

**UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA AMBIENTAL**

CAMILA SOUZA ALMEIDA DOS SANTOS

**SÍNTESE DE CORANTES NATURAIS PELA OXIDAÇÃO DE COMPOSTOS
FENÓLICOS UTILIZANDO LACASES FÚNGICAS**

**CURITIBA
2020**

CAMILA SOUZA ALMEIDA DOS SANTOS

**SÍNTESE DE CORANTES NATURAIS PELA OXIDAÇÃO DE COMPOSTOS
FENÓLICOS UTILIZANDO LACASES FÚNGICAS**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – Campus Curitiba, como requisito parcial para obtenção do título de “Mestre em Ciência e Tecnologia Ambiental”.

Orientadora: Profa. Dra. Giselle Maria Maciel
Coorientadora: Profa. Dra. Lúcia Regina Rocha
Martins

CURITIBA
2020

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

Santos, Camila Souza Almeida dos

Síntese de corantes naturais pela oxidação de compostos fenólicos utilizando lacases fúngicas [recurso eletrônico] / Camila Souza Almeida dos Santos. -- 2020.

1 arquivo texto (71 f.): PDF; 1,52 MB.

Modo de acesso: World Wide Web.

Título extraído da tela de título (visualizado em 21 maio 2020).

Texto em português com resumo em inglês.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental, Curitiba, 2020.

Bibliografia: p. 59-71.

1. Tecnologia ambiental - Dissertações. 2. Fungos. 3. Enzimas - Análise. 4. Erva-mate. 5. Microorganismos - Cultura e meios de cultura. I. Maciel, Giselle Maria, orient. II. Martins, Lúcia Regina Rocha, coorient. III. Universidade Tecnológica Federal do Paraná - Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental, inst. IV. Título.

CDD: Ed. 23 - 363.7

Biblioteca Ecoville da UTFPR, Câmpus Curitiba
Bibliotecária: Lucia Ferreira Littiere - CRB 9/1271
Aluna de Biblioteconomia: Josiane Mangueira

TERMO DE APROVAÇÃO DE DISSERTAÇÃO Nº 141

A Dissertação de Mestrado intitulada: **Síntese de corantes naturais pela oxidação de compostos fenólicos utilizando lacases fúngicas**, defendida em sessão pública pela Candidata **Camila Souza Almeida dos Santos**, no dia 27 de março de 2020, foi julgada para a obtenção do título de Mestre em Ciência E Tecnologia Ambiental, área de concentração: Tecnologia E Processos Ambientais, linha de pesquisa: Processos Químicos e Biotecnológicos de Tratamento e Valorização de Resíduos, e aprovada em sua forma final, pelo Programa de Pós-Graduação em Ciência E Tecnologia Ambiental.

BANCA EXAMINADORA:

Prof^ª. Dr^ª. Giselle Maria Maciel - Presidente - UTFPR

Prof^ª. Dr^ª. Tatiane Brugnari - UTFPR

Prof^ª. Dr^ª. Renata Rodrigues Gomes - UFPR

A via original deste documento encontra-se arquivada na Secretaria do Programa, contendo a assinatura da Coordenação após a entrega da versão corrigida do trabalho.

Curitiba, **27 de março de 2020**.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente devo agradecimento aos meus pais por todo apoio, força, criação e amor que me deram. Por eles eu tenho força para conquistar o mundo e enfrentar todas as barreiras. Agradeço aos meus irmãos Bruno e Ivens por sempre me apoiarem e estarem ao meu lado. Aos meus sobrinhos Bea e Cadu que com carinho me trazem o desejo de ser alguém sempre melhor. Aos meus tios Edilene e Fábio que sempre acreditaram no meu potencial e sempre me deram força. Obrigada por serem fundamentais em toda a minha vida e com vocês eu posso entender o significado do amor e da família.

Ao Thiago por toda paciência, amor e principalmente companheirismo. Obrigada por me acalmar nos momentos de dificuldade, por me proporcionar momentos de alegria, por fazer eu perceber que a vida fica mais leve com você do lado e por me dar uma segunda família. Ao Joso, Rosana, César e Camila, obrigada por todos os momentos de preocupação, apoio e diversão.

À dona Arlete e sua família, por ter sido como uma mãe para mim nos momentos em que estava longe da minha família. À prof^a Cassiana e prof^o Rafael por todo ensinamento durante a graduação e por me disponibilizarem um lar.

Aos meus amigos Ana Paula, Aléxia e Lucas por entenderem minha ausência nesses últimos dois anos, mas que mesmo assim souberam que sempre estive e estarei ao lado deles.

À minha orientadora, Prof^a Dra. Giselle e coorientadora Prof^a Dr. Lúcia, por todo ensinamento, apoio, compreensão e por sempre acreditarem no meu trabalho.

Aos meus companheiros de laboratório Bruno, Isabela, Matheus e Raquel. Um agradecimento especial para Dayane, Débora, Nigella, Tati B. e Tati A, que sempre estiveram comigo no laboratório, dando apoio moral, ajudando na hora do desespero, e por serem pessoas que quero ter ao meu lado pela vida toda.

À Júlia, Eduarda, Márcia, prof^a Adriane, prof^o Charles e prof^o Thomaz, que autorizaram o uso do laboratório e equipamentos, além de sempre estarem dispostos a me ajudar.

À Universidade Tecnológica Federal do Paraná, ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental e a CAPES, por me disponibilizarem laboratórios, equipamentos, materiais e estrutura financeira para a realização do trabalho.

“Vá viver, sem se apressar. Deguste momentos, suaves ou tensos, sinta o que vida pode lhe ensinar” – Tales de Polli (Maneva, 2015).

RESUMO

SANTOS, Camila Souza Almeida dos. **Síntese de corantes naturais pela oxidação de compostos fenólicos utilizando lacases fúngicas**. 72 f. Dissertação de mestrado. Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Curitiba, 2020.

As lacases são enzimas da classe das oxidorreductases encontradas em diversos organismos e têm papel importante nos processos metabólicos dos mesmos. Devido à capacidade dessas enzimas em alterar a estrutura de compostos fenólicos e poder formar produtos naturais com baixa toxicidade, pode-se utilizá-las em processos biotecnológicos para aplicações industriais e ambientais. A produção de corantes sintéticos está aumentando cada vez mais e conseqüentemente causando mais impactos ambientais, tais como a contaminação dos corpos d'água devido à liberação de efluentes industriais com elevado grau de toxicidade. O processo de oxidação mediado pela lacase, possibilita a síntese de corantes naturais que podem ser utilizados em indústrias têxteis, alimentícias e de cosméticos, resultando em menores danos ao ambiente. O objetivo do presente estudo foi avaliar o potencial biotecnológico de lacases fúngicas para síntese de corantes naturais. As lacases foram produzidas pelo cultivo individual e conjunto dos fungos *Microsphaeropsis arundinis* e *Trametes villosa* em meio de cultura líquido estático contendo diferentes indutores de enzimas ligninolíticas. Após o crescimento dos fungos, a atividade da lacase no extrato bruto enzimático foi determinada espectrofotometricamente monitorando-se a oxidação do 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico) (ABTS). A caracterização enzimática da enzima lacase foi analisada em gel de poliacrilamida-dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), com coloração de prata e zimograma em gel de ABTS. A síntese dos corantes pela ação das lacases foi avaliada em reações com ácido gálico, ácido ferúlico e extrato de erva-mate. O potencial antioxidante dos produtos das reações foi determinado utilizando-se os métodos de 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) e poder antioxidante de redução do íon férrico (FRAP). Observou-se que o co-cultivo dos fungos *Microsphaeropsis arundinis* e *Trametes villosa* apresentou atividade enzimática 99,93% e 26% maior que os cultivos individuais, respectivamente. Foram identificadas três isoenzimas diferentes de lacase, duas isoenzimas no *M. arundinis* e uma isoenzima no *T. villosa*. Os corantes naturais sintetizados em reações com as lacases apresentaram tons de marrom e amarelo, que variaram de acordo com as concentrações dos substratos utilizados na reação. A maior atividade antioxidante foi identificada na amostra seis, obtida pelo método FRAP, apresentando 939 $\mu\text{mol/L}$ equivalente de Trolox. Os corantes resultantes das reações entre ácido gálico e extrato de erva-mate (10 mg/mL) apresentaram potencial antimicrobiano, através da aglomeração bacteriana, contra *S. aureus*. Os corantes utilizados para caracterizações mais detalhadas apresentaram colorações marrom intensas, demonstrando um grande potencial para serem utilizadas nas indústrias cosméticas e têxtil.

Palavras-chave: Fungos. Enzimas. Síntese verde. Erva-mate. Ácido Gálico. Atividade Antimicrobiana.

ABSTRACT

Santos, Camila Souza Almeida dos Santos. **Synthesis of natural dyes by the oxidation of phenolic compounds using fungal laccases**. 72 l. Masters dissertation. Graduate Program in Environmental Science and Technology. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Curitiba, 2020.

Laccases are oxidoreductase enzymes found in different organisms with an important role in their metabolic processes. Due to the ability of these enzymes to modify the structure of phenolic compounds producing natural products with low toxicity, they can be used in biotechnological processes for industrial and environmental applications. The production and use of synthetic dyes has increased in the past years consequently causing more environmental impacts, such as contamination of water due to the release of industrial effluents with a high degree of toxicity. The oxidation process mediated by the laccase, allows the synthesis of natural dyes that can be used in textile, food and cosmetics industries, resulting in less damage to the environment. The aim of the present study was to evaluate the biotechnological potential of fungal laccases for the synthesis of natural dyes. Laccases were produced by individual and co-culture of the fungi *Microsphaeropsis arundinis* and *Trametes villosa* in static liquid culture medium containing different inducers of ligninolytic enzymes. After the growth of fungi, the activity of the laccase in the crude enzyme extract was determined spectrophotometrically by monitoring the oxidation of 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic) (ABTS). The enzymatic characterization of the laccase enzyme was analyzed on sodium polyacrylamide-dodecyl sulfate gel (SDS-PAGE), with silver staining and ABTS gel zymogram. The synthesis of dyes by the action of laccases was evaluated in reactions with gallic acid, ferulic acid and yerba mate extract. The antioxidant potential of the reaction products was determined using the methods of 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) and Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP). It was observed that the co-cultivation of the fungi *M. arundinis* and *T. villosa* presented enzymatic activity 99.93% and 26% higher than the individual cultures of *M. arundinis* and *T. villosa*, respectively. Three different laccase isoenzymes were identified, two isoenzymes in *M. arundinis* and one isoenzyme in *T. villosa*. The natural dyes synthesized in reactions with the laccases presented brown and yellow tones, which varied according to the concentrations of the substrates used in the reaction. The highest antioxidant activity was identified in sample six, obtained by the FRAP method, with 939 $\mu\text{mol/L}$ equivalent of Trolox. The dyes resulting from the reactions between gallic acid and yerba mate extract (10 mg/mL) showed antimicrobial potential, through bacterial agglomeration, against *S. aureus*. The dyes used for more detailed characterizations showed intense brown colorings, demonstrating a great potential to be used in the cosmetic and textile industries.

Keywords: Fungi. Enzymes. Green synthesis. Yerba mate. Gallic acid. Antimicrobial activity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Sítio ativo da enzima lacase.....	15
Figura 2 -	Ciclo catalítico da oxidação de um substrato catalisado pela lacase.....	16
Figura 3 -	Fungo <i>Trametes villosa</i> em tronco de árvore.....	18
Figura 4 -	(A) Fungo <i>Microsphaeropsis arundinis</i> em placa de Petri contendo meio Ágar Dextrose Sabouraud com 14 dias de crescimento; (B) Morfologia microscópica do <i>M. arundinis</i> corada com coloração Lactofenol azul de algodão.....	19
Figura 5 -	Estrutura molecular do ácido gálico.....	20
Figura 6 -	Estrutura molecular do ácido ferúlico.....	21
Figura 7 -	Folha da Árvore <i>Ilex paraguarensis</i>	22
Figura 8 -	Estrutura química do composto fenozazina.....	24
Figura 9 -	Fluxograma das etapas desenvolvidas no trabalho.....	28
Figura 10 -	Esquema representativo do repique do fungo em meio PDA para o meio nutritivo líquido.....	29
Figura 11 -	(A) Fungo <i>Microsphaeropsis arundinis</i> em meio líquido nutritivo com 12 dias de cultivo a 28°C. (B) Fungo <i>Trametes villosa</i> em meio líquido nutritivo com 12 dias de cultivo a 28°C. (C) Co-cultivo do fungo <i>M. arundinis</i> e <i>T. villosa</i> e Inibição do crescimento do <i>M. arundinis</i> pelo <i>T. villosa</i> em meio líquido nutritivo com 12 dias de cultivo a 28°C.....	38
Figura 12 -	Cinética de crescimento do co-cultivo entre os fungos <i>Trametes villosa</i> e <i>Microsphaeropsis arundinis</i> em meio líquido nutritivo em 28°C.....	38
Figura 13 -	Análise cinética da produção enzimática em relação aos dias de cultivo do co-cultivo entre os fungos <i>Trametes villosa</i> e <i>Microsphaeropsis arundinis</i> em meio líquido nutritivo em 28°C (n=3).....	39
Figura 14 -	Gel de eletroforese do peso molecular das isoenzimas de lacase no extrato bruto do cultivo individual de <i>M. arundinis</i> e <i>T. villosa</i> e do co-cultivo dos fungos <i>M. arundinis</i> e <i>T. villosa</i> . (A) Gel de eletroforese colorido com ABTS para observar a posição do peso da lacase; (B) Gel de eletroforese com coloração de prata para avaliar o peso molecular das enzimas presente nos cultivos.....	40
Figura 15 -	Cinética dos corantes sintetizados através de reações mediadas por lacase fúngica.....	41
Figura 16 -	Análise espectrofotométrica (700 a 400 nm) dos corantes naturais sintetizados após 24 horas de reação a 40°C com rotação de 120 rpm.....	42
Figura 17 -	Corantes naturais sintetizados através da combinação com diferentes concentrações de ácido gálico, erva-mate e lacase, após 35 horas de reação em incubadora shaker a 40°C com rotação de 120 rpm.....	43

Figura 18 - Análise espectrofotométrica (700 a 400 nm) dos corantes sintetizados através do delineamento experimental após 35 horas de reação a 40°C.....	44
Figura 19 - Análise colorimétrica por CIELHC dos corantes sintetizados através do delineamento experimental após 35 horas de reação à 40°C Análise CIE L*h*c* dos corantes.....	45
Figura 20 - Diagrama de Pareto para avaliar a influência dos compostos utilizados na síntese de corantes naturais e sua atividade antioxidante.....	46
Figura 21 - Placa da análise da atividade antimicrobiana para demonstrar o aglomerado de bactérias resultante do contato com os corantes....	48
Figura 22 - Teste de Concentração Inibitória Mínima (<i>MIC</i>) em maior escala para demonstrar o aglomerado de bactérias resultante do contato entre os corantes naturais e <i>S. aureus</i> . (A) Crescimento aglomerado de <i>S. aureus</i> em contato com o corante natural; (B) Controle de crescimento de <i>S. aureus</i> em caldo Mueller-Hinton.....	49
Figura 23 - Análise espectrofotométrica (700 a 400 nm) dos corantes sintetizados através do resultado do teste ANOVA após 35 horas de reação a 40°C.....	50
Figura 24 - Corantes naturais sintetizados através do resultado do teste ANOVA para as combinações de ácido gálico, erva-mate e lacase com melhor potencial antioxidante e antimicrobiano, após 35 horas de reação em incubadora shaker a 40°C com rotação de 120 rpm.....	51
Figura 25 - Análise colorimétrica por CIELHC dos corantes sintetizados através do resultado do teste ANOVA após 35 horas de reação à 40°C Análise CIE L*h*c* dos corantes.....	52
Figura 26 - Distribuição dos valores de cores obtidas das reações de coloração catalisadas pela enzima lacase.....	53

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	OBJETIVOS	14
2.1	Objetivo geral.....	14
2.2	Objetivos específicos.....	14
3	REFERENCIAL TEÓRICO	15
3.1	Lacases fúngicas.....	15
3.2	<i>Trametes villosa</i>	17
3.3	<i>Microsphaeropsis arundinis</i>	18
3.4	Compostos fenólicos naturais de origem vegetal	19
3.4.1	Ácido Gálico.....	20
3.4.2	Ácido Ferúlico.....	21
3.5	Erva-mate	22
3.6	Síntese enzimática de corantes	23
3.7	Atividade antioxidante	25
3.8	Atividade antimicrobiana	26
4	METODOLOGIA	28
4.1	Fluxograma das etapas metodológicas	28
4.2	Microrganismos e condições de cultura	28
4.3	Produção do extrato enzimático e análise da cinética	29
4.4	Caracterização da enzima lacase no extrato bruto do cultivo individual e co-cultivo	30
4.5	Síntese de corantes naturais	31
4.6	Ajuste das condições reacionais	32
4.7	Determinação da atividade antioxidante dos corantes naturais líquidos	33
4.7.1	Efeito da captação do DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil).....	33
4.7.2	Análise FRAP (poder antioxidante de redução férrica).....	33
4.8	Determinação da atividade antimicrobiana dos corantes naturais líquidos	34
4.9	Seleção dos corantes com melhor potencial antioxidante e antimicrobiano	34
4.10	Separação das proteínas contidas nos corantes naturais	34
4.10.1	Precipitação utilizando acetona.....	34
4.10.2	Precipitação utilizando acetona gelada.....	35
4.10.3	Precipitação por centrifugação.....	35
4.10.4	Precipitação por acidificação do meio reacional.....	35
4.11	Determinação de fenólicos totais nos corantes após a precipitação	36
4.12	Determinação da atividade antioxidantes após a precipitação ..	36
4.13	Determinação da atividade antimicrobiana após a precipitação	36
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
5.1	Produção do extrato enzimático e análise da cinética enzimática	37
5.2	Caracterização enzimática da lacase no extrato bruto dos cultivos individuais e co-cultivo	40
5.3	Análise da síntese de corantes	41
5.3.1	Otimização da reação de síntese da coloração selecionada.....	42

5.4	Determinação da atividade antioxidante.....	45
5.5	Determinação da atividade antimicrobiana.....	47
5.6	Seleção dos corantes naturais com melhor potencial antioxidante e antimicrobiano.....	49
5.7	Separação das proteínas contidas nas reações de oxidação e sua influência nos fenólicos totais, potencial antioxidante e antimicrobiano.....	53
6	Conclusões.....	57
7	Sugestão para trabalhos futuros.....	58
	REFERÊNCIAS.....	59

1 INTRODUÇÃO

Lacases são enzimas produzidas por diversos organismos como plantas, insetos, bactérias e fungos (leveduriformes, filamentosos, basidiomicetos e ascomicetos) (MIKOLASCH; SCHAUER, 2009). São enzimas oxidorreductases que contém cobre em seu sítio ativo e que catalisam a oxidação monoelétrica de vários substratos (fenóis e aminas aromáticas), utilizando o oxigênio molecular como aceptor final de elétrons (JEON et al., 2012). A oxidação mediada pela lacase é responsável pela desprotonação do grupo hidroxila do substrato fenólico, formando radicais fenóxi instáveis, os quais sofrem oxidação adicional ou reações de acoplamento espontânea para produzir dímeros ou oligômeros e polímeros em maior tempo reacional (POLAK; JAROSZ-WILKOLAZKA, 2012). Essas enzimas alteram a estrutura de compostos fenólicos e/ou aminas aromáticas, degradam polímeros naturais complexos, como a lignina e promovem a polimerização de fenóis (POLAK et al., 2016a).

No ambiente natural, as lacases possuem papel importante em diversas etapas metabólicas, como a lignificação de plantas, biodegradação da lignina, renovação do húmus e pigmentação fúngica, na qual diversos organismos possuem colorações variadas devido à produção de pigmentos que são sintetizados durante a oxidação de compostos fenólicos em reações mediadas pela lacase (POLAK; JAROSZ-WILKOLAZKA, 2012). Devido ao alto potencial redox das lacases fúngicas (característica que as torna mais adequada para uso em processos oxidativos), seu uso é bastante promissor para diversas áreas da biotecnologia, como a síntese orgânica, branqueamento de fibras têxteis e de celulose, biorremediação, *grafting* químico e modificação polimérica (MIKOLASCH; SCHAUER, 2009).

As lacases reagem com vários substratos naturais (fenóis, polifenóis, anilinas, benzenotiol e compostos orgânicos e inorgânicos), sendo assim, pode ser utilizada como enzima verde por conduzir diversos tipos de reações oxidativas (JEON et al., 2012). Desta forma, são enzimas promissoras para aplicações industriais, pois podem formar diversos produtos menos prejudiciais ao ambiente e à saúde humana e com menor geração de subprodutos ou resíduos menos tóxicos em comparação com aqueles produzidos pelas indústrias químicas (AVILA, 2012; VICENTE et al., 2016).

Os compostos fenólicos naturais podem sofrer oxidação mediada pela lacase, dando origem a produtos orgânicos naturais (JEON et al., 2012) e como o oxigênio

molecular é utilizado como acceptor final, torna a oxidação rentável devido à abundância de oxigênio presente na natureza (GIARDINA et al., 2010). Considerando a sua capacidade de polimerização de fenóis, existe a possibilidade de utilizá-las na síntese verde de pigmentos e substâncias com propriedades antioxidantes e/ou antimicrobianas (VICENTE et al., 2016). Com a oxidação mediada pela lacase dos compostos fenólicos e aromáticos, é possível formar produtos coloridos que podem ser usados na indústria como corantes (BLANCO et al., 2009; JEON et al., 2010; POLAK et al., 2016).

A produção global de corantes sintéticos é de aproximadamente 800 mil toneladas por ano (HASSAAN; NEMR, 2017a). Os corantes sintéticos são utilizados em diversas indústrias, como têxtil, alimentícia, de papel, fármacos e cosméticas (HEALTH, 2016). A principal fonte de liberação de corantes no meio ambiente é associada com a exaustão incompleta dos corantes das fibras têxteis do processo de tingimento aquoso, desta forma, havendo a necessidade de reduzir a quantidade de corante residual no efluente têxtil (HASSAAN; NEMR, 2017b). Além dos problemas ambientais, o contato a longo prazo ou exposição acidental com os corantes sintéticos, pode causar riscos à saúde, como o problema respiratório devido a inalação de partículas do corante (HASSAAN; NEMR, 2017a). Outros problemas relacionados a exposição dos corantes são: irritação na pele, irritação no nariz, espirros, e olhos vermelhos e doloridos (HEALTH, 2016).

Em razão do crescimento das indústrias de corantes e conseqüentemente dos produtos tóxicos liberados no ambiente decorrente da produção e o risco à saúde humana, ocorreu um aumento na demanda de estudos em busca de protocolos para síntese de produtos mais sustentáveis como corantes naturais (SOUSA et al., 2019). Portanto, este estudo propôs avaliar o potencial de lacases fúngicas na síntese de corantes, visto que estas enzimas são precursoras para produção de corantes naturais e causam menores prejuízos ao meio ambiente, devido à baixa toxicidade dos subprodutos e resíduos formados.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar o potencial biotecnológico de lacases produzidas pelos fungos *Microsphaeropsis arundinis* e *Trametes villosa* para sintetizar corantes naturais e analisar a capacidade antioxidante e antimicrobiana dos produtos formados.

2.2 Objetivos específicos

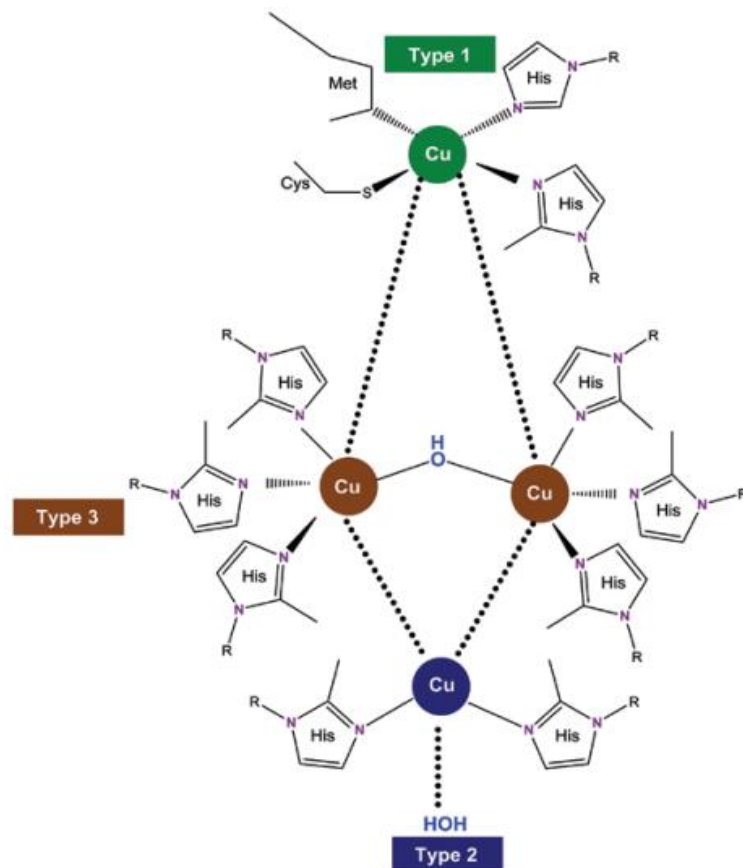
- Investigar a forma de cultivo fúngico (cultivo individual ou co-cultivo) adequada para obtenção de maior atividade enzimática de lacases;
- Realizar a cinética de produção de lacase;
- Caracterizar as enzimas lacase produzidas no cultivo individual e no co-cultivo;
- Analisar a coloração resultante das reações entre compostos fenólicos e o extrato bruto contendo lacases.

3 REFERÊNCIAL TEÓRICO

3.1 Lacases fúngicas

Lacases (EC 1.10.3.2) são enzimas oxirredutases caracterizadas pela presença de cobre em seu sítio ativo e pela catálise da oxidação monoelétrica de vários substratos, como fenóis e aminas aromáticas (JEON et al., 2012; POLAK; bJAROSZ-WILKOLAZKA, 2012). As lacases são caracterizadas pela presença de um íon de cobre tipo-1, um íon de cobre tipo-2 e dois íons de cobre tipo-3 (MIKOLASCH; SCHAUER, 2009). O cobre tipo-1 está ligado a enzima com resíduos de histidina e um de cisteína, enquanto oito resíduos de histidina servem como ligantes para os átomos de cobre tipo-2 e tipo-3 (HOEGGER et al., 2006). Os substratos são oxidados pelo cobre tipo-1 e os elétrons extraídos são transferidos para o cobre tipo-2/tipo-3, onde o oxigênio molecular é reduzido para a água (Figura 1) (BALDRIAN, 2006).

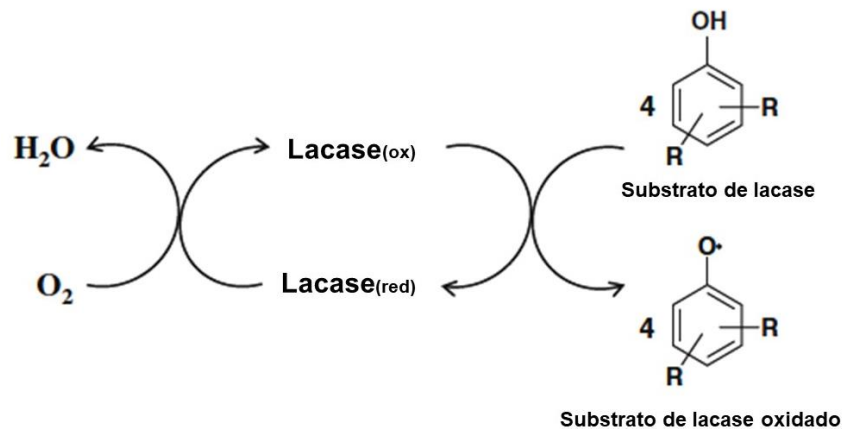
Figura 1 – Sítio ativo da enzima lacase.



Fonte: Boeckx et al., 2015.

A oxidação de substratos aromáticos hidroxilados, ocorre juntamente com a redução de um oxigênio molecular para a água pela transferência de quatro elétrons (HOEGGER et al., 2006). Desta forma, a oxidação mediada pela lacase envolve a perda de apenas um elétron e a formação de um radical livre (Figura 2) (MIKOLASCH; SCHAUER, 2009).

Figura 2 – Ciclo catalítico da oxidação de um substrato catalisado pela lacase.



Fonte: Adaptado de Mikolasch e Schauer, 2009.

As lacases desempenham papéis importantes em várias etapas metabólicas dos organismos, como as envolvidas na pigmentação fúngica, lignificação de plantas, biodegradação da lignina e renovação de húmus (MAYER; STAPLES, 2002; RUIZ-DUEÑAS; MARTÍNEZ, 2009; JEON et al., 2012).

Estas enzimas são divididas em lacases de baixo (LAC 2 e LAC 3) e alto potencial redox (LAC 1), sendo que as lacases de alto potencial redox ocorrem em basidiomicetos (CHERKASHIN et al., 2007; HERNÁNDEZ-LUNA; GUTIÉRREZ-SOTO; SALCEDO-MARTÍNEZ, 2008; MIKOLASCH; SCHAUER, 2009) e de baixo potencial redox são encontradas em leveduras, bactérias, insetos e plantas (JUNG; XU; LI, 2002). O potencial redox das lacases é determinado pelo comprimento da cadeia polipeptídica, a qual contém dois resíduos para LAC 1 e três resíduos para LAC 2 e LAC 3, e pelas propriedades do cobre central (KLONOWSKA et al., 2002).

As lacases de alto potencial redox são encontradas em diversos fungos, como os *Phanerochaete* sp., *Trametes* sp., *Pycnoporus* sp., *Nematoloma* sp., *Sporotrichum* sp., entre outros gêneros, e mais de 125 genes de lacases diferentes tem sido descritos (HOEGGER et al., 2006; JEON et al., 2012).

Estudos da atividade da lacase em substratos orgânicos naturais sugerem que esta enzima pode ser útil em processos biotecnológicos para aplicações industriais (POLAK; JAROSZ-WILKOLAZKA, 2012). Devido a versatilidade de suas propriedades bioquímicas, alta estabilidade proteica e a ampla gama de aplicações, as lacases são biocatalizadoras úteis na biotecnologia (MIKOLASCH; SCHAUER, 2009).

As lacases fúngicas têm sido aplicada em diversas áreas da biotecnologia, incluindo síntese orgânica, branqueamento têxtil, biorremediação, modificação de polímeros e adição de cadeias poliméricas em uma superfície (KUNAMNENI et al., 2008; MIKOLASCH; SCHAUER, 2009; JEON et al., 2012), além de sintetizar vários produtos terapêuticos, como antibióticos, que causam menores danos ao meio ambiente, quando comparados com produtos sintéticos (PEZZELLA; GUARINO; PISCITELLI, 2015). O uso das lacases fúngicas é uma das ferramentas fundamentais para a meta da química verde, pois estes catalisadores não são perigosos ao meio ambiente e à saúde humana e minimizam a produção de resíduos tóxicos (RAN et al., 2008).

3.2 *Trametes villosa*

Os organismos do gênero *Trametes* são fungos basidiomicetos, pertencentes ao Reino Fungi, Filo Basidiomycota e Família Polyporaceae (GIMENES, 2011). Este gênero compreende 20 espécies que geralmente desenvolvem-se em madeira de angiospermas em decomposição (CARNEIRO et al., 2017; FERREIRA et al., 2018).

O fungo *Trametes villosa* (Figura 3) é uma espécie tropical, geralmente encontrada em regiões semiáridas do Brasil (CARNEIRO et al., 2017). Esta espécie tem se destacado, por ser capaz de produzir três importantes enzimas lignolíticas: Lacase (Lac), Manganês Peroxidase (MnP) e Lignina Peroxidase (Lip) (FERREIRA et al., 2018). Por este motivo, tem demonstrado alto potencial para aplicações biotecnológicas, dentre estas, a descoloração de corantes industriais, o branqueamento de papel e a degradação de poluentes orgânicos (ORTIZ-MONSALVE et al., 2017; FERREIRA et al., 2018).

Figura 3 – Fungo *Trametes villosa* em tronco de árvore.



Fonte: Natura lista, 2019.

Estudos mostraram que o gênero de fungo da podridão-branca *Trametes* sp. possui lacase de alto potencial redox com atividade enzimática moderada e de baixo potencial redox que possui alta capacidade oxidativa (KLONOWSKA et al., 2005). O potencial do *T. villosa* está relacionado com a capacidade de degradação realizada pelo seu sistema enzimático oxidativo (ALI, 2010). Além da degradação, este fungo pode realizar processos de biossorção e bioacumulação para remoção de corantes (ORTIZ-MONSALVE et al., 2019).

Apesar do *T. villosa* ser considerado um eficiente decompositor de madeira e um fungo promissor para aplicações biotecnológicas, devido ao seu sistema enzimático lignocelulítico, existem poucos dados relacionados com a síntese enzimática, código genético e regulação (FERREIRA et al., 2018).

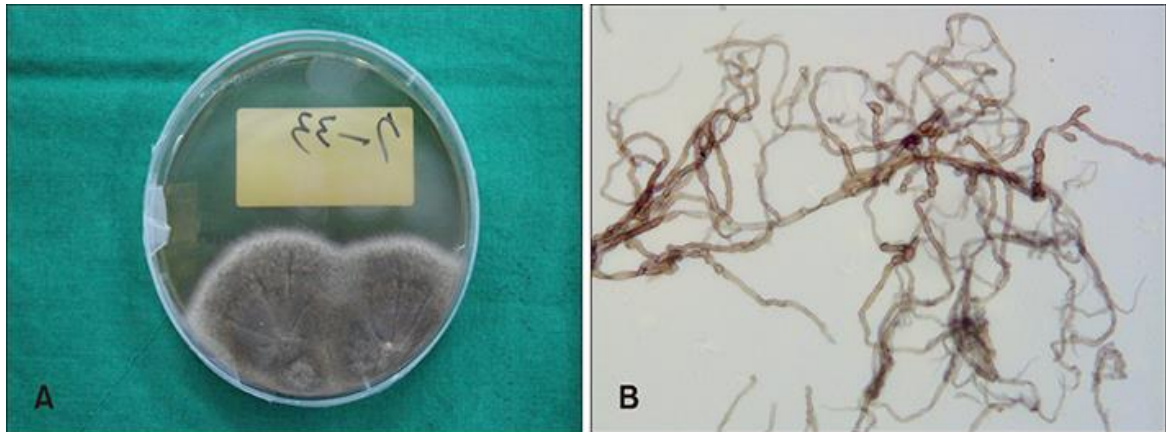
3.3 *Microsphaeropsis arundinis*

O gênero *Microsphaeropsis* é pertencente ao Reino Fungi, Filo Ascomycota e Família Montagnulaceae (SUTTON, 1980). Este gênero é caracterizado por ser rica fonte de compostos bioativos, como compostos antibacterianos, citotóxicos, antibióticos, antifúngicos e bio-herbicida (BERNARDES, 2010; SOMMART et al., 2012; QIN et al., 2017).

Microsphaeropsis arundinis (Figura 4) é um fungo anamorfo, cosmopolita e endofítico, caracterizado por habitar planta hospedeira terrestre e por ser encontrado

em solo e água (HALL, 2009; BARON, 2014). Os fungos endofíticos estão presentes nos organismos do reino vegetal e são fontes interessantes de metabólitos com potencial biológico (BOTERO et al., 2020).

Figura 4 – (A) Fungo *Microsphaeropsis arundinis* em placa de Petri contendo meio Ágar Dextrose Sabouraud com 14 dias de crescimento; (B) Morfologia microscópica do *M. arundinis* corada com coloração Lactofenol azul de algodão.



Fonte: Choi et al., 2019.

O fungo *M. arundinis* está relacionado à raras infecções na pele de hospedeiros imunocomprometidos (CRAWFORD et al., 2015). Apesar desta espécie estar sendo reconhecida como causadora de infecções cutâneas em animais e humanos, apresentou atividade antioxidante (em ensaios de DPPH) e antifúngica contra *Microsporium gypseum* (SOMMART et al., 2012). Segundo Luo et al. (2013), o composto Arundinona B extraído do fungo *M. arundinis* apresenta citotoxicidade contra as células T24 (câncer de bexiga) e A549 (câncer de pulmão).

Na literatura existe pouco estudo relacionado à lacases fúngicas extraídas do *M. arundinis*. Apenas o trabalho desenvolvido por Passarini (2012), Sun, Guo e Hyde (2011) e Paula (2019) avaliaram a produção enzimática de lacase por este fungo, os quais ambos os trabalhos apresentaram resultado positivo para produção de lacase.

3.4 Compostos fenólicos naturais de origem vegetal

Os compostos fenólicos estão amplamente distribuídos no reino vegetal como metabólitos secundários das plantas, os quais possuem a função de protegê-las contra infecções e responderem ao estresse causado por fatores externos

(BHATTACHARYA; SOOD; CITOVSKY, 2010; KUDANGA; NEMADZIVA; LE ROES-HILL, 2017).

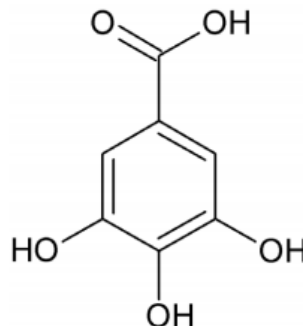
Compostos fenólicos, tais como, catecol, ácido vanílico, ácido siríngico, hidroquinona, ácido ferúlico, ácido gálico ou outros bifenois hidroxilados, podem ser oxidados pela lacase (MIKOLASCH; SCHAUER, 2009). Em razão dos bioativos produzidos, os compostos fenólicos apresentam diversos benefícios terapêuticos, através de produtos com propriedades anti-inflamatórias, antialérgicas, antiarteogênicas, antimicrobianas, antioxidantes e ações vasodilatadoras (BORGES et al., 2013; PASHA et al., 2013).

Os compostos fenólicos naturais despertam o interesse para novas aplicações sintéticas. Por este motivo, são utilizados como substratos para processos catalisados por lacase que originam produtos orgânicos naturais, tais como corantes, biocombustíveis e fármacos, com diversas funcionalidades físico-químicas e baixa toxicidade (JEON, 2010, 2012).

3.4.1 Ácido Gálico

O ácido gálico (Figura 5) é um composto polifenólico natural (LI et al., 2019). Este composto é encontrado em frutas cítricas e vermelhas, cereais, chás, vinhos e ervas (AYTAC et al., 2016).

Figura 5 – Estrutura molecular do ácido gálico.



Fonte: Munoz-bernal e Torres-Aguirre, 2017.

Este composto fenólico é considerado um agente antimicrobiano por sua capacidade de realizar alterações na membrana de *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes* (BORGES et al., 2013; AYTAC et al., 2016). Além da sua capacidade antimicrobiana, este composto é

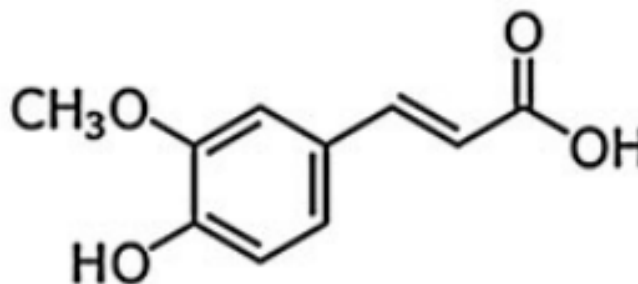
utilizado na indústria farmacêutica, alimentícia, cosmética e química, devido ao seu potencial antioxidante (AYTAC et al., 2016; AYDOGDU et al., 2019; ZHANG et al., 2019).

Os processos biotecnológicos ocorrem em condições aeróbias e alguns processos, como na indústria química, necessitam de temperaturas elevadas. Desta forma, a aplicação do ácido gálico em processos biotecnológicos é dificultada devido à sua instabilidade, pois em contato com oxigênio, alta temperatura, contato com a luz e em outras condições é facilmente degradado (BORGES et al., 2013; AYDOGDU et al., 2019; ZHANG et al., 2019). No entanto existem diversos trabalhos que utilizam o ácido gálico para a síntese de novos produtos naturais, como o trabalho de Jeon et al. (2010) para a produção de novos corantes; Xie et al. (2014) para a produção de um polissacarídeo com potencial antioxidante; Bozic, Gorgieva e Kokol (2012) para a formação de novas estruturas fenólicas oligoméricas ou poliméricas com atividade antioxidante maior que o monômero utilizado; Zheng et al. (2018) para síntese de produtos com maior atividade antioxidante e antisséptica e Li et al. (2019) para produção de um composto com potencial antimicrobiano maior que o fenólico utilizado.

3.4.2 Ácido Ferúlico

Ácido ferúlico (Figura 6) é um composto fenólico encontrado em tecidos vegetais (DRAGAN et al., 2016). Alimentos consumidos no dia a dia como grãos, frutas cítricas, banana, café, berinjela, beterraba, repolho, espinafre e brócolis são fontes de ácido ferúlico (ZHAO; MOGHADASIAN, 2008).

Figura 6 – Estrutura molecular do ácido ferúlico.



Fonte: Borges et al., 2013.

Este composto é um antioxidante natural, o qual possui propriedades antimicrobianas, anti-inflamatórias e anticancerígenas, e possui efeito analgésico (MALEH et al., 2019). Além destes benefícios, o ácido ferúlico é utilizado na indústria farmacêutica, em medicamento para doenças cardiovasculares, contra o câncer e Alzheimer (KWON et al., 2019; REN et al., 2019). Além disso, este composto fenólico protege o DNA e lipídios do estresse oxidativo (ZHAO; MOGHADASIAN, 2008).

Como os processos catalisados pela lacase melhoram o potencial benéfico dos compostos fenólicos e geram produtos orgânicos naturais, há diversos estudos utilizando ácido ferúlico e lacases, como o desenvolvido por Shin, Guebitz, Cavaco-Paulo (2001), Jeon et al. (2010), Adhlakun et al. (2012a) e Song et al. (2018) para sintetizar produtos naturais com maiores potenciais antioxidantes e antimicrobianos.

3.5 Erva-mate

A erva-mate (*Ilex paraguarensis*) (Figura 7) é uma espécie tropical da América do Sul, cultivada no sul do Brasil, Argentina e Uruguai (BRITO; GOSMANN; OLIVEIRA, 2018). Esta espécie de árvore tem suas folhas processadas, secas e picadas para serem utilizadas em bebidas não alcoólicas (LONDOÑO; REYNOSO; RESNIK, 2014).

Figura 7 – Folha da Árvore *Ilex paraguarensis*.



Fonte: Agência legislativa, 2019.

O extrato aquoso da erva-mate é consumido como uma bebida quente (chimarrão) ou gelada (tereré) (SILVA et al., 2019). A erva-mate é fonte de cafeína e é amplamente consumida nas cidades da América do Sul (ORANUBA et al., 2019).

A bebida com erva-mate tem sido descrita por ter diversas atividades biológicas, as quais foram relacionadas com o alto teor (aproximadamente 64 mg de polifenóis totais em um grama de erva-mate seca) de polifenóis (GAMBERO; RIBEIRO, 2015). Além dos polifenóis, como os flavonoides (flavonol, rutina, glicosídeos de quercetina, kaempferol) e ácidos fenólicos, a erva-mate é fonte de cafeína e saponinas (BASTOS et al., 2007; JUNIOR; MORAND, 2016). Os principais compostos fenólicos encontrados na erva-mate são o ácido cafêico, clorogênico, cumárico e ferúlico (GÓMEZ-JUARISTI et al., 2017).

Devido à sua composição e suas propriedades farmacológicas, a erva-mate tem sido utilizada como antioxidante, vasodilatador, anti-inflamatório e agente termogênico (GAMBERO; RIBEIRO, 2015).

3.6 Síntese enzimática de corantes

Nos dias atuais, existem mais de 100 mil corantes disponíveis no comércio, os quais são utilizados na indústria têxtil, alimentícia e de cosmético (HASSAAN; NEMR, 2017a). Os corantes sintéticos são amplamente utilizados e a indústria têxtil é a principal consumidora desse produto (POLAK et al., 2016a).

A classe Azo é a mais importante para a indústria de corantes e são sintetizados durante a reação acoplada de oxidação entre dois substratos diferentes (POLAK; JAROSZ-WILKOLAZKA, 2012). Os corantes Azo frequentemente utilizado são: tartrazina, amarelo crepúsculo, vermelho cochonilha, azorubina, amaranço, azul brilhante e vermelho allura (BADNJEVIC; SKRBIC; POKVIC, 2019). Muitos corantes Azo e os produtos químicos e biológicos resultante da sua degradação podem ser tóxicos, mutagênicos ou carcinogênicos, além de provocar reações alérgicas (GOTTLIEB et al., 2003).

Os efluentes liberados pelas indústrias contém grande quantidade de corantes e produtos químicos, alguns dos quais não são biodegradáveis e são cancerígenos, o que os torna prejudicial para a saúde humana e para o meio ambiente (BADNJEVIC; SKRBIC; POKVIC, 2019). Esses corantes podem alterar as propriedades físicas e

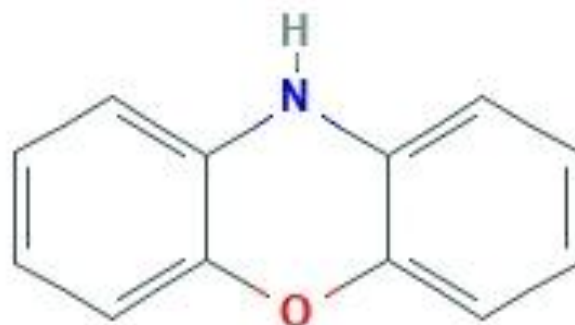
químicas do solo e da água, causando danos à fauna e flora (HASSAAN; NEMR, 2017a).

Diversos estudos demonstraram o potencial de reações mediadas pela lacase para a síntese de corantes naturais, como o desenvolvido por Mustafa et al. (2005) para síntese de corantes fenólicos, Jeon et al. (2010) para síntese de corantes capilares, Polak et al. (2016b) para propriedades de coloração por corantes naturais em tecido, Kumar et al. (2018) para polimerização de precursores naturais para síntese de corantes capilares e Sousa et al. (2019) para síntese de corante azobenzeno.

A lacase catalisa a formação de substâncias coloridas pela oxidação de substratos simples que são derivados de benzeno e, por este motivo, tem sido utilizada em processos de polimerização para formar pigmentos coloridos (MIKOLASCH; SCHAUER, 2009; POLAK; JAROSZ-WILKOLAZKA, 2012). Desta forma, existem diversas oxidações mediadas pela lacase de composto simples (fenólicos e não-fenólicos) que formam compostos coloridos que podem ser utilizadas em corantes têxteis e alimentícios (BAKER et al., 1996; MUSTAFA et al., 2005; POLAK et al., 2016).

Os compostos de fenoxazinas (Figura 8) são coloridos e podem ser usados como corantes têxteis em fábricas de corantes naturais (BRUYNEEL et al., 2009). Estes compostos possuem excelente propriedade de coloração e não possuem toxicidade, desta forma, podem ser sintetizado sem adição de químicos perigosos durante o processo catalisado pela lacase (POLAK; JAROSZ-WILKOLAZKA, 2012).

Figura 8 – Estrutura química do composto fenoxazina.



Fonte: National Center for Biotechnology Information, 2020.

Os polifenóis podem ser polimerizados enzimaticamente para sintetizar corantes naturais pretos, marrons e alaranjados (COVINGTON et al., 2005). Muitas

substâncias coloridas produzidas durante a oxidação mediada pela lacase são solúveis em água e podem ser utilizadas em indústrias têxteis, de papel e na indústria farmacêutica (POLAK; JAROSZ-WILKOLAZKA, 2012; VICENTE et al., 2016). Além da capacidade de coloração, os compostos pigmentados produzidos pelas reações da lacase com os compostos fenólicos podem apresentar potencial antimicrobiano e antioxidante, que poderão ser utilizados na indústria farmacêutica, de cosméticos e alimentícia (LI et al., 2019).

3.7 Atividade antioxidante

Antioxidantes são substâncias naturais utilizadas para regular fatores causados por agressões externas para prevenir o estresse oxidativo (ALONSO et al., 2013). Segundo Thiele, Dreher e Packer (2002), os compostos contendo antioxidantes podem contribuir com a redução dos efeitos dos radicais livres, juntamente com os antioxidantes produzido pelo organismo.

A maioria dos antioxidantes exógenos utilizados é adquirido de produtos naturais como isoflavonas da soja, fenóis do azeite de oliva e polifenóis da uva e chá (JAYAPRAKASHA; SELVI; SAKARIAH, 2003). O uso de compostos fenólicos naturais como antioxidantes tem trazido benefícios para a saúde (ADELAKUN et al., 2012b). Os fenóis previnem diversas doenças (cardiovasculares e neurodegenerativas) relacionadas ao estresse oxidativo, alterando a atividade enzimática e os receptores celulares, além de eliminar os radicais livres (OLIVEIRA et al., 2011).

A pele é um órgão que fica constantemente exposta a ambientes e compostos pró-oxidantes, como radiação ultravioleta, drogas e poluentes (THIELE; PODDA; PACKER, 1997). Além dos indutores externos pró-oxidantes, a pele sofre com a produção endógena de espécies reativas de oxigênio (ROS) e outros radicais, o quais são produzidos durante o metabolismo celular fisiológico (THIELE; DREHER; PACKER, 2002).

Há evidências de que as ROS e radicais livres derivados do oxigênio podem contribuir com o desenvolvimento de efeitos patológicos como danos no DNA, carcinogênese e de degeneração celular, e induzir doenças como câncer, diabete e artrite reumatoide (VALKO et al., 2007). Por este motivo, é necessário desenvolver e utilizar antioxidantes, para proteger o corpo humano de radicais livres e retardar o progresso de doenças crônicas (LIU et al., 2010).

Além dos benefícios para o organismo humano, os antioxidantes são adicionados à carne suína e bovina para prevenir a oxidação lipídica e a deterioração da cor (KIM et al., 2016). Existem diversos antioxidantes naturais de fontes vegetais que são utilizados para melhorar os valores nutricionais e melhorar a qualidade do alimento através da preservação das carnes de animais (YOO et al., 2008). Segundo Zheng et al. (2018), gerenciar e manusear a carne animal para a sua preservação, é um desafio científico com alto impacto econômico, pois os antioxidantes naturais possuem alto custo (ZHENG et al., 2018).

Como o interesse por antioxidantes sintéticos está reduzindo, devido aos possíveis riscos causados por estes antioxidantes e o alto custo, o estudo pelos antioxidantes naturais está aumentando (ADELAKUN et al., 2012b). Em razão disto, as lacases têm sido descritas por catalisarem a polimerização de compostos fenólicos como caminho para aumentar a capacidade antioxidante de alguns compostos (NCANANA; BURTON, 2007).

3.8 Atividade antimicrobiana

A resistência antimicrobiana tem se tornado um sério problema para a saúde, pois os agentes antimicrobianos estão perdendo sua eficiência (BORGES et al., 2013). A evolução da resistência bacteriana pode estar relacionada com o uso excessivo de antibióticos e a transmissão do gene resistente entre as bactérias (ANDERSSON; HUGHES, 2011). Esta resistência se dá por diferentes mecanismos como: modificação do local de ligação dos antibióticos, produção de enzimas que podem degradar ou alterar a estrutura antibiótica, mutações em genes que codifica as proteínas de transporte, e assim, causando a ruptura da parede celular e o bombeamento ativo das moléculas do antibiótico para fora da célula (ALDULAIMI, 2017).

A maioria dos antibióticos é desenvolvido a partir dos próprios microrganismos, no entanto, as plantas possuem estratégias químicas para protegê-las contra microrganismos (HEMAISWARYA; KUMAR; DOBLE, 2008). Estudos recentes têm relatado que polifenóis são a classe de antimicrobianos naturais que possuem ações inibitórias contra bactérias Gram-positivas e negativas (LI et al., 2019). Os polifenóis, flavonóis e ácidos fenólicos possuem atividade antibacteriana devido à capacidade de

inibir fatores de virulência como enzimas e toxinas, interagir com a membrana citoplasmática e suprimir a formação do biofilme (QUIDEAU et al., 2011).

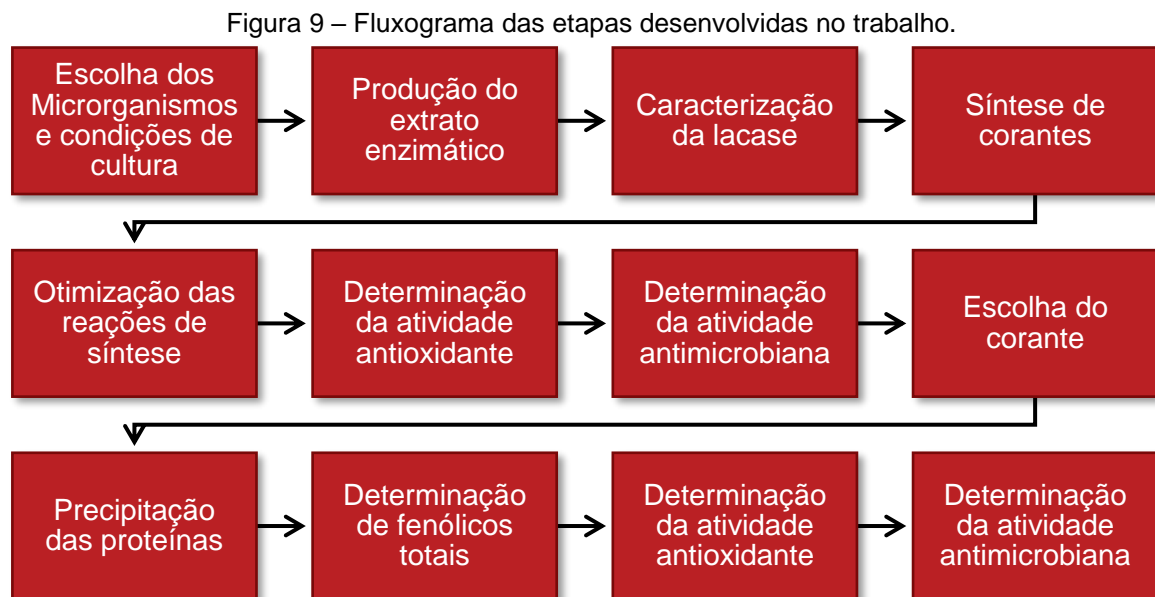
Compostos fenólicos naturais extraído de plantas podem apresentar diversos efeitos biológicos como antibacteriano, antifúngico, antiviral, anti-inflamatório, antialérgico, anticancerígeno e com ações vasodilatadoras (BORGES et al., 2013). As propriedades presentes nestes compostos fenólicos podem apresentar potencial antibiótico bactericida ou bacteriostáticos, por este motivo, demonstram ser promissores como um antibiótico natural (MIKLASIŃSKA-MAJDANIK et al., 2018).

Com o intuito de produzir novas classes de antimicrobianos que não estejam ultrapassados, em relação a sua eficiência, quanto os antimicrobianos atuais (SALEEM et al., 2010). Existe interesse na produção de novos antibióticos através da oxidação fenólica, do acoplamento oxidativo fenólico e da oxidação acoplada com amina nuclear, catalisada por lacase (MIKOLASCH et al., 2008).

4 METODOLOGIA

4.1 Fluxograma das etapas metodológicas

Para o desenvolvimento do trabalho foi necessário seguir as seguintes etapas metodológicas (Figura 9):



Fonte: O autor, 2020.

4.2 Microrganismos e condições de cultivo

As espécies fúngicas utilizadas para a avaliação da produção de lacase foram *Microsphaeropsis arundinis* e *Trametes villosa* obtidas do banco de cepas do Laboratório de Biotecnologia do Departamento Acadêmico de Química e Biologia da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – *campus* Curitiba.

Os fungos foram inoculados em placas de Petri contendo meio ágar batata dextrose (*Potato Dextrose Agar* - PDA), até o crescimento por sete dias em estufa (Quimis, modelo Q316B24) com temperatura controlada de 28°C, sem necessidade do controle de luminosidade e umidade (MOLDES; LORENZO; SANROM, 2004).

Após o crescimento, os fungos foram repicados em meio PDA para a obtenção de duas réplicas de cada fungo, um para o uso experimental e outro para estoque. Além do armazenamento em placa, foi realizada a técnica de conservação de fungos

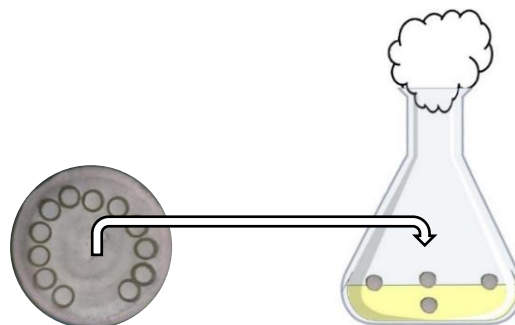
em água destilada estéril, descrita por Castellani (1939), na qual após sete dias de crescimento em temperatura de 28°C no meio PDA, os fungos foram repicados em tubos Eppendorf contendo água destilada esterilizada. As duas formas de armazenamento dos fungos foram mantidas a temperatura de 4°C para sua preservação.

4.3 Produção do extrato enzimático e análise da cinética

O meio de cultivo utilizado para a produção enzimática foi adaptado seguindo o protocolo de (RIEDI, 2019), utilizando três diferentes indutores de enzimas ligninolíticas (bagaço de cana, bagaço de uva bordô e casca de arroz). O meio líquido foi composto por bagaço de cana (20 g/L), bagaço de uva bordô (5 g/L), casca de arroz (10 g/L), glicose (10 g/L), fosfato de potássio (3 g/L), peptona (5 g/L), sulfato de cobre (1 mM), sulfato de magnésio (1mM), sulfato de manganês (1 mM) e sulfato de zinco (1 mM). Foram preparados 50 mL de meio de cultivo líquido em Erlenmeyers de 250 mL.

A produção de lacases foi avaliada em duas formas de cultivo, o cultivo individual (cada espécie de fungo foi cultivada individualmente) e o co-cultivo (duas espécies de fungo foram cultivadas em um mesmo Erlenmeyer). Os fungos foram inoculados, através de discos (quatro nos cultivos individuais e dois de cada fungo no co-cultivo), com diâmetro de 10 mm, retirados da placa contendo PDA (Figura 10). Os discos fúngicos foram colocados no meio líquido para crescimento em estufa (Quimis, modelo Q316B24) a 28°C (MOLDES; LORENZO; SANROM, 2004).

Figura 10 – Esquema representativo do repique do fungo em meio PDA para o meio nutritivo líquido.



Fonte: O autor, 2019.

Após o resultado da forma de cultivo com maior produção enzimática, foi realizada a cinética deste cultivo para analisar o tempo ideal para a obtenção da maior

atividade enzimática. A produção enzimática foi quantificada após três, cinco, sete, dez e doze dias de cultivo.

A biomassa foi separada por papel filtro qualitativo para a obtenção do extrato enzimático bruto, que em seguida foi centrifugado em microtubos (Quimis, modelo Q-222-T28) à 10.000 rpm durante 10 minutos, sem controle de temperatura (HOU et al., 2004).

A atividade da lacase foi determinada pela oxidação do ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico) (ABTS) em 50 mM de acetato de sódio (pH 5,0), utilizando o espectrofotômetro UV-visível (BEL M-51) a 420 nm (ADELAKUN et al., 2012b). A atividade enzimática foi expressa em unidades internacionais (U), na qual uma unidade da atividade da lacase foi definida como a quantidade de enzima necessária para oxidar 1 mol de ABTS por minuto a 40°C.

4.4 Caracterização da enzima lacase no extrato bruto do cultivo individual e co-cultivo

A eletroforese para analisar o peso molecular das lacases utilizadas no trabalho foi realizada em gel de poliacrilamida-dodecil sulfato de sódio (*SDS-PAGE*) na concentração de 10% (WANG; DING; ZHU, 2018). O gel eletroforético foi preparado na ausência de β -Mercaptoetanol e sem aquecimento prévio das amostras, para manter a enzima lacase ativa. O extrato bruto da lacase foi precipitado com acetona gelada e posteriormente 10 μ L foi inoculado no gel de eletroforese. Após aproximadamente quatro horas de corrida da eletroforese à 180 V e 40 A, foi realizada a determinação da massa molecular das proteínas encontradas no extrato (coradas por reação com prata) através da comparação com o padrão de massa molecular Sigma Market. Posteriormente foi realizado o zimograma em gel de ABTS, para identificar qual das proteínas coradas correspondiam a enzima lacase.

A coloração por prata foi realizada para analisar o peso da enzima lacase, após a observação das bandas que foram visíveis no gel de determinação da atividade da lacase. O gel da eletroforese foi fixado em solução de etanol (50%), ácido acético (12%) e formaldeído 37% (0,075%) durante 24 horas. O gel foi lavado com agitação por três vezes em etanol (50%). Após a fixação, o gel permaneceu durante um minuto em tiosulfato de sódio e posteriormente foi lavado três vezes com água deionizada. O gel foi mergulhado no corante de prata (0,25% de nitrato de prata; 0,075%

formaldeído) por 25 minutos e então foi lavado três vezes com água deionizada. Após estes processos, o gel de eletroforese foi mergulhado na solução reveladora (6% de carbonato de sódio; 0,05% de formaldeído; 2 mL de solução de tiosulfato de sódio) para a observação do peso molecular da enzima lacase.

O protocolo utilizado para determinar a atividade da lacase em gel de SDS foi desenvolvido por Yaver et al. (1996). O gel da eletroforese foi lavado por 30 minutos em álcool isopropílico (25%) e tampão acetato de sódio (50 mM – pH 5,0) e posteriormente lavado por mais 30 minutos em tampão acetato de sódio. Após a secagem do gel substrato (0,05 g de ABTS; 1 g de ágar; 50 mL de tampão acetato de sódio), o gel da eletroforese foi sobreposto na placa contendo o gel substrato e foi observado o aparecimento de bandas verdes (bandas de atividade de lacase).

4.5 Síntese de corantes naturais

As reações para síntese de corantes foram realizadas com dois diferentes compostos fenólicos (ácido gálico (1 mM) e ácido ferúlico (1 mM)), extrato de erva-mate (10 g/L) e extrato enzimático de lacase do co-cultivo (100 U/L) em uma solução contendo acetato de sódio (100 mM – pH 5,0) (JEON et al., 2010). Foram realizadas sete combinações (Quadro 1) e estas reações foram incubadas em Shaker (MA, modelo 420) à 40°C, com rotação de 120 rpm por 24 horas.

Para obtenção do extrato de erva-mate, adicionou-se 10 g/L das folhas de erva-mate secas em etanol 40% (adaptado de HAMINIUK et al., 2011). Esta solução foi colocada em incubadora Shaker a 120 rpm com temperatura de 40°C. Após duas horas, a solução foi filtrada em filtro de papel qualitativo de 11 cm de diâmetro.

Quadro 1 - Combinação entre os compostos utilizados para a síntese de corantes naturais.

	Ácido Gálico (1 mM)	Ácido Ferúlico (1 mM)	Extrato de Erva-mate (1%)	Lacase (100 U/L)	Acetato de sódio (100 mM)
1ª Combinação	X			X	X
2ª Combinação		X		X	X
3ª Combinação			X	X	X
4ª Combinação	X	X		X	X
5ª Combinação	X		X	X	X
6ª Combinação		X	X	X	X
7ª Combinação	X	X	X	X	X

Fonte: O autor, 2020.

A formação de substâncias polifenólicas foi monitorada no tempo inicial e após 1, 2, 4 e 24 horas de reação, no espectrofotômetro UV-visível nos comprimentos de onda de 700 a 400 nm.

4.5.1 Ajuste das condições reacionais

A partir dos corantes sintetizados foi selecionada a combinação da cor de interesse, a qual obteve a tonalidade mais escura, e foram testadas diversas concentrações dos compostos e atividades de lacase em 100 mM de acetato de sódio (pH 5,0). Um delineamento experimental em três níveis e três variáveis independentes (concentração de ácido gálico, extrato de erva-mate e lacase) foi selecionado para esta etapa de otimização, resultando em nove experimentos realizados em duplicata (Tabela 1).

Tabela 1. Delineamento experimental com diferentes concentrações de ácido gálico, extrato de erva-mate e lacase para a síntese do corante de interesse (n=2).

Amostra	Ácido gálico (mM)	Extrato de erva-mate (mg/L)	Lacase (U/L)
1	1	0,25	100
2	2,5	0,25	500
3	5	0,25	250
4	1	0,5	500
5	2,5	0,5	250
6	5	0,5	100
7	1	1	250
8	2,5	1	100
9	5	1	500

Fonte: O autor, 2020.

As amostras resultantes do delineamento experimental com diferentes concentrações foram levadas à incubadora Shaker a 40°C com 120 rpm.

Os produtos sintetizados foram analisados com 35 horas de reação, os quais foram monitorados no tempo inicial e após 1, 2, 4 e 35 horas de reação, no espectrofotômetro UV-visível nos comprimentos de onda de 700 a 400 nm. A diferença nas colorações formadas foi analisada em colorímetro (Miniscan xe plus), utilizando o padrão da Comissão Internacional em Iluminação de L'Eclairage (CIE $L^*a^*b^*$), o qual é amplamente utilizado para analisar a coloração de diversos materiais. Os valores de

L^* representam luminosidade que variam da cor preta (0) ao branco (100), a^* representa a coloração que varia da cor verde (-100) ao vermelho (100) e b^* a variação entre a coloração azul (-100) a amarelo (100) (JEON et al., 2010).

4.6 Determinação da atividade antioxidante dos corantes naturais líquidos

A atividade antioxidante do corante sintetizado foi determinada utilizando dois métodos: análise de captação do radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) e FRAP (poder antioxidante de redução férrica) (ADELAKUN et al., 2012b). Nas duas metodologias realizadas, os resultados foram comparados com a capacidade antioxidante do Trolox (ácido 2-carboxílico-6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano).

4.6.1 Efeito de captação do DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil)

O reagente DPPH foi dissolvido em metanol (0,025 mg/mL). Em tubos de ensaio foi adicionado 0,1 mL da amostra e 3,9 mL da solução de DPPH. Os tubos foram agitados no vórtex (Biomixer, modelo QL901) e incubados em temperatura ambiente e na ausência de luz. Após 30 minutos foi determinada a absorbância em espectrofotômetro a 517 nm (XIE et al., 2014).

4.6.2 Análise FRAP (poder antioxidante de redução férrica)

A atividade antioxidante foi mensurada pelo poder antioxidante de redução do íon férrico de acordo com a metodologia de Benzie e Strain (1996), adaptada de Alvarez et al. (2017).

O reagente FRAP foi preparado através da mistura de 300 mM de tampão acetato (pH 3,6), solução de 10 mM de TPTZ (2,4,6-tripiridil-s-triazina) em 40mM de HCL e 20 mM de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$. O reagente foi preparado misturando 25mL de tampão acetato, 2,5 mL de solução de TPTZ e 2,5 mL de solução $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (BENZIE; STRAIN, 1996; ADELAKUN et al., (2012).

Para a análise, 0,05 mL da amostra foi misturada com 1,5 mL do reagente FRAP. As amostras foram agitadas no vórtex e mantidas no escuro em temperatura ambiente. Após 30 minutos, a absorbância foi analisada em espectrofotômetro a 593 nm.

4.7 Determinação da atividade antimicrobiana dos corantes naturais líquidos

A atividade antibacteriana foi desenvolvida seguindo a metodologia da Concentração Inibitória Mínima (*MIC*) e analisada no leitor de microplacas Elisa (BMG LabTech, modelo FLUOstar Omega) (WIEGAND; HILPERT; HANCOCK, 2008). O teste antimicrobiano para leveduras foi seguindo o método do Teste de Diluição em Caldo para Determinação da Sensibilidade de Leveduras à Terapia Antifúngica (Norma M27-A2) (NCCLS, 2002).

O potencial antimicrobiano dos corantes sintetizados foi avaliado contra cepas de bactérias Gram-negativas (*Escherichia coli* - ATCC 25922) e Gram-positivas (*Staphylococcus aureus* - ATCC 6538) e da levedura *Saccharomyces cerevisiae* (ATCC 9763).

4.8 Seleção dos corantes com melhor potencial antioxidante e antimicrobiano

Com o resultado do planejamento experimental e o teste ANOVA, realizado no programa Statistica 7.1, foi possível identificar a concentração ideal dos compostos para obter um melhor resultado colorimétrico, com potencial antioxidante e antimicrobiano.

4.9 Separação das proteínas contidas nos corantes naturais

Com a escolha dos corantes com melhor potencial antioxidante e antimicrobiano foi realizada a precipitação das proteínas dos produtos sintetizados escolhidos para possibilitar a realização das análises cromatográficas.

A precipitação das proteínas dos corantes sintetizados foi desenvolvida utilizando quatro métodos (precipitação com acetonitrila, acetona gelada, sulfato de amônio e acidificação com HCl) para possibilitar a escolha do método de precipitação das proteínas que mantivesse o potencial antioxidante e antimicrobiano. Após a realização das diferentes formas de precipitação, os corantes foram mantidos no ultrafreezer vertical com temperatura de -80°C e posteriormente foram liofilizados no liofilizador (Liotop – L101).

4.9.1 Precipitação utilizando acetonitrila

O protocolo para a precipitação utilizando acetonitrila foi adaptado da metodologia realizada por Karagoz et al. (2011). Neste processo, foi adicionada acetonitrila em um volume de 50% do volume final do corante sintetizado. A solução contendo acetonitrila e corante foi mantida em temperatura ambiente por duas horas e após este período, a solução foi centrifugada à 6.000 rpm durante 10 minutos sem controle de temperatura. A acetonitrila contida no corante foi evaporada utilizando o rotaevaporador (Fisatom) com rotação de 80 rpm e imerso em banho-maria com temperatura de 40°C.

4.9.2 Precipitação utilizando acetona gelada

A metodologia utilizada para a precipitação de proteínas com acetona gelada foi adaptada da metodologia de Yadav et al. (2019). Para precipitar as proteínas com acetona gelada foi utilizado o volume de 2,5 mL de acetona gelada para cada 1 mL do corante. O corante com acetona gelada foi mantido em temperatura ambiente e após uma hora a solução foi centrifugada à 6.000 rpm durante 10 minutos sem controle de temperatura. A acetona contida no corante foi evaporada utilizando o rotaevaporador (Fisatom) com rotação de 80 rpm e imerso em banho-maria com temperatura de 40°C.

4.9.3 Precipitação por centrifugação

O protocolo utilizado para precipitar proteínas por precipitação foi adaptada da metodologia de Yadav et al. (2019). A amostra foi centrifugada à 6.000 por 15 minutos sem controle de temperatura.

4.9.4 Precipitação por acidificação do meio reacional

A metodologia utilizada para a precipitação das proteínas através da acidificação do meio reacional desenvolvida de acordo com a metodologia realizada por Muniz-mouro et al. (2017). Nesta forma de precipitação foi adicionado HCl (6 mM) ao corante sintetizado até que este chegasse ao pH 2. Após a acidificação, a solução

foi centrifugada à 4.500 rpm durante 30 minutos sem controle de temperatura. O sobrenadante foi retirado e alcalinizado com NaOH até voltar ao pH inicial (pH 5,0).

4.10 Determinação de fenólicos totais nos corantes após a precipitação

Os compostos fenólicos totais foram determinados de acordo com o protocolo adaptado de Singleton e Rossi (1965). Em tubos de ensaio, foram adicionados 8,4 mL de água deionizada, 0,5 µL da amostra na concentração de 1 mg/mL e 0,5 mL do reagente Folin-Ciocalteu (0,20 N). Após três minutos, foi adicionado 1 mL da solução de carbonato de cálcio (15%) e após a agitação, a reação foi mantida no escuro em temperatura ambiente por uma hora. Passado o tempo de reação, a absorbância foi determinada em espectrofotômetro no comprimento de onda de 765 nm. Os resultados foram expressos equivalente a mg presente no ácido gálico (mg GAE/g).

4.11 Determinação da atividade antioxidante após a precipitação

A atividade antioxidante do produto sintetizado foi determinada pela mesma metodologia (análise de captação do radical DPPH) que o teste para avaliar atividade antioxidante para os produtos líquidos. No entanto, os corantes foram dispostos na concentração de 1 mg/mL, previamente dissolvidos em água deionizada, para a realização do teste.

4.12 Determinação da atividade antimicrobiana após a precipitação

A atividade antibacteriana foi desenvolvida seguindo a metodologia da Concentração Inibitória Mínima (*MIC*), a mesma utilizada para avaliar o potencial dos corantes líquidos, e analisada no leitor de microplacas Elisa (BMG LabTech, modelo FLUOstar Omega) (WIEGAND; HILPERT; HANCOCK, 2008).

O potencial antimicrobiano dos corantes liofilizados, dissolvidos em água deionizada, foi avaliado contra cepas de bactérias Gram-positivas (*S. aureus* - ATCC 6538), na concentração final de 3,2; 1,6; 0,8; 0,4; 0,2; 0,1; 0,05; 0,03; 0,013 e 0,006 mg/mL.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Produção do extrato enzimático e análise da cinética enzimática

A produção do extrato enzimático de lacase dos fungos *Microsphaeropsis arundinis* e *Trametes villosa* foi avaliada utilizando o meio de cultivo líquido nutritivo desenvolvido por Riedi (2019). Este meio demonstrou ser eficiente para induzir a produção da lacase. Através da comparação entre a produção enzimática dos cultivos individuais e do co-cultivo, observou-se que o co-cultivo entre *Microsphaeropsis arundinis* e *Trametes villosa* apresentou maior produção enzimática no período de crescimento de sete dias, com 13.284,85 U/L de atividade enzimática (Tabela 2). A produção da lacase no co-cultivo dos fungos *M. arundinis* e *T. villosa* apresentou atividade enzimática 99,93% e 26% maior que os cultivos individuais, respectivamente. Foi observada diferença significativa ($p < 0,05$), pelo teste ANOVA, da produção enzimática em relação aos dias de cultivo.

Tabela 2 - Produção fúngica de lacases entre os tipos de cultivo (cultivo individual e co-cultivo) com sete dias de crescimento em temperatura de 28°C (n=3).

Cultivos	Média da atividade enzimática (U/L)
<i>M. arundinis</i>	9,51 ± 0,03
<i>T. villosa</i>	9.872,90 ± 51,02
<i>M. arundinis</i> + <i>T. villosa</i> (Co-cultivo)	13.284,85 ± 143,53

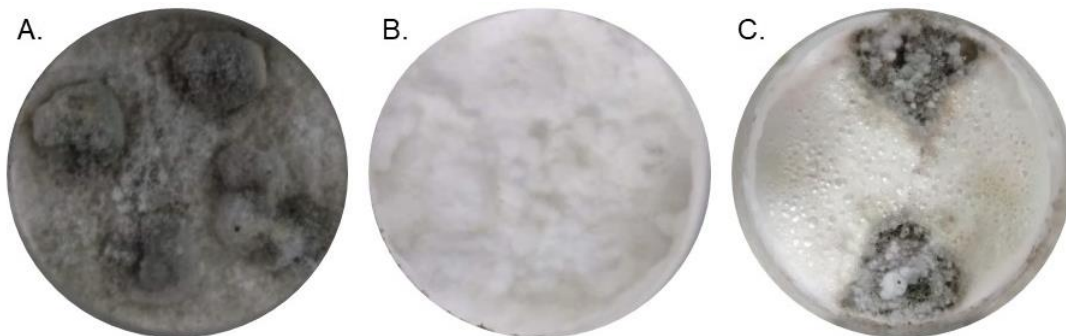
Fonte: O autor, 2020.

Segundo Hou et al. (2004) e Ijoma e Tekere (2019), as condições de cultivo podem interferir na fisiologia dos fungos e com isso, na produtividade enzimática. Desta forma, foi observado que o co-cultivo entre os fungos aumentou a atividade enzimática. No estudo realizado por Kuhar, Castiglia e Levin (2015), observou-se um novo padrão isoenzimático entre o co-cultivo entre *Ganoderma lucidum* e *Trametes versicolor* diferente das isoenzimas produzidas nos cultivos individuais.

Ao cultivar as duas espécies em conjunto foi possível observar visualmente um crescimento mais lento de *M. arundinis* em relação à *T. villosa* (Figura 11). Isso pode estar relacionado a características específicas de desenvolvimento de cada espécie no meio de cultivo utilizado ou mesmo uma competição. Segundo Kennedy (2010),

quando há competição entre fungos, pode existir diminuição da taxa de crescimento de uma espécie na presença de outra.

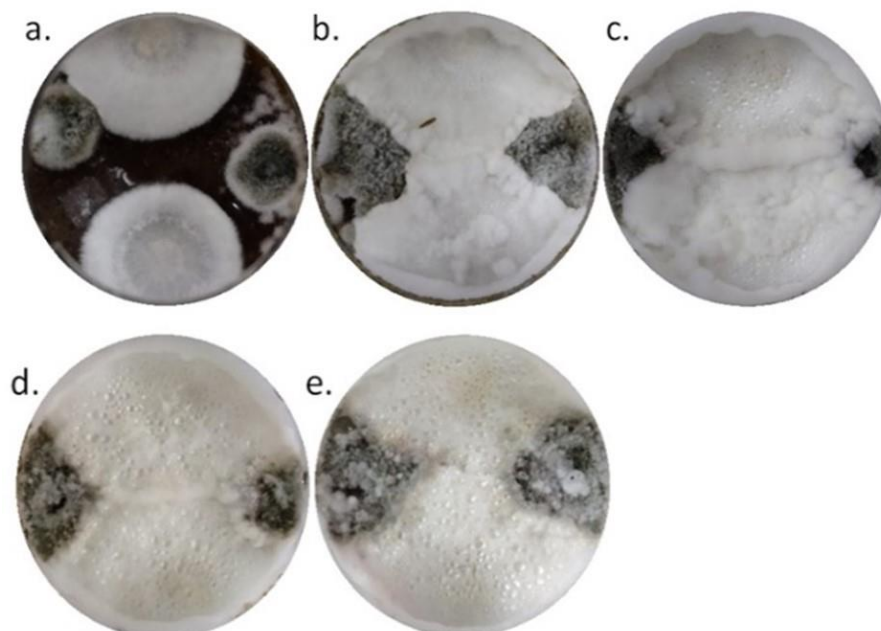
Figura 11 – (A) Fungo *Microsphaeropsis arundinis* em meio líquido nutritivo com 12 dias de cultivo a 28°C. (B) Fungo *Trametes villosa* em meio líquido nutritivo com 12 dias de cultivo a 28°C. (C) Co-cultivo do fungo *M. arundinis* e *T. villosa* e inibição do crescimento do *M. arundinis* pelo *T. villosa* em meio líquido nutritivo com 12 dias de cultivo a 28°C.



Fonte: O autor, 2020.

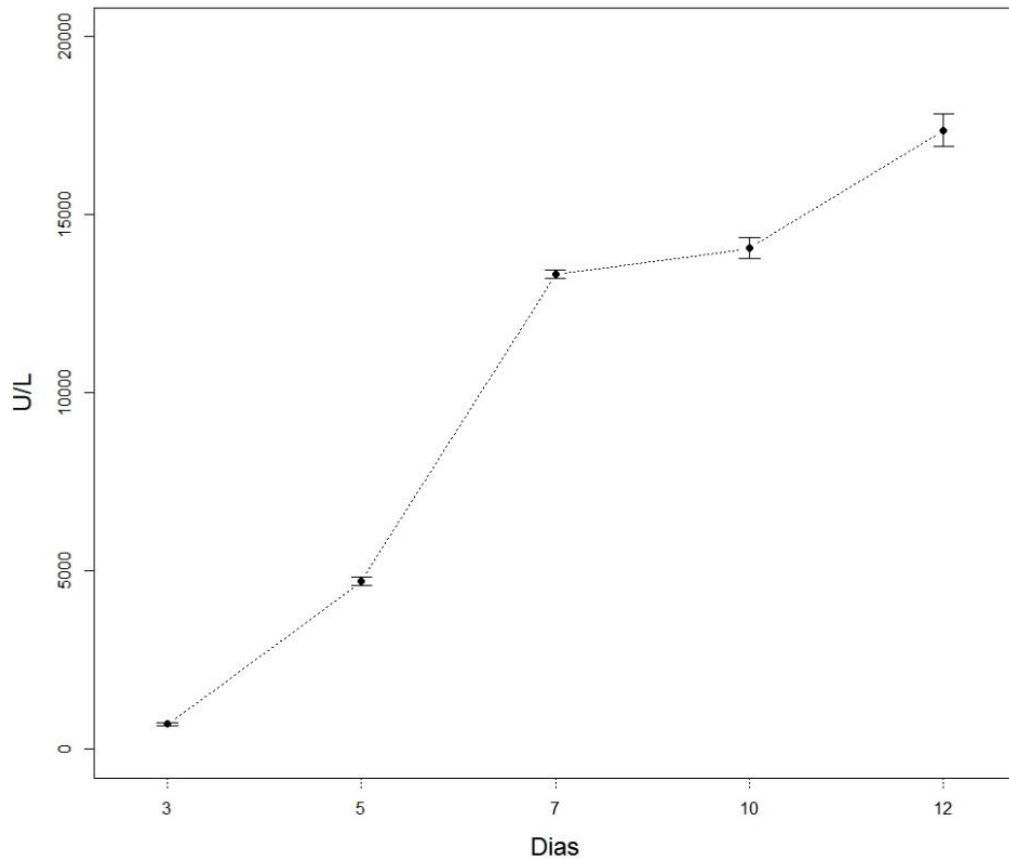
Ao avaliar a cinética de crescimento do co-cultivo (Figura 12) foi possível analisar que os dias de cultivo e a atividade enzimática apresentaram resultados diretamente proporcionais positivos, os quais apresentaram maior atividade conforme o aumento nos dias de cultivo (Figura 13).

Figura 12 - Cinética de crescimento do co-cultivo entre os fungos *Trametes villosa* e *Microsphaeropsis arundinis* em meio líquido nutritivo em 28°C. (a) 3 dias, (b) 5 dias, (c) 7 dias, (d) 10 dias e (e) 12 dias.



Fonte: O autor, 2020.

Figura 13 - Análise cinética da produção enzimática em relação aos dias de cultivo do co-cultivo entre os fungos *Trametes villosa* e *Microsphaeropsis arundinis* em meio líquido nutritivo em 28°C (n=3).



Fonte: O autor, 2020.

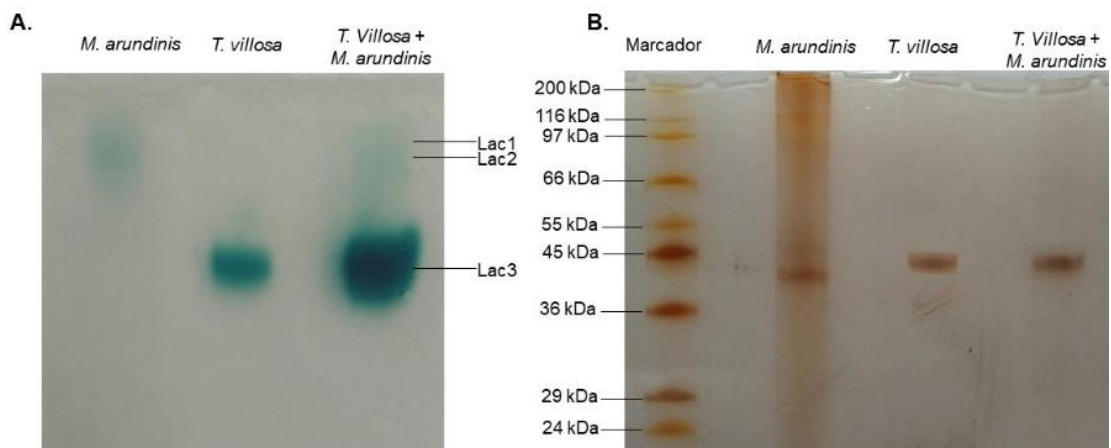
No estudo realizado por Dao et al. (2019) os fungos *Pycnoporus sanguineus* (≈ 5.000 U/L), *Inonotus pachyphloeus* (≈ 8.000 U/L) e *Junghuhnia crustácea* (≈ 6.600 U/L) apresentaram maior atividade enzimática com doze, sete e dez dias de crescimento, respectivamente. Dong et al. (2014) encontrou alta atividade de lacase fúngica produzida pelo fungo *Dichomitus squalens* com nove dias de crescimento ($\approx 6,2$ U/mg), mas a maior atividade observada foi com 12 dias de cultivo (9,42 U/mg). Passarini (2012) caracterizou a produção de lacase do fungo *M. arundinis* com 0,18 U/L. Apesar da maior atividade de lacase produzida pelo co-cultivo entre *Microsphaeropsis arundinis* e *Trametes villosa* ser detectada com 12 dias de cultivo, o sétimo dia pode ser considerado como um tempo ótimo de cultivo, devido ao interesse na redução do tempo de cultivo, pelo alto custo de produção enzimática em grande escala (LONAPPAN et al., 2017).

5.2 Caracterização enzimática da lacase no extrato bruto dos cultivos individuais e co-cultivo

A corrida de eletroforese revelou duas bandas com atividade de lacase com peso molecular de 116 kDa e 97 kDa no extrato bruto do *M. arundinis*. A atividade de lacase do *T. villosa* foi observada em uma banda com peso molecular de 45 kDa. O co-cultivo apresentou três bandas de atividade de lacase com peso molecular de 116 kDa, 97 kDa e 45 kDa (Figura 14).

Figura 14 – Gel de eletroforese do peso molecular das isoenzimas de lacase no extrato bruto do cultivo individual de *M. arundinis* e *T. villosa* e do co-cultivo dos fungos *M. arundinis* e *T. villosa*. (A)

Gel de eletroforese colorido com ABTS para observar a posição do peso da lacase; (B) Gel de eletroforese com coloração de prata para avaliar o peso molecular das enzimas presente nos cultivos.



Fonte: O autor, 2020.

No presente trabalho não foi observado novo padrão isoenzimático de lacase, pois as bandas de atividade de lacase encontradas no co-cultivo, foram as mesmas encontradas nos cultivos individuais. No entanto, no trabalho realizado por Kuhar, Castiglia e Levin (2015) foi observado um novo padrão isoenzimático no co-cultivo entre *Ganoderma lucidum* e *Trametes versicolor*, devido ao padrão isoenzimático encontrado no co-cultivo ter sido diferente do padrão observados nos cultivos individuais.

No estudo de Zhang, Ke e Chen (2020) foram encontradas três isoformas de lacase (Lac1, Lac2 e Lac3) e foi observado que a banda de Lac3 no co-cultivo foi mais intensa e maior do que a banda de Lac3 no cultivo individual do *Trametes* sp. Desta forma, observou-se que a melhora na atividade da lacase foi melhorada pela

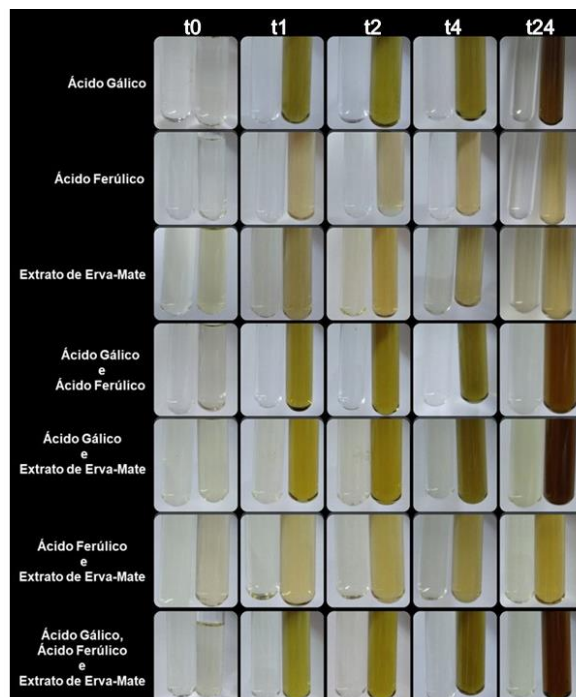
superexpressão do Lac3 entre o co-cultivo do *Sporidiobolus pararoseus* e *Trametes* sp. Foi possível observar neste trabalho, o mesmo padrão de superexpressão encontrado no trabalho de Zhang, Ke e Chen (2020). A banda de Lac3 no co-cultivo apareceu mais intensa que a banda de Lac3 no cultivo individual do *Trametes villosa*.

A provável explicação pelo aumento na produção de lacase em condições de co-cultivo, é a diminuição ou ausência de glicose no meio, a suplementação com glicerol ou a indução pelo β -caroteno (GUO et al., 2017). A competição por recurso no co-cultivo leva a inibição da amilase fúngica e a superprodução de lacase (ZHANG; KE; CHEN, 2020).

5.3 Análise da Síntese de Corantes

As reações de oxidação mediada pela lacase resultaram em duas diferentes tonalidades (amarelo e marrom) de corantes (Figura 15). Segundo Kim, Moldes e Cavaco-Paulo (2007), a polimerização de fenóis naturais pela lacase pode gerar pigmentos coloridos para tingir tecidos e aplicados na indústria de cosméticos e alimentícia.

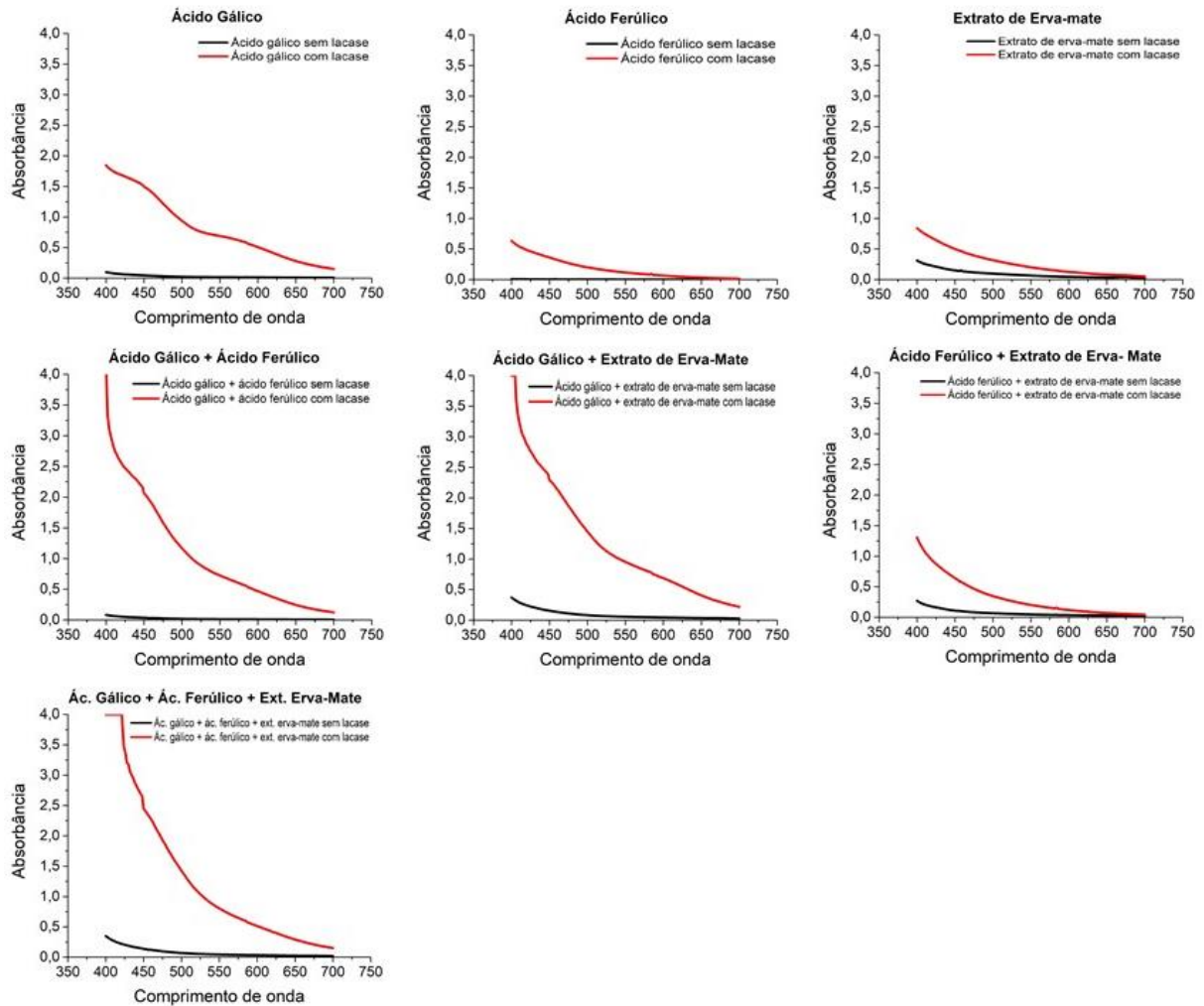
Figura 15 – Cinética dos corantes sintetizados através de reações mediadas por lacase fúngica. t0: tempo inicial da reação; t1: após uma hora de reação; t2: após duas horas de reação; t4: após quatro horas de reação; t24: após 24 horas de reação.



Fonte: O autor, 2020.

Ao analisar os corantes sintetizados no espectrofotômetro UV-visível, não foi possível observar banda formada na região visível do espectrofotômetro que pudesse indicar o comprimento de onda da cor sintetizada (Figura 16).

Figura 16 – Análise espectrofotométrica (700 a 400 nm) dos corantes naturais sintetizados após 24 horas de reação a 40°C com rotação de 120 rpm. Linha preta: reações sem lacase; linha vermelha: reações com lacase.



Fonte: O autor, 2020.

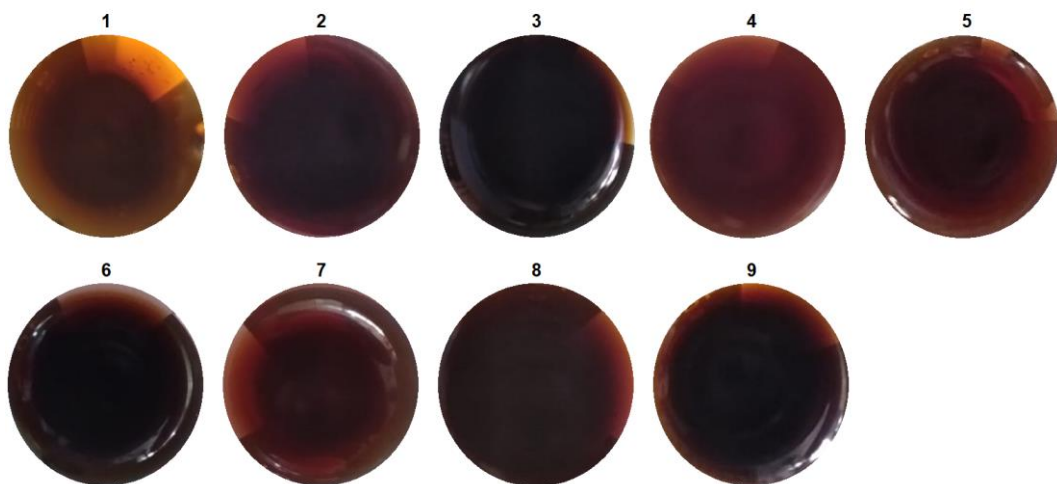
Segundo Ghaedi et al. (2013), a Lei de Lambert-Beer, a qual estabelece relação entre a absorvância e a concentração de uma solução, não se aplicou aos corantes, pois possivelmente houve interação dos componentes presentes na amostra, não apresentando uma única banda de absorção. A análise de corantes em reações de mistura é dificultada por diversas sobreposições de absorção do espectro na ordem zero (CRINI; BADOT, 2008).

5.3.1 Otimização da reação de síntese da coloração selecionada

A partir da síntese dos corantes, a coloração com tonalidade mais escura foi selecionada para o trabalho, a qual foi resultante da combinação entre o Ácido Gálico e o Extrato de Erva-Mate. Desta forma, foi realizado um planejamento na qual as concentrações para o ácido gálico foram de 1 a 5 mM, extrato de erva-mate de 0,25 a 1 mg/L e para lacase de 100 a 500 U/L para analisar as tonalidades e as propriedades antioxidantes e antimicrobiana do produto formado.

A partir da combinação das diferentes concentrações realizada no planejamento observou-se diferentes tons da cor marrom (Figura 17).

Figura 17 – Corantes naturais sintetizados através da combinação com diferentes concentrações de ácido gálico, erva-mate e lacase, após 35 horas de reação em incubadora shaker a 40°C com rotação de 120 rpm.



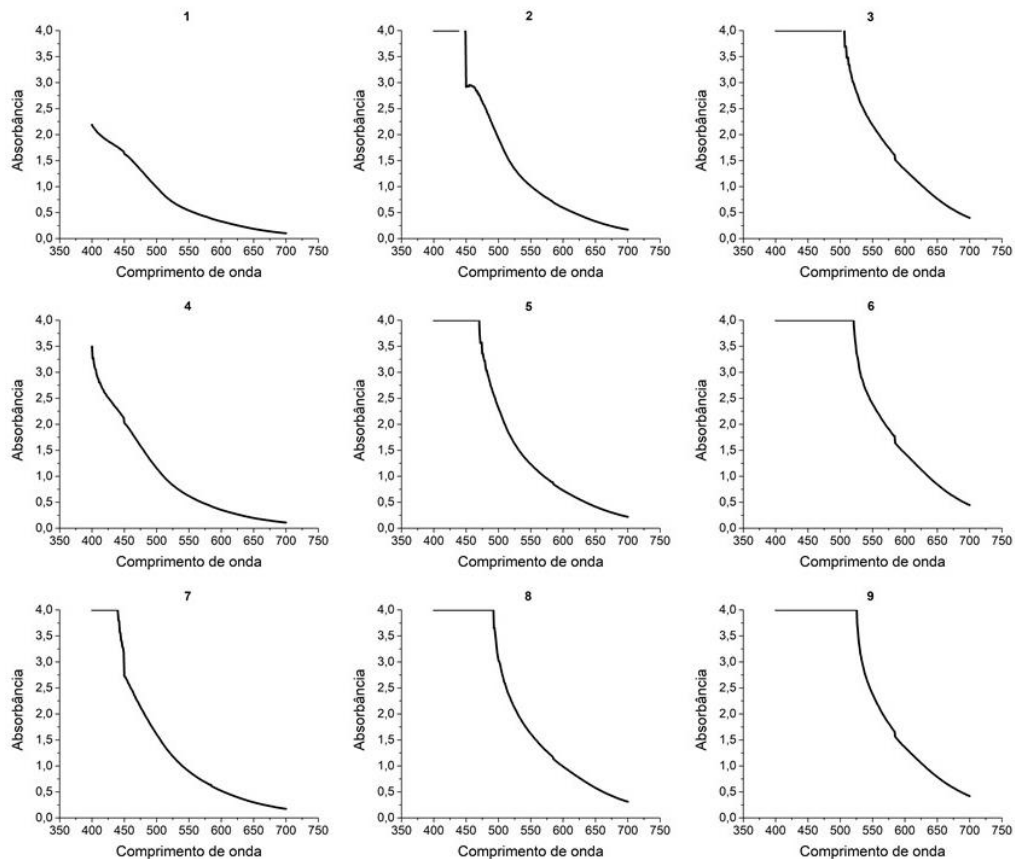
Fonte: O autor, 2020.

Estes novos corantes foram analisados no espectrofotômetro (Figura 18) e da mesma forma que os primeiros corantes sintetizados, não houve as formações de banda devido às diversas sobreposições de absorção do espectro na ordem zero (CRINI; BADOT, 2008).

As cores foram mensuradas pela análise CIELAB por colorímetro e analisada pelo método CIELHC, o que possibilitou a observação da tonalidade pelo ângulo hue (h°) e da cromaticidade (C^*) (Tabela 3). O ângulo hue (h°) indica a tonalidade dos corantes em um plano cartesiano das cores vermelho (0°), amarelo (90°), verde (180°) e azul (270°). A cromaticidade reflete saturação da cor, a qual varia de cores mais

escuras (0) a cores vivas (100) (MALEC; KOLODZIEJCZYK; GUYOT, 2014). Segundo *A guide to understanding color communication* (2007), a análise pelo método CIELHC tem maior vantagem em relação a CIELAB, por ser mais fácil de relacionar os dados com o sistema físico de coloração.

Figura 18 – Análise espectrofotométrica (700 a 400 nm) dos corantes sintetizados através do delineamento experimental após 35 horas de reação a 40°C.



Fonte: O autor, 2020.

Tabela 3 – Análise colorimétrica por CIE $L^*a^*b^*$ dos corantes sintetizados através do delineamento experimental após 35 horas de reação a 40°C.

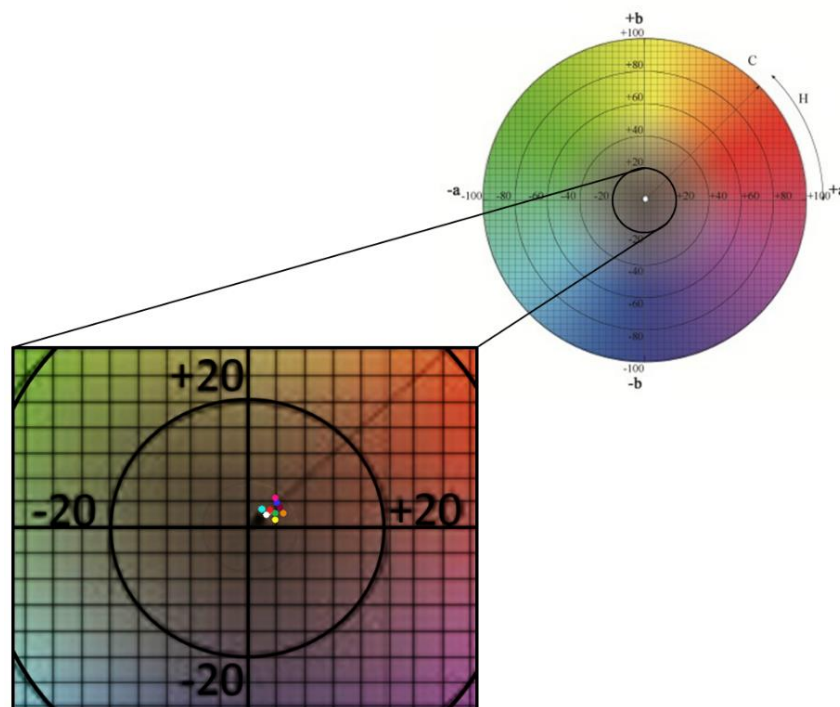
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
L*	0,21	0,39	0,14	0,30	0,46	0,35	0,49	0,30	0,30
a*	0,53	0,61	0,29	0,70	0,51	0,21	0,49	0,44	0,51
b*	0,21	0,45	0,34	0,33	0,56	0,42	0,62	0,34	0,32
h°	20,92	36,70	35,51	25,87	44,60	63,51	51,22	37,77	32,32
C*	0,57	0,76	0,52	0,78	0,78	0,48	0,84	0,56	0,61

Fonte: O autor, 2019.

L* variação entre preto (0) a branco (100); a* variação entre verde (-100) e vermelho (100); b* variação entre azul (-100) e amarelo (100); h°: ângulo hue: indica a posição da cor no gráfico polar; C* saturação das cores: escuras (0) e cores vivas (100).

Cada cor tem sua própria aparência, com base em três elementos: tonalidade (h°), cromaticidade (C^*) e a luminosidade (L^*) (Figura 19) (A GUIDE TO UNDERSTANDING COLOR COMMUNICATION, 2007).

Figura 19 – Análise colorimétrica por CIELHC dos corantes sintetizados através do delineamento experimental após 35 horas de reação à 40°C Análise CIE $L^*h^*c^*$ dos corantes. Ponto amarelo: corante 1; Ponto vermelho Bordô: corante 2; Ponto branco: corante 3; Ponto laranja: corante 4; Ponto azul escuro: corante 5; Ponto azul piscina: corante 6; Ponto rosa: corante 7; Ponto vermelho: corante 8; Ponto verde: corante 9.



Fonte: O autor, 2020.

Pelos valores encontrados para o ângulo h° através das análises de CIELAB e CIELHC, as reações de polimerização utilizando ácido gálico e extrato de erva-mate, apresentam colorações entre vermelho e alaranjado. No entanto, devido ao valor de cromaticidade ser próximo ao ponto zero do plano cartesiano, os corantes foram caracterizados com uma coloração escura, próximo ao preto (MALEC; KOLODZIEJCZYK; GUYOT, 2014). Com estes dados, utilizando extrato natural, como a erva-mate demonstrou ter um alto potencial para a síntese de novos corantes.

5.4 Determinação da atividade antioxidante

Os corantes apresentaram resultados diferentes para os dois métodos (DPPH e FRAP) utilizados para avaliar a atividade antioxidante (Tabela 4).

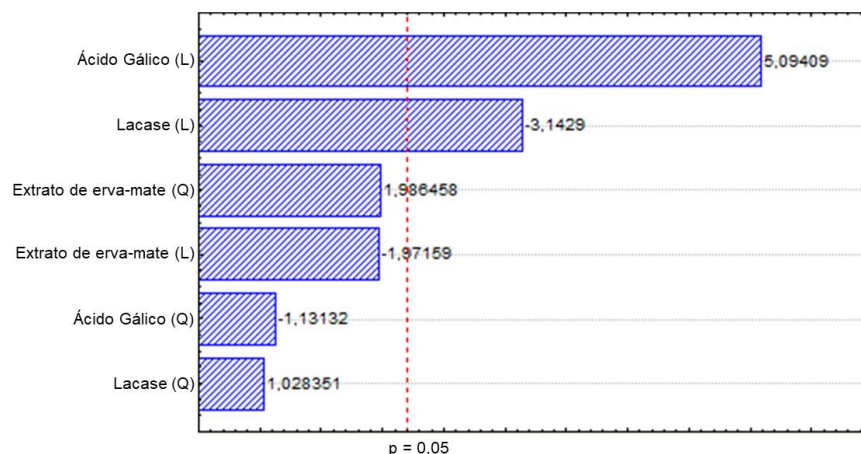
Tabela 4 – Atividade antioxidante dos corantes naturais determinada pelos métodos DPPH e FRAP.

Amostras	DPPH ($\mu\text{mol/L}$ de Trolox)	FRAP ($\mu\text{mol/L}$ de Trolox)
1	0	232,58 \pm 31,6
2	0	423,28 \pm 7,7
3	99,34 \pm 12,98	904,19 \pm 119,4
4	0	106,68 \pm 10,7
5	0	331,38 \pm 40,3
6	166,68 \pm 8,81	939,05 \pm 103,8
7	0	361,16 \pm 14,1
8	90,18 \pm 27,85	436,10 \pm 214,2
9	96,91 \pm 3,31	838,16 \pm 63,6

Fonte: O autor, 2020.

Os corantes três, seis e nove apresentaram maior potencial antioxidante. O corante 3 é composto por 5 mM de ácido gálico, 25 mg/mL extrato de erva-mate e 250 U/L lacase; o corante 6 é composto por 5 mM ácido gálico, 0,5 mg/mL extrato de erva-mate e 100 U/L lacase e o corante 9 é composto por 5 mM ácido gálico, 1 mg/mL extrato de erva-mate e 500 U/L lacase. A concentração do composto que teve maior influência no potencial antioxidante dos corantes foi o ácido gálico (Figura 20). A concentração do ácido gálico e a atividade antioxidantes nas amostras foram diretamente proporcionais nos dois métodos. Segundo Xie et al. (2014) a capacidade antioxidante das amostras adquiridas em seu estudo, tiveram seu potencial aumentado conforme o aumento na concentração do ácido gálico.

Figura 20 – Diagrama de Pareto para avaliar a influência dos compostos utilizados na síntese de corantes naturais e sua atividade antioxidante. Resíduos: 1013.379.



Fonte: O autor, 2020.

A diferença dos resultados entre os dois métodos deve-se ao mecanismo de ação de ambos os testes. No método DPPH, os antioxidantes reduzem o radical DPPH estável para formar DPPH-H, ou seja, a atividade de eliminação de antioxidantes do DPPH está relacionado com a habilidade de doação de hidrogênio (LIU et al., 2010). O método FRAP está relacionado com a capacidade do antioxidante, na presença do TPTZ, em reduzir o Fe^{3+} em Fe^{2+} , desta forma, o potencial antioxidante está relacionado com a habilidade da doação de elétrons para quebrar as reações de cadeia de radicais livres (XIE et al., 2014). Por este motivo, é necessário levar em consideração o potencial antioxidante resultante dos dois diferentes métodos.

Obter um produto com capacidade antioxidante pode ser importante devido ao interesse em diversas áreas. Podem ser utilizados na indústria alimentícia para prevenir a oxidação lipídica e a deterioração das colorações de carne suína e bovina, ajudando a preservar a carne animal (YOO et al., 2008; KIM et al., 2016). E além da indústria alimentícia, podem ser úteis na indústria de cosméticos e farmacêutica através de cremes ou medicamentos que protegem o corpo humano de radicais livres, para prevenir o envelhecimento e/ou retardar o progresso de doenças crônicas (LIU et al., 2010).

5.5 Determinação da atividade antimicrobiana

Os corantes resultantes do delineamento experimental não apresentaram potencial fungicida, pois não afetaram o crescimento da levedura *Saccharomyces cerevisiae*. No entanto, apresentaram potencial antimicrobiano bactericida, devido a redução no crescimento de bactérias Gram-negativas e Gram-positivas (Tabela 5).

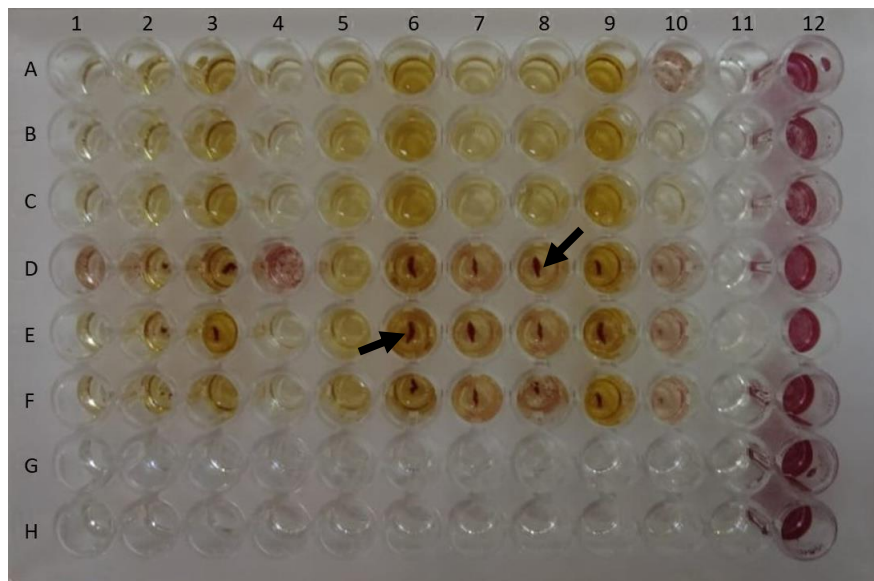
Tabela 5 – Porcentagem de redução do crescimento bacteriano em contato com os corantes sintetizados.

	Corantes								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
<i>E. coli</i> (G-)	0%	34%	0%	0%	23%	0%	15%	0%	0%
<i>S. aureus</i> (G+)	10%	25%	42%	18%	44%	10%	38%	62%	71%
<i>S. cerevisiae</i>	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%

Fonte: O autor, 2019. G-: Bactéria Gram-negativa e G+: bactéria Gram-positiva.

O corante oito e nove demonstraram ser promissores para reduzir o crescimento em bactérias Gram-positivas. O corante oito é composto por 2,5 mM de ácido gálico, 1mg/mL de extrato de erva-mate e 100 U/L de lacase e o corante nove é composto por 5 mM de ácido gálico, 1 mg/mL de extrato de erva-mate e 500 U/L de lacase. Além de reduzir o crescimento de bactérias Gram-positivas, os corantes formaram agregados bacterianos (Figura 21 e 22).

Figura 21 – Microplaca utilizada para análise da atividade antimicrobiana que demonstra a presença de um aglomerado de bactérias resultante do contato com os corantes. Bactérias estão coradas em rosa. Poço 1: corante 1; poço 2: corante 2; poço 3: corante 3; poço 4: corante 4; poço 5: corante 5; poço 6: corante 6; poço 7: corante 7; poço 8 : corante 8; poço 9: corante 9; poço 10: duplicata do corante 1; poço 11: controle de esterilidade; poço 12: controle de crescimento. Colunas de A a C são os brancos dos corantes; colunas de D a F são resultados do teste; coluna G e H são controle de crescimento em antibiótico.



Fonte: O autor, 2020.

Segundo Eom et al. (2014) a membrana celular é um componente estrutural das bactérias onde os antibióticos agem. Quando algum composto danifica a membrana celular bacteriana e faz com que o conteúdo celular saia da célula, ocasiona em morte celular (LI et al., 2019). No estudo realizado por Li et al. (2019), foi avaliado o potencial antimicrobiano da reação entre quitosana e ácido gálico, mediada pela lacase, e foi possível observar mudanças morfológicas na membrana de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. Desta forma, observou-se que o produto resultante da catálise do composto fenólico do ácido gálico mediado pela lacase é um

agente bacteriostático que pode ser utilizado para inibir o crescimento de alguns patógenos comuns.

Figura 22 – Teste de Concentração Inibitória Mínima (*MIC*) em maior volume para demonstrar o aglomerado de bactérias resultante do contato entre os corantes naturais e *S. aureus*. (A) Crescimento aglomerado de *S. aureus* em contato com o corante natural; (B) Controle de crescimento de *S. aureus* em caldo Mueller-Hinton.



Fonte: O autor, 2020.

Segundo Trunk, Khalil e Leo (2018), a autoagregação é observada macroscopicamente pela formação de aglomerados bacterianos que se depositam no fundo dos tubos de cultivo. A agregação de células bacterianas pode ser resposta ao estresse causado pela exposição bacteriana ao composto antimicrobiano, que pode causar lise celular ou alteração na membrana celular (TYAGI; MALIK, 2012; ZHANG et al., 2016).

5.6 Seleção dos corantes naturais com melhor potencial antioxidante e antimicrobiano.

Com o teste ANOVA foi identificado qual a melhor concentração dos compostos para obter um melhor potencial antioxidante e antimicrobiano (Tabela 6).

Tabela 6 – Concentrações de ácido gálico, extrato de erva-mate e lacase para a síntese de corantes naturais definidas pelo teste ANOVA como melhor potencial antioxidante e antimicrobiano (n=3).

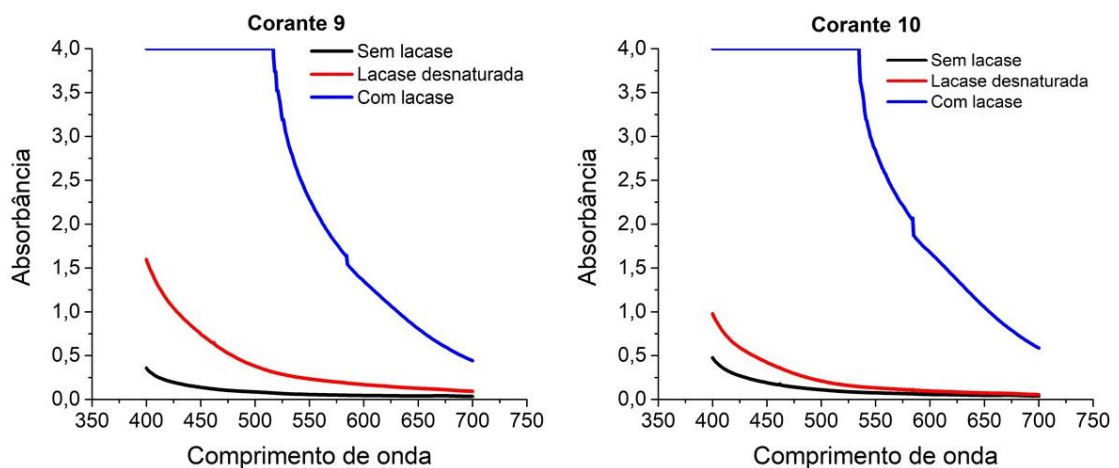
Amostras	Ácido gálico (mM)	Extrato de erva-mate (mg/L)	Lacase (U/L)
9	5	1	500
10	5	1	100

Fonte: O autor, 2020.

A análise espectrofotométrica para estes corantes não apresentou nenhuma formação de banda que indicasse o ponto máximo de absorbância que representasse a coloração formada (Figura 23). No entanto, foi possível observar que houve diminuição significativa da intensidade da absorbância das amostras tratadas com lacase. Isso pode ser devido aos processos oxidativos e/ou de oligomerização realizados pela lacase com os compostos fenólicos presentes nas amostras (SONG et al., 2018).

Em relação aos parâmetros (a^* , b^* e L^*) analisados no colorímetro foi possível observar que as reações controles possuem absorção fraca na luz visível devido ao baixo valor de a^* (Tabela 7).

Figura 23 – Análise espectrofotométrica (700 a 400 nm) dos corantes sintetizados através do resultado do teste ANOVA após 35 horas de reação a 40°C.



Fonte: O autor, 2020.

Segundo Jeon et al. (2010), os valores de cor (a^* , b^* e L^*) dos compostos fenólicos naturais em soluções aquosas, são muito semelhantes ao da água, por este motivo possuem baixa absorção na luz visível. Em contrapartida, quando a lacase foi adicionada na solução de ácido gálico e erva-mate foi possível observar coloração na

reação, devido a reação de polimerização do ácido gálico e erva-mate mediada pela lacase (Figura 24). A polimerização de polifenóis naturais catalisada pela lacase pode gerar produtos coloridos, que poderão ser úteis na indústria têxtil e de cosmético (KIM; MOLDES; CAVACO-PAULO, 2007).

Tabela 7 – Análise colorimétrica por CIE L*a*b* dos corantes sintetizados através do resultado do teste ANOVA após 35 horas de reação a 40°C (n=3).

	L*	a*	b*
9. Controle	41,01 ± 1,80	2,54 ± 1,09	31,43 ± 2,89
9. Lacase Desnaturada	10,35 ± 0,23	14,58 ± 1,87	22,18 ± 7,93
9. Com lacase	0,09 ± 0	0,02 ± 0,01	0 ± 0
10. Controle	42,48 ± 0,87	1,64 ± 0,48	30,46 ± 1,50
10. Lacase Desnaturada	26,07 ± 2,95	10,12 ± 1,71	39,91 ± 2,90
10. Com lacase	0,09 ± 0	0 ± 0	0 ± 0

Fonte: O autor, 2020. L* variação entre preto (0) a branco (100); a* variação entre verde (-100) e vermelho (100); b* variação entre azul (-100) e amarelo (100).

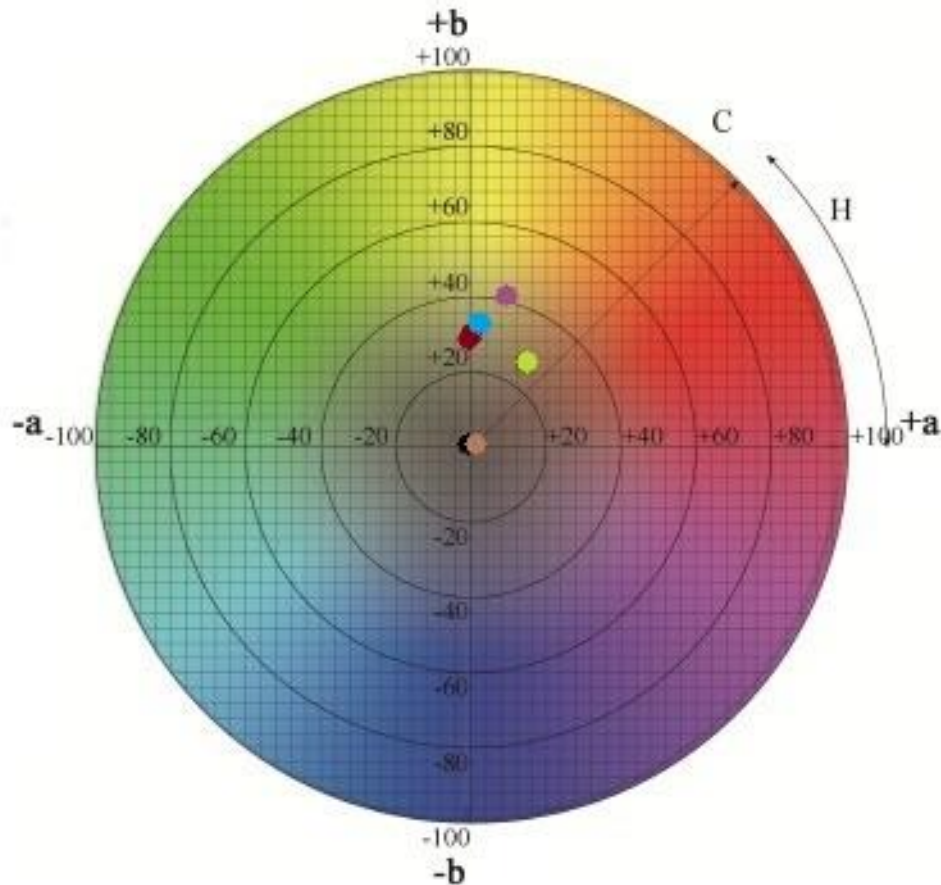
Figura 24 – Corantes naturais sintetizados através do resultado do teste ANOVA para as combinações de ácido gálico, erva-mate e lacase com melhor potencial antioxidante e antimicrobiano, após 35 horas de reação em incubadora shaker a 40°C com rotação de 120 rpm.



Fonte: O autor, 2020.

Os valores de L* (luminosidade) variaram entre 0 (preto) a 100 (branco), mas os valores de a* e b* para as reações com lacase foram iguais a 0 e/ou valores positivos. Através dos valores encontrados para o ângulo h° através das análises de CIELAB e CIELHC, as amostras que reagiram com lacase apresentaram colorações marrom escura, próximo ao preto (Figura 25). Esta característica se dá pelo fato do valor da cromaticidade (C*) ser dado como valores próximos ao ponto zero do plano do plano cartesiano (MALEC; KOLODZIEJCZYK; GUYOT, 2014).

Figura 25 - Análise colorimétrica por CIELHC dos corantes sintetizados através do resultado do teste ANOVA após 35 horas de reação à 40°C Análise CIE $L^*h^*c^*$ dos corantes. Ponto azul: corante 9 controle; ponto amarelo: corante 9 com lacase desnaturada; ponto preto: corante 9 com lacase ativa; ponto roxo: corante 10 controle; ponto vermelho: corante 10 com lacase desnaturada; ponto bege: corante 10 com lacase ativa.

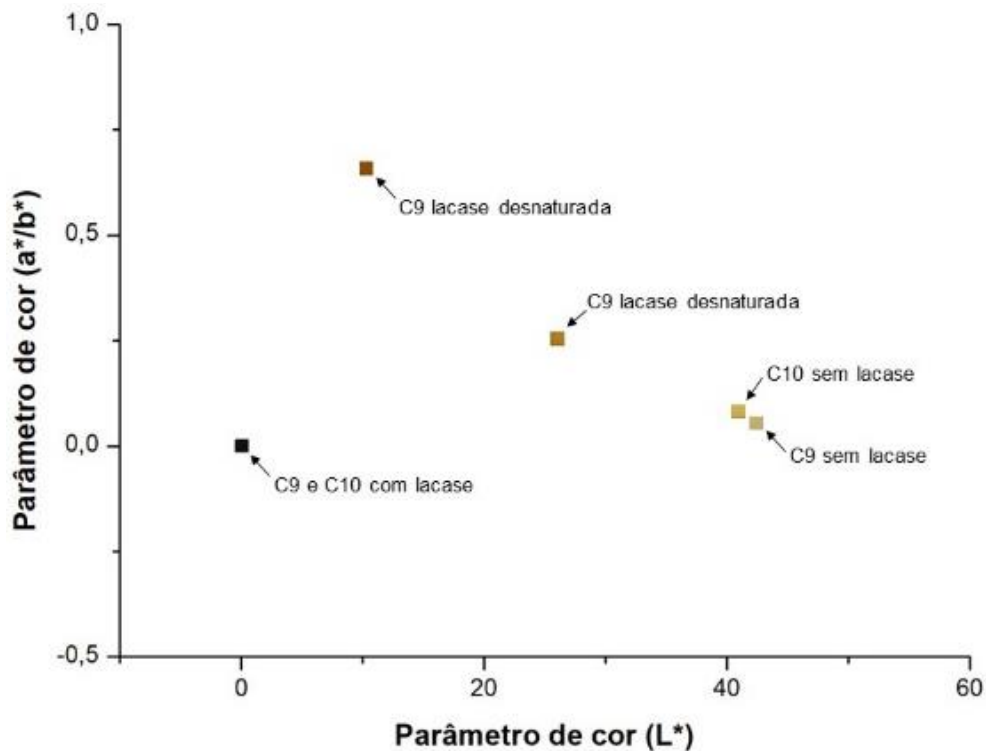


Fonte: O autor, 2020.

Na Figura 26 pode-se avaliar a diversidade de cores sintetizadas, quando comparadas com as amostras controles (sem lacase), através da relação dos valores de L^* em relação aos valores de a^*/b^* .

Segundo (JEON et al., 2010), as cores visíveis geradas através de reações de oxidação utilizando ácido gálico, podem gerar pouca diversidade de cores. A polimerização de polifenóis pode gerar compostos coloridos para tingir tecidos de linho e celulose (KIM; MOLDES; CAVACO-PAULO, 2007). No entanto, a diversidade de cores é limitada para aplicação na indústria de cosméticos e alimentícias (JEON et al., 2010).

Figura 26 – Distribuição dos valores de cores obtidas das reações de coloração catalisadas pela enzima lacase. L^* representa a luminosidade com valores de 0 (preto) a 100 (branco) e os valores de a^*/b^* indicam os valores de proporção do verde-vermelho ao azul-amarelo. C9: corante 9; C10: corante 10.



Fonte: O autor, 2020.

As colorações sintetizadas no trabalho, obtiveram colorações amarronzadas com tonalidade escura próximo ao preto. O interesse pelo tingimento de cabelos grisalhos, para fins cosméticos, tem aumentado devido à semelhança do tingimento com cabelos com colorações naturais (JEON et al., 2010). Como a maioria dos precursores para atingir um corante com coloração escura são tóxicas, podendo causar alergia e ser carcinogênico, como o p-fenilenodiamina (HUANG et al., 2007), a utilização de ácido gálico com extrato de erva-mate pode ser uma alternativa para o tingimento de cabelos, devido a sua naturalidade.

5.7 Separação das proteínas contidas nas reações de oxidação e sua influência nos fenólicos totais, potencial antioxidante e antimicrobiano

Todas as diferentes metodologias utilizadas para a precipitação de proteínas, para realizar a análise cromatográfica posteriormente, foram eficientes, apresentando mais de 99% de redução de proteínas (Tabela 8).

Tabela 8 – Análise da porcentagem de redução de proteínas totais contidas nos corantes, de acordo com as diferentes formas de precipitação das proteínas.

	% de redução de proteínas totais			
	Acetonitrila	Acetona	Centrífuga	HCl
C9 sem lacase	99,96	99,94	100	99,98
C9 lac. desnaturada	99,91	99,94	99,98	99,98
C9 com lacase	99,86	99,91	99,97	99,97
C10 sem lacase	99,96	99,97	100	99,99
C10 lac. desnaturada	99,96	99,96	100	99,98
C10 com lacase	99,92	99,96	99,99	99,94

Fonte: O autor, 2020.

Após a separação das proteínas presentes nas reações dos compostos fenólicos com lacase, as soluções perderam a concentração de fenólicos totais (Tabela 9).

Tabela 9 – Teste de fenólicos totais contidos nos corantes naturais.

	Fenólicos totais (mg GAE/L)			
	Acetonitrila	Acetona	Centrífuga	HCl
C9 sem lacase	92,08 ± 20,20	108,25 ± 2,93	103,09 ± 10,37	131,68 ± 5,53
C9 lac. desnaturada	169,05 ± 44,14	106,23 ± 26,74	125,55 ± 36,94	69,38 ± 8,46
C9 com lacase	0	0	0	0
C10 sem lacase	13,49 ± 3,61	31,17 ± 5,19	97,26 ± 3,82	37,43 ± 6,12
C10 lac. desnaturada	43,44 ± 9,24	37,70 ± 14,67	39,94 ± 8,13	78,91 ± 5,08
C10 com lacase	0	0	0	0

Fonte: O autor, 2020.

Da mesma maneira que a composição dos fenólicos totais foi reduzida, a atividade antioxidante foi perdida após o processo de precipitação das proteínas (Tabela 10 e 11).

Segundo Xie et al. (2014) as reações mediadas pelas lacase, dependem da oxidação de grupos hidroxilas, e desta forma, podem diminuir a atividade antioxidante presente nos compostos fenólicos. Desta forma, observou-se que a precipitação das proteínas foi a responsável pela perda total do potencial antioxidante presente nos corantes.

Tabela 10 – Atividade antioxidante dos corantes naturais determinada pelo método FRAP.

	FRAP $\mu\text{mol (TE/g)}$			
	Acetonitrila	Acetona	Centrífuga	HCl
C9 sem lacase	92,08 \pm 20,20	108,25 \pm 2,93	103,09 \pm 10,37	131,68 \pm 5,53
C9 lac. desnaturada	169,05 \pm 44,14	106,23 \pm 26,74	125,55 \pm 36,94	69,38 \pm 8,46
C9 com lacase	27,27 \pm 1,14	0	0	0
C10 sem lacase	13,49 \pm 3,61	31,17 \pm 5,19	97,26 \pm 3,82	37,43 \pm 6,12
C10 lac. desnaturada	43,44 \pm 9,24	37,70 \pm 14,67	39,94 \pm 8,13	78,91 \pm 5,08
C10 com lacase	0	0	0	0

Fonte: O autor, 2020.

Tabela 11 – Atividade antioxidante dos corantes naturais determinada pelo método DPPH.

	DPPH $\mu\text{mol (TE/g)}$			
	Acetonitrila	Acetona	Centrífuga	HCl
C9 sem lacase	32,38 \pm 3,67	25,58 \pm 1,58	40,36 \pm 4,14	39,60 \pm 1,50
C9 lac. desnaturada	36,74 \pm 1,54	24,06 \pm 2,86	44,91 \pm 13,04	32,26 \pm 6,68
C9 com lacase	0	0	0	0
C10 sem lacase	30,22 \pm 2,91	18,27 \pm 5,96	4,23 \pm 0,86	11,55 \pm 2,10
C10 lac. desnaturada	32,05 \pm 6,48	15,34 \pm 2,09	12,14 \pm 2,14	6,25 \pm 2,03
C10 com lacase	0	0	0	0

Fonte: O autor, 2020.

As formas de precipitação influenciaram na atividade antimicrobiana dos corantes contra *S. aureus*. A precipitação, com acetonitrila, acetona e centrifugação, fez com que o potencial antimicrobiano analisado antes do processo de precipitação se perdesse. Este fato é importante para ser utilizado na indústria têxtil, pois se o produto ou seu resíduo forem lançados no meio ambiente, evita-se a seleção de microrganismos resistentes.

Em contrapartida, a precipitação das proteínas realizada com HCl manteve o potencial antimicrobiano de aglomeração das bactérias *S. aureus* quando dispostas em contato com 0,10 mg/mL do corante sintetizado.

Muitos coagulantes e floculantes são utilizados no processo convencional do tratamento de água, para remover a turbidez e bactérias, através da aglomeração (RAMAVANDI, 2014). Os coagulantes (sais de alumínio e polímeros orgânicos sintéticos), frequentemente utilizados são caros e em alguns lugares precisam ser

importados. Para tornar o processo de coagulação e floculação mais atrativos, deve-se ter um produto coagulante com baixo custo e alto poder de coagulação.

6 Conclusões

Com os resultados do presente trabalho foi possível explicar o potencial do uso de lacases na produção de corantes naturais para uso industrial, podendo trazer benefícios econômico e ambiental. Esses benefícios estão relacionados à utilização de resíduos agroindustriais para obter o extrato enzimático, e o ambiental está relacionado com o uso menor de produtos químicos, os quais podem ser tóxicos para a saúde humana e para o meio ambiente. A aplicação de compostos fenólicos naturais na indústria têxtil e de cosmético é considerada ecológica e menos tóxica, quando comparada com os métodos atuais de tingimento à base de p- fenilenodiaminas.

As reações utilizando compostos fenólicos (ácido gálico e ácido ferúlico), extrato de erva-mate e lacases fúngicas, formam corantes alaranjando e marrom que poderão ser utilizados nas indústrias alimentícias, de cosmético e têxtil.

A competição por nutrientes no co-cultivo entre os fungos *Microsphaeropsis arundinis* e *Trametes villosa* induziu a produção de lacase em relação ao cultivo individual de ambos os fungos. Além da forma de cultivo que apresentou melhor atividade enzimática, a avaliação da cinética enzimática demonstra que o tempo ideal de cultivo buscando custo-benefício, é com sete dias de cultivo, pois o ideal é obter uma grande produção enzimática em menor tempo em busca de reduzir a energia consumida para cultivos em grande escala.

Três isoformas de lacase apareceram no co-cultivo, sendo assim, o conjunto das isoenzimas de lacase do *M. arundinis* e *Trametes villosa* contribuíram para o aumento da atividade de lacases nos ensaios enzimáticos das amostras de co-cultivo.

Os produtos obtidos das reações enzimáticas de oxidação dos compostos fenólicos apresentaram atividade antioxidante menor em relação aos controles. Em relação ao potencial antimicrobiano foi concluído que há propriedades antimicrobianas, com capacidade bacteriostática contra *S. aureus* dos corantes naturais sintetizados, devido a capacidade dos corantes em realizarem a aglomeração bacteriana.

7 Sugestão para trabalhos futuros

Avaliar a formação de novos corantes naturais utilizando diferentes compostos fenólicos, para observar a variedade de cores que poderão ser formadas. Determinar a capacidade de tingimento dos corantes obtidos em cabelos naturais e em tecidos de algodão, testando a resistência e a durabilidade. Além da capacidade de tingimento, seria necessário avaliar a toxicidade dos corantes naturais em células humanas e no meio ambiente, e com isso, avaliar o potencial de biodegradação do corante obtido.

REFERÊNCIAS

A Guide to Understanding Color Communication. **X.rite Pantone**, p. 1–24, 2007.

ADELAKUN, O. E. et al. Laccase-catalyzed dimerization of ferulic acid amplifies antioxidant activity. “**Journal of Molecular Catalysis. B, Enzymatic**”, v. 74, n. 1–2, p. 29–35, 2012a.

ADELAKUN, O. E. et al. Enzymatic modification of 2, 6-dimethoxyphenol for the synthesis of dimers with high antioxidant capacity. **Process Biochemistry**, v. 47, n. 12, p. 1926–1932, 2012b.

Agencia Legislativa. **El INYM creó una base de datos de Yerba Mate y salud inédita y de amplia funcionalidad**, 2019.

ALDULAIMI, O. A. General Overview of Phenolics from Plant to Laboratory, Good Antibacterials or Not. **Pharmacognosy**, v. 1, n. 2, p. 8–15, 2017.

ALI, H. Biodegradation of Synthetic Dyes — A Review. **Water Air Soil Pollut**, v.213, p. 251–273, 2010.

ALONSO, C. et al. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics Antioxidant cosmeto-textiles : Skin assessment. **EUROPEAN JOURNAL OF PHARMACEUTICS AND BIOPHARMACEUTICS**, p. 6–13, 2013.

ALVAREZ, L. V. H. et al. Monitoring of the phenolic compounds and in vitro antioxidant activity of apple beverages according to geographical origin and their type: A chemometric study. **LWT - Food Science and Technology**, v. 84, p. 385–393, 2017.

ANDERSSON, D. I.; HUGHES, D. Persistence of antibiotic resistance in bacterial populations. **FEMS Microbiology Reviews** v. 35, p. 901–911, 2011.

AVILA, L. A. **Diversidade e potencial biotecnológico de *Pseudomonas* spp. de sedimentos de manguezais**. Tese de doutorado - Instituto Butantã, São Paulo, 2012.

AYDOGDU, A. et al. Food Hydrocolloids Enhancing oxidative stability of walnuts by using gallic acid loaded lentil flour based electrospun nanofibers as active packaging

material. **Food Hydrocolloids**, v. 95, n. April, p. 245–255, 2019.

AYTAC, Z. et al. Encapsulation of gallic acid / cyclodextrin inclusion complex in electrospun polylactic acid nano fibers : Release behavior and antioxidant activity of gallic acid. **Materials Science & Engineering C**, v. 63, p. 231–239, 2016.

BADNJEVIC, A.; SKRBIC, R.; POKVIC, L. G. **IFMBE Proceedings**. v. 73, 2019.

BAKER, W. L. et al. Laccase catalyzes formation of an indamine dye between 3-methyl- 2-benzothiazolinone hydrazone and 3- dimethylaminobenzoic acid. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 18, n. 95, p. 90–94, 1996.

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

BARON, N. C. **Identificação e caracterização de fungos melanizados com potencial de degradação de tolueno**. Dissertação de mestrado - Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2014.

BASTOS, D. H. M. et al. Yerba maté: Pharmacological Properties, Research and Biotechnology. **Medicinal and Aromatic Plant Science and Biotechnology**, 2007.

BENZIE, I. F. F.; STRAIN, J. J. The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of “Antioxidant Power”: The FRAP Assay. **Measurement of Reducing Ability of Plasma**, v. 76, p. 70–76, 1996.

BERNARDES, M. T. C. P. **Fungos endófitos do cacau: seleção e avaliação da atividade antimicrobiana, antioxidante e antiproliferativa do extrato da fermentação de *Microspheeropsis* sp.** Dissertação de mestrado - Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, 2010.

BHATTACHARYA, A.; SOOD, P.; CITOVSKY, V. The roles of plant phenolics in defence and communication during Agrobacterium and Rhizobium infection. **Molecular Plant Pathology**, v. 11, n. 5, p. 705–719, 2010.

BLANCO, C. D. et al. Dyeing properties, synthesis, isolation and characterization of an in situ generated phenolic pigment, covalently bound to cotton. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 44, p. 380–385, 2009.

BOECKX, T. et al. Polyphenol oxidase in leaves; is there any significance to the chloroplastic localization?. **Journal of Experimental Botany Advance**, 2015.

BORGES, A. et al. Antibacterial Activity and Mode of Action of Ferulic and Gallic Acids Against Pathogenic Bacteria. **Microbial Drug Resistance**, n. 0, 2013.

BOTERO, W. B. et al. Aromatic Polyketides and Macrolides from *Microsphaeropsis arundinis*. **J. Braz. Chemical Society**, v. 31, n. 2, p. 364–369, 2020.

BOZIC, M.; GORGIEVA, S.; KOKOL, V. Laccase-mediated functionalization of chitosan by caffeic and gallic acids for modulating antioxidant and antimicrobial properties. **Carbohydrate Polymers**, v. 87, p. 2388–2398, 2012.

BRITO, F. C. DE; GOSMANN, G.; OLIVEIRA, G. T. Extracts of the unripe fruit of *Ilex paraguariensis* as a potential chemical control against the golden apple snail *Pomacea canaliculata*. **Natural Product Research**, v. 6419, p. 1–4, 2018.

BRUMBLE, M. H. J. K. L. *Microsphaeropsis arundinis*: Case report of cutaneous infection. p. 2415, 2009.

BRUYNEEL, F. et al. Laccase-mediated synthesis of novel substituted phenoxazine chromophores featuring tuneable water solubility. **Chemistry - A European Journal**, v. 15, n. 33, p. 8283–8295, 2009.

CHERKASHIN, E. A. et al. Comparative analysis of gene sequences of three high-redox-potential laccases from Basidiomycetes. **Biochemistry, Biophysics and Molecular Biology**, v. 417, n. 5, p. 348–351, 2007.

CHOI, H. et al. A Case of Subcutaneous and Intranasal Phaeohyphomycosis Caused by *Microsphaeropsis arundinis* in an Immunocompromised Patient Misdiagnosed with Mucormycosis. **CASE REPORT**, v. 31, n. 5, p. 571–575, 2019.

CRAWFORD, S. J. et al. *Microsphaeropsis arundinis* skin and soft tissue infection in renal transplant recipients: Three case reports and a review of the literature. **Transplant Infectious Disease**, v. 17, n. 6, p. 915–920, 2015.

CRINI, Ñ.; BADOT, P. Application of chitosan, a natural aminopolysaccharide, for dye removal from aqueous solutions by adsorption processes using batch studies: A review of recent literature. **Progress in Polymer Science**, v. 33, p. 399–447, 2008.

DAO, A. T. N. et al. Screening white-rot fungi for bioremediation potential of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. **Industrial Crops & Products**, v. 128, p. 153–161, 2019.

DONG, Y.-C. et al. Biodegradation of chestnut shell and lignin-modifying enzymes production by the white-rot fungi *Dichomitus squalens*, *Phlebia radiata*. **Bioprocess Biosyst Eng**, p. 755–764, 2014.

DRAGAN, M. et al. Evaluation of anti-inflammatory potential of some new ferullic acid derivatives. **Farmacía**, v. 64, p. 3–6, 2016.

EOM, S. et al. The mechanism of antibacterial activity of phlorofuocufuroeckol-A against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Applied Microbial and Cell Physiology**, p. 9795–9804, 2014.

FERREIRA, D. S. S. et al. Draft genome sequence of *Trametes villosa* (Sw.) Kreisel CCMB561, a tropical white-rot Basidiomycota from the semiarid region of Brazil. **Data in Brief**, v. 18, p. 1581–1587, 2018.

GAMBERO, A.; RIBEIRO, M. L. The Positive Effects of Yerba Maté (*Ilex paraguariensis*) in Obesity. **Nutrients** n. February, 2015.

GHAEDI, M. et al. Journal of Industrial and Engineering Chemistry *Saccharomyces cerevisiae* for the biosorption of basic dyes from binary component systems and the high order derivative spectrophotometric method for simultaneous analysis of Brilliant green and Methylene blue. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v. 19, n. 1, p. 227–233, 2013.

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

GIMENES, L. J. **Biodegradação de pentaclorofenol por *Trametes villosa* (Sw.) Kreisel: análises bioquímicas e moleculares**. Tese de doutorado - Instituto de Botânica da Secretaria do meio Ambiente, São Paulo, 2011.

GÓMEZ-JUARISTI, M. et al. Absorption and metabolism of yerba mate phenolic compounds in humans. **Food Chemistry**, 2017.

GOTTLIEB, A. et al. The toxicity of textile reactive azo dyes after hydrolysis and decolourisation. **Journal of Biotechnology**, v. 101, n. 1, p. 49–56, 2003.

GUO, C. et al. β -Carotene from Yeasts Enhances Laccase Production of *Pleurotus eryngii* var. *ferulae*. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. June, p. 1–8, 2017.

HAMINIUK, C. W. I. et al. Chemical, antioxidant and antibacterial study of Brazilian fruits. **International Journal of Food Science and Technology**, p. 1529–1537, 2011.

HASSAAN, M. A.; NEMR, A. EL. Health and Environmental Impacts of Dyes: Mini Review. **American Journal of Environmental Science and Engineering**, v. 1, n. 3, p. 64–67, 2017a.

HASSAAN, M. A.; NEMR, A. EL. Advanced Oxidation Processes for Textile Wastewater Treatment Advanced Oxidation Processes for Textile Wastewater Treatment. **International Journal of Photochemistry and Photobiology**, 2017b.

HEMAISWARYA, S.; KUMAR, A.; DOBLE, M. Synergism between natural products and antibiotics against infectious diseases. **Phytomedicine**, v. 15, p. 639–652, 2008.

HERNÁNDEZ-LUNA, C. E.; GUTIÉRREZ-SOTO, G.; SALCEDO-MARTÍNEZ, S. M. Screening for decolorizing basidiomycetes in Mexico: Screening and selection of ligninolytic basidiomycetes with decolorizing ability in Northeast Mexico. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 24, n. 4, p. 465–473, 2008.

HOEGGER, P. J. et al. Phylogenetic comparison and classification of laccase and related multicopper oxidase protein sequences. **FEBS Journal**, v. 273, p. 2308–2326, 2006.

HOU, H. et al. Enhancement of laccase production by *Pleurotus ostreatus* and its use for the decolorization of anthraquinone dye. **Process Biochemistry**, v. 39, p. 1415–1419, 2004.

HUANG, Y. C. et al. p-Phenylenediamine induced DNA damage in SV-40 immortalized human uroepithelial cells and expression of mutant p53 and COX-2 proteins. **Toxicology Letters**, v. 170, n. 2, p. 116–123, 2007.

IJOMA, G. N.; TEKERE, R. S. M. The potential of fungal co - cultures as biological inducers for increased ligninolytic enzymes on agricultural residues. **International Journal of Environmental Science and Technology**, v. 16, n. 1, p. 305–324, 2019.

JAYAPRAKASHA, G. K.; SELVI, T.; SAKARIAH, K. K. Antibacterial and antioxidant

activities of grape (*Vitis vinifera*) seed extracts. **Food Research International**, 2003.

JEON, J. R. et al. Laccase-catalyzed polymeric dye synthesis from plant-derived phenols for potential application in hair dyeing: Enzymatic colorations driven by homo- or hetero-polymer synthesis. **Microbial Biotechnology**, v. 3, n. 3, p. 324–335, 2010.

JEON, J. R. et al. Laccase-catalyzed oxidations of naturally occurring phenols: From in vivo biosynthetic pathways to green synthetic applications. **Microbial Biotechnology**, v. 5, n. 3, p. 318–332, 2012.

JUNG, H.; XU, F.; LI, K. Purification and characterization of laccase from wood-degrading fungus *Trichophyton rubrum* LKY-7. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 30, n. 2, p. 161–168, 2002.

JUNIOR, E. L. C.; MORAND, C. Interest of mate (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil.) as a new natural functional food to preserve human cardiovascular health – A review. **Journal of Functional Foods**, v. 21, p. 440–454, 2016.

KARAGOZ, B. et al. Bioresource Technology Amine functional monodisperse microbeads via precipitation polymerization of N -vinyl formamide: Immobilized laccase for benzidine based dyes degradation. **Bioresource Technology journal**, v. 102, p. 6783–6790, 2011.

KENNEDY, P. Tansley review Ectomycorrhizal fungi and interspecific competition: species interactions, community structure, coexistence mechanisms, and future research. **New Phytologist**, p. 895–910, 2010.

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

KIM, S.; MOLDES, D.; CAVACO-PAULO, A. Laccases for enzymatic coloration of unbleached cotton. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, p. 1788–1793, 2007.

KLONOWSKA, A. et al. Characterization of a low redox potential laccase from the basidiomycete C30. **Eur. J. Biochem**, v. 6125, p. 6119–6125, 2002.

KLONOWSKA, A. et al. LAC3, a new low redox potential laccase from *Trametes* sp. strain C30 obtained as a recombinant protein in yeast. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 36, p. 34–41, 2005.

KUDANGA, T.; NEMADZIVA, B.; LE ROES-HILL, M. Laccase catalysis for the synthesis of bioactive compounds. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 101, n. 1, p. 13–33, 2017.

KUHAR, F.; CASTIGLIA, V.; LEVIN, L. International Biodeterioration & Biodegradation Enhancement of laccase production and malachite green decolorization by co-culturing *Ganoderma lucidum* and *Trametes versicolor* in solid-state fermentation. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 104, p. 238–243, 2015.

KUMAR, D. et al. An alkaline bacterial laccase for polymerization of natural precursors for hair dye synthesis. **3 Biotech**, 2018.

KUNAMNENI, A. et al. Engineering and Applications of fungal laccases for organic synthesis. **Microbial Cell Factories**, v. 7, p. 1–17, 2008.

KWON, M. et al. Biochemical and Biophysical Research Communications A caffeic acid-ferulic acid hybrid compound attenuates lipopolysaccharide-mediated inflammation in BV2 and. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 515, p. 565–571, 2019.

LI, K. et al. Antibacterial activity and mechanism of a laccase-catalyzed chitosan – gallic acid derivative against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. **Food Control journal**, v. 96, n. June 2018, p. 234–243, 2019.

LIU, J. et al. In vitro and in vivo antioxidant activity of exopolysaccharides from endophytic bacterium *Paenibacillus polymyxa* EJS-3. **Carbohydrate Polymers**, v. 82, n. 4, p. 1278–1283, 2010.

LONAPPAN, L. et al. Agro-industrial-Produced Laccase for Degradation of Diclofenac and Identification of Transformation Products. **ACS Sustainable Chemistry & Engineering**, 2017.

LONDOÑO, V. A. G.; REYNOSO, M.; RESNIK, S. Food Additives & Contaminants: Part B: Surveillance Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in yerba mate (*Ilex paraguariensis*) from the Argentinean market. **Food additives e contaminants**, p. 37–41, 2014.

LORENZO, M. et al. Improving laccase production by employing different lignocellulosic wastes in submerged cultures of *Trametes versicolor*. **Bioresource Technology**, v. 82, n. 2, p. 109–113, 2002.

LUO, J. et al. Arundinols A-C and arundinones A and B from the plant endophytic fungus *Microsphaeropsis arundinis*. **Journal of Natural Products**, v. 76, n. 1, p. 107–112, 2013.

MALEC, M.; KOLODZIEJCZYK, K.; GUYOT, S. Polyphenol Profiling of a Red-Fleshed Apple Cultivar and Evaluation of the Color Extractability and Stability in the Juice. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 2014.

MALEH, H. K. et al. Determination of ferulic acid in the presence of butylated hydroxytoluene as two phenolic antioxidants using a highly conductive food nanostructure electrochemical sensor. **Chemical Papers**, v. 73, n. 10, p. 2441–2447, 2019.

MARTIN, J. G. **Potencial Biotecnológico de Fungos de Origem Marinha: Produção de Enzimas Lignolíticas e Avaliação da Toxicidade**. Dissertação de Mestrado - Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2015.

MAYER, A. M.; STAPLES, R. C. Laccase: New functions for an old enzyme. **Phytochemistry**, v. 60, n. 6, p. 551–565, 2002.

MIKLASIŃSKA-MAJDANIK, M. et al. Phenolic compounds diminish antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* clinical strains. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 15, n. 10, 2018.

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

MIKOLASCH, M. W. et al. Novel β -Lactam Antibiotics Synthesized by Amination of Catechol's Using. **Chem. Pharm. Bull**, v. 56, n. 7, p. 902–907, 2008.

MOLDES, D.; LORENZO, M.; SANROM, M. A. Different proportions of laccase isoenzymes produced by submerged cultures of *Trametes versicolor* grown on lignocellulosic wastes. **Biotechnology Letters**, n. 1990, p. 327–330, 2004.

MUNIZ-MOURO, A. et al. Comprehensive investigation of the enzymatic oligomerization of esculin by laccase in ethanol: water mixtures. **The Royal Society of Chemistry**, p. 38424–38433, 2017.

MUNOZ-BERNAL, O.; TORRES-AGUIRRE, G. A. Nuevo acercamiento a la interacción del reactivo de Folin-Ciocalteu con azúcares durante la cuantificación de polifenoles totales. **Rev.Esp.Cienc.Quím.Biol**, n. April, 2017.

MUSTAFA, R. et al. Phenolic colorants obtained by enzymatic synthesis using a fungal laccase in a hydro-organic biphasic system. **Food Research International**, v. 38, n. 8–9, p. 995–1000, 2005.

National Center for Biotechnology Information. **U.S. National Library of Medicine**, 2020.

NCANANA, S.; BURTON, S. Oxidation of 8-hydroxyquinoline catalyzed by laccase from *Trametes pubescens* yields an antioxidant aromatic polymer. **Journal of Molecular Catalysis**, v. 44, p. 66–71, 2007.

NCCLS. **Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para Determinação da Sensibilidade de Leveduras à Terapia Antifúngica: Norma Aprovada – Segunda Edição**, v. 22

OLIVEIRA, S. et al. Phenolic compounds, flavonoids and antioxidant activity in different cocoa samples from organic and conventional. **British Food Journal**, 2011.

ORANUBA, E. et al. Environmental Carcinogenesis and Ecotoxicology Reviews Polycyclic aromatic hydrocarbons as a potential source of carcinogenicity of mate. **Journal of Environmental Science and Health**, v. 0, n. 0, p. 1–16, 2019.

ORTIZ-MONSALVE, S. et al. Biodecolourisation and biodegradation of leather dyes by a native isolate of *Trametes villosa*. **Process Safety and Environmental Protection**, v. 109, p. 437–451, 2017.

ORTIZ-MONSALVE, S. et al. Biodecolourization and bi detoxification of dye-containing wastewaters from leather dyeing by the native fungal strain *Trametes villosa* SCS-10. **Biochemical Engineering Journal**, v. 141, n. October 2018, p. 19–28, 2019.

PASHA, I. et al. Nutraceutical and Functional Scenario of Wheat Straw. **Critical**

Reviews in Food Science and Nutrition, v. 53, n. 3, p. 287–295, 2013.

PASSARINI, M. R. Z. **Caracterização da Diversidade de Fungos Filamentosos Associados a Esponjas Marinhas e Avaliação da Produção de Lacase**. Tese de Doutorado - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2012.

PEROXIDASE, L. et al. *Trametes villosa* Lignin Peroxidase (TvLiP): Genetic and Molecular Characterization. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 27, n. 1, p. 179–188, 2017.

PEZZELLA, C.; GUARINO, L.; PISCITELLI, A. How to enjoy laccases. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 72, n. 5, p. 923–940, 2015.

POLAK, J. et al. Toxicity and dyeing properties of dyes obtained through laccase-mediated synthesis. **Journal of Cleaner Production**, v. 112, p. 4265–4272, 2016a.

POLAK, J. et al. Laccase-mediated synthesis of a phenoxazine compound with antioxidative and dyeing properties - the optimization process. **New Biotechnology**, v. 33, n. 2, p. 255–262, 2016b.

POLAK, J.; JAROSZ-WILKOLAZKA, A. Fungal laccases as green catalysts for dye synthesis. **Process Biochemistry**, v. 47, n. 9, p. 1295–1307, 2012.

QIN, S. H. et al. A New Isochroman Derivative from the Endophytic *Microsphaeropsis arundinis*. **Chemistry of Natural Compounds**, v. 53, n. 5, p. 877–879, 2017.

QUIDEAU, S. et al. Natural Products Plant Polyphenols: Chemical Properties, Biological Activities, and Synthesis ** Angewandte. **Angewandte Chemie**, p. 586–621, 2011.

RAMAVANDI, B. Treatment of water turbidity and bacteria by using a coagulant extracted from *Plantago ovata*. **Water Resources and Industry**, v. 6, p. 36–50, 2014.

RAN, N. et al. Recent applications of biocatalysis in developing green chemistry for chemical synthesis at the industrial scale. **Green Chem.**, v. 10, n. 4, p. 361–372, 2008.

REN, J. et al. Synergistic degradation of trans-ferulic acid by water falling film DBD plasma coupled with cobalt oxyhydroxide: Performance and mechanisms. **Chemical Engineering Journal**, v. 372, n. April, p. 321–331, 2019.

RIEDI, H. D. E. P. **Purificação, caracterização e imobilização de lacases de basidiomicetos e seu uso na degradação simultânea purificação, caracterização e imobilização de lacases**. Tese de Mestrado - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Curitiba, 2019.

RUIZ-DUEÑAS, F. J.; MARTÍNEZ, Á. T. Microbial degradation of lignin: How a bulky recalcitrant polymer is efficiently recycled in nature and how we can take advantage of this. **Microbial Biotechnology**, v. 2, n. 2 SPEC. ISS., p. 164–177, 2009.

SALEEM, M. et al. Antimicrobial natural products: an update on future antibiotic drug candidates. **Natural Product Reports**, p. 238–254, 2010.

SHIN, H.; GUEBITZ, G.; CAVACO-PAULO, A. “In Situ” Enzymatically Prepared Polymers for Wool Coloration. **Macromol. Mater. Eng**, p. 691–694, 2001.

SILVA, J. J. et al. Occurrence and diversity of *Aspergillus* in commercial yerba mate elaborated for the Brazilian beverage ‘chimarrão’. **Food Research International**, 2019.

SINGLETON, Vernon L.; ROSSI, Joseph A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. **American journal of Enology and Viticulture**, v. 16, n. 3, p. 144-158, 1965.

SOMMART, U. et al. Modiolin and phthalide derivatives from the endophytic fungus *Microsphaeropsis arundinis* PSU-G18. **Tetrahedron**, v. 68, n. 48, p. 10005–10010, 2012.

SONG, J. E. et al. Bio-coloration of bacterial cellulose assisted by immobilized laccase. **AMB Express**, 2018.

SOUSA, A. C. et al. Synthesis of Azobenzene Dyes Mediated by CotA Laccase. **Chem. Asian J**, p. 187–193, 2019.

SUN, X.; GUO, L.; HYDE, K. D. Community composition of endophytic fungi in *Acer truncatum* and their role in decomposition. **Fungal Diversity**, p. 85–95, 2011.

THIELE, J. J.; DREHER, F.; PACKER, L. Antioxidant Defense Systems in Skin. **J. Toxicol**, v. 21, p. 119–160, 2002.

THIELE, J. J.; PODDA, M.; PACKER, L. Tropospheric Ozone: An Emerging Environmental Stress to Skin. **Biol. Chem**, v. 378, p. 1299–1305, 1997.

TRUNK, T.; KHALIL, H. S.; LEO, J. C. Bacterial autoaggregation. **AIMS Microbiology**, v. 4, n. 1, p. 140–164, 2018.

TYAGI, A. K.; MALIK, A. Morphostructural damage in food-spoiling bacteria due to the lemon grass oil and its vapour: SEM, TEM, and AFM investigations. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2012, 2012.

VALKO, M. et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 39, p. 44–84, 2007.

VICENTE, A. I. et al. Evolved alkaline fungal laccase secreted by *Saccharomyces cerevisiae* as useful tool for the synthesis of C–N heteropolymeric dye. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 134, p. 323–330, 2016.

WANG, Q.; DING, L.; ZHU, C. Characterization of laccase from a novel isolated white-rot fungi *Trametes* sp. MA-X01 and its potential application in dye decolorization. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, v. 32, n. 6, p. 1477–1485, 2018.

WIEGAND, I.; HILPERT, K.; HANCOCK, R. E. W. Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. **Nature Protocols**, v. 3, n. 2, p. 163–175, 2008.

XIE, M. et al. Grafting of Gallic Acid onto Chitosan Enhances Antioxidant Activities. **J. Agric. Food Chem**, 2014.

YADAV, M. et al. Secretory Laccase from *Pestalotiopsis* Species CDBT-F-G1 Fungal Strain Isolated from High Altitude: Optimization of Its Production and Characterization. **Applied sciences**, p. 1–15, 2019.

YAVER, D. S. et al. Purification, Characterization, Molecular Cloning, and Expression of Two Laccase Genes from the White Rot Basidiomycete *Trametes villosa*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, n. 3, p. 834–841, 1996.

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

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

ZHANG, J.; KE, W.; CHEN, H. Enhancing laccase production by white-rot fungus *Trametes hirsuta* SSM-3 in co-culture with yeast *Sporidiobolus pararoseus* SSM-8. **Preparative Biochemistry & Biotechnology**, v. 50, n. 1, p. 10–17, 2020.

ZHANG, Y. et al. Antibacterial activity and mechanism of cinnamon essential oil against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. **Food Control**, 2015.

ZHANG, Y. et al. Gallic acid liposomes decorated with lactoferrin: Characterization, in vitro digestion and antibacterial activity. **Food Chemistry**, v. 293, n. April, p. 315–322, 2019.

ZHAO, Z.; MOGHADASIAN, M. H. Chemistry, natural sources, dietary intake and pharmacokinetic properties of ferulic acid: A review. **Food Chemistry**, v. 109, p. 691–702, 2008.

ZHENG, M. et al. Preparation of Gallic Acid-Grafted Chitosan Using Recombinant Bacterial Laccase and Its Application in Chilled Meat Preservation. **Frontiers of Microbiology**, v. 9, p. 1–10, 2018.