INSTITUTO LATINO-AMERICANO DE CIÊNCIAS DA VIDA E DA NATUREZA (ILACVN)

CURSO DE BIOTECNOLOGIA

DEGRADAÇÃO DE BISFENOL A POR LACASES MICROBIANAS: UMA REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

JHONATAN OTTO DE SIQUEIRA

Foz do Iguaçu
2021

INSTITUTO LATINO-AMERICANO DE CIÊNCIAS
DA VIDA E DA NATUREZA (ILACVN)

BIOTECNOLOGIA

DEGRADAÇÃO DE BISFENOL A POR LACASES MICROBIANAS: UMA REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

JHONATAN OTTO DE SIQUEIRA

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto Latino-Americano de Ciências da Vida e da Natureza da Universidade Federal da Integração Latino-Americana, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dra. Rafaella Costa Bonugli Santos

Foz do Iguaçu
2021

JHONATAN OTTO DE SIQUEIRA

DEGRADAÇÃO DE BISFENOL A POR LACASES MICROBIANAS: UMA REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto Latino-Americano de Ciências da Vida e da Natureza da Universidade Federal da Integração Latino-Americana, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof. Dra Rafaella Costa Bonugli Santos
UNILA

Prof. Dr. Michel Rodrigo Zambrano Passarini
UNILA

Prof. Dr. Cristian Antonio Rojas
UNILA

Foz do Iguaçu, 02 de junho de 2021.

TERMO DE SUBMISSÃO DE TRABALHOS ACADÊMICOS

Nome completo do autor(a): Jhonatan Otto de Siqueira

Curso: Biotecnologia

	Tipo de Documento
(…x..) graduação	(…..) artigo
(…..) especialização	(…x..) trabalho de conclusão de curso
(…..) mestrado	(…..) monografia
(…..) doutorado	(…..) dissertação
	(…..) tese
	(…..) CD/DVD – obras audiovisuais
	(…..) _____

Título do trabalho acadêmico: _____ DEGRADAÇÃO DE BISFENOL A POR LACASES MICROBIANAS: UMA REVISÃO BIBLIOGRÁFICA _____

_____

_____

Nome do orientador(a): ____ Rafaella Costa Bonugli Santos
_____

Data da Defesa: ___02__/___06__/__2021____

Licença não-exclusiva de Distribuição

O referido autor(a):

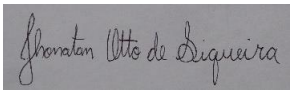
a) Declara que o documento entregue é seu trabalho original, e que o detém o direito de conceder os direitos contidos nesta licença. Declara também que a entrega do documento não infringe, tanto quanto lhe é possível saber, os direitos de qualquer outra pessoa ou entidade.

b) Se o documento entregue contém material do qual não detém os direitos de autor, declara que obteve autorização do detentor dos direitos de autor para conceder à UNILA – Universidade Federal da Integração Latino-Americana os direitos requeridos por esta licença, e que esse material cujos direitos são de terceiros está claramente identificado e reconhecido no texto ou conteúdo do documento entregue.

Se o documento entregue é baseado em trabalho financiado ou apoiado por outra instituição que não a Universidade Federal da Integração Latino-Americana, declara que cumpriu quaisquer obrigações exigidas pelo respectivo contrato ou acordo.

Na qualidade de titular dos direitos do conteúdo supracitado, o autor autoriza a Biblioteca Latino-Americana – BIUNILA a disponibilizar a obra, gratuitamente e de acordo com a licença pública *Creative Commons* **Licença 3.0 Unported.**

Foz do Iguaçu, __02___ de ____julho_____ de ___2021____.



_____

Assinatura do Responsável

Dedico este trabalho a todos os seres, especialmente à minha família e professores e a todos aqueles que visam à saúde ambiental e humana.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço especialmente à minha mãe, ao meu pai, que foram cruciais para meu desenvolvimento acadêmico e pessoal. A eles dedico todo o mérito desse trabalho.

Também agradeço a toda a minha família pela ajuda e apoio.

A minha professora orientadora não só pela constante orientação neste trabalho, mas sobretudo pela ajuda e companheirismo.

Aos professores da banca pelas pelos conselhos e orientações, mas também a todos os professores ao longo do curso que me transmitiram ensinamentos preciosos que levarei para o resto da vida.

Aos colegas de curso pela amizade e apoio na construção de minha trajetória acadêmica.

Por fim, agradeço a todos os seres que permitiram a realização deste trabalho direta ou indiretamente e que continuam a me mostrar O Caminho.

Quando cria harmonia em si próprio, o ser humano provoca harmonia nas coisas a sua volta. A questão é perceber que estamos em rede, que tudo está conectado e que uma atitude benéfica transforma o entorno.

Monja Coen Roshi

DE SIQUEIRA, Jhonatan Otto. **DEGRADAÇÃO DE BISFENOL A POR LACASES MICROBIANAS: UMA REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.** Trabalho de Conclusão do Curso de Bacheralado em Biotecnologia – Universidade Federal da Integração Latino-Americana, Foz do Iguaçu, 2020.

RESUMO

O bisfenol A (BFA), [2′-bis-(4- hidroxifenil) propano], ou IUPAC 4,4′-dihidroxi-2,2-difenilpropano, é um dos xenobióticos emergentes mais comumente detectado em ecossistemas aquáticos e é produzido em grandes quantidades em todo o mundo. Tal molécula tem sido muito utilizada devido à gama de suas aplicações, especialmente como monômero na fabricação de resinas epóxi e plástico policarbonato, por exemplo. Essas resinas são a matéria-prima para a confecção de diversos tipos de mamadeiras e para algumas embalagens alimentícias. Contudo, esse composto representa um risco significativo de dano ao meio ambiente e à saúde humana e suscita, portanto, grande preocupação. No que diz respeito à degradação do BFA, o uso de microrganismos ou metabólitos produzidos por bactérias e fungos, como as enzimas extracelulares ligninolíticas, é uma alternativa viável em relação a métodos físico-químicos convencionais. Isso porque são de alta eficiência catalítica, baixa toxicidade, baixo tempo de reação e alta especificidade de substrato. Diversos fungos produzem enzimas ligninolíticas, como a lacase, em determinadas condições ambientais que apresentam potencial para degradar o BFA. As lacases estão entre as mais estudadas pois utilizam oxigênio molecular como aceitador final de elétrons, e são produzidas em concentrações mais significativas em fungos basidiomicetos. Este trabalho objetivou a revisão bibliográfica da biotecnologia recente aplicável a degradação do BFA utilizando a enzima lacase produzida por fungos. Foram selecionadas as palavras-chave “Fungi”, “Laccase”, “Bisphenol a” e “Purified”, e determinou-se para o estudo os artigos publicados no período de maior relevância das publicações. Foi realizada, também, uma comparação entre os resultados de estudos com lacase imobilizada ou livre, e purificada ou bruta. Com base na pesquisa o período de maior publicação foi entre 2016 a 2021. Nesse período foram identificados, nos bancos de dados analisados (*Science Direct* e *PubMed*), 116 artigos e apenas 14 deles descreveram no resumo a origem da enzima e então foram selecionados para avaliação na íntegra. O período de maior impacto das citações foi entre os anos 2018 e 2019 indicando a relevância temporal dessa linha de pesquisa. A fonte predominante de lacases foram basidiomicetos já que elas são produzidas em grandes quantidades nesses organismos. Nos estudos avaliados para tratar o BFA a concentração média ideal de lacase foi em torno de 1.280 $U.L^{-1}$, e o tempo médio de reação ideal ficou em torno de 2h. O grupo de lacases brutas foi capaz de degradar uma quantidade maior de BFA em menor tempo e com menos enzima que o grupo de lacases purificadas. Visando à aplicação em processos de biorremediação de grandes volumes de água residual ou de poluente avaliou-se que lacases imobilizadas são preferíveis em tratamentos de BFA de longa duração e em larga escala enquanto a enzima bruta é preferível à purificada nesse tipo de estudo.

Palavras-chave: Mediadores redox. Imobilização. Purificação. Potencial biotecnológico. Biorremediação.

DE SIQUEIRA, Jhonatan Otto. **55** Número de páginas. Trabalho de Conclusão do Curso de Bacharel em Biotecnologia– Universidade Federal da Integração Latino-Americana, Foz do Iguaçu, 2020.

ABSTRACT

Bisphenol A (BFA), [2′-bis-(4-hydroxyphenyl) propane], or IUPAC 4,4′-dihydroxy-2,2-diphenylpropane, is one of the most commonly detected emerging xenobiotics in aquatic ecosystems and is produced in large quantities around the world. This molecule has been widely used due to the range of its applications, especially as a monomer in the manufacture of epoxy resins and polycarbonate plastic, for example. These resins are the raw material for production of several types of baby bottles and for some food packaging. However, this compound poses a significant risk of harm to the environment and human health and is therefore of great concern. With regard to BFA degradation, the use of microorganisms or metabolites produced by bacteria and fungi, such as ligninolytic extracellular enzymes, is a viable alternative to conventional physicochemical methods. This is due to their high catalytic efficiency, low toxicity, low reaction time and high substrate specificity. Several fungi produce ligninolytic enzymes, such as laccase, in certain environmental conditions that have the potential to degrade BFA. Laccases are among the most studied because they use molecular oxygen as the final electron acceptor, and are produced in more significant concentrations in basidiomycete fungi. This work aimed to review the literature of recent biotechnology applicable to BFA degradation using the laccase enzyme produced by fungi. There were selected the keywords “Fungi”, "Laccase", “Bisphenol a” and “Purified”, and the articles published in the period of greatest relevance of the publications were determined for the study. A comparison was performed between the results of studies with immobilized or free laccase, and purified or crude laccase. Based on the research, the period of greatest publication was between 2016 and 2021. During this period, 116 articles were identified in the analyzed databases (Science Direct and PubMed), and only 14 of them described the origin of the enzyme in the abstract and were then selected for evaluation in full. The period of greatest impact of citations was between 2018 and 2019, indicating the temporal relevance of this line of research. The predominant source of laccases was basidiomycetes since they are produced in larger quantities in these organisms. In the studies evaluated to treat BFA, the ideal average concentration of laccase was around 1,280 $U.L^{-1}$, and the average ideal reaction time was around 2h. The crude laccases group was able to degrade a greater amount of BFA in less time and with less enzyme than the purified laccases group. Aiming at the application in bioremediation processes of large volumes of waste water or pollutant, it was evaluated that immobilized laccases are preferable in long-term and large-scale BFA treatments while crude enzyme is preferable to purified one in this type of study.

Key words: Redox mediators. Immobilization. Purification. Biotechnological potential. Biorremediation.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Mecanismo de reação simplificado da oxidação de substrato adequado por lacase 15
Figura 2 –Estrutura Molecular do Bisfenol A..... 29
Figura 3 – Nuvem de Palavras (NP) gerado pelo aplicativo Pro Word Cloud® a partir do texto da tabela 4..... 36

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Atividade enzimática em relação a SSF em diferentes substratos, temperaturas, tempos e espécies 21

Tabela 2 – Atividade enzimática de lacase produzida em SSF por *Trametes versicolor* extraída por diferentes métodos para SSF de basidiomicetos e produção de lacase 27

Tabela 3 –Características físico-químicas do BFA.....30

Tabela 4 – Artigos selecionados do período 2016-2021 nos bancos de dados *ScienceDirect* e *PubMed* para avaliação dos tratamentos do BFA usando a lacase purificada.....34

Tabela 5 – Avaliação inicial dos artigos relacionados ao trabalho para seleção das palavras-chave.....35

Tabela 6 – Títulos de patentes registradas em diferentes mecanismos de busca de patentes online.....44

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Número de artigos dos bancos de dados *Science Direct* e *PubMed* gerados a partir das palavras-chave “fungi”; “laccase”; “bisphenol a”, e “purified” no período de 2016 a março de 2021.....37

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 13

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA 15

2.1 LACASE.....15
2.1.1 Lacases fúngicas.....17
2.2 PRODUÇÃO DE LACASE FÚNGICA POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO (SSF) PARA APLICAÇÃO EM PROCESSOS BIOTECNOLÓGICOS.....18
2.2.1 Suportes inertes.....19
2.2.2 Suportes não-inertes e características do cultivo.....19
2.3 MÉTODOS DE EXTRAÇÃO ENZIMÁTICA (LACASE).....23
2.3.1 Semi-purificação de Lacases.....25
2.4 BISFENOL A.....29

3 OBJETIVOS GERAIS.....**32**

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....32

4 MATERIAIS E MÉTODOS 33

4.1 SELEÇÃO DAS PALAVRAS-CHAVE E PERÍODO DO LEVAMENTO BIBLIOGRÁFICO..... 33

4.2 LEVANTAMENTO BIBLIOGRÁFICO PARA AVALIAÇÃO DOS TRATAMENTOS DO BFA USANDO A LACASE PURIFICADA..... 33

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO 35

5.1 SELEÇÃO DAS PALAVRAS-CHAVE E PERÍODO DO LEVAMENTO BIBLIOGRÁFICO.....35

5.2 TRATAMENTO DO BFA USANDO A LACASE PURIFICADA..... 37

5.3 TRATAMENTOS DIVERSOS DO BFA USANDO O EXTRATO ENZIMÁTICO 39
5.4 POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DA LACASE NO TRATAMENTO DO BFA. ...41

6 CONCLUSÃO..... 45

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 46

1. INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, compostos conhecidos como desreguladores endócrinos (CDEs) ou xenoestrogênios foram amplamente introduzidos no meio ambiente principalmente por meio de atividades humanas (BISPHENOL A ACTION PlAN, 2010). Entre esses compostos, o Bisfenol A (BFA) [2,2-bis (4-hidroxifenil) propano], usado na produção de policarbonatos e resinas epóxi, por exemplo, é produzido em grandes quantidades em todo o mundo, com uma produção anual de 4 milhões de toneladas, em média (MICHAŁOWICZ, 2014). A Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos, EUA (EPA) classificou o BFA como um composto que pode apresentar um risco significativo de danos ao meio ambiente em animais aquáticos, por exemplo, e em 2017, a Agência Europeia da Química (ECHA) listou o BFA como substância que suscita grande preocupação (ECHA, 2017). Ademais, esse composto tem sido apontado como deletério à saúde humana como fator no desenvolvimento do câncer de mama, por exemplo (SHAFEI et al., 2018). Nesse sentido, a presença de BFA nos ecossistemas representa uma séria ameaça ao meio ambiente e à saúde pública (ARBOLEDA et al., 2013).

No que tange ao tratamento do BFA, os processos biológicos têm sido considerados uma alternativa viável em comparação com os físico-químicos convencionais, que são onerosos e levam à formação de subprodutos nocivos, assim como alguns processos biológicos (DE FREITAS et al., 2017; BA & VINOTH KUMAR, 2017). Nesses últimos processos, ao contrário de microrganismos, o uso de enzimas separadas de suas células apresenta várias vantagens, como baixa toxicidade, alta eficiência catalítica, alta especificidade de substrato, baixo tempo de reação e condições intermediárias de reação (SHARMA et al., 2018). Os fungos do filo Basidiomycota, conhecidos como basidiomicetos, secretam enzimas ligninolíticas, como lacases, lignina peroxidases (LiPs) e peroxidases dependentes de manganês (MnPs), em condições ambientais propícias como ausência de luz e presença de substrato, que apresentam potencial de degradação do BFA (BILAL et al., 2017). As lacases, dentre as enzimas acima mencionadas, são as mais frequentemente estudadas já que utilizam oxigênio molecular, geralmente disponível no meio ambiente, como aceitador final de elétrons, diferentemente das peroxidases (BALDRIAN, 2006).

Nesse contexto, o alto custo da purificação se tornou a principal limitação para aplicações extensas de lacases purificadas, especialmente para o tratamento do BFA, uma

vez que este poluente pode contaminar grandes volumes de resíduos. Se a etapa de purificação for simplificada, no entanto, os processos de biorremediação usando lacases se tornarão viáveis (ATACAG ERKUT, 2015). Além disso, as lacases purificadas apresentam menor capacidade de oxidar o BFA devido à ausência de mediadores, compostos sintéticos ou naturais de pequeno peso molecular, que atuam em reações redox e melhoram a atividade das lacases, e estão presentes naturalmente no cultivo do fungo. É, portanto, de interesse desenvolver métodos de menor grau de purificação no intuito de utilizar lacases brutas (“extrato cru”) ou parcialmente purificadas, para degradar o BFA (CAÑAS & CAMARERO, 2010).

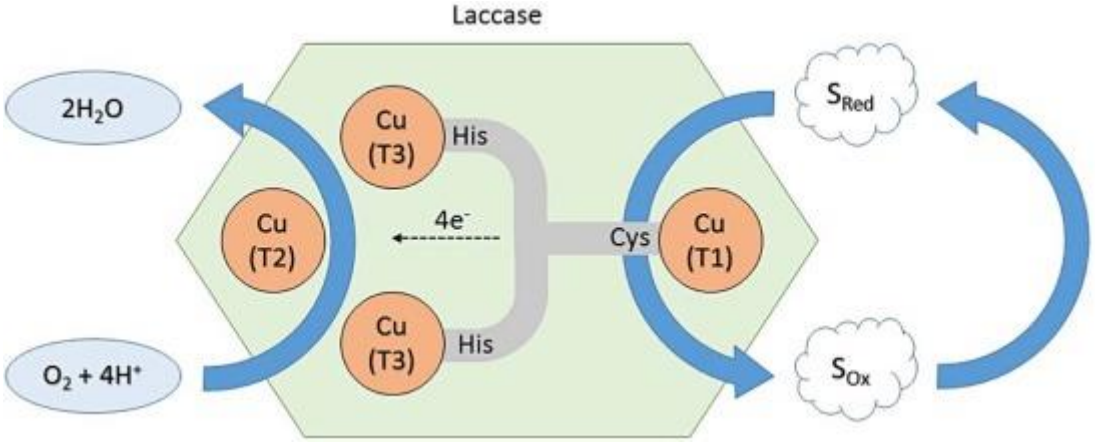
Levando esses pontos em consideração, o presente trabalho se caracterizou por uma revisão bibliográfica que objetivou avaliar o potencial de degradação do bisfenol A (BFA) através da enzima lacase produzida por fungos basidiomicetos. Inicialmente, na primeira sessão esse trabalho traz uma fundamentação teórica sobre a lacase, sua produção, extração e purificação, para depois explorar a aplicação no tratamento do BFA, e então pontuar o potencial biotecnológico desse tratamento enzimático, estratégias usadas e desafios futuros.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 LACASE

Lacases (EC 1.10.3.2) são enzimas da família de oxidases que possuem cobre no sítio ativo, conhecidas como multicopper oxidases (FOROOTANFAR & FARAMARZI, 2015). São encontradas em uma variedade de bactérias, fungos, insetos e plantas e isoladas pela primeira vez na seiva da laca japonesa *Rhus vernicifera* (Yoshida 1883) (HATTORI et al., 2005). Uma molécula típica de lacase apresenta quatro átomos de cobre divididos em sítios de Cu tipo 1, tipo 2 e tipo 3 (Cu binuclear) baseados em características espectroscópicas exclusivas. A oxidação do substrato ocorre no sítio 1 e os elétrons são transferidos para o cluster trinuclear de cobre (TNC), formado pelo sítio 1 e 2, onde o oxigênio molecular é reduzido à água (Figura 1) (JONES & SOLOMON, 2015). Lacases de vegetais e bacterianas têm baixo potencial redox comparadas àquelas dos fungos, de modo que as lacases fúngicas são preferíveis em aplicações biotecnológicas (POGNI et al., 2015).

Figura 1 - **Mecanismo de reação simplificado da oxidação de substrato adequado por lacase**.



Fonte: ALEMÁN NAVA et al., 2015.

Além disso, lacases têm a capacidade de oxidar uma ampla gama de compostos aromáticos e não aromáticos, como fenóis substituídos, íons inorgânicos e outros compostos não fenólicos. Devido à sua baixa especificidade de substrato, podem atuar em uma ampla gama de substratos e se tornaram promissoras no setor ambiental, biotecnológico e industrial (MATERA et al., 2008). Essas enzimas foram consideradas uma ferramenta ecológica, porque requerem oxigênio molecular como o único co-substrato para a biocatálise (AFREEN et al., 2018). As lacases têm a capacidade de reduzir o dióxido de oxigênio à água pela oxidação de um elétron do substrato, que são principalmente

compostos fenólicos substituídos (SURWASE et al., 2016).

Com base nas propriedades de cobre do tipo T1-T3, as lacases podem ser categorizadas em enzimas com alto (0,6-0,8V) ou baixo (0,4-0,6V) potencial redox (CHRISTOPHER et al., 2014). Substratos não fenólicos, com potenciais redox acima de 1,3V, não podem ser diretamente oxidados por lacases (BIBI et al., 2011). No entanto, essa limitação pode ser superada através do uso de mediadores redox (CAMARERO et al., 2004). Esses pequenos compostos naturais ou sintéticos, tais quais o siringaldeído e o ABTS, respectivamente, de baixo peso molecular, chamados mediadores, com maior potencial redox que a própria lacase (> 0,9V), podem ser usados para oxidar a parte não fenólica da lignina (CAMARERO et al., 2005; JOHANNES & MAJCHERCZYK, 2000). Nos últimos anos, a descoberta de mediadores sintéticos novos e eficientes estendeu a catálise da lacase para vários substratos xenobióticos como o BFA, por exemplo (CAÑAS & CAMARERO, 2010).

Lacases e enzimas semelhantes são abundantes na natureza e têm funções biológicas diversas (THURSTON, 1994). Os fungos conhecidos como de podridão branca (devido à alta atividade de enzimas que degradam a lignina da parede vegetal) secretam lacases junto a outras oxidases extracelulares para degradar lignina ou ácidos húmicos, por exemplo (HATAKKA, 1994). A Lacase tem a capacidade de polimerizar e despolimerizar compostos, razão pela qual tem um papel tanto na lignificação quanto na deslignificação em plantas, por exemplo (CLAUS & FLIP, 1988).

Nesse sentido, muitas lacases vem sendo caracterizadas em plantas superiores, tais quais: *Zea mays*, *Nicotiniana tabacum* e *Arabidopsis thaliana*, por exemplo (MOROZOVA et al., 2007). O papel fisiológico das lacases em traqueófitas é fornecer a forma de radical livre de unidades de monolignol, como álcoois coniferil, q-cumaril e sinapil para polimerização em lignina e, também, para oxidação de ferro (DWIVEDI et al., 2011). A espécie vegetal *Pinus taeda*, por exemplo, pode produzir até oito tipos de lacases diferentes (SATO et al., 2001).

Em contraposição às lacases de origem vegetal, aquelas produzidas por fungos estão envolvidas na degradação e reciclagem da lignina, como citado acima. Essas enzimas são essenciais para a sobrevivência de alguns hifomicetos (fungos anamórficos) no organismo hospedeiro, pois degradam toxinas (MOROZOVA et al., 2007). A lacase de algumas leveduras, como *Cryptococcus neoformans*, está ligada também a sua virulência. Muitos fungos são capazes de produzir diferentes isoformas da enzima lacase, daí a

comum menção desta enzima no plural (ZHU et al., 2001) A produção de isoformas de lacase pode ser dependente da espécie de fungo, estágio de desenvolvimento e condições ambientais (KALIA et al., 2014).

Em procariotos, a primeira lacase a ser caracterizada foi em *Azospirillum lipoferum* (DIAMANTIDIS et al., 2000). Diferente da maioria das lacases fúngicas e derivadas de plantas, aquelas provenientes de bactérias são intracelulares, resistem a altas concentrações de íons e permanecem ativas em pH e temperatura elevados (SHARMA et al., 2007; MOROZOVA et al., 2007). Desintoxicação, pigmentação e resistência à radiação UV são outros papéis fisiológicos das lacases bacterianas em algumas espécies de *Bacillus*, por exemplo (DWIVEDI et al., 2011; LONČAR et al., 2013).

Algas como *Tetracystis aeria* e líquens de diversos grupos taxonômicos, tais como *Solorina crocea*, também possuem a capacidade de produzir lacases. Esta última espécie utiliza a enzima no metabolismo da solorinina e do ácido solorínico (OTTO et al., 2010; LISOV et al., 2007). Diversas espécies de insetos também sintetizam lacases, dentre elas: *Riptortus pedestris*, *Nysius plebeius*, e *Bombyx mori*. Nesses animais, a enzima está envolvida em processos como ecdise e pigmentação, por exemplo (FUTAHASHI et al., 2011).

2.1.1 Lacases Fúngicas

Dentre os grupos de fungos, as lacases são típicas dos degradadores de madeira que causam podridão branca pertencentes ao filo Basidiomycota e a um grupo relacionado de fungos saprotróficos, isto é, aquelas espécies que causam degradação da lignina (HATAKKA, 2001). Na literatura, já foi relatado que a grande maioria das espécies de fungos de podridão branca produzem lacase em graus variados, sendo que a enzima foi purificada de muitas espécies desses basidiomicetos. Estas se incluem em gêneros muito estudados em relação à produção de lacase, como *Trametes*, *Pycnoporus* e *Pleurotus*, por exemplo (BALDRIAN, 2006).

Como já mencionado, esses gêneros pertencem aos fungos da podridão branca, que quebram a lignina (e alguns, também celulose) na madeira, deixando, nela, uma cor mais clara, daí o nome do grupo (FLOUDAS et al., 2015). Esses fungos são capazes de produzir enzimas, como a lacase, capaz de oxidar a lignina e outras moléculas orgânicas complexas, sendo investigados para uso em aplicações de micorremediação (COHEN et al., 2002).

Outro grupo de basidiomicetos decompositores é o da podridão parda. Tais

organismos decompõem a hemicelulose e a celulose que formam a estrutura da madeira. A celulose é quebrada pelo peróxido de hidrogênio (H_2O_2) produzido durante a decomposição da hemicelulose, que se difunde rapidamente pela madeira e ocasiona uma descoloração marrom e rachaduras cúbicas. Exemplos de espécies do grupo são: *Schizophyllum commune*, *Fomes fomentarius* e *Serpula lacrymans* (DEACON, 2005).

Além destes, outro grupo de fungos está envolvido na deterioração de madeira: o da podridão mole. Esta é causada por uma gama diversificada de microfungos ascomicetos e deuteromicetos e tem distribuição abrangente em todo o mundo. A madeira apodrecida devido à ação de enzimas lignocelulolíticas visualmente fica cinza e até preta em estágios avançados de decomposição devido à colonização por hifas de fungos na madeira. A superfície da madeira apodrecida também tende a rachar de maneira semelhante à podridão marrom. *Phialocephala dimorphospora* é um exemplo de fungo da podridão mole. (DANIEL, 2016)

2.2 PRODUÇÃO DE LACASE FÚNGICA POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO (SSF) PARA APLICAÇÃO EM PROCESSOS BIOTECNOLÓGICOS

Para aplicações biotecnológicas a produção massal da enzima faz-se necessária e a fermentação em estado sólido (SSF) é um processo muito empregado na produção de enzimas e apresenta vantagens econômicas e biotecnológicas em relação à fermentação submersa.A SSF se caracteriza como o processo de crescimento microbiano em um substrato sólido sem água livre aparente. Na SSF é possível utilizar resíduos agroindustriais sólidos (bagaço de cana, palha de arroz e farelo de soja, por exemplo) que servem como fonte de energia para o crescimento microbiano, contribuindo também para um destino adequado desses resíduos (AITA et al., 2019).

No sistema de SSF deve-se utilizar suportes (material sólido) que permitam o cultivo microbiano, a seleção de um suporte adequado leva em consideração principalmente a porosidade, tamanho de partícula, composição química, disponibilidade e custo. Os materiais sólidos usados em SSF se dividem em duas classes: suportes inertes (compostos sintéticos), que servem como base de fixação do microrganismo e suportes não-inertes (compostos orgânicos) que servem como fonte de nutrientes e fixação. Estes últimos, apesar de dificultarem processos de purificação enzimática, proporcionam redução nos custos de produção (PASTRANA et al., 1995).

Para maximizar a produção enzimática, algumas características dos suportes são

necessárias: distribuição heterogênea de tamanho de partícula ou partículas de tamanho intermediário, substratos com baixos valores do ponto crítico de umidade e com composição química indutora à produção enzimática. Essas características devem ser analisadas para cada isolado, já que dependem de variáveis como tipo de microrganismo utilizado e enzima almejada. Ademais, as características dos substratos devem ser analisadas em conjunto e não isoladamente a fim de estabelecer as condições que levem à maior produção enzimática em SSF (ADEKUNLE et al., 2017).

2.2.1 Suportes inertes

A maioria dos processos de SSF utiliza resíduos de indústrias alimentícias e florestais, suportes não-inertes, como espuma de poliuretano e esponja de nylon, o que evita problemas econômicos e ambientais gerados pelos seus descartes. No entanto, suportes inertes podem tornar os processos de extração e purificação enzimática mais simples e compensar os altos custos dos meios de cultivo (AYDINOĞLU & SARGIN, 2013).

Em um estudo, foi analisada a influência de diferentes suportes inertes na produção de lacase em condições de SSF por *Trametes pubescens*: espuma de poliuretano, esponja de nylon, esponja de aço inoxidável e suporte comercial Kaldnes K1, composto de polietileno em formato cilíndrico e diâmetro de 10 mm utilizado como suporte de crescimento microbiano no tratamento de água (PRATIWI et al.,2018). Este último levou à maior atividade enzimática de lacase (3.667 $U.L^{-1}$) e ainda poderia ser reutilizado, tornando o processo mais economicamente vantajoso (RODRÍGUEZ-COUTO, 2012).

Aqueles substratos com maior superfície específica (área total em relação à massa das partículas) levaram às maiores atividades de lacase. Além disso, constatou-se que a hidrofobicidade do suporte tem grande influência na produção de lacase em condições de SSF (RODRÍGUEZ-COUTO, 2018).

2.2.2 Suportes não-inertes e características do cultivo

Tem havido uma tendência crescente para a utilização de resíduos industriais orgânicos como matéria-prima para produzir lacase sob condições de SSF (OOIJKAAS et al., 2000). O uso de tais resíduos, além de tornar o processo muito mais econômico devido ao seu teor de nutrientes ajuda a amenizar os problemas econômicos e ambientais

causados pelos seus descartes. Além disso, a maioria deles contém lignina ou outros compostos indutores de lacase (MUSSATO et al., 2012).

Neste sentido, resíduos agrícolas são excelentes fontes de carbono e nitrogênio para o crescimento de fungos e produção de lacases em SSF. Em geral, a fonte de resíduos agrícolas lignocelulósicos mais abundante e mais barata é a palha da colheita de culturas como o milho e a soja. Outra fonte abundante é o bagaço-de-cana (BALAT et al., 2008). Além da lignocelulose, certos resíduos agrícolas são ricos em sacarídeos que são facilmente metabolizados por microrganismos ou podem ser usados como suporte devido à sua integridade física (como a casca de banana, por exemplo). Os resíduos lignocelulósicos são bons candidatos para a produção de lacase por SSF, pois podem funcionar como suporte, fonte de nutrientes e indutores. (OSMA et al., 2007)

Exemplos desses resíduos que mostram ser substratos eficazes na produção de lacase sob em SSF são: bagaço-de-cana, casca e palha de arroz, casca de semente de girassol, semente de girassol, farelo de trigo, serragem, palha de milho amoniada, palha de trigo, folhas de milho, dentre outros (WANG et al.,2019). Na tabela 1, vê-se que o bagaço-de-cana e a palha de trigo são substratos que requereram menor tempo de cultivo em relação aos outros e que a temperatura de cultivo para diferentes basidiomicetos e substratos está entre 28 a 30º C.

Os resíduos lignocelulósicos são úteis nos processos de fermentação, mas geralmente é necessário a adição de nutrientes suplementares para promover o crescimento inicial de fungos. As fontes de carbono no meio, além do cobre, promovem o crescimento micelial e induzem a transcrição do gene da lacase, porém, o impacto das fontes de nitrogênio para a produção de enzimas ligninolíticas difere entre organismos (JING, 2010). Alguns tipos de fungos requerem excesso de nitrogênio para proteger a enzima, enquanto outros o inverso. Além disso, o nitrogênio orgânico é mais propício à produção de lacase do que o nitrogênio inorgânico (KARP et al., 2015).

Tabela 1. Atividade enzimática em SSF em diferentes substratos, temperaturas, tempos e espécies.

Substrato sólido	Temperatura (ºC)	Tempo de cultivo (dias)	Fungo	Atividade enzimática	Referência
Palha de trigo	28	8	*Pleurotus ostreatus*	14.189 $U.g^{-1}$ (3.952 $U.g^{-1}$ sem indutores)	PATEL et al. (2009)
Bagaço de tomate e talo de sorgo	28	16/4	*Trametes versicolor*/ *Pleurotus ostreatus*	35 $U.g^{-1}$/15 $U.g^{-1}$	IANDOLO et al. (2011)
Farelo de trigo	30	5	*Pleurotus pulmonarius*	8.600 $U.g^{-1}$	MARQUES DE SOUZA et al. (2002)
Casca e palha de arroz e Casca de semente de girassol	25±3	30-40	*Ganoderma lucidum*	7-23 $U.g^{-1}$	POTEMSKY et al. (2017)
Bagaço de cana	30	7	*Pleurotus ostreatus*	151,6 $U.g^{-1}$	KARP et al. (2015)
Casca de banana	30	20	*Trametes pubescens*	1.600 $U.L^{-1}$	OSMA et al. (2007)
Espiga de milho	28	12	*Trametes hirsuta/Trametes versicolor/Marasmius* sp.	400,56 $U.L^{-1}$/134,03 $U.L^{-1}$/872,09 $U.L^{-1}$	RISDIANTO et al. (2012)
Sementes de uva e Esponja de nylon	30	20	*Trametes hirsuta*	15.000-18.000 $U.L^{-1}$	COUTO et al. (2006)
Resíduo de horticultura	30	3-15	*Trametes versicolor*	3,5-4,0 $U.g^{-1}$	XIN & GENG (2011)
Talo de milho pré-tratado com explosão de vapor.	30	16	*Trametes versicolor*	2.600,33 $U.g^{-1}$	ADEKUNLE et al. (2017)

Fonte: o autor, 2021.

A relação carbono/nitrogênio é um dos principais parâmetros para a produção de lacase em resíduos lignocelulósicos e seu valor ideal pode ser avaliado levando em consideração o microrganismo e a composição do substrato (NANDAL et al., 2013). Uma proporção carbono:nitrogênio (C:N) de 20:1 foi ideal para máxima biossíntese de lacase por *Trametes versicolor* em bagaço de cana-de-açúcar como substrato. Suplementação mineral também é necessária para o crescimento de microrganismos, principalmente o fósforo elementar, já que é imprescindível na estrutura do DNA (SAKDARONNARONG et al., 2012)

Já o teor de água da cultura pode ser um dos fatores mais relevantes, pois afeta a difusão dos compostos fenólicos no substrato, influenciando na transcrição de genes da lacase (MAJEAU et al., 2010). Além disso, um aumento no teor de água está relacionado à maior disponibilidade de açúcar, fator crítico para a produção de lacase na maioria dos fungos (ECONOMOU et al., 2010). A atividade de lacase em *Phlebia floridensis*, cultivada em palha de trigo, aumentou 34 vezes no teor máximo de umidade. (SHARMA e ARORA, 2010)

De fato, a proporção de umidade é decisiva na produção de lacase em SSF. Nesse processo a umidade do substrato sólido deve estar entre 20-70 % para fungos filamentosos (KRISHNA, 2005). PATEL & GUPTE encontraram que a proporção de substrato para meio umidificante (p/v) ideal foi de 1:4 para produção máxima de lacase de *Tricholoma giganteum* em palha de trigo (PATEL & GUPTE, 2016). Já JASIM encontrou a proporção ideal de 1:3 (p/v) para produção máxima de lacase de *Pleurotus ostreatus* em serragem (JASIM, 2012).

Quanto à luminosidade aplicada em SSF, ADEKUNLE e colaboradores cultivaram, na ausência de luz, *Trametes versicolor* em talo de milho para produção de lacase (ADEKUNLE et al., 2017). De mesmo modo, COUTO e colaboradores empregaram *Trametes hirsuta* em sementes de uva e esponja de nylon para produção da enzima sob escuridão (COUTO et al., 2006). Assim também, OSMA e colaboradores cultivaram sem luminosidade *Trametes pubescens* em casca de banana para obtenção de lacase (OSMA et al., 2007). Na maioria dos estudos para produção de lacase fúngica sob SSF a fermentação ocorre na ausência de luz. A presença ou ausência de luz é uma fonte importante de informação para uma regulação metabólica com economia de energia e influencia na produção de lacase por *Pycnoporus sanguineus*, por exemplo. Isso porque o desenvolvimento micelial desse fungo ocorre, naturalmente, dentro do substrato lignocelulósico na ausência de luz. Nessa condição o fungo produz lacase para degradar o substrato e obter energia sendo que, quando há presença de luz, o fungo cessa essa

produção interpretando esse sinal regulatório como ausência de lignocelulose (HERNÁNDEZ et al., 2016).

O inóculo também é um fator significativo na produção de enzimas na SSF. Um nível baixo de inóculo pode ser insuficiente ao crescimento fúngico, enquanto um nível elevado pode causar inibição competitiva, de modo que determinar a quantidade de inóculo é crucial na SSF (SABU et al., 2005). REVANKAR e colaboradores obtiveram atividade de lacase máxima com *Ganoderma* sp. em farelo de trigo utilizando 7 discos (0,8 mm de diâmetro) de ágar do fungo previamente cultivado (REVANKAR et al., 2007). De modo similar, PATEL e colaboradores cultivaram sob SSF *Pleurotus ostreatus* em palha de trigo e obtiveram atividade de lacase máxima com 5 discos (0,8 mm de diâmetro) de ágar do cultivo fúngico em placa (PATEL et al., 2009). HU & DUVNJAK, com 1,1 mg de biomassa fúngica de *Pleurotus ostreatus* por grama de resíduo de canola, obtiveram atividade de lacase máxima (300 nkat/g) sob SSF (HU & DUVNJAK, 2004).

O inóculo para SSF é geralmente preparado crescendo micélio fúngico em meio líquido ou retirando fragmentos (plugs) das extremidades de um cultivo (em ágar, por exemplo) estabelecido (MATSUBARA et al., 2006). Em alternativa a esses métodos, ANG e colaboradores desenvolveram o Cultivo em Filme Celofane (CFC) que consiste no cultivo do inóculo em placas de ágar cobertas por filme celofane. Esta técnica facilita a separação da biomassa, permite a produção em grande quantidade e é menos suscetível a contaminações em relação às técnicas convencionais (ANG et al., 2013).

Levando os resultados apresentados na tabela 1 recomenda-se a metodologia de MARQUES DE SOUSA e colaboradores para produção de lacase em estado sólido por basidiomiceto (MARQUES DE SOUSA et al., 2002). Isso porque essa, em comparação com a proposta por PATEL e colaboradores, obteve maior produção de lacase sem o uso de indutores (PATEL et al., 2012). Além disso, em comparação com o trabalho de COUTO e colaboradores, o tempo de cultivo é quatro vezes menor e não apresenta a necessidade de suporte inerte, mesmo assim obtendo cerca da metade de produção enzimática em relação a esse trabalho (COUTO et al., 2006).

2.3 MÉTODOS DE EXTRAÇÃO ENZIMÁTICA (LACASE)

Visando a aplicação biotecnológica uma das etapas cruciais para obtenção do produto é a extração enzimática. Inicialmente no processo de obtenção de uma enzima, o escopo das etapas de extração e clarificação é preparar uma amostra clarificada de

proteína solúvel a partir do material de origem para posterior purificação, além de remover material particulado ou outros contaminantes que não são compatíveis com técnicas cromatográficas (lipídeos e DNA, por exemplo). O procedimento a se escolher para atingir esses objetivos depende da origem da amostra. No caso em que a proteína alvo é secretada no meio de cultura, a centrifugação ou a filtração podem ser suficientes para produzir uma amostra clarificada para iniciar a cromatografia. Geralmente, porém, é preciso extrair a proteína das células hospedeiras em que foi expressa. Qual método deve-se usar em um caso particular depende do tipo de célula hospedeira e da quantidade de células a serem lisadas (EMBL, 2020).

Ademais, deve-se considerar a adsorção de enzimas extracelulares ao substrato. Por exemplo, SAARINEN e colaboradores constataram que lacases de *Trametes hirsuta* e *Melanocarpus albomyces* adsorveram em superfícies de celulose e lignina em valores de pH ácidos e neutros (4,5 e 7,5) (SAARINEN et al., 2009). Nesse sentido, considerando que resíduos agroindustriais são compostos em até 25% de lignina e em até 50% de celulose e amplamente utilizados em SSF, nota-se a importância de utilizar um componente, tal como um tampão, que aumente o pH do meio e facilite a extração de lacase após SSF nessa classe de resíduos (ANWAR et al., 2014).

Assim, um exemplo de método de extração de lacase produzida por SSF utiliza tampão acetato que é misturado ao meio fermentado formando uma mistura que é então agitada, centrifugada e seu sobrenadante corresponde ao extrato enzimático cru (PERDANI et al., 2020). Outro método consiste em utilizar água destilada ao invés do tampão, seguido de filtração, centrifugação e coleta de sobrenadante (IQBAL et al., 2011). Também é possível suspender o fermentado em água bidestilada, adicionar tampão fosfato de sódio, fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF, um inibidor de protease), centrifugar e coletar o sobrenadante. Na tabela 2 há esses e outros métodos de extração de lacase produzida em SSF por *Trametes versicolor* (IANDOLO et al., 2011).

RAHAYU e colaboradores extraíram lacase adicionando tampão acetato de sódio 0,2 $mol.L^{-1}$ (pH 5,5) aos biorreatores após o oitavo dia de incubação de *Trichoderma asperellum* em palha de arroz. Após houve agitação (150 rpm por 10 min) e centrifugação (8.000 rpm), decantação, filtração por um papel microfibra de vidro (GF/C). A solução enzimática foi lavada com o tampão e ultrafiltrada usando membranas de 10 kD. A solução enzimática foi então conservada a -20º C (RAHAYU et al., 2019).

KARP e colaboradores extraíram enzimas produzidas por *Pleurotus ostreatus* em

SSF utilizando bagaço-de-cana como substrato através de extração sólido-líquida usando tampão fosfato de sódio ($NaH_2PO_4 \cdot H_2O$, 50 mM, pH 7,0) na proporção de 1:10 (p/p) a uma alíquota (1g) de amostra fermentada. Foi adicionado um inibidor de protease (PMSF 1mM) à mistura, que foi vortexada, centrifugada (7,500 g, 4° C, 45 min) e teve o sobrenadante separado para análise (KARP et al., 2015).

PERDANI e colaboradores, após SSF de *Trametes versicolor* em casca de arroz, talo de milho e bagaço-de-cana, misturaram os meios fermentados com tampão acetato de sódio (50 mM, pH 5,0), agitaram a 120 rpm por 60 min e filtraram as misturas resultantes utilizando tecido musseline e então centrifugadas a 9.000 rpm. O sobrenadante obtido foi testado para atividade de lacase utilizando espectrofotômetro UV-VIS com comprimento de onda a 240 nm (PERDANI et al., 2020).

POTEMSKY e colaboradores, após fermentarem resíduos de cultura de arroz e girassol utilizando *Ganoderma lucidum* extraíram enzimas coletando uma amostra (6g) dos reatores e colocando-a em água destilada (pH 5,5). Esta foi, então, cortada com um bisturi por 30s e reservada a 4º C por 16h. Após, essa mistura foi comprimida (5 $kg.cm^{-2}$), o líquido coletado, medido seu volume e separado em 3 alíquotas (n=3) que foram centrifugadas (6.000g) e tiveram os sobrenadantes coletados para obter o extrato enzimático cru (POTEMSKY et al.,2017).

AYDINOĞLU & SARGIN após operarem SSF de *Trametes versicolor* em folhas de oliveira extraíram a lacase adicionando água destilada a cada biorreator (frasco) deixando-a em contato com o fermentado por 30min, agitando com bastão de vidro a cada 10min. Então a mistura foi filtrada em tecido musseline e centrifugada (4º C, 9.000 rpm, 10 min), tendo o sobrenadante sido coletado para análise de atividade enzimática em espectrofotômetro à 420 nm utilizando ABTS como substrato (AYDINOĞLU & SARGIN, 2013).

2.3.1 Semi-purificação de Lacases

O processo de extração de uma enzima resulta em uma solução altamente contaminada com resíduos celulares, muitas enzimas, proteínas diversas e componentes do método de cultivo. Essa contaminação diminui drasticamente a atividade enzimática especialmente devido à falta de especificidade da solução. Neste sentido, o isolamento da enzima de interesse faz-se necessário. O processo de isolamento é conhecido como purificação enzimática (CONFORTIN, 2019).

O nível de purificação de uma enzima depende do uso a que se destina, para isso, é necessário o desenvolvimento de métodos e materiais de purificação eficientes e eficazes para cada processo. Os métodos de purificação podem ser classificados como de baixa resolução (semi-purificação) ou alta resolução, e exploram diferenças em propriedades químicas, físicas e funcionais entre a proteína-alvo e outras proteínas no extrato enzimático cru. Geralmente, a purificação de alta resolução utiliza cromatografia como método de separação (LABROU, 2014).

A purificação enzimática pode ser um processo único ou de várias etapas. Um processo completo de *downstream* pode ser realizado em duas operações: na primeira ocorre uma separação sólido/líquido inicial por filtração e centrifugação seguida de uma separação baseada nas características de solubilidade da enzima. Na segunda etapa, a purificação enzimática pode ser alcançada através de técnicas cromatográficas de troca iônica e de filtração em gel (PANNU & KAPOOR, 2014).

Na purificação de extratos brutos de proteínas, esse primeiro passo comum para as isolar a enzima é a precipitação usando um sal como o sulfato de amônio $(NH4)_2SO_4$. Esse processo é chamado “Salting In” ou “Salting Out” e pode ser caracterizado como uma semi-purificação que permite maior pureza da solução enzimática bruta. Tal característica implica em uma maior eficiência e atividade específica da enzima-alvo. Uma vantagem desse método é que ele pode ser executado de forma barata com volumes muito grandes (WESTERN OREGON UNIVERSITY, 2019).

Tabela 2. Atividade enzimática de lacase produzida em SSF por *Trametes versicolor* extraída por diferentes métodos para SSF de basidiomicetos e produção de lacase.

Substrato sólido	Temperatura (ºC)	Tempo de cultivo (dias)	Método de extração da lacase	Atividade enzimática	Referência
Talo de milho tratado com explosão de vapor e adição de nutrientes	Temperatura ambiente	13	50 mL tampão acetato (50 mM, pH 5,0). Agitação 120 rpm/60min.	6,88 $U.mL^{-1}$	PERDANI et al. (2020)
Palha de arroz	30	3	Água Destilada. Agitação 120 rpm/30min. Filtração.	99 $U.mL^{-1}$	IQBAL et al. (2011)
Bagaço de tomate + Talos de sorgo	28	22	50 mM tampão fosfato de sódio pH 6,8 + 1 mM Fluoreto de fenilmetilsulfonil.	38 $U.g^{-1}$	IANDOLO et al. (2011)
Resíduo de horticultura	30	7	5g substrato + 50mM tampão acetato de sódio (pH 4,8). Agitação 150 rpm/2h/30º C. Centrifugar 12.000g/4º C/20min.	8,6 $U.g^{-1}$	XIN & GENG (2011)
Grãos usados na fermentação de cerveja	30	16	1,5 g fermentado+50mM tampão fosfato sódio (pH 6,5)+agitador de pulso/20min. Centrifugar 9.000g/15min/4º C	10.108 $IU.g^{-1}$	DHILLON et al. (2012)
Parthenium sp.	30	20	5g fermentado+100mM tampão CP (pH 4,0)+0,1% Tween 80: 2h temperatura ambiente + agitação manual. Filtração.	185 $U.g^{-1}$	SINGH et al. (2019)

Fonte: o autor, 2021.

A purificação da lacase é uma etapa essencial para a determinação de parâmetros cinéticos precisos devido à possível presença de metabólitos secundários do fungo produtor ou enzimas semelhantes que podem exibir cinética de reação significativamente diferente (RITTSTIEG et al., 2003). O método mais empregado para purificação de lacase é a eluição de sal de uma resina de troca aniônica, devido à maior estabilidade da lacase a pH neutro a ligeiramente alcalino, bem como ao ponto isoelétrico desse tipo de enzima (PATEL et al., 2014).

Para a determinação da homogeneidade, pureza e peso molecular da lacase obtida durante e após os processos de purificação, pode-se utilizar eletroforese em gel SDS-Page, que consiste numa separação do extrato enzimático por peso molecular seguida de marcação com o substrato da lacase e fixação dessa marcação, que geralmente resulta na emissão de um sinal caso a enzima esteja presente. Através do SDS-page é possível acompanhar o processo de isolamento da enzima e faz parte da rotina de purificação mesmo em metodologias de alta resolução (MORE et al., 2011).

CORDI e colaboradores semi-purificaram um extrato enzimático cru de lacase filtrando-o em uma membrana Milipore 0,45 µm e liofilizando o filtrado. Então, uma solução contendo 2,0 g de extrato liofilizado e 30 mL de tampão fosfato citrato 75 mmol.L^{-1} (pH 5,0) foi precipitada com sulfato de amônio a 90% (CORDI et al., 2007).

NILADEVI & PREMA concentraram o extrato enzimático cru que obtiveram utilizando precipitação fracionada utilizando sulfato de amônio em uma saturação entre 30-60 %. Depois da centrifugação o precipitado foi ressuspendido em buffer fosfato de sódio 50 mM (pH 7,0) e dialisado extensivamente no mesmo buffer. A atividade da lacase dialisada foi medidia espectrofotometricamente monitorando a oxidação de ABTS a 420 nm (NILADEVI & PREMA, 2008).

JHADAV e colaboradores purificaram parcialmente extrato enzimático cru obtido da fermentação em estado sólido de *Phanerochaete chrysosporium* em agro-resíduos de milho, trigo e arroz. Para isso, dializaram o extrato em buffer Tris-HCL 20 mmol.L^{-1} (pH 7,5). O extrato dializado foi, então, submetido à cromatografia de troca iônica usando uma coluna DEAE e como eluente 0,1-1,0 mol.L^{-1} NaCl. A amostra purificada foi, então, analisada em SDS-PAGE (JHADAV et al., 2009).

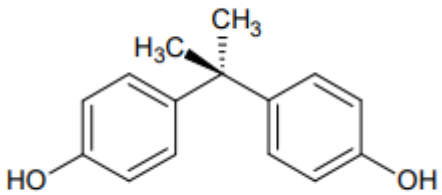
Após produção enzimática de *Trichophyton* sp. sob SSF em farelo de trigo como substrato, NNAMCHI e colaboradores obtiveram extrato enzimático cru do fermentado. Este foi semi-purificado utilizando precipitação com sulfato de amônio e diálise. A concentração

de 90% de sulfato de amônio obteve maior atividade de lacase e, portanto, foi utilizada pra precipitação de uma amostra de lacase crua. Após 24h, a amostra foi centrifugada, o precipitado coletado e ressuspendido em buffer acetato de sódio 0,1 mol.L^{-1} (pH 5,0) e dialisado por 12h no mesmo buffer(NNAMCHI et al., 2019).

2.4 BISFENOL A

O bisfenol A (BFA), [2′-bis- (4- hidroxifenil) propano] ou 4,4′-isopropilidenodifenol, é o poluente emergente mais comumente detectado em ecossistemas aquáticos (YING et al., 2009; KANG & KATAYAMA, 2008). Suas características químicas são apresentadas na tabela 3 e figura 2. Essa molécula tem sido extensivamente estudada devido sua ampla aplicação como monômero na fabricação de resinas epóxi e plástico policarbonato (CAREGHINI et al., 2015). Neste sentido, essas resinas são utilizadas na preparação de mamadeiras de policarbonato para crianças e revestimentos epóxi de embalagens alimentícias (DEKANT e VÖLKEL, 2008). No entanto, foi classificado como CDE (Composto Desregulador Endócrino) pela Agência de Proteção Ambiental dos EUA (EPA) porque interfere no metabolismo de hormônios naturais associados à homeostase, comportamento ou reprodução em organismos vivos. (BARRIOS-ESTRADA et al., 2018; BILAL & IQBAL, 2019b).

Figura 2. Estrutura Molecular do Bisfenol A



Fonte: SANTANA. 2018

Tabela 3. **Características físico-químicas do BFA**

Parâmetro	Especificação
Fórmula Molecular	C15H1602
Peso Molecular	228,291 g/mol
Ponto de fusão	150-157° C
Ponto de Ebulição	250-252° C
Ponto de Inflamação	227 °C
Solubilidade em água	0.12 mg/mL a 25 °C
Densidade	1,2 g/cm^3 a 25 °C

Fonte: adaptado de NATIONAL, 2019

Somado a esse efeito deletério, o BFA pode causar feminização, devido à alteração de atividade estrogênica, em diferentes espécies de animais e mostrou efeitos adversos à saúde em ratos de laboratório (VOM & HUGHES, 2005). Há poucos estudos relatando a influência do BFA nos seres humanos, no entanto, seus efeitos adversos nos animais revelam impactos potencialmente danosos em *Homo sapiens*, como demonstrado por estudos que correlacionam essa molécula com abortos espontâneos e doenças do ovário (SUGIURA-OGASAWARA et al., 2005). Presume-se que a exposição ao BFA cause problemas de desenvolvimento, reprodutivos, neuroquímicos, comportamentais, diabetes tipo 2 e câncer de próstata e de mama humano (WETHERILL et al., 2002; ANDERSON et al., 2012). Além disso, a exposição materna ao BFA resulta em alterações pós-parto na metilação do DNA, interrompendo a programação epigenética da expressão gênica durante o crescimento infantil. (KUNDAKOVIC & CHAMPAGNE, 2012).

Os tratamentos físico-químicos convencionais são as etapas de coagulação, floculação, decantação e posteriormente a filtração, cloração e fluoretação onde separam os resíduos da parte líquida (SAAE et al., 2006), entretanto, não existe uma etapa de tratamento específica para tratar o BFA e outros contaminantes emergentes (PESCARA, 2014). Devido à sua forte capacidade de oxidação e desempenho de tratamento estável, o processo Fenton pode degradar substâncias orgânicas em uma alta taxa reativa e com eficácia estável e tem sido estudado como alternativa ao tratamento do BFA (WANG et al., 2020).

Um dos desafios no tratamento do BFA é sua dificuldade de detecção. Conforme Barcellos, para quantificar o BFA podem ser utilizadas diversas técnicas, especialmente as

técnicas cromatográficas, sendo a cromatografia líquida a técnica mais empregada e pode ser acoplada a detectores espectrofotométricos UV-Vis e de fluorescência (BARCELLOS, 2019).

Souza averiguou que, através de sua metodologia, a biorremediação do BFA pela lacase bruta se mostrou eficiente, pois na primeira hora de reação foi reduzida cerca de 50% da concentração inicial de bisfenol A, e após 10 h de reação já não foi mais possível detectar o contaminante em solução. A autora comparou duas técnicas de detecção de bisfenol A e constatou, também, que a espectrofotometria UV-Vis derivativa é cabível em relação à cromatografia líquida já que se trata de uma técnica com menor custo em relação a equipamentos e reagentes, além de não requerer separações prévias da amostra (SOUZA, 2017). Diferentes metabólitos derivam da degradação de BFA pela lacase, como por exemplo, acetoacetato de etila, benzaldeído e nonadecano podendo eles serem mais ou menos tóxicos individualmente que o próprio BFA (TEODORO et al., 2018).

3. OBJETIVOS GERAIS

O presente projeto tem como objetivo levantar informações sobre o potencial de degradação do bisfenol A (BFA) através da enzima lacase produzida por fungos a partir de artigos publicados em periódicos internacionais.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar o número de artigos que utilizam lacases no tratamento do BFA por meio da busca com palavras-chave.
- Identificar o período de maior impacto das citações e selecionar os artigos mais relevantes.
- Caracterizar a origem da enzima lacase utilizada
- Avaliar e descrever as melhores formas de tratamento do BFA usando lacases.
- Identificar patentes relacionadas à degradação de BFA por lacases
- Delinear o potencial biotecnológico de lacases no tratamento do BFA.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

O trabalho de levantamento de dados iniciou-se em 25 março de 2021 até 15 de abril de 2021. Foram utilizados os bancos de dados *Science Direct* e *PubMed*, trabalhando apenas com artigos científicos indexados. Todos os artigos foram baixados no Portable Document Format (Formato Portátil de Documento – PDF) e salvos no banco de dados do computador pessoal (NEVES, 2013).

4.1 SELEÇÃO DAS PALAVRAS-CHAVE E PERÍODO DO LEVAMENTO BIBLIOGRÁFICO

Inicialmente para definição das palavras-chave que foram utilizadas no levantamento bibliográfico selecionou-se artigos relacionados com o assunto e usados anteriormente no desenvolvimento do referencial teórico (sessão 2). Para auxiliar no processo foi gerada uma nuvem de palavras utilizando o aplicativo Pro Word Cloud®.

Para seleção do período do levantamento bibliográfico foi realizado em estudo comparativo nos bancos de dados *Science Direct* e *PubMed.*

4.2 LEVANTAMENTO BIBLIOGRÁFICO PARA AVALIAÇÃO DOS TRATAMENTOS DO BFA USANDO A LACASE PURIFICADA

Foram utilizados 116 artigos selecionados a partir das palavras-chaves “fungi”; “laccase”; “bisphenol a”, e “purified”. Esses artigos foram inicialmente triados e os artigos que não apresentaram no resumo o fungo de origem da enzima foram descartados (tabela 4). No final, 14 trabalhos foram avaliados na íntegra e utilizados para levantar as informações sobre os tratamentos do BFA usando a lacase purificada e lacase bruta (com mediadores).

Tabela 4. Artigos selecionados do período 2016-2021 nos bancos de dados *ScienceDirect* e *PubMed* para avaliação dos tratamentos do BFA usando a lacase purificada.

Autores	Fungo(s)	Ano
ScienceDirect		
OLAJUYIGBE et al.	*Cyberlindnera fabianii*	2019
BARRIOS-ESTRADA et al.	*Pycnoporus sanguineus*; *Trametes versicolor*	2018
BILAL et al.	*Trametes versicolor*	2019
BRUGNARI et al.	*Pleurotus ostreatus*	2018
ZHAO et al.	*Pycnoporus sanguineus*	2018
JI et al.	*Pleurotus ostreatus*	2017
PubMed		
BARRIOS-ESTRADA et al.	*Pycnoporus sanguineus*; *Trametes versicolor*	2018
OLAJUYIGBE et al.	*Cyberlindnera fabianii*	2019
SAITO et al.	*Stropharia rugosoannulata*	2004

Fonte: o autor, 2021.

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 SELEÇÃO DAS PALAVRAS-CHAVE E PERÍODO DO LEVAMENTO BIBLIOGRÁFICO

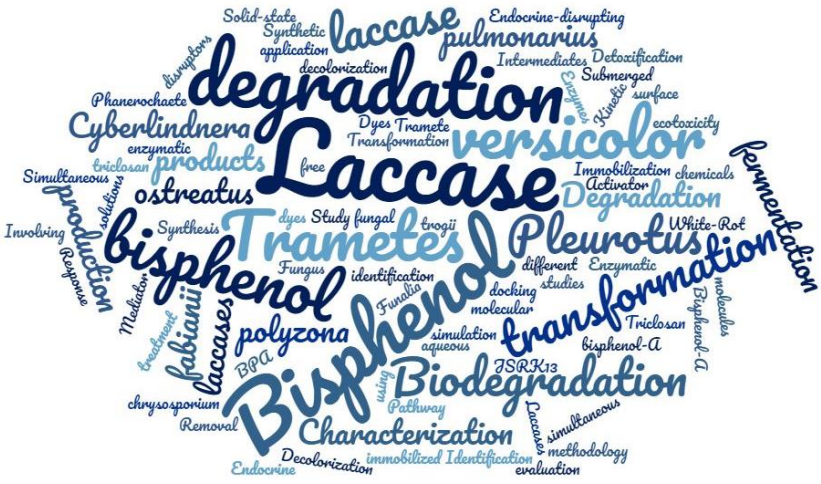
Para definição das palavras-chave foram compilados os dados dos artigos científicos usados no referencial teórico (sessão 2) desse trabalho e apresentados na tabela 5. A partir dos dados levantados, escolheu-se as palavras-chave mais recorrentes dentre os artigos selecionados com base também em seus títulos (Figura 3).

Tabela 5. Avaliação inicial dos artigos relacionados ao trabalho para seleção das palavras-chave.

Nome do artigo	Palavras-chave	Ano
Simultaneous laccase production and transformation of bisphenol-A and triclosan using *Trametes versicolor*	Bisphenol-A · Triclosan · Laccase · Laccase production and simultaneous transformation · Solid-state fermentation · Submerged fermentation · *Trametes versicolor* JSRK13	2019
Kinetic studies of Bisphenol A in aqueous solutions by enzymatic treatment	Endocrine-disrupting chemicals · Laccase · *Phanerochaete chrysosporium* · Response surface methodology	2019
Removal of bisphenol A and evaluation of ecotoxicity of degradation products by laccases from *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus pulmonarius*	Biodegradation · Bisphenol A · Laccase · *Pleurotus ostreatus* · *Pleurotus pulmonarius*	2017
Biodegradation and Detoxification of BPA: Involving Laccase and a Mediator	Activator molecules · Bisphenol A · Endocrine disruptors · Enzymes · *Funalia trogii*	2015
Study on transformation and degradation of bisphenol A by *Trametes versicolor* laccase and simulation of molecular docking	*Trametes versicolor* · Laccase Bisphenol A · Transformation · Degradation	2019
Degradation of bisphenol A by different fungal laccases and identification of its degradation products	Bisphenol A · Laccases · Biodegradation · Identification · Intermediates · Pathway	2016
Biodegradation of Bisphenol A and Decolorization of Synthetic Dyes by Laccase from White-Rot Fungus, *Trametes polyzona*	Laccase . Tramete polyzona . Bisphenol A degradation . Synthesis dyes decolorization	2013
Characterization of free and immobilized laccase from *Cyberlindnera fabianii* and application in degradation of bisphenol A	Laccase · Characterization · Enzymatic degradation · Bisphenol A · Immobilization · *Cyberlindnera fabianii*	2018

Fonte: o autor, 2021.

Figura 3 - Nuvem de Palavras (NP) gerado pelo aplicativo Pro Word Cloud® a partir do texto da tabela 4.



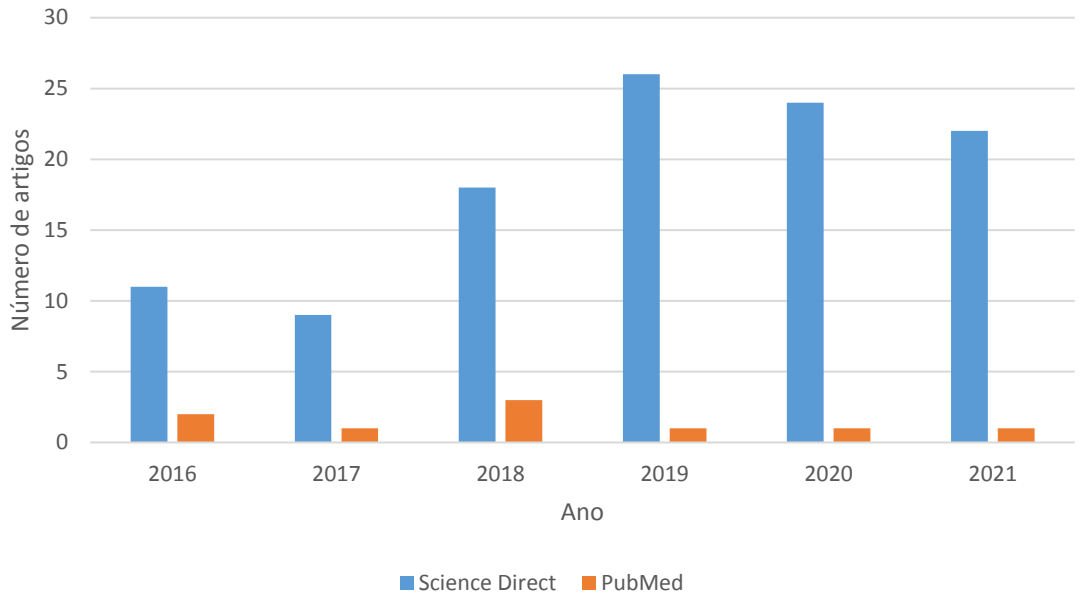
Fonte: https://wordcloud.pro/en, 2021.

Inicialmente, as palavras escolhidas foram “fungi”; “laccase”; “bisphenol a”. Apesar de não apresentado na figura 3, a palavra “fungi” foi selecionada em substituição aos nomes dos fungos destacados. Uma busca simplificada foi realizada no banco de dados *ScienceDirect* e resultou em 410 artigos. Como elas foram muito abrangentes, visto o número de resultados de busca nos bancos de dados, decidiu-se incluir uma quarta palavra: “purified”. Essa palavra foi selecionada visando a análise do potencial da lacase purificada, descartando os estudos com o extrato enzimático bruto.

No total, as palavras-chave utilizadas para busca resultaram em 195 artigos no *Science Direct* sem restrição de ano e 110 resultados entre os anos 2016-2021. No caso do *PubMed*, as palavras-chave resultaram em 13 artigos sem restrição de ano e 6 artigos entre os anos 2016-2021. Sendo esse período selecionado para o levantamento bibliográfico. Essa discrepância de resultados entre as bases de dado possivelmente se deu pelo *PubMed* focar em artigos voltados à área biomédica.

Entre os anos com maior número de resultados na busca com as palavras-chave “fungi”; “laccase”; “bisphenol a”, e “purified” dentro do período de 2016 a 2021 (Gráfico 1) aquele que teve maior impacto no número de artigos como resultado no *ScienceDirect* foi 2019, com 26 artigos. Já no PubMed o ano de maior impacto foi o de 2018, com 3 artigos conforme mostra o gráfico 1.

Gráfico 1. Número de artigos dos bancos de dados *Science Direct* e *PubMed* gerados a partir das palavras-chave “fungi”; “laccase”; “bisphenol a”, e “purified” no período de 2016 a março de 2021.



Fonte: o autor, 2021.

5.2 TRATAMENTO DO BFA USANDO A LACASE PURIFICADA

O uso de enzimas microbianas para o tratamento biológico pode ocorrer através do cultivo e produção direta microbiana no poluente ou através da adição de enzimas isoladas, purificadas ou semi-purificadas, e ou imobilizadas. Como mencionado anteriormente, o método mais comumente utilizado para purificação de lacase é a eluição de sal de uma resina de troca aniônica, provavelmente devido à maior estabilidade da lacase em pH neutro a levemente alcalino, bem como através do ponto isoelétrico das lacases (RITTSTIEG et al., 2003).

Diversos trabalhos, como os citados logo a seguir, relatam o tratamento de BFA desde a produção e purificação da lacase. Contudo, diferentes concentrações da enzima e do BFA foram testadas.

Olajuyigbe e colaboradores extraíram e purificaram lacase de *Cyberlindnera fabianii* com cromatografia de troca iônica e de filtragem em gel. A degradação de 100 µM de bisfenol A foi testada em uma mistura com 250 µL de lacase livre (LC) e imobilizadas em acrilamida com cálcio e com cobre (LCa e LCu, respectivamente) mais 1 mL de reagente

Folin-Ciocalteu. A primeira absorbância medida (espectrofotômetro UV-VIS) foi 1h após feita a mistura e continuou sendo avaliada de 3h em 3h durante 24h e de 2 em 2 dias até 14 dias. Após 24h a LC degradou 48,2 % de BFA, LCa degradou 42,7 % de BFA e LCu degradou 39,1% de BFA (OLAJUYIGBE et al., 2019).

Barrios-Estrada e colaboradores isolaram e purificaram lacase de *Pycnoporus sanguineus* e utilizaram também a lacase comercial Sigma-Aldrich® do fungo *Trametes versicolor* como controle. Neste estudo, 100% de degradação de bisfenol A (20 $mg.L^{-1}$) foi alcançada em menos de 24h na presença de lacase de *P. sanguineus* (620.55±14.85 $U.L^{-1}$) e *T. versicolor* (620.55±14.85 $U.L^{-1}$). A determinação da percentagem de BFA degradado foi feita utilizando HPLC-UV equipado com uma coluna Onyx (BARRIOS-ESTRADA et al., 2018).

Bilal e colaboradores utilizaram lacase livre e imobilizada de *T. versicolor* em esferas de quitosana para degradação de BFA. O teste de degradação de BFA foi feito com este na concentração de 10 $mg.L^{-1}$ utilizando a enzimas nas duas formas (livre e imobilizada) e medindo a degradação espectrofotometricamente após 150 min de reação. Após 2h de tratamento, 97,7% de BFA foi degradado com a lacase livre e 86,6% de BFA degradado com lacase imobilizada (BILAL et al., 2019c).

Brugnari e colaboradores utilizaram lacase parcialmente purificada de *Pleurotus ostreatus* de forma livre e imobilizada em MANAE-agarose para teste de degradação de BFA. Foi utilizada 5 $U.mL^{-1}$ de enzima, nas duas formas, com 100 $mg.L^{-1}$ de BFA por 60 min. O resultado da degradação foi mensurado com espectrofotômetro e 50% do BFA foi transformado utilizando lacase imobilizada em 20 min e em 27 min utilizando lacase livre (BRUGNARI et al., 2018).

Zhao e colaboradores clonaram gene da lacase de *Pycnoporus sanguineus* em plasmídeo recombinante de *Trichoderma reesei*. A lacase recombinante foi capaz de degradar eficientemente 95% de BFA após 1 h de reação com 0,06 $IU.mL^{-1}$ de lacase com 25 $mg.L^{-1}$ de BFA cujas concentrações foram aferidas com auxílio de detector UV (ZHAO et al., 2018).

Ji e colaboradores extraíram a enzima lacase de *Pleurotus ostreatus* e a imobilizaram em nanopartículas de titânio (TiO2) para avaliar a capacidade de degradar BFA. Com 0,4 $U.L^{-1}$ de enzima imobilizada observou-se rápida degradação de BFA, 90% em 6h. No experimento de degradação com enzima livre 75% da atividade enzimática foi perdida no final da degradação comparada a 18% da enzima imobilizada. A análise quantitativa após

degradação de BFA foi feito com HPLC com detector UV (JI et al., 2017).

Saito e colaboradores a partir de um fungo isolado de solo da família *Chaetomiaceae* purificou-se a lacase produzida por ele utilizando precipitação e cromatografia de troca iônica. Uma quantidade de 50 $U.mL^{-1}$ dessa enzima foi colocada em uma mistura reativa contendo bisfenol A 5 mM sendo o pH 7,0 e a temperatura 40º C. Os resíduos de BFA foram analisados por HPLC e obteve-se a remoção de 93,7% desse composto após 1h de reação (SAITO et al., 2004).A partir desses estudos utilizando lacase purificada para tratamento de bisfenol A, pode-se inferir que, aparentemente, aquele que obteve maior taxa de degradação de BFA (95%) com menor tempo (1h) e quantidade de lacase (0,06 IU) foi o de ZHAO e colaboradores (ZHAO et al., 2018). Esse trabalho utilizou a enzima recombinante o que pode ter favorecido a eficiência na degradação devido possivelmente a alta facilidade de purificação de enzimas recombinantes que resultam em estabilidade e maior atividade catalítica (PREETHI et al., 2020). Já o trabalho que apresentou a menor eficiência na degradação, supostamente, foi o de OLAJUYIGBE e colaboradores cuja taxa de degradação de BFA foi de 48,2% em um tempo de 24h utilizando 250 µL de lacase livre (concentração desconhecida) (OLAJUYIGBE et al., 2019). Logo, tempos maiores de reação não implicam necessariamente em uma maior taxa de degradação de BFA.

5.3 TRATAMENTOS DO BFA USANDO O EXTRATO ENZIMÁTICO E MEDIADORES

Apesar das vantagens do uso de lacases purificadas, em alguns casos, enzimas purificadas podem possuir menor potencial de oxidar o BFA devido à ausência de mediadores, compostos sintéticos ou naturais de pequeno peso molecular que atuam em reações redox e melhoram a atividade enzimática, e estão presentes naturalmente no cultivo do fungo. Em contrapartida é possível, também, que haja moléculas interferentes à atividade da lacase no extrato não purificado, sendo necessário avaliar se compensa o uso dos mesmos no tratamento de BFA (CAÑAS E CAMARERO, 2010). Diversos trabalhos, nesse sentido, não especificam a purificação da lacase o que dificulta a elaboração de uma análise sistemática e comparativa.

Vários estudos utilizaram reações homogêneas catalisadas por lacases para a biotransformação e biodegradação de BFA de águas residuárias com e sem adição de mediadores redox. Por exemplo, Singh e colaboradores obtiveram 90% de degradação de 1 mL de BFA (250 µM) após 24 h (28º C) de tratamento com 1 mL de extrato bruto de lacase

(100 U.mL^{-1}) produzida pelo fungo *T. versicolor* utilizando HBT como mediador redox (SINGH et al., 2019). Já Nejad e colaboradores utilizando lacase livre de *Phanerochaete chrysosporium* na concentração de 3 U.mL^{-1} em pH 8,0 a 40º C sobre uma concentração de 2 mM de BFA em 3h, relataram degradação de 93% de bisfenol (NEJAD et al., 2019)

Em outro estudo, de Freitas e colaboradores utilizaram lacases brutas de *Pleurotus ostreatus* e *Pleurotus pulmonarius* para degradar o BFA em solução aquosa. O bisfenol residual foi quantificado por HPLC e os metabólitos do BFA produzidos pela ação das lacases foram identificados por cromatografia gasosa. O BFA a 100 mg.L^{-1} e 200 mg.L^{-1} foi removido em 100% e 85%, respectivamente, em uma reação de 1 h pelas duas lacases fúngicas na concentração de 8 U.L^{-1} sob pH 5,0 a 28º C (de FREITAS et al., 2017).

Os resultados de Atacag Erkut demonstraram que possivelmente não há necessidade de isolamento enzimático para a biodegradação enzimática do BFA. Nessa pesquisa, foram comparadas as eficiências de biodegradação da lacase pura comercial de *T. versicolor*, extrato bruto de *Funalia trogii* e da mistura de lacase pura de *T. versicolor* e extrato bruto de *F. trogii* inativado termicamente. O BFA (50 mg.L^{-1}) foi completamente removido pelo extrato bruto e com a mistura, enquanto apenas 30% foi removido com lacase pura (23-24 U) sob incubação a 40º C, pH 5,0-6,0 e agitação a 150 rpm no escuro (ATACAG ERKUT, 2015).

Hongyan e colaboradores analisaram a interação entre a lacase de *T. versicolor* e BFA por meio de “docking molecular” (um método que prevê a orientação preferencial de uma molécula a uma segunda, quando ligados entre si para formar um complexo estável), e a degradação catalítica do BFA foi verificada por experimentos. Os resultados do *docking* demonstraram que a reação entre a lacase bruta e o BFA foi espontânea e a taxa de degradação em 24h atingiu 88,76 %. Após aplicação de Metodologia de Superfície de Resposta, método estatístico que visa otimizar os parâmetros de reação para melhores resultados, observou-se que a maior taxa de degradação do BFA (97,68%) por lacase bruta (50 U.L^{-1}) foi alcançada após 1 hora de reação a 44,6° C com concentração inicial de 5 mg.L^{-1} de BFA em pH 5,20 (HONGYAN et al., 2019).

Lassouane e colaboradores produziu lacase em meio semi-sólido a partir de *Trametes pubescens* e a imobilizou por técnicas de “cross-linking” com glutaraldeído e “entrapment” em esferas específicas. Esse sistema de biocatálise foi testado em solução aquosa em pH 5, 30º C sendo a concentração de BFA 20 mg.L^{-1} e a de lacase 1500 U.L^{-1}. O método para avaliar a degradação de BFA foi a espectroscopia de FTIR. Uma remoção

de BFA maior que 99% foi atingida em 2h (LASSOUANE et al., 2019).

Chhaya e Gupte aplicaram sistema micelar reverso, que aumenta a atividade enzimática em meio orgânico, à lacase produzida por *Fusarium incarnatum.* Assim, com uma concentração de lacase igual a 43,5 $\mu g.mL^{-1}$ sob 30º C obteve-se degradação de 91,43% de 200 $mg.L^{-1}$ de bisfenol A após 75 min de reação. Foi necessário 120 min de reação para degradar completamente o bisfenol A. A degradação deste composto foi monitorada com auxílio de cromatografia líquida de alta performance (CHHAYA & GUPTE, 2013).

Conforme levantando, diferentes métodos e condições enzimáticas mostraram nos trabalhos taxas eficientes de degradação do BFAs, trabalhando sempre com condições entre 20 a 100 mg.L-1 de BFA.

5.4 POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DA LACASE NO TRATAMENTO DO BFA

O levantamento bibliográfico identificou, em suma, as seguintes estratégias para o tratamento de BFA: 1. aplicação do extrato bruto de fungos com atividade da lacase, ou utilização de enzimas purificadas; 2. Aplicação da enzima livre ou imobilizada na solução de BFA.

Em relação a imobilização, no estudo de Olajuyigbe e colaboradores as lacases imobilizadas em cálcio e em cobre degradaram uma porcentagem menor (42,7% e 39,1%, respectivamente) de BFA que aquela por lacase livre (48,2%) (OLAJUYIGBE et al., 2019). A taxa de degradação do BFA por lacases imobilizadas também foi menor que as livres no estudo de BILAL e colaboradores (2019c), no qual 97,7% de BFA foi removido por lacase livre e 86,6% de BFA removido por lacase imobilizada em esferas de quitosana. Apesar dessa menor eficiência aparente da lacase imobilizada, em outros estudos, pode-se identificar vantagens no uso da imobilização (BILAL et al., 2019c). Como no trabalho de Brugnari e colaboradores (2018) que a lacase imobilizada em MANAE-agarose degradou BFA em menor tempo (20 min) que a lacase livre (27 min). No experimento de degradação de Ji e colaboradores (2017) com enzima livre 75% da atividade enzimática foi perdida no final da degradação comparada a 18% da enzima imobilizada. Isso mostra que a imobilização da enzima permite a recuperação da atividade enzimática tornando esse método muitas vezes mais vantajoso a longo prazo, para um processo de biorremediação de BFA, do que uma única aplicação de lacase livre (BRUGNARI et al., 2018; JI et al.,2017).

A quantidade de lacase para degradação de BFA dos estudos variou: de 0,4 $U.L^{-1}$ a

50.000 $U.L^{-1}$, com média de 11.136,19 $U.L^{-1}$ para lacases purificadas, e 8 $U.L^{-1}$ a 100.000 U L^{-1}, com média de 20.911,6 $U.L^{-1}$ para lacases em extrato enzimático. Considerando os valores de 50.000 $U.L^{-1}$ e 100.000 U L^{-1} como *outliers*, a variação da quantidade de lacase utilizada na maioria dos estudos nos quais ela é purificada está entre de 0,4 $U.L^{-1}$ a 5.000 $U.L^{-1}$ e nos quais ela está em extrato bruto varia, na maioria dos estudos, entre 8 $U.L^{-1}$ e 3.000 $U.L^{-1}$. Assim, a concentração média de lacase nos estudos analisados é de 1.420,24 $U.L^{-1}$ para lacases purificadas e de 1.139,5 $U.L^{-1}$ para lacases não purificadas. Considerando os dois grupos em conjunto e descartando os *outliers*, a concentração média ideal de lacase para realização de estudos análogos aos analisados está em torno de 1.279,87 $U.L^{-1}$.

Em relação ao tempo de reação médio da lacase com bisfenol A, nos estudos com lacase purificada esse tempo foi de 8,33h, para lacase em extrato bruto foi de 5,5h, e no geral com média de 7h. Porém, na maioria dos estudos com lacase purificada esse tempo variou entre 20 min e 6 h, enquanto na maioria dos estudos com lacase bruta esse tempo variou entre 1h e 3h. Assim, desconsiderando os *outliers* (tempos de 24h), o tempo de reação médio da maioria dos estudos dos dois grupos de lacases é de 1,93 h. Assim sendo, já que apenas 8 $U.L^{-1}$, menor quantidade enzimática dentre os estudos com lacase bruta, foi capaz de degradar 100% da segunda maior quantidade de BFA desses estudos (100 $mg.L^{-1}$) em um tempo de reação de 1h e que, dentre os estudos de lacase purificada, 5.000 $U.L^{-1}$ foi capaz de degradar 100% da maior quantia de bisfenol A (50 mg. L^{-1}) em apenas 20 min, pode-se perceber que o tempo médio de reação ideal está, de fato, em torno de 2h. Margot et al., (2013) observou em seu estudo utilizando lacase fúngica para degradar micropoluente que quanto maior o tempo de reação entre os dois, maior é a perda de lacase por inativação, provavelmente devido a interação da enzima com espécies reativas do meio. Isso explica porque tempos de reação menores são preferíveis nesse caso.

Levando em consideração apenas estudos cujos resultados das variáveis analisadas tinham mesma unidade de medida, selecionou-se os dados de Barrios-Estrada et al. (2018), Brugnari et al. (2018) e Zhao et al. (2018) para lacases purificadas e os dados de Hongyan et al. (2019), de Freitas et al. (2017) e Lassouane et al. (2019) para lacases em extrato bruto. As variáveis quantidade média de bisfenol A, tempo de reação médio e quantidade média de lacase utilizadas nesses estudos foram determinadas. Para o grupo de lacases purificadas, a quantidade média de bisfenol A degradada foi 31,25 $mg.L^{-1}$, o tempo de reação médio 8,44 h e quantidade média de lacase utilizada foi 1893,52 $U.L^{-1}$. Para o grupo de lacases brutas, a quantidade média de bisfenol A degradada foi 41,56 $mg.L^{-1}$, o tempo

de reação médio 1,33 h e quantidade média de lacase utilizada foi 519,33 $U.L^{-1}$. Esses resultados evidenciam que, para os estudos analisados, em média, o grupo de lacases brutas degradou uma quantidade maior de bisfenol A em menor tempo e com menos enzima que o grupo de lacases purificadas, sugerindo uma vantagem daquele grupo potencialmente devido a presença de mediadores redox como já mencionado.

Em relação ao volume de reação dos ensaios de degradação de BFA pela lacase, nove estudos foram analisados (cinco estudos de lacase purificada e quatro estudos de lacase bruta). No geral, esse volume variou de 200 µL até 5 L. A maior parte dos volumes (sete dentre os nove) ocorreu em mililitros, com média de 48,14 mL sem considerar os valores extremos. O estudo de Barrios-Estrada e colaboradores, cujo volume da mistura reativa foi de 5 L, indica que é possível realizar a degradação de bisfenol A em um volume até 10 vezes maior que a média dos estudos analisados. Este foi o volume do tanque de aço inoxidável com selamento de teflon equipado com bombas e canos que injetam solução de bisfenol A em contato com a enzima imobilizada em cerâmica multi-camadas (BARRIOS-ESTRADA et al., 2018).

A aplicação de lacases solúveis na biodegradação de xenobióticos apresenta algumas desvantagens como o alto custo de produção, perda de estabilidade e não reutilização. Esses fatores tornam o tratamento de lacase em larga escala economicamente inaceitável. Assim, a imobilização de lacases pode resolver, pelo menos em parte, a limitação para aplicação em grande escala. No estudo de Brugnari e colaboradores) a lacase imobilizada foi mais eficiente na degradação do BFA presente em altas concentrações (100 $mg.L^{-1}$) do que a lacase livre. Além disso, a enzima imobilizada reteve mais de 90% de sua capacidade inicial de degradar o BFA após 15 ciclos de reutilização. Logo, a lacase de *P. ostreatus* em agarose-MANAE poderia ser uma alternativa econômica para degradação em larga escala de bisfenol A em sistemas aquosos (BRUGNARI et al., 2018).

Pouca literatura apresenta o uso de lacase para biorremediação em larga escala, porém já se sabe que para um processo dessa magnitude o ideal seria utilizar lacase bruta devido a presença de mediadores redox naturais e da economia com processos onerosos de purificação. Outra etapa essencial para aplicar a enzima *in situ*, ou seja, em grandes volumes é a imobilização em suportes baratos e não tóxicos/interferentes no meio ambiente. Portanto, estudos futuros visando a biorremediação de bisfenol A devem avaliar a viabilidade da aplicação de lacase fúngica bruta imobilizada levando em consideração

fatores cinéticos, toxicológicos, ambientais e econômicos.

Por fim, foi realizada, no dia 12 de maio de 2021 uma busca por patentes relacionadas à biorremediação de bisfenol A por lacase em dois mecanismos internacionais de pesquisa online: *Espacene Patent search* e *Google Patent search*. Foram utilizadas as palavras-chave: "*laccase*" e "*bisphenol A*" e obteve-se, no total, 40 resultados entre o período de 2016-2021 no *Espacene Patent search e* 144 resultados no *Google Patent search.* Dentre esses resultados, foram reunidos os títulos de patentes realmente relacionados à busca inicial na tabela 6. No total, pode-se constatar que a busca resultou em 6 patentes relacionadas à degradação de bisfenol A por lacase. É possível perceber que o uso dessa enzima, por exemplo, varia nas formas de extrato cru e imobilizada dentre as patentes selecionadas, o que pode ter relação com a maior eficiência da enzima nessas formas como sugerido neste trabalho. Também foi feita busca, com as mesmas palavras-chave, em um banco de patentes brasileiro, o site do Instituto Nacional da Propriedade Industrial (INPI), e não foi identificada nenhuma patente com relação entre lacase e bisfenol A. A análise do perfil de patentes é um importante termômetro na avaliação da aplicabilidade de um processo. Neste sentido, pode-se dizer que a uso de lacases no tratamento de BFA apresenta potencial significativo representando uma área promissora para a biotecnologia.

Tabela 6. Títulos de patentes registradas em diferentes mecanismos de busca de patentes online.

Espacenet Patent search
Cerrena unicolor derived laccase and gene and application thereof
Method for degrading bisphenol A by virtue of crude enzyme liquid *Lentinula edodes*
Method for degrading bisphenol A through white-rot fungus crude enzyme
Google Patent search
Copper-based metal organic framework material immobilized laccase and preparation method and application thereof
Laccase from *Trichoderma unicolor* as well as gene and application thereof
Metal-organic framework material immobilization laccase and its preparation method and application

Fonte: o autor, 2021

6. CONCLUSÃO

Esse trabalho trouxe a partir da fundamentação teórica inicial, até o levantamento e discussão bibliográfica final, um perfil do uso da enzima lacase na degradação do BFA, desde a produção, purificação, métodos de tratamento e potencial para aplicação em larga escala. Por fim, foi selecionado nos bancos de dados analisados (*Science Direct e PubMed*) 14 artigos que utilizam lacase no tratamento de BFA. O período de maior impacto das citações foi 2018-2019 indicando a grande relevância atual dessa linha de pesquisa. A origem da lacase foi de fungos basidiomicetos, predominantemente. E as formas de tratamento do BFA foram com enzima livre ou imobilizada e enzima bruta ou purificada. Nesse sentido, avaliou-se que lacases imobilizadas são preferíveis em tratamentos de BFA de longa duração e em larga escala, mesmo com taxas de degradação menores, enquanto a enzima bruta é preferível à purificada devido a seu baixo custo de obtenção e maior potencial redox para degradação de bisfenol A. Foram encontradas, também, seis patentes utilizando lacase bruta e imobilizada para degradação de BFA. Por fim, independente da origem da lacase e do tipo de processo pode-se verificar que o próximo passo para a aplicação prática na biorremediação são estudos em larga escala visando a confirmação e efetividade do processo.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADEKUNLE, Abiodun E. et al. Laccase production from Trametes versicolor in solid-state fermentation of steam-exploded pretreated cornstalk. **Waste and biomass valorization**, v. 8, n. 1, p. 153-159, 2017.

AFREEN, S. et al. Extracellular laccase production and its optimization from Arthrospira maxima catalyzed decolorization of synthetic dyes. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 25, n. 7, p. 1446-1453, 2018.

AITA, Bruno C. et al. Production of cell-wall degrading enzymes by solid-state fermentation using agroindustrial residues as substrates. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 7, n. 3, p. 103-193, 2019.

ALEMÁN NAVA, Gibrán Sidney et al. Laccase-based biosensors for detection of phenolic compounds. 2015.

ANDERSON, Olivia S. et al. Epigenetic responses following maternal dietary exposure to physiologically relevant levels of bisphenol A. **Environmental and molecular mutagenesis**, v. 53, n. 5, p. 334-342, 2012.

ANG, Teck Nam; NGOH, Gek Cheng; CHUA, Adeline Seak May. Development of a novel inoculum preparation method for solid-state fermentation—Cellophane film culture (CFC) technique. **Industrial crops and products**, v. 43, p. 774-777, 2013.

ANWAR, Zahid; GULFRAZ, Muhammad; IRSHAD, Muhammad. Agro-industrial lignocellulosic biomass a key to unlock the future bio-energy: a brief review. **Journal of radiation research and applied sciences**, v. 7, n. 2, p. 163-173, 2014.

ARBOLEDA, Carolina et al. Elimination of bisphenol A and triclosan using the enzymatic system of autochthonous Colombian forest fungi. **ISRN biotechnology**, v. 2013, 2013.

ATACAG ERKURT, Hatice. Biodegradation and detoxification of BPA: involving laccase and a mediator. **CLEAN–Soil, Air, Water**, v. 43, n. 6, p. 932-939, 2015.

AYDINOĞLU, Tuğba; SARGIN, Sayıt. Production of laccase from Trametes versicolor by solid-state fermentation using olive leaves as a phenolic substrate. **Bioprocess and biosystems engineering**, v. 36, n. 2, p. 215-222, 2013.

AYDINOĞLU, Tuğba; SARGIN, Sayıt. Production of laccase from Trametes versicolor by solid-state fermentation using olive leaves as a phenolic substrate. **Bioprocess and biosystems engineering**, v. 36, n. 2, p. 215-222, 2013.

BA, Sidy; VINOTH KUMAR, Vaidyanathan. Recent developments in the use of tyrosinase and laccase in environmental applications. **Critical reviews in biotechnology**, v. 37, n. 7,

p. 819-832, 2017.

BARRIOS-ESTRADA, Carlos et al. Emergent contaminants: endocrine disruptors and their laccase-assisted degradation–a review. **Science of the total environment**, v. 612, p. 1516-1531, 2018.

BALAT, Mustafa; BALAT, Havva; ÖZ, Cahide. Progress in bioethanol processing. **Progress in energy and combustion science**, v. 34, n. 5, p. 551-573, 2008.

BALDRIAN, Petr. Fungal laccases–occurrence and properties. **FEMS microbiology reviews**, v. 30, n. 2, p. 215-242, 2006.

BALTIERRA-TREJO, Eduardo; MÁRQUEZ-BENAVIDES, Liliana; SÁNCHEZ-YÁÑEZ, Juan Manuel. Inconsistencies and ambiguities in calculating enzyme activity: The case of laccase. **Journal of microbiological methods**, v. 119, p. 126-131, 2015.

BANERJEE, U. C.; VOHRA, R. M. Production of laccase byCurvularia sp. **Folia microbiologica**, v. 36, n. 4, p. 343-346, 1991.

BARCELLOS, Ema. **Bioprospecção de fungo com potencial de biodegradação do Bisfenol A: avaliação da metodologia de seleção**. 49 p. Trabalho de Conclusão de Curso II (Biotecnologia) – Universidade Federal da Integração Latino-Americana, Foz do Iguaçu, 2019

BARRIOS-ESTRADA, Carlos et al. Potentialities of active membranes with immobilized laccase for Bisphenol A degradation. **International journal of biological macromolecules**, v. 108, p. 837-844, 2018.

BIBI, Ismat; BHATTI, Haq Nawaz; ASGHER, Muhammad. Comparative study of natural and synthetic phenolic compounds as efficient laccase mediators for the transformation of cationic dye. **Biochemical engineering journal**, v. 56, n. 3, p. 225-231, 2011.

BILAL, Muhammad et al. Immobilized ligninolytic enzymes: an innovative and environmental responsive technology to tackle dye-based industrial pollutants–a review. **Science of the Total Environment**, v. 576, p. 646-659, 2017.

BILAL, Muhammad; IQBAL, Hafiz MN; BARCELÓ, Damiá. Mitigation of bisphenol A using an array of laccase-based robust bio-catalytic cues–a review. **Science of The Total Environment**, v. 689, p. 160-177, 2019a.

BILAL, Muhammad; IQBAL, Hafiz MN. An insight into toxicity and human-health-related adverse consequences of cosmeceuticals—a review. **Science of the total environment**, v. 670, p. 555-568, 2019b.

BILAL, Muhammad et al. Immobilization of fungal laccase on glutaraldehyde cross-linked chitosan beads and its bio-catalytic potential to degrade bisphenol A. **Biocatalysis and**

Agricultural Biotechnology, v. 19, p. 101174, 2019c.

BISPHENOL A Action Plan (CASRN 80-05-7). 2010. Disponível em: https://www.epa.gov/sites/production/files/2015-09/documents/bpa_action_plan.pdf. Acesso em: 18 maio 2020.

BRUGNARI, Tatiane et al. A highly reusable MANAE-agarose-immobilized Pleurotus ostreatus laccase for degradation of bisphenol A. **Science of the Total Environment**, v. 634, p. 1346-1351, 2018.

BUSWELL, John A.; CAI, Yijin; CHANG, Shu-ting. Effect of nutrient nitrogen and manganese on manganese peroxidase and laccase production by Lentinula (Lentinus) edodes. **FEMS microbiology letters**, v. 128, n. 1, p. 81-87, 1995.

CAMARERO, Susana et al. Efficient bleaching of non-wood high-quality paper pulp using laccase-mediator system. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 35, n. 2-3, p. 113-120, 2004.

CAMARERO, Susana et al. Lignin-derived compounds as efficient laccase mediators for decolorization of different types of recalcitrant dyes. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 71, n. 4, p. 1775-1784, 2005.

CAÑAS, Ana I.; CAMARERO, Susana. Laccases and their natural mediators: biotechnological tools for sustainable eco-friendly processes. **Biotechnology advances**, v. 28, n. 6, p. 694-705, 2010.

CAREGHINI, Alessando et al. Bisphenol A, nonylphenols, benzophenones, and benzotriazoles in soils, groundwater, surface water, sediments, and food: a review**.** **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, n. 8, p. 5711-5741, 2015.

CHAIRIN, Thanunchanok et al. Biodegradation of bisphenol A and decolorization of synthetic dyes by laccase from white-rot fungus, Trametes polyzona. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 169, n. 2, p. 539-545, 2013.

CHHAYA, Urvish; GUPTE, Akshaya. Possible role of laccase from Fusarium incarnatum UC-14 in bioremediation of Bisphenol A using reverse micelles system. **Journal of hazardous materials**, v. 254, p. 149-156, 2013.

CHRISTOPHER, Lew Paul; YAO, Bin; JI, Yun. Lignin biodegradation with laccase-mediator systems. **Frontiers in Energy Research**, v. 2, p. 12, 2014.

CLAUS, H.; FILIP, Z. Behaviour of phenoloxidases in the presence of clays and other soil-related adsorbents. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 28, n. 4-5, p. 506-511, 1988.

COHEN, R.; PERSKY, L.; HADAR, Y. Biotechnological applications and potential of wood-

degrading mushrooms of the genus Pleurotus. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 58, n. 5, p. 582-594, 2002.

CONFORTIN, Tássia C. et al. Microbial Enzymes as Control Agents of Diseases and Pests in Organic Agriculture. **New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering**, p. 321-332, 2019.

CORDI, Lívia et al. Fungal laccase: copper induction, semi-purification, immobilization, phenolic effluent treatment and electrochemical measurement. **African Journal of Biotechnology**, v. 6, n. 10, 2007.

COUTO, S. Rodríguez et al. Production of laccase by Trametes hirsuta grown in an immersion bioreactor and its application in the docolorization of dyes from a leather factory. **Engineering in Life Sciences**, v. 4, n. 3, p. 233-238, 2004.

COUTO, Susana Rodríguez; LOPEZ, Elena; SANROMÁN, M. Angeles. Utilisation of grape seeds for laccase production in solid-state fermentors. **Journal of Food Engineering**, v. 74, n. 2, p. 263-267, 2006.

DANIEL, Geoffrey. Fungal degradation of wood cell walls. In: **Secondary xylem biology**. Academic Press, 2016. p. 131-167.

DEACON, Jim. **WOOD DECAY, AND WOOD-ROTTING FUNGI**. 2005. Disponível em: http://archive.bio.ed.ac.uk/jdeacon/FungalBiology/woodrots.htm. Acesso em: 21 maio 2020.

DEKANT, Wolfgang; VÖLKEL, Wolfgang. Human exposure to bisphenol A by biomonitoring: methods, results and assessment of environmental exposures. **Toxicology and applied pharmacology**, v. 228, n. 1, p. 114-134, 2008.

DHILLON, Gurpreet Singh et al. Flocculation and haze removal from crude beer using in-house produced laccase from Trametes versicolor cultured on brewer's spent grain. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 60, n. 32, p. 7895-7904, 2012.

DIAMANTIDIS, Grigorios et al. Purification and characterization of the first bacterial laccase in the rhizospheric bacterium Azospirillum lipoferum. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 32, n. 7, p. 919-927, 2000.

DWIVEDI, Upendra N. et al. Structure–function relationship among bacterial, fungal and plant laccases. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 68, n. 2, p. 117-128, 2011.

ECHA (Helsinki). **One new substance added to the Candidate List, several entries updated**. 2017. Disponível em: https://echa.europa.eu/-/one-new-substance-added-to-the-candidate-list. Acesso em: 18 maio 2020.

ECONOMOU, Ch N. et al. Semi-solid state fermentation of sweet sorghum for the biotechnological production of single cell oil. **Bioresource technology**, v. 101, n. 4, p. 1385-

1388, 2010.

EMBL. **Protein Expression and Purification Core Facility**. PROTEIN PURIFICATION EXTRACTION AND CLARIFICATION. Disponível em: https://www.embl.de/pepcore/pepcore_services/protein_purification/extraction_clarification/index.html. Acesso em: 11 abr. 2020.

FLOUDAS, Dimitrios et al. Evolution of novel wood decay mechanisms in Agaricales revealed by the genome sequences of Fistulina hepatica and Cylindrobasidium torrendii. **Fungal Genetics and Biology**, v. 76, p. 78-92, 2015.

FOROOTANFAR, Hamid; FARAMARZI, Mohammad Ali. Insights into laccase producing organisms, fermentation states, purification strategies, and biotechnological applications. **Biotechnology progress**, v. 31, n. 6, p. 1443-1463, 2015.

de FREITAS, Emanuelle Neiverth et al. Removal of bisphenol A by laccases from Pleurotus ostreatus and Pleurotus pulmonarius and evaluation of ecotoxicity of degradation products. **Chemical Engineering Journal**, v. 330, p. 1361-1369, 2017.

FUTAHASHI, Ryo et al. Laccase2 is required for cuticular pigmentation in stinkbugs. **Insect biochemistry and molecular biology**, v. 41, n. 3, p. 191-196, 2011.

HATAKKA, A. Biodegradation of lignin In: Hofrichter M, Steinbüchel A, editors. **Biopolymers 1. Lignin, humic substances and coal**. 2001.

HATAKKA, Annele. Lignin-modifying enzymes from selected white-rot fungi: production and role from in lignin degradation. **FEMS microbiology reviews**, v. 13, n. 2-3, p. 125-135, 1994.

HATTORI, Makoto et al. Laccase-type phenoloxidase in salivary glands and watery saliva of the green rice leafhopper, Nephotettix cincticeps. **Journal of Insect Physiology**, v. 51, n. 12, p. 1359-1365, 2005.

HERNÁNDEZ, Christian A. et al. Light-induced inhibition of laccase in Pycnoporus sanguineus. **Folia microbiologica**, v. 61, n. 2, p. 137-142, 2016.

HONGYAN, Liu et al. Study on transformation and degradation of bisphenol A by Trametes versicolor laccase and simulation of molecular docking. **Chemosphere**, v. 224, p. 743-750, 2019.

HU, J.; DUVNJAK, Z. Production of a laccase and decrease of the phenolic content in canola meal during the growth of the fungus pleurotus ostreatus in solid state fermentation processes. **Engineering in life sciences**, v. 4, n. 1, p. 50-55, 2004.

IANDOLO, Donata et al. Enzyme production by solid substrate fermentation of Pleurotus ostreatus and Trametes versicolor on tomato pomace. **Applied biochemistry and**

biotechnology, v. 163, n. 1, p. 40-51, 2011.

IQBAL, Hafiz Muhammad Nasir; ASGHER, Muhammad; BHATTI, Haz Nawaz. Optimization of physical and nutritional factors for synthesis of lignin degrading enzymes by a novel strain of Trametes versicolor. **BioResources**, v. 6, n. 2, p. 1273-1287, 2011.

JASIM HASHIM, Abdulkareem. Determination of optimal conditions for laccase production by Pleurotus ostreatus using sawdust as solid medium and its use in phenol degradation. **Baghdad Science Journal**, v. 9, n. 3, p. 491-499, 2012.

JHADAV, A. et al. Optimization of production and partial purification of laccase by Phanerochaete chrysosporium using submerged fermenation. **International Journal of Microbiology Research**, v. 1, n. 2, p. 9, 2009.

JI, Chao et al. Direct immobilization of laccase on titania nanoparticles from crude enzyme extracts of P. ostreatus culture for micro-pollutant degradation. **Separation and Purification Technology**, v. 178, p. 215-223, 2017.

JING, Debing. Improving the simultaneous production of laccase and lignin peroxidase from Streptomyces lavendulae by medium optimization. **Bioresource technology**, v. 101, n. 19, p. 7592-7597, 2010.

JOHANNES, Christian; MAJCHERCZYK, Andrzej. Natural mediators in the oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons by laccase mediator systems. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 66, n. 2, p. 524-528, 2000.

JONES, Stephen M.; SOLOMON, Edward I. Electron transfer and reaction mechanism of laccases. **Cellular and molecular life sciences**, v. 72, n. 5, p. 869-883, 2015.

KALIA, Susheel et al. Laccase-assisted surface functionalization of lignocellulosics. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 102, p. 48-58, 2014.

KANG, Jeong-Hun; KATAYAMA, Yoshiki. Biodegradation or metabolism of bisphenol A in the environment. In: **Environmental Biodegradation Research Focus**. Nova Publishers New York, 2008. p. 49-76.

KARP, Susan Grace et al. Statistical optimization of laccase production and delignification of sugarcane bagasse by Pleurotus ostreatus in solid-state fermentation. **BioMed research international**, v. 2015, 2015.

KRISHNA, Chundakkadu. Solid-state fermentation systems—an overview. **Critical reviews in biotechnology**, v. 25, n. 1-2, p. 1-30, 2005.

KUNDAKOVIC, Marija; CHAMPAGNE, Frances A. Epigenetic perspective on the developmental effects of bisphenol A. **Brain, behavior, and immunity**, v. 25, n. 6, p. 1084-1093, 2011.

LABROU, Nikolaos E. Protein purification: an overview. In: **Protein Downstream Processing**. Humana Press, Totowa, NJ, 2014. p. 3-10.

LAEMMLI, Ulrich K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **nature**, v. 227, n. 5259, p. 680-685, 1970.

LISOV, Alexander V. et al. Laccases produced by lichens of the order Peltigerales. **FEMS microbiology letters**, v. 275, n. 1, p. 46-52, 2007.

LASSOUANE, Fatiha et al. A promising laccase immobilization approach for Bisphenol A removal from aqueous solutions. **Bioresource technology**, v. 271, p. 360-367, 2019.

LONČAR, Nikola et al. Bacillus amyloliquefaciens laccase–from soil bacteria to recombinant enzyme for wastewater decolorization. **Bioresource technology**, v. 147, p. 177-183, 2013.

MAJEAU, Josée-Anne; BRAR, Satinder K.; TYAGI, Rajeshwar Dayal. Laccases for removal of recalcitrant and emerging pollutants. **Bioresource technology**, v. 101, n. 7, p. 2331-2350, 2010.

MARGOT, Jonas et al. Bacterial versus fungal laccase: potential for micropollutant degradation. **AMB express**, v. 3, n. 1, p. 1-14, 2013.

MARQUES DE SOUZA, Cristina Giatti; ZILLY, Adriana; PERALTA, Rosane Marina. Production of laccase as the sole phenoloxidase by a Brazilian strain of Pleurotus pulmonarius in solid state fermentation. **Journal of Basic Microbiology: An International Journal on Biochemistry, Physiology, Genetics, Morphology, and Ecology of Microorganisms**, v. 42, n. 2, p. 83-90, 2002.

MARICHAL-GALLARDO, P. A.; ALVAREZ, Mario Moises. State-of-the-art in downstream processing of monoclonal antibodies: process trends in design and validation. **Biotechnology progress**, v. 28, n. 4, p. 899-916, 2012..

MATERA, Irene et al. Crystal structure of the blue multicopper oxidase from the white-rot fungus Trametes trogii complexed with p-toluate. **Inorganica Chimica Acta**, v. 361, n. 14-15, p. 4129-4137, 2008.

MATSUBARA, M.; LYNCH, J. M.; DE LEIJ, F. A. A. M. A simple screening procedure for selecting fungi with potential for use in the bioremediation of contaminated land. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, n. 7, p. 1365-1372, 2006.

MONTENECOURT, BLAND S.; EVELEIGH, DOUGLAS E. Preparation of mutants of Trichoderma reesei with enhanced cellulase production. **Appl. Environ. Microbiol**., v. 34, n. 6, p. 777-782, 1977.

MORE, Sunil S. et al. Isolation, purification, and characterization of fungal laccase from Pleurotus sp. **Enzyme research**, v. 2011, 2011.

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

MICHAŁOWICZ, Jaromir. Bisphenol A–sources, toxicity and biotransformation. **Environmental toxicology and pharmacology**, v. 37, n. 2, p. 738-758, 2014.

MINUSSI, Rosana C. et al. Purification, characterization and application of laccase from Trametes versicolor for colour and phenolic removal of olive mill wastewater in the presence of 1-hydroxybenzotriazole. **African Journal of biotechnology**, v. 6, n. 10, 2007.

MUSSATTO, Solange I. et al. Use of agro-industrial wastes in solid-state fermentation processes. **Industrial waste**, v. 274, 2012.

NANDAL, Preeti; RAVELLA, Sreenivas Rao; KUHAD, Ramesh Chander. Laccase production by Coriolopsis caperata RCK2011: optimization under solid state fermentation by Taguchi DOE methodology. **Scientific reports**, v. 3, p. 1386, 2013.

NATIONAL Center for Biotechnology Information. **PubChem Database.** Bisphenol A, CID=6623, https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Bisphenol-A (acesso em 20 de junho de 2019)

NEJAD, Z. Ghobadi; BORGHEI, S. M.; YAGHMAEI, S. Kinetic studies of Bisphenol A in aqueous solutions by enzymatic treatment. **International journal of environmental science and technology**, v. 16, n. 2, p. 821-832, 2019.

NEVES, Lilia Maria Bitar (org.). **Tutorial de pesquisa bibliográfica**. 2013. Disponível em: https://portal.ufpr.br/pesquisa_bibliogr_bvs_sd.pdf. Acesso em: 07 maio 2021.

NILADEVI, K. N.; PREMA, P. Immobilization of laccase from Streptomyces psammoticus and its application in phenol removal using packed bed reactor. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 24, n. 7, p. 1215-1222, 2008.

NNAMCHI, Chukwudi Innocent; EZEOFOR, Grace Adaeze; AMADI, Chioma Onyetugo. Preliminary Production and Partial Purification of Laccase from a White Rot Fungus and Its Application in Dye Degradation. **Biotechnology Journal International**, p. 1-9, 2019.

OLAJUYIGBE, Folasade M.; ADETUYI, Oluwafijimi Y.; FATOKUN, Cornelius O. Characterization of free and immobilized laccase from Cyberlindnera fabianii and application in degradation of bisphenol A. **International journal of biological macromolecules**, v. 125, p. 856-864, 2019.

OOIJKAAS, Lydia P. et al. Defined media and inert supports: their potential as solid-state fermentation production systems. **Trends in Biotechnology**, v. 18, n. 8, p. 356-360, 2000.

OSMA, Johann F.; HERRERA, José L. Toca; COUTO, Susana Rodríguez. 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, n. 1, p. 32-37, 2007.

OTTO, Benjamin; SCHLOSSER, Dietmar; REISSER, Werner. First description of a laccase-like enzyme in soil algae. **Archives of microbiology**, v. 192, n. 9, p. 759-768, 2010.

PANNU, J. Singh; KAPOOR, R. K. Microbial laccases: a mini-review on their production, purification and applications. **Int j pharm arch**, v. 3, n. 12, p. 528-536, 2014.

PASTRANA, L. M. et al. Interactions affecting gibberellic acid production in solid-state culture: a factorial study. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 17, n. 9, p. 784-790, 1995.

PATEL, Helina; GUPTE, Akshaya. Optimization of different culture conditions for enhanced laccase production and its purification from Tricholoma giganteum AGHP. **Bioresources and Bioprocessing**, v. 3, n. 1, p. 11, 2016.

PATEL, Hardik; GUPTE, Akshaya; GUPTE, Shilpa. Effect of different culture conditions and inducers on production of laccase by a basidiomycete fungal isolate Pleurotus ostreatus HP-1 under solid state fermentation. **BioResources**, v. 4, n. 1, p. 268-284, 2009.

PERDANI, Meka Saima et al. Solid state fermentation method for production of laccase enzyme with bagasse, cornstalk and rice husk as substrates for adrenaline biosensor. **Energy Reports**, v. 6, p. 336-340, 2020.

PESCARA, Igor Cardoso. Ocorrência e remoção de contaminantes emergentes por tratamentos convencionais de água e esgoto. 2014. 167 f. Tese (Doutorado) **- Curso de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas,** 2014.

PHYSIOLOGYWEB. **Units per Volume Solution Concentration Calculator**. 2018. Disponível em: https://www.physiologyweb.com/terms_of_use.html. Acesso em: 22 maio 2020.

POGNI, Rebecca et al. Spectroscopic and computational characterization of laccases and their substrate radical intermediates. **Cellular and molecular life sciences**, v. 72, n. 5, p. 885-896, 2015.

POSTEMSKY, Pablo Daniel et al. Pilot-scale bioconversion of rice and sunflower agro-residues into medicinal mushrooms and laccase enzymes through solid-state fermentation with Ganoderma lucidum. **Bioresource technology**, v. 231, p. 85-93, 2017.

PRATIWI, R.; NOTODARMOJO, S.; HELMY, Q. Decolourization of remazol black-5 textile dyes using moving bed bio-film reactor. In: **IOP Conference Series: Earth and Environmental Science**. IOP Publishing, 2018. p. 012089.

PREETHI, P. Sai et al. Laccase: Recombinant Expression, Engineering and Its Promising Applications. In: **Microbial Enzymes: Roles and Applications in Industries**. Springer,

Singapore, 2020. p. 63-85.

RAHAYU, A. G. et al. Surfactant, Nitrogen and Carbon Media Optimization for Trichoderma Asperellum LBKURCC1 Laccase Production by Flask Solid State Fermentation of Rice Straw. In: **Journal of Physics: Conference Series**. IOP Publishing, 2019. p. 012030.

REVANKAR, Madhavi S.; DESAI, Kiran M.; LELE, S. S. Solid-state fermentation for enhanced production of laccase using indigenously isolated Ganoderma sp. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 143, n. 1, p. 16-26, 2007.

RISDIANTO, Hendro et al. Optimization of Laccase Production using White Rot Fungi and Agricultural Wastes in Solid-State Fermentation. **Journal of Engineering and Technological Sciences**, v. 44, n. 2, p. 93-105, 2012.

RITTSTIEG, Klaus et al. Polymerization of Guaiacol and a Phenolic β-O-4-Substructure by Trameteshirsuta Laccase in the Presence of ABTS. **Biotechnology progress**, v. 19, n. 5, p. 1505-1509, 2003.

RODRIGUEZ, A. et al. Laccase activities of Penicillium chrysogenum in relation to lignin degradation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 45, n. 3, p. 399-403, 1996.

RODRÍGUEZ-COUTO, Susana. A promising inert support for laccase production and decolouration of textile wastewater by the white-rot fungus Trametes pubescesns. **Journal of hazardous materials**, v. 233, p. 158-162, 2012.

RODRÍGUEZ-COUTO, Susana. Solid-state fermentation for laccases production and their applications. In: Current Developments in Biotechnology and Bioengineering. **Elsevier**, 2018. p. 211-234.

RÜHL, Martin; MAJCHERCZYK, Andrzej; KÜES, Ursula. Lcc1 and Lcc5 are the main laccases secreted in liquid cultures of Coprinopsis cinerea strains. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 103, n. 5, p. 1029-1039, 2013.

SAAE. **Sistemas de Tratamento de Água**. Aracruz, v. 1, n. 1, p.1-10, jun. 2006

SAARINEN, Terhi et al. Adsorption of different laccases on cellulose and lignin surfaces. **BioResources**, v. 4, n. 1, p. 94-110, 2009.

SABU, A. et al. Tamarind seed powder and palm kernel cake: two novel agro residues for the production of tannase under solid state fermentation by Aspergillus niger ATCC 16620. **Bioresource Technology**, v. 96, n. 11, p. 1223-1228, 2005.

SAITO, Takao et al. Detoxification of bisphenol A and nonylphenol by purified extracellular laccase from a fungus isolated from soil. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 98, n. 1, p. 64-66, 2004.

SAKDARONNARONG, Chularat Krongtaew et al. Improving enzymatic saccharification of

sugarcane bagasse by biological/physico-chemical pretreatment using Trametes versicolor and Bacillus sp. **BioResources**, v. 7, n. 3, p. 3935-3947, 2012.

SANTANA, Felipe Silva de. **Isolamento de bactérias degradadoras de Bisfenol A do ambiente estuarino da Baixada Santista**. 2018. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

SATO, Yasushi et al. Molecular cloning and expression of eight laccase cDNAs in loblolly pine (*Pinus taeda*). **Journal of Plant Research**, v. 114, n. 2, p. 147-155, 2001.

SCHERER, Mario; FISCHER, Reinhard. Purification and characterization of laccase II of Aspergillus nidulans. **Archives of microbiology**, v. 170, n. 2, p. 78-84, 1998.

SHAFEI, Ayman et al. Stop eating plastic, molecular signaling of bisphenol A in breast cancer. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 25, n. 24, p. 23624-23630, 2018.

SHARMA, Rakesh Kumar; ARORA, Daljit Singh. Production of lignocellulolytic enzymes and enhancement of in vitro digestibility during solid state fermentation of wheat straw by Phlebia floridensis. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 23, p. 9248-9253, 2010.

SHARMA, Babita; DANGI, Arun Kumar; SHUKLA, Pratyoosh. Contemporary enzyme based technologies for bioremediation: a review. **Journal of environmental management**, v. 210, p. 10-22, 2018.

SHARMA, P.; GOEL, R.; CAPALASH, N. Bacterial laccases. **World journal of microbiology and biotechnology**, v. 23, n. 6, p. 823-832, 2007.

SHENDURE, Jay; AIDEN, Erez Lieberman. The expanding scope of DNA sequencing. **Nature biotechnology**, v. 30, n. 11, p. 1084, 2012.

SINGH, Jagdeep et al. Simultaneous laccase production and transformation of bisphenol-A and triclosan using Trametes versicolor. **3 Biotech**, v. 9, n. 4, p. 129, 2019.

SOUZA, Angélica Vieira da Silva Bertoncello. **OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE LACASE PELO FUNGO Trametes sp. PARA A BIORREMEDIAÇÃO DE BISFENOL A EM MEIO AQUOSO**. 2017. 144 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Programa de Pós-graduação Profissional em Meio Ambiente Urbano e Industrial, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2017.

SUGIURA-OGASAWARA, Mayumi et al. Exposure to bisphenol A is associated with recurrent miscarriage. **Human reproduction**, v. 20, n. 8, p. 2325-2329, 2005.

SURWASE, Swati V. et al. Interaction of small molecules with fungal laccase: a surface plasmon resonance based study. **Enzyme and microbial technology**, v. 82, p. 110-114, 2016.

TEODORO, Thaís Silva et al. The influence of Tween 80 on laccase production by Pleurotus sajor-caju and the efficiency of crude enzyme broth in the removal of bisphenol-A. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 85, 2018.

THURSTON, Christopher F. The structure and function of fungal laccases. **Microbiology**, v. 140, n. 1, p. 19-26, 1994.

VOM SAAL, Frederick S.; HUGHES, Claude. An extensive new literature concerning low-dose effects of bisphenol A shows the need for a new risk assessment. **Environmental health perspectives**, v. 113, n. 8, p. 926-933, 2005.

WANG, Feng et al. Fungal Laccase Production from Lignocellulosic Agricultural Wastes by Solid-State Fermentation: A Review. **Microorganisms**, v. 7, n. 12, p. 665, 2019.

WANG, Mingming et al. Bisphenol A degradation by Fenton Advanced Oxidation Process and operation parameters optimization. In: **E3S Web of Conferences**. EDP Sciences, 2020. p. 01014.

WESTERN OREGON UNIVERSITY. **Biochemistry – Defining Life at the Molecular Level**. 2019. Disponível em: https://wou.edu/chemistry/courses/online-chemistry-textbooks/ch450-and-ch451-biochemistry-defining-life-at-the-molecular-level/chapter-3-investigating-proteins/. Acesso em: 21 maio 2020.

WETHERILL, Yelena B. et al. The Xenoestrogen Bisphenol A Induces Inappropriate Androgen Receptor Activation and Mitogenesis in Prostatic Adenocarcinoma Cells 1 This work was supported by NIH Training Grant ES07250-13 (to YBW; Environmental Mutagenesis and Cancer) and NIH Grant R01 CA93404-01 (to KEK). 1. **Molecular cancer therapeutics**, v. 1, n. 7, p. 515-524, 2002.

XIN, Fengxue; GENG, Anli. Utilization of horticultural waste for laccase production by Trametes versicolor under solid-state fermentation. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 163, n. 2, p. 235-246, 2011.

YING, Guang-Guo et al. Occurrence and implications of estrogens and xenoestrogens in sewage effluents and receiving waters from South East Queensland. **Science of the Total Environment**, v. 407, n. 18, p. 5147-5155, 2009.

ZHAO, Jie et al. Expression of a thermotolerant laccase from Pycnoporus sanguineus in Trichoderma reesei and its application in the degradation of bisphenol A. **Journal of bioscience and bioengineering**, v. 125, n. 4, p. 371-376, 2018.

ZHU, Xudong et al. Laccase of Cryptococcus neoformans is a cell wall-associated virulence factor. **Infection and immunity**, v. 69, n. 9, p. 5589-5596, 2001.