

Degradação e Detoxificação do Corante Azul Brilhante de Remazol R pela Lacase de *Oudemansiella canarii*

**Thaís Marques Uber¹, Gabriel Bruno da Silva¹, Gidiane Scaratti², Suélen Maria Amorim²,
Cristiane Vieira Helm³, Rosely A. Peralta², Regina de Fátima Peralta Muniz Moreira²,
Adelar Bracht¹, Rosane Marina Peralta¹**

¹Universidade Estadual de Maringá, CEP 87 020-900 Maringá, Paraná. E-mail: (rmperalta@uem.br)

²Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina

³EMBRAPA-FLORESTAS, Colombo, PR

RESUMO

*Neste trabalho, uma lacase de *Oudemansiella canarii* foi utilizada na degradação do corante azul brilhante de remazol R (RBBR). Análise por FTIR permitiu concluir que a lacase atuou não apenas no grupo cromóforo do corante, mas em toda a estrutura do corante, causando uma fragmentação efetiva da molécula. A ação da lacase causou uma redução significativa na toxicidade, conforme indicado pelo teste Microtox. Em conclusão, a lacase de *O. canarii* pode ser útil em futuras estratégias biológicas visando a degradação de corantes azo.*

Palavras-chave: corantes sintéticos; lacase; azul reativo 19; *Oudemansiella canarii*.

INTRODUÇÃO

Enormes quantidades de corantes sintéticos são lançados no meio ambiente causando um sério impacto ambiental no ecossistema. A remoção de corantes dos efluentes antes da sua descarga no meio ambiente é, portanto, uma questão de grande importância. A poluição da água com corantes é claramente visível impedindo a penetração de luz na água e interferindo diretamente na sobrevivência de organismos aquáticos. O corante azul brilhante de remazol R (RBBR) (azul reativo 19, C₂₂H₁₆N₂Na₂O₁₁S₃, massa molecular 626,53 g/mol) é um corante antraquinônico largamente utilizado na indústria têxtil (Fig. 1).

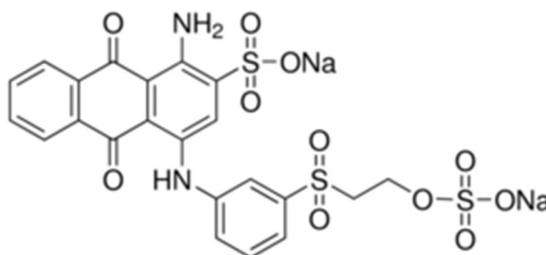


Figura 1. Estrutura química do corante azul brilhante de remazol R (RBBR)



VII SIMPÓSIO DE BIOQUÍMICA E BIOTECNOLOGIA 11 a 13 de setembro de 2019, Londrina - PR

Por ser um organo-poluente tóxico e recalcitrante, sua degradação é altamente desejável. Atualmente, os efluentes contendo corantes são tratados principalmente por métodos físicos e químicos. No entanto, esses métodos apresentam várias desvantagens, como geração de lodo, alto custo e uso de grandes quantidades de produtos químicos. Isso tem impulsionado a busca por métodos biológicos alternativos, utilizando microrganismos e suas enzimas, especialmente as peroxidases e oxidases. Dentre as diferentes enzimas oxidativas secretadas pelos fungos ligninolíticos, as lacases (EC 1.10.3.2) têm sido bastante exploradas na degradação de corantes, pois catalisam a oxidação de uma grande variedade de compostos fenólicos e não-fenólicos e necessitam apenas de oxigênio molecular como co-substrato (PERALTA et al. 2017).

Oudemansiella canarii, um basideomiceto ligninolítico da ordem Agaricales, é comum em vários biomas brasileiros, incluindo a Mata Atlântica, a Amazônia e o Pantanal. Estudos prévios realizados em nosso laboratório têm demonstrado a habilidade da lacase de *O. canarii* degradar eficientemente o corante azo vermelho do Congo (IARK et al. 2019). O objetivo do presente estudo foi avaliar a capacidade da lacase de *O. canarii* em degradar o RBBR.

MATERIAL E MÉTODOS

Oudemansiella canarii foi identificado e gentilmente cedido pela Embrapa-Floresta, Colombo, PR. O fungo foi mantido em laboratório através de repiques sucessivos em ágar-batata-dextrose. Para a produção de lacase, discos miceliais de *O. canarii* (diâmetro de 10 mm) foram transferidos para frascos Erlenmeyer (0,25 L) contendo uma mistura de 2,5 g de bagaço de cana e 2,5 g de farelo de trigo como substrato e 15 mL de solução mineral. Os cultivos foram mantidos por 14 dias a 28 °C na ausência de luz. A lacase foi extraída pela adição de água aos cultivos. Após centrifugação, o extrato enzimático foi dialisado contra água destilada e concentrado por liofilização (IARK et al. 2019).

Os ensaios de descoloração foram conduzidos em tampão acetato 50 mM (pH 5,0) em frascos Erlenmeyer de 250 mL, com volume total de 50 mL contendo 100 mg/L de RBBR e 5 U de lacase. As misturas foram incubadas a 30 °C no escuro num agitador rotativo a 100 rpm. Após 24 h de incubação, os espectros de absorção foram registrados na faixa de luz visível (400-800 nm). Os valores de absorbância a 595 nm foram utilizados para avaliar a descoloração em termos de porcentagem.

Para determinar os parâmetros cinéticos (velocidade máxima, V_{max} e a constante de Michaelis-Menten, K_M), as velocidades iniciais foram medidas a 30 °C e pH 5,0 utilizando concentrações de RBBR variando de 16 a 144 μ M. A descoloração foi monitorada espectrofotometricamente seguindo a redução da absorbância inicial a 497 nm ao longo de um período de 2 minutos, imediatamente após o início da reação pela adição de 2 U de lacase. Para determinar K_M e V_{max} , a equação de Michaelis-Menten ($v = V_{max}[S]/(K_M + [S])$) foi ajustada diretamente aos dados experimentais usando o procedimento de ajuste não-linear de mínimos quadrados do Graph-Pad Prism. Software 5.0.

As amostras de antes e após a ação da lacase foram submetidas à espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) para análise dos grupos funcionais. Análise de toxicidade das amostras de antes e após da ação da lacase foi realizada utilizando o teste MICROTOX baseado na inibição da luz emitida pelo *Vibrio fischeri* (bioluminescência), de acordo com o protocolo ISO 11348-3:2007.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A lacase de *O. canarii* foi eficiente na descoloração do RBBR, ficando a solução corante gradativamente incolor em função do tempo de incubação. Após 24 h de incubação, a absorvância inicial a 595 nm foi reduzida em torno de 80%. A relação entre a velocidade inicial de descoloração e a concentração de corante obedeceu à cinética de Michaelis-Menten ($R^2=0,9899$ (Fig. 1A-B) , em acordo com outros relatos da literatura (MICHNIEWICZ et al. 2008; REZAI et al. 2015). O valor de K_M encontrado foi $114,90 \pm 15,63 \mu\text{M}$ e o valor de V_{max} foi de $1,318 \pm 0,100 \mu\text{mol}/\text{min}$. A mesma lacase apresentou para o corante vermelho do Congo, um K_M de $46.180 \pm 6.245 \mu\text{M}$, e uma V_{max} de $1.840 \pm 0.101 \mu\text{mol}/\text{min}$ (IARK et al. 2019).

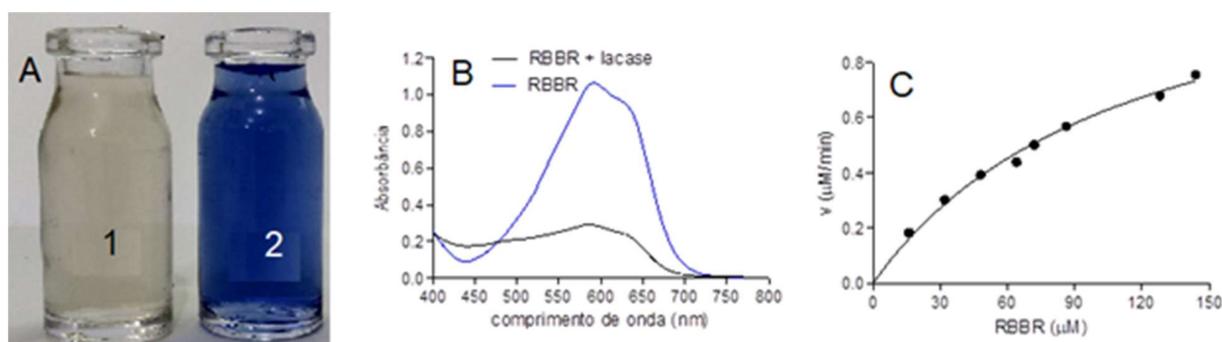


Figura 2. Descoloração do RBBR pela lacase de *O. canarii*. A: corante após (1) e antes (2) da ação da lacase; B: Curva de absorção espectral do RBBR antes e após a degradação; (C) Efeito da concentração do RBBR sobre a velocidade de descoloração.

Para avaliar as transformações do RBBR catalisadas pela lacase, utilizou-se como ferramenta FTIR. Alterações acentuadas no FTIR de antes e após a ação da lacase sobre o RBBR podem ser observadas na Fig. 3, especialmente entre os números de onda $500-1500 \text{ cm}^{-1}$.

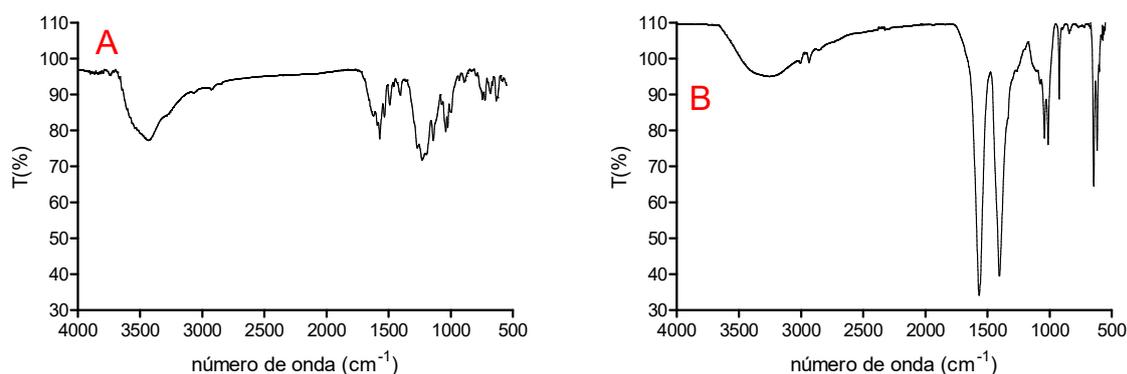


Figura 3. FTIR do RBBR antes (A) e após (B) o tratamento com a lacase de *O. canarii*

A Fig. 4 apresenta a toxicidade relativa dos sistemas de incubação contendo RBBR antes e depois de um tratamento de 24 h com lacase. O ensaio Microtox detectou uma diminuição da toxicidade de $81,48 \pm 1,20\%$ do corante para $3,00 \pm 2,00\%$ após 24 h de degradação do RBBR pela lacase nativa de *O. canarii*. Os resultados indicam que a toxicidade estava intimamente associada à presença do RBBR uma vez que foi praticamente abolida pela lacase. Além disso, estes resultados sugerem que os produtos de degradação do RBBR são muito menos tóxicos do que o composto original.

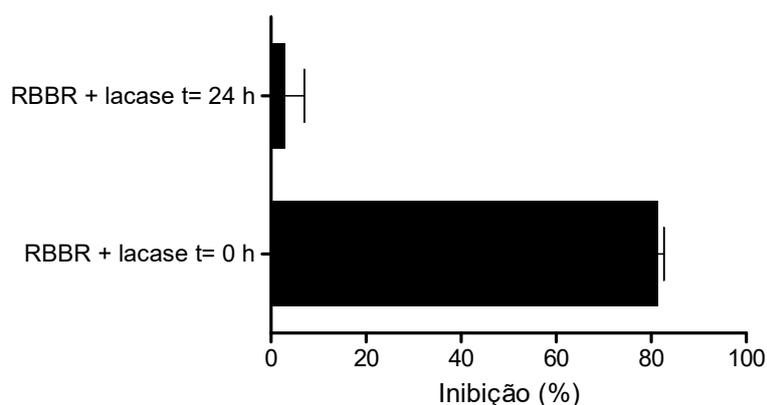


Figura 4. Mudanças na inibição da luminescência do *Vibrio fischeri* causada pelo RBBR (100 mg/L) tratado por 0 e 24 h com 5 U de lacase de *O. canarii*.

CONCLUSÕES

A lacase de *O. canarii* foi eficiente na descoloração do RBBR. Uma degradação efetiva, além da alteração do grupo cromóforo, é sugerida por FTIR. Uma efetiva redução na toxicidade foi encontrada em consequência da ação da lacase. Em conclusão, a lacase *O. canarii* pode ser usada em estratégias de biorremediação deste corante antraquinônico.

Agências de Fomento: Capes, CNPQ e UEM.

REFERÊNCIAS

- IARK, D., BUZZO, A.J.R., GARCIA, J.A.A., CORREA, V.G., HELM, C.V., CORREA, R.C.G., PERALTA, R.A., PERALTA MUNIZ MOREIRA, R.F., BRACHT, A., PERALTA, R.M. Enzymatic degradation and detoxification of azo dye Congo red by a new laccase from *Oudemansiella canarii*. **Bioresource Technology**, v. 289, article 121655, 2019
- MICHNIEWICZ, A., LEDAKOWICZ, S., ULLRICH, R., HOFRICHTER, M. Kinetics of the enzymatic decolorization of textile dyes by laccase from *Cerrena unicolor*. **Dyes and Pigments**, v. 77, p. 295-302, 2008
- PERALTA, R.M., SILVA, B.P., CÔRREA, R.C.G., KATO, C.G., SEIXA, F.A.V.S., BRACHT, A. Enzymes from Basidiomycetes: peculiar and efficient tools for biotechnology. In: G Brahmachari, A.L. Demain and J.L. Adrio (Eds), **Biotechnology of Microbial Enzymes-Production, Biocatalysis and Industrial Applications**. (pp. 119-150). Elsevier, 2017
- REZAEI, S., TAHMASBI, H., MOGHARABI, M., AMERI, A., FOROOTANFAR, H., KHOSHAYAND, M.R., FARAMARZI, M.A. Laccase-catalysed decolorization and detoxification of acid blue 92: statistical optimization, microtoxicity, kinetics, and energetics. **Journal of Environmental Health Science & Engineering**, v. 16, p. 13-31, 2015