

**UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
DEPARTAMENTO ACADÊMICO DE QUÍMICA E BIOLOGIA
BACHARELADO EM QUÍMICA**

**PAOLA CRISTINA RODAK
PRISCILA FERNANDA PAULISTA**

**APLICAÇÃO DE LACASES NA DEGRADAÇÃO DE CORANTES
SINTÉTICOS**

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

**CURITIBA
2017**

**PAOLA CRISTINA RODAK
PRISCILA FERNANDA PAULISTA**

**APLICAÇÃO DE LACASES NA DEGRADAÇÃO DE CORANTES
SINTÉTICOS**

Trabalho de Conclusão de Curso de graduação, do Curso de Bacharelado em Química do Departamento Acadêmico de Química e Biologia da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, como requisito parcial para obtenção do grau de Bacharel em Química.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Giselle Maria Maciel.

**CURITIBA
2017**

**PAOLA CRISTINA RODAK
PRISCILA FERNANDA PAULISTA**

APLICAÇÃO DE LACASES NA DEGRADAÇÃO DE CORANTES SINTÉTICOS

Trabalho de Conclusão de Curso aprovado como requisito parcial à obtenção do grau de BACHAREL EM QUÍMICA pelo Departamento Acadêmico de Química e Biologia (DAQBI) do Câmpus Curitiba da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR, pela seguinte banca examinadora:

Membro 1 – Profa. Dra. Marlene Soares
Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Membro 2 – Prof. Dr. Charles Windson Isidoro Haminiuk
Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Orientadora – Profa. Dra. Giselle Maria Maciel
Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Coordenador de Curso – Prof. Dr. Luiz Marcos de Lira Faria

Curitiba, 26 de junho de 2017.

DEDICATÓRIA

Eu, Paola, dedico ao meu namorado,
Eduardo, por todo o apoio em cada
momento, por todo o amor que me
dedicou, por toda a paciência e por me
acalmar sempre que eu considerava não
ser mais possível. Sem o seu apoio esta
etapa não seria possível.
Aos meus pais, José e Marilza, por todo o
amor, por todo o incentivo, por todo o
apoio e por toda a confiança que sempre
dedicaram a mim.

Eu, Priscila, dedico ao meu marido Paulo
Henrique, por sempre estar ao meu lado
nas horas mais difíceis, pela paciência,
amor e por sempre tentar me acalmar,
fazendo-me rir de alguma forma.
Aos meus pais, João Airton e Ilsolete, que
sempre estiveram ao meu lado, confiando
em meu potencial, dando-me amor e
carinho incondicional da melhor maneira
possível.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos primeiramente a Deus, por nunca nos desamparar, por nos ajudar nessa batalha e chegar até aqui, nos dando força todos os dias.

Agradecemos à nossa orientadora Dr^a. Giselle Maria Maciel, por confiar em nosso trabalho e por toda a paciência e dedicação para conosco.

Agradecemos aos professores Dr^a. Marlene Soares, ao Dr. Alessandro Feitosa e ao Dr. Charles Windson Isidoro Haminiuk pelas contribuições, considerações, questionamentos e correções dadas ao nosso projeto.

Agradecemos às nossas famílias por todos os ensinamentos, toda a confiança, todo o apoio e todo o carinho a nós dedicados, não apenas durante esta trajetória, mas por toda a vida.

Agradecemos aos nossos amigos, que fizeram parte desta nossa trajetória, nos ajudando de alguma forma em nosso projeto.

Agradecemos à nossa instituição, UTFPR, por nos disponibilizar todos os equipamentos e recursos necessários para o nosso projeto.

Eu Priscila, agradeço aos meus irmãos, César e Hellen, pela companhia, ajuda e companheirismo.

RESUMO

PAULISTA, Priscila F.; RODAK, Paola C. **Aplicação de lacases na degradação de corantes sintéticos**. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Química) - Departamento Acadêmico de Química e Biologia, Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Curitiba. 2017.

Lacases são enzimas, pertencentes à classe das oxirredutases, que podem ser encontradas em uma grande variedade de organismos, como bactérias, insetos, plantas, fungos, sendo os fungos da podridão branca os maiores responsáveis por sua produção. Estas enzimas possuem grande variedade de substratos e, por isso, apresentam ampla gama de aplicações tecnológicas, que envolvem desde o bi branqueamento de polpa de celulose, o branqueamento de fibras têxteis e o tratamento de águas residuárias até a utilização em alimentos e síntese orgânica. Os corantes são uma classe de substratos de grande interesse pois são substâncias que podem ser recalitrantes, tóxicas, mutagênicas e carcinogênicas. Estas substâncias são em geral de difícil degradação, mantendo-se estáveis à ação da luz, da temperatura e de produtos químicos. Contudo, as lacases são capazes de degradar alguns corantes pois oxidam grupos fenólicos contidos em sua estrutura. Porém, em muitos casos, é necessária a presença de mediadores que auxiliam indiretamente a enzima no processo de degradação do substrato, fazendo a transferência dos elétrons na reação enzimática de oxidação, aumentando, assim, o número de compostos sobre os quais a enzima atua. Neste sentido, o presente trabalho teve como objetivo produzir lacases por cultivo líquido utilizando o fungo *Trametes* sp., que se mostrou eficiente em meio de cultivo Ágar Extrato de Malte e em cultivo líquido contendo resíduos ligninocelulósicos, e a aplicação dessas enzimas em processos de degradação dos corantes sintéticos Azul Marinho reativo e Cristal Violeta, bem como avaliar a influência do mediador químico redox HBT no processo de degradação. Foram determinadas as atividades das enzimas espectrofotometricamente no comprimento de onda de 420 nm para a lacase, 310 nm para a lignina peroxidase e em 270 nm para a atividade de manganês peroxidase. O processo de degradação dos corantes foi determinado em espectrofotômetro, fazendo-se uma varredura na região entre 400 e 800 nm, sendo que o corante Azul Marinho Reativo apresentou comprimento de onda de maior absorção em 610 nm e o corante Cristal Violeta em 584,5 nm e os experimentos de biodegradação foram realizados para cada corante em seu maior comprimento de onda. A degradação dos corantes pelo extrato em presença do mediador foi eficiente. Para efeitos comparativos, foi utilizada paralelamente uma lacase comercial proveniente do fungo *Pleurotus ostreatus*, e os resultados de degradação foram semelhantes aos obtidos pela aplicação do extrato bruto de *Trametes* sp., sendo que ambos atingiram valores superiores a 70% de remoção em todos os experimentos, comprovando-se a ação principal de lacases fúngicas no processo de biodegradação e admitindo-se que a lacase produzida *in vitro* pode ser utilizada na degradação de corantes.

Palavras-chave: Fungos. Mediadores Redox. Enzima. Biodegradação.

ABSTRACT

PAULISTA, Priscila F.; RODAK, Paola C. **Laccases application in the degradation of synthetic dyes.** Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Química) - Departamento Acadêmico de Química e Biologia, Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Curitiba. 2017.

Laccases are enzymes belonging to the class of oxidoreductases, which do not require hydrogen peroxide as a co-substrate. It can be found in a wide variety of organisms, such as bacteria, insects, plants, fungus. Where the white rot fungus is the most responsible for its production. These enzymes have a wide variety of substrates and then, have a wide range of technological applications ranging from pulping of cellulose pulp, bleaching of textile fibers and wastewater treatment to food use and organic synthesis. Dyes are one of these substrates of great interest because they are substances that can be recalcitrant, toxic, mutagenic and carcinogenic. These substances are generally difficult to degrade, being stable to the action of light, temperature and chemicals. However, laccases are capable to degrade some dyes because they oxidize phenolic groups contained in their structure. Although, in many cases, it is necessary the presence of mediators to indirectly help the enzyme in the substrate degradation process by transferring the electrons to the oxidation enzymatic reaction, increasing the number of compounds where the enzyme acts. Thus, the objective of this paper was to produce laccases by liquid culture using the *Trametes sp.*, that was efficient in culture medium Agar Extract of Malt and in liquid culture containing residues ligninocelulosicos the application of these enzymes in degradation processes of the Reactive Navy Marine and Violet Crystal, which are synthetic dyes, and evaluate the influence of the chemical redox mediator HBT in its degradation. The activities of the enzymes were determined spectrophotometrically at the wavelength of 420 nm for the laccase, 310 nm for the lignin peroxidase and at 270 nm for the activity of manganese peroxidase. The dye degradation process was determined in a spectrophotometer, with a scan in the region between 400 and 800 nm, and the Reactive Navy Marine dye showed the highest absorption wavelength at 610 nm and the Violet Crystal dye at 584,5 nm and the biodegradation experiments were performed for each dye at its highest wavelength. The degradation of the dyes by the extract in the presence of the mediator was efficient. For comparison purposes, a commercial laccase from *Pleurotus ostreatus* fungus was used in parallel, and the degradation results were similar to those obtained by the application of *Trametes sp.* crude extract, both of which reached values above 70% of removal in all experiments, proving the main action of fungal laccases in the process of biodegradation and assuming that the laccase produced in vitro can be used in the degradation of dyes.

Key-works: Fungus. Redox Mediator. Enzyme. Biodegradation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Fórmula estrutural do corante Marinho Reativo.	20
Figura 2 – Fórmula estrutural do corante Cristal Violeta.	21
Figura 3 – Possíveis aplicações de lacases em biotecnologia.	25
Figura 4 – Fórmula estrutural do mediador redox HBT	26
Figura 5 - Mecanismos de reações catalisadas por lacase na presença de HBT em fragmento de lignina.....	24
Figura 6 – Etapas metodológicas desenvolvidas para avaliação da degradação dos corantes Marinho Reativo e Cristal violeta por lacase.....	31
Figura 7 – Cepas pertencentes ao banco de fungos do laboratório de biotecnologia da UTFPR.	38
Figura 8 – Cultivo de <i>Trametes</i> sp. em meio Extrato de Malte após incubação em estufa à 28 °C por 7 dias.	39
Figura 9 – Cultivo de <i>Trametes</i> sp. em meio Extrato de Malte com presença de resíduos lignocelulósicos após incubação em estufa à 28 °C por 7 dias.	40
Figura 10 – Cultivo de <i>Trametes</i> sp. em meio líquido com presença de resíduos lignocelulósicos após incubação em estufa à 28 °C por 7 dias.	42
Figura 11 – Curva de calibração do corante Azul Marinho Reativo.....	43
Figura 12 – Comparação visual entre a degradação, a partir do extrato enzimático bruto, do corante Marinho Reativo, 25 mg L ⁻¹ , com o controle, onde não há presença do extrato enzimático, em: (a) Ausência de HBT, (b) Presença de HBT.....	44
Figura 13 – Curva de calibração do corante Cristal Violeta.	46
Figura 14 – Comparação visual entre a degradação do corante Cristal Violeta, 5 mg L ⁻¹ , com o controle, onde não há presença do extrato enzimático, em: (a) Ausência de HBT, (b) Presença de HBT.....	47
Figura 15 – Comparação visual entre a degradação do corante Cristal Violeta, 10 mg L ⁻¹ , com o controle, onde não há presença do extrato enzimático, em: (a) Ausência de HBT, (b) Presença de HBT.....	47
Figura 16 – Comparação visual entre a degradação, realizada pelo extrato de lacase comercial, do corante Marinho Reativo, 25 mg L ⁻¹ , com o controle, onde não há presença do extrato enzimático, em: (a) Ausência de HBT, (b) Presença de HBT...	49

Figura 17 – Comparação visual entre a degradação, realizada pelo extrato de lacase comercial, do corante Cristal Violeta, 5 mg L^{-1} , com o controle, onde não há presença do extrato enzimático, em: (a) Ausência de HBT, (b) Presença de HBT.....51

Figura 18 – Comparação visual entre a degradação, realizada pelo extrato de lacase comercial, do corante Cristal Violeta, 10 mg L^{-1} , com o controle, onde não há presença do extrato enzimático, em: (a) Ausência de HBT, (b) Presença de HBT.....52

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1 – Comparação, a partir da porcentagem de descoloração realizada pelo extrato enzimático bruto, entre a degradação do corante Cristal Violeta para as concentrações de 5 e 10 mg L⁻¹ na ausência e na presença de HBT.48
- Gráfico 2 – Comparação, a partir da porcentagem de descoloração realizada pelo extrato enzimático bruto e pelo extrato comercial, referente a degradação do corante Azul Marinho Reativo para as concentrações de 25 e 40 mg L⁻¹ na presença de HBT.50
- Gráfico 3 – Comparação, a partir da porcentagem de descoloração, realizada pelo extrato de lacase comercial, entre a degradação do corante Cristal Violeta para as concentrações de 5 e 10 mg L⁻¹ na ausência e na presença de HBT.52

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Resultados obtidos em estudos para a degradação de corantes a partir de lacases fúngicas.....	28
----------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABTS	2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina-6- ácido sulfônico)
CONAMA	Conselho Nacional do Meio Ambiente
DBO	Demanda Bioquímica de Oxigênio
DQO	Demanda Química de Oxigênio
HBT	1-hidroxibenzotriazol
LiP	Lignina Peroxidase
MnP	Manganês Peroxidase
UTFPR	Universidade Tecnológica Federal do Paraná

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	OBJETIVOS	16
2.1	OBJETIVO GERAL.....	16
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
3	REFERENCIAL TEÓRICO	17
3.1	UTILIZAÇÃO E DESCARTE DE CORANTES.....	17
3.2	FUNGOS DA PODRIDÃO BRANCA E ENZIMAS LIGNINOLÍTICAS.....	22
3.3	LACASES	24
4	PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS	31
4.1	CULTIVO E ARMAZENAMENTO DAS CEPAS FÚNGICAS	31
4.2	PREPARO DO INÓCULO PARA MEIO LÍQUIDO	32
4.3	PRODUÇÃO DE ENZIMAS EM CULTIVO LÍQUIDO ESTÁTICO.....	32
4.3.1	Determinação da Biomassa Fúngica	33
4.3.2	Determinação da Atividade De Lacase	33
4.3.3	Determinação da Atividade De MnP	34
4.3.4	Determinação da Atividade De LiP	34
4.4	PREPARO DAS SOLUÇÕES DE CORANTES	35
4.5	BIODEGRADAÇÃO DOS CORANTES AZUL MARINHO REATIVO E CRISTAL VIOLETA A PARTIR DO EXTRATO ENZIMÁTICO BRUTO.....	36
4.6	BIODEGRADAÇÃO DOS CORANTES AZUL MARINHO REATIVO E CRISTAL VIOLETA A PARTIR DA LACASE COMERCIAL	37
5	RESULTADOS E DISCUSSÕES	38
5.1	PRODUÇÃO DE ENZIMAS LIGNINOLÍTICAS.....	38
5.2	BIODEGRADAÇÃO UTILIZANDO O EXTRATO ENZIMÁTICO BRUTO.....	42
5.2.1	Corante Azul Marinho Reativo	42
5.2.2	Corante Cristal Violeta	45
5.3	BIODEGRADAÇÃO UTILIZANDO EXTRATO ENZIMÁTICO COMERCIAL.....	48
5.3.1	Corante Azul Marinho Reativo	49
5.3.2	Corante Cristal Violeta	51
6	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	55
7	CONCLUSÃO	57

REFERÊNCIAS.....	58
------------------	----

1 INTRODUÇÃO

Os corantes, compostos coloridos, adicionados em solução e que se fixam ao material ao qual são aplicados, são utilizados desde a antiguidade pelo homem, inicialmente em pinturas de cavernas e com o passar do tempo passaram a ter utilização para tingimento de roupas e alimentos ¹. Atualmente os corantes são aplicados em diversos setores industriais e, portanto, são encontrados em grandes quantidades em efluentes líquidos, apresentando grande potencial poluidor ^{1; 2}. São moléculas aromáticas que apresentam uma estrutura molecular não saturada, sendo solúveis em meio ácido, básico ou neutro ³. Sua estrutura molecular é bastante complexa e apresenta uma cinética lenta de degradação, além de serem substâncias recalcitrantes, podendo ter muitas reações intermediárias ². Os corantes podem ser classificados de acordo com seu grupo funcional, que depende de um grupo cromóforo (o qual é responsável em dar a cor característica dos corantes), ou através da sua forma de aplicação ³.

Dois exemplos de corantes amplamente utilizados em indústrias, e que são o foco deste estudo, são o corante Cristal Violeta, empregado na indústria têxtil e de pigmentos e o Azul Marinho Reativo, empregado na indústria de algodão, lã e celulose, sendo este um corante reativo ⁴. Estudos relacionados a degradação de corantes através de diversos meios vem sendo investigados nos últimos anos. O corante Cristal Violeta e o corante reativo Azul Turquesa, por exemplo, já foram alvos de estudo em aplicação de argila maranhense como adsorvente para remoção destes corantes ⁵. Porém, não foram encontrados estudos voltados especificamente para a degradação do corante Azul Marinho Reativo, o que torna importante realizar uma pesquisa direcionada a este corante, uma vez que não se encontram pesquisas relacionadas a ele, mesmo que a classe de corantes reativos seja amplamente utilizada industrialmente ⁴.

A persistência destes compostos em relação aos tratamentos convencionais existentes e a decomposição incompleta dos resíduos resultam em moléculas complexas com efeitos mutagênicos e prejudiciais aos seres vivos ². Contudo, novas práticas para a remoção de corantes vêm chamando atenção. Tais práticas consistem na degradação dos corantes por microrganismos, incluindo bactérias, leveduras e, principalmente, fungos filamentosos ¹.

Com o aumento do interesse por estudos de biodegradação, vários fungos ligninolíticos foram avaliados para a mineralização e descoloração de corantes. Estudos de degradação demonstraram que os fungos pertencentes ao grupo dos Basidiomicetos são grandes degradadores de corantes de diversas classes^{3;6}. Estes fungos têm sido bastante utilizados por apresentarem como característica a produção de enzimas capazes de degradar moléculas complexas, como por exemplo lacases e peroxidases².

Um fungo amplamente estudado quanto à produção de enzimas ligninolíticas é o *Trametes* sp.⁷. Esse basidiomiceto é capaz de produzir a lacase, que é uma enzima da classe das oxirredutases. Estas enzimas, bem como as peroxidases, possuem um importante papel biológico, degradando compostos aromáticos e despolimerizando a lignina^{8;9}.

As lacases possuem quatro átomos de cobre em sua estrutura e são capazes de catalisar diversos substratos, entre eles a lignina presente na parede celular das plantas¹⁰. Por esta característica de degradação de compostos complexos e recalcitrantes, a lacase tem sido alvo de diversas pesquisas. Também tem sido utilizada em diversas áreas industriais, como o biobranqueamento de polpa de celulose, o tratamento de águas provenientes de instalações industriais, o branqueamento nas indústrias têxteis e de corantes, entre outras aplicações. Com isso é possível notar uma importante relação entre a biodegradação de substâncias aromáticas e a descoloração de corantes pela ação de enzimas^{2; 7; 10}. Estas aplicações podem ser ampliadas se forem utilizados mediadores, uma vez que com a sua utilização a quantidade e a variedade de substratos que podem ser utilizados pela enzima aumentam consideravelmente, potencializando sua ação⁸.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Produzir lacase fúngica a partir do basidiomiceto *Trametes* sp. para aplicação no processo de biodegradação dos corantes sintéticos Azul Marinho Reativo e Cristal Violeta.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Avaliar a produção de lacase pelo fungo *Trametes* sp. em cultivo líquido estático;
- b) Avaliar a degradação dos corantes Azul Marinho Reativo e Cristal Violeta em ensaios *in vitro* utilizando o extrato bruto enzimático produzido no cultivo de *Trametes* sp.;
- c) Avaliar a degradação dos corantes Azul Marinho Reativo e Cristal Violeta utilizando lacases comerciais, provenientes do fungo *Pleurotus ostreatus* para comparação da eficiência do processo em relação ao extrato bruto enzimático produzido no cultivo de *Trametes* sp.;
- d) Determinar o efeito da presença do mediador químico 1- hidroxibenzotriazol (HBT) no processo de biodegradação.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 UTILIZAÇÃO E DESCARTE DE CORANTES

Corantes são substâncias coloridas, com capacidade de absorver e emitir radiação no espectro visível (400 a 700 nm), que conferem cor aos materiais aos quais são aplicados. Os corantes são utilizados desde a antiguidade, inicialmente como tinta para pinturas em cavernas, mas logo depois para colorir pele, roupas e alimentos. Várias civilizações desenvolveram técnicas de tingimento, destacando-se entre elas o Egito, onde utilizavam compostos naturais, de origem animal, vegetal ou mineral, como forma de tingimento para produtos e alimentos ^{2; 11}. Entretanto, estes compostos inicialmente utilizados não atingiam resultados tão bons quanto o esperado, o que resultou em pesquisas para obtenção de corantes sintéticos que conferissem melhor coloração ¹.

O primeiro corante sintético foi obtido acidentalmente, como subproduto de uma reação de fenilamina com dicromato de potássio. Posteriormente outros corantes sintéticos foram descobertos e usados indiscriminadamente, para diversos fins, como por exemplo para mascarar alimentos de má qualidade. Com o passar do tempo, diversas indústrias, como a indústria têxtil, a indústria de papel e celulose, a indústria plástica, a indústria farmacêutica, entre outras passaram a utilizar corantes sintéticos como uma alternativa de menor custo em relação aos corantes naturais ¹.

Mesmo com sua grande utilização, apenas atualmente tem-se dado a devida importância à toxicidade presente em muitos corantes, que possuem, por exemplo, potenciais mutagênicos e carcinogênicos ^{1; 12}. Além destes potenciais danosos os corantes também possuem estruturas de difícil degradação, que produzem muitas reações intermediárias, com diversos subprodutos ².

Esta potencial toxicidade está diretamente relacionada à estrutura dos corantes, cuja molécula é composta de um grupo cromóforo e uma estrutura de fixação ¹³. O grupo cromóforo é o responsável pela absorção de energia luminosa conferindo cor ao composto, enquanto a estrutura de fixação é composta de grupos auxiliares que conferem sua interação com o substrato ². A partir desta divisão da molécula existem duas maneiras de classificar corantes, a primeira é a partir da

estrutura do grupo cromóforo (classificado como azo, nitro, entre outros) e a segunda tem relação com a estrutura de fixação os corantes (classificados como ácidos, básicos, azoicos, branqueadores, pré-metalizados, entre outros), sendo que cada tipo de corante possui utilizações específicas de acordo com a sua classificação ^{1;2}.

O grupo cromóforo de maior destaque é o grupo azo, que possui, em sua estrutura, a presença de um ou mais grupos $-N=N-$ ligados a anéis aromáticos, formando estruturas de difícil degradação ². Ainda tem-se o grupo antraquinona, composto por estruturas aromáticas fundidas bastante estáveis, o grupo ftaleína que é formado por moléculas resultantes da reação entre o anidrido ftálico e o resorcinol, que produz um xanteno (composto fluorescente bastante utilizado como corante) e o grupo trifenilmetano, que é uma substância com três grupos fenil e um hidrogênio ligados a um átomo de carbono ¹.

Estes corantes sintéticos, amplamente utilizados por diversas indústrias, geram grandes problemas no gerenciamento de efluentes, mesmo quando descartados em pequenas concentrações. Isso acontece, pois com a coloração da água, a solubilidade do oxigênio diminui, afetando o ecossistema aquático, além de liberar substâncias nocivas ao ambiente e aos seres vivos ¹.

Todo esse efluente gerado deve ser disposto de maneira correta, a fim de promover a qualidade dos corpos receptores. Para garantir o controle e a disposição final adequada destes efluentes é importante estar de acordo com a legislação vigente. Segundo a Resolução Nº 430/2011 do CONAMA- Conselho Nacional do Meio Ambiente, que “dispõe sobre condições, parâmetros, padrões e diretrizes para gestão do lançamento de efluentes e que somente poderão ser lançados diretamente nos corpos receptores após o devido tratamento”. A Resolução CONAMA 357/2005 determina que “corantes provenientes de fontes antrópicas que não sejam removíveis por processo de coagulação, sedimentação e filtração convencionais devem estar ausentes em efluentes” ^{14; 15}.

Um dos maiores exemplos de indústria a se destacar é a indústria têxtil, a qual gera uma quantidade abundante de águas residuárias com grande potencial poluidor, rico em produtos complexos, principalmente corantes. Grande parte destes resíduos é proveniente das impurezas advindas da matéria prima, limpeza de máquinas e caldeiras, produtos utilizados nas etapas de produção e corantes liberados durante as etapas de tingimento e descoloração. A partir destes processos, são desencadeados diversos parâmetros que causam a poluição de efluentes, tais

como altas cargas de demanda química de oxigênio (DQO) e demanda bioquímica de oxigênio (DBO), além de outras substâncias de baixa biodegradabilidade ². Um corante amplamente utilizado em indústrias têxteis e de pigmentos é o corante Cristal Violeta, já em outras indústrias, como a de algodão, lã e celulose, se tem a utilização dos corantes reativos ⁴. A utilização destes corantes e o seu descarte em efluentes industriais acaba por gerar os problemas citados, o que torna interessante o estudo de sua degradação ¹⁶.

O corante Cristal Violeta vem sendo objeto de estudo de pesquisas relacionadas a degradação de corantes. Como exemplo tem-se estudos onde foram utilizadas zeólitas e palha de carnaúba como removedores deste corante ^{17; 18}.

Os corantes reativos possuem em sua estrutura um grupo eletrofílico (reativo), que tem grande tendência a formar ligações covalentes com outros grupos, como os grupos amino das poliamidas, os grupos hidroxila das fibras de celulose e também com os grupos tióis ¹⁹. Como características, essa classe de corantes apresenta uma grande solubilidade em água ²⁰.

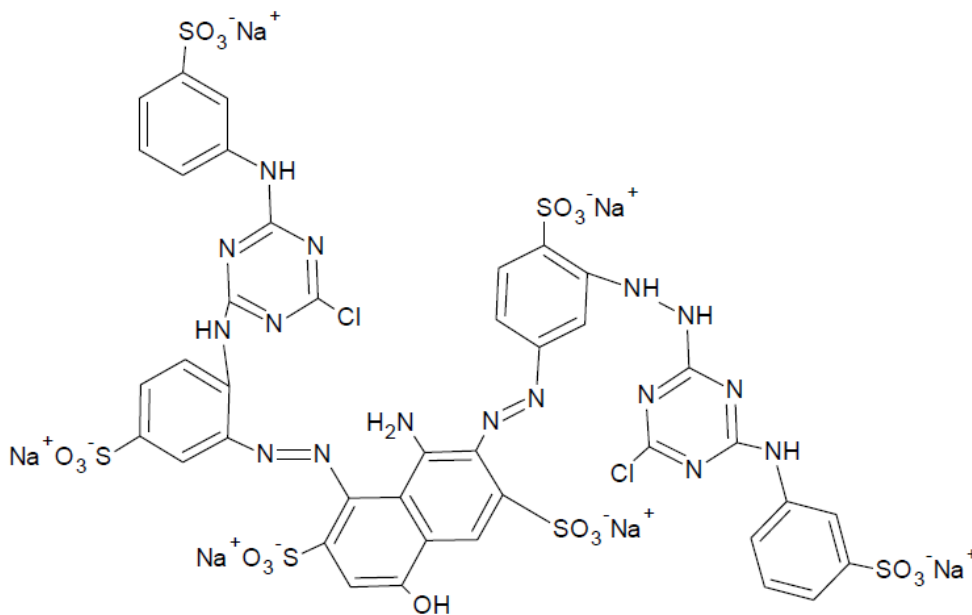
Os corantes reativos também estão sendo alvo de pesquisas em relação a sua degradação. Como exemplos tem-se os estudos: avaliação da capacidade de remoção de corante têxtil pelo fungo *Lasiodiplodia theobromae* MMPI ²; descoloração e degradação de azocorantes por bactérias ¹ foram realizados, entretanto existem diferentes corantes reativos e é necessário realizar-se mais pesquisas direcionadas a eles.

Existem diversos grupos de corantes reativos, dentre os quais se destacam os que possuem como grupos cromóforos as funções azo e antraquinona e, como grupos reativos, a clorotriazinila e a sulfatoetilsulfonila ²¹. No que se refere ao processo de tingimento de fibras, a classe de corantes reativos está entre as mais utilizadas no mundo. Esta ampla utilização ocorre, pois estes corantes apresentam ótimas propriedades de solidez e brilho o que os possibilita dominar mercado de tingimento e estamparia do algodão ⁴.

A relação destes corantes com a fibra, por exemplo, ocorre através de uma ligação covalente gerada a partir da reação em que o grupo nucleofílico do corante é substituído pelo grupo hidroxila (-OH) da celulose. A formação desta ligação covalente entre a fibra e o corante confere maior estabilidade na cor do tecido tingido quando comparado a outros tipos de corantes, nos quais o processo de coloração ocorre através de ligações de menor intensidade ^{20; 21}.

Um corante pertencente a classe dos corantes reativos é o corante Azul Marinho Reativo, também conhecido como Azul Reativo 171, fornecido pela indústria QUIMISA. Este possui peso molecular de $1433,95 \text{ g mol}^{-1}$. Sua estrutura é bastante complexa, sendo um dos motivos pelo qual é de difícil degradação ²².

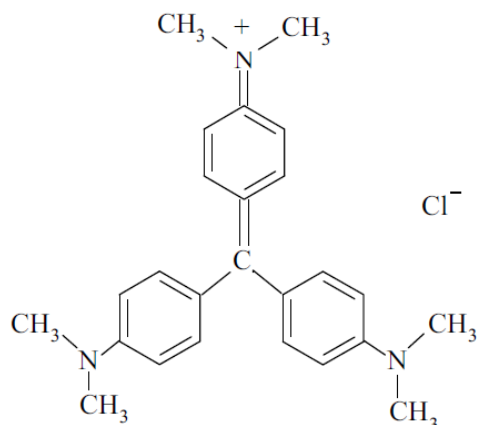
Figura 1 – Fórmula estrutural do corante Azul Marinho Reativo.



Fonte: Adaptado de Giovanella, 2011 ²².

O corante Cristal Violeta, apresentado na Figura 2, pertencente à classe dos triarilmetanos é de natureza catiônica e possui fórmula molecular: $\text{C}_{25}\text{H}_{30}\text{ClN}_3$ e peso molecular: $373,90 \text{ g mol}^{-1}$ ^{12; 18; 23}. Este é muito usado como corante roxo na indústria têxtil e como tinta de impressão, tendo absorvância variável e dependente do pH do meio ¹⁸.

Figura 2 – Fórmula estrutural do corante Cristal Violeta.



Fonte: Aguiar *et. al.*, 2006 ¹².

Os riscos toxicológicos à saúde humana relacionados a estes corantes são diversos e dependem da via de entrada no organismo, sendo ingestão oral, sensibilização da pele ou por vias respiratórias e dependem do tempo de exposição, bem como da solubilidade do contaminante no meio e a rota metabólica deste no organismo ¹⁸. Em relação à ingestão oral, um pequeno número de corantes pode apresentar toxicidade aguda, sendo estes encontrados principalmente nos azocorantes (dados medidos através de 50% da dose letal) ¹.

Devido às estruturas altamente estáveis, os corantes sintéticos são dificilmente removidos de efluentes contaminados pelos métodos físico-químicos normalmente utilizados ¹². Com isso fez-se necessário estudar outros métodos de remediação e observou-se que a utilização de microrganismos, principalmente fungos filamentosos da classe dos Basidiomicetos, têm um resultado bastante positivo para a degradação destes compostos, devido à produção de enzimas capazes de mineralizar tais contaminantes. Isso ocorre, pois a biodegradação de diversos compostos aromáticos por fungos produtores de enzimas ligninolíticas está bastante relacionado com a descoloração e mineralização de diversos corantes ^{7; 12}.

Em geral, estudos utilizando lacases provenientes de outros fungos, como o *Trametes villosa* SC10 ³, *Pleurotus spp* ²⁴, *Pycnoporus sanguineus* e *Trametes versicolor* ¹⁶ para a degradação e descoloração de corantes já foram realizados por diversos autores. Porém, houve uma grande dificuldade em encontrar trabalhos relacionados à degradação dos corantes Azul Marinho Reativo e Cristal Violeta na

presença da enzima lacase proveniente de *Trametes* sp., o que torna importante a preocupação em realizar-se um estudo relacionando lacase derivada deste fungo com a degradação dos corantes descritos.

3.2 FUNGOS DA PODRIDÃO BRANCA E ENZIMAS LIGNINOLÍTICAS

Os fungos decompositores da madeira podem ser divididos em três categorias, fungos da podridão branca, parda e branca⁶. Os fungos da podridão branca são Basidiomicetos que atacam preferencialmente madeiras duras e têm por característica degradar completamente a parede celular dos vegetais, incluindo a lignina, sendo identificados pelo aspecto esbranquiçado da madeira decomposta^{3; 6; 12}. Estes fungos são subdivididos em duas classes: fungos que degradam simultaneamente todos os compostos da parede celular e fungos que degradam principalmente a lignina, sendo que esta e a hemicelulose são decompostas antes da celulose. Os fungos da podridão branca degradam preferencialmente madeiras duras, principalmente as com alto teor de umidade, formam cavidades na parede secundária das células vegetais, consumindo celulose e gerando resíduos de lignina. Os fungos de degradação parda atacam preferencialmente madeiras macias quebrando a celulose em moléculas menores deixando um substrato rico em lignina tornando a madeira quebradiça^{6; 12}.

Os fungos da podridão branca são considerados os organismos mais importantes na decomposição da lignina¹⁶. Isto acontece, pois estes apresentam conjuntos de enzimas com ação inespecífica em seus organismos, os quais podem decompor diversos compostos persistentes de estrutura complexa, semelhante à da lignina¹³. Os tratamentos realizados com estes microrganismos possuem vantagens, como seletividade e eficiência, em relação aos tratamentos convencionais e cada vez mais se tem estudado formas de tratamentos utilizando enzimas fúngicas²⁵.

Estes complexos enzimáticos possuem duas classes principais de enzimas, aquelas que estão relacionadas à degradação da celulose e da hemicelulose, que são as enzimas hidrolíticas, celulasas e hemicelulasas e, também aquelas relacionadas à degradação da lignina, que são as enzimas oxidativas, peroxidases e lacases⁶.

O fungo da podridão branca *Trametes* sp. é comumente usado em estudos de degradação da lignina, devido à sua alta degradação, seu rápido crescimento e seu fácil manuseio ⁷.

Dentre os fungos produtores de enzimas degradadores de lignina tem-se três outros grupos: fungos que não excretam quantidades significativas de enzimas oxidativas; fungos produtores de peroxidases (enzimas que requerem peróxidos para catalisar reações) e fungos produtores de lacases ^{16; 24}.

Dentre as peroxidases produzidas por estes fungos, pode-se destacar a Manganês Peroxidase (MnP) e a Lignina Peroxidase (LiP), ambas clivam ligações na presença do mediador peróxido de hidrogênio (H_2O_2) ¹². A MnP tem um potencial de redução suficiente para retirar elétrons apenas de fenóis ⁶. A MnP contém em sua estrutura, como grupo prostético, a ferroprotoporfirina IX (grupo heme) e depende da oxidação do Mn^{2+} à Mn^{3+} , que se mantém estável e posteriormente oxida outros substratos, como fenóis monoméricos e diméricos. A LiP é uma glicoproteína, que contém como grupo prostético o grupo heme ²⁶, esta enzima possui potencial de redução superior ao da MnP e pode oxidar estruturas aromáticas não fenólicas, a qual oxida álcoois benzílicos, quebra cadeias aromáticas e anéis compostos ^{6; 12}. Devido a estas degradações as peroxidases podem ser utilizadas para a remoção de compostos aromáticos de efluentes, dentre estes compostos incluem-se os corantes, entretanto sua atividade pode ser prejudicada pela formação de radicais livres durante a sua ação, isto faz com que as peroxidases sejam menos utilizadas ²⁴.

Em relação às lacases, também produzidas por fungos Basidiomicetos, se tem a atuação catalítica sobre uma variedade de substratos. Entretanto esta enzima possui um potencial de redução mais baixo que os das peroxidases e só é capaz de oxidar fragmentos fenólicos, sendo que a utilização de mediadores aumenta consideravelmente os seus substratos. Dentre estes substratos, incluem-se os corantes, que são dificilmente degradados, mas com a ação enzimática mediada a descoloração é favorecida, visto que em presença de mediadores, alguns corantes altamente resistentes alcançam bons níveis de remoção de cor ^{8; 26; 27}.

3.3 LACASES

As lacases são enzimas ligninolíticas encontradas em fungos, mas também em outros organismos, como plantas e bactérias, entretanto são as lacases fúngicas que possuem a função de degradar a lignina em estruturas vegetais ²⁸.

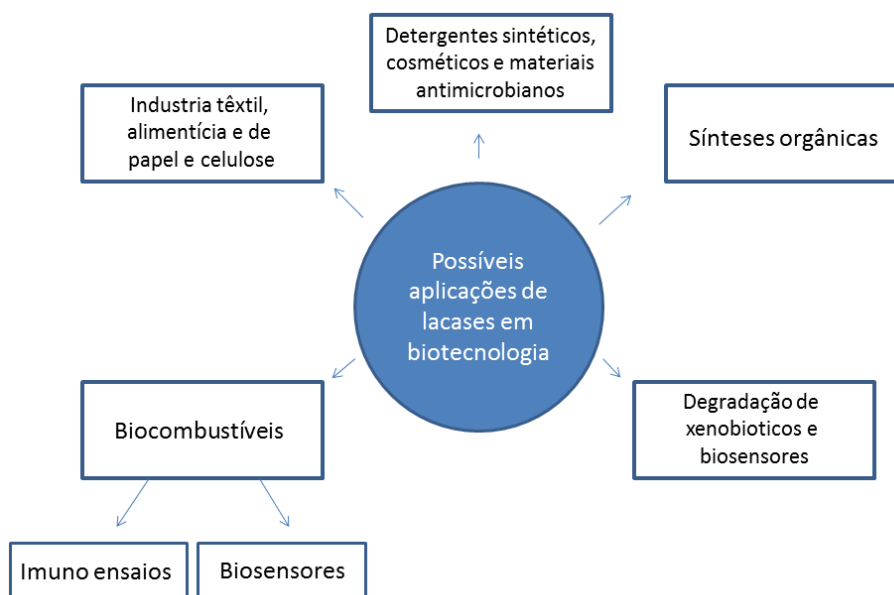
Lacases são oxiredutases, enzimas que catalisam processos de oxidação e redução que atuam sobre diversos substratos aromáticos e inorgânicos ¹².

A molécula desta enzima é uma glicoproteína que possui em sua estrutura um centro ativo composto de quatro átomos de cobre distribuídos em três diferentes sítios de ligação redox, classificados, segundo suas classes espectroscópicas. A lacase possui um cobre Tipo 1, um cobre Tipo 2 e dois cobres Tipo 3 ^{28; 29; 30}. A enzima catalisa a remoção de um elétron e um próton do substrato formando um radical livre. Durante a ação da enzima o elétron transferido para a enzima reduz o cobre Tipo 1 depois ocorre uma transferência interna de elétrons para os cobres dos Tipo 2 e 3 e, então o oxigênio é reduzido à água pela sua interação com os cobres Tipo 2 e 3, durante esse processo ocorre a oxidação de substratos orgânicos (especialmente aromáticos) ou inorgânicos ^{8; 31}.

A lacase é uma enzima considerada bastante inespecífica em comparação a outras. Esta enzima consegue catalisar a oxidação de diversas substâncias, como complexos metálicos, anilinas e principalmente fragmentos fenólicos, o que a torna uma importante biodegradadora de corantes além de outras aplicações biotecnológicas ^{25; 31}.

A Figura 3 exemplifica algumas aplicações da lacase no setor biotecnológico, das quais se destacam sua atuação na indústria de papel e celulose, em indústrias têxteis, em indústrias cosméticas, além de possuir boas perspectivas na descoloração de efluentes industriais ³¹.

Figura 3 – Possíveis aplicações de lacases em biotecnologia.



Fonte: Adaptado de Morozova *et. al.*, 2007 ³¹.

Por possuir um potencial de redução inferior ao da LiP e ao da MnP a lacase oxida apenas fragmentos fenólicos de lignina, não sendo capaz de degradar compostos não fenólicos. Entretanto a utilização de mediadores (compostos de baixo peso molecular que mediam a transferência de elétrons para o centro reativo da enzima) é capaz de aumentar o número de substratos atacados pela enzima ^{8; 28; 32}.

A utilização de mediadores é interessante pelo fato de que muitas vezes o substrato de interesse não pode ser catalisado pela enzima por não conseguir adentrar em seu sítio ativo devido a um impedimento estérico derivado do tamanho da molécula de substrato, uma vez que moléculas demasiadamente grandes não alcançam o centro ativo enzimático, ou, ainda, devido a ter um potencial de redução elevado ^{26; 32}.

Além da dependência em relação ao potencial da lacase, há também uma dependência em relação à diferença de potencial entre o substrato e a enzima, visto que para moléculas com potencial acima de 1,100 mV, ou seja, potenciais superiores ao da enzima, só podem ser utilizadas mediante o emprego de mediadores, formando sistemas conhecidos como lacase-mediador ^{28; 32}. Estes mediadores são compostos altamente oxidáveis que atuam como substratos

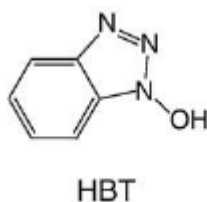
intermediários para a enzima, sendo capazes de interagir com moléculas volumosas ou de alto potencial de redução ^{25; 33}.

Além da degradação de substratos não fenólicos e de substratos de altos potenciais redox que não podem ser degradados diretamente pela enzima, os mediadores atuam contribuindo para a degradação de substratos complexos e/ou recalcitrantes. Os mediadores redox são compostos de baixo peso molecular que podem ser oxidados pela enzima, para, então oxidar os compostos através de mecanismos diferentes do mecanismo enzimático ³². À medida que o mediador oxida o composto a ser degradado o mesmo é reduzido, pelo próprio composto, voltando ao seu estado inicial e tornando o processo um ciclo que terá fim apenas quando os sítios ativos da enzima estiverem saturados, ou quando não houver mais substrato a ser degradado ³¹.

São conhecidos atualmente muitos mediadores, que podem ser tanto naturais como sintéticos, sendo que ambos atuam da mesma forma na transferência de elétrons envolvidos nas reações de oxidação e redução. Este grande número de mediadores gera uma ampla variedade de possíveis aplicações para a transformação oxidativa de substratos, como deslignificação e branqueamento de fibras de papel e descoloração de corantes sintéticos ²⁵.

Estudos mostram que os melhores mediadores para a lacase são os mediadores NN-OH, entre estes se destaca o 1-hidroxibenzotrizol (HBT), conhecido por ser um poderoso e eficiente mediador para a degradação de diversos substratos, como corantes e fármacos. Este mediador possui fórmula molecular $C_6H_5N_3O$ e peso molecular $M = 135,043 \text{ g mol}^{-1}$. A Figura 4 representa a estrutura do mediador HBT e demonstra seu baixo peso molecular, característica ideal para bons mediadores ³².

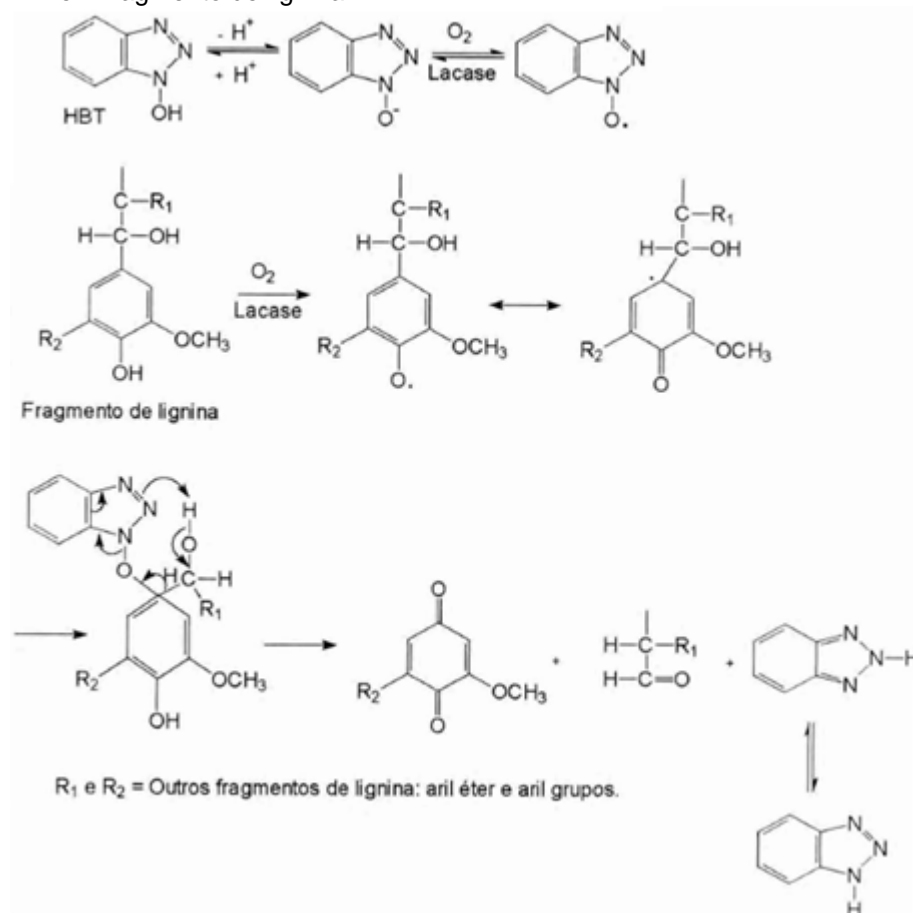
Figura 4 – Fórmula estrutural do mediador redox HBT



Fonte: Adaptado de Cañas, Camarero, 2010 ³².

Quando na presença da enzima lacase, o HBT é oxidado e reage com o substrato através de reações não enzimáticas, oxidando-o e sendo, por sua vez, reduzido novamente ao seu estado de origem, como demonstra a Figura 5 ³⁴:

Figura 5: Mecanismos de reações catalisadas por lacase na presença de HBT em fragmento de lignina



Fonte: Villela, 2003 ³⁴.

Com isso tem-se que as lacases realizam três tipos de reações: a oxidação direta de derivados fenólicos simples, a oxidação de substratos fenólicos e não fenólicos em presença de mediadores e o acoplamento de radicais reativos formados pela enzima, sendo importante destacar que estas reações podem ser utilizadas para a degradação ou para a síntese de compostos ²⁸.

Devido à sua versatilidade as lacases, e os sistemas lacase-mediador, podem ser utilizadas para biorremediar diversos contaminantes como hidrocarbonetos aromáticos, fenóis, pesticidas, corantes, entre outros. Os corantes são substratos de

interesse para tais sistemas uma vez que são capazes de oxidar as estruturas aromáticas que compõe os corantes, o que faz com que as lacases sejam consideradas por alguns autores as principais enzimas envolvidas na biodegradação destes compostos ²⁶. Com isso é possível perceber, no que diz respeito aos corantes, a utilização de lacases está encontrando cada vez mais aplicações biotecnológicas favoráveis ao ambiente ⁹.

A Tabela 1 apresenta estudos que utilizaram lacase fúngica para a degradação de corantes (variações na taxa de remoção estão relacionadas ao tempo de incubação).

Tabela 1 – Resultados obtidos em estudos para a degradação de corantes a partir de lacases fúngicas.

Corantes	Organismo produtor da lacase	Condições experimentais	Taxa de remoção	Referência
Vermelho Congo	<i>Pycnoporus sanguineus</i>	Incubação a 35 °C, pH 6,0, em PDA	Remoção menor	16
	<i>Trametes versicolor</i>	Incubação a 30 °C, pH 6,0, em PDA	100%	16
Verde Malaquita	<i>Pycnoporus sanguineus</i>	Incubação a 35 °C, pH 6,0, em PDA	Remoção menor	16
	<i>Trametes versicolor</i>	Incubação a 30 °C, pH 6,0, em PDA	100%	16
Azul de Metileno	<i>Pycnoporus sanguineus</i>	-	Remoção menor	16
	<i>Trametes versicolor</i>	-	100%	16
Cristal Violeta	<i>Pycnoporus sanguineus</i>	-	Remoção menor	16
	<i>Trametes versicolor</i>	-	100%	16

Tabela 1 – Resultados obtidos em estudos para a degradação de corantes a partir de lacases fúngicas.

Corantes	Organismo produtor da lacase	Condições experimentais	Taxa de remoção	Referência
Laranja II	<i>Lentinus strigellus</i>	25°C, tampão acetato pH 3,5 e ABTS	55 – 74%	12
	<i>Pycnoporus Sanguineus</i>		66 – 72%	12
Crisofenina	<i>Lentinus strigellus</i>	25°C, tampão acetato pH 3,5 e ABTS	-	12
	<i>Pycnoporus Sanguineus</i>		-	12
Vermelho Reativo 120	<i>Lentinus strigellus</i>	25°C, tampão acetato pH 3,5 e ABTS	-	12
	<i>Pycnoporus sanguineus</i>		25 – 30%	12
Azul Cibacron 3GA	<i>Lentinus strigellus</i>	25°C, tampão acetato pH 3,5 e ABTS	7 – 84%	12
	<i>Pycnoporus sanguineus</i>		2 – 90%	12
Azul Brilhante Remazol R	<i>Lentinus strigellus</i>	25°C, tampão acetato pH 3,5 e ABTS	4 – 65, 5%	12
	<i>Pycnoporus sanguineus</i>		24 – 77%	12
Cristal Violeta	<i>Lentinus strigellus</i>	25°C, tampão acetato pH 3,5 e ABTS	33 – 65%	12
	<i>Pycnoporus sanguineus</i>		24 – 64%	12
Azure B	<i>Lentinus strigellus</i>	25°C, tampão acetato pH 3,5 e ABTS	18 – 22%	12
	<i>Pycnoporus sanguineus</i>		5%	12

Tabela 1 – Resultados obtidos em estudos para a degradação de corantes a partir de lacases fúngicas.

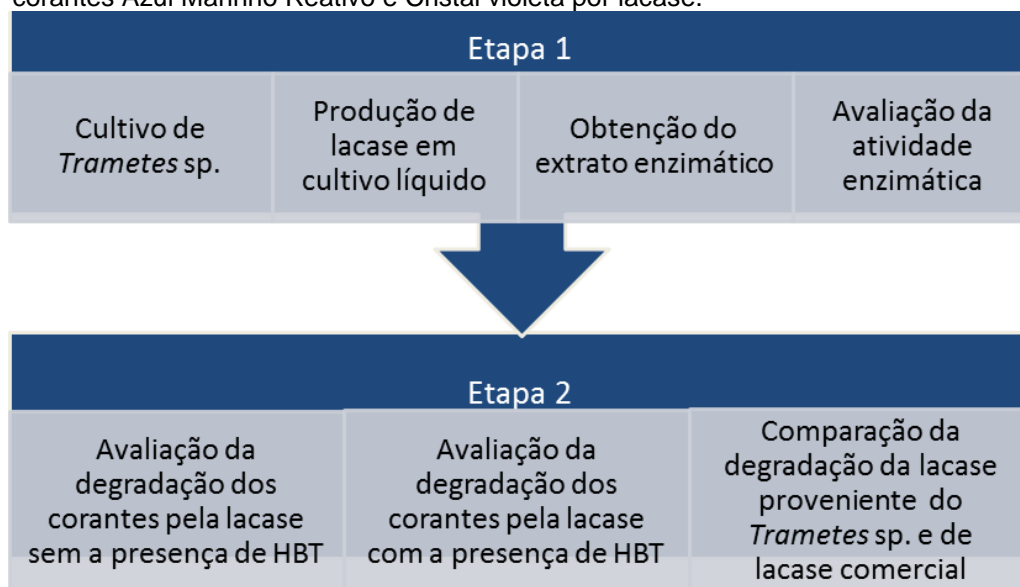
Corantes	Organismo produtor da lacase	Condições experimentais	Taxa de remoção	Referência
Azul de Metileno	<i>Lentinus strigellus</i>	25°C, tampão acetato pH 3,5 e	7 – 22%	12
	<i>Pycnoporus sanguineus</i>	ABTS	2 – 32%	12

Fonte: Os autores, 2016.

4 PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS

A metodologia utilizada foi dividida em duas etapas, conforme indica a Figura 6, onde a primeira etapa refere-se ao cultivo do fungo *Trametes* sp. e a produção da enzima lacase; a segunda etapa está relacionada à biodegradação dos corantes Azul Marinho Reativo e Cristal Violeta pela ação da enzima produzida com e sem presença do mediador redox 1-hidroxibenzotriazol (HBT) e, também pela ação de lacase comercial para comparação.

Figura 6 – Etapas metodológicas desenvolvidas para avaliação da degradação dos corantes Azul Marinho Reativo e Cristal violeta por lacase.



Fonte: Os autores, 2017.

4.1 CULTIVO E ARMAZENAMENTO DAS CEPAS FÚNGICAS

O basidiomiceto *Trametes* sp., que possui nível de biossegurança 1, ou seja, não possui patogenicidade, foi obtido do banco de fungos do Laboratório de Biotecnologia da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR), Campus Curitiba. O fungo foi repicado e cultivado em placas de Petri com meio Agar Extrato de Malte. A incubação foi realizada em estufa, a 28 °C, por 7 dias, o tempo necessário

para que o micélio ocupasse todo o meio. Após o tempo de crescimento as placas de Petri foram transferidas para um refrigerador, onde foram conservadas a 4 °C.

4.2 PREPARO DO INÓCULO PARA MEIO LÍQUIDO

O inóculo foi preparado através da transferência de discos de micélio fúngico de placas de Petri com Agar Extrato de Malte para placas de Petri contendo meio sólido constituído por glicose (10 g L⁻¹), peptona de carne bacteriológica (3 g L⁻¹), fosfato de potássio monobásico (1 g L⁻¹), sulfato de cobre (1 mM), casca de arroz (0,5%), serragem de eucalipto (0,5%)³⁵ e ágar bacteriológico (18 g L⁻¹). Esses discos miceliais (plugs de ágar) foram obtidos com o auxílio de um tubo de ensaio estéril para realização de cortes de 11 mm de diâmetro no meio de cultura com o fungo. As placas inoculadas foram, então, cultivadas em estufa, à temperatura de 28 °C, por 7 dias.

4.3 PRODUÇÃO DE ENZIMAS EM CULTIVO LÍQUIDO ESTÁTICO

O cultivo foi realizado em doze frascos Erlenmeyer de 250 mL, aos quais foram adicionados 50 mL de meio de cultivo líquido previamente autoclavado contendo glicose (10 g L⁻¹), peptona de carne bacteriológica (3 g L⁻¹), fosfato de potássio monobásico (1 g L⁻¹) e sulfato de cobre (1 mM), casca de arroz (0,5%) e serragem de eucalipto (0,5%), pois a incorporação de resíduos lignocelulósicos insolúveis poderia beneficiar a produção de lacases^{35; 36}. Três discos miceliais do inóculo de *Trametes* sp. foram adicionados em cada frasco, sempre tomando cuidado para que o micélio ficasse voltado para fora do meio líquido. Os frascos erlenmeyer, fechados com tampão de algodão e gaze, foram incubados em estufa, a 28°C, por 7 dias^{35; 37}.

Ao término de 7 dias os cultivos foram retirados da estufa e, através de filtração em papel filtro qualitativo, utilizando-se uma bomba de vácuo, a biomassa fúngica pode ser separada do extrato enzimático bruto. O extrato enzimático foi, então,

centrifugado a 5000 rpm por 15 minutos ³⁸ e o sobrenadante foi armazenado em freezer para posterior utilização em ensaios de atividade enzimática e experimentos de biodegradação dos corantes Azul Marinho Reativo e Cristal Violeta.

4.3.1 Determinação da Biomassa Fúngica

Para a determinação da biomassa fúngica foi realizado um ensaio gravimétrico. A biomassa, separada anteriormente do extrato enzimático, foi adicionada à um papel filtro quantitativo, previamente seco em estufa a 105 ° C por 4 h, e pesada. Posteriormente, esta biomassa em conjunto com o papel filtro foi levada à estufa, a temperatura de 60 ° C por 24 h. Ao ser retirada da estufa a biomassa foi conservada em um dessecador até que a temperatura se igualasse à temperatura ambiente e foi pesada novamente.

A diferença entre a massa inicial do filtro e a massa final, que continha o filtro e a biomassa fúngica, resulta na massa fúngica, em gramas, podendo ser convertido para gramas por litro ². Entretanto é necessário descontar-se as massas dos resíduos ligninocelulósicos e as massas dos plugs de micélio fúngico adicionados anteriormente ao meio.

4.3.2 Determinação da Atividade De Lacase

A determinação da atividade da lacase foi realizada através de análise em espectrofotômetro, a partir do monitoramento e acompanhamento da oxidação de 2,2'-azino-bis(3-etiltiazolina-6-sulfonato) (ABTS), sendo a leitura realizada no comprimento de onda de 420 nm ^{2; 37; 39}.

A solução reacional utilizada para a realização da leitura foi composta por 200 µL de ABTS 10 mM e 1,7 mL de solução tampão de acetato de sódio 50 mM (pH 5,0) ³⁷. Os tubos contendo essas soluções foram aquecidos em chapa de aquecimento a 40°C e, então foi adicionado 100 µL de extrato enzimático bruto com

diluição 1:15, aguardaram-se 5 minutos de incubação imediatamente foi realizada a medida da absorbância.

4.3.3 Determinação da Atividade De MnP

A determinação da atividade da enzima manganês peroxidase foi avaliada através espectrofotômetro, a partir do monitoramento e acompanhamento da oxidação do MnSO_4 10 mM, sendo a leitura realizada no comprimento de onda de 270 nm.

A solução utilizada para a leitura foi composta por 1,4 mL de tampão malonato (pH 4,5), 0,2 mL da solução de MnSO_4 10 mM e 0,2 mL do extrato enzimático. Para se dar início a reação, adicionou-se 0,2 mL da solução de H_2O_2 , e rapidamente misturou-se o conteúdo do tubo por inversão. Para zerar o espectrofotômetro, utilizou-se o próprio conteúdo da reação, iniciando-se em seguida a leitura. A cinética de reação foi monitorada por 5 min, para observar o possível aumento linear de absorbância pelo tempo.

4.3.4 Determinação da Atividade De LiP

A determinação da atividade enzimática da lignina peroxidase foi analisada através de espectrofotômetro, a partir do monitoramento e acompanhamento da oxidação do álcool veratrílico 4 mM, utilizando-se um comprimento de onda de 310 nm.

Essa solução foi composta por 1,5 mL de tampão tartarato 0,1 M (pH 3,0), 0,2 mL de álcool veratrílico 4 mM e 0,2 mL do extrato enzimático. Para iniciar a reação, foi adicionado 0,1 mL de H_2O_2 , misturando a solução por inversão. O espectrofotômetro foi zerado com a própria solução reacional, iniciando a leitura em seguida. O monitoramento cinético ocorreu durante 10 minutos para analisar o possível aumento linear da absorbância pelo tempo.

4.4 PREPARO DAS SOLUÇÕES DE CORANTES

O corante Azul Marinho Reativo foi fornecido pela empresa QUIMISA, que informou que o corante em questão também é conhecido como Azul Reativo 171. Este corante possui peso molecular igual a $1433,95 \text{ g mol}^{-1}$ e apresenta uma estrutura bastante complexa, sendo pertencente à classe dos azo corantes, conforme demonstra a Figura 1 ²². Não foi possível obter informações diretamente relacionadas à aplicação do corante em estudo, uma vez que existem pouquíssimos dados sobre este corante, entretanto é conhecido que a classe de corantes reativos é amplamente utilizada em indústrias têxteis ⁴.

O corante Cristal Violeta foi obtido no laboratório de biotecnologia da UTFPR possui fórmula molecular: $\text{C}_{25}\text{H}_{30}\text{ClN}_3$ e peso molecular: $373,90 \text{ g mol}^{-1}$, pertencente a classe dos triarilmetanos, de natureza catiônica ^{12; 18; 23}. Este é muito usado como corante roxo na indústria têxtil e como tinta de impressão, tendo absorvância variável e dependente do pH do meio ¹⁸.

Para o preparo das soluções, utilizou-se cada um dos corantes na forma sólida, sendo pesados para que fossem preparados 250 mL de soluções aquosas dos corantes Azul Marinho Reativo e Cristal Violeta, com concentrações de 250 e 500 mg L^{-1} respectivamente. Essas soluções foram conservadas em geladeira durante a realização de todos os testes.

Posteriormente, foram feitas diluições destas concentrações para realizar a varredura espectrofotométrica dos corantes, para a construção da curva analítica e para a utilização nos ensaios de biodegradação.

Uma varredura nos comprimentos de onda de 400 a 800 nm foi realizada em espectrofotômetro para determinar o pico de absorção máximo dos corantes Azul Marinho Reativo, 30 mg L^{-1} , e Cristal Violeta, 10 mg L^{-1} , ambos em solução aquosa.

Tendo encontrado o comprimento de onda de maior absorção, para os dois corantes, foram preparadas curvas de calibração para os ambos em diferentes concentrações (variando de 3 a 50 mg L^{-1} para o corante Azul Marinho Reativo e de 0,8 a 10 mg L^{-1} para o corante Cristal Violeta).

4.5 BIODEGRADAÇÃO DOS CORANTES AZUL MARINHO REATIVO E CRISTAL VIOLETA A PARTIR DO EXTRATO ENZIMÁTICO BRUTO

As análises de biodegradação foram realizadas em triplicata, em frascos Erlenmeyer de 100 mL onde se tinha um volume de reação de 50 mL, utilizando dois frascos controle para cada condição.

Foram realizadas análises com e sem a presença do mediador químico HBT, para obter-se uma comparação da atuação da enzima com estas duas condições, pois mediadores químicos são compostos que podem influenciar positivamente a eficiência de enzimas ligninomodificadoras que decompõem compostos xenobióticos^{40; 41}. A atuação de um mediador químico na decomposição dos corantes Azul Marinho Reativo e Cristal Violeta foi analisada ao longo do experimento de biodegradação.

As análises sem a presença do mediador (HBT) foram realizadas adicionando-se ao frasco os corantes, tampão acetato de sódio e os extratos enzimáticos e os frascos controle continham os corantes e o tampão, mas não continham os extratos enzimáticos. Para as análises com a presença de HBT foram adicionados aos frascos os corantes, tampão acetato de sódio, o mediador e os extratos enzimáticos. Os frascos controle continham os corantes, o tampão e o mediador e não continham os extratos enzimáticos.

Os extratos enzimáticos continham atividade enzimática pré-determinada e as condições de degradação foram avaliadas em incubadora *shaker* de bancada a 25 °C em meio agitado, com rotação de 130 rpm, para as concentrações de 25 e 40 mg L⁻¹ do corante Azul Marinho Reativo e para as concentrações de 5 e 10 mg L⁻¹ do corante Cristal Violeta.

Foi verificada a eficiência da lacase na degradação dos corantes comparando a quantidade inicial encontrada na amostra e após o tratamento enzimático, segundo a Equação 1⁷.

$$D = \frac{Abs_i - Abs_f}{Abs_i} \times 100\% \quad \text{Equação 1}$$

Onde:

D: Porcentagem de absorção da reação de descoloração;

Abs_i: Absorbância inicial observada na amostra;

Abs_f: Absorbância final observada na amostra (após o tratamento enzimático) ⁸.

Posteriormente foram utilizadas amostras de lacase comercial, nas mesmas condições, para comparação dos resultados de degradação.

4.6 BIODEGRADAÇÃO DOS CORANTES AZUL MARINHO REATIVO E CRISTAL VIOLETA A PARTIR DA LACASE COMERCIAL

Obteve-se, a partir da empresa Sigma-Aldrich, lacase purificada proveniente do fungo *Pleurotus ostreatus*. Para poder-se realizar os ensaios com a lacase comercial, primeiramente determinou-se a atividade de lacase da mesma forma que foi descrito no item 4.3.2 para o extrato bruto produzido. Posteriormente, foram realizados ensaios de biodegradação para os corantes Azul Marinho Reativo e Cristal violeta seguindo o mesmo procedimento do item 4.5, utilizando os mesmos equipamentos, nas mesmas condições.

Os corantes utilizados foram os mesmos, para poder-se obter uma comparação da eficiência da biodegradação entre o extrato bruto enzimático e o extrato comercial.

A utilização da lacase comercial para os ensaios de degradação dos corantes foi utilizada com o intuito de comparar a eficiência do processo em relação ao extrato bruto enzimático produzido no cultivo de *Trametes* sp. e, determinar se um extrato não purificado poderá obter resultados semelhantes aos encontrados para um extrato puro.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 PRODUÇÃO DE ENZIMAS LIGNINOLÍTICAS

Para realizar a ativação e cultivo do fungo *Trametes* sp. foram utilizadas quatro cepas pertencentes ao banco de dados do Laboratório de Biotecnologia da UTFPR, tais cepas são apresentadas pela Figura 7.

Figura 7 – Cepas pertencentes ao banco de fungos do laboratório de biotecnologia da UTFPR.



Fonte: Os autores, 2017.

Foi possível, apenas, realizar a ativação do basidiomiceto de interesse da cepa 4, uma vez que as demais apresentaram contaminação e/ou não apresentaram desenvolvimento fúngico no período de incubação de 7 dias. A Figura 8 apresenta o resultado do crescimento do fungo *Trametes* sp. proveniente da cepa 4 em meio Agar Extrato de Malte ao fim do período de incubação.

Figura 8 – Cultivo de *Trametes* sp. em meio Agar Extrato de Malte após incubação em estufa a 28 °C por 7 dias.



Fonte: Os autores, 2017.

A partir da ativação do fungo *Trametes* sp. foi possível transferir discos de micélio fúngico para um meio de cultivo seletivo próprio para o desenvolvimento do microrganismo. O meio escolhido continha resíduos lignocelulósicos (casca de arroz e serragem de eucalipto) para tornar o meio mais próximo ao ambiente no qual o microrganismo se desenvolve na natureza, ou seja, para suprir as necessidades de nutrientes necessários para o crescimento fúngico. Este procedimento foi realizado, pois segundo a literatura, há indicação de que a presença de lignina induz a produção de lacase^{42; 43}. O crescimento em meio contendo resíduos lignocelulósicos se deu de forma satisfatória ao longo de um período de incubação de 7 dias e tal crescimento pode ser observado na Figura 9.

Figura 9 – Cultivo de *Trametes* sp. em meio Agar Extrato de Malte com presença de resíduos lignocelulósicos após incubação em estufa à 28 °C por 7 dias.



Fonte: Os autores, 2017.

A partir do cultivo em meio contendo resíduos lignocelulósicos foi possível transferir discos de micélio para um cultivo líquido com as mesmas proporções de resíduos, no qual se obteve, novamente, ao fim dos 7 dias de incubação, crescimento sobre toda a superfície do meio, conforme demonstra a Figura 10. O conteúdo presente nos Erlenmeyers foi filtrado e, a partir daí obteve-se o extrato enzimático e a biomassa fúngica. Com o extrato enzimático foram realizados testes de atividade enzimática para a determinação da atividade da lacase, da MnP e da LiP e ensaios de biodegradação, enquanto que a biomassa foi seca e sua massa foi medida, gerando como resultado o valor de $12,513 \text{ g L}^{-1} \pm 2,2 \text{ g L}^{-1}$. O valor obtido indica que o fungo teve um desenvolvimento bom, gerando uma quantidade de biomassa considerada alta, uma vez que os resultados observados em literatura chegavam até $8,7 \text{ g L}^{-1}$, ou seja, o meio e as condições de cultivo utilizados se mostraram adequados ao desenvolvimento do fungo *Trametes* sp., que cresceu de forma apropriada^{2; 25}.

A atividade das enzimas ligninolíticas foi determinada espectrofotometricamente com leitura nos comprimentos de onda de 420 nm para a

lacase, 270 nm para a MnP e 310 nm para a LiP. Ao medir-se a atividade da lacase, a partir de sua reação com ABTS, determinou-se que o extrato bruto enzimático continha uma atividade equivalente a $727,27 \text{ U L}^{-1}$, já a atividade da MnP foi equivalente à $12,58 \text{ U L}^{-1}$ e a LiP não apresentou atividade no extrato avaliado, este resultado pode ser esperado, uma vez que a MnP e a LiP são enzimas mais difíceis de ser produzidas pois a sua produção está fortemente ligada às condições de cultivo do fungo utilizado, sendo necessário que o ambiente seja o propício para a produção destas enzimas, tendo como condições apropriadas a composição do meio, pH e temperatura adequados para a produção destas peroxidases. O que não aconteceu devido ao fato do foco do trabalho ser a produção de lacase, portanto as condições de cultivo foram adequadas para a produção de lacase. Além disso, outro fator que pode ter sido determinante para a baixa, ou nula, produção das enzimas MnP e LiP foi o tempo de cultivo líquido do fungo, que pode não ter sido suficiente para a produção destas enzimas, uma vez que estima-se que a lacase desenvolva-se primeiro no cultivo ⁴⁴.

Na sequência os extratos foram diluídos para que os testes de biodegradação fossem realizados com o valor de atividade da lacase igual a 50 U L^{-1} , o que foi determinado, pois, segundo dados da literatura, valores até 100 U L^{-1} são suficientes para a degradação de diversos substratos, uma vez que 1 U é a quantidade de enzima necessária para oxidar $1 \mu\text{mol}$ de substrato em 1 minuto ^{45; 46}. Ao longo do experimento concluiu-se que a escolha de utilizar-se o extrato enzimático com diluição para 50 U L^{-1} foi correta, pois, conforme será abordado posteriormente, foi uma quantidade suficiente para a comparação dos resultados de biodegradação envolvendo o extrato com presença e ausência do mediador químico HBT.

Figura 10 – Cultivo de *Trametes* sp. em meio líquido com presença de resíduos ligninocelulósicos após incubação em estufa à 28 °C por 7 dias.



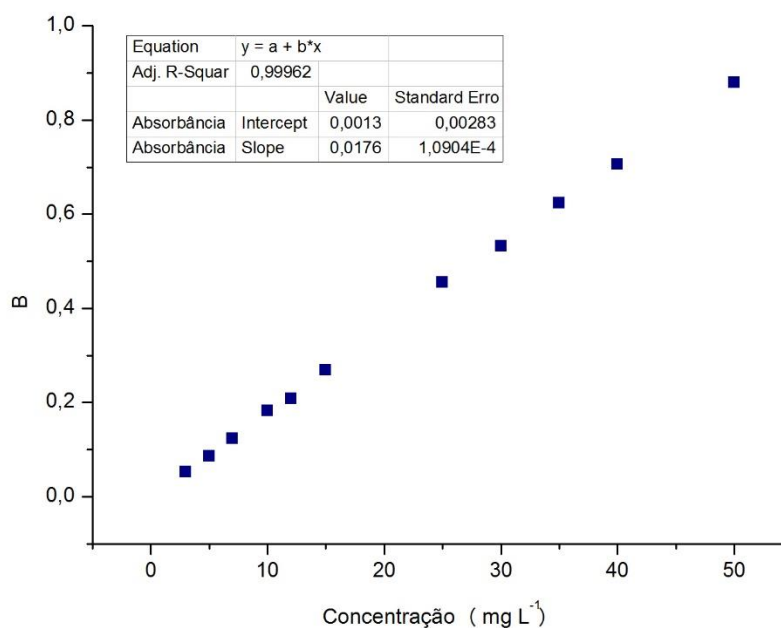
Fonte: Os Autores, 2017.

5.2 BIODEGRADAÇÃO UTILIZANDO O EXTRATO ENZIMÁTICO BRUTO

5.2.1 Corante Azul Marinho Reativo

Através da análise espectrofotométrica de varredura realizada entre os comprimentos de onda 300 a 800 nm, foi possível identificar que o comprimento de onda de maior absorção do corante Azul Marinho Reativo é 610 nm, o que era esperado, devido à intensa coloração azul apresentada pelo corante. Tendo o conhecimento do pico máximo de absorção, construiu-se uma curva de calibração, Figura 11, para o corante com concentrações variando de 3 a 50 mg L⁻¹. A curva obtida apresentou coeficiente de determinação R² igual a 0,9996.

Figura 11 – Curva de calibração do corante Azul Marinho Reativo.

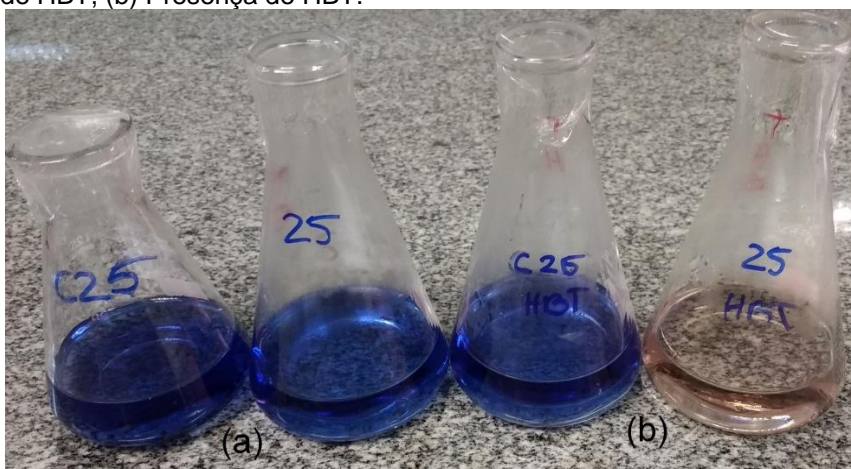


Fonte: Os autores, 2017.

Com o auxílio da curva de calibração foi possível identificar as concentrações ideais para se realizar os ensaios de biodegradação. As concentrações escolhidas foram as que pertenciam aproximadamente ao meio e ao final da curva de calibração, 25 mg L⁻¹ e 40 mg L⁻¹.

Ao final do período de 24 h foi possível identificar visualmente a diminuição da cor das soluções com presença de HBT; entretanto não foi possível identificar de forma visual descoloração nos testes realizados sem a presença do mediador, conforme demonstra a Figura 12. Ao término do ensaio foi realizada uma leitura espectrofotométrica no comprimento de onda de maior absorção do corante (610 nm) e, utilizando a Equação 1, que compara o valor de absorbância da solução antes do tratamento enzimático e o valor de absorbância após o tratamento enzimático, foi possível determinar a porcentagem de descoloração do corante Azul Marinho Reativo nas amostras.

Figura 12 – Comparação visual entre a degradação, a partir do extrato enzimático bruto, do corante Azul Marinho Reativo, 25 mg L⁻¹, com o controle, onde não há presença do extrato enzimático, em: (a) Ausência de HBT, (b) Presença de HBT.



Fonte: Os autores, 2017.

Ao se analisar a Figura 12 é possível perceber que a presença de mediador foi determinante na degradação do corante Azul Marinho Reativo.

O estudo de degradação realizado sem a presença do mediador pode ter tido resultados nulos devido às características do corante, como por exemplo o impedimento estérico causado pelo grande volume da estrutura do corante, ou por ele apresentar um potencial redox acima daquele que a enzima consegue oxidar^{29; 32}. Mas também pode ser devido às condições ambientais do experimento, como por exemplo, a temperatura de reação, que no experimento foi de 25 ° C para simular condições ambientais normais, ou seja, mais próximas da realidade, entretanto as condições ideais de temperatura para a maioria das enzimas estão situadas à temperaturas superiores, em torno de 50 à 70 ° C, desta forma a atuação da enzima poderia ser prejudicada, podendo degradar substrato, mas de forma lenta, de modo que não houve degradação em um período de 24 h³¹.

Já em relação ao estudo realizado em presença do mediador, obteve-se um resultado que pode ser esperado em alguns casos, pois os mediadores químicos que podem ser utilizados como substrato por enzimas geram intermediários com alto potencial de oxidação, sendo que estes intermediários auxiliam na ação enzimática por oxidar os compostos em solução³¹. Os mediadores da classe NN-OH, como o HBT, ao serem oxidados pela lacase geram um radical altamente reativo (NN-O·) conhecido como nitroxilo. A formação deste radical se dá quando a lacase retira um

elétron da estrutura NN-OH do mediador e, por consequência há a liberação de um próton, tornando o radical nitroxilo disponível para realizar a oxidação do corante ³².

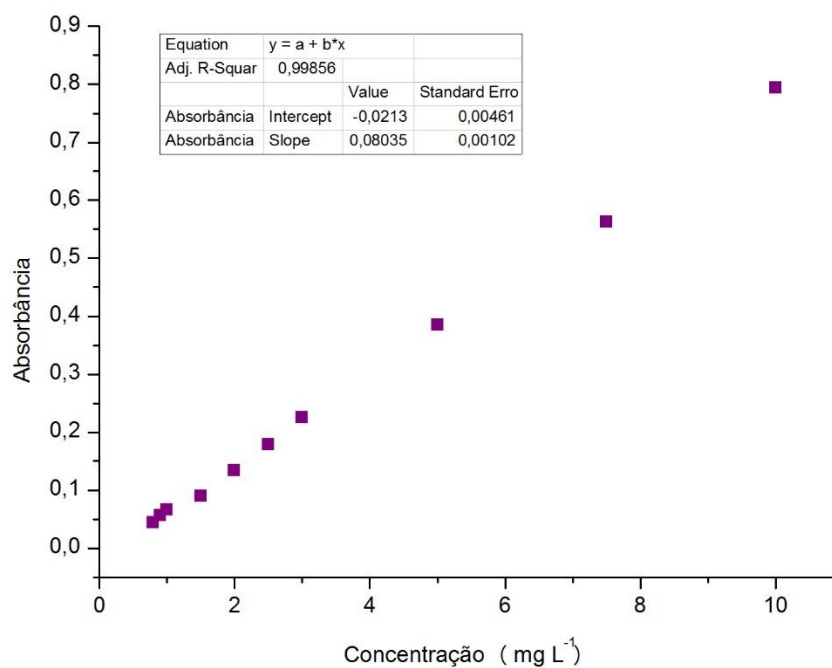
Estudos anteriores já comprovaram que a descoloração de alguns corantes resistentes à degradação de lacase é potencialmente melhorada por sistemas de lacase-mediador ²⁹.

Com isso é possível explicar as degradações, onde, para as duas concentrações avaliadas obteve-se resultados muito semelhantes, em que o extrato bruto puro não degradou ou degradou uma quantidade insignificante do corante. Enquanto com a presença de mediador a degradação foi superior à 75% para as duas concentrações.

5.2.2 Corante Cristal Violeta

Através da análise espectrofotométrica de varredura realizada entre os comprimentos de onda 300 e 800 nm foi possível identificar que o comprimento de onda de maior absorção do corante Cristal Violeta é 584,5 nm. Tendo o conhecimento do pico de absorção construiu-se, também, uma curva de calibração, Figura 13, para o corante com concentrações variando de 0,8 a 10 mg L⁻¹. A curva apresentou coeficiente de determinação R² igual a 0,9985.

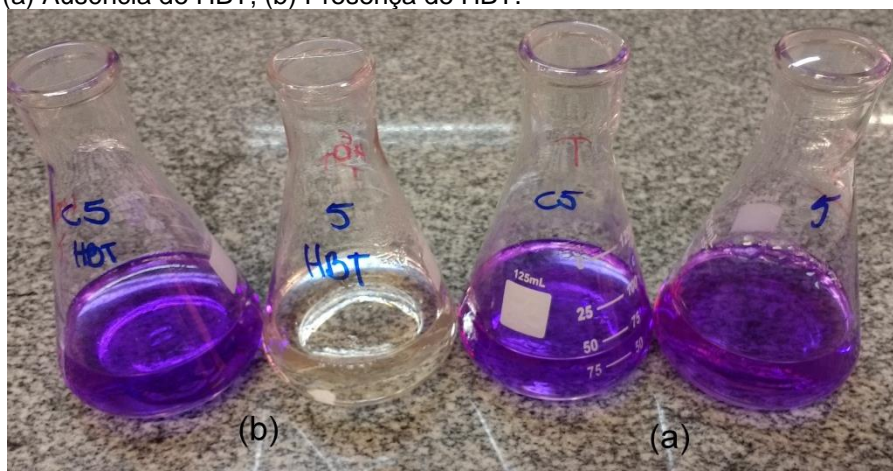
Figura 13 – Curva de calibração do corante Cristal Violeta.



Fonte: Os autores, 2017.

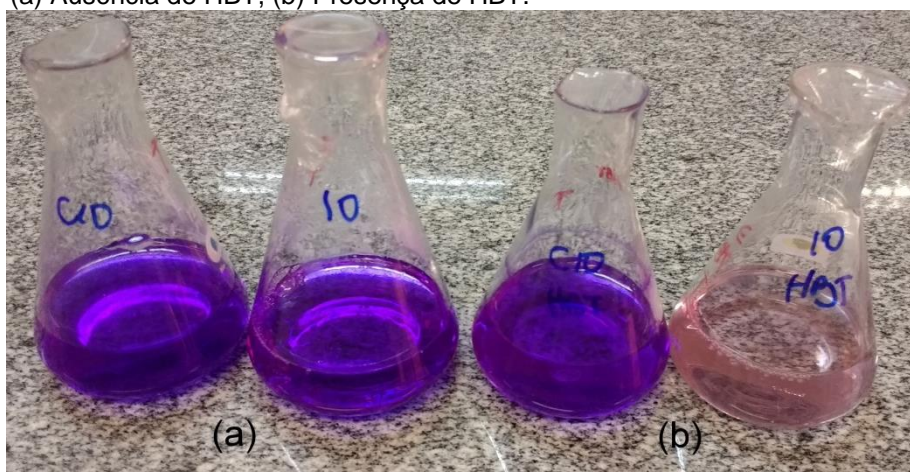
Conforme o procedimento descrito no item 5.2.1 também foi possível avaliar a degradação enzimática do corante Cristal Violeta. As Figuras 14 e 15 mostram a degradação de forma visual, após 24h de reação, sendo que novamente a descoloração é perceptível apenas na presença do mediador químico HBT. Também conforme descrito no item 5.2.1 foi possível obter as porcentagens de descoloração, descritas pelo Gráfico 1.

Figura 14 – Comparação visual entre a degradação do corante Cristal Violeta, 5 mg L^{-1} , com o controle, onde não há presença do extrato enzimático, em: (a) Ausência de HBT, (b) Presença de HBT.



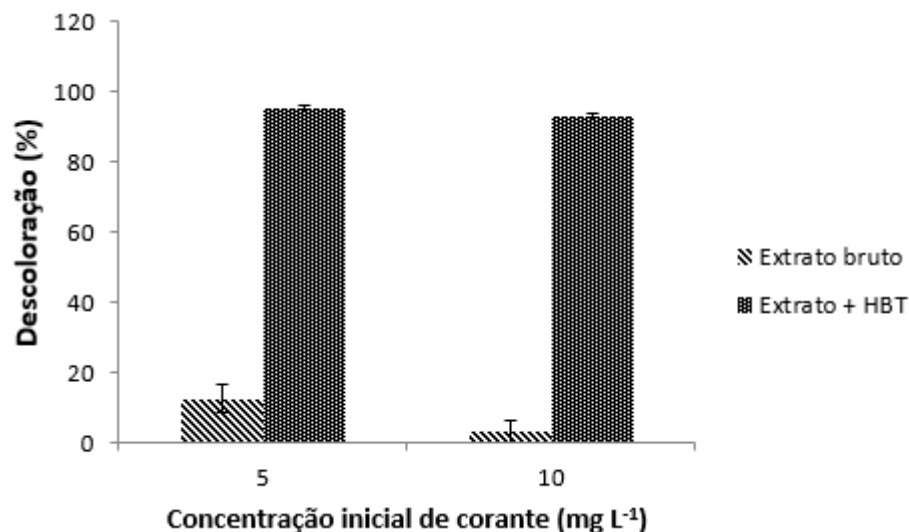
Fonte: Os autores, 2017.

Figura 15 – Comparação visual entre a degradação do corante Cristal Violeta, 10 mg L^{-1} , com o controle, onde não há presença do extrato enzimático, em: (a) Ausência de HBT, (b) Presença de HBT.



Fonte: Os autores, 2017.

Gráfico 1 – Comparação, a partir da porcentagem de descoloração realizada pelo extrato enzimático bruto, entre a degradação do corante Cristal Violeta para as concentrações de 5 e 10 mg L⁻¹ na ausência e na presença de HBT.



Fonte: Os autores, 2017.

Outra vez é possível notar a grande influência do mediador HBT na biodegradação, onde obteve-se resultados próximos para as duas concentrações avaliadas, sendo que o extrato bruto puro degradou de 3 a 12% do corante Cristal Violeta presente nas amostras. Esta degradação, superior à apresentada para o corante Azul Marinho Reativo, pode estar relacionada ao impedimento estérico de cada estrutura. A estrutura do corante Cristal Violeta é menor e menos complexa que a estrutura do corante Azul Marinho Reativo, conforme demonstram as Figuras 1 e 2, portanto o impedimento estérico exercido pelo corante Cristal violeta sobre o sítio ativo da lacase é menor, o que pode fazer com que a sua degradação seja mais rápida e, até mesmo, ocorra em maior quantidade ^{29; 32}.

Enquanto com a presença de mediador a degradação foi superior à 90% para as duas concentrações, sendo que estima-se que os motivos da obtenção de tais resultados são os mesmos apresentados no item 5.2.1.

5.3 BIODEGRADAÇÃO UTILIZANDO EXTRATO ENZIMÁTICO COMERCIAL

Para o teste de biodegradação com o extrato comercial, a atividade da enzima lacase comercial registrada foi de 5137,08 U L⁻¹. O extrato foi diluído de modo

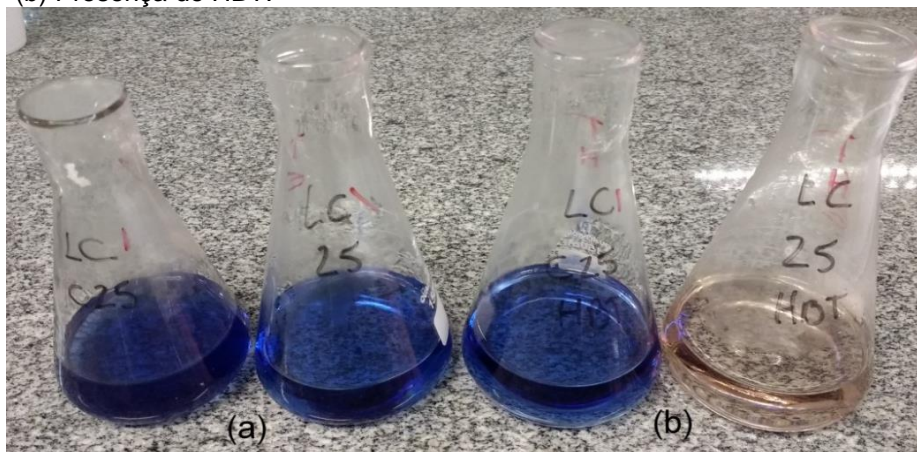
a realizar os testes de biodegradação nas mesmas condições dos testes com extrato enzimático bruto, ou seja, com atividade igual a 50 U L^{-1} .

5.3.1 Corante Azul Marinho Reativo

As condições de análise para essa etapa de biodegradação foram as mesmas descritas no item 5.2.1, com a única diferença da utilização do extrato de lacase comercial e não do extrato bruto enzimático obtido pelo cultivo do fungo *Trametes sp.*

A Figura 16 mostra a imagem referente à comparação entre a degradação do corante Azul Marinho Reativo com o controle, na ausência e presença de HBT.

Figura 16 – Comparação visual entre a degradação, realizada pelo extrato de lacase comercial, do corante Azul Marinho Reativo, 25 mg L^{-1} , com o controle, onde não há presença do extrato enzimático, em: (a) Ausência de HBT, (b) Presença de HBT.

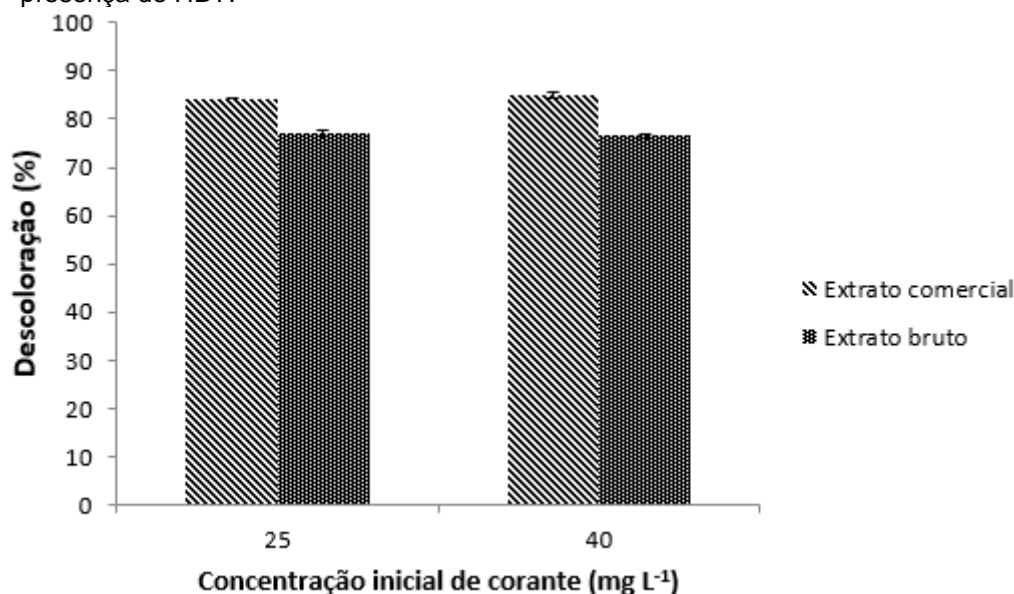


Fonte: Os autores, 2017.

Através da Figura 16, pode-se notar que a degradação do corante foi alta para os extratos de lacase comercial que continham HBT. Para ambas as concentrações a porcentagem de remoção foi acima de 84%. Já para os extratos puros, sem a presença de HBT, a eficiência da descoloração foi nula para ambas as concentrações.

O Gráfico 2 representa a comparação entre a degradação do corante Azul Marinho Reativo para as concentrações de 25 e 40 mg L⁻¹, na presença do mediador químico HBT, a partir da porcentagem de descoloração ocorrida no corante pela ação do extrato enzimático bruto em comparação ao extrato de lacase comercial. Não foram apresentados gráficos referentes à degradação do corante Azul Marinho Reativo sem a presença no mediador, pois os resultados obtidos para os dois extratos foram iguais a zero.

Gráfico 2 – Comparação, a partir da porcentagem de descoloração realizada pelo extrato enzimático bruto e pelo extrato comercial, referente a degradação do corante Azul Marinho Reativo para as concentrações de 25 e 40 mg L⁻¹ na presença de HBT.



Fonte: Os autores, 2017.

Ao comparar-se os resultados do extrato enzimático bruto com a lacase comercial, nota-se que os valores foram próximos, com uma taxa de remoção acima de 75% para os extratos que continham HBT. Enquanto, para os extratos sem HBT, as porcentagens foram baixas para todos os testes realizados.

Os resultados apresentados comprovam que as lacases, dentre as várias funções que apresentam, realizam a degradação de corantes, mesmo que através de mediadores. A utilização da lacase em conjunto com o mediador HBT para degradação de substrato é um fator determinante para a sua aplicabilidade neste estudo e através do uso do mediador HBT, notou-se que este aumentou a atividade

catalítica da lacase em relação aos corantes ^{29; 32}. Os possíveis motivos para a obtenção de tais resultados encontram-se discutidos no item 5.2.1.

5.3.2 Corante Cristal Violeta

As condições de análise para essa etapa de biodegradação foram às mesmas descritas no item 5.2.1 e a curva de calibração encontra-se na Figura 13, apresentada no item 5.2.2. A diferença apresentada neste teste em relação aos anteriores foi a utilização do extrato de lacase comercial e não do extrato bruto enzimático obtido a partir do basidiomiceto *Trametes* sp.

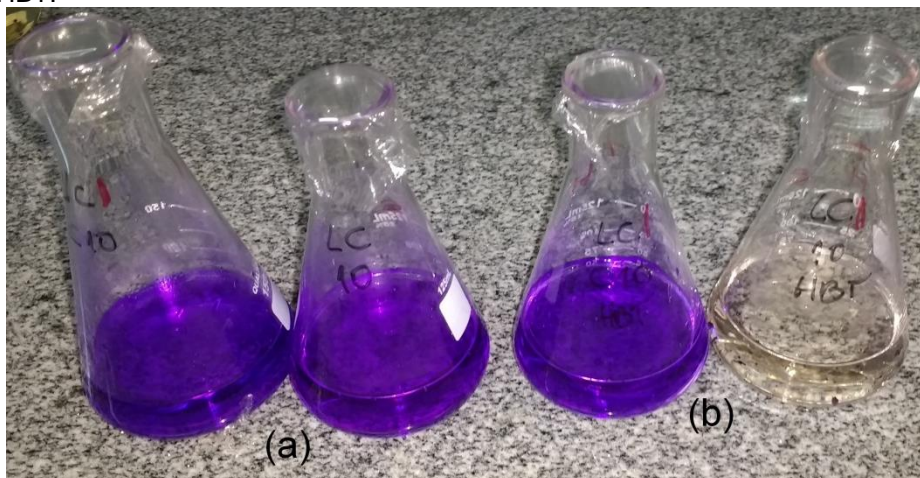
As Figuras 17 e 18 mostram as imagens da comparação entre a degradação do corante Cristal Violeta com o controle, na ausência e presença de HBT, referente às concentrações de 5 mg L⁻¹ e 10 mg L⁻¹, respectivamente.

Figura 17 – Comparação visual entre a degradação, realizada pelo extrato de lacase comercial, do corante Cristal Violeta, 5 mg L⁻¹, com o controle, onde não há presença do extrato enzimático, em: (a) Ausência de HBT, (b) Presença de HBT.



Fonte: Os autores, 2017.

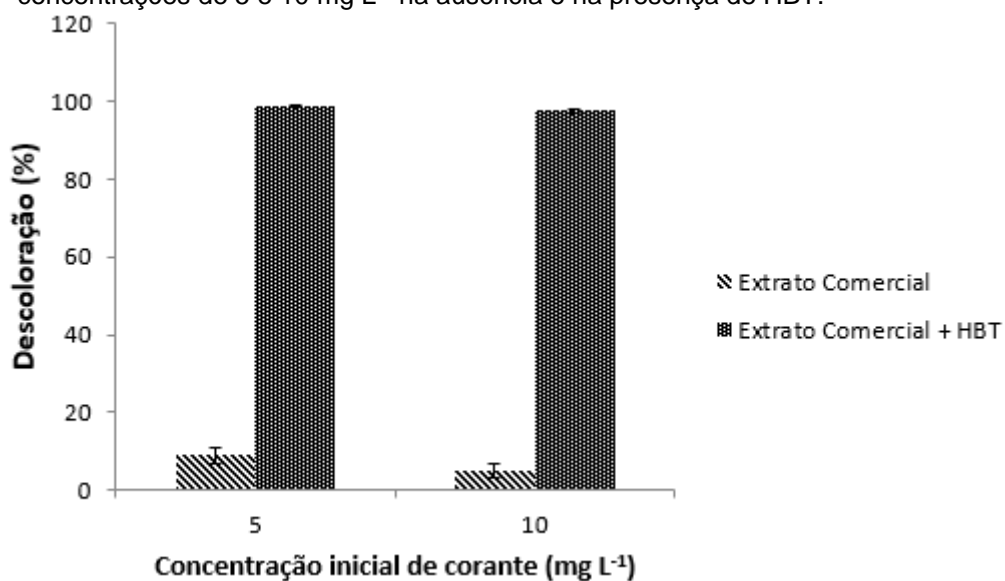
Figura 18 – Comparação visual entre a degradação, realizada pelo extrato de lacase comercial, do corante Cristal Violeta, 10 mg L^{-1} , com o controle, onde não há presença do extrato enzimático, em: (a) Ausência de HBT, (b) Presença de HBT.



Fonte: Os autores, 2017.

O Gráfico 3 representa a comparação entre a degradação do corante Cristal Violeta para as concentrações de 5 e 10 mg L^{-1} , na ausência e na presença de HBT, a partir da porcentagem de descoloração ocorrida no extrato de lacase comercial.

Gráfico 3 – Comparação, a partir da porcentagem de descoloração, realizada pelo extrato de lacase comercial, entre a degradação do corante Cristal Violeta para as concentrações de 5 e 10 mg L^{-1} na ausência e na presença de HBT.



Fonte: Os autores, 2017.

Analisando-se as Figuras 17 e 18, e o Gráfico 3, é possível notar novamente que o mediador presente foi decisivo na degradação do corante Cristal Violeta. Para as duas concentrações estudadas obteve-se resultados muito próximos, com uma porcentagem de remoção em torno de 97%. Para os extratos puros, mais uma vez, a porcentagem de remoção do corante apresentou um resultado abaixo de 9%.

Avaliando de forma comparativa os resultados do extrato enzimático bruto e a lacase comercial em presença de HBT, observa-se que para a concentração de 10 mg L^{-1} a remoção foi superior a 93% e para a concentração de 5 mg L^{-1} foi de 95%. Para os extratos sem a presença de HBT, a taxa de descoloração foi inferior a 13%. Assim, pode-se notar que os resultados foram bastante próximos, portanto a enzima produzida a partir do fungo filamentosso *Trametes sp.* foi tão eficiente quanto à enzima comercial utilizada.

Mesmo as enzimas utilizadas tendo sido produzidas por diferentes fungos, o *Trametes sp.* e o *Pleurotus ostreatus*, o resultado próximo de degradação já era esperado, uma vez que, segundo a literatura, as taxas de degradação das enzimas produzidas por estes fungos é bastante próxima ³⁹. A degradação por lacase proveniente de *Trametes sp.* é levemente superior à degradação obtida por lacase proveniente de *Pleurotus ostreatus*, pois o potencial de redução da lacase derivada de *Trametes sp.* é superior ao potencial de redução para a enzima proveniente de *Pleurotus ostreatus*. Entretanto, a maior oxidação pelo extrato proveniente de *Trametes sp.* não foi observado neste estudo, mas pode estar relacionado ao fato da enzima purificada ter uma eficiência superior à enzima não purificada ^{39; 45}. Contudo, os resultados obtidos comprovam que, para a forma de degradação avaliada neste estudo e sob as condições utilizadas, o extrato enzimático bruto foi tão eficiente quanto o extrato comercial e pode ser utilizado sem a realização de etapas de purificação que, além de serem etapas trabalhosas, demandam maior custo ^{45; 47}.

Além disso, neste caso, mais uma vez se confirma, a grande importância da presença do mediador HBT como substrato para enzima em estudo, pois este permite a oxidação dos compostos de interesse que em princípio não são os substratos da enzima devido ao grande tamanho das moléculas dos corantes ou devido ao seu potencial redox elevado ³². Em relação a este último, as lacases apresentam um potencial redox inferior aos compostos analisados, sendo que o potencial de redução da enzima varia de 400 a 800 mV e por isso não oxidam os

corantes sem a presença de HBT, porém na presença de pequenas moléculas que atuam como mediadores na transferência de elétrons essa oxidação é possível^{29; 39; 45}.

Outro fator importante é que é possível perceber, através dos três gráficos de descoloração obtidos, que para todos os testes, a concentração utilizada não influenciou na taxa de descoloração. Pode-se afirmar isto, pois as duas concentrações de cada experimento obtiveram, sempre, porcentagens de descoloração muito próximas, tanto para a degradação sem a presença do mediador químico HBT, quanto para a degradação com a presença de HBT.

Com estes resultados é possível notar a repetição da característica de biodegradação da lacase, tanto aquela presente no extrato bruto produzido a partir do cultivo do fungo basidiomiceto *Trametes* sp. como a lacase obtida comercialmente. Essa observação é possível, pois a enzima obteve resultados muito semelhantes em relação aos dois corantes avaliados em todos os experimentos e em relação a todas as concentrações estudadas. Portanto, a eficiência da enzima obtida em laboratório e da enzima comercial é bastante próxima.

6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Um dos pontos importantes em relação a degradação está relacionado ao potencial redox das enzimas degradantes de lignina, pois as estruturas não fenólicas, por exemplo, possuem altos potenciais de redução e a lacase, com potencial redox máximo de 800 mV, não é capaz de oxidar estas estruturas. Devido a isso, a utilização de mediadores é de fundamental importância, uma vez que, em sua presença, a lacase é capaz de oxidar compostos com maior potencial redox ³⁹.

Com o exposto é possível comprovar a eficácia dos sistemas de lacase-mediador para degradar corantes, o que é algo de extremo interesse biotecnológico e ambiental, uma vez que os corantes são substâncias recalcitrantes bastante tóxicas. Entretanto, a aplicação de sistemas lacase-mediador é algo que deve ser avaliado em relação à viabilidade econômica e em relação à formação de subprodutos tóxicos no processo de degradação de corantes.

Assim, podemos verificar problemas relacionados ao uso de mediadores redox sintéticos, que impedem, em muitos casos, sua utilização em conjunto com a enzima lacase ^{32; 39}. Esta enzima pode ser produzida em larga escala a um valor acessível para diversas finalidades, uma vez que pode degradar diversos substratos, porém, quando é necessária a utilização de um mediador é interessante desenvolver estudos quanto à utilização de mediadores naturais, de menor custo e que possam ser mineralizados no processo, ou, se degradados parcialmente, que não tenham formação de substâncias tóxicas ^{32; 39}. Além disso, o alto custo pode influenciar na utilização de reagentes, por exemplo, um frasco de 10 g do mediador HBT, utilizado neste estudo, custa em média R\$ 210,00 ⁴⁸.

Diversos mediadores naturais já vêm sendo estudados, com o intuito de trazer vantagens ambientais e econômicas, tendo demonstrado alta eficiência, muitas vezes com resultados bastante próximos aos resultados obtidos com mediadores sintéticos, como o HBT ³².

Assim, seria interessante desenvolver, futuramente, estudos envolvendo a degradação de corantes por lacase mediados por substâncias naturais. Com isso seria possível observar se a degradação também teria alta eficiência, e ainda, avaliar os produtos obtidos após a etapa de degradação, pois ao se analisar apenas a absorbância final estamos avaliando a degradação dos grupos cromóforos presentes

nos corantes, não tendo avaliado se há degradação completa, ou seja, a mineralização da substância, sendo essa uma pesquisa de grande interesse ambiental.

Além disso, pode ser avaliada a degradação de corantes compostos por uma mistura de substâncias, como é o caso da Coloração de Gram, que é uma mistura do corante Cristal Violeta com outras substâncias, para verificar se a eficiência de degradação permanece alta em presença de um mediador, ou se a presença de outros componentes diminui a eficiência de degradação.

Outra etapa que seria importante ser avaliada em estudos futuros é a cinética do processo de biodegradação de corantes. O estudo da cinética de degradação é uma etapa importante, pois a partir dele podemos determinar a velocidade da reação, que está relacionada com as características químicas do sistema e também definir quais as melhores condições reacionais, como pH, temperatura e velocidade de rotação do equipamento, podendo-se otimizar o processo ⁴⁹. Desta maneira, é possível definir como o processo de biodegradação de corantes ocorre, podendo avaliar, por exemplo, qual é o momento do experimento que ocorre a maior degradação. Este estudo seria interessante, por exemplo, para avaliar se sem a presença de mediador a lacase é capaz de degradar os corantes avaliados em experimentos de maior duração, ou, se a maior degradação ocorrer no início do experimento é um indicativo de que não adiantaria realizar-se experimentos mais longos, pois realmente não haveria degradação sem a presença de um mediador. E, desta forma, seria possível determinar o melhor tempo para o experimento de descoloração.

7 CONCLUSÃO

A produção de lacase pelo fungo filamentoso *Trametes* sp. mostrou-se eficiente em meio de cultivo Extrato de Malte e com a presença de resíduos ligninocelulósicos e também no cultivo líquido com as mesmas proporções de resíduos, obtendo-se crescimento micelial sobre toda a superfície dos meios, o que gerou uma alta biomassa fúngica.

A atividade das enzimas foi determinada espectrofotometricamente e constatou-se que o extrato bruto enzimático continha uma atividade de lacase equivalente a 727,27 U L⁻¹. Já a enzima LiP não apresentou atividade no extrato bruto produzido e a atividade da MnP foi equivalente à 12,58 U L⁻¹, sendo esse um resultado considerado insignificante para as análises.

A eficiência na degradação dos corantes Azul Marinho Reativo e Cristal Violeta pelo extrato enzimático bruto, quando na presença de HBT, foi elevada, atingindo valores superiores a 70% em todos os experimentos. O mesmo resultado foi obtido para a lacase de origem comercial, o que faz com que se admita que a lacase presente no extrato bruto produzido em laboratório apresenta potencial para ser utilizada na degradação de corantes, uma vez que sua eficiência na descoloração foi bastante semelhante à obtida para a lacase adquirida comercialmente.

REFERÊNCIAS

- 1 FRANCISCON, E. **Descoloração e degradação de azocorantes por bactérias**. 2010. 164 p. Tese (doutorado)- Universidade Estadual de Campinas, Departamento de Ciências de Alimentos, Campinas, SP.
- 2 PIZATO, E. **Avaliação da capacidade de remoção de corante têxtil pelo fungo *Lasiodiplodia theobromae* MMPI em efluente sintético e industrial**. 2013. 101 p. Dissertação (mestrado) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Pato Branco, PR
- 3 ORTIZ-MONSALVE, S. **Estudos de descoloração de corantes para couro pelo isolado nativo *Trametes villosa* SC10**. 2015. 171 p. Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Engenharia Química, Porto Alegre, RS.
- 4 ALMEIDA, A. D. S. **Avaliação da associação de processos oxidativos avançados e adsorção em carvão ativado na remoção de corante reativo em meio aquoso**. 2013. 92 p. Dissertação (mestrado)- Universidade Federal de Alagoas, Programa de Pós- Graduação em Recursos Hídricos e Saneamento, Maceió.
- 5 FERREIRA, R. da C. **Aplicação de argila maranhense como adsorvente para os corantes têxteis violeta cristal e azul turquesa em sistema aquoso**. 2014. 62 p. Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Maranhão, Programa de Pós-Graduação em Química, São Luís, MA.
- 6 FARIA, R. de A. **Estudo da produção de enzimas ligninolíticas por *Ceriporiopsis subvermispora***. 2010. 102 p. Dissertação (mestrado) - Universidade de São Paulo, Escola de Engenharia de Lorena, Lorena, SP.
- 7 MOREDO, N. *et. al.* Enhanced ligninolytic enzyme production and degrading capability of *Phanerochaete chrysosporium* and *Trametes versicolor*. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**. v. 19. p. 665-669. 2003.
- 8 GARCIA, T. A. **Purificação e caracterização das lacases de *Pycnoporus sanguineus***. 2009. 126 p. Tese (doutorado) – Universidade de Brasília, Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular, Brasília, DF.
- 9 MIKOLASCH, A.; SCHAUER, F. Fungal laccases as tools for the synthesis of new hybrid molecules and biomaterials. **Appl Microbiol Biotechnol**. v. 82. p. 605–624. 2009.
- 10 KUNAMNENI, A. *et. al.* Engineering and Applications of fungal laccases for organic synthesis. **Microbial Cell Factories**. Madrid, Spain. 20 November 2008. 17 p. 2008.
- 11 POLAK, J.; JAROSZ-WILKOŁAZKA, A. Weseharochle-cell fungal transformation of precursors into dyes. **Microbial Cell Factories**. 2010.

- 12 AGUIAR, A. P. **Seleção de espécies de basidiomicetos produtoras de ligninases para caracterização e aplicação das enzimas sobre corantes aromáticos.** 2006. 137 p. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Área de concentração Ciência e Tecnologia de Alimentos, São José do Rio Preto, SP.
- 13 SOUZA, A. F.; ROSADO, F. R. Utilização de fungos basidiomicetos em biodegradação de efluentes têxteis. **Revista em Agronegócios e Meio Ambiente.** v. 2. p. 121-139. 2009.
- 14 TEIXEIRA, I. **Resolução N° 430.** 430. CONAMA 2011.
- 15 SILVA, M. **Resolução N° 357.** 057. CONAMA. DOU. 357: 58-63 p. 2005.
- 16 PINKOSKI, P. I. **Produção de lacase e descoramento do vermelho congo e verde malaquita pelo *Pycnoporus sanguineus* e *Trametes versicolor*.** 1997. 190 p. Tese (doutorado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Porto Alegre, RS.
- 17 SILVA, R. P. D. **Emprego de zeólita na remoção dos corantes têxteis violeta cristal e azul de metileno em solução aquosa.** 2014. 60 p. Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Maranhão, Programa de Pós-Graduação em Química, São Luís, MA.
- 18 GÓES, M. C. D. C. **Palha da carnaúba (*Copernicia cerifera*) como removedor dos corantes azul de metileno e cristal violeta.** 2013. 104 p. Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Maranhão Programa de Pós-Graduação em Química, São Luís, MA.
- 19 GUARATINI, I. C. C.; ZANONI, M. V. Corantes Têxteis. **Química Nova.** v. 23, p. 71-78. 2000.
- 20 CERQUEIRA, A. A. **Aplicação da técnica de eletrofloculação no tratamento de efluentes têxteis.** 2006. 114 p. Dissertação (mestrado)- Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Programa de Pós-Graduação em Química, Rio de Janeiro.
- 21 SOUZA, C. R. L. **Degradação de corantes reativos e remediação de efluentes têxteis por processos avançados envolvendo ferro metálico.** 2006. 100 p. Dissertação (mestrado)- Universidade Federal do Paraná, Programa de Pós-Graduação em Química, Setor de Ciências Exatas, Curitiba.
- 22 GIOVANELLA, R. F. **Estudo cinético da biodegradação dos corantes *c.i.* azul reativo 171 e *c.i.* azul reativo 160 catalisada pela *peroxidase* da raiz forte.** 2011. 86 p. Dissertação (mestrado)- Universidade Regional de Blumenau, Universidade Regional de Blumenau, Programa de Pós-Graduação em Química, Centro de Ciências Exatas e da Terra, Blumenau.
- 23 OLIVEIRA, C. S. D. **Propriedades fotoquímicas dos fotossensibilizadores cristais violeta e azul de metileno em sistemas microheterogêneos e em células cancerosas em cultura.** 2006. 124 p. Tese (doutorado) – Universidade de São Paulo, Instituto de Química, São Paulo, SP.

- 24 SILVA, G. M. **Expressão de enzimas de *Pleurotus spp.* e descoloração do corante azul índigo.** 2014. 122 p. Dissertação (mestrado) - Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba, SP.
- 25 SOARES, G. M. B. **Aplicação de sistemas enzimáticos a degradação de corantes têxteis.** 2000. 173 p. Tese (Doutorado) - Universidade do Minho, Departamento de Engenharia Têxtil, Braga, Portugal.
- 26 BETTIN, F. *et al.* Aplicação de mediadores redox na descoloração de corantes utilizando caldo enzimático bruto de *pleurotus sajor-caju* ps-2001. **COBEQ 2014 XX Congresso Brasileiro de Engenharia Química.** 8 p. 2014
- 27 LIMA, E. A. D. **Prospecção, clonagem, produção, purificação e caracterização de enzimas do sistema lignocelulolítico de *Bacillus licheniformis* CBMAI 1609.** 2015. 361 p. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Campinas, SP
- 28 POLAK, J.; JAROSZ-WILKOLAZKA, A. Fungal laccases as green catalysts for dye synthesis **Process Biochemistry.** Lublin, Poland. v.47. p. 1295–1307. 2012.
- 29 COUTO, S. R.; HERRERA, J. L. T. Industrial and biotechnological applications of laccases: A review. **Biotechnology Advances**, v. 24, p.500-513, 2006.
- 30 MINUSSI, R. C. **Produção, purificação, caracterização e aplicação industrial de lacase fungica.** 2002. 95 p. Tese (doutorado)- Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Campinas, SP.
- 31 MOROZOVA, O. V. *et al.* "Blue" Laccases. **Biokhimiya**, v. 72, p. 1396-1412. 2007.
- 32 CAÑAS, A. I.; CAMARERO, S. Laccases and their natural mediators: Biotechnological tools for sustainable eco-friendly processes. **Biotechnology Advances**, v. 28, p. 694-705, 2010.
- 33 RIVA, S. Laccases: blue enzymes for green chemistry. **Trends in Biotechnology**, v. 24, n. 5, 2006.
- 34 VILLELA, S. M. **Biodegradação de efluentes industriais na presença de lacase de *Aspergillus sp* e peroxidase de raiz forte.** 2003. 50 p. Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Físicas e Matemáticas, Curso de Química, Florianópolis, SC.
- 35 GALHAUPA, C. *et al.* Increased production of laccase by the wood-degrading basidiomycete *Trametes pubescens*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 30, p. 529-536, 2002.
- 36 MOLDES, D.; LORENZO, M.; SANROMÁN, M. A. Different proportions of laccase isoenzymes produced by submerged cultures of *Trametes versicolor* grown on lignocellulosic wastes. **Biotechnology Letters**, v. 26, p. 327–330, 2004.

- ³⁷ HOU, H. *et. al.* Enhancement of laccase production by *Pleurotus ostreatus* and its use for the decolorization of anthraquinone dye. **Process Biochemistry**, v. 39, p. 1415-1419, 2004.
- ³⁸ KAMIDA, H. M. *et. al.* Biodegradação de efluente têxtil por *Pleurotus sajor-caju*. **Química Nova**, v. 28, n. 4, p. 629-632, 2005.
- ³⁹ LI, K.; XU, F.; ERIKSSON, K. E. I. Comparison of Fungal Laccases and Redox Mediators in Oxidation of a Nonphenolic Lignin Model Compound. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n. 6, p. 2654-2660, 1999.
- ⁴⁰ ASGHER, M. *et. al.* Recent developments in biodegradation of industrial pollutants by white rot fungi and their enzyme system. **Biodegradation**, v. 19, p. 771-783, 2008.
- ⁴¹ WESENBERG, D.; KYRIAKIDES, I.; AGATHOS, S. N. White-rot fungi and their enzymes for the treatment of industrial dye effluents. **Biotechnology Advances**, v. 22, p. 161-187, 2003.
- ⁴² BURLA, G. *et. al.* Effects of different growth conditions on enzyme production by *Pleurotus ostreatus* in submerged culture. **Bioresource Technology**, v. 42, n. 2, p. 89-94, 1992.
- ⁴³ ARORA, D. S.; GILL, P. K. Effects of various media and supplements on laccase production by some white rot fungi. **Bioresource Technology**, v. 77, n. 1, p. 89-91, 2001.
- ⁴⁴ CARNEIRO, J. L. G. *et. al.* **Otimização de enzimas ligninolíticas produzidas pelo fungo *Fomitella supina***. 4 p. Bolsista PROBIC/CNPq- Universidade Estadual de Feira de Santana.
- ⁴⁵ FRASCONI, M. *et. al.* Kinetic and biochemical properties of high and low redox potential laccases from fungal and plant origin. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1804, p. 899-908, 2010.
- ⁴⁶ GARCIA, F. F. **Biodegradação de 2, 4 – diclorofenol e 2, 4, 6 – triclorofenol por fungos do gênero *Pleurotus***. 2009. 94 p. Dissertação (mestrado)- Universidade da Região de Joinville, Programa de Mestrado em Engenharia de Processos, Joinville, SC.
- ⁴⁷ LEONTIEVSKY, A. A. *et. al.* Blue and yellow laccases of ligninolytic fungi. **FEMS Microbiology Letters**, v. 156, p. 9-14, 1997.
- ⁴⁸ SIGMA ALDRICH. Disponível em: <http://www.sigmaaldrich.com/brazil.html>. Acesso em: 03 jul. 2017.
- ⁴⁹ ZHAO, H. *et. al.* Kinetic Study on the Photo-Catalytic Degradation of Pyridine in TiO₂ Suspension Systems. **Catalysis Today**, n.93–95, p. 857–861, 2004.