



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO  
UNIDADE ACADÊMICA DE SERRA TALHADA  
CURSO DE BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

LARISSA CELESTINO DA SILVA

**ANÁLISE ESTRUTURAL E USO DE LACASE DE CAMARÃO PARA A  
DEGRADAÇÃO DE ANTRACENO**

MONOGRAFIA

SERRA TALHADA - PE

2022

LARISSA CELESTINO DA SILVA

**ANÁLISE ESTRUTURAL E USO DE LACASE DE CAMARÃO PARA A  
DEGRADAÇÃO DE ANTRACENO**

Monografia apresentada ao Curso de Bacharelado em Ciências Biológicas da Universidade Federal Rural de Pernambuco, Unidade Acadêmica de Serra Talhada (UFRPE/UAST), em exigência a aquisição do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Diego de Souza Buarque

SERRA TALHADA – PE

2022

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal Rural de Pernambuco  
Sistema Integrado de Bibliotecas  
Gerada automaticamente, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

S586a Silva , Larissa Celestino  
Análise estrutural e uso de lacase de camarão para a degradação de antraceno: trabalho de conclusão do curso /  
Larissa Celestino Silva . - 2022.  
39 f. : il.

Orientador: Diego de Souza Buarque.  
Inclui referências.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Bacharelado em  
Ciências Biológicas, Serra Talhada, 2022.

1. Lacase. 2. Hidrocarbonetos. 3. Antraceno. 4. Biorremediação. I. Buarque, Diego de Souza, orient. II. Título

CDD 574

---

LARISSA CELESTINO DA SILVA

**ANÁLISE ESTRUTURAL E USO DE LACASE DE CAMARÃO PARA A  
DEGRADAÇÃO DE ANTRACENO**

Monografia apresentada ao Curso de Bacharelado em Ciências Biológicas da Universidade Federal Rural de Pernambuco, Unidade Acadêmica de Serra Talhada (UFRPE/UASt), em exigência a aquisição do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Diego de Souza Buarque

**BANCA EXAMINADORA:**

---

Prof. Dr. Diego de Souza Buarque

Prof. Adjunto da UFRPE (Unidade Acadêmica de Serra Talhada) 1º titular (Presidente)

---

Prof. Dr. Rogério de Aquino Saraiva

Prof. Adjunto da URCA (Universidade Regional do Cariri) 2º titular

---

Prof. Dr. Airton Torres Carvalho

Prof. Adjunto da UFRSA (Universidade Federal Rural do Semi-Árido) 3º titular

**Dedico este trabalho à minha família, em especial, aos meus pais Francisco Celestino e Maria do Socorro pela presença constante em minha vida, e sobretudo, pelo apoio, incentivo e amor condicional.**

## AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, a Deus, pela dádiva da vida e por sua presença a todo o momento, por me ouvir, abençoar e me proteger, por ter permitido que eu tivesse saúde e determinação para não desanimar durante a realização deste trabalho.

A UFRPE/UAST, que no decorrer do curso foi literalmente a minha casa, pela a oportunidade de vivenciar e desfrutar da vida acadêmica, e aos professores do Curso de Bacharelado em Ciências Biológicas pela dedicação e comprometimento em passar conhecimentos, os quais foram extremamente necessários para a minha formação.

Ao Laboratório de Química da UFRPE/UAST, o qual foi primordial para a elaboração deste trabalho.

Imensamente, ao meu Orientador Prof. Dr. Diego de Souza Buarque, pela oportunidade de ser orientada pelo mesmo, pelos conselhos, ensinamentos, incentivos, paciência, e apoio concedido durante toda a trajetória em que me orientou. Que Deus possa te devolver em alegria e chuva de bênçãos por toda dedicação e ensinamento que foram destinados a mim.

Aos meus pais, por terem me ensinado os valores morais e éticos que só se aprendem em casa e por terem me apoiado e me darem forças para continuar até o fim dessa jornada. Aos meus irmãos (Liliane, Lucas e Luís) pelo apoio.

As minhas amigas da graduação: Victoria Karolina, Vitória Régia, Thais, jefferson e Girianne (companheira dos trabalhos, atividades, e que esteve comigo desde o começo, e tivemos até o prazer de dividirmos o laboratório para a realização do ESO.

A minha amiga Ingrid Maria que sempre me apoiou e torceu por mim, que está comigo desde o começo e que não se cansa de encher a boca pra dizer que tem uma amiga bióloga.

“A mente que se abre para uma nova idéia jamais voltará ao seu tamanho original”.

Albert Einstein

## RESUMO

Por meio do grande crescimento populacional e desenvolvimento tecnológico, a utilização de recursos naturais tornou-se cada vez mais presente e constante, acarretando também preocupações, medidas e soluções referentes ao ambiente. Neste contexto, o derramamento de petróleo tem afetado os ecossistemas aquáticos. Ademais, o petróleo abrange uma série de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, os quais são pouco voláteis e se depositam no fundo dos ambientes aquáticos. Por isso, o uso de enzimas lacases pode ser utilizada para combater os hidrocarbonetos do petróleo. A estrutura da lacase de *L. vannamei* apresentou domínios conservados característicos dessa enzima, como aqueles que são importantes para os centros de cobre, uma vez que, os mesmos são responsáveis por realizar a oxidação dos compostos aromáticos. Além disso, a sequência dessa enzima apresentou um percentual de identidade maior quando comparada com as lacases de outros organismos, tal fato pode ser caracterizado devido ao número de posições idênticas existentes entre as sequências de aminoácidos das mesmas. O presente trabalho abordou a utilização de ferramentas de bioinformática para entender a estrutura da lacase e, conseqüentemente, testar a atividade da enzima na degradação do hidrocarboneto antraceno.

**Palavras-chave:** Lacase, hidrocarbonetos, antraceno, biorremediação.

## ABSTRACT

Through the large population growth and technological development, the use of natural resources has become increasingly present and constant, also causing concerns, measures and solutions related to the environment. In this context, the oil spill has affected aquatic ecosystems. Furthermore, petroleum comprises a series of polycyclic aromatic hydrocarbons, which are not very volatile and are deposited at the bottom of aquatic environments. Therefore, the use of laccase enzymes can be used to combat petroleum hydrocarbons. The structure of the *L. vannamei* laccase showed conserved domains characteristic of this enzyme, such as those that are important for copper centers, since they are responsible for carrying out the oxidation of aromatic compounds. In addition, the sequence of this enzyme showed a higher percentage of identity when compared to the laccases of other organisms, this fact can be characterized due to the number of identical positions existing between their amino acid sequences. The present work addressed the use of bioinformatics tools to understand the structure of the laccase and, consequently, test the activity of the enzyme in the degradation of the anthracene hydrocarbon.

**Keywords:** Laccase, hydrocarbons, anthracene, bioremediation.

## LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1** - Fórmula estrutural do antraceno ..... 18
- FIGURA 2** - Principais áreas de aplicação de lacases ..... 20
- FIGURA 3** - Representação esquemática dos centros de cobre da enzima lacase..... 21
- FIGURA 4** - Sequência FASTA de aminoácidos da lacase de *Litopenaeus vannamei* obtida no pubmed. Na sequência, os quatros domínios cobre-oxidases estão destacados em amarelo e um outro domínio conservado (C-X-R-X-C), encontrado perto do N-terminal da proteína está destacado em azul (em que X representa qualquer aminoácido) .....26
- FIGURA 5** - Alinhamento da sequência da lacase de *Litopenaeus vannamei* com as sequências primárias dos modelos obtidos. Em verde escuro, resíduos conservados, em verde claro, semiconservados e em amarelo claro resíduos diferentes com algumas propriedades e funções químicas semelhantes, em branco resíduos diferentes que não apresentam nenhuma propriedade química semelhante. Os traços nas sequências (--) apontam os “gaps”.....28
- FIGURA 6** - Acompanhamento da degradação do antraceno pela enzima lacase do camarão *Litopenaeus vannamei* na ausência de mediadores. A) Assim que realizado o experimento no tempo de 0 horas já ouve a degradação do antraceno de 10%. B) após o tempo de incubação de 2h ouve um aumento na taxa de oxidação chegando a 50%. C) em 48h de incubação foi possível vizualizar a maior atividade da enzima, conseguindo degradar 95% do antraceno ...30

## LISTA DE TABELAS

**TABELA 1** - Percentual de identidade das enzimas lacases obtidas com a enzima lacase de *Litopenaeus vannamei* (enzima molde) ..... 27

**TABELA 2** - Dados do respectivo hidrocarboneto sobre o qual a lacase age obtida pelo Pubchem ..... 29

## **LISTA DE ABREVIÇÕES**

**ANT-** Antraceno

**HPAS-** Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos

**IUPAC-** União Internacional de Química Pura e Aplicada

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>14</b>
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>16</b>
2.1. PETRÓLEO: POTENCIAL POLUIDOR.....	16
2.2. HIDROCARBONETOS POLICÍCLICOS AROMÁTICOS (HPAS) .....	17
2.3. ANTRACENO .....	17
2.4. BIORREMEDIAÇÃO: SOLUÇÃO ECOLÓGICAMENTE VIÁVEL .....	18
2.5. LACASES .....	19
2.6. IMPORTÂNCIA DA BIOINFORMÁTICA NO ALINHAMENTO DE SEQUÊNCIAS .....	22
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	<b>23</b>
3.1. OBJETIVO GERAL .....	23
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	23
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>23</b>
4.1. OBTENÇÃO E ANÁLISE DA SEQUÊNCIA DA LACASE DE <i>LITOPENAEUS VANNAMEI</i> .....	23
4.2. ANÁLISE DA HOMOLOGIA COM LACASES DE OUTROS ORGANISMOS .....	24
4.3. PURIFICAÇÃO PARCIAL DA LACASE.....	24
4.4. TESTE COLORIMÉTRICO DE DEGRADAÇÃO DO ANTRACENO.....	25
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>25</b>
<b>6. CONCLUSÕES</b> .....	<b>31</b>
<b>7. REFERÊNCIAS</b> .....	<b>32</b>

## 1. INTRODUÇÃO

Ao longo dos séculos, as atividades de exploração do meio ambiente têm sido consideradas fontes para o desenvolvimento da economia, estando assim na base das sociedades modernas (MANCINI; SALA, 2018; TOST et al., 2018). Pois, além do fato de ser uma atividade de alta rentabilidade econômica, uma vez que, é caracterizada por uma das principais atividades produtoras de matéria-prima, é também, responsável por gerarem milhares de empregos diretos e indiretos (IBRAM, 2020).

Dentre as atividades de mineração, dá-se uma ênfase nas atividades de mineração do petróleo, uma vez que, esse mineral têm sido muito utilizado pelas sociedades. Sendo que, essa substância é uma matéria-prima empregada na produção de plásticos, tintas, borrachas sintéticas e outros materiais (CLIFON, 2014), o mesmo está presente em produtos cosméticos, brinquedos, remédios, produtos de limpeza, asfalto etc.

Ainda que, várias sejam as contribuições da atividade de mineração, esta também causa significativa degradação ambiental (TOST et al., 2018; RANJAN, 2019). Essas atividades acarretam riscos ambientais para a área em questão como a poluição marinha, que pode ser definida a partir da introdução de forma direta ou indireta, pelo homem, de substâncias ou energia no ecossistema. Que logo, vão resultar em efeito deletério aos seres vivos, causando prejuízo à saúde humana e redução da qualidade da água e de atividades como pesca, recreação e outras (BÍCEGO et al, 2008).

Dentre os impactos decorrentes dessas atividades, vale enfatizar a contaminação de águas superficiais pelo vazamento direto dos minerais extraídos ou seus componentes, tais como o petróleo (PENA, 2016). Em 2019, a ação antrópica também causou um grande desastre ambiental com o derramamento de óleo proveniente de petróleo em praias do Nordeste (DANTAS et al., 2019). Esse desastre está levando um prejuízo sem precedentes aos ecossistemas aquáticos, uma vez que, além de poluir o ecossistema marinho acaba também acometendo os organismos aquáticos queo compõem. Haja visto, que o óleo pode impedir de fazer as trocas necessárias com o meio, como a respiração, alimentação, processo fotossintético, eliminação de excreta, além de alterar também a temperatura do corpo (CETESB, 2020).

Diante desses derramamentos de petróleo, os poluentes comumente encontrados nos ambientes aquáticos são hidrocarbonetos (KENNISH, 1991). O petróleo abrange uma série de

hidrocarbonetos, incluindo também os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs), os quais são considerados poluentes orgânicos de grande importância ambiental apresentando efeito toxicológico, pois muitos apresentam propriedades pré-carcinogênicas e/ou mutagênicas para homens e animais (CAMARGO; TOLEDO, 2002).

Dentre os HPAS constituintes do petróleo podemos destacar então o antraceno, o qual é pouco volátil e costuma se depositar no fundo dos ambientes aquáticos, como por exemplo, nos sedimentos dos manguezais, sendo, portanto, de difícil separação (JEONG; CHO, 2005). O antraceno é um dos poucos HPAs produzidos industrialmente, sendo também obtido a partir do carvão (VERSCHUEREN, 2001).

Dessa forma, medidas de combate ao petróleo e seus constituintes, incluindo o antraceno, são necessárias para a biorremediação dos manguezais afetados. Neste contexto, o uso de enzimas tem sido empregado para a degradação de HPAs (NEMADZIVA et al., 2018; MUÑIZ-MOURO et al., 2018; REANO et al., 2016; NAGHDI et al., 2019; DARONCH et al., 2020). Além disso, a carcinicultura marinha apresentou significativo desenvolvimento, a partir da introdução de *Litopenaeus vannamei* (BOONE, 1931). Desse modo, a partir do reaproveitamento dos subprodutos dos camarões é possível obter lacases, as quais são enzimas do tipo cobre oxidases que catalisam a oxidação de vários compostos aromáticos, fazendo a redução do oxigênio molecular à água (RIVA, 2006).

Essas enzimas são muito caracterizadas em fungos e bactérias (CAVALLAZZI; OLIVEIRA; KASUYA, 2004) e, nos últimos anos, sua atividade tem sido também descoberta em organismos aquáticos (THEERACHAT et al., 2018). Estas enzimas catalisam a oxidação de uma variedade de compostos fenólicos e aromáticos, como a lignina, aminas, ésteres, éteres e alguns íons inorgânicos com a concomitante redução do oxigênio à água (SHLEEV et al., 2009). As lacases têm contribuído na degradação dos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (FILAZZOLA et al., 1999).

Desta forma, o uso de lacases do camarão *Litopenaeus vannamei*, que é uma espécie originária do Oceano Pacífico (BRASIL, 2001), irá contribuir com a redução do impacto ao meio ambiente pelo reaproveitamento dos subprodutos da indústria pesqueira e também na degradação do antraceno, uma vez que, a mesma apresenta potenciais biotecnológicos, bem como pode atuar na biodegradação dos HPAs em ambientes contaminados (PACHECO; SOARES, 2014).

## **2. REVISÃO DE LITERATURA**

### **PETRÓLEO: POTENCIAL POLUIDOR**

Segundo Amaral et al. (1972), um dos minerais marinhos mais bem explorado no Brasil é o petróleo. Visto que, é dos recursos não-renováveis mais usados no dia a dia da atual sociedade moderna (BOZELLI et al., 2008). Este, por sua vez, é uma substância bastante utilizada nos mais diversos setores de produção, servindo como combustível na produção de energia elétrica, na indústria e no transporte (CLIFON, 2014).

Além disso, as atividades de mineração dos hidrocarbonetos de petróleo também vêm ocorrendo em grande escala, as quais são potenciais causadoras de impacto ambiental, tanto em suas etapas de exploração quanto de produção (ELLIS, 1988). Uma vez que, a intensa exploração do petróleo acaba acarretando em derrames de óleo (de pequenas ou de grandes proporções) no ambiente marinho por conta do transporte e distribuição do produto ao longo da costa (RIOS, 2014).

No entanto, apesar de sua grande relevância e aplicação, os ecossistemas localizados adjacentes às áreas de extração, processamento, distribuição e rotas de transporte do óleo, estão altamente susceptíveis aos impactos diretos e indiretos provocados por essas atividades (CLIFON, 2014). Estima-se que, na atualidade, sejam produzidos cerca de 80 milhões de barris deste óleo por dia (EIA, 2018), onde a maioria é conduzida por rotas marítimas. No Brasil, o processo de extração se intensificou a partir do século XXI, com a descoberta do pré-sal (RODRIGUES; SUSLICK, 2009; LIMA; LIMA, 2017).

Um dos maiores exemplos de acidente desse tipo registrado é a da plataforma de petróleo Deepwater Horizon (BP), ocorrido no Golfo do México, em 2010. Estima-se que, através desse desastre, houve o derramamento de cerca de 700.000 m<sup>3</sup> de óleo ao longo de três meses (PEREZ-UMPHREY et al., 2018), gerando morte de vários organismos.

O petróleo é uma mistura complexa que contém uma abundância de substâncias tóxicas conhecidas, incluindo compostos orgânicos voláteis (VOCs), hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs), e metais pesados. Os danos à saúde e a gravidade dos efeitos da exposição ocorre por ingestão, absorção por meio da pele íntegra e inalação, dependendo da dose e do tempo de exposição a essas toxinas. Os riscos toxicológicos envolvidos são caracterizados por graves, agudos e crônicos, pois, frações de petróleo podem levar à morte por intoxicação, especialmente, quando associado aos compostos aromáticos (SAVITZ; ANDREWS, 1997; BAAN et al., 2008).

## **HIDROCARBONETOS POLICÍCLICOS AROMÁTICOS (HPAs)**

Os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) são substâncias químicas formadas naturalmente ou antropogenicamente durante a combustão incompleta de substâncias orgânicas como o carvão mineral, óleo cru, dentre outras substâncias (USDHS,1995). São compostos constituídos unicamente de átomos de carbono e de hidrogênio, arranjados na forma de dois ou mais anéis aromáticos (LI, J; Li, F; LIU, 2017). Devido à possibilidade de fusão de um número variável de anéis e de várias posições em que estes anéis podem se ligar entre si há atualmente mais de 100 HPAs reconhecidos pela União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC) (POTIN et al., 2004).

Os HPAs são caracterizados pela presença de duplas ligações conjugadas em suas estruturas, as quais são responsáveis por determinar as propriedades físicas e químicas dos mesmos. Além disso, a maioria dos HPAs apresentam-se em sua forma sólida em condições de temperatura ambiente e possuem altas temperaturas tanto de fusão como de ebulição, baixa solubilidade em água e baixa pressão de vapor, onde a solubilidade e a pressão de vapor diminui conforme o aumento da massa molecular, ou seja, são inversamente proporcionais (NETTO et al., 2000; MEIRE; AZEREDO; TORRES, 2007; VEIGA, 2003; CARUSO; ALABURDA, 2008).

A presença dos HPAs no ambiente torna-se preocupante devido à possibilidade destes compostos reagirem com o DNA, tornando-se mutagênicos e carcinogênicos ao homem e aos animais (CAMARGO; TOLEDO, 2002). Ou seja, os HPAs e seus derivados estão associados ao aumento da incidência de câncer no pulmão, intestino, fígado, pâncreas e na pele do homem (CHAKRADEO et al., 1993). Isto é, além de causar defeitos genéticos em humanos, é possível acometer também a fauna e a flora por meio da absorção e acúmulo nas cadeias alimentares (NACCI et al., 2002; DODOR; HWANG; EKUNWE, 2004; RENGARAJAN et al., 2015; YUAN et al., 2017).

Dessa forma, como a presença de HPAs no meio ambiente é considerada um risco para os organismos a eles expostos, surge à necessidade de avaliar a distribuição desses compostos tóxicos e adotar medidas para a sua degradação (GUO et al., 2011).

## **ANTRACENO**

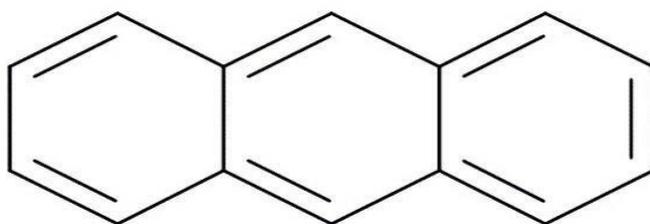
O antraceno é um dos poucos HPAs produzidos naturalmente e de forma contínua. Por meio da combustão incompleta da matéria orgânica, bem como o carvão (HARITASH; KAUSHIK, 2009). Porém, a contaminação ambiental está relacionada à geração antropogênica associada às indústrias petroquímicas, a partir da produção de carvão vegetal e devido ao

processo de extração, transformação, transporte e utilização do petróleo (BAMFORTH; SINGLETON, 2005).

É obtido por meio do carvão numa fração conhecida como “óleo de antraceno” ou “óleo verde”. O antraceno também conhecido como antracina ou paranaftaleno, é formado por três anéis benzênicos, arranjados de forma linear (Figura 1), apresentando uma massa molecular de 178,2 g e uma solubilidade em água de 0,076 mg L<sup>-1</sup> (IARC, 1973).

O antraceno também é utilizado pela indústria, principalmente na produção de corantes, na produção de fibras sintéticas, além de outros usos (HAWLEY, 1993). Em razão de apresentar menor toxicidade em comparação dos demais HPAs, o antraceno tem sido utilizado como modelo para estudos envolvendo a dinâmica dos HPAs no ambiente.

**Figura 1.** Fórmula estrutural do antraceno.



**Fonte:** <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/8418>.

### **BIORREMEDIÇÃO: SOLUÇÃO ECOLÓGICAMENTE VIÁVEL**

A biorremediação consiste no processo de descontaminação do solo e da água, ou seja, é um método que tem como objetivo transformar e degradar contaminantes em substâncias não-tóxicas ou atingir uma menor toxicidade quando comparada ao seu estado original (HORNUNG, 1997). Esta técnica utiliza de organismos vivos como plantas, microrganismos ou suas enzimas, para fazer a remoção ou reduzir os poluentes no ambiente (GAYLARD; BELLINASSO; MANFIO, 2005).

A biorremediação é uma estratégia bastante significativa a ser empregada para degradar os HPAs, visto que, a biorremediação é um processo natural, portanto, é considerado um processo seguro (MASHI, 2013). Além disso, é um processo que apresenta custo de tratamento mais baixo, quando comparado às outras técnicas de tratamento de áreas degradadas (ANDRADE; AUGUSTO; JARDIM, 2010). Por outro lado, uma das desvantagens da

biorremediação é que muitas das técnicas utilizadas são consideradas lentas (VIDALI, 2001).

Dentro do contexto apresentado, tem sido utilizado o reaproveitamento de subprodutos da carcinicultura do camarão marinho *Litopenaeus vannamei*, a principal espécie de camarão cultivada no Brasil (PONTES; ARRUDA, 2005). Neste contexto, os rejeitos do cultivo de camarão representam cerca de 50% da biomassa desse animal, a qual também é descartada de forma inadequada no meio ambiente. Por meio desses rejeitos, tem sido possível obter enzimas, as quais podem ter atividades de detoxificação de compostos tóxicos ao meio ambiente (CAHÚ et al., 2012). Assim, torna-se possível promover a biorremediação por meio do reaproveitamento dos sub-produtos da indústria pesqueira e do uso do mesmo para a produção de enzimas de degradação de compostos danosos, como as lacases.

## **LACASES**

As lacases, também conhecidas como enzimas multicobre e são classificadas como oxirredutases. As mesmas são produzidas na natureza por bactérias, alguns insetos e em maior quantidade por fungos, especialmente dos filos Ascomycota e Basidiomycota, predominando neste último grupo, que são conhecidos de fungos da podridão branca (MISHRA *et al.*, 2010; BALDRIAN, 2006). Além do mais, as lacases são predominantemente enzimas extracelulares, o que facilita a sua ação e atividade (SHLEEV *et al.*, 2009).

As lacases apresentam uma característica muito importante que é a baixa especificidade por substratos. Isto é, são capazes de apresentar atividade em diferentes substratos. Elas catalisam a oxidação de uma variedade de compostos fenólicos e aromáticos com a concomitante redução do oxigênio molecular à água. (BALDRIAN, 2006; MAJEAU et al., 2010). A lacase realiza a oxidação via abstração de um elétron de fenóis para radicais fenoxila, sendo que é a sequência de aminoácidos constituintes da enzima que vai determinar a sua especificidade pelo substrato prestes a ser oxidado. Isto é, lacases de diferentes fungos podem então oxidar diferentes substratos, inclusive em diferentes faixas de pH (RINGLING e VAN ALFEN, 1993).

Sabe-se ainda, mais recentemente, do uso destas enzimas em diferentes aplicações ambientais (MIGLIORE et al., 2012; LI et al., 2012; SINGH; AHLAWAT; RAJOR, 2012; BALAN; SATHISHKUMAR; PALVANNAN, 2012; ASGHER; ASLAM; IQBAL, 2013; CHANG; CHANG, 2014; HADIBARATA; KRISTANTI, 2014). Uma vez que, as lacases tanto em sua forma livre como também imobilizadas têm sido empregadas na degradação de poluentes (NEMADZIVA et al., 2018; MUÑIZ-MOURO et al. 2018; REANO et al., 2016; NAGHDI et al., 2019; DARONCH et al., 2020). Vale salientar que, além da importância

ecológica e ambiental, uma vez que participam do ciclo do carbono, promovendo a degradação de compostos de plantas, as lacases possuem um vasto campo de aplicação biotecnológica como eficiência no processo de degradação de fármacos e de corantes (TOUAHAR et al., 2014; LLORET et al., 2012).

As lacases também são muito utilizadas em aplicações industriais, como a detoxificação de efluentes e resíduos das indústrias petroquímica e têxtil, na produção alimentícia e de papel, biorremediação, remoção, precipitação ou transformação de compostos tóxicos e recalcitrantes, biodegradação de componentes xenobióticos, biosensores, dentre outras atividades (Figura 2) (RANGELOV; NICELL, 2015; ARORA; SHARMA, 2010).

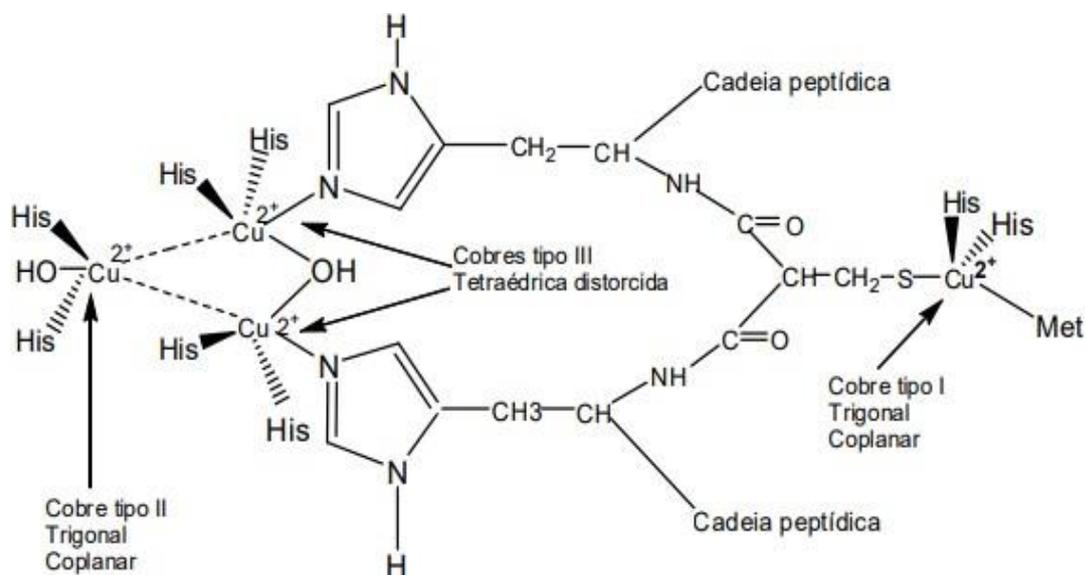
**FIGURA 2:** Principais áreas de aplicação de lacases



Fonte: KATO-SCHWARTZ et al., 2020.

A lacase é composta por um sítio ativo formado por quatro átomos de cobre (Figura 3), os quais são divididos em três grupos, caracterizados em função de suas características espectroscópicas, que vão desempenhar seus diferentes papéis durante o processo enzimático (DURÁN et al., 2002; PIONTEK; ANTORINI; CHOINOWSKI, 2002). Além disso, a atividade catalítica da lacase está intimamente relacionada à presença desses 4 átomos de cobre (CLAUS, 2004; LEONTIEVSKY et al. 1997a). Por convenção, um cobre é designado do tipo 1 (T1), dois cobres são do tipo 3 (T3) e um quarto é do tipo 2 (T2).

Na região do cobre T1 é onde ocorre a oxidação do substrato, os elétrons recebidos por este cobre e então são transferidos para o “cluster” trinuclear formado por dois átomos de cobre T3 e um cobre de T2, onde ocorre a redução do oxigênio molecular (DURÁN et al., 2002; PIONTEK; ANTORINI; CHOINOWSKI, 2002).



**Figura 3:** Representação esquemática dos centros de cobre da enzima lacase (DURÁN et al., 2002; PIONTEK; ANTORINI; CHOINOWSKI, 2002).

O ciclo catalítico da lacase engloba três principais passos: a) redução do cobre tipo 1 com a simultânea oxidação do substrato. Além disso, um outro fator importante a ser ressaltado com relação a este cobre é a ligação covalente que o mesmo apresenta com a cisteína, isto é, a este átomo de cobre encontra-se duas histidinas e uma cisteína como ligantes conservados, e apresentam também a presença de um ligante variável. Em bactérias esse ligante é a metionina, já em lacases fúngicas há uma leucina e uma fenilalanina como ligante (CLAUS, 2004). Essa diferença de ligante variável pode ser um fator preponderante na relação da proteína com o substrato, uma vez que pode interferir na interação da proteína com os contaminantes em questão (SAKURAI; KATAOKA, 2007).

Essas diferenças estruturais entre as enzimas podem levar a diferentes especificidades para os sítios de ligação, desta forma, interferindo na ação da lacase na degradação de um determinado substrato (KUMAR et al, 2003), como o antraceno; b) transferência de elétrons do cobre tipo para os cobres tipo 2 e 3. O cobre tipo 2 fica próximo ao cobre tipo 3 e o mesmo é composto por duas histidinas; c) redução do oxigênio molecular para água através de sua interação com os cobres tipo 2 e 3, e no cobre tipo 3 estão seis moléculas de histidina (GIANFREDA et al., 1999; DURÁN et al., 2002).

## **IMPORTÂNCIA DA BIOINFORMÁTICA NO ALINHAMENTO DE SEQUÊNCIAS**

A bioinformática é um campo interdisciplinar, onde a mesma emergiu diante da necessidade de fusão da biologia/ciência com a informática, visto que, por meio da tecnologia a qual engloba um desenvolvimento sistêmico e aplicação de soluções de tecnologia da informação para lidar com informações biológicas, bem como, acesso a coleção e armazenamento de dados biológicos, permissão de pesquisas em bancos de dados, análises e interpretação e modelagem (DEGRAVE et al., 2002; XIONG, 2009; JAYARAM; DHINGRA, 2010). Ou seja, a bioinformática é uma ferramenta criada que auxilia na análise de dados biológicos (KUMOR, 2009).

Então, com o rápido desenvolvimento de tecnologias genômicas especialmente as técnicas de sequenciamento automático, foi produzido uma enorme quantidade de dados baseado em sequências de nucleotídeos e proteínas. Hoje em dia, é possível ver vários bancos de dados que auxiliam e facilita os estudos envolvendo proteínas como o GenBank (BENSON, 2004), Uniprot (APWEILER et al., 2004), PDB (BERMAN, 2000), PubMed Medline, etc., os quais além de exibir as sequências de nucleotídeos e proteínas, também disponibiliza anotações e publicações de pesquisas relacionadas.

A bioinformática tem muitas aplicações práticas em diferentes áreas da biologia e da medicina. Na bioinformática, as atividades comuns incluem mapear e analisar as sequências de DNA, RNA e proteínas, alinhar diferentes sequências de DNA e proteínas para poder compará-las e visualizar modelos 3D das estruturas das proteínas (LUSCOMBE et al., 2001; NILGES; LINGE, 2009).

Há três aspectos da análise bioinformática de grande importância, as áreas de análise de sequências: consistem no alinhamento de sequências, pesquisa de banco de dados de sequências, reconstrução de relações evolutivas e montagem e comparação de genomas. As análises estruturais englobam análise, classificação, comparação e previsão da estrutura de ácidos nucléicos e proteínas. Já, a análise funcional abrange perfil de expressão gênica, previsão de localização subcelular de proteína, reconstrução e simulação de vias metabólicas e previsão de interação proteína-proteína (RAO et al., 2008; XIONG, 2009).

Dessa forma, a bioinformática tem sido uma ferramenta de grande importância no alinhamento de sequências, visto que, é possível identificar os genes nas sequências de DNA de vários organismos, alinhar sequências semelhantes e gerar árvores filogenéticas para

examinar as relações evolutivas (TRAMONTANO, 2009), fazer a interpretação de domínios e de proteínas e suas estruturas (WALES, 2009), prever sítios ativos nas estruturas de proteínas, encontrar todos os genes e proteínas de um genoma a partir de uma determinada sequência de aminoácidos (RAO et al., 2008).

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo Geral

Utilizar ferramentas de bioinformática, visando entender a estrutura da enzima lacase do camarão *Litopenaeus vannamei* em comparação com lacases de outros organismos e determinar a degradação de antraceno.

#### 3.2 Objetivos Específicos

- 1 - Analisar uma sequência de aminoácidos predita de lacase de *L. vannamei*;
- 2 - Identificar os resíduos conservados na sequência da lacase de *L. vannamei*;
- 3 - Determinar o grau de homologia da lacase de *L. vannamei* com lacases dos outros organismos;
- 4 - Mensurar a degradação de antraceno pela lacase de *L. vannamei*.

### 4. METODOLOGIA

#### Obtenção e análise da sequência da lacase de *Litopenaeus vannamei*

Inicialmente foi realizada a busca da sequência do RNAm de uma enzima lacase do camarão *Litopenaeus vannamei* por meio do banco de dados do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>) o qual é uma seção da biblioteca nacional de medicina dos Estados Unidos. Em seguida, essa mesma sequência encaminhou-se para o *Expasy* (<https://web.expasy.org/translate/>), que é um portal de recursos bioinformático, que usa como parâmetro a sequência de DNA e o formato de saída é apenas a sequência FASTA, por meio deste foi realizado o processo de tradução para a determinação da sequência de aminoácidos putativa.

Além disso, por intermédio da ferramenta ORFfinder Home (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>) que utiliza como parâmetro a sequência fasta, foram adquiridos os quadros abertos de leitura (*Open Reading Frames – ORFs*). Posteriormente, com o auxílio da literatura foi analisada se havia a presença de resíduos conservados ou de domínios

cobre-oxidases na enzima lacase, visto que, são estritamente necessários para a estrutura da proteína ou para sua função.

### **Análise da homologia com lacases de outros organismos**

Para a compreensão dos resíduos conservados da lacase de *L. vannamei*, a mesma foi alinhada com sequências de lacases de outros artrópodes por meio de dois programas: o primeiro é o Blastp ([http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastp&PAGE\\_TYPE=BlastSearch&BLAST\\_SPEC=&LINK\\_LOC=blasttab&LAST\\_PAGE=blastx](http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastp&PAGE_TYPE=BlastSearch&BLAST_SPEC=&LINK_LOC=blasttab&LAST_PAGE=blastx)), o qual utiliza como algoritmo blastp (proteína-proteína BLAST) para mostrar outras proteínas similares a proteína usada como base para comparação, esse programa ainda destaca o percentual de identidade da sequência de interesse traduzida com sequências de outros organismos.

Além disso, deu-se início ao uso do programa Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>), utilizando como parâmetro o ClustalW com contagem de caracteres, por meio deste ocorreu então o alinhamento das sequências destacando os resíduos de aminoácidos conservados e semiconservados.

### **Purificação parcial da lacase**

A purificação parcial das lacases ocorreu a partir da realização do extrato bruto do hepatopâncreas do *Litopenaeus vannamei*, onde posteriormente foi removido o hepatopâncreas e feito o extrato enzimático na concentração de 4mg/mL, contendo tampão tris-HCl 0,1M pH 7,5. Logo após ocorreu a centrifugação à 8000XP por 15 minutos a temperatura de 4°C, após o tempo de centrifugação é retirado o líquido e o restante descartado.

Em seguida, foi dado início ao processo de purificação por meio da técnica de cromatografia de afinidade com a Concanavalina-A. Então, primeiro foi adicionado o tampão de equilíbrio que é tris-HCl 0,1M pH 7,5 contendo os sais NaCl 0,5M, CaCl<sub>2</sub> 0,1mM e MnCl<sub>2</sub> 0,1mM, o tampão de equilíbrio vai equilibrar a coluna, a seguir passa-se todo o extrato, e posteriormente adicionou-se novamente o tampão de equilíbrio e depois o tampão de eluição, o qual contém 0,5M de sacarose, sendo este coletado de 1 mL em 1 mL.

Posteriormente, foi dosado a atividade da lacases das frações coletadas pelo uso da hidroquinona como substrato e as frações que apresentaram maior atividade de lacase foram submetidas a diálise para fazer a remoção da sacarose deixando apenas a lacase. A purificação foi feita de acordo com a metodologia de Nivedita, Veda e Upendra (2015).

### **Teste colorimétrico de degradação do antraceno**

A avaliação da capacidade de degradar o antraceno pela a enzima lacase foi realizada seguindo a metodologia de Alcalde, Bulter e Arnold (2002) considerando alterações em algumas proporções. Para a incubação, foi utilizado 5 mL de uma solução de Tris-HCl 0,1M pH 8,0 contendo 1% de Tween 20 e 2% de etanol grau P.A., 100µM de solução de antraceno e 2 mL da lacase purificada. A mistura foi submetida a reação por 48h, armazenada a temperatura ambiente e sem incidência luminosa.

Após o tempo de incubação, 600 µL de uma solução de borohidreto de sódio 1M em NaOH 40% foi misturada a 600µL de etanol grau P. A. Em seguida, 200 µL desta solução foi adicionada a 200 µL da incubação do teste de degradação. A leitura foi realizada após 15 minutos da reação incubada nas mesmas condições anteriores e submetidas ao espectrofotômetro para a leitura a partir da absorvância em um comprimento de onda de 419 nm para identificação da formação do 9,10-antraquinona.

## **5. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Os estudos propostos contribuirão para o desenvolvimento do trabalho sobre a enzima lacase, desde a sua estrutura até a sua aplicação e importância, principalmente do ponto de vista ecológico. Uma vez que, o intuito do trabalho é utilizar enzimas lacases para serem empregadas no processo de biorremediação de ambientes contaminados pelos constituintes do petróleo, como o antraceno.

Desse modo, a partir de ferramentas da bioinformática foi possível obter a sequência fasta da enzima lacase do camarão *Litopenaeus vannamei*. Ademais, vale salientar que, durante a análise feita com base na estrutura/constituição da enzima lacase por meio desta sequência, foi concluído que a mesma apresenta resíduos conservados ou os domínios cobre-oxidases (Figura 4).

Esses domínios cobre-oxidases são muito relevantes, pois eles são responsáveis pela oxidação de diversos compostos aromáticos através da redução do oxigênio molecular à água (BALDRIAN, 2006; MAJEAU et al., 2010). Ou seja, esses resíduos conservados são muito significativos, pois, os mesmos apresentam importância funcional e estrutural para o funcionamento adequado da enzima (SUTTO et al, 2015). Isto é, alguns dos resíduos são conservados por questões funcionais, enquanto que outros são por questões estruturais. Visto que, se esses resíduos conservados forem responsáveis de compor o sítio catalítico, caso haja mutações nesses resíduos causará inatividade da proteína (KINCH; GRISHIN, 2002).

LacaseATU82298.1[*Penaeus vannamei*]

```
MAVACQCSAVCAATMVALVLAIAIATLTSVITAEPTAGSNCYRKCVPGDRRLCHFTFEVHPYQTMSRACHNCPNASDCS
LPDCVPGDGVQRRIIAINKQMPGPIQVCEGDTIVVDVKNLLPDGGLTVHWHGLTMLGGIRDGIQYPSTPHMDGTPGITQCPI
HFGGSFRYTFYALNPGTHWYHAHTGFHRADGVLGAIVIRQPPGKDHAATGLYDYDLPQHTMVIHDWLHMPTEDKFVLRHHGG
GDDFPESMLINGLPHQNIATPTSAAMPYKRFKVSPGARYRFRIINTGILNCPITVHIDEHQLTVIATDGNPVPVPTNASSVVVY
SGERWDVIVKTENTKVGTFWISFMGGVDCAPSSAHQFALFEYEQVGFYKTPAYVKQQDGGQEIIPDSVLLRHMPPKPVYTEA
PPAGVQVNSINSACYDDLICVAGLRSPVPMPEVLRTPRANFTFYLAEMRQIHNAHFYSRAFYNFESADEDQQIPTQVNNLSF
VGPSTPLLSGGRYDTRVCSLENPIGRSCHDDYCECLHMYHVPLGATVEMVFIDEGQHGDENHPIHLGHHFWVVGMDRPN
DVVGAATRDEVINLDRSGQLMRNFYHPVRKDTVITPDGGYTVRFIADNPGYWLMHCHLIFSAAGMEVVKVGEVTDIPPS
PPGFPSCGNFKYHGL
```

**Figura 4:** Sequência FASTA de aminoácidos da lacase de *Litopenaeus vannamei* obtida no pubmed. Na sequência, os quatro domínios cobre-oxidases estão destacados em amarelo e um outro domínio conservado (C-X-R-X-C), encontrado perto do N-terminal da proteína está destacado em azul (em que X representa qualquer aminoácido).

Como já mencionado anteriormente, por meio do algoritmo Blastp foi então dado início ao processo de alinhamento de sequências das enzimas lacases de diferentes organismos utilizando como base para a comparação a lacase do camarão *Litopenaeus vannamei*. Nesse caso, o alinhamento de sequências é uma ferramenta de grande importância para a construção de árvores filogenéticas, na identificação de resíduos conservados e nas funções de proteínas e de suas estruturas secundárias e terciárias (KEMENA; NOTREDAME, 2009).

Desse forma, a partir da análise realizada foram selecionados 6 modelos de lacases que apresentaram maiores valores de identidade com relação a lacase do *L. vannamei*, isso fica evidente na tabela que foi feita com esses respectivos dados, onde fica evidenciado os organismos nos quais essas lacases foram encontradas, bem como também destaca a porcentagem de identidade entre as sequências (Tabela 1).

Além disso, por meio do alinhamento de sequências realizado foi possível observar que dentre as lacases obtidas dos mais variados artrópodes, a lacase de *L. monodon* que é conhecido como camarão-tigre gigante, apresentou um maior percentual de identidade quando comparada com a lacase de *L. vannamei*. Desse modo, a lacase de *L. monodon* mostrou-se apresentar um maior grau de similaridade com a enzima lacase de *L. vannamei*, podendo então ser analisada futuramente para ser empregada na questão da biorremediação dos ambientes contaminados assim como a lacase de *L. vannamei*.

**Tabela 1:** Percentual de identidade das enzimas lacases obtidas com a enzima lacase de *Litopenaeus vannamei* (enzima molde).

<b>Descrição</b>	<b>Nome científico</b>	<b>Por. Identidade%</b>
<b>Lacase</b>	<i>Litopenaeus vannamei</i>	99,69%
<b>Lacase</b>	<i>Litopenaeus monodon</i>	94,22%
<b>Lacase</b>	<i>Procambarus clarkii</i>	60,22%
<b>Lacase</b>	<i>Chiromantes hematocheir</i>	42,41%
<b>Lacase</b>	<i>Orussus abietinus</i>	41,78%
<b>Lacase</b>	<i>Asbolus verrucosus</i>	41,37%
<b>Lacase</b>	<i>Plutella xilostela</i>	40,96%

Por meio do alinhamento também foi possível obter o grau de homologia entre os resíduos de aminoácidos da sequência primária da proteína molde (lacase de *Litopenaeus vannamei*) com as sequências primárias das enzimas obtidas (os seis modelos obtidos a partir do Blastx), demonstrando as regiões conservadas (resíduos de aminoácidos iguais), regiões semiconservadas (resíduos diferentes mais com grande número de propriedades químicas semelhantes) e regiões diferentes (mas com algumas propriedades e funções químicas semelhantes), e região com resíduos diferentes que não apresentam nenhuma propriedade química (Figura 5).

Ou seja, o alinhamento entre as sequências diz respeito a análise das semelhanças biológicas observadas entre os organismos de espécies diferentes, mas que apresentam um mesmo ancestral comum (Darwin, 1859). Isto é, a homologia é uma forte evidência evolutiva pois permite estabelecer ancestralidade comum entre organismos diferentes.

Ademais, geralmente as lacases caracterizam-se pela presença de uma metionina no centro de cobre T1, porém a maioria das lacases de plantas e fungos têm uma fenilalanina ou leucina nesta posição, o que de fato pode ter interferido no grau de similaridade das sequências das lacases como também na interação da proteína com os contaminantes em questão (SAKURAI; KATAOKA, 2007).

[Penaeus [monodon [Procambarus [Chiromantes [Plutella [Asbolus [Orussus	MAVACQCSAVCAATMV---ALVL-A-----AAI-ATLTSVITA-QEPP MAVACQCSAVCAATMV---ALVL-A-----AAI-ATLTSVITA-QEPP -----ML---TLAL-AS-----TVV-ATLASVITASHRPV -----MFGPLL-----LLPLLLLHVTL -----MKRFNQVL-----CCVAIA-----LLSGATAED --MQCVRKTGKSTHIVSIVAVLISSEVLINSGSAETVITADHGLSNVWVQDEKFFPEID	37 37 25 18 24 0 58
[Penaeus [monodon [Procambarus [Chiromantes [Plutella [Asbolus [Orussus	TAGSNCYRKCVPVPG-DRRLHITIEVHFQIMRHHNRNAS-SLPLDVPGVQVRL TAGSNYYRRCVVLG-DRRVHITIEVHFQIMRHHNRNAS-SLPLDVPGVQVRL TPGELCYRKCVEL-DTRLVYCHDVHFQITRAYDERTTT-ERPEVPGVQVRL GAAHECERDCVVG-DNRTLLDSDSQEHTLRVYNEEELASREEIAGSVAEPL EENHPCNRECEIG-ETMTHYDTEGWQSMKQYDFNADNRKDIIPAGISPL -----MPMTIRNNTLEWHTLKQYNYEYEQCYRTDIIPAGRKPV WENHPCRRTCQENAPFMEHTEERVEAYTMRKQYDFNYTIFRPHVAGVVEEPL	96 96 84 77 83 46 118
[Penaeus [monodon [Procambarus [Chiromantes [Plutella [Asbolus [Orussus	IADVROMPGESVQCEITVIVVVKLLPDGGLVYVWRLTMLGGIRDGIQYFSTPML IADVROMPGESVQCEITVIVVVKLLPDGGLVYVWRLTMLGGIRDGIQYFSTPML IADVROMPGESVQCEITVIVVVKLLPDGGLVYVWRLTMRSS---DPRDPTPML ITVIROLPGESVQCEIRVVVLYLQLSDTALVWVQHHMI-----GQQYVPL NVVIRKMPGSAITVQCSRLVVDVEIMTEGSSVSWRHHQV-----GTFMML VVVIRKMPGSESVECLSEVITVVLLSSDSTIHWVHHQK-----ENPMM IVVIRKMPGSESVECCRLIIVTMMPTESTIHWVQHP-----GTFMML	156 155 141 127 132 96 168
[Penaeus [monodon [Procambarus [Chiromantes [Plutella [Asbolus [Orussus	IVGILQDLHFGGSPRITVYAL-NPGRHWGSAITVPHADVLAALVIRQPPGKDHATGL IVGILQDLHFGGSPRITVYAL-NPGRHWGSAITVPHADVLAALVIRQPPGKDHATGL IVNLLQDLHNGGSPRITVYAS-DAVDFWHSQSEGLDFLAIIVQPPAEDPNIGT VVYLQDLVVLG-GTIRNHLASTPPEHLVHSISQSSIFSLVVQA--EDPHRGL TIVVQDLSPLSPTIRNHTAS-NPTEFWHSSSQDIDMAAFIVKTRRSREPNFG VVVYQDLHPGMTVHKKVN-NAVTEFWHSSSQDSDTFFVFFVVEEEDPHSSL VVVYQDLVPGATVHHTAA-TSDFWHSSSPHGDIIVFALIVVVEPSRDHDKDL	215 214 200 184 191 155 227
[Penaeus [monodon [Procambarus [Chiromantes [Plutella [Asbolus [Orussus	VYVLPQITVYVHLLMPTEDFVLRHHGGGDFPESKILVLLPHQNIAT-PTSAA VYVLPQITVYVHLLMPTEDFVLRHHGGGDFPESKILVLLPHQNIAT-PTSAA VYVLPQITVYVHLLMPTEDFVLRHHGGGDFPESKILVLLPHQNIAT-PTSAA VYVLPQITVYVHLLMPTEDFVLRHHGGGDFPESKILVLLPHQNIAT-PTSAA VYVLPQITVYVHLLMPTEDFVLRHHGGGDFPESKILVLLPHQNIAT-PTSAA VYVLPQITVYVHLLMPTEDFVLRHHGGGDFPESKILVLLPHQNIAT-PTSAA VYVLPQITVYVHLLMPTEDFVLRHHGGGDFPESKILVLLPHQNIAT-PTSAA	274 273 260 244 251 215 285
[Penaeus [monodon [Procambarus [Chiromantes [Plutella [Asbolus [Orussus	PYKRFKSPGARVPRINVTGILNDEITVHIEQITVLAISNPFVPTNASVYVSGE PYKRFKSPGARVPRINVTGILNDEITVHIEQITVLAISNPFVPTNASVYVSGE PYVFIIRPGRNRYLALSTGISLSTFSVQANTLSTSPFVPRPAAELIISSE PLEVLTTEGLKRLAFGGSGNDRMVVSVSNITLITADDPDIPFPADFLIISSE KTAQFDKEGYSVFFLNAEFNDEIEMTIGNNITLIASVHDLPIA-TLISASE PAAFTIEEGYRVSFVNAGFNDEIEMSNITNVISSSDFNATEVELTISASE PVAVVSKQNFYRLIINAEFNDLEVSINNTIYVVSNDNDEPIEAEVTLISASE	334 333 320 304 310 275 345
[Penaeus [monodon [Procambarus [Chiromantes [Plutella [Asbolus [Orussus	QWVVKTEITKVGITVYVYVAP--SSAHFALIEVQVQFYKTPAYVKQDQGO QWVVKTEITKVGITVYVYVAP--SSAHFALIEVQVQFYKTPAYVKQVQGO QWVVKTEITKVGITVYVYVAP--SSAHFALIEVQVQFYKTPAYVKQVQGO QWVVKTEITKVGITVYVYVAP--SSAHFALIEVQVQFYKTPAYVKQVQGO QWVVKTEITKVGITVYVYVAP--SSAHFALIEVQVQFYKTPAYVKQVQGO QWVVKTEITKVGITVYVYVAP--SSAHFALIEVQVQFYKTPAYVKQVQGO QWVVKTEITKVGITVYVYVAP--SSAHFALIEVQVQFYKTPAYVKQVQGO	391 391 378 350 358 323 393
[Penaeus [monodon [Procambarus [Chiromantes [Plutella [Asbolus [Orussus	QEIPDSVLLRHMPKPVTEAP--PAGVQVHSNSACYDD--LVCVAGRSPVPMPEVL QEIPDSVLLRHMPKPVTEAP--PAGVQVHSNSACYDD--LVCVAGRSPVPMPEVL GT-----PAGALPPEPSTIDVPE--PAGVQVHSNSACYDD--LVCVADRSVSEAL -----VLNITNPSY--PAGVQVHSNSACYDD--LVCVADRSVSEAL -----AGNPTNEESH--RDGLQVAAKGEEDM--ATISIPENHSLHAWDESM -----SSEPNDSSR--RDGKQVAAKGEEDM--ATISIPENHSLHAWDESM -----KETVSEERVPTSDALQVTLVQGMETD--TVISVPLDSDLPDDES	446 446 427 392 402 369 439
[Penaeus [monodon [Procambarus [Chiromantes [Plutella [Asbolus [Orussus	RTFRATFTFAEMRQIHAAHYSRAFINESADE-DQIIPVNVNIFVGPSTLIL RTFRATFTFAEMRQIHAAHYSRAFINESVDE-DQIIPVNVNIFVGPSTLIL KTPHADITLFAFVRNINMDFPVSVPFFFAVDT-SQVTPDQINLVAQPAALIL P-ETVROQFVGTENQVMTFERNSELVNGVSE-EWVMTLILDSFAFASPLS K-EVEHOFVITVYFYKKNSEKPKAPYGENQMTDIDNMFELHIMONPKLIL K-KVPEQYVYVYFYKIDNPHFKDPLGFFNVNTEQQLLECLYITMKLLFPIL T-RKPEQYVYVYFYKIDNPHFKRNLGSHQVQKDKRQLFELHIMONPKLIL	505 505 486 450 461 428 498
[Penaeus [monodon [Procambarus [Chiromantes [Plutella [Asbolus [Orussus	SG--GRYDRVSIENPIPGRSNDVYELHMYHYPGATVEMVETIEVQHGEMHIL SG--GRYDRVSIENPIPGRSNDVYELHMYHYPGATVEMVETIEVQHGEMHIL TGLRGQERRVNAEHPPDNTDADYELHLYSIFGATVEMVETIEVQHGEMHIL QPQDEQPTLILY--GQDPPDGDPESSIVYLEVAGETVEMVETIEVQHGEMHIL SK-FLSSGFINAD-TVDEEYKPKRHLVSKSSYELVILIEVNTVARRHIL QRQIDPMTNET-SVEKDEENPTEVYVSNVEMILIKVAVARHIL QRDSISTEQFINAS-TVE--GVEDEALTHVQVXGSVEMVETIEVQHGEMHIL	563 563 546 506 519 487 555
[Penaeus [monodon [Procambarus [Chiromantes [Plutella [Asbolus [Orussus	SHHWVGMDFPNDVVGAAIIRDEINLRSQIMNNTYHVRVGVVILPDSGIVVRL SHHWVGMDFPNDVVGAAIIRDEINLRSQIMNNTYHVRVGVVILPDSGIVVRL SHHWVGMDFPNDVVGAAIIRDEINLRSQIMNNTYHVRVGVVILPDSGIVVRL SHHWVGMDFPNDVVGAAIIRDEINLRSQIMNNTYHVRVGVVILPDSGIVVRL SHHWVGMDFPNDVVGAAIIRDEINLRSQIMNNTYHVRVGVVILPDSGIVVRL SHHWVGMDFPNDVVGAAIIRDEINLRSQIMNNTYHVRVGVVILPDSGIVVRL SHHWVGMDFPNDVVGAAIIRDEINLRSQIMNNTYHVRVGVVILPDSGIVVRL	623 623 606 562 575 543 611
[Penaeus [monodon [Procambarus [Chiromantes [Plutella [Asbolus [Orussus	INDPCKLMLHLLISAA--EVVFKVEVILIPSPGFPSENFKYHGL----- INDPCKLMLHLLISAA--EVVFKVEVILIPSPGFPSENFKYHGL----- LSPKPKLMLHLLISAA--DLVIRADKDELVFNPTNFIIGSKNY----- INDPCKLMLHLLISAA--EVVFKVEVILIPSPGFPSENFKYHGL----- KIDPCKLMLHLLISAA--EVVFKVEVILIPSPGFPSENFKYHGL----- KIDPCKLMLHLLISAA--EVVFKVEVILIPSPGFPSENFKYHGL----- KIDPCKLMLHLLISAA--EVVFKVEVILIPSPGFPSENFKYHGL-----	675 675 660 612 627 602 670

Figura 5: Alinhamento da sequência da lacase de *Litopenaeus vannamei* com as sequências primárias dos modelos obtidos. Em verde escuro, resíduos conservados, em verde claro, semiconservados e em amarelo claro resíduos diferentes com algumas propriedades e funções químicas semelhantes, em branco resíduos diferentes que não apresentam nenhuma propriedade química semelhante. Os traços nas sequências (--) apontam os “gaps”.

Além disso, por meio do Pubchem, foi efetuada a coleta de dados/informações (bem como, a fórmula molecular, peso molecular, ponto de fusão e de ebulição, logP, solubilidade, toxicidade, dentre outros), em relação ao antraceno, que é o hidrocarboneto utilizado na pesquisa com o intuito de identificar a atividade da lacase no processo de degradação do mesmo.

De acordo com essas informações, fez-se necessária a construção de uma tabela (tabela 2). Uma vez que, o antraceno é um dos hidrocarbonetos encontrados nos ambientes aquáticos que vem causando prejuízos sem precedentes, desde a poluição até a morte dos que habitam naquele ecossistema (JEONG; CHO, 2005).

**Tabela 2:** Dados do respectivo hidrocarboneto sobre o qual a lacase age obtida pelo Pubchem.

<b>Hidrocarboneto</b>	<b>Antraceno</b>
<b>Pubchem CID</b>	8418
<b>Número CAS</b>	120-12-7
<b>Fórmula molecular</b>	C14H10
<b>Peso molecular</b>	178,23 g/mol
<b>Densidade</b>	1,25-1,28 g/cm <sup>3</sup>
<b>Aparência</b>	Incolor
<b>Ponto de fusão</b>	217 °C
<b>Ponto de ebulição</b>	340 °C
<b>Solubilidade em água (25°C)</b>	Insolúvel
<b>logP</b>	4,45
<b>Ponto de fulgor</b>	121°C
<b>Anéis aromáticos</b>	3 anéis
<b>Tóxico</b>	( X ) sim ( ) Não

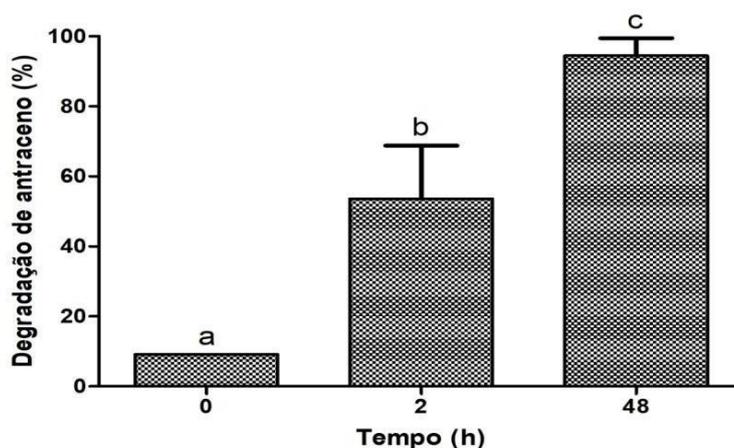
Como já mencionado anteriormente, os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAHs) são compostos químicos tóxicos presentes em produtos de origem petroquímica (NACCI et al., 2002; DODOR et al., 2004; RENGARAJAN et al., 2015; YUAN et al., 2017). Dessa forma, surge então a necessidade de degradar o antraceno e propor potenciais estratégias de biorremediação.

Então, a degradação do antraceno foi realizada a partir de 2 mL da lacase purificada. Onde a amostra foi encaminhada para leitura após 15 minutos da reação incubada, sendo submetida a leitura da absorbância apresentando 419 nm para a formação do 9,10-antraquinona que é o produto formado a partir da oxidação do antraceno, visto que, mediante estudos de citotoxicidade do antraceno e antraquinona foram avaliadas, e os resultados ilustraram que a

antraquinona é menos tóxica que o ANT (HU; WANG; HWANG,2009).

No entanto, no experimento de Alcade, Bulter, Arnold (2002), foi utilizado a lacase de dois fungos *Trametes versicolor* e *Myceliophthora thermophila* com potenciais redox muito diferentes e na presença de mediadores. Assim como foi relatado em outros estudos (JOHANNES; MAJCHERCZYC; HUTTERMANN, 1996), que a oxidação dos HPAs foi considerada melhorada devido à adição de compostos mediadores. Em particular, a lacase de *T. versicolor* apresentou níveis significativos de oxidação com acenafteno (100%), antraceno (95%), benzo[a]pireno (94%), acenaftileno (90%), perileno (90%), fluoreno (85%), e benzo[b]antraceno (60%). Por outro lado, *M. thermophila* lacase obteve um alto rendimento de oxidação apenas com antraceno (70%).

Comparando ao trabalho de Alcade, Bulter e Arnold (2002), onde eles ressaltam que a lacase sozinha também é capaz de oxidar xenobióticos, mas a atividade de lacase não mediada é muito baixa para aplicações práticas. Neste trabalho a lacase de *L. vannamei* apresentou uma taxa de degradação significativa, visto que, a oxidação do antraceno foi realizada na ausência de mediadores diferentemente do trabalho dele, conseguindo degradar 95% do mesmo hidrocarboneto (figura 6).



**Figura 6:** Acompanhamento da degradação do antraceno pela enzima lacase do camarão *Litopenaeus vannamei* na ausência de mediadores. O resultado encontra-se expresso pela média  $\pm$  desvio padrão ( $n=3$ ) do experimento realizado em triplicata, seguido pela análise estatística pela ANOVA e fator de Tukey ( $p < 0,05$ ), sendo indicado as diferenças estatísticas pela correspondência de letras diferentes (a,b,c). A) Assim que realizado o experimento no tempo de 0 horas já houve a degradação do antraceno de 10%. B) após o tempo de incubação de 2h houve um aumento na taxa de oxidação chegando a 50%. C) em 48h de incubação foi possível visualizar a maior atividade da enzima, conseguindo degradar 95% do antraceno.

## 6. CONCLUSÕES

Com relação a importância da aplicação da bioinformática no presente trabalho, pode-se concluir que a mesma é uma ferramenta chave para o desenvolvimento da pesquisa, uma vez que, todos os dados necessários bem como a obtenção da sequência fasta da enzima, o alinhamento de sequências, o percentual de identidade e os resíduos conservados foram obtidos por meio do auxílio de programas bioinformáticos e seus algoritmos, dessa forma, a bioinformática se mostra útil para o desenvolvimento de trabalhos relacionados a tecnologia genômica e proteômica.

Dessa forma, pode-se concluir que a enzima lacase do camarão mostrou-se benéfica para ser empregada no processo de biorremediação de ambientes marinhos contaminados pelos HPAs, visto que, a mesma obteve um resultado significativo na degradação do antraceno, conseguindo degradar 95% do antraceno na ausência de mediadores. Ou seja, podemos concluir que o este trabalho apresentou resultados promissores no processo de biodegradação do antraceno a partir do uso da lacase do camarão *Litopenaeus vannamei*, visto que, o objetivo de vários trabalhos é desenvolver uma lacase que funcione eficientemente na ausência de mediadores, uma vez que os mesmos são tóxicos, pouco solúvel e caro.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALCALDE, Miguel; BULTER, Thomas; ARNOLD, Frances H. Colorimetric Assays for Biodegradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by Fungal Laccases. *Journal of Biomolecular Screening*, v. 7, n. 6, p. 547–553, 1 dez. 2002.

AMARAL, C.A.B.; VICALVI, M.A.; BARRETO, L.A. & SANTANA, C.I., 1972. Recursos minerais da margem continental brasileira. *Anais do XXVI Congresso Brasileiro de Geologia*, 2: 289-299.

ANDRADE, J. A.; AUGUSTO, F.; JARDIM, I. C. S. F. Biorremediação de solos contaminados por petróleo e seus derivados. *Eclética Química*, São Paulo, v. 35, n. 3, p. 17-43, set. 2010.

APWEILER, R. (2004). UniProt: the universal protein knowledgebase, *Nucleic Acids Res.* 32: 115119.

ARORA, Daljit Singh; SHARMA, Rakesh Kumar. Ligninolytic Fungal Laccases and Their Biotechnological Applications. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 160:1760-1788, 2010.

ASGHER, M.; ASLAM, B.; IQBAL, H. M. N. Novel catalytic and effluent decolorization functionalities of sol-gel immobilized *Pleurotus ostreatus* IBL-02 manganese peroxidase produced from bio-processing of wheat straw. *Chinese Journal of Catalysis*, v. 34, p. 1756-1761, 2013.

BAAN, R; STRAIF, K; GROSSE, Y; SECRETAN, B; GHISSASSI, F. E; BOUVARD, V; BENBRAHIM-TALLAA, L; COGLIANO, V. Carcinogenicity of some aromatic amines, organic dyes, and related exposures. *Lancet Oncol* 2008; 9: 322–23.

BALAN, K.; SATHISHKUMAR, P.; PALVANNAN, T. Decolorization of malachite green by laccase: Optimization by response surface methodology. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, v. 43, p. 776–782, 2012.

BALDRIAN, P. “Fungal laccases – occurrence and properties”, *FEMS Microbiology Reviews*, Volume 30, Issue 2, pp. 215–22, 2006.

BAMFORTH, S.; SINGLETON, I. Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons: current knowledge and future directions. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, Sussex, v.80, n.7, p.723-736, 2005.

BENSON, D. A (2004). GenBank: update. *Nucleic Acids Res.*, 32: 23-26.

BERMAN, D. A (2000). The protein data bank, *Nucleic Acids Res.*, 28: 235242.

BÍCEGO, M. C. et. al. Poluição por Petróleo. In: BATISTA NETO, José Antônio; WALLNER-KERSANACH, Mônica; PATCHINEELAM, Soraya Maia. *Poluição Marinha*. Rio de Janeiro. Interciência, 2008.

BOZELLI, R. L.; LOPES, A. F.; SANTOS, L. F.; SILVA, J. M. C. Impactos ambientais da exploração e produção de petróleo na bacia de campos, RJ. Brasília, IV Encontro Nacional da Anppas, 2008.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Agropecuária e Abastecimento. **Plataforma tecnológica do camarão marinho cultivado**. Brasília: MAPA, 2001. 276p.

CAHÚ, Thiago Barbosa et al. Recovery of protein, chitin, carotenoids and glycosaminoglycans from Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) processing waste. *Process Biochemistry*. Recife, p.570–577. abr. 2012.

CAMARGO, MSFO; TOLEDO, MCF. Avaliação da ingestão de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA's) através da dieta, em diferentes regiões do Brasil. *Rev Bras Toxicol*. 2002; 14(2):23-30.

CARUSO, M. S. F.; ALABURDA, J. Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos - benzo(a)pireno: uma revisão. *Revista Instituto Adolfo Lutz*, v.67, p.1-27, 2008.

CAVALLAZZI, J. R. P; OLIVEIRA, M. G. A; KASUYA, M.C.M. Laccase production by *Lepistasordida*. **Brazilian Journal of Microbiology**. v. 35, p 261-263, 2004.

CETESB. **Efeitos do óleo nos organismos**. São Paulo: CETESB, 2020. Disponível em: <https://cetesb.sp.gov.br/emergencias-quimicas/tipos-de-acidentes/vazamentos-de-oleo/impactos-ambientais/efeitos-do-oleo-nos-organismos/#:~:text=%C3%93leos%20pesados%20e%20viscosos%20recobrem,levar%20os%20organismos%20%C3%A0%20morte..> Acesso em: 23 nov. 2020..

CHAKRADEO, P.P. et al. Effect of benzo(a)pireno and methyl (acetoxymethyl) nitrosamine on thymidine uptake and induction of aryl hydrocarbon hydroxylase activity in human fetal esophageal cells in culture. **Cellular Biology International**, Amsterdam, v.17, n.7, p.671-676,1993.

CHANG, B.; CHANG, Y. Biodegradation of toxic chemicals by *Pleurotus eryngii* in submerged fermentation and solid-state fermentation. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, Article in press, p. 1-7, 2014.

CLAUS, H. Laccases: structure, reactions, distribution. **Micron**, New York, v. 35. P. 93-96, 2004.

CLIFON, A. *Oil Spills – Environmental Issues, Prevention and Ecological Impacts*. Nova Iorque: Nova Publisher, 2014, 241 p.

DANTAS, Carolina; OLIVEIRA, Elida; MANZANO, Fábio; FIGUEIREDO, Patrícia. **Óleo no Nordeste: veja a evolução das manchas e quando ocorreu o pico do desastre que completa 2 meses**. G1. 2019. Disponível em: <<https://g1.globo.com/natureza/desastre-ambiental-petroleopraias/noticia/2019/10/30/oleo-no-nordeste-veja-a-evolucao-das-manchas-e-quando-ocorreu-o-picodo-desastre-que-completa-2-meses.ghtml>>. Acesso em: 09 Out. 2022.

DARONCH, N.A.; KELBERT, M.; PEREIRA, C.S.; ARAÚJO, P.H.H.; OLIVEIRA, D. Elucidating the choice for a precise matrix for laccase immobilization: A review. *Chemical Engineering Journal*, v. 397, 125506, 2020.



HORNUNG, U. (1997) **Soil venting**. Disponível em: <<http://cage.rug.ac.be/nms/LHKW/Ihkw.htm>>. Acesso em: 16/10/2022.

HU, X.; WANG, P.; HWANG, H. Oxidation of anthracene by immobilized laccase from *Trametes versicolor*. *Bioresource Technology*, v. 100, n. 21, p. 4963- 4968, 2009.

INSTITUTO BRASILEIRO DE MINERAÇÃO - **IBRAM. Economia Mineral 2020**. Disponível em: . Acesso em 30/01/2020.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. IARC. **Certain polycyclic aromatic hydrocarbons and heterocyclic compounds**. Monographs on the evaluation of carcinogenic risk of the chemical to man. Lyon, France: World Health Organization, v.3, n.p. 1973.

JAYARAM, B; DHINGRA, P. (2010). *Bioinformatics for a better tomorrow*. Indian Institute of Technology, HauzKhas, New Delhi - 110016, India.

JEONG, W.-G; CHO, S.-M. 2005. The effects of polycyclic aromatic hydrocarbon exposure on the fertilization and larval development of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Journal of Shellfish Research*, 24(1), 209–213.

JOHANNES, C; MAJCHERCZYK, A; HUTTERMANN, A. Degradation of anthracene by laccase of *Trametes versicolor* in the presence of different mediators' compounds. *Appl Microbiol Biotechnol* 1996;46:313-317.

KATO-SCHWARTZ, C. G. et al. aplicação de lacases em síntese orgânica para obtenção de bioativos com atividade antioxidante: uma revisão. *CIAGRO* 2020.

KEMENA, C; NOTREDAME, C 2009. Upcoming challenges for multiple sequence alignment methods in the high-throughput era. *Bioinformatics* 25: 2455–2465.

KENNISH, Michael J (1991). *Ecology of estuaries: anthropogenic effects*. Boca Raton, USA: CRC Press: 512 pp.

KINCH, L. N., GRISHIN, N. V. Evolution of protein structures and functions. *Current Opinion in Structural Biology*, 12(3), 400–408, 2002.

KUMAR, S.V.S.; Phale, P.S.; Durani, S.; Wangikar, P.P. Combined sequence and structure analysis of the fungal laccase family. *Biotechnol. Bioeng.* **2003**, 83, 386–394.

KUMOR, S. (2009). Introduction to bioinformatics, scope and potential of bioinformatics. Disponível em: <<http://www.bioinformaticsweb.org/catagory/bioinformatics.html>>. Acesso em: 12/10/2022.

LEONTIEVSKY, A. A. Et al. Blue and yellow laccases of ligninolytic fungi. **FEMS Microbiology Letters**, 156; 9 – 14, 1997a.

LI, J.; LI, F.; LIU, Q. PAHs behavior in surface water and groundwater of the Yellow River estuary: Evidence from isotopes and hydrochemistry. **Chemosphere**, v. 178, p. 143-153, 2017.

LI, X.; WU, Y.; LIN, X.; ZHANG, J.; ZENG, J. Dissipation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in soil microcosms amended with mushroom cultivation substrate. *Soil Biology & Biochemistry*, v. 47, p. 191-197, 2012.

LIMA, P. C. R.; LIMA, P. G. D. Análise das rodadas de licitação previstas para o pré-sal. Consultoria Legislativa – Estudo técnico, 45 p., 2017.

LLORET, L. et al., Continuous operation of a fluidized bed reactor for the removal of estrogens by immobilized laccase on Eupergit supports. **Journal of Biotechnology** 162(4):404-406, 2012.

LUSCOMBE, N. M., Greenbaum, D. and Gerstein, M. (2001). What is Bioinformatics? A Proposed Definition and Overview of the Field. New Haven, USA.

MAJEAU, Josée-Anne; Brar, Satinder K.; Tyagi, Rajeshwar Dayal. Laccases for removal of recalcitrant and emerging pollutants. **Bioresource Technology** 101:2331-2350, 2010.

MANCINI, L.; SALA, S. Social impact assessment in the mining sector: Review and comparison of indicators frameworks. **Resources Policy**, v.57, p. 98-111, 2018.

MARTINEZ-CORDOVA, L.R.; A. PORCHAS-CORNEJO; H. VILLARREALCOLEMNARES; J.A. CALDERON-PEREZ & J.N. NARANJO-PARAMO. 1998. Evaluation of Three Feeding Strategies on the Culture of White Shrimp *Penaeus vannamei* Boone 1931 in low water exchange ponds. *Aquacultural Engineering*, Amsterdam, 17: 21-28.

MASHI, H. B. (2013) - **Biorremediation: Issues an Challenges**; jornal JORIND. vol: 11 (2) pp: 1596-8303.

MEIRE, R.O.; AZEVEDO, A.; TORRES, J.P.M. Aspectos ecotoxicológicos de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos. *Oecologia Brasiliensis*, v.11, n.2, p.188-201, 2007.

MIGLIORE, L.; FIORI, M.; SPADONI, A.; GALLI, E. Biodegradation of oxytetracycline by *Pleurotus ostreatus* mycelium: a mycoremediation technique. *Journal of Hazardous Materials*, v. 215– 216, p. 227– 232, 2012.

MISHRA U., R. Lal, D. Liu, and M. Van Meirvenne. 2010. Predicting the spatial variation of soil organic carbon pool at a regional scale, **Soil Science Society of America Journal**, 74: 906- 914.

MUÑIZ-MOURO, A.; GULLÓN, B.; LÚ-CHAU, T.; MOREIRA, M.; LEMA, J.; EIBES, G. Laccase Activity as an Essential Factor in the Oligomerization of Rutin. **Catalysis**, v. 8(321), p. 1–15, 2018.

N. Jaiswal, V. P. Pandey, U. N. Dwivedi. Purification of a thermostable alkaline laccase from papaya (*Carica papaya*) using affinity chromatography, *Internacional Journal of Biological Macromolecules*. 2015 Jan;72: 326-32. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2014.08.032.

NACCI, D. E.; KOHAN, M.; PELLETIER, M.; GEORGE, E. Effects of benzo[a]pyrene exposure on a fish population resistant to the toxic effects of dioxin-like compounds. **Aquatic Toxicology**, v. 57, n. 4, p. 203-215, 2002.

NAGHDI, M.; TAHERAN, M.; BRAR, S.K.; KERMANSHAHI-POUR, A.; VERMA, M.; SURAMPALLI, R.Y. Fabrication of nanobiocatalyst using encapsulated laccase onto chitosannanobiochar composite. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 1, p. 530–536, 2019.

NEMADZIVA, B.; ROES-H, M. L.; KOORBANALLY, N.; KUDANGA, T. Small laccase-catalyzed synthesis of a caffeic acid dimer with high antioxidant capacity. **Process Biochemistry**, v. 69, p. 99–105, 2018.

NILGES, M; LINGE, J.P. (2009). *Bio-Informatique Structurale*. Institut Pasteur, F-75015 Paris, France.

PACHECO, Sabrina M. V.; SOARES, Carlos Henrique L. **Imobilização e caracterização de lacase e seu uso na biodegradação de efluentes de indústrias papeleiras**. *Quím. Nova*, São Paulo , v. 37, n. 2, p. 209- 214, Apr. 2014 . Available from . access on 03 Set. 2022.

PENA, Rodolfo F. Alves. **Impactos ambientais da Mineração**. 2016, Mundo Educação. Disponível em: < <http://mundoeducacao.bol.uol.com.br/geografia/impactos-ambientaismineracao.htm>> Acesso em 09 out. 2022.

NETTO, A.D.P; MOREIRA, J.C.; DIAS, A.E.X.O.; ARBILLA, G.; FERREIRA, L.F.V.; OLIVEIRA, A.S.; BAREK, J. Avaliação da contaminação humana por hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) e seus derivados nitrados (NHPAs): uma revisão metodológica. **Química Nova**, v.23, p.765-773, 2000.

PEREZ-UMPHREY, A. A.; BURNS, C. M.; STOUFFER, P. C.; WOLTMANN, S.; TAYLOR, S. S. Polycyclic aromatic hydrocarbons exposure in seaside sparrows (*Ammodramus maritimus*) following the 2010 Deepwater Horizon oil spill. *Science of the Total Environment*,v. 630, p. 1086-1094, 2018.

PIONTEK, K.; ANTORINI, K.; CHOINOWSKI, T. Crystal Structure of a Laccase from the Fungus *Trametes versicolor* at 1.90-Å Resolution Containing a Full Complement of Coppers', *Journal of Biological Chemistry*, v. **277**, n. 40, p . 37663-37669, 2002.

PONTES, Cibele S.; ARRUDA, Maria de F. Comportamento de *Litopenaeus vannamei* (Boone)(Crustacea, Decapoda, Penaeidae) em função da oferta do alimento artificial nas fases clara e escura do período de 24 horas. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 22, n. 3, p. 648-652, 2005.

POTIN, O. et al. Bioremediation of an aged polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs)-contaminated soil by filamentous fungi isolated from the soil. **International Biodeterioration and Biodegradation**, Oxford, v.54, n.1, p.45-52, 2004.

- RANGELOV, Stoyan; NICELL, Jim A. A model of the transient kinetics of laccase-catalyzed oxidation of phenol at micromolar concentrations. **Biochemical Engineering Journal**, 99:1-15, 2015.
- RANJAN, R. Assessing the impact of mining on deforestation in India. **Resources Policy**, v. 60, p. 25-35, 2019.
- RAO, V. S., Das, S.K., Rao, V.J and Srinubabu, G. (2008).Recent developments in life sciencesresearch: Role of Bioinformatics. *African Journal of Biotechnology* 7 (5): 495-503.
- REANO, A. F.; PION, F.; DOMENEK, S.; DUCROT, P-R.; ALLAIS, F. Chemo-enzymatic preparation and characterization of renewable oligomers with bisguaiacol moieties: promising sustainable antiradical/antioxidant additives. **Green Chemistry**, v. 18(11), p. 3334-3345, 2016.
- RENGARAJAN, T., RAJENDRAN, P.; NANDAKUMAR, N.; LOKESHKUMAR, B.; RAJENDRAN, P.; NISHIGAKI, I. Exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons with special focus on cancer. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 5, n. 3, p. 182-189, 2015.
- RINGLING, D.; VAN ALFEN, N.K. Extra and intracellular laccases of the Chestnut Blight fungus, *Cryphonectria parasitica*. **Appl. Environ. Microbiol.** v.59, p.3634-3639, 1993.
- RIOS, M. C. **Capacidade do sedimento do estuário do Paraguaçu-BA de formar agregado óleo-material particulado em suspensão (OSA)**. 2014. 65 f. Monografia (Graduação em Oceanografia) – Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2014.
- RIVA, S. Laccases: blue enzymes for green chemistry. **TRENDS in Biotechnology**, 24, 219 – 226, 2006.
- RODRIGUES, M. R.; SUSLICK, S. B. An overview of Brazilian Petroleum Exploration Lease Auction. *Terrae*, v. 6, n. 1, p. 6-20, 2009.
- SAKURAI, T; KATAOKA, K. Estrutura e função do cobre tipo I em oxidases multicobre. *Célula. Mol. Ciência da Vida*. **64** , 2642(2007).
- SAVITZ, D. A; ANDREWS, K. W. Review of epidemiologic evidence on benzene and lymphatic andhematopoietic cancers. *Am J Ind Med* 1997; 31:287-95.
- SHLEEV, Se. et al. Interaction of fungal laccases and laccase-mediator systems with lignin. **Enzyme and Microbial Technology**, 39(4):841-847, 2009.
- SINGH, R.; AHLAWAT, O. P.; RAJOR, A. Identification of the potential of microbial combinations obtained from spent mushroom cultivation substrates for use in textile effluent decolorization. *Bioresource Technology*, v. 125, p. 217–225, 2012.
- SUTTO, L., MARSILI, S., VALENCIA, A., GERVASIO, F. L.From residue coevolution to protein conformational ensembles and functional dynamics.PNAS.1-6, 2015.

THEERACHAT, M; GUIEYSSE, D; MOREL, S; REMAUD-SIMÉON, M; CHULALAKSANANUKUL, W. Lacases de organismos marinhos e suas aplicações na biodegradação de poluentes tóxicos e ambientais: uma revisão. *Appl Biochem Biotechnol* 187, 583–611 (2018).

TOST, M.; HITCH, M.; CHANDURKAR, V.; MOSER, P.; FEIEL, S. The state of environmental sustainability considerations in mining. *Journal of Cleaner Production*, v. 182, p. 969-977, 2018.

TOUAHAR, I. E. et al. Characterization of combined cross-linked enzyme aggregates from laccase, versatile peroxidase and glucose oxidase, and their utilization for the elimination of pharmaceuticals. *Science of the Total Environment*, 481:90-99, 2014.

TRAMONTANO, A.L. (2009). Bioinformatics. In: Encyclopedia of Life Sciences (ELS). John Wiley & Sons, Ltd: Chichester. DOI: 10.1002/9780470015902.a0001900.pub2.

UNITED STATES DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES - USDHS. **Toxicological profile for polycyclic aromatic hydrocarbons**. In: U.S.. ATSDR, 1995. Atlanta, GE.

VEIGA, I.G. **Avaliação da origem dos hidrocarbonetos em sedimentos superficiais de manguezais da região norte da baía de Todos os Santos / Bahia**. 2003. 224 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Reservatório e de Exploração) - Centro de Ciência e Tecnologia, Universidade Estadual do Norte Fluminense, Macaé, 2003. august 1995. 454p.

VERSCHUEREN, K. **Handbook of environmental data of organic chemicals**. 4th ed. Chichester, England: Wiley, 2001. 2416p.

VIDALI, M. (2001) - **Bioremediation - An overview**; IUPAC, Pure and Applied Chemistry 73,1163–1172.

WALES, J. (2009). Bioinformatics [http://en.wikipedia.org/wiki/Bioinformatics#Web\\_services\\_in\\_bioinformatics](http://en.wikipedia.org/wiki/Bioinformatics#Web_services_in_bioinformatics).

XIONG, J. (2009). Essential bioinformatics: introduction and biological databases. Cambridge University press, USA. <http://www.cambridge.org/catalogue>.

YUAN, K.; CHEN, B.; QING, Q.; ZOU, S.; WANG, X.; LUAN, T. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) enrich their degrading genera and genes in humanimpacted aquatic environments. *Environmental Pollution*, v. 230, p. 936-944, 2017.