construídos com base na matrix de distância gerada a partir dos alinhamentos obtidos empregando o programa Mega (versão 4), utilizando o método de otimização de clusterização de Vizinhos próximos (“Neighbor Joining”) empregando reamostragens com “bootstrapping” de 1000). A possível presença de peptídeos sinais também foi investigada com o auxílio da ferramenta SignalP (Dyrlov Bendtsen *et al.*, 2004).

2.3 Transformação das células de *Escherichia coli*

Uma vez não havendo a existência de material gênico para a amplificação do gene por PCR foi feita a encomenda da síntese desta ORF junto a empresa GenOne (<http://www.genone.com.br/>), sendo entregue o gene ligado ao vetor pET28a. O plasmídeo recombinante foi então utilizado para a transformação em células competentes *E. coli* (1 µL de vetor recombinante para 200 µL da célula competente. Foram utilizadas três cepas diferentes de *E. coli*: BL21 (DE3), C43 (DE3) e WK6, a transformação foi feita por choque térmico e, para isso, a reação foi colocada por 20 min em banho de gelo e logo em seguida, submetida a 42 °C, por 90 s, sendo recolocada no banho de gelo por 2 min. Depois de transformadas, essas células foram crescidas em 970 µL de meio SOC [2% de triptona (m/v), 5% de extrato de levedura (m/v), 1mL de NaCl 1 mol/L, 0,25 mL de KCl 1 mol/L, 1 mL de Mg²⁺ 2 mol/L e 1 mL de glicose 2 mol/L] e submetidas a agitação orbital de 200 rpm, a 37 °C por 90 min. Após o período de incubação, 100 µL da cultura foram acrescidos em 100 mL de meio LB líquido contendo 50mg/mL de canamicina. As células foram incubadas a 37 °C por 16 – 18 h.

2.4 Ensaios de expressão, super expressão e extração das proteínas recombinantes

Inicialmente foram realizados testes de expressão das proteínas de interesse. Para isso, um clone positivo de cada construção foi inoculado em 50 mL de LB meio contendo canamicina, que permaneceu sob agitação durante 16 horas, a 37 °C, 200 rpm, para o preparo do pré-inóculo, e 2% deste foi inoculado em 100 mL de meio LB com o antibiótico apropriado, que permaneceu em agitação a 37 °C, 200 rpm, até atingir a fase logarítmica de crescimento, com D.O. 600 de 0,4-0,6. A indução foi realizada adicionando 0,3 mM de IPTG e 30 °C que permaneceram sob as condições descritas por 3 horas.

A análise de expressão foi feita coletando alíquotas no tempo 0 (T0 – antes da indução), tempo 1 (T1 – 1 hora depois da indução) e tempo 3 (T3 – 3 horas depois da indução) e centrifugadas por 15 min a 6.387 g. Uma vez determinada a melhor condição de expressão, os ensaios foram realizados em

utilizando volumes maiores (1L de meio LB), seguindo o procedimento descrito anteriormente.

Para a extração das proteínas, as células foram centrifugadas e ressuspendidas em tampão de lise (tris-HCl 20 mol/L, NaCl 400 mol/L e pH 8,0) e incubadas durante 1h com 1mg/L de lisozima. As células foram rompidas por ultrassom com sonificador Branson Sonifier 250 (Branson, Connecticut, USA), com razão cíclica de 20 % durante 1 min. As células rompidas foram centrifugadas por 30 min a 6.387g a 4°C para a obtenção dos extratos.

2.5 Atividade de esterase em placa

A atividade de esterase foi realizada em placas de petri contendo meio sólido composto por 5 g/L de NaCl, 10 g/L de peptona, 0,1 g/L de $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 10 mL de Tween 20, pH 7,0. Após 3 dias as placas foram avaliadas para verificar o aparecimento de precipitados de CaCl_2 .

2.6 Análise por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) e zimograma

As análises de expressão e as amostras de proteína foram submetidas a uma eletroforese em gel de SDS-PAGE 10%, posteriormente incubado com o corante Azul Brilhante de Comassie para a visualização das bandas e descorado com solução de ácido acético 10% (Laemmli, 1970), usando sistema vertical de eletroforese Mini-Protean System II (Biorad, CA, USA).

A atividade de esterase em gel foi verificada em PAGE 7,5% (zimograma/gel nativo), e a coloração foi realizada utilizando 50 mg de α -naftil-acetato e 45 mg de FastBlue RR (Sigma) em tampão tris-HCl 25 mol/L, pH 7,5 e incubado por 30 min.

2.7 Atividade de esterase e tanase

A atividade de esterase foi mensurada utilizando o 2 mol/L de *p*-nitrofenil acetato (C2), 20 mol/L de tampão acetato de sódio pH 5,0, 37 °C por 30 min. As leituras foram feitas em espectrofotômetro na absorbância de 410 nm.

A atividade de tanase foi realizada utilizando 200 µL do extrato proteico e adicionado 300 µL de ácido tânico 2% (p/v) diluído em tampão acetato de sódio 0,2 mol/L pH 5,5 e incubado por 40 min a 40 °C. Após o período de incubação adicionou-se 3,0 mL de BSA (1mg/mL) e foi centrifugado por 10 min. O material foi dissolvido em 1% de SDS e depois adicionado 1,0 mL de FeCl₃ (0,13 mmol L⁻¹) e incubado por 15 min, e posteriormente centrifugado. A leitura de 530 nm foi feita a partir do sobrenadante (Mondal *et al.*, 2001). Todos os ensaios foram realizados em triplicata e as leituras de absorbância foram feitas no espectrofotômetro e o controle negativo foi a uma célula sem inserto de *E.coli* BL21 DE3 (Multiskan Go Microplate Spectrophotometer, Thermo Fisher Scientific) em placas de 96 poços.

3. RESULTADOS e DISCUSSÃO

3.1 Análise da sequência e predição de características de FaeC7

Utilizando a busca por similaridade de sequência nos metagenomas do LBMP foi encontrada uma ORF-*open reading frame*, correspondente a uma feruloil esterase putativa. A ORF-*faec7* foi identificada a partir da biblioteca metagenômica de solo de floresta nativa de áreas adjacentes a plantação de cana-de-açúcar na região de Santa Rita do Passa Quatro, estado de São Paulo (Nascimbém *et al.*, 2021). A sequência de aminoácido de FaeC7 foi submetida a análises de similaridade utilizando a plataforma BLASTp do NCBI. Para o parâmetro de proteína não redundante (nr) os resultados indicaram que FaeC7 possui de 78% de identidade e 99% de cobertura da sequência de entrada (“query coverage”) com *Bryobacteriales bacterium* (número de acesso MSV34661.1). Utilizando o parâmetro de bancos curado UniProtKB/Swiss-Prot FaeC7 obteve 36,94% de identidade e 99% de query coverage com uma esterase de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* str. ATCC 33913 (número de acesso Q8P8Y5.1). Com o ESTHER database, que é um dedicado as alfas/beta hidrolases, FaeC7 obteve 39% de identidade e 52% de query coverage com uma tanase de *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (MAFF 311018) (número de acesso WP_011408483.1).

Buscando melhor predizer em que família de feruloil esterase FaeC7 poderia pertencer, foi usada a nomenclatura de Crepin e colaboradores (2004a).

Segundo o dendrograma fenético contendo sequências representantes de todas os tipos de FAE (A, B, C e D), FaeC7 agrupou no clado das FAE-C, que são as feruloil esterases que apresentam similaridades com tanase, o que corrobora com o resultado obtido na plataforma ESTHER, indicando que essa enzima pode pertencer a feruloil esterases do tipo C, que são enzimas similares em sequência a tanases (Figura 2.A). Uma vez que essa divisão também é relacionada com o substrato que estas atuam, as do tipo C e D, apresentam atividade catalítica para os quatro substratos metil hidroxycinamatos, 3-metoxi-4-hidroxycinamato de metila (MFA), 3,4-di-hidroxycinamato de metila (MCA), 3,5-dimetoxi-4-hidroxycinamato de metila (MSA), 4-hidroxycinamato de metila (MpCA) (Crepin, Faulds e Connerton, 2004a; b; Li *et al.*, 2018).

Usando a ferramenta online MEME (<http://meme-suite.org/>) foi possível verificar um padrão de *motif* (regiões conservadas) para todas as sequências analisadas, sendo unanime a presença do motif “GxSxG” (Figura 2 B e C.1), correspondente ao penta peptídeo conservado característico de enzima lipolíticas (Ohlhoff *et al.*, 2015; Peng *et al.*, 2014; Zarafeta *et al.*, 2016), inclusive o único presente para membros da família A, que são as que apresentam similaridade com lipases. Os representantes de FAE do tipo C, inclusive FaeC7, apresentaram um *motif* diferente, GXXHC (Figura 2.C.2), que também já foi observado em outras FAE da família C (Dimarogona *et al.*, 2020).

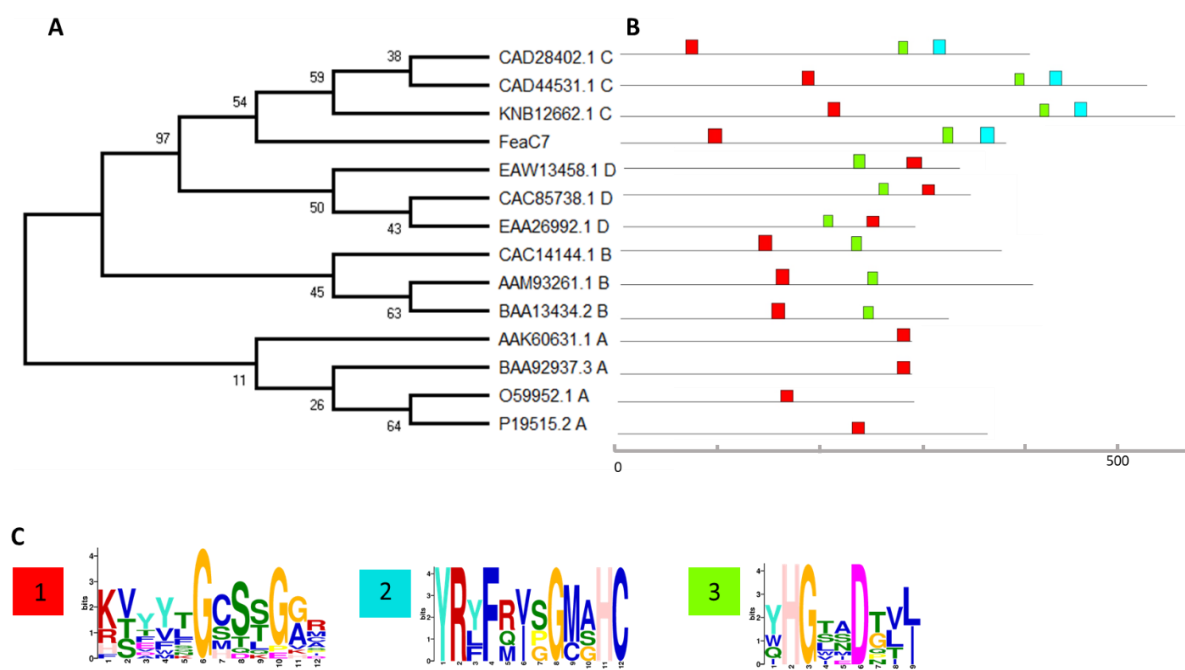


Figura 2. A) Dendrograma fenético com os quatro tipos de feruloil esterases, com representantes do tipo A, B, C e D. B) Distribuição dos motivos conservados ao longo das sequências de feruloil esterases utilizando a plataforma MEME suite. C) Motivos conservados visualizados

Os dados do alinhamento múltiplo gerado entre FaeC7 e membros do tipo C elucidam a semelhança entre as sequências analisadas. Os motifs de resíduos semelhantes foram destacados, e um deles foi o GCSTGGRQG, que além de conter o pentapeptídeo conservado (GX SXG) apontou uma maior conservação dos resíduos adjacentes (Figura 3). Apesar de Gao e colaboradores (2016) já indicarem a presença do motif GCSTG para FAEs do tipo C, o motif citado era menor do que encontrado neste trabalho (**GCSTGGRQG**). Além disso, dados da literatura apresentaram o alinhamento contendo FAE do tipo C no qual foi possível ver a mesma sequência encontrada nesse trabalho e com mais semelhanças ainda, por conter os motifs SYXXGCSTGGRQG e GXXHC (Dimarogona *et al.*, 2020), o que pode indicar uma assinatura ampliada para a FAE do tipo C. Banerjee e colaboradores (Banerjee *et al.*, 2012) indicaram o *motif* GCSTGGREALKQAQRWPHDYDGIANNPA de 29 aminoácidos como uma marca para tanases, o que apresenta similaridade nos aminoácidos iniciais com o encontrado nesse trabalho e em outros presentes na literatura com FAE do tipo C (Suzuki *et al.*, 2014). Os resíduos da tríade catalítica típico de esterases (Arpigny e Jaeger, 1999) foram preditos em Ser87, Asp296 e His235.

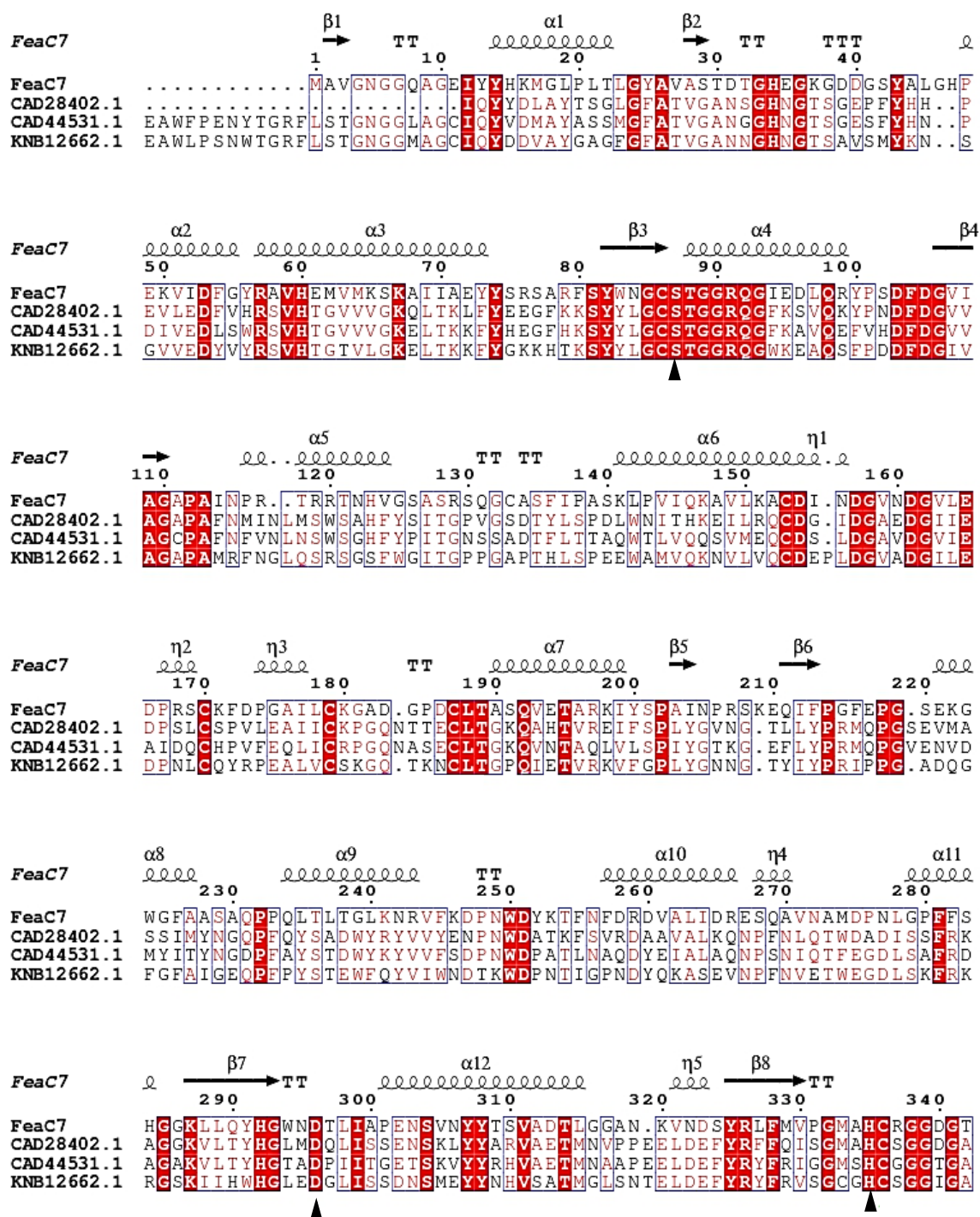


Figura 3. Alinhamento múltiplo de representantes de feruloil esterases do tipo C utilizando a ferramenta Esprit. Resíduos pertencentes a tríade catalítica (S-D-H) com triângulos pretos.

3.2 Expressão, obtenção dos extratos solúveis e *screening* de atividade de Fae07

Utilizando a ferramenta online ProtParam (<http://us.expasy.org/tools/protparam.html>) foi possível obter os parâmetros teóricos referentes a FaeC7 (Tabela 1), como massa molecular, ponto isoelétrico (pI) que foram utilizados para os ensaios seguintes.

Tabela 1. Tabela dos parametros de FaeC7.

	FaeC7
Aminoácidos	347
Massa Molecular	
(Da)	37553,01
pI	6,25
ϵ^* ($M^{-1} cm^{-1}$)	44.725

*=coeficiente de extinção molar

Inicialmente os testes de expressão foram feitos coletando três clones de cada célula utilizada e estes foram avaliados no tempo inicial de pré indução (T0) e após três horas de indução (T3). As condições de expressão foram 30 °C, 150 r.p.m e 0,3 mol/L de IPTG. Foi possível identificar que todos os clones apresentaram expressão no 37 kDa, que é compatível com a massa molecular predita pelo ProtParam para a FaeC7 (Figura 4.A-C). Após essa identificação, foram escolhidos dois clones de cada célula para verificar se esses apresentavam a proteína na sua forma solúvel. Para identificar quais clones apresentavam atividade de esterase, foram feitos testes contendo Tween 20 (Figura 3 D-I). A atividade de esterase em placa contendo Tween 20 se caracteriza pela formação de precipitados em torno do crescimento da colônia microbiana, essa formação ocorre devido aos íons de cálcio que complexam com os ácidos graxos liberados do Tween (Noor *et al.*, 2020). Todos os seis clones apresentaram atividade, porém os clones C43(DE3)₂ e C43(DE3)₃, foram os que apresentaram maior quantidade de grânulos ao redor da colônia e os clones WK6₁ e WK6₂ o com menor quantidade.

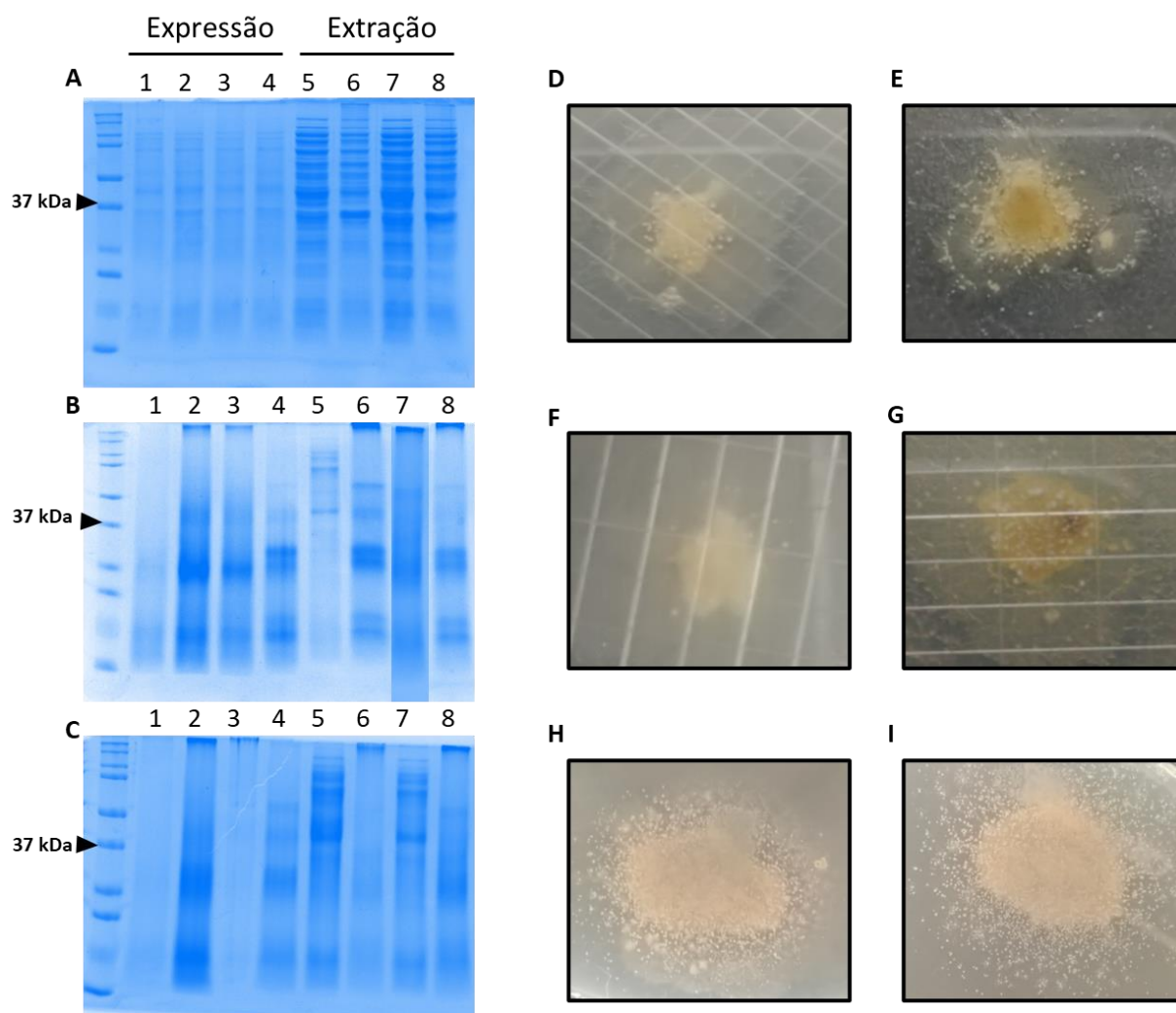


Figura 4. Análise de SDS Page dos perfis de expressão e extração das células BL21 (A), WK6 (B) e C43 (DE3). Canaleta 1: Tempo zero de expressão; canaletas 2-4: 3 h após a indução; canaletas 5 e 7: extratos solúveis; e 6 e 8: pellet. Atividade em placa dos clones BL21 DE3₁, BL21 DE3₃, WK6₁, WK6₂, C43(DE3)₂ e C43(DE3)₃.

3.3 Atividade enzimática de tanase

Para comprovar que a FaeC7 é uma FAE do tipo C, foi realizado teste de atividade de tanase com os extratos solúveis de BL21 DE3₁, BL21 DE3₃, WK6₁, WK6₂, C43(DE3)₂ e C43(DE3)₃ (Figura 5). Tanases são enzimas que atuam na degradação do tanino, sendo este o quarto composto mais abundante em plantas, e geralmente são compostos que tornam-se recalcitrantes após o processo de biodegradação (las Rivas, de *et al.*, 2019; Sivashanmugam e

Jayaraman, 2011). Todas as células avaliadas apresentaram atividade para tanase, somente o extrato da célula WK6₁ obteve atividade relativa menor que 80%. Os extratos das células BL21 DE3₃ e C43(DE3)₂ obtiveram as maiores porcentagens, porém a C43(DE3)₂ foi o que alcançou maior atividade. Sendo assim, esse foi o clone escolhido para os testes seguintes.

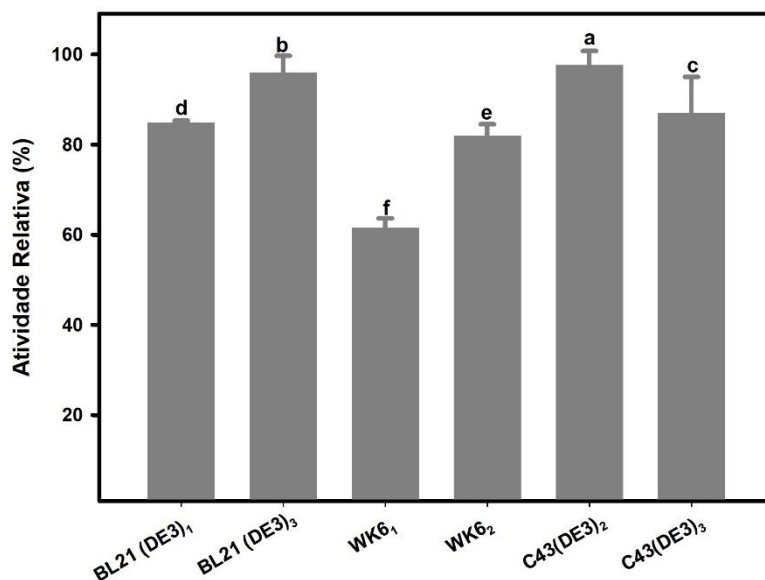


Figura 5. Atividade enzimática de tanase dos clones positivos de FaeC7. As letras minúsculas no topo de cada coluna o indicam a diferença estatística entre cada condição realizada no experimento, de acordo com ANOVA e teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Xu e colaboradores (2019) buscando otimizar os parâmetros de expressão de uma FAE heteróloga de *Lactobacillus crispatus* avaliaram a atividade de FaeLcr em diferentes tempos de indução (4 – 72 h), e observaram que com 48 h a atividade relativa da enzima atingia a maior porcentagem. Para FaeC7, apesar do padrão de expressão visualizado em gel (SDS-PAGE) (Figura 6. A) indicar maior concentração de proteína, a atividade enzimática referente aos tempos de maior indução foram os que apresentaram menores atividades quando comparados a 6 horas de indução (Figura 6.B). Sendo assim, os ensaios que foram realizados posteriormente seguiram esse tempo.

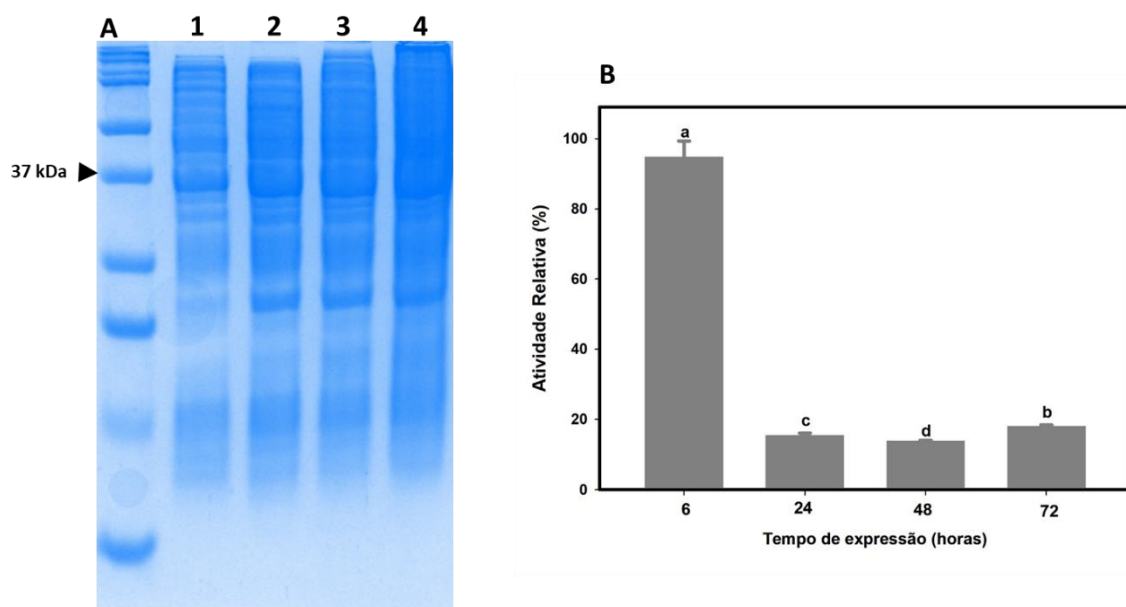


Figura 6. A) Gel de SDS-PAGE dos extratos solúveis dos tempos de indução, marcador Precision Plus Protein Standards Dual Color (Bio-Rad), 1) 6 h, 2) 24 h, 3) 48 h e 4) 72 h. B) Atividade de esterase dos tempos de indução de FaeC7. As letras minúsculas no topo de cada coluna o indicam a diferença estatística entre cada condição realizada no experimento, de acordo com ANOVA e teste de Tukey a 5% de probabilidade.

A atividade em gel de esterase utilizando o substrato α -naftil-acetato foi confirmada no zimograma (Figura 7), indicando que a banda que teve atividade era referente ao tamanho de 37 kDa, indicado para FaeC7. Além disso, FaeC7 apresentou o mesmo tamanho molecular predito pela ferramenta ProtParam (37 kDa), o que poderá ser confirmado nos passos futuros de purificação dessa proteína.

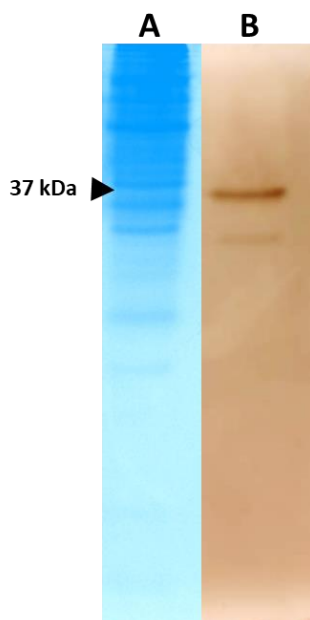


Figura 7. A) Gel nativo da fração solúvel. .B) Análise da atividade em gel dos extratos solúveis de FaeC7 com substrato α -naftil-acetato

4. CONCLUSÕES

A prospecção de novas FAE nos metagenomas do LBMP, encontrou uma nova representante do tipo C. FaeC7 foi obtida na forma solúvel e apresentou atividade com *p*-nitrofenil acetato, além disso como representante do tipo C, também apresentou atividade para tanase. A descoberta dessa nova enzima bifuncional, demonstra mais uma vez o potencial da técnica de metagenômica para obtenção de novas moléculas funcionais.

5. REFERÊNCIAS

- ABOKITSE, K. *et al.* Thermostable feruloyl esterase for the bioproduction of ferulic acid from triticale bran. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 87, n. 1, p. 195–203, 2 jun. 2010.
- ANTONOPOULOU, I. *et al.* Tailoring the specificity of the type C feruloyl esterase FoFaeC from *Fusarium oxysporum* towards methyl sinapate by rational redesign based on small molecule docking simulations. **PLoS ONE**, v. 13, n. 5, p. 1–20, 2018.
- ARPIGNY, J. L.; JAEGER, K.-E. Bacterial lipolytic enzymes : classification and properties. **Biochem. J**, v. 343, p. 177–183, 1999.
- BANERJEE, A. *et al.* Characterization of tannase protein sequences of bacteria and fungi: An in silico study. **Protein Journal**, v. 31, n. 4, p. 306–327, 2012.
- BENOIT, I. *et al.* Biotechnological applications and potential of fungal feruloyl esterases based on prevalence, classification and biochemical diversity. **Biotechnology Letters**, v. 30, n. 3, p. 387–396, 1 mar. 2008.
- BORKAR, S. Alkaliphilic bacteria: Diversity, physiology and industrial applications. *In: Bioprospects of Coastal Eubacteria: Ecosystems of Goa.* [s.l: s.n.]. p. 59–84.
- CREPIN, V. F.; FAULDS, C. B.; CONNERTON, I. F. Functional classification of the microbial feruloyl esterases. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 63, n. 6, p. 647–652, 2004a.
- _____. Identification of a type-D feruloyl esterase from *Neurospora crassa*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 63, n. 5, p. 567–570, 1 maio 2004b.
- DIMAROGONA, M. *et al.* The crystal structure of a *Fusarium oxysporum* feruloyl esterase that belongs to the tannase family. **FEBS Letters**, v. 594, n. 11, p. 1738–1749, 2020.
- DYRLØV BENDTSEN, J. *et al.* Improved prediction of Signal Peptides: SignalP 3.0. **Journal of Molecular Biology**, v. 340, n. 4, p. 783–795, jul. 2004.
- FERNANDES, C. C. *et al.* Bacterial communities in mining soils and surrounding areas under regeneration process in a former ore mine. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 49, n. 3, p. 489–502, 2018.
- FINN, R. D. *et al.* The Pfam protein families database: Towards a more sustainable future. **Nucleic Acids Research**, v. 44, n. D1, p. D279–D285, 2016.
- GAO, L. *et al.* Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic Biochemical characterization of a novel feruloyl esterase from *Penicillium piceum* and its application in biomass bioconversion. v. 133, p. 388–394, 2016.
- GOMES, E. S. **Análise E Expressão De Genes De Pks li E De Carboidrases Provenientes De Bibliotecas Metagenômicas.** [s.l: s.n.].
- JESUS, R. B. DE *et al.* Bacterial diversity in bovine rumen by metagenomic 16S rDNA sequencing and scanning electron microscopy. **Acta Scientiarum - Animal Sciences**, v. 37, n. 3, p. 251–257, 2015.

KANG, Q. *et al.* Bioethanol from lignocellulosic biomass: Current findings determine research priorities. **Scientific World Journal**, v. 2014, n. Ci, 2014.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680–685, 15 ago. 1970.

LAS RIVAS, B. DE *et al.* Bacterial tannases: classification and biochemical properties. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 103, n. 2, p. 603–623, 2019.

LEVASSEUR, A. *et al.* Construction of Engineered Bifunctional Enzymes and Their Overproduction in *Aspergillus niger* for Improved Enzymatic Tools To Degrade Agricultural By-Products. **Applied and environmental microbiology**, v. 71, n. 12, p. 8132–8140, 1 dez. 2005.

LI, X. *et al.* Identification of a Novel Feruloyl Esterase by Functional Screening of a Soil Metagenomic Library. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, p. 1–14, 2018.

MKABAYI, L. *et al.* Evaluating feruloyl esterase-xylanase synergism for hydroxycinnamic acid and xylo-oligosaccharide production from untreated, hydrothermally pre-treated and dilute-acid pre-treated corn cobs. **Agronomy**, v. 10, n. 5, 2020.

MONDAL, K. C. *et al.* Colorimetric assay method for determination of the tannin acyl hydrolase (EC 3.1.1.20) activity. **Analytical Biochemistry**, v. 295, n. 2, p. 168–171, 2001.

NASCIMBÉM, E. A. P. *et al.* Taxonomic and nitrogen-cycling microbial community functional profiles of sugarcane and adjacent forest soils in Southeast Brazil. **MOJ Ecology & Environmental Sciences**, v. 6, n. 4, p. 119–125, 2021.

NIETER, A. *et al.* A halotolerant type A feruloyl esterase from *Pleurotus eryngii*. **Fungal Biology**, v. 118, n. 3, p. 348–357, 2014.

NOOR, H. *et al.* Insight on esterase from *Pseudomonas aeruginosa* strain S3 that depolymerize poly(lactic acid) (PLA) at ambient temperature. **Polymer Degradation and Stability**, v. 174, n. 2020, p. 109096, 2020.

OHLHOFF, C. W. *et al.* An unusual feruloyl esterase belonging to family VIII esterases and displaying a broad substrate range. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 118, p. 79–88, ago. 2015.

PAIXÃO, D. A. A. *et al.* Molecular analysis of the bacterial diversity in a specialized consortium for diesel oil degradation. **Revista Brasileira de Ciencia do Solo**, v. 34, n. 3, p. 773–781, 2010.

PENG, Q. *et al.* Isolation of a novel alkaline-stable lipase from a metagenomic library and its specific application for milkfat flavor production. **Microbial cell factories**, v. 13, n. 1, p. 1–9, 2014.

POIDEVIN, L. *et al.* Comparative analyses of *Podospora anserina* secretomes reveal a large array of lignocellulose-active enzymes. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 98, n. 17, p. 7457–7469, 3 set. 2014.

RECORD, E. *et al.* Overproduction of the *Aspergillus niger* feruloyl esterase for

pulp bleaching application. p. 349–355, 2003.

SIVASHANMUGAM, K.; JAYARAMAN, G. Production and partial purification of extracellular tannase by *Klebsiella pneumoniae* MTCC 7162 isolated from tannery effluent. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 8, p. 1364–1374, 2011.

SUZUKI, K. *et al.* Crystal structure of a feruloyl esterase belonging to the tannase family: A disulfide bond near a catalytic triad. **Proteins: Structure, Function and Bioinformatics**, v. 82, n. 10, p. 2857–2867, 1 out. 2014.

UDATHA, D. B. R. K. G. *et al.* The interplay of descriptor-based computational analysis with pharmacophore modeling builds the basis for a novel classification scheme for feruloyl esterases. **Biotechnology Advances**, v. 29, n. 1, p. 94–110, 2011.

WEISS, B. *et al.* Unraveling a Lignocellulose-Decomposing Bacterial Consortium from Soil Associated with Dry Sugarcane Straw by. **Microorganisms**, v. 9, n. 995, p. 1–18, 2021.

WELKER, C. M. *et al.* Engineering plant biomass lignin content and composition for biofuels and bioproducts. **Energies**, v. 8, n. 8, p. 7654–7676, 2015.

WONG, D. W. S. Feruloyl Esterase: A Key Enzyme in Biomass Degradation. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 133, n. 2, p. 87–112, 2006.

XU, Z.; WANG, T.; ZHANG, S. Extracellular secretion of feruloyl esterase derived from *Lactobacillus crispatus* in *Escherichia coli* and its application for ferulic acid production. **Bioresource Technology**, v. 288, n. 72, p. 121526, 2019.

ZARAFETA, D. *et al.* Metagenomic mining for thermostable esterolytic enzymes uncovers a new family of bacterial esterases. **Scientific Reports**, v. 6, n. November, p. 1–16, 2016.

ZHANG, S.-B. *et al.* Expression, purification and characterization of a feruloyl esterase A from *Aspergillus flavus*. **Protein Expression and Purification**, v. 92, p. 36–40, 2013.

Capítulo 5 – Considerações finais

Utilizando a metagenômica para acessar potenciais novas enzimas, nosso trabalho reforça a capacidade da técnica em encontrar biomecúlas com elevado potencial biotecnológico. Nos trabalhamos com duas enzimas de metagenoma do solo, LacMeta e FaeC7.

LacMeta demonstrou ser um excelente agente de biorremediação, atuando sob compostos como corantes, herbicidas e fungidas. Para o Verde Malaquita (corante), LacMeta foi capaz de descolorir o corante em 24 h, e o produto da catalise enzimática foi capaz de detoxificar o corante, o espectro de H-RMN demonstrou a total degradação dos anéis aromáticos presentes no verde de malaquita e a não formação do leucomalaquita, trantando-se assim de um dos tratamentos mais eficiente na biorremediação/biodegradação desse corante. Quando avaliado o potencial de atuação da LacMeta na biodegradação do hidróxido de fentina (fungicida), o tratamento atuou diretamente no potencial fungicida desse composto. Para imazapic, supreendentemente, esse herbicida foi capaz de induzir a atividade enzimática da LacMeta, o que indica que essa enzima pode ser promissora para o tratamento desse herbicida. Além desses características, nosso estudo aponta que essa enzima pode atuar sobre outros compostos aromáticos, atuando de maneira versátil e eficiente.

FaeC7, é uma feruloil esterase que foi prospectada no metagenoma de floresta próximo a plantação de cana-de-açúcar. Essa enzima foi predita como uma feluloil esterase do tipo C, que apresentam similaridade com as tanases. Os ensaios prévios demonstraram que a proteína esta sendo expressa na forma solúvel, e que além da comprovada atividade de esterase, possui atividade de tanase, sendo assim uma enzima bifuncional. Os passos futuros serão realizar a purificação e caracterização enzimática da FaeC7.