



**UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS**  
**ESCOLA DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA E RECURSOS**  
**NATURAIS DA AMAZÔNIA**

**TAYANA JESSIE SUWA MESQUITA DE SOUZA**

**Casca de *Astrocaryum aculeatum* Meyer como substrato para produção de lacase por *Pleurotus ostreatus* LM 6226 para remoção de composto recalcitrante**

MANAUS

2018

**TAYANA JESSIE SUWA MESQUITA DE SOUZA**

**Casca de *Astrocaryum aculeatum* Meyer como substrato para produção de lacase por *Pleurotus ostreatus* LM 6226 para remoção de composto recalcitrante**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Recursos naturais da Amazônia da Universidade do Estado do Amazonas (UEA), como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia e Recursos Naturais.

**Orientador: Prof<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Érica Simplício de Souza**  
**Co-orientador: Prof. Dr. João Vicente Braga de Souza**

MANAUS

2018

### Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).  
**Sistema Integrado de Bibliotecas da Universidade do Estado do Amazonas.**

S729c Souza, Tayana Jessie Suwa Mesquita de  
Casca de *Astrocaryum aculeatum* Meyer como  
substrato para produção de lacase por *Pleurotus ostreatus*  
LM 6226 para remoção de composto recalcitrante /  
Tayana Jessie Suwa Mesquita de Souza. Manaus : [s.n],  
2018.  
52 f.: color.; 30 cm.

Dissertação – PGSS – Biotecnologia e Recursos  
Naturais da Amazônia (Mestrado) – Universidade do  
Estado do Amazonas, Manaus, 2018.  
Inclui bibliografia  
Orientador: Dra. Érica Simplício de Souza  
Coorientador: Dr. João Vicente Braga de Souza

1. Resíduo agroindustrial. 2. Bioprocesso em estado  
sólido. 3. Basidiomicetos. 4. Enzima. 5. Corante. I.  
Dra. Érica Simplício de Souza (Orient.). II. Dr. João  
Vicente Braga de Souza (Coorient.). III. Universidade do  
Estado do Amazonas. IV. Casca de *Astrocaryum*  
*aculeatum* Meyer como substrato para produção de lacase  
por *Pleurotus ostreatus* LM 6226 para remoção de  
composto recalcitrante

**TAYANA JESSIE SUWA MESQUITA DE SOUZA**

**Casca de *Astrocaryum aculeatum* Meyer como substrato para produção de lacase por *Pleurotus ostreatus* LM 6226 para remoção de corante têxtil**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Recursos naturais da Amazônia da Universidade do Estado do Amazonas (UEA), como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em Biotecnologia e Recursos Naturais.

**Data da aprovação:** 26/06/2018

**Banca Examinadora:**

---

Profª Drª. Érica Símplicio de Souza  
Universidade do Estado do Amazonas-UEA

---

Profª Drª. Patrícia Melchionna Albuquerque  
Universidade do Estado do Amazonas-UEA

---

Profª Drª. Ormezinda Celeste Cristo Fernandes  
Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado – FMT-HVD/AM

MANAUS

2018

*Dedico este trabalho a minha avó, Nelly (in memorian)  
e ao meu avô Jonas (in memorian), a minha mãe e ao  
meu pai, sempre serão meus exemplos e orgulho.*

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus pelo seu infinito amor e auxílio em mais uma caminhada. Toda honra e glória ao meu Deus.

A minha família pelos incentivos e esforços, sem medida, para me ajudar. Tenho muito orgulho de vocês. Sempre estarão em meu coração.

Ao grupo de pesquisa do laboratório de Micologia Médica do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, nas pessoas do Dr. João Vicente Braga de Souza e da Dra. Érica Simplício de Souza. Meus eternos agradecimentos pela oportunidade de poder trabalhar ao lado de vocês.

Ao meu amigo de jornada, Doutorando Ralyvan, pela amizade, companheirismo e ajuda. Obrigada por ter tornado os dias melhores.

A Dra. Patrícia Melchionna e Dra. Ormezinda Fernandes por suas participações nas minhas bancas de qualificação e defesa.

Aos meus colegas de mestrado pelos momentos memoráveis. MBT/2016 foi a melhor turma da vida.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia da Universidade do Estado do Amazonas pela oportunidade.

Ao CNPq pela bolsa concedida.

*“Eu sou a videira; vocês são os ramos. Se alguém permanecer em mim e Eu nele, esse dá muito fruto; pois sem mim vocês não podem fazer coisa alguma”.*

João 15:5

## RESUMO

A enzima lacase é utilizada em diversos ramos de aplicações industriais e biotecnológicas. *Pleurotus ostreatus* é um conhecido bom produtor de lacases. Atualmente, são necessários estudos que investiguem a redução de custos dos bioprocessos, incluindo como estratégia o uso de resíduos como substrato para bioprocessos em estado sólido. No estado do Amazonas, a casca do fruto de tucumã, *Astrocaryum aculeatum* Meyer, é um resíduo amplamente produzido. O presente trabalho investigou a utilização de casca do fruto de *A. aculeatum* Meyer como substrato para produção de lacase em bioprocessos em estado sólido com *P. ostreatus* LM 6226. O bioprocessos foi realizado em frascos Erlenmeyer (125 mL) contendo 15 g de meio de cultivo (cascas de tucumã, umidade de 70%). O inóculo foi realizado transferindo-se 10 plugs (5 mm  $\phi$ ) de micélio retirados de placas de BDA previamente incubadas (120 horas). As culturas foram mantidas à 25 °C, por 15 dias. Ensaios univariados foram realizados para avaliar a influência dos fatores: a) Temperatura de crescimento, b) Tamanho de inóculo, c) % de umidade, d) suplementação com farelo de trigo, e) presença de  $\text{CuSO}_4$  e f) Regime de iluminação. Uma cinética foi realizada nas condições estabelecidas nos ensaios univariados. Em adição, foi investigada a influência de temperatura, pH e estabilidade das lacases. Por fim, foi investigado o potencial da enzima produzida na remoção de cor (% redução de Abs a 595 nm) de uma solução de Remazol Brilliant Blue-R (RBBR) (200 mg/L). As condições ótimas para a produção de lacases utilizando a casca do fruto de *A. aculeatum* como substrato foram: temperatura de 25°C, inóculo de 10 plugs por cultivo, 70% de umidade e incubação em iluminação ambiental. A presença de farelo de trigo e sulfato de cobre não apresentaram influência na produção da enzima. O estudo quanto a cinética de produção das lacases demonstrou que no 10º dia do bioprocessos foram observadas as atividades máximas da enzima. A investigação quanto a temperatura e pH ótimos revelou enzimas com pH ótimo de 5 e temperaturas ótimas entre 25-50°C. Os estudos de estabilidade da enzima demonstraram lacases com atividade residual >85% quando incubadas por 24 em pH entre 5-6 e atividade residual >75% quando incubadas por 70 min em temperaturas entre 25-30 °C. O ensaio de remoção de cor de uma solução de RBBR apresentou taxas de remoção relativa de até 20% da  $\text{Abs}_{(595 \text{ nm})}/\text{h}$ .

**Palavras-chave:** Resíduo agroindustrial. Bioprocessos em estado sólido. Basidiomicetos. Enzima. Corante.



## **ABSTRACT**

The enzyme laccase is used in industrial and biotechnological applications. *Pleurotus ostreatus* is a good laccase producer. They are, studies that investigate the reduction of costs of bioprocesses, including the strategy of using substrates for solid state bioprocessing. In the state of Amazonas, a bark of the fruit of the fruit, *Astrocaryum aculeatum* Meyer, is a widely produced time. The present work investigated the use of *A. aculeatum* Meyer fruit peel as a substrate for the production of glucose in solid state with *P. ostreatus* LM 6226. The bioprocess was carried out in Erlenmeyer flasks (125 mL) containing 15 g of culture medium (peels of tucumã, humidity of 70%). The screw was removed 10 plugs (5 mm) of mycelium removed from incubated Premium BDA plates (120 hours). Cultures were maintained at 25 °C for 15 days. Univariate tests were the key to evaluate the factors: a) Growth temperature, b) Size of inoculum, c) % humidity, d) supplementation with wheat bran, e) presence of CuSO<sub>4</sub> and f) Illumination regime. A kinetic was performed in climates, in the univariate ones. In additive, the influence of temperature, pH and laccase stability was investigated. Finally, the potential of the air removal technique (Reduction of Abs at 595 nm) of a solution of Remazol Brilliant Blue-R (RBBR) (200 mg/L) was investigated. The optimal conditions for laccase production using a fruit of the *A. aculeatum* as substrate were: temperature of 25 °C, inoculum of 10 plugs per culture, 70% of humidity and incubation in environmental environment. The presence of wheat bran and copper sulphate are not produced in the production of the enzyme. The study of kinetics of laccase production demonstrated that no 10 years of bioprocess were observed as maximum activities of the enzyme. The quality and pH of great enzymes with pH 5 and indoor atmospheric radio between 25-50 °C. Stability studies of the enzyme demonstrated laccases with residual residual > 85% when incubated for 24 at pH between 5-6 and residual activity > 75% when incubated for 70 min at temperatures between 25-30 °C. The RBBR blood solution removal assay had removal rates of up to 20% Abs (595 nm)/h.

**Keywords:** Agroindustrial residue. Solid state bioprocess. Basidiomycetes. Enzyme. Dye.

## LISTA DE FIGURAS

### REFERENCIAL TEÓRICO

<b>Figura 1</b> – Ciclo catalítico da lacase .....	3
<b>Figura 2</b> – Principais constituintes dos materiais lignocelulósicos.....	5
<b>Figura 3</b> – Fungo basidiomiceto do gênero <i>Pleurotus</i> .....	6
<b>Figura 4</b> – Estrutura química do corante Remazol Brilliant Blue-R (RBBR).....	9

### CAPÍTULO I

<b>Figura 1</b> – Resultados dos experimentos de otimização para produção de lacase a) umidade, b) inóculo, c) farelo de trigo, d) sulfato de cobre, e) temperatura, f) iluminação.....	20
<b>Figura 2</b> - Cinética de produção de lacase, em meio de cultivo em estado de sólido com cascas de tucumã a partir de <i>P. ostreatus</i> , em 30 dias.....	22
<b>Figura 3</b> - Efeito do pH e temperatura na atividade enzimática da lacase. a) O efeito do pH, b) E o efeito da temperatura na atividade da enzima .....	22
<b>Figura 4</b> - Efeito do pH e temperatura na atividade enzimática da lacase. a) O efeito do pH, b) E o efeito da temperatura na atividade enzimática.....	23
<b>Figura 5</b> - Remoção do corante Remazol Brilliant Blue-R a partir do extrato enzimático de lacase de <i>P. ostreatus</i> cultivado com casca de tucumã em fermentação em estado sólido por 30 dias a) Remoção de RBBR acompanhada em espectrofotômetro, b) Remoção de RBBR acompanhada através da leitura visual.....	24

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	1
2.1 <i>Lacase</i> .....	2
2.2 <i>Fungos produtores de lacase</i> .....	4
2.3. <i>Composto recalcitrante</i> .....	7
2.3.1. <i>Corante sintético</i> .....	7
2.4. <i>Bioprocesso em estado sólido</i> .....	10
2.4.1. <i>Resíduo agroindustrial</i> .....	11
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	13
3.1 <i>Objetivo geral</i> .....	13
3.2 <i>Objetivos específicos</i> .....	13
<b>4. RESULTADOS</b> .....	15
<b>5 CONCLUSÃO</b> .....	32
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	33

## 1 INTRODUÇÃO

As lacases são enzimas multicobre, que podem catalisar uma variedade de reações envolvendo a oxidação de elétrons dos substratos e são encontradas, principalmente, em fungos basidiomicetos (VALLE, 2012). Essas enzimas oxidativas são empregadas em uma variedade de setores das indústrias mundiais, assim como, em processos de biorremediação, uma vez que, são consideradas ecológicas por envolver oxigênio como aceptor final de elétrons e, assim, produz água como subproduto (ARCA-RAMOS et al., 2017; CHEN et al., 2016; RODRÍGUEZ-DELGADO et al., 2016; VISWANATH et al., 2014). E junto com outras enzimas de interesse industrial, movimentam anualmente bilhões de dólares (ORLANDELLI et al., 2012).

Com a crescente industrialização, as crescentes preocupações ambientais e os benefícios múltiplos das enzimas, espera-se que a demanda por enzimas aumente entre 2016 e 2021 (DEWAN, 2017). Frente ao cenário mundial, o mercado brasileiro é considerado pouco representativo, mas revela grande potencial para a produção de enzimas, por gerar grandes quantidades de resíduos agroindustriais. Assim, utilizar esses resíduos durante o processo de produção enzimática pode reduzir os custos decorrentes da obtenção de matéria prima (DEWAN, 2017; MUSSATO et al., 2007). Os resíduos agrícolas são utilizados na fermentação em estado sólido, por simular o *habitat* natural dos fungos basidiomicetos, de forma a estimular a produção de enzimas, como as lacases (FARINAS, 2015; RAVINDRAN; JAISWAL, 2016; RISDIANTO et al., 2012).

O Estado do Amazonas produz grandes quantidades de resíduos agroindustriais como as cascas de tucumã e estas podem ser uma alternativa empregada em bioprocessos em estado sólido devido a sua elevada disponibilidade e baixo custo (PANDEY et al., 2000; SANTOS, 2016). SANTOS (2016), obteve produção significativa de lacase por *P. ostreatus* utilizando cascas de tucumã, cascas de pupunha e cascas da raiz da mandioca, enzima de interesse para degradação de vários compostos poluentes.

Os corantes sintéticos são amplamente empregados nas indústrias do setor têxtil, que geram grandes volumes de águas residuais provenientes do processos de coloração dos tecidos (BIBI; BHATTI, 2012; GUIVARCH et al., 2003; ROBINSON; CHANDRAN; NIGAM, 2001; SINGH; CHADHA, 2016; YUAN, et al., 2016). E suas estruturas complexas, resistentes à exposição ao suor, à luz, à água, agentes oxidantes, tornam os corantes muito

estáveis e difíceis de degradar (NIGAM et al., 2000; WILLMOTT; GUTHRIE; NELSON, 1998).

O objetivo deste trabalho foi utilizar cascas de tucumã do Amazonas, *Astrocaryum aculeatum* Meyer, como substrato em bioprocesso em estado sólido para produção de lacase por *Pleurotus ostreatus*, visando utilizar o extrato enzimático para remover o corante Remazol Brilliant Blue-R.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Lacase

A busca por produtos ou processos que minimizem as consequências negativas oriundas das indústrias, tem incentivado a demanda por pesquisas que auxiliem as indústrias a se desenvolver de forma sustentável, mantendo e/ou aumentando a sua lucratividade. Essas são questões que estimulam, principalmente, o mercado mundial das enzimas (PEZZELLA et al., 2014; VALLE, 2012).

A produção de enzimas é um campo da biotecnologia em expansão (ORLANDELLI et al., 2012). Esse mercado deverá atingir US\$ 1,27 bilhão até 2021. E dentre as indústrias de enzimas mundialmente conhecidas pode-se citar algumas como Novozymes (Dinamarca), Amano Enzymes Inc. (Japão), Codexis Inc. (E.U.A.), Sanofi S.A. (França), F. Hoffmann-La Roche Ltd. (Suíça) (DEWAN, 2017).

As enzimas são moléculas com a capacidade de acelerar processos químicos e apresentam grandes vantagens, além de gerarem benefícios ambientais pois, são biodegradáveis, o que as tornam ecologicamente mais viáveis (MUSSATO et al., 2007; PEZZELLA et al., 2014; TAVARES, 2006). Elas são de grande interesse industrial: a) porque podem ser obtidas de forma facilitada através da biotecnologia; b) por apresentarem ação específica ou inespecífica; c) por apresentarem menor consumo energético e maior velocidade de reação; d) por proporcionarem redução dos custos de laboratório, assim como de maquinário e, em consequência, melhorias dos processos em que estão envolvidas (MUSSATO et al., 2007).

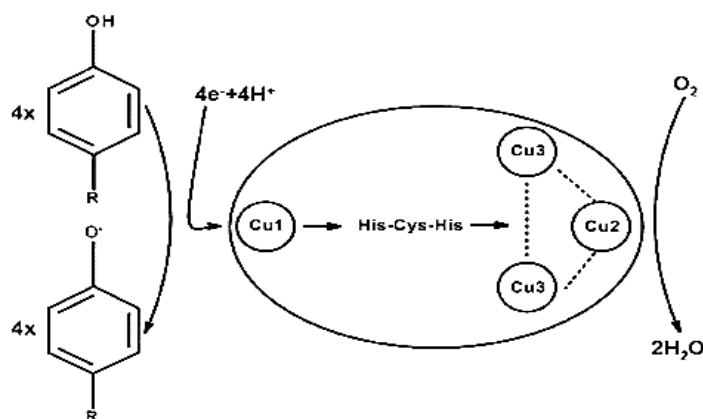
E dentre as enzimas de interesse está a lacase, que pode ser utilizada para fins industriais e/ou processos de biorremediação (MAJEAU; BRAR; TYAGI, 2010; TAVARES, 2006).

A lacase é uma glicoproteína com, em média, 500 a 550 aminoácidos que apresenta massa molecular entre 50 e 130 kDa, cujo componente de carboidratos é composto essencialmente por manose, N-acetilglicosamina e galactose. As quantidades de carboidratos nesta enzima variam entre diferentes fungos e parece ser responsável pela estabilidade da proteína e pela proteção contra proteólise e ação de radicais livres (MOROZOVA et al., 2007; VALLE, 2012).

A enzima lacase ou para-difenol (EC 1.10.3.2) pertence à classe das oxidoredutases e à subclasse das oxidases, contém cobre e utiliza a capacidade redox dos íons de cobre para catalisar a redução de oxigênio molecular à água, por possuir afinidade específica com o oxigênio molecular como seu aceptor de elétrons. Uma das suas características marcantes é sua baixa especificidade em relação aos seus substratos redutores, basicamente qualquer substrato com características semelhantes a um p-difenol será oxidado por lacases. Pelo menos algumas das lacases fúngicas também podem oxidar monofenóis e têm a capacidade para oxidar compostos não fenólicos sob certas condições, além de poderem atuar na ausência das enzimas manganês peroxidase e lignina peroxidase (BOURBONNAIS; PAICE, 1990; MAYER; STAPLES, 2002; SHAH; NERUD, 2002; THURSTON, 1994).

O ciclo da lacase se resume basicamente na redução da lacase nativa através dos seus centros catalíticos (4 átomos de Cu com estado de oxidação +2). No processo de oxidação desta reação ocorre a redução do cobre tipo 1 ( $\text{Cu}^{2+}$  à  $\text{Cu}^{1+}$ ) pelo substrato e transferência interna de elétrons acontecem do sítio catalítico tipo 1 para os demais sítios catalíticos (tipo 2 e 3) até a completa redução de todos os sítios. Posteriormente, acontece a redução do  $\text{O}_2$ , formando água para retomar novamente o ciclo permitindo, assim, que a enzima atue de forma cíclica e que o centro catalítico tipo 1 sempre esteja pronto para promover a oxidação de um novo substrato como mostrado na Figura 1 (AGUIAR; FERRAZ, 2011; BOLLAG, 2010; COLE et al., 1990; GIANFREDA; XU; VILLELA, 2006).

**Figura 1** - Ciclo catalítico da lacase.



Fonte: JAVED et al. (2017).

Além de ser utilizada em vários ramos industriais, tais como no setor de alimentos (LETTERA et al., 2015), indústria de papel e celulose (MONSSEF; HASSAN; RAMADAN, 2016), indústrias têxteis (IRACHETA-CÁRDENAS et al., 2016), as lacases têm atraído interesse crescente, por sua utilização bem sucedida, em processos de biorremediação, particularmente em tratamento de descoloração, por conta da semelhança estrutural de muitos corantes têxteis com os substratos naturais da lacase, por exemplo a lignina (BOLLAG; SHUTTLEWORTH; ANDERSON, 1988; YUAN et al., 2016).

## 2.2 Fungos produtores de lacase

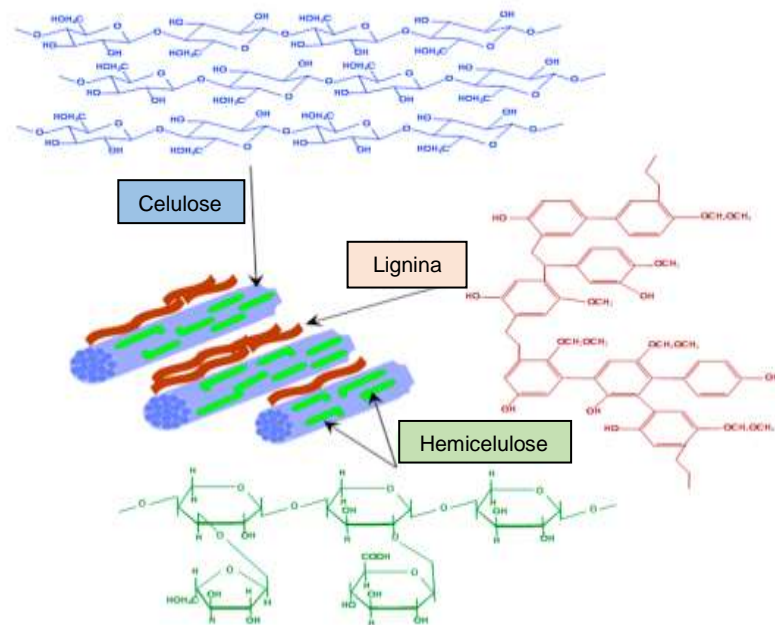
As lacases são amplamente distribuídas na natureza, encontradas em plantas, insetos, bactérias e, principalmente, em fungos basidiomicetos (MAJEAU; BRAR; TYAGI, 2010; MAYER; STAPLES, 2002; MIKOLASCH; SCHAUER, 2009; MOROZOVA et al., 2007; THURSTON, 1994; VALLE, 2012).

Os fungos basidiomicetos, conhecidos também por fungos lignocelulolíticos ou lignolíticos, se desenvolvem principalmente sobre a madeira em decomposição e outros resíduos de origem vegetal. São importantes decompositores e responsáveis pela reciclagem do carbono nos ecossistemas, degradando os componentes estruturais da madeira, a partir dos quais obtém energia para o seu crescimento e reprodução. Conseqüentemente, causam a podridão branca na madeira e este termo está relacionado a aparência de cor branca frequentemente, observada na madeira atacada por esses fungos que degradam esses

constituintes estruturais a dióxido de carbono, água e resíduos húmicos (BUTLER; MASON, 1997; ERIKSSON, 1990; HATAKKA, 1994; MAYER; STAPLES, 2002; MELO; AZEVEDO, 1997; PERALTA et al., 2016; YU et al., 2013).

Dentre os componentes estruturais básicos da madeira ou do material lignocelulósico, ou lignolítico, está a celulose, hemicelulose e a lignina, além de xilose, arabinose, manose e ramnose. Dentre os três constituintes, a lignina destaca-se pela sua recalcitrância, ou seja, é um polímero de difícil degradação por conta da sua composição, que confere, assim, proteção contra o ataque de alguns micro-organismos e ação de certas enzimas como mostrado na Figura 2 (HARTLEY; FORD, 1989; GARROTE; DOMÍNGUEZ; PARAJÓ, 1999; PERALTA et al., 2016; SÁNCHEZ, 2009).

**Figura 2** - Principais constituintes dos materiais lignocelulósicos.



**Fonte:** PERALTA et al. (2016).

Os micro-organismos que conseguem degradar a lignina são os fungos de decomposição branca. Estes conseguem tal feito através de suas enzimas extracelulares, incluindo a lacase, que oxidam os compostos estruturais da lignina (AGUIAR, 2006; CONCEIÇÃO, 2010; ERIKSSON, 1990; TAVARES, 2006; YUAN et al., 2016).

E a elucidação do mecanismo de degradação da lignina contribuiu para o desenvolvimento de várias pesquisas com fungos de degradação branca, a fim de avaliar a sua



capacidade de degradar outros compostos com característica recalcitrante (BOLLAG; SHUTTLEWORTH; ANDERSON, 1988; MAYER; STAPLES, 2002; MELO; AZEVEDO, 1997; YUAN et al., 2016).

Os micro-organismos que são particularmente empregados em bioprocessos em estado sólido são os fungos basidiomicetos (FARINAS, 2015; PANDEY; SOCCOL, 1998), pois são capazes de degradar a estrutura da lignina, presente nos resíduos lignolíticos comumente utilizados nesses bioprocessos (RAVINDRAN; JAISWAL, 2016). E uma vez que a FES simula seu *habitat* natural eles são capazes de produzir altas quantidades de enzimas (FARINAS, 2015; RAVINDRAN; JAISWAL, 2016).

No entanto, não apenas as particularidades do fungo, mas também a natureza do material lignocelulósico são fatores muito importantes que determinam a expressão do potencial enzimático dos fungos (PACKIYAM; RAGUNATHAN, 2013).

Um basidiomiceto bastante relatado em FES é do gênero *Pleurotus*. KARP et al., (2015), cultivaram *P. ostreatus* em bagaço de cana-de-açúcar e obtiveram 151,6 (U/g) de lacase em 5 dias. SANTOS (2016), ao cultivar a mesma espécie em casca de tucumã conseguiu a produção de 21766,82 U/Kg da mesma enzima em 30 dias. AKPINAR e UREK (2017), cultivaram *Pleurotus eryngii* com resíduos de pêsego e alcançaram a produção da lacase de 2193,06 U/L, em 17 dias. *Pleurotus nebrodensis* foi cultivado em palha de trigo por 6 dias e produziu 145,10 U/mL (ASLAM et al., 2016). Figura 3.

**Figura 3** – Fungo basidiomiceto do gênero *Pleurotus*.



**Fonte:** SANTOS (2016).

### 2.3. *Composto recalcitrante*

O crescimento dos centros urbanos, das indústrias, da agricultura tem contribuído para a contaminação dos solos e dos corpos d'água, através da exposição de diversos compostos orgânicos sintéticos, conhecidos como xenobióticos por serem estranhos aos seres vivos. Assim, esses compostos são acumulados rotineiramente, de forma a desencadear impactos negativos ao meio ambiente (ABDOLALI et al., 2014; BORGES et al., 2016; BROWN, 2000; DUBUS; HOLLIS; KUSTER et al., 2009; MELO; AZEVEDO, 1997).

#### 2.3.1. *Corante sintético*

Desde a descoberta do corante sintético em 1856, por William Henry Perkin, a sua produção vem aumentando a cada ano. Só no final do século XIX, foram desenvolvidos e fabricados 10.000 novos corantes sintéticos (WESENBERG; KYRIAKIDES; AGATHOS, 2003).

As indústrias desse ramo podem ser divididas em duas grandes áreas: as de pigmentos, substâncias inorgânicas ou orgânicas insolúveis em água que geralmente são aplicadas ao substrato que devem colorir em um processo não aquoso. E a outra área é a dos corantes, substâncias orgânicas solúveis em água (BROWN, 1987; CHIOU; LI, 2002). De maneira geral, os termos corante e pigmento são utilizados para designar substâncias que conferem cor (CARVALHO, 2004).

Indústrias de couros, têxteis, plásticos, papéis e outras, utilizam frequentemente corantes sintéticos para colorir seus produtos finais (CHIOU; LI, 2002; GUIVARCH et al., 2003). Sendo que as principais indústrias a utilizar os corantes sintéticos são as do setor têxtil, uma das principais indústrias do mundo, que geram grandes volumes de águas residuais decorrentes dos seus vários processos de tingimento. Onde são utilizados aproximadamente de 200 a 400 litros de água para produzir 1 kg de tecido (BIBI; BHATTI, 2012; GUIVARCH et al., 2003; ROBINSON; CHANDRAN; NIGAM, 2001; SINGH; CHADHA, 2016; YUAN, et al., 2016).

Estima-se que 10 a 20% dos corantes sejam descartados nas águas residuais das indústrias têxteis em consequência de perdas durante o processo de fixação aos tecidos (CATANHO; MALPASS; MOTHEO, 2006). Normalmente esses corantes passam inalterados pelos sistemas de tratamento convencionais de esgotos e voltam para os cursos d'água

(BROWN, 1987; FU; VIRARAGHAVAN, 2001; WILLMOTT; GUTHRIE; NELSON, 1998). Essa inalteração ocorre por conta de suas estruturas complexas, projetadas a resistir à exposição ao suor, à luz, à água, agentes oxidantes, e como resultado se tornam muito estáveis e difíceis de degradar (GUTHRIE; NELSON, 1998; NIGAM et al., 2000; WILLMOTT).

E a presença dos corantes sintéticos na água é potencialmente prejudicial aos seres vivos, pois estes apresentam propriedades mutagênicas, cancerígenas, entre outros (JOACHIM; BURRELL; ANDERSEN, 1985; SINGH; CHADHA, 2016). Além de serem prejudiciais ao meio ambiente, causando eutrofização, poluição estética, entre outros (LACHHEB et al., 2002).

Os corantes são perceptíveis mesmo em pequenas quantidades nos corpos d'água, uma concentração de 1 mg/L, aproximadamente, é suficiente para detectá-los visualmente (BANAT et al., 1996; CAMPOS et al., 2001; CHUNG; STEVENS, 2006; GUARATINI; ZANONI, 1999; GUIVARCH et al., 2003). A coloração das águas também pode afetar os processos fotossintéticos e a solubilidade dos gases na água (ARSLAN; BALCIOĞLU; BAHNEMANN, 2000).

No ano 2000, já existiam mais de 100.000 corantes disponíveis comercialmente. E essa variedade justifica-se pelo fato de que cada fibra a ser colorida necessita de corante com características específicas (GUARATINI; ZANONI, 1999; NIGAM et al., 2000). Os corantes possuem dois grupos responsáveis por suas propriedades únicas: um é o grupo cromóforo (KUNZ et al., 2002), responsável pela cor (ROSA, 2010) e o outro grupo é responsável pela fixação do corante no tecido (ALCANTARA; DALVIN, 1996; GUARATINI; ZANONI, 1999; WESENBERG; KYRIAKIDES; AGATHOS, 2003).

Existe uma diversidade de grupos cromóforos utilizados para sintetizar corantes, sendo que a distinção entre eles se baseia no tipo de grupos funcionais conjugados. Dentre eles estão os nitrofenol, nitrosofenol, trifenilmetano, antraquinona, ftalocianina, vinilsulfônico, pirimidina e triazina, mas os principais grupos são os azos e as antraquinonas. (CARREIRA, 2009; KUNZ et al., 2002; TWARDOKUS, 2004; VANDEVIVERE; BIANCHI; VERSTRAETE, 1998).

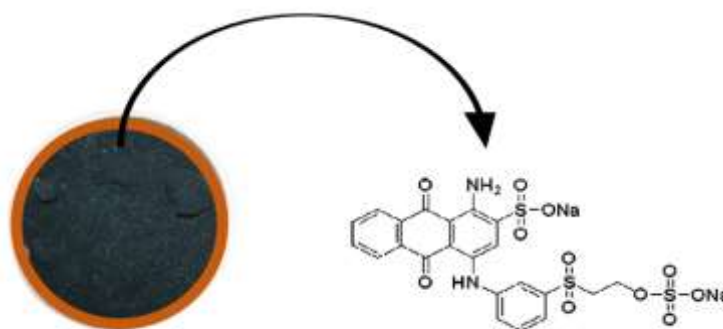
E de acordo com o modo de fixação têm-se os grupos dos corantes classificados como diretos, azóicos, ácidos, à cuba, de enxofre, dispersivos, pré-metalizados, branqueadores e os reativos (ALCANTARA; DALVIN, 1996; GUARATINI; ZANONI, 1999).

Os corantes reativos são solúveis em água e os principais corantes desta classe contêm cromóforos com funções azo e antraquinona e grupos reativos, eletrófilo, como clorotriazinila e sulfatoetilsulfonila. Dentre eles, os que possuem a base de antraquinona são considerados mais resistentes, devido a sua composição apresentar estruturas de anéis aromáticos fundidos que mantêm a cor por longos períodos de tempo em corpos d'água (ALCANTARA; DALTIM, 1996; GUARATINI; ZANONI, 1999; NIGAM et al., 2000) . Eles também favorecem a obtenção de todas as tonalidades, inclusive as colorações mais brilhantes (ALCANTARA; DALTIM, 1996).

Esses corantes são aplicados às fibras através de ligações covalentes entre grupos reativos presentes em suas estruturas e os grupos das fibras celulósicas (R-OH), ou com grupos das fibras proteicas (R-NH<sub>2</sub>, R-OH e R-SH) ou com grupos das poliamidas (R-NH<sub>2</sub>) (ALCANTARA; DALTIM, 1996; BERGAMINI; OLIVEIRA; ZANONI, 2005; GUARATINI; ZANONI, 1999; TWARDOKUS, 2004). Este tipo de ligação química estabelecido entre a fibra e o grupo reativo do corante, confere maior estabilidade a cor do tecido tingido quando comparado a outros tipos de corantes (BERTAZZOLI; PELEGRINI, 2002; TWARDOKUS, 2004).

Dentre os corantes reativos comumente utilizados nas indústrias têxteis para tingir fibras celulósicas está o Remazol Brilliant Blue R (RBBR), também conhecido como Reactive Blue 19. É um corante de vinilsulfona a base de antraquinona, derivado do antraceno, hidrocarboneto aromático policíclico, geralmente utilizado como material de partida na produção de corantes poliméricos cuja estrutura é mostrada na Figura 4 (HADIBARATA; YUSOFF; KRISTANTI, 2012; SING et al., 2017; SINGH; CHADHA, 2016; SOARES; AMORIM; COSTA-FERREIRA, 2001).

**Figura 4** - Estrutura química do corante Remazol Brilliant Blue-R (RBBR).



Fonte: Adaptado de BIBI e BHATTI ( 2012).

O RBBR representa uma importante classe de poluentes orgânicos tóxicos e recalcitrantes, por conta de sua estrutura química complexa e estável. E quando liberado sem tratamento adequado pode persistir por anos no meio ambiente (BROWN, 1987; CHIOU; LI, 2002; SING et al., 2017; SINGH; CHADHA, 2016; SOARES; AMORIM; COSTA-FERREIRA, 2001). O clássico trabalho de WEBER e STICKNEY (1993), demonstrou que a vida média para a degradação de RBBR no meio ambiente, a pH 7, típico de águas naturais, a 25°C, é de aproximadamente 46 anos.

Logo, corantes em águas residuais devem ser tratados antes de serem lançados no meio ambiente. E as técnicas a partir de tratamento biológico tem demonstrado ser uma solução eficaz e com custos consideráveis, onde as lacases dos fungos de decomposição branca demonstram ser eficientes na remoção de corantes têxteis (SING et al., 2017; YUAN et al., 2016; ZHUO et al., 2016).

#### *2.4. Bioprocesso em estado sólido*

A fermentação é uma das mais antigas tecnologias utilizadas no mundo, onde quase todos os processos de fermentação se baseavam no princípio da fermentação em estado sólido (FES) (FARINAS, 2015; PANDEY, 2003; PEREIRA; SOCCOL; SOCCOL, 2016). No processo de fermentação são empregados micro-organismos para a produção de produtos de interesse (FARINAS, 2015).

A FES oferece vantagens como baixo consumo de energia, menor produção de efluentes e benefícios ecologicamente adequados, como a redução de resíduos agroindustriais em locais inadequados (SOCCOL; VANDENBERGHE, 2003). Sendo que os extratos enzimáticos extraídos desse tipo de bioprocessos apresentam boa qualidade (MARTINS et al., 2011; RAVINDRAN; JAISWAL, 2016).

Opta-se em utilizar a FES, dentre outros motivos, por conta de seus custos operacionais reduzidos quando comparados aos da fermentação submersa (RAVINDRAN; JAISWAL, 2016), somado a agregação de valor dos resíduos agroindustriais utilizados como substrato. Podendo, a FES, ser utilizada a) de modo que o resíduo agroindustrial possa ser utilizado como fonte de carbono, energia; b) ou utilizada como suporte sólido inerte (PANDEY et al., 2000).

Este tipo de fermentação possui a característica do micro-organismo se desenvolver em materiais sólidos em que não há água na forma livre, mas o meio de cultivo deve conter umidade suficiente para suportar o seu crescimento (PANDEY, 1992).

Muitas enzimas produzidas foram descritas a partir da FES, empregando condições operacionais específicas ou variando uma condição por vez (FARINAS, 2015). E a otimização deste processo, de produção enzimática, se torna necessária para aumentar a sua obtenção com características constantes e uniformes. Algumas variáveis operacionais são importantes para o processo de otimização, como a escolha do micro-organismo específico, a seleção do substrato, umidade, temperatura, pH e tempo de cultivo (FARINAS, 2015; PACKIYAM; RAGUNATHAN, 2013; PANDEY, 2003; RAVINDRAN; JAISWAL, 2016; SINGHANIA et al., 2010; SOCCOL; VANDENBERGHE, 2003).

#### 2.4.1. Resíduo agroindustrial

Na FES comumente utilizam-se materiais de origem agroindustrial, por serem abundantes, facilmente disponíveis, ricos em carbono e normalmente subutilizados (FARINAS, 2015; PANDEY et al., 2000). E no Brasil o emprego dos resíduos agroindustriais é favorecido, uma vez que o país possui a agricultura como principal atividade agrícola, disponibilizando grandes quantidades desses tipos de resíduos (PANDEY, 2003).

Na produção comercial das enzimas, quase 28% dos custos operacionais são voltados para a aquisição de matéria-prima (KLEIN-MARCUSCHAMER et al., 2012). E para tentar baratear os custos de produção enzimática, várias pesquisas são voltadas para utilizar resíduos agroindustriais como matéria-prima para a sua produção. E a utilização de resíduos subutilizados, da área agroindustrial, como substrato para processos fermentativos contribui para a produção de produtos com valor agregado como enzimas, etanol, aminoácidos, entre outros (GASSARA et al., 2010; PANDEY et al., 2000; RAVINDRAN; JAISWAL, 2016).

E um dos resíduos agroindustriais subutilizados na região Norte é a casca do tucumã, que é uma fruta proveniente de uma palmeira conhecida como tucumanzeiro. São conhecidas duas espécies de tucumã: a) *Astrocaryum vulgare* Martius comumente encontrada na região de Belém, no estado do Pará e b) *Astrocaryum aculeatum* Meyer, encontrada no estado do Amazonas, com demanda firmada e crescente na cidade de Manaus (CLEMENT; LLERAS; VAN, 2005).

Em média, um tucumanzeiro pode produzir, aproximadamente, 750 frutos (SHANLEY; MEDINA, 2005). O tucumã possui teor vitamínico até três vezes maior quando comparado com a cenoura, e até noventa vezes maior ao ser comparado com o abacate (ARAGÃO, 2013; CAVALCANTE, 1974; SHANLEY; MEDINA, 2005). Além de ser um ótimo produtor de carotenoides ( $\beta$  caroteno) (RODRIGUEZ-AMAYA, 1996).

Do fruto, a polpa é a mais utilizada para diversas finalidades, sendo geralmente consumida *in natura* acompanhada de café, farinha de mandioca, pão, tapioca. Mas também pode ser consumida em forma de sucos ou sorvete. Atualmente na cidade de Manaus, a polpa do tucumã é incluída em alguns preparos alimentícios, como pizzas e sushis, dando um toque regional a estes alimentos (CANTO, 2016; DIDONET; FERRAZ, 2014).

Em 2014 foram comercializadas, aproximadamente, 367,8 t de tucumã nas feiras e mercados da cidade de Manaus. E apesar da exploração do fruto, da polpa e seus derivados representar uma atividade econômica significativa, esta é fundamentada quase totalmente na exploração extrativista e em uma cadeia de comércio informal. Deste modo, os frutos e a polpa, raramente são comercializados em supermercados, sendo encontrados, geralmente, em mercados municipais, feiras livres ou a partir de vendedores ambulantes nas ruas da capital amazonense (CANTO, 2016; DIDONET; FERRAZ, 2014; RUFINO et al., 2015).

As cascas e sementes são geralmente resíduos subutilizados, não são aproveitados em todo o seu potencial. E, desta forma, contribuem para a poluição ambiental e visual dos mercados, das feiras e ruas, principalmente, da cidade de Manaus (AGUIAR, 2016; DIDONET; FERRAZ, 2014).

Mas uma pesquisa realizada por SANTOS, (2016), demonstrou que as cascas de tucumã podem ser reaproveitadas, de forma a minimizar os impactos negativos no meio ambiente, uma vez que estas apresentaram potencial como substrato em FES para produção de lacase a partir de *P. ostreatus*.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral

Utilizar casca de tucumã (*Astrocaryum aculeatum* Meyer) como substrato para a produção de lacase por *Pleurotus ostreatus* LM 6226 para remover um corante têxtil.

#### 3.2 Objetivos específicos

- Avaliar a influência de fatores limitantes (como iluminação, temperatura, quantidade de inóculo, métodos de suplementação e indução) na produção de lacase por *P. ostreatus* LM 6226.
- Determinar o pH e temperatura ótimos para atividade de lacase.
- Verificar a estabilidade da atividade da lacase frente a mudanças de pH e temperatura.
- Averiguar a remoção de um corante têxtil pela lacase de *P. ostreatus* LM 6226.



**CAPÍTULO I**

**Cascas do fruto de tucumã (*Astrocaryum aculeatum* Meyer)  
como substrato para produção de lacase por *Pleurotus*  
*ostreatus* LM 6226 para remoção de corante têxtil**

#### 4. RESULTADOS

Os resultados do presente trabalho estão apresentados no formato de artigo que será submetido a publicação na revista **International Journal of Microbiology**.

#### **Casca do fruto de *Astrocaryum aculeatum* Meyer como substrato para produção de lacase por *Pleurotus ostreatus* LM 6226 para remoção de corante têxtil**

Tayana Jessie Suwa Mesquita de Souza<sup>1</sup>, Ralyvan Araújo dos Santos<sup>1</sup>; Ana Cláudia Cortez<sup>3</sup>, Rodrigo Ribeiro Cruz Santos<sup>3</sup>, João Vicente Braga de Souza<sup>3</sup>, Érica Simplício de Souza<sup>1,2\*</sup>.

<sup>1</sup>*Programa de Pós-graduação em Biotecnologia e Recursos Naturais, Universidade do Estado do Amazonas, Amazonas 69065-001, Brasil.*

<sup>1,2</sup>*Departamento em Engenharia Química, Escola de Tecnologia Superior, Universidade do Estado do Amazonas, Amazonas 69050-020, Brasil.*

<sup>3</sup>*Laboratório de Micologia, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Amazonas 69080-97, Brasil.*

\* Érica Simplício de Souza

E-mail: ericasimpliciosouza@yahoo.com.br

#### **RESUMO**

A enzima lacase é utilizada em diversos ramos de aplicações industriais e biotecnológicas. *Pleurotus ostreatus* é um conhecido bom produtor de lacases. Atualmente, são necessários estudos que investiguem a redução de custos dos bioprocessos, incluindo como estratégia o uso de resíduos como substrato para bioprocessos em estado sólido. No estado do Amazonas, há um grande consumo do fruto de tucumã (*Astrocaryum aculeatum* Meyer), e conseqüente descarte das cascas do fruto. O presente trabalho investigou a utilização de casca do fruto de *A. aculeatum* como substrato para produção de lacase em bioprocessos em estado sólido com *P. ostreatus* LM 6226. O bioprocessos foi realizado em frascos Erlenmeyer (125 mL) contendo 15 g de meio de cultivo (cascas de tucumã, umidade de 70%). O inóculo foi realizado transferindo-se 10 plugs (5 mm  $\phi$ ) de micélio retirados de placas de BDA previamente incubadas (120 horas). As culturas foram mantidas em condição estática, à 25°C, por 15 dias. Ensaio univariados foram realizados para avaliar a influência dos fatores: a) Temperatura de crescimento, b) Tamanho de inóculo, c) % de umidade, d) suplementação com farelo de trigo,

e) presença de  $\text{CuSO}_4$  e f) Regime de iluminação. Uma cinética foi realizada nas condições estabelecidas nos ensaios univariados. Em adição, foi investigada a influência de temperatura, pH e estabilidade das lacases. Por fim, foi investigado o potencial da enzima produzida na remoção de cor (% redução de Abs a 595 nm) de uma solução de Remazol Brilliant Blue-R (RBBR) (200 mg/L). As condições ótimas para a produção de lacases utilizando a casca do fruto de *A. aculeatum* como substrato foram: temperatura de 25°C, inóculo de 10 plugs por cultivo, 70% de umidade e incubação em iluminação ambiental. A presença de farelo de trigo e sulfato de cobre não apresentaram influência na produção da enzima. O estudo quanto a cinética de produção das lacases demonstrou que no 10º dia do bioprocessamento foram observadas as atividades máximas da enzima. A investigação quanto a temperatura e pH ótimos revelou enzimas com pH ótimo de 5 e temperaturas ótimas entre 25-50 °C. Os estudos de estabilidade da enzima demonstraram lacases com atividade residual >85% quando incubadas por 24 em pH entre 5-6 e atividade residual >75% quando incubadas por 70 min em temperaturas entre 25-30°C. O ensaio de remoção de cor de uma solução de RBBR apresentou taxas de remoção relativa de até 20% da  $\text{Abs}_{(595 \text{ nm})/\text{h}}$ .

**Palavras-chave:** Resíduo agroindustrial. Bioprocessamento em estado sólido. Basidiomicetos. Enzima. Corante.

## 1 INTRODUÇÃO

As lacases são enzimas multicobre, que podem catalisar uma variedade de reações envolvendo a oxidação de elétrons dos substratos e são encontradas, principalmente, em fungos basidiomicetos [1]. Essas enzimas oxidativas são empregadas em uma variedade de setores industriais mundiais, assim como, em processos de biorremediação, uma vez que, são consideradas ecológicas por envolver oxigênio molecular como acceptor final de elétrons e, assim, produz água como subproduto [2–5]. E junto com outras enzimas de interesse industrial, movimentam anualmente bilhões de dólares [6].

Na produção comercial de enzimas, incluindo lacases, quase 28% dos custos operacionais são voltados para a aquisição de matéria-prima, tornando as enzimas comercialmente caras [7]. Apesar do mercado brasileiro ser considerado pouco representativo, revela grande potencial, uma vez que, é um país agrícola, que gera grandes volumes de resíduos agroindustriais. Logo, a redução nos custos de produção de enzimas é favorecida,

através da utilização dos subprodutos agrícolas como matéria-prima [8,9]. A utilização desses resíduos agrícolas é bem empregada na fermentação em estado sólido, já que estes simulam o *habitat* natural dos fungos basidiomicetos, estimulando-os a produzir altas quantidades de enzima lacase [10–12].

Poucos trabalhos foram desenvolvidos descrevendo a produção de lacase por basidiomicetos a partir de resíduos agroindustriais de origem Amazônica. Dentre essas pesquisas, deve-se destacar o trabalho desenvolvido por Santos, que demonstrou ser possível utilizar resíduos agroindustriais da região como substratos para produção de lacase, com destaque para casca do fruto de *Astrocaryum aculeatum* Meyer, conhecido popularmente como tucumã [13].

O objetivo deste trabalho foi investigar o potencial de cascas do fruto de tucumã (*Astrocaryum aculeatum* Meyer) como substrato em fermentação em estado sólido para produção de lacase por *P. ostreatus* LM 6226.

## 2 METODOLOGIA

### 2.1 Micro-organismo

Nesse estudo foi utilizado o basidiomiceto *Pleurotus ostreatus* 154 obtido comercialmente por meio da empresa "Cogumelo Hobby (Jundiaí - São Paulo - Brasil)", empresa especializada na comercialização de cepas de fungos para fins médicos e alimentícios. Atualmente, a linhagem está depositada na Coleção de Micro-organismos do INPA sob o número LM 6226.

### 2.2 Resíduo Agroindustrial

As cascas de tucumã do Amazonas (fruto de *Astrocaryum aculeatum* Meyer) foram coletadas na feira do Coroadó, na cidade de Manaus-AM, entre os meses de janeiro a julho de 2017. As amostras foram limpas e secas (80°C até peso constante), trituradas (moinho de cereais) e padronizadas quanto a granulometria (3-5 mm).

### 2.3 Bioprocesso em estado sólido

O bioprocesso foi realizado em frascos Erlenmeyer (125 mL) contendo 15 g de meio de cultivo (cascas de tucumã, umidade inicial de 70%). Os frascos foram autoclavados (120 °C, 15 minutos). O inóculo foi realizado transferindo-se 10 plugs (5 mm  $\phi$ ) de micélio retirado de placas de BDA previamente incubadas (120 horas). As culturas foram mantidas à 25°C, por 15 dias.

Tomando como base o bioprocesso descrito no parágrafo anterior, ensaios univariados foram realizados para avaliar a influência da: a) Temperatura de crescimento (5, 25, 35 e 45°C), b) Tamanho de inóculo (1, 5, 10 e 20 Plug/ensaio) c) % de umidade inicial (50, 60, 70 e 80 %) d) Suplementação com farelo de trigo (0; 1; 2,5 e 5 g) e) Suplementação com sulfato de cobre (0; 0,5; 1 e 2 mM) f) Regime de iluminação (Sem iluminação ou com lux por 12 horas).

#### *2. 4 Determinação da atividade enzimática*

Após o período de cultivo, a extração enzimática foi realizada transferindo-se 1g de meio do bioprocesso para um tubo com tampa descartável (15 mL) contendo 9 mL de tampão citrato fosfato (50 mM, pH 5). A mistura foi incubada (tubo na vertical) sob agitação orbital (100 rpm) por uma hora. Após esse período, a mistura foi centrifugada (10.000 G por 15 min, 4°C) e o sobrenadante foi usado para a quantificação enzimática.

A atividade de lacase foi medida utilizando como substrato a siringaldazina [14]. A solução reativa consistiu de tampão citrato-fosfato a 50 mM, pH 5,0 (0,80 mL), solução de 1mM de siringaldazina (0,1 mL) e solução enzimática bruta (0,1 mL). A oxidação da siringaldazina foi acompanhada pelo aumento da absorbância a 525 nm ( $\epsilon=65,000\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ), de 10 em 10 segundos durante 1 minuto. Nas condições experimentais, uma unidade internacional de atividade enzimática (UI) foi definida como a quantidade de enzima requerida para produzir 1  $\mu\text{mol}$  de produto/minuto.

#### *2. 5 Cinética de produção enzimática*

O bioprocesso com as melhores condições, anteriormente descritas de cultivo para produção de lacase foi realizado no total de 30 dias. E as culturas foram interrompidas a cada

cinco dias para análise enzimática de lacase. As lacases produzidas no 10º dia desse experimento foram utilizadas nos demais ensaios descritos a seguir.

### *2. 6 pH e temperatura ótimos das lacases produzidas*

Para determinação do pH ótimo, foi usada a metodologia descrita para quantificação das lacases, porém variando-se os tampões utilizados na quantificação enzimática. Foram utilizados os seguintes tampões: a) Citrato (50 mM), pH 3, 4 e 5; b) Fosfato de sódio (50 mM) pH 6 e 7 e c) o Tris-HCl (50 mM) pH 8 e 9.

Para determinação da temperatura ótima também foi usada a metodologia já descrita para quantificação das lacases, porém variando-se as temperaturas de incubação. As temperaturas investigadas foram 25, 30, 40, 50, 60, 70 e 80 °C.

### *2. 7 Influência do pH e temperatura na estabilidade das lacases produzidas*

A estabilidade em diferentes pH foi avaliada incubando-se as lacases em diferentes tampões a) Citrato-fosfato (50 mM), pH 3, 4 e 5; b) Fosfato de sódio para 50 mM) pH 6 e 7 e c) o Tris-HCl (50 mM) pH 8 e 9 por 24 horas, sendo que a cada 1 hora foi avaliada a atividade enzimática residual (atividade residual/ atividade inicial x 100%) utilizando-se pela metodologia previamente descrita.

A estabilidade em diferentes temperaturas foi avaliada incubando-se as lacases em diferentes temperaturas: 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80 e 90 °C por 70 minutos, sendo que a cada 10 minutos foi avaliada a atividade enzimática residual (atividade residual/ atividade inicial x 100%) utilizando-se pela metodologia previamente descrita.

### *2. 8 Remoção do composto recalcitrante com o extrato enzimático*

Para avaliar a capacidade do extrato enzimático de lacase em remover o composto recalcitrante conhecido como Remazol Brilliant Blue-R, RBBR, um corante têxtil, foi realizada uma mistura reacional contendo: RBBR (200 mg/L) em tampão com pH ótimo e o extrato enzimático (50 UI/L). A incubação ocorreu em tubos de ensaios por até 24 horas. E

após os períodos de 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 24 h foi avaliada a remoção de absorvância em 595nm ( $\lambda_{max}$ ) do RBBR em espectrofotômetro (FEMTO 600 Plus).

### 2. 9 Análise estatística

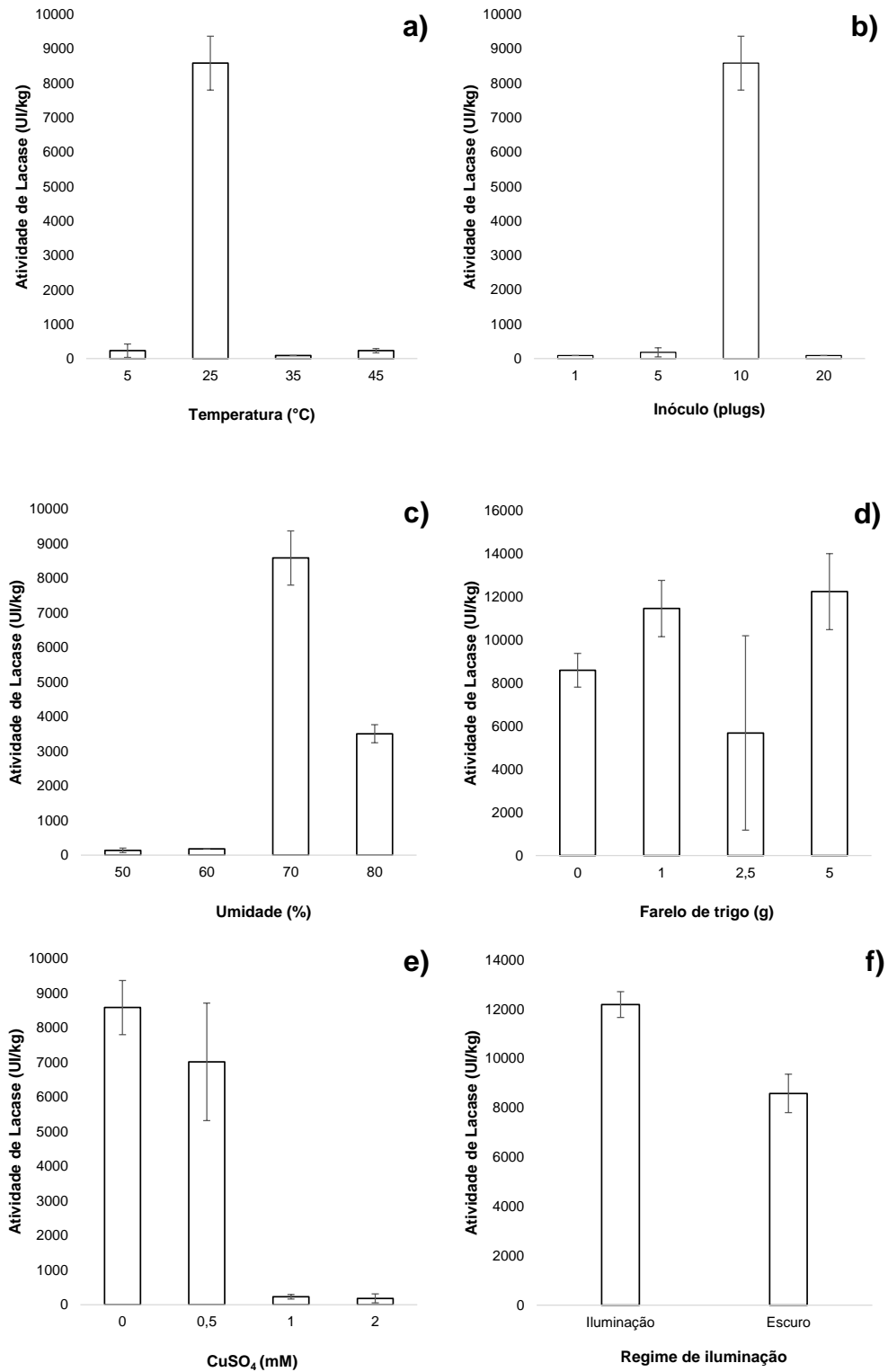
Todos os experimentos foram realizados em triplicata e foram calculados o desvio padrão e a média para cada uma das determinações realizadas. Quando necessário comparar variâncias foi utilizado teste de ANOVA suplementado pelo teste paramétrico “t”, com intervalo de confiança de 95%.

## 3 RESULTADOS

### 3. 1 Produção de lacase

A fim investigar fatores do bioprocesso em estado sólido na produção de lacase por *P. ostreatus* utilizando a casca do fruto de tucumã (*A. aculeatum* Meyer) como substrato foram realizados ensaios univariados que investigaram a influência dos fatores: a) Temperatura de crescimento, b) Tamanho de inóculo, c) % de umidade, d) Suplementação com farelo de trigo, e) Presença de  $CuSO_4$  e f) Regime de iluminação (Figura 1). As condições selecionadas para a produção de lacases utilizando a casca do fruto de *A. aculeatum* Meyer como substrato foram: temperatura de 25 °C, inóculo de 10 plugs por cultivo, 70% de umidade e incubação em iluminação ambiental. A presença de farelo de trigo e sulfato de cobre não apresentaram influência na produção da enzima.

**Figura 1- Estudo das condições de cultivo para produção de lacase por *P. ostreatus* em bioprocesso sólido com casca de tucumã (*A. aculeatum* Meyer) por 15 dias. a) umidade, b) inóculo, c) farelo de trigo, d) sulfato de cobre, e) temperatura, f) iluminação.**



Fonte: o autor (2018).

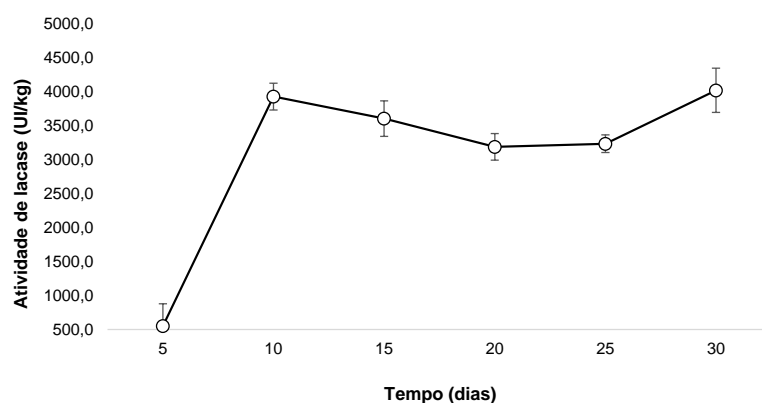
### 3. 2 Cinética de produção de lacase

Com a finalidade de estudar a produtividade do bioprocesso em estado sólido, um bioprocesso foi realizado utilizando-se dos melhores parâmetros identificados pelos



experimentos anteriores. Uma produtividade de  $392 \text{ UI/kg.dia}^{-1}$  foi obtida no 10º dia de bioprocesso. Figura 2.

**Figura 2** - Cinética de produção enzimática da lacase a partir de *P. ostreatus* LM 6226, em meio de cultivo em estado de sólido com casca do fruto de tucumã durante 30 dias.

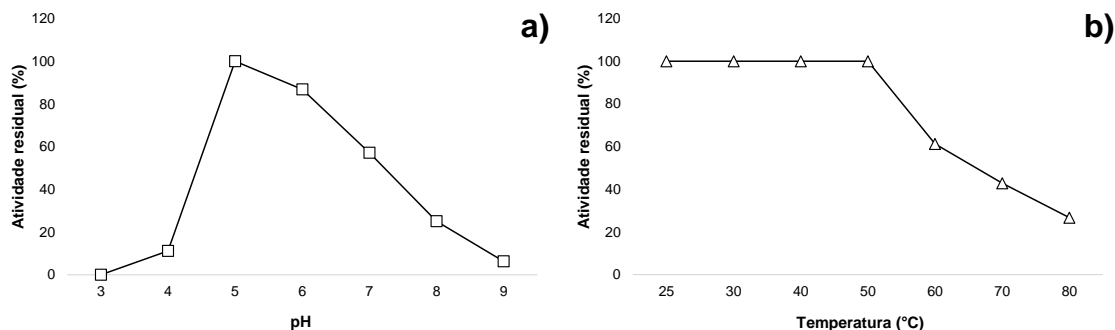


Fonte: o autor (2018).

### 3. 3 pH e temperatura ótima das lacases de *P. ostreatus* LM 6226

Com a finalidade de conhecer melhor as lacases produzidas por *P. ostreatus* LM 6226 foram realizados ensaios que investigaram o pH e temperatura ótima (Figura 3). O pH ótimo foi 5 e as temperaturas ótimas foram entre 25-50 °C. As análises para pH e temperatura foram realizadas ao final de 10 minutos.

**Figura 3** - Efeito do ótimo do pH e temperatura na atividade enzimática da lacase. a) O efeito do pH, b) E o efeito da temperatura na atividade da enzima.

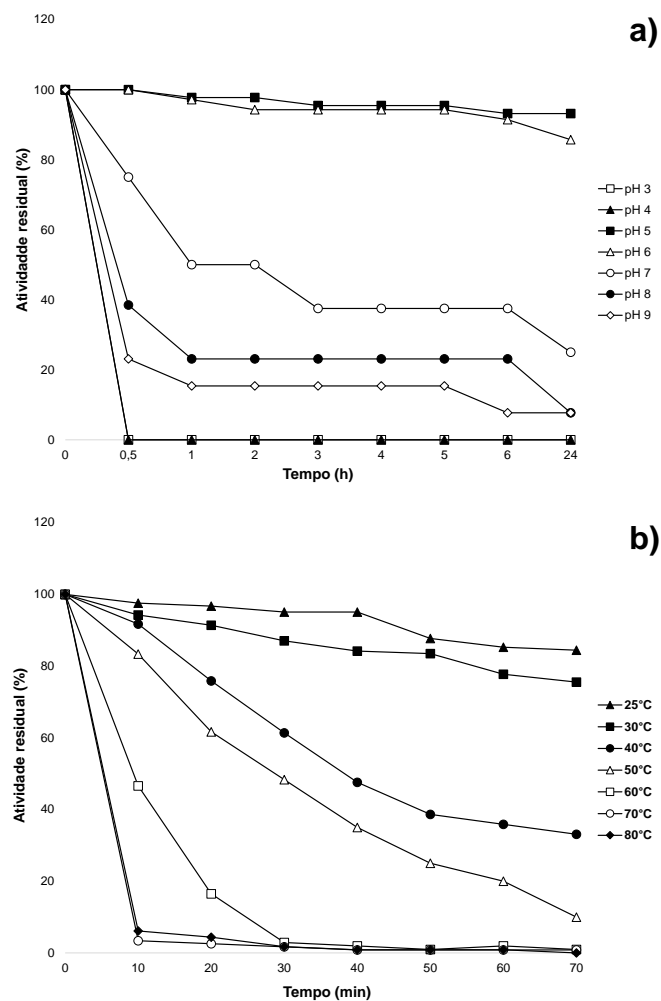


Fonte: o autor (2018).

### 3. 4 Estabilidade das lacases de *P. ostreatus* LM 6226

A fim de avaliar a influência do pH e da temperatura na estabilidade das atividades enzimáticas da lacase de *P. ostreatus* LM 6226, os extratos enzimáticos foram expostos a diferentes condições de incubação e tiveram a sua atividade residual quantificada em diferentes períodos. Os estudos de estabilidade da enzima demonstraram lacases com atividade residual >85% quando incubadas por 24 em pH entre 5-6 e atividade residual >75% quando incubadas por 70 min em temperaturas entre 25-30 °C. Figura 4.

**Figura 4** - Efeito da estabilidade do pH e temperatura na atividade da lacase. a) O efeito do pH, b) E o efeito da temperatura na atividade enzimática.



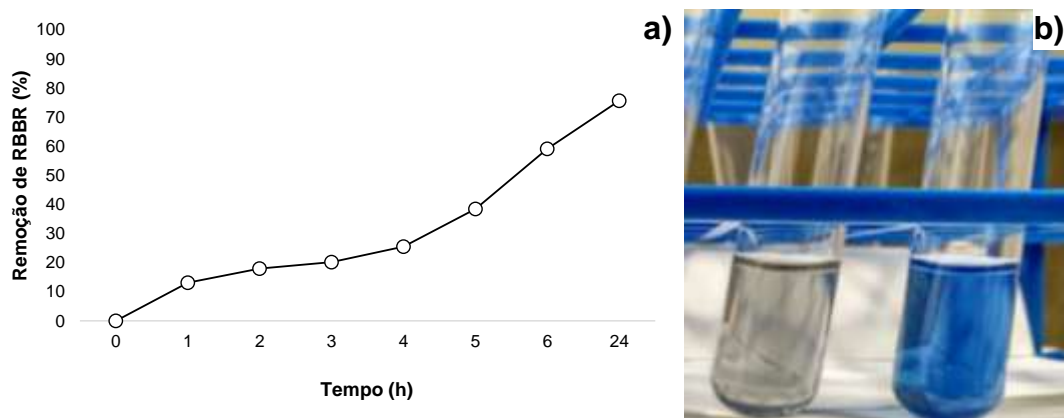
Fonte: o autor (2018).

### 3. 5 Remoção do corante têxtil Remazol Brilliant Blue-R (RBBR)

Um ensaio foi realizado para investigar a capacidade de remoção de cor (% de remoção de  $Abs_{(595\text{ nm})/h}$ ) de uma solução do corante RBBR pelas lacases produzidas (Figura

5). O ensaio de remoção de cor de uma solução de RBBR apresentou taxas de remoção relativas de até 20% da  $Abs_{(595\text{ nm})/h}$ .

**Figura 5** – Remoção do corante Remazol Brilliant Blue-R a partir do extrato enzimático de lacase de *P. ostreatus* cultivado com casca de tucumã em fermentação em estado sólido por 30 dias a) Remoção de RBBR acompanhada em espectrofotômetro, b) Remoção de RBBR ao final de 24h acompanhada através da leitura visual.



Fonte: o autor (2018).

#### 4 DISCUSSÃO

No presente trabalho, inicialmente descreveu-se as condições ótimas para a produção de lacases por *P. ostreatus* LM 6226 utilizando a casca do fruto de *A. aculeatum* como substrato em fermentação no estado sólido. Em seguida, foi definido o momento de maior produtividade enzimática. Caracterizou-se pH, temperatura e estabilidade das lacases produzidas e, por fim, foi demonstrado o potencial das lacases em oxidar e remover a cor de RBBR. Esse é o primeiro trabalho a descrever a otimização desse substrato para ser utilizado como substrato para produção de lacase por bioprocessos em estado sólido. Esse resultado é muito animador e possui uma importância regional aplicada a reutilização de resíduos que são um problema de gerenciamento urbano e a produção de uma enzima de grande valor agregado.

Segundo a Secretária Municipal de Limpeza e Serviços Públicos (Semulsp), são desperdiçados em média 95 toneladas de alimentos nas feiras da cidade de Manaus, isso inclui o descarte de resíduos agroindustriais. Então, desenvolver pesquisas que contribuam de forma a minimizar os impactos negativos causados por esses desperdícios, é promissor não somente para o campo acadêmico, mas também para a sociedade. Os resíduos agroindustriais têm sido bastante utilizados na fermentação em estado sólido como substrato porque são relativamente

baratos, facilmente disponíveis, ricos em carbono e normalmente subutilizados [10,15]. Muitas enzimas foram produzidas a partir deste tipo de fermentação, empregando condições operacionais específicas ou variando uma condição por vez [10]. No presente trabalho, cascas de tucumã foram utilizadas na produção de lacase por fermentação em estado sólido a partir de *P. ostreatus* LM 6226.

As condições ótimas para a produção de lacases utilizando a casca do fruto de *A. aculeatum* como substrato foram: temperatura de 25°C, inóculo de 10 plugs por cultivo, 70% de umidade e incubação em iluminação ambiental. Sanches, descreveu em seu trabalho que as temperaturas ideais para o crescimento de *P. ostreatus* acontece em torno de 25 a 28°C [16]. Souza, Zilly e Peralta (2002), descreveram que temperatura igual ou superior a 35°C não era adequada para o crescimento de *P. pulmonarius* [17]. A temperatura pode interferir no crescimento do microorganismo, a formação e germinação de esporos e a formação de produtos [18]. Trabalhos relatam a inoculação de fungos basidiomicetos em bioprocessos de estado sólido através de plugs miceliais, mas geralmente eles não descrevem a sua otimização [19–21]. A umidade pode influenciar os resultados da FES, de modo que a presença de alta umidade resulta na aglomeração de partículas diminuindo a porosidade, de forma a impedir difusão de oxigênio, podendo favorecer a contaminação por bactérias. Por outro lado, a baixa quantidade de umidade tende a reduzir a difusão de nutrientes, resultando em um baixo desenvolvimento, logo, um nível ótimo de umidade deve ser mantido [18,22,23]. A literatura descreveu que a faixa ideal de umidade para o cultivo de *P. ostreatus* acontece de 65 a 70% [24]. Estudo avaliou o crescimento de três basidiomicetos em resposta a diferentes regimes de luminosidade e evidenciaram que a luz foi fator importante para o desenvolvimento miceliano [25]. A presença de farelo de trigo e sulfato de cobre, no presente trabalho, não apresentaram influência na produção da enzima. Akpinar (2012), ao utilizar resíduos de uva como substrato, descreveu a importância do sulfato de cobre para o aumento da produção de lacase no 17º dia ( $\pm 1200$  U/L) a partir de *P. eryngii* [26]. Em oposição, o resíduo da casca de tucumã não necessitou de indução enzimática e apresentou significativa produção de lacase, demonstrando ser um substrato que não necessita de suplementações. Elbatal et al., (2015), também demonstraram que a suplementação com sulfato de cobre não foi uma variável significativa na produção de lacase [27]. Souza, Zilly e Peralta (2012), descreveram que temperatura igual ou superior a 35°C não era adequada para o crescimento de *P. pulmonarius* [17]. Thiribhuvanamala et al., (2017), relataram que a produção enzimática varia conforme o tipo de substrato utilizado [28].

No bioprocesso em condições otimizadas foram observados máximos na produção de lacase no 10º dia. Akpinar, utilizou como substratos resíduos de pêssego e cereja, e obteve maior produção no 17º dia (2193,06 U/L) e no 10º dia (1297,22 U/L), respectivamente, a partir do cultivo com *P. eryngii* [29]. A produção de lacase com *Trametes lactinea* foi investigada usando cascas de tucumã em fermentação submersa, e foi observada atividade enzimática máxima em 9 dias (33, 7 UI/L) [30]. A produção da enzima lacase pode depender do metabolismo primário em um determinado substrato, que muda com a composição química dos diferentes materiais lignocelulósicos [29], condições de cultivo (fermentação sólida ou submersa), da espécie e linhagens do gênero *Pleurotus*, fontes de carbono, nitrogênio [31]. Assim, é possível observar que o cultivo de *P. ostreatus* LM 6226 com casca de tucumã em fermentação em estado sólido não precisa ser prolongado para alcançar bons valores de produção enzimática de lacase.

No presente estudo, o pH ótimo de atividade enzimática da lacase foi 5. O pH ótimo 5 é comumente relatado na literatura quando utiliza-se como substrato enzimático a siringaldazina [27,32]. Uma vez que os valores ótimos de pH variam de acordo com o tipo de substrato utilizado [33]. Sendo que mudanças no pH do meio reacional podem afetar a estrutura da molécula proteica, de forma a influenciar na sua natureza catalítica [34]. Em relação a temperatura ótima, é possível observar que a enzima apresentou atividade enzimática ativa em uma extensa faixa de temperatura entre 25 e 60°C. Elbatal et al., relataram que a atividade de lacase, a partir de *P. ostreatus*, apresentava-se ativa em intervalo de temperatura entre 30 e 50°C [27]. E nos trabalhos de Liu e Elbatal et al., é possível observar a diminuição abrupta na atividade enzimática de lacase em temperatura acima de 60°C [27,35], provavelmente por acontecer a desnaturação da enzima, inibição enzimática, aceleração ou inibição na produção de um determinado metabolito, e morte celular [18]. A temperatura ideal para a atividade da lacase pode diferir muito de uma cepa para outra [36].

A enzima também foi submetida a diferentes temperaturas e pH's para avaliar a sua estabilidade em relação ao tempo. Palmieri, estudou a estabilidade térmica de três isoenzimas de lacase, a partir de *P. ostreatus*, e observou que elas apresentavam atividade máxima em uma faixa de 45 a 65°C, 50 a 60°C e de 25 a 35°C [37]. A prevenção da inativação enzimática sob condições industriais é muito importante durante sua aplicação [38].

Nas condições reacionais, foi possível observar a remoção de 59% do corante Remazol Brilliant Blue-R em apenas 6h. A utilização da lacase bruta pode ser mais econômica e rentável para a sua aplicação [39]. Trabalhos demonstram a eficiência da

remoção de corantes em 24h, incluindo RBBR, através do extrato enzimático bruto de lacase a partir de fungos basidiomicetos, com remoção de 80% [40], 67% [41], 89% [39]. Zhuou, Kim e Murugesan ao avaliarem a capacidade de descoloração a partir do extrato enzimático bruto da lacase, descreveram que o processo de descoloração acontecia, principalmente, pela presença da enzima lacase [39,42,43]. A descoloração de corante é um método simples que avalia a capacidade de degradação de substâncias aromáticas por lacase, potencializando a sua utilização em processos biotecnológicos [27,39].

Novas pesquisas voltadas a identificar e/ou conhecer melhor os resíduos agroindustriais da região Amazônica para a produção enzimática na fermentação em estado sólido devem ser realizadas. Esse tipo de estratégia pode: a) reduzir os custos durante a produção enzimática, b) minimizar os impactos negativos oriundos dos descartes inapropriados dos resíduos agroindustriais.

A crescente demanda por enzimas lacases pelo mercado internacional, demonstra a sua importância em diferentes setores industriais e em processos biotecnológicos. O presente trabalho é importante pois descreve o potencial da utilização de um resíduo regional na produção de uma enzima de interesse global. Entendendo-se a potencial importância da bioindústria para a Amazônia, trabalhos como o apresentado são estratégicos para o desenvolvimento regional e nacional.

## REFERÊNCIAS

- [1] VALLE, J. S. **Produção, identificação e caracterização molecular de lacases de *Agaricus blazei* obtidas por fermentação de resíduos agroindustriais**. Paraná, Curitiba: Tese de doutorado em Processos Biotecnológicos da Universidade Federal do Paraná, 2012.
- [2] VISWANATH, B. et al., Fungal Laccases and Their Applications in Bioremediation. **Enzyme Research**, v. 2014, p. 21, 2014.
- [3] CHEN Y, et al., Cell surface display fungal laccase as a renewable biocatalyst for degradation of persistent micropollutants bisphenol A and sulfamethoxazole Cell surface display fungal laccase as a renewable biocatalyst for degradation of persistent micropollutants. **Environmental Science & Technology**, v. 50, p. 8799-8808, 2016.
- [4] RODRÍGUEZ-DELGADO, M. et al. Biotransformation kinetics of pharmaceutical and industrial micropollutants in groundwaters by a laccase cocktail from *Pycnoporus sanguineus* CS43 fungi. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 108, p.

- 34-41, 2016.
- [5] ARCA-RAMOS, A. et al. Enzymatic reactors for the removal of recalcitrant compounds in wastewater. **Biocatalysis and biotransformation**, v. 36, p. 195-215, 2017.
- [6] ORLANDELLI, R. C. et al. Enzimas de Interesse Industrial: Produção por Fungos e Aplicações. **Revista Saúde e Biologia**, v. 7, n. 3, p. 97–109, 2012.
- [7] KLEIN-MARCUSCHAMER, D. et al. The Challenge of Enzyme Cost in the Production of Lignocellulosic Biofuels. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 109 p. 1083-1087, 2012.
- [8] MUSSATO, S. et al. Enzimas - Poderosa ferramenta na indústria. **Ciência hoje**, Lorena, São Paulo, n. 346, 2007
- [9] DEWAN, S. S. Global Markets for Enzymes in Industrial Applications. **BCC Research**, v. 116, 2017.
- [10] FARINAS, C. S. Developments in solid-state fermentation for the production of biomass-degrading enzymes for the bioenergy sector. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 52, p. 179-188, 2015.
- [11] RAVINDRAN, R., JAISWAL, A. Microbial Enzyme Production Using Lignocellulosic Food Industry Wastes as Feedstock: A Review. **Bioengineering**, v. 3, p. 30, 2016.
- [12] RISDIANTO, H. et al. Optimisation of Laccase Production using White Rot Fungi and Agriculture Wastes in Solid State Fermentation. **Journal of Engineering and Technological Sciences**, v. 44, p. 93-105, 2012.
- [13] SANTOS, L. C. R. M. **Resíduos produzidos nas feiras abertas da cidade de Manaus como substrato para o cultivo e produção de lacase por *Pleurotus ostreatus***. Manaus, Amazonas: Dissertação de Mestrado em Biotecnologia e Recursos naturais da Amazônia da Universidade do Estado do Amazonas, 2016.
- [14] LEONOWICZ, A., GRZYWNOWICZ, K. Quantitative estimation of laccase forms in some white-rot fungi using syringaldazine as a substrate. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 3, p. 55-63, 1981.
- [15] PANDEY, A. et al. Biotechnological potential of agro-industrial residues . I : sugarcane bagasse. **Bioresource Technology**, v. 74, p. 69-80, 2000.
- [16] SÁNCHEZ, C. Cultivation of *Pleurotus ostreatus* and other edible mushrooms.

**Applied Microbiology Biotechnology**, v. 85, p.1321–1337, 2010.

- [17] SOUZA, G. M. C., ZILLY, A., PERALTA, R. M. Production of laccase as the sole phenoloxidase by a Brazilian strain of *Pleurotus pulmonarius* in solid state fermentation. **Journal of Basic Microbiology**, v. 42, p. 83–90, 2002.
- [18] PANDEY, A. Solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 13, p. 81–84, 2003.
- [19] BAZANELLA, G. S. C. et al. Production of laccase and manganese peroxidase by *Pleurotus pulmonarius* in solid-state cultures and application in dye decolorization. **Folia Microbiologica**, v. 58, p. 641–647, 2013.
- [20] ERGUN, S. O., UREK, R. O. Production of ligninolytic enzymes by solid state fermentation using *Pleurotus ostreatus*. **Annals of Agrarian Sciences**, v. 15, p. 273–277, 2017.
- [21] ZERVA, A. et al. Degradation of olive mill wastewater by the induced extracellular ligninolytic enzymes of two wood-rot fungi. **Journal of Environmental Management**, v. 203, p. 791–798, 2017.
- [22] LONSANE, B. K., et al. Engineering aspects of solid state fermentation. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 7, p. 258–265, 1985.
- [23] RAIMBAULT, M., ALAZARD, D. Culture Method to Study Fungal Growth in Solid Fermentation. **European J Appl Microbiol Biotechnol**, v.9, p. 199–209, 1980.
- [24] AGUIAR, L. V. B. **Cultivo e avaliação nutricional de *Pleurotus ostreatus* de ocorrência na Amazônia, em condições ambientais não controladas**. Manaus, Amazonas: Dissertação de Mestrado em Agricultura no Trópico Úmido do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, 2016.
- [25] SOUZA, J. O. **Influência de variáveis físicas na produção da lacase e biomassa micelial de basidiomicetos amazônicos e de sua interação**. Manaus, Amazonas: Dissertação de Mestrado em Biotecnologia e Recursos naturais da Amazônia da Universidade do Estado do Amazonas, p. 51–65, 2013.
- [26] AKPINAR, M., UREK, R.O. Production of ligninolytic enzymes by solid-state fermentation using *Pleurotus eryngii*. **Preparative Biochemistry and Biotechnology**, v. 42, p. 582–597, 2012.
- [27] EL-BATAL, AI. et al. Laccase production by *Pleurotus ostreatus* and its application in synthesis of gold nanoparticles. **Biotechnology Reports**, v. 5, p. 31–39, 2015.



- [28] THIRIBHUVANAMALA, G. et al. Induction of lignolytic enzyme activities in different agro residues by the white rot fungi, *Pleurotus sajar-caju*. **International Journal of Chemical Studies**, v. 5, p. 89–94, 2017.
- [29] AKPINAR, M., UREK, R. O. Peach and Cherry Agroindustrial Wastes : New and Economic Sources for the Production of Lignocellulolytic Enzymes. **Acta Chimica Slovenica**, v. 64, p. 422–430, 2017.
- [30] CARVALHO, A.R., **Secreção de lacase utilizando a cepa amazônica *Trametes lactinea* , suplementado com o resíduo da casca do *Astrocaryum aculeatum* Meyer , coletados no município de Alvarães/AM.** Manaus, Amazonas: Trabalho de conclusão de curso de graduação em ciências biológicas da Universidade do Estado do Amazonas, 2012.
- [31] STAJIĆ, M. et al. Effect of different carbon and nitrogen sources on laccase and peroxidases production by selected *Pleurotus* species. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 38, p. 65–73, 2006.
- [32] IRACHETA-CÁRDENAS, M. M. et al. A *Pycnoporus sanguineus* laccase for denim bleaching and its comparison with an enzymatic commercial formulation. **Journal of Environmental Management**, v. 177, p. 93–100, 2016.
- [33] PATEL, H. et al. Purification and characterization of an extracellular laccase from solid-state culture of *Pleurotus ostreatus* HP-1. **Biotech**, v. 4, p. 77–84, 2014.
- [34] NETO, S. L. M. **Enzimas ligninolíticas produzidas por *Psilocybe castanella* CCB444 em solo contaminado com hexaclorobenzeno.** Dissertação (Mestrado em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente), Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente, São Paulo, 2006.
- [35] LIU L, et al. Fermentation optimization and characterization of the laccase from *Pleurotus ostreatus* strain 10969. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 44, p. 426-433, 2009.
- [36] PACKIYAM, J. E. Ragunathan R. Production, purification, characterization, and copper induction of laccase isoenzyme in the lignolytic fungus *Pleurotus florida*. **Journal of Microbiology and Biotechnology Research**, v. 4, p. 10–16, 2013.
- [37] PALMIERI G, et al. A novel white laccase from *Pleurotus ostreatus*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 272, p. 31301–31307, 1997.
- [38] MAJEAU, J. A., BRAR, S. K., TYAGI, R. D. Laccases for removal of recalcitrant and emerging pollutants. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 2331–2350, 2010.
- [39] ZHUO, R. et al. Induction of laccase by metal ions and aromatic compounds in

- Pleurotus ostreatus* HAUCC 162 and decolorization of different synthetic dyes by the extracellular laccase. **Biochemical Engineering Journal**, v. 117, p. 62–72, 2016.
- [40] MARIM, R. A. et al. Use of sugarcane molasses by *Pycnoporus sanguineus* for the production of laccase for dye decolorization. **Genetics and Molecular Research**, v.15, 2016.
- [41] FABRINI, M. R. A. et al. Produção de lacase de *Pycnoporus sanguineus* em meio de cultivo à base de melaço soja. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR**, v. 19, p.159–64, 2016.
- [42] KIM, H. et al. Decolorization of remazol brilliant blue R by a purified laccase of *Polyporus brumalis*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 166, p. 159–164, 2012.
- [43] MURUGESAN, K. et al. Decolorization of reactive dyes by a thermostable laccase produced by *Ganoderma lucidum* in solid state culture. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, p. 1662–1672, 2007.

## 5 CONCLUSÃO

- O basidiomiceto *Pleurotus ostreatus* LM 6226 é um bom produtor da enzima lacase utilizando cascas do fruto de tucumã da Amazônia, como substrato em bioprocessamento sólido.
- Quantidades significativas de lacase foram produzidas por *P. ostreatus* LM 6226 empregando cascas de tucumã, como substrato em bioprocessamento sólido, sem a suplementação com farelo de trigo e sulfato de cobre em diferentes concentrações.

## REFERÊNCIAS

- ABDOLALI, A. et al. Typical lignocellulosic wastes and by-products for biosorption process in water and wastewater treatment: A critical review. **Bioresource Technology**, v. 160, p. 57–66, 2014.
- AGUIAR, A.; FERRAZ, A. Mecanismos envolvidos na biodegradação de materiais lignocelulósicos e aplicações tecnológicas correlatas. **Química Nova**, v. 34, n. 10, p. 1729–1738, 2011.
- AGUIAR, A. P. **Seleção de espécies de basidiomicetos produtoras de ligninases pra caracterização e aplicação das enzimas sobre corantes aromáticos**. São José do Rio Preto, São Paulo: Dissertação de Mestrado em Engenharia de Alimentos do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, 2006.
- AGUIAR, L. V. B. DE. **Cultivo e avaliação nutricional de *Pleurotus ostreatus* de ocorrência na Amazônia, em condições ambientais não controladas**. Manaus, Amazonas: Dissertação de Mestrado em Agricultura no Trópico Úmido do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, 2016.
- AKPINAR, M.; UREK, R. O. Peach and Cherry Agroindustrial Wastes : New and Economic Sources for the Production of Lignocellulolytic Enzymes. **Acta Chimica Slovenica**, v. 64, p. 422–430, 2017.
- ALCANTARA, M. R.; DALTIM, D. A Química Do Processamento Têxtil. **Química Nova**, v. 19, n. 3, p. 320–330, 1996.
- ARAGÃO, A. B. DE. **Caracterização bioquímica e centesimal das espécies de tucumã e uxi**. São Paulo: Dissertação de Mestrado em Biotecnologia do Instituto de Química da Universidade Estadual Paulista, 2013.
- ARCA-RAMOS, A. et al. Enzymatic reactors for the removal of recalcitrant compounds in wastewater. **Biocatalysis and biotransformation**, v. 36, p. 195-215, 2017.
- ARSLAN, I.; BALCIOĞLU, I. A.; BAHNEMANN, D. W. Advanced chemical oxidation of reactive dyes in simulated dyehouse effluents by ferrioxalate-Fenton/UV-A and TiO<sub>2</sub>/UV-A processes. **Dyes and Pigments**, v. 47, n. 3, p. 207–218, 2000.
- ASLAM, S. et al. Exploration of optimum operating conditions for enhanced laccase enzyme production by *Pleurotus nebrodensis* WC 850 through resposner surface methodology. **The Journal of Animal & Plant Sciences**, v. 26, n. 3, p. 794–804, 2016.
- BANAT, I. . et al. Microbial decolorization of textile-dye-containing effluents: A review. **Bioresource Technology**, v. 58, n. 3, p. 217–227, 1996.
- BERGAMINI, M. F.; DE OLIVEIRA, F. C. M.; ZANONI, M. V. B. Análise voltamétrica do corante têxtil do tipo antraquinona empregando eletrodos de carbono impresso. **Ecletica Química**, v. 30, n. 2, p. 53–59, 2005.
- BERTAZZOLI, R.; PELEGRINI, R. Descoloração e degradação de poluentes orgânicos em

soluções aquosas através do processo fotoeletroquímico. **Química Nova**, v. 25, n. 3, p. 477–482, 2002.

BIBI, I.; BHATTI, H. N. Enhanced biodecolorization of reactive dyes by basidiomycetes under static conditions. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 166, n. 8, p. 2078–2090, 2012.

BOLLAG, J. M.; SHUTTLEWORTH, K. L.; ANDERSON, D. H. Laccase-Mediated Detoxification of Phenolic Compoundst. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 54, n. 12, p. 3086–3091, 1988.

BORGES, R. M. et al. Uso de filtros de carvão ativado granular associado a microrganismos para remoção de fármacos no tratamento de água de abastecimento. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 21, n. 4, p. 709-720, 2016.

BOURBONNAIS, R; PAICE, M. G. Oxidation An expanded of non-phenolic substrates role for lactase in lignin biodegradation. **FEBS Lett.**, v. 267, n. 1, p. 99–102, 1990.

BROWN, D. Effects of colorants in the aquatic environment. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 13, n. 2, p. 139–147, 1987.

BUTLER, C. S.; MASON, J. R. Structure-function analysis of the bacterial aromatic ring-hydroxylating dioxygenases. **Advances in microbial physiology**, v. 38, p. 47–84, 1997.

CAMPOS, R. et al. Indigo degradation with purified laccases from *Trametes hirsuta* and *Sclerotium rolfsii*. **Journal of Biotechnology**, v. 89, n. 2–3, p. 131–139, 2001.

CANTO, A. R. **Processamento da polpa de tucumã do amazonas (*Astrocaryum aculeatum*) em conserva e avaliação da estabilidade durante o armazenamento**. Campinas: Tese de doutorado da Faculdade de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas, 2016.

CARREIRA, H. **Redução de grupos cromóforos responsáveis pela cor da pasta kraft**. Aveiro: Dissertação de Mestrado Engenharia Química da Universidade de Aveiro, 2009.

CARVALHO, J. C. DE. **Desenvolvimento De Bioprocesso Para a Produção De Pigmentos a Partir De Monascus Por Fermentação Em Substrato Sólido**. Paraná: Tese de Doutorado em Processos Biotecnológicos da Universidade Federal do Paraná., 2004.

CATANHO, M.; MALPASS, G. R. P.; MOTHEO, A. D. J. Avaliação dos tratamentos eletroquímico e fotoeletroquímico na degradação de corantes têxteis. **Química Nova**, v. 29, n. 5, p. 983–989, 2006.

CAVALCANTE, P. B. **Frutas comestíveis da Amazônia II**. Belém: Museu Paraense Emílio Goeldi, 1974.

CHEN, Y. et al. Cell surface display fungal laccase as a renewable biocatalyst for degradation of persistent micropollutants bisphenol A and sulfamethoxazole Cell surface display fungal laccase as a renewable biocatalyst for degradation of persistent micropollutants bisp. **Environmental Science & Technology**, v. 50, p. 8799-8808, 2016.

CHIOU, M. S.; LI, H. Y. Equilibrium and kinetic modeling of adsorption of reactive dye on cross-linked chitosan beads. **Journal of Hazardous Materials**, v. 93, n. 2, p. 233–248, 2002.

CHUNG, K.; STEVENS, S. Degradation of Azo Dyes by environmental microorganisms and helminths. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 71, n. 11, p. 100–113, 2006.

CLEMENT, C. R.; LLERAS, P. E.; VAN, L. J. O potencial das palmeiras tropicais no Brasil: acertos e fracassos das últimas décadas. **Agrociências**, v. 9, n. 1–2, p. 67–71, 2005.

COLE, J. L. et al. Reactivity of the Laccase Trinuclear Copper Active-Site with Dioxygen - an X-Ray Absorption-Edge Study. **Journal of the American Chemical Society**, v. 112, n. 6, p. 2243–2249, 1990.

CONCEIÇÃO, T. A. **Estudo da produção de enzimas ligninolíticas por fungos agaricomycetes cultivados em resíduos agro-industriais do estado da Bahia**. Feira de Santana, Bahia: Dissertação de mestrado em Biotecnologia da Universidade Estadual de Feira de Santana, 2010.

DEWAN, S. S. Global Markets for Enzymes in Industrial Applications. **BCC Research**, p. 116, 2017.

DIDONET, A. A.; FERRAZ, D. K. O comércio de frutos de tucumã (*Astrocaryum aculeatum* G. Mey - ARECACEAE) nas feiras de Manaus (AMAZONAS, BRASIL). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 1, p. 353–362, 2014.

DUBUS, I. G.; HOLLIS, J. M.; BROWN, C. D. Pesticides in rainfall in Europe. **Environmental Pollution**, v. 110, n. 2, p. 331–344, 2000.

ERIKSSON, K. E. L. Biotechnology in the pulp and paper industry. **wood science and technology**, v. 24, p. 79–101, 1990.

FARINAS, C. S. Developments in solid-state fermentation for the production of biomass-degrading enzymes for the bioenergy sector. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 52, p. 179–188, 2015.

FU, Y.; VIRARAGHAVAN, T. Fungal decolorization of dye wastewaters: A review. **Bioresource Technology**, v. 79, n. 3, p. 251–262, 2001.

GARROTE, G.; DOMÍNGUEZ, H.; PARAJÓ, J. C. Mild autohydrolysis : an environmentally friendly technology for xylooligosaccharide production from wood. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 1109, n. July, p. 1101–1109, 1999.

GASSARA, F. et al. Screening of agro-industrial wastes to produce ligninolytic enzymes by *Phanerochaete chrysosporium*. **Biochemical Engineering Journal**, v. 49, n. 3, p. 388–394, 2010.

GIANFREDA, L.; XU, F.; BOLLAG, J. Laccases : A Useful Group of Oxidoreductive Enzymes Laccases : A Useful Group of Oxidoreductive Enzymes. **bioremediation journal**, v. 3, n. 1, p. 1–26, 2010.

GUARATINI, C. C. I.; ZANONI, V. B. Fixação do Corante A forma de fixação da molécula do corante a essas fibras geralmente é feita em solução aquosa e pode envolver basicamente. **Química Nova**, v. 23, n. 1, p. 71–78, 1999.

GUIVARCH, E. et al. Degradation of azo dyes in water by Electro-Fenton process. **Environmental Chemistry Letters**, v. 1, n. 1, p. 38–44, 2003.

HADIBARATA, T.; YUSOFF, A. R. M.; KRISTANTI, R. A. Decolorization and metabolism of anthraquinone-type dye by laccase of white-rot fungi *Polyporus* sp. S133. **Water, Air, and Soil Pollution**, v. 223, n. 2, p. 933–941, 2012.

HARTLEY, R. D.; FORD, C. W. Phenolic Constituents of Plant Cell Walls and Wall Biodegradability. **Plant Cell Wall Polymers**, p. 137–145, 1989.

HATAKKA, A. Lignin-modifying enzymes from selected white-rot fungi : production and role in lignin degradation. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 13, p. 125–135, 1994.

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

JAVED, A. et al. A review on the potential industrial applications of microbial laccases. **European Journal of Pharmaceutical and Medical Research**, v. 4, n. 4, p. 238–246, 2017.

JOACHIM, F.; BURRELL, A.; ANDERSEN, J. Mutagenicity of azo dyes in the Salmonella/microsome assay using in vitro and in vivo activation. **Mutation Research/Genetic Toxicology**, v. 156, n. 3, p. 131–138, 1985.

KARP, S. G. et al. Statistical Optimization of Laccase Production and Delignification of Sugarcane Bagasse by *Pleurotus ostreatus* in Solid-State Fermentation. **Biomedical Research International**, v. 2015, p. 1–9, 2015.

KLEIN-MARCUSCHAMER, D. et al. The Challenge of Enzyme Cost in the Production of Lignocellulosic Biofuels. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 109, n. 4, p. 1083–1087, 2012.

KUNZ, A. et al. Novas tendências no tratamento de efluentes têxteis. **Química Nova**, v. 25, n. 1, p. 78–82, 2002.

KUSTER, M. et al. Analysis of phytoestrogens , progestogens and estrogens in environmental waters from Rio de Janeiro ( Brazil ). **Environment International**, v. 35, p. 997–1003, 2009.

LACHHEB, H. et al. Photocatalytic degradation of various types of dyes (Alizarin S, Crocein Orange G, Methyl Red, Congo Red, Methylene Blue) in water by UV-irradiated titania. **Applied Catalysis B: Environmental**, v. 39, n. 1, p. 75–90, 2002.

LEONOWICZ, A.; GRZYWNOWICZ, K. Quantitative estimation of laccase forms in some white-rot fungi using syringaldazine as a substrate. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 3, n. 1, p. 55–58, 1981.

LETTERA, V. et al. Efficient immobilization of a fungal laccase and its exploitation in fruit juice clarification. **Food Chemistry**, v. 196, p. 1272–1278, 2015.

MAJEAU, J. A.; BRAR, S. K.; TYAGI, R. D. Laccases for removal of recalcitrant and emerging pollutants. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 7, p. 2331–2350, 2010.

MARTINS, S. et al. Bioactive phenolic compounds: Production and extraction by solid-state fermentation. A review. **Biotechnology Advances**, v. 29, n. 3, p. 365–373, 2011.

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

MELO, I. S. DE; AZEVEDO, J. L. DE. **Microbiologia ambiental**. Jaguariúna: Embrapa-CNPMA, 1997.

MIKOLASCH, A.; SCHAUER, F. Fungal laccases as tools for the synthesis of new hybrid molecules and biomaterials. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 82, n. 4, p. 605–624, 2009.

MONSSEF, E.; HASSAN, E. A.; RAMADAN, E. M. Production of laccase enzyme for their potential application to decolorize fungal pigments on aging paper and parchment. **Annals of Agricultural Sciences**, v. 61, n. 1, p. 145–154, 2016.

MOROZOVA, O. V. et al. “Blue” laccases. **Biochemistry (Moscow)**, v. 72, n. 10, p. 1136–1150, 2007.

MUSSATO, S. et al. **Enzimas - Poderosa ferramenta na indústria**. Lorena, São Paulo: Ciência hoje, 2007.

NIGAM, P. et al. Physical removal of textile dyes from effluents and solid-state fermentation of dye-adsorbed agricultural residues. **Bioresource Technology**, v. 72, n. 3, p. 219–226, 2000.

ORLANDELLI, R. C. et al. Enzimas de Interesse Industrial: Produção por Fungos e Aplicações. **Revista Saúde e Biologia**, v. 7, n. 3, p. 97–109, 2012.

PACKIYAM, J. E.; RAGUNATHAN, R. Production, purification, characterization, and copper induction of laccase isoenzyme in the lignolytic fungus *Pleurotus florida*. **Journal of Microbiology and Biotechnology Research**, v. 4, n. 2, p. 10–16, 2013.

PANDEY, A. Recent process developments in solid-state fermentation. **Process Biochemistry**, v. 27, n. 2, p. 109–117, 1992.

PANDEY, A. et al. Biotechnological potential of agro-industrial residues . I: sugarcane bagasse. **Bioresource Technology**, v. 74, p. 69–80, 2000.

PANDEY, A. Solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 13, n. 2–3, p. 81–84, 2003.

PANDEY, A.; SOCCOL, R. C. Bioconversion of Biomass: A Case Study of Ligno-



cellulosics Bioconversions in Solid State Fermentation. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 41, p. 379–390, 1998.

PERALTA, R. M. et al. Enzymes from Basidiomycetes-Peculiar and Efficient Tools for Biotechnology. In: **Biotechnology of Microbial Enzymes: Production, Biocatalysis and Industrial Applications**. Chennai, India: Elsevier Inc., 2016. p. 119–149.

PEREIRA, G. V. DE. M.; SOCCOL, V. T.; SOCCOL, C. R. Current state of research on cocoa and coffee fermentations. **Current Opinion in Food Science**, v. 7, p. 50–57, 2016.

PEZZELLA, C. et al. Immobilization of a *Pleurotus ostreatus* laccase mixture on perlite and its application to dye decolourisation. **BioMed Research International**, v. 2014, p. 11, 2014.

RAVINDRAN, R.; JAISWAL, A. Microbial Enzyme Production Using Lignocellulosic Food Industry Wastes as Feedstock: A Review. **Bioengineering**, v. 3, n. 4, p. 30, 2016.

RISDIANTO, H. et al. Optimisation of Laccase Production using White Rot Fungi and Agriculture Wastes in Solid State Fermentation. **Journal of Engineering and Technological Sciences**, v. 44, n. 2, p. 93–105, 2012.

ROBINSON, T.; CHANDRAN, B.; NIGAM, P. Studies on the production of enzymes by white-rot fungi for the decolourisation of textile dyes. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 29, n. 8–9, p. 575–579, 2001.

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Assessment of the provitamin A contents of foods—the Brazilian experience. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 9, n. 9, p. 196–230, 1996.

RODRÍGUEZ-DELGADO, M. et al. International Biodeterioration & Biodegradation Biotransformation kinetics of pharmaceutical and industrial micropollutants in groundwaters by a laccase cocktail from *Pycnoporus sanguineus* CS43 fungi. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 108, p. 34–41, 2016.

ROSA, J. M. **Sustentabilidade no beneficiamento têxtil: Produção de tingimentos com reuso de efluente tratado por fotocatalise via UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>**. São Paulo: Dissertação de Mestrado em Engenharia de Produção da Universidade Nove de Julho, 2010.

RUFINO, J. P. F. et al. Análise econômica da inclusão de farinha do resíduo de tucumã (*Astrocaryum vulgare*, Mart) na alimentação de poedeiras comerciais. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 16, p. 1–9, 2015.

SÁNCHEZ, C. Lignocellulosic residues: Biodegradation and bioconversion by fungi. **Biotechnology Advances**, v. 27, p. 185–194, 2009.

SANTOS, L. C. R. M. **Resíduos produzidos nas feiras abertas da cidade de Manaus como substrato para o cultivo e produção de lacase por *Pleurotus ostreatus***. Manaus, Amazonas: Dissertação de Mestrado em Biotecnologia e Recursos naturais da Amazônia da Universidade do Estado do Amazonas, 2016.

SHAH, V.; NERUD, F. Lignin degrading system of white-rot fungi and its exploitation for

dye decolorization. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 48, p. 857–870, 2002.

SHANLEY, P.; MEDINA, G. **Frutíferas e Plantas Úteis na Vida Amazônica Frutíferas e Plantas Úteis na Vida Amazônica**. Belém: CIFOR, Imazon, 2005.

SING, N. N. et al. Decolourisation Capabilities of Ligninolytic Enzymes Produced by *Marasmius cladophyllus* UMAS MS8 on Remazol Brilliant Blue R and Other Azo Dyes. **BioMed Research International**, v. 2017, p. 1-8, 2017.

SINGH, Z.; CHADHA, P. Textile industry and occupational cancer. **Journal of Occupational Medicine and Toxicology**, v. 11, n. 1, p. 1–6, 2016.

SINGHANIA, R. R. et al. Advancement and comparative profiles in the production technologies using solid-state and submerged fermentation for microbial cellulases. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 46, n. 7, p. 541–549, 2010.

SOARES, G. M. B.; AMORIM, M. T. P.; COSTA-FERREIRA, M. Use of laccase together with redox mediators to decolourize Remazol Brilliant Blue R. **Journal of Biotechnology**, v. 89, n. 2–3, p. 123–129, 2001.

SOCOL, C. R.; VANDENBERGHE, L. P. S. Overview of applied solid-state fermentation in Brazil. **Biochemical Engineering Journal**, v. 13, n. 2–3, p. 205–218, 2003.

TAVARES, A. P. M. **Produção de lacase para potencial aplicação como oxidante na indústria papeleira**. Aveiro: Tese de Doutorado em Engenharia Química da Universidade Aveiro, 2006.

THURSTON, C. F. The structure and function of fungal laccases. **microbiology**, v. 140, p. 19–26, 1994.

TWARDOKUS, R. G. **Reuso de água no processo de tingimento da indústria têxtil**. Santa Catarina: Dissertação de Mestrado em Engenharia Química da Universidade Federal de Santa Catarina, 2004.

VALLE, J. S. . **Produção, identificação e caracterização molecular de lacases de *Agaricus blazei* obtidas por fermentação de resíduos agroindustriais**. Paraná: Tese de doutorado em Processos Biotecnológicos da Universidade Federal do Paraná., 2012.

VANDEVIVERE, P. C.; BIANCHI, R.; VERSTRAETE, W. Review Treatment and Reuse of Wastewater from the Textile Wet-Processing Industry: Review of Emerging Technologies. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 72, p. 289–302, 1998.

VILLELA, S. M. **Imobilização de lacase e seu uso na biotransformação de efluentes de indústrias papeleiras**. Florianópolis: Dissertação de Mestrado em Biotecnologia da Universidade Federal de Santa Catarina, 2006.

VISWANATH, B. et al. Fungal Laccases and Their Applications in Bioremediation. **Enzyme Research**, v. 2014, p. 1-21, 2014.

WEBER, E. J.; STICKNEY, V. C. Hydrolysis kinetics of Reactive Blue 19-Vinyl Sulfone.

**Water Research**, v. 27, n. 1, p. 63–67, 1993.

WESENBERG, D.; KYRIAKIDES, I.; AGATHOS, S. N. White-rot fungi and their enzymes for the treatment of industrial dye effluents. **Biotechnology Advances**, v. 22, n. 1–2, p. 161–187, 2003.

WILLMOTT, N.; GUTHRIE, J.; NELSON, G. The biotechnology approach to colour removal from textile effluent. **Journal of The Society of Dyers and Colourists**, v. 114, p. 38–41, 1998.

YU, H. et al. Lignin-modifying enzymes from selected white-rot fungi: production and role from in lignin degradation. **Bioresource Technology**, v. 103, n. 3, p. 273–280, 2013.

YUAN, X. et al. Degradation of dyes using crude extract and a thermostable and pH-stable laccase isolated from *Pleurotus nebrodensis*. **Bioscience Reports**, v. 36, n. 4, 2016.

ZHUO, R. et al. Induction of laccase by metal ions and aromatic compounds in *Pleurotus ostreatus* HAUCC 162 and decolorization of different synthetic dyes by the extracellular laccase. **Biochemical Engineering Journal**, v. 117, p. 62–72, 2016.