UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CENTRO DE DESENVOLVIMENTO SUSTENTÁVEL DO SEMIÁRIDO
UNIDADE ACADÊMICA DE ENGENHARIA DE BIOTECNOLOGIA E BIOPROCESSOS
CURSO DE ENGENHARIA DE BIOTECNOLOGIA E BIOPROCESSOS

ANTENOR LINHARES NETO

VALORAÇÃO DA ÁGUA RESIDUÁRIA DA LIQUEFAÇÃO HIDROTÉRMICA DE ALGAS PARA PRODUÇÃO DE LACASE POR *Pleurotus ostreatus*

SUMÉ - PB

2023

ANTENOR LINHARES NETO

VALORAÇÃO DA ÁGUA RESIDUÁRIA DA LIQUEFAÇÃO HIDROTÉRMICA DE ALGAS PARA PRODUÇÃO DE LACASE POR *Pleurotus ostreatus*

Monografia apresentada ao Curso de Engenharia de Biotecnologia e Bioprocessos do Centro de Desenvolvimento Sustentável do Semiárido da Universidade Federal de Campina Grande, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Engenharia de Biotecnologia e Bioprocessos.

Orientadora: Professora Dra. Glauciane Danusa Coelho.

SUMÉ - PB
2023



L755v Linhares Neto, Antenor.
Valoração da água residuária da liquefação hidrotérmica de algas para produção de lacase por Pleurotus ostreatus. / Antenor Linhares Neto. - 2023.

58 f.

Orientadora: Professora. Dra. Glauciane Danusa Coelho.
Monografia - Universidade Federal de Campina Grande; Centro de Desenvolvimento Sustentável do Semiárido; Curso de Engenharia de Biotecnologia e Bioprocessos.

1. Lacase de Pleurotus ostratus. 2. Atracamento molecular. 3. Complexo ligninolítico. 4. Biorremediação. 5. Fungos basidiomicetos. 6. Liquefação hidrotermal. 7. Água residuária pós-liquefação hidrotermal. 8. Pleurotus ostreatus. 9. I. Coelho, Glauciane Danusa. II. Título.

CDU: 60(043.1)

Elaboração da Ficha Catalográfica:

Johnny Rodrigues Barbosa
Bibliotecário-Documentalista
CRB-15/626

ANTENOR LINHARES NETO

VALORAÇÃO DA ÁGUA RESIDUÁRIA DA LIQUEFAÇÃO HIDROTÉRMICA DE ALGAS PARA PRODUÇÃO DE LACASE POR *Pleurotus ostreatus*

Monografia apresentada ao Curso de Engenharia de Biotecnologia e Bioprocessos do Centro de Desenvolvimento Sustentável do Semiárido da Universidade Federal de Campina Grande, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Engenharia de Biotecnologia e Bioprocessos.

BANCA EXAMINADORA:

Professora Dra. Glauciane Danusa Coelho
Orientadora – UAEB/CDSA/UFCG

Professora Dra. Giovana Tommaso
Examinadora Externa I – USP – FZEA - Pirassununga

Professora Dra. Luciana Jandelli Gimenes
Examinadora Externa II – USP - Butatã

Trabalho aprovado em: 23 de junho de 2023.

SUMÉ - PB

Aos meus pais, à minha irmã e a cada uma das pessoas que contribuíram nessa jornada, dedico.

“Então disse o Senhor a Abrão: Saia da sua terra, do meio dos seus parentes e da casa do seu pai, e vá para a terra que Eu lhe mostrarei.”

Gênesis 12:1

AGRADECIMENTOS

Chegar até aqui foi uma aventura!! (Daquelas bem desafiadoras). Com certeza não teria finalizado tudo isso sem as pessoas que me apoiaram durante todo esse tempo. Por isso quero deixar meus agradecimentos:

Aos meus pais, por serem minha base, minha maior motivação. Especialmente pela coragem e a confiança de terem me permitido viver a experiência de sair do "campo de supervisão e proteção" deles para viver uma vida nova em uma cidade até então desconhecida, morando sozinho, sem saber o mínimo sobre como sobreviver morando longe deles. Agradeço também a minha irmã, um exemplo de coragem e determinação, por ter me incentivado a entrar no curso e seguir adiante com a ideia de morar fora, por ter me ensinado e me apoiado durante todo esse tempo. Foi difícil, especialmente os primeiros dias quando a saudade de casa bateu e eu chorei me perguntando se tinha feito a escolha certa, mas cá estou 5 anos depois, outra pessoa. Obrigado por tudo, amo vocês!!

À minha professora Girlaine, uma das primeiras a saber que tinha sido aprovado na universidade lá no ensino médio me deu uma oportunidade que mudaria minha forma de ver a importância dos estudos e literalmente mudou minha vida. Ao meu grande amigo Arcanjo que me incentivou a fazer a matrícula quando eu estava em dúvida se continuava estudando ou se iria procurar um emprego.

Aos meus irmãos de curso Ana e Isac. Foram muitos dias de luta, muitos desafios para dar conta, mas tenho que dizer que com vocês os trabalhos e provas sempre foram mais leves. Estamos chegando lá (finalmente os dias de glória) e muita coisa boa ainda está por vir. Tenho muito orgulho de vocês, foi um enorme prazer conhecê-los, ter aprendido e ter chegado até aqui ao lado de vocês.

Agradeço também a mãe que esse curso me deu: Dra. Glauciane. O que eu escrever aqui vai ser muito pouco para expressar a gratidão, respeito e admiração que tenho por ela. Exemplo de maestria no ensino, de dedicação ao que faz é alguém que não mede esforços para ajudar quem precisa. Eu te agradeço MUITO por ter me contratado e confiado em mim em um momento difícil no curso, por todos os ensinamentos, conselhos, conversas, paciência, pelas oportunidades, pelos sonhos que me permitiu realizar, pelos novos lugares que conheci e por todas as experiências que vivi. A senhora é um pilar que sustenta a vida de muitas pessoas, as quais foram transformadas e alcançaram grandes coisas graças a você. Tudo que a senhora me proporcionou me desenvolveu e abriu minha mente para novas possibilidades. Sou muito feliz e tenho muito orgulho por ter sido seu aluno e orientando, a senhora é uma grande inspiração.

Agradeço também a toda a galera que faz parte do laboratório de micro, especialmente Cícero Anthonyelson pela paciência, ajuda, confiança, conversas sobre a vida pós-faculdade, e pelas monitorias de esfregaço sanguíneo haha, Virgínia principalmente pelo senso de humor e por ter me recebido tão bem quando cheguei no lab, Julio por toda ajuda nas pesquisas e ser dono das melhores histórias, José pelas monitorias de bioinformática e dicas sobre como melhorar a velocidade do meu PC kkk, Carol prodígio que representa nossa universidade sendo de atleta à engenheira mecânica, e Marco e Caio pelas contribuições no desenvolvimento da pesquisa.

Volto a agradecer a Isac, dessa vez por ter feito parte da minha trajetória no laboratório desde o início, ter me ensinado tudo que aprendeu no projeto de IC, por ter presenciado os resultados positivos e negativos, os altos e baixos tanto na minha vida pessoal quanto acadêmica, pela organização, comprometimento, responsabilidade, e pela coragem de sair vendendo "ação entre amigos" na chuva e no sol de Sumé tudo em nome do estágio em São Paulo. Foi uma experiência e tanto, inclusive a adrenalina de se perder pelas ruas de SP kkkk. Mas sobrevivemos, foi ótimo!! Assim como Glau você é peça fundamental e um exemplo de pessoa que sempre terá minha gratidão.

Agradeço a professora Giovana e Gilda por terem recebido a mim e a Isac no estágio de forma tão acolhedora, e todos os ensinamentos especialmente a enorme paciência de Gilda que sempre sabia como resolver os problemas que eu e Isac encontrávamos nos experimentos.

Agradeço a Kamila e a Taliana que nos receberam em São Paulo, sendo Taliana *host* e também guia turística. Também agradeço a Otto, Bárbara e Edson por terem me dado abrigo quando eu não tive onde morar em Sumé kkk.

Agradeço ao pessoal do CA, especialmente Judieldo e Yalle por terem me convidado para fazer parte do time.

À dupla dinâmica Dani e Graci pelas resenhas, dicas de culinária, cultura baiana e dedicação nas disciplinas de Bruno kkk.

Aos professores, técnicos e todos que fazem parte da UFCG, em especial Aldinete, Alex, Ana Mary, Bruno, Franklin, Jean, Janduy e Mérgia por todos os ensinamentos e contribuição na minha formação. Também Cristiano e Adriana por contribuírem no bom funcionamento do bloco do nosso laboratório.

Aos meus amigos Angélica, Pageú, Davy e Matheus por não terem se distanciado com minha distância e continuarem me chamando para os rolês kkkk.

MUITO OBRIGADO, todos vocês!!

RESUMO

A busca por combustíveis de fontes renováveis tem atraído atenção para a liquefação hidrotérmica, que permite gerar bio-óleo porém produz água residuária pós-liquefação hidrotermal (PLHT) altamente tóxica, sendo impeditivo desse processo em larga escala. Métodos químicos e físicos podem ser empregados para tratar águas residuárias, mas geralmente são caros e podem levar à formação de moléculas ainda mais tóxicas. Considerando que os fungos basiodiomicetos são mais tolerantes a condições adversas, especialmente devido à produção de um complexo ligninolítico, que inclui a lacase, este estudo propõe um tratamento inovador utilizando *Pleurotus ostreatus*. O potencial da lacase de *P. ostreatus* para degradar componentes de PLHT de algas foi avaliado usando um modelo 3D desta enzima. Tolerância de *P. ostreatus* foi avaliada em meio Batata-Dextrose-Ágar (BDA). Produção de lacase foi monitorada em caldos de batata (BD), Kirk modificado e fibra de coco (KF), com e sem PLHT. Lacase foi determinada por oxidação do ABTS. Acompanhamento da degradação dos compostos N-heterocíclicos foi feito pela quantificação dos compostos fenólicos totais (CFT). Interações entre o modelo 3D e moléculas tóxicas do PLHT indicaram viabilidade de degradação devido ao estabelecimento de pontes de hidrogênio e energia de ligação negativa. *P. ostreatus* tolerou até 20% PLHT (v:v). Picos de produção de lacase ocorreram com 15 dias, com o maior rendimento sendo 772,94 $U.L^{-1}$, em meio KF com PLHT, com concomitante redução de 86,62% de CFT. Aumento da produção de lacase na presença de PLHT mostra que, durante o tratamento, essa água também induz a atividade da lacase.

Palavras-chave: Atracamento Molecular. Complexo Ligninolítico. Biorremediação. Basidiomiceto. Liquefação Hidrotermal.

ABSTRACT

The search for fuels from renewable sources has attracted attention to hydrothermal liquefaction, which allows the generation of bio-oil, but generates highly toxic post-hydrothermal liquefaction wastewater (PHTL), which hinders the application of this process on a large scale. Chemical and physical methods may be employed to treat wastewater, but generally they are expensive and can lead to the formation of even more toxic molecules. Considering that basiodiomycete fungi are more tolerant to adverse conditions, mainly due to the production of a ligninolytic complex, which includes laccase, this study proposes an innovative treatment using *Pleurotus ostreatus*. Potential of *P. ostreatus* laccase to degrade algal PHTL components awas evaluated using a 3D model of this enzyme. The *P. ostreatus* tolerance was determined in PDA medium. Laccase production underwent analysis on potato broth (PB), modified Kirk and coconut fiber (KF) media, with and without PHTL. Lacase assessment was performed by ABTS oxidation. Assessing the degradation of N-heterocyclic compounds was performed by quantification of Total Phenolic Compounds (TPC). Interactions between the 3D model of laccase and the toxic molecules of PLHT indicated degradation viability due to the establishment of hydrogen bonds and negative binding energy. *P. ostreatus* tolerated up to 20% PLHT (v:v). Peak production of laccase occurred at day 15, with the highest yield of 772.94 $U.L^{-1}$, in KF medium with PHTL, with a concomitant reduction of 86.62% of CFT. Increased laccase production in the presence of PHTL shows that during treatment, this water also acts as an inducer of laccase activity.

Keywords: Molecular docking. Ligninolytic Complex. Bioremediation. Basidiomycete. Hydrothermal Liquefaction.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Sítio catalítico do modelo de lacase do *P.ostreatus.* Cobre T1 interage com HIS397, HIS458 e CYS453. Cobre T2 interage com HIS67 e HIS400. Cobre T3α interage com HIS452, HIS402, HIS114. Cobre T3β interage com HIS69, HIS112, HIS454.....19

Figura 2. Modelo tridimensional de lacase de *P. ostreatus* *20*

Figura 3. Atracamento molecular entre a lacase de *P. ostreatus* e os compostos presentes no PHLT. ASN: asparagina; ARG: arginina; ALA: alanina; ASP: ácido aspártico; GLY: glicina; HIS: histidina; ILE: isoleucina; LEU: leucina; PHE: fenilalanina; PRO: prolina; VAL: valina. 32

Figura 4 Interações moleculares em duas dimensões entre a lacase de *P. ostreatus* e os compostos presentes no PHLT. Legenda: ASN: asparagina; ARG: arginina; ALA: alanina; ASP: ácido aspártico; GLY: glicina; HIS: histidina; ILE: isoleucina; LEU: leucina; PHE: fenilalanina; PRO: prolina; VAL: valina.....34

Figura 5. Teste de tolerância do *P. ostreatus* em meio sólido contendo PLHT.....37

Figura 6. Crescimento do *P. ostreatus* a partir do segundo dia de incubação até o oitavo dia sem PLHT. O número em cada figura representa o tempo de incubação (dias).....37

Figura 7. Crescimento do *P. ostreatus* em uma placa contendo meio BDA com 10% de PLHT. Cada figura representa um dia de incubação totalizando doze dias..... 37

Figura 8. Perfis produção de lacase, biomassa e pH de *P. ostreatus* em meio líquido. **A**: Meio BD; **B:** Meio Kirk modificado; **C:** Meio Kirk modificado com fibra de coco verde 39

Figura 9. Perfis de produção de lacase, pH, concentração de AR e biomassa de *P. ostreatus* em **A** Meio BD com 10% de PHLT; **B:** Meio BD com 20% de PHLT; **C:** Meio de Kirk modificado com PLHT a 15%; **D:** Meio de Kirk modificado com fibra de coco (KF) com PLHT a 15%..... 42

Figura 10. Degradação *in vivo* de CFT *in vivo* por *P. ostreatus* em meio Kirk modificado com PLHT (15%). Como controle utilizou-se as mesmas condições de cada ensaio, sem a presença do fungo.....44

Figura 11. Degradação de compostos fenólicos, biomassa e atividade enzimática por micélios de *P. ostreatus* quando o inóculo não submergiu no meio.....45

Figura 12. Concentração de compostos fenólicos totais (CFT) em meio Kirk com PLHT (15%) tratado *in vivo* com *P. ostreatus*.....45

Figura 13. Concentração de CFT em meio Kirk com fibra de coco e PLHT (15%) com *P. ostreatus*.....46

Figura 14 - Índice de Germinação, crescimento radicular e germinação das sementes de alface cultivadas seguindo o teste de ecotoxicidade em extratos após pré-tratamento do PHLT em meio líquido de batata suplementando com dextrose com 10% da água residuária.....48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Estrutura molecular presente no PHTL utilizadas como receptores no atracamento Molecular.....23

Tabela 2. Composição do meio de cultivo BDA.....24

Tabela 3. Composição do Meio Líquido de caldo de batata suplementado com dextrose.....25

Tabela 4. Composição do Meio Kirk Modificado.....26

Tabela 5. Concentrações da mistura de reação para determinação da atividade enzimática.....27

Tabela 6. Resultado das simulações de atracamento molecular entre a Lacase e cada um dos 8 compostos tóxicos avaliados.....31

LISTA DE ABREVIATURAS

(Å)	Angstrom
ABTS	2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato)
ADNS	Ácido 3,5-dinitosalicílico
ARG	Arginina
AR	Açúcares redutores
ASN	Asparagina
ASP	Aspartato
BDA	Batata, Dextrose e Ágar
$CaCl_2 * 2H_2O$	Cloreto de cálcio di-hidratado
CCIBt	Coleção de Cultura de Algas, Cianobactérias e Fungos
CFT	Compostos Fenólicos Totais
CRR	Crescimento relativo das raízes
$CuSO_4 * 5H_2O$	Sulfato de cobre penta-hidratado
DA	Digestão Anaeróbia
FZEA	Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos
GLY	Glicina
GR	Germinação Relativa
HIS	Histidina
IG	Índice de Germinação
ILE	Isoleucina
K	Kelvin
KH_2PO_4	Fosfato monopotássico
LEU	Leucina
LHT	Água residuária da liquefação hidrotermal
$MgSO_4 * 7H_2O$	Sulfato de magnésio hepta-hidratado
$MnSO_4 * H_2O$	Sulfato de manganês mono-hidratado
Mpa	MegaPascal
BD	Meio Batata-Dextrose
KF	Meio Kirk com adição de fibra de coco
PHE	Fenilalanina
PLHT	Água residuária pós liquefação hidrotermal
PRO	Prolina
USP	Universidade de São Paulo

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO **15**

2 OBJETIVOS **16**

2.1 OBJETIVO GERAL 16

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS 16

3 REFERENCIAL TEÓRICO **16**

3.1 LIQUEFAÇÃO HIDROTERMAL E PLHT 16

3.2 *Pleurotus ostreatus* 17

3.3 LACASE 19

3.4 ATRACAMENTO MOLECULAR 21

4 MATERIAIS E MÉTODOS **22**

4.1 EXPERIMENTOS *IN SÍLICO* 22

4.1.1 Modelo teórico da lacase de P. *ostreatus* **22**

4.1.2 Estudo de atracamento molecular **22**

4.2 EXPERIMENTOS *in vivo* 24

4.2.1 Água residuária PLHT **24**

4.2.2 Basidiomiceto **24**

4.2.3 Inóculo fúngico **24**

4.2.4 Meios líquidos **25**

4.2.5 Análise da produção de lacase em meio contendo PLHT **26**

4.2.6 Obtenção do filtrado **26**

4.3 ATIVIDADES ENZIMÁTICAS: LACASE 27

4.3.1 Determinação da massa seca **27**

4.3.2 Determinação de açúcares redutores **27**

4.3.3 Tolerância dos basidiomicetos a doses crescentes de PLHT **28**

4.3.4 Teste de degradação de compostos fenólicos totais **28**

4.3.5 Teste de ecotoxicidade **28**

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO 29

5.1 ESTUDO DE ATRACAMENTO MOLECULAR 29

5.2 TOLERÂNCIA DE *PLEUROTUS OSTREATUS* A DOSES CRESCENTES DE PLHT 36

5.3 CINÉTICA DE CRESCIMENTO DO *P. OSTREATUS* E PRODUÇÃO DE LACASE EM MEIO LÍQUIDO 38

5.4 CINÉTICA DE CRESCIMENTO DO *P. OSTREATUS* E PRODUÇÃO DE LACASE EM MEIO LÍQUIDO CONTENDO PLHT 41

5.5 DEGRADAÇÃO DE CFT 44

5.6 TESTE DE ECOTOXICIDADE 47

6 CONCLUSÃO 48

REFERÊNCIAS 50

1 INTRODUÇÃO

Liquefação hidrotermal (LHT) é um processo de grande interesse econômico por gerar de forma rápida um bio-óleo que pode ser uma alternativa aos combustíveis de origem fóssil, com a vantagem de poder empregar uma variedade de matérias-primas na alimentação da reação (SAENGSURIWONG *et al*.,2023). No entanto, a geração de uma água residuária denominada pós-liquefação hidrotermal (PLHT) configura-se como um dos principais gargalos que impedem a aplicação da LHT em larga escala (WATSON *et al*.,2020) pois esse subproduto é rico em moléculas tóxicas. Como relatado por Quispe *et al*. (2018) a caracterização do PLHT gerado por biomassa de *Spirulina* indicou a presença de fósforo, alta concentração de nitrogênio e amônia, assim como de pelo menos 10 compostos heterocíclico-nitrogenados. Uma forma de estimular a aplicação em larga escala da LHT, é reaproveitar essa água residuária na alimentação de outros processos, visando sua valorização e, consequentemente, lucro nas aplicações industriais. Um meio de valorizar esse subproduto é submetê-lo a digestão anaeróbia (DA) para geração de biogás. Contudo, a alta toxicidade dos compostos presentes no PLHT inibe a ação das bactérias empregadas no processo, e reduz a eficiência de produção gasosa (ZHOU *et al*.,2015). Assim, é necessário que se faça um pré-tratamento do PLHT antes de submetê-lo a DA. Apesar de existirem diversos tratamentos químicos e físicos, esses podem gerar outros compostos ainda mais tóxicos no processo (ELLOUZE; SAYADI, 2016). Portanto, utilizar uma abordagem biológica pode ser uma boa alternativa para contornar esse obstáculo.

Sabe-se que alguns fungos causadores da podridão da madeira como o basidiomiceto *P. ostreatus* é capaz de produzir um complexo ligninolítico composto por diversas enzimas entre as quais destaca-se a lacase, que também pode ser produzida por diversos organismos como plantas, bactérias, insetos e fungos. Essa enzima desperta grande interesse biotecnológico especialmente na biorremediação por ser inespecífica, o que permite a catálise de uma variedade de moléculas xenobióticas e recalcitrantes (DELOISA; GONZÁLEZ; PALOMARES, 2020).

Alguns trabalhos têm apontado para a eficiência do complexo ligninolítico fúngico basidiomicetos na degradação de compostos tóxicos originados de processos industriais, como a águas residuárias da indústria têxtil (BLANCO-VARGAS *et al*., 2018), farmacêutica (KANG *et al*, 2021), da produção de azeite de oliva (NTOUGIAS *et al*, 2021), da cadeia produtiva do café (SILVA, 2022) e compostos organoclorados (COELHO *et al*., 2019).

No presente trabalho foi realizado um estudo *in silico* para avaliar o potencial da lacase *P. ostreatus* em degradar os componentes do PLHT, para isso foram feitos testes de atracamento molecular entre moléculas encontradas no PLHT e um modelo teórico tridimensional de lacase desenhado por Silva *et al*. (2022), seguido pelos testes de produção de lacase por *P. ostreatus* CCIBt 2347 em diferentes meio de cultura e degradação *in vivo* do PLHT.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o potencial de *P. ostreatus* como o pré-tratamento dos compostos presentes a água residuária de liquefação hidrotérmica de algas (PLHT).

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estudar o atracamento molecular entre o modelo teórico da lacase de *P. ostreatus* (SILVA *et al*., 2022) e os compostos presentes no PLHT (QUISPE *et al*.,2018).
- Determinar o nível de tolerância de *P. ostreatus* a doses crescentes de PLHT em meio sólido;
- Avaliar o efeito do PLHT na produção de lacase por *P. ostreatus* em diferentes meios de cultivo;
- Avaliar o potencial de pré-tratamento do PLHT pelo monitoramento da degradação de compostos fenólicos;
- Avaliar a possível redução da toxicidade do PLHT por teste de ecotoxicidade.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 LIQUEFAÇÃO HIDROTERMAL E PLHT

A liquefação hidrotermal é uma metodologia que aplica altas temperaturas e altas pressões sobre uma determinada biomassa a fim de gerar uma espécie de óleo com características semelhantes ao petróleo, a partir do processo de pirólise, sem que seja necessário secar a matéria-prima, a qual pode ser diversa, incluindo esterco, lodo de esgoto e algas. O processo hidrotermal pode ser dividido em 3 tipos: 1. Carbonização Hidrotermal, 2. Liquefação hidrotermal e 3. Gaseificação Hidrotermal que se diferenciam quanto ao tipo de produto gerado dada as diferentes condições de operação. Para esses processos, a temperatura e a pressão aplicadas estão na faixa de 523 a 647 K e de 4 a 22 Mpa, sendo que a LHT ocorre no nível intermediário (ELLIOT *et al*., 2014).

Apesar da LHT ser um mecanismo promissor, durante o processo ocorre a geração de subprodutos, entre os quais está o PLHT que se caracteriza pela composição extremamente complexa de alta carga orgânica, nutrientes e substâncias potencialmente tóxicas (QUISPE *et al*., 2018). Caracterização do PLHT derivado de algas por Chen *et al*. (2014) indicou que os principais grupos presentes são ácidos orgânicos e compostos derivados de aminas cíclicas. Na produção a 320 °C houve aumento de alcalóides e derivados fenólicos. ZHENG *et al*., 2016 observaram a presença de grupos como benzeno, fenóis, heterocíclicos nitrogenados/oxigenados além de derivados de amida.

Alguns estudos têm apontado que o PLHT pode ser reaproveitado e valorizado na produção de biogás a partir do processo de digestão anaeróbia (ZHOU *et al*., 2015). Contudo, ZHENG *et al*. (2016) destacam que essa composição orgânica complexa dificulta a degradação biológica do PLHT por inibir a ação de microrganismos utilizados no processo, o que prejudica a eficiência na produção de biogás. Dessa forma é necessário que se faça um pré-tratamento dessa água residuária a fim de reduzir sua toxicidade para que haja melhor aproveitamento na geração do biogás.

A aplicação de mecanismos biológicos pode ser uma forma eficiente e ecológica de obter esse pré-tratamento, visto que métodos químicos ou agentes físicos podem gerar subprodutos indesejados de característica xenobiótica e/ou recalcitrante (PRZYSTAS; GODLEWSKA; SOTA,2016). Nesse sentido, este trabalho apresenta uma proposta de pré-tratamento inovador pela avaliação da aplicação do fungo basidiomiceto *P. ostreatus* visto a sua conhecida capacidade de degradar moléculas de composição complexa, xenobióticas e recalcitrantes.

3.2 *Pleurotus ostreatus*

Os fungos da podridão são capazes de degradar os componentes da madeira. De acordo com a forma de ação esses microrganismos podem ser classificados em três principais grupos: fungos da podridão mole, fungos da podridão marrom e fungos da podridão branca (BARI *et al*., 2020).

Os fungos da podridão mole conseguem degradar polissacarídeos de partes superficiais, causando escurecimento e amolecimento da madeira (ANDLAR *et al*, 2018). Os fungos da podridão marrom degradam a celulose, hemicelulose e realizam modificação da lignina por dimetilação em um processo que envolve reação de Fenton e de compostos de baixa massa molecular, dado que as enzimas secretadas não conseguem penetrar na célula intacta da madeira

nos estágios iniciais do processo. Íons de ferro reagem com água oxigenada produzida pelo fungo gerando radicais de hidroxila, o que desestabiliza a matriz lignocelulósica (ARANTES; GOODELL, 2023).

Os fungos da podridão branca conseguem degradar lignina, além da celulose e da hemicelulose, deixando a madeira com aparência esbranquiçada e fibrosa (LI *et al*., 2022). O mecanismo de ação desses fungos se baseia na ação de enzimas do chamado complexo ligninolítico constituído essencialmente por manganês peroxidase, lignina peroxidase, peroxidase versátil e Lacase (BILAL *et al*., 2017). O fungo *P. ostreatus* é um basidiomiceto bastante cultivado mundialmente para culinária que além de ser comestível encontra aplicação na biorremediação por ser um dos principais fungos causadores da podridão branca, e deter um aparato enzimático capaz de agir na degradação de moléculas complexas e potencialmente tóxicas (CHUN, 2019).

Entre as aplicações de *P. ostreatus* na biorremediação é possível citar o tratamento de uma variedade de substâncias. Kist *et al*., (2020) aplicaram esse basidiomiceto na degradação dos compostos 2,4 e 2,6-dinitrotolueno derivados da indústria de explosivos e indicaram relação direta do mecanismo de degradação com a ação de enzimas do complexo ligninolítico. Vaseen, Singh e Singh (2020) cultivaram o fungo em meio contendo água residuária da lavagem de carvão e perceberam que o fungo conseguiu assimilar os metais tóxicos no basidiocarpo concluindo que o fungo foi eficiente na detoxificação dos metais presentes na água residuária. No trabalho de Bhatnagar, Tamboli e Mishra (2021) foi observado que apesar do fungo sofrer inibição no crescimento devido à natureza tóxica do corante, em comparação ao meio sem corante, o fungo conseguiu uma degradação de 70 a 95% dos corantes sintéticos recalcitrantes azul brilhante de remazol R; vermelho de metila e verde de malaquita. Além disso, conseguiu remover quase completamente o fármaco micropoluente lamotrigina no estudo feito por Chefetz *et al*. (2019). Mediante a renovação nutrientes ao longo da cultura, os autores demonstraram que o isolado de *P. ostreatus* conseguiu estender o tempo de capacidade de degradação. Além disso, conseguiu degradar 82,62% dos compostos fenólicos e descolorir 84,26% da água residuária da produção de azeite de oliva no trabalho de Dimou *et al*. (2023).

Tais estudos apontam para a capacidade do *P. ostreatus* em sobreviver a ambientes adversos. Associar essa tolerância com a produção de enzimas ligninolíticas, especialmente a lacase, que apresenta alto potencial redox, baixa especificidade pelo substrato e um sistema de mediadores enzimáticos que amplia a quantidade de moléculas que podem ser catalisadas pela enzima (DAO *et al*, 2021; EZIKE, 2021; UPADHYAY; SHRIVASTAVA; AGRAWAL, 2016),

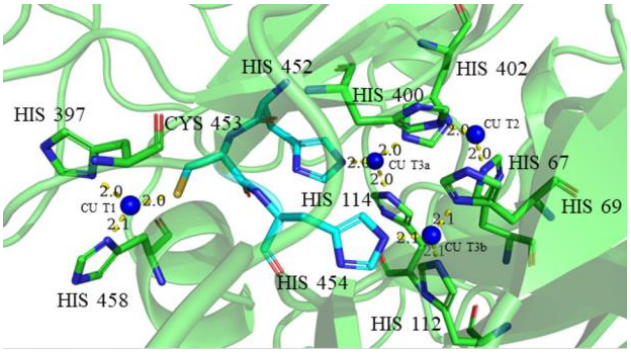
permite supor que esse basidiomiceto além de tolerar a presença de PLHT pode também ser apto para o tratamento das moléculas tóxicas presentes nessa água residuária.

3.3 LACASE

A família das enzimas multicobre-oxidades azuis são divididas em dois grupos: multicobre oxidase e nitrito redutase. Essa é uma das mais importantes famílias de enzimas que contém cobre na estrutura. Há uma variedade de proteínas que compõem esse grupo as quais podem conter cadeias de 300 a 1000 amino ácidos com 2 a 6 átomos de cobre na estrutura multidomínio (KOMORI e HIGUCHI, 2010).

Lacases (EC 1.10.3.2) fazem parte do grupo das enzimas multicobre oxidases. Apresentando de 3 a 4 tipos de cobre no seu sítio catalítico, sendo o Cu T1 responsável por dar coloração azul a enzima. Essa macromolécula catalisa as reações por oxidação do substrato ao passo que reduz oxigênio molecular à água (BALDRIAN *et al*., 2006). O Cu T1 também é responsável pelo início da reação e desempenha papel fundamental como o aceptor de elétrons do substrato a ser oxidado. Por outro lado, os cobres T2 e T3 são responsáveis pela redução do oxigênio molecular a água (MATHUR; SANYAL; DEY, 2021). Em lacases que possuem três domínios, o Cu T1 fica localizado na parte mais externa da proteína enquanto os cobres do T2 e T3 formam um agrupamento de 3 cobres na parte mais interna da lacase na interface entre os domínios 1 e 3. Nesse sistema ocorre a presença de pelo menos 10 histidinas sendo que o Cu T3 se liga a seis partes de imidazol desse aminoácido enquanto o Cu T2 se liga a outras 2. As duas histidinas restantes coordenam o cobre tipo 1, juntamente com um resíduo de cisteína (PARK *et al*., 2015; SITARZ; MIKKELSEN; MEYER, 2016; SILVA *et al*., 2022), como mostra a Figura 1.

Figura 1 – Sítio catalítico do modelo de lacase do *P. ostreatus.* Cu T1 interage com HIS397, HIS458 e CYS453. Cu T2 interage com HIS67 e HIS400. Cu T3α interage com HIS452, HIS402, HIS114. Cu T3β interage com HIS69, HIS112, HIS454.

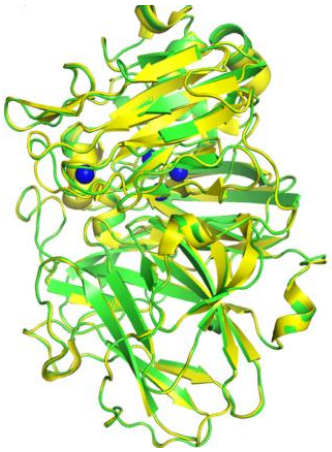


Fonte: SILVA *et al*., 2022.

Dentre 200 tipos de oxidases e oxigenases, a habilidade catalítica da lacase a coloca entre um pequeno grupo de macromoléculas capazes de realizar esse tipo de reação, do qual fazem parte citocromo-c oxidase, arcorbato-L oxidase, ceruloplasmina, bilirrubina oxidase e fenoxazinona sintase (GIARDINA *et al*., 2009).

Por conter um alto potencial redox, essas enzimas são capazes de catalisar a oxidação de uma variedade de substratos, principalmente compostos fenólicos, que tem baixo potencial redox. Além disso, a lacase consegue oxidar alguns compostos de baixa massa molecular e utilizá-los como mediadores enzimáticos, dessa forma consegue acessar locais que por si só não conseguiria. Com esse mecanismo permite também a ocorrência de oxidação de moléculas com alto potencial redox (BALDRIAN *et al*.,2006; GIARDINA *et al*., 2009).

Figura 2 – Modelo tridimensional de lacase de *P. ostreatus*.



Fonte: Silva *et al*.,2022.

A Figura 2 apresenta o modelo teórico tridimensional de lacase de *P. ostreatus* (Lacc4MN) descrito por Silva *et al*. (2022). Esse modelo teórico da lacase é composto por 4 átomos de cobre, contém alta quantidade de folhas-β que leva a formação de motivos chave-grega em cada um dos domínios que são estabilizadas por pontes de hidrogênio entre as estruturas de folha-β. Os autores demonstaram que o sítio 3 é o sítio catalítico da lacase de *P. ostreatus* e que é composto por 35 resíduos de aminoácidos sendo 21 deles apolares, que podem ser responsáveis pela estabilização do ligante, apresentando os resíduos de ancoramento.

A definição da estrutura tridimensional da Lacc4MN abre novos caminhos para a elucidação dos mecanismos e possibilidades de atracamento que essa enzima é capaz de realizar com uma variedade de substratos, tornando-a ainda mais interessante para aplicações nas mais diferentes indústrias, inclusive na biorremediação.

3.4 ATRACAMENTO MOLECULAR

Durante muito tempo, a cristalografia era o método mais comum de análise de estruturas de lacase (JANUSZ *et al*., 2020). No entanto, com o avanço da computação, desenvolvimento da bioinformática e elevada geração de dados permitiu-se que novos modelos enzimáticos fossem construídos a partir de análises computacionais. Em posse desses modelos, o atracamento molecular tornou-se uma das ferramentas mais empregadas na análise de dados biológicos atualmente sendo indispensável no estudo de interação entre estruturas alvo e ligantes (SCHERER *et al*., 2021).

A essência do atracamento molecular é estabelecer uma previsão da conformação de ligação entre uma proteína e um ligante utilizando os métodos computacionais. Para isso, tem como base amostras conformacionais do ligante no sítio ativo da proteína que gera um ranqueamento dos valores de ligação (MENG *et al*,2012). As etapas do atracamento molecular compreendem a escolha e tratamento da proteína e do ligante, seleção do tipo de abordagem, escolha do melhor *scoring* (pontuação) e validação experimental. A energia de ligação está relacionada com a atribuição da pontuação de ligação. Ela pode ser estimada pela equação de Gibbs-Helmholtz e indica a estabilidade do complexo estabelecido entre a enzima e o ligante, sendo que quanto menor o valor da energia, maior a estabilidade e melhores resultados podem ser obtidos na escolha de posições de ligação com esses valores (GUPTA, SHARMA e KUMAR *et al*., 2018).

O atracamento molecular é uma atividade intensamente empregada no ramo da medicina por fornecer informações importantes quanto à forma de ligação de moléculas de interesse a alvos que possam ser usados na formulação de novos medicamentos (SETHI *et al*., 2019). Entre as possibilidades de aplicação pode-se destacar o *virtual screening*, previsão de efeitos adversos, descoberta de novos alvos, redirecionamento de drogas e polifarmacologia (MUHAMMED; YALCIN *et al*.,2022). As potencialidades dessa técnica também podem ser aplicadas na biorremediação, com o estudo de enzimas que possam degradar compostos perigosos que coloquem em risco a saúde das pessoas e o meio ambiente como um todo (LIU *et al*.,2018; BALLAMINUT *et al*.,2019). A bioinformática fornece um meio rápido e de menor custo no que se refere a busca de novas moléculas de interesse em comparação com outros métodos. A realização do atracamento permite compreender também a capacidade que enzimas já conhecidas têm em degradar poluentes (SRINIVASAN *et al*, 2019).

Bhatt *et al*. (2023) usaram o atracamento molecular para avaliar a capacidade de lacase em se ligar e degradar os compostos glifosato, isoproturon, polímero de lignina e paration. Os

resultados mostram boa afinidade da enzima pelos alvos. Nos ensaios práticos foi possível confirmar diferentes níveis de degradação para cada um dos compostos estudados. Singh, Kumari e Pal (2015) aplicaram atracamento molecular para avaliar interação das lacases do basidiomiceto *Trametes versicolor* e da bactéria *Bacillus subtilis* na degradação de sete micropoluentes farmacêuticos (roxitromicina, claritromicina, indometacina, benzafibrato, metoprolol, celiprolol e iopromida). Por energia de ligação avaliaram que tanto a enzima fúngica como a bacteriana podem ser eficientes na degradação de pelo menos três das moléculas avaliadas. Dasgupta, Vishwakarma e Gupta (2020) aplicaram atracamento molecular para avaliar interação entre lacase do fungo*Trametes versicolor* e 5 compostos sintéticos, sendo observada interação de todos os corantes com o sítio ativo da enzima com baixa energia de ligação, formação de pontes de hidrogênio e ligações pi.

No presente estudo, além do estudo *in silico*, buscou-se avaliar experimentalmente a capacidade de produção de lacase em diferentes meios de cultura, bem como a degradação dos compostos fenólicos totais presentes no PLHT.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 EXPERIMENTOS *in sílico*

4.1.1 Modelo teórico da lacase de *P. ostreatus*

O modelo teórico da lacase de *Pleurotus ostreatus* utilizado foi construído por Silva e colaboradores (2022) empregando a técnica de modelagem por homologia utilizando-se o programa Modeller. O modelo foi construído com base na sequência da lacase de *P. ostreatus* e o modelo cristalográfico da lacase obtidos nos bancos de dados NCBI (AOM73725.1) e Protein Data Bank (PDB ID 4JHU), respectivamente, e apresenta mais de 90% dos aminoácidos dispostos em regiões energeticamente mais favoráveis.

4.1.2 ESTUDO DE ATRACAMENTO MOLECULAR

As estruturas 3D dos resíduos N-heterocíclicos provenientes da liquefação hidrotermal de algas estão apresentadas na Tabela 1. A preparação para o estudo de atracamento molecular foi feita usando o UCSF Chimera (PETTERSEN *et al*., 2004) e por meio da ferramenta Dock Prep, realizou-se a adição de hidrogênio e das cargas. O *grid* usado foi determinado com base no modelo tridimensional 1KYA ficando localizado na região do bolsão próximo ao Cu T1 da lacase a fim de abranger os aminoácidos do sítio ativo. Assim, ficou com as dimensões

X=14,6736 Å, Y=25,613 Å, Z=12,9 Å, e centrado nas coordenadas X=5,04339 Å, Y=-44,7222 Å, Z=-23,1315 Å, dado que é nessa região que está o centro ativo do modelo da lacase, conforme descrito por Silva e colaboradores (2022). Após o preparo, avaliou-se o atracamento molecular no AutoDock Vina (TROTT; OLSON, 2009) utilizando-se atracamento semirrígido/semiflexível e a análise dos atracamentos ocorreu no Discovery Studio (BIOVIA, 2022). Para cada ligante foram realizados 10 atracamentos.

Tabela 1 - Estrutura molecular presente no PHTL utilizadas como receptores no atracamento molecular.

N-heterocíclicos	ID	Site (Estrutura 3D)
Piperidine	8082	https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/8082
Pyrazine, methyl	7976	https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/7976
Pyrazine, 2,5-dimethyl	31252	https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/31252
Pyrazine, 2-ethyl-6-methyl	26332	https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/26332
2-Pyrrolidinone ou butyrolactam	12025	https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/12025
2-Piperidinone or δ-valerolactam	77761	https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/12665
Pyrrolidine, 1-(1-oxopropyl)	551043	https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/551043
Caprolactam	7768	https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/7768

Legenda: ID – Identificador das estruturas moleculares dos resíduos N-heterocíclicos presentes no PLHT

Fonte: Autores, 2023.

4.2 EXPERIMENTOS *in vivo*

4.2.1 Água residuária PLHT

O PLHT é uma água residuária gerada após o processo de LTH, cujas propriedades variam substancialmente, dependendo da biomassa e das condições do processamento. Quispe *et al*. (2018) realizou a caracterização do PLHT utilizado nessa pesquisa, que foi cedido pela Profa. Dra. Giovana Tommaso da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos (FZEA) pertencente a Universidade de São Paulo (USP). A referida água residuária tem elevado conteúdo de nitrogênio total, fósforo, sólidos totais, compostos N-heterocíclicos, como piridinas e seus derivados, com pH alcalino na faixa de 8,64.

4.2.2 Basidiomiceto

Neste trabalho foi utilizado o basidiomiceto *P. ostreatus* cedido pela Coleção de Cultura de Algas, Cianobactérias e Fungos (CCIBt) do Instituto de Botânica, IBt, da Secretaria de Infraestrutura e Meio Ambiente do Estado de São Paulo, sob a numeração 2347.

4.2.3 Inóculo fúngico

O inóculo fúngico foi preparado em meio BDA (Tabela 2). As batatas foram descascadas, cozidas em água destilada e filtradas. Ao caldo, acrescentou-se o ágar, a dextrose e a água destilada até completar-se 1000,0 mL. Os componentes do meio de cultura foram fundidos em banho maria, e autoclavados a 121°C e 1 atm durante 20 minutos. Em condições assépticas o meio foi vertido em placas de Petri previamente esterilizadas. Após a solidificação e resfriamento, as placas contendo o meio de cultura foram inoculadas com 1 disco (5 mm de diâmetro) de meio de cultura contendo o fungo previamente crescido. Em seguida as placas foram incubadas a 28°C, até que o micélio atingisse ¾ da área da placa.

Tabela 2 - Composição do meio de cultivo BDA.

Composição	**(g/L)**
Batata	200,0g
Dextrose	20,0g
Ágar	20,0g
Água destilada	1,0L

Fonte: FAHIM, 1966.

4.2.4 Meios líquidos

A produção de lacase e de biomassa por *P. ostreatus* foram avaliadas em três meios de cultura, (BD, Kirk modificado e Kirk suplementado com fibra de coco verde) na presença e na ausência de PLHT. O meio BD foi preparado em caldo de batata suplementado com dextrose (Tabela 3), sendo que as batatas foram previamente descascadas, cozidas em água destilada e filtradas. Acrescentou-se ao caldo a dextrose e o volume de água destilada foi ajustado para 1000,0 mL. A composição do meio Kirk Modificado está na Tabela 4. A avaliação do crescimento do fungo foi feita durante o período de 30 dias, exceto para o meio BD (caldo de batata). A cada cinco dias o cultivo foi interrompido para coleta do extrato e biomassa. O meio Kirk modificado com a adição de 5 g de fibra de coco. Recebeu fibras de coco verde com 5 cm de comprimento em cada Erlenmeyer. Para todos os meios foram utilizados frascos do tipo Erlenmeyer com capacidade de 250 mL contendo 50 mL de meio de cultivo previamente autoclavado (1 atm, 121°C durante 20 minutos) foram inoculados com cinco discos (diâmetro de 0,8 mm) de crescimento fúngico em meio BDA e incubados em estufa a 28°C. Os ensaios foram feitos em quintuplicata.

Tabela 3 - Composição do Meio BD - caldo de batata suplementado com dextrose

Componente	Quantidade
Batata	200,0g
Dextrose	20,0g
Água Destilada	1000,0 mL

Fonte: Dados da pesquisa, 2023.

Tabela 4 - Composição do Meio Kirk Modificado.

Nutriente	Concentração
Glicose	5 g L^{-1}
Extrato de Levedura	2 g L^{-1}
KH2PO4	0,2 g L^{-1}
MgSO4 7H2O	0,05 g L^{-1}
CaCl2 2H2O	0,013 g L^{-1}
MnSO4 H2O	0,016 g L^{-1}
CuSO4 5H2O	0,2 mM

Fonte: MOREIRA, 2021.

4.2.5 Análise da produção de lacase em meio contendo PLHT

A análise da produção de lacase foi realizada em meio BD e em meio de Kirk, conforme descrito no item 4.2.7, ajustando a concentração final de PHLT para 10% e 20%, em meio BD e 15% para o meio de Kirk, ambos com pH do efluente ajustado para 5,5. A esterilização e a inoculação ocorreram como descrito em itens anteriores. Também foi feita a imobilização do fungo em fibra de coco em meio KF durante 15 dias de incubação para a formação de um pellet (fungo crescido sobre a fibra de coco) em seguida, o pelllet foi transferido para um novo Erlenmeyer contendo meio Kirk com 15% de PLHT.

4.2.6 Obtenção do filtrado

O filtrado foi obtido por filtração a vácuo do meio de cultura líquido após a incubação, utilizando papel filtro. O filtrado foi utilizado para a avaliação da produção enzimática e aferição do pH. A biomassa retida no papel filtro foi utilizada para a determinação da massa seca.

4.3 ATIVIDADES ENZIMÁTICAS: LACASE

A atividade da enzima foi determinada pela oxidação do ABTS a 420nm (ε: 36.000 M^{-1}. cm^{-1}) em tampão acetato de sódio 0,1 M, pH 4,8, na ausência de H_2O_2, durante 420 segundos, em espectrofotômetro UV – 1000A, de acordo com Ballaminut e Matheus (2007). A mistura de reação está expressa na Tabela 5. Uma unidade enzimática correspondeu à quantidade de enzima capaz de oxidar 1 μMol de ABTS por minuto.

Tabela 5 - Concentrações da mistura de reação para determinação da atividade enzimática.

Componente	Quantidade (μL)
Tampão Acetato de Sódio	450
ABTS	150
Extrato enzimático	900

Fonte: BALLAMINUT; MATHEUS, 2007.

4.3.1 Determinação da massa seca

A quantificação do crescimento fúngico em meio líquido foi realizada pela determinação da biomassa seca, de acordo com a equação 1. A biomassa retida na filtração foi incubada em estufa a 60ºC, por 72 horas, em papel filtro seguida de aferição por gravimetria.

$$X = \frac{Massa2 - Massa1}{Massa1} \qquad \text{Eq. 1}$$

Onde:

X: Valor da Biomassa;

$Massa_2$: Média do papel filtro com fungo;

$Massa_1$: Média do papel filtro sem fungo.

4.3.2 Determinação de açúcares redutores

Para a quantificação de açúcares utilizou o método de Miller (1959), em que foi utilizado 500 μL do filtrado de cada ensaio e 500 μL de ADNS. A mistura foi fervida por 5

minutos, adicionada de 2,5 mL de água ultrapura e procedeu-se a leitura a 540 nm. Os testes foram realizados em duplicatas. A curva padrão para a determinação dos açúcares redutores foi construída com o intervalo de diluição da glicose de 0,1 mg/mL com limites inferior e superior de 0 $mg.mL^{-1}$ e 0,9 $mg.mL^{-1}$, respectivamente. A equação da reta para a curva foi y = 1,0863x - 0,0583 e o valor de R^2 igual a 0,999.

4.3.3 Tolerância dos basidiomicetos a doses crescentes de PLHT

Foi avaliada pela determinação da capacidade de crescimento do basidiomicetos durante o cultivo em meio BDA suplementado pela adição de doses crescentes de PLHT (1%, 2,5%, 5%, 7,5%, 10%, 15%, 20% e 25%), com pH ajustado para 5,5, seguido de autoclavagem por 20 minutos, a 1 atm, e 121°C. Em capela de exaustão higienizada, o meio foi vertido nas placas de Petri e após o resfriamento as placas foram inoculadas com 1 disco (5 mm) de inoculo. As placas foram incubadas a 28 °C. A cada 24 horas foram realizadas medições dos quatro eixos de crescimento radial, com uso de uma régua. Os testes foram realizados em triplicata.

4.3.4 Teste de degradação de compostos fenólicos totais

A degradação dos compostos fenólicos totais foi monitorada pela quantificação dessas moléculas utilizando o método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteau (WOISKY; SALATINO, 1998). A curva padrão foi construída com limites inferior e superior de 0,0224 e 0,064 mg/mL dissolvido em etanol 100% (y: 10,414x e R^2: 0,9935). Os resultados foram expressos em mg/mL. Apesar de ser amplamente empregado para determinação de fenóis, de acordo com Ikawa *et al*. (2003) esse método também pode ser útil na detecção de compostos heterocíclicos nitrogenados. Por convenção, resolveu-se adotar a nomenclatura de Compostos fenólicos totais para referir à degradação desses compostos combinados.

4.3.5 Teste de ecotoxicidade

Serve como ferramenta de avaliação da eficiência dos bio-tratamentos (BILAL *et al*., 2017). A ecotoxicidade do PLHT antes e após o tratamento biológico com *P. ostreatus,* foi avaliado em meio BD sem diluição e diluído (10^{-1} e 10^{-2}), por meio de teste de germinação de sementes de alface conforme descrito por (TAM; TIQUIA, 1994). Para isso, sementes de alface (*Lactuca sativa*) foram dispostas sobre papel de filtro em placas de Petri, previamente esterilizado e embebido com 2 mL de meio de cultivo. Como controle, o meio de cultivo foi substituído por água destilada esterilizada. Os testes foram feitos em quintuplicata. As amostras

foram incubadas no escuro a 25 ± 2 ºC. O tempo total de duração do teste foi de 7 dias e o índice de germinação (IG) foi calculado combinando o percentual de germinação de sementes e a medida de crescimento das raízes, de acordo com as seguintes equações 1 a 3 descritas por Tam e Tíquia (1994).

Germinação Relativa (GR):

$$GR(\%) = NTNC \times 100 \quad \text{Eq.2}$$

Sendo:
NT = número de sementes que germinaram nos testes;
NC = número de sementes que germinaram no controle.

Crescimento relativo das raízes (CRR):

$$CRR(\%) = MTMC \times 100 \quad \text{Eq.3}$$

Sendo:
MT = média do crescimento das raízes na amostra de efluente;
MC = média do crescimento das raízes no controle.

Índice de Germinação (IG):

$$IG(\%) = GR(\%) * CRR(\%)100 \quad \text{Eq.4}$$

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 ESTUDO DE ATRACAMENTO MOLECULAR

A Tabela 6 e as Figuras 3 e 4 contém os resultados do estudo de atracamento molecular entre o modelo teórico da lacase de *P. ostreatus* e os oito compostos N-heterocíclicos presentes no PHLT, descritos por Quispe e colaboradores (2018). A Tabela 6 apresenta os valores de energia livre de ligação e as interações entre o modelo teórico da lacase e os ligantes. A energia livre de ligação foi negativa para todos os atracamentos. Ocorreu formação de pontes de hidrogênio em seis das moléculas estudadas, exceto para Pyrazine, 2-ethyl-6-methyl e Pyrrolidine, 1-(1-oxopropyl).

As moléculas piperidine, 2-piperidinone e caprolactam estabeleceram pontes de hidrogênio com o sítio ativo da lacase a partir do Aspartato (ASP) 208. As outras moléculas realizaram ligações de pontes de hidrogênio com outros aminoácidos. A Pyrazine, 2,5-dimethyl com Arginina (ARG) 270; 2-Pyrrolidinone com Glicina (GLY) 268 e ARG 270; Pyrazine - methyl com Asparagina (ASN) 210.

Como mencionado anteriormente a Pyrazine, 2-ethyl-6-methyl e Pyrrolidine, 1-(1-oxopropyl) não realizaram ligações de ponte de hidrogênio com nenhum aminoácido, no entanto, há presença de outros tipos de ligações, para a Pyrazine, 2-ethyl-6-methyl ocorreram ligações do tipo Pi Ânion com ASP 208; Alkyl com Isoleucina (ILE) 455 e Prolina (PRO) 398; e Pi Alkyl com Histidina (HIS) 458, ILE 455, Fenilalanina (PHE) 241, PRO 396 e Leucina (LEU) 267. Para a Pyrrolidine, 1-(1-oxopropyl) ocorrem ligações do tipo Carbono-Hidrogênio com ASP 208 e PRO 396; Alkyl com HIS 458 e Pi Alkyl com LEU 267.

Todas as moléculas analisadas apresentam uma ou mais interações com os aminoácidos GLY 268, ASN 210, ILE 455, PRO 398, PHE 241, LEU 267, PRO 396, HIS 458 e ASP 208 os quais também estão presentes no sítio ativo do modelo de lacase descrito por Silva e colaboradores (2022), sendo HIS 458 e ASP 208 aminoácidos conservados presentes em todas as lacases, que atuam como aceptores de prótons e elétrons, respectivamente. Enquanto aqueles aminoácidos de natureza hidrofóbica podem estar relacionados com a estabilização da interação proteína-ligante. Dessa forma, as interações observadas entre os ligantes e o modelo indicam possível degradabilidade dos compostos presentes no PHLT por ação enzimática da lacase de *P. ostreatus.*

Outros fatores também corroboram com a hipótese de degradação dos referidos compostos. Maia e Amador (2018) relatam em seu estudo de atracamento molecular com enzimas desintoxicantes, que baixos valores de energia livre de ligação são resultado de uma maior afinidade entre a enzima e o ligante, e que a distância entre as ligações inferior a 4Å valida a possibilidade de reações de transformação das moléculas. Ambas as características foram visualizadas neste estudo de atracamento entre a lacase e os compostos N-heterocíclicos avaliados, assim, a degradação da Pyrazine, 2-ethyl-6-methyl e Pyrrolidine, 1-(1-oxopropyl), que não apresentaram formação de ponte de hidrogênio, também pode ocorrer.

Sabe-se que a lacase tem capacidade de oxidar uma gama de substratos com o uso de oxigênio como aceptor de elétrons (HIROFUMI; YOSHIKI, 2015), além dessa via, a lacase pode usar de mediadores, que são facilmente oxidados e podem expandir a atividade catalítica aumentando o potencial redox da enzima (NGUYEN, 2016). A enzima oxida o mediador que irá realizar a oxidação real do substrato ou molécula tóxica no caso (NGUYEN, 2014), deste modo as moléculas podem ser degradadas pela ação da lacase. Assim, as moléculas presentes no PHLT e avaliadas no estudo de atracamento molecular demonstram possibilidade de degradação por ação direta ou indireta da lacase, necessitando de testes *in vitro* ou *in vivo,* para tal comprovação.

Tabela 6 - Resultado das simulações de atracamento molecular entre a Lacase e cada um dos 8 compostos presentes no PLHT.

Composto do PLHT	Energia livre de ligação (Kcal/mol)	Número de pontes de hidrogênio	Posição dos resíduos	Distância aa-Terminal (Å)
Piperidine	-2,5 a -3,4	1	ASP 208 - H	1,89
Pyrazine, methyl	-2,4 a -3,6	1	ASN 210 - N	3,30
Pyrazine, 2,5-dimethyl	-2,4 a -3,1	1	ARG 270 - N	2,99
Pyrazine, 2-ethyl-6-methyl	-2,7 a -3,8	0	-	-
2-Pyrrolidinone ou butyrolactam	-2,1 a -3,8	2	GLY 268 - O ARG 270 - O	2,98 2,94
2-Piperidinone or δ-valerolactam	-2,8 a -3,8	1	ASP 208 -H	2,60
Pyrrolidine, 1-(1-oxopropyl)	-2,7 a -3,9	0	-	-
Caprolactam	-2,6 a -3,9	1	ASP 208 - H	2,09

Fonte: Dados da pesquisa, 2023.

Figura 3 - Atracamento molecular entre a lacase de *P. ostreatus* e os compostos presentes no PHLT. Legenda:ASN: asparagina; ARG: arginina; ALA: alanina; ASP: ácido aspártico; GLY: glicina; HIS: histidina; ILE: isoleucina; LEU: leucina; PHE: fenilalanina; PRO: prolina; VAL: valina.

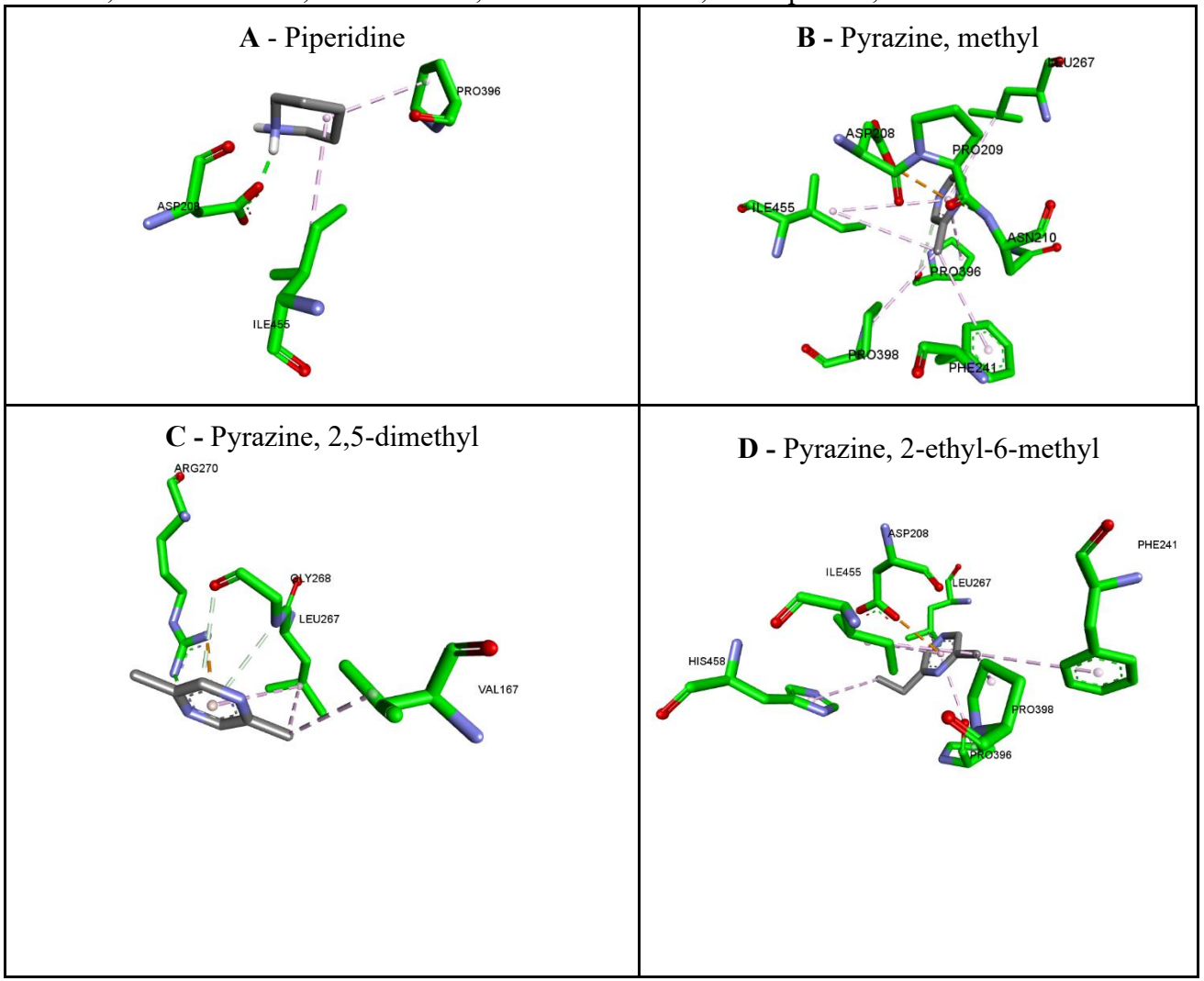
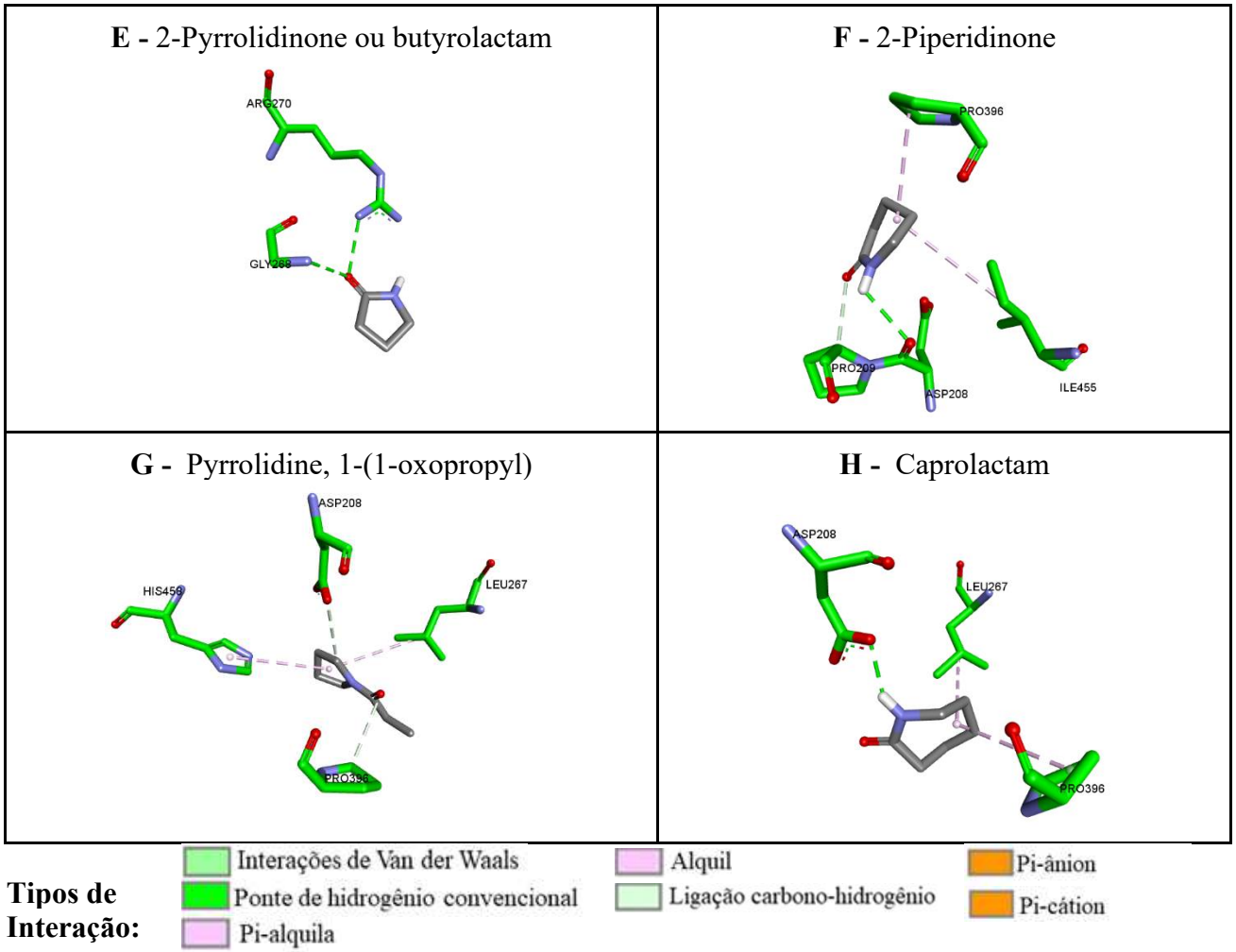


Figura 3 - Atracamento molecular entre a lacase de *P. ostreatus* e os compostos presentes no PHLT (Continuação).



Fonte: Dados da pesquisa, 2023

Figura 4 - Interações moleculares em duas dimensões entre a lacase de *P. ostreatus* e os compostos presentes no PHLT. Legenda: ASN: asparagina; ARG: arginina; ALA: alanina; ASP: ácido aspártico; GLY: glicina; HIS: histidina; ILE: isoleucina; LEU: leucina; PHE: fenilalanina; PRO: prolina; VAL: valina.

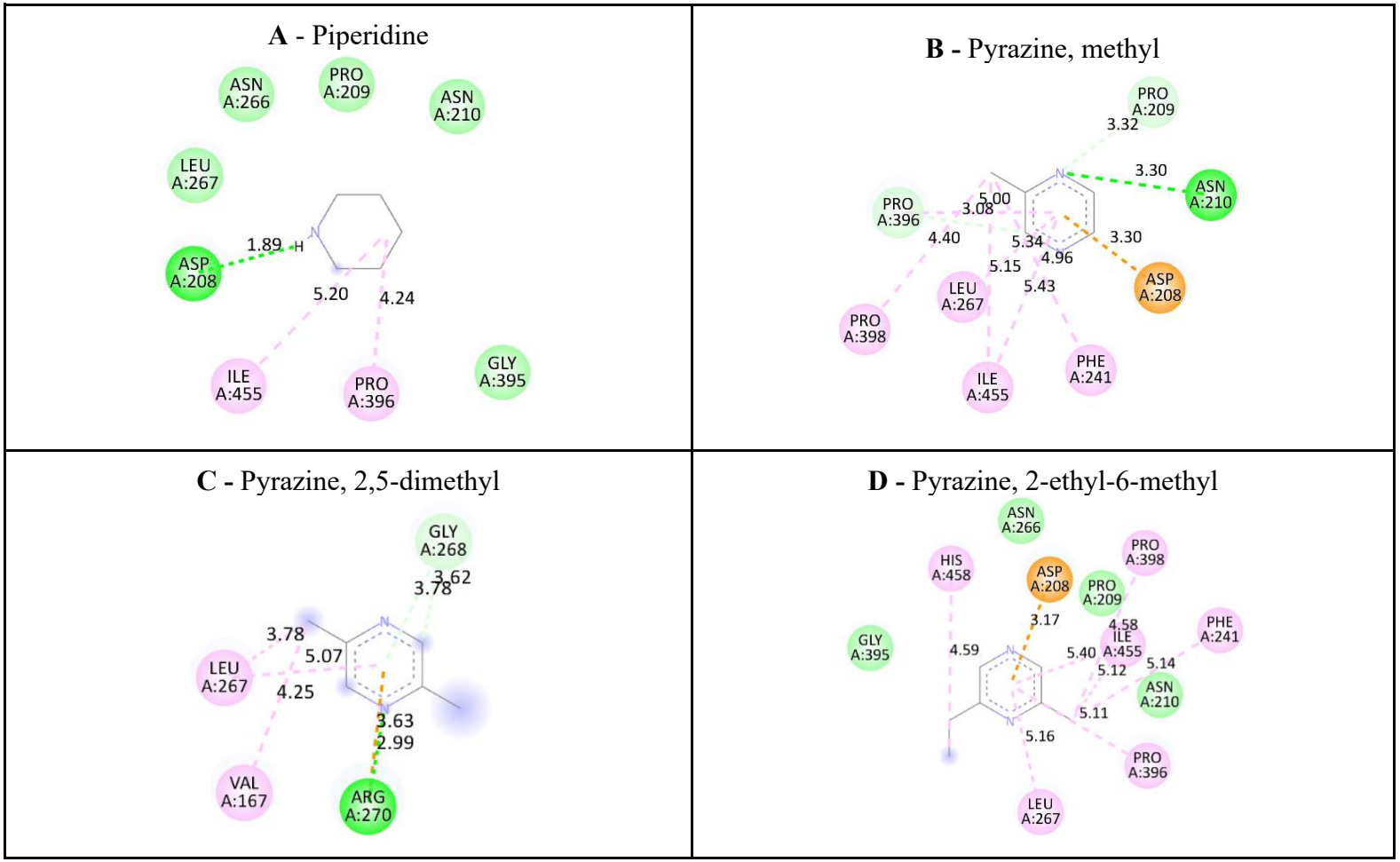
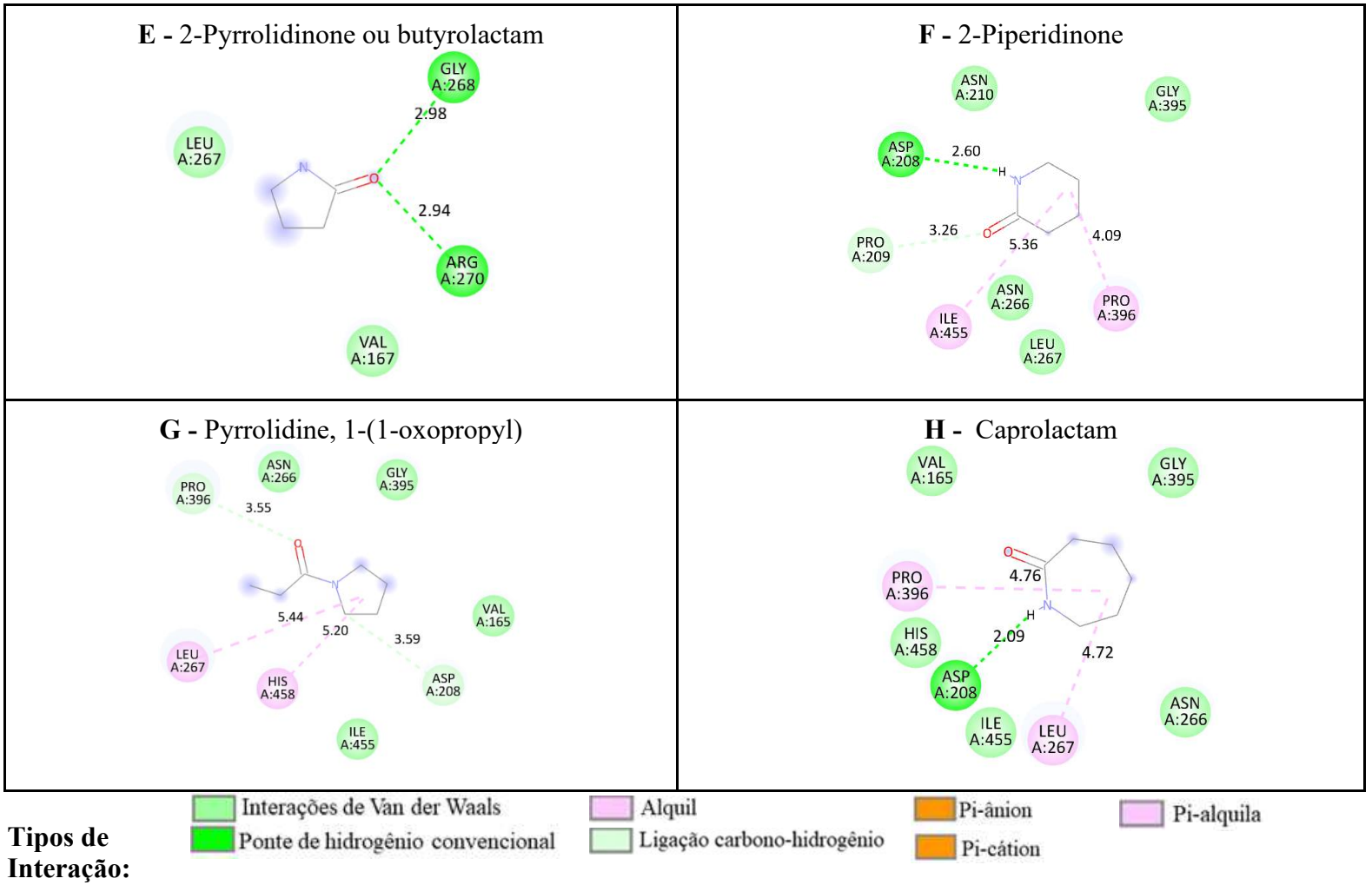


Figura 4 - Interações moleculares em duas dimensões entre a lacase de *P. ostreatus* e os compostos presentes no PHLT (continuação).



Fonte: Dados da pesquisa, 2023.

5.2 TOLERÂNCIA DE *Pleurotus ostreatus* A DOSES CRESCENTES DE PLHT

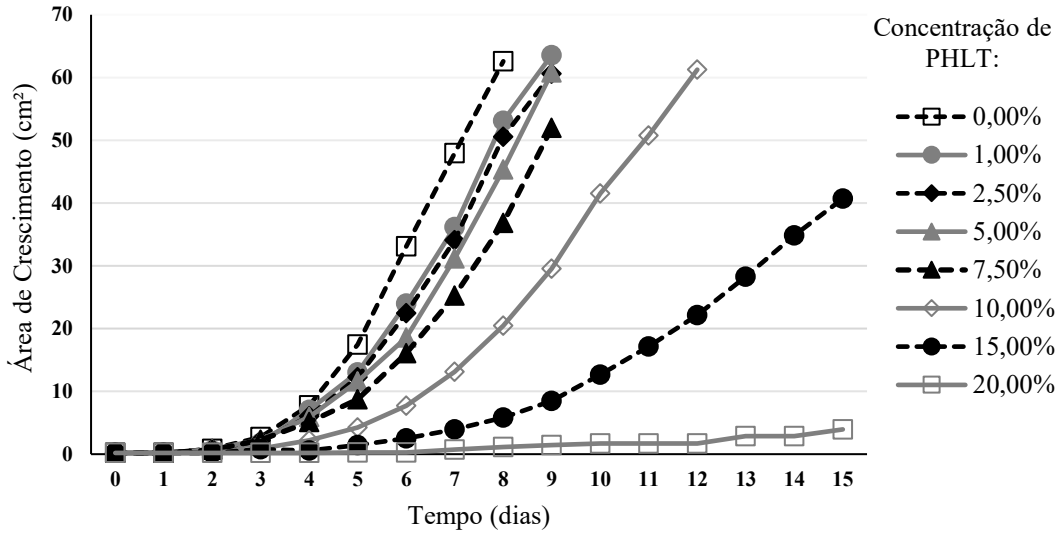
A Figura 5 apresenta o crescimento de *P. ostreatus* em meio BDA sólido em diferentes concentrações de PLHT em um período de 15 dias. Em meio sem adição do PLHT (0 % de concentração), observou-se que o fungo completou a placa de Petri no oitavo dia de crescimento, totalizando uma área de 62,59 cm². Nas concentrações percentuais de PLHT de 1, 2,5, 5 e 7,5 *P. ostreatus* alcançou área de crescimento (em cm^2) de 63,6; 60,6; 60,8 e 52,0 respectivamente, no nono dia. Na concentração de 10% de PLHT o basidiomiceto preencheu toda a placa em 12 dias com área de 61,25 cm². Nas concentrações de 15% e 20% o micélio ocupou área de 40,69 cm² e 3,94 cm², respectivamente, com 15 dias de incubação.

Verificou-se que com o aumento da concentração de PLHT, maior foi o tempo necessário para crescimento do micélio na placa. Efeito semelhante foi observado por Mallak *et al*. (2020) que perceberam diminuição da velocidade de crescimento do *P. ostreatus* quando submetido a doses crescentes de Triclosan, que pertence ao grupo de fenóis e éteres, reforçando a hipótese de que os compostos fenólicos presentes na composição do PLHT podem ser responsáveis pela desaceleração no crescimento do fungo. Outro ponto importante foi o tempo de adaptação do fungo a diferentes concentrações de PLHT. Nas concentrações entre 0% e 7,5% o fungo apresentou crescimento a partir do segundo dia após inoculação. Com 10%, 15% e 20% de PLHT o crescimento foi iniciado no terceiro dia, no quarto dia, e no quinto dia após a inoculação, respectivamente. Sendo que 20% de PLHT foi a concentração máxima tolerada pelo fungo em meio sólido. Com 25% de PLHT não houve crescimento. O crescimento radial na ausência de PLHT é apresentado na Figura 6. A concentração de 10% de PLHT foi a concentração máxima em que se verificou o preenchimento total da placa por *P. ostreatus,* durante 15 dias de avaliação (Figura 5). Comparando-se as Figuras 6 e 7 nota-se que em presença de PLHT o *P. ostreatus* apresenta micélio mais denso, Abreu e colaboradores (2007) em seu estudo de degradação com basidiomicetos de podridão branca perceberam que o fungo responsável pelo maior potencial de biodegradação do material utilizado na pesquisa foi o que apresentou maior densidade micelial, correlacionando dessa forma a densidade do micélio e o potencial de degradação do fungo. O aumento da densidade do micélio diante de concentrações de poluentes também foi verificado por Silva (2022) e Gimenes (2011), tendo respectivamente, adição de água residuária da produção do café solúvel e pentaclorofenol.

O teste de tolerância foi essencial para a escolha das concentrações utilizadas nos testes seguintes, para as cinéticas de cultivo em meio líquido. Inicialmente foram realizadas as cinéticas utilizando o meio BD, com as porcentagens de 10% e 20% de PHLT, sendo um valor

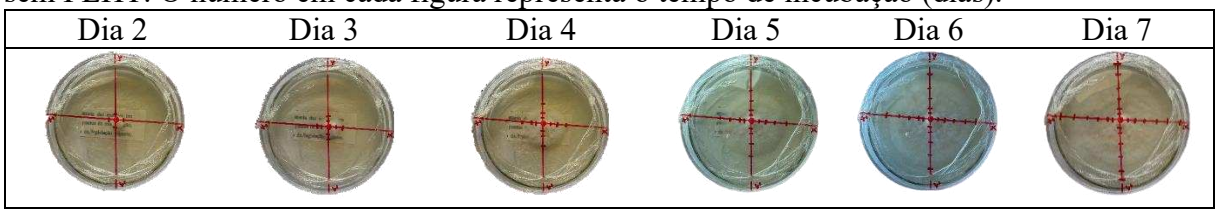
de bom crescimento fúngico e o máximo tolerado pelo fungo, após essas cinéticas foi decidido e utilizada a concentração de 15% de PHLT nas cinéticas posteriores, com meio Kirk.

Figura 5 - Teste de tolerância do *P. ostreatus* em meio sólido contendo PLHT



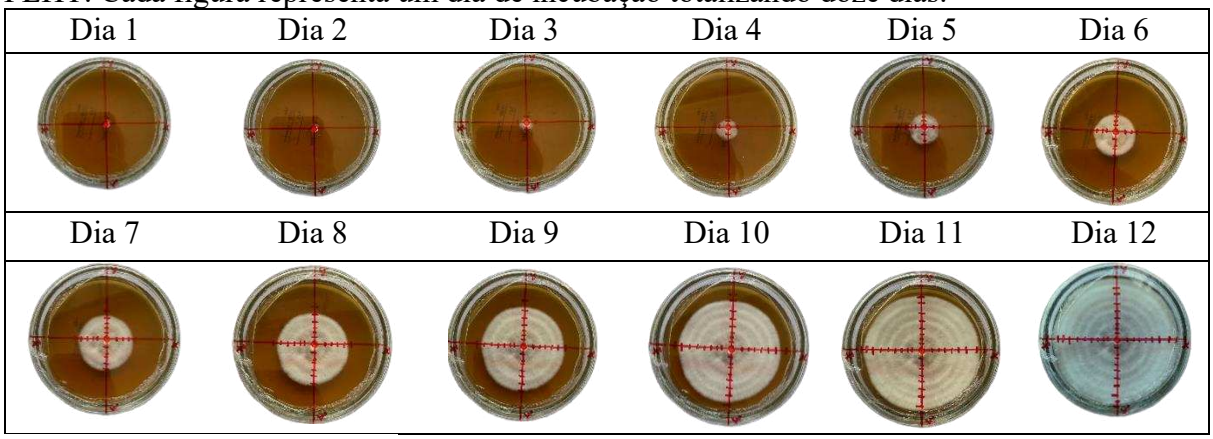
Fonte: Dados da pesquisa, 2023.

Figura 6 - Crescimento do *P. ostreatus* a partir do segundo dia de incubação até o sétimo dia sem PLHT. O número em cada figura representa o tempo de incubação (dias).



Fonte: Dados da pesquisa, 2023.

Figura 7 - Crescimento do *P. ostreatus* em uma placa contendo meio BDA com 10% de PLHT. Cada figura representa um dia de incubação totalizando doze dias.



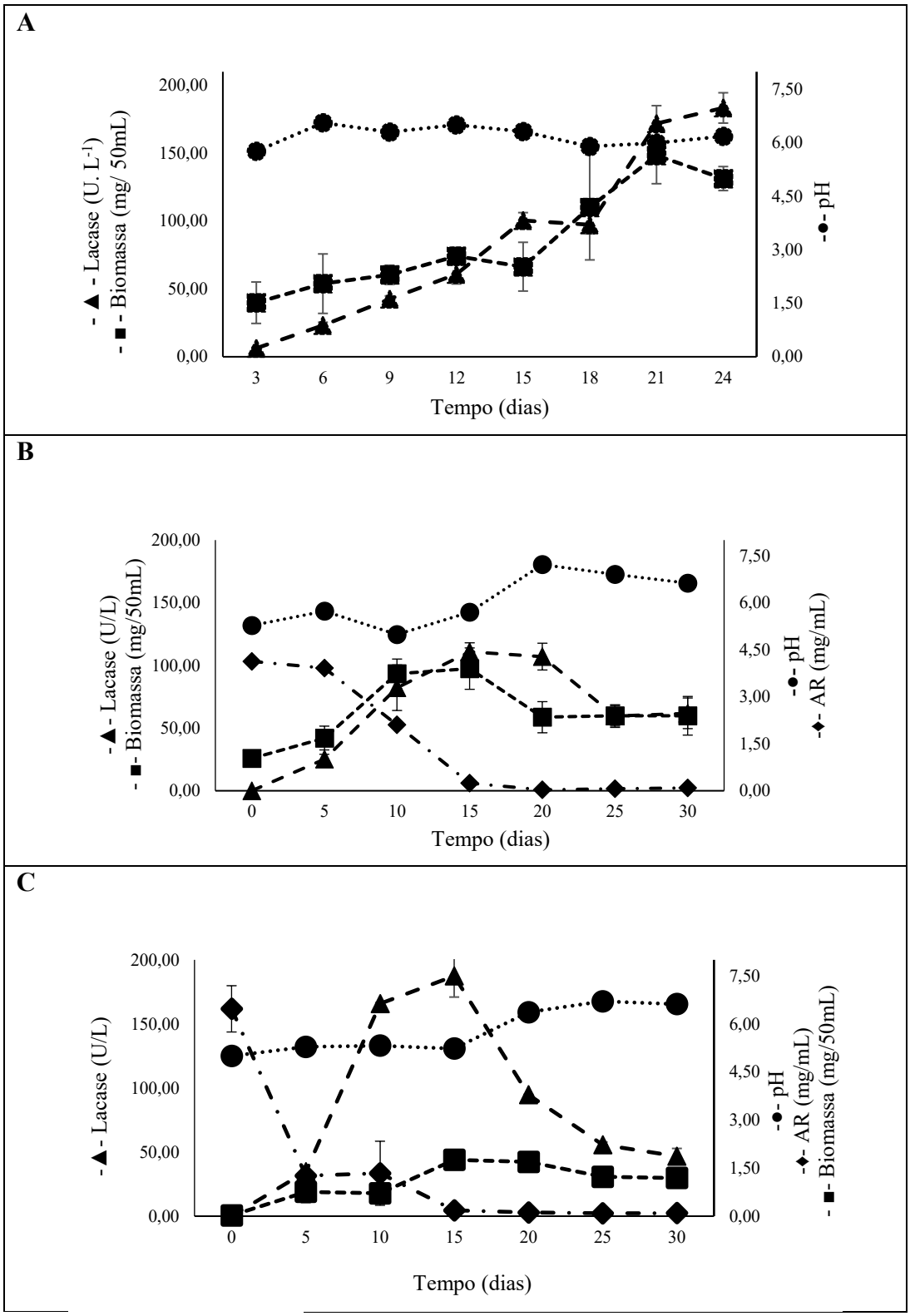
Fonte: Dados da pesquisa, 2023.

5.3 CINÉTICA DE CRESCIMENTO DO *P. ostreatus* E PRODUÇÃO DE LACASE EM MEIO LÍQUIDO

Os perfis de produção de lacase, biomassa e valores de pH de *P. ostreatus* em meio BD, Kirk e KF estão apresentados na Figura 8. Em meio BD o fungo atingiu o crescimento de 39,82 mg.50mL^{-1} ao terceiro dia, o crescimento da biomassa continuou aumentando até o 21º dia registrando biomassa de 148,37 mg.50mL^{-1}. O pH aumentou durante o cultivo, apresentando leves variações ao longo do tempo. Em meio Kirk a biomassa apresentou um perfil crescente até o 15°dia, quando atingiu o pico de 97,44 mg.50mL^{-1}. Em seguida ocorreu uma queda no dia 20 e estabilização nas análises subsequentes. Mann *et al*. (2015) observaram que a produção de biomassa pelo basidiomiceto *Cerrena consors* alcançou um máximo do dia 14 ao 21 seguido de queda. Comparando esse resultado com o meio KF, nota-se que o dia de maior produção também ocorreu dentro desse intervalo, no entanto, no meio com fibra a produção de biomassa foi menor, alcançando 43,90 mg.50mL^{-1} aos 15 dias.

A produção de lacase em meio BD foi verificada a partir do terceiro dia com atividade de 6,26 U. L $^{-1}$, e manteve tendência ascendente até o 24º, alcançando o valor de 183,36 U. L $^{-1}$. Em meio Kirk a produção de lacase apresentou aumento até o 15° dia, quando foi alcançado o pico de 110,89 U.L^{-1}, seguida de diminuição. Comparando as Figuras 8B e 8C nota-se algumas semelhanças, como o pico de produção de lacase e biomassa acontecendo no 15° dia de cultivo, limitação de AR no mesmo período e ligeiro aumento do pH, que chegou a 6,6 para ambos os testes no final do cultivo. Apesar das semelhanças, percebe-se que com a imobilização, houve um aumento na quantidade de lacase produzida, que chegou a 187,42 U.L^{-1}, representando um aumento de 69,01% em comparação ao meio Kirk modificado sem fibra.

Figura 8 – Perfis produção de lacase, biomassa e pH de *P. ostreatus* em meio líquido. **A**: Meio BD; **B:** Meio Kirk modificado; **C:** Meio Kirk modificado com fibra de coco verde



Fonte: Dados da pesquisa, 2023.

Regina *et al*. (2012) obtiveram uma produção de lacase de 0,36 U. L^{-1} aos 12 dias de cultivo a partir de linhagens de *Pleurotus* usando como substrato o extrato de sabugo de milho no meio líquido. Subowo *et al*. (2021) obtiveram produção de 245,36 $U.L^{-1}$ em meio BD pelo basidiomiceto *Coltricia cinnamomea.* Selvaraj, Sanjeeviraya e Rajendran (2015) obtiveram até 6471 $U.L^{-1}$ no cultivo de *Pleurotus ostreatus* em meio BD suplementado com bagaço de cana e farelo de arroz, indicando que alterações na composição do meio podem auxiliar no aumento de produção da enzima.

Tanto o aumento do pH, quanto o pico de produção enzimática em meio Kirk coincidem com os resultados obtidos por Moreira (2021) quando cultivou o mesmo isolado de *P. ostreatus* em meio Kirk, visando a degradação da água residuária da produção de café. O pico de produção da lacase ocorreu no 15° dia, quando aproximadamente 95% dos AR haviam sido consumidos sendo que no dia 0 o valor da concentração de AR era de 4,13 mg/mL e a no dia 20 esse número caiu para 0,24 mg/mL. Couto (2007) cultivando outra espécie de fungo da podridão branca (*Trametes hirsuta*) em meio sólido, observou que a produção de lacase começou após todo açúcar ser exaurido, sugerindo que a lacase pode ser reprimida mediante a presença de açúcar. Reforçando tal hipótese, Kuhar e Papinutti (2014), destacaram que a produção de lacase pelo basidiomiceto *Ganoderma lucidum* começa quando a concentração de açúcar no meio é inferior a 5 g/L

Silvério *et al*. (2013) obtiveram um aumento de 35 vezes na produção de lacase pelo fungo *Peniophora cinerea* após imobilização em fibra sintética em comparação ao fungo não imobilizado. O aumento de produção de lacase pelo fungo imobilizado mostra que esta é uma maneira de melhorar a produção de lacase e o crescimento fúngico, nesse sentido, a fibra de coco se mostra como uma matriz viável, pois promove um ambiente de crescimento mais próximo ao natural servindo de sustentação, assim como uma forma de induzir a produção enzimática, dada a composição lignocelulósica da fibra (KARIM; ANNUAR, 2009).

5.4 CINÉTICA DE CRESCIMENTO DO *P. ostreatus* E PRODUÇÃO DE LACASE EM MEIO LÍQUIDO CONTENDO PLHT

Visto que a presença de compostos fenólicos no meio de crescimento pode induzir a produção de lacase por fungos da podridão branca, adicionar PLHT ao meio pode ser uma forma de, simultaneamente, induzir a produção de lacase e realizar o tratamento dos compostos de características tóxicas presentes no PLHT. Um trabalho que fundamenta tal hipótese foi feito por Mann *et al*. (2015) ao avaliar a viabilidade do uso da água residuária da produção de azeite de oliva como substrato para produção enzimática pelo fungo *Cerrena consors* ao passo que acontecia o tratamento dos compostos tóxicos desse subproduto.

As cinéticas de cultivo do *P. ostreatus* em meio BD, Kirk e KF na presença de PLHT estão apresentadas na Figura 9 (9A-9D). O primeiro registro de biomassa em meio BD com 10% de PLHT foi de 21,25 mg/50mL, seguiu em crescimento até 15 dias de cultivo, mantendo-se estável até o 20º dia, posteriormente ocorreu novo crescimento obtendo-se o maior valor, 67,82 mg.50mL^{-1}, no fim do período da cinética. Esse valor foi inferior ao observado por Zarmi *et al*. (2022) que conseguiu produzir 125 mg.50mL^{-1} em meio BD. Esse resultado não é surpreendente visto que era esperado que a presença de PLHT tivesse fator limitante no desenvolvimento do micélio fúngico. Ao elevar a concentração de PLHT para 20% biomassa apresentou variações mínimas, se mantendo praticamente constante ao longo da cinética. O perfil do pH em 10% de PLHT variou de 5,96 a 6,62 enquanto em 20% de PHLT, o valor da variação foi menor passando de 5,70 para 5,98. Em meio Kirk houve crescimento de biomassa nos primeiros cinco dias o qual passou de 25,80 mg.50mL^{-1} no início do cultivo para 58,95 mg.50mL^{-1} se mantendo praticamente constante até o fim da cinética. Quando comparado ao meio sem PLHT, evidencia mais uma vez o efeito da toxicidade dessa água residuária que dificultou o crescimento do *P. ostreatus.* De forma semelhante, Laconi *et al*. (2007), utilizando diferentes espécies de Pleurotus no tratamento da água residuária da produção de azeite de oliva, observaram baixo ou nulo rendimento de biomassa na presença da água residuária, que foi justificado pelos autores pela toxicidade dos compostos polifenólicos presentes nesse efluente.

Figura 9 - Perfis de produção de lacase, pH, concentração de AR e biomassa de *P. ostreatus* em **A** Meio BD com 10% de PHLT; **B:** Meio BD com 20% de PHLT; **C:** Meio de Kirk modificado com PLHT a 15%; **D:** Meio de Kirk modificado com fibra de coco (KF) com PLHT a 15%

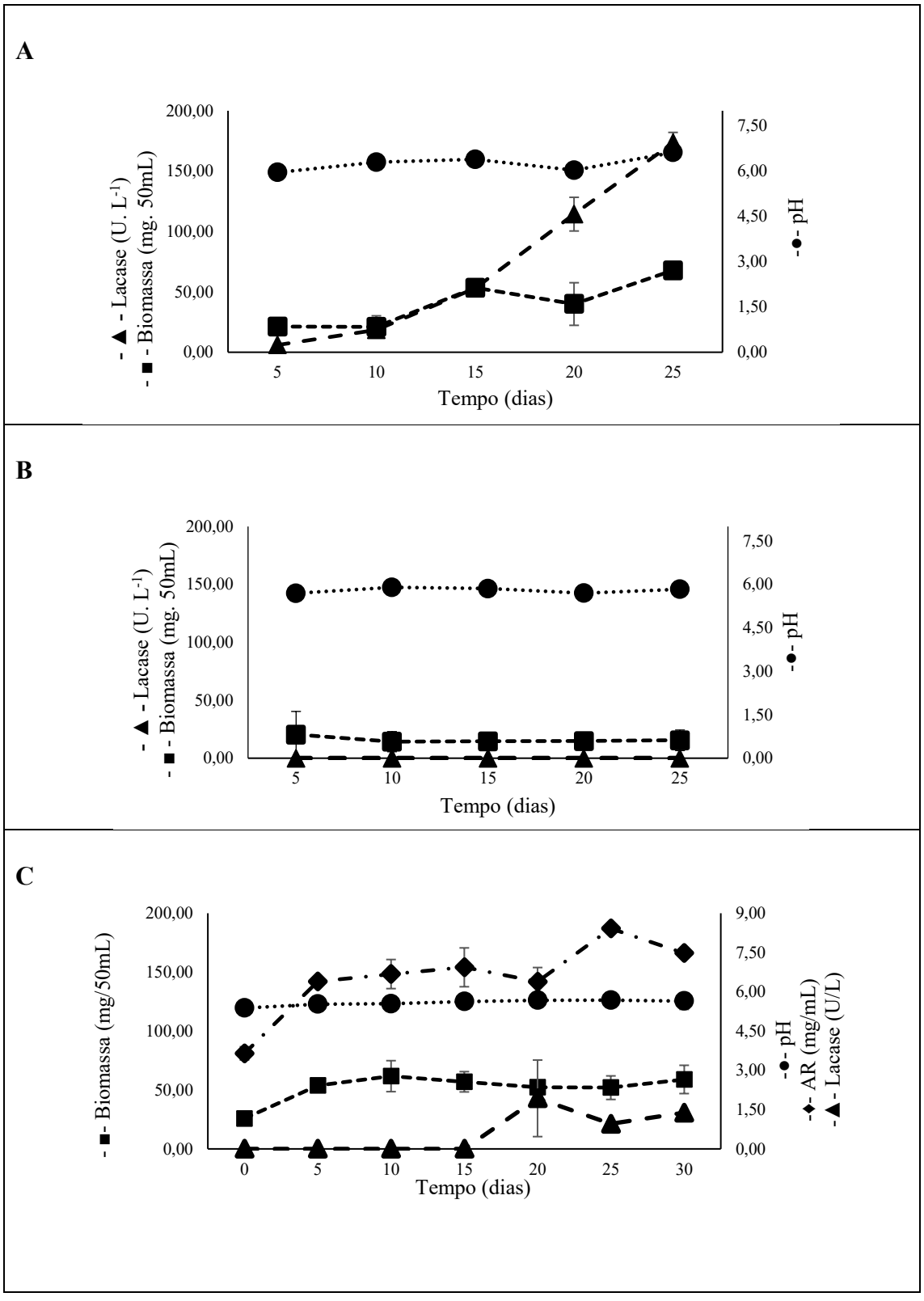
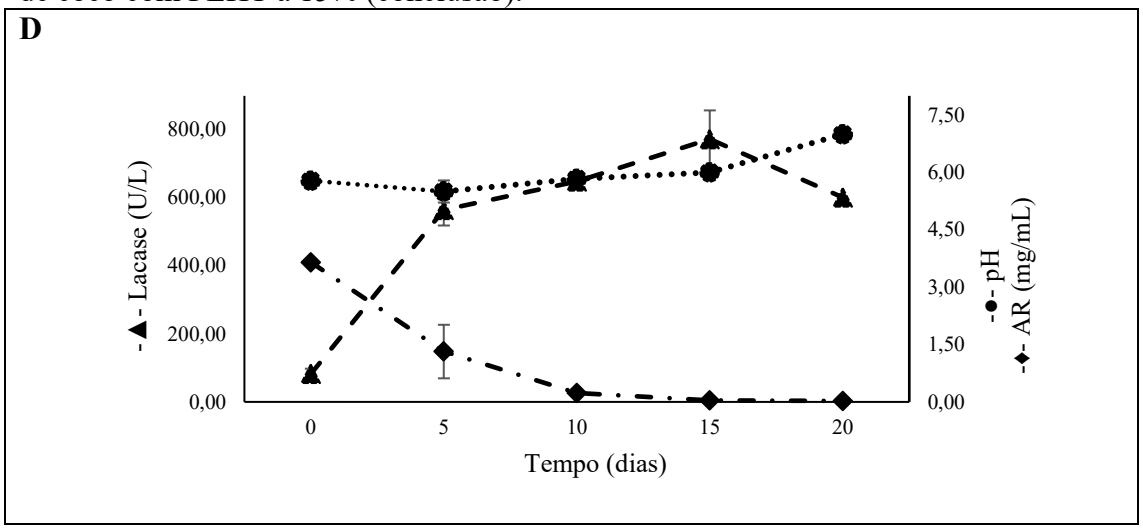


Figura 9 - Perfis de produção de lacase, pH, concentração de AR e biomassa de *P. ostreatus* em **A** Meio BD com 10% de PHLT; **B:** Meio BD com 20% de PHLT; **C:** Meio de Kirk modificado com PLHT a 15%; **D:** Meio de Kirk modificado com fibra de coco com PLHT a 15% (conclusão).



Fonte: Dados da pesquisa, 2023.

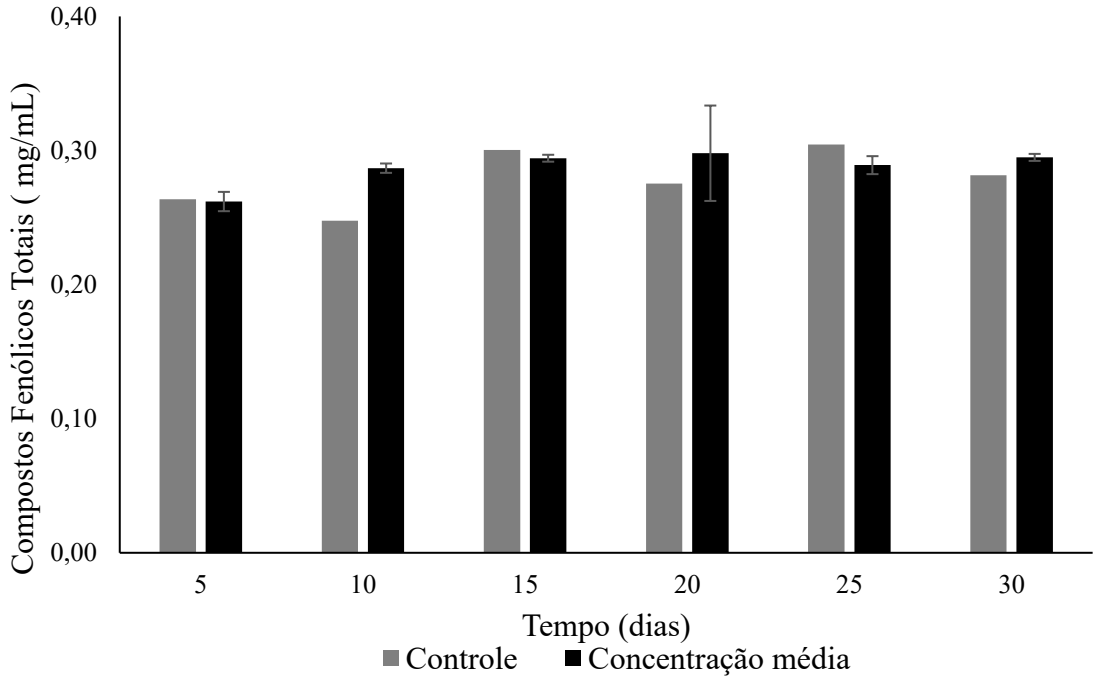
A atividade enzimática de lacase em BD na primeira retirada com 5 dias era de 5,98 $U.L^{-1}$, ao fim de 25 dias se manteve crescente e alcançou 173,40 $U.L^{-1}$ na última quantificação (Figura 9A). Apesar da presença de 10% de PLHT e do crescimento limitado, o fungo manteve a produção de lacase em níveis semelhantes ao meio sem PLHT. Ao elevar para 20% de PLHT (Figura 9B) não houve produção de lacase. No meio Kirk (Figura 9C) verificou-se atividade de lacase variando em torno de 1 $U.L^{-1}$ e 2 $U.L^{-1}$ somente a partir do 20° dia de cultivo indicando redução drástica da produção em comparação ao meio sem PLHT, o que pode ser atribuído a toxicidade do PLHT. Por outro lado, em meio KF foi obtida a maior produção de lacase em comparação a todas as outras cinéticas. No tempo zero (antes da transferência do pellet com o *P. ostreatus* para um Erlenmeyer com meio Kirk) a atividade enzimática era de 82,46 $U.L^{-1}$, após 5 dias 564,33 $U.L^{-1}$, com 15 dias atingiu o pico da atividade com 772,94 $U.L^{-1}$, com 20 dias houve uma redução da atividade para 601,34 $U.L^{-1}$ (Figura 9D).

De uma forma geral, em todas as cinéticas houve aumento de pH, sendo o maior aumento observado no meio KF passando de 5,78 para 7,0. A concentração de açúcares redutores por sua vez no meio KF seguiu em declínio, obtendo valor próximo de zero ao 15º dia. A concentração antes da passagem do pellet era 3,65 mg/mL com 15 dias havia apenas 0,04 $mg.mL^{-1}$ (Figura 9D). Resultados semelhantes foram observados por MANN *et al*. (2015) ao descrever que a maior produção de lacase pelo basidiomiceto *Cerrena consors* na presença de água residuária da produção de azeite de oliva aconteceu durante a idiofase, quando a fonte de carbono se esgotou

5.5 DEGRADAÇÃO DE CFT

Conforme citado anteriormente, a presença do PLHT limitou o desenvolvimento dos fungos. Dessa forma, aqueles inóculos que submergiram no meio sofreram maior inibição e não foi observado redução na concentração de compostos fenólicos, como mostra a Figura 10.

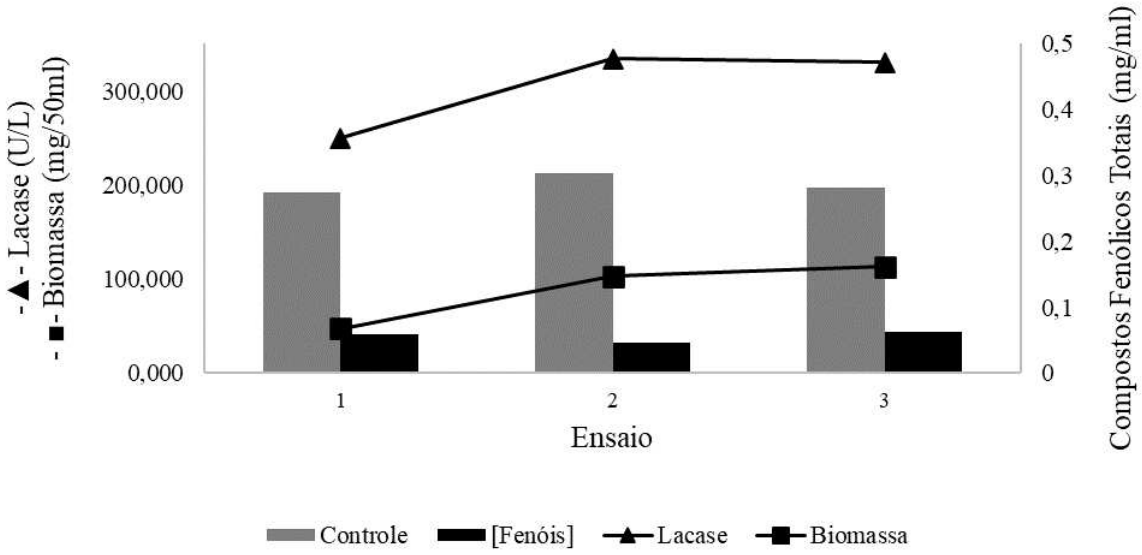
Figura 10 – Degradação *in vivo* de CFT *in vivo* por *P. ostreatus* em meio Kirk modificado com PLHT (15%). Como controle utilizou-se as mesmas condições de cada ensaio, sem a presença do fungo.



Fonte: Dados da pesquisa, 2023.

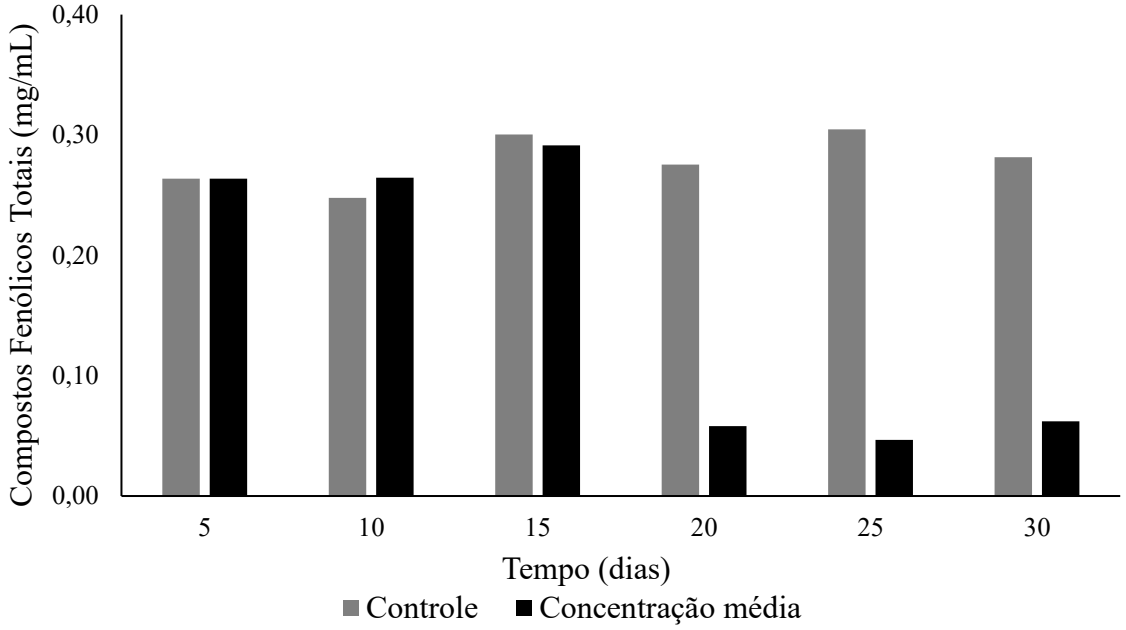
Por outro lado, percebeu-se que alguns ensaios tiveram melhor desenvolvimento micelial quando o inóculo conseguiu se manter na superfície do meio líquido ou conseguiu se prender às paredes do frasco. Ao avaliar a quantidade de lacase e a quantificar os CFT nesses ensaios foi constatado maior produção da enzima que alcançou um máximo de 334,4 $U.L^{-1}$ e maior redução da quantidade de CFT no meio (Figura 11). O maior valor de degradação ocorreu no dia 25, representando redução 84,6% dos CFT (Figura 12).

Figura 11 - Degradação de compostos fenólicos, biomassa e atividade enzimática por micélios de *P. ostreatus* quando o inóculo não submergiu no meio.



Fonte: Dados da pesquisa, 2023.

Figura 12 - Concentração de compostos fenólicos totais (CFT) em meio Kirk com PLHT (15%) tratado *in vivo* com *P. ostreatus*.



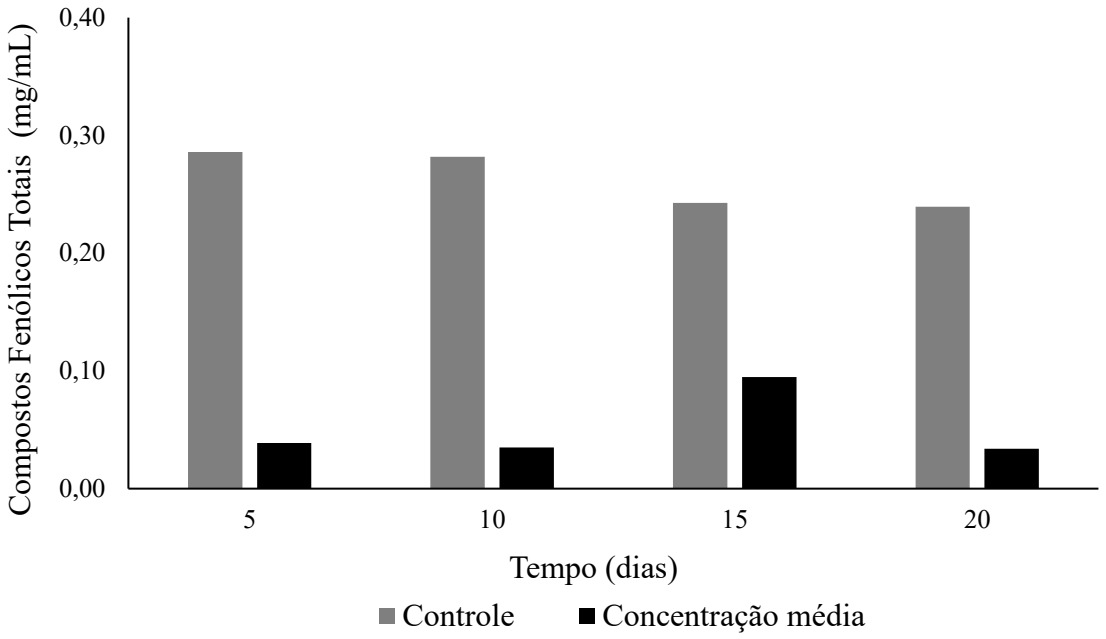
Fonte: Dados da pesquisa, 2023.

De acordo com Pacheco e Soares (2011), os compostos fenólicos de baixa massa molecular são responsáveis por conferir toxicidade à água residuária gerada na produção de papel e, quando empregada, a enzima lacase foi capaz de degradar os CFT, de baixa e de alta massa molecular. Tal resultado em comparação com os obtidos neste trabalho reforçam os

indícios de que o extrato enzimático produzido por *P. ostreatus*, contendo enzima lacase, consegue degradar os CFT presentes no PLHT. Com base nas observações dessa análise pensou-se em imobilizar o fungo em alguma superfície para que houvesse um suporte que impedisse o contato direto com o PLHT a fim de mantê-lo vivo em meio ao ambiente tóxico e, consequentemente, gerar melhores resultados quanto a produção de lacase e degradação de compostos fenólicos.

Já com o fungo imobilizado, isso é, na cinética com KF e PHLT em 15% de concentração percebeu-se uma alta taxa de degradação de CFT com apenas 5 dias da cinética, ocorreu uma degradação de 0,247 mg/mL, 86,36% da concentração inicial, como é apresentado na Figura 13. Nos demais dias não houve maiores degradações, tendo em vista alta degradação inicial. Com 5, 10 e 20 dias a quantidade de CFT permaneceu entre 0,039 e 0,034 mg/mL. A alta produção enzimática observada na cinética associada com a alta degradação de CFT indica que a imobilização teve importância crucial no tratamento do PLHT.

Figura 13 - Concentração de CFT em meio Kirk com fibra de coco (KF) e PLHT (15%) com *P. ostreatus*.

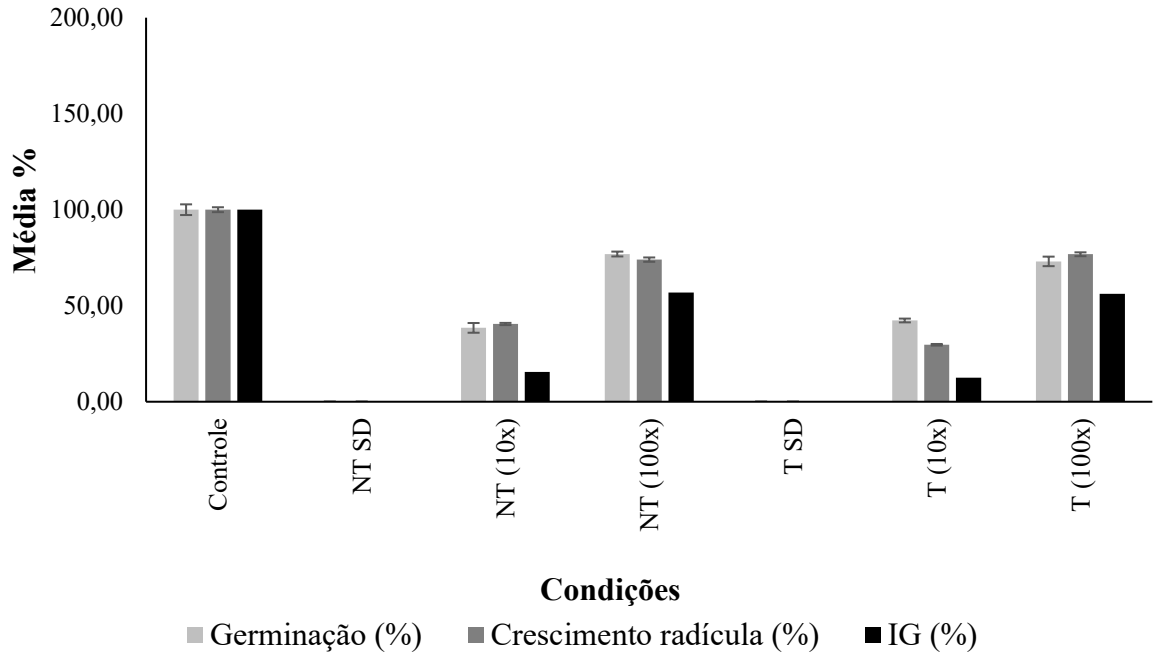


Fonte: Dados da pesquisa, 2023.

5.6 TESTE DE ECOTOXICIDADE

A Figura 19 apresenta os resultados do teste de ecotoxicidade para as sementes que foram cultivadas em BD com PLHT (10%). Não houve germinação das sementes de alface na água residuária sem tratamento (NTSD) e na tratada sem diluição (TSD). Pela alta concentração de compostos tóxicos presentes no PHLT e caracterizados por Quispe e colaboradores (2018) o extrato TSD pode apresentar toxicidade elevada devido a formação de novas moléculas com potencial para tal efeito, a biodegradação de compostos fenólicos pode gerar compostos intermediários mais tóxicos elevando a toxicidade para células e tecidos vivos (PRIYADHARSHINI; BAKTHAVATSALAM, 2019). A maior porcentagem de germinação ocorreu na condição com o PHLT tratado e não tratado diluído 100x, com valores de 73,08% e 76,92%, respectivamente. O crescimento das radículas também foi maior nessa diluição com valores de 74,00 e 76,79% para as condições NT(100X) e T(100X). Para a NT(10X), 40,48% e T(10X) 29,66%. Para o índice de germinação, observou-se 56,9%, no NT(100X), 56,1% em T(100X); 15,57% no NT(10X) e 12,55% no T(10X). Para as condições com diluição de 1:100 não foram observadas diferenças significativas entre estar ou não tratado, levando em consideração os índices, as condições com essa diluição se destacaram por apresentarem maior porcentagem em todos os parâmetros estudados no teste de ecotoxicidade, Palácio e colaboradores (2012) também obtiveram maiores índices nas condições com maiores diluições, justificando-se pela diluição das amostras, diminuindo a quantidade de substâncias nocivas proporcionalmente ao aumento das diluições. O índice de germinação para as diluições de 100X foi acima de 50% e nas diluições de 10X pouco acima de 10%, Segundo Aguerre e Gavazzo (2012) valores de IG entre 50 e 80% indicam uma presença moderada de substâncias fitotóxicas, enquanto valores abaixo de 50% indicam forte presença de tais resíduos, dessa forma há presença de compostos fitotóxicos nos extratos utilizados nos testes, sendo tratado ou não.

Figura 14 - Índice de Germinação, crescimento radicular e germinação das sementes de alface cultivadas seguindo o teste de ecotoxicidade em extratos após pré-tratamento do PHLT em meio líquido de batata suplementando com dextrose com 10% da água residuária.



Fonte: Dados da pesquisa, 2023.

6 CONCLUSÃO

O estudo de atracamento molecular mostrou o potencial de degradação dos compostos de PLHT pela lacase de *P. ostreatus*. Também apresentou interação entre todos os substratos avaliados com os aminoácidos presentes no sítio ativo da lacase de *P. ostreatus* com energia de ligação negativa. Havendo formação de pontes de hidrogênio, interação de Van der Waals e ligações pi com distâncias inferiores a 4 Å.

O fungo conseguiu tolerar doses crescentes de PLHT em meio sólido até 20% (v:v).

O tratamento biológico com fungo *P. ostreatus* mostrou eficiência na diminuição dos compostos fenólicos presentes no PLHT.

O pico de produção de lacase aconteceu aos 15 dias de cultivo nos meios Kirk, sendo mais rápidos em comparação ao BD.

A passagem do pellet para meio com PLHT previamente crescido em meio Kirk induziu a redução de compostos fenólicos de forma mais rápida.

O crescimento de *P. ostreatus* em meio imobilizado aumentou a produção enzimática de lacase drasticamente, assim como a diminuição de compostos fenólicos totais e permitiu que o fungo tolerasse até 15% de PLHT em meio líquido.

O teste de ecotoxicidade mostrou melhor desenvolvimento das sementes na diluição de 1:100. Sugere-se realização de teste de genotoxicidade para avaliar a condição das sementes.

REFERÊNCIAS

ABREU, L. D. *et al*. Degradação da madeira de Eucalyptus sp. por basidiomicetos de podridão branca. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 74, p. 321-328, 2007.

ALEXANDRINO, A. M. *et al*. Aproveitamento do resíduo de laranja para a produção de enzimas lignocelulolíticas por *Pleurotus ostreatus* (Jack: Fr). **Food Science and Technology**, v. 27, p. 364-368, 2007.

ANDLAR, M. *et al*. Lignocellulose degradation: An overview of fungi and fungal enzymes involved in lignocellulose degradation. **Engineering in Life Sciences**, v. 18, n. 11, p. 768-778, 2018.

ARANTES, V.; GOODELL, B.. Current understanding of brown-rot fungal biodegradation mechanisms: a review. **Deterioration and protection of sustainable biomaterials**, p. 3-21, 2014.

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

BALLAMINUT, N.; COELHO, G. D.; MAIA, R. T.; VITALI, V. M. V.; MATHEUS, D. R. (2019). *In vitro* and *in silico* decolorization of reactive dye by basidiomycete fungus lacase. **In Knowledge, Conservation and Use of Fungi**, v. 1, p. 107–115, 2019.

BALLAMINUT, N.; MATHEUS, D. R. Characterization of fungal inoculum used in soil bioremediation. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, n. 2, p. 248–252, 2007.

BARI, E. *et al*. Comparison of the decay behavior of two white-rot fungi in relation to wood type and exposure conditions. **Microorganisms**, v. 8, n. 12, p. 1931, 2020.

BHATNAGAR, A.; TAMBOLI, E.; MISHRA, A. Wastewater treatment and Mycoremediation by *P. ostreatus* mycelium. In: **IOP Conference Series: Earth and Environmental Science**. IOP Publishing, p. 1-13, 2021.

BHATT, P. *et al*. Bioremediation potential of laccase for catalysis of glyphosate, isoproturon, lignin, and parathion: Molecular docking, dynamics, and simulation. **Journal of Hazardous Materials**, v. 443, 2023.

BHATT, Pankaj *et al*. Bioremediation potential of laccase for catalysis of glyphosate, isoproturon, lignin, and parathion: Molecular docking, dynamics, and simulation. **Journal of Hazardous Materials**, v. 443, p. 130319, 2023.

BILAL, M. *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, M. *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.

BIOVIA, Dassault Systèmes, Discovery Studio Modeling Environment, Release 2020, San Diego: Dassault Systèmes, 2022.

BLANCO-VARGAS, A. *et al*. A novel textile wastewater treatment using ligninolytic co-culture and photocatalysis with TiO2. **Universitas Scientiarum**, v. 23, n. 3, p. 437-464, 2018.

CHEFETZ, B. *et al*. Transformation of lamotrigine by white-rot fungus *Pleurotus ostreatus*. **Environmental Pollution**, v. 250, p. 546-553, 2019.

CHEN, W. *et al*. Hydrothermal liquefaction of mixed-culture algal biomass from wastewater treatment system into bio-crude oil. **Bioresource technology**, v. 152, p. 130-139, 2014.

CHUN, S. C. *et al*. Mycoremediation of PCBs by *Pleurotus ostreatus*: possibilities and prospects. **Applied Sciences**, v. 9, n. 19, p. 4185, 2019.

COELHO, G. D.; BALLAMINUT, N.; THOMAZ, DOUGLAS VIEIRA, MACHADO, K. M. G. Characterization of a thermostable Deconica castanella Laccase and application toward pentachlorophenol degradation. **Preparative Biochemistry and Biotechnology**, v. 48, n. 9, p. 908–915, 2019.

COUTO, S. R. Laccase from Trametes hirsuta grown on paper cuttings: application to synthetic dye decolorization at different pH values. **Engineering in Life Sciences**, v. 7, n. 3, p. 229-234, 2007.

DAO, A. *et al*. Elucidating fungal Rigidoporus species FMD21 lignin-modifying enzyme genes and 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin degradation by laccase isozymes. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 147, p. 1-9, 2021.

DASGUPTA, D.; VISHWAKARMA, S. R.; GUPTA, P.P. *In silico* molecular modelling and docking studies of selected textile dyes and laccase to investigate the dye degradation mechanism of the enzyme. **Journal of Advanced Scientific Research**, v. 11, n. 02, p. 152-158, 2020.

DELOISA, Karla; GONZÁLEZ, Mirna; PALOMARES, Marco. Laccases in food industry: Bioprocessing, potential industrial and biotechnological applications. **Frontiers in bioengineering and biotechnology**, v. 8, p. 222, 2020.

DIMOU, M. D. *et al*. Use of Microbially Treated Olive Mill Wastewaters as Soil Organic Amendments; Their Short-Term Effects on the Soil Nematode Community. **Diversity**, v. 15, n. 4, p. 497, 2023.

ELLIOTT, D. C. *et al*. Hydrothermal liquefaction of biomass: Developments from batch to continuous process. **Bioresource technology**, v. 178, p. 147-156, 2015.

ELLOUZE, M.; SAYADI, S.. White-rot fungi and their enzymes as a biotechnological tool for xenobiotic bioremediation. **Management of hazardous wastes**, p. 103-120, 2016.

EZIKE, T. C. *et al*. Substrate specificity of a new laccase from Trametes polyzona WRF03. **Heliyon**, v. 7, n. 1, p. 1-8, 2021.

FAHIM, M. M. The effect of light and other factors on the sporulation of Alternaria porri. **Transactions of the British Mycological Society,** v. 49, n. 1, p. 73-78, 1966.

GIARDINA, P. *et al*. Laccases: a never-ending story. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 67, p. 369-385, 2010.

GIMENES, LUCIANA JANDELLI. **Biodegradação de pentaclorofenol por Trametes villosa (Sw.) Kreisel: análises bioquímicas e moleculares**. 2011. Tese de Doutorado.(Doutorado em biodiversidade vegetal e meio ambiente). Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente, São Paulo.2011.

GUPTA, M.; SHARMA, R.; KUMAR, A.. Docking techniques in pharmacology: How much promising?. **Computational biology and chemistry**, v. 76, p. 210-217, 2018.

IKAWA, M., SCHAPER, T. D., DOLLARD, C. A., & Sasner, J. J. Utilization of Folin−Ciocalteu phenol reagent for the detection of certain nitrogen compounds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.51,n.7, p.1811-1815,2003.

JANUSZ, G. *et al*. Laccase properties, physiological functions, and evolution. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 3, p. 1-25, 2020.

KANG, B. R. *et al*. Removal of pharmaceuticals and personal care products using native fungal enzymes extracted during the ligninolytic process. **Environmental Research**, v. 195, p. 1-8, 2021.

KARIM, M. A. A.; ANNUAR, M. S. M.. Novel application of coconut husk as growth support matrix and natural inducer of fungal laccase production in a bubble column reactor. **Asia Pac J Mol Biol Biotechnol**, v. 17, n. 2, p. 47-52, 2009.

KIRK, T. K. *et al*. Influence of Culture Parameters on Lignin Metabolism by Phanerochaete chrysosporium. v. 285, p. 277–285, 1978.

KIST, C. P. *et al*. Biodegradation of nitroaromatic compounds in Red Water by white rot fungi *Pleurotus ostreatus* and *floridae*. **Revista Ambiente & Água**, v. 15, 2020.

KUHAR, F.; PAPINUTTI, L. Optimization of laccase production by two strains of Ganoderma lucidum using phenolic and metallic inducers. **Revista Argentina de Microbiología**, v. 46, n. 2, p. 144-149, 2014.

LACONI, S. *et al*. Bioremediation of olive oil mill wastewater and production of microbial biomass. **Biodegradation**, v. 18, n. 5, p. 559-566, 2007.

LI, T. *et al*. Wood decay fungi: An analysis of worldwide research. **Journal of Soils and Sediments**, v. 22, n. 6, p. 1688-1702, 2022.

LIU, Z. *et al*. Application of molecular docking for the degradation of organic pollutants in the environmental remediation: A review. **Chemosphere**, v. 203, p. 139-150, 2018.

MAIA, R. T.; AMADOR, V. C. Molecular docking for detoxifying enzyme studies. In: **Molecular Docking**. IntechOpen, 2018. p. 31.

MALLAK, A. M. *et al*. Effect of *Pleurotus ostreatus* and *Trametes versicolor* on triclosan biodegradation and activity of laccase and manganese peroxidase enzymes. **Microbial Pathogenesis**, v. 149, p. 104-473, 2020.

MANN, J. *et al*. Use of olive mill wastewater as a suitable substrate for the production of laccase by Cerrena consors. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 99, p. 138-145, 2015.

MATHUR, Purvi; SANYAL, Doyeli; DEY, Pannalal. Optimization of growth conditions for enhancing the production of microbial laccase and its application in treating antibiotic contamination in wastewater. **3 Biotech**, v. 11, p. 1-15, 2021.

MENG, X. *et al*. Molecular docking: a powerful approach for structure-based drug discovery. **Current computer-aided drug design**, v. 7, n. 2, p. 146-157, 2011.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959.

MOHAMAD, Saharuddin Bin; ONG, Ai Ling; RIPEN, Adiratna Mat. Evolutionary trace analysis at the ligand binding site of laccase. **Bioinformation**, v. 2, n. 9, p. 369, 2008.

MOREIRA, F. **Valoração da água residuária da produção de café solúvel para a produção de lacase**. 2021. Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado em engenharia de biotecnologia e bioprocessos) - Universidade Federal de Campina Grande, Sumé, 2021.

MUHAMMED, M.T.; AKI-YALCIN, E.. Molecular Docking: Principles, Advances, and Its Applications in Drug Discovery. **Lett. Drug Des. Discov.**, v. 19, p.1-16, 2022.

NGUYEN, L. N. *et al*. Enhancement of trace organic contaminant degradation by crude enzyme extract from Trametes versicolor culture: effect of mediator type and concentration. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v. 45, n. 4, p. 1855-1862, 2014.

NGUYEN, L. N. *et al*. Laccase–syringaldehyde-mediated degradation of trace organic contaminants in an enzymatic membrane reactor: Removal efficiency and effluent toxicity. **Bioresource technology**, v. 200, p. 477-484, 2016.

NTOUGIAS, S. *et al*. Olive mill wastewater biodegradation potential of white-rot fungi–Mode of action of fungal culture extracts and effects of ligninolytic enzymes. **Bioresource technology**, v. 189, p. 121-130, 2015.

PACHECO, S. M. V.; SOARES, C. H. L. Biotransformation of a paper and cellulose factory effluent in the presence of laccase and Horseradish Peroxidase. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 78, p. 581-585, 2020.

PARK, M. *et al*. Differential expression of laccase genes in *Pleurotus ostreatus* and biochemical characterization of laccase isozymes produced in Pichia pastoris. **Mycobiology**, v. 43, n. 3, p. 280-287, 2015.

PETTERSEN, E. F. *et al*. UCSF Chimera? A visualization system for exploratory research and analysis. **Journal of Computational Chemistry**, v. 25, n. 13, p. 1605–1612, out. 2004.
POLLEGIONI, L.; TONIN, F.; ROSINI, E.. Lignin-degrading enzymes. **The FEBS journal**, v. 282, n. 7, p. 1190-1213, 2015.

PRZYSTAS, W.; ZABLOCKA-GODLEWSKA, E.; GRABINSKA-SOTA, E. Efficacy of fungal decolorization of a mixture of dyes belonging to different classes. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 46, p. 415-424, 2016.

QUISPE, D. *et al*. Anaerobic and photocatalytic treatments of post-hydrothermal liquefaction wastewater using H2O2. **Bioresource Technology Reports**, v. 3, p. 247-255, 2018.

REGINA, M. *et al*. Sabugo de milho e carvão ativado na produção de Lacase e Basidiomas de *Pleurotus* sp. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 33, n. 1, p. 39-47, 2012.

SAENGSURIWONG, R. *et al*. Conversion of tobacco processing waste to biocrude oil via hydrothermal liquefaction in a multiple batch reactor. **Clean Technologies and Environmental Policy**, v. 25, n. 2, p. 397-407, 2023.

SCHERER, M. *et al*. Computational enzyme engineering pipelines for optimized production of renewable chemicals. **Frontiers in bioengineering and biotechnology**, v. 9, p. 1-13, 2021.

SELVARAJ B.; SANJEEVIRAYAR A.; RAJENDRAN, A. Laccase production using mixed substrates containing lignocellulosic materials by *Pleurotus ostreatus* in submerged liquid culture. **International Journal of ChemTech Research,** v.7,n.1,p.355-368, 2015.

SETHI, A. *et al*. Molecular docking in modern drug discovery: Principles and recent applications. **Drug discovery and development-new advances**, v. 2, p. 1-21, 2019.

SILVA, M. A *et al*. Comparative homology of *Pleurotus ostreatus* laccase enzyme: Swiss model or Modeller?. **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics**, p. 1-14, 2022. DOI:10.1080/07391102.2022.2138975

SILVA, M. A. **Biodegradabilidade de compostos fenólicos de água residuária da produção industrial de café solúvel: fermentação fúngica acoplada a produção metanogênica.**2022.

Dissertação (Mestrado em Ciências da Engenharia Ambiental). - Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo, São Carlos, 2022.

SILVÉRIO, S. C. *et al*. Laccase production by free and immobilized mycelia of Peniophora cinerea and Trametes versicolor: a comparative study. **Bioprocess and biosystems engineering**, v. 36, p. 365-373, 2013.

SINGH, A.; KUMARI, S.; PAL, T. K.. *In silico* analysis for laccase-mediated bioremediation of the emerging pharmaceutical pollutants. **Int. J. Bioautom**, v. 19, p. 423-432, 2015.

SITARZ, A. K.; MIKKELSEN, Jørn D.; MEYER, Anne S. Structure, functionality and tuning up of laccases for lignocellulose and other industrial applications. **Critical reviews in biotechnology**, v. 36, n. 1, p. 70-86, 2016.

SRINIVASAN, S. *et al*. Application of docking and active site analysis for enzyme linked biodegradation of textile dyes. **Environmental Pollution**, v. 248, p. 599-608, 2019.

SUBOWO, Y. B.; SUGIHARTO, A. The Influence of Inducers on the Coltricia cinnamomea Laccase Activity and its Ability to Degrade POME. **Biosaintifika: Journal of Biology & Biology Education**, v. 13, n. 2, p. 243-249, 2021.

TAM, N. F. Y.; TIQUIA, S. Assessing toxicity of spent pig litter using a seed germination technique. **Resources, Conservation and Recycling**, 1994.

TROTT, O.; OLSON, A. J. AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. **Journal of Computational Chemistry**, p. NA-NA, 2009.

UPADHYAY, P.; SHRIVASTAVA, R.; AGRAWAL, P. K.. Bioprospecting and biotechnological applications of fungal laccase. **3 Biotech**, v. 6, n. 1, p. 1-12, 2016.

VASEEM, H.; SINGH, V. K.; SINGH, M. P. An ecofriendly approach to decontaminate toxic metals from coal washery effluent using the mushroom *Pleurotus ostreatus*. **SN Applied Sciences**, v. 2, p. 1-11, 2020.

WATSON, Jamison *et al*. Valorization of hydrothermal liquefaction aqueous phase: pathways towards commercial viability. **Progress in Energy and Combustion Science**, v. 77, p. 1-45, 2020.

WOISKY, R. G.; SALATINO, A. Analysis of propolis: some parameters and procedures for chemical quality control. **Journal of apicultural research**, v. 37, n. 2, p. 99-105, 1998.

YOKOTA, K. *et al*. Effect of high molecular weight carbohydrates on bud cell formation by Fusarium oxysporum in potato dextrose broth. **Journal of general plant pathology**, v. 76, p. 219-224, 2010.

ZARMI, Ashrafalsadat Hatamian *et al*. A Kinetic Modeling of Growth and Mycelial Exopolysaccharide Production by Lentinus edodes (Shiitake Edible Mushroom). **Applied Food Biotechnology**, v. 9, n. 1, p. 67-78.

ZHENG, M. *et al*. Anaerobic digestion of wastewater generated from the hydrothermal liquefaction of Spirulina: Toxicity assessment and minimization. **Energy conversion and management**, v. 141, p. 420-428, 2017.

ZHOU, Y. *et al*. Anaerobic digestion of post-hydrothermal liquefaction wastewater for improved energy efficiency of hydrothermal bioenergy processes. **Water science and technology**, v. 72, n. 12, p. 2139-2147, 2015.