

Congresso
Internacional da
Agroindústria
10 e 11 de junho



Inovação,
Gestão e
Sustentabilidade
na Agroindústria

**PRODUÇÃO DE LACASES POR FUNGOS DA PODRIDÃO BRANCA E
APLICAÇÃO NA DESCOLORAÇÃO DO CORANTE VERDE MALAQUITA**

**PRODUCCIÓN DE LACASAS POR HONGOS DE LA PUDRICIÓN BLANCA Y
APLICACIÓN EN LA DECOLORACIÓN DE COLORANTE VERDE MALAQUÍTA**

**PRODUCTION OF LACASES BY WHITE ROT FUNGI AND APPLICATION IN
THE DISCOLORATION OF GREEN MALACHI DYE**

Thaís Marques Uber¹; Gabriel Bruno da Silva²; Emanueli Backes³; Vinicius M. S. Cheute⁴; Rosane M. Peralta⁵

DOI: <https://doi.org/10.31692/IICIAGRO.0039>

RESUMO

Lacases são óxido-redutases com ampla especificidade de ação podendo oxidar diferentes substratos, incluindo diferentes grupos de xenobióticos, como corantes, herbicidas, fármacos e pesticidas. O potencial redox padrão das lacases geralmente não é grande o suficiente para oxidar vários compostos xenobióticos, porém sua ação oxidativa pode ser melhorada com a utilização de mediadores. Estes são pequenas moléculas facilmente oxidáveis que podem atuar como intermediários redox entre o sítio ativo da enzima e o substrato que a enzima sozinha é incapaz de oxidar. O verde malaquita (VM) é um corante trifenilmetano utilizado como fungicida que é altamente tóxico para células de mamíferos. A degradação do VM por diferentes lacases de fungos ligninolíticos têm sido relatada. Neste contexto, os objetivos deste trabalho foram, primeiro, cultivar *Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus pulmonarius* e *Trametes versicolor* para produzir lacases. Segundo, estudar o potencial de biorremediação do VM por essas lacases na ausência e presença de três diferentes mediadores: acetilacetona, ácido violúrico e hidróxi-benzotriazol (HBT). Para obtenção das lacases, os fungos foram cultivados em estado sólido utilizando resíduo da pupunheira como substrato. Após 6 dias de cultivo, as lacases foram extraídas com água, filtradas em gaze e centrifugadas a 1800g por 15 min. Os sobrenadantes límpidos foram considerados como extratos brutos de lacase. Para avaliar a ação das lacases na degradação do VM, as enzimas foram adicionadas a soluções contendo 100 ppm do VM e as misturas foram incubadas a 40 °C por até 24 h. Periodicamente a absorbância da solução foi avaliada em espectrofotômetro a 620 nm. Os melhores resultados foram obtidos utilizando-se ácido violúrico como mediador. Os testes de toxicidade foram realizados com sementes de alface (*Lactuca sativa*). Após 5 dias, avaliou-se o crescimento das radículas na presença do corante sem tratamento e com o corante pós tratamento com lacase de *T. versicolor* ou com lacase de *T. versicolor* + ácido violúrico. As análises com sementes de alface mostraram uma redução significativa da fitotoxicidade do VM após os dois tratamentos, mas o ácido violúrico apresentou por si só discreta fitotoxicidade.

Palavras-Chave: biodegradação, corantes industriais, oxidases, fungos ligninolíticos, lacases.

¹Programa de Pós-graduação em Bioquímica, Universidade Estadual de Maringá, thaisuber@gmail.com

²Bacharelado em Bioquímica, Universidade Estadual de Maringá, ra101830@uem.br

³Programa de Pós-graduação em Ciência de Alimentos, Universidade Estadual de Maringá, emanuelibackes@outlook.com

⁴Programa de Pós-graduação em Bioquímica, Universidade Estadual de Maringá, vinimateusopo@gmail.com

⁵Departamento de Bioquímica, Universidade Estadual de Maringá, rmperalta@uem.br

RESUMEN

Las lacasas son óxido reductasas con una amplia especificidad de acción que pueden oxidar diferentes sustratos, incluidos diferentes grupos de xenobióticos, como colorantes, herbicidas, medicamentos y pesticidas. El potencial redox estándar de las lacasas generalmente no es lo suficientemente grande como para oxidar varios compuestos xenobióticos, pero su acción oxidativa puede mejorarse con el uso de mediadores. Esos son pequeñas moléculas fácilmente oxidables que pueden actuar como intermediarios redox entre el sitio activo de la enzima y el sustrato que la enzima sola no puede oxidar. El verde de malaquita (VM) es un tinte de trifenilmetano que se usa como fungicida y es altamente tóxico para las células de mamíferos. La degradación de VM por lacasas de hongos ligninolíticos ha sido reportada. En este contexto los objetivos de este trabajo fueron, primero, cultivar *Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus pulmonarius* y *Trametes versicolor* para producir lacasas. Segundo, estudiar el potencial de biorremediación de VM por esas lacasas en ausencia y presencia de tres diferentes mediadores: acetilacetona, ácido violúrico y hidroxibenzotriazol (HBT). Para obtener las lacasas, los hongos se cultivaron en estado sólido utilizando como sustrato residuo de palma melocotón. Después de 6 días de cultivo, las lacasas se extrajeron con agua, se filtraron a través de una gasa y se centrifugaron a 1800g durante 15 min. Los sobrenadantes transparentes se consideraron extractos de lacasa en bruto. Para evaluar la acción de las lacasas en la degradación de VM, se agregaron enzimas a soluciones con 100 ppm de VM y las mezclas se incubaron a 40 °C hasta por 24 h. La absorbancia de la solución se evaluó periódicamente en un espectrofotómetro a 620 nm. Los mejores resultados se obtuvieron utilizando ácido violúrico como mediador. Se realizaron pruebas de toxicidad con semillas de lechuga (*Lactuca sativa*). Después de 5 días, se evaluó el crecimiento de la raíz en presencia del tinte sin tratar y con el tinte después del tratamiento con lacasa de *T. versicolor* o con lacasa de *T. versicolor* + ácido violúrico. Los análisis con semillas de lechuga mostraron una reducción significativa en la fitotoxicidad de VM después de los dos tratamientos, pero el ácido violúrico solo mostró una leve fitotoxicidad.

Palabras Clave: biodegradación, tintes industriales, oxidasas, hongos ligninolíticos, lacasas.

ABSTRACT

Laccases are oxidoreductases with a wide specificity of action that can oxidize an ample number of substrates including different groups of xenobiotics, such as dyes, herbicides, drugs and pesticides. The standard redox potential of the laccases is generally not large enough to oxidize various xenobiotic compounds, but their oxidative action can be improved by the use of mediators. The latter are small easily oxidizable molecules that can act as redox intermediates between the active site of the enzyme and the substrate which the enzyme alone is unable to oxidize. Malachite green (MG) is a triphenylmethane dye used as a fungicide that is highly toxic to mammalian cells. MG degradation has been reported to be catalyzed by several laccases of ligninolytic fungi. Within this context the objectives of this work were, first, to grow the fungi *Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus pulmonarius* and *Trametes versicolor* for producing laccases. And, second, to study the potential of these enzymes in degrading MG in the absence and presence of three different mediators: acetylacetone, violuric acid and hydroxybenzotriazole (HBT). To obtain the laccases, the fungi were grown under solid state conditions using peach palm residues as substrate. After 6 days of cultivation, the laccases were extracted with water, filtered through gauze and centrifuged at 1800g for 15 min. The clear supernatants were considered as crude laccase extracts. To assess the degradation of MG by the laccases, the enzymes were added to solutions containing 100 ppm MG and the mixtures were incubated at 40 °C for up to 24 h. The absorbance of the solution was periodically evaluated in a spectrophotometer at 620 nm. The best results were obtained using violuric acid as mediator. Toxicity tests were performed with lettuce seeds (*Lactuca sativa*). After 5 days, root growth was evaluated in the presence of the untreated dye and with the dye after treatment with *T. versicolor* laccase or with *T. versicolor* laccase + violuric acid. The analyses with lettuce seeds showed a significant reduction in the phytotoxicity of MG after both treatments, but violuric acid by itself showed a slight phytotoxicity.

Keywords: biodegradation, industrial dyes, oxidases, ligninolytic fungi, laccase.

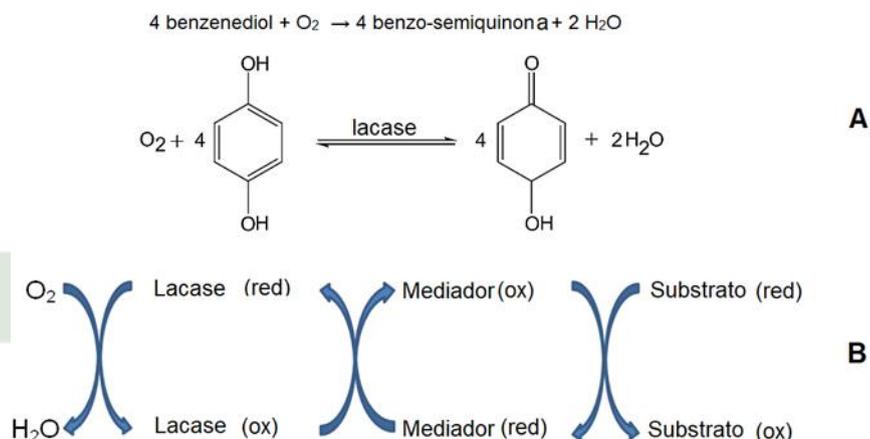
INTRODUÇÃO

Fungos causadores da podridão branca da madeira são um grupo diverso e abundante da classe dos Agaricomycetes. Esses fungos degradam todos os componentes da madeira, celulose, hemicelulose e lignina a partir dos quais obtém energia para seu crescimento e reprodução. Na natureza existem vários organismos capazes de produzir celulases e hemicelulases e hidrolisar os polissacarídeos celulose e hemicelulose em monossacarídeos. No entanto, quando esses polissacarídeos são complexados com lignina, eles são resistentes à hidrólise enzimática. Por essa razão, os fungos da podridão branca são os mais aptos microrganismos capazes de metabolizar completamente a lignina, sendo essenciais nos ecossistemas das florestas. Entre as espécies mais comumente estudadas de fungos da podridão branca estão as espécies: *Trametes versicolor*, *Pleurotus ostreatus* e *Pleurotus pulmonarius* (PERALTA et al., 2017).

A capacidade de degradar a lignina, o polímero orgânico mais abundante da natureza, vem da capacidade destes fungos em produzir um conjunto de enzimas chamadas enzimas ligninolíticas. Peroxidases e lacases são as mais importantes enzimas deste grupo. São óxido-redutases, com especificidade ampla de ação, podendo oxidar diferentes substratos. As lacases (EC 1.10.3.2) podem catalisar a oxidação de grande variedade de substratos orgânicos e inorgânicos, incluindo mono-, di- e polifenóis, metoxifenóis, aminas aromáticas e ascorbato por um mecanismo de transferredução de uma molécula de oxigênio para duas moléculas da água e a oxidação concomitante de quatro moléculas de substrato para produzir quatro radicais (RIVA, 2006) (Fig. 1). As peroxidases capazes de oxidar a lignina são a lignina peroxidase, peroxidase dependente de manganês e versátil peroxidase (PERALTA et al., 2017).

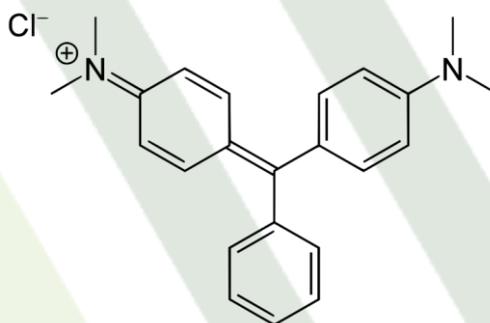
Corantes sintéticos são utilizados extensivamente nas indústrias têxtil, de papel, lã, algodão e cosméticos (SAJAB et al., 2011). Cerca de 10-15% da produção total de corantes é descartada em efluentes industriais (ARANTES et al., 2006). Verde de malaquita ($C_{23}H_{25}ClN_2$), massa molecular 364,9 g/mol) é um corante trifenilmetano utilizado na indústria de seda, lã, juta e couro (Fig. 2). Devido à sua elevada toxicidade para muitos microrganismos, a sua biodegradação é difícil em águas residuais (PAPINUTTI et al., 2006). O descarte do verde malaquita e outros corantes em córregos tem o efeito de inibir a penetração da luz solar e diminuir a atividade fotossintética, que pode ser tóxico para a vida aquática (VASANTH KUMAR et al., 2006).

Figura 1. Reação geral da lacase (A) e representação esquemática da oxidação do substrato pela lacase na presença de um mediador químico (B)



Fonte: PERALTA et al., 2017 com modificações

Figura 2. Estrutura do corante sintético verde malaquita



Fonte: Própria (2021)

Os objetivos deste trabalho foram produzir lacases através de cultivos dos fungos ligninolíticos em estado sólido utilizando resíduo da pupunheira como substrato e avaliar a aplicação dos extratos enzimáticos ricos em lacases na degradação do corante verde malaquita. Esforços foram realizados para comparar a fitotoxicidade do verde de malaquita antes e após o tratamento com as lacases.

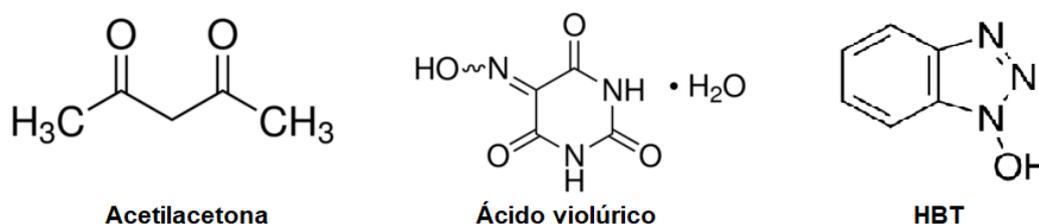
FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

Lacases e peroxidases possuem ampla especificidade de ação podendo atuar em diferentes grupos de xenobióticos quimicamente semelhantes à lignina incluindo corantes, herbicidas, fármacos e pesticidas (PERALTA et al., 2017, IARK et al., 2019). Entretanto, o potencial redox padrão da lacase geralmente não é grande o suficiente para oxidar vários compostos xenobióticos, porém sua ação oxidativa pode ser melhorada com a utilização de

mediadores, pequenas moléculas facilmente oxidáveis que podem atuar como intermediários redox entre o sítio ativo da enzima e um substrato que a enzima sozinha é incapaz de oxidar. (MAJEAU et al., 2010). Mediadores são compostos orgânicos de baixa massa molecular que primeiro são oxidados pela lacase e depois oxidam os compostos não fenólicos que a lacase sozinha não é capaz de oxidar (Fig. 1B) (CHRISTOPHER et al., 2014).

Três destes mediadores são a acetilacetona, o ácido violúrico e 1-hidroxibenzotriazol (HBT) (Fig. 3). Estas moléculas já foram descritas como mediadores excelentes em vários processos de biodegradação utilizando lacases. Ácido violúrico foi descrito como excelente mediador na degradação de corantes recalcitrantes pela lacase de *Trametes hirsuta* (COUTO & SANROMÁN, 2007) e na degradação de pesticidas pela lacase de *Trametes versicolor* (JIN et al., 2016). A degradação de poluentes orgânicos pela lacase de *Trametes versicolor* foi significativamente aumentada em presença de acetilacetona (YANG et al., 2015a). HBT aumentou a degradação do herbicida isoproturon pela lacase de *T. versicolor* (ZENG et al., 2017).

Figura 3. Estruturas químicas dos mediadores acetilacetona, ácido violúrico e HBT



Fonte: Própria (2021)

Para a produção de lacases, cultivos em estado sólido utilizando resíduos agroindustriais e florestais como substratos tem recebido grande atenção devido à facilidade, baixo custo e obtenção de extratos enzimáticos com elevadas atividades (SOCCOL et al., 2017). Os principais resíduos utilizados nos cultivos em estado sólido são o farelo de trigo, bagaço de cana, casca de arroz, serragem de eucalipto, entre vários outros. Pesquisas que incluam outros substratos que possibilitem rápido crescimento dos fungos e elevada produção da enzima são de grande importância, pois podem baratear a obtenção das lacases.

A pupunheira é uma palmeira nativa da região amazônica que têm seu cultivo difundido nos estados Santa Catarina, Paraná, Rio Grande do Sul, Rio de Janeiro e Espírito Santo (SEBEN et al., 2012). O palmito e o fruto são as partes da pupunheira mais exploradas comercialmente,

restando, após a extração do palmito, cerca de 80% a 90% do seu peso bruto como resíduo. Os resíduos agroindustriais exibem alto potencial poluente, no entanto não podem ser considerados como lixo, pois possuem valor econômico agregado e podem ser tratados e aproveitados no próprio setor agroindustrial (PEDROSA et al., 2013). Por serem basicamente fibras lignocelulósicas, os resíduos da pupunheira possuem potencial aplicação como substrato para crescimento de fungos lignocelulolíticos.

METODOLOGIA

A pesquisa realizada foi de natureza quantitativa experimental. Os fungos da podridão branca *Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus pulmonarius* e *Trametes versicolor* foram obtidos da Coleção de Basidiomicetos do Laboratório de Bioquímica de Microrganismos e Alimentos da Universidade Estadual de Maringá. Os fungos foram mantidos em laboratório através de repiques sucessivos em ágar batata dextrose ou ágar extrato de malte.

Os resíduos da pupunheira (bainha interna e casca) foram gentilmente cedidos pela EMBRAPA-FLORESTAS. Os materiais foram secos ao sol, moídos para dar um tamanho de partícula de 2–3 mm de espessura e usados como matéria-prima neste estudo. Os materiais foram avaliados pela técnica da fibra em detergente ácido (FDA) para obtenção dos percentuais de celulose, hemicelulose e lignina, e fibra em detergente neutro (FDN) para a porcentagem de lignocelulose (VAN SOEST et al., 1991). A composição média da bainha interna da pupunheira foi de $34,2 \pm 4\%$ celulose, $19 \pm 2\%$ hemiceluloses e $23 \pm 2\%$ lignina. A composição média da casca de pupunha foi $36,0 \pm 4\%$ celulose, $20 \pm 4\%$ hemiceluloses e $20 \pm 3\%$ lignina.

Para produção das lacases foi utilizada a técnica de cultivo em estado sólido. Cinco gramas dos resíduos de pupunha (bainha interna ou casca) foram colocados em frascos Erlenmeyer e um volume de 15 mL de meio mineral de Vogel (MONTENECOURT & EVEILEIGH, 1977) foi adicionado para a obtenção de uma umidade inicial de 75%. Em alguns cultivos glicose a 1% foi adicionado ao meio mineral. Os frascos foram autoclavados por 15 min. Após resfriamento, 3 discos de micélio de cada fungo foram uniformemente distribuídos nos frascos em condições assépticas. Os frascos foram mantidos em estufa a 28 °C no escuro. Os cultivos foram interrompidos após 6 dias adicionando-se 20 mL de água destilada a cada frasco. Os frascos foram mantidos em geladeira por cerca de 4 h, filtrados em gaze e centrifugados em centrífuga refrigerada a 2000 rpm. Os sobrenadantes foram considerados como sendo os extratos enzimáticos brutos.

A atividade da lacase foi avaliada utilizando-se o substrato 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico) (ABTS) em 50 mM de tampão acetato de sódio pH 5.0. A

oxidação do ABTS foi determinada pelo aumento da absorbância a 420 nm ($\epsilon = 36 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$) (MOTA et al., 2015). As atividades enzimáticas foram determinadas a 40°C e expressas em unidade enzimática internacional (U) obtidas por g de substrato (U/g substrato).

Para a avaliação da habilidade das lacases brutas degradarem o corante verde de malaquita, os ensaios foram realizados nas seguintes proporções: um volume de 18 mL do corante verde malaquita na concentração de 100 ppm foi acondicionado em frasco Erlenmeyer de 50 mL. Um volume de 100 μL do extrato enzimático bruto (para obtenção de uma atividade final de lacase de 1 U/mL de lacase), 100 μL de um dos mediadores (acetilacetona, ácido violúrico, HBT na concentração final de 0,5 mM) foram adicionados ao frasco contendo o corante. Nos ensaios onde não foi adicionado um mediador, um volume de 100 μL de água destilada foi adicionado para manutenção do volume de reação. As misturas reacionais foram mantidas a 40°C sem agitação. Periodicamente um volume de 2 mL das misturas foi introduzido na cubeta do espectrofotômetro e realizado um espectro de absorção da mistura na faixa do visível (400 a 700 nm). Para cálculo do percentual de descoloração, foi utilizado o valor da absorbância obtida no comprimento de onda 620 nm.

A avaliação da toxicidade foi realizada utilizando-se sementes de alface (*Lactuca sativa*). O bioensaio foi conduzido usando verde malaquita não tratado e tratado com lacase diluídos convenientemente para obtenção do corante na concentração de 100 ppm. Placas de Petri (90 mm de diâmetro), contendo papel de filtro saturado com 3 mL das várias amostras ou água (controle), receberam vinte sementes de alface. As placas foram mantidas no escuro a 28°C. Após 5 dias, os comprimentos das radículas foram medidos e expressos como alongamento da raiz em cm (COELHO-MOREIRA et al., 2018).

Os dados foram submetidos a ANOVA com teste post hoc de Tukey. Valores de $p \leq 0,05$ foram adotados para significância. O software GraphPad Prism (versão 8.0) foi utilizado para as análises de ANOVA e também para a confecção das figuras deste trabalho.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os fungos *Trametes versicolor*, *Pleurotus pulmonarius* e *Pleurotus ostreatus* apresentaram os primeiros sinais de crescimento micelial já no segundo dia de cultivo, apresentando colonização completa do substrato após 5 dias de cultivo. A Tabela 1 mostra a produção de lacases no 6º dia de cultivo. Analisando-se os dados obtidos, podemos concluir que as culturas de *P. ostreatus* e *T. versicolor* produziram atividades de lacase maiores em tempos menores de cultivo, quando as atividades foram comparadas.

Tabela 1. Produção de lacases pelos fungos ligninolíticos em cultivos em estado sólido utilizando resíduo de pupunha como substrato

Fungo	Resíduo de pupunha	Lacase (6 dias de cultivo) U/g de substrato
<i>T. versicolor</i>	casca	10,80±1,13 ^a
<i>T. versicolor</i>	interno	31,56±2,80 ^b
<i>P. ostreatus</i>	casca	13,83±1,50 ^a
<i>P. ostreatus</i>	interno	17,67±1,90 ^c
<i>P. pulmonarius</i>	casca	14,21±0,55 ^a
<i>P. pulmonarius</i>	interno	23,64±0,40 ^d

Médias identificadas com letras diferentes são estatisticamente diferentes ($p \leq 0,05$).

Fonte: Própria (2021)

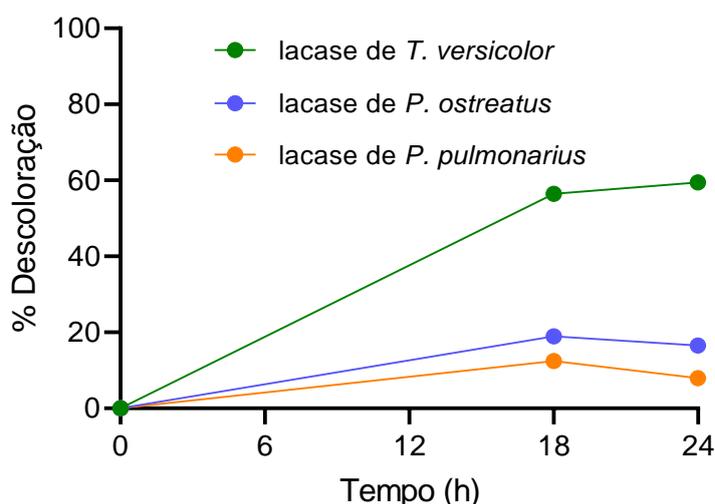
Os resultados indicam que os resíduos da pupunheira (bainha externa e interna) são bons substratos para o crescimento e produção de lacases pelos fungos *T. versicolor*, *P. ostreatus* e *P. pulmonarius*, tendo-se obtido valores significativamente mais altos de lacase ($p \leq 0,05$) quando a bainha interna da pupunha foi utilizada como substrato. A utilização destes resíduos como substratos para cultivos dos fungos reduzem o potencial poluente dos resíduos de pupunheira ao serem utilizados para a geração de produtos de alto valor agregado, neste caso as lacases, sendo um exemplo de economia circular (UBANDO et al., 2020).

Das três lacases, a mais efetiva na degradação do verde de malaquita sem a presença de um mediador, foi a enzima do *T. versicolor*. Utilizando 1 U/mL da lacase de *T. versicolor*, a solução de verde malaquita na concentração de 100 ppm foi descolorida 60% após 24 h (Fig. 4). Utilizando a lacase de *P. ostreatus* e *P. pulmonarius*, o percentual de descoloração foi inferior a 20%. A maior ou menor capacidade da lacase em oxidar um substrato está associada ao seu potencial redox. As lacases são classificadas em 3 grupos quanto ao potencial redox: as de alto potencial redox (0,7-0,8 V), as de médio potencial redox (0,5-0,6 V) e as de baixo potencial redox (0,4-0,5 V) (UZAN et al., 2010). As lacases de *Trametes* sp são considerada de alto potencial redox, enquanto as de *Pleurotus* sp são consideradas de potencial redox médio (PERALTA et al., 2017)

Tem sido relatado que lacases de diferentes fungos são hábeis na descoloração do verde malaquita. Por exemplo, lacase (30 U/mL) de *Ganoderma* sp foi capaz de descolorir mais de 90% de uma solução 100 ppm de VM após 12 h (SHARMA et al., 2015). Uma lacase de

Trametes pubescens (300 U/L ou 0,3 U/mL) descoloriu 41% e 96% de uma solução de VM (33 ppm) após 4 e 21 h, respectivamente (OSMA et al., 2007).

Figura 4. Porcentagem de descoloração do corante verde malaquita pelas lacases de *Trametes versicolor*, *Pleurotus ostreatus* e *Pleurotus pulmonarius*. Os meios reacionais continham 1 U/mL de lacase (concentração final)

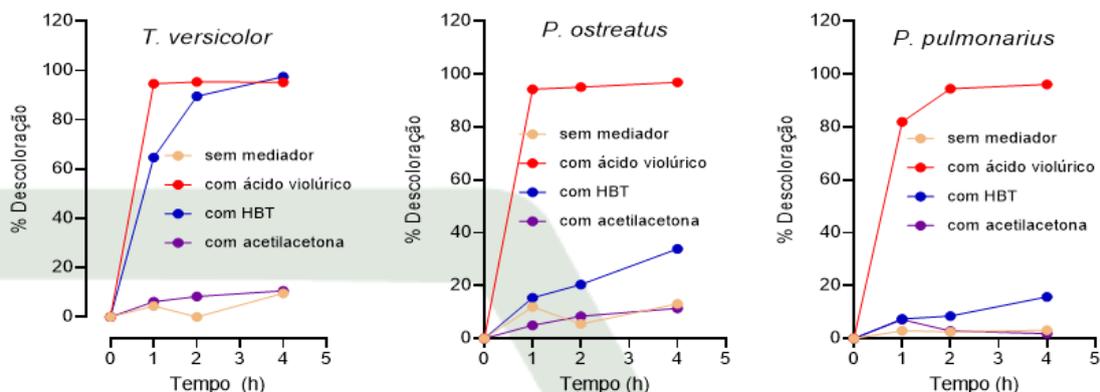


Fonte: Própria (2021)

A Figura 5 exibe os resultados do ensaio enzimático de descoloração do verde malaquita pelas lacases de *T. versicolor*, *P. ostreatus* e *P. pulmonarius* na presença dos mediadores ácido violúrico, HBT e acetilacetona. O tempo do ensaio foi reduzido para um máximo de 4 horas. Maior descoloração foi observada quando a lacase de *T. versicolor* foi utilizada com ácido violúrico a 0,5 mM como mediador: 100% de descoloração foi observado após incubação de 1 h. O HBT aumentou a capacidade de descoloração no extrato de *T. versicolor*, mas não aumentou a descoloração causada pelas lacases de *P. ostreatus* e *P. pulmonarius*. O mediador acetilacetona não aumentou a descoloração do verde malaquita para nenhuma das lacases testadas.

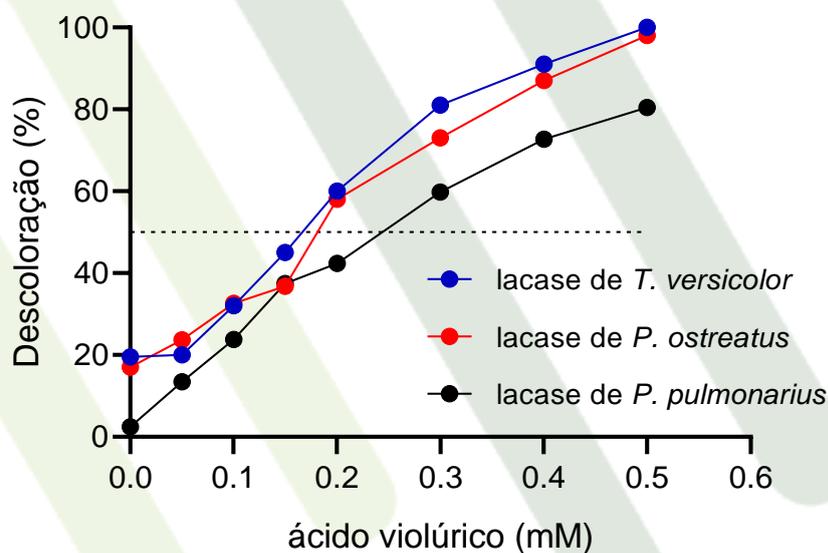
A descoloração do verde malaquita foi medida utilizando-se diferentes concentrações do ácido violúrico. O efeito do ácido violúrico na descoloração do verde malaquita é dose dependente para todas as lacases testadas (Fig. 6). Após 1 h a descoloração do corante foi próxima a 100% ao se utilizar as lacases de *T. versicolor* e de *P. ostreatus* e cerca de 80% ao se utilizar a lacase de *P. pulmonarius*. Ao redor de 50% de descoloração do verde de malaquita foi obtida ao se utilizar o ácido violúrico nas concentrações de 0,16, 0,18 e 0,25 mM em associação com as lacases de *T. versicolor*, *P. ostreatus* e *P. pulmonarius*, respectivamente.

Figura 5. Porcentagem de descoloração do corante verde malaquita (100 ppm) lacases de *T. versicolor*, *P. ostreatus* e *P. pulmonarius* (lacase na concentração final de 1 U/mL) com adição dos mediadores ácido violúrico, 1-hidroxibenzotriazol (HBT) e acetilacetona todos na concentração final de 0,5 mM.



Fonte: Própria (2021)

Figura 6. Efeito da concentração do ácido violúrico sobre a descoloração do verde malaquita pelas lacases de *T. versicolor*, *P. ostreatus* e *P. pulmonarius*. O tempo reacional foi de 1 h utilizando verde de malaquita 100 ppm

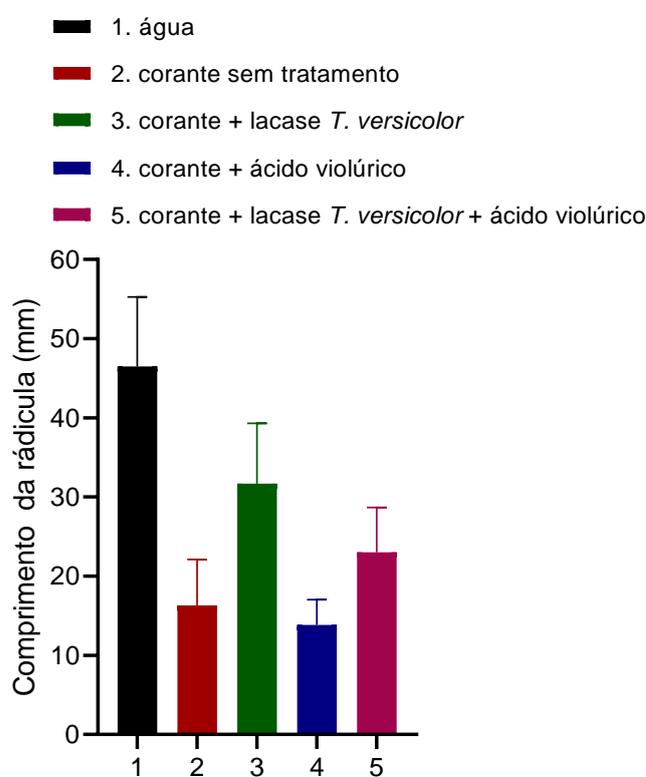


Fonte: Própria (2021)

Para verificar se a descoloração do verde malaquita é acompanhada ou não de redução da fitotoxicidade, foram realizados experimentos utilizando sementes de alface e avaliando-se o crescimento da radícula na presença de água, verde malaquita sem tratamento, verde malaquita com enzima, verde malaquita com mediador e verde malaquita com enzima e mediador. Para este experimento, utilizou-se o extrato enzimático de *T. versicolor*. Comparando

com a água (controle) a solução com corante foi fitotóxica, visto que o comprimento médio das radículas foi reduzido de 50 para 15 mm ((Fig. 7). As soluções descoloridas (corante + lacase e corante + lacase + ácido violúrico) apresentaram menor fitotoxicidade. A solução de ácido violúrico e corante exibiu maior fitotoxicidade do que o corante sozinho, o que sugere que ácido violúrico também apresentou fitotoxicidade.

Figura 7. Análise da fitotoxicidade do corante verde malaquita. A fitotoxicidade foi avaliada com sementes de alfafa, medindo-se o comprimento das radículas após 5 dias



Fonte: Própria (2021)

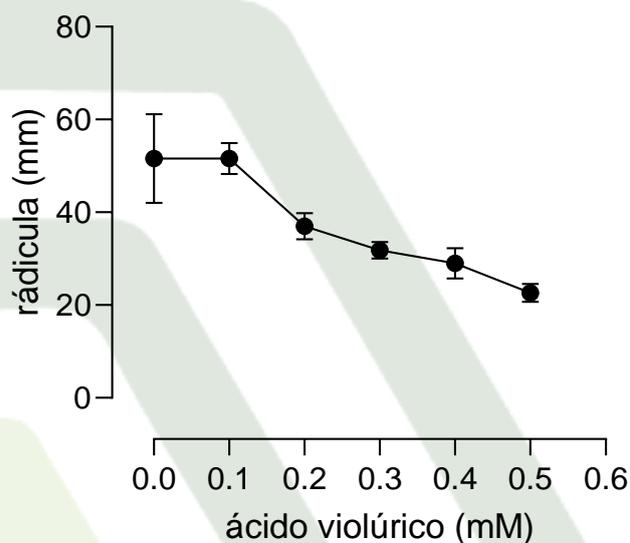
A fim de avaliar a fitotoxicidade do ácido violúrico foi realizado um novo teste apenas com o mediador em diferentes concentrações. À medida que as sementes foram expostas à concentrações mais elevadas de ácido violúrico, o tamanho das radículas foi menor (Fig. 8).

Diversos trabalhos tem avaliado o efeito positivo do ácido violúrico na degradação de corantes. A adição de 1 mM de ácido violúrico aumentou de 2 a 30 vezes a degradação de diferentes corantes pela lacase de *Trametes hirsuta* (YANTO et al., 2019, RODRIGUEZ-COUTO & SANROMÁN, 2007). O uso do ácido violúrico como mediador da lacase de *Pleurotus ostreatus* também aumentou a degradação de diversos corantes (POGNI et al., 2007). Entretanto, em função dos resultados obtidos que mostram uma redução do crescimento das

UMA PARTE DO TÍTULO EM PORTUGUÊS, NEGRITO, CAIXA ALTA

radículas das sementes de alface pelo ácido violúrico, os estudos de degradação de corantes utilizando sistemas lacase-ácido violúrico devem ser monitorados quanto a toxicidade e se priorizar o uso de concentrações baixas deste mediador.

Figura 8. Efeito da concentração de ácido violúrico no comprimento das radículas de alface



Fonte: Própria (2021)

CONCLUSÕES

Os resíduos da pupunheira foram substratos adequados para crescimento dos fungos *P. ostreatus*, *P. pulmonarius* e *T. versicolor*. Maiores atividades de lacase foram obtidas com *T. versicolor* cultivado na bacia interna da pupunheira. As lacases dos três fungos foram eficientes na degradação do corante verde de malaquita. A adição do mediador ácido violúrico aumentou a eficiência do processo de degradação do corante, diminuindo o tempo necessário para completa descoloração. No entanto, o ácido violúrico apresentou certa fitotoxicidade que deve ser considerada na sua associação com lacases quando o objetivo for degradação e detoxificação de xenobióticos.

REFERÊNCIAS

ARANTES, V., BALDOCCHI, C., MILAGRES, A. M. F. Degradation and decolorization of a biodegradable-resistant polymeric dye by chelator-mediated Fenton reactions. **Chemosphere**, v. 63, p. 1764–1772, 2006.

CHRISTOPHER, L. P.; YAO, B.; & JI, Y. Lignin biodegradation with laccase-mediator systems. **Frontiers in Energy Research**, v. 2, artigo 12, 2014.

COELHO-MOREIRA, J.S.; BRUGNARI, T.; SÁ-NAKANISHI, A. B.; CASTOLDI, R.; SOUZA, C.G.M.; BRACHT, A.; PERALTA, R.M. Evaluation of diuron tolerance and biotransformation by the white-rot fungus *Ganoderma lucidum*. **Fungal Biology**, v. 122, p. 471-478, 2018.

COUTO, S.R.; SAMROMÁN, M.A. The effect of violuric acid on the decolourization of recalcitrant dyes by laccase from *Trametes hirsuta*. **Dyes and Pigments**, v. 74, p. 123-126, 2007.

IARK, D.; BUZZO, A.J.R.; GARCIA, J.A.A.; CORRÊA, V.G.; HELM, C.V.; CORRÊA, R.C.G.; PERALTA, R.A.; PERALTA MUNIZ MOREIRA, R.F.; 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, artigo 121655, 2019.

JIN, X.; YU, X.; ZHU, G.; ZHENG, Z.; FENG, F.;ZHANG, Z. Conditions optimizing and application of laccase-mediator system (LMS) for the laccase-catalyzed pesticide degradation. **Scientific Reports**, v. 6, artigo 35787, 2016.

MAJEAU, J. A.; BRAR, S. K.; TYAGI, R. D. Laccases for removal of recalcitrant and emerging pollutants. **Bioresource Technology**, 101, 2331–2350, 2010.

MONTENECOURT, B.S.; EVELEIGH, D.E. Preparation of mutants of *Trichoderma reesei* with enhanced cellulase production. **Applied Environmental Microbiology**, v. 34, p. 777-782, 1977.

MOTA, T.R.; KATO, C.G.; PERALTA, R.A.; BRACHT, A.; MORAIS, G.R.; BAESSO, M.L.; SOUZA, C.G.M.; BRACHT, A.; PERALTA, R.M. Decolourization of Congo Red by *Ganoderma lucidum* Laccase: evaluation of degradation products and toxicity. **Water, Air, & Soil Pollution**, v. 226, p. 351-362, 2015.

OSMA, J.F.; HERRERA, J.L.T.; COUTO, S.R. Banana skin: a novel waste for laccase production by *Trametes pubescens* under solid-state conditions. Application to synthetic dye decolouration. **Dyes and Pigments**, v. 75, p. 32-37, 2007.

PAPINUTTI, L.; MOUSO, N.; FORCHIASSIN, F. Removal and degradation of the fungicide dye malachite green from aqueous solution using the system wheat bran–*Fomes sclerodermeus*. **Enzyme and Microbial Technology**, 39, 4, 848–853, 2006.

PEDROSA, T. D.; FARIAS, C. A. S.; PEREIRA, R. A.; DO RÊGO FARIAS, E. T. Monitoramento dos parâmetros físico-químicos na compostagem de resíduos agroindustriais. **Nativa**, v. 1, p. 44-48, 2013.

PERALTA, R.M.; SILVA, B.P.; CORREA, R.C.G.; KATO, C.G.; SEIXAS, F.A.V.; BRACHT, A. 2017. Enzymes from basidiomycetes: peculiar and efficient tools for biotechnology. **Biotechnology of Microbial Enzymes**. Ed. G. BRAMACHARI, A.L. DEMAIN & J.L. ADRIO. Elsevier, pp 119-150.

POGNI, R.; BROGIONI, B.; CAMILLA BARATTO, M.; SINICROPI, A.; GIARDINA, P.; PEZZELLA, C.; SANNIA, G.; BASO, R. Evidence for a radical mechanism in biocatalytic

degradation of synthetic dyes by fungal laccases mediated by violuric acid. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 25, p. 269-275, 2007

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

RODRIGUEZ COUTO, S.; SANROMÂ, M. A. The effect of violuric acid on the decolourization of recalcitrant dyes by laccase from *Trametes hirsuta*. **Dyes and Pigments**, v. 74, p. 123-126, 2007

SAJAB, M. S.; CHIA, C. H.; ZAKARIA, S.; JANI, S. M.; AYOB, M. K.; CHEE, K. L.; KHIEW, P. S.; CHIU, W. S. Citric acid modified kenaf core fibres for removal of methylene blue from aqueous solution. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 7237-7243, 2011.

SEBEN, L.; DE PAULA, I. C.; VIANA S. G. Análise do processo de beneficiamento da Palmeira Real da Austrália (palmito em conserva) para determinação das variáveis que influenciam as operações de valorização de seus resíduos. **Produto & Produção**, v. 13, p. 75-92, 2012.

SHARMA, A.; SHRIVASTAVA, B.; KUHAD, R.C. Reduced toxicity of malachite green decolorized by laccase produced from *Ganoderma* sp. rckk-02 under solid-state fermentation. **3 Biotech**, v. 5, p. 621-631, 2015.

SOCCOL, C.R.; COSTA, E.S.F.; LETTI, L.A.J.; KARP, S.G.; WOICIECHOWSKI, A.L., VANDENBERGHE, L.P.S. Recent developments and innovations in solid-state fermentation. **Biotechnology Research 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.

UZAN E.; NOUSIAINEN P.; BALLAND V.; SIPILA J.; PIUMI F.; NAVARRO D.; ASTHER M.; RECORD E.; LOMASCOLO, A. High redox potential laccases from the lignolytic fungi *Pycnoporus coccineus* and *Pycnoporus sanguineus* suitable for white biotechnology: from gene cloning to enzyme characterization and applications. **Journal of Applied Microbiology**, v. 108, p. 2199-2213, 2010

VAN SOEST, P.J.; ROBERTSON, J.B.; LEWIS, B.A.: Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. **Journal of Dairy Science** v. 74, p. 35-83, 1991

VASANTH KUMAR, K.; RAMAMURTHI, V.; SIVANESAN, S. Biosorption of malachite green, a cationic dye onto *Pithophora* sp., a fresh water algae. **Dyes and Pigments**, v. 69, p. 102-107, 2006.

YANG, H.; SUN, H.; ZHANG, S.; WU, B.; PAN, B. Potential of acetylacetone as a mediator for *Trametes versicolor* laccase in enzymatic transformation of organic pollutants. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, p. 10882–10889, 2015a.

YANG J.; YANG X.; LIN Y.; NG T.B.; LIN J.; YE X. Laccase-catalyzed decolorization of malachite green: performance optimization and degradation mechanism. **PLoS One**, v.10, p. 1–14, 2015b.

PRINCIPAL, et al.

YANTO, D. H. Y. Y.; AULIANA, N.; ANITA, S. H.; WATANABE, T. Decolorization of synthetic textile dyes by laccase from newly isolated *Trametes hirsuta* EDN084 mediated by violuric acid. **The 8th International Symposium for Sustainable Humanosphere**. IOP Conf. Series: Earth and Environmental Science v. 374, artigo 012005, 2019

ZENG, S.; QIN, X.; XIA L. Degradation of the herbicide isoproturon by laccase-mediator systems. **Biochemical Engineering Journal**, v. 199, p. 92-100, 2017.