



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
CURSO DE BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

MARIA EDUARDA ALVES DA SILVA

**PRODUÇÃO E PURIFICAÇÃO DE LACASES DE *Lentinus crinitus* UCP 1206
OBTIDAS EM BORRA DE CAFÉ E AVALIAÇÃO DO SEU POTENCIAL NA
DEGRADAÇÃO *IN VITRO* DA MELANINA PARA APLICAÇÕES EM
HIPERPIGMENTAÇÃO**

RECIFE
2026

MARIA EDUARDA ALVES DA SILVA

**PRODUÇÃO E PURIFICAÇÃO DE LACASES DE *Lentinus crinitus* UCP 1206
OBTIDAS EM BORRA DE CAFÉ E AVALIAÇÃO DO SEU POTENCIAL NA
DEGRADAÇÃO *IN VITRO* DA MELANINA PARA APLICAÇÕES EM
HIPERPIGMENTAÇÃO**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientador (a): Raquel Pedrosa Bezerra
Coorientador (a): Anna Gabrielly Duarte
Neves

RECIFE

2026

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Sistema Integrado de Bibliotecas da UFRPE
Bibliotecário(a): Suely Manzi – CRB-4 809

S586p Silva, Maria Eduarda Alves da.
Produção e purificação de lacases de *Lentinus crinitus* UCP 1206 obtidas em borra de café e avaliação do seu potencial na degradação *in vitro* da melanina para aplicações em hiperpigmentação / Maria Eduarda Alves da Silva. – Recife, 2026.

56 f.; il.

Orientador(a): Raquel Pedrosa Bezerra.

Co-orientador(a): Anna Gabrielly Duarte Neves.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Bacharelado em Ciências Biológicas, Recife, BR-PE, 2026.

Inclui referências.

1. Enzimas de fungos. 2. Fermentação. 3. Melanina. 4. Borra de café 5. Inibidores enzimáticos. I. Bezerra, Raquel Pedrosa, orient. II. Neves, Anna Gabrielly Duarte, coorient. III. Título

CDD 574

MARIA EDUARDA ALVES DA SILVA

**PRODUÇÃO E PURIFICAÇÃO DE LACASES DE *Lentinus crinitus* UCP 1206
OBTIDAS EM BORRA DE CAFÉ E AVALIAÇÃO DO SEU POTENCIAL NA
DEGRADAÇÃO *IN VITRO* DA MELANINA PARA APLICAÇÕES EM
HIPERPIGMENTAÇÃO**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de Ciências
Biológicas da Universidade Federal Rural
de Pernambuco, como requisito parcial
para obtenção do título de Bacharel em
Ciências Biológicas.

Aprovado em: 11/02/2026

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Raquel Pedrosa Bezerra (Orientadora)

Universidade Federal Rural de Pernambuco

Dra. Yanara Alessandra Santana Moura (Examinador Interno)

Universidade Federal Rural de Pernambuco

Dra. Kethylen Barbara Barbosa Cardoso (Examinador Externo)

Universidade de Pernambuco

AGRADECIMENTOS

Agradeço, em primeiro lugar, à Universidade Federal Rural de Pernambuco, instituição que me acolheu e que foi fundamental na minha formação acadêmica e pessoal. Durante o curso de Bacharelado em Ciências Biológicas, encontrei não apenas conhecimento, mas também apoio, incentivo e oportunidades que contribuíram diretamente para o meu crescimento. Sou grata aos professores, gestores e coordenadores que caminharam comigo ao longo dessa trajetória, oferecendo orientação, dedicação e compromisso com a educação.

Dirijo meus agradecimentos a todos os integrantes do LabioprotecBio, o Laboratório de Avanços em Biotecnologia de Proteínas e Tecnologia de Bioativos. Foi nesse ambiente que desenvolvi boa parte das habilidades e experiências que levarei para minha vida profissional. Meu reconhecimento especial vai à professora Raquel Pedrosa Bezerra, minha orientadora, e à coorientadora Anna Gabrielly Duarte Neves. Ambas tiveram papel central na minha formação científica, compartilhando ensinamentos, corrigindo meus caminhos e contribuindo para que eu pudesse evoluir. Muito do que tenho a oferecer hoje como futura profissional é fruto da dedicação e paciência delas. Agradeço também ao pessoal do laboratório LIBAS, da UPE, cuja parceria com o nosso laboratório foi de grande importância. Agradeço ainda ao apoio institucional recebido pelo CNPq, CAPES e FACEPE que financiaram direta e indiretamente os meus projetos e foram essenciais para o desenvolvimento deste trabalho e para minha formação científica.

À minha família, deixo minha gratidão mais profunda. Foram eles que me sustentaram em todos os sentidos, oferecendo apoio emocional, estrutural e econômico para que eu pudesse prosseguir na área acadêmica. Ter uma base sólida e presente foi essencial para que eu tivesse o privilégio de chegar até aqui. Registro ainda meu agradecimento aos amigos que construí ao longo da graduação, cada um deles fez parte dessa trajetória de maneira única, oferecendo companhia, afeto, parceria e momentos que tornaram este percurso mais leve e especial. São laços que levarei comigo muito além dos limites da universidade.

A todos que, de alguma forma, contribuíram para que este trabalho se tornasse possível, deixo meu sincero agradecimento.

RESUMO

As lacases são enzimas oxidativas produzidas por fungos ligninolíticos com amplo potencial biotecnológico, especialmente na oxidação de compostos fenólicos e pigmentos complexos. Este trabalho teve como objetivo produzir e purificar lacases de *Lentinus crinitus* UCP 1206 por fermentação em estado sólido utilizando borra de café como substrato agroindustrial alternativo, bem como avaliar a eficiência da enzima na degradação *in vitro* da melanina. A fermentação foi conduzida por 15 dias a 28 °C, e a atividade enzimática da lacase do extrato bruto foi determinada utilizando os substratos ABTS e guaiacol, apresentando valores de 9,72 U/L e 47,67 U/L, respectivamente. A pré-purificação por precipitação salina evidenciou maior atividade frente ao ABTS na fração 0–40% de sulfato de amônio (101,25 U/L), enquanto a maior atividade frente ao guaiacol foi observada na faixa de 60–80% (82,52 U/L). A precipitação com solventes orgânicos resultou em aumento da atividade, destacando-se o etanol, que apresentou 166,85 U/L frente ao guaiacol, e a acetona, que concentrou duas isoformas, com 136,34 U/L para guaiacol e 91,11 U/L para ABTS. A purificação por cromatografia de troca aniônica em DEAE-Sephadex A50 resultou em uma fração com atividade de 1,94 U/L, atividade específica de 15,86 U/mg e recuperação de 4,0%. Na avaliação da degradação da melanina, a lacase purificada apresentou 28,77% de descoloração em 180 min e 36,08% após 24 h, enquanto o extrato bruto e a fração precipitada apresentaram valores inferiores, e o controle com enzima desnaturada não apresentou descoloração. Assim, os resultados confirmam o elevado potencial biotecnológico de *Lentinus crinitus* UCP 1206 para a produção de lacases em borra de café e demonstram que o grau de purificação enzimática é determinante para a eficiência da degradação da melanina.

Palavras-chave: Lacases fúngicas; Fermentação em estado sólido; Purificação enzimática; Degradação de melanina; Borra de café; Aplicações despigmentantes.

ABSTRACT

Laccases are oxidative enzymes produced by ligninolytic fungi with broad biotechnological potential, particularly in the oxidation of phenolic compounds and complex pigments. This study aimed to produce and purify laccases from *Lentinus crinitus* UCP 1206 through solid-state fermentation using spent coffee grounds as an alternative agroindustrial substrate, as well as to evaluate the enzyme's efficiency in the *in vitro* degradation of melanin. Fermentation was carried out for 15 days at 28 °C, and laccase activity in the crude extract was determined using ABTS and guaiacol as substrates, yielding activities of 9,72 U/L and 47,67 U/L, respectively. Pre-purification by ammonium sulfate precipitation showed higher activity toward ABTS in the 0–40% saturation fraction (101,25 U/L), while the highest activity toward guaiacol was observed in the 60–80% fraction (82,52 U/L). Organic solvent precipitation increased enzymatic activity, with ethanol yielding 166,85 U/L toward guaiacol and acetone concentrating two isoforms, with activities of 136,34 U/L for guaiacol and 91,11 U/L for ABTS. Purification by anion-exchange chromatography on DEAE-Sephadex A50 resulted in a fraction with an activity of 1,94 U/L, a specific activity of 15,86 U/mg, and an activity recovery of 4,0%. In the melanin degradation assay, purified laccase achieved 28,77% decolorization after 180 min and 36,08% after 24 h, whereas the crude extract and precipitated fraction showed lower values, and the thermally inactivated enzyme control showed no decolorization. Overall, the results confirm the high biotechnological potential of *Lentinus crinitus* UCP 1206 for laccase production using spent coffee grounds and demonstrate that the degree of enzymatic purification is a determining factor for melanin degradation efficiency.

Keywords: Fungal laccases; Solid-state fermentation; Enzyme purification; Melanin degradation; Spent coffee grounds; Depigmenting applications.

SUMÁRIO

| | |
|---|-----------|
| 1 INTRODUÇÃO..... | 14 |
| 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA..... | 17 |
| 2.1 MELANINA: ESTRUTURA, BIOSÍNTESE E MECANISMOS DE DEGRADAÇÃO..... | 17 |
| 2.1.1 Vias de melanogênese..... | 17 |
| 2.1.2 Mecanismos fisiológicos de degradação da melanina..... | 18 |
| 2.2 HIPERPIGMENTAÇÃO CUTÂNEA..... | 18 |
| 2.2.1 Melasma..... | 20 |
| 2.2.2 Hiperpigmentação pós-inflamatória..... | 22 |
| 2.2.3 Abordagens terapêuticas atuais para hiperpigmentação..... | 24 |
| 2.3 APLICAÇÕES DAS LACASES NA DEGRADAÇÃO DE MELANINA..... | 25 |
| 2.4 ESTRUTURA, PROPRIEDADES E MECANISMOS CATALÍTICOS DAS LACASES..... | 26 |
| 2.5 LENTINUS CRINITUS COMO FONTE FÚNGICA PARA PRODUÇÃO DE LACASE..... | 28 |
| 2.6 APROVEITAMENTO DA BORRA DO CAFÉ NO CULTIVO FÚNGICO PARA PRODUÇÃO DE LACASE..... | 30 |
| 3 OBJETIVOS..... | 33 |
| 3.1 GERAL..... | 33 |
| 3.2 ESPECÍFICO..... | 33 |
| 4 MATERIAIS E MÉTODOS..... | 34 |
| 4.1 MICRORGANISMOS..... | 34 |
| 4.2 RESÍDUOS DE CAFÉ USADO..... | 34 |
| 4.3 PRODUÇÃO DE LACASE POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO (FES)..... | 34 |
| 4.4 EXTRAÇÃO E DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA LACASE..... | 35 |
| 4.5 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS..... | 36 |
| 4.6 PRÉ- PURIFICAÇÃO / PRECIPITAÇÃO COM SOLVENTES E SAL ORGÂNICO..... | 37 |
| 4.7 PURIFICAÇÃO DA LACASE POR CROMATOGRAFIA DE ALTA RESOLUÇÃO - FPLC..... | 37 |
| 4.8 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DA LACASE NA DEGRADAÇÃO DE MELANINA..... | 38 |
| 5 RESULTADOS E DISCUSSÕES..... | 39 |
| 5.1 PRODUÇÃO DA LACASE..... | 39 |
| 5.2 PROCESSO DE PRECIPITAÇÃO E PRÉ-PURIFICAÇÃO DA LACASE..... | 41 |
| 5.3 PURIFICAÇÃO DA LACASE POR CROMATOGRAFIA DE TROCA IÔNICA... 43 | |
| 5.4 ATIVIDADE DA LACASE NA DESCOLORAÇÃO DE MELANINA..... | 46 |
| 6 CONCLUSÕES..... | 49 |

| | |
|-------------------------|-----------|
| REFERÊNCIAS..... | 50 |
|-------------------------|-----------|

1 INTRODUÇÃO

A hiperpigmentação cutânea compreende um conjunto de distúrbios caracterizados pelo aumento focal ou difuso da produção e/ou deposição de melanina na epiderme ou derme. Entre as formas mais prevalentes estão a hiperpigmentação pós-inflamatória (HPI), como a hiperpigmentação pós-acne, o lentigo solar e a melnose pós-irradiação, condições frequentemente associadas a processos inflamatórios, dano à barreira cutânea, estímulo UV crônico e ativação anômala de melanócitos e queratinócitos (Cestari; Dantas; Boza, 2014). A HPI, em particular, resulta de eventos inflamatórios prévios, como acne, dermatites irritativas, queimaduras ou procedimentos estéticos, que desencadeiam liberação de citocinas, estresse oxidativo e aumento da transferência de melanossomas, levando ao desenvolvimento de máculas acastanhadas persistentes, especialmente em indivíduos de fototipos intermediários (III e IV) a elevados (V e VI) (Maghfour *et al.*, 2022). Assim, a hiperpigmentação representa um importante problema estético e psicológico, pois tende a ser crônica, recorrente e de resposta variável ao tratamento, exigindo estratégias terapêuticas seguras e de longo prazo (Shenoy; Madan, 2020).

O melasma por sua vez, é uma dermatose hiperpigmentar adquirida, crônica e recorrente, caracterizada pelo depósito irregular de melanina na epiderme e/ou derme, resultando em manchas acastanhadas simétricas, especialmente em regiões fotoexpostas como a face, o colo e os antebraços. Embora não represente risco direto à saúde física, essa condição afeta significativamente a qualidade de vida, interferindo na autoestima, no bem-estar psicológico e na vida social, sobretudo em mulheres de fototipo alto (fototipos cutâneos mais escuros, IV a VI na classificação de Fitzpatrick) e em idade fértil (Handel; Miot; Miot, 2014). A fisiopatologia do melasma envolve um conjunto multifatorial de mecanismos: alterações hormonais, predisposição genética, estresse oxidativo, resposta inflamatória exacerbada, angiogênese dérmica e exposição à radiação ultravioleta A (UVA) e à luz visível, sendo esta última capaz de ativar melanócitos por meio de fotossensores específicos (Espósito *et al.*, 2022).

Os tratamentos convencionais dessas alterações pigmentares cutâneas incluem compostos despigmentantes como hidroquinona, ácido tranexâmico, ácido

kójico, retinóides e corticosteroides, além de procedimentos como *peelings* químicos, microagulhamento e lasers fracionados. No entanto, essas abordagens enfrentam limitações importantes, incluindo o surgimento de efeitos adversos como dermatite de contato, ocronose exógena, irritações cutâneas, além do risco de rebote pigmentar após suspensão do tratamento, especialmente em indivíduos de pele mais escura (Jiryis *et al.*, 2024).

Estas limitações impulsionam a busca por alternativas terapêuticas seguras, eficazes e ambientalmente sustentáveis. Neste contexto, a lacase (EC 1.10.3.2) se destaca como uma alternativa ecológica aos clareadores tradicionais. Essa enzima é uma multicobre oxidase amplamente distribuída em fungos basidiomicetos, que catalisa reações de oxidação de compostos fenólicos e aromáticos com uso de oxigênio molecular como aceptor final de elétrons, formando água como subproduto (Gigli *et al.*, 2022). Sua atuação na via da melanogênese se dá pela oxidação de intermediários como L-DOPA, dopacromo e dopaquinona, interrompendo a polimerização da melanina e promovendo a fragmentação de seus polímeros em produtos incolores (Park *et al.*, 2021). Além do efeito clareador, estudos demonstram que sistemas bioativos sintetizados com lacase e compostos fenólicos naturais podem exibir atividade antioxidante e propriedades anti-inflamatórias, favorecendo a integridade da barreira epidérmica e auxiliando nos processos de reparação tecidual em aplicações biomédicas; nesses sistemas, a lacase atua como catalisador verde para integrar compostos fenólicos (que conferem tais propriedades) em hidrogéis funcionais (Zhong *et al.*, 2018).

A produção dessa enzima pode ser potencializada pelo uso de resíduos agroindustriais como substratos fermentativos (Wang *et al.*, 2019a). Dentre esses subprodutos, a borra de café, subproduto do processamento do café, apresenta composição rica em carbono, compostos fenólicos, polissacarídeos e cafeína, o que favorece a indução da via secundária fúngica e a secreção de enzimas ligninolíticas (França *et al.*, 2025). *Lentinus crinitus* UCP 1206, um basidiomiceto de apodrecimento branco, destaca-se como produtor de lacases, com alta afinidade por meios contendo resíduos lignocelulósicos como a borra de café (França *et al.*, 2025). Dessa forma, o presente trabalho tem como objetivo investigar a viabilidade do uso da lacase produzida por *Lentinus crinitus* UCP 1206 cultivado em borra de café por fermentação em estado sólido, como potencial ativo para degradação de melanina, e

visando aplicações futuras em formulações tópicas voltadas ao tratamento do melasma.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 MELANINA: ESTRUTURA, BIOSÍNTESE E MECANISMOS DE DEGRADAÇÃO

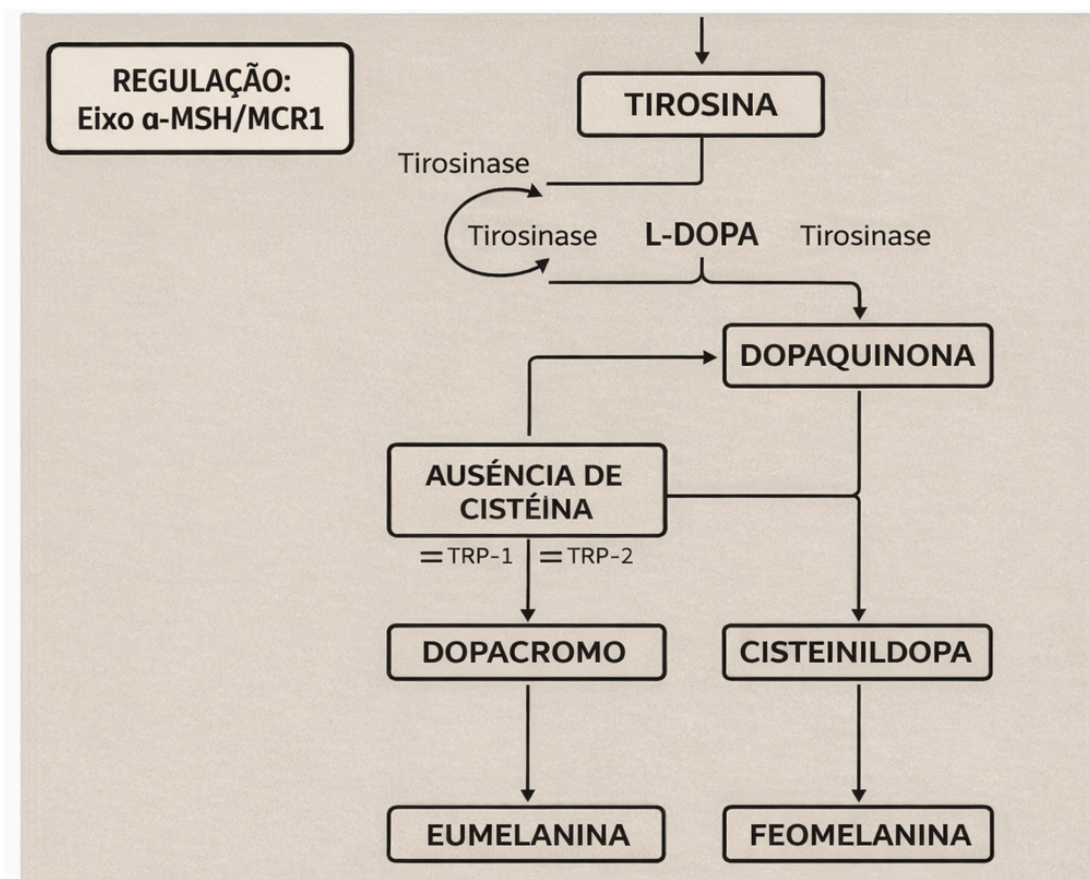
A melanina é um biopolímero complexo responsável pela coloração da pele, cabelos e olhos, além de atuar como importante mecanismo de defesa contra radiação ultravioleta e estresse oxidativo. Estruturalmente, a melanina é composta por unidades derivadas da oxidação da tirosina, formando polímeros heterogêneos com propriedades físico-químicas distintas. As principais classes são a eumelanina, de coloração marrom-escura a negra, e a feomelanina, de tonalidade amarelada a avermelhada. A proporção entre esses tipos determina variações individuais de pigmentação (Snyman *et al.*, 2024).

A biossíntese da melanina ocorre nos melanosomas, organelas especializadas dos melanócitos, que passam por um processo de maturação dividido em quatro estágios. Nessas estruturas, a tirosinase e proteínas relacionadas, como TRP-1 e TRP-2, catalisam reações que levam à formação dos diferentes tipos de melanina. A transferência dos melanosomas maduros para os queratinócitos completa o processo pigmentário que define a coloração cutânea. Além disso, mecanismos de degradação do pigmento, como vias lisossomais e autofágicas, desempenham papel na regulação fina da pigmentação, evitando acúmulo excessivo de melanina (Slominski *et al.*, 2004).

2.1.1 Vias de melanogênese

A melanogênese inicia-se com a oxidação da tirosina à L-DOPA e, posteriormente, à dopaquinona, reações catalisadas principalmente pela enzima tirosinase, como presente na figura 1. A partir da dopaquinona, o caminho metabólico diverge para a síntese de eumelanina ou feomelanina. Na ausência de cisteína, a dopaquinona sofre ciclização intramolecular e forma dopacromo, levando à produção de eumelanina por meio das enzimas TRP-1 e TRP-2. Quando a cisteína está presente, ocorre formação de cisteinildopa, originando feomelanina (Snyman *et al.*, 2024).

Figura 1 - Cascata oxidativa da tirosina durante o processo de melanogênese.



Fonte: O autor, 2025.

A ativação da melanogênese é regulada por múltiplas vias de sinalização, sendo a principal delas o eixo α -MSH/MCR1, que aumenta a atividade tirosinásica via proteína CREB. Fatores externos como radiação ultravioleta, espécies reativas de oxigênio e mediadores inflamatórios também modulam a síntese de melanina ao estimular a expressão de genes melanogênicos. Além disso, processos inflamatórios crônicos e estresse oxidativo reduzem mecanismos antioxidantes naturais, contribuindo para maior estímulo melanocítico (Kim; Lee, 2023).

2.1.2 Mecanismos fisiológicos de degradação da melanina

A degradação da melanina é um processo essencial para a renovação pigmentária e ocorre predominantemente por vias lisossomais e autofágicas. Ao longo do ciclo epidérmico, queratinócitos contendo melanosomas são gradualmente transportados para camadas superficiais, onde a melanina é fragmentada e eliminada com a descamação cutânea. Esse turnover contribui para a remoção fisiológica do pigmento (Kim *et al.*, 2020; Murase *et al.*, 2013; Zhao, 2020).

Além do turnover epidérmico, estudos recentes demonstraram que mecanismos de autofagia, especialmente mediados pela via Nrf2/p62, participam da degradação ativa de melanosomas. A ativação dessa via leva ao recrutamento de componentes autofágicos que reduzem a quantidade de melanosomas maduros sem interferir diretamente na síntese de melanina pelo melanócito. Alterações em processos autofágicos têm sido associadas a distúrbios pigmentares em que há acúmulo de melanina, sugerindo que a eficiência dessas vias é crucial para a manutenção da homeostase pigmentária (Kim *et al.*, 2020; Yun *et al.*, 2021).

2.2 HIPERPIGMENTAÇÃO CUTÂNEA

A hiperpigmentação cutânea compreende um conjunto de alterações caracterizadas pelo escurecimento localizado ou difuso da pele, decorrente do aumento na produção, transferência ou deposição de melanina. A melanina é sintetizada nos melanócitos por meio da via da melanogênese, que se inicia com a oxidação da tirosina a L-DOPA e, posteriormente, a dopaquinona, reações dependentes principalmente da enzima tirosinase (Snyman *et al.*, 2024). A partir desse ponto, diferentes etapas bioquímicas levam à formação de eumelanina ou feomelanina, processos que variam de acordo com a disponibilidade de cisteína, com a atividade enzimática e com o estágio de maturação dos melanosomas. A distribuição final do pigmento resulta da transferência dos melanosomas para os queratinócitos, que condicionam o padrão clínico das alterações pigmentares (Snyman *et al.*, 2024).

A hiperpigmentação possui etiologia multifatorial. Fatores extrínsecos, como radiação ultravioleta e luz visível, induzem aumento da atividade da tirosinase por mecanismos mediados por espécies reativas de oxigênio e por vias inflamatórias, especialmente em fototipos elevados. Além disso, poluição atmosférica e microinflamações crônicas também influenciam a produção de mediadores que estimulam a melanogênese, contribuindo para quadros pigmentares persistentes (Kim; Lee, 2023). Entre os fatores intrínsecos, destacam-se predisposição genética, disfunções hormonais, alterações na interação melanócito-queratinócito e processos que reduzem a degradação fisiológica dos melanosomas. Evidências recentes indicam que o estresse oxidativo desempenha papel central na amplificação da síntese de melanina, uma vez que a redução da atividade de mecanismos

antioxidantes modula vias de sinalização como NRF2, favorecendo maior acúmulo de pigmento (Kim; Lee, 2023).

Os padrões de hiperpigmentação variam conforme o nível de deposição do pigmento. Quando localizado na epiderme, o escurecimento tende a ser mais acastanhado e responsivo a tratamentos tópicos. Já a deposição dérmica, na qual melanófagos acumulam melanina, resulta em pigmentação acinzentada e resposta terapêutica mais limitada, dado o isolamento anatômico e a dificuldade de acesso aos cromóforos mais profundos (Snyman *et al.*, 2024). A interação entre processos inflamatórios, alteração da barreira cutânea e modulação da comunicação entre células epidérmicas contribui para a cronicidade dos quadros pigmentares, mesmo após interrupção dos fatores desencadeantes (Snyman *et al.*, 2024).

As estratégias terapêuticas para hiperpigmentação são diversas e dependem da etiologia. Tradicionalmente, agentes tópicos que reduzem a síntese de melanina são amplamente empregados, incluindo inibidores da tirosinase como hidroquinona, ácido kójico e arbutina. Apesar de efetivos, esses compostos apresentam limitações relacionadas à estabilidade, irritação e risco de induzir hipopigmentação residual, o que reforça o uso prudente e supervisionado (Gan, 2024). Em paralelo, pesquisas recentes vêm explorando abordagens que atuem na degradação do pigmento já formado, como a ativação de vias autofágicas capazes de promover diminuição de melanossomas maduros sem influenciar de modo direto a fisiologia basal dos melanócitos (Yun *et al.*, 2021). Também têm sido investigadas estratégias enzimáticas de descoloração da melanina, ainda restritas a modelos laboratoriais, mas com potencial de complementar terapias convencionais, sobretudo em pigmentações persistentes (Sadaqat *et al.*, 2020).

2.2.1 Melasma

Em distúrbios pigmentares como o melasma, o processo patológico vai além do simples excesso de melanina, envolvendo múltiplos mecanismos celulares, moleculares e teciduais. Embora a hiperpigmentação resulte do aumento da melanogênese, o melasma é atualmente compreendido como uma condição multifatorial, na qual há interação entre melanócitos hiperfuncionais, queratinócitos alterados, fibroblastos dérmicos, vasos sanguíneos e mediadores inflamatórios, caracterizando uma desregulação do microambiente cutâneo (Sanchez *et al.*, 2024;

Ali; Al-Niaimi, 2025). Além da exposição à radiação ultravioleta e à luz visível, fatores hormonais, como estrogênio e progesterona, predisposição genética e alterações da barreira cutânea contribuem para o desencadeamento e a persistência do quadro (Inova Saúde, 2022).

Evidências recentes destacam o papel central do estresse oxidativo e da inflamação crônica de baixo grau na ativação de vias pró-melanogênicas, com aumento da expressão da tirosinase, do fator de transcrição MITF e de outros genes relacionados à síntese de melanina, resultando em uma melanogênese patológica persistente (Kim *et al.*, 2023; Zhang *et al.*, 2025). Além disso, alterações estruturais na derme, como degradação de fibras colágenas, dano à membrana basal e aumento da vascularização, contribuem para a gravidade clínica e para a resistência terapêutica do melasma, reforçando seu caráter crônico e recorrente (Ali; Al-Niaimi, 2025).

Do ponto de vista clínico, o melasma manifesta-se por máculas hiperpigmentadas, irregulares, de coloração castanho-clara a castanho-escura, geralmente simétricas e sem alteração de relevo ou textura, caracterizando lesões maculares não inflamatórias (Sanchez *et al.*, 2024). As áreas mais frequentemente afetadas são as regiões fotoexpostas da face, incluindo os padrões centrofacial, malar e mandibular como presente na figura (2A). Entretanto, o melasma também pode acometer regiões extrafaciais, como pescoço, colo, antebraços e dorso das mãos, sobretudo em indivíduos com exposição solar crônica, sendo essas apresentações cada vez mais descritas na literatura (Research, Society And Development, 2023).

De acordo com a profundidade do depósito de melanina, o melasma é classificado em três tipos principais: epidérmico, quando a melanina se concentra predominantemente na epiderme; dérmico, quando ocorre deposição na derme com presença de melanófagos; e misto, que apresenta características de ambos e representa a forma mais comum na prática clínica, como presente da figura (2B) (Rcmos, 2025). Essa classificação possui relevância clínica e terapêutica, uma vez que o melasma dérmico e o misto tendem a responder de forma menos satisfatória aos tratamentos convencionais.

Figura 2 - Distribuição clínica do melasma facial nos padrões centrofacial, malar e mandibular (A) e tipos de melasma (B).



Fonte: Adaptado de Gupta e Doolan (2021).

Entre os principais fatores desencadeantes e agravantes do melasma destacam-se a exposição solar sem fotoproteção adequada, alterações hormonais associadas à gestação, uso de anticoncepcionais orais e terapias hormonais, além do calor, poluição, cosméticos irritantes e procedimentos dermatológicos inadequados, os quais intensificam o estresse oxidativo e a inflamação cutânea (Inova Saúde, 2022; Sanches *et al.*, 2024). O impacto psicossocial do melasma é significativo, uma vez que as lesões acometem áreas visíveis e podem comprometer a autoestima e a qualidade de vida dos indivíduos afetados, o que justifica a busca por estratégias terapêuticas seguras, eficazes e de longa duração, que atuem não apenas na redução da melanina, mas também no controle da inflamação e da disfunção do microambiente cutâneo (Ali; Al-Niaimi, 2025).

2.2.2 Hiperpigmentação pós-inflamatória

A hiperpigmentação pós-inflamatória (HPI) caracteriza-se pelo escurecimento cutâneo decorrente de processos inflamatórios ou injúrias prévias, diferente do melasma como mostra a quadro 1, sendo uma das condições pigmentares mais prevalentes em diversos grupos populacionais. A HPI ocorre em resposta ao aumento da produção ou liberação de melanina após uma agressão que desencadeia mediadores inflamatórios capazes de estimular a atividade melanocítica. Entre as causas mais frequentes, destacam-se acne, dermatites, queimaduras, procedimentos estéticos e traumas cutâneos diversos (Vashi *et al.*, 2023).

Quadro 1 – Diferenças clínicas e etiopatogênicas entre melasma e hiperpigmentação pós-inflamatória.

| Características | Melasma | Hiperpigmentação pós-inflamatória (HPI) |
|--------------------------------------|---|---|
| Definição | Distúrbio pigmentário crônico caracterizado por máculas hiperpigmentadas simétricas, principalmente em áreas fotoexpostas | Aumento da pigmentação cutânea secundário a um processo inflamatório prévio |
| Fator desencadeante principal | Exposição solar, alterações hormonais, predisposição genética | Inflamação cutânea prévia (acne, dermatites, procedimentos estéticos, queimaduras, infecções) |
| Distribuição das lesões | Predominantemente facial | Coincide com o local da lesão inflamatória prévia; distribuição irregular |
| Mecanismo fisiopatológico | Hiperatividade melanocítica estimulada por radiação UV, hormônios e fatores vasculares | Aumento da produção e/ou deposição de melanina após dano inflamatório |
| Simetria | Geralmente simétrico | Assimétrico |
| Evolução | Curso crônico, recorrente e de difícil tratamento | Pode ser transitória ou persistente, com possibilidade de regressão espontânea |
| Resposta ao tratamento | Geralmente lenta e recidivante | Em geral apresenta melhor resposta terapêutica |

Fonte: O autor, 2025. Com base em Passeron (2013) e Davis; Callender (2010).

O mecanismo fisiopatológico central envolve a ativação de vias inflamatórias que liberam citocinas, prostaglandinas e espécies reativas de oxigênio, promovendo aumento da expressão de tirosinase e de outras enzimas relacionadas à melanogênese. Esse processo leva à amplificação da síntese de melanina ou à

ruptura de melanócitos e melanosomas, com consequente deposição de pigmento nos queratinócitos epidérmicos e, em alguns casos, na derme. Quando o pigmento permanece na epiderme, a HPI apresenta coloração castanho-escura; quando há deposição dérmica, o tom torna-se acinzentado, e a resposta terapêutica tende a ser mais limitada (Vashi *et al.*, 2023).

Entre as causas inflamatórias, a acne vulgar é uma das principais responsáveis pela HPI, especialmente em indivíduos com fototipos III a VI. A formação de pápulas, pústulas ou nódulos desencadeia cascatas inflamatórias que persistem mesmo após a resolução das lesões, favorecendo a formação de manchas residuais que podem permanecer por meses ou anos (Vashi *et al.*, 2023). Em fototipos mais elevados, a sensibilidade dos melanócitos aos mediadores inflamatórios e à radiação ultravioleta intensifica a resposta pigmentária, contribuindo para a maior prevalência e impacto clínico nesses grupos (Vashi *et al.*, 2023).

A gestão da HPI requer necessariamente o controle da causa desencadeante, evitando recorrência do processo inflamatório. Medidas fotoprotetoras são fundamentais, uma vez que a exposição à radiação ultravioleta acentua e prolonga a pigmentação. Os agentes tópicos utilizados incluem inibidores da tirosinase, ácidos esfoliantes e compostos antioxidantes, que modulam tanto a síntese quanto a transferência de melanina. No entanto, dependendo da profundidade do pigmento, o tratamento pode demandar meses e apresentar respostas variáveis. A avaliação clínica criteriosa é essencial, especialmente em HPI decorrente de procedimentos estéticos, para evitar irritação adicional que possa agravar a pigmentação (Kaufman *et al.*, 2017).

2.2.3 Abordagens terapêuticas atuais para hiperpigmentação

As abordagens terapêuticas voltadas ao tratamento da hiperpigmentação têm como objetivos principais reduzir a síntese de melanina, modular processos inflamatórios associados e, em algumas situações, remover o pigmento já depositado. Entre as estratégias disponíveis, os inibidores de tirosinase constituem uma das classes mais empregadas: a hidroquinona atua por inibição competitiva da tirosinase, enquanto ácido kójico e arbutina interferem nas etapas iniciais da melanogênese; embora efetivos, esses compostos podem causar irritação e exigem

acompanhamento adequado (Moolla; Miller-Monthrope, 2022; Desai, 2014). Outras intervenções incluem peelings químicos, como ácidos glicólico, salicílico e mandélico, que promovem esfoliação controlada e aceleram o turnover epidérmico, além de retinóides, como adapaleno, tretinoína e tazaroteno, que estimulam a renovação da epiderme, aumentam a penetração de agentes tópicos e modulam a transferência de melanosomas. Antioxidantes, como vitamina C, niacinamida e ácido ferúlico, auxiliam na redução do impacto das espécies reativas de oxigênio e regulam vias inflamatórias relacionadas à pigmentação, podendo potencializar a ação de outros ativos (Pillai; Oresajó; Hayward, 2005).

Além dessas opções, agentes despigmentantes adicionais, como ácido azelaico, ácido tranexâmico e compostos de origem botânica (por exemplo, resveratrol e extratos de *Glycyrrhiza glabra*), atuam em diferentes etapas da via melanogênica, incluindo a modulação da inflamação e a redução da transferência de melanosomas. Procedimentos baseados em energia, como laser *Q-switched*, Nd:YAG fracionado e luz intensa pulsada, também são utilizados, promovendo fragmentação do pigmento e estímulo da renovação tecidual; entretanto, sua indicação deve ser individualizada, uma vez que podem induzir pigmentação paradoxal em fototipos mais elevados (Mckesey; Alster, 2020). A escolha terapêutica depende da profundidade do pigmento, do fototipo cutâneo, da etiologia da hiperpigmentação e da tolerância do paciente às diferentes modalidades disponíveis.

Apesar da ampla disponibilidade de abordagens terapêuticas para hiperpigmentação, muitas apresentam limitações importantes que justificam a busca por alternativas mais seguras e eficazes. Agentes tópicos tradicionais, como hidroquinona, retinóides e ácidos esfoliantes, estão frequentemente associados a irritação cutânea, dermatite de contato, ressecamento e risco de agravamento da pigmentação, especialmente em indivíduos com fototipos elevados, que possuem maior predisposição à resposta inflamatória exacerbada (Grimes, 2009). Procedimentos baseados em energia, como lasers e luz intensa pulsada, embora eficazes em alguns casos, podem desencadear hiperpigmentação paradoxal devido à inflamação pós-procedimento, além de apresentarem custo elevado e necessidade de equipamentos especializados, fatores que limitam sua aplicabilidade clínica (Lee *et al.* 2022). Outro desafio central é que a hiperpigmentação, sobretudo a

pós-inflamatória, tende a ser crônica e recidivante, de modo que terapias agressivas podem perpetuar o mesmo processo inflamatório que originou as lesões pigmentares, dificultando o controle a longo prazo (Vashi, N. A; Kundu, R. V. 2013). Diante dessas limitações, cresce o interesse por alternativas com melhor perfil de segurança, ação antioxidante e anti-inflamatória, e capacidade de modular a melanogênese sem induzir irritação ou sensibilização, reforçando a necessidade de soluções inovadoras e sustentáveis no tratamento da hiperpigmentação.

2.3 APLICAÇÕES DAS LACASES NA DEGRADAÇÃO DE MELANINA

A melanina é um polímero heterogêneo e de baixa solubilidade em água, que possui alta estabilidade química, o que dificulta sua degradação por métodos convencionais (Solano, 2014). Estudos recentes demonstram que as lacases têm capacidade de promover a despolimerização da melanina por meio da oxidação de seus grupos fenólicos, resultando em produtos de menor massa molecular, com coloração reduzida e menor visibilidade dérmica (Park *et al.*, 2021). Um bom exemplo dessa aplicação é o estudo de Park *et al.* (2021), no qual foi desenvolvido um sistema lacase-mediador utilizando acetoseringona como co-substrato natural, e esse sistema foi eficaz na descoloração de melanina sintética e melanina extraída de amostras humanas, destacando seu potencial como clareador biológico.

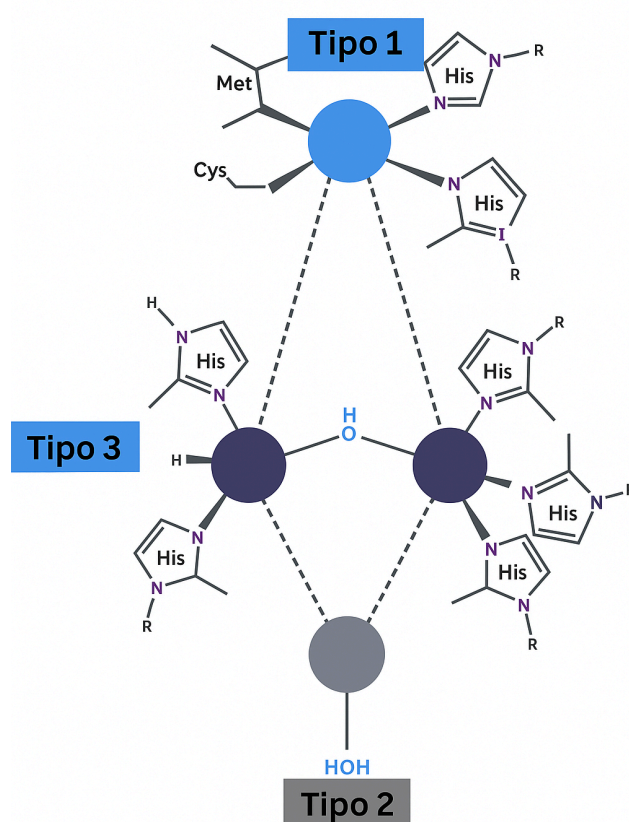
Ao atuar sobre o pigmento formado, a lacase diferencia-se de agentes despigmentantes que inibem a tirosinase, oferecendo uma abordagem pós-melanogênese (Park *et al.*, 2021). Isso é especialmente relevante em peles reativas ou sensíveis, pois reduz os riscos de resposta inflamatória e permite aplicações tópicas mais seguras. A utilização de mediadores naturais, como compostos fenólicos vegetais, amplia a gama de substratos-alvo da lacase e evita o uso de intermediários tóxicos (Park *et al.*, 2021). Ou seja, sistemas baseados em lacase-mediador representam, portanto, uma abordagem inovadora e sustentável para o manejo de hiperpigmentações dérmicas resistentes (Sadaqat *et al.*, 2020).

2.4 ESTRUTURA, PROPRIEDADES E MECANISMOS CATALÍTICOS DAS LACASES

As lacases (EC 1.10.3.2) possuem um sistema enzimático altamente especializado, com centros ativos de cobre (T1, T2, T3), como mostra a figura 3, que

promovem a oxidação de substratos fenólicos e a redução do oxigênio molecular a água (Solomon *et al.*, 2014). Esses centros de cobre funcionam de forma coordenada, transferindo elétrons do substrato oxidado até o oxigênio molecular, o que confere à enzima sua elevada eficiência catalítica. Essa propriedade redox é valiosa para aplicações dermatológicas, pois permite a modulação de compostos bioativos na pele sem gerar subprodutos tóxicos, um aspecto crítico para a segurança de produtos cosméticos aplicados topicamente.

Figura 3 - Sítios ativos da Lacase.



Fonte: Elaborado pelo autor com base em Boeckx *et al.* (2015).

Além disso, a lacase é capaz de oxidar compostos fenólicos e aminados presentes em pigmentos cutâneos ou substâncias pró-inflamatórias, favorecendo processos como despigmentação, uniformização do tom da pele e com potencial ação antisséptica (Solomon *et al.*, 2014).

Lacases de origem fúngica, como as produzidas por *Lentinus crinitus*, possuem alto grau de glicosilação, o que confere termoestabilidade, resistência à

oxidação e viabilidade em formulações tópicas (Rodríguez-Couto; Toca-Herrera, 2006). Essa glicosilação protege a estrutura da proteína contra desnaturação térmica e degradação por agentes oxidantes, além de contribuir para uma maior meia-vida da enzima em sistemas complexos como emulsões e géis dermatológicos. A presença desses grupos glicosídeos também favorece a interação da enzima com a matriz do produto e com a pele, ampliando seu tempo de ação e eficácia local (Giardina *et al.*, 2010). Sua ampla faixa de pH e temperatura ideal de atuação tornam essas enzimas apropriadas para sistemas cosméticos com diferentes bases e veículos, desde loções aquosas até cremes oleosos ou emulsões gelificadas, possibilitando formulações versáteis, estáveis e eficazes (Baldrian, 2006).

A lacase é também considerada um “green catalyst” pela baixa toxicidade, biodegradabilidade e compatibilidade com a pele, características que a diferenciam dos clareadores sintéticos convencionais, como a hidroquinona, que está associada a efeitos colaterais como irritação, reações alérgicas e risco de ocronose exógena (Khatami *et al.*, 2022).

2.5 *Lentinus crinitus* COMO FONTE FÚNGICA PARA PRODUÇÃO DE LACASE

Lentinus crinitus é um basidiomiceto ligninolítico pertencente à família Polyporaceae, encontrado predominantemente em regiões tropicais, onde coloniza troncos, galhos e resíduos vegetais em decomposição. Como fungo de podridão branca, apresenta a capacidade de degradar lignina de forma eficiente através da secreção de enzimas oxidativas extracelulares. Esse tipo de degradação é característico de basidiomicetos sapróbios da ordem Polyporales, que apresentam sistemas enzimáticos especializados para a despolimerização de lignina e outros compostos aromáticos (Janusz *et al.*, 2017). Do ponto de vista morfológico, *L. crinitus* possui basidiomas pileados, de consistência coriácea, com himênio poroide, crescimento lateral sobre madeira morta e presença de cistídios característicos, sendo considerado um decompositor ativo em ecossistemas florestais tropicais (Fabros *et al.*, 2022).

O gênero *Lentinus* inclui diversas espécies ligninolíticas reconhecidas por sua capacidade de produzir lacases (EC 1.10.3.2), manganês peroxidases e lignina peroxidases, fundamentais para a degradação da lignina. Lacases são enzimas multicobre amplamente distribuídas em basidiomicetos, e podem ser classificadas

em três tipos principais: lacases fúngicas típicas, lacases sensíveis a haletos e lacases de alto potencial redox, estas últimas comuns em fungos de podridão branca devido à capacidade de oxidar fenóis e estruturas aromáticas recalcitrantes (Giardina *et al.*, 2010). Em espécies do gênero *Lentinus*, predominam lacases de alto potencial redox, associadas a vias metabólicas adaptadas à decomposição de madeira dura, à oxidação de compostos derivados da lignina e ao uso de mediadores naturais, como ácidos fenólicos liberados durante a degradação da parede celular vegetal (Christopher *et al.* 2014).

Espécies de *Lentinus* e outros Polyporaceae apresentam ainda características ecológicas e fisiológicas que favorecem sua atuação como bons decompositores em ambientes tropicais: crescimento rápido em madeira morta, tolerância a oscilações de umidade, habilidade de colonização secundária em estágios avançados de decomposição e produção elevada de enzimas extracelulares quando expostas a substratos ricos em fenóis ou lignina. (Lundell *et al.*, 2010). Estudos de Santana *et al.*, (2018) demonstraram também, que espécies do gênero apresentam ótima expressão de lacase em condições de cultivo com lignocelulose, evidenciando o potencial biotecnológico do grupo para biorremediação e processos industriais. Ademais, alguns estudos têm explorado o potencial biotecnológico de *Lentinus crinitus*, avaliando diferentes cepas, substratos e atividades metabólicas, com ênfase na produção de enzimas extracelulares e na utilização de resíduos agroindustriais como fonte de carbono. Conforme apresentado na quadro 2, os trabalhos relatam variações quanto às cepas empregadas, aos substratos utilizados e às atividades avaliadas, como a produção de lacase e a aplicação desses metabólitos em processos de descoloração e degradação, ressaltando a versatilidade metabólica e o interesse crescente desse fungo para aplicações biotecnológicas.

Quadro 2 – Comparação das atividades enzimáticas e bioquímicas reportadas em estudos com espécies do gênero *Lentinus*

| Fungo | Cepa | Substrato utilizado | Atividade avaliada | Referência |
|-------|------|---------------------|--------------------|------------|
|-------|------|---------------------|--------------------|------------|

| | | | | |
|---------------------------------|----------------------------------|-------------------------------|---|------------------------------|
| <i>Lentinus crinitus</i> | U9-1 | Casca de café e polpa cítrica | Lacase (produção e uso na descoloração de corante Remazol Brilliant Blue R) | Almeida <i>et al.</i> , 2018 |
| <i>Lentinus crinitus</i> | UCP 1206 | Borra de café (SCG) | Lacase (produção; otimização por planejamento fatorial; aplicação em biossorvente e descoloração de corantes) | França <i>et al.</i> , 2025 |
| <i>Lentinus crinitus</i> | CCIBt 2611 | Cultivo em BDA | Expressão de lacase; avaliação do efeito do inóculo sobre produção enzimática | Beserra, 2023 |
| <i>Lentinus crinitus</i> | U9/1 (ou U9-1 variantes citadas) | Vinhaça (resíduo da cana) | Lacase: produção em meio com vinhaça; influência de fontes e concentrações de N | UNIPAR <i>et al.</i> , 2017 |

Fonte: A autora, 2025.

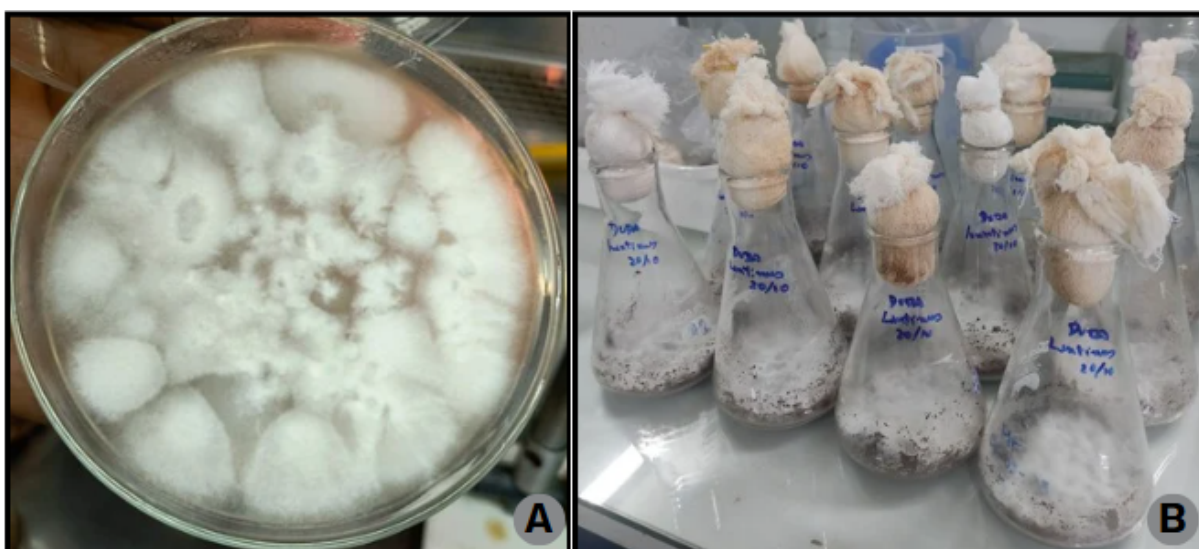
No caso específico de *Lentinus crinitus*, o conhecimento ainda é limitado comparado a gêneros mais estudados como *Trametes* ou *Pleurotus*, mas os dados disponíveis confirmam que a espécie compartilha características fundamentais de basidiomicetos ligninolíticos. A única caracterização detalhada de lacases para a linhagem *L. crinitus* UCP 1206 foi realizada por França *et al.* (2025), que isolaram a cepa na Mata Atlântica de Pernambuco a partir de madeira em decomposição. Nesse estudo, a produção de lacase foi induzida em fermentação em estado sólido utilizando borra de café, com atividades relatadas entre 18 e 32 U·g⁻¹ de substrato, dependendo das condições de umidade e suplementação nitrogenada. Também foi observado que compostos fenólicos presentes no resíduo atuam como indutores enzimáticos, padrão típico de fungos de podridão branca.

2.6 APROVEITAMENTO DA BORRA DO CAFÉ NO CULTIVO FÚNGICO PARA PRODUÇÃO DE LACASE

A intensificação da atividade agroindustrial tem resultado em uma geração crescente de resíduos orgânicos subutilizados, representando simultaneamente um

desafio ambiental e uma oportunidade estratégica no contexto da bioeconomia circular. Entre esses resíduos, a borra de café (BC) destaca-se por sua ampla disponibilidade e elevado volume de descarte, decorrente do consumo mundial de café, que ultrapassou 178 milhões de sacas de 60 kg em 2023 (International Coffee Organization – ICO, 2024). O Brasil, maior produtor e exportador global, responde por mais de 35% da produção mundial, gerando grandes quantidades de BC em ambientes domésticos, indústrias de processamento e estabelecimentos comerciais. Estima-se que cerca de 90% do pó de café utilizado se torne resíduo sólido, e que a fabricação de café solúvel gere aproximadamente 2 kg de borra úmida para cada 1 kg de produto final (Campos-Vega *et al.*, 2015). Esse material apresenta características químicas de grande interesse biotecnológico, incluindo alto teor de carbono, óleos residuais, cafeína, ácidos fenólicos e taninos, além de quantidades moderadas de nitrogênio e minerais, tornando-se um substrato atrativo para processos fermentativos e estudos microbiológicos como presentes na figura 4 (Ballesteros *et al.*, 2014).

Figura 4 - Crescimento de *Lentinus crinitus* UCP 1206 em diferentes condições experimentais. Colônia de *L. crinitus* em placa de BDA antes do processo fermentativo (A). Biomassa fúngica após 15 dias de fermentação em estado sólido utilizando borra de café como substrato (B).



Fonte: O autor, 2025.

O estudo sobre a utilização da borra de café (BC) em fermentações em estado sólido (FES) tem sido crescente devido à sua elevada disponibilidade, baixo

custo e composição rica em carboidratos residuais, proteínas, lipídios e compostos fenólicos, os quais favorecem o crescimento microbiano e a indução de enzimas oxidativas. Esse resíduo agroindustrial apresenta características físicas e químicas adequadas para FES, como boa porosidade e retenção de umidade, tornando-se um ótimo substrato para processos biotecnológicos. França *et al.* (2025) demonstraram que *Lentinus crinitus* cultivado em borra de café apresentou produção alta de lacase em FES, com atividades variando entre 18 e 32 U·g⁻¹ de substrato, evidenciando a eficiência da BC como substrato indutor dessa enzima. Resultados semelhantes foram observados por Murthy e Naidu (2012), que relataram a produção de lacase por fungos basidiomicetos utilizando borra de café como substrato, destacando o potencial desse resíduo para a valorização biotecnológica. Dessa forma, a borra de café destaca-se não apenas como fonte nutricional, mas como um substrato funcional capaz de estimular a produção de lacases em sistemas fermentativos.

A produção enzimática utilizando borra de café (BC) é ainda favorecida por suas propriedades físicas, como estrutura porosa e adequada aeração, que contribuem para o estabelecimento de condições favoráveis à fermentação em estado sólido (Pandey *et al.*, 2000). Nesse contexto, o uso da BC como base fermentativa representa uma alternativa sustentável para a produção de lacases em escala ampliada, ao mesmo tempo em que contribui para a redução dos impactos ambientais associados ao descarte desse resíduo orgânico. Além da borra, outros subprodutos da cadeia cafeeira, como cascas, mucilagens e polpas, têm sido investigados como substratos fermentativos para a produção de enzimas oxidativas, ampliando as possibilidades de aproveitamento desses resíduos. Machado *et al.* (2023) destacam que a utilização integrada desses materiais favorece o rendimento do processo fermentativo e contribui para o aproveitamento sustentável dos resíduos da cafeicultura, agregando valor econômico por meio da geração de bioinsumos com aplicação em diferentes setores industriais.

3 OBJETIVOS

3.1 GERAL

- Produzir e purificar lacases de *Lentinus crinitus* UCP 1206 obtidas por fermentação em estado sólido com borra de café, e avaliar o potencial da enzima na degradação *in vitro* da melanina para aplicações em hiperpigmentação.

3.2 ESPECÍFICO

- Produzir lacases por *Lentinus crinitus* UCP 1206 em fermentação em estado sólido, utilizando borra de café como substrato agroindustrial alternativo;
- Purificar a lacase por cromatografia em alta resolução (FPLC);
- Avaliar a eficiência de degradação da melanina usando o extrato bruto enzimático e a lacase pura em condições *in vitro*.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MICRORGANISMOS

O fungo *Lentinus crinitus* UCP 1206 foi fornecido pela Coleção de Culturas da Universidade Católica de Pernambuco (UNICAP), localizada no Centro Multiusuário de Análise e Caracterização de Biomoléculas e Superfícies de Materiais (CEMACBIOS), em Recife, PE, Brasil. As linhagens foram mantidas em ágar batata-dextrose (BDA), pH 5,5, sob refrigeração a 5°C e replicadas continuamente a cada mês, .

4.2 RESÍDUOS DE CAFÉ USADO

Os resíduos de borra de café foram obtidos por meio de doações de cafeterias situadas em Recife, PE. Posteriormente, foram submetidos à secagem em estufa com circulação de ar a 65°C até atingirem um teor de umidade de aproximadamente 10%. Em seguida, os materiais foram resfriados a 28°C por um período de duas horas. Após o processo de secagem, as amostras foram devidamente homogeneizadas e acondicionadas em recipientes herméticos de polipropileno, armazenados em ambiente com temperatura controlada de 28°C até o momento de sua utilização, seguindo a metodologia descrita por França *et al.* (2025). Para caracterizar a granulometria, realizou-se uma análise utilizando uma sequência de peneiras padronizadas conforme as normas ASTM/Tyler, com malhas de abertura variando entre os tamanhos 18, 32, 48, 60, 100, 150, 200 e 325.

4.3 PRODUÇÃO DE LACASE POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO (FES)

O inóculo foi preparado segundo a metodologia descrita por França *et al.* (2025). O fungo *Lentinus crinitus* UCP 1206 foi cultivado em meio BDA ajustado para pH 5,5 e incubado em estufa a 28°C por cinco dias. Posteriormente, três discos de micélio, com diâmetro de 5 mm, foram utilizados como inóculo nos ensaios de fermentação em estado sólido para produção de lacase, utilizando resíduo de café como substrato. A fermentação em estado sólido foi conduzida em triplicata, em frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 10 g do resíduo de café, cuja umidade foi ajustada para 60% por adição de tampão acetato de sódio 0,1 M, com pH mantido em 5,5, e incubada a 28°C durante 15 dias. Após o período de fermentação, o extrato enzimático foi extraído por adição de 50 mL de tampão acetato de sódio 0,1

M, pH 5,0, seguido de agitação orbital a 120 rpm e temperatura de 28 °C durante duas horas. Em ambos os procedimentos, o extrato enzimático bruto foi obtido mediante filtração em bomba a vácuo, seguida de centrifugação a 6000 rpm e 4 °C por 10 minutos para remoção da biomassa residual.

4.4 EXTRAÇÃO E DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA LACASE

A extração da lacase foi realizada com base na metodologia modificada de Nascimento *et al.* (2015) . Para a extração da enzima, foi utilizado o tampão de acetato de sódio 0,1 M, pH 5,0, o mesmo empregado na atividade enzimática, sendo adicionado numa proporção de 7,5 ml por grama de substrato utilizado na FES. Após a etapa de extração, o material foi submetido à filtração a vácuo, para remoção inicial de partículas sólidas. Em seguida, o filtrado foi centrifugado a 6000 rpm por 10 min a 4 °C para separação da biomassa residual e obtenção de um sobrenadante claro. O extrato enzimático bruto resultante foi então alocado em falcons estéreis, mantido sob refrigeração a 4 °C para uso imediato ou armazenado a -20 °C para análises posteriores, a fim de preservar a atividade enzimática e evitar degradação proteica.

A atividade da lacase foi determinada utilizando dois substratos: ABTS (2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico)), (Sigma-Aldrich/Merck, código A1888) e guaiacol (Sigma-Aldrich/Merck, código G5502). Para o ensaio com ABTS, a reação enzimática foi monitorada pelo aumento da absorbância a 420 nm, indicando a oxidação do substrato. A mistura da reação continha 0,3 mL de tampão de acetato de sódio (0,1 M, pH 5,0), 0,1 mL de solução de ABTS (0,5 mM) e 0,6 mL do extrato fúngico. A unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para gerar 1,0 μmol de produto por minuto nas condições do ensaio conforme Bonugli-Santos *et al.* (2016). Para o ensaio com guaiacol, foi utilizada a metodologia de França *et al.* (2025). A reação foi realizada em uma mistura de 3 mL contendo 1 mL de guaiacol 2 mM, 1 mL de tampão de acetato de sódio 0,1 M (pH 5,0) e 1 mL do extrato enzimático. A mistura foi incubada por 20 minutos a 28°C, e a absorbância foi medida a 450 nm por espectrofotometria UV-visível. A atividade de lacase foi definida como a quantidade de enzima necessária para oxidar 1 μmol de ABTS ou guaiacol por minuto, calculada pela equação (Baltierra-Trejo e Sánchez-Yáñez, 2015), derivada da Lei de Beer-Lambert:

$$\text{Atividade enzimática (U/L)} = \Delta A \times V \times D \times 10^6 / t \times \epsilon \times d \times v$$

- U/L = atividade enzimática;
- ΔA = Variação da absorbância por minuto medida a 420 nm para ABTS e 450 para guaiacol.;
- V = volume total da reação (mL);
- D_f = fator de diluição aplicado à amostra
- 10^6 = fator de conversão para expressar a atividade em micromoles ($\mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$)
- t = tempo da reação (min);
- ϵ = coeficiente de extinção molar do produto da oxidação do ABTS ($3,6 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) guaiacol ($6740 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$)
- d = caminho óptico (1 cm)
- v = volume do extrato enzimático (mL)

Os resultados da atividade enzimática foram expressos em unidades (U) por miligrama de substrato em peso seco (U/mg) ou em unidades por volume da atividade enzimática (U/L).

4.5 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS

A determinação da concentração protéica foi realizada de acordo com o método descrito por Smith *et al.* (1985), utilizando a albumina soro bovina como padrão. A determinação da concentração protéica foi baseada na reação do bicinconínico de sódio (BCA) com grupos funcionalmente reduzidos das proteínas, formando um complexo roxo cuja intensidade de cor é proporcional à concentração proteica. Para isso, foi utilizado o Kit de reagente BCA, conforme as instruções do fabricante. As amostras foram incubadas com o reagente por 30 minutos a 30 °C, e a absorbância foi medida em espectrofotômetro a 595 nm. A albumina de soro bovino (BSA) foi utilizada como padrão para a construção da curva padrão, com concentrações variando de 0 a 2 mg/mL.

4.6 PRÉ- PURIFICAÇÃO / PRECIPITAÇÃO COM SOLVENTES E SAL ORGÂNICO

Para a concentração parcial das proteínas, foi empregada a técnica de precipitação fracionada, utilizando dois métodos distintos: adição de solvente orgânico e sulfato de amônio. Inicialmente, extratos enzimáticos foram submetidos à precipitação por adição lenta de acetona ou etanol previamente resfriados a -20°C , até atingir uma concentração final de 70% (v/v), sob agitação suave e banho de gelo. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 10.000 g por 15 minutos a 4°C , e o precipitado foi ressuscitado em tampão acetato 0,1 M, pH 5,0 (Burgess, 2009).

Paralelamente, foi realizada a precipitação fracionada com sulfato de amônio, também em banho de gelo, aplicando-se gradientes de saturação de 0–40%, 40–60% e 60–80%, conforme os princípios da *salting-out*. A cada faixa de saturação, o sal foi adicionado gradualmente ao extrato sob constante agitação, mantendo-se a solução resfriada. Após um período de incubação de 2 hora a 4°C , cada fração foi centrifugada a 10.000 g por 15 minutos, e os precipitados obtidos em cada intervalo foram dissolvidos separadamente em tampão acetato 0,1 M, pH 5,0, para posterior análise da atividade enzimática da lacase (Wingfield, 2001).

4.7 PURIFICAÇÃO DA LACASE POR CROMATOGRAFIA DE ALTA RESOLUÇÃO - FPLC

Para avaliar a melhor estratégia de purificação da lacase, foram realizados testes independentes utilizando colunas de troca iônica, catiônica e aniônica conforme protocolos clássicos de purificação proteica (Scopes, 1994; Loughran; Milne, 2023). A primeira coluna empregada foi a de CM-Celulose G50, equilibrada com tampão acetato de sódio 0,1 M, pH 5,0. A segunda coluna, de troca aniônica, foi montada com DEAE-Sephadex A50, equilibrada com tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 7,2. Em ambos os sistemas, a eluição das proteínas foi conduzida por meio de um gradiente crescente de NaCl (0,1 M, 0,5 M e 1,0 M) no tampão respectivo, com fluxo constante de 1 mL/min, permitindo a dissociação seletiva das proteínas ligadas à fase estacionária. O progresso da eluição foi monitorado espectrofotometricamente em 215 nm e 280 nm, correspondentes à absorção das ligações peptídicas e dos resíduos aromáticos, respectivamente. As frações foram coletadas separadamente, analisadas quanto à atividade enzimática da lacase e proteína total, e posteriormente

avaliadas para determinar a coluna e condição de eluição que proporcionam maior pureza e rendimento da enzima.

4.8 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DA LACASE NA DEGRADAÇÃO DE MELANINA

A avaliação da capacidade da lacase em promover a descoloração da melanina foi conduzida com base na metodologia proposta por Park *et al.* (2021) e adaptada conforme as exigências do presente estudo. Inicialmente, preparou-se uma solução de melanina sintética (Sigma-Aldrich) na concentração de 5 mg/mL. A melanina foi solubilizada em NaOH 10 mM sob agitação contínua até completa dispersão. Para a preparação das reações de descoloração, a solução concentrada de melanina foi posteriormente ajustada em tampão acetato de sódio (0,1 M, pH 5,0) de modo que a concentração final de melanina na mistura reacional fosse de 0,01%. As reações foram conduzidas para um volume final de 1 mL, estabelecendo-se a proporção de 1:1 entre a fonte enzimática e a solução tampão contendo o pigmento. O ensaio de degradação foi realizado com o extrato bruto, a fração da enzima precipitada e com a enzima purificada. A reação era iniciada imediatamente após a adição da enzima e as amostras eram submetidas a uma agitação controlada de 120 rpm de modo a garantir a homogeneidade do sistema durante toda a cinética oxidativa de 24h, com alíquotas sendo analisadas entre intervalos de 30 minutos.

A descoloração foi monitorada espectrofotometricamente com leituras em 540 nm em intervalos de 30 minutos, permitindo quantificar a redução da absorbância ao longo do tempo. Para validar que o efeito era dependente da atividade catalítica da enzima, foi estabelecido um controle de desnaturação térmica, no qual o extrato bruto contendo lacase foi submetido a aquecimento a 90 °C por 15 min, garantindo sua completa inativação. A porcentagem de descoloração foi calculada a partir da diferença entre a absorbância inicial e a absorbância residual em cada ponto temporal, usando a seguinte fórmula, conforme descrito por Fu; Viraraghavan (2001).:

$$\text{Descoloração (\%)} = (A_0 - A_t) / A_0 \times 100$$

Onde: A_0 corresponde à absorbância inicial (tempo zero) e A_t à absorbância medida após cada intervalo de incubação. Os resultados foram expressos como média \pm desvio-padrão, considerando triplicatas independentes para cada condição experimental.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 PRODUÇÃO DA LACASE

A produção de lacase por *Lentinus crinitus* UCP 1206 foi realizada por fermentação em borra de café, para explorar o potencial biotecnológico desse fungo na síntese de lacase a partir de substratos de baixo custo. O resíduo utilizado foi a borra de café, reforçando a proposta de reaproveitamento sustentável de resíduos orgânicos. A fermentação em estado sólido foi conduzida por 15 dias conforme otimização realizada por França *et al.* (2025).

Neste estudo, a atividade enzimática da lacase de *Lentinus crinitus* UCP 1206 foi avaliada utilizando dois substratos cromogênicos amplamente empregados em ensaios de oxidação: ABTS e guaiacol. No extrato bruto, a maior atividade enzimática foi observada com o guaiacol (47,67 U/L), enquanto o ABTS apresentou atividade inferior (9,72 U/L), conforme apresentado na Tabela 1. Esse resultado indica uma maior afinidade catalítica da lacase produzida frente ao guaiacol nas condições de cultivo e extração empregadas, sugerindo a predominância de isoformas com maior eficiência para substratos fenólicos simples (Yuan *et al.* 2016).

Tabela 1 - Dados da precipitação da Lacase de *Lentinus crinitus* UCP 1206

| Condição | Faixa / Solvente | Substrato Cromogênico | Atividade enzimática (U/L) | Taxa de Recuperação da atividade (%) |
|--|------------------|-----------------------|----------------------------|--------------------------------------|
| Extrato bruto | - | Guaiacol | 47,67 | 100,00 |
| | | ABTS | 9,72 | 100,00 |
| Precipitação salina (gradiente de sal) | 0–40% | Guaiacol | 7,81 | 3,28 |
| | | ABTS | 101,25 | 208,29 |
| | 40–60% | Guaiacol | 41,59 | 17,45 |
| | | ABTS | 8,75 | 18,00 |
| | 60–80% | Guaiacol | 82,52 | 34,62 |
| | | ABTS | 1,39 | 2,86 |

| | | | | |
|--------------------------------------|---------|----------|--------|--------|
| Precipitação por solventes orgânicos | Acetona | Guaiacol | 136,34 | 57,20 |
| | | ABTS | 91,11 | 187,43 |
| | Etanol | Guaiacol | 166,85 | 70,00 |
| | | ABTS | 10,97 | 22,57 |

Fonte: O autor, 2025.

Embora a literatura frequentemente descreva o ABTS como um substrato mais sensível para a detecção da atividade de lacases, devido à formação de um radical catiônico altamente estável e intensamente colorido, com absorção máxima em torno de 420 nm (Ezike *et al.* 2021), os dados obtidos neste estudo demonstram que essa maior sensibilidade nem sempre se traduz em maior atividade mensurada. A resposta enzimática depende fortemente da isoforma expressa, das condições fisiológicas do fungo e da composição do extrato bruto, podendo resultar em maior atividade frente a substratos alternativos, como o guaiacol. O guaiacol, por sua vez, é oxidado pela lacase formando tetraguaiacol, um composto de coloração marrom-avermelhada com absorção entre 450 e 470 nm. Apesar de apresentar menor estabilidade e maior suscetibilidade à oxidação não enzimática quando comparado ao ABTS (Li *et al.*, 2008). A elevada atividade observada com esse substrato no presente estudo sugere que a lacase produzida possui alta eficiência catalítica para compostos fenólicos, característica relevante para aplicações ambientais e industriais, como degradação de polímeros aromáticos como a melanina (Thathola *et al.*, 2024).

Resultados semelhantes, nos quais a atividade frente ao guaiacol supera a obtida com ABTS, também têm sido associados à presença de isoformas específicas de lacase, com sítios ativos mais acessíveis ou maior afinidade por fenóis simples, o que no presente estudo pode ter acontecido devido a compostos fenólicos presentes na borra do café, principalmente ácidos fenólicos, geralmente ácido clorogênico, cafeico, ferúlico e p-cumárico (Marra *et al.*, 2020). Esses achados reforçam que a escolha do substrato cromogênico deve considerar não apenas a sensibilidade analítica, mas também o perfil enzimático do sistema em estudo (Elsayed *et al.* 2023).

5.2 PROCESSO DE PRECIPITAÇÃO E PRÉ-PURIFICAÇÃO DA LACASE

Com relação à precipitação da lacase de *Lentinus crinitus* UCP 1206, a atividade enzimática variou bastante em função tanto do método de precipitação quanto do substrato cromogênico utilizado, indicando a presença de isoformas com diferentes afinidades catalíticas e comportamentos de solubilidade.

Durante a precipitação salina, verificou-se uma aparente separação funcional das isoformas. A fração 0–40% apresentou maior atividade frente ao ABTS (101,25 U/L), com taxa de recuperação superior a 200%, indicando possível remoção de inibidores ou concentração seletiva de isoformas com maior afinidade por substratos não fenólicos. Enquanto, a atividade frente ao guaiacol foi detectada de forma mais pronunciada na fração 80–90% (82,52 U/L), com taxa de recuperação de 34,62% , indicando forte seletividade por substratos fenólicos, conforme apresentado na Tabela 1.

O perfil de precipitação observado é compatível com o descrito para lacases fúngicas de peso molecular moderado, cuja recuperação por sulfato de amônio ocorre principalmente entre 40 e 80% de saturação, variando conforme a isoforma predominante e o protocolo de purificação (Sarma *et al.*, 2022; Ejaz *et al.*, 2022). Essa faixa está associada à maior concentração de atividade enzimática na etapa inicial de fracionamento salino, refletindo diferenças físico-químicas entre isoformas (Ejaz *et al.*, 2022). As isoformas de lacase apresentam preferências catalíticas distintas, sendo a atividade com ABTS geralmente mais elevada e facilmente detectável do que com guaiacol, devido a diferenças na interação substrato–enzima (Li *et al.*, 2008). Estudos indicam que isoformas mais ativas com ABTS tendem a precipitar em menores concentrações salinas, enquanto aquelas mais eficientes na oxidação do guaiacol precipitam em faixas de saturação mais elevadas, refletindo diferenças de solubilidade e organização estrutural. Essas variações estão relacionadas a características como glicosilação, cargas superficiais e ponto isoelétrico, sendo comum lacases fúngicas apresentarem pl ácido e múltiplas isoformas, o que influencia seu comportamento de precipitação (Janusz *et al.*, 2020).

Quanto à aplicação de solventes orgânicos, o etanol favoreceu a precipitação da isoforma com maior afinidade pelo substrato fenólico guaiacol, resultando na maior atividade observada neste estudo (166,85 U/L) e em uma taxa de recuperação

elevada (70,00%). Resultados semelhantes são relatados na literatura, na qual isoformas de lacase com maior eficiência na oxidação de fenóis simples tendem a ser preferencialmente recuperadas em solventes de polaridade intermediária, como o etanol, devido à maior estabilidade estrutural dessas enzimas nessas condições (Amit Kumar *et al.*, 2017; Wu *et al.*, 2019).

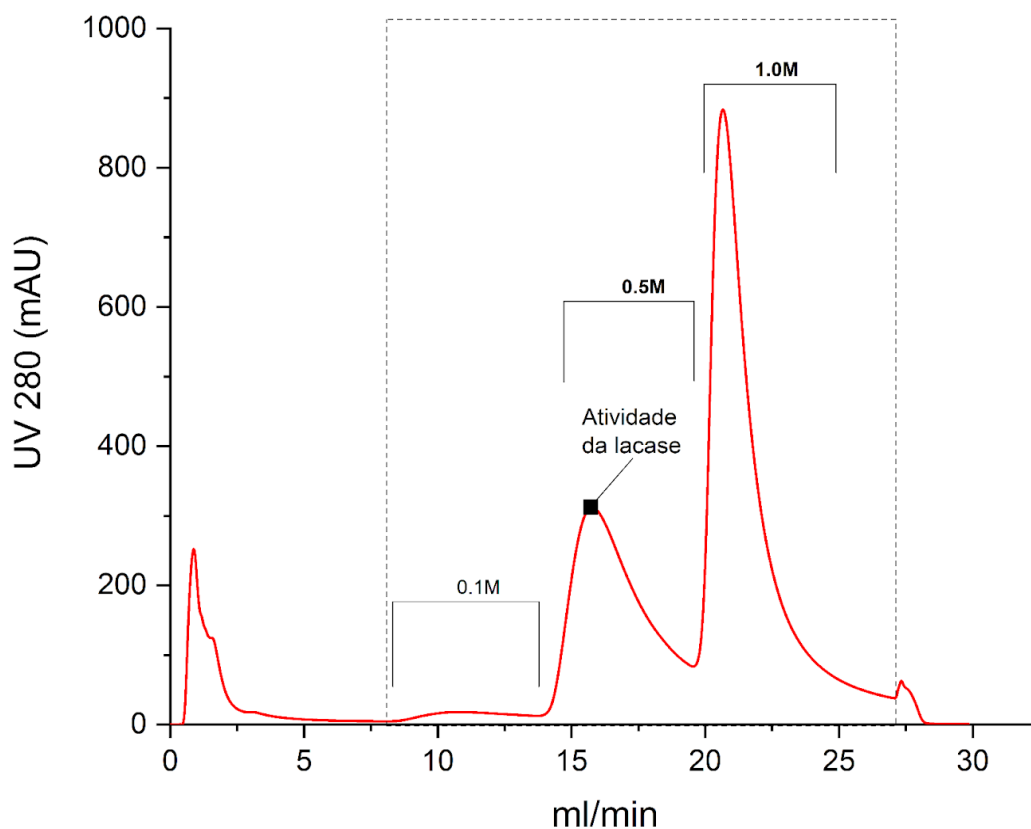
Em contraste, a acetona foi a única condição capaz de precipitar de forma satisfatória ambas as isoformas funcionalmente ativas, promovendo recuperação de 57,20% da atividade com guaiacol (136,34 U/L) e recuperação superior a 180% da atividade com ABTS (91,11 U/L). Esse aumento aparente da atividade após precipitação é consistente com relatos de ativação parcial por remoção de interferentes ou mudanças conformacionais induzidas por solventes orgânicos, especialmente para isoformas com maior afinidade por substratos sintéticos como o ABTS (Wu *et al.*, 2019). Resultados semelhantes foram observados por Bryjak e Rekuć, que utilizaram acetona fria como agente de precipitação na purificação de lacase de *Cerrena unicolor*, obtendo recuperação superior a 73% da atividade enzimática; nesse estudo, a acetona foi escolhida por sua eficiência na remoção de contaminantes e pigmentos solúveis, favorecendo a concentração da enzima e a redução de interferentes que podem mascarar ou inibir a atividade catalítica (Bryjak; Rekuć, 2010).

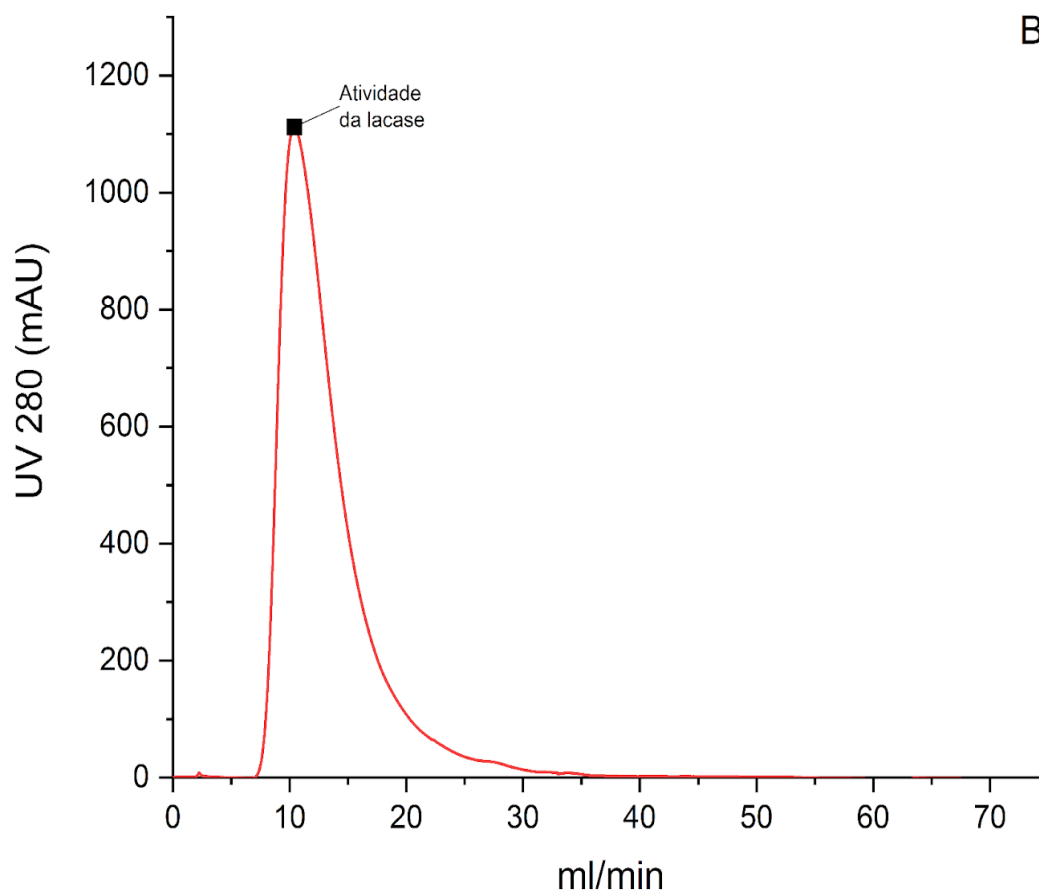
Os resultados reforçam a heterogeneidade isoenzimática funcional da lacase produzida por *Lentinus crinitus* e indicam que a escolha do método de precipitação influencia diretamente o perfil catalítico recuperado. Do ponto de vista aplicado, o etanol mostrou-se mais indicado para a concentração de isoformas voltadas à oxidação de compostos fenólicos, enquanto a acetona se destacou por permitir a precipitação eficiente de ambas as isoformas, com boa recuperação de atividade frente ao guaiacol e ao ABTS. Assim, a acetona foi selecionada para as análises posteriores por garantir uma preparação enzimática mais versátil e com atividade ampliada, aspecto particularmente relevante para aplicações farmacológicas, nas quais a amplitude de substratos e a eficiência catalítica são desejáveis.

5.3 PURIFICAÇÃO DA LACASE POR CROMATOGRAFIA DE TROCA IÔNICA

A cromatografia de troca aniônica em DEAE-Sephadex A50 foi mais eficiente que a troca catiônica (CM-Celulose G50) para a separação da isoforma de lacase com afinidade por ABTS. Na DEAE, a atividade concentrou-se em um único pico eluído com 0,5 M de NaCl, apresentando 1,94 U/L, atividade específica de 15,86 U/mg e 2,69% de recuperação da atividade inicial, presente na tabela 2. Esse perfil indica interação eletrostática efetiva da enzima com a matriz aniônica, compatível com lacases fúngicas que apresentam carga líquida negativa no pH operacional e são eluídas apenas sob força iônica intermediária, conforme observado no cromatograma apresentado na figura 5A, em que a atividade da lacase concentrou-se em um pico bem definido eluído sob força iônica intermediária, coincidindo com a aplicação do gradiente de NaCl, evidenciando a interação específica da isoforma com a matriz DEAE-Sephadex A50.

Figura 5 - Cromatograma da purificação da lacase com cromatografia de troca aniônica (A) e troca catiônica (B). A linha tracejada representa a eluição com NaCl, e os colchetes indicam o gradiente aplicado.





Fonte: O autor, 2025.

A baixa recuperação global de atividade observada após a purificação ($\leq 5\%$) é um comportamento amplamente descrito para lacases, especialmente durante etapas cromatográficas envolvendo gradientes salinos. Estudos recentes mostram que perdas de atividade têm sido associadas à diluição da enzima durante a eluição e à perda parcial de íons metálicos essenciais, como cobre, do centro ativo tipo I, o que compromete a transferência eletrônica catalítica (Fernández-Remacha *et al.*, 2022; Kumar *et al.*, 2023). Por exemplo, em purificações de lacase de *Pleurotus sp.*, a etapa final de cromatografia por troca iônica e filtração em gel resultou em um rendimento total de apenas 22,4 % da atividade original, com perda de grande parte da atividade durante as etapas de separação, mesmo com um aumento de 72-fold na pureza específica (Mahajan *et al.*, 2011). Esse tipo de perda tem sido explicado pela remoção de cobre dos sítios catalíticos e interações proteína-resina, que podem induzir mudanças conformacionais desfavoráveis à atividade (Peralta; De-Souza, 2010). Além disso, interações prolongadas com resinas de troca iônica podem levar à inativação parcial da lacase, um efeito observado em várias isoformas purificadas

por cromatografia aniônica (Fernández-Remacha *et al.*, 2022; Kumar *et al.*, 2023). Ainda assim, o aumento da atividade específica após DEAE confirma que houve enriquecimento seletivo de uma isoforma funcional, mesmo com redução do rendimento.

Tabela 2 - Dados da purificação da Lacase de *Lentinus crinitus* UCP 1206 (atividade com ABTS).

| | PROTEÍNA TOTAL (MG/ML) | ATIVIDADE DA LACASE (U/L) | ATIVIDADE ESPECÍFICA (U/MG) | RECUPERAÇÃO DA ATIVIDADE (%) |
|----------------------|---------------------------|------------------------------|-----------------------------------|------------------------------------|
| Bruto | 1,63 | 9,72 | 9,05 | 100 |
| Precipitado | 0,57 | 8,75 | 15,35 | 18,23 |
| Cm Celulose G50 | 0,09 | 1,93 | 15,78 | 4,0 |
| Deae Sephadex A50 | 0,09 | 1,94 | 15,86 | 4,0 |

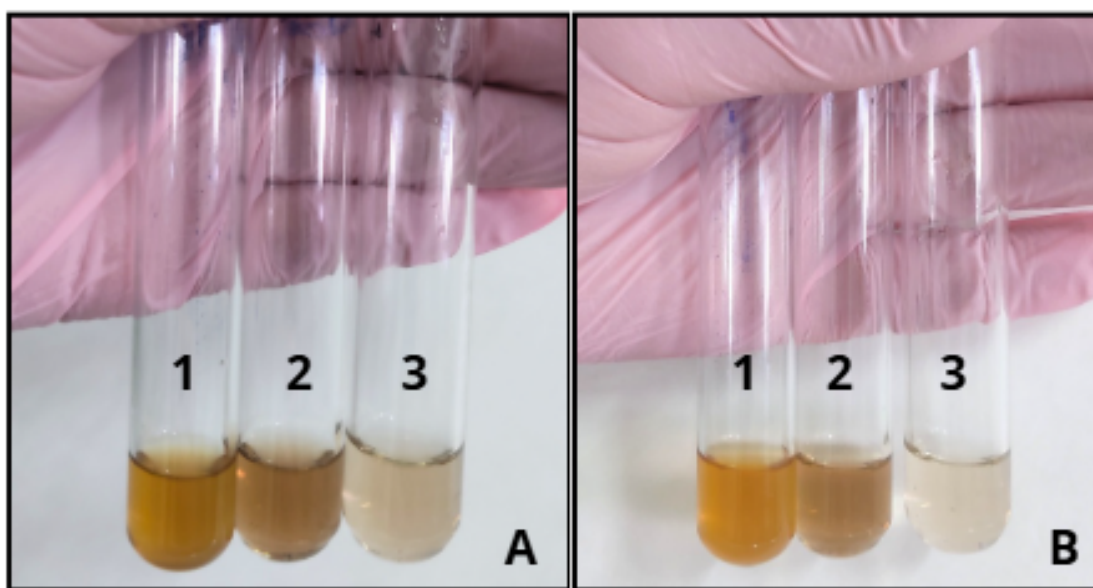
Fonte: O autor, 2025.

Apesar desse enriquecimento seletivo, a cromatografia em CM-Celulose G50 não promoveu retenção significativa da lacase, uma vez que a atividade foi majoritariamente detectada na fração não adsorvida (1,94 U/L; ~4% de recuperação), mas não promoveu a separação de outras proteínas presentes, evidenciado pela ausência de picos adicionais e indicando que não houve limpeza do precipitado. Esse comportamento será confirmado posteriormente por eletroforese, permitindo avaliar a pureza das frações. A atividade restrita observada reforça que isoformas com maior afinidade por ABTS apresentam características estruturais e funcionalidade distintas daquelas mais ativas sobre guaiacol, evidenciando a heterogeneidade funcional das lacases fúngicas (Ezike *et al.*, 2021; Fernández-Remacha *et al.*, 2022).

5.4 ATIVIDADE DA LACASE NA DESCOLORAÇÃO DE MELANINA

A degradação da melanina sintética pela lacase de *Lentinus crinitus* UCP 1206, apresentada na figura 6, evidenciou diferenças marcantes entre os três estados enzimáticos avaliados (lacase bruta, precipitada e purificada), diretamente relacionadas à atividade enzimática obtida na última fermentação, que foi a utilizada neste ensaio. As atividades foram de 9,72 U/L para o extrato bruto, 8,75 U/L para a fração precipitada e 1,93 U/L para a lacase purificada, confirmando que a etapa de purificação concentrou uma isoforma funcional, apesar da redução da atividade total, evidenciando o enriquecimento seletivo da enzima.

Figura 6 – Comparação visual do tempo 0 (A) e após 24 h (B) da reação de descoloração da melanina sintética em tubos contendo lacase bruta (1), precipitada (2) e purificada (3) de *Lentinus crinitus* UCP 1206.

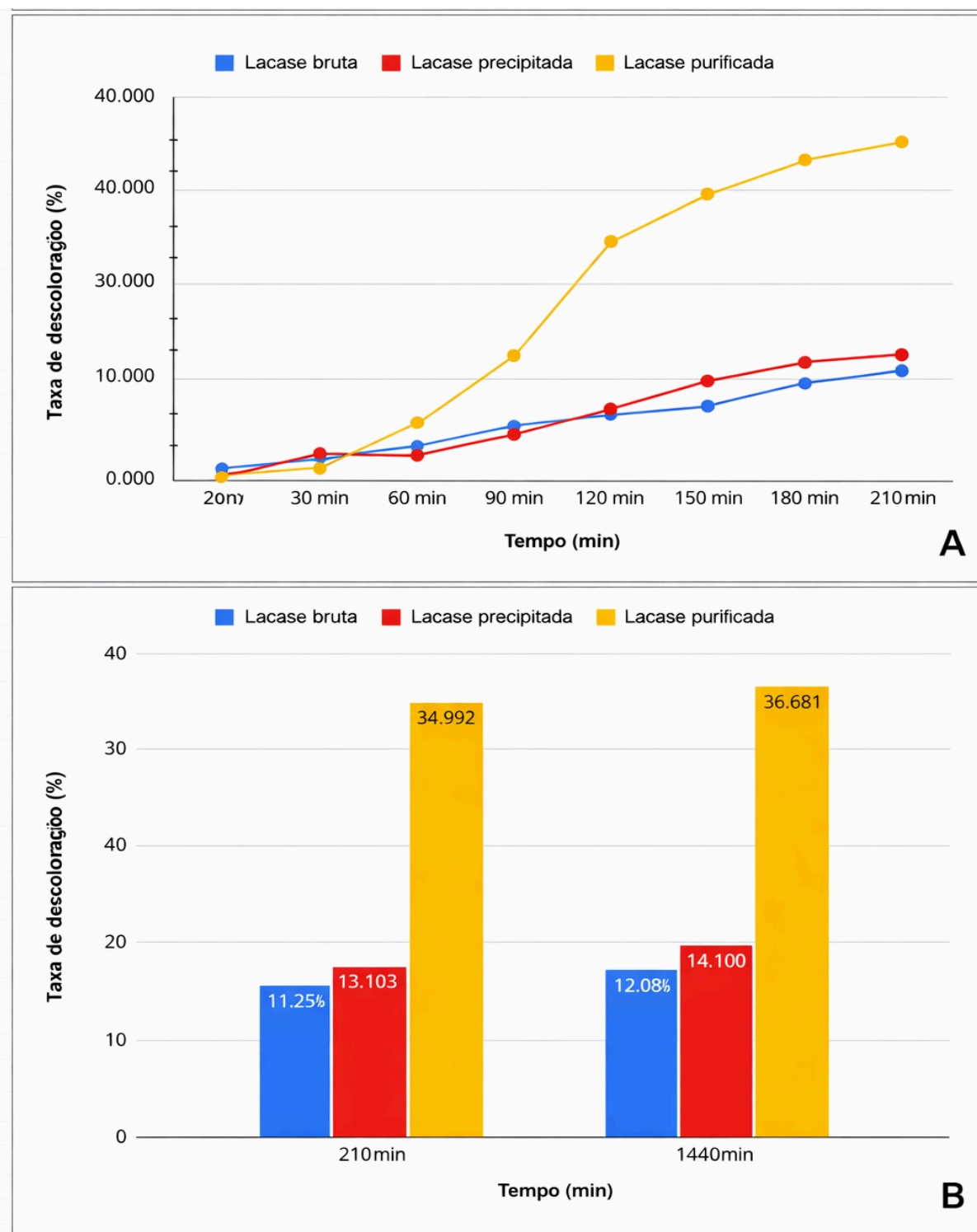


Fonte: O autor, 2025.

Em concordância com esses dados, a lacase purificada apresentou o melhor desempenho na descoloração da melanina, alcançando 28,77 % em 180 min e 36,08 % em 24 h, conforme mostrado na Figura 7. O extrato bruto e a fração precipitada apresentaram valores inferiores, possivelmente devido à presença de compostos interferentes no extrato bruto, como fenólicos residuais, proteínas competidoras e sais, bem como à perda parcial de cobre do sítio ativo tipo 1 (T1) ou à desnaturação parcial da enzima durante a etapa de precipitação, fatores que

podem reduzir a eficiência catalítica mesmo quando a proteína permanece detectável.

Figura 7 – Degradação da melanina: Cinética da degradação até 210 min (A); Comparativo após 210 min e 1440 min (24h) de degradação (B).



Fonte: O autor, 2025.

Quando comparados com a literatura recente, os resultados obtidos situam-se em uma faixa compatível com estudos publicados nos últimos cinco anos que descrevem degradação parcial de melanina por lacases fúngicas e por outros sistemas oxidativos. Por exemplo, *Trametes polyzona* em sistema com mediador fenólico como o ácido galóico que alcançou 77,8 % de degradação da melanina sintética em 24h, destacando o potencial de lacases fúngicas (Andriani *et al.*, 2024). A utilização de sistemas lacase–mediador também foi mostrada como eficaz na decoloração de melanina, com melhorias significativas frente à lacase isolada (Park *et al.*, 2021). Estudos com lignina peroxidase também demonstraram degradação eficiente de melanina sob condições otimizadas de pH e temperatura (Sadaqat *et al.*, 2020). Esses resultados indicam que maiores níveis de degradação da melanina estão geralmente associados ao uso de mediadores naturais ou à combinação de diferentes enzimas oxidativas.

Assim, o desempenho observado neste trabalho pode ser atribuído às condições empregadas e ao uso da lacase de *Lentinus crinitus* UCP 1206 de forma isolada, evidenciando que a eficiência do processo está diretamente relacionada à atividade enzimática disponível, à pureza da enzima e à presença ou ausência de isoformas específicas. A degradação da melanina sugere que a lacase atuou predominantemente pela oxidação de unidades fenólicas e pela interrupção da polimerização do pigmento, mecanismo associado ao potencial redox do sítio ativo tipo 1 (T1), característico de lacases fúngicas capazes de oxidar uma ampla variedade de substratos fenólicos (Salas *et al.*, 2023). Nesse contexto, a maior eficiência observada para a lacase purificada pode ser explicada pela redução de moléculas interferentes presentes no extrato bruto, como taninos e outros compostos fenólicos, que podem reagir com intermediários de oxidação ou mascarar a atividade real em ensaios espectrofotométricos (Terrón *et al.*, 2004). A ausência de decoloração significativa nos controles com enzima desnaturada confirma que o processo é exclusivamente dependente da atividade catalítica, descartando interferências abióticas.

6 CONCLUSÕES

A produção de lacase por *Lentinus crinitus* UCP 1206 utilizando borra de café mostrou-se eficiente, evidenciando o potencial desse fungo na valorização biotecnológica de resíduos agroindustriais. Além de atuar como substrato, a borra de café possivelmente influenciou o perfil catalítico da enzima produzida, contribuindo para os resultados observados, indicando sua relevância como indutor natural na produção enzimática. A maior atividade enzimática frente ao guaiacol em relação ao ABTS sugere a predominância de isoformas com afinidade por substratos fenólicos, compatível com aplicações voltadas à degradação da melanina. As etapas de precipitação e pré-purificação indicaram heterogeneidade isoenzimática, evidenciada pela recuperação diferencial da atividade enzimática, com destaque para o etanol e a acetona como estratégias eficientes de concentração. A cromatografia de troca aniônica em DEAE-Sephadex A50 possibilitou o isolamento parcial de uma isoforma funcional, ainda que com baixa recuperação global de atividade, comportamento característico de lacases fúngicas. A enzima purificada apresentou maior eficiência na descoloração da melanina sintética, demonstrando a influência do grau de purificação no desempenho catalítico. Em conjunto, os resultados confirmam o potencial da lacase de *L. crinitus* UCP 1206 para aplicações biotecnológicas sustentáveis na degradação de compostos aromáticos, destacando a necessidade de otimização das etapas de purificação e de estudos adicionais voltados à elucidação dos produtos de degradação e à avaliação de segurança em modelos biológicos.

REFERÊNCIAS

ALI, L. et al. Pathogenesis of melasma explained. **International Journal of Dermatology**, v. 64, n. 7, p. 1201-1212, 2025. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/40022484/>

ALMEIDA, P. H. et al. Decolorization of remazol brilliant blue R with laccase from *Lentinus crinitus* grown in agro-industrial by-products. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v. 90, n. 3, p. 1–13, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1590/0001-3765201820170458>

BALDRIAN, P. Effect of cadmium and mercury on activities of ligninolytic enzymes in *Pleurotus ostreatus*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 239, n. 1, p. 177–181, 2004. DOI: [10.1128/AEM.66.6.2471-2478.2000](https://doi.org/10.1128/AEM.66.6.2471-2478.2000)

BALDRIAN, P. Fungal laccases – occurrence and properties. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 30, n. 2, p. 215–242, 2006. DOI: [10.1111/j.1574-4976.2005.00010](https://doi.org/10.1111/j.1574-4976.2005.00010)

BALLESTEROS, L. F. et al. Chemical, functional and structural properties of spent coffee grounds and coffee silverskin. **Food and Bioprocess Technology**, v. 7, p. 3493–3503, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11947-014-1349-z>

BALTIERA-TREJO. et al. Inconsistencies and ambiguities in calculating enzyme activity: the case of laccase. **Journal of Microbiological Methods**, v. 119, p. 126–131, 2015. DOI: [10.1016/j.mimet.2015.10.007](https://doi.org/10.1016/j.mimet.2015.10.007).

BESERRA, E. S. S. Efeito do inóculo sobre a expressão de lacase por *Lentinus crinitus* CCIBt 2611. 2023. **Trabalho de Conclusão de Curso — Universidade Federal de Campina Grande**, Sumé, 2023. Disponível em: <https://dspace.sti.ufcg.edu.br/handle/riufcg/33591>

BOECKX, Tinne et al. Polifenol oxidase em folhas: a localização cloroplástica tem alguma importância? **Journal of Experimental Botany**, v. 66, n. 12, p. 3571–3579, jun. 2015. DOI: <https://doi.org/10.1093/jxb/erv141>.

BONUGLI-SANTOS. et al. Enhanced textile dye decolorization by marine-derived basidiomycete *Peniophora* sp. CBMAI 1063 using integrated statistical design.

Environmental Science and Pollution Research, v. 23, n. 9, p. 8659–8668, 2016. DOI: 10.1007/s11356-016-6053-2.

BRYJAK, et al. Effective purification of *Cerrena unicolor* laccase using microfiltration, ultrafiltration and acetone precipitation. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 160, n. 8, p. 2219–2235, 2010. DOI: 10.1007/s12010-009-8791-9.

BURGESS, R. R. Protein Precipitation Techniques. In: *Methods in Enzymology*, v. 463, **Elsevier**, 2009. p. 331–343. DOI: 10.1016/S0076-6879(09)63020-2.

CAMPOS-VEGA, R. et al. Spent coffee grounds: A review on current research and future prospects. **Trends in Food Science & Technology**, v. 45, p. 24–36, 2015. DOI: 10.1016/j.tifs.2015.04.012.

CESTARI, T. F. et al. Acquired hyperpigmentations. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, Rio de Janeiro, v. 89, n. 1, p. 11–25, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1590/abd1806-4841.20142353>

CHERNYKH, A. et al. Laccase isoforms with unusual properties from the basidiomycete *Steccherinum ochraceum* strain 1833. **Journal of Applied Microbiology**, v. 105, n. 6, p. 2065–2075, 2008. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2008.03924.x

CHRISTOPHER, L. P. et al. Lignin biodegradation with laccase-mediator systems. **Frontiers in Energy Research**, [s.l.], v. 2, art. 12, p. 1–14, 31 mar. 2014. DOI: 10.3389/fenrg.2014.00012.

COUTO, S. R. et al. Industrial and biotechnological applications of laccases: a review. **Biotechnology Advances**, v. 24, p. 500–513, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2006.04.003>

DA SILVA MAGALHÃES, A. A. et al. Production and characterization of proteolytic enzymes of *Lentinus crinitus* DPUA 1693 from the Amazonian biome. **Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi – Ciências Naturais**, v. 14, n. 3, p. 231–244, 2019. DOI: <https://doi.org/10.46357/bcnaturais.v14i3.231>

DAVIS, A. R.; CALLENDER, V. D. Postinflammatory hyperpigmentation: A review of the epidemiology, pathogenesis, and treatment. **Journal of Clinical and Aesthetic Dermatology**, v. 3, n. 7, p. 20–27, 2010. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2921758/>

DESAI, S. R. Hyperpigmentation Therapy: A Review. **Journal of Clinical and Aesthetic Dermatology**, v. 7, n. 8, p. 13–17, 2014. PMID: PMC4142815

D'SOUZA-TICLO. et al. Enhanced production of laccase by a marine fungus during treatment of colored effluents and synthetic dyes. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 38, n. 3–4, p. 504–511, 2006. DOI: 10.1016/j.enzmictec.2005.07.005.

EJAZ, M. et al. *Screening of Novel Laccase Producers—Isolation and Characterization of Cold-Adapted Laccase from Kabatiella bupleuri G3 Capable of Synthetic Dye Decolorization.* 2023. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2218-273X/11/6/828/htm>.

ELSAYED, A. M. et al. *Purification and biochemical characterization of two laccase isoenzymes isolated from Trichoderma harzianum S7113 and its application for bisphenol A degradation.* **Microbial Cell Factories**, v. 22, n. 1, p. 1-18, 2023. DOI: 10.1186/s12934-022-02011-z

EISENTHAL, R. et al. *Enzyme Assays: A Practical Approach.* 1. ed. **Oxford: Oxford University Press**, 2002. ISBN: 978-0199638208.

ESPÓSITO, A. C. C. et al. *Update on Melasma—Part I: Pathogenesis.* **Dermatology and Therapy (Heidelberg)**, v. 12, p. 1967–1988, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1007/s13555-022-00779-x>

EZIKE, T.C. et al. Substrate specificity of a new laccase from Trametes polyzona WRF03, **Heliyon**, v. 7, n. 1, art. e06080, 2021. DOI: 10.1016/j.heliyon.2021.e06080.

FABROS, J. A. et al. Distribution, cultivation, nutritional composition, and bioactivities of *Lentinus* (Polyporaceae, Basidiomycetes): a review. **Current Research in Environmental & Applied Mycology (Journal of Fungal Biology)**, v. 12, n. 1, p. 170–219, 2022. Disponível em: https://www.creamjournal.org/pdf/CREAM_12_1_13.pdf

FERNÁNDEZ-REMACHA, D.; et al. (2022). Analysis of laccase-like enzymes secreted by fungi: biochemical and mechanistic insights. **MicrobiologyOpen**, 11(1), e1279. DOI: 10.1002/mbo3.1279

FRANÇA, E. S. da S. et al. Valorization of spent coffee grounds as substrate. **Fermentation**, v. 11, n. 7, 396, 2025. DOI: <https://doi.org/10.3390/fermentation11070396>

FU, Y. et al. Fungal decolorization of dye wastewaters: a review. **Bioresource Technology**, v. 79, n. 3, p. 251–262, 2001. DOI: 10.1016/S0960-8524(01)00028-1.

GAO, Y. et al. *High melanin degradation by laccase from a novel isolated white rot fungi *Trametes polyzona* 023 in the presence of phenolic compounds.* **Bioresource Technology Reports**, v. 27, art. 101923, 2024. DOI: 10.1016/j.biteb.2024.101923.

GIGLI, M. et al. Laccase mediator cocktail system for eumelanin decolorization. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 11, 6238, 2022. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms23116238>

GRIMES, P. E. Management of hyperpigmentation in darker racial ethnic groups. **Seminars in cutaneous medicine and surgery**, v. 28, n. 2, p. 77–85, 2009

GUPTA, M.; DOOLAN, B. J. Clinical patterns of facial melasma. **ResearchGate**, 2021. Disponível em: https://www.researchgate.net/figure/Clinical-patterns-of-facial-melasma-Reproduced-with-permission-from-Gupta-M-Doolan-BJ_fig2_354464526.

HANDEL, A. et al. Melasma: a clinical and epidemiological review. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, Rio de Janeiro, v. 89, n. 5, p. 771–782, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1590/abd1806-4841.20143063>

INOVA SAÚDE. Melasma nos ciclos da vida da mulher: uma revisão integrativa da literatura. **Inova Saúde**, v. 15, n. 3, p. 1-15, 2022. DOI: <https://doi.org/10.18616/inova.v15i3.7639>

INTERNATIONAL COFFEE ORGANIZATION (ICO). **Coffee Market Report 2024**. Londres, 2024. Disponível em: <https://www.ico.org>

JANUSZ, G. et al. Laccase Properties, Physiological Functions, and Evolution. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, p. 8402, 2020. DOI: 10.3390/ijms21218402

JIRYIS, B. et al. Management of Melasma: Laser and Other Therapies — Review Study. **Journal of Clinical Medicine**, Basel, v. 13, n. 5, p. 1468, 2024. DOI: <https://doi.org/10.3390/jcm13051468>

KAUFMAN, B. P. et al. Postinflammatory Hyperpigmentation: Epidemiology, Clinical Presentation, Pathogenesis and Treatment. **American Journal of Clinical Dermatology**, v. 18, n. 4, p. 489–503, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1007/s40257-017-0333-6>

KHAMMUANG, S. et al. Decolorization of synthetic melanins by crude laccases of *Lentinus polychrous* Lév. **Folia Microbiologica**, v. 58, n. 1, p. 1–7, 2013. DOI: 10.1007/s12223-012-0151-4.

KIM, Y. J. et al. Exposure factors in the occurrence and development of melasma: a review. **Experimental and Therapeutic Medicine**, v. 25, n. 6, 2023. DOI: <https://doi.org/10.3892/etm.2023.12419>

KIM, N.-H. et al. Oxidative stress induces skin pigmentation in melasma by inhibiting Hedgehog signaling. **Antioxidants**, v. 12, n. 11, 1969, 2023. DOI: <https://doi.org/10.3390/antiox12111969>

KUMAR, et al. Gel-based purification and biochemical study of laccase isozymes from *Ganoderma* sp. and its role in enhanced callogenesis. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, p. 674, 2017. DOI: 10.3389/fmicb.2017.00674

LI, AIRONG. et al. Comparative study on the determination of assay for laccase of *Trametes* sp. **African Journal of Biochemistry Research**, v. 2, n. 8, p. 181–183, 2008. Disponível em: <https://www.internationalscholarsjournals.com/articles/comparative-study-on-the-determination-of-assay-for-laccase-of-trametes-sp.pdf>

LOUGHRAN. et al. *Protein Chromatography: Methods and Protocols*. **New York: Humana Press**, 2023. DOI: 10.1007/978-1-0716-3362-5.

LUNDELL, T. K.. et al.. *Lignin-modifying enzymes in filamentous basidiomycetes – ecological, functional and phylogenetic review*. **Journal of Basic Microbiology**, v. 50, n. 1, p. 5–20, 2010. DOI: 10.1002/jobm.200900338.

MACHADO, M. et al. *Bioactive Potential and Chemical Composition of Coffee By-Products: From Pulp to Silverskin*. **Foods**, v. 12, n. 12, art. 2354, 2023. DOI: 10.3390/foods12122354.

MAHAJAN, R. et al. Isolation, purification, and characterization of fungal laccase using ion-exchange and gel filtration chromatography: yields and activity retention. **Journal of Microbiological Methods**, v. 86, p. 347-352, 2011. Disponível em: *PMCID: PMC3184503*

MAHAJAN, V. K. Medical therapies for melasma. **Journal of Cosmetic Dermatology**, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1111/jocd.15242>

MAGHFOUR, J. et al. A focused review on the pathophysiology of post-inflammatory hyperpigmentation. **Pigment Cell & Melanoma Research**, Hoboken, v. 35, n. 3, p. 320–327, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1111/pcmr.13038>

MARRA, Fabio et al. Bioavailability and Bioactivities of Polyphenols Eco Extracts from Coffee Grounds after In Vitro Digestion. **Foods**, v. 9, n. 9, p. 1281, 2020. DOI: 10.3390/foods9091281.

McKESEY, J. et al. Melasma Treatment: An Evidence-Based Review. **Dermatologic Surgery**, v. 46, n. 1, p. 1–10, 2020. Disponível em: PubMed - *Melasma Treatment: An Evidence-Based Review*.

MERCK / MILLIPORE. Purification and characterization of a novel laccase from *Pleurotus nebrodensis*. **Documento técnico**. Disponível em: <https://www.merckmillipore.com/TD/en/tech-docs/paper/292807>

MOOLLA, S. et al. Dermatology: how to manage facial hyperpigmentation in skin of colour. *Drugs in Context*, 2022. DOI: 10.7573/dic.2021-11-2

MTIBAA, R. et al. Purification and characterization of a fungal laccase from *Thermobifida fusca* and study of its biochemical properties. **International Journal of**

Biological Macromolecules, v. 120, p. 1744–1752, 2018. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2018.09.175.

MURASE, D. et al. Autophagy has a significant role in determining skin color by regulating melanosome degradation in keratinocytes. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 133, n. 10, p. 2416–2424, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1038/jid.2013.165>

NASCIMENTO, F. A. C. et al. *Seleção e produção de lacases a partir da fermentação em estado sólido de fungos filamentosos*. **Revista Multidisciplinar em Saúde**, v. 3, n. 3, p. 1–7, 2015. Disponível em: <https://editoraime.com.br/revistas/index.php/remas/article/download/3382/400>

NAUTIYAL, A. et al. *Management of hyperpigmentation: Current treatments and challenges*. **Pigment Cell & Melanoma Research**, v. 34, n. 1, p. 100–112, 2021. DOI: 10.1111/pcmr.12986.

PALMIERI, G. et al. Copper induction of laccase isoenzymes in *Pleurotus ostreatus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 3, p. 920–924, 2000. DOI: <https://doi.org/10.1128/AEM.66.3.920-924.2000>

PANDEY, A. et al. Solid-state fermentation in biotechnology. **Current Science**, v. 77, n. 1, p. 149–162, 2000.

PARK, S. et al. Laccase-Mediator System Using a Natural Mediator as a Whitening Agent for the Decolorization of Melanin. **Polymers (Basel)**, v. 13, n. 21, p. 3671, 2021. DOI: <https://doi.org/10.3390/polym13213671>

PASSERON, T. *Melasma pathogenesis and influencing factors — an overview of the latest research*. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, v. 27, n. 1, p. 5-6, 2013. DOI: 10.1111/jdv.12049.

PERALTA, R. M.; DE-SOUZA, T. P. Role of copper in laccase structure and catalytic activity: implications for activity loss upon purification. **Journal of Inorganic Biochemistry**, 104(7), p. 789-794, 2010. DOI: 10.1016/j.jinorgbio.2010.03.012.

PILLAI, S. et al. Ultraviolet radiation and skin aging: roles of reactive oxygen species, inflammation and protease activation. **International Journal of Cosmetic Science**, v. 27, n. 1, p. 17–34, 2005. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1467-2494.2004.00241.x>

PINHEIRO, M. A. de M. Produção, caracterização e aplicação do extrato bruto de *Lentinus crinitus*. **Monografia — Universidade Federal de Campina Grande**. Disponível em: <https://dspace.sti.ufcg.edu.br/handle/riufcg/8674>

RCMOS – **REVISTA CIENTÍFICA MULTIDISCIPLINAR O SABER**. Melasma: classificação clínica e aspectos fisiopatológicos. São Paulo, 2025. Disponível em: <https://submissoesrevistarcmos.com.br/rcmos/article/download/1592/3763/6676>

RESEARCH, SOCIETY AND DEVELOPMENT. Aspectos clínicos e psicossociais do melasma. **Research, Society and Development**, v. 12, n. 6, e12312642040, 2023. DOI: <https://doi.org/10.33448/rsd-v12i6.42040>

RODRÍGUEZ-COUTO, S. et al. Industrial and biotechnological applications of laccases: a review. **Biotechnology Advances**, v. 24, n. 5, p. 500–513, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2006.04.003>

SADAQAT, B. et al. Enzymatic decolorization of melanin by lignin peroxidase. **Scientific Reports**, v. 10, 20240, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-020-76376-9>

SALAS, M. et al. Fungal laccases: Fundamentals, engineering and classification update. **Biomolecules**, v. 13, n. 12, p. 1716, 2023. DOI: 10.3390/biom13121716.

SANCHES, M. H. F. et al. Melasma: epidemiologia, patogênese, apresentação clínica e diagnóstico. **Brazilian Journal of Implantology and Health Sciences**, v. 6, n. 10, p. 1580-1597, 2024. DOI: <https://doi.org/10.36557/2674-8169.2024v6n10p1580-1597>

SANTANA, Thiago T. et al. Metallic-aromatic compounds synergistically induce *Lentinus crinitus* laccase production. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 16, p. 625–630, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2018.10.018>

SCOPES, Robert K. Protein Purification: Principles and Practice. 3. ed. **New York: Springer-Verlag**, 1994. DOI: 10.1007/978-1-4757-2333-5.

SIGMA-ALDRICH. Laccase from *Trametes versicolor*: **product specification sheet**.

Código 38429. Disponível em:

<https://www.sigmaaldrich.com/BR/pt/product/sigma/38429>

SILVA, D. P. D. Efeito da concentração do corante vermelho Congo na degradação pelo fungo *Lentinus crinitus*. 2015. **TCC — Universidade Federal de Campina Grande**. Disponível em: <https://dspace.sti.ufcg.edu.br/handle/riufcg/5531>

SILVA, M. A. Purificação e caracterização de lacase de *Lentinus crinitus*. 2019.

Monografia — Universidade Federal de Campina Grande. Disponível em:

<https://dspace.sti.ufcg.edu.br/handle/riufcg/33666>

SLOMINSKI, A. et al. Melanin pigmentation in mammalian skin and its hormonal regulation. *Physiological Reviews*, Bethesda, v. 84, n. 4, p. 1155–1228, 2004. DOI: <https://doi.org/10.1152/physrev.00044.2003>

SMITH, P. K. et al. Measurement of protein using bicinchoninic acid. **Analytical Biochemistry**, v. 150, p. 76–85, 1985. DOI:

[https://doi.org/10.1016/0003-2697\(85\)90442-7](https://doi.org/10.1016/0003-2697(85)90442-7)

SNYMAN, M. et al. The metabolism of melanin synthesis. **Pigment Cell & Melanoma Research**, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1111/pcmr.13165>

SOLANO, F. Melanins: skin pigments and much more—types, structural models, biological functions, and formation routes. **New Journal of Science**, v. 2014, p. 1–28, 2014. DOI: 10.1155/2014/498276

SOLANO, F. et al. Discussion on ABTS sensitivity compared to guaiacol. **ResearchGate Discussion**, 2013. Disponível em: <https://www.researchgate.net/>

SOLOMON, E. I. et al. Multicopper oxidases and oxygenases. **Chemical Reviews**, v. 114, n. 7, p. 3659–3853, 2014. DOI: 10.1021/cr950046o

STRONG, P. J. et al. Laccase: a review of its past and its future in bioremediation. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, v. 41, n. 4, p. 373–434, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1080/10643380902945706>

THATHOLA, P. et al. Laccase-mediated degradation of emerging contaminants: unveiling a sustainable solution. **Environmental Science: Advances**, v. 3, p. 1500, 2024. DOI: 10.1039/D4VA00173G.

TERRÓN, M. C. et al. Tannic acid interferes with the commonly used laccase assay with ABTS. **Biochimie**, v. 86, n. 10, p. 1035–1039, 2004. DOI: 10.1016/j.biochi.2004.07.013.

UNIPAR; SESHAT. Produção de lacase de *Lentinus crinitus* U9/1 em meio à base de vinhaça de cana-de-açúcar e seu potencial na produção enzimática. Relatório técnico. **Umuarama: Universidade Paranaense**; Seshat, 2017. Disponível em: <https://seshat.unipar.br/trabalho/producao-de-lacase-de-lentinus-crinitus-em-meio-base-de-vinhaca-de-cana-de-acucar-e-seu-potencial-na/>

VASHI, N. A. et al. Postinflammatory hyperpigmentation: a review of the epidemiology, clinical features, and treatment options. **Journal of clinical and aesthetic dermatology**, v. 6, n. 7, p. 36–43, 2013.

VÁZQUEZ-DUHALT, R. et al. Kinetic differences of purified laccases from six *Pleurotus ostreatus* strains. **Letters in Applied Microbiology**, v. 32, n. 5, p. 331-335, 2001. DOI: 10.1046/j.1472-765X.2001.00913.x.

WANG, H. X. et al.. Purification of a laccase from *Pleurotus eryngii*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 69, p. 521–525, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00253-005-0086-7>

WANG, F. et al. Fungal laccase production from lignocellulosic agricultural wastes: A review. **Microorganisms**, Basel, v. 7, n. 12, p. 665, 2019. DOI: <https://doi.org/10.3390/microorganisms7120665>

WIKEE, S. et al. Marine fungal laccases. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 8, 1864, 2019. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms20081864>

WINGFIELD, P. Protein precipitation using ammonium sulfate. **Current Protocols in Protein Science**, 2001. DOI: 10.1002/0471140864.psa03fs13.

WU, M.-H. et al. Enhancement of laccase activity by pre-incubation with organic solvents. **Scientific Reports**, v. 9, p. 9754, 2019. DOI: 10.1038/s41598-019-45118-x.

YUAN, X. et al. Biochemical characteristics of three laccase isoforms from the basidiomycete *Pleurotus nebrodensis*. **Molecules**, v. 21, n. 2, p. 203, 2016. DOI: 10.3390/molecules21020203.

YUN, C.-Y. et al. Marliolide derivative induces melanosome degradation via autophagy. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 8, 3995, 2021. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms22083995>

ZHANG, A. D. et al. A scoping review on melasma treatments and their histopathologic correlates. **Dermatopathology**, v. 12, n. 2, p. 13, 2025. DOI: <https://doi.org/10.3390/dermatopathology12020013>

ZHONG, X. et al. *Anti-inflammatory and anti-oxidant properties of laccase-synthesized phenolic-O-carboxymethyl chitosan hydrogels*. **New Biotechnology**, Amsterdam, v. 40 Pt B, p. 236–244, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2017.09.004>