

XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

Aplicação de Lacases Bruta e Comercial na Descoloração de Misturas de Corantes das Classes Antraquinona, Azo e Trifenilmetano

Fernanda Bettin¹, Nicole Amanda Boff¹, Rochele Santos da Conceição¹,
Mauricio Moura da Silveira¹, Aldo José Pinheiro Dillon¹

¹Universidade de Caxias do Sul – Instituto de Biotecnologia
Caixa Postal 1352 – 95070-560 – Caxias do Sul/RS – E-mail: fbettin@ucs.br

RESUMO

Neste trabalho, avaliou-se a descoloração de misturas de corantes antraquinona, azo e trifenilmetano com lacases bruta (de *Pleurotus sajor-caju* PS-2001) e comercial (*DeniLite II*) e diferentes concentrações dos mediadores redox HBT e SYR. Para a mistura de corantes antraquinona, maior percentual (40%) foi obtido com 0,3 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ de HBT; para as misturas de trifenilmetano e de todos os corantes, obteve-se 28% de descoloração com 0,5 e 0,3 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ de HBT, respectivamente. Nessas condições, a enzima comercial mostrou resultados superiores. Porém, para a mistura de azo-corantes, lacase bruta de *P. sajor-caju* proporcionou 32% de remoção de cor com 0,5 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ de HBT, todos após 168 horas de incubação. Em geral, percentuais de descoloração superiores foram mensurados com HBT para lacase comercial e com SYR para lacase bruta. Os resultados mostraram que essas oxidases possuem potencial para aplicação na descoloração de misturas de corantes complexos, comumente presentes em efluentes da indústria têxtil.

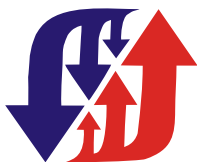
Palavras-chave: *Pleurotus sajor-caju*, corantes, lacases, *DeniLite II*, descoloração.

INTRODUÇÃO

Lacases catalisam a oxidação de aminas fenólicas e aromáticas, representando uma alternativa promissora para processos biotecnológicos de interesse ambiental, como branqueamento de polpa de celulose, oxidação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, detoxificação de efluentes e poluentes ambientais, remoção de fenóis e descoloração de corantes têxteis. Além disso, também podem ser utilizadas nas indústrias cosmética, química, farmacêutica, de alimentos, de bebidas e como biossensores ambientais (Tinoco *et al.*, 2001; Dhawan *et al.*, 2005; Couto & Herrera, 2006; Munari *et al.*, 2007; Schmitt *et al.*, 2012).

O uso de corantes em processos das indústrias têxtil, de papel, farmacêutica, cosmética e alimentícia vem sendo empregado há muito tempo e a disponibilidade comercial desses compostos é ampla (Guaratini & Zanoni, 1999; Ciullini *et al.*, 2008). Dentre as possíveis aplicações dos corantes, a indústria têxtil os utiliza em maior escala, no tingimento de tecidos. Devido a essa demanda, milhões de compostos químicos coloridos foram sintetizados nos últimos 100 anos e cerca de 10.000 são produzidos em escala industrial. Atualmente, cerca de 2.000 tipos de corantes estão disponíveis para a indústria têxtil (Guaratini & Zanoni, 1999).

Alguns microrganismos vêm sendo estudados pela sua capacidade de degradar compostos poluentes, como os corantes (Soares *et al.*, 2002). O uso lacases fúngicas em processos de remoção de cor é uma alternativa biotecnológica viável, pois essas enzimas atuam oxidando anéis aromáticos presentes na estrutura química dos corantes e descolorindo uma ampla variedade desses compostos (Rodríguez *et al.*, 1999). Diante disto, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito de extratos enzimáticos bruto e comercial e de diferentes concentrações de mediadores redox sobre a descoloração de misturas de corantes pertencentes aos grupos cromóforos antraquinona, azo e trifenilmetano.



XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

MATERIAL E MÉTODOS

Enzimas – Extratos brutos de lacases de *Pleurotus sajor-caju* PS-2001 foram produzidos em biorreator com agitação mecânica (Bettin *et al.*, 2011). A enzima comercial utilizada foi *Denilite*[®] II (Novozymes), obtida de *Aspergillus oryzae* em cultivo submerso. Os dois caldos enzimáticos foram utilizados em concentrações de 50 U.mL⁻¹ de lacases.

Corantes – Foram preparadas misturas em proporções iguais de corantes de diferentes grupos cromóforos, sendo quatro da classe antraquinona (*Acid Blue* 80, *Acid Green* 28, *Reactive Blue* 220 e *Remazol Brilliant Blue* R), dez da classe azo (*Acid Red* 315, *Congo Red*, *Disperse Blue* 79, *Disperse Orange* 30, *Disperse Red* 324, *Levafix Brilliant Red* E-4BA, *Levafix Golden Yellow* E-G, *Orange G*, *Reactive Red* 198 e *Reactive Yellow* 15) e oito da classe trifenilmetano (*Brilliant Green*, *Bromocresol Green*, *Bromophenol Blue*, *Coomassie Brilliant Blue* G-250, *Gentian Violet*, *Malachite Green*, *Methyl Violet* e *Phenol Red*). Uma mistura de todos os corantes também foi preparada em proporções iguais, totalizando 22 corantes. As soluções individuais de corantes foram preparadas em concentração de 50 mg.L⁻¹.

Mediadores redox – Foram utilizados os compostos hidroxibenzotriazol (HBT) e siringaldazina (SYR), preparados em concentração de 5 mmol.L⁻¹. Nas misturas reacionais, as concentrações finais testadas foram de 0,1, 0,3 e 0,5 µmol.L⁻¹ de cada mediador.

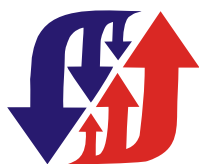
Espectrofotometria de varredura dos corantes – O comprimento de onda para leitura das misturas reacionais foi determinado por varredura, no espectro de luz visível (350 a 750 nm), em espectrofotômetro *Molecular Devices - SpectraMax* 190. Os valores de leitura das amostras foram de 624 nm para corantes da classe antraquinona, 494 nm para a classe azo, 525 nm para a classe trifenilmetano e 587 nm para a mistura de todos os corantes.

Determinação da atividade de lacases – Lacases foram quantificadas pela oxidação do substrato ABTS em tampão acetato de sódio pH 5,0 por 90 segundos a 25°C, em 420 nm (Wolfenden & Willson, 1982).

Testes de descoloração – Em frascos Duran de 50 mL, foram adicionados 10 mL de cada mistura de corantes e 10 mL de cada extrato enzimático (bruto e comercial), avaliados separadamente. Os mediadores, em concentrações específicas, foram acrescentados e os frascos foram mantidos em banho termostático sem agitação, em temperatura de 35°C. Amostras foram coletadas diariamente, em triplicata, do tempo 0 até 168 horas, para as leituras em espectrofotômetro, no comprimento de onda específico para cada mistura realizada.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

Na Tabela 1, são apresentados os resultados obtidos no teste de descoloração de misturas de corantes das classes antraquinona, azo e trifenilmetano, utilizando caldos enzimáticos de lacases bruta e comercial e os mediadores HBT e SYR. Verifica-se, de uma forma geral, que para os controles e para as misturas contendo diferentes concentrações do mediador HBT, os percentuais de descoloração foram superiores com o uso da enzima comercial. Entretanto, na presença do mediador redox SYR, a remoção de cor, em alguns casos, foi superior para lacases de *P. sajor-caju* PS- 2001, que foram mais eficientes com relação à preparação comercial. Dentre as condições testadas, somente em duas delas não foi observada descoloração, uma utilizando caldo enzimático bruto (controle) e outra com lacase comercial (0,3 µmol.L⁻¹ do mediador SYR), mas ambas para a mistura de azo-corantes. Em todos os testes, na presença de *DeniLite* II, a mistura de corantes antraquinona mostrou percentuais de descoloração mais elevados com relação às demais, o que não ocorreu com o extrato enzimático bruto de *P. sajor-caju* PS- 2001, que não apresentou esse padrão para uma classe específica de corantes.



XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

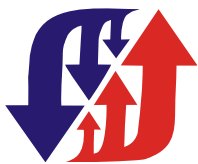
Tabela 1. Percentual máximo de descoloração de misturas de corantes das classes antraquinona, azo e trifenilmetano após reação de até 168 horas com 50 U.mL⁻¹ de lacases bruta e comercial a 35°C.

ENZIMA		LACASE BRUTA DE <i>Pleurotus sajor-caju</i> PS-2001		LACASE COMERCIAL (<i>DeniLite II</i>)	
		PERCENTUAL DE DESCOLORAÇÃO / TEMPO (horas)			
TRATAMENTO	MISTURA	%	t (h)	%	t (h)
Controle (sem mediador)	Antraquinona	3,36	24	31,6	96
	Azo	ND*	---	10,5	168
	Trifenilmetano	2,67	24	18,0	168
	Todos	2,47	24	15,0	168
0,1 µmol.L ⁻¹ do mediador HBT	Antraquinona	9,21	24	37,5	168
	Azo	3,97	24	6,70	168
	Trifenilmetano	7,75	24	22,8	168
	Todos	5,93	24	26,1	168
0,3 µmol.L ⁻¹ do mediador HBT	Antraquinona	16,4	24	40,3	168
	Azo	13,0	24	17,9	168
	Trifenilmetano	7,93	48	26,4	168
	Todos	5,93	24	28,3	168
0,5 µmol.L ⁻¹ do mediador HBT	Antraquinona	12,1	24	30,9	96
	Azo	8,13	24	19,9	168
	Trifenilmetano	12,2	48	28,2	168
	Todos	8,43	24	25,2	168
0,1 µmol.L ⁻¹ do mediador SYR	Antraquinona	16,7	24	28,8	168
	Azo	32,2	168	13,4	168
	Trifenilmetano	5,63	24	11,8	168
	Todos	12,2	24	19,1	168
0,3 µmol.L ⁻¹ do mediador SYR	Antraquinona	25,2	168	26,8	48
	Azo	12,9	168	ND*	---
	Trifenilmetano	11,0	96	22,5	168
	Todos	23,8	168	23,1	168
0,5 µmol.L ⁻¹ do mediador SYR	Antraquinona	17,4	168	29,4	168
	Azo	19,8	168	2,73	168
	Trifenilmetano	5,00	168	26,5	168
	Todos	19,9	168	27,5	168

*ND - Descoloração não observada.

A oxidação de corantes por lacases é facilitada quando esses compostos são tratados individualmente. Porém, misturas de corantes são mais complexas e resistentes à descoloração. Conforme a Tabela 1, os percentuais mais elevados de descoloração foram de 20 a 40%. Em geral, com o uso de HBT como mediador e da menor concentração de SYR (0,1 µmol.L⁻¹), a descoloração máxima foi obtida antecipadamente com lacases de *P. sajor-caju* PS-2001, geralmente em 24 horas de reação. É importante ressaltar que essas enzimas são provenientes de um caldo bruto, que não passou por nenhuma etapa de purificação, enquanto a preparação comercial, que está no mercado desde 1999, provém de um extrato enzimático purificado e liofilizado, que é aplicado em larga escala na indústria têxtil, para a estonagem de *jeans*.

Em testes realizados com corantes dispersos, Schmitt *et al.* (2012) observaram que HBT e SYR aumentaram a descoloração utilizando peroxidases, mas esse efeito não foi observado para lacases. Guaratini & Zanoni (1999) relataram que corantes pertencentes à classe azo apresentam maior resistência à degradação e, por isso, necessitam de um mediador redox para melhorar a eficiência da descoloração. Corantes antraquinona, por serem mais suscetíveis à decomposição, também são estudados em misturas com corantes de outras classes para verificar um melhor efeito na descoloração. Assim, corantes que atingem maiores níveis



XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

de descoloração podem auxiliar na remoção de cor dos que apresentam maior resistência nesse processo (Forss & Welander, 2011). De acordo com Casas *et al.* (2009), corantes da classe trifenilmetano apresentam alta toxicidade, sendo prejudiciais à saúde humana, animal e ambiental. Compostos desse grupo são, também, altamente recalcitrantes (Yang *et al.*, 2011).

CONCLUSÕES

Os dados apresentados neste trabalho mostram que o tratamento de misturas de corantes com extratos enzimáticos bruto e comercial promovem percentuais de descoloração variados, dependendo da classe dos corantes. A adição de mediadores redox às misturas reacionais, em geral, aumenta os níveis de remoção de cor com relação aos controles (sem mediador). Extratos brutos de lacases de *P. sajor-caju* PS-2001 mostram resultados comparáveis aos obtidos com a enzima comercial na presença de diferentes concentrações de SYR. Os resultados indicam que lacases podem ser utilizadas na descoloração de misturas de corantes complexos, geralmente presentes em efluentes têxteis, e apontam o potencial do uso de lacases fúngicas na implementação de uma futura tecnologia de tratamento de compostos tóxicos e recalcitrantes, como é o caso dos corantes utilizados em diferentes segmentos industriais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bettin F, Rosa LO, Montanari Q, Calloni R, Gaio TA, Malvessi E, Silveira MM, Dillon AJP. 2011. Growth, kinetics, production, and characterization of extracellular laccases from *Pleurotus sajor-caju* PS-2001. *Process Biochem* 46:758-764.
- Casas N, Parella T, Vicent T, Caminal G, Sarrà M. 2009. Metabolites from the biodegradation of triphenylmethane dyes by *Trametes versicolor* or laccase. *Chemosphere* 75:1344-1349.
- Ciullini I, Tilli S, Scozzafava A, Briganti F. 2008. Fungal laccase, cellobiose dehydrogenase, and chemical mediators: Combined actions for the decolorization of different classes of textile dyes. *Bioresour Technol* 99:7003-7010.
- Couto SR, Herrera JLT. 2006. Industrial and biotechnological applications of laccases: A review. *Biotechnol Adv* 24:500-513.
- Dhawan S, Lal R, Hanspal M, Kuhad RC. 2005. Effect of antibiotics on growth and laccase production from *Cyathus bulleri* and *Pycnoporus cinnabarinus*. *Bioresour Technol* 96:1415-1418.
- Forss J, Welander U. 2011. Biodegradation of azo and anthraquinone dyes in continuous systems. *Int Biodeterior Biodegrad* 65:227-237.
- Guaratini CCI, Zanoni MVB. 1999. Corantes têxteis. *Quím Nova* 23:71-78.
- Munari FM, Gaio TA, Dillon AJP. 2007. Phenol degradation and colour removal in submerged culture of *Pleurotus sajor-caju* with paper mill effluents. *Biocatal Biotransform* 25:24-28.
- Rodríguez E, Pickard MA, Vazquez-Duhalt R. 1999. Industrial dye decolorization by laccases from ligninolytic fungi. *Curr Microbiol* 38:27-32.
- Schmitt S, Souza R, Bettin F, Dillon AJP, Valle JAB, Andreas J. 2012. Decolorization of aqueous solutions of disperse textile dyes by oxidoreductases. *Biocatal Biotransform* 30:48-56.
- Soares GMB, Amorim MTP, Hrdina R, Ferreira MC. 2002. Studies on the biotransformation of novel disazo dyes by laccase. *Process Biochem* 37:581-587.
- Tinoco R, Pickard MA, Vazquez-Duhalt R. 2001. Kinetic differences of purified laccases from six *Pleurotus ostreatus* strains. *Lett Appl Microbiol* 32:331-335.
- Wolfenden BS, Willson RL. 1982. Radical-cations as reference chromogens in the kinetic studies of one-electron transfer reactions: pulse radiolysis studies of 2,2'-azinobis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonate). *J Chem Soc Perkin Trans II* 02:805-812.
- Yang X, Wang J, Zhao X, Wang Q, Xue R. 2011. Increasing manganese peroxidase production and biodecolorization of triphenylmethane dyes by novel fungal consortium. *Bioresour Technol* 102:10535-10541.

Apoio: CAPES, FAPERGS e UCS.