

***APLICAÇÃO DE SISTEMAS ENZIMÁTICOS À  
DEGRADAÇÃO DE CORANTES TÊXTEIS***

*Graça Maria Barbosa Soares*

Dissertação para obtenção do grau de Doutor em Engenharia Têxtil pela  
Universidade do Minho

**Universidade do Minho  
Escola de Engenharia  
Departamento de Engenharia Têxtil**

**2000**

**Tese realizada sob orientação da**

**Professora Doutora *Teresa Maria Sousa Pessoa de Amorim***

Professora Associada com Agregação

e

**Doutora *Maria José Costa Ferreira***

Investigadora Principal do INETI

***Quero expressar o meu sincero agradecimento:***

À Professora Doutora *Maria Teresa Sousa Pessoa de Amorim* (Departamento de Engenharia Têxtil, Universidade do Minho) pelos ensinamentos na orientação deste trabalho e pela sua influência determinante no curso da minha vida académica.

À Doutora *Maria José Costa-Ferreira* (Unidade de Bioengenharia e Bioprocessos, Departamento de Biotecnologia, INETI), pela orientação deste trabalho com o pragmatismo e objectividade que a tornam uma pessoa especial.  
Obrigada pelo constante incentivo.

À Professora Doutora *Ana Maria Oliveira-Campos* (Departamento de Química, Universidade do Minho), pela ajuda constante e desinteressada, pelo incentivo nas horas mais difíceis e... acima de tudo, pela grandeza de pessoa e professora que a tornam uma referência a seguir.

Ao Professor Doutor *Radim Hrdina* (University of Pardubice, Czech Republic) pela ajuda e disponibilidade, pela sua postura simples e esclarecida, característica daqueles que são realmente sabedores e... sobretudo por me ter ensinado aquilo que sei de síntese de corantes.

Aos *colegas do Departamento de Engenharia Têxtil* que, com a sua amizade ou com o seu exacerbado sentido de competição, estimularam a minha persistência em continuar. Em especial, à *Teresa Miranda* pela “companhia” nas “lutas” diárias mas sobretudo pela amizade.

À minha *família*, em especial ao *Filipe*, à *Diana* e à *Maria*, maiores lesados por falta de tempo e atenção mas que com o seu carinho remeteram sempre à sua verdadeira dimensão as dificuldades que surgiam.

***A todos muito obrigada.***

Os problemas ambientais associados à indústria têxtil derivam, sobretudo, do uso de corantes orgânicos. Um grande número destes compostos são recalcitrantes e apresentam carácter carcinogénico e mutagénico. A descoloração de corantes têxteis pode ser levada a cabo por enzimas que são na natureza produzidas por microorganismos. As enzimas oxidativas, nomeadamente as lacases provenientes de fungos de degradação branca, tem vindo a despertar particular atenção mas os estudos documentados dizem normalmente respeito a extractos brutos de fungos e não enzimas puras. Assim, atendendo à diversidade de enzimas produzidas e à especificidade destes processos, a investigação neste domínio tem-se confrontado com numerosas dificuldades, nomeadamente no esclarecimento das reacções envolvidas e na definição dos factores que as influenciam.

Nesta dissertação, estudou-se a acção da lacase na descoloração de corantes têxteis. Usou-se, para isso, uma preparação comercial, o DeniLite™, usado na indústria têxtil no acabamento de produtos tingidos com índigo, contendo para além da lacase, um mediador (ácido fenotiazina-10-propiónico) e um surfactante não iónico (de origem indeterminada). Foi ainda avaliada comparativamente a acção da lacase isolada desta preparação por um processo filtração por gel. A enzima isolada ainda que apresentando uma menor estabilidade térmica, comportou-se de maneira semelhante no que se refere aos perfis de pH e temperatura.

Os corantes antraquinónicos representam uma importante classe de corantes têxteis. Atendendo às suas características químicas são difíceis de biodegradar. Escolheu-se o corante Remazol Brilliant Blue R, para representar este grupo de compostos nos estudos de degradação com lacase. A formulação comercial descolorou o corante em contraste com a lacase isolada que não revelou qualquer acção na remoção de cor. Esse facto determinou a necessidade de analisar o efeito do mediador e do detergente não iónico incluído na preparação comercial neste processo. Para isso, estudou-se comparativamente o efeito de três surfactantes não iónicos, Triton X-100, Brij 35 e Tween 20, em concentrações abaixo das respectivas concentrações micelares críticas. Os resultados obtidos comprovam a não influência destes compostos na descoloração enzimática do corante.

A adição do mediador foi determinante para que a descoloração do corante ocorresse. Dos mediadores estudados, promazina, ácido violúrico e *N*-hidroxibenzotriazole, o segundo foi o que se apresentou mais eficaz, permitindo a descoloração completa do Remazol Brilliant Blue R ao comprimento de onda de absorção máxima em apenas 20 minutos, cerca de duas vezes mais rápido que com o dobro da concentração de *N*-hidroxibenzotriazole em iguais condições experimentais. A promazina, apesar da semelhança química com o ácido fenotiazina-10-propiónico, não mediou o processo de descoloração do corante.

Estudou-se o efeito da estrutura química de corantes azo na descoloração com a lacase. Para isso sintetizaram-se sete novos corantes disazo, todos eles com um grupo hidroxilo na posição para em relação à ligação azo, variando os substituintes no anel fenólico.

Destes compostos, só os que eram solúveis em água, ou seja, os que continham grupos sulfónicos na molécula, é que são substratos da lacase. De entre os corantes solúveis, aqueles que incluíam grupos doadores de electrões no anel fenólico, do tipo metoxilo, eram descolorados pela lacase enquanto que no corante com substituinte carboxílico foi necessária a presença do ácido violúrico para que a descoloração ocorresse.

O *N*-hidroxibenzotriazole não apresentou qualquer efeito na catálise enquanto o ácido violúrico acelerou as reacções de descoloração destes corantes.

Os resultados deste estudo levou-nos a propor um mecanismo de biotransformação de corantes disazo com a formação de um corante mono azo e benzoquinona.

A consciência da necessidade de explorar o efeito sinérgico de várias enzimas para se obter a mineralização de corantes ou outros compostos resultantes da degradação destes, escolheram-se duas oxidases, a glucose-1-oxidase e a glucose-2-oxidase e analisou-se o seu efeito na catálise de diferentes compostos quinónicos.

Foi interessante notar que as duas oxidases foram capazes de reduzir as quinonas ainda que a glucose-2-oxidase, tipicamente encontrada nos fungos de degradação branca, tenha sido mais eficaz. Os resultados foram discutidos no contexto da degradação oxido-redutora de corantes complexos poliaromáticos.

O conjunto de resultados sugere que a natureza robusta da lacase e a sua disponibilidade podem tornar possíveis aplicações em escala alargada na descoloração de águas residuais têxteis.

The deleterious environmental impact of the textile industry is largely due to the use of organic dyes. The vast majority of these dyes are recalcitrant and have the potential to form carcinogenic and mutagenic compounds. The decolorization of textile dyes can be catalysed by enzymes produced from microorganisms. Oxidative enzymes, namely laccases from white-rot fungi have been the subject of much work but the main thrust of this work has been done using crude fungal extracts, and much less has been done using purified laccases. Therefore, taking into consideration the diversity of enzymes produced and the specificity of such processes, research in this area has had to deal with numerous variables that include understanding the reactions involved and the factors that influence these reactions.

In this dissertation, the effect of laccase on the decolorization of textile dyes was studied. To this effect, a commercial formulation called DeniLite™ used in the textile industry finishing process for indigo-stained cloths, which contained laccase, a mediator and a non-ionic surfactant, were employed. Gel filtration chromatography of the preparation made it possible to study the effect of the laccase alone. The purified laccase showed slightly lower thermal stability than the commercial laccase preparation. The pH and temperature profiles of the two preparations were similar.

Anthraquinone dyes represent an important class of textile dyes. However, their chemical properties make them difficult to degrade. Remazol Brilliant Blue R was selected as a representative of this class of dyes in studies on biodegradation with laccase. The commercial laccase formulation decolorized this dye whereas its laccase alone did not do so. This prompted the need to study the effect of mediators and of non-ionic detergents that were present in the commercial formulation. The effect of three non-ionic surfactants, Triton X-100, Brij 35 and Tween 20 were studied at concentrations below their critical micelle concentrations. The results indicated that these did not play a role in the decolorization process. On the other hand, the addition of mediator was found to be critical for decolorization to occur. Among the potential mediators studied, namely, promazine, violuric acid and N-hydroxybenzotriazole, the second was found to be the most effective. Using violuric acid, complete decolorization

was obtained after about 20 min, determined at the absorption maxima of the dye. Promazine, although chemically similar to phenothazine-10-propionic acid present in the commercial formulation, was not a suitable mediator for the decolorization process.

The relationship between the chemical structures of several disazo dyes and their biodegradability by laccase was studied. To perform this study, seven novel disazo dyes were synthesized. Each had a hydroxyl group in the *para* position in relation to the azo bond, whereas other substituents on the phenolic ring varied. Among these compounds, only the four water soluble compounds, which had a sulfonic group, were suitable substrates for laccase. Those which had electron donating groups in the phenolic moiety, such as methoxy groups, were readily decolorized by laccase. The dye with a carboxylic substituent required the presence of the mediator violuric acid in order for decolorization to occur.

N-hydroxybenzotriazole did not affect the laccase-catalyzed reaction, whereas in general violuric acid increased the velocity of the laccase-mediated decolorization of the dyes.

The need to study the synergistic effect of various enzymes in order to obtain dye mineralization led to the study of two oxidases, namely, glucose 1-oxidase and glucose 2-oxidase. A study was carried out using model quinones of different chemical composition. Interestingly, both of the oxidases were able to reduce the quinones, although glucose 2-oxidase, typically found in white-rot fungi, was more effective. These results are discussed within the context of the oxido-reductive degradation of complex polyaromatic dyes.

Taken together, the results suggest that the robust nature of the laccase and its ready availability might make it suitable for larger scale applications in the decolorization of industrial textile wastewater.



[X]-	Concentração da espécie X
$1/K_m$ -	Afinidade da enzima para o substrato
A-	Constante
ABTS -	Ácido 2,2-azino-bis-(3-etilbenzotiazolína-6-sulfónico)
AOX -	Compostos Organohalogenados Adsorvíveis
AV-	Ácido Violúrico
BZT -	Benzotriazole
$CBO_5$ -	Carência Bioquímica de Oxigénio (lida após 5 dias)
CDH -	Celobiose desidrogenase
CBQ -	Celobiose: quinona 1-oxidoreductase
C.I.-	Colour Index
CLF -	Formulação comercial com lacase
CMC -	Concentração Micelar Crítica
CPZ -	Cloropromazina
CQO -	Carência Química de Oxigénio
$C\alpha$ -	Carbono na posição $\alpha$
DMF -	Dimetilformamida
DMQ -	Dimetoxiquinona (2,6-dimetoxi-1,4-benzoquinona)
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA -	Ácido Desoxirribonucleico
DPIP -	Sal de sódio do 2,6-dicloroindofenol
DTBB -	3,5- <i>di-tert-butil-o</i> -benzoquinona
E -	Enzima
$E_{1/2}$ -	Potencial eléctrico de meia onda
$E_a$ -	Energia de activação
EC -	“ Enzyme Classification”
EPR -	“Electron Paramagnetic Resonance”
E-S -	Complexo enzima-substrato
Et -	Enzima total
G1O -	Glucose-1-oxidase
G2O -	Piranosose oxidase ou glucose-2-oxidase

HBT-	<i>N</i> - hidroxibenzotriazole
HNNS -	Ácido 2-nitroso-1-naftol-4-sulfónico
HRP-	“Horseradish” Peroxidase (Horseradish significa Rábano silvestre)
I-	Inibidor
IV -	Infravermelho
K -	Constante de equilíbrio
K <sub>m</sub> -	Constante de Michaelis-Menten
LiP-	Lenhina Peroxidase
LMS -	“Lacase Mediator System”
MnP -	Manganês Peroxidase
MQ -	Metoxiquinona (2-metoxi-1,4-benzoquinona)
M <sub>w</sub> -	Massa molecular em peso
NHE -	Eléctrodo Normal de Hidrogénio
NNDS -	Ácido 1-nitroso-2-naftol-3,6-dissulfónico
NF-	Nanofiltração
o-	<i>orto</i>
p-	<i>para</i>
P -	Produto
PAH -	Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos
PEG -	Polietilenoglicol
pI -	Ponto Isoelectico
PZ -	Promazina (10-(3-[dimetilamino]propil)fenotiazina)
Q -	Quinona
R -	Constante dos gases perfeitos
RBBR -	“Reactive Brilliant Blue R”
RG -	Reagente de Gibb´s ( <i>N</i> ,2,6-tricloro-1,4-benzoquinona-imina)
RMN -	Ressonância Magnética Nuclear
RNA -	Ácido Ribonucleico
RMN -	Ressonância Magnética Nuclear
RO -	Osmose Inversa
S -	Substrato

PAGE -	Electroforese em gel de poliacrilamida
u.m.a -	Unidade de massa atómica
UF -	Ultrafiltração
UI -	Unidades Internacionais
U -	Unidade enzimática
UV/VIS -	Ultravioleta-Vísivel
$V_0$ -	Velocidade inicial da reacção
VAO -	Veratril álcool oxidase
$V_{max}$ -	Velocidade máxima de reacção

## *Introdução*



## **1. *Introdução***

O controlo da poluição da água é presentemente uma das áreas mais investigadas e a remoção de cor, em particular, tem vindo a ser objecto de atenção crescente.

Nas últimas décadas, a descoloração por métodos fisico-químicos tem vindo a ser desenvolvida, mas a sua adopção por parte da indústria têxtil tem sido diminuta quando comparada com o esforço de investigação feito. Razões de custo elevado, baixa eficiência e não aplicabilidade à imensa variedade de corantes são responsáveis por este facto.

Os sistemas biológicos são capazes de reduzir a carência bioquímica de oxigénio mas parecem globalmente incapazes de remover a cor. Todavia, têm vindo a fazer-se progressos com o isolamento de certos fungos e com a utilização de culturas mistas de bactérias capazes de crescer em meios onde usam corantes como fontes de carbono. A utilização de microrganismos termofílicos ou termotolerantes também perspectiva avanços nesta área de aplicação (Banat et al., 1996).

O mecanismo de remoção de cor pelos microrganismos envolve processos com enzimas. Do melhor esclarecimento desses processos depende a possibilidade do uso prático dessas técnicas.

Os tratamentos enzimáticos encontram-se em acelerado esforço de investigação, tendo vindo a ser propostos por muitos investigadores como alternativa a alguns processos convencionais de tratamento de efluentes. Isso deve-se a vantagens que apresentam, tais como selectividade e eficiência (mesmo em concentrações baixas) e ao desenvolvimento a nível de produção de enzimas, traduzido na sua disponibilidade comercial a mais baixo preço (revisto em Karam & Nicell, 1997).

A utilização de mediadores conjuntamente com enzimas veio ampliar a gama de substratos em que actuam, potenciando, desta forma, a importância de catalizadores como a lacase, em processos degradativos.

### *1.1. Objectivos do presente trabalho*

O objectivo geral da tese foi estudar o efeito de sistemas enzimáticos na descoloração de corantes têxteis ou compostos que com eles se relacionassem, fossem eles precursores ou resultantes da degradação de corantes.

A escolha da lacase como uma das enzimas a estudar teve a ver com as potencialidades apresentadas por esta enzima na oxidação de um vasto conjunto de compostos orgânicos e inorgânicos. Apesar de estar amplamente distribuída na natureza e ter vindo a ser estudada desde os anos 70 em diferentes aspectos de aplicabilidade, o que atesta a sua versatilidade de utilização, mantém uma certa “descrição” em termos de utilização em processos de biodegradação de corantes. Longe do protagonismo das peroxidases, como comprova o facto da primeira lacase comercial ter sido lançada apenas 100 anos após a sua descoberta, apresenta uma acção oxidante complexa e muitas vezes pouco esclarecida. A descoberta da chamada tecnologia mediadora nos anos 90 (Bourbonnais & Paice, 1990) veio permitir ampliar o espectro de substratos em que esta enzima actua e tornar a sua utilização prática mais promissora.

Assim, a aplicação da lacase na descoloração de corantes apresentou-se como uma tarefa aliciante, com a dose necessária de imprevisibilidade que estimula a investigação.

Um dos objectivos da investigação descrita neste trabalho foi estudar as condições de reacção que influenciavam a actividade da lacase e, poder assim, definir os parâmetros experimentais que permitissem descorar os corantes em maior extensão no menor intervalo de tempo. Com este propósito, usou-se uma formulação composta por lacase, um mediador e um surfactante não iónico (DeniLite™), disponível comercialmente.

Pretendeu-se analisar o efeito dos diferentes componentes deste produto enzimático. Para isso, purificou-se a enzima e ensaiaram-se conjuntamente com ela diferentes mediadores redox na descoloração de um corante antraquinónico tipo (RBBR).

No sentido de avaliar a relação entre a descoloração pela lacase e a estrutura do composto, sintetizou-se um conjunto de corantes diazo modelo com características estruturais bem definidas. Fez-se variar, controladamente, a estrutura química dos corantes mantendo, no entanto, em comum um grupo hidroxilo em posição *para* em relação à ligação azo, uma característica estrutural importante do ponto de vista de ligação ao centro activo da lacase.

O estudo da cooperação entre enzimas é uma área de interesse crescente, uma vez que só entendendo o efeito combinado dos vários catalisadores se pode atingir objectivos suficientemente abrangentes a nível de degradação de corantes e outros xenobióticos. Mas, o estudo da sinergia de acção das várias enzimas pressupõe o estudo da sua acção isoladamente em substratos interessantes do ponto de vista de mecanismo degradativo. Neste âmbito, iniciou-se um estudo com outras enzimas que pudessem, de alguma forma, estar relacionadas com a descontaminação de compostos resultantes da degradação de corantes têxteis e cujo mecanismo de actuação pudesse interligar-se com o da lacase. Escolheu-se, para o efeito, a glucose-1-oxidase, uma oxidase comercial de *Aspergillus niger* e a glucose-2-oxidase, que foi purificada de *Trametes versicolor* e analisou-se comparativamente a capacidade redutiva destas enzimas num conjunto de quinonas, de estrutura química conhecida e diversa entre si. Definiram-se também as condições reacionais necessárias.

---

1.	Introdução.....	1
1.1.	Objectivos do presente trabalho.....	3
2.	Revisão bibliográfica .....	5
2.1.	A cor nos efluentes têxteis.....	6
2.1.1.	Remoção de cor.....	10
2.2.	Enzimas na indústria têxtil.....	13
2.3.	Enzimas no tratamento de efluentes .....	18
2.3.1.	Peroxidasas e fenoloxidasas .....	19
2.3.2.	Lacase e mediadores .....	28
2.4.	Cinética enzimática.....	37
2.4.1.	Parâmetros cinéticos da literatura para a lacase.....	41
2.5.	Aplicações das lacases.....	45
2.5.1.	Lacases e a remoção de fenóis.....	45
2.5.2.	Fungos (lacases) e biodegradação de corantes.....	47
2.5.3.	Outras aplicações das lacases .....	48
3.	Síntese e biotransformação de corantes disazo.....	53
3.1.	Introdução .....	54
3.2.	Materiais e métodos.....	55
3.2.1.	Químicos.....	55
3.2.2.	Lacase.....	55
3.2.3.	Síntese dos corantes disazo.....	55
3.2.4.	Determinação da actividade da lacase .....	60
3.2.5.	Oxidação dos corantes disazo pela lacase .....	60
3.3.	Resultados.....	62
3.3.1.	Efeito dos solventes orgânicos na actividade da lacase versus ABTS.....	62
3.3.2.	Efeito da concentração de enzima na oxidação do corante IV.....	62
3.3.3.	Oxidação dos corantes disazo pela lacase .....	63
3.3.4.	Efeito da presença e concentração de mediadores (HBT e AV) na descoloração dos corantes disazo pela lacase .....	66

---



---

3.3.5.	<i>Parâmetros cinéticos das reacções de oxidação de corantes disazo modelo com lacase</i> .....	67
3.4.	<i>Discussão</i> .....	68
4.	<i>Descoloração de um corante antraquinónico por uma formulação com lacase</i> ...	76
4.1.	<i>Introdução</i> .....	77
4.2.	<i>Materiais e métodos</i> .....	78
4.2.1.	<i>Químicos</i> .....	78
4.2.2.	<i>Formulação comercial com lacase</i> .....	78
4.2.3.	<i>Purificação da lacase</i> .....	79
4.2.4.	<i>Determinação da actividade da lacase</i> .....	79
4.2.5.	<i>Estabilidade térmica da lacase</i> .....	80
4.2.6.	<i>Efeito da temperatura na actividade da lacase</i> .....	80
4.2.7.	<i>Efeito do pH na actividade da lacase</i> .....	80
4.2.8.	<i>Oxidação do RBBR pela lacase</i> .....	80
4.3.	<i>Resultados</i> .....	81
4.3.1.	<i>Estabilidade térmica da lacase e efeito do pH</i> .....	81
4.3.2.	<i>Descoloração do RBBR</i> .....	85
4.3.3.	<i>Detergentes</i> .....	92
4.3.4.	<i>Comparação dos parâmetros cinéticos da reacção catalisada pela preparação comercial e pela lacase</i> .....	93
4.3.5.	<i>Efeito da variação da concentração de HBT nos parâmetros cinéticos da reacção de oxidação do corante</i> .....	93
4.4.	<i>Discussão</i> .....	95
5.	<i>Efeito da glucose -1- oxidase e glucose -2- oxidase em compostos quinónicos</i> ...	99
5.1.	<i>Introdução</i> .....	100
5.2.	<i>Materiais e métodos</i> .....	102
5.2.1.	<i>Químicos</i> .....	102
5.2.2.	<i>Enzimas</i> .....	104
5.2.3.	<i>Purificação Glucose-2- oxidase (G2O) de <i>Trametes versicolor</i></i> .....	104
5.2.4.	<i>Determinação da actividade enzimática e teor em proteínas</i> .....	105
5.2.5.	<i>Redução das quinonas pela Glucose-1-oxidase e Glucose-2-oxidase</i> .....	105

---

5.3. Resultados.....	106
5.3.1. Efeito da concentração de glucose e de enzima na redução da DTBB.....	107
5.3.2. Efeito do tratamento enzimático nos espectros de absorção das quinonas	109
5.4. Discussão.....	116
6. Conclusões gerais.....	120
7. Perspectivas futuras.....	124
Bibliografia .....	127

*Índice de Figuras*

Figura 2-1 - Sistema de tratamento de águas residuais .....	10
Figura 2-2 - Esquema de reacção da lacase com mediador .....	32
Figura 2-3 - Esquema do mecanismo de reacção do radical ABTS com fenóis ou radicais fenoxilo e produtos secundários formados do ABTS .....	34
Figura 2-4 - Mecanismo possível para formação do benzotriazol durante as reacções LMS .....	35
Figura 3-1 - Estrutura dos corantes disazo sintetizados .....	56
Figura 3-2 - Preparação dos corantes disazo I-III .....	57
Figura 3-3 - Preparação do corantes disazo IV .....	58
Figura 3-4 - Intermediários comerciais usados na síntese dos corantes .....	59
Figura 3-5 - Espectros de absorção do corante IV depois do tratamento com 30 UmL <sup>-1</sup> lacase .....	62
Figura 3-6 - Efeito da concentração de lacase na velocidade de descoloração do corante IV .....	63
Figura 3-7 - Espectros de absorção do corante VI depois do tratamento com 15 UmL <sup>-1</sup> lacase .....	65
Figura 3-8 - Espectros de absorção do corante VII depois do tratamento com 15 UmL <sup>-1</sup> lacase .....	66
Figura 3-9 - Espectros de absorção do corante IV depois do tratamento com lacase e AV .....	67
Figura 3-10 - Espectro de RMN de <sup>1</sup> H (300 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ) do corante VI .....	70
Figura 3-11 - Equilíbrio entre a forma azo e a forma hidrazona .....	73
Figura 3-12 - Proposta de mecanismo para a degradação do corante disazo pela lacase .....	74
Figura 4-1 - Estabilidade da formulação comercial de lacase (CLF) e da lacase em função do tempo .....	82
Figura 4-2 - Efeito da temperatura na actividade da CLF e lacase .....	83
Figura 4-3 - Efeito da pré-incubação a diferentes pH na actividade da CLF e da lacase .....	84
Figura 4-4 - Espectros de absorção do do RBBR em presença de CLF .....	85
Figura 4-5 - Efeito da concentração de lacase na descoloração do RBBR .....	87

---

Figura 4-6 - Espectros de absorção do RBBR em presença de lacase e AV 5,7 mM. ....	88
Figura 4-7- Descoloração do RBBR usando lacase e diferentes concentrações de HBT89	
Figura 4-8- Descoloração do RBBR usando lacase e diferentes concentrações de AV. .90	
Figura 4-9 -Variação da velocidade de descoloração do RBBR com a concentração de AV e HBT .....	91
Figura 4-10 - Representação de Lineweaver-Burk para a oxidação do RBBR usando lacase e HBT.....	94
Figura 5-1 - Estruturas químicas das quinonas estudadas .....	103
Figura 5-2 - Efeito da concentração de glucose na redução da DTBB medida através da percentagem de descoloração .....	107
Figura 5-3 - Efeito da concentração de G1O e G2O na redução da DTBB.....	108
Figura 5-4 - Espectros de absorção do DPIP depois do tratamento com G2O. ....	109
Figura 5-5 - Espectros de absorção do DPIP depois do tratamento com G1O. ....	110
Figura 5-6 - Espectros de absorção do RG depois do tratamento com G1O. ....	111
Figura 5-7- Espectros de absorção do RG depois do tratamento com G2O. ....	111
Figura 5-8 - Espectros de absorção do Q1 depois do tratamento com G1O.....	112
Figura 5-9 - Espectros de absorção do Q1 depois do tratamento com G2O.....	112
Figura 5-10- Espectros de absorção do MQ depois do tratamento com G2O. ....	113
Figura 5-11 - Espectros de absorção do MQ depois do tratamento com G1O. ....	114
Figura 5-12 - Mecanismo de acção da G2O e lacase na oxidação-redução dos fenóis.	117

---

*Índice de Tabelas*

Tabela 2-1 – Concentração de corante não fixado, descarregado e volume de água requerido em função da classe de corante.....	7
Tabela 2-2 - Consumo de corantes estimado para tingimento de fibras celulósicas.....	8
Tabela 2-3 – Normas de descarga das águas residuais para o sector dos têxteis, excluindo o subsector dos lanifícios. ....	9
Tabela 2-4 - Classificação de corantes considerando tipo de corante, carga/solubilidade e processo a aplicar .....	11
Tabela 2-5 – Intervalo de tempo para o impacto comercial de aplicações biotecnológicas na indústria têxtil .....	15
Tabela 2-6 – Alguns mediadores da lacase.....	31
Tabela 2-7 - Parâmetros cinéticos para algumas lacases .....	42
Tabela 3-1 - Descoloração (%) do corante após 15 minutos de reacção com lacase .....	64
Tabela 3-2 - Parâmetros cinéticos para a oxidação dos corantes IV, VI e VII.....	68
Tabela 4-1 - Efeito dos surfactantes não-iónicos na descoloração do RBBR pela lacase .....	92
Tabela 5-1 - Valores de absorvidade molar ( $\epsilon$ ) determinados para as quinonas .....	104
Tabela 5-2 - Intervalo de tempo em que se verificaram alterações nas quinonas.....	115
Tabela 5-3 - Redução máxima das quinonas .....	116

## *Revisão bibliográfica*



## 2. *Revisão bibliográfica*

### 2.1. *A cor nos efluentes têxteis*

A cor é um dos factores de sucesso comercial dos produtos têxteis. Cada vez mais, os consumidores exigem produtos com níveis altos de qualidade. Por consequência, estes produtos terão que apresentar, entre outras características, alta solidez à luz e à lavagem. Isto implica, para além da necessária optimização de processos, que os corantes usados terão que ser cada vez mais robustos para resistirem aos vários tratamentos e que serão usadas substâncias cada vez mais difíceis de degradar.

A cor é o primeiro sintoma de contaminação visível no efluente (Mishra, 1993). A remoção de cor dos efluentes têxteis torna-se assim uma prioridade, constituindo um sério desafio à indústria têxtil e a organismos e empresas dedicadas ao tratamento de águas residuais.

Os processos de tingimento e estamparia nunca levam à completa exaustão dos corantes e a consequência é a descarga do excedente nas águas residuais (Cooper, 1993). Nos efluentes estão geralmente presentes corantes, em concentrações que normalmente variam entre 10 e 50 mgL<sup>-1</sup>. A CBO<sub>5</sub> é tipicamente 200-300 mgL<sup>-1</sup>, para o que muito contribuem os aditivos usados nos processos de fabrico e a CQO varia entre 500-5000 mgL<sup>-1</sup>. Apresentam teores de sólidos suspensos da ordem de 50-500 mgL<sup>-1</sup> e valores de pH entre 4 e 12. A relação CQO/CBO varia entre 2,5:1,0 a 5,0:1,0 o que perspectiva problemas de biodegradabilidade (Laing, 1991).

Há mais de 8000 produtos químicos associados ao processo de tingimento, referenciados no Colour Index (“Society of Dyers and Colourists”) e cerca de 100 000 corantes disponíveis no mercado (Banat et al., 1996). A esta enorme variedade de corantes sintéticos aplicada no acabamento têxtil, acresce ainda a imensa diversidade de estruturas decorrente do uso de diferentes grupos cromóforos (azo, antraquinónicos, triarilmetano e ftalocianinas, por exemplo).

Estima-se que 10-20 % dos corantes usados na indústria têxtil são descarregados para os efluentes. Naturalmente que isso depende do tipo de corante, tom pretendido e do método de aplicação usado (Heinfling et al., 1998).

A Tabela 2-1 apresenta para cada classe de corante:

- a percentagem de corante não fixado à fibra que será rejeitado,
- a quantidade rejeitada por Kg de corante usado após tratamento
- e o volume de água necessário para atingir o valor admissível de rejeição em função da quantidade de corante usada,

tendo em consideração a legislação em vigor.

**Tabela 2-1 – Concentração de corante não fixado, descarregado e volume de água requerido em função da classe de corante**

Corantes	Corante não fixado (%)	Descarga após tratamento <sup>a</sup> (g Kg <sup>-1</sup> )	Volume de água requerida <sup>b</sup> (m <sup>3</sup> Kg <sup>-1</sup> corante)
Dispersos	5	10	7
Ácidos	5	5	3,5
Catiónicos	2	5	0,7
Reactivos	30	300	200

<sup>a</sup>g de corante descarregado por Kg de corante usado

<sup>b</sup>calculado para atingir nível aceitável no efluente (Adaptado de Beckmann et al.,1991)

A maior contribuição em termos percentuais para a descarga nos efluentes deve-se aos tingimentos por esgotamento com corantes reactivos. Em média, 30% do corante usado que vai hidrolisar, não se liga quimicamente à fibra e vai ser rejeitado (Beckmann et al.,1991).

A produção mundial de corantes foi de 800 000 toneladas em 1996 (Heinfling et al., 1998). Só para tingimento de fibras celulósicas, prevê-se que em 2004 o consumo



mundial seja de 363 000 toneladas como mostra a Tabela 2-2, que relaciona a classe com o consumo de corantes para fibras celulósicas em toneladas para os anos referidos.

**Tabela 2-2 - Consumo de corantes estimado para tingimento de fibras celulósicas**

Corantes para Fibras Celulósicas	Consumo (toneladas)		
	1988	1991	2004 <sup>a</sup>
Sulfurosos	90 000	70 000	70 000
Directos	74 000	60 000	68 000
Cuba	36 000	21 000	22 000
Índigo	12 000	12 000	12 000
Azoicos	28 000	18 000	13 000
Reactivos	60 000	109 000	178 000
Total	300 000	290 000	363 000

<sup>a</sup> Estimado Segundo dados do Business Research services Ltd. (Phillips, 1996).

A maioria dos corantes que constam no *Colour Index* pertencem ao grupo dos compostos azo. Há pelo menos 3 000 corantes azo diferentes a ser usados industrialmente (Chung et al., 1993). Estes corantes são seguidos, em termos de predominância, pelos corantes antraquinónicos, que devido às suas características estruturais, podem permanecer longos períodos de tempo nas águas residuais sem se degradarem (Mishra et al., 1993; Banat et al., 1996).

Muito se tem investigado acerca de novas possibilidades de remover a cor. À luz do conhecimento actual, acredita-se que a solução para este problema não assenta num tipo de tratamento por si só mas na combinação de vários processos que concorram para a remoção total destes produtos, levando em consideração aspectos económicos tão importantes como os consumos energéticos e custos ambientais, para além da disponibilidade de tecnologia.

O respeito pelo ambiente implica, muitas vezes, uma autêntica revolução industrial, com modificação de processos, alteração de procedimentos, privilégio de medidas conducentes à reciclagem e, naturalmente, à procura de novas possibilidades de tratamento para degradar os poluentes. Os sistemas biotecnológicos poderão ter um contributo importante para a resolução deste problema.

Em Portugal, nos últimos anos, tem-se assistido a um processo de transformação do tecido industrial, com melhoria significativa de todo o aparelho produtivo. As empresas tomaram consciência dos seus pontos fortes e fracos e de que a sua competitividade passava obrigatoriamente por uma gestão integrada, dinamizando os factores de competitividade em todas as áreas funcionais, nomeadamente na área ambiental.

A legislação portuguesa aplicável às águas residuais no sector têxtil em Portugal é a Portaria Sectorial n.º 432/97 de 25 de Junho, que estabelece os valores limite de emissão (Tabela 2-3) e o decreto-lei n.º 236/98, de 1 de Agosto.

**Tabela 2-3** – Normas de descarga das águas residuais para o sector dos têxteis, excluindo o subsector dos lanifícios.

Parâmetro	Expressão de resultados	Valor máximo admissível
pH	Escala Sorensen	5,5-9,0
CBO <sub>5</sub>	mg L <sup>-1</sup> O <sub>2</sub>	100
CQO	mg L <sup>-1</sup> O <sub>2</sub>	250
Cor	-	Não visível na diluição de 1:40

### 2.1.1. Remoção de cor

Uma boa solução para resolver o problema das águas residuais têxteis tem que, em teoria, pressupor reciclar o máximo possível, tratar o menos possível e da maneira mais eficaz possível. Isto implica a adopção dos processos produtivos menos poluentes e de processos de tratamento disponíveis ecologicamente mais eficazes.

Em princípio, a descoloração consegue-se usando um ou vários dos seguintes sistemas combinados:

- adsorção,
- filtração,
- precipitação,
- degradação química,
- fotodegradação,
- biodegradação.

Na Figura 2-1 é apresentado um sistema de tratamento e águas residuais onde se exemplifica a combinação destes processos.

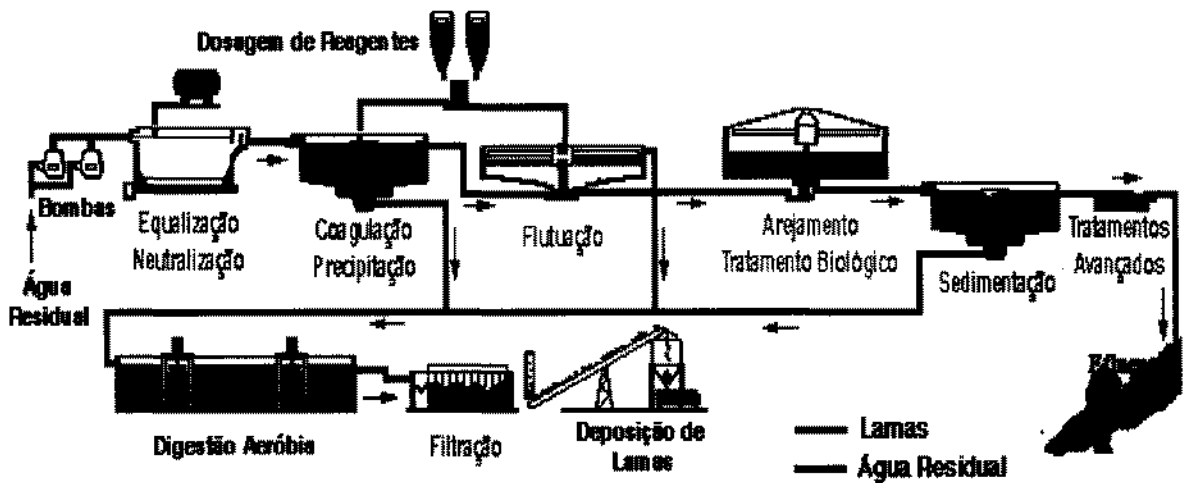


Figura 2-1 - Sistema de tratamento de águas residuais

(Diogo et al. 1996)

Teffrey-Goatley (citado em Correia et al., 1994) propuseram uma classificação de corantes agrupando-os segundo as suas características de solubilidade e carga da molécula em solução, relacionando esses grupos com os processos de remoção da cor normalmente utilizados para os efluentes da indústria têxtil (Tabela 2-4).

**Tabela 2-4 - Classificação de corantes considerando tipo de corante, carga/solubilidade e processo a aplicar**

Classificação	Corante	Carga/solubilidade	Processo
Grupo I	Disperso Azoico Cuba Sulfuroso	Carga negativa Coloidal	Coagulação Membrana Oxidação
Grupo A	Ácido Reactivo Directo A mordente Complexo metálico	Aniónico Solúvel	Adsorção Troca iónica Membrana Oxidação
Grupo C	Básico	Catiónico Solúvel	Membrana Oxidação

(Correia et al., 1994)

Os processos químicos ou físico-químicos são normalmente caros, produzem resíduos que terão que ser submetidos a tratamento posterior e, muitas vezes, são pouco eficientes e de aplicação limitada. Ledakowicz et al. (1999), estudaram um processo integrado de tratamento de águas residuais têxteis e analisaram a influência do pré-tratamento físico-químico, nomeadamente a oxidação com  $O_3/UV/H_2O_2$ , no tratamento biológico subsequente, tendo concluído que este pré-tratamento podia ser inibidor do crescimento e desempenho dos microrganismos.

A capacidade do ozono para destruir corantes foi demonstrada nos estudos de Perkowski e colaboradores (1996), mas não se conseguem apreciáveis reduções da

CQO e carbono orgânico total. Mesmo usando doses altas de ozono, não há uma completa mineralização da matéria orgânica (Ledakowicz et al., 1999).

A adsorção com carvão activado tem sido exaustivamente estudada como processo de remoção de corantes no tratamento de águas residuais. A avaliação deste método para as várias classes de corantes comprovou que a extensão da adsorção depende da estrutura molecular do composto. Os corantes com grupos nitro, azo e hidroxilo têm adsorção preferencial em detrimento dos que contém grupos sulfônicos. Este facto está intimamente ligado com as características de solubilidade dos corantes, traduzindo-se normalmente o aumento da solubilidade e polaridade do composto na diminuição da adsorção. Os corantes solúveis em água como os ácidos, básicos, directos, metalizados e reactivos têm dificuldade em ser adsorvidos devido, sobretudo, à sua natureza polar em oposição à natureza apolar do carvão. No entanto, os corantes dispersos, de cuba e pigmentos têm tão baixa solubilidade que a sua adsorção é demasiado lenta à temperatura ambiente.

A escolha do tipo e dosagem de carvão e o controlo de factores como a temperatura, pH e tempo de contacto são determinantes na eficácia destes processos (Reife et al., 1996 e referências nele incluídas).

Sendo o elevado custo do adsorvente uma das principais desvantagens da adsorção com carvão activado, têm sido investigados muitos materiais, orgânicos e inorgânicos, como alternativa mais económica. Entre muitos, a zeólite, bentonite, materiais têxteis como a lã carbonizada, metasilicato de cálcio e lamas activadas, constituem alguns exemplos. Estas últimas apresentam propriedades de adsorção características equivalentes às ao carvão activado.

Mas, do ponto de vista ambiental, a maior desvantagem deste processo de tratamento reside no facto dos corantes adsorvidos não serem mineralizados, havendo na realidade uma transferência de poluentes de uma fase líquida para outra sólida, que terá que ser posteriormente tratada (Kapdan et al., 1999).

Assim, o processo de adsorção não é eficiente nem economicamente atraente quando aplicado sozinho mas pode ser muito útil se combinado com redução química ou processos de biodegradação.

Os processos com membranas, UF, NF e RO, apresentam-se como soluções eficazes para alguns casos de remoção de cor, mas têm desvantagens consideráveis no que respeita ao investimento, custo de processo e tempo de vida das membranas. Deles resulta uma fracção, o concentrado, que em si mesma constitui um problema. Estes processos podem ser de grande valor se forem encarados como parte de um conjunto de processos concorrentes para a resolução do problema (Cooper, 1993; Mishra et al., 1993; Woerner et al., 1993).

O tratamento biológico inclui habitualmente processos aeróbios que, em relação à remoção de cor, são ineficazes para uma grande variedade de corantes. Estes processos carecem de ser melhorados para resolverem o problema dos corantes reactivos e ácidos. Os corantes azo não se degradam por via aeróbia. É possível degradar estes compostos por via anaeróbia mas desse processo resultam produtos, ainda que sem cor, mais tóxicos que os compostos de partida. Por redução da ligação azo do corante surgem aminas aromáticas tóxicas (Chung et al., 1993; Wong et al., 1999). Desta forma, em vez de resolver, apenas se consegue transferir o problema. No entanto, a alternância de tratamento aeróbio-anaeróbio permite obter bons resultados em algumas situações (Willmott et al., 1998).

Os processos biológicos continuam a ser objecto de interesse, sobretudo devido à sua relação eficiência/preço e ao facto de serem “amigos do ambiente”.

Em resumo, não há neste momento um processo adequado para a remoção de cor das águas residuais têxteis (Chen et al, 1999).

## 2.2. *Enzimas na indústria têxtil*

A biotecnologia pode oferecer melhores formas, processos mais rápidos, mais baratos e eficientes de produção industrial. Estudos feitos em 260 pequenas e médias empresas

têxteis de 4 regiões europeias, enquadrados no projecto europeu BEMET II (Walker et al., 1996), demonstraram que as possibilidades de aplicação da biotecnologia à têxtil são várias, nomeadamente:

- na produção e alteração de propriedades de fibras têxteis,
- no melhoramento de fibras animais,
- na produção de novas fibras biopoliméricas,
- em alternativa ao uso de determinados químicos (substituição por processos enzimáticos),
- em processos de acabamento têxtil,
- como novas ferramentas de diagnóstico de defeitos e de controlo de qualidade de produtos,
- na gestão de resíduos.

Mas, apesar de apresentar vantagens em determinados aspectos, a biotecnologia continua, sobretudo, ligada à investigação, sendo a sua adopção pelas indústrias europeias tradicionais muito lenta.

No enquadramento do projecto BEMET foi avaliado o tempo de impacto de alguns processos têxteis em que intervêm enzimas (Tabela 2-5):

**Tabela 2-5 – Intervalo de tempo para o impacto comercial de aplicações biotecnológicas na indústria têxtil**

Processos com Enzimas	Tempo (anos)
<b>Processos Têxteis</b>	
Carbonização	2-5
Desencolagem	estabelecido
Lavagem e branqueamento	> 10
Acabamento	0-2
<b>Matérias Primas Novas e Modificadas / Modificação nos Organismos Produtores</b>	
Algodão	2-5
Lã	2-5
Linho, juta, etc.	2-5
Seda	> 5
<b>Novas fibras</b>	
Biopolímeros	2-5
<b>Corantes e Intermediários</b>	
Índigo bacteriano e produtos relacionados	> 10
Pigmentos fúngicos	> 10
<b>Identificação e Análise de fibras</b>	
Provas de DNA para análise de espécies	0-2
Marcadores	0-2
<b>Protecção do Ambiente</b>	
Remoção de cor	0-2
Remoção de metais	2-5
<b>Novos Usos dos têxteis em biotecnologia</b>	
Biosensores	2-5
Suportes para imobilização de enzimas	> 5

De: BMB Status Report Textile (1996), (Walker et al., 1996)



A utilização de enzimas nos processos têxteis tem vindo a crescer, sobretudo nos últimos 10 anos (Novo Nordisk, 1998; 1999; Ethers et al., 1998). Em 1992, o volume de enzimas para a têxtil atingia os 11-12% do total de vendas de enzimas industriais. O maior responsável por este facto é o uso de celulases no “bio-stoning” dos “jeans” (Pedersen et al., 1996a).

A maior expressão da aplicação de enzimas neste sector continua centrada na sua utilização em processos de desengolagem e acabamento.

As celulases são já uma constante nos processos de acabamento têxteis, como agentes modificadores de superfície. São normalmente usadas misturas de extractos brutos com várias enzimas. Usam-se cada vez mais na lavagem dos “denim”, conferindo um aspecto mais suave ao produto acabado (Tyndal, 1992).

O efeito das celulases em fibras artificiais como o acetato e a viscose é diferente. Permite diminuir a tendência de formação do “pilling” no Lyocell mas não parece ter qualquer efeito nas fibras de acetato (Kumar et al., 1994). Estas enzimas têm ainda efeito benéfico no rendimento do tingimento, uma vez que aumentam a afinidade da fibra para o corante, sem prejuízo das propriedades de solidez do produto final.

Nos últimos anos, o bioacabamento tem vindo a ter uma atenção especial. Cavaco-Paulo e colaboradores (Cavaco-Paulo et al., 1998, 1998a) caracterizaram a actividade de celulases de *T. reisei* e demonstraram a influência de factores como a força iónica, a temperatura e o pH no processo de acabamento do algodão.

A combinação de pectinases e celulases permite obter algodões com melhor capacidade de retenção de água (Hartzell et al., 1998). Os tratamentos com celulases e proteases permitem remover impurezas e melhorar a molhabilidade dos tecidos.

As xilanases e pectinases são usadas em processos de amaciamento.

As proteases em tratamentos cuidadosamente controlados são usadas no acabamento da lã. Estas enzimas, têm ainda sido propostas como componentes de detergentes e como agentes bactericidas (Cumming, 1998).

Naturalmente que todos estes processos enzimáticos requerem uma optimização das condições de operação por limitação dos perfis de actividade das enzimas.

As lipases permitem remover gorduras e outras impurezas que contribuem para a hidrofobicidade dos artigos de poliéster. Um estudo efectuado com seis lipases comprovou que cinco delas, em condições de aplicação óptimas, aumentavam mais a hidrofiliidade da fibra que os tratamentos alcalinos clássicos. O efeito conseguia-se em condições moderadas de temperatura, em banhos não tamponados e em poucos minutos (Hsieh et al., 1998).

As preparações comerciais para a descolagem dos “denim” e outros artigos de algodão contém frequentemente alfa-amilase e lipase. É também usada na composição de detergentes juntamente com proteases e amilases.

A catalase pode intervir em processos de lavagem, permitindo encurtar o processo e consequentemente poupar água. A redução da poluição é acompanhada de um aumento da eficiência e reprodutibilidade de tingimentos subsequentes (Achwal, 1998). De facto, o excesso de peróxido de hidrogénio residual do processo de branqueamento pode ser removido por acção de catalases.

A imobilização da catalase veio permitir dispor de sistemas mais económicos, aumentando a resistência da enzima a flutuações de pH e temperatura, além de a protegerem da acção de surfactantes (Schacht et al., 1998).

Mas, para se ter uma noção da implementação das enzimas nos processos a molhado na indústria têxtil, convém analisar a introdução das várias enzimas comerciais pela Novo Nordisk, o maior produtor mundial de enzimas:

Primeiro foram introduzidas as amilases,

1952 - Thermozyme

1954 - Aquazym

São ambas preparações enzimáticas usadas para a descolagem a baixa temperatura.

1973 - Termamyl. Usada para descolagem a alta temperatura.

1981 - Proteases para remoção da cola da seda

1986 - Cellusoft . As celulases para o processo de “Bio-Polishing”

1987 - Denimax. As celulases para a abrasão do brim.

1991 - Terminox. As catalases que intervêm no processo “Bleach Cleanup”.

1996 - DeniLite™ . A lacase para branqueamento do “brim” ou para aumentar a abrasão.

Estas lacases só aparecem 100 anos depois da sua descoberta.

1997 – DemiPrime. Uma combinação de lipase e amilase para a descolagem. As enzimas mais recentes disponíveis foram as pectinases.

1999 – BioPrep. Pectinases para lavagem de algodão (Novo Nordisk, 1999).

1999 - Denilite II, uma versão melhorada da primeira formulação de lacase, surge nos Estados Unidos.

2000 - Denilite II, surge na Europa.

Há, assim, toda uma variedade de enzimas disponível no mercado para ser usada nos processos têxteis. No entanto, em relação ao tratamento de efluentes resultantes destes processos, apenas podemos falar em termos de perspectivas futuras de aplicação.

### 2.3. *Enzimas no tratamento de efluentes*

As enzimas lenhínicas, designação que se deve ao facto de intervirem, directa ou indirectamente, no processo de degradação da lenhina, têm sido exaustivamente estudadas no domínio do papel. Apresentam-se como um conjunto de catalisadores biológicos capazes de intervir na degradação de um vasto conjunto de compostos, assumindo importância crescente nas mais variadas áreas de aplicação, nomeadamente no tratamento de efluentes (Eriksson, 1990).

Muito se tem investigado acerca da capacidade que os fungos de podridão branca têm de degradar um conjunto amplo de compostos poluentes tóxicos muito estáveis. Sabe-se que esta capacidade está directamente relacionada com o facto destes organismos degradarem a lenhina. Este polímero tridimensional é muito complexo e a sua estereoquímica torna-o muito resistente ao ataque enzimático. Além disso, não pode ser absorvido e degradado por enzimas intracelulares. Este conjunto de condições, levou a

que estes fungos desenvolvessem mecanismos não específicos de degradação que lhes permitem a mineralização de compostos poluentes (Barr & Aust, 1994).

A actividade de fenoloxidasas extracelulares foi descoberta na década de 30 em fungos de degradação branca. De seguida, demonstrou-se que as reacções eram catalisadas por óxido-redutases do tipo das lacases e peroxidases.

A capacidade de oxidar compostos fenólicos tem mesmo sido utilizada como critério de identificação para fungos de degradação branca (Eriksson, 1990).

As enzimas lenhínicas fúngicas fazem parte do sistema enzimático extracelular e são normalmente produzidas como resposta a baixas concentrações de fontes de carbono, azoto e enxofre, referidas como condições lenhínicas (Tien & Kirk, 1983; Barr & Aust, 1994).

O primeiro passo da degradação de muitos compostos pelos fungos envolve a formação de radicais livres, muito reactivos, que desencadearão depois reacções em cadeia. Esta é a base da não especificidade destes processos.

Outro dado importante destes processos refere-se ao facto destes fungos filamentosos nem sempre degradarem poluentes para obterem energia (Barr & Aust, 1994).

Do conjunto de enzimas oxidativas que têm sido referidas como desempenhando um papel importante no tratamento de águas residuais, salientam-se as peroxidases e as polifenoloxidasas.

### *2.3.1. Peroxidases e fenoloxidasas*

As peroxidases são óxido-redutases produzidas por uma grande variedade de microrganismos e plantas, catalisam uma grande variedade de reacções mas requerem a presença de peróxido de hidrogénio. Inclui-se neste grupo a “horseradish peroxidase”, cloroperoxidase, lenhina peroxidase e manganês peroxidase.

As fenoloxidasas também se incluem nas oxidoreduções mas catalisam reacções de oxidação de compostos fenólicos não necessitando de  $H_2O_2$  como co-substrato. Neste grupo incluem-se as tirosinases e lacases; ambas requerem oxigénio e não necessitam de co-factores (Jolivet et al., 1998; Chevalier et al., 1999).

### 2.3.1.1. *Horseradish Peroxidase (HRP, EC 1.11.1.7)*

A HRP é uma das enzimas mais estudadas. Catalisa a oxidação de vários substratos onde se incluem compostos aromáticos do tipo fenol, bifenol, anilinas, benzidinas e compostos heteroaromáticos relacionados. Os compostos resultantes são polimerizados por via não enzimática podendo vir a ser removidos por sedimentação e filtração. Actua num amplo intervalo de pH e temperatura. O seu mecanismo de actuação é relativamente bem conhecido e matematicamente modelado (Nicell et al., 1993, Nicell, 1994).

Klibanov e colaboradores (1981) foram os primeiros a propor o HRP para remover mais de 30 fenóis e aminas aromáticas diferentes da água, com eficiências de remoção para alguns poluentes, superiores a 99%. O problema neste processo prendia-se com o tempo de vida, relativamente curto, da enzima, que foi atribuído primeiro à inactivação da peroxidase mas que Nakamoto e Machida (1992) vieram a comprovar dever-se à adsorção da HRP pelo polímero formado como produto final da reacção. Estes investigadores mostraram que a quantidade de enzima necessária poderia ser muito reduzida se juntasse gelatina ou PEG, que inibia a reacção entre o polímero fenólico e a HRP. Resultados semelhantes foram apresentados por Wu e colaboradores (1993, 1997) em relação ao PEG, tornando este processo de remoção de fenóis muito mais competitivo.

Os estudos feitos nos últimos 20 anos no sentido de otimizar a remoção de fenóis de soluções aquosas catalisada por HRP são inúmeros, mostrando o interesse suscitado por este assunto (Klibanov et al., 1981; Ibrahim et al., 1997; Gagne & Blase, 1997; Wiese et al., 1998; Zhang et al., 1998). Houve ainda, um esforço de investigação na imobilização

desta enzima, no sentido de aumentar o seu tempo e vida útil e, dessa forma, diminuir o custo da sua utilização (Ferrer et al., 1991; Siddique et al., 1993; Bodzek et al., 1994; Peralta-Zamora et al. 1998; Horak et al., 1999).

A utilização desta enzima imobilizada na descoloração de efluentes da indústria têxtil e do papel foi avaliada por Peralta-Zamora e colaboradores (1998a). Estes investigadores, estudaram a imobilização da HRP em suportes de vários tipos, nomeadamente sílica, sílica modificada, resinas (Amberlite IRA-400, Amberlite CG-400, Amberlite CG-120, Amberlite IRA-904) e avaliaram a eficiência da enzima imobilizada na descoloração de efluentes simulados. No caso dos efluentes têxteis, o facto dos suportes exibirem reactividade química e adsorverem as espécies coradas comprometia a aplicação destes sistemas com essa finalidade.

#### 2.3.1.2. *Cloroperoxidase (CPO, EC: 1.11.1.10)*

Sabe-se que pode oxidar compostos fenólicos (Pickard et al., 1991; Casella et al., 1994; Zhao & Luong, 1996). Intervém em algumas reacções de transferência como a oxidação do etanol a acetaldeído. As reacções catalisadas por esta enzima podem resultar na formação de uma variedade de produtos, alguns mais tóxicos que os de partida, que obstam à sua utilização em processos de bio-remediação (Aitken et al., 1994).

A estereoquímica da CPO só muito recentemente foi publicada (Sundaramoorty et al., 1998)

#### 2.3.1.3. *Lenhina Peroxidase (LiP, EC 1.11.1.14)*

Em 1983 dois grupos de investigação (Glenn & Gold, 1983 e Tien & Kirk, 1983), relataram a descoberta de uma enzima que degrada a lenhina em culturas de *Phanerochaete chrysosporium*. Esta enzima, que primeiro foi referida como lenhinase, é uma glicoproteína que contém ferroporfirina IX (heme) como grupo prostético e requer peróxido de hidrogénio para a sua actividade catalítica. Estudos posteriores revelaram que a lenhina peroxidase (LiP) de *Phanerochaete chrysosporium* apresenta múltiplas

formas com ponto isoelétrico (pI) de 3,2 – 4,7 e massa molecular de 38000 – 43000 u.m.a.

Têm sido isoladas diferentes LiP em numerosos fungos (Gold et al., 1993). A sua estabilidade foi estudada por Aitken & Irvine (1989) que demonstraram ser a enzima realmente inactivada a pH baixo. A estabilidade era, contudo, melhorada pela subida do pH, aumento da concentração e incubação em presença de álcool veratrílico. Na realidade, o álcool veratrílico é um composto com um papel relevante na catálise da LiP: é um redutor preferencial da enzima, produzido pelo fungo de podridão branca após lenhinólise e aparentemente protege a enzima da inactivação quando em presença de excesso de peróxido de hidrogénio (Durán, 1997).

Aitken e colaboradores (1989) definiram as melhores condições para remoção de fenóis com esta enzima: alta concentração de enzima, pH igual a 4 e adição controlada de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

A LiP em presença do peróxido de hidrogénio, tem capacidade de degradar compostos fenólicos e não fenólicos. Degrada anéis aromáticos alcoxilados do tipo da lenhina e também modelos de lenhina assim como clorolenhinas (Durán, 1997). Oxida ainda, álcoois benzílicos, quebra cadeias aromáticas laterais C $\alpha$  – C $\beta$ , desmetila e provoca rearranjos intramoleculares (Gold et al., 1993).

Foram feitos variados estudos de imobilização (Cornwell et al., 1999; Fawer et al., 1991; Ferrer et al., 1991, Peralta-Zamora et al., 1998) com resultados muito animadores em termos de preservação de estabilidade da enzima mas com perda clara de actividade em relação à enzima livre.

#### 2.3.1.4. *Manganês Peroxidase (MnP, EC 1.11.1.13)*

A MnP está presente em *Phanerochaete chrysosporium* juntamente com a LiP. Recentemente, tem sido objecto de mais atenção e têm aparecido vários estudos

relativos a esta enzima (Figuroa-Espinoza et al., 1999; Timofeevski et al., 1999; Collins et al., 1999; Banci et al., 1999).

É também uma enzima extracelular, de massa molecular entre 45000 - 47000 u.m.a. e possui um grupo prostético heme. Catalisa a oxidação de fenóis monoaromáticos e corantes aromáticos (Wariishi et al., 1992; Aitken et al., 1994; Ruttimann-Johnson & Lamar, 1996; Heifling et al., 1998; Ehara et al.; 1998, Hofrichter et al., 1999; Palma et al., 1998) mas a sua actividade oxidativa depende do peróxido de hidrogénio, de Mn (II) e da composição de soluções tampão (Aitken & Irvine, 1989). É estabilizada por um  $\alpha$ -acetoácido, como o ácido láctico.

O facto do processo requerer altas concentrações de Mn (III) tornam a sua aplicação difícil (Aitken et al., 1994).

MnP purificada de *Lentimula edodes* foi imobilizada de modo covalente (Grabski et al., 1995, 1996, 1998).

#### 2.3.1.5. *Tirosinase (EC 1.14.18.1)*

A tirosinase é conhecida como fenoloxidase ou catecolase e catalisa duas reacções consecutivas: a hidroxilação de monofenóis a *orto*-bifenóis com oxigénio molecular e a desidrogenação de *orto*-bifenóis a *orto*-quinonas. As quinonas formadas são compostos instáveis que polimerizam por via não enzimática, formando substâncias insolúveis em água e que podem ser removidas por filtração (Karam e Nicell, 1997).

#### 2.3.1.6. *Lacases (EC 1.10.3.2)*

As lacases pertencem ao grupo das oxidases que complexão o cobre e catalisam a oxidação de vários compostos, inorgânicos e orgânicos, particularmente fenóis, com a concomitante redução do oxigénio com formação de água.

Visto que esta enzima é objecto do presente trabalho, será descrita mais pormenorizadamente que as anteriormente mencionadas.



A lacase foi descoberta em 1883 por Yoshida em plantas (*Rhus sp*) mas só foi denominada lacase cerca de 10 anos mais tarde, em 1894 depois de isolada e purificada por Bertrand. As lacases fúngicas também foram descobertas durante o século XIX por Bertrand (1896) e Laborde (1896) (citados em Call & Mücke, 1997), e têm sido estudadas exaustivamente desde os anos 70 nos seus diferentes aspectos de aplicabilidade (Yaropolov et al., 1994; Marco & Bacelo, 1996; Guerra et al., 1998; Gonçalves et al., 1998; Bajpai, 1999; Rodriguez et al., 1999; Carvalho et al., 1999), expressão genética (Yaver et al., 1999; Karahanian et al., 1998; Jönsson et al. 1995; 1998; Mansur et al., 1997; Ong et al., 1997), transcrição genética (Collins & Dowson, 1997), clonagem (Coll et al., 1993; 1993a; Giardina et al., 1996; Yaver et al., 1996; D'Souza et al., 1996; Hatamoto et al., 1999) e genética molecular (Cullen, 1997). Da bibliografia consultada salientam-se Thurston, 1994, Yaropolov et al., 1994 e Xu, 1999, como os trabalhos de revisão sobre lacase.

#### *i. Detecção*

A lacase está amplamente estudada tendo sido detectada em várias espécies de plantas, bactérias, insectos e em mais de 40 espécies de fungos.

Até ao presente, foi purificada e caracterizada em mais de 20 organismos diferentes, em 14 dos quais foi determinada a sua estrutura primária. A maioria das lacases tem sido isolada de fungos de podridão branca embora alguns o tenham sido de plantas (Eriksson, 1990; Jönsson et al., 1995; Eggert et al., 1996a; Pérez et al., 1996; Sengupta et al. 1997; Muñoz et al., 1998; Chefetz et al., 1998; Koroljova-Skorosogat Ko et al., 1998 e 1999; Xu, 1999).

Os estudos referentes à sua função fisiológica determinaram a sua acção na biossíntese da parede celular das plantas (Dean & Eriksson, 1994; O'Malley et al., 1993), na degradação da lenhina, na patogenicidade dos fungos (Viterbo et al., 1993), na melanização bacteriana e virulência nos humanos relacionada com a alteração da melanina.

## ii. Características moleculares

A maioria das lacases estudadas são proteínas extracelulares, ainda que já tenham sido detectadas lacases intracelulares em alguns fungos e insectos. Normalmente as lacases fúngicas apresentam o pI entre 3 e 7 enquanto que as lacases de plantas têm pI de 9.

Estas enzimas diferem entre si na sua sequência primária de aminoácidos e na sua função biológica; são semelhantes no que respeita à sua estrutura tridimensional e nas suas características de ligações com cobre em 3 diferentes tipos de centros activos.

As massas moleculares da lacase variam dentro de um intervalo bastante amplo. Segundo Yaropolov e colaboradores (1994), as massas moleculares (Mw) das lacases variam entre 50000 e 150000 u.m.a. Thurston (1994) assume que variam entre 60000 - 80000 u.m.a., em que 5 - 20% corresponde a hidratos de carbono. Segundo este autor, foram detectadas massas maiores mas em condições experimentais inadequadas ou referindo-se a dímeros e não a macromoléculas individuais. Xu (1999), afirma que em PAGE nativa, a maioria das lacases apresentam mobilidades correspondentes a pesos moleculares (Mw) entre 60000 - 100000 u.m.a., em que 10-50% pode ser atribuído à glicosilação. Os dados disponíveis indicam que a manose é o principal componente ligado à lacase.

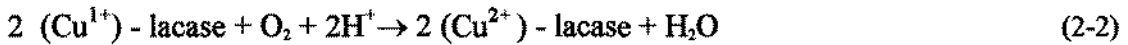
A maioria das lacases têm 4 átomos de cobre por molécula.

## iii. Enzimologia

A enzimologia das lacases de *Rhus vernificera* e *Trametes versicolor* têm sido estudada exhaustivamente (Morpurgo et al., 1982, 1993). Em contraste com a especificidade característica das enzimas, a lacase é relativamente inespecífica. Esta enzima pode catalisar a oxidação de muitas substâncias reduzidas, tanto inorgânicas como orgânicas, tais como complexos metálicos, anilinas, tiois e especialmente fenóis, com a concomitante redução de oxigénio e a formação de água.

Xu (1999) descreve a catálise da lacase envolvendo a redução do cobre tipo I pelo substrato reduzido, a transferência interna de electrão do cobre tipo I para o cobre tipo II e tipo III e a redução do oxigénio com a formação de água nos centros tipo II e tipo III.

Para substratos fenólicos as lacases catalisam oxidações por extracção de um electrão gerando radicais fenoxilos.



Os radicais formados rapidamente desencadeiam reacções não catalíticas tais como acoplamento radical-radical, dismutação e desprotonação.

Normalmente, o pH óptimo para a actividade da lacase depende do tipo de substrato. Por exemplo, no caso dos fenóis, costumam ter actividade óptima num intervalo de pH entre 3 e 7 para as lacases fúngicas e 9 para as de plantas. De qualquer forma, a maioria das lacases isoladas actua em zonas ácidas de pH, com valores óptimos normalmente entre 5-6. Há estudos que assumem que o centro activo da enzima contém dois grupos ácido-base com valores de pKa próximos de 5,5. Mas, há já lacases isoladas capazes de actuar a pH alcalinos, o que por si só, aumenta o leque de possibilidades de utilização (Raghukumar et al., 1994; Schneider et al., 1999). Muitos trabalhos referem uma forte dependência entre as constantes cinéticas e o pH (Xu et al., 1998). De facto, o perfil de pH assume uma extraordinária relevância em termos da aplicabilidade destas enzimas.

O segundo substrato da reacção enzimática é o oxigénio molecular, apresentando valores de  $K_m$  à volta de  $10^{-5}$  M. A  $V_{max}$  varia para lacases isoladas conforme a sua proveniência, entre 50 - 300  $\text{M s}^{-1}$  (Yaropolov et al., 1994).

A actividade enzimática é ainda influenciada pela força iónica e pelas suas propriedades de oxidação-redução (Xu et al., 1998, 1997, 1996). Os potenciais redox para algumas lacases em relação ao eléctrodo normal de hidrogénio estão no intervalo de 0,4 - 0,8 V

(Xu, 1999). Na realidade, a estrutura e o potencial redox de um composto parece definir o que é substrato das enzimas lenhínicas. As lenhinas são capazes de oxidar substratos com potenciais elevados, com  $E_{1/2}$  superior a 1,49V no caso da MnP e 1,12 V para a HRP, enquanto a lacase não pode oxidar compostos não fenólicos com  $E_{1/2}$  superiores a 1,06 V (Kersten, 1990; Fawer et al., 1991).

Independentemente da fonte da enzima, a lacase pode ser fortemente inibida por muitos aniões tais como a azida (Sugumaran, 1995), tiocianida e fluoreto, que podem interagir com os centros activos. Sabe-se que a azida se liga aos centros activos II e III e impede a transferência electrónica interna do electrão. Os agentes complexantes, removem o cobre e inibem também a actividade da lacase. Outros inibidores incluem iões metálicos (ex.  $Hg^{2+}$ ), ácidos gordos, reagentes sulfidrílo, hidroxiglicina e detergentes catiónicos de amónio quaternário.

#### *iv. Obtenção e clonagem*

As lacases são geralmente obtidas por purificação de extractos de fungos seleccionados. Certos compostos aromáticos como o ácido ferrúlico, xilidina, *p*-anisidina ou antraquinona podem ser usados como indutores da produção desta enzima pelos microrganismos.

Várias técnicas de purificação de proteínas podem ser usadas para as lacases. Os protocolos de purificação típicos envolvem ultrafiltração, troca iónica, filtração por gel, interacção hidrofóbica, outras técnicas electroforéticas e cromatográficas. A cromatografia por afinidade, que usa um grupo fenólico como ligante, pode aumentar muito a eficiência do processo de purificação.

Progressos recentes recorrem a técnicas de engenharia genética como alternativa industrial de produção (Kojima et al., 1990). A transcrição ou expressão da lacase pode ser detectada por hibridização DNA-RNA ou por ensaios imunológicos com anticorpo anti-lacase.

A actividade da lacase pode ser determinada com substratos cromogénicos característicos como a “seringaldazine” (4-hidroxi-3,5-dimetoxibenzaldeído azina) (Harkin & Obst, 1973; Harkin et al., 1974; Ander & Eriksson, 1976; Leonowicz & Grzywonowicz, 1981) e o ABTS (ácido 2,2-azino-bis-(3-etilbenzotiazolona-6-sulfónico)) (Kersten et al., 1990; Ander & Messner, 1998) entre outros. Este último é apropriado para o “screening” da enzima dado que o produto de oxidação é solúvel em água, estável e apresenta uma cor verde.

### 2.3.2. Lacase e mediadores

Mediadores são moléculas de baixo peso molecular que estão indirectamente envolvidas na reacção enzimática. Ao permitirem alargar o espectro de substratos em que a enzima actua, vieram dar um novo aspecto à acção das enzimas em geral e da lacase em particular (Bourbonnais & Paice, 1990; Majcherczyk et al., 1998).

Os fungos de degradação branca segregam um conjunto de compostos juntamente com as enzimas oxidativas, que se sabem ser os mediadores necessários à acção das enzimas. Os termos mediador e mediação dizem respeito, na realidade, a um conjunto de reacções em cascata, complexas e que continuam a ser intensivamente investigadas.

Os mediadores conhecidos são substratos da lacase. Nem todos são sintéticos, foram identificados mediadores naturais, nomeadamente no *Pycnoporus cinnabarinus* (Eggert et al., 1996). Entre os mediadores naturais conhecidos incluem-se a metionina, a cisteína e a glutatona reduzida (contém grupos sulfidrilo).

Mas, todos os compostos ditos mediadores, naturais ou de síntese, fazem o transfer dos electrões envolvidos no processo de oxidação-redução.

Um mediador químico da lacase é geralmente um intermediário fortemente oxidável. Os mais eficazes que se descobriram até agora são compostos heterocíclicos de azoto com grupos N-OH, sendo o *N*-hidroxibenzotriazole (HBT) um dos primeiros a ser descoberto (Call & Mück, 1994; Sealey et al., 1998; Wong et al., 1999).

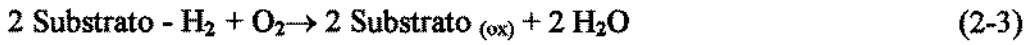
O potencial de oxidação-redução mais alto descrito para a lacase é de 800 mV, que se crê não ser suficiente alto para permitir oxidar substratos não fenólicos. No entanto, foi demonstrado que a lacase pode oxidar substratos com potenciais redox superiores à própria enzima (Bourbonnais et al., 1998). O mecanismo pelo qual isto ocorre é ainda desconhecido, sabe-se, contudo, que a eficiência de oxidação aumenta proporcionalmente com o potencial redox dos mediadores fenólicos até um valor máximo de 0,9 V e decresce a partir desse valor (Li et al, 1999).

Há muito tempo que se sabe que as reacções catalisadas pela lacase podem ser modeladas. Por exemplo, a oxidação do 2,4-diclorofenol pela lacase pode ser prevenida por adição de um bom substrato como o catecol. Pelo contrário, o ácido siríngico, aumenta a polimerização de substratos clorados (Call & Mücke, 1994).

Um outro exemplo diz respeito à conversão do ácido veratrílico, que não é substrato da lacase, em veratraldeído na presença de ABTS (Boubonnais & Paice, 1990). A acção notável da conjugação de enzima e mediadores, foi referida na oxidação de grupos metilo em anéis aromáticos (Potthast et al., 1995) e de vários álcoois aromáticos a aldeídos (Rosenau et al., 1996; Majcherczyk et al., 1999). Foi demonstrado que outros substratos, do tipo hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (PAH), são extensivamente oxidados por este sistema (Collins et al., 1996; Majecherczyk et al., 1998; Johannes et al., 1996, 2000). Pickard e colaboradores (1999) comprovaram mesmo uma sinergia quando da utilização de dois mediadores, ABTS e HBT.

Outro tipo de compostos, os sideróforos, também actuam como mediadores naturais das enzimas oxidativas (Machuca et al., 1999). Estes são quelantes com altas constantes de afinidade para formação de complexos metálicos, muito estáveis, produzidos pelos microrganismos para retirarem ferro do meio ambiente. Nesta nova perspectiva têm vindo a ser objecto de atenção recente (Hernlem et al., 1999; Parra et al., 1998, 1998a).

Como substratos da lacase, os mediadores seguem a reacção geral:



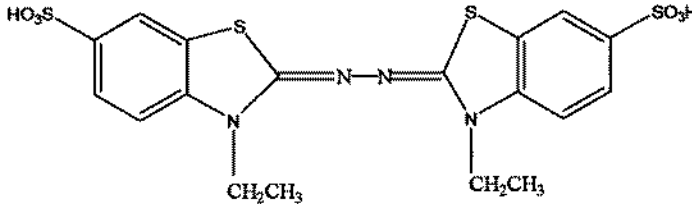
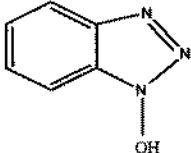
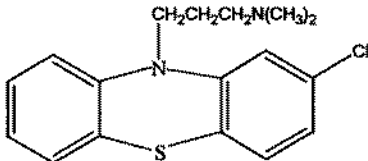
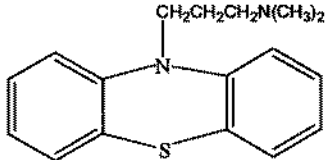
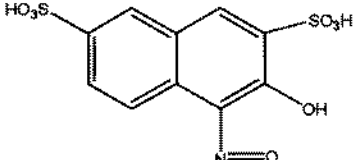
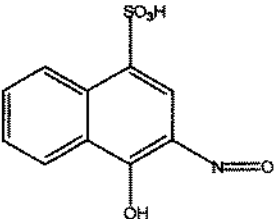
A quantidade de oxigénio consumido é directamente proporcional ao substrato transformado. Assim, o oxigénio é um co-substrato na reacção e tem de estar presente em quantidade suficiente para que estes processos enzimáticos ocorram.

### *2.3.2.1. Tipo de mediadores*

Mais de 100 possíveis mediadores tem sido descritos, mas os mais comuns são o ABTS, o primeiro mediador referido para a lacase (Bourbonnais & Paice, 1990), e o HBT (Call & Mück, 1994).

Alguns exemplos de mediadores são apresentados na tabela 2-6.

Tabela 2-6 – Alguns mediadores da lacase

Estrutura Química	Nome
	<p>ABTS</p> <p>Ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico)</p>
	<p>HBT</p> <p>N- Hidroxibenzotriazole</p>
	<p>CPZ</p> <p>Cloropromazina</p>
	<p>PZ</p> <p>Promazina (10-(3-[dimetilamino]propil)fenotiazina)</p>
	<p>NNDS</p> <p>ácido 1-nitroso-2-naftol-3,6-dissulfônico</p>
	<p>HNNS</p> <p>ácido 2-nitroso-1-naftol-4-sulfônico</p>



O HBT e compostos relacionados são substâncias bem conhecidas em áreas de aplicação muito diferentes, como a síntese de péptidos (Carpiano et al., 1991, 1993), como anti-corrosivos e fotossensibilizadores de polímeros. O efeito da lacase e diferentes mediadores tem sido investigada, sobretudo no âmbito da deslenhificação (Wong et al., 1999).

### 2.3.2.2. Mecanismo de acção dos mediadores

A maneira como os intervenientes principais na reacções mediadas com lacase, enzima, mediador e substrato interagem continua a ser objecto de estudo. Call e colaboradores (1997) propuseram como esquema geral de reacção da lacase com mediador o apresentado na figura 2-2.

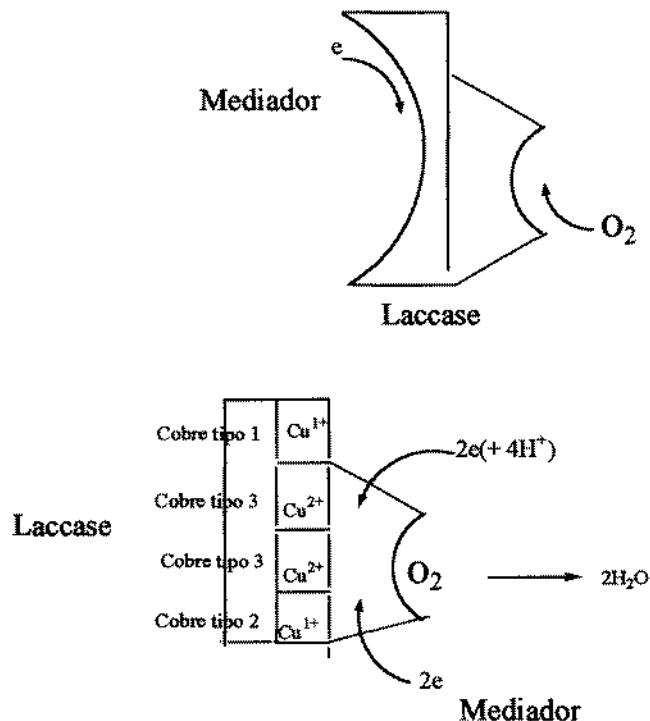


Figura 2-2 - Esquema de reacção da lacase com mediador

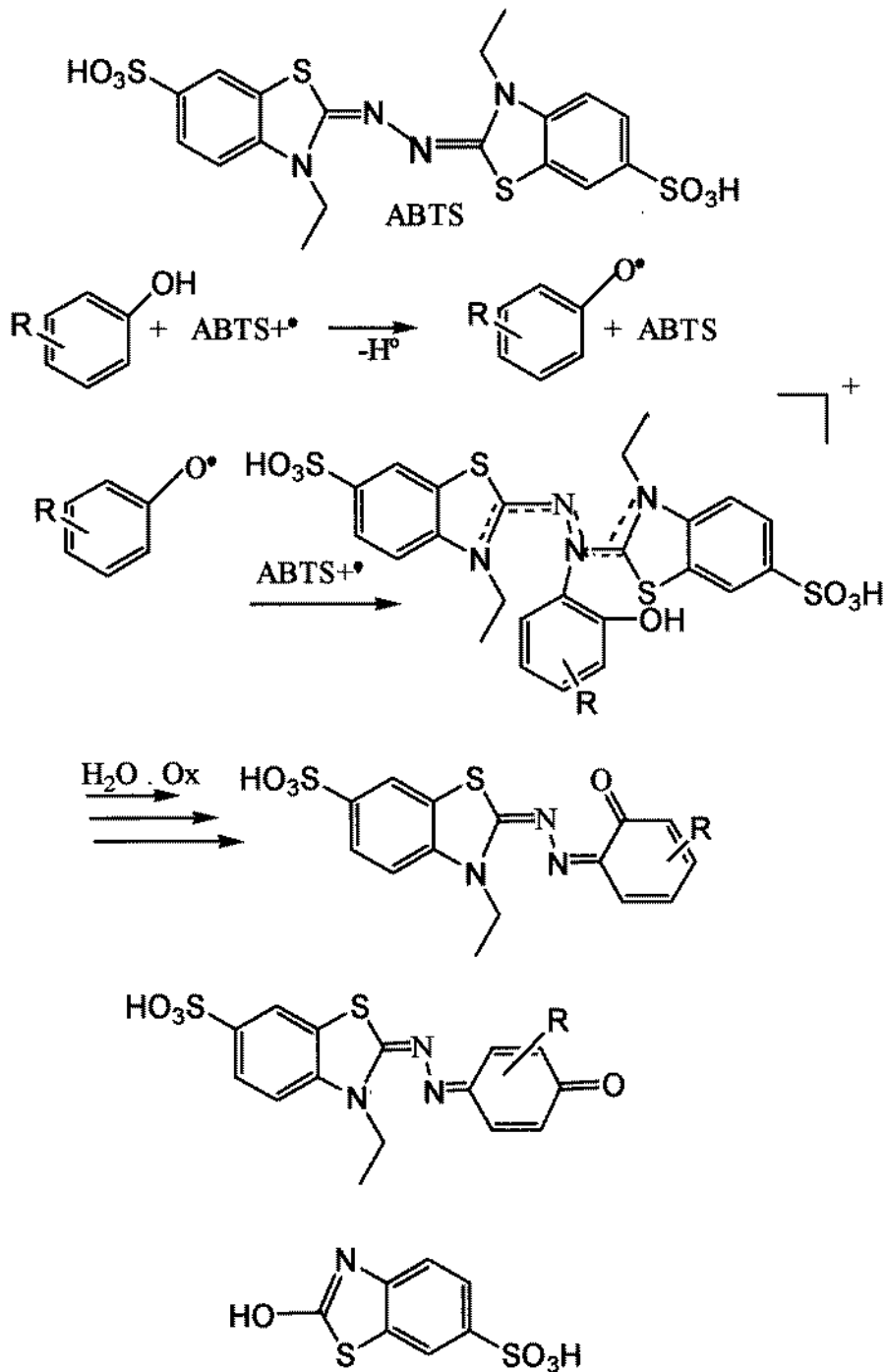
Estudos feitos com compostos fenólicos modelo (Potthast et al., 1997; Majeherczyk et al., 1999), revelaram o que se expõe a seguir:

O ABTS é frequentemente usado na reacção na forma de sal, solúvel em água. Por reacção com a lacase desenvolve rapidamente radicais (corados), estáveis e que podem reagir com fenóis, de acordo com os seus potenciais redox, formando novos radicais, fenoxilo, que desencadeiam novas reacções. Nessa interacção os radicais formados regeneram ABTS (Figura 2-3).

A oxidação do ABTS dá-se em duas etapas independentes do pH do meio reaccional no intervalo de 2 a 11.

Os potenciais redox da forma radicalar ( $ABTS^{\cdot+}$ ) e forma iónica ( $ABTS^{2+}$ ) do ABTS são respectivamente 0,680 e 1,09 V em relação ao NHE (Majeherczyk et al., 1999). Não há, no entanto, evidência demonstrada da acção do dicatão neste processo LMS (Lacase Mediator System).

As reacções de acoplamento desencadeadas ocorrem apenas nas posições *orto* e *para* em relação ao OH fenólico,

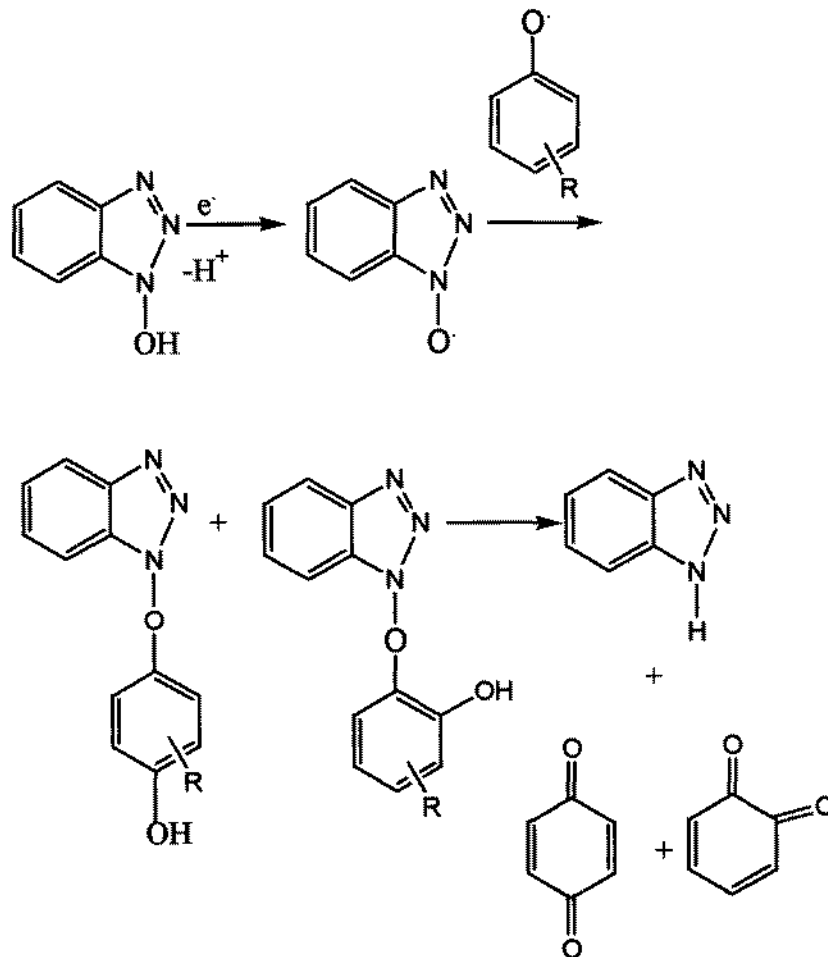


**Figura 2-3** – Esquema do mecanismo de reacção do radical ABTS com fenóis ou radicais fenoxilo e produtos secundários formados do ABTS

(Potthast et al., 1997)

Ao contrário do  $\text{ABTS}^+$  o radical resultante do HBT é instável na presença de oxigénio ou água. A sua alta reactividade confere-lhe baixa selectividade.

A reacção da oxidação do HBT pela lacase pode ser convenientemente avaliada pela medição da absorvância a 408nm (Ander et al., 1998). De acordo com dados de voltametria cíclica, não há regeneração do HBT. Depois da reacção, o HBT é convertido em BT, ou seja, a ligação N-O é quebrada.



**Figura 2-4 - Mecanismo possível para formação do benzotriazol durante as reacções LMS**

(Potthast et al., 1997)

Em resumo, tanto o ABTS como o HBT formam radicais por reacção com a lacase. No primeiro caso, são radicais mais estáveis e mais selectivos. No caso do HBT são mais instáveis, por isso mais reactivos e têm a vantagem de ser mais inespecíficos. No processo com ABTS o mediador é regenerado, o que não acontece com o HBT, que é transformado em BT e outros produtos (Potthast al., 1997; Li et al., 1999; Xu et al., 2000).

Um outro dado importante, refere-se ao facto de apenas as lacases provenientes de fungos lenhicolíticos de degradação branca oxidarem o HBT. Lacases de outras proveniências parecem não ter qualquer efeito neste composto (Ander et al., 1998a).

## 2.4. Cinética enzimática

As reacções enzimáticas podem ser estudadas explorando diferentes aspectos da catálise. A análise da cinética enzimática revela aspectos importantes das características da enzima.

A velocidade da reacção enzimática é, em geral, seguida através da medição da quantidade de produto (ou produtos) formado por unidade de tempo.

Em 1913, Michaelis e Menten, propuseram um modelo geral para as reacções enzimáticas. Assume-se que uma enzima E reage com um substrato S para dar um complexo enzima-substrato E - S, que origina então a enzima e o produto de reacção P:



onde  $K_1$ ,  $K_{-1}$ , e  $K_2$  são as constantes de velocidade dos respectivos passos reacionais.

Esta representação é válida para um período inicial da reacção em que a quantidade de substrato transformado é baixa e a reacção inversa é desprezável.

Com base nas reacções apresentadas e no facto de que o equilíbrio entre E, S e E - S se atinge rapidamente em comparação com a reacção  $E-S \xrightarrow{K_2} E+P$

Michaelis e Menten realizaram um estudo quantitativo das variações de velocidade de uma reacção enzimática em função da concentração de substrato.

A vantagem da equação de Michaelis e Menten reside no facto de não necessitar dos valores de  $[E]$  e  $[E-S]$ , concentrações difíceis de determinar.

A quantidade de P formada, assim como a velocidade da reacção, vão depender directamente da concentração em complexo E-S, isto é, da concentração de enzima que se liga ao substrato. Daí que o estudo do equilíbrio  $E+S \rightleftharpoons E-S$  permita a

interpretação simplificada da cinética da reacção sem comprometer o seu rigor.

A constante de equilíbrio, ou constante de Michaelis, para a dissociação do complexo E-S é

$$K_m = K_s = \frac{K_i}{K_j} = \frac{[E][S]}{[E-S]} \quad (2-5)$$

em que [E] representa a concentração de enzima livre.

Substituindo [E] e rearranjando, obtemos a Equação Michaelis e Menten:

$$\frac{v}{V_{\max}} = \frac{[S]}{K_m + [S]} \quad (2-6)$$

onde  $V_{\max}$  é a velocidade máxima da reacção.

Esta equação permite calcular o  $V_{\max}$  e  $K_m$  a partir das variações de velocidade em função do substrato. Se escolhermos um valor de  $v$  correspondente ao valor de  $V_{\max}/2$ , teremos

$$K_m = [S] \quad (2-7)$$

A constante de Michaelis ou constante de equilíbrio da dissociação de complexo E - S, é assim igual à concentração de substrato para a qual a velocidade de reacção é metade da velocidade máxima.

A velocidade da reacção enzimática é influenciada por factores físicos como a temperatura e o pH, e agentes químicos que podem funcionar como activadores ou inibidores.

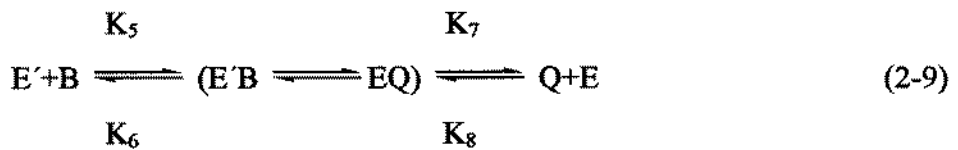
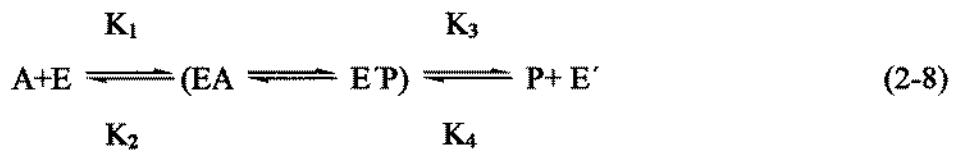
A maioria das reacções enzimáticas envolve dois ou mais substratos e resulta na formação de mais de um produto. Muitas delas são multisubstrato e/ou multiproduto.

As reacções envolvendo dois substratos (Bi Bi Reacções) podem ocorrer segundo três tipos de mecanismo diferentes (Copeland, 1996; Brezonik, 1994):

- Mecanismo de Ping-Pong
- Mecanismo sequencial ordenado
- Mecanismo sequencial ao acaso

No mecanismo de Ping-Pong, pelo menos um produto é libertado antes de todos os substratos se terem combinado com a enzima. Nos mecanismos sequenciais, todos os substratos são adicionados à enzima antes da libertação de qualquer produto da reacção. As equações apresentadas a seguir, ilustram os mecanismos para as reacções de Bi Bi substrato:

1. Os mecanismos de Ping-Pong são do tipo geral:



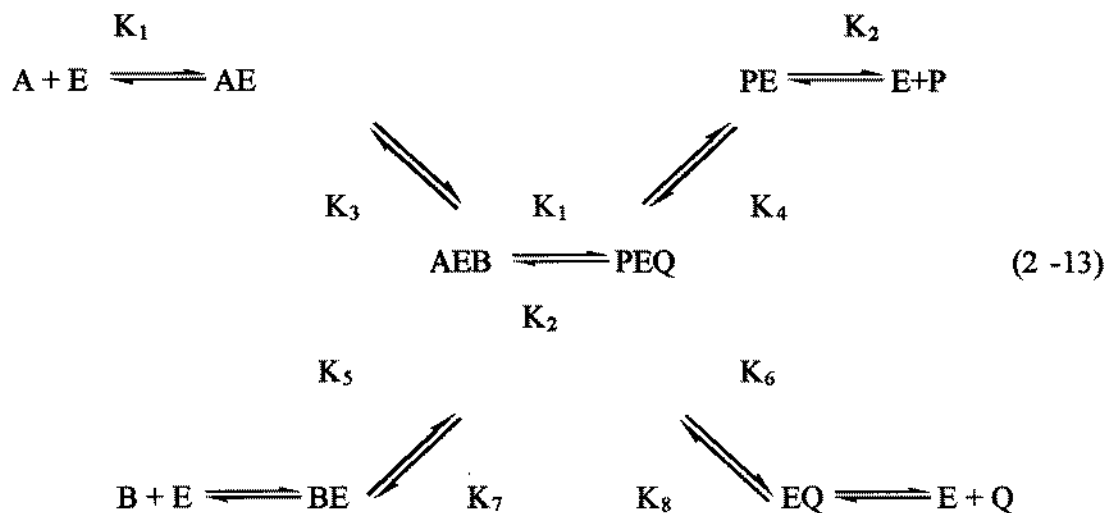
2. O mecanismo sequencial ordenado é do tipo geral:







3. O equilíbrio ao acaso envolve a formação rápida e reversível de complexos com os substratos A ou B. O passo limitante da reacção é a conversão do complexo ternário:



Nestas equações, A e B representam substratos, P e Q produtos de reacção e K as respectivas constantes de velocidade.

O mecanismo das reacções Bi Bi substrato pode ser identificado pelo modelo de inibição dos produtos P e Q avaliado pelos traçados de Lineweaver-Burk.

Nos mecanismos de Ping-Pong os gráficos  $1/v$  em função de  $1/[A]$  ou  $1/[B]$ , fixando  $[B]$  ou  $[A]$  respectivamente, são rectas paralelas, semelhante ao caso da inibição acompetitiva.

Nos mecanismos sequenciais é necessário saber qual é o substrato que se liga primeiro à enzima, uma vez que só este poderá ser inibido competitivamente pelo produto de reacção. Por convenção esse será o substrato A.

Para avaliar os parâmetros cinéticos da reacção é preciso traçar os gráficos  $1/v$  em função de  $1/[B]$ , fixando  $[B]$ . As rectas correspondentes a cada valor fixo de B convergem todas para um determinado ponto no lado esquerdo do eixo dos YY, sendo os valores de intercepção do eixo dos YY os valores de  $1/V_{\max}^{\text{app}}$ . Traçando depois o gráfico dos declives dessas rectas *versus*  $1/[B]$ , obtemos  $(-1/K^B)$  quando o valor de Y é zero e  $K^A/V_{\max}$  quando o valor do X é zero. Traçando então,  $1/V_{\max}^{\text{app}}$  *versus*  $1/[B]$ , quando o valor de X é zero o valor de Y corresponde a  $(1/V_{\max})$ .

Pelo traçado de Lineweaver-Burk não é possível distinguir se se trata de um mecanismo sequencial ordenado ou ao acaso. Para se poder fazer essa diferença é preciso recorrer ao uso de marcadores (isótopos) ou a estudos com inibidores específicos.

Embora seja relativamente fácil relacionar a cinética das reacções de Bi Bi substrato com o modelo cinético de Michaelis-Menten, nas reacções mais complexas, envolvendo substratos múltiplos, é muito mais difícil de derivar os termos da equação de velocidade. Um método desenvolvido por King e Altman em 1956, (citado em Copeland, 1996) permite derivar a equação de velocidade de reacções mais complexas com base nas constantes de velocidade para os vários passos da reacção. A implementação deste método para reacções complexas recorre naturalmente a sistemas computadorizados de cálculo.

#### 2.4.1. Parâmetros cinéticos da literatura para a lacase

Na tabela 2-7 são apresentados alguns dados da literatura relativos aos parâmetros cinéticos para lacases provenientes de diversos fungos.

Tabela 2-7 - Parâmetros cinéticos para algumas lacases

Compostos	Fontes de Lacase	$K_m$ ( $\mu\text{M}$ )	$K_{cat}$ ( $\text{s}^{-1}$ )	$V_{max}$	Ref.
Pirocatecol	<i>C. hirsutus</i>	390	492		Yaropolov et al., 1994
	<i>C. maxima</i>	123	404		
Hidroquinona	<i>C. hirsutus</i>	180	257		
	<i>C. maxima</i>	-	-		
	<i>Fusarium graminearum</i>	-	900		
	<i>Fusarium graminearum</i>	-	800		
Ferrocianeto de potássio	<i>Coriolus zonatus</i>	86	485		
	<i>C. hirsutus</i>	97	457		
	<i>C. maxima</i>	-	-		
	<i>Fusarium graminearum</i>	-	2000		
2,6-dimetoxifenol	<i>Coriolus zonatus</i>	202	517		Schneider et al., 1999
	<i>Botrytis cinerea</i>	190	-		Yaropolov et al., 1994 Schliephake et al., 1996
Quinol	<i>Botrytis cinerea</i>	133, 533	-		Yaropolov et al., 1994
	<i>Schinus molle</i>	1250	-		
Guaiacol	<i>C. versicolor</i>	300	200	-	Yaropolov et al., 1994
	<i>Fusarium graminearum</i>	-	660	-	
	<i>Pleurotus florida</i>	28500		0,175 $\mu\text{Kat/mg}$	Dean et al., 1994
	<i>Pleurotus florida</i>	3130		1,353 $\mu\text{Kat/mg}$	
	<i>PMI</i>	750			Coll et al, 1993; Eggert et al., 1996
	<i>Pycnoporus cinnabarinus</i>	750			
	<i>Trametes hirsutus</i>	750			

Compostos	Fontes de Lacase	$K_m$ ( $\mu\text{M}$ )	$K_{cat}$ ( $\text{s}^{-1}$ )	$V_{max}$	Ref.
Álcool vanílico	<i>C. versicolor</i>	400	182		Yaropolov et al., 1994
Vanilina	<i>C. versicolor</i>	2000	90		
Ácid vanílico	<i>C. versicolor</i>	1000	160		
Ácid homovanílico	<i>C. versicolor</i>	350	160		
Eugenol ou 4-alil-2-metoxifenol	<i>C. versicolor</i>	600	150		
Di-hidrocugenol	<i>C. versicolor</i>	260	160		
Guaiacil-propanol	<i>C. versicolor</i>	-	-		
Veratraldeide	<i>C. versicolor</i>	-	-		
Acido ascórbico	<i>C. versicolor</i>	2000	110		
	<i>Fusarium graminearum</i>	-	2300		
Dioxifenilalanine	<i>C. versicolor</i>	1000	70		
	<i>Fusarium graminearum</i>	-			
o-Dianisidina	<i>C. versicolor</i>	100	130		Yaropolov et al., 1994
	<i>Fusarium graminearum</i>	-	100		
	<i>Pleurotus florida</i>	330		1,47 $\mu\text{Kat}/\text{mg}$	Dean et al., 1994
	<i>Pleurotus florida</i>	290		2,4 $\mu\text{Kat}/\text{mg}$	
Acido Violúrico	<i>T. villosa</i>	5	260 $\text{min}^{-1}$		Sengupta et al. 1997
	<i>M. termophila</i>	18	27 $\text{min}^{-1}$		
	<i>P. cinnabarinus</i>	9	370 $\text{min}^{-1}$ 40 $\text{min}^{-1}$		
	<i>B. cinerea</i>	11	1		
Acido Sinapínico	<i>Coriolus zonatus</i>	7	624		
Catecol	<i>Coriolus zonatus</i>	197	423		Schneider et al. ,1999
3,3',5,5'- tetrametilbenzidina	<i>Fusarium graminearum</i>	-	1000		Yaropolov et al., 1994

Compostos	Fontes de Lacase	$K_m$ ( $\mu M$ )	$K_{cat}$ ( $s^{-1}$ )	$V_{max}$	Ref.
SGZ(Siringaldazina)	<i>Coprinus cinereus</i>	26+/-6	180 $min^{-1}$		Swamy et al., 1999
	<i>M. thermophila</i>				Xu, 1996
	<i>P. cinnabarinus</i>	3,9	1,1 $min^{-1}$		Sengupta et al. 1997
	<i>B. cinerea</i>	2,9	180 $min^{-1}$		
		4	52 $min^{-1}$		
		0,8			
	<i>T villosa</i>	58	2700 Kcat/min		Xu, 1996
	<i>Scytalidium thermophilum</i>	1	290Kcat/min		
	<i>Rhus vernificera</i>	43	600Kcat /min		
	<i>Rhizoctomia solani</i>	17			
	<i>M. thermophila</i>				
HBT	<i>T villosa</i>	15	84 $min^{-1}$		Sengupta et al. 1997
	<i>M. thermophila</i>	10	0,12 $min^{-1}$		
	<i>P. cinnabarinus</i>	29	22 $min^{-1}$		
	<i>B. cinerea</i>	12	10 $min^{-1}$		
	<i>Trametes hirsuta</i>	8	-		
	<i>Coprinus cinereus</i>	23	1090+/-30 $min^{-1}$		Yaropolov et al., 1994
ABTS	<i>Coprinus cinereus</i>	170	270+/-10 $min^{-1}$		
	<i>Coprinus cinereus</i>	280	60+/-2 $min^{-1}$		
			2,7 $min^{-1}$		
	<i>T villosa</i>		440 $min^{-1}$		
	<i>M. thermophila</i>	58	920 $min^{-1}$		Sengupta et al. 1997
	<i>P. cinnabarinus</i>	96	23 $min^{-1}$		
	<i>B. cinerea</i>	18			
		28			

## 2.5. *Aplicações das lacases*

As lacases têm vindo a ser usadas para a remoção de vários compostos xenobióticos aromáticos e poluentes (substratos modelo) que se encontram nos resíduos industriais, solos e em águas contaminadas. Os exemplos incluem a descoloração dos clorofenóis, clivagem de anéis aromáticos, mineralização de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, descoloração de efluentes de fábricas de pasta de papel ou de processamento de algodão (Kawai et al., 1988; Chivukula et al., 1995). A polimerização dos compostos resultantes traduz-se na imobilização dos poluentes ou insolubilização permitindo sua posterior remoção por processos de sedimentação ou filtração (Roper et al., 1995).

Muitos têm sido os trabalhos publicados referindo a acção de lacases sobre um amplo conjunto de compostos químicos, nomeadamente na oxidação de corantes fenólicos (Chivukula & Renganathan, 1995; Durán, et al., 1999), de fenóis (Dahiya et al., 1998; Gianfreda et al., 1998, Pothhast et al., 1999), clorofenóis (Dec & Bollag, 1994, 1994a, 1995; Roper et al., 1995, Grey et al., 1998; Kadhim et al., 1999, Ullah et al., 2000), bifenilmetanos (Xu et al., 1997a, Crestini & Argyropoulos, 1998), benzopirenos (Rama et al., 1998), fenilendiaminas *N*-substituídas (Kristopaitis et al., 1998), organofosforados (Amitai et al., 1998) e  $\alpha$ -*o*-dímeros não fenólicos, modelos da lenhina, (Kawai et al., 1999; Majcherczyk et al., 1999).

A aplicação de lacases no tratamento de efluentes têxteis apresenta-se promissora no que respeita à remoção de cor, uma vez que, os corantes têxteis e alguns dos seus produtos de degradação são do tipo de substratos “alvo” desta enzima.

### 2.5.1. *Lacases e a remoção de fenóis*

Compostos aromáticos, incluindo fenóis e aminas, constituem uma das maiores classes de poluentes com limites de descarga em muitos países. São encontrados nas águas

residuais de uma variedade de indústrias onde se inclui a indústria têxtil. Estas enzimas assumem importância na descontaminação de águas ou solos deste tipo de poluentes (Xu, 1996a; Smith et al., 1997).

A maioria dos fenóis são tóxicos e provocam cheiro e intensa coloração na água. Concentrações tão baixas como  $0,005 \text{ mg L}^{-1}$  de fenóis em água causam paladar e odor desagradável, sobretudo se estiverem em presença de clorofenóis.

Os métodos clássicos de remoção de fenóis nas águas industriais, incluem adsorção, degradação microbiana e oxidação química. Estes métodos apresentam desvantagens, tais como, custo elevado, remoção incompleta, formação de produtos tóxicos. A aplicação está limitada para determinadas gamas de concentrações de poluentes (Kadhim et al., 1999).

O mecanismo de acoplamento oxidativo de fenóis é conhecido desde os anos 60 (Brown, 1967), mas a sua aplicação ao tratamento de águas residuais só é descrita 14 anos depois (Klibanov & Morris, 1981).

Até há relativamente pouco tempo, acreditava-se que as lacases apenas estavam envolvidas em processos de polimerização de compostos fenólicos e não na sua degradação oxidativa. Para esta ideia, muito contribuiu o facto do fungo mais estudado, *Phanerochaete cryosporium*, não segregar níveis detectáveis de lacase nas condições habituais de cultura (Muñoz et al., 1997). Contudo, Srinivasan e colaboradores (1995) mencionam a capacidade de o fazer em determinadas condições ainda que em pequena quantidade.

O facto das lacases utilizarem oxigénio em vez de peróxido de hidrogénio, torna-as catalisadores atractivos nestes processos (Dec & Bollang, 1990). Muitos estudos têm sido feitos no sentido de avaliar a capacidade e condições necessárias para a remoção de compostos fenólicos com lacases. Compostos com átomos de cloro substituintes no anel benzénico em posição *orto* ou *para* são mais facilmente degradados que aqueles que têm os substituintes em posição *meta*. Além disto o aumento do oxigénio dissolvido também aumenta a eficiência de remoção (Kadhim et al., 1999). As lacases de *Coriolus*

---

*versicolor* mostraram-se eficazes na remoção de AOX nomeadamente os clorofenóis e cloroguaicois de efluentes provenientes da indústria do papel (Roy-Arcand et al., 1991).

### 2.5.2. Fungos (*lacases*) e biodegradação de corantes

Muitos trabalhos têm tido como objectivo fazer o “screening” dos fungos com capacidade de descorar corantes comerciais têxteis (Glenn & Gold, 1983; Gold et al., 1988). O fungo *Phanerochaete chrysosporium*, um dos mais exaustivamente estudados, revelou a capacidade de degradar corantes azo, antraquinónicos, heterocíclicos, trifenilmetano e poliméricos (Glenn & Gold, 1983; Cripps et al., 1990; Ollikka et al., 1993; Paszczynski et al., 1992, Spadaro et al., 1992).

Outros fungos, como o *Bjerkandera adusta* e *Trametes versicolor* degradam os corantes azo, Reactive Orange 96, Reactive Violet 5, Reactive Black 5, ftalocianina, Reactive Blue 15 e Reactive Blue 38 (Heinfling et al., 1997). No entanto, na maior parte destes trabalhos, a degradação dos corantes é atribuída às peroxidases, sobretudo à LiP segregada pelo fungo, requerendo a presença de mediadores, tipo álcool veratrílico (Ollikka et al., 1993; Kim et al., 1995; Paszczynski et al., 1991, 1991a; Yu et al., 1999).

Os corantes não são igualmente susceptíveis à degradação enzimática. Três corantes sintéticos Acid green 27, Acid violet 7 e Índigo carmine, com cromóforos típicos, antraquinónico, azo e índigo respectivamente, foram descorados pelo fungo *Trametes versicolor*. A degradação do corante catalisada pela lacase depende da estrutura do respectivo corante. Neste caso, o corante antraquinónico revelou ser um bom substrato desta lacase. O Acid violet 7 e o Índigo carmine, não sendo substratos da lacase, precisaram de compostos mediadores. Foi então, avançada a ideia de que os corantes, substratos da lacase, podem actuar nos efluentes como mediadores promovendo a descoloração de outros corantes que não são substratos naturais (Yu et al., 1999).

Vários autores estudaram a oxidação de corantes fenólicos e a influência da estrutura do corante na sua biodegradabilidade (Chivukula & Renganathan, 1995; Pasti-Grigsby et



al.,1992; Durán et al., 1999). Chivukula e Renganathan (1995) tentaram explicar o papel das lacases na oxidação de corantes azo. Para isso usaram um conjunto de corantes azo modelo (derivados do 4-(4'-sulfofenilazo)-fenol) em que apenas variaram os substituintes no anel benzênico e testaram a influência destas variações estruturais na capacidade da lacase de *P. oryzae* em oxidar estes compostos. De todos os corantes testados, apenas os que tinham grupos doadores de electrões, metilo ou metoxilo eram oxidados. Os compostos 4-(4'-sulfofenilazo)-fenol não substituídos ou com substituintes 2-cloro ou 2-nitro não sofreram qualquer oxidação. Com base nestas observações, concluíram que o anel fenólico do corante azo tem que ser rico em electrões para poder ser oxidado pela lacase. Mas, a localização dos substituintes também é importante. O derivado 2,6-dimetoxilado é o melhor substrato. Era conhecido desde os anos 60 que este composto era substrato da lacase (Bocks, 1967).

Nos estudos descritos por Chivukula & Renganathan, não foi verificada qualquer polimerização e segundo o mecanismo proposto não há formação de aminas aromáticas, uma vez que no processo de redução é formado azoto.

### *2.5.3. Outras aplicações das lacases*

Como oxidases, podem ser usadas numa variedade de processos industriais e aplicações medicinais em que estão envolvidas oxidações. Há investigações em curso com lacase no domínio da bio-oxidação, biotransformação, uso como biossensores e síntese enzimática.

#### *i. Deslenhificação de lenhinoceulósicos*

Os métodos convencionais de deslenhificação e descoloração da polpa do papel envolvem tanto  $\text{ClO}_2$  como  $\text{O}_3$ . Apesar de eficientes, estes métodos têm sérios problemas, tais como a formação de produtos secundários clorados e perda de resistência das fibras de celulose (Xu, 1999). A deslenhificação enzimática com lacase obvia estes problemas e poderá ser adaptada ao sistema produtivo da indústria do papel, oferecendo uma alternativa menos poluente.

Foi desde há muito assumido que a lacase participa na deslenhificação natural. Várias lacases mostraram-se capazes de degradar quer a lenhina natural quer os seus modelos sintéticos. Estas enzimas podem ainda oxidar os componentes fenólicos expostos na lenhina ou, em presença de mediadores redox apropriados, oxidar fenóis e componentes não fenólicos. Como resultado da oxidação da lenhina pela lacase, os radicais gerados podem provocar despolimerização por clivagens C - C alifáticas ou aromáticas.

Assim, na indústria do papel, a lacase pode actuar num pré-tratamento como agente biológico degradando parcialmente a lenhina e facilitando a polpagem (Messner et al., 1994). Também pode ser aplicada como alternativa aos oxidantes químicos no biobranqueamento (Call et al., 1994, 1994a).

## *ii. Laccase no acabamento têxtil*

A lacase tem sido referida como meio de evitar o manchamento dos têxteis tingidos ou estampados. Pode ainda ser usada no acabamento do algodão, substituindo oxidantes convencionais como o hipoclorito e no processo de lavagem dos “denim” tingidos com índigo, conseguindo-se variados efeitos de lavagem nos produtos (Pedersen et al., 1992, 1996, 1996a; Barfoed et al., 1998).

O DeniLite™ lançado em 1996 pelo Novo Nordisk representou uma inovação para o acabamento dos jeans. Até aí, as enzimas tinham sido usadas para desengomar e desgastar o tecido. Esta preparação foi a primeira lacase comercial no mercado. Apresenta-se sob a forma de uma suspensão não aquosa com uma consistência de xarope de ácer que tornava difícil dosear-la correctamente e misturá-la com água. A estas desvantagens, acrescia ainda a dificuldade de conservação do produto durante o transporte e armazenamento.

Em 1999, nos Estados Unidos, foi lançado o DeniLite II™, produto baseado num novo tipo de lacase com actividade superior à do DeniLite I™, tornando-o mais económico e sobretudo mais fácil de usar, uma vez que se trata de um granulado fácil de misturar em água.

*iii. Aplicações médico-sanitárias*

A lacase pode ser usada em processos de desinfecção, através de oxidação do iodeto com formação *in situ* de iodo, composto correntemente usado como desinfectante. A aplicação de um sal lacase-iodeto tem vantagens em relação à aplicação directa e iodo dado que é mais estável e mais seguro que o iodo em termos de armazenamento, transporte e manuseamento. Acresce ainda que a libertação do iodo pode ser facilmente controlada, por ajuste da concentração de lacase na preparação (Xu, 1996a). O sistema pode ser usado em aplicações industriais, domésticas ou de cuidados pessoais. Pode aplicar-se à desinfecção de águas de beber ou de piscinas, por exemplo.

*iv. Estética*

A pintura e ondulações dos cabelos envolvem processos oxidativos que implicam uso de químicos com odores desagradáveis, irritantes para os tecidos ou de difícil manuseamento. O uso de sistemas com lacases, torna o processo menos irritante e permite actuar em condições muito menos drásticas de pH e concentração de solventes mais baixas (Jumino et al., 1994).

Oxidações catalisadas por lacases têm sido referidas na pintura de cabelos e processos de ondulação. Estes sistemas associam a uma maior facilidade de processamento um certo efeito cosmético (Roure et al., 1992; Saruno, 1991; Martin et al., 1994).

*v. Imunoensaios*

A lacase pode ser usada para ensaiar outras enzimas. Neste caso, a enzima com interesse catalisa a produção de um composto que pode ser depois oxidado pela lacase provocando uma mudança física detectável. O produto de reacção com a lacase é regulado pela actividade da enzima com interesse. Este método pode ser usado para a amilase, aminopeptidase, fosfatase alcalina, angiotensina I convertase, arilamidase, celobiose oxidase, quimiotripsina, glucosidase, para dar alguns exemplos.

A lacase ligada covalentemente a um anti-corpo ou anti-gene pode ser usada como marcador enzimático em imunoenaios (Yaropolov et al., 1994; Zouari, 1994).

*vi. Síntese orgânica*

A lacase pode ser usada na síntese de vários compostos orgânicos funcionais, incluindo polímeros com determinadas características mecânicas, eléctricas ou ópticas, corantes têxteis, pigmentos para cosmética, aldeídos aromáticos, pesticidas e compostos heterocíclicos como a fenoxazina (Potthast et al., 1995).

Pode ser usado na síntese de compostos medicinais complexos como as do grupo dos anti-inflamatórios, anestésicos, sedativos, da vimblastina (anti-tumoral), da "Penicillin X dimer", cefalosporinas (antibióticos), etc. (Yaropolov et al., 1994).

*vii. Tratamento de alimentos e bebidas*

O escurecimento e turvação durante o processo de armazenamento dos sumos e vinhos é um dos maiores problemas da indústria alimentar. Os compostos fenólicos estão envolvidos nestes processos. Convencionalmente, estas substâncias eram adsorvidas e removidas usando, por exemplo, gelatina e bentonite, que normalmente tinham baixa especificidade e podiam afectar a cor, o aroma e causar problemas de depósitos.

A lacase pode ser usada para remover ou modificar sacarídeos fenólicos, melhorar transparência, aparência de cor, aroma, sabor, estabilidade de sumos de fruta e bebidas alcoólicas fermentadas (Picquadio et al., 1997; Cliff et al., 1994; Yaropolov et al., 1994). As substâncias fenólicas não desejadas podem, depois de polimerizadas pela lacase, ser removidas por filtração.

Casos há em que a presença da lacase é indesejável em substâncias alimentares dado que provoca o escurecimento dos alimentos. Neste caso, a sua inibição pode ser conseguida usando substâncias como ácido ferúlico, ácido oxálico ou removendo o O<sub>2</sub>.

Podem usar-se lacases para alterar a cor de bebidas e alimentos, de que é exemplo o azeite (Brenna et al., 1994; Picquadio et al., 1997; Lacki, 1998).

#### *Outros exemplos de aplicações*

A lacase é usada no cross-linking de polissacarídeos para a produção de compósitos (Pedersen et al., 1996a).

Outra aplicação interessante é na área dos curtumes. Usa-se na transformação oxidativa e consequente acoplamento de precursores de corantes à matriz de colagénio dos couros. Os precursores solúveis dos corantes podem ser adsorvidos, oxidados e polimerizados dando os efeitos de curtimento desejados. Este processo melhora a eficiência do tingimento e as características do couro ao mesmo tempo que permite reduzir o custo do processo (Sørensen et al., 1993).

Aplicações de lacase na área de diagnóstico ou usada em biosensores tem vindo a ser referida, nomeadamente na detecção de substâncias como fenóis, anilinas e O<sub>2</sub> (Gardiol et al., 1996; Zouari et al., 1994).

*Síntese e biotransformação de corantes disazo*



### **3. *Síntese e biotransformação de corantes disazo***

#### **3.1. *Introdução***

Os corantes azo têm enorme importância, tanto do ponto de vista de aplicação como ambiental. De facto, este grupo de compostos inclui 70% dos corantes globalmente produzidos. São compostos contendo grupos azo ligados a anéis benzeno ou naftaleno e, em alguns casos, ligados a anéis aromáticos heterocíclicos. Resultam de síntese e são de difícil degradação por microrganismos visto que não existem na natureza (Paszczynsky et al., 1992). As suas propriedades mutagénicas/cancerígenas resultam, para além do corante em si mesmo, das aminas aromáticas formadas na redução da ligação azo durante a biotransformação (Spadaro et al., 1992).

A maioria dos corantes directos para tingimento de algodão são corantes poliazos. A afinidade destes corantes para a fibra pode ser melhorada pelo aumento da cadeia com sistemas de ligações duplas conjugadas e a introdução de alguns grupos nas estruturas planares destas moléculas. Com excepção do C.I. Direct Yellow 28, os corantes monoazo não têm, hoje em dia, importância prática como corantes directos, têm sim importância como parte cromogénica de corantes reactivos violeta e rubi (Zollinger, 1987).

No presente trabalho, sintetizaram-se sete corantes disazo com características estruturais bem definidas. Todos apresentam em comum um grupo hidroxilo em posição *para* em relação à ligação azo, característica estrutural importante do ponto de vista de ligação ao centro activo da lacase, variando apenas os substituintes nos anéis aromáticos.

Estudou-se a oxidação enzimática destes corantes pela lacase acompanhando-se a descoloração resultante do processo e determinaram-se os parâmetros cinéticos para as reacções envolvidas.

Avaliou-se a influência da presença de mediadores na reacção enzimática, a relação entre a estrutura dos corantes e a oxidação pela enzima, propondo-se um mecanismo de degradação para este tipo de compostos.

### 3.2. *Materiais e métodos*

#### 3.2.1. *Químicos*

HBT (*N*-hidroxibenzotriazole), ABTS (ácido 2,2-azino-bis-(3-etilbenzotiazolína-6-sulfónico)), AV (ácido violúrico), *p*-aminobenzeno, ácido 3-aminobenzenossulfónico, 1-naftilamina, ácido salicílico, 3-metilfenol e 2,5-dimetilfenol, 2,6-dimetoxifenol foram adquiridos à Sigma (St. Lois, USA) Os intermediários de síntese (A) e (B) (Figura 3-4) foram fornecidos pela Synthesia A S. (Pardubice, Rep. Checa).

Todos os produtos químicos foram usados em grau analítico.

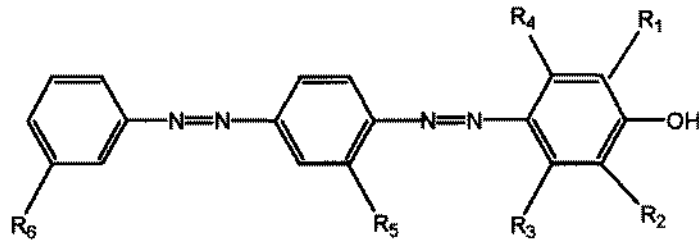
#### 3.2.2. *Lacase*

A lacase foi obtida do DeniLite™ por extração, filtração por gel e diálise conforme descrito em 4.2.3.

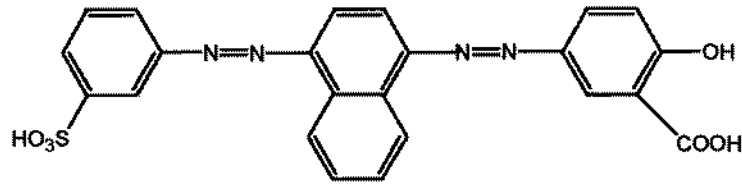
#### 3.2.3. *Síntese dos corantes disazo*

A síntese dos corantes disazo objecto deste estudo e apresentados na Figura 3-1, foi feita pelo processo químico clássico de preparação deste tipo de compostos. Primeiro a diazotação da amina formando-se o sal de diazónio respectivo, seguida de acoplamento deste último com a amina ou fenol adequado à estrutura de corante pretendida (Zollinger, 1987).

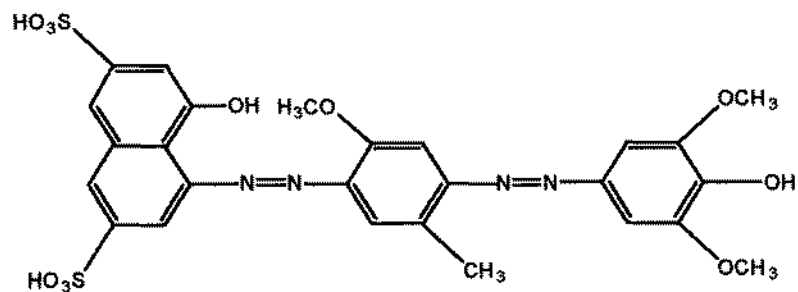




Corante	- R <sub>1</sub>	- R <sub>2</sub>	- R <sub>3</sub>	- R <sub>4</sub>	- R <sub>5</sub>	- R <sub>6</sub>
I	- H	- H	- CH <sub>3</sub>	- H	- H	- H
II	- H	- CH <sub>3</sub>	- H	- CH <sub>3</sub>	- H	- H
III	- H	- COOH	- H	- H	- H	- H
V	- COOH	- H	- H	- H	- OCH <sub>3</sub>	-SO <sub>3</sub> H
VI	- OCH <sub>3</sub>	- OCH <sub>3</sub>	- H	- H	- OCH <sub>3</sub>	-SO <sub>3</sub> H



Corante IV



Corante VII

Figura 3-1 - Estrutura dos corantes disazo sintetizados

A Figura 3-2 descreve a síntese dos corantes I-III :

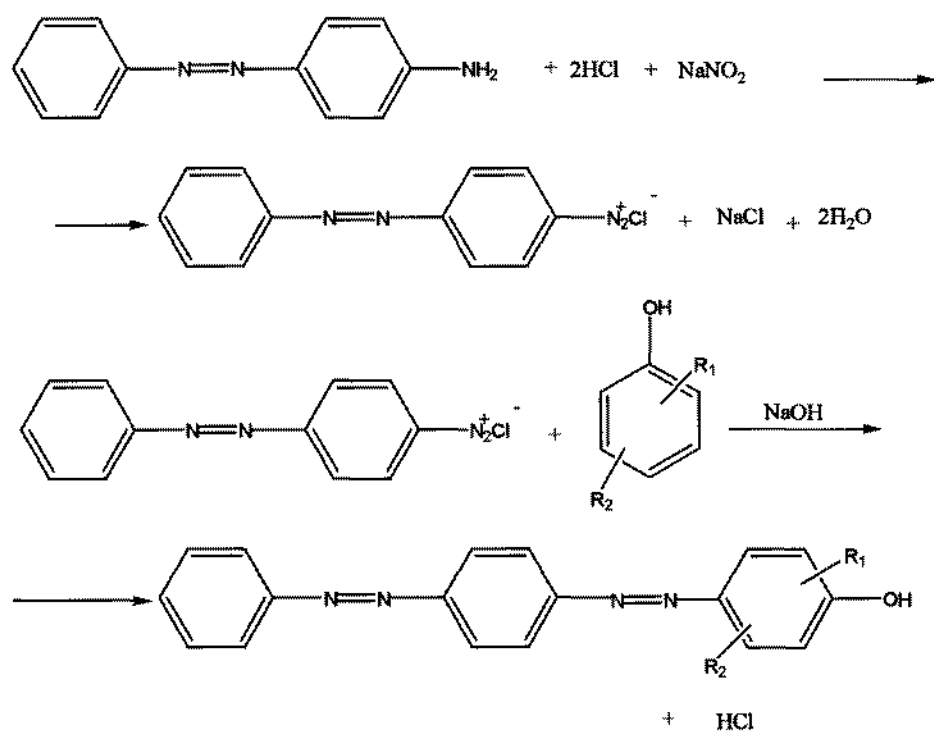


Figura 3-2 - Preparação dos corantes disazo I-III

Na Figura 3-3 apresenta-se a síntese do corante IV,

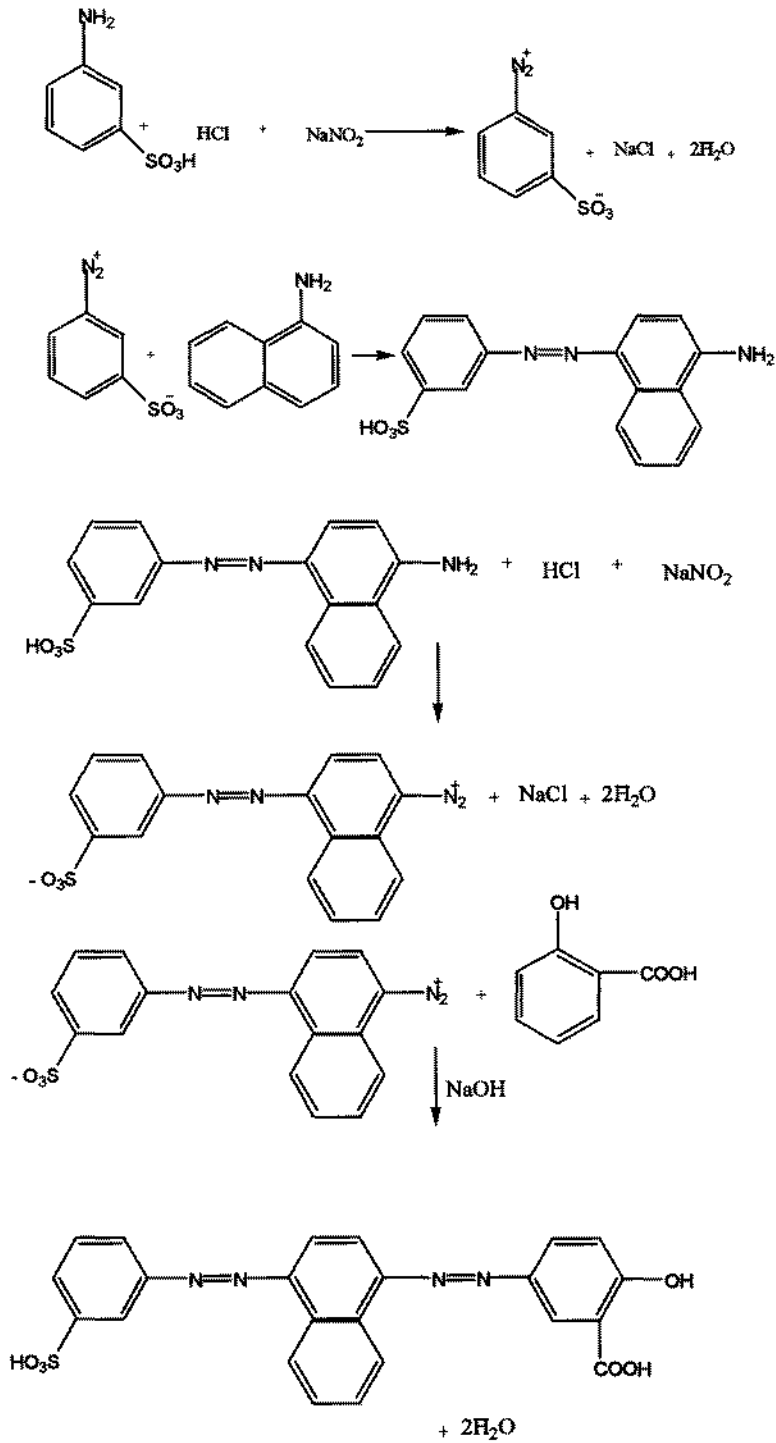
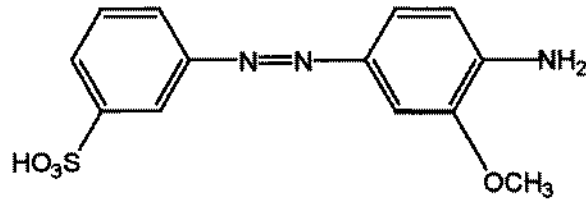
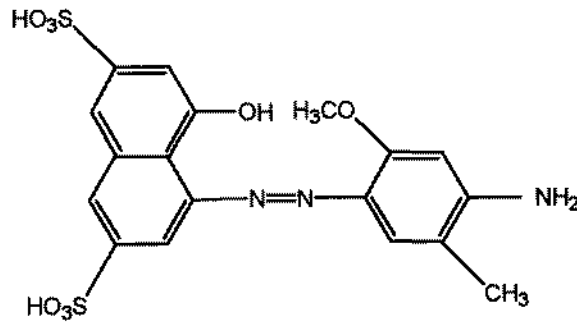


Figura 3-3 - Preparação do corantes disazo IV

A síntese dos corantes V-VII realizou-se de forma semelhante à apresentada na figura 3-2, tendo sido usados os intermediários comerciais (A e B) apresentados na Figura 3-4 como compostos de partida para a reacção de diazotação.



(A)



(B)

Figura 3-4 - Intermediários comerciais usados na síntese dos corantes

A descrição detalhada da síntese destes corantes é apresentada no Anexo I.

Os corantes foram purificados por recristalização (Fierz-David et al., 1938), sendo a sua pureza controlada por cromatografia em camada fina ( $\text{SiO}_2$ ) usando como eluente 2-propanol / 1-propanol / acetato de etilo / água (2:4:1:3).

As estruturas foram confirmadas por análise de espectroscopia de infravermelho e RMN (ver discussão, pág. 68).

### *3.2.4. Determinação da actividade da lacase*

A actividade da lacase foi determinada espectrofotometricamente usando ABTS como substrato conforme descrito em 4.2.4. (Ander & Messner, 1998).

O efeito inibidor na lacase dos solventes orgânicos usados neste estudo foi avaliado segundo procedimento descrito por Johannes & Majeherczyk (2000a). O teste padrão da acção inibitória na lacase foi feito por pré-incubação da enzima com o inibidor (etanol usado nas soluções dos corantes I, II e III, e DMF usado na solução do ácido violúrico) durante 2 minutos. A medição da variação da absorvância a 420 nm iniciou-se após a adição do ABTS 0,5 mM e a inibição foi avaliada pela variação de actividade por minuto ao longo do tempo de reacção (1 minuto), em relação à reacção enzimática em condições equivalentes mas sem a pré-incubação com o inibidor.

### *3.2.5. Oxidação dos corantes disazo pela lacase*

Os corantes IV-VII estudados foram solúveis em água porque incluíam na sua estrutura grupos sulfónicos, enquanto os corantes I a III apresentam características de solubilidade diferentes, apenas foram solúveis em solventes orgânicos. Assim, usaram-se como soluções mãe de corante, soluções aquosas para os corantes IV-VII, soluções etanólicas para os corantes I-III.

#### *Corantes I a III*

A mistura reaccional foi composta por solução de corante I-III em etanol a 96% (1mL,  $3,50 \times 10^{-5}$  M,  $3,85 \times 10^{-5}$  M e  $2,35 \times 10^{-5}$  M respectivamente), 0,5 mL de solução de lacase ( $15 \text{ U mL}^{-1}$ ) e tampão fosfato 50 mM (pH 5,5) até um volume final de 9 mL.

#### *Corante IV*

A mistura reaccional foi composta por solução aquosa de corante IV (1,5 mL;  $3,5 \times 10^{-4}$  M), 0,5 mL de lacase ( $15 \text{ U mL}^{-1}$ ) e tampão de fosfato 50mM (pH 5,5) até um volume final de 9 mL.

### Corantes V a VII

A mistura reaccional foi composta por solução aquosa de corante V-VII (1,5 mL;  $1,8 \times 10^{-4}$  M,  $1,8 \times 10^{-4}$  ,  $1,3 \times 10^{-4}$  M respectivamente), 0,5 mL de lacase ( $15 \text{ U mL}^{-1}$ ) e tampão de fosfato 50 mM (pH 5,5) até um volume final de 9 mL.

Todas as misturas reacionais foram incubadas a  $60^\circ\text{C}$  com agitação (200 rpm) durante 1 hora.

Foram ainda realizados ensaios de descoloração com os corantes disazo com  $30 \text{ U mL}^{-1}$ , correspondente à melhor concentração de enzima na descoloração do corante IV determinada experimentalmente (ver Figura 3-6).

Imediatamente após a adição da lacase, fez-se o varrimento do espectro de absorção da mistura analisando-se os resultados entre 350 e 700 nm, em intervalos de tempo que serão especificados no texto, usando um espectrofotómetro Unicam UV2. A oxidação do corante é monitorizada pela variação de absorvância no comprimento de absorção máxima para cada corante.

Para a determinação das constantes cinéticas, incubou-se uma quantidade conveniente de solução de lacase ( $15 \text{ U mL}^{-1}$ ) com várias concentrações de corante, em tampão de fosfatos 50 mM, pH 5,5, num volume total de 9 mL.

Quando necessário, os mediadores redox (HBT ou AV) foram adicionados em concentrações que serão descritas caso a caso. Usou-se solução de AV em DMF e solução aquosa de HBT preparada conforme descrito por Ander et al. (1998).

Todos os ensaios foram feitos em triplicado e realizaram-se paralelamente ensaios de controlo, sem enzima, sob idênticas condições experimentais.

### 3.3. Resultados

#### 3.3.1. Efeito dos solventes orgânicos na actividade da lacase versus ABTS

Nenhum dos solventes usados neste estudo apresentou qualquer efeito inibitório na actividade da enzima, determinada com ABTS como substrato, nas concentrações usadas nos ensaios experimentais de degradação dos corantes.

#### 3.3.2. Efeito da concentração de enzima na oxidação do corante IV

Estudou-se o efeito da concentração (até  $45 \text{ U mL}^{-1}$ ) de lacase na oxidação dos corantes disazo usando o corante IV como modelo. Para uma concentração óptima de enzima de  $30 \text{ U mL}^{-1}$ , houve diminuição de 60,3 % da cor ao comprimento de onda de absorção máxima em 15 minutos e 96,2 % em 30 minutos de reacção (Figura 3-5).

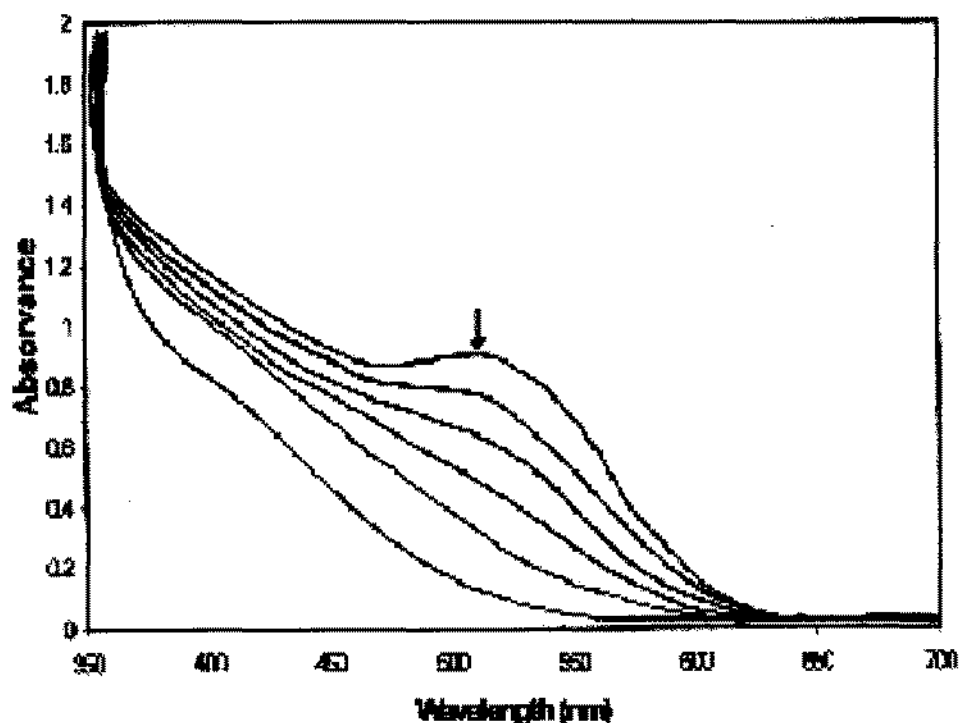


Figura 3-5 - Espectros de absorção do corante IV depois do tratamento com  $30 \text{ U mL}^{-1}$  lacase.

(O intervalo de tempo entre os varrimentos é de 5 minutos).

O efeito da concentração da lacase na velocidade de descoloração do corante IV avaliada em 30 minutos de reacção é mostrada na Figura 3-6.

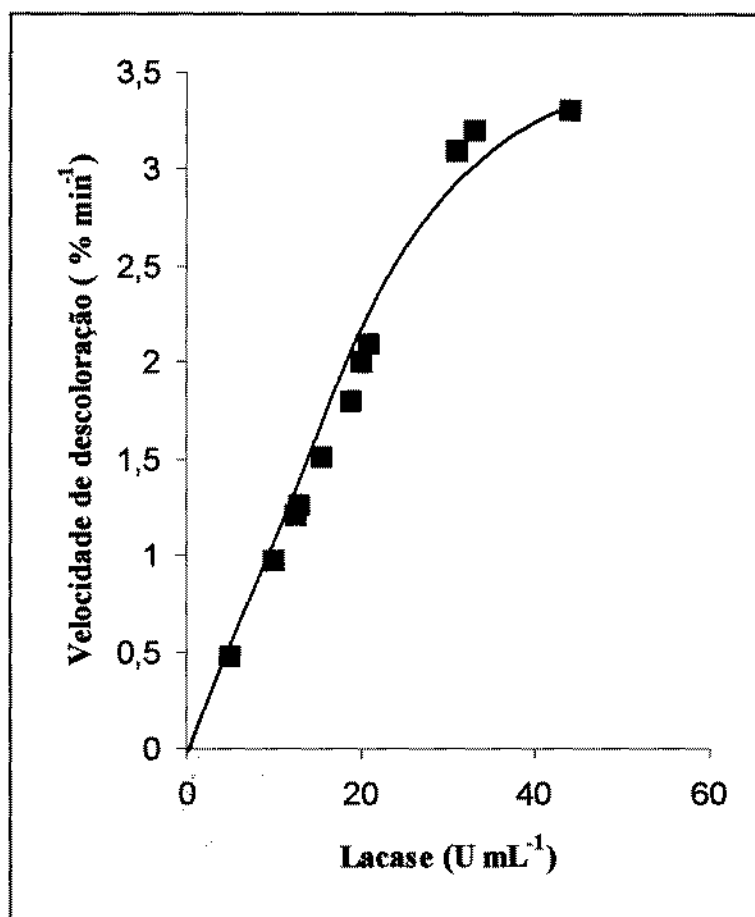


Figura 3-6 - Efeito da concentração de lacase na velocidade de descoloração do corante IV

### 3.3.3. Oxidação dos corantes disazo pela lacase

As soluções de corantes disazo foram incubadas com 15 U mL<sup>-1</sup> de enzima durante uma hora, a 60°C, com agitação. Em paralelo, fizeram-se ensaios em que se adicionou



também mediador conjuntamente com a lacase, nas concentrações mais favoráveis à descoloração determinadas experimentalmente, 5,7 mM de AV e 11,0 mM de HBT (ver 4.3.2.1.).

Os resultados de descoloração obtidos para os primeiros 15 minutos de reacção (Tabela 3-1), indicam que os corantes I, II, III e V não são substratos da lacase.

**Tabela 3-1 - Descoloração (%) do corante após 15 minutos de reacção com lacase**

Corante	$\lambda_{\max}$ (nm)	Lacase (15 UmL <sup>-1</sup> )	Lacase (15 UmL <sup>-1</sup> ) + AV (5,7 mM)	Lacase (15 UmL <sup>-1</sup> ) + HBT (11,0 mM)
<i>I</i>	410	0,0	Nd	0,0
<i>II</i>	410	0,0	Nd	0,0
<i>III</i>	410	0,0	Nd	0,0
<i>IV</i>	510	23,2	79,4	23,1
<i>V</i>	460	0,0	24,1	0,0
<i>VI</i>	500	55,9	70,1	69,9
<i>VII</i>	496	62,1	74,1	73,9

Nd- não foi determinado por se verificarem precipitações

Os corantes I-III não apresentaram descoloração quando ensaiados no sistema etanol/tampão de fosfato 50 mM (pH 5,5) e precipitavam no sistema DMF/tampão de fosfato 50 mM (pH 5,5), levando a que não fosse possível concluir acerca da sua degradação por acção da lacase nestas condições experimentais.

O corante V não é descorado pela lacase independentemente da concentração de enzima usado a menos que em presença de ácido violúrico como mediador.

Dos sete corantes estudados, apenas os corantes IV, VI e VII são oxidados pela lacase sozinha.

Os corantes VI e VII perdem rapidamente a cor, medida ao respectivo comprimento de onda máximo. A Figura 3-7 (corante VI) e a Figura 3-8 (corante VII) ilustram que a descoloração ocorre sobretudo nos primeiros 10 minutos, com maior velocidade nos 6 minutos iniciais.

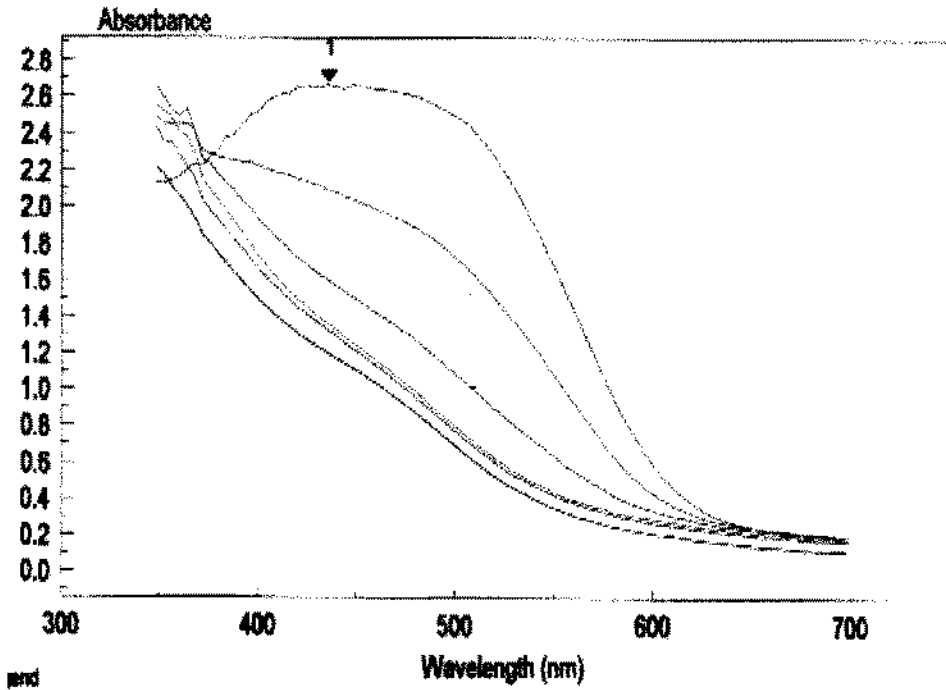
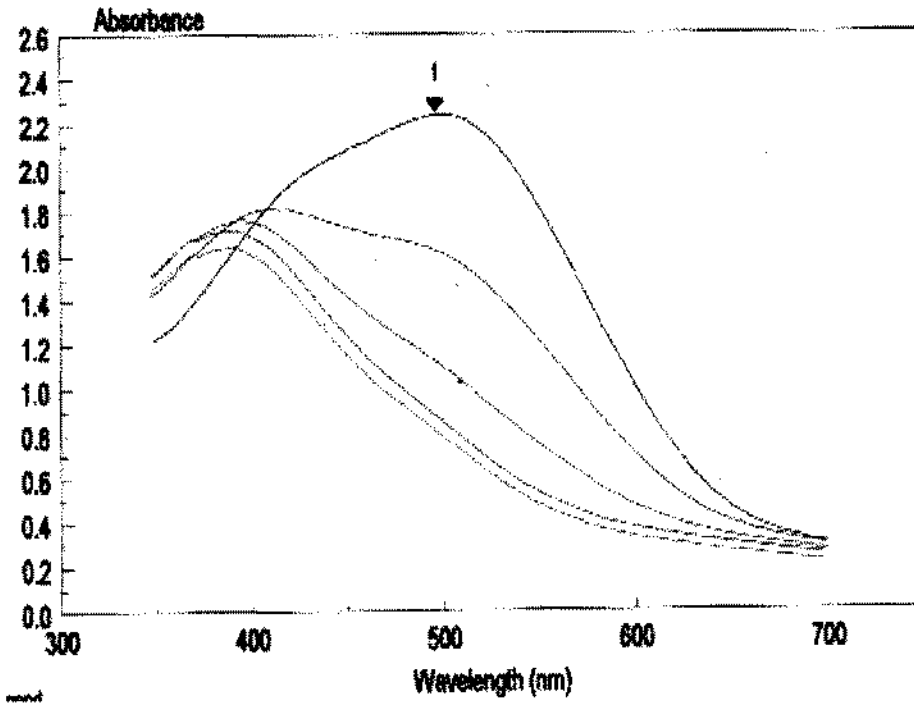


Figura 3-7 - Espectros de absorção do corante VI depois do tratamento com  $15 \text{ U mL}^{-1}$  lacase.

(O intervalo de tempo entre os varrimentos é de 3 minutos).



**Figura 3-8** – Espectros de absorção do corante VII depois do tratamento com  $15 \text{ UmL}^{-1}$  lacase.

(O intervalo de tempo entre os varrimentos é de 3 minutos).

#### 3.3.4. Efeito da presença e concentração de mediadores (HBT e AV) na descoloração dos corantes disazo pela lacase

Os dois mediadores estudados comportaram-se de maneira diferente na descoloração dos corantes disazo. O HBT, nas condições experimentais aplicadas, não apresentou qualquer efeito na oxidação do corantes IV enquanto que o ácido violúrico acelerou a reacção. O corante V, que não funcionou como substrato da lacase sozinha, passou a ser oxidado na presença deste segundo mediador.

A Figura 3-9 apresenta o comportamento do corante IV em presença do AV. O mediador acelerou a reacção de descoloração do corante, atingindo nos primeiros 12 minutos de reacção, a completa remoção de constituinte ao comprimento de absorção máxima (510 nm).

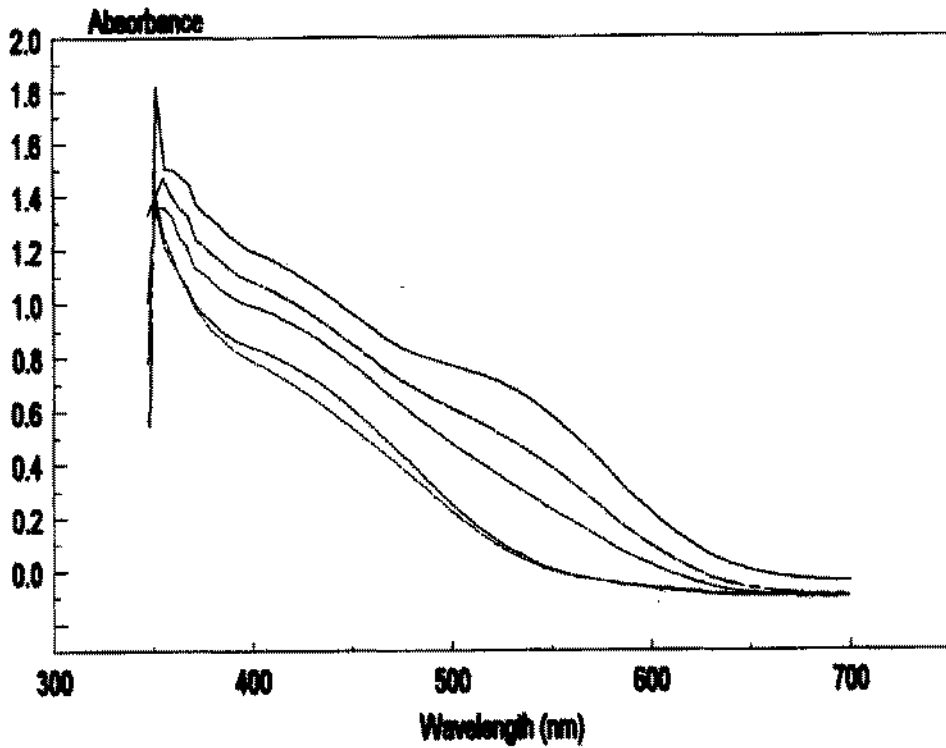


Figura 3-9 - Espectros de absorção do corante IV depois do tratamento com lacase e AV.

(O intervalo de tempo entre varrimentos é de 3 minutos).

### 3.3.5. Parâmetros cinéticos das reacções de oxidação de corantes disazo modelo com lacase

Os parâmetros cinéticos referentes à descoloração dos corantes substratos da lacase, sem necessidade da presença do mediador, foram calculados de acordo com a equação de Michaelis-Menten, assumindo tratarem-se de reacções de pseudo-primeira ordem.

Na Tabela 3-2 apresentam-se os  $K_m^{app}$  e  $V_{max}$  para os corantes IV, VI e VII estudados.

**Tabela 3-2** - Parâmetros cinéticos para a oxidação dos corantes IV, VI e VII

Corante	$K_m^{app}$ (mM)	$V_{max}$ (mM min <sup>-1</sup> )
IV	0,50	2,76
VI	0,60	4,05
VII	1,42	8,05

### 3.4. Discussão

Com o objectivo de estudar a influência dos substituintes nos anéis fenólicos dos corantes disazo na sua descoloração pela lacase, prepararam-se sete corantes com pequenas variações estruturais, mantendo em comum a estrutura disazo e o grupo hidroxilo em posição *para* em relação à ligação azo.

As estruturas destes compostos foram confirmadas por espectroscopia de absorção no infravermelho (FTIR Bomem, MB Series, fazendo 21scans, usando uma resolução de 4 cm<sup>-1</sup> e correcção de linha de base) e RMN. Nos espectros de infravermelho dos corantes (Tabela 3-3) observa-se, em todos eles, uma banda larga entre 3406 e 3463 cm<sup>-1</sup> devida à vibração de alongamento do grupo OH.

Para os corantes III, IV e V é visível um sinal que corresponde à vibração de alongamento do grupo carbonilo, que surge a 1658 cm<sup>-1</sup> para o corante IV.

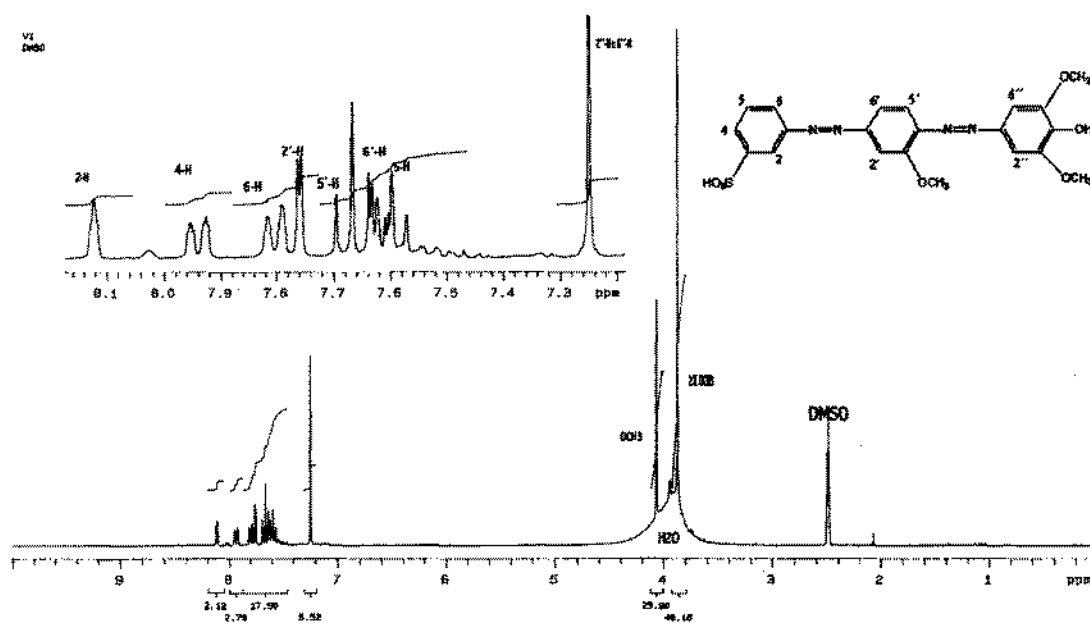
Nos corantes com grupos metoxilo é visível a banda, quase sempre intensa, característica da vibração de alongamento da ligação C-O, que para o corante V aparece a 1204 cm<sup>-1</sup>. No entanto, nesta região, sobrepõem-se as bandas de absorção devidas às vibrações de alongamento dos grupos sulfónicos.

Tabela 3-3 – Dados de absorção de radiação Infravermelha para os corantes I-VII

Corante	$\bar{\nu}_{\max}$ (cm <sup>-1</sup> ); pastilha de KBr (1%)
I	3437 (larga), 2923, 1598, 1235, 1100, 853, 765, 684, 550
II	3406 (larga), 2921, 1585, 1529, 1466, 1441, 1417, 1378, 1261, 1086, 851, 766, 684, 552
III	3430 (larga), 1636, 1488, 1461, 1429, 1385, 854, 836, 761, 682, 576
IV	3446 (muito larga), 2943, 2871, 1658, 1613, 1484, 1444, 1296, 1214, 1186, 1039, 994, 760, 697, 619
V	3449 (larga), 2957, 2893, 1657-1600 (larga), 1483, 1401, 1341, 1204 (forte), 1107, 1036, 994, 795, 761, 713, 625, 1618
VI	3436 (larga), 2936, 2843, 1665, 1596, 1544, 1527, 1372, 1329, 1259, 1218, 1116, 1084, 1035, 967, 712, 618
VII	3463 (larga), 2915, 2853, 1613, 1591, 1521, 1494, 1369, 1325, 1270, 1196, 1141, 1116, 1043, 973, 792, 779, 759, 672, 578

Foi ainda possível obter os espectros de RMN de próton dos corantes, em DMSO. Desta maneira confirmou-se as estruturas destes corantes.

Na Figura 3-10 apresenta-se o espectro de RMN de <sup>1</sup>H para o corante VI. Os sinais foram atribuídos com base na técnica da dupla ressonância. O sinal devido ao OH, que não é visível, poderá aparecer com o sinal largo da água, que se sobrepõe aos sinais dos grupos metoxilo.



**Figura 3-10** - Espectro de RMN de <sup>1</sup>H (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) do corante VI

Deste conjunto de compostos, os corantes I, II, III não se revelaram substratos da lacase, independentemente da presença ou ausência dos mediadores (HBT e AV). Verificou-se, contudo, a descoloração rápida dos corantes IV, VI e VII com lacase. De facto, só os corantes solúveis em água, que incluíam na sua estrutura grupos sulfónicos, apresentaram perda de cor por oxidação com a enzima.

O corante V, que não se apresentou como substrato da lacase, sofreu oxidação quando em presença de enzima e AV como mediador.

A degradação de corantes azo com fungos tem vindo a ser estudada por vários autores nos últimos anos, nomeadamente com *Phanaerochaete chrysosporium* (Cripps et al., 1990; Praszczynsky et al. 1991; 1991a; Olikka et al, 1993) e a descoloração e mineralização parcial destes compostos foi demonstrada (Praszczynsky et al. 1992; Spadaro et al., 1992).

Praszczynsky e colaboradores (1992) referiram que o ácido sulfanílico e corantes do tipo azo, com anéis fenólicos e de naftaleno, eram degradados pelos fungos *P. cryosporium* e *S. chromofuscus*, assumindo que a posição do grupo hidroxilo em relação à ligação azo era relevante para a sua degradação pelos fungos.

Outros fungos, como *T. versicolor* e *B. adusta* mostraram eficiência na degradação de alguns corantes comerciais (Heinfling, 1997). Mas, todos estes estudos têm sido feitos usando extractos brutos de fungos ou culturas lenhínicas e o envolvimento de peroxidases tem sido sugerido como interveniente nestes processos degradativos (Spadaro et al., 1992). Estes investigadores assumiram que os corantes azo sofriam clivagem por acção das peroxidases fúngicas, formando quinonas e derivados do diazeno com ruptura da ligação azo e formação de azoto. Desta forma, prevenia-se a formação das aminas aromáticas carcinogénicas.

No sentido de avaliar a importância da lacase na degradação de corantes azo, Chivukula e Renganathan (1995) examinaram a capacidade oxidativa de lacase de *P. oryzae* em derivados do 4-(4'-sulfonilazo)fenol. Verificaram que os substratos de lacase eram os derivados cujo anel fenólico era rico em electrões, resultado da contribuição de grupos dadores de electrões do tipo metilo e metoxilo. Assim, os derivados do 4-(4'-sulfonilazo)fenol, com grupos 2-metilo, 2-metoxilo, 2,6-dimetilo e 2,6-dimetoxilo eram oxidados pela lacase enquanto os que continham substituintes em 3,5 não sofriam qualquer alteração.

Se analisarmos os nossos resultados, verificamos que razões estruturais semelhantes às referidas por Chivukula e Renganathan (1995) poderão explicar a maior facilidade de degradação dos compostos estudados pela lacase. O corantes VI e VII, com grupos metoxilo em 2 e 6 no fenol, são degradados muito rapidamente, enquanto o corante V com o substituinte 2-carboxilo precisa da acção mediadora do AV para ser oxidado. No entanto, o resto da molécula também é importante, como atestam os resultados obtidos com os corantes IV e V comparativamente.

No caso do corante VII, temos na molécula dois grupos hidroxilo que poderão eventualmente funcionar como grupos alvo para a enzima. Há referência na literatura a



corantes disazo degradados por fungos com grupos hidroxilicos em posição *orto* no naftaleno em relação à ligação azo (Paszczynski et al., 1992).

Comparando os parâmetros cinéticos para a oxidação dos corantes IV, VI e VII, concluímos que a afinidade da enzima diminui do corante IV para o VI e ainda mais para o VII ( $K_m^{app}$  é 0,50 mM, 0,60 mM e 1,42 mM respectivamente) enquanto a  $V_{max}$  aumenta no sentido inverso, sendo  $2,76 \text{ mMmin}^{-1}$  para o corante IV,  $4,05 \text{ mMmin}^{-1}$  para o corante VI e  $8,05 \text{ mMmin}^{-1}$  para o corante VII. Estes valores não podem ser comparados com os da literatura, não só porque estes corantes especificamente nunca foram estudados mas também porque a maioria dos estudos tem sido feita com sobrenadantes de culturas de fungos.

Chivukula e Renganathan (1995) usaram corantes monoazo, quimicamente menos complexos que os nossos e o maior valor de velocidade de oxidação que obtiveram foi  $703 \text{ nMmin}^{-1}\text{mg}^{-1}$ . É importante referir que estes investigadores usaram lacase parcialmente purificada, podendo outras enzimas como a lenhina peroxidase ou a tirosinase estar presentes.

Os mediadores redox, descritos pela primeira vez por Bourbonnais e Paice (1990), permitem à lacase a oxidação de compostos não fenólicos, estendendo a amplitude de substratos em que a enzima catalisa reacções de oxidação.

Para melhor esclarecer o mecanismo pelo qual actuam estes compostos redox com a lacase, Xu e colaboradores (2000), analisaram as interacções destes compostos com o N-OH na sua estrutura em relação a algumas lacases. Observaram que a velocidade da reacção de oxidação dos mediadores pela lacase dependia do potencial redox destes compostos e que as reacções ocorriam segundo um mecanismo similar ao referido para os fenóis, as fenotiazinas e as fenoxazinas.

O AV acelerou a reacção de oxidação dos corantes IV, VI e VII e permitiu que houvesse oxidação do corante V.

Diferenças de potencial redox e estabilidade podem estar na origem da diferença de resultados obtidos com AV e HBT nas reacções de oxidação dos corantes disazo. Contudo, a proveniência da lacase também condiciona a reacção oxidativa em que a

enzima e mediador estão envolvidos (Li et al.,1999). Este facto vai definir a necessidade ou não de mediador bem como a sua natureza para que a degradação enzimática de determinado composto possa ocorrer.

Os resultados experimentais subjacentes deste trabalho revelaram que apenas os corantes solúveis em água podiam funcionar como substratos da lacase, directamente ou na presença do mediador. É desde há muito conhecido o facto deste tipo de compostos estarem em solução aquosa numa situação de equilíbrio entre duas formas: a forma azo e a forma hidrazona (Figura 3-11). Ainda que num sistema aquoso a forma hidrazona predomine, à medida que a forma azo é consumida na reacção, o equilíbrio desloca-se no sentido da formação da forma azo .

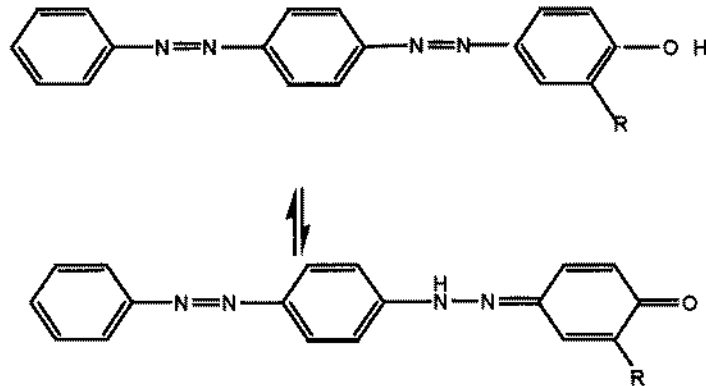


Figura 3-11 - Equilíbrio entre a forma azo e a forma hidrazona

Assim, podemos assumir que a interacção com o centro activo da enzima ocorre através de um grupo fenólico, conforme descrito na literatura.

Por analogia com o mecanismo proposto por Chivukula e Renganathan, poderíamos pôr a hipótese de que com os corantes diazo, ocorresse um mecanismo semelhante (Figura 3-12), resultando na formação de um composto *mono-azo* e moléculas menores por ruptura de uma das ligações azo da molécula.

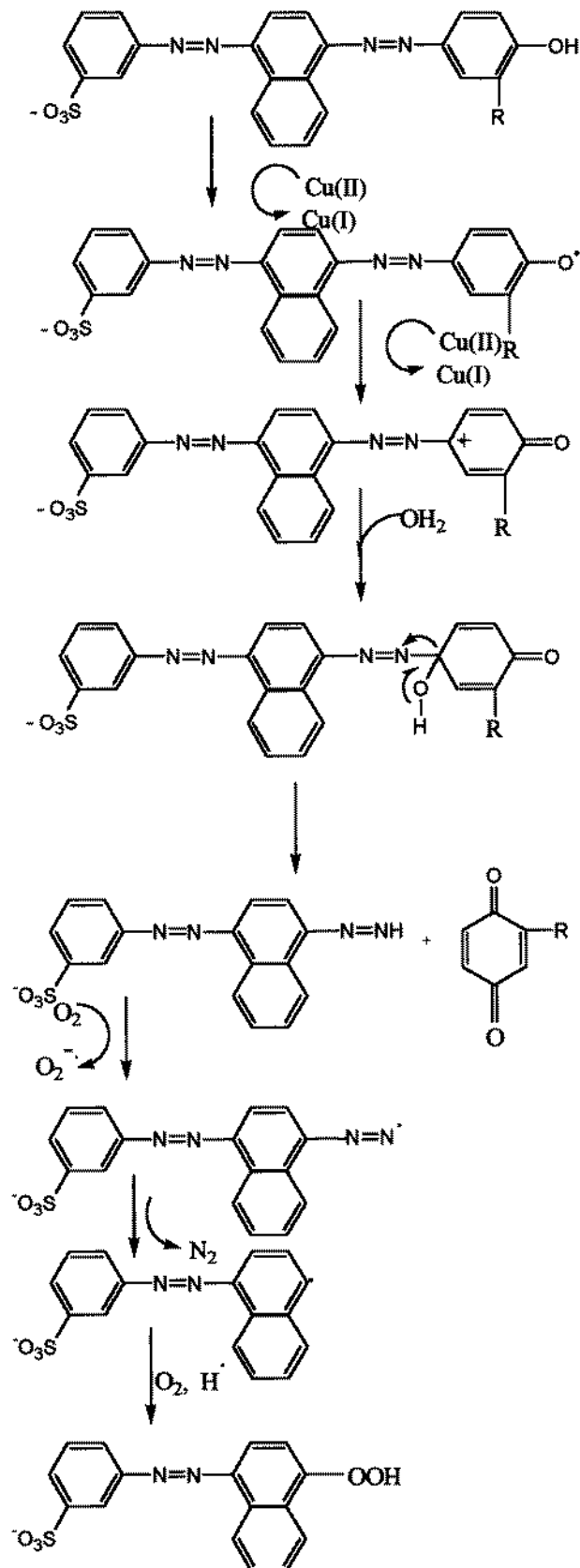


Figura 3-12 - Proposta de mecanismo para a degradação do corante disazo pela lacase

Estes autores reforçam a importância no mecanismo do grupo sulfônico no peróxido formado, conferindo-lhe uma estabilidade anormal em relação a outros peróxidos. Este facto teria que ser analisado mas, a ter comportamento semelhante, os grupos sulfônicos na molécula tornar-se-iam importantes no mecanismo de reacção. Assim, assume a maior importância a solubilidade destes compostos em solução aquosa e por consequência a presença dos grupos sulfônicos na molécula.

O presente estudo deixa em aberto todo um conjunto de hipóteses a ser analisadas detalhadamente em trabalhos futuros. O efeito dos grupos sulfônicos ou, por outras palavras, a solubilidade destes diazenos tem que ser cuidadosamente analisada. O mecanismo destes processos precisa de ser confirmado com o isolamento e identificação das estruturas dos compostos resultantes das reacção de oxidação dos *disazos*.

***Descoloração de um corante antraquinônico  
por uma formulação com laccase***



#### **4. Descoloração de um corante antraquinónico por uma formulação com lacase**

##### **4.1. Introdução**

O RBBR é um corante industrialmente importante, que é usado frequentemente como material de partida na produção de outros corantes poliméricos. É um derivado do antraceno e representa uma classe importante de poluentes orgânicos tóxicos e recalcitrantes (Banat et al., 1996).

A informação acerca da degradação do RBBR pela lacase é escassa. Num dos poucos estudos sobre este assunto, Schliephake e Lonergan (1996) constataram a descoloração do RBBR num bioreactor com *P. cinnabarinus*. O corante foi adicionado no terceiro dia de fermentação mas foram precisas mais de 48 horas para obter 75% da descoloração do corante na cultura fúngica. Quando usaram lacase purificada de culturas do fungo com diferentes idades, obtiveram os melhores resultados com lacase purificada de culturas de 4 dias e precisaram de cerca de 3,3 horas para obter cerca de 50% de descoloração do RBBR.

Neste trabalho pretendeu estudar-se os factores que influenciavam a actividade da lacase e determinar as melhores condições que permitiam descolorar rapidamente o corante. Com este propósito foi usada uma formulação comercial de lacase, DeniLite™, que é utilizada na indústria têxtil no acabamento dos “denim” tingidos com índigo. Os resultados obtidos com esta formulação foram então comparados com os que se obtiveram só com lacase. Esta lacase pura foi obtida aplicando um processo de extracção seguido de filtração por gel e diálise, que permitiu separar a enzima dos demais componentes da formulação comercial. Excluindo uma ligeira perda de estabilidade térmica, a lacase pura apresentou características semelhantes às da preparação comercial de origem, no que respeita a perfis de temperatura e pH.

Naturalmente, que a relevância de cada um dos componentes da formulação comercial foi analisado, estudando-se ainda a influência de mediadores redox no processo de biotransformação.

## 4.2. *Materiais e métodos*

### 4.2.1. *Químicos*

HBT (*N*-hidroxibenzotriazole), ABTS (ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolína-6-sulfónico)), AV (ácido violúrico), promazina (10 (3[*N,N*-dimetilamino]propil)fenotiazina) e surfactantes (Triton X-100, Tween 20 e Brij 35) foram comprados à Sigma (St. Lois, USA)

RBBR (C.I. Remazol Brilliant Blue R ou C.I. Reactive Blue 19 cuja fórmula estrutural aparece referida com o n.º 61200 no Colour Index) foi gentilmente oferecido pela DyeStar (Portugal).

Todos os produtos químicos foram usados, em pelo menos, grau analítico.

### 4.2.2. *Formulação comercial com lacase*

A formulação de lacase, DeniLite™, foi gentilmente cedida pela Novo Nordisk (Dinamarca).

Este produto contém lacase, um detergente não iónico, tampão de fosfato e ácido fenotiazina-10-propiónico como mediador redox (informação fornecida por Dr. Per Hans, Director Técnico da Novo Nordisk, em comunicação pessoal). A lacase (EC 1.10.3.2) é produzida por fermentação de espécies de *Aspergillus* geneticamente modificados (Novo Nordisk Product Sheet B 917 and Application Sheet B 919).

A preparação comercial de lacase não é solúvel em água.

#### *4.2.3. Purificação da lacase*

Fizeram-se ensaios preliminares com o objectivo de separar a enzima dos demais componentes da suspensão aquosa de DeniLite™. Com base nos resultados obtidos, usou-se um processo de extracção com tampão de fosfato 50 mM, pH 5,5, contendo 0,1 M de NaCl. Após 24 h de repouso a 5°C, isolou-se a fase menos densa, que continha mais de 90 % da actividade enzimática total determinada usando ABTS como substrato. Esta fracção foi então sujeita a um processo de filtração por gel: 2 mL de fracção foram eluídos numa coluna de Superdex 75 (XK16, Prep. Grad, Pharmacia). A coluna foi previamente equilibrada com tampão de fosfato 50 mM, pH 5,5. A lacase foi eluída usando tampão fosfatos 50 mM, pH 5,5, a 5°C e com um fluxo de 1mL min<sup>-1</sup>. Recolheram-se fracções (5mL) e determinou-se a actividade da lacase em cada fracção. Juntaram-se as fracções que apresentavam actividade enzimática e procedeu-se à purificação e reconcentração da enzima através de um processo de diálise (membrana de celulose, Sigma) contra tampão de fosfato, pH 5,5. A lacase assim obtida passará a ser referida no texto simplesmente como lacase.

A electroforese realizada em condições nativas (PAGE 10%) mostrou que tanto a preparação de lacase comercial como da lacase migram como uma banda única.

#### *4.2.4. Determinação da actividade da lacase*

A actividade da lacase foi determinada espectrofotometricamente, medindo o aumento da absorvância a 420nm, de uma solução de ABTS 0,5 mM, em tampão de fosfato 50 mM, (pH 4,5) a 30° C (Ander & Messner, 1998). Uma IU (Unidade Internacional) de actividade da lacase foi calculada como a formação de uma  $\mu$ mole de ABTS oxidada por minuto, usando um coeficiente de extinção molar de 43,2 mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>.



#### *4.2.5. Estabilidade térmica da lacase*

As misturas reacionais de formulação comercial de lacase (CLF) ou de lacase em tampão de fosfato 50 mM, a pH 5,5 foram pré-incubada a diferentes temperaturas (30°, 50° e 60° C) durante 100 minutos. Retiraram-se amostras (0,5 mL) ao longo do tempo (10 em 10 minutos) e avaliou-se a actividade enzimática conforme ensaio padrão descrito em 4.2.4. A actividade residual foi determinada em relação ao máximo de actividade determinado no instante zero.

#### *4.2.6. Efeito da temperatura na actividade da lacase*

A actividade da lacase e da CLF foi determinada conforme ensaio padrão descrito em 4.2.4 mas usando diferentes temperaturas de reacção (40°, 50°, 55°, 60°, 65°, 70° e 80°C).

#### *4.2.7. Efeito do pH na actividade da lacase*

As misturas reacionais contendo laccase ou CLF e tampão de fosfato-citrato foram incubadas durante 15 minutos a diferentes pH (entre 4,0 e 7,0) e a actividade da lacase em relação ao ABTS foi determinada de seguida nas condições padrão, conforme descrito em 4.2.4 .

#### *4.2.8. Oxidação do RBBR pela lacase*

A mistura reaccional para medir a descoloração enzimática do RBBR consiste numa solução aquosa de corante (0,02 gL<sup>-1</sup>), 0,3 mL de solução de enzima (10 U mL<sup>-1</sup>) e tampão de fosfato 50 mM, pH 5,5 num volume total de 25 mL.

Quando apropriado, foi adicionado o mediador, promazina, HBT ou AV, em concentrações que serão especificadas no texto. O tempo de incubação das reacções, que será referido caso a caso, variou entre 12 minutos e 2 horas a 60°C. Todas as reacções foram sujeitas a agitação (200 rpm).

Imediatamente após a adição de 0,3 mL da solução da enzima, a curva de varrimento da mistura (absorvância em função do comprimento de onda), foi efectuada e analisados os resultados entre 350 e 700 nm, em intervalos de tempo que serão especificados no texto, usando um espectrofotómetro Unicam UV2. A monitorização da oxidação do corante foi feita pela diminuição da absorvância a 590 nm, comprimento de onda de absorção máxima para o RBBR.

Nos ensaios destinados a avaliar o efeito do detergente não iónico na oxidação do RBBR com lacase, adicionou-se à mistura reaccional acima descrita 0,002 a 0,010 gL<sup>-1</sup> de Triton X-100, 0,002 a 0,010 gL<sup>-1</sup> de Brij 35 e 0,001 a 0,004 gL<sup>-1</sup> de Tween 20. Mantiveram-se as demais condições de reacção usadas nos ensaios de descoloração do corante.

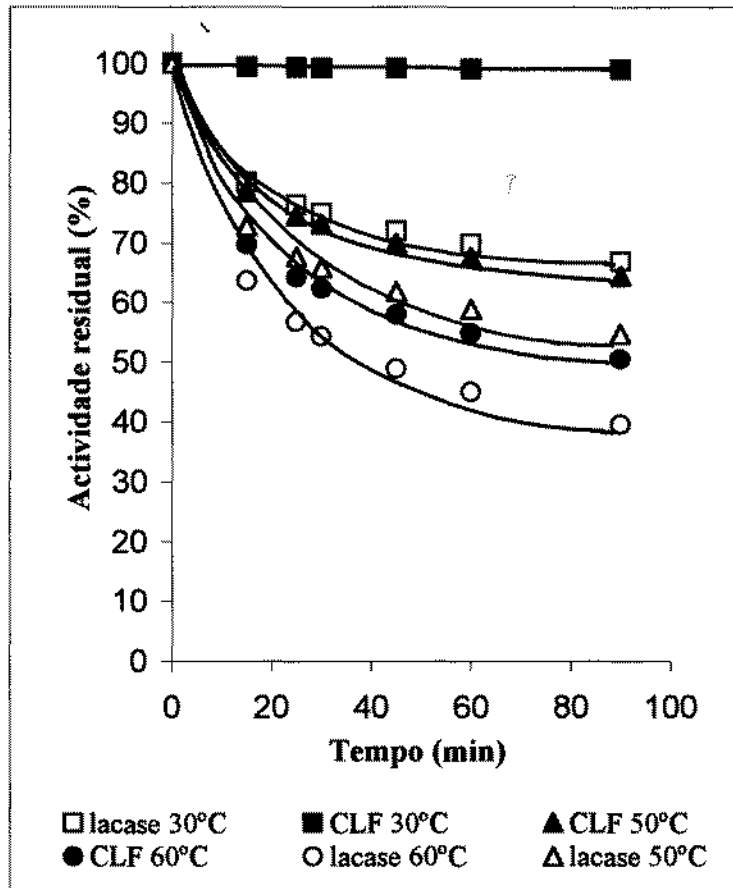
Para a determinação das constantes cinéticas incubou-se a CLF ou a lacase com diferentes concentrações de RBBR em tampão de fosfato 50 mM, pH 5,5, num volume total de 25 mL.

Todos os ensaios foram feitos em triplicado e realizaram-se paralelamente ensaios controlo, sem enzima, sob idênticas condições experimentais.

### *4.3. Resultados*

#### *4.3.1. Estabilidade térmica da lacase e efeito do pH*

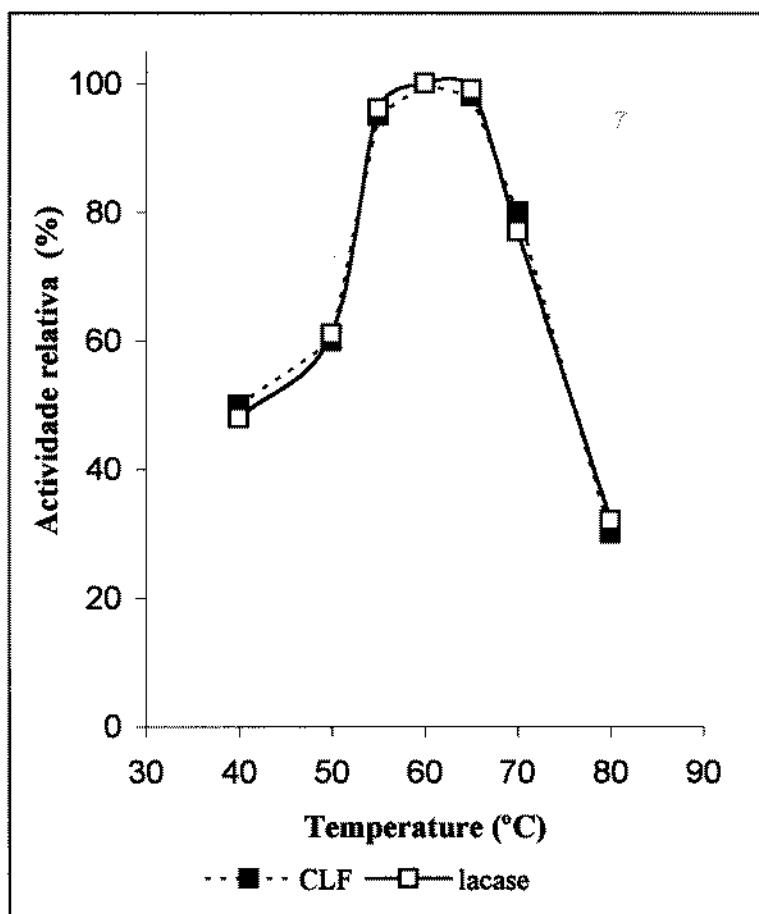
A estabilidade térmica da CLF e da lacase foram determinadas em função do tempo, usando tampão de fosfato 50 mM, a pH 5,5, a temperaturas de 30°, 50° e 60°C.



**Figura 4-1** - Estabilidade da formulação comercial de lacase (CLF) e da lacase em função do tempo

Os resultados apresentados na Figura 4-1 mostram que a preparação comercial a 30°C é muito estável, não se observando qualquer perda de actividade ao longo do tempo de ensaio. Pelo contrário, a lacase perde cerca de 30% da sua actividade inicial durante uma hora a 30°C. A temperaturas mais elevadas, 50° e 60°C, a diferença entre as duas preparações de lacase é menos acentuada.

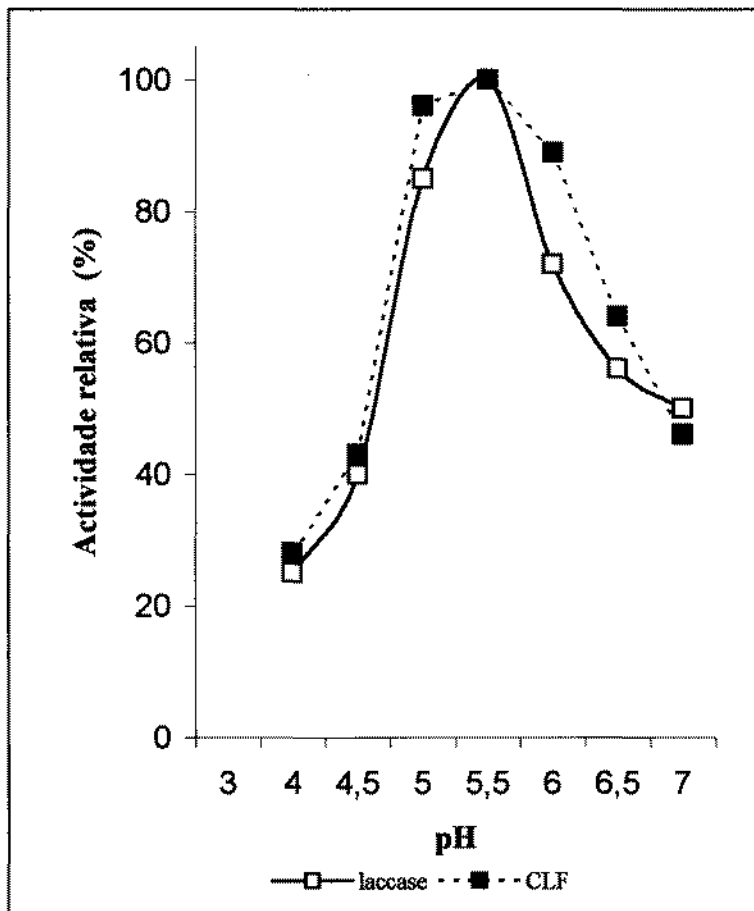
A perda de actividade é particularmente rápida nos primeiros 20 minutos de incubação, independentemente da preparação considerada.



**Figura 4-2** - Efeito da temperatura na actividade da CLF e lacase

A influência da temperatura na actividade da lacase e CLF é apresentada na Figura 4-2. Observou-se um valor máximo de actividade a cerca de 60 °C, quer para a lacase quer para a preparação comercial.

A Figura 4-3 apresenta a actividade relativa da CLF e da lacase em função do pH, após incubação das amostras durante 15 minutos, entre pH 4,0 e 7,0 em sistema tampão de fosfato-citrato, seguido da determinação da actividade da lacase usando o ensaio padrão (*Materiais e métodos, 4.2.4*). Observou-se um máximo de actividade para pH 5,5. As curvas de variação da actividade em função do pH para a lacase e a preparação apresentaram comportamento semelhante.

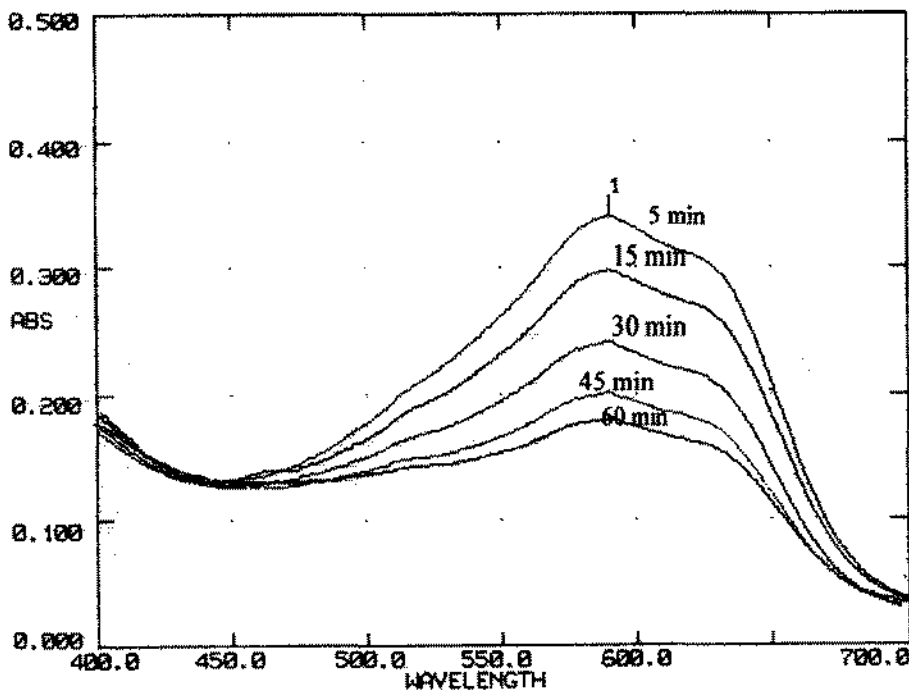


**Figura 4-3** - Efeito da pré-incubação a diferentes pH na actividade da CLF e da lacase

Com base nestes resultados definiu-se que as reacções enzimáticas subsequentemente realizadas neste trabalho com lacase o seriam a pH 5,5 e 60°C.

#### *4.3.2. Descoloração do RBBR*

Quando se fez reagir o RBBR com a preparação comercial, CLF, contendo 10 U $\text{mL}^{-1}$  de lacase verificou-se que havia uma diminuição da absorvância a 590 nm ao longo do tempo associada à oxidação do corante. Após 30 minutos de reacção, observou-se uma descoloração de 48,0%, sendo de 72,0% após uma hora (Figura 4-4).



**Figura 4-4** - Espectros de absorção do do RBBR em presença de CLF.

Para o comprimento de onda de absorção máxima, a descoloração completa registou-se após 2 h de reacção, usando um pH de 5,5 e uma temperatura de reacção de 60°C.

Face a estes resultados, em que se obteve a rápida descoloração do corante, as experiências seguintes foram definidas no sentido de estudar o efeito dos diferentes componentes da preparação comercial na remoção de cor do RBBR.

#### *4.3.2.1. Concentração de lacase em presença e ausência de mediador*

Estudou-se o efeito da concentração de enzima na descoloração do corante até 25 U mL<sup>-1</sup> usando lacase, CLF, e lacase adicionada de mediador (AV e HBT).

Não se observou qualquer descoloração quando se usou lacase sozinha. O espectro de absorção no UV-VIS permaneceu inalterado ao longo do tempo, independentemente da concentração de enzima usada ou condições reacionais, pH e temperatura.

A preparação comercial de lacase que contém mediador e detergente não iônico mostrou-se muito eficaz na descoloração do RBBR.

Na impossibilidade de dispor do mediador incluído na preparação comercial, ácido fenotiazina-10-propiónico, escolheram-se três mediadores disponíveis no mercado para estudo.

Atendendo à analogia da estrutura da promazina, (10-(3-[dimetilamino]propil) fenotiazina) com o ácido fenotiazina-10-propiónico, avaliaram-se as potencialidades deste composto como mediador na reacção de descoloração do RBBR. Infelizmente não se observou qualquer descoloração na solução, provavelmente devido à ausência do grupo N-OH na estrutura do composto.

O HBT foi escolhido segundo um critério de eficiência (conforme referido na literatura e apresentado na *Revisão bibliográfica*).

Os dados disponíveis na literatura relativos ao AV como mediador são escassos tornando interessante o seu estudo no contexto deste trabalho.

A Figura 4-5 apresenta a influência da concentração da enzima na descoloração do corante em presença de ácido fenotiazina-10-propiónico (CLF), HBT e AV.

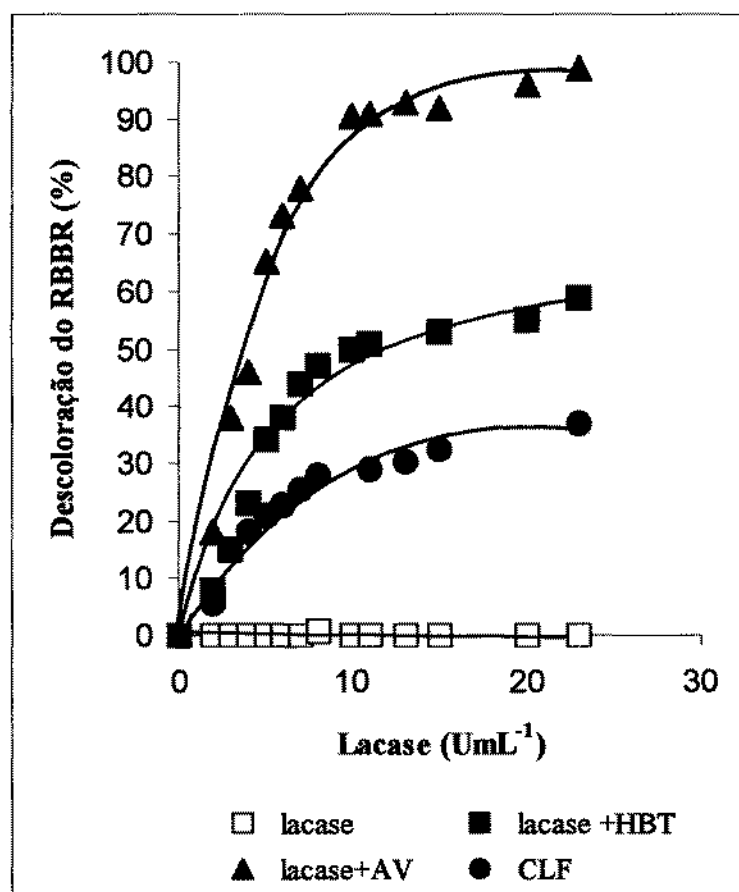


Figura 4-5 - Efeito da concentração de lacase na descoloração do RBBR

Usaram-se concentrações de 11,0 mM de HBT e 5,7 mM de AV, as concentrações que se haviam determinado mais eficazes segundo ensaios prévios e apresentados em 4.3.2.2. O ácido violúrico (5,7 mM) foi mais eficaz que os outros mediadores, tendo ocorrido mais de 90% de descoloração em 20 minutos com 10 UmL<sup>-1</sup> de lacase (Figura 4-6)



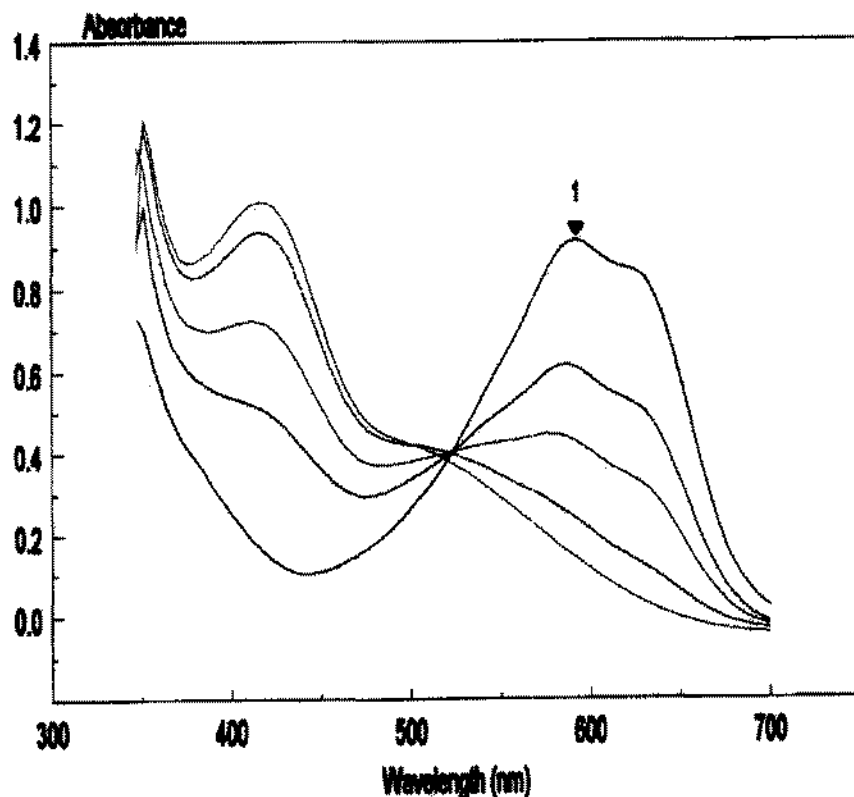


Figura 4-6 - Espectros de absorção do RBBR em presença de lacase e AV 5,7 mM.  
(O intervalo de tempo entre varrimentos é de 3 minutos).

A enzima em presença do *N*-hidroxibenzotriazole (HBT, 11,0 mM) descora o RBBR mais lentamente e em menor extensão que em presença do AV. Por outro lado, concentrações mais altas de mediador foram inibitórias, eventualmente devido a inibição da lacase pelos radicais de HBT em excesso tal como referido por Li e colaboradores (1999).

A preparação comercial, contendo como mediador ácido fenotiazina-10-propiónico, foi a menos eficaz: ocorreu apenas 30% de descoloração em 20 minutos de reacção, não se verificando aumento significativo na descoloração por aumento da concentração da enzima.

#### 4.3.2.2. Concentração de mediador

Estudou-se ainda o efeito da concentração de HBT (0 a 27,0 mM) (Figura 4-7) e de AV (0 a 57,0 mM) (Figura 4-8) conjuntamente com a lacase (10 U mL<sup>-1</sup>). Foram efectuados ensaios de controlo sem corante que permitiram comprovar que, no intervalo de concentrações usado, o HBT ou o AV não interferem no ensaio com ABTS.

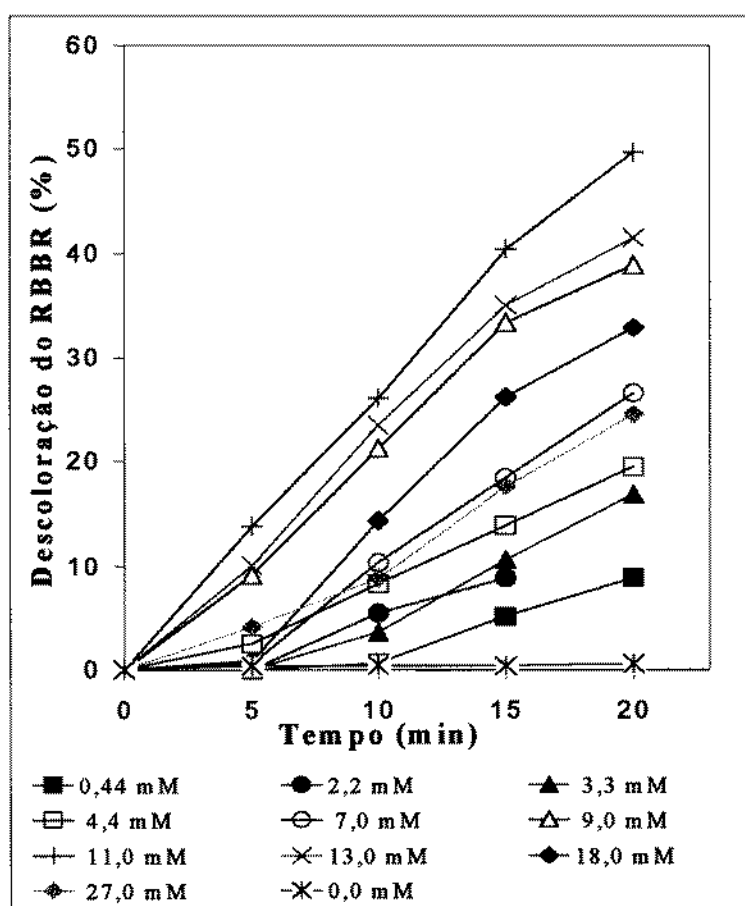


Figura 4-7- Descoloração do RBBR usando lacase e diferentes concentrações de HBT

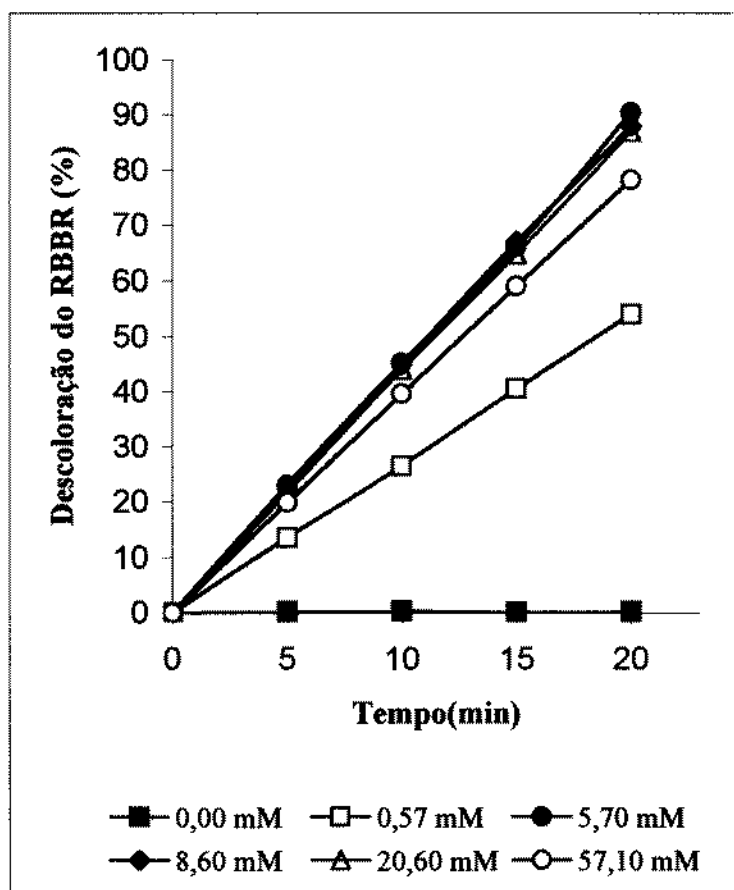
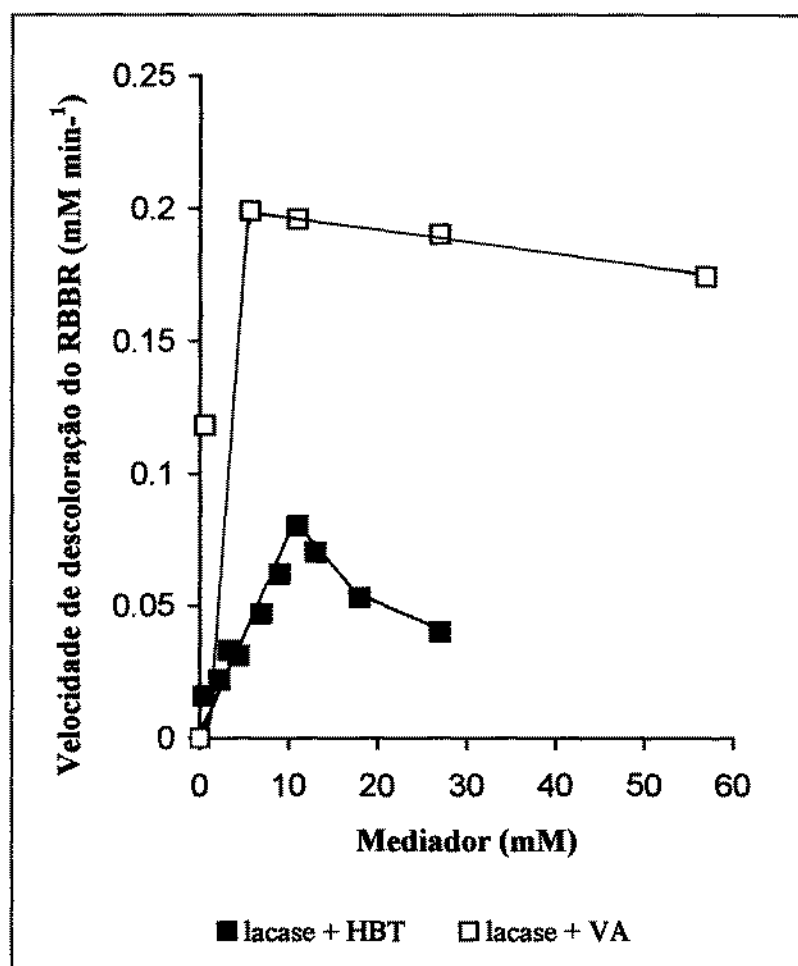


Figura 4-8- Descoloração do RBBR usando lacase e diferentes concentrações de AV

Nas figuras 4-7 e 4-8 verifica-se que a descoloração ocorre mais rapidamente e em maior extensão com AV que quando o HBT é usado como mediador da reacção. Além disso, concentrações acima de 11,0 mM de HBT revelaram-se inibitórias. Pelo contrário, para concentrações de AV de 57,0 mM há apenas uma ligeira inibição (uma diminuição de cerca de 10% no valor máximo de descoloração).

A velocidade de descoloração em função da concentração de HBT e AV é apresentado na Figura 4-9.



**Figura 4-9** -Variação da velocidade de descoloração do RBBR com a concentração de AV e HBT

A oxidação do RBBR é dependente da concentração de mediador até determinado valor, aproximadamente 11 mM para o HBT e 5,7 mM para o AV. Para esta concentração de AV obteve-se uma velocidade de descoloração duas vezes superior do que com o dobro da concentração de HBT (11,0 mM).

### 4.3.3. Detergentes

Para avaliar a influência na descoloração do detergente presente na preparação comercial estudou-se o efeito de três detergentes não iónicos, de características químicas diferentes, na oxidação do RBBR com lacase. Com esse propósito usou-se um detergente do tipo octifenol (Triton X-100), um detergente tipo éster de polioxietileno (Brij 35) e um detergente do tipo éster de sorbitol (Tween 20), todos eles em concentrações abaixo da sua respectiva concentração micelar crítica (CMC). Os ensaios realizados com detergente mostraram comportamento semelhante ao da reacção só com corante e mediador mas algumas diferenças nos resultados de descoloração obtidos (Tabela 4-1).

**Tabela 4-1** - Efeito dos surfactantes não-iónicos na descoloração do RBBR pela lacase

	CMC (mM)	Surfactante (w/v %)	HBT (mM)	Descoloração (%)
Controlo	-	-	4,400	33
			9,000	59
Triton X-100	0,033	0,002	4,400	26
		0,004	4,400	27
		0,004	9,000	28
		0,010	4,400	28
Tween 20	0,033	0,002	4,400	30
		0,004	4,400	36
		0,004	9,000	37
		0,010	4,400	37
Brij 35	0,051	0,001	4,400	37
		0,004	9,000	51

Analisando a percentagem de descoloração do RBBR após 30 minutos de reacção, verifica-se que o detergente não acentua essa descoloração e, em alguns casos, a sua

presença traduz-se mesmo num efeito inibitório, particularmente acentuado para o caso do Triton X-100 e Tween 20 e baixas concentrações de HBT.

#### *4.3.4. Comparação dos parâmetros cinéticos da reacção catalisada pela preparação comercial e pela lacase*

Os parâmetros cinéticos foram calculados de acordo com a equação de Michaelis-Menten, assumindo tratar-se de reacções com cinética de pseudo-primeira ordem.

Assim, usando a preparação comercial de lacase o  $K_m^{app}$  obtido para a oxidação do RBBR foi de 0,064 mM e a  $V_{max}$  de 0,15 mMmin<sup>-1</sup>.

No caso das reacções catalisadas com lacase e mediadores (HBT e AV), uma vez comprovada a dependência da concentração do mediador, para cada concentração de enzima, foi determinada a concentração óptima de mediador não limitante. Quando se usou a lacase com HBT (11,0 mM) o  $K_m^{app}$  foi igual a 0,40 mM e a  $V_{max}$  igual a 1,22 mMmin<sup>-1</sup>. Para o caso do AV (5,7 mM) os valores foram de 0,59 mM e 3,31 mMmin<sup>-1</sup> para o  $K_m^{app}$  e a  $V_{max}$  respectivamente.

#### *4.3.5. Efeito da variação da concentração de HBT nos parâmetros cinéticos da reacção de oxidação do corante*

Escolheu-se para este estudo o processo mediado pelo HBT uma vez que este composto claramente provocava inibição da reacção para concentrações superiores a 11,0 mM. Determinaram-se as constantes cinéticas (conforme condições experimentais especificadas em 2.4.8), usando várias concentrações de HBT (7,0 mM; 9,0 mM e 11,0 mM), para tentar explicar o mecanismo subjacente ao processo de mediação.

Na Figura 4-10 apresenta-se a representação de Lineweaver-Burk para a oxidação do RBBR usando a lacase e HBT em várias concentrações.

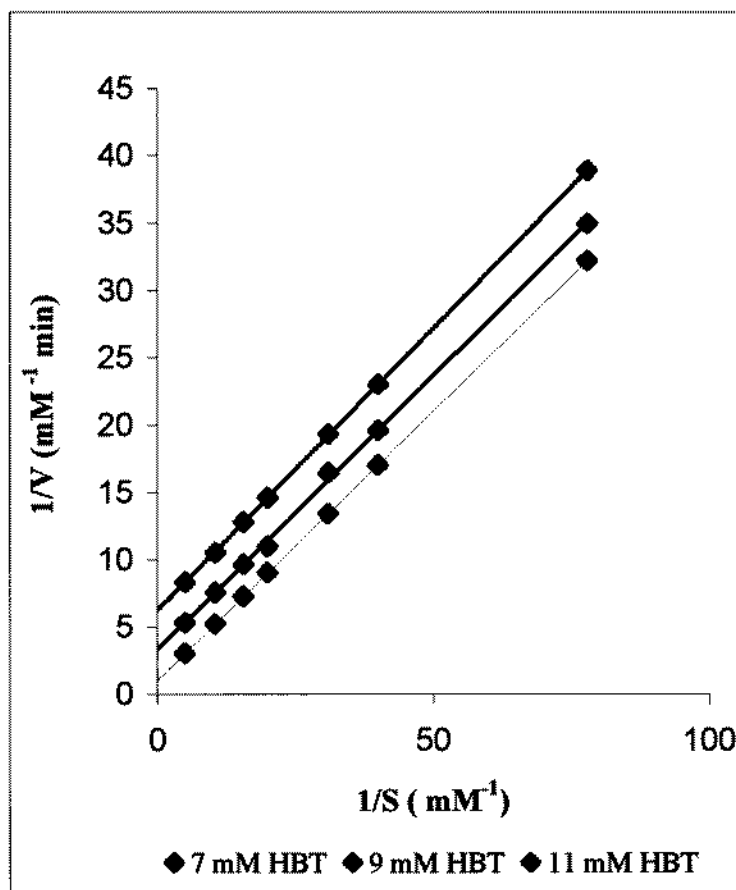


Figura 4-10 - Representação de Lineweaver-Burk para a oxidação do RBBR usando lacase e HBT

A representação gráfica perspectiva uma reação de multi-substrato, de acordo com a explicação apresentada (Copeland, 1996; Brezonik, 1994), em que possivelmente estará envolvido um mecanismo de ping-pong .

#### 4.4. *Discussão*

A formulação comercial de lacase, que para além da enzima, contém também moléculas de baixo peso molecular, nomeadamente um mediador redox e um detergente não iónico de natureza não especificada, revelou uma estabilidade ligeiramente superior em relação à lacase isolada. Foi interessante notar que a diferença de estabilidade térmica entre as duas se torna menos marcada a temperaturas mais altas (acima de 60°C). Apresentaram, no entanto, comportamento em relação à temperatura e pH similares. Estes resultados sugerem que os aditivos presentes na preparação comercial contribuem para a estabilizar, tornando-a resistente nomeadamente, a pequenas variações de temperatura, durante armazenamento e transporte uma vez que se trata de um produto a ser usado em ambiente industrial.

Nos ensaios relativos à descoloração do RBBR usando a preparação comercial de lacase (ver 4.3.2), observou-se descoloração rápida e completa do corante ao comprimento de absorção máxima (ver 4.3.2). Em contraste, a lacase isolada só produz descoloração no RBBR quando é adicionado o mediador redox.

Os mediadores redox, descritos pela primeira vez por Bourbonnais & Paice (1990), permitem que as lacases oxidem compostos não fenólicos, expandindo assim a gama de substratos que podem ser oxidados por estas enzimas. O mecanismo de acção dos sistemas lacase-mediador têm sido estudados exaustivamente em virtude do seu potencial de aplicação (Bourbonnais et al., 1995; Muheim et al., 1992, Novo Nordisk, 1998; Majcherczyk et al., 1999). Um exemplo disto é o conceito de lacase-mediador para o branqueamento da polpa na indústria do papel, que representa uma aplicação biotecnológica de um processo baseado numa única enzima lenhinolítica (Call & Mücke, 1994, 1997). Ao longo dos anos foram descritos mais de 100 mediadores redox incluindo os novos sistemas de polioxometalato.

A verificação de que a inclusão do mediador é um pré-requisito fundamental para que a descoloração do RBBR ocorra contrasta com os resultados de Lonergan e



colaboradores. Os seus estudos com culturas de *P. cinnabarinus* (Schliephake et al., 1993; Jones et al., 1996) e lacase purificada destas culturas (Schliephake & Lonergan, 1996) mostraram que a lacase sozinha podia descorar o RBBR. Em estudos posteriores, usando lacase purificada, foram precisas cerca de 5h para descorar 10 a 60% do corante, dependendo da idade da cultura da qual a enzima tinha sido purificada. Uma justificação plausível para esta discrepância de resultados poderá estar na diferença de espécie fúngica de que se obteve a lacase. O sistema lenhínolítico do *P. cinnabarinus* não é usual, falta-lhe tanto lenhina peroxidase como manganês peroxidase e a sua lacase parece ter uma acção num conjunto de substratos mais alargado do que seria de esperar para lacase de fungo de degradação branca (Eggert et al., 1996). Mas, por outro lado, é interessante notar que um mediador natural, o ácido 3-hidroxi-antranílico, foi identificado neste fungo (Eggert et al., 1996a).

O presente trabalho refere um processo de descoloração eficiente, usando lacase e AV conjuntamente. A preparação comercial de lacase, que contém ácido fenotiazina-10-propiónico como mediador, revelou-se menos eficaz na descoloração do RBBR que a lacase adicionada do mediador, permitindo descorar apenas cerca de 30% do corante em condições experimentais idênticas.

O ácido violúrico permitiu descolorações superiores às do HBT. Este último provoca inibição da reacção para concentrações superiores a 11,0 mM nas condições ensaiadas. Este comportamento parece ser devido aos radicais de HBT gerados pela interacção com a lacase que se sabem ser a espécie mais reactiva no sistema lacase-mediador (Call & Mücke, 1997). Devido à sua alta reactividade, estes radicais podem também induzir reacções nas cadeias laterais de amino-ácidos da enzima, inactivando-a (Pfaller et al., 1998), o que pode explicar a inibição observada. Pfaller e colaboradores, estudaram a toxicidade da combinação de lacases fúngicas e mediadores relativamente ao processo de deslenhificação. De mais de 6 lacases fúngicas diferentes, cerca de metade eram inibidas em menor extensão pelo AV que pelo HBT, indicando também que esta inibição é dependente da espécie de que a enzima é originária.

Outros investigadores (Xu,1996; Li et al., 1999) compararam lacases fúngicas em combinação com vários mediadores redox e concluíram que o potencial redox das lacases varia dependendo da fonte da enzima. Isto pode condicionar consideravelmente a necessidade e/ou a natureza do mediador redox para que a degradação de um determinado composto possa ocorrer.

Outras fenoloxidasas, para além da lacase, foram associadas com a oxidação do RBBR. Ollika e colaboradores (1993) referem uma descoloração de 75% do RBBR usando um extracto bruto do fungo com lenhina peroxidase. No entanto, a presença de outros agentes como o álcool veratrílico ou outras enzimas podem ter contribuído para esta descoloração. Peralta-Zamora e colaboradores (1999) referiram que a lenhina peroxidase de *P. chrysosporium* pode descorar cerca de 30% do RBBR num mL de mistura reaccional, mas o “scaling up” da reacção não é possível devido as grandes quantidades de enzima necessárias.

Uma RBBR oxigenase parcialmente caracterizada, até hoje apenas referida no *Pleurotus ostreatus* (Vyas & Molitorys, 1995; Shin et al.,1997) e mais recentemente em *Irpex lacteus* (Novotny et al., 2000) pode também descorar este corante. Em culturas de *Pleurotus ostreatus* esta enzima apresenta um  $K_m$  entre 11 a 50  $\mu\text{M}$  para o RBBR, variando com a idade das culturas. A constante de afinidade aparente referida para a RBBR oxigenase era da mesma ordem de grandeza que a obtida no nosso trabalho para a preparação de lacase comercial. No entanto, a reacção foi mais lenta ( $V_{\max} = 0,58 \mu\text{Mmin}^{-1}$ ) do que a referida neste estudo para a lacase.

O RBBR tem sido usado no “screening” da actividade lenhinolítica de numerosos fungos (Gold et al., 1988). No entanto há que ter em conta que esta metodologia de “screening” apresenta algumas limitações. Por exemplo, Lonergan e colaboradores (1993) referiram que podem ocorrer resultados falso negativos dependendo da temperatura e meio de cultivo usado. Os nossos resultados sugerem que um fungo que tenha lacase e o correspondente mediador redox natural, será mais facilmente detectado

usando RBBR como substrato cromogénico, se excluirmos a possibilidade de eventual adsorção do corante pelo fungo.

Hatakka (1994) classificou os fungos de degradação branca em quatro grupos dependendo da combinação de fenoloxidasas/oxidases excretadas pelo fungo. De acordo com esta classificação, fungos não produtores de lacase, nomeadamente o grupo daqueles que produz lenhina peroxidase e manganês peroxidase, seriam consideravelmente mais difíceis de detectar usando RBBR como substrato indicador.

Os resultados do estudo cinético usando várias concentrações de HBT, sugerem tratar-se de uma reacção de multi-substrato em que possivelmente estará envolvido um mecanismo de ping-pong. Este mecanismo envolve a ligação do mediador à enzima e transferência do electrão para outro centro activo da enzima, transferindo-o depois para o corante (segundo substrato), que não pode ligar-se directamente à enzima livre. O mediador tem nesta reacção o papel de transportador dos electrões envolvidos no processo redox.

Os três tipos diferentes de detergentes não iónicos estudados não melhoraram a descoloração do RBBR. Em determinados casos, Triton X-100 e Tween 20, observou-se um efeito inibitório que pode ser explicado pela inibição da actividade da enzima tal como descrito por Eriksson (1990). A principal função do detergente não iónico presente na preparação comercial parece estar, sobretudo, relacionado com a necessidade de estabilização do produto comercial.

***Efeito da glucose-1-oxidase e da glucose-2-oxidase em compostos quinónicos***



## **5. Efeito da glucose -1- oxidase e glucose -2- oxidase em compostos quinónicos**

### **5.1. Introdução**

Um aspecto importantíssimo a considerar na utilização de sistemas enzimáticos na biodegradação de xenobióticos diz respeito às sinergias que poderão ser desenvolvidas entre as várias enzimas lenhicolíticas.

A sinergia entre enzimas lenhicolíticas não é de todo desconhecida. Há todo um outro conjunto de enzimas que intervêm na degradação da lenhina, para além das peroxidases e outras oxidoreduções cujo efeito conjugado de sinergias com a lacase é ainda um mundo desconhecido a explorar.

Mas, o estudo da cooperação entre enzimas pressupõe a investigação da sua acção isolada em substratos interessantes do ponto de vista de mecanismo degradativo.

A escolha das oxidoreduções dos açúcares, objecto do estudo documentado neste capítulo, deveu-se principalmente aos aspectos que a seguir se enunciam:

- a) Serem enzimas versáteis do ponto de vista de acção, actuando em compostos, nomeadamente do tipo antraquinónico e fenólico, que poderão estar presentes nos banhos residuais têxteis, como resultado da degradação de corantes.
- b) Estarem relacionadas com a lacase em processos degradativos.
- c) Serem uma nova aposta no domínio têxtil em processos de branqueamento.
- d) Poderem vir a fazer parte de um cocktail enzimático, juntamente com a lacase, na degradação de corantes têxteis.

As oxidoreduções dos açúcares intervêm, *in vivo*, em processos de polimerização subsequentes a reacções com fenoloxidasas. A cooperação da glucose-1-oxidase com a lacase na eficiência dos processos de despolimerização da lenhina provocados pelos fungos de degradação branca, nomeadamente por *Trametes versicolor*, foi objecto de estudo recente (Leonowicz et al, 1999).

O facto destas enzimas, presentes na maioria dos fungos de degradação branca, actuarem como dadores de peróxido de hidrogénio tem sido investigado (Eriksson, 1990; Kersten, 1990; Guillén et al., 2000; Mazullo et al., 1995). Por esta razão, o estudo da cooperação destas enzimas com as peroxidases tem vindo a ser objecto de interesse. Neste contexto, a glucose-1-oxidase é uma das enzimas que tem sido proposta para ser usada nos processos de preparação têxtil em alternativa aos processos de branqueamento clássico com utilização de produtos químicos (Yang et al., 2000).

A glucose-1-oxidase é uma enzima que oxida preferencialmente a glucose (Kurek e Kersten, 1995).

A glucose-2-oxidase (EC 1.1.3.10) catalisa a oxidação da D-glucose e outras piranoses ao nível do segundo átomo de carbono na presença de oxigénio, produzindo 2-cetoaldoses e peróxido de hidrogénio (Volc & Eriksson, 1988).

Estas duas oxidases têm vindo a revelar-se capazes de actuar em substâncias diversas dos seus substratos naturais, nomeadamente compostos aromáticos complexos. Mas, a glucose-2-oxidase, em comparação com a primeira, parece actuar numa maior variedade de substratos, provavelmente, devido a características funcionais ainda não esclarecidas (Costa-Ferreira et al., 1997).

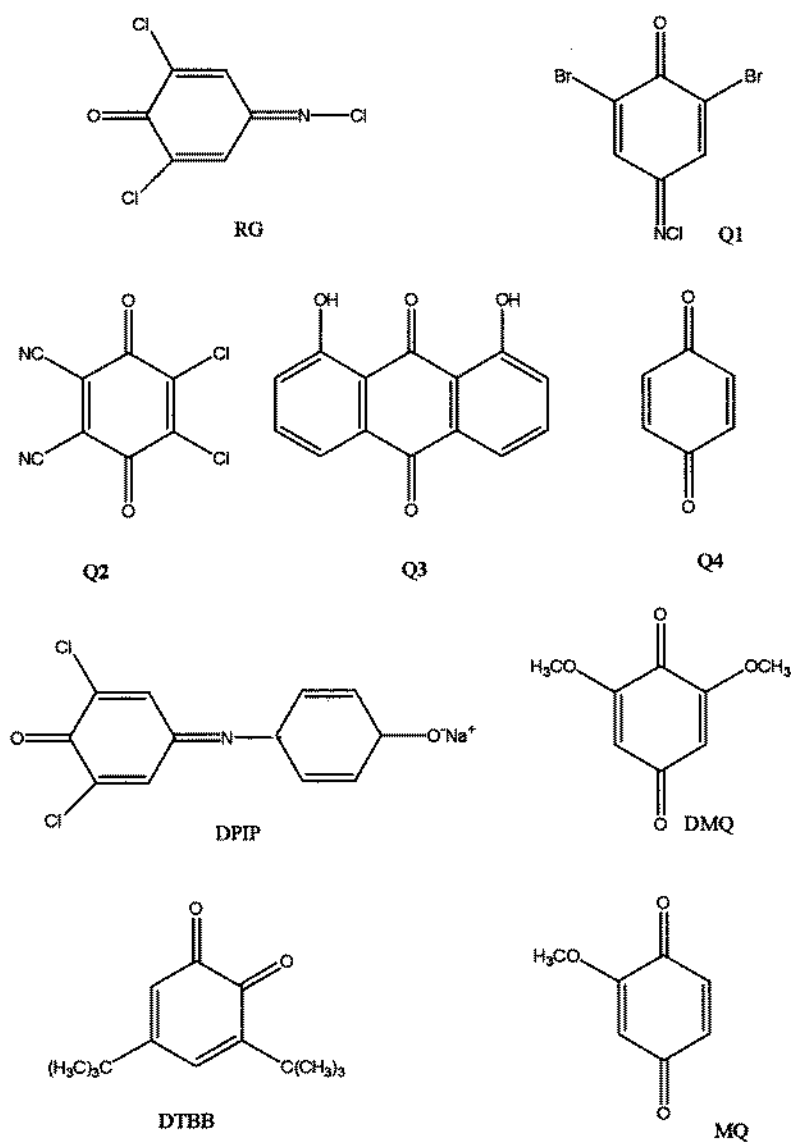
No presente trabalho, a interacção de quinonas com glucose-2-oxidase (G2O) e glucose-1-oxidase (G1O) foi estudada. A glucose-2-oxidase foi purificada de *Trametes versicolor* a sua acção comparada com a da glucose-1-oxidase comercial de *Aspergillus niger*. Os resultados obtidos demonstraram a capacidade da G1O e da G2O modificarem quinonas com estruturas químicas diversificadas.

## 5.2. *Materiais e métodos*

### 5.2.1. *Químicos*

As quinonas (Figura 5-1), 2,6-dicloro-4-(cloroimida)-2,5-ciclo-hexadien-1-ona (RG), 2,6-dibromoquinona-4-clorimida (Q1), 5,6-diciano-2,3-dicloro-1,4-benzoquinona (Q2), 1,8-dihidroxi-9,10-antracenediona (Q3 ), 1,4-benzoquinona (Q4 ), Sal de sódio do 2,6-dicloroindofenol (DPIP), 2,6-dimetoxi-1,4-benzoquinona (DMQ), 3,5-di-*tert*-butil-*o*-benzoquinona (DTBB) and 2-metoxi-1,4-benzoquinona (MQ) foram oferecidas pela Dra. Maria José Costa-Ferreira (INETI).

As quinonas RG (6 mg), Q4 (3,1 mg) e DTBB (6,7mg) foram dissolvidas em 10 mL etanol 99%; Q1 (9,2 mg) e Q2 (6,9 mg) dissolveram-se numa mistura de 1,0 mL etanol 99% + 9,0 mL água; DPIP (11,5 mg) dissolveu-se em 10mL água; Q3 (3,4 mg) dissolveu-se numa mistura de 1,0 mL NaOH 0,5 M + 9,0mL água; MQ (2,5 mg) em 0,75 mL metanol e DMQ (4,1 mg) em 2,02 mL metanol.



**Figura 5-1 - Estruturas químicas das quinonas estudadas**

Os valores de absorvidade molar ( $\epsilon$ ) calculados para as quinonas em que a acção das enzimas se mostrou relevante são apresentados na Tabela 5-1.



**Tabela 5-1 - Valores de absorvidade molar ( $\epsilon$ ) determinados para as quinonas**

Composto	$\lambda$ (nm) (solvente)	$\epsilon$ ( $M^{-1} cm^{-1}$ )
RG	366nm (etanol 99%)	19156
Q1	292 (etanol/água 1:10)	10505
Q3	264 (NaOH 0,5 M/água 1:10)	21159
DPIP	600 (água)	38400
DTBB	420 (etanol 99%)	31100
MQ	386 (metanol)	1704
DMQ	289 (metanol)	5607

O metanol, o etanol 99% e o NaOH foram adquiridos à Merck (Portugal), a DTBB e glucose, foram adquiridos à Sigma (St. Lois, USA). Todos os produtos químicos foram usados em, pelo menos, grau analítico.

Todas as soluções de quinonas foram usados no dia em que foram preparadas.

### 5.2.2. Enzimas

A “horseradish peroxidase” foi comprada à Aldrich.

A glucose-1-oxidase foi comprada à Sigma (St. Lois, USA).

A glucose-2-oxidase foi extraída de *T. versicolor* e purificada usando o método de Volc e Eriksson (1988) modificado conforme descrito em 5.2.3.

### 5.2.3. Purificação Glucose-2- oxidase (G2O) de *Trametes versicolor*

O micélio congelado do fungo foi sujeito a uma extracção com tampão de fosfato 50 mM, pH 6,5, homogeneizado em Ultra-Turrax (LKA-Labortechnik) durante 4 minutos e sonificado (Labsonic 2000, B. Brawn) durante 90 segundos a 160 watts, sendo centrifugado de seguida a 12 000g, durante 20 minutos, obtendo-se o extracto de células livres.

A G2O extraída de *T. Versicolor* foi purificada usando o método de Volc e Eriksson (1988). O extracto celular foi diluído na proporção de 1:1 com tampão fosfatos 50 mM, pH 6,5, contendo 1,2 M de sulfato de amónio e foi aplicado numa coluna de Butiolspharose (Pharmacia) e eluído em gradiente decrescente de sal. As fracções com actividade foram reunidas e eluídas numa coluna de Sepharose Q (Pharmacia) de fluxo rápido, previamente equilibrada com tampão de fosfatos. A G2O eluiu com o aumento de gradiente (0 a 0,4 M) de NaCl.

A electroforese da enzima nativa (PAGE 10% ) revelada com nitrato de prata mostrou que a enzima pura migrou como uma banda única.

#### *5.2.4. Determinação da actividade enzimática e teor em proteínas*

A actividade da glucose-1-oxidase (G1O) e a glucose-2-oxidase (G2O) foi determinada com *o*-dianisidina/ horseradish peroxidase (Bergmeyer, 1974).

Uma IU de actividade da oxidase foi calculada pela formação de uma  $\mu$ mole de produto resultante da oxidação (castanho) por minuto usando um coeficiente de extinção molar de  $8,3 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .

A determinação de proteínas foi feita segundo o método de Lowry modificado (Ohnishi & Berr, 1978) usando Micro Protein Determination (Sigma Diagnostics, St. Louis, USA) com albumina bovina como proteína padrão.

#### *5.2.5. Redução das quinonas pela Glucose-1-oxidase e Glucose-2-oxidase*

A mistura reaccional para avaliação da capacidade redutora das enzimas consistiu em 0,1 mL de solução de quinona (0,1 mM para todas as quinonas com excepção da 2-metoxi-1,4-benzoquinona, 0,12mM e 2,6-dimetoxi-1,4-benzoquinona, 0,41mM), 0,16  $\text{UmL}^{-1}$  de enzima, 0,5 mL de solução de glucose (160 mM) e 50 mM de tampão de fosfato, pH 4,5, num volume total de 3 mL.

Todas as reacções foram incubadas a 30°C até tempo máximo de 24 horas.

Imediatamente após a adição da enzima, fez-se o varrimento do espectro de absorção da mistura analisando-se os resultados entre 200 e 700 nm de 5 em 5 minutos usando um

espectrofotómetro Unicam UV2. A redução do composto é monitorizada pela variação de absorvância no respectivo comprimento de onda de absorção máxima.

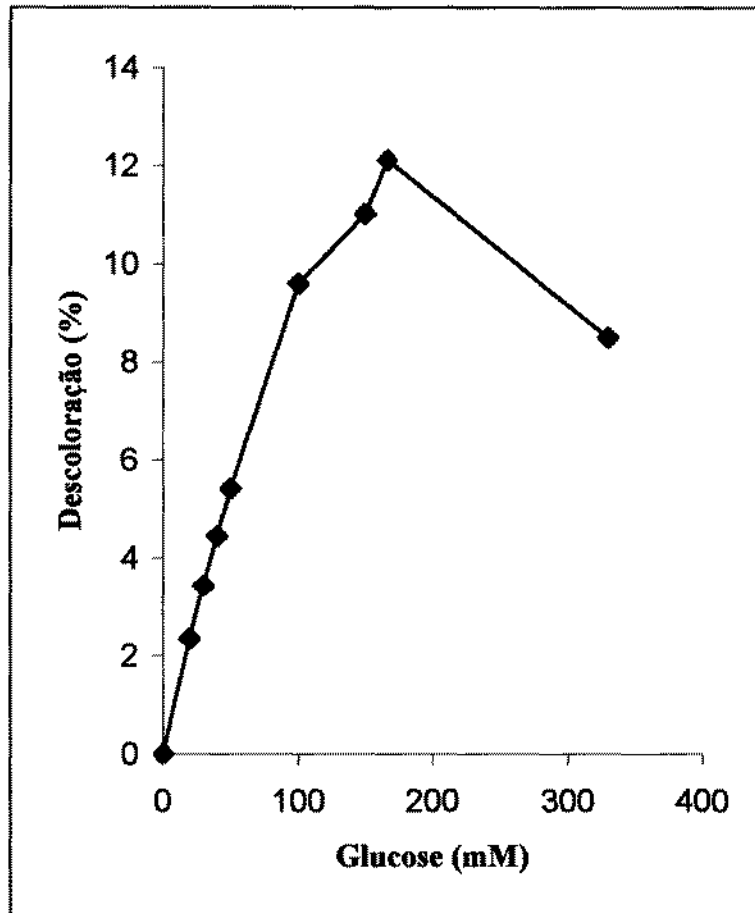
Todos os ensaios foram feitos em triplicado e realizaram-se paralelamente ensaios controlo, sem enzima, sob idênticas condições experimentais.

### *5.3. Resultados*

A influência da temperatura e do pH tinha sido previamente estudada por Costa-Ferreira e colaboradores (1998), tendo sido definida a temperatura de 30°C e o pH de 4,5 como as condições experimentais mais convenientes.

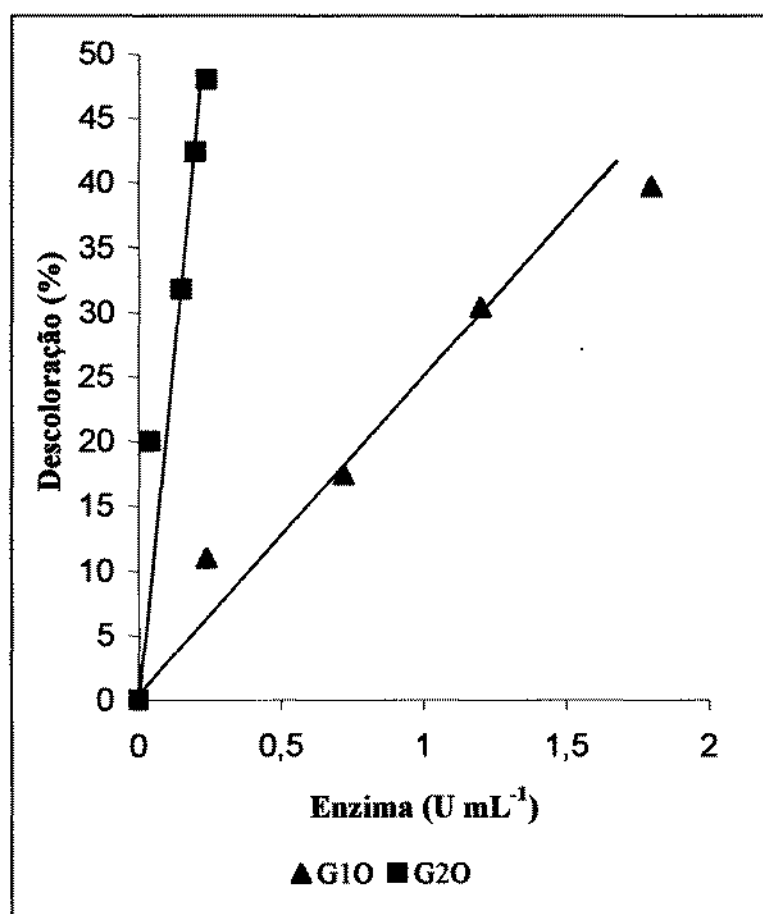
A concentração de glucose a usar nos ensaios de redução foi determinada usando DTBB como padrão e assumida para todos os outros compostos estudados. Os motivos desta escolha prenderam-se com o facto de existirem estudos prévios e em curso pelo grupo de investigação liderado pela Dr. Maria José Costa Ferreira (INETI) (não incluídos neste estudo) com esse composto ainda que usando enzimas diferentes.

*5.3.1. Efeito da concentração de glucose e de enzima na redução da DTBB*



**Figura 5-2** - Efeito da concentração de glucose na redução da DTBB medida através da percentagem de descoloração

Fez-se variar a concentração de glucose de 0,0 a 340,0 mM na mistura reaccional (conforme descrito em 5.2.5) e avaliou-se o efeito desta variação na redução da DTBB. Os resultados apresentados na Figura 5-2 mostram que a reacção é dependente da presença e concentração de glucose. A melhor concentração de glucose, nas condições reacionais ensaiadas, foi 160,0 mM. Acima desta concentração, parece haver inibição.



**Figura 5-3** - Efeito da concentração de G10 e G20 na redução da DTBB

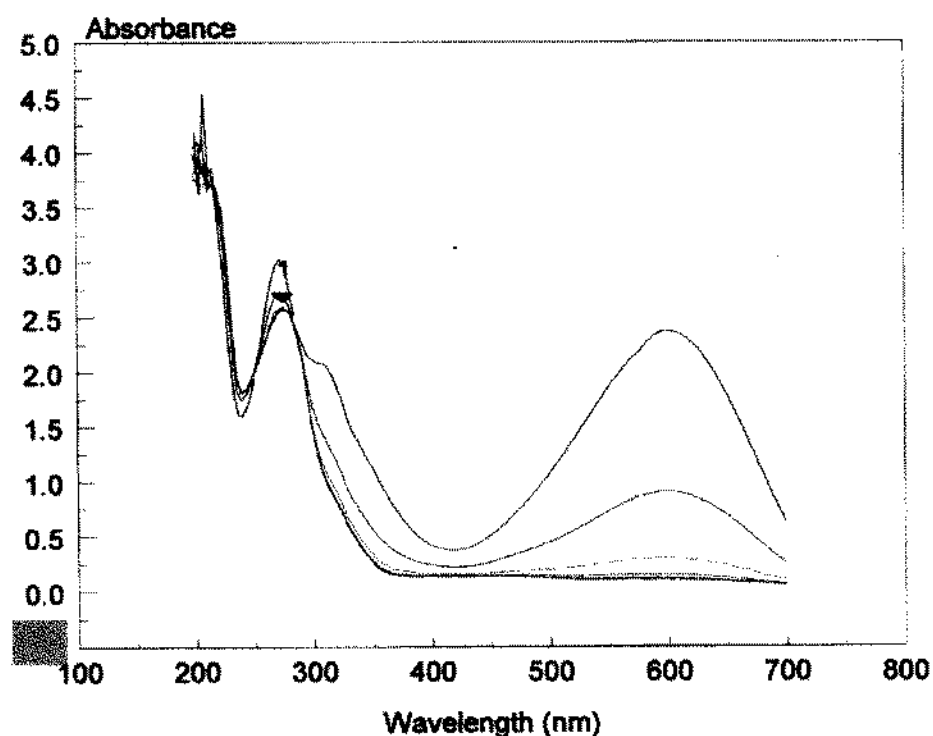
O efeito da concentração de enzima na redução da DTBB foi estudado usando até 2 UmL<sup>-1</sup> de G10 ou até 1 UmL<sup>-1</sup> de G20 (Figura 5-3). O uso de tão baixas concentrações de enzima justifica-se pela alta velocidade apresentada por estas reacções.

### *5.3.2. Efeito do tratamento enzimático nos espectros de absorção das quinonas*

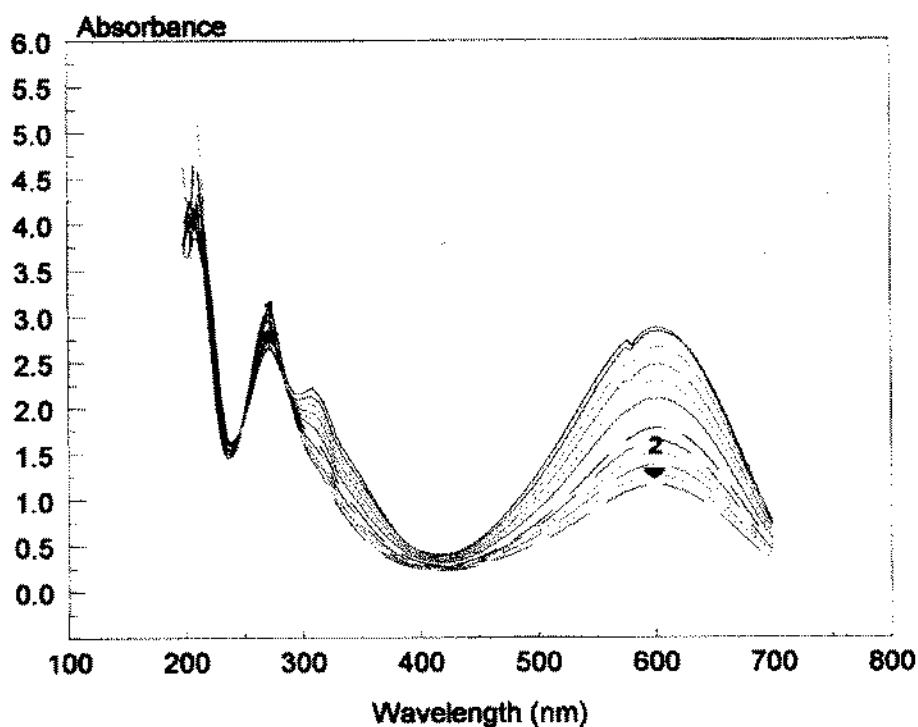
A acção da G1O e da G2O na modificação das quinonas foi comparativamente avaliado pelas variações de absorvância registadas entre 200-700 nm.

Os espectros de absorção das quinonas Q2 e Q4 não registaram qualquer alteração em 24 horas de ensaio, independentemente da concentração e tipo de enzima usada (G1O ou G2O).

A DPIP foi completamente reduzida pelas duas enzimas mas a velocidade significativamente diferente, como se observa na Figura 5-4 e Figura 5-5.

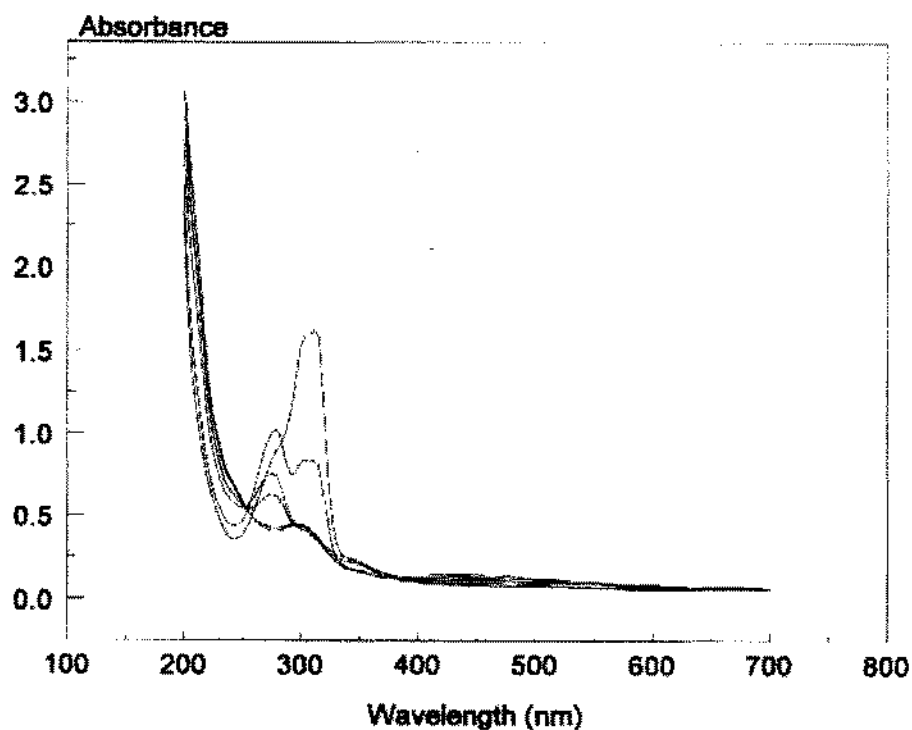


**Figura 5-4** - Espectros de absorção do DPIP depois do tratamento com G2O.  
(O intervalo de tempo entre varrimentos é de 5 minutos).

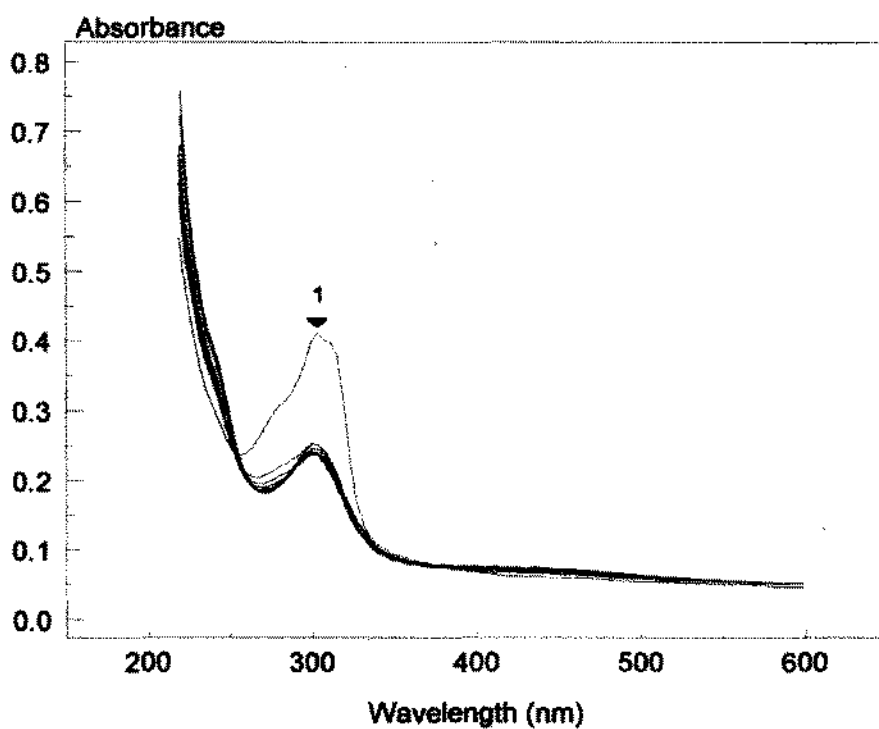


**Figura 5-5** - Espectros de absorção do DPIP depois do tratamento com G1O.  
(O intervalo de tempo entre varrimentos é de 5 minutos).

As quinonas RG, Q1 e Q3, sofrem variações no espectro apenas nos primeiros 10 minutos de reação. Essas alterações são rápidas no caso da RG (Figura 5-6) e na Figura 5-7) e Q1 (Figura 5-8 e na Figura 5-9) e apenas ligeiras para a Q3.

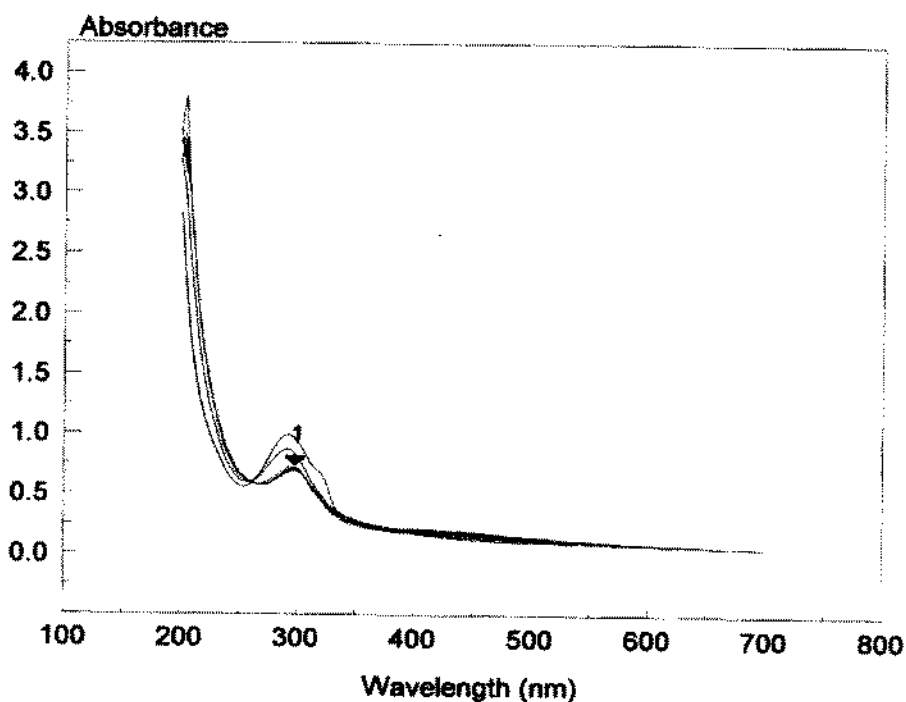


**Figura 5-6** - Espectros de absorção do RG depois do tratamento com G1O.  
(O intervalo de tempo entre varrimentos é de 5 minutos).

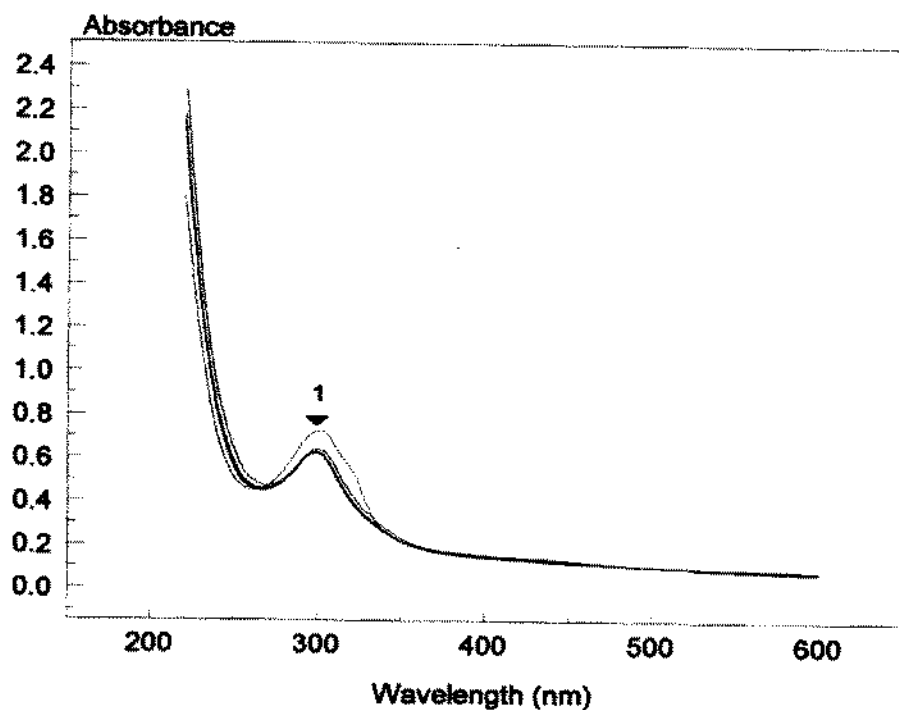


**Figura 5-7**- Espectros de absorção do RG depois do tratamento com G2O.  
(O intervalo de tempo entre varrimentos é de 5 minutos).



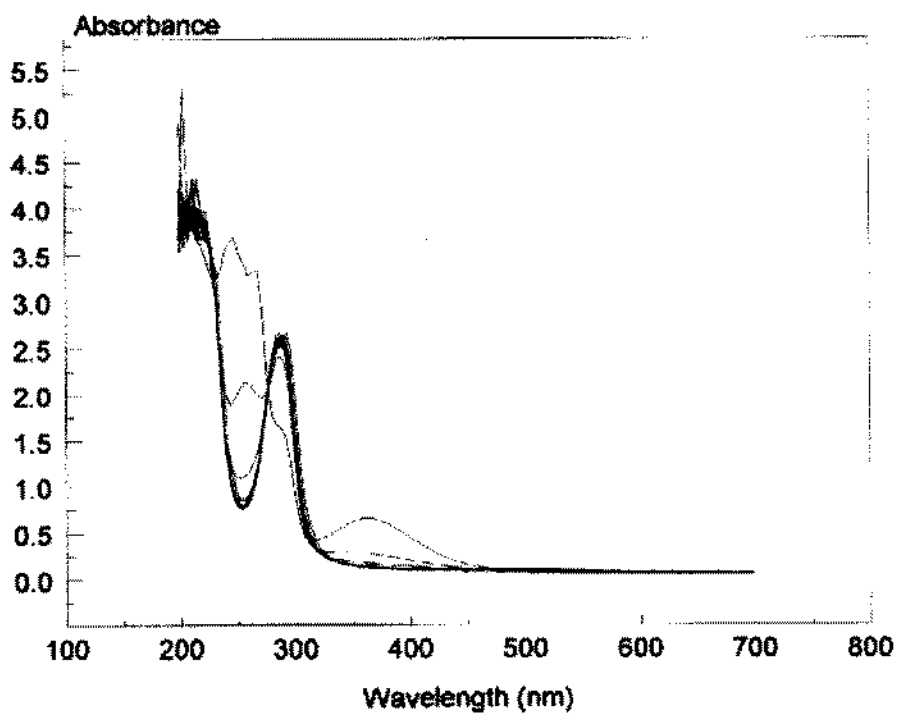


**Figura 5-8** - Espectros de absorção do Q1 depois do tratamento com G1O.  
(O intervalo de tempo entre varrimentos é de 5 minutos).

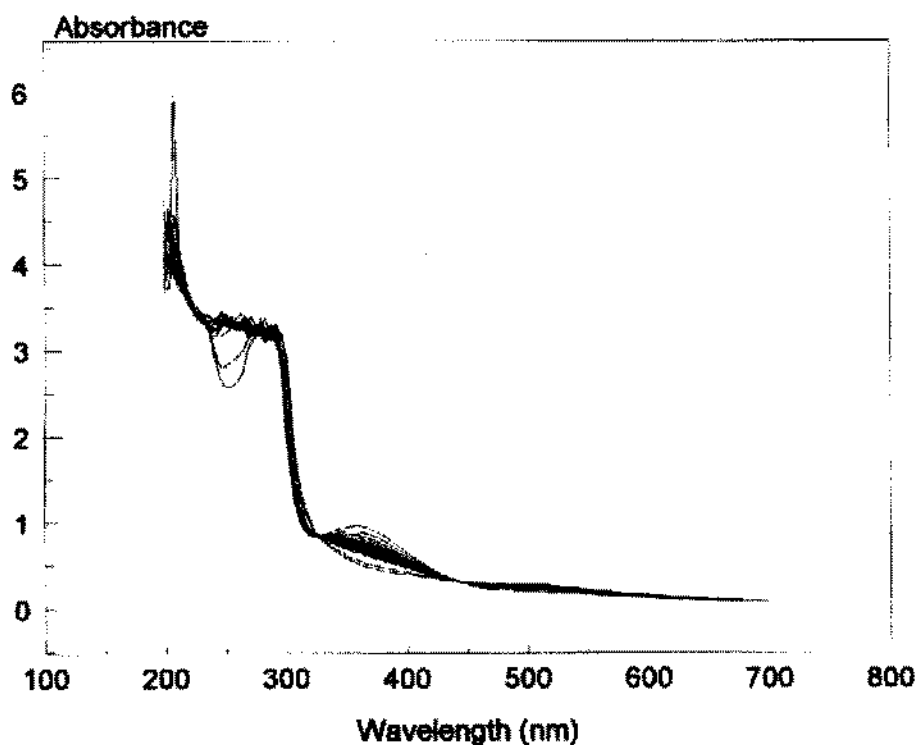


**Figura 5-9** - Espectros de absorção do Q1 depois do tratamento com G2O.  
(O intervalo de tempo entre varrimentos é de 5 minutos).

A redução da MQ é completa e rápida com a G2O (Figura 5-10) o que não acontece quando a reação é catalisada pela G1O ( Figura 5-11)



**Figura 5-10-** Espectros de absorção do MQ depois do tratamento com G2O.  
(O intervalo de tempo entre varrimentos é de 5 minutos).



**Figura 5-11** - Espectros de absorção do MQ depois do tratamento com G1O.  
(O intervalo de tempo entre varrimentos é de 5 minutos).

Os nossos ensaios apresentam uma alteração muito ligeira da DMQ com a G2O e são precisas 24 horas para que isso aconteça. Na reacção catalisada pela G1O não se regista qualquer alteração nas condições ensaiadas.

As Tabelas 5-2 e 5-3 resumem os resultados obtidos para as quinonas ensaiadas.

**Tabela 5-2** - Intervalo de tempo em que se verificaram alterações nas quinonas

Quinona	Intervalo de tempo (min) <sup>b</sup>	
	G1O	G2O
RG	10	10
Q1	10	10
Q3	10	10
DPIP	210	20
DTBB	180	90
MQ	180	10
DMQ	>24h	>24h

<sup>b</sup> Redução máxima calculada em condições idênticas para as duas enzimas

Com base nos resultados obtidos na determinação de proteínas (37 mgL<sup>-1</sup> para a Glucose-1-oxidase 170 mgL<sup>-1</sup> para a Glucose-2-oxidase) e nas reduções de absorção ao comprimento de onda máximo para cada quinona, calculou-se a redução máxima obtida para cada caso, em µmoles de quinona, por unidade de tempo (min) e por mg de proteína (Tabela 5-3).

**Tabela 5-3 - Redução máxima das quinonas**

Quinona	Redução máxima ° ( $\mu\text{moles min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{proteína}$ )	
	G1O	G2O
RG	2,20	2,26
Q1	0,89	0,75
Q3	0,31	0,14
DPIP	0,19	3,50
DTBB	0,18	0,63
MQ	0,37	2,30
DMQ	0,00	0,00

° Redução máxima calculada em condições idênticas para as duas enzimas

#### 5.4. *Discussão*

As quinonas são normalmente reduzidas a hidroquinonas quando em contacto com extractos de fungos (Guillén et al, 2000). Essas reacções dependem da espécie de fungo em questão e são influenciadas pelas condições ambientais (pH e a temperatura), mas outros factores como a estrutura química do substrato quinónico, no que diz respeito ao número e posição de substituintes ou o potencial redox também influenciam a sua extensão.

As oxidoreductases dos açúcares podem ser produzidas em larga escala e têm vindo a ser propostas para prevenir a polimerização de compostos radicalares muito reactivos resultantes da oxidação pelas fenoloxidasas (como a lacase). Esta ideia surge do facto de que estas enzimas parecem intervir na regulação da lacase e de peroxidases “*in vivo*”, reduzindo os radicais fenoxilo formados e diminuindo a repolimerização dos fenóis formados na degradação

A interação da G2O com a lacase (Figura 5-12) poderá ser do mesmo tipo que a cooperação das CDH/CBQ (Celobiose desidrogenase/ Celobiose: quinona 1-oxidoreductase) com a lacase, referida por Ander (1994).

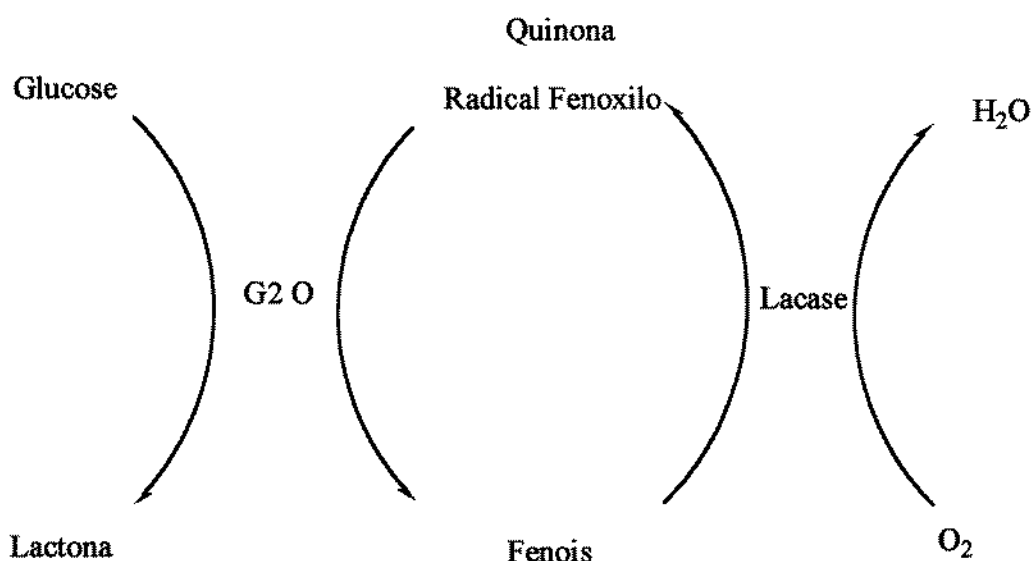


Figura 5-12 - Mecanismo de acção da G2O e lacase na oxidação-redução dos fenóis

Note-se que este mecanismo não exclui a participação possível de outras redutases, como foi descrito por Brock e colaboradores (1995).

Há muito que se conhece a redução do di-cloroindofenol pela glucose-1-oxidase. Mais recentemente, Costa-Ferreira et al. (1997) mostraram a redução deste composto pela G2O de *Polyporus obtusus* e *Trametes versicolor*, referindo diferenças notáveis entre esta enzima e a G1O de *A. niger*. Os nossos resultados corroboram os desses investigadores na medida em que demonstram o diferente comportamento das várias quinonas estudadas conforme são sujeitas à acção da G1O e da G2O.

A DTBB, usada como substrato na determinação da actividade da CDH por Ander e Eriksson (1977) e desde então frequentemente utilizada, foi também completamente

reduzida pelas duas enzimas mas a velocidade de redução foi significativamente diferente,  $0,18 \mu\text{moles min}^{-1}$  por mg de proteína no caso da G1O e  $0,63 \mu\text{moles min}^{-1}$  por mg de proteína no caso da G2O.

As quinonas com um átomo de azoto substituindo o oxigénio, RG, Q1 e DPIP, apresentam resultados menos previsíveis se considerarmos a sua reactividade relativa. A Q1, atendendo ao facto de ter na sua molécula substituintes mais electronegativos, deveria ser mais facilmente reduzida que a RG. Contudo, esse facto não se confirma com base nos presentes resultados experimentais. Nas condições reacionais usadas, a RG foi a quinona que mais alterações registou. A DPIP apresentou, no entanto, a maior diferença deste grupo de quinonas no que respeita à acção relativa das duas enzimas estudadas, cerca de mais 18 vezes de substrato transformado por acção da G2O.

No caso das *p*-quinonas estudadas, Q2, Q4, DMQ e MQ, apenas as que apresentavam substituintes do tipo metoxilo, na sua estrutura química, DMQ e MQ, sofreram alterações por acção das enzimas. Essa acção foi mais intensa para o caso da G2O mas as duas enzimas provocaram maior alteração no composto mono-substituído. Assumindo que as quinonas têm igual apetência para o centro activo das enzimas, era de prever que a MQ fosse mais facilmente redutível que a DMQ uma vez que o aumento de grupos dadores de electrões, do tipo metoxilo, tornam mais difícil a redução. Assim, do ponto de vista químico, a DMQ é menos reactiva que a MQ.

A redução da MQ é completa e rápida com a G2O:  $2,3 \mu\text{moles de composto MQ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$  de proteína são modificados quando a reacção é catalisada por esta enzima.

Mas no caso da G1O, a reacção é muito mais lenta,  $0,37 \mu\text{moles min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$  de proteína. Ander (1996) verificou que a MQ sofria redução rápida pela CDH mais CBQ ( $V_{\text{max}} 166$ ;  $K_m^{\text{app}} 100 \mu\text{M}$ ;  $K_{\text{cat}} 1,890 \text{s}^{-1}$ ), à semelhança do que havia sido previamente proposto por Westmark e Eriksson (1974). Mas para o caso da DMQ verificaram uma redução muito mais lenta ( $V_{\text{max}} 46,5$ ;  $K_m^{\text{app}} 200 \mu\text{M}$ ;  $K_{\text{cat}} 528 \text{s}^{-1}$ ).

Sabe-se que concentrações de cerca de 10 pM de DMQ são suficientes para inibir enzimas como as lacases de *Phlebia radiata* e *Coriolus versicolor* em 50% (Rogalski et al., 1995) e embora Ander (1996) verificasse que 0,41 mM de DMQ não inibia a CDH,

nada se sabe acerca do que acontece a esse respeito com a G1O ou a G2O. Poderá suceder uma inibição das enzimas provocada pela concentração de DMQ.

Para além dos motivos estruturais atrás analisados e da consideração de factores de selectividade enzimática, não podemos terminar esta análise sem referir a reversibilidade destes processos de oxidação-redução que não foi objecto deste estudo.

No entanto, os resultados aqui apresentados sugerem que as Glucose-1-oxidase e a Glucose-2-oxidase poderão ser catalisadores da degradação de compostos resultantes da metabolização de corantes ou outros xenobióticos, nomeadamente quinonas metoxiladas e nitroquinonas.



## *Conclusões gerais*



## **6. *Conclusões gerais***

O DeniLite™, uma preparação comercial contendo lacase e usada industrialmente para acabamento de jeans tingidos com índigo, descora o RBBR de maneira eficaz. Quando se fez reagir o RBBR com a preparação comercial contendo 10 UmL<sup>-1</sup> de lacase, observa-se uma descoloração completa ao comprimento de onda de absorção máximo, após duas horas a pH 5,5 e a uma temperatura de 60°C.

Procedeu-se, então ao isolamento e purificação da lacase avaliando de seguida a estabilidade e comportamento relativamente ao pH e temperatura da enzima isolada. O estudo de estabilidade comprovou uma perda de estabilidade térmica de cerca de 30% a 30°C, comparativamente com a preparação comercial. Esta diferença tornava-se menos acentuada (inferior a 10%) para temperaturas superiores (50°C e 60°C). O seu perfil de pH e temperatura, no entanto, é semelhante, com um máximo de actividade a pH 5,5 e 60°C. Mas, verificou-se que a enzima isolada não tinha qualquer acção na descoloração do RBBR. Esse facto determinou o estudo da influência dos demais componentes da preparação comercial: o detergente não iónico e o mediador.

Em virtude de não se conhecer o detergente incluído na preparação comercial, analisou-se então a interferência na reacção enzimática de descoloração do RBBR com a lacase pura de três detergentes não iónicos de características químicas diferentes: um detergente do tipo octifenol (Triton X-100), um detergente tipo éster de polioxietileno (Brij 35) e um detergente do tipo éster de sorbitol (Tween 20), todos eles em concentrações abaixo da sua respectiva concentração micelar crítica (CMC). Os resultados destes ensaios revelaram a não interferência destes compostos na reacção catalisada pela enzima, levando a admitir que a sua presença na preparação comercial se deva, sobretudo, à necessidade de estabilização do produto e cumprir os requisitos de conservação e armazenamento necessários a uma substância para uso industrial.

Em contraste com os resultados do estudo da influência do detergente, o uso de mediador associado à lacase revelou-se um requisito absoluto para que a descoloração do corante ocorra.

O resultado dos ensaios com os diferentes mediadores, atestaram a importância da natureza do mediador neste processo. A promazina, escolhida pela semelhança

estrutural com o ácido fenotiazina-10-propiónico incluído no DeniLite™ não revelou qualquer eficácia na mediação da reacção de descoloração do corante.

No entanto, o ácido violúrico mostrou ser, dos mediadores estudados, aquele que provocava menor efeito inibitório por concentração, na descoloração do composto antraquinónico.

O *N*-hidroxibenzotriazole, ainda que revelando eficácia como mediador, provocou marcado efeito inibitório para concentrações acima de 11,0 mM (nas condições experimentais usadas).

Do trabalho experimental até aqui inuniciado decorre a conclusão de que o DeniLite™ é um preparado comercial que inclui uma lacase robusta e capaz de descorar o RBBR e eventualmente outros compostos do mesmo tipo.

Por sua vez, a comparação das constantes catalíticas determinadas neste estudo com as descritas na literatura para descoloração do RBBR, sugere que a lacase usada no presente estudo é mais eficiente que outras enzimas referidas na literatura desde que o mediador esteja presente.

A extensão do estudo a outros corantes têxteis, do tipo disazo com hidroxilo em posição *para* em relação à ligação azo, permitiu constatar que esta lacase pode também descorar estes compostos e sem necessidade de mediador. Assume contudo, uma importância determinante o tipo de substituintes nos anéis benzénicos do corante. Derivados com grupos dadores de electrões no anel fenólico, como os grupos *metoxilo* e *metilo*, potenciam a acção da lacase, podendo marcar a diferença entre serem ou não substratos da enzima.

Apenas os corantes solúveis em água parecem poder funcionar como substratos da lacase *per se* ou com mediador associado. Carece de investigação a importância dos grupos sulfónicos na molécula de corante no mecanismo de biotransformação destes compostos.

A adição de compostos como o ácido violúrico pode em casos em que a enzima não actua sozinha, alargar o espectro de acção do catalisador, como comprovaram os resultados obtidos para o caso do corante V.

À semelhança do que acontece para o caso do corante antraquinónico, não é indiferente o tipo de mediador usado no processo enzimático de descoloração. Enquanto a presença

do AV acelerou as reacções de descoloração destes compostos e permitiu que ocorressem em casos em que a lacase sozinha não apresentava qualquer efeito, o HBT não teve o mesmo efeito mediador nestes processos.

Há todo um “universo” de enzimas a ser estudado do ponto de vista de aplicação à degradação de corantes têxteis e seus derivados presentes nos efluentes. Escolhemos iniciar este estudo usando as “oxidoredutases dos açúcares”. Estudos descritos na literatura atestam a possibilidade destas intervirem como reguladores de processos de oxidação-redução “in vivo”

Os ensaios realizados com quinonas de estrutura molecular diferenciada, comprovam a acção destas enzimas na modificação destes compostos. Nestas reacções, as quinonas são, provavelmente, reduzidas a hidroquinonas em reacções que dependem, entre outros, do número e posição de substituintes nos compostos quinónicos. O estudo comparativo da acção da G2O de *Trametes versicolor* com a G1O de *Aspergillus niger* apresenta diferenças em termos de especificidade de substrato no universo de quinonas estudado, apresentando a primeira, acção num conjunto mais amplo de compostos. Há ainda diferenças em relação à velocidade de reacção para cada uma das quinonas. Estas diferenças não podem, contudo, ser explicadas exclusivamente com base nas diferenças químicas e estruturais dos compostos. Questões de selectividade enzimática terão que ser levadas em consideração.

A quantidade de enzima necessária nestes processos é pequena,  $0,16 \text{ U mL}^{-1}$  catalisam até 3,50 moles de substrato quinónico por minuto e por proteína. No entanto, a obrigatoriedade de presença da glucose em concentrações apreciáveis (um valor óptimo de 160 mM) é um aspecto menos positivo a considerar em termos de aplicação à degradação de corantes têxteis.

*Perspectivas futuras*



## 7. *Perspectivas futuras*

Neste trabalho iniciou-se a investigação da acção de enzimas como a lacase ou as glucose oxidases na degradação de corantes têxteis, seus precursores ou produtos de degradação.

Por cada problema resolvido surge todo um conjunto de novas questões, de aspectos de investigação interessantes e que urgem esclarecer, para se possam aplicar na prática estes sistemas. Os mecanismos envolvidos em cada uma das reacções a que se aludiu na tese são alguns desses aspectos. Para isso, há que isolar e caracterizar os compostos resultantes destas complexas reacções enzimáticas. As técnicas hifenadas, cromatográficas e espectroscópicas (HPLC, espectroscopia de massa, FTIR e RMN) serão obrigatoriamente o suporte analítico para se atingir este objectivo em que se começou já a investir trabalho.

O alargamento do estudo a outros compostos, quer corantes quer mediadores será outra das vias a explorar. É fundamental definir, tão exhaustivamente quanto possível, as relações estrutura química-actividade das enzimas, de forma a prever o comportamento destes processos enzimáticos e poder avançar no sentido do seu dimensionamento em mais larga escala.

Outro aspecto importantíssimo diz respeito às sinergias que poderão ser desenvolvidas entre a lacase e as outras enzimas. Na natureza, a lacase não actua só. De facto, *in vivo*, requer outras enzimas nos processos complexos em que intervém. Há todo um outro conjunto de enzimas, para além das peroxidases e outras oxidoreduções cujo efeito conjugado de sinergias com a lacase é ainda um mundo desconhecido a explorar nestes processos de biodegradação. A VAO (veratril álcool oxidase) poderá ser uma outra opção uma vez que se sabe que actua sinergicamente com a lacase prevenindo a polimerização dos radicais fenoxilo formados. O estudo da cooperação entre a lacase e as glucose oxidases foi já iniciado.

Este aspecto da cooperação entre enzimas poderá, eventualmente, traduzir-se na acção sobre substratos diferentes, de que foi exemplo o estudo com as glucose oxidases apresentado neste trabalho ou optimização da acção enzimática, por exemplo, na remoção de eventuais inibidores. Muito há a estudar acerca de eventuais inibições por parte de outros produtos resultantes do processamento têxtil e presentes nos efluentes descarregados.

Uma outra área apaixonante é a da imobilização destes catalisadores. A rentabilização e aplicação prática destes processos depende obrigatoriamente da possibilidade de se poderem reutilizar as enzimas. O desenvolvimento de técnicas que permitam a imobilização química destas enzimas, sem perda da sua actividade catalítica permitirá a implementação prática destes processos.

Não foi objectivo deste trabalho o estudo da toxicidade destes processos. Ainda que conscientes da importância desse aspecto mas realistas na disponibilidade de tempo, considerou-se que esse assunto terá que ser remetido para trabalhos futuros.

*E assim começa a história....*

## ***Bibliografia***





## Bibliografia

- Achwal, W.B. (1998). Limitations in the applicability of selected natural dyes to synthetic fibres. *Colourage*, **45** (1), 45-46
- Aitken, M.D., Venkatrati, R., & Irvine, R.L. (1989). Oxidation of phenolic pollutants by lignin degrading enzyme from white-rot fungus *Phanerochaete cryso sporium*. *Wat. Res.*, **23**, 443-450.
- Aitken, M.D., Massey, L.L., Chen, T., & Heck, P.E. (1994). Characterization of reaction products from the enzyme catalysed oxidation of phenolic pollutants. *Wat. Res.*, **28**, 1879-1889.
- Amitai, G., Adami, R., Sod-Moriah, G., Rabinovitz, I., Vincze, A., Leadar, F. L., Chefetz, B., Leibovitz-Persky, L., Friesem, D., & Hadar, Y. (1998). Oxidative biodegradation of phosphorothiolates by fungal laccase. *FEBS Lett.*, **438**, 195-200.
- Ander, P. & Eriksson, K.-E. (1976). The importance of phenol oxidase activity in lignin degradation by white rot fungus *Sporotrichum pulverulentum*. *Arch. Microbiol.*, **109**, 1-8.
- Ander, P. & Eriksson, K.-E. (1977). Selective degradation of wood components by white rot fungus. *Physiol. Plant.*, **41**, 239-248.
- Ander, P. (1994). The cellobiose-oxidizing enzymes CBQ and CBO as related to lignin and cellulose degradation – A review. *FEMS Microb. Rev.*, **13**, 297-311.
- Ander, P. (1996). Effects of cellobiose dehydrogenase on guaiacyl guaiacyl /syringyl lignins in the presence of iron and hydrogen peroxide. *Holzforschun.*, **50** , 413-419.
- Ander, P. & Messner, K. (1998). Oxidation of 1-hydroxybenzotriazole by laccase and lignin peroxidase. *Biotechnol. Techniques*, **12**, 191-195.

- Ander, P., Grabner, K., Kandioller, G., Screbotnik, E., Poppius-Levlin, K., Semar, S., Anke, H., Niku-Paavola, M-L., Viikau, L., & Messner, K. (1998a) The in vitro <sup>14</sup>C-labelled kraft pulp assay as used for evaluation of laccase and mediators intended for pulp and paper bleaching. Volume A (Proc. 7<sup>th</sup> Int. Conf. on Biotechnol. Pulp and Paper Industry), 111-128. Vancouver. Canada.
- Banat, I.M., Poonam, N., Singh, D., & Marchant, R. (1996). Microbial decolorization of textile dye-containing effluents: A review. *Bioresource Technol.*, **58**, 217-227.
- Banci, L., Ciofi-Baffoni, S., & Tien. M. (1999). Lignin and Mn peroxidase-catalyzed oxidation of phenolic lignin oligomers. *Biochem.*, **38**, 3205-3210.
- Bajpai, P. (1999). Application of enzymes in the pulp and paper industry. *Biotechnol. Prog.*, **15**, 147-157.
- Barfoed, M. & KirK, O. (1998) Enzymatic method for over dyeing cellulosic textiles. WO9805816.
- Barr, D.P., & Aust, S.D. (1994). Mechanisms white rot fungi use to degrade pollutants. *Environ. Sci. Technol.* **28** (2), 78-87.
- Beckmann, W., I.M., & Sewekow, U.R. (1991). Coloured effluents of reactive dyestuffs: Problems and methods to solve them. *Textil Praxis International.*, **4**, 346-349.
- Bergmeyer, H.U. (1974). Glucose oxidase assay method, in: *Methods of Enzymatic Analysis*. New York: Academic Press, 1, 457-460.
- Bocks, S.M. (1967). Fungal metabolism-II. Studies on the formation and activity of *p*-diphenoloxidase (laccase). *Photochemistry*, **6**, 771-783.
- Bodzek, M., Bohdziewicz, J., & Kowalska, M. (1994). Preparation of membrane-immobilized enzymes for phenol decomposition. *J.Chem.Tech. Biotechnol.*, **61**, 3231-239.

- Bourbonnais, R. & Paice, M.G. (1990). Oxidation of non-phenolic substrates. An expanded role for laccase in biodegradation. *FEBS Lett.*, **267**, 99-102.
- Bourbonnais, R., Paice, M.G., Reid, I.D., Lanthier, P., & Yaguchi, M. (1995). Ligninolytic oxidation by laccase from *Trametes versicolor* and role of the mediator 2,2'-azinobis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonate) in Kraft lignin depolymerization. *Appl. Environ. Microbiol.*, **61**, 1876-1880.
- Bourbonnais, R., Leach, D., & Paice, M.G. (1998). Electrochemical analysis of the interactions of laccase mediators with lignin model compounds. *Biochem. Biophys. Acta*, **1379**, 381-390.
- Brenna, O. & Bianchi, E. (1994). Immobilization of laccase for phenolic removal in must and wine. *Biotechnol.Lett.*, **16**, 35-40.
- Brezonik, P.L. (1994). Kinetics of biochemical reactions and microbial processes in natural waters. In *Chemical kinetics and process dynamics in aquatic systems*. Lewis Publishers, London, 419-548.
- Brock, B.J. Rieble, S., & Gold, M.H. (1995). Purification and characterization of a 1,4-benzoquinone reductase from basidiomycete *Phanerochaete cryosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **61**, 3076-3081.
- Brown, B. R. (1967). *Biochemical aspects of oxidation coupling of phenols*. Taylor W.I. & Battersby, A. R. Eds., New York, Marcel Decker. 177-197.
- Call, H. P. & Mücke, I. (1994). Enzymatic Bleaching pulps with laccase-Mediator-System. Proc. Pulping Conf., AIChE Session. San Diego, CA, USA.
- Call, H. P. & Fitzner. (1994 ). Multicomponent bleaching system. WO9429425.
- Call, H.P. & Mücke, I. (1997). History, overview and application of mediated ligninolytic systems, especially laccase-mediator-systems (Lignozym®-Process). *J. Biotechnol.*, **53**, 163-202.

- Carpiano, L.A., Chao, H.G., Beyermann, M., & Bienert, M. (1991). ((9-fluorenylmethyl)oxy)carbonyl amino acid chlorides in solid-phase peptide synthesis. *J. Org. Chem.*, **56**, 2635-2642.
- Carpiano, L.A. (1993). 1-hydroxy-7-azabenzotriazole: an efficient peptide coupling additive. *J. Am. Chem. Soc.*, **115**, 4397-4398.
- Casella, L., Poli, S., Gulloti, M., Selvaggini, C., Beringhelli, T., & Marchesini, A. (1994). The chloroperoxidase-catalyzed oxidation of phenols. Mechanisms, selectivity and characterization of enzyme-substrate complexes. *Biochem.*, **33**, 6377-6386.
- Carvalho, M.E.A., Monteiro, M.C., & Sant'Anna, G.L.J. (1999). Laccase from *Trametes versicolor*, stability at temperature and alkaline conditions and its effect on biobleaching of hardwood kraft pulp. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **77-79**, 723-733.
- Cavaco-Paulo, A., Almeida, L., & Bishop, D. (1998). Hydrolysis of cotton cellulose by engineered cellulases from *Trichoderma reesei*. *Tex. Res. J.*, **68** (4), 273-280.
- Cavaco-Paulo, A., Moragado, J., Almeida, L., & Kilburan, D. (1998a). Indigo backstaining during cellulase washing. *Tex. Res. J.*, **68** (6), 398-401.
- Chefetz, B., Chen, Y., & Hadar, Y. (1998). Purification and characterization of laccase from *Chaetium thermophilium* and its role in humification. *Appl. Environ. Microbiol.*, **64**, 78-82.
- Chen, K.C., Huang, W.T., Wu, J.Y., & Houng, J.Y. (1999). Microbial decolorization of azo dyes by *Proteus mirabilis*. *J. Ind. Microb. Biotechnol.*, **23** (1), 686-690.
- Chevalier, T., de Rigal, D., Mbeguie-A-Mbeguie, D., Gauillard, F., Richard-Forget, F., & Fils-Lycaon, B.R. (1999). Molecular cloning and characterization of apricot fruit polyphenol oxidase. *Plant Physiol.*, **119**, 1261-1269.

- Chivukula, M. & Renganathan, V. (1995). Phenolic azo-dye oxidation by laccase from *Pyricularia oryzae*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **61**, 4374-4377.
- Chung, K.T., & Stevens, Jr. S.E. (1993). Decolorization of azo dyes by environmental microorganisms and helminths. *Environ. Toxicol-Chem.*, **12** (11), 2121-2132.
- Cliff, S., Fawer, M.S., Maier, G., Takata, K., & Ritter, G. (1994). Enzyme assays for the phenolic content of natural juices. *J.Agricultural and Food Chemistry*, **42**, 1824-1828.
- Coll, P.M., Taberero, C., Villanueva, J.R., Santamaria, R., & Perez, P. (1993). Characterization and structural analysis of the laccase I gene from the newly isolated ligninolytic basidiomycetes PM1 (CECT 2971). *Appl. Environ. Microbiol.*, **59**, 4129-4135.
- Coll, P.M., Fernandez-Abalos, J.M., Villanueva, J.R., Santamaria, R., & Perez, P. (1993a). Purification and characterization of phenoloxidase (laccase) from the lignin-degrading basidiomycete PM1 (CECT 2971). *Appl. Environ. Microbiol.*, **59**, 2613.
- Collins, P.J., Kotterman, M.J.J., Field, J.A., & Dobson, A.D.W. (1996). Oxidation of anthracene and benzo[a]pyrene by laccases from *Trametes versicolor*. *Appl. Environ. Microb.*, **62**, 4567.
- Collins, P.J. & Dowson, A.D.W. (1997). Regulation of laccase gene transcription in *Trametes versicolor*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **63**, 3444-3450.
- Collins, P.J., O'Brien, M.M., & Dowson, A.D.W. (1999). Cloning and characterization of cDNA encoding a novel extracellular peroxidase from *Trametes versicolor*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **65**, 1343-1347.
- Cooper, P. (1993). Removing colour from dyehouse waste waters - a critical review of technology available. *J. S. D. C.*, **109**, 97-100.

- Copeland., R.A. (1996). Enzymes. In A practical introduction to struture, mechanism, and data analysis. VCH Publications, Inc.New York. 1-306.
- Cornwell, R.L., Tinland-Butez, M.-F., Tardone, P.J., Cabasso, I., & Hammel, K.E. (1999). Lignin degradation and lignin peroxidase production in cultures of *Phanerochaete cryso sporium* immobilized on porous ceramic supports. *Enzym. Microb. Technol.*, **12**, 916-920.
- Correia, V.M., Stefhenson, T., & Judd, S.J. (1994). Characterization of textile wastewaters- A review. *Environm. Technol.*, **15**, 917-929.
- Costa-Ferreira, Duarte, J. C. M. & Ander, P. (1997) Reduction of diclorophenol-indophenol and other quinones by glucose oxidase. Proc. TAPPI Biological Sciences Symposium. San Francisco: TAPPI Press, 453.
- Costa-Ferreira, Duarte, J. C. M. & Ander, P. (1998). Possible implications of quinone reduction by pyranose oxidases. Volume A (7<sup>th</sup> Int. Conf. on Biotechnol. Pulp and Paper Industry), 89-92. Vancouver. Canadá.
- Cripps, C., Bumpus, J.A., & Aust, S.D. (1990). Biodecolorization of azo and heterocyclic dyes by *Phanerochaete cryso sporium*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **56**, 1114-1118.
- Crestini, C. & Argyropoulos, D.S. (1998). The early oxidative biodegradation steps of residual kraft lignin models with laccase. *Biorg. Med. Chem.*, **6**, 2161-2169.
- Cullen, D. (1997). Recent advances on the molecular genetics of ligninolytic fungi. *J. Biochem.*, **53**, 273-289.
- Cumming, D. X. Foam detergent composition with enzymes. (1998). EP839905.
- D'Sousa, T.M., Boominathan, K., & Reddy, C.A. (1996). Isolation of laccase gene-specific sequences from white rot and brown fungi by PCR. *Appl. Environ. Microbiol.*, **62**, 3739-3744.

- Dahiya, J.S., Singh, D., & Nigam, P. (1998). Characterization of laccase from *Coniothyrium miffitans*. *J. Basic Microbiol.*, **338**, 349-359.
- Dean, J.F.D. & Eriksson, K.-E. (1994). Biotechnological modification of lignin structure and composition in forest trees. *Holzforschung*, **48**, 21-33.
- Dec, J. & Bollag, J.M. (1990). Detoxification of substituted phenols by oxidoreductase enzymes through polymerisation reactions. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, **19**, 543-550.
- Dec, J. & Bollag, J.M. (1994). Use of plant material for the decontamination of water polluted with phenols. *Biotechnol. Bioeng.*, **44**, 1132-1139.
- Dec, J. & Bollag, J.M. (1994a). Dehalogenation of chlorinated phenols during oxidative coupling. *Environ. Sci. Technol.*, **28**, 484-490.
- Dec, J. & Bollag, J.M. (1995). Effect of various factors on dehalogenation of chlorinated phenols and anilines during oxidative coupling. *Environ. Sci. Technol.*, **29**, 657-663.
- Diogo, J., Frutuoso, A. & Escalera, R. (1996) <http://www.esb.ucp.pt/biblio/diogo>
- Durán, N. (1997). Biodegradação da lignina e tratamento de efluentes por fungos ligninolíticos. Itamar Soares de Melo e João Lúcio de Azevedo. (Microbiologia Ambiental), 269-292. Brazil, Embrapa Editores.
- Durán, N., Minussi, R. C., Pastore, G. M., Alves, O. L., Gimenes, I. F., Peralta-Zamora, P., & Moraes, S. G. (1999). Laccase production and its environmental applications in the presence of mediators. Proc. II National Meeting of Environmental Applied Microbiology (Soares, C.H.). Florianópolis, Brazil.
- Eggert, C., Temp, U., Dean, J.F.D. & Eriksson, K.-E.L. (1996). The white-rot fungus, *Pycnoporus cinnabarinus*, degrades lignin using laccase and a redox mediator. *FEBS Lett.* 391:144-148.

- Eggert, C., Temp, U., & Eriksson, K.-E. (1996a). The lignonolytic system of the white rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus*: purification and characterization of the laccase. *Appl. Environ. Microbiol.*, **62**, 1151-1158.
- Ehara, K., Tsutsumi, Y., & Nishida, T. (1998). Structural changes of residual lignin in the softwood kraft pulp treated with manganese peroxidase. *J. Wood Sci.*, **44**, 327-331.
- Eriksson, K.-E. (1990). Biotechnology in the Pulp and Paper Industry. *Wood Science and Technology*, **24**, 79-101.
- Etters, J.N. & Annis, P.A. (1998). Textile enzyme use: a developing technology. *American Dyestuff Reporter*, 18-23.
- Fawer, M.S., Stierli, J., Cliffe, S., & Fiechter, A. (1991). The characterization of immobilized lignin peroxidase and horseradish peroxidase. *Biochem. Biophys. Acta*, **1076**, 15-22.
- Ferrer, I., Dezotti, M., & Durán, N. (1991). Decolorization of kraft effluent by free and immobilized lignin peroxidase and horseradish peroxidase. *Biotechnol. Lett.*, **13**, 577-532.
- Figuroa-Espinoza, M.C., Morel, M.H., Surget, A., & Rouau, X. (1999). Oxidative cross-linking of wheat arabinoxylans by manganese peroxidase. Comparison with laccase and horseradish peroxidase. Effect of cystein and tyrosine on gelation. *J. Sci. Food Agric.*, **79**, 460-463.
- Fierz-David, H.E , & Blangey, L. (1938). *Grundlegende Operationen der Farbenchemie*, Vierte Auflage, Julius Springer, Wien.
- Gagne, F., & Blasé, C. (1997). Evaluation of industrial wastewater quality with a chemiluminescent peroxidase activity assay. *Environ. Toxicol. Water Qual.*, **12**, 315-320.



- Gardiol, A.E., Hernandez, R.J., Reinhammar, B., & Harte, B.R. (1996). Development of a gas-phase oxygen biosensor using blue copper-containing oxidase. *Enzyme Microbiol. Technol.*, **18**, 347-352.
- Gianfreda, L., Sannino, R., Filazzola, M.T., & Leonowicz, A. (1998). Catalytic behavior and detoxifying ability of a laccase from fungus strain *Cerretia ullicolor*. *J. Mol. Catal. B. Enzymatic*, **4**, 133-230.
- Giardina, P., Aurelia, V., Cannio, R., Marzullo, L., Amoresano, A., Sicilian, R., Pucci, P., & Sannia, G. (1996). The gene protein and glycan structure of laccase from *Pleurotus ostreatus*. *Eur. J. Biochem.*, **235**, 508-515.
- Glenn, J.K., & Gold, M.H. (1983). Decolorization of several polymeric dyes by the lignin-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **45**, 1741-1747.
- Gold, H.M., Glenn, G.K., & Alic, M. (1988). Use of polymeric dyes in lignin biodegradation assays. *Methods in Enzymol.*, **161**, 74-78.
- Gold, H.M., & Alic, M. (1993). Molecular biology of the lignin-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Microbiol. Rev.*, **57** (3), 605-622.
- Gonçalves, A. R., Oviedo, M. A. S., Cotrim, A. R., & Da Silva, F. T. (1998). Improvement of the chelating capacity of sugarcane bagasse lignin through oxidation with polyphenoloxidase. Paice, M. G. and Saddler, J. Proc. of 7<sup>th</sup> Int. Conf. on Biotechnol. Pulp and Paper Industry, 7B, 171-173. Vancouver, Canada.
- Grabsky, A.C., Coleman, P.L., Drtina, G.J., & Burgess, R.R. (1995). Immobilization of manganese peroxidase from *Lentinula edodes* on azlactone-functional polymers and generation of Mn<sup>+3</sup> by the enzyme-polymer complex. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **55**, 55-73.

- Grabsky, A.C., Rasmussen, L.K., Coleman, P.L. & Burgess, R.R. (1996). Immobilization of manganese peroxidase from *Lentinula edodes* on alkylaminated Emphaze`r M AB 1 polymer for generation of W' as an oxidizing agent. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **60**, 1-17.
- Grabsky, A.C., Grimek, H.J., & Burgess, R.R. (1998). Immobilization of manganese peroxidase from *Lentinula edodes* and its generation of Mn III-chelate as chemical oxidant of chlorophenols by the enzyme-polymer complex. *Biotechnol. Bioeng.*, **60**, 204-215.
- Grey, R., Hofer, C., & Schlosser, D. (1998). Degradation of 2-chlorophenol and formation of 2-chloro-1,4-benzoquinone by mycelia and cell-free crude liquids of *Trametes versicolor* in relation to extracellular laccase activity. *J. Basic Microbiol.*, **38**, 371-382.
- Guerra, A., Ferraz, A., Citrim, A. R., & Da Silva, F. T. (1998). Polymerization of acid soluble lignin fragments by patatto-polyphenoloxidase enzymes. Paice, M. G. and Saddler, J. Proc. of 7<sup>th</sup> Int. Conf. on Biotechnol. in the Pulp and Paper Industry, B 167-169. Vancouver, Canada.
- Guillén, F., Muñoz, C., Gomez-Torbio, V., Martínez, A.T., & Martínez, M.J. (2000). Oxygen activation during oxidation of methoxyhydroquinones by laccase from *Pleurotus eryngii*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **66**, 170-175.
- Harkin, J.M. & Obst, J.R. (1973). Syringaldazine, an effective reagent for detecting laccase and peroxidase in fungi. *Experientia*, **29**, 381-387.
- Harkin, J.M., Larsen, M.J., & Obst, J.R. (1974). Use of syringaldazine for detection of laccase in sporophores of wood rotting fungi. *Mycologia*, **66**, 469-476.
- Hartzell, M.M. & Hsieh, Y.L. (1998). Enzymatic scouring to improve cotton fabric wettability. *Tex. Res. J.*, **68** (4), 233-241

- Hatakka, A. (1994). Lignin -modifying enzymes from selected white-rot fungi: production and role in lignin degradation. *FEMS Microbiol. Rev.*, **13**, 125-135.
- Hatamoto, O., Sekine, H., Nakano, E., & Abe, K. (1999). Cloning and expression of cDNA encoding the laccase from *Schizophyllum commune*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **63**, 58-64.
- Heinfling, A., Bergbauer, M., & Szewzyk, U. (1997). Biodegradation of azo and phthalocyanine dyes by *Trametes versicolor* and *Bjerkandera adusta*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **48**, 261-266.
- Heinfling, A., Martínez, J., & Martínez, A.T. (1998). Transformation of industrial dyes by manganese-independent reaction. *Appl. Environ. Microbiol.*, **64**, 2788-2793.
- Hernlem, B.J., Vane, L.M., & Sayles, G.D. (1999). The application of siderophores for metal recovery and waste remediation; examination of correlations for prediction of metal affinities. *Wat. Res.*, **33**, 951-960.
- Hoffrichter, M., Vares, K., Scheibner, K., Galkin, S., Sipila, J., & Hatakka, A. (1999). Mineralization and solubilization of synthetic lignin by manganese peroxidases from *Nematoloma frowardii* and *Phlebia radiata*. *J. Biotechnol.*, **67**, 217-228.
- Horak, D., Karpisek, M., Turkova, J., & Benes, M. (1999). Hydrazide-functionalized Poly(2-hydroxyethylmetacrylate) microspheres for immobilization of horseradish peroxidase. *Biotechnol. Prog.*, **15**, 208-215.
- Hsieh, Y-L. & Cram, L.A. (1998). Enzymatic hydrolysis to improve wetting and absorbency of polyester fabrics. *Tex. Res. J.*, **68** (5), 311-319.
- Ibrahim, M.S., Ali, H.I., Taylor, K.E., Biswas, N., & Bewtra, J.K. (1997). Removal of phenol from industrial wastewater using *Arthomyces ramosus* peroxidase in a continuous flow system. Proc.52<sup>nd</sup> Ind. Waste Conf. (Fac.Eng.Ain Shams Univ.Ed., Cairo, Egypt), 271-277.

- Johannes, C., Majcherczyk, A., & Hüttermann, A. (1996). Degradation of anthracene by laccase of *Trametes versicolor* in the presence of different mediator compounds. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **46**, 313-317.
- Johannes, C., & Majcherczyk, A., (2000). Natural mediators in the oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons by laccase mediator systems.. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **66**, 524-528.
- Johannes, C., & Majcherczyk. (2000a). Laccase activity tests and laccase inhibitors. *J. Biotechnol.*, **78**, 193-199.
- Jolivet, S., Arpin, Wischers, H.J., & Pellon, G. (1998) *Agaricus bisporus* browning: A review. *Mycol. Res.*, **102**, 1459-1483.
- Jones, C.L., Mainwaring, D.E., Lonergan, G. T. (1996). The reaction dimension for fungal catalysis of an organic dye. In: Proc. 10<sup>th</sup> Intl Biotechnol Symp (Poster Session 8-Environmental Biotechnology). Melbourne, Australia.
- Jönsson, L., Sjöström, K., Häggström, F., & Nyman, P.O. (1995). Characterization of laccase gene from the white-rot fungus *Trametes versicolor* and structural features of basidiomycete laccases. *Biochem. Biophys. Acta*, **1251** , 210-215.
- Jönsson, L., Cassland, P., Reimann, A., and Nilvebrant, N O. (1998). Laccase from *Trametes versicolor*: cloning expression and catalysis. Paice, M. G. and Saddler, J., Proc. of 7<sup>th</sup> Int. Conf. on Biotechnol. Pulp and Paper Industry, 7B, 175-178.. Vancouver, Canada.
- Jumino, A. and Martin, R.. (1994). Procède de preparation d'un pigment Indolique par voie enzymatique, pigment obtenu et son utilisation en cosmetique. FR2694021.
- Kadhim, H., Graham, C., Barrat, P., Evans, C.S., & Rastall, R.A. (1999). Removal of phenolic compounds in water using *Coriolus versicolor* grown on wheat bran. *Enzyme Microb. Technol.*, **24**, 303-307.

- Kapdan, I.K., Kargi, F., McMullan, G., & Marchant, R. (1999). Effect of environmental conditions on biological decolorization of textile dyestuff by *C. versicolor*. *Enzyme Microb. Technol.*, **26**, 381-387.
- Karam, J., & Nicell, J.A. (1997). Potential applications of enzymes in waste treatment. *J. Chem. Tech. Biotechnol.*, **69**, 141-153.
- Karahanian, E., Corsini, G., Lobos, S., & Vicufla, R. (1998). Structure and expression of laccase gene from the ligninolytic basidiomycete *Ceriporiopsis subvermispora*. *Biochem. Biophys. Acta, Gene Struct. Expression*, 65-74.
- Kawai, S., Umezawa, T., & Higuchi, T. (1988). Degradation of phenolic  $\beta$ -1 lignin substructure model compounds by laccase of *Coriolus versicolor*. *Arch. Biochem. Biophys.*, **262**, 99-110.
- Kawai, S., Nakagawa, M., & Ohashi, H. (1999). Aromatic ring cleavage of a non-phenolic beta-O-4 lignin model dimer by laccase from *Trametes versicolor* in presence of 1-hydroxybenzotriazole. *FEBS Lett.*, **446**, 355-358.
- Kersten, P.J. (1990). Glyoxal oxidase of *Phanerochaete cryosporium*: its characterization and activation by lignin peroxidase. *Proc. Nat. Acad. Sci USA*, **87**, 2936-2940.
- Kim, S.J., Ishikawa, K., Hirai, M., & Shoda, M. (1995). Characteristics of a newly isolated fungus, *Geotricum candidum* Dec 1, which decolorizes various dyes. *J. Ferm. Bioeng.*, **79**, 601-607.
- Klibanov, R.M. & Moris, E.D. (1981). Horseradish peroxidase for the removal of carcinogenic aromatic amines from water. *Enzyme Microb. Technol.*, **3**, 119-122.
- Kojima, Y., Tsukuda, Y., Kawai, Y., Tsukamoto, A., Sakaimo, M., Sugiura, J., & Kita, Y. (1990). Cloning sequence analysis and expression of lignolytic phenoloxidase

- genes of white-rot basidiomycetes *Coriolus hirsutus*. *J. Biol. Chem.*, **265**, 15224-15230.
- Koroljova-Skorobogat'Ko, O., Stepanova, E.V., Gavrilova, V.P., Morozova, O.V., Lubimova, N.V., Dzchafarova, A.N., Jaropolov, A.I., & Makower, A. (1998). *Biotechnol. App. Biochem.*, **28**, 47-54.
- Koroljova-Skorobogat'Ko, O., Stepanova, E.V., Gavrilova, V.P., Biniukov, V.I., Jaropolov, A.I., Varfolomeyev, S.D., Schller, F., Makower, A., & Otto, A. (1999). *App. Biochem. Biotechnol.*, **76**, 115-127.
- Kristopaitis, K., Kulys, J., Pedersen, A.H., & Schneider, P. (1998). *N*-substituted phenylenediamines as peroxidase and laccase substrates. *Acta Chem. Scan.*, **52**, 469-474.
- Kumar, A., Lepole, M. & Pertell, C. (1994). Enzyme finishing of man-made cellulose fabrics. *Tex. Chem. Color.*, **25** (10), 25-28.
- Kurek, B. & Kersten, P.J. (1995). Physiological regulation of glyoxal oxidase from *Phanerochaete cryosporium* by peroxidase systems. *Enzyme Microb. Technol.*, **17**, 751-756.
- Lacki, K., Duvnjak, Z. (1998). Decrease of phenolic content in canola meal using a polyphenol oxidase preparation from *Trametes versicolor*: effect of meal saccharification. *Biotechnol. Tec.*, **12** (1), 31-34.
- Laing, I.G. (1991). The impact of effluents regulations on the dyeing industry. *Rev. Prog. Coloration*, **21**, 56-71.
- Ledakowicz, S. & Gonera, M. (1999). Optimisation of oxidants dose for combined chemical and biological treatment of textile wastewater. *Wat. Res.*, **33**, 2511-2516.

- Leonowicz, A. & Gszywnowicz, K. (1981). Quantitative estimation of laccase forms in some white-rot fungi using syringaldazine as substrate. *Enzyme Microb. Technol.*, **3**, 55-58.
- Leonowicz, A., Rogalski, J., Jaszek, M., Luterek, J., Wojtas-Wasilewska, M., Malarczyk, E., Ginalska, G., Fink-Boots, M., & Cho, N.-S. (1999). Cooperation of fungal laccase and glucose-1-oxidase in transformation of Björkman lignin and some phenolic compounds. *Holzftorschung*, **53**, 376-380.
- Li, H., Xu, F., & Eriksson, K.-E. (1999). Comparison of fungal laccases and redox mediators in oxidation of a nonphenolic lignin models compound. *Appl. Environ. Microbiol.*, **65**, 2654-2660.
- Lonergan, G.T., Jones, C.L., & Mainwaring, D.E. (1993). The effect of temperature and culture medium on the degradative activity of *Phanerochaete chrysosporium* evaluated using three qualitative screening methods. *Intl Biodeter. Biodegrad.*, **31**, 107-114.
- Machuca, A., Aoyama, H., & Durán, N. (1999). Isolation and partial characterization of an extracellular low-molecular mass component with high phenoloxidase activity from *Thermoascus auranticus*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **256**, 20-26.
- Majcherczyk, A., Johannes, C., & Hüttermann, A. (1998). Oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) by laccase of *Trametes versicolor*. *Enzyme Microb. Technol.*, **22**, 335-341.
- Majcherczyk, A., Johannes, C., & Hüttermann, A. (1999). Oxidation of aromatic alcohols by laccase from *Trametes versicolor* mediates by the 2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) cation radical and dication. *Appl. Microb. Biotechnol.*, **51**, 267-276.
- Mansur, M., Suarez, T., Fernandez-Larrea, J.B., Brizuela, M.A., & Gonzalez, A.E. (1997). Identification of laccase gene family in new-lignin-degradation Basidiomycete CETT20197. *Appl. Environ. Microbiol.*, **63**, 2637-2643.

- Marco, M.P. & Barcelo, D. (1996). Environmental applications of analytical biosensors. *Measurements Sci. Technol.*, **7**, 1547-1562.
- Martin, R., Jumino, A., Dubief, C., Rosenbaum, G., & Audouysset, M.-P. (1994). Utilisation de laccases d'origine vegetable comme agents oxydants en cosmetique, compositions cosmétiques, les contenant, procedure de traitement cosmetique les mettant en oeuvre et procede d'obtention de ces enzymes. FR2694018.
- Marzullo, L., Cannio, R., Giardina, P., Santini, M.T., & Sanna, G. (1995). Veratryl alcohol oxidase from *Pleurotus ostreatus* participates in lignin biodegradation and prevents polymerization of laccase-oxidized substrates. *J. Biol. Chem.*, **270**, 3823-3827.
- Messner, K., & Srebotinik, E. (1994) Biopulping: an overview of developments in an environmentally safe papermaking technology. *FEMS Microbiol. Rev.*, **13**, 351-365.
- Mishra, G. & Tripathy, M. (1993). A critical review of the treatments for decolorization of textile effluent. *Colourage*, **10**, 35-38.
- Morpurgo, L., Desideri, A., & Rotilio, G. (1982). Heterogeneity of type 3 copper in Japanese -lacquer-tree (*Rhus vernificera*) laccase. *Biochem. J.*, **207**, 625-627.
- Morpurgo, L., Graziani, M.T., & Avigliano, L. (1993). Role of reduction potential in copper abstraction from trinuclear cluster of blue oxidases TI. *J. Inorg. Biochem.*, **51**, 641-647.
- Muheim, A., Fiechter, A., Harvey, P.J., & Schoemaker, H.E., (1992). On the mechanism of oxidation of non-phenolic lignin model compounds by the laccase-ABTS couple. *Holzforchung*, **46**, 121-126.
- Muñoz, C., Guillén, F., Martínez, A.T., & Martínez, M.J. (1997). Laccase isoenzymes of *Pleurotus eryngii*: characterization, catalytic properties, and participation in



- activation of molecular oxygen and  $M^{2+}$  oxidation. *Appl. Environ. Microbiol.*, **63**, 2166-2174.
- Muñoz, C., Guillén, F., Martínez, A.T., & Martínez, M.J. (1998). Laccase isoenzymes of *Pleurotus eryngii*: characterization, catalytic properties and participation in activation of molecular oxygen and  $M^{2+}$  oxidation. *Appl. Environ. Microbiol.*, **63**, 2166-2174.
- Nakamoto, S., & Machida, N. (1992). Phenol removal from aqueous solutions by peroxidase-catalysed reaction using additives. *Wat. Res.*, **26**, 49-54.
- Nicell, J.A., Bewtra, J.K., Biswas, N., St. Pierre, C., & Taylor, K.E. (1993). Enzyme catalysed polymerization and precipitation of aromatic compounds from aqueous solution. *Can. Chem. Eng.*, **20**, 725-735.
- Nicell, J.A. (1994). Kinetics of horseradish peroxidase-catalysed polymerization and precipitation of aqueous 4-chlorophenol. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, **60**, 203-215.
- Novo Nordisk. 1998. [www.novo.com](http://www.novo.com). Internet Communication
- Novo Nordisk (1999). A revista bioindustrial da Novo Nordisk. *BioTimes*, **4**, 10-12.
- Novotny, C., Erbanova, P., Cajthaml, T., Rothschild, N., Dosoretz, C., Sasek, V. (2000). *Irpex lacteus*, a white rot fungus applicable to water and soil bioremediation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **54** (6), 850-853.
- O'Malley, D.M., Whetton, R., Bao, W., Chen, C.L., & Sederoff, R.R. (1993). The role of laccase in lignification. *Plant J.*, **4**, 751-757.
- Ohnishi, S.T., & Berr, J.K. (1978). A simplified method of quantitating proteins using biuret and phenol reagents. *Anal. Biochem.*, **36**, 207
- Ollika, P., Alhonnaki, K., Leppaen, V., Glumoff, T., & Sudnimene, L. (1993). Decolorization of azo, triphenil methane, heterocyclic and polymeric dyes by

lignin peroxidase isoenzymes from *Phanerochaete crysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **59**, 4010-4016.

Ong, E., Pollock, W.B.R., & Smith, M. (1997). Cloning and sequence analysis of two laccase complementary DNSs from the ligninolytic basidiomycete *Trametes versicolor*. *Gene*, **196**, 113-119.

Palma, C., Moreira, M.T., Feijoo, G., Lema, J.M. (1998). In vitro degradation of the dye poly R-478 by crude and semipurified manganese peroxidase. Volume B (7<sup>th</sup> Int. Conf. on Biotechnol. Pulp and Paper Industry), 103-105 Vancouver. Canada.

Parra, C., Rodriguez, J., Baeta, J., Freu, J., & Durán, N. (1998). Iron-binding catechols oxidating lignin and chlorolignin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **251**, 399-402.

Parra, C., Santiago, M.F., Rodriguez, J., & Durán, N. (1998a). Hydroxamate iron complex with phenoloxidase activity acting on lignin and chlorolignins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **249**, 719-722.

Pasti-Grigsby, M.B., Paszczynski, A., Goszczynski, S., Crawford, D.L., & Crawford, R.L. (1992). Influence of aromatic substitution patterns on azo dye degradability by *Streptomyces spp.* and *Phanerochaete crysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **58**, 3605-3613.

Paszczynski, A., Pasti, M.B., Crawford, D.L., & Crawford, R.L. (1991). New approach to improve degradation of recalcitrant azo dyes by *Streptomyces spp.* and *Phanerochaete crysosporium*. *Enzyme Microb. Technol.*, **13**, 378-384.

Paszczynski, A. & Crawford, R.L. (1991a). Degradation of azo compounds by ligninase from *Phanerochaete crysosporium*: involvement of veratryl alcohol. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **178**, 1056-1063.

Paszczynski, A., Pasti-Grigsby, M.B., Goszczynski, S., & Crawford, D.L. (1992). Mineralization of sulfonated azo dyes and sulfanilic acid by *Phanerochaete*

*chryso sporium* and *Streptomyces chromofuscus*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **58**, 3598-3604.

Pedersen, G. & Schmidt, M. (1992). Removal of excess dye from new textiles. WO9218687.

Pedersen, A. H. & Kierulff, J. V. (1996). Bleaching process comprising use of phenol oxidizing enzyme, a hydrogen peroxide source and an enhancing agent. WO9612845 A1.

Pedersen, A. H. & Kierulff, J. V. (1996a). Bleaching process comprising use of phenol oxidizing enzyme, a hydrogen peroxide source and an enhancing agent. WO9612846.

Peralta-Zamora, P., Moares, S.G., Esposito, E., Antunes, R., Reyes, J. & Durán, N. (1998). Decolorization of pulp mill effluents with immobilized lignin and manganese peroxidase from *Phanerochaete chryso sporium*. *Environ. Technol.*, **19**, 521-528.

Peralta-Zamora, P., Esposito, E., Pelegrini, R., Goto, R., Reyes, J. & Durán, N. (1998a). Effluent treatment of pulp and paper, and textile industries using immobilized horseradish peroxidase. *Environ. Technol.*, **19**, 55-63.

Peralta-Zamora, P., Kunz, Moraes, S.G. de, Pelegrini, R., Moleiro, P. C., Reyes, J., & Durán, N., (1999). Degradation of reactive dyes. I. Comparative study of ozonation, enzymatic and photochemical processes. *Chemosphere*, **38**, 835-852.

Perkowski, J., Kos, L., & Ledakowicz, S. (1996). Application of ozone in textile wastewater treatment. *Ozone Sci. Eng.*, **18**, 73-80.

Pérez, J., Martínez, J., & Rubia, T. (1996). Purification and partial characterization of laccase from the white rot fungus *Phanerochaete flavio-alba*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **62**, 4263-4267.

- Pickard, M.A., Kadima, T.A., & Carmichael, R.D. (1991). Chloroperoxidase, a peroxidase with potential. *J. Ind. Microbiol.*, **7**, 99-102.
- Pickard, M.A., Roman, R., Tinoco, R., & Vasquez-Duhalt, R. (1999). Polycyclic aromatic hydrocarbon metabolism by white rot fungi and oxidation by *Coriolopsis gallica* UAMH 8260 laccase. *Appl. Environ. Microbiol.*, **65**, 3805-3809.
- Pfaller, R., Amann, M., Freudenreich, J. (1998). Analysis of laccase and mediator interactions in the LMS. Volume A (7<sup>th</sup> Int. Conf. on Biotechnol. Pulp and Paper Industry), 99-102. Vancouver. Canada.
- Phillips, D. (1996). Environmental friendly, productive and reliable: priorities for cotton dyes and dyeing processes. *J. S. D. C.*, **112** (7/8), 183-186.
- Pickard, M.A., Roman, R., Tinoco, R., & Vasquez-Duhal, R. (1999). Polycyclic aromatic hydrocarbon metabolism by white rot fungi and oxidation by *Coriolos gallica* UAMH8260 laccase. *Appl. Environ. Microbiol.*, **65**, 3806-3809.
- Picquadio, P., De Stefano, G., Sammartino, M., & Sciancalepore, V. (1997). Phenols removal from juice by laccase immobilized on Cu<sup>2+</sup>-chelate regenerable carrier. *Biotechnol. Techniques.*, **11** (7), 515-517.
- Potthast, A., Rosenau, T., Chen, C.L., & Gratzl, J.S. (1995). Selective enzymatic oxidation of aromatic methyl groups to aldehydes. *J. Org. Chem.*, **60**, 4320-4321.
- Potthast, A., Koch, H., Fisher, K. (1997). The laccase-mediator-system reaction with model compounds and pulp. . Volume F (9<sup>th</sup> Int. Symp. on Wood and. Pulp Chemistry), 2-4. Montreal. Canada.
- Potthast, A., Rosenau, T., Koch, H., & Fischer, K. (1999). The reaction of phenol model compounds in the laccase-mediator system (LMS) - investigations by matix

assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS). *Holzforschung*, **53**, 175-180.

- Potthast, A., Rosenau, T., Chen, C.L., & Gratzl, J.S. (2000). A novel method for the conversion of benzylalcohols to benzaldehydes by laccase-catalysed oxidation. *J. Mol. Catal.*, **108**, 5-9.
- Raghukumar, C., Raghukumar, S., Chinnaraj, A., Chandramohan, D., D'Sousa, T.M., & Reddy, C.A. (1994). Laccase and other ligninocellulose modifying enzymes of marine fungi isolated from coast of India. *Botanica Marina*, **37**, 515-523.
- Rama, R., Mougin, C., Boyer, F.D., Kollmann, A., Malosse, C., & Sigoillot, J.C. (1998). Biotransformation of benzo[a]pyrene in bench scale reactor using laccase of *Pycnoporus cinnabarinus*. *Biotechnol. Lett.*, **20**, 1101-1104.
- Reife, A., & Freeman, H.S. (1996) Carbon adsorption of dyes and selected intermediates. In *Environmental Chemistry of Dyes and Pigments*; Reife, A., Freeman, H.S. Eds.; John Wiley & Sons Inc., New York, 3-31
- Rodriguez, R., Pickard, M.A., & Vasquez-Duhal, R. (1999). Industrial dye decolorization by laccase from ligninolytic fungi. *Curr. Microbiol.*, **38**, 27-32.
- Rogalski, J., Józwick, E., Hatakka, A., & Leonowicz, A. (1995). Immobilization of laccase from *phlebia radiata* on controlled porosity glass. *J. Mol. Cat. A.*, **95**, 99-108.
- Roper, J.C., Sarkar, J.M., & Bollag, J.M. (1995). Enhanced enzymatic removal of chlorophenols in the presence of co-substrates. *Wat. Res.*, **29**, 2720-2724.
- Rosenau, T., Potthast, A., Chen, C.L., & Gratzl, J.S. (1996). A mild, simple and general procedure for oxidation of benzyl alcohols to benzaldehydes. *Synth. Comm.*, **26**, 315-320.

- Roure, P., Delattre, P., Froger, H. & Perma. (1992). Composition for an enzymatic coloration of keratin fibres, especially for hair and its use in dyeing process. EP504005 A1.
- Roy-Arcand, L. & Archibald, F.S. (1991). Direct decolorization of chlorophenolic compounds by laccases from *Trametes (coriolus) versicolor*. *Enzyme Microb. Technol.*, **13**, 194-203.
- Ruttimann-Johnson, C., & Lamar, R.T. (1996). Polymerization of pentachlorophenol and ferulic acid by fungal extracellular lignin-degrading enzymes. *Appl. Environ. Microbiol.*, **62**, 3890-3893.
- Sundaramoorty, M., Turner, J., & Poulos, T.L.(1998). Stereochemistry of the chloroperoxidase active site: crystallographic and molecular-modeling studies. *Chem. Biol.*, **5**, 461-473.
- Saruno, R. (1991). Fixed type constant velocity universal joint. JP9177813 A2.
- Schacht, H., Kronen, R., Cleve, E., Denter, U., Kesting, W., & Schollmeyer, E. (1998). Perspectives of enzymatic processes in textile finishing II. *Textilveredlung*, **33**, 1-2, 8-13
- Scheller, F., Wollenberger, U., & Makower, A. (1994). Biosensor. DE4314417.
- Schliephake, K., Lonergan, G.T., Jones, C.L., & Mainwaring, D.E. (1993). Decolourisation of a pigment plant effluent by *Pycnoporus cinnabarinus* in a packed-bed bioreactor. *Biotech. Lett.* **15**, 1185-1188.
- Schliephake, K., & Lonergan, G.T. (1996). Laccase variation during dye decolourisation in a 200L packed-bed bioreactor. *Biotechnol. Lett.*, **18**, (8) 881-886.

- Schneider, P., Carpersen, M.B., Mondorf, K., Halkier, T., Skov, L.K., Østergaard, P.R., Brown, K.M., Brown, S.H., & Xu, F. (1999). Characterization of a *Coprinus cinereus* laccase. *Enzyme Microb. Technol.*, **25**, 502-508.
- Sealey, J., Ragauskas, & A.J. (1998). Residual lignin studies of laccase-delignified kraft pulps. *Enzyme Microb. Technol.*, **23**, 422-426.
- Sengupta, N.D.S. & Murkherjee, M. (1997). Importance of laccase in vegetative growth of *Pleurotus florida*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **63**, 4122
- Siddique, M.H., St. Pierre, C.C., Biswas, N., Bewtra, J.K., & Taylor, K.E. (1993). Immobilized enzyme catalysed removal of 4-chlorophenol from aqueous solution. *Wat. Res.*, **27**, 883-890.
- Smith, M., Thurston, C.F., & Wood, D.A. (1997). Fungal laccases. Role in delignification and possible industrial applications. In World Scientific (Ed.), *Multi-cooper oxidizes* Singapore: Messersschmidt, A. Ed., 201-224.
- Shin, K.-S., Oh, I.K., & Kim, C.-J., (1997). Production and purification of Remazol Brilliant Blue R decolorizing peroxidase from the culture filtrate of *Pleurotus*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **63**, 1744-1748.
- Sørensen, K., Ingvorsen, K., & Møllgaard, A. (1993). Novo Nordisk Biotech. WO4259318.
- Spadaro, J.T., Gold, M.H., & Renganathan, V. (1992). Decolorization of azo dyes by lignin-degrading fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **58**, 2397-2401.
- Srinivasan, C., D'Sousa, T.M., Boominathan, K., & Reddy, C.A. (1995). Demonstration of laccase in white rot basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium* BKM-F1767. *Appl. Environ. Microbiol.*, **61**, 4274-4277.
- Sugumarán, M. (1995). A caustic about the azide anhibition of enzymes associated with electrophilic metabolites. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **212**, 834-839.

- Swamy, J., & Ramsay, J.A., (1999). The evaluation of white rot fungi in the decoloration of textile dyes. *Enzyme Microb. Technol.*, **24**, 130-137.
- Tien, M., & Kirk, T.K. (1983). Lignin-degrading enzyme from the hymenomycete *Phenerochaete chrysosporium*. *Science*, **221**, 661-663.
- Timofeevski, S.L., Nie, G., Reading, N.S., & Aust, S.D. (1999). Addition of veratryl alcohol oxidase activity to manganese peroxidase by site-directed mutagenesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **256**, 500-504.
- Thurston, C.F. (1994). The structure and function of fungal laccases. *Mycrobiology*, **140**, 19-26.
- Tyndal, R.M. (1992). Improving the softness and surface appearance of cotton fabrics and garments by treatment with cellulase enzymes. *Tex. Chem. Color.*, **24** (6), 23-26.
- Ullah, M.A., Bedford, C.T., & Evans, C.S. (2000). Reactions of pentachlorophenol with laccase from *Coriolus versicolor*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **52**, 230-234.
- Viterbo, A., Yagen, B., & Mayer, A.M. (1993). Cucurbitacins, "attack" enzymes and laccase in *Botrytis cinerea*. *Phytochemistry*, **32**, 61-65.
- Vyas, B.R.M. & Molitoris, H.P. (1995). Involvement of an extracellular H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-dependent ligninolytic acting on the White-rot fungus *Pleurotus ostreatus* in the decolorization of Remazol Brilliant Blue R. *Appl. Environ. Microbiol.*, **61**, 3919-3927.
- Volc, J. & Eriksson, K-E. (1988). Pyranose-2-oxidase activity from *Phanerochaete chrysosporium*. *Methods Enzymol.* , **161**, 316-322.
- Walker, V., Griffin, M. Noé, J., Morón, M., Marchant, R., Magni, A., & Meda, F. (1996) Repor of Pilot Project - Biotecnology Application in the Europe Textile Sector: The current impact of biotechnology in four European regions. A review



of the technological developments and applications for European competitiveness.  
<http://science.ntu.ac.uk/research/bemet/Publications>

- Wariishi, H., Valli, K., & Gold, M.H. (1992). Manganese (II) oxidation by manganese peroxidase from basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium* –Kinetic mechanisms and role of chelators. *J. Biol. Chem.*, **267**, 23688-23695.
- Weise, F.W., Chang, H.C., Lloyd, R.V., Freeman, J.P., & Samokyszyn, V.M. (1998). Peroxidase-catalysed oxidation of 2,4,6-trichlorophenol. *Arch. Environm. Contam. Toxicol.*, **34**, 217-222.
- Westermarck, U., & Eriksson, K-E. (1974). Cellobiose quinone oxidoreductase, a new wood-degrading enzyme from white-rot fungi. *Acta Chem. Scand. B*, **28**, 209-214.
- Willmott, N., Guthrie, J., & Gordon, N. (1998). The biotechnology approach to colour removal from textile effluent. *J. S. D. C.*, **114**, 38-44.
- Woerner, D.L. & Wheeler, N.E. (1993). How mills can save money while treating wastewater. *Textile world*, **5**, 65
- Wong, Y., Kathyn, B., Anderson, R., & Kibblewhite, R.P. (1999). Effects of the laccase-mediator system on handsheet properties of two high kapp kraft pulps. *Enzyme Microbiol. Technol.*, **25**, 125-131.
- Wu, J., Taylor, K. E., Bewtra, J.K., & Biswas, N. (1993) Optimization of the reaction conditions for enzymatic removal of phenol from wastewater in the presence of polyethylene glycol. *Wat. Res.*, **27**, 1701-1706.
- Wu, Y., Taylor, K. E., Biswas, N., & Bewtra, J.K. (1997). Comparasion of additives in the removal of phenolic compounds by peroxidase-catalysed polymerization. *Wat. Res.*, **31**, 2699-2704.

- Xu, F. (1996). Oxidation of phenols, anilines, and benzenethiols by fungal laccases: correlation between activity and redox potentials as well as halide inhibition. *Biochemistry*, **35**, 7608-7616.
- Xu, F. (1996a). Cooper containing oxidases useful as iodide oxidases. WO9616165 A1.
- Xu, F. (1997). Effects of redox potential and hydroxide inhibition on the pH activity of fungal laccases. *J. Biol. Chem.*, **10**, 924-928.
- Xu, H., Lai, Y.Z., Slomczynski, D., Nakas, J.P., & Tanenbaum, S.W. (1997a). Mediator assisted selective oxidation of lignin model compounds by laccase from *Botrytis cinerea*. *Biotechnol. Lett.*, **19**, 957-960.
- Xu, F., Berka, R.M., Wahleithner, J.A., Nelson, B.A., Shuster, J.R., Brown, S.H., Parmer, A.E., & Solomon, E.I. (1998). Site-directed mutations in fungal laccase: effect on redox potential, activity and pH profile. *Biochem. J.*, **334**, 63-70.
- Xu, F. (1999). Recent progress in laccase study: properties, enzymology, production, and applications. Flickinger M.C. and Drew, S. W.. New York. In the encyclopedia of bioprocessing technology: fermentation, biocatalysis and bioseparation. John Wiley and Sons, Eds., 1545-1554
- Xu, F., Kulys, J., Duke, K., Li, K., Kristopaitis, K., Deussen, H.-J.W., Abbate, E., Galinyte, V., & Schneider, P. (2000). Redox chemistry in laccase-catalysed oxidation of *N*-hydroxy compounds. *Appl. Environ. Microbiol.*, **66**, 2052-2056.
- Yang X. D., & Buschle-Diller, G. (2000). Optimization of enzymatic cotton preparation. Book of abstracts, Symp. on Biotechnol. Textile Industry, Póvoa de Varzim, Portugal, 15.
- Yaropolov, A.I., Skorobogat'ko, O.V., Vartanov, S.S., & Varfolomeyev, S.D. (1994). Laccase. Properties, catalytic mechanism and applicability. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **49**, 257-280.

- Yaver, D.S., Xu, F., Golightly, E.J., Brown, K.M., Brown, S.H., Rey, M.W., Schneider, P., Halkier, T., Mondorf, K., & Dalbøge, H. (1996). Purification, characterization, molecular cloning, and expression of two laccase genes from white rot basidiomycete *Trametes villosa*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **62**, 834-841.
- Yaver, D.S., Overjero, M.D., Xu, F., Nelson, B.A., Brown, K.M., Halkier, T., Bernauer, S., Brown, S.H., & Kauppinen, S. (1999). Molecular characterization of laccase genes from the basidiomycete and heterologous expression of laccase 1cc1. *Appl. Environ. Microbiol.*, **65**, 4943-4948.
- Yoon, M. Y. (1998). Process for improved shrink resistance in wool. WO9827264.
- Yu, J. & Wong, Y. (1999). Laccase-catalysed decolorization of syntetic dyes. *Wat. Res.*, **33**, 3512-3520.
- Zhang, T., Zhao, Q.X., Huang, H., Li, Q., Zhang, Y., & Qi, M. (1998). Kinetic study on the removal of toxic phenol and chlorophenol from waste water by horseradish peroxidase. *Chemosphere*, **37**, 1571-1577.
- Zhao, S.S., & Luong, J.H.T. (1996). An electrocatalytic approach for the measurement of chlorophenols. *Anal. Chem. Acta.*, **327**, 235-242.
- Zollinger, H. (1987) In *Colour Chemistry. Syntheses, Properties and Applications of Organic Dyes and Pigments*; Ebel, H. F., Dyllick-Brenzinger, C., Eds.; New York, 85-150
- Zouari, N., Roumette, J.-L., & Thomas, D. (1994). Laccase electrode for the continuous flow determination of phenolic compounds. *Biotechnol. Techniques*, **8**, 503-508.

## ANEXO I

### Preparação dos corantes I-III

Arrefeceu-se uma mistura de *p*-aminobenzidina (3,94 g, 0,02 moles) em água (40 mL) e HCl concentrado (35 %, 6 mL) a 5°C (banho de gelo/acetona) e adicionou-se uma solução de NaNO<sub>2</sub> 5N (4 mL).

Deixou-se em agitação até a diazotação terminar (confirmou-se com papel de amido-iodeto), cerca de 30 minutos.

A uma mistura do componente de acoplamento (3-metilfenol, 2,5-dimetilfenol ou ácido 3-aminobenzenossulfônico, 0,02 moles) em água (30 mL) juntou-se NaOH para manter o pH entre 8-9. Arrefeceu-se a solução resultante a 5°C e adicionou-se-lhe lentamente a solução do sal de diazônio. Manteve-se a temperatura entre 5 a 10°C e o pH a 8.

Quando terminou a reacção de acoplamento adicionou-se HCl concentrado (35 %) até pH 7. Filtrou-se o corante que precipitou, lavou-se com água destilada e secou-se a 80°C. O produto foi obtido com grau de pureza superior a 95 %.

### Preparação dos corantes IV

Arrefeceu-se uma mistura de ácido 3-aminobenzenossulfônico (3,46 g, 0,02 moles) em água (40 mL) e HCl concentrado (35 %, 6 mL) a 5°C (banho de gelo/acetona) e adicionou-se uma solução de NaNO<sub>2</sub> 5N (4 mL).

Deixou-se em agitação até a diazotação terminar (confirmou-se com papel de amido-iodeto), cerca de 15 minutos.

Arrefeceu-se uma mistura de 1-naftilamina (2,86 g, 0,02 moles) em água (30 mL) e HCl concentrado (35%, 2,1 mL) a 5°C e adicionou-se lentamente a solução do composto diazônio. Juntou-se de CH<sub>3</sub>COONa 5N para manter o pH entre 4 e 5. Manteve-se a solução resultante à temperatura ambiente com agitação durante 6 horas.

Quando terminou a reacção de acoplamento filtrou-se o corante monoazo que precipitou por adição de NaCl (15 g), lavou-se com água destilada e secou-se a 80°C. O produto foi obtido com grau de pureza superior a 85 %.

Arrefeceu-se uma mistura do corante monoazo (3,27 g, 0,01 moles) em água (30 mL) e HCl concentrado (35%, 3,1 mL) a 5°C (banho de gelo/acetona) e adicionou-se uma solução de NaNO<sub>2</sub> 5N (2 mL).

Deixou-se em agitação até a diazotação terminar (confirmou-se com papel de amido-iodeto), cerca de 2 horas.

Arrefeceu-se uma mistura de ácido salicílico (1,38 g, 0,01 moles) em água (20 mL) e NaOH 5N (4 mL) a 5°C (banho de gelo/acetona) e adicionou-se lentamente a solução de diazônio. Manteve-se o pH a 8.

Quando terminou a reacção de acoplamento adicionou-se HCl concentrado (35%) para baixar o pH para 3. Filtrou-se o corante que precipitou por adição de NaCl (10 g), lavou-se com água destilada e secou-se a 80°C. O produto foi obtido com grau de pureza superior a 80 %.

#### Preparação dos corantes V-VII

Arrefeceu-se uma mistura do corante monoazo ((A) ou (B), Figura 3-4) (0,02 moles) em água (80 mL) e HCl concentrado (35 %, 5 mL) a 5°C (banho de gelo/acetona) e adicionou-se uma solução de NaNO<sub>2</sub> 5N (4 mL).

Deixou-se em agitação forte até a diazotação terminar (confirmou-se com papel de amido-iodeto), cerca de 1 horas.

A uma solução de componente de acoplamento fenólico (0,02 moles) em água (50 mL) juntou-se NaOH para manter o pH a 8. Arrefeceu-se a solução resultante a 5°C e adicionou-se-lhe lentamente a solução do sal de diazônio.

Quando terminou a reacção de acoplamento (10 minutos) filtrou-se o corante que precipitou por adição de NaCl (25 g), lavou-se com água destilada e secou-se a 80°C. O produto foi obtido com grau de pureza superior a 80 %.