

Congresso
Internacional da
Agroindústria
10 e 11 de junho



Inovação,
Gestão e
Sustentabilidade
na Agroindústria

PRODUÇÃO DE LACASE POR *Oudemansiella canarii* E APLICAÇÃO EM SÍNTESE ORGÂNICA

PRODUCCIÓN DE LACASA POR *Oudemansiella canarii* Y APLICACIÓN EN SÍNTESIS ORGÁNICA

LACASE PRODUCTION FROM *Oudemansiella canarii* AND APPLICATION IN ORGANIC SYNTHESIS

Camila Gabriel Kato¹; Emanuelli Backes²; Thaís Marques Uber³; Gisella Maria Zanin⁴; Rosane M. Peralta⁵

DOI: <https://doi.org/10.31692/IICIAGRO.0150>

RESUMO

As lacases (EC 1.10.3.2) são enzimas capazes de catalisar a remoção de um elétron de fenóis para produzir radicais fenoxi concomitantemente reduzindo o oxigênio molecular à água. Atualmente, as lacases têm sido grandemente estudadas em síntese orgânica para o desenvolvimento de novos produtos dentro do conceito de química “verde”. Tem-se muito interesse na descoberta de novos compostos fenólicos que apresentem propriedades antioxidantes e que sejam estáveis ao calor, luz e oxigênio. Oligomerização dos radicais para formar novos compostos com propriedades antioxidantes são objetos de vários estudos. Os objetivos desse projeto foram 1. avaliar a produção de lacase por um fungo ainda pouco estudado, *Oudemansiella canarii* e 2. avaliar o uso da enzima em síntese orgânica visando a obtenção de dímeros e trímeros fenólicos com atividade antioxidante a partir do ácido cafeico. A produção da lacase foi realizada através de cultivos em estado sólido utilizando diferentes resíduos como substrato e a atividade lacase foi determinada utilizando 2,2-azinobis (ácido 3-etilbenztiazolina-6-sulfônico). Os produtos formados a partir da oxidação do ácido cafeico foram monitorados por cromatografia em camada delgada e as atividades antioxidantes foram avaliadas pelos métodos FRAP e DPPH. Entre os vinte diferentes substratos de cultivo utilizados, os melhores resultados foram obtidos nos cultivos utilizando farelo de trigo (21,745 ±1,837 U/g de substrato), seguido da coroa de abacaxi (11,006±0,024 U/g de substrato). A lacase de *O. canarii* atuou sobre o ácido cafeico e pelo menos um novo composto fenólico com atividade antioxidante foi produzido nas condições utilizadas neste trabalho.

Palavras-Chave: lacases, basidiomicetos, síntese orgânica, antioxidantes.

¹ Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Alimentação e Nutrição, Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, camila.kato@ufms.br

² Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, Universidade Estadual de Maringá, emanuelibackes@outlook.com

³ Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Universidade Estadual de Maringá, thaisuber@gmail.com

⁴ Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Estadual de Maringá, giselladeq@gmail.com

⁵ Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, Universidade Estadual de Maringá, rmperalta@uem.br

RESUMEN

Las lacasas (EC 1.10.3.2) son enzimas capaces de catalizar la eliminación de un electrón de los fenoles para producir radicales fenoxi que reducen concomitantemente el oxígeno molecular a agua. Actualmente, las lacasas han sido ampliamente estudiadas en síntesis orgánica para el desarrollo de nuevos productos dentro del concepto de química "verde". Hay mucho interés en el descubrimiento de nuevos compuestos fenólicos que tengan propiedades antioxidantes y que sean estables al calor, la luz y el oxígeno. La oligomerización de los radicales para formar nuevos compuestos con propiedades antioxidantes es objeto de varios estudios, y los objetivos de este proyecto fueron 1. evaluar la producción de lacasa por un hongo aún poco estudiado, *Oudemansiella canarii* y 2. evaluar el uso de la enzima en síntesis orgánica con el objetivo de obtener dímeros y trímeros fenólicos con actividad antioxidante a partir del ácido cafeico. La producción de lacasa se llevó a cabo mediante cultivos en estado sólido usando diferentes residuos y la actividad de lacasa se determinó usando ácido 2,2-azinobis (3-etilbenztiazolina-6-sulfónico) como sustrato. Los productos formados a partir de la oxidación del ácido cafeico fueron monitoreados por cromatografía en capa fina y las actividades antioxidantes fueron evaluadas por los métodos FRAP y DPPH. Entre los veinte diferentes sustratos de cultivo utilizados, los mejores resultados se obtuvieron en los cultivos que utilizaron salvado de trigo (21.745 ± 1.837 U / g de sustrato), seguido de la corona de piña (11.006 ± 0.024 U / g de sustrato). La lacasa de *O. canarii* actuó sobre el ácido cafeico y se produjo al menos un nuevo compuesto fenólico con actividad antioxidante en las condiciones utilizadas en este trabajo.

Palabras Clave: lacasas, basidiomicetos, síntesis orgánica, antioxidantes.

ABSTRACT

Laccases (EC 1.10.3.2) are enzymes capable of catalyzing the removal of an electron from phenols to produce phenoxy radicals with a concomitant reduction of molecular oxygen to water. Currently, laccases have been frequently used in organic syntheses for the development of new products within the concept of "green" chemistry. There is great interest in the discovery of new phenolic compounds that have antioxidant properties and that are stable against excessive heat, light and oxygen. Oligomerization of the radicals to form new compounds with antioxidant properties are the object of several studies. The objectives of the present project were 1. to evaluate the laccase production by a fungus still scarcely studied, *Oudemansiella canarii*, and 2. to evaluate the use of the enzyme in organic synthesis aiming at obtaining phenolic dimers and trimers from caffeic acid with antioxidant activity. The laccase production was carried out through solid state conditions with different residues and the laccase activity was determined using 2,2-azinobis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) as substrate. The products formed by the oxidation of caffeic acid were monitored by thin layer chromatography and the antioxidant activities were evaluated by the FRAP and DPPH methods. Among the twenty different substrates used in the cultivation, the best results were obtained with the wheat bran cultures (21.745 ± 1.837 U / g of substrate), followed by the pineapple cultures (11.006 ± 0.024 U / g of substrate). The *O. canarii* laccase acted on caffeic acid and at least one new phenolic compound with antioxidant activity was produced under the conditions used in this work.

Keywords: laccases, basidiomycetes, organic synthesis, antioxidants.

INTRODUÇÃO

As lacases (EC 1.10.3.2) são oxidases encontrada em plantas, insetos, bactérias e fungos (GUZIK et al., 2014). As mais estudadas são as lacases de fungos basidiomicetos, tais como *Pleurotus ostreatus*, *Trametes versicolor*, *Pycnoporus cinnabarinus*, *Pycnoporus sanguineus* além de diversos ascomicetos e alguns deuteromicetos, como *Trichoderma* sp. (RIVERA-HOYOS et al., 2013; BRUGNARI et al., 2018).

Lacases são cobre-oxidases capazes de catalisar reações de oxidação monoelétrica de diversos substratos tais como anilinas, fenóis, aminas aromáticas, aminofenóis, metoxifenóis,

polifenóis, poliaminas e derivados de lignina (JEON et. al., 2010; BRUGNARI et. al., 2018; WELLINGTON, GOVINDJEE e STEENKAMP, 2018). Pelo fato das enzimas utilizarem o oxigênio como aceptores de elétrons, a água é o único subproduto da reação.

Devido à sua atividade oxidativa, as lacases apresentam potencial aplicação em diversas áreas, incluindo modificação de polímeros, branqueamento têxtil, processamento de alimentos, síntese orgânica, indústrias de transformação e biorremediação de uma infinidade de compostos xenobióticos incluindo hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, pesticidas, corantes sintéticos e produtos farmacêuticos como diclofenaco (BILAL et al., 2019; KUNAMNENI et al., 2008; MIKOLASCH e SCHAUER, 2009; TAHERAN et al., 2017; BARRIOS- ESTRADA et al., 2018).

Nos últimos anos, as lacases têm sido avaliadas como catalisadores na síntese orgânica para o desenvolvimento de novos produtos dentro do conceito de química verde. As lacases podem catalisar de forma eficiente a polimerização de unidades fenólicas que é iniciada pela formação de radicais cationicos seguidos por ataque intermolecular para a produção de dímeros a partir fenólicos tais como ácido gálico, ácido ferúlico e ácido cafeico (JEON et. al., 2010; 2012; RAN et al., 2008). A partir dos dímeros pode ocorrer a síntese de oligômeros e polímeros, sendo nestes casos necessário um maior tempo de reação (JEON et. al., 2010; JEON et. al., 2012).

Oudemansiella canarii, um cogumelo comestível comum em vários biomas brasileiros, incluindo a Mata Atlântica, Floresta Amazônica e Pantanal (BONONI et al., 2008, ROSA & CAPELARI, 2009, RUEGGER et al., 2001), é considerado um fungo decompositor da madeira, mas até agora o conhecimento sobre suas enzimas lignocelulósicas, incluindo as lacases, ainda é limitado. Recentemente nosso grupo publicou dois artigos com as lacases de *O. canarii*. No primeiro, a lacase de *O. canarii* foi utilizada na degradação de um azo corante, o vermelho do Congo (IARK et al., 2019). No segundo artigo, a lacase foi imobilizada por reticulação e utilizada na degradação do corante antraquinônico azul brilhante de Remazol R (UBER et al., 2020).

O objetivo desse trabalho foi produzir a lacase de *Oudemansiella canarii* em cultivos em estado sólido utilizando diversos resíduos agro-industriais e utilizar a enzima em síntese orgânica visando a obtenção de dímeros e trímeros fenólicos com atividades antioxidantes a partir do ácido cafeico.

FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

Os compostos fenólicos sintéticos ou naturais são conhecidos por minimizar os efeitos deletérios da oxidação de proteínas e lipídios que causam efeitos deletérios aos alimentos reduzindo o tempo de prateleira dos alimentos (SHAHIDI & AMBIGAIPALAN, 2015). Entretanto, o uso dos compostos fenólicos é muitas vezes limitado devido à baixa solubilidade em meio aquoso e suscetibilidade ao calor, luz e oxigênio (NEMADZIVA et. al., 2018).

A modificação dos fenólicos naturais através de enzimas se torna interessante devido à fraca capacidade antioxidante de alguns fenólicos naturais quando comparados aos fenólicos sintéticos tais como BHT e BHA, ineficiência da síntese química e a necessidade de melhorar a biodisponibilidade de compostos fenólicos (ADELAKUN et. al., 2012a). Dessa forma, a modificação permitiria uma ampliação de suas funcionalidades, permitindo o enriquecimento de alimentos com esses novos compostos antioxidantes mais resistentes à temperatura e outros fatores.

As lacases são enzimas promissoras na melhoria da capacidade antioxidante de compostos fenólicos através de dimerização (ADELAKUN et. al., 2012a; ADELAKUN et. al., 2012b; GAVEZZOTTI et. al., 2014) ou polimerização para compostos de maior peso molecular (NEMADZIVA et. al., 2018).

METODOLOGIA

A pesquisa realizada foi de natureza quantitativa experimental. O fungo *Oudemansiella canarii* (EF72) foi obtido da Coleção de Basidiomicetos da Embrapa (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária), Colombo, PR, Brasil, e mantida em laboratório através de repiques sucessivos em ágar de extrato de malte (2% dextrose, 2% de extrato de malte, 0,1% peptona, ágar 2%).

Para a produção de enzima lacase a partir do *O. canarii*, 5 g de diferentes substratos ou misturas de substratos e 15 mL de solução de sal de Vogel diluído 1:50 (VOGEL, 1956) foram acondicionados em frascos Erlenmeyer de 250 mL. Nesta condição, obtém-se uma umidade inicial de 80%. Essas misturas foram esterilizadas em autoclave por 15 min a 121 °C. Os inóculos dos fungos foram colocados diretamente nos frascos. Eles consistiam de três plugs miceliais obtidos das culturas agarificadas. As culturas foram mantidas a 28 °C e na ausência de luz por 10 dias (IARK et. al., 2019).

Para extração das enzimas, um volume de 30 mL de água foi adicionado aos frascos que foram mantidos em agitação de 100 rpm por 30 min. Em seguida as misturas foram filtradas primeiramente em gaze e posteriormente as frações solúveis foram centrifugadas a

1500g por 15 min. Os sobrenadantes límpidos foram considerados como extratos enzimáticos brutos.

A atividade da lacase foi testada usando 1 mmol/L do substrato 2,2-azinobis (ácido 3-etilbenztiazolina-6-sulfônico) (ABTS) preparado em 50 mmol/L de acetato de sódio (pH 5,0). A reação de oxidação do substrato foi monitorada por 5 min a 40 °C a 420 nm ($\epsilon=36.000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). A atividade enzimática foi expressa em unidades enzimáticas internacionais. Uma unidade internacional (U) foi definida como a quantidade de enzima que transforma 1 mmol de substrato por minuto (MOTA et al., 2015).

Para a oxidação do ácido cafeico com a lacase do *O.canarii*, foi adotada a metodologia descrita por Nemadziva et. al., (2018) com algumas modificações. As reações de oxidação continham tampão acetato de sódio (T) 50 mM pH 5,0, ácido cafeico 20 mM (AC) (concentração inicial), acetato de etila (AE) e duas diferentes concentrações da lacase nativa (LC) (120,8 U/L e 3480 U/L). Como controles negativos, frascos foram mantidos em paralelo utilizando lacase desnaturada (5 min em fervura) (LD). Todos os frascos foram mantidos por 8 h em agitador (28 °C, 100 rpm). E as amostras foram mantidas em estufa a 40 °C para remoção do acetato de etila, congelados, liofilizados e mantidos a -20 °C.

Os produtos da reação de oxidação do ácido cafeico foram monitorados em cromatografia em camada delgada usando placas de sílica 60 F254 TLC (Sigma). Como fase móvel utilizou-se um sistema contendo acetato de etila, metanol, água e ácido fórmico (8: 1: 1: 0,02 v / v). As manchas foram visualizadas sob luz ultravioleta a 254 nm (NEMADZIVA et. al., 2018).

Para avaliação das atividades antioxidantes dos produtos obtidos, utilizou-se o ensaio FRAP (do inglês *ferric reducing antioxidant power*) e a atividade sequestrante de radicais livres (DPPH, do inglês *2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl* conforme descrito previamente (KOEHNLEIN et al., 2016).

As análises foram realizadas em quadruplicata para cada amostra. Os resultados foram expressos como as médias $\pm$ desvio padrão. O software Graphpad Prism.VERSÃO 8.0 foi utilizado para a construção das figuras.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Primeiramente foram realizados experimentos para obtenção da lacase do fungo *Oudemansiella canarii* em sistema de estado sólido no qual foram testados 20 tipos de substratos como casca de abacaxi, farelo de trigo, sabugo de milho, bagaço de cana, entre outros e todos foram realizados em duplicata para posteriormente obter a média da atividade da

PRODUÇÃO DE LACASE A PARTIR DO *Oudemansiella canarii* E APLICAÇÃO EM SÍNTESE ORGÂNICA

enzima. O aproveitamento de resíduos agroindustriais como substrato em bioprocessos com o objetivo de produzir enzimas encaixa-se dentro do conceito de economia circular que busca o aproveitamento máximo dos recursos naturais com um mínimo de impacto ambiental (UBANDO et al., 2020). Conforme observado no Quadro 1, o melhor substrato para a produção de lacases foi farelo de trigo.

Quadro 1. Efeito do substrato utilizado no cultivo em estado solido na produção de lacase por *O. canarii*.

Substrato	Atividade média lacase (U/g substrato)
Farelo de trigo	21,745 ±1,837
Bagaço de cana	1,275 ± 0,005
Farelo de trigo + bagaço de cana (1:1)	12,904 ± 0,071
Serragem de eucalipto + bagaço de cana (1:1)	0,842 ± 0,080
Casca de soja	0,703 ± 0,089
Casca de soja + bagaço de cana (1:1)	3,869 ± 0,122
Sabugo de milho	3,543 ± 0,000
Sabugo de milho + bagaço de cana (1:1)	4,709 ± 0,047
Manipueira	4,322 ± 0,122
Manipueira + bagaço de cana (1:1)	1,355±0,071
Serragem de eucalipto	1,595±0,099
Serragem de eucalipto + farelo de trigo (1:1)	7,759±0,141
Coroa de abacaxi	11,006±0,024
Coroa de abacaxi + bagaço de cana (1:1)	9,707±0,212
Bagaço de laranja	0,483±0,005
Bagaço de laranja + bagaço de cana (1:1)	1,818±0,019
Casca de maracujá	0,629±0,005
Casca de maracujá + bagaço de cana (1:1)	4,362±0,066
Casca de abacaxi	5,961±0,122
Casca de abacaxi + bagaço de cana (1;1)	5,321±0,047

Fonte: Própria (2021)

A enzima lacase pode ser obtida por fermentação submersa e em estado sólido (RODRIGUEZ-COUTO, 2018). Entretanto, a fermentação em estado sólido possui muitas vantagens quando comparada com a fermentação submersa, incluindo baixo custo energético, a possibilidade de usar subprodutos e resíduos de alimentos e agroindústrias como substratos, e alta produtividade (NILADEVI et al., 2007; SOCCOL et al., 2017). Uma mistura de farelo de trigo-bagaço já foi utilizada como substrato para cultivos de *O. canarii* para produção de lacases (IARK et al., 2019), mas neste trabalho, os melhores resultados foram obtidos utilizando-se

somente o farelo de trigo como substrato. Para os demais experimentos realizados, foram utilizados os extratos enzimáticos dos cultivos desenvolvidos com farelo de trigo.

O Quadro 2 identifica as siglas usadas com as específicas condições de cada experimento utilizado para a oxidação do ácido cafeico.

Quadro 2: Condições definidas para a oxidação do ácido cafeico e dimerização/trimerização pela lacase de *O.canarii*.

Amostras	SIGLA	Condições experimentais
1	Controle Padrão (ACP)	18 mL de acetato de etila + 27 mL de tampão acetato
2	Controle negativo (AC)	18 mL de ácido cafeico (AC)+ 9 mL de tampão acetato (T) + 18 mL de extrato contendo lacase desnaturada (LD)
3	ACLC	18 mL de ácido cafeico (AC) + 9 mL de tampão acetato (T) + 18 mL extrato de lacase (LC) com atividade de 3,48 U/mL
4	ACLCA E	18 mL de ácido cafeico (AC) +4,5 mL de tampão acetato (T) + 4,5 mL de acetato de etila (AE) + 18 mL extrato de lacase (LC) com atividade de 3,48 U/mL
5	ACLD	18 mL de ácido cafeico (AC) + 9 mL de tampão (T)+18 mL de extrato de lacase (LC) com atividade de 0,13 U/mL
6	ACLDA E	18 mL de ácido cafeico (AC) + 4,5 mL de tampão acetato (T) + 4,5 mL de acetato de etila (AE) + 18 mL de extrato de lacase (LC) com atividade de 0,13 U/mL

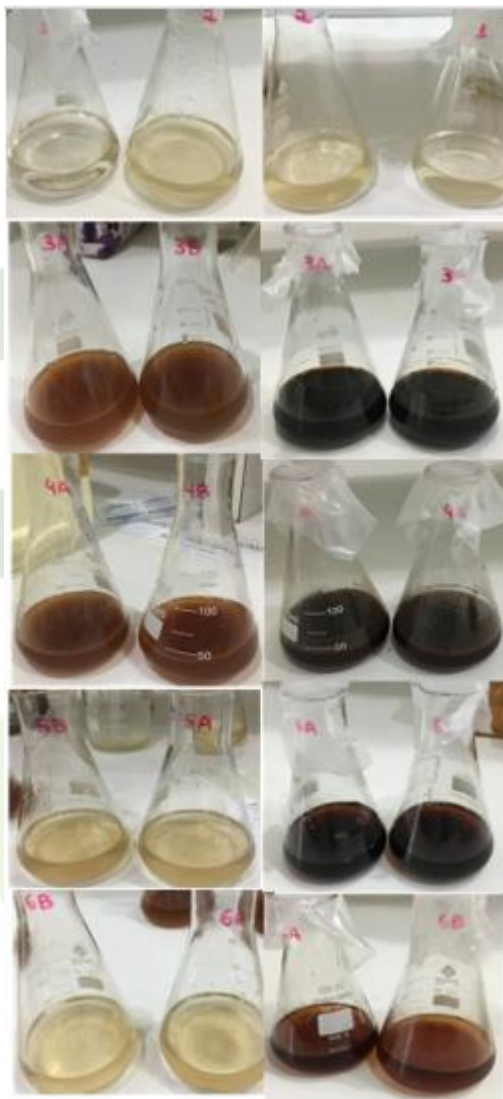
Fonte: Própria (2021)

Após 8 horas, as reações foram interrompidas. Os aspectos macroscópicos dos meios reacionais são apresentados na Fig. 1. Em todas as amostras que continham lacase com maior atividade ocorreu alteração da cor do meio reacional após 8 h. A amostra 1 (controle), não houve alteração na cor, como era esperado, pois não foi colocado a enzima, assim como na amostra 2 já que nestes frascos, a enzima estava presente na forma desnaturada.

O meio reacional onde os compostos fenólicos são substratos em geral necessita de um solvente orgânico, uma vez que muitos fenólicos, incluindo o ácido cafeico, são pouco solúveis em água (NEMADZIVA et. al., 2018). De acordo com Adelakun et al., (2012), a presença de solventes orgânicos ajuda a minimizar a polimerização. Os aspectos mais escuros dos meios onde a reação foi desenvolvida na presença do acetato de etila, sugere que transformações oxidativas foram mais pronunciadas nestes frascos (amostra 5 e 6).

PRODUÇÃO DE LACASE A PARTIR DO *Oudemansiella canarii* E APLICAÇÃO EM SÍNTESE ORGÂNICA

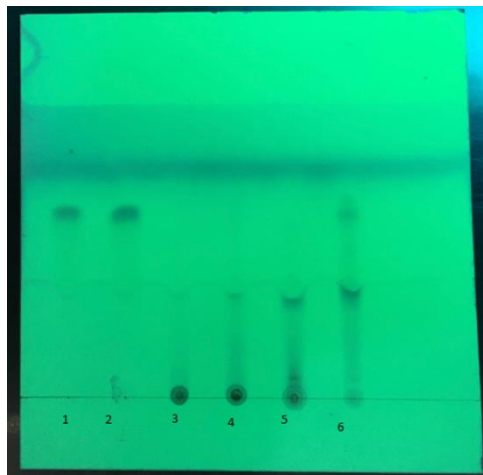
Figura 1: Aspecto das preparações contendo lacase de *O. canarii* e ácido cafeico nas diferentes condições testadas. Imagens das condições testadas (ver Quadro 1) no tempo zero e após 8 h de reação.



Fonte: Própria (2021)

As amostras foram em seguida submetidas a uma cromatografia em camada delgada (TLC) (Fig. 2). A TLC é um método de separação eficaz e econômico que permanece popular na pesquisa orgânica. TLC envolve a separação de compostos com base em suas distribuições entre 2 fases (fase móvel e fase estacionária). Para este estudo, foram utilizadas placas de F254 TLC. A matriz de SiO_2 nas placas F254 torna a fase estacionária polar (NEMADZIVA et. al., 2018). A separação de compostos por TLC pode ser determinada por três fatores; (i) polaridade e tamanho da molécula; (ii) polaridade da fase estacionária; (iii) polaridade do solvente (fase móvel). Nesse estudo, apenas a polaridade da fase móvel poderia ser controlada porque os compostos sendo separados eram novos e de características de polaridade e peso molecular desconhecidos.

Figura 2: Cromatografia em camada delgada (TLC) dos produtos da reação da lacase utilizando ácido cafeico como substrato em diferentes condições. 1- ácido cafeico; 2-ácido cafeico+ lacase desnaturada; 3- ácido cafeico+ lacase 3,48 U/mL em tampão; 4-ácido cafeico+lacase 3,48 U/mL em tampão +acetato de etila; 5. Ácido cafeico+ lacase 0,13 U/mL em tampão. 6. Ácido cafeico + lacase 0,13 U/mL em tampão + acetato de etila.



Fonte: Própria (2021)

A interação de produtos de acoplamento com fase estacionária sugeriu que os produtos gerados eram mais polares do que os substratos. Os fenólicos são considerados compostos polares, devido ao seu grupo hidroxila. Após as reações de acoplamento, espera-se que os produtos da reação sejam mais polares, uma vez que os produtos de acoplamento podem teoricamente ter grupos funcionais mais polares (SHERMA & FRIED, 2003). Portanto, para separar os produtos de acoplamento, foram empregados sistemas de solventes polares.

Pela análise da Figura 2 concluímos que nas amostras 3, 4, 5 e 6 houve o surgimento de pelo menos uma mancha com R_f (distância percorrida pelo composto/distância percorrida pelo solvente) de 0,46, diferente de ácido cafeico (R_f do ácido cafeico=0,75), mostrando ter menor afinidade pelo solvente móvel utilizado. Também foi possível observar uma outra mancha que não saiu da origem de aplicação R_f = zero, mais evidente nas amostras 3,4 e 5.

Todas as amostras, após secagem foram utilizadas para determinação da atividade antioxidante, pelos métodos FRAP e DPPH. Os ensaios FRAP e DPPH são métodos baseados na transferência de um único elétron contudo, cada método possui seu mecanismo de ação. O ensaio DPPH é um ensaio simples e barato no qual utiliza-se um radical de cor púrpura estável contendo nitrogênio, que é reduzido por antioxidantes naturais ou compostos redutores a uma hidrazina de cor amarelo claro (MOHD AZMAN et al., 2013). Sendo assim, os antioxidantes reduzem o radical DPPH estável para formar DPPH-H, ou seja, as atividades de eliminação de antioxidantes do DPPH estão relacionadas com a habilidade de doação de hidrogênio (LIU et al., 2010). O método FRAP está relacionado com a capacidade do antioxidante, na presença do TPTZ, em reduzir o Fe^{+3} em Fe^{+2} , desta forma, o potencial antioxidante está relacionado

PRODUÇÃO DE LACASE A PARTIR DO *Oudemansiella canarii* E APLICAÇÃO EM SÍNTESE ORGÂNICA

com a habilidade da doação de elétrons para quebrar as reações de cadeia de radicais livres (XIE et al., 2014).

As amostras apresentaram resultados diferentes para os dois métodos (DPPH e FRAP) utilizados para avaliar a atividade antioxidante (Quadro 3).

Quadro 3: Atividade antioxidantes das amostras determinadas pelos métodos DPPH E FRAP.

Amostra	DPPH (μmol TE/g liofilizado)	FRAP (μmol TE/g liofilizado)
2 AC	1063,58 $\pm$ 57,71 (*)	1932,80 $\pm$ 17,83 (*)
3 ACLC	156,26 $\pm$ 26,87	230,31 $\pm$ 11,66
4 ACLCAE	215,46 $\pm$ 4,61	411,28 $\pm$ 16,16
5 ACLD	601,52 $\pm$ 0,92	844,37 $\pm$ 28,97
6 ACLDAE	1267,24 $\pm$ 7,30	2344,84 $\pm$ 34,84

(*) com extrato enzimático desnaturado

Fonte: Própria (2021)

A amostra contendo apenas ácido cafeico em tampão também teve a atividade antioxidante analisada. Entretanto, estes valores não podem ser comparados com os obtidos pelas amostras 2 a 6. O peso destas amostras foi muito superior ao obtido na amostra 1 pelo fato delas conterem os extratos enzimáticos brutos. Consideramos por isto os valores de atividade antioxidante encontrados na amostra 2, que continha o ácido cafeico e também o extrato enzimático bruto desnaturado (mas presente em massa) para fazer algumas considerações. Comparando as atividades antioxidantes das amostras 3 a 6 com a amostra 2, podemos observar que maiores atividades antioxidantes nos frascos onde a lacase estava presente em sua forma ativa foram observados nas amostras 5 e 6, onde a reação foi conduzida na presença do acetato de etila. O fato da amostra 6 ter apresentado os maiores valores de DPPH e FRAP sugere que a molécula com $R_f = 0,46$ seja promissora em termos de atividade antioxidante.

A descoberta de novas moléculas com capacidade antioxidante é muito atrativa e interessante pois na indústria alimentícia os mesmos auxiliam na prevenção da oxidação lipídica e na deterioração de carnes suína e bovina, auxiliando na conservação da carne (YOO et al., 2008; KIM et al., 2016). Moléculas com atividade antioxidante são muito úteis na indústria farmacêutica e de cosméticos, pois podem ser adicionados a cremes ou medicamentos que auxiliam na proteção do corpo humano contra os radicais livres, prevenindo e/ou retardando o envelhecimento e o progresso de doenças crônicas (LIU et al., 2010).

CONCLUSÕES

Conclui-se que se pode utilizar diversos resíduos agroindustriais para a produção de lacase a partir de fungos, dentro do conceito de economia circular. O fungo *Oudemansiella canarii* mostrou ser um excelente produtor de lacase com potencial uso em síntese orgânica de novos compostos fenólicos. Os dados obtidos neste estudo sugerem que os produtos formados pela ação da lacase de *O. canarii* sobre o ácido cafeico possuem atividade antioxidante, mas serão necessários mais experimentos para otimização do processo e identificação destes compostos.

REFERÊNCIAS

ADELAkun, O. E.; KUDANGA, T.; PARKER, A., GREEN, I. R.; ROES-HILL, M. L.; BURTON, S.G. Laccase catalyzed dimerization of ferulic acid amplifies antioxidant activity, **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic** 74, 29-35, 2012a.

ADELAkun, O.E.; KUDANGA, T.; GREEN, I.R.; ROES-HILL, M. L.; BURTON, S.G. Enzymatic modification of 2,6-dimethoxyphenol for the synthesis of dimers with high antioxidant capacity, **Process Biochemistry** 47, 1926-1932, 2012b.

BARRIOS-ESTRADA, C.; ROSTRO-ALANIS, M. DE J.; MUÑOZ-GUTTIÉRREZ, B.D.; IQBAL, H.M.N.; KANNAN, S.; PARRA-SALDÍVAR, R. Emergent contaminants: endocrine disruptors and their laccase-assisted degradation – a review. **Science of the Total Environment** 612, 1516–1531, 2018.

BILAL, M.; RASHEEDB, T.; NABEELB, F.; IQBALC, H.M.N.; ZHAO, Y. Hazardous contaminants in the environment and their laccase-assisted degradation – A review. **Journal of Environmental Management**, 234, 253-264, 2019.

BONONI, V.L.R.; A.K.M. OLIVEIRA, A.K.M.; QUEVEDO, J.R.; GUGLIOTTA, A.M. Fungos macroscópicos do Pantanal do Rio Negro, Mato Grosso do Sul, Brasil. **Hoehnea**, v. 35, p. 489-511, 2008.

BRUGNARI, T.; PEREIRA, M.G.; BUBNA, G.A.; FREITAS, E.N.; CONTATO, A.G.; CORRÊA, R.C.G.; CASTOLDI, R.; SOUZA, C.G.M.; POLIZELI, M.L.T.M.; BRACHT, A.; PERALTA, R.M.. A highly reusable MANAE-agarose- immobilized *Pleurotus ostreatus* laccase for degradation of bisphenol A. **Science of the Total Environment**, v. 634, p.1346-1351, 2018.

GAVEZZOTTI, P.; VAVŘÍKOVÁ, E.; VALENTOVÁ, K.; FRONZA, G.; KUDANGA, T.; KUZMA, M.; RIVA, S.; BIEDERMANN, D.; KŘEN, V.; Enzymatic oxidative dimerization of silymarin flavonolignans, **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic** v.109, p. 24-30, 2014.

GUZIK, U.; HUPERT-KOCUREK, K.; WOJCIESZYNSKA, D. Immobilization as a strategy for improving enzyme properties-application to oxidoreductases. **Molecules**, v.19, p. 8995–9018, 2014.

IARK, D.; BUZZO, A. J. R.; GARCIA, J. A. A. G.; CÔRREA, V.G.; HELM, C.V.; CORREA, R.C.G.; PERALTA, R.A.; MOREIRA, R.F.P.M.; BRACHT, A.; PERALTA, R.M. Enzymatic degradation and detoxification of azo dye Congo red by a new laccase from *Oudemansiella canarii*. **Bioresource Technology**, v.289, 121655, 2019.

JEON, J-R.; KIM, E-J.; MURUGESAN, K.; PARK, H-K.; KIM, Y-M.; KWON, J-H.; KIM, W-G.; LEE, J-Y.; CHANG, Y-S. Laccase-catalysed polymeric dye synthesis from plant-derived phenols for potential application in hair dyeing: Enzymatic colourations driven by homo- or hetero-polymer synthesis. **Microbial Biotechnology**, v.3, p.324-335, 2010.

JEON, J-R.; BALDRIAN, P.; MURUGESAN, K.; CHANG, Y-S. Laccase-catalysed oxidations of naturally occurring phenols: from in vivo biosynthetic pathways to green synthetic applications. **Microbial Biotechnology**, v.5(3), p.318-332, 2012.

KIM, H. W. et al. Effects of edible films containing procyanidin on the preservation of pork meat during chilled storage. **Korean Journal for Food Science of Animal Resources**, v.36, n. 2, p. 230–236, 2016.

KOEHNLEIN, E. A.; KOEHNLEIN, É. M.; GOMES, R. C.; NISHIDA, V. S.; CORREA, V. G.; BRACHT, A.; PERALTA, R. M. Analysis of a whole diet in terms of phenolic content and antioxidant capacity : effects of a simulated gastrointestinal digestion. **International Journal of Food Science and Nutrition**, v.67, p. 614–623, 2016.

KUNAMNENI, A.; CAMARERO, S.; GARCÍA-BURGOS, C. A; PLOU, F. J. Engineering and Applications of fungal laccases for organic synthesis. **Microbial Cell Factories**, p.7-32, 2008.

LIU, J.; LUO, J.; YE, H.; SUN, Y.; LU, Z.; ZENG, X. In vitro and in vivo antioxidant activity of exopolysaccharides from endophytic bacterium *Paenibacillus polymyxa* EJS-3. **Carbohydrate Polymers**, v. 82, n. 4, p. 1278–1283, 2010.

MIKOLASCH, A.; SCHAUER, F. Fungal laccases as tools for the synthesis of new hybrid molecules and biomaterials. **Applied Microbiology and Biotechnology** v. 82, p. 605–624, 2009.

MOHD AZMAN, A.N; S. HUSNI, S.; ALMAJANO, P.M.; GALLEGU, G.M. Solvent effect on antioxidant activity and total phenolic content of *Betula alba* and *Convolvulus arvensis*. **International Journal of Biological, Veterinary, Agricultural and Food Engineering**, v.7 (5), p.152-157, 2013.

MOTA, T.R.; KATO, C.G.K.; PERALTA, R.A.; BRACHT, A.; MORAIS, G.R.; BAESSO, M.L.; SOUZA, C.G.M.; PERALTA, R.M. Decolourization of congo red by *Ganoderma lucidum* laccase: evaluation of degradation products and toxicity. **Water, Air, and Soil Pollution** v.226, p.351–362, 2015.

NEMADZIVA, B.; ROES-H, M. L.; KOORBANALLY, N.; KUDANGA, T. Small laccase-catalyzed synthesis of a caffeic acid dimer with high antioxidant capacity. **Process Biochemistry**, v.69, p. 99-105, 2018.

NILADEVI, K.N.; SUKUMARAN, R.K.; PREMA, P. Utilization of rice straw for laccase in solid state fermentation. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology** v.34, p.665–674, 2007.

RAN, N.; ZHAO, L.; CHEN, Z., TAO, J. Recent applications of biocatalysis in developing green chemistry for chemical synthesis at the industrial scale. **Green Chemistry** v.10, p.361–372, 2008.

RIVERA-HOYOS, C.M., MORALES-ÁLVAREZ, E.D., POUTOU-PIÑALES, R.A., PEDROSA-RODRIGUEZ, A.M., RODRIGUEZ-VÁSQUEZ, R., DELGADO-BOCADA, J.M. Fungal laccases. **Fungal Biology Review** v.27, p.67–82, 2013.

RODRIGUEZ-COUTO, S. Solid-state fermentation for laccases production and their applications. **Curr. Develop. Biotechnol. Bioeng. Curr. Adv. Solid-State Ferment.** p. 211–234, 2018.

ROSA, L.H.; CAPELARI, M. Agaricales fungi from Atlantic rain Forest fragments in Minas Gerais, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 40, p. 846–851, 2009.

RUEGGER, M.J.S.; TORNISIELO, S.M.T.; BONONI, V.R.L.; CAPELARI, M. Cultivation of the edible mushroom *Oudemansiella canarii* (Jungh.) Höhn. in lignocellulosic substrates. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 32, p. 211-214, 2001.

SHAHIDI, F.; AMBIGAIPALAN, P. Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: Antioxidant activity and health effects – A review. **Journal of Functional Foods**, v. 18, p. 820-897, 2015

SHERMA, J.; FRIED, B. **Handbook of thin-layer chromatography**, CRC press, 2003.

SOCOL, C.R.; COSTA, E.S.F.; JR, LETTI, KARP, S.G.; WOICIECHOWSKI, A.L.; VANDENBERGHE, L.P.S. Recent developments and innovations in solid state fermentation. **Biotechnology Research and Innovation** v.1, p. 52–71, 2017.

UBANDO, A. T.; FELIX, C. B.; CHEN, W. H. Biorefineries in circular bioeconomy: A comprehensive review. *Bioresource Technology*, v. 299, artigo 122585, 2020

UBER, T. M.; BUZZO, A. J. R.; SCARATTI, G.; AMORIM, S. M.; HELM, C.V.; MACIEL, M. G.; PERALTA, R. A.; MOREIRA, R.F.P.M.; BRACHT, A.; PERALTA, R. M. Comparative detoxification of Remazol Brilliant Blue R by free and immobilized laccase of *Oudemansiella canarii*. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 38, p. 1-12, 2020.

VOGEL, H.J. A convenient growth medium for *Neurospora* (Medium N), **Microbial Genetic Bulletin**. v.13, p. 42-43, 1956.

XIE, M. et al. Grafting of Gallic Acid onto Chitosan Enhances Antioxidant Activities. **Journal Agricultural and Food Chemistry** v.62 (37), p.9128-9136, 2014.

YOO, E. A. et al. Evaluation of antioxidant, antinociceptive, and anti-inflammatory activities of ethanol extracts from *Aloe saponaria* Haw. **Phytotherapy Research**, v. 22, n. 4, p. 544–549, 2008.

PRODUÇÃO DE LACASE A PARTIR DO *Oudemansiella canarii* E APLICAÇÃO EM SÍNTESE ORGÂNICA

WELLINGTON, K.W.; GOVINDJEE, V.P.; STEENKAMP, P. A laccase-catalysed synthesis of triaminated cyclohexa-2,4-dienones from catechol. **Journal of Catalysis**, v.368, p.306-314, 2018.