



Fundação Educacional do Município de Assis  
Instituto Municipal de Ensino Superior de Assis  
Campus "José Santilli Sobrinho"

**PAULO SERGIO BORTOLUCCI**

**UTILIZAÇÃO DA ENZIMA LACASE PRODUZIDA PELO FUNGO  
*Pycnoporus sanguineus* NO USO DA BIODEGRADAÇÃO DO CORANTE  
REMAZOL BRILLANT BLUE UTILIZADO EM INDÚSTRIAS TÊXTEIS**

**Assis/SP  
2018**



Fundação Educacional do Município de Assis  
Instituto Municipal de Ensino Superior de Assis  
Campus "José Santilli Sobrinho"

**PAULO SERGIO BORTOLUCCI**

**UTILIZAÇÃO DA ENZIMA LACASE PRODUZIDA PELO FUNGO  
*Pycnoporus sanguineus* NO USO DA BIODEGRADAÇÃO DO CORANTE  
REMAZOL BRILLANT BLUE UTILIZADO EM INDÚSTRIAS TÊXTEIS**

Trabalho de pesquisa apresentado ao curso de Química Industrial do Instituto Municipal de Ensino Superior de Assis – IMESA e a Fundação Educacional do Município de Assis – FEMA, como requisito à obtenção do Certificado de Conclusão.

**Orientando:** Paulo Sérgio Bortolucci

**Orientadora:** Profª Msc. Flávia Augusta Marquezini

**Assis/SP  
2018**

FICHA CATALOGRÁFICA

BORTOLUCCI, Paulo Sérgio

**Utilização da Enzima Lacase Produzida pelo Fungo *Pycnoporus sanguineus* no Uso da Biodegradação do Corante Remazol Brilliant Blue Utilizado em Indústrias Têxteis** / Paulo Sérgio Bortolucci. Fundação Educacional do Município de Assis –FEMA – Assis, 2018.

47 páginas.

1. Potencialidade carcinogênica. 2. Resíduos de tingimento textil.

CDD:  
Biblioteca da FEMA

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO:

UTILIZAÇÃO DA ENZIMA LACASE PRODUZIDA PELO FUNGO *Pycnoporus sanguineus*  
NO USO DA BIODEGRADAÇÃO DO CORANTE REMAZOL BRILLANT BLUE  
UTILIZADO EM INDÚSTRIAS TÊXTEIS

PAULO SÉRGIO BORTOLUCCI

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto  
Municipal de Ensino Superior de Assis, como requisito do  
Curso de Graduação, avaliado pela seguinte comissão  
examinadora:

**Orientador:**

\_\_\_\_\_  
Prof<sup>a</sup> Msc. Flávia Augusta Marquezini

**Examinador:**

\_\_\_\_\_  
Prof<sup>a</sup> Msc. Gilcelene Bruzon

Assis/SP  
2018

## DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à Deus, e a minha  
namorada pelo apoio e suporte.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus por me dar a oportunidade de chegar onde estou hoje.

A minha orientadora, Flávia Marquezini, pela paciência e orientação durante o desenvolvimento do projeto.

Aos amigos que estiveram junto durante essa jornada, especialmente ao Tiago Fidemann, que com seus puxões de orelhas me deram força para terminar o projeto.

A minha namorada/futura esposa, Priscila Loose, que com paciência e carinho sempre me apoiou e esteve a meu lado.

A minha mãe, Aparecida, que ajudou e me apoiou, e de perto viu meu esforço.

A todos aqueles que direta ou indiretamente colaboraram com meu sucesso.

## RESUMO

Estima-se que o processamento têxtil tem contaminado os ecossistemas aquáticos, sendo 20% de resíduos de tingimento perdidos durante o processo, e até 50% da concentração inicial de corantes reativos, descarregada no banho de tingimento. O descarte desses resíduos têm trazido impactos drásticos ao meio ambiente a longo prazo, a biotransformação desses corantes pode ser responsável pela formação de aminas, benzidinas e outros intermediários com potencialidade carcinogênica. Com isso, a pesquisa sobre a utilização de enzimas provenientes de microrganismos ou plantas no tratamento de efluentes e na remoção de poluentes orgânicos, tem se mostrado uma alternativa promissora devido ao seu apelo ecológico, atuando como redutores da carga de resíduos para o sistema de tratamento biológico. A lacase é uma das principais enzimas utilizadas nesse processo, pois oxidam fenóis e estruturas ligninolíticas fenólicas pela abstração de um elétron com formação de radicais que podem repolimerizar ou levar a despolimerização. Este trabalho teve como objetivo analisar o efeito biodegradativo da enzima lacase sobre o corante Remazol Brilliant Blue. A lacase foi produzida pelo fungo *Pycnoporus sanguineus*, obtido na natureza, isolado para obtenção da enzima. Discos de micélios formados foram colocados em placas de Petri contendo meio ágar batata dextrose juntamente com 0,01% do corante, observando uma significativa descoloração do corante. Trabalhos posteriores deverão ser realizados para certificar a descoloração, bem como a taxonomia do fungo para definição da espécie.

**Palavras-chave:** potencialidade carcinogênica; resíduos de tingimento; repolimerizar.

## ABSTRACT

It is estimated that textile processing has contaminated aquatic ecosystems, with 20% of dye residues lost during the process, and up to 50% of the initial concentration of reactive dyes, discharged in the dyebath. The disposal of these wastes has brought drastic impacts to the environment in the long term, the biotransformation of these dyes can be responsible for the formation of amines, benzidines and other intermediates with carcinogenic potential. Thus, the research on the use of enzymes from microorganisms or plants in the treatment of effluents and the removal of organic pollutants has shown to be a promising alternative due to its ecological appeal, acting as reducing the waste load to the treatment system biological. Laccase is one of the main enzymes used in this process, because they oxidize phenols and phenolic ligninolytic structures by the abstraction of an electron with formation of radicals that can repolymerize or lead to depolymerization. This work aims to analyze the biodegradation effect of laccase enzyme on Remazol Brilliant Blue dye. The laccase was produced by the fungus *Pycnoporus sanguineus*, obtained in nature, isolated to obtain the enzyme without contaminants. Discs of formed mycelia were placed in Petri dishes containing potato dextrose agar medium along with 0.01% of the dye, observing a significant discoloration of the dye. Subsequent work should be performed to certify the discoloration as well as the taxonomy of the fungus to define the species.

**Keywords:** carcinogenic potential; waste dyeing; repolymerize.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Estrutura química de um azo corante.....	15
Figura 2 - Corante Remazol brilliant blue em concentração de 2ppm na água .....	18
Figura 3 - Estrutura em 3D da enzima lacase.....	26
Figura 4 - Esquema simplificado do sítio ativo de lacase do <i>Bacillus subtilis</i> , com as distâncias (em Å) entre os átomos mais importantes .....	30
Figura 5 - Diagrama da estrutura da lacase de <i>T. versicolor</i> . Disposições das cadeias polipeptídicas divididas em domínios estruturais, apresentando em diferentes códigos (D1-D3). Íons cobres são representados por esferas. Carboidratos e pontes dissulfetos são postados como barras (“stick models”). .....	31
Figura 6 - Ciclo catalítico da enzima lacase, mostrando o mecanismo de redução e oxidação dos sítios de cobre.....	32
Figura 7 - Fungo <i>Pycnoporus sanguineus</i> (Orelha de pau) adquirido da natureza .....	34
Figura 8 - Fungo <i>Pycnoporus sanguineus</i> (Orelha de pau) adquirido da natureza, exemplar utilizado no experimento. ....	34
Figura 9 - Placas petri com meio agar e disco de micélio do fungo <i>Pycnoporus sanguineus</i> (orelha de pau). ....	36
Figura 10 - Colônia isolada do fungo <i>Pycnoporus sanguineus</i> (orelha de pau) em placa de petri.....	37
Figura 11 - Halo de descoloração observado em desenvolvimento de colônia em placa petri contendo meio ágar e corante azul brilliant blue (0,02%). .....	37
Figura 12- Halo de descoloração observado em placa petri contendo corante azul brilliant blue (0,01%) em meio ágar. ....	38
Figura 13 – Fungo <i>Pycnoporus sanguineus</i> (orelha de pau) utilizado para coleta do material de análise, contaminado com <i>Trichoderma</i> . ....	39

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>11</b>
<b>2. CORANTES .....</b>	<b>13</b>
2.1. DEFINIÇÃO .....	13
2.2. ORIGEM DOS CORANTES .....	14
2.3. CLASSIFICAÇÃO .....	14
2.3.1. Corantes à Cuba .....	14
2.3.2. Corantes Ácidos (aniônico) .....	15
2.3.3. Corantes Azóicos .....	15
2.3.4. Corantes Branqueadores .....	16
2.3.5. Corantes de Enxofre .....	16
2.3.6. Corantes Diretos .....	16
2.3.7. Corantes Dispersivos .....	16
2.3.8. Corantes Pré-Metalizados .....	17
2.3.9. Corantes Reativos .....	17
2.4. TOXICIDADE DOS CORANTES .....	17
2.4.1. Meio ambiente .....	18
2.4.2. Aspectos Toxicológicos .....	19
2.4.3. Aspectos Ecológicos .....	20
2.5. TÉCNICAS DE TRATAMENTO DOS EFLUENTES .....	21
2.5.1. Floculação .....	22
2.5.2. Flotação .....	22
2.5.3. Eletroflotação .....	23
2.5.4. Eletrocoagulação .....	23
2.5.5. Eletrooxidação .....	23
2.5.6. Ozonização fotocatalítica .....	24
2.5.7. Processos Oxidativos Avançados (POA) .....	24
2.5.8. Eletrocinética .....	25
<b>3. LACASE .....</b>	<b>26</b>
3.1. DEFINIÇÃO .....	26
3.2. APLICAÇÕES .....	26
3.3. ESTUTURA E MECANISMOS DE AÇÃO .....	27
3.4. DESCOBERTA .....	28

3.5.	ESPECIFICIDADE .....	28
<b>4.</b>	<b>MATERIAIS E EQUIPAMENTOS.....</b>	<b>34</b>
4.1.	MICROORGANISMOS .....	34
4.2.	REAGENTES PARA PREPARO DOS MEIOS DE CULTIVO.....	35
4.3.	CORANTE .....	35
4.4.	EQUIPAMENTOS .....	35
<b>5.</b>	<b>MÉTODOS .....</b>	<b>36</b>
5.1.	COLETA DO MATERIAL.....	36
5.2.	PREPARO DO INÓCULO .....	36
<b>6.</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>38</b>
<b>7.</b>	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>40</b>
<b>8.</b>	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>41</b>

## 1. INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, o nível de compostos xenobióticos nos ecossistemas aquáticos tem aumentado de forma alarmante, como resultado da atividade antropogênica sobre o meio ambiente. Neste contexto, o setor têxtil apresenta destaque, uma vez que o efluente gerado pela indústria deste segmento é classificado como o mais poluidor entre os setores industriais. Os processos têxteis são grandes consumidores de água e de corantes sintéticos, geradores de efluentes com intensa coloração e ricos em compostos orgânicos, aliado ao teor de sais inorgânicos. Estima-se que aproximadamente 20% da carga de corantes seja perdido nos resíduos de tingimento durante o processamento têxtil, enquanto, para os corantes reativos, até 50% da concentração inicial do corante é descarregada no banho de tingimento (AZMI; BANERLLE, 2001).

A quantidade exata de corantes produzidos e de corantes despejados no meio ambiente é desconhecida, mas estima-se uma produção mundial de 10.000 t/ano, enquanto as perdas são de 1% na produção e de 1% a 10% na aplicação (FORGACS; CSERHÁTI; OROS, 2004). Uma pequena quantidade de corante (10 a 50 mg/L<sup>-1</sup>) é bastante visível e afeta a estética, a transparência e a solubilidade de gases em corpos aquáticos (SPONZA; ISIK, 2004).

Vários métodos físicos e químicos, são empregados para o tratamento de efluentes contaminados. Alguns desses processo tem custo elevado e nem sempre é eficiente no tratamento de efluentes que apresentam corantes em sua composição. Muitas enzimas, são responsáveis pela degradação de vários poluentes orgânicos. A utilização de enzimas provenientes de microorganismos ou plantas no tratamento de efluentes e na remoção de poluentes orgânicos mostra-se uma alternativa promissora devido ao seu apelo ecológico. Empregados como tratamento primário, os processos enzimáticos atuam reduzindo a carga para o sistema de tratamento biológico (BARR, AUST, 1994 a; b; POINTING, 2001).

As lacases são consideradas verdadeiras fenoloxidasas e oxidam fenóis e estruturas ligninolíticas fenólicas pela abstração de um elétron com formação de radicais que podem repolimerizar ou levar a despolimerização (HIGUCHI, 1989). Alguns fungos, aparentemente, apresentam os dois tipos de exoenzimas (peroxidases e lacases) enquanto

outros podem ter um ou o outro tipo (TUOR, WINTERHALTER, FIECHTER, 1995; HOFRICHTER, 2002).

As lacases são enzimas que catalisa uma grande variedade de substratos orgânicos e inorgânicos incluindo mono-, di- e polifenóis, aminofenóis, metoxifenóis e aminas aromáticas com concomitante redução de oxigênio para água. As lacases vêm sendo estudadas para várias aplicações biotecnológicas, tais como a biotransformação de xenobióticos e efluentes industriais, a descoloração de corantes, a biorremediação de solos contaminados, a produção de bioetanol, a clarificação de vinhos e chás e a produção de biossensores (DURÁN, 2002; MORENO, IBARRA, FERNÁNDEZ, 2012; PLÁCIDO, IMAM, CAPAREDA, 2013)

O trabalho foi desenvolvido com o objetivo de estudar da decomposição do corante usado nas indústrias têxteis utilizando a enzima lacase produzida por fungos.

## 2. CORANTES

### 2.1. DEFINIÇÃO

Os corantes sintéticos são extensivamente usados em muitas indústrias incluindo a têxtil, a de papel, tipografias, cosméticas e farmacêuticas (MURUGESAN et al., 2007).

Calcula-se que, aproximadamente, 800.000 toneladas/ano de corantes são utilizados pelas indústrias e estima-se que 10 a 15% dos corantes não se fixam às fibras, sendo liberados durante o processo de tingimento (PALMIERI, CENNAMO, SANNIA, 2005; MURUGESAN et al., 2007).

As indústrias têxteis consomem grandes volumes de água (tipicamente 200 – 400L são necessários para produzir 1 kg de tecido) e produtos químicos durante os processos têxteis a úmido. Os produtos químicos utilizados neste ramo compreendem compostos inorgânicos, polímeros e produtos orgânicos. Os corantes têxteis mais utilizados são os corantes ácidos, básicos, dispersos, azos, diazos, baseados em antraquinona e corantes de metais complexos (PERUZZO, 2003).

Na indústria têxtil o processo de tingimento é um dos fatores fundamentais no sucesso comercial dos produtos. Além da padronização e beleza da cor, o consumidor normalmente exige algumas características básicas do produto como elevado grau de fixação em relação à luz, além de lavagem e transpiração, tanto inicialmente quanto após o uso prolongado. Para garantir essas propriedades, as substâncias que conferem coloração à fibra devem apresentar alta afinidade, uniformidade na coloração, resistência aos agentes desencadeadores do desbotamento e ainda apresentarem-se viáveis economicamente (GUARATINI, ZANONI, 2000; VAZOLLER, 2002; DULLIUS, 2004).

Kunz, Peralta e Moraes (2002) afirmam que, muitas indústrias, além da têxtil, como de tintas e papéis utilizam-se de corantes além de um grande volume de água, gerando uma quantidade considerável de água residual colorida. Em virtude disto, os efluentes despejados têm sido cada vez mais estudados devido a problemas ambientais gerados. Os autores citam também que a contaminação da água provoca, além da poluição visual, alterações em ciclos biológicos afetando principalmente processos de fotossíntese. Além disso, estudos têm demonstrado que algumas classes de corantes podem ser carcinogênicos e/ou mutagênicos.

## 2.2. ORIGEM DOS CORANTES

A tintura de tecidos é uma arte que começou há milhares de anos e a disponibilidade comercial de corantes é enorme. Não se sabe a origem inicial do uso dos primeiros corantes, sabe-se apenas que há indicações de seu uso pelo homem desde os primórdios das antigas civilizações, através de pesquisas feitas em amostra de tecidos de tumbas egípcias e antigos hieróglifos datados de 2.500 a.C, sendo detectado presença dos mesmos em tais amostras (VAZOLLER, 2002; DULLIUS, 2004).

Em virtude desta demanda, vários milhões de compostos químicos coloridos têm sido sintetizados nos últimos 100 anos, dos quais cerca de 10.000 são produzidos em escala industrial. Entretanto, estimam-se que atualmente 2.000 tipos de corantes estão disponíveis para a indústria têxtil (ZOLLINGER, 1991). Essa diversidade é justificada, uma vez que cada tipo de fibra a ser colorida requer corantes com características próprias e bem definidas (VAZOLLER, 2002; DULLIUS, 2004).

A tecnologia no tingimento consiste de dúzias de etapas que são escolhidas de acordo com a natureza da fibra têxtil, características estruturais, classificação e disponibilidade do corante para aplicação, propriedades de fixação compatíveis com o destino do material a ser tingido, considerações econômicas e muitas outras (ZOLLINGER, 1991; ABRAHANT, 1977).

## 2.3. CLASSIFICAÇÃO

Os principais grupos de corantes são classificados pelo modo de fixação ou pela sua estrutura química de acordo com Abrahant (1977) e Venkataraman (1974) tendo compilação de Guaratini e Zanoni (2000), e estão mostrados a seguir.

### 2.3.1. Corantes à Cuba

É uma grande e importante classe de corantes baseada nos índigos, tioindigóides e antraquinóides. Eles são aplicados principalmente no tingimento de algodão e fibras celulósicas, sendo praticamente insolúveis em água. Embora, devido às suas excelentes propriedades de fixação, outros materiais também têm sido utilizados.

Durante o processo de tintura eles são reduzidos com ditionito, em solução alcalina, transformando-se em um composto solúvel (leuco). Entretanto, como a produção química de hidrossulfito de sódio pode causar problemas ecológicos, o custo desta classe de corantes tem sido bastante alto.

### 2.3.2. Corantes Ácidos (aniônico)

O termo corante ácido corresponde a um grande grupo de corantes aniônicos portadores de um a três grupos sulfônicos. Estes grupos substituintes ionizáveis tornam o corante solúvel em água, e têm vital importância no método de aplicação do corante em fibras proteicas (lã, seda) e em fibras de poliamida sintética. No processo de tintura, o corante previamente neutralizado (solução contendo cloreto, acetato, hidrogenossulfato, etc.) se liga à fibra através de uma troca iônica envolvendo o par de elétrons livres dos grupos amino e carboxilato das fibras proteicas, na forma não-protonada.

### 2.3.3. Corantes Azóicos

São compostos coloridos, insolúveis em água, que são realmente sintetizados sobre a fibra durante o processo de tingimento. Nesse processo a fibra é impregnada com um composto solúvel em água, conhecido como agente de acoplamento que apresenta alta afinidade por celulose. A adição de um sal de diazônio ( $RN_2^+$ ) provoca uma reação com o agente de acoplamento já fixado na fibra e produz um corante insolúvel em água com alto padrão de fixação e alta resistência contra luz e umidade. A Figura 1 mostra a fórmula estrutural de um corante azo.

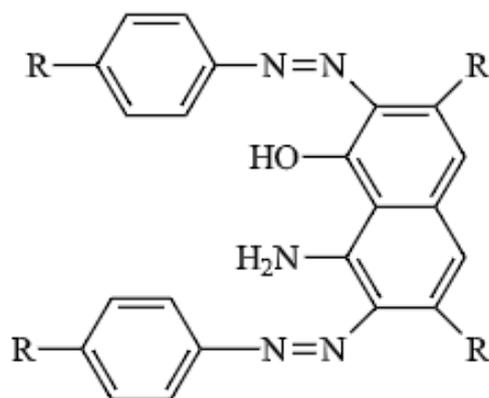


Figura 1- Estrutura química de um azo corante

#### **2.3.4. Corantes Branqueadores**

As fibras têxteis no estado bruto apresentam como característica uma aparência amarelada por absorver luz particularmente na faixa de baixo comprimento de onda. A diminuição dessa tonalidade tem sido diminuída na indústria ou na lavanderia pela oxidação da fibra com alvejantes químicos ou utilizando os corantes brancos também denominados de branqueadores ópticos ou mesmo branqueadores fluorescentes.

#### **2.3.5. Corantes de Enxofre**

É uma classe de corantes que após a aplicação se caracterizam por compostos macromoleculares com pontes de polissulfetos, os quais são altamente insolúveis em água. Estes compostos têm sido utilizados principalmente na tintura de fibras celulósicas, apresentando boa fixação. Entretanto, estes corantes usualmente apresentam resíduos altamente tóxicos como sulfetos, diminuindo seu uso.

#### **2.3.6. Corantes Diretos**

Este grupo de corantes caracteriza-se como compostos solúveis em água capazes de tingir fibras de celulose (algodão, viscose, etc.) através de interações de Van der Waals. A grande vantagem desta classe de corantes é o alto grau de exaustão durante a aplicação e consequente diminuição do conteúdo do corante nas águas de rejeito. O que causa esse efeito é o fato de sua estrutura molecular ser estreita e plana, o que facilita o alinhamento com as fibras planas da celulose.

#### **2.3.7. Corantes Dispersivos**

Constitui uma classe de corantes insolúveis em água aplicados em fibras de celulose e outras fibrassintéticas como nylon, poliéster e poliacrilonitrila. Durante o processo de tintura, o corante sofre hidrólise e a forma originalmente insolúvel é lentamente precipitada na forma dispersa sobre o substrato têxtil.

### 2.3.8. Corantes Pré-Metalizados

São úteis principalmente para tintura de fibras protéicas e poliamida. Os corantes são caracterizados pela presença de um grupo hidroxila ou carboxila na posição orto em relação ao cromóforo azo, permitindo a formação de complexos com íons metálicos. A desvantagem ecológica deste tipo de corante está associada ao alto conteúdo de metal (cromo) nas águas de rejeito.

### 2.3.9. Corantes Reativos

São corantes contendo um grupo eletrofílico (reativo) capaz de formar ligação covalente com grupos hidroxila das fibras celulósicas, com grupos amino, hidroxila e tióis das fibras proteicas e também com grupos amino das poliamidas.

Este grupo de corantes apresenta como característica uma alta solubilidade em água e o estabelecimento de uma ligação covalente entre o corante e a fibra, cuja ligação confere maior estabilidade na cor do tecido tingido quando comparado a outros tipos de corante em que o processo de coloração se opera através de ligações de maior intensidade.

## 2.4. TOXICIDADE DOS CORANTES

Guaratini e Zanoni (2000) afirmam que os corantes são altamente detectáveis a olho nu, sendo visíveis em alguns casos em concentrações tão baixas quanto 1 ppm (1mg/L). A remoção desses compostos é um grande problema visto que os corantes não pertencem a uma mesma classe de compostos químicos, mas englobam diversas substâncias com grupos funcionais diferentes. Com variedades na reatividade, na solubilidade, na volatilidade, estabilidade, etc.; assim sendo, requerem métodos específicos para a identificação, quantificação e degradação. A Figura 2 mostra uma água colorida com o corante Remazol brilliant blue.



**Figura 2** - Corante Remazol brilliant blue em concentração de 2ppm na água

#### **2.4.1. Meio ambiente**

Devido a estimativa da produção mundial de corantes ser de aproximadamente 15% descartada no meio ambiente durante seu processamento, síntese ou aplicação, há uma preocupação muito grande em relação ao meio ambiente. (CLARKE, ANLIKER, 1980; WEBER, STICKNEY, 1993; ZOLLINGER, 1991).

Esse descarte chega a representar cerca de 1,2 ton por dia de lançamento dessa classe de compostos diretamente para o meio-ambiente, tendo como principal fonte desta perda a fixação incompleta dos corantes, chegando a uma quantidade que varia entre 10% a 20% de compostos que não se fixam no tecido durante a etapa de tingimento das fibras têxteis, e que acabam sendo lançados nos efluentes (ANLIKER, 1978).

Por conta destes problemas, nos últimos anos, regulamentações rigorosas têm sido estabelecidas em muitos países referentes ao descarte de efluentes coloridos. A legislação governamental está se tornando cada vez mais rigorosa, especialmente nos países desenvolvidos e em desenvolvimento, no que diz respeito à remoção de cor dos efluentes industriais. A aplicação desta lei continuará a assegurar que indústrias têxteis e de outros

corantes tratem seus efluentes para que se ajustem aos padrões requeridos, minimizando o impacto ambiental (ANJANEYULU, CHARY, RAJ, 2005).

#### **2.4.2. Aspectos Toxicológicos**

Os riscos toxicológicos de corantes sintéticos à saúde humana estão intrinsecamente relacionados ao modo e tempo de exposição, ingestão oral, sensibilização da pele e das vias respiratórias (CLARKE, STEINLE, 1995).

A análise do grau de toxicidade oral de corantes, medido através de 50% da dose letal ( $LD_{50}$ ) tem demonstrado que apenas um número reduzido de corantes pode apresentar toxicidade aguda ( $LD_{50} < 5g/Kg$ ) e são encontrados particularmente nos corantes bis-azo e catiônicos (ANLIKER, 1979; CLARLE, ANLIKER, 1980; 1984).

Estudos biocinéticos têm mostrado evidências de que corantes azo solúveis em água, se oralmente administrados, são metabolizados na microflora intestinal e excretados mais rapidamente do que os compostos menos solúveis (CLARLE, ANLIKER, 1984; CLARLE, STEINLE, 1995).

Por outro lado, os corantes insolúveis em água poderiam ser biodegradados no fígado, formando conjugados solúveis em água que seriam então transportados para o intestino e sujeitos a reduções por bactérias da flora normal. Assim, existe grande possibilidade de que nem o corante ou seus metabólitos mostre potencial bioacumulador. Entretanto, os riscos crônicos destes tipos de corantes e intermediários levam em consideração suas propriedades carcinogênicas e mutagênicas (CLARLE, STEINLE, 1995; HUNGER, 1994; JUNG, 1992).

Nesta classe de corantes, o grupo que tem atraído maior atenção tem sido os corantes contendo a função azo-aromático como cromóforo, os quais constituem o maior grupo de corantes orgânicos produzidos mundialmente. A biotransformação destes corantes pode ser responsável pela formação de aminas, benzidinas e outros intermediários com potencialidade carcinogênica. Destes, pelo menos 3.000 corantes azo comerciais foram catalogados como cancerígenos e não têm sido mais produzidos por fabricantes responsáveis (CLARLE, STEINLE, 1995; GUARATINI; ZANONI, 2000).

Entretanto, Clarke e Steinle mostram que devido a problemas econômicos, países menos desenvolvidos como Brasil, México, Índia e Argentina, não têm cessado completamente a

produção de alguns corantes à base de benzidinas (e.g. Congo Red 14) de grande potencialidade econômica.

Adicionalmente, a exposição destes corantes à pele e/ou ao sistema respiratório também pode ser uma rota perigosa, pela qual se pode absorver estas substâncias e promover sensibilização da pele ou das vias respiratórias (CLARLE, ANLIKER, 1984; HAUSEN, 1993; KLASCHKA, 1994)

Os efeitos mais preocupantes no primeiro caso concernem a processos de dermatites de contato causadas por certos corantes não incorporados totalmente à fibra, comprometendo principalmente os consumidores que mantêm grande proximidade entre o tecido tinto e zonas da pele sujeitas à transpiração. Um exemplo deste tipo de reação frequentemente encontrada baseia-se nos casos de corantes do tipo disperso em que a partícula encontra-se adsorvida sobre a fibra (HAUSEN, 1993)

De um modo geral, o nível de risco à população parece ser pequeno quando comparado à ingestão oral destes compostos. A manifestação clínica do estado de alergia respiratória ao corante comumente aparece por sintomas de asma e rinites alérgicas. Diversos exemplos de sensibilidade deste tipo tem sido resultado da exposição a corantes do tipo reativo (ESTLANDER, 1988; NILSSON, 1993).

### **2.4.3. Aspectos Ecológicos**

Efluentes provenientes da indústria de corante ou de processos envolvendo tingimento têxtil, não tratados convenientemente, antes de serem lançados em águas naturais, capazes de atingir reservatórios e estações de tratamento de água são a preocupação ecológica mais emergente. Deste modo, corantes altamente insolúveis que requerem uma baixa solubilidade no processo de aplicação, apresentam menor biodisponibilidade do que outros corantes contendo grupos sulfônicos, os quais aumentam a solubilidade, embora apresentem resíduos tóxicos na água de lavagem devido à menor fixação (ANJANEYULU, CHARY, RAJ, 2005).

A abundância de normas e regulamentações desenvolvidas ao longo dos anos para controle de rejeitos coloridos tem criado um grande impacto na indústria de corantes e seus correlatos, além de ter criado grande confusão aos consumidores. (WEBER, STICKNEY, 1993).

Devido à alta diluição, poucos corantes solúveis poderiam causar efeitos ecológicos agudos em concentrações em que não sejam visíveis à olho nu. No entanto, dependendo do tipo de corante e do modo de aplicação requerido, a etapa final da tintura pode contribuir significativamente no lançamento de rejeitos de diversas substâncias químicas com composição variável (corante, umectante, antiespumante, eletrólitos, dispersantes, etc.) utilizadas nas etapas de montagem e fixação (COOPER, 1993; BECKMANN, SEWEKOW, 1991).

Algumas classe de corantes caracteriza-se por apresentar grupos quimicamente ativos capazes de reagir covalentemente com celulose na indústria têxtil, porém esta reação é estendida na bioquímica para purificação de proteínas por comprovada reação com moléculas biologicamente importantes (ABETA, YOSHIDA, IMADA, 1984).

Deste modo, resíduos deste corante poderiam ser altamente nocivos quando presentes em qualquer organismo vivo. A inativação deste rejeitos normalmente é realizada através de reações de hidrólise de seus grupos funcionais, que torna o corante quimicamente inerte. Estes compostos, nesta forma, não apresentam alta estabilidade hidrolítica em meio neutro, permitindo um tempo de vida de 50 anos em ambientes aquáticos, causando expressiva preocupação quanto aos aspectos ecológicos (MATSUI, SHIBATA, TAKASE, 1984; WEBER, STICKNEY, 1993).

## 2.5. TÉCNICAS DE TRATAMENTO DOS EFLUENTES

Dentro do contexto dos processos de degradação, cabe aos processos biológicos um lugar de destaque, principalmente em função da relativa facilidade encontrada na implementação de sistemas que operem em grande escala e pela eficiência destes processos (DULLIUS, 2004).

As soluções para o tratamento dos efluentes industriais podem ser encontradas através da utilização dos processos biológicos associados, em alguns casos, aos processos comumente aplicados (químicos e físico-químicos). A título de exemplo, temos o caso da aplicação *in situ* de microrganismos especializados, que são técnicas que degradam e/ou transformam as substâncias químicas sintéticas e tóxicas despejadas nos corpos d'água (DULLIUS, 2004).

Os corantes sintéticos, são em sua maioria xenobióticos, ou seja, os sistemas naturais de microrganismos em rios e lagos não contêm enzimas específicas para a degradação deste tipo de composto sob condições aeróbicas e sob condições anaeróbicas a degradação do corante se processa muito lentamente (OGAWA et al. 1986 e GUARANTINI, ZANONI, 2000).

Kunz, Peralta e Moraes (2002), comentaram sobre os limites das técnicas de tratamento de efluentes baseadas nos processos físico-químicos como a floculação combinadas com técnicas com flotação, eletroflotação, eletrocoagulação eletrocinética, eletrooxidação e ozonização, quando comparadas com os processos biológicos de degradação.

Fungos de podridão branca são bem conhecidos por sua notável capacidade extracelular para produzir enzimas oxidativas (lacase, lignina peroxidase-LIP, manganês peroxidase-MnP), que estão envolvidas na degradação de vários corantes (ERKUT, ÜNYAYAR, KUMBUR, 2007). Entre os processos usados no tratamento de efluentes, pode-se citar:

### **2.5.1. Floculação**

Na floculação ocorre a agregação das partículas em suspensão, em função das forças de Van Der Waals. A formação dos flocos pode ocorrer de maneira espontânea, apenas pelos sucessivos choques entre as várias partículas presentes, desde que o sistema possua energia disponível para tal, decorrente da agitação dele. No entanto, uma agitação muito intensa pode fazer com que os flocos formados se desagreguem espontaneamente (PAULA, 2004).

### **2.5.2. Flotação**

A flotação é um processo de separação sólido-líquido onde as partículas presentes na suspensão são recuperadas pela adesão das mesmas a bolhas de gás (geralmente ar). Ao contrário do que ocorre na sedimentação gravitacional, o agregado (definido como agregado bolha-partícula) possui densidade menor que a densidade da suspensão. Este agregado ascende na fase aquosa permitindo assim a sua separação (EDAZWALD, 2010).

### **2.5.3. Eletroflotação**

A eletroflotação flota os poluentes para a superfície da água por bolhas de hidrogênio e oxigênio geradas pela eletrólise da água. Uma corrente baixa produz uma densidade baixa de bolhas, conduzindo às baixas condições ascendentes de fluxo – o que favorece a sedimentação sobre a flotação. Assim que a corrente é aumentada, a densidade de bolhas aumenta resultando um fluxo ascendente maior e assim uma remoção mais provável por flotação (WIMMER, 2008).

### **2.5.4. Eletrocoagulação**

Neste processo, um potencial é aplicado aos anodos do metal, que causam reações separadas de dissolução da placa metálica, formando íons que é hidrolisado quase imediatamente ao hidróxido polimérico do material metálico, e hidrólise da água. Estes hidróxidos poliméricos são agentes coagulantes excelentes (MOLLAH, et al., 2004).

A coagulação ocorre quando cátions do metal combinam-se com as partículas negativas carregadas para o anodo pelo movimento eletroforético. Ao invés da adição de produtos químicos coagulantes como no processo convencional de coagulação, estes agentes coagulantes são gerados in situ. Essa técnica pode ser convenientemente usada nas áreas rurais onde a eletricidade não está disponível, desde que um painel solar unido à unidade seja suficiente para realizar o processo (MOLLAH, 2001).

### **2.5.5. Eletrooxidação**

No processo de oxidação eletroquímica, as moléculas de materiais orgânicos se decompõem em produtos como dióxido de carbono, água, amônia e outros. No caso de degradação incompleta da molécula, resulta na formação de produtos orgânicos mais simples, não tóxicos ou menos tóxicos, os quais podem ser degradados pelo uso de outras metodologias de tratamento do efluente, como oxidação biológica (WIMMER, 2008).

Os poluentes são destruídos tanto por processo de oxidação direto, onde a molécula é primeiramente adsorvida na superfície do ânodo e então degradada pela reação de transferência de elétron anódica, ou indireto, que degrada em solução pela reação de

oxidação do intermediário reativo gerado, que podem ser oxidantes fortes tais como hipoclorito/cloro, ozônio, peróxido de hidrogênio (MONEGO, 2007; WIMMER, 2008).

Os eletrodos e a configuração geométrica das células são construídos de forma a minimizar as perdas de energia devido à distribuição ineficiente de corrente e reações paralelas. Esses processos podem tratar muitos poluentes e em quantidades de microlitros para milhões de litros (SALES, 2014).

No processo eletrolítico, o desprendimento de oxigênio ocorre simultaneamente, e a oxidação indireta é o processo que promove maior transferência de átomos de oxigênio para o material que deve ser oxidado. Ocorre a formação de radicais hidroxilas, que adsorvem fisicamente na superfície do eletrodo (GOMES, 2009).

#### **2.5.6. Ozonização fotocatalítica**

Consiste na combinação das técnicas de fotocatalise e ozonização. O efeito sinérgico ocorre entre os dois métodos, onde os elétrons fotogerados podem reagir com as moléculas de ozônio gerando radicais oxidantes, responsáveis pela degradação das moléculas orgânicas, o que conseqüentemente resulta em uma alta eficiência de degradação de compostos orgânicos (MOREIRA et al., 2016).

#### **2.5.7. Processos Oxidativos Avançados (POA)**

Estes processos se baseiam na formação de radicais hidroxila de alto poder oxidante. Os radicais hidroxila têm vida curta e podem ser obtidos a partir de oxidantes fortes, como peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e ozônio ( $O_3$ ), combinados ou não com radiação. Representa uma alternativa simples e eficiente para descoloração de corantes reativos (GUIMARÃES, 2000).

Ainda são poucos os estudos de aplicação em grande escala no tratamento de efluentes industriais. A modelagem fenomenológica do tratamento de efluentes através de processos POA's é muito complexa devido ao uso de equações de balanço de energia radiante, distribuição espacial da radiação absorvida, transferência de massa e aos mecanismos de degradação fotoquímicos ou fotocatalíticos envolvendo espécies de radicais (DIAS, et. al., 2013).

### **2.5.8. Eletrocinética**

Em princípio, as técnicas eletrocinéticas são passíveis de aplicação em qualquer meio permeável humidificado, onde o contaminante a ser removido, é do tipo inorgânico, orgânico ou organometálico, adsorvidos ou não sob superfícies sólidas, ou de espécies carregadas (iônicas) e não carregadas (polar e não polar) em solução (DENISOV, et al., 1996).

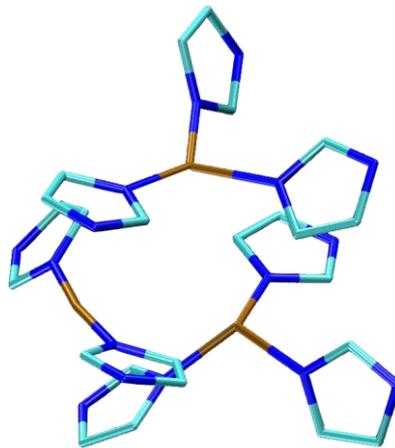
### 3. LACASE

#### 3.1. DEFINIÇÃO

A lacase é uma enzima pertencente ao grupo das oxidases que catalisa a oxidação de compostos fenólicos e aminas aromáticas. Tem sido utilizada em tratamentos biológicos de efluentes contaminados por corantes químicos (REVANKAR, LELE, 2007).

De acordo com Couto e Herrera (2006), é uma glicoproteína que geralmente contém quatro átomos de cobre por monômero, sendo que essa enzima catalisa a oxidação de orto e para-fenol, aminofenol, polifenol, poliaminas, ligninas e aril diaminas, bem como alguns íons inorgânicos.

As lacases têm sido encontradas em muitos fungos, insetos, bactérias e plantas superiores e estão sujeitas a muitas pesquisas para uma ampla variedade de aplicações devido a sua baixa especificidade (CAVALLAZZI, OLIVEIRA, KASUYA, 2004). A estrutura da enzima lacase é mostrado na Figura 3.



**Figura 3** - Estrutura em 3D da enzima lacase

#### 3.2. APLICAÇÕES

De acordo com Couto e Herrera (2006), podemos citar várias aplicações para a lacase nas indústrias de alimentos, para melhorar ou modificar a aparência do alimento ou bebida, já

que elimina compostos fenólicos responsáveis pelo escurecimento, turbidez de sucos de frutas, cervejas e vinhos.

Na indústria de papel tem sido empregada na separação e degradação da lignina da polpa da madeira, substituindo procedimentos convencionais e poluentes, pois pré-tratamentos da polpa com enzimas lignolíticas poderiam melhorar as estratégias de deslignificação. A capacidade das lacases para formar radicais reativos na lignina poderia também ser usada na modificação das fibras da madeira (COUTO, HERRERA, 2006).

Na indústria têxtil, mais de 100.000 diferentes tipos de corantes tem gerado  $7 \times 10^5$  toneladas de efluentes e resíduos anualmente. Devido a sua estrutura química ser resistente a luz, a água e diferentes produtos químicos, sua descoloração se torna mais difícil (COUTO, HERRERA, 2006).

Legislações governamentais têm exigido das indústrias têxteis a remoção dos corantes dos efluentes, considerando que muitos desses corantes são conhecidos carcinogênicos, tais como benzidinas e outros compostos aromáticos. Muitos dos processos de tratamento têm sido ineficientes e não econômicos. Entretanto o desenvolvimento de processos de tratamento baseados no uso de lacases tem sido uma solução atrativa devido ao seu potencial de degradação de corantes com diferentes estruturas químicas incluindo os corantes sintéticos, correntemente empregados nas indústrias (COUTO, HERRERA, 2006).

O uso de lacase na indústria têxtil está crescendo rapidamente, tanto na descoloração dos efluentes como no branqueamento dos tecidos, com inúmeras misturas enzimáticas já sendo comercializadas, principalmente para aplicação da degradação de corantes índigos, aplicados no tingimento de jeans (COUTO, HERRERA, 2006).

### 3.3. ESTUTURA E MECANISMOS DE AÇÃO

A lacase (benzenodiol: oxigênio oxidoreductase EC 1.10.3.2), por sua vez, é membro das oxidases azuis de cobre (proteínas azuis com cobre) também denominadas oxidases “multicopper” que catalisam uma reação de transferência de elétrons a partir de vários compostos e é incluída no grande grupo das polifenoloxidasas (MADHAVI, LELE, 2009).

O cobre contido em sua constituição catalisa a oxidação de 4-benzenodiol em 4-benzoquinona. Essa enzima é capaz de biodegradar a lignina e desintoxicar os produtos derivados das lacases são enzimas capazes de degradar fenóis e aminas aromáticas

oxidantes, produzidas por fungos e também por plantas. São produzidas pela maioria dos basidiomicetos e catalisam oxidações por extração de um elétron de substratos fenólicos gerando radicais fenoxilas. (COUTO, HERRERA, 2007; FERREIRA et al., 2010).

Essas enzimas são notavelmente não específicas capazes de oxidar compostos aromáticos e não fenólicos. Isso faz com que esta enzima se torne altamente interessante para diferentes aplicações industriais tais como branqueamento de celulose, descoloração do corante têxtil, de águas residuais, biorremediação, e etc. (COUTO, HERRERA, 2007).

Lacase é uma oxidase, cujo sítio ativo contém quatro átomos de cobre de três diferentes tipos, e que catalisa a redução de oxigênio molecular a água- não havendo a etapa de produção de peróxido de hidrogênio – com a concomitante abstração de um elétron de um substrato doador, (especialmente compostos aromáticos) (REINHAMEMAR, MALMSTROM, 1981).

### 3.4. DESCOBERTA

Esta enzima primeiramente isolada em 1883 da árvore da laca japonesa (YOSHIDA, 1883). *Toxicodendron vernicifluum* (anteriormente *Rhus vernicifera*), da família do caju. Embora ocorram em outras plantas, tais como tabaco (*Nicotina tobacco*) e milho (*Zea mais*), a maioria das lacases é extraída de fungos superiores, especialmente dos basidiomicetos de podridão branca (que degradam lignina) e de alguns ascomicetos (MOROZOVA, SHUMAKOVICH, SHLEEV, 2007).

### 3.5. ESPECIFICIDADE

Embora as funções da lacase não esteja bem definida nas plantas e fungos estipula-se que, em plantas elas estão envolvidas na síntese de lignina e catalisam a polimerização radicalar de unidades estruturais de alcoóis p-cumarilílico, coniferílico e sinapílico. Já nos fungos, a função é inversa, ou seja, a degradação da lignina, além da destruição de patógenos, destoxificação e desenvolvimento morfológico do fungo (THURSTON, 1994; BALDRIAN, 2006; LEONOWICZ et al., 2001).

Considerando a especificidade do substrato, as enzimas ligninolíticas em fungos são extracelulares. Embora a maioria das lacases sejam extracelulares, fungos de podridão

branca, principalmente, produzem lacases intracelulares e extracelulares, porém a maioria (cerca de 95%) está localizada fora da célula (BLAICH, ESSER, 1975).

Até agora, centenas de lacases foram isoladas e caracterizadas. Muitos fungos produzem várias isoformas, daí a comum menção desta enzima no plural. Tanto as lacases de plantas como de bactérias ou fungos são glicoproteínas. As de fungos possuem massa molecular de 50-190 kDa, pI 3,2-7,5 e temperatura ótima de 20-80 graus Celsius, geralmente produzindo temperaturas relativamente elevadas (MOROZOVA, SHUMAKOVICH, SHLEEV, 2007).

O sítio ativo das lacases contém quatro átomos de cobre 'azul' mononuclear (sítio T1) e três cobres em um cluster (sítio T2/T3) consistindo de um cobre T2 e dois T3 (Figura 4). Os íons de cobre da lacase são classificados pela distribuição espectral no UV-Vis e características de EPR (SOLOMON, SUNDARAM, MACHONKIN, 1996; REINHAMMAR, MALMSTROM, 1981).

Na Figura 4, o sítio T1 confere cor azul clara a solução de lacase em água, sendo caracterizado por uma banda pronunciada em 600nm e um fraco desdobramento paralelo superfino no espectro de EPR ( $g_{ii} = 2,30$   $A_j = 40-95 \cdot 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$ ). O átomo de cobre do sítio T1 tem como ligantes dois grupos imidazólicos de histidina e um grupo sulfídrico de cisteína, formando uma estrutura triangular. O cobre do sítio T2 mononuclear não é detectável por absorção UV-Vis, mas exibe desdobramento superfino no espectro de EPR ( $g_{ii} = 2,24$ ;  $A_j = 140-200 \cdot 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$ ), típico de complexos tetraédricos (SOLOMON SUNDARAM, MACHONKIN, 1996).

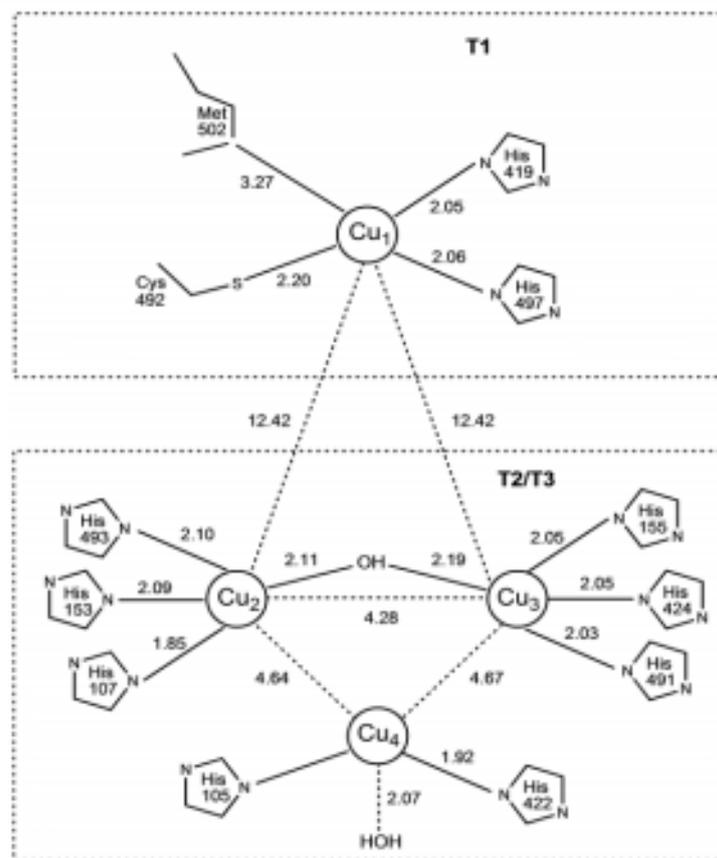
Por fim, o sítio T3 é binuclear, com os átomos de cobre pareados de forma antiferromagnética, via uma ponte de um grupo hidroxila, o que o torna diamagnético e impossibilita sua detecção por EPR. Ele é identificado como um ombro em 330nm. Oito grupos imidazólicos de histidina são os ligantes do cluster T2/T3 (SOLOMON, SUNDARAM, MACHONKIN, 1996).

Deve-se ressaltar que lacases com diferentes arranjos de sítios ativos são descritas na literatura. Por exemplo, o sítio da lacase do fungo *Phiebiaradiata* contém dois átomos de cobre (em T1 e T2) e um grupo prostético de pirroquinolinaquinona (PQQ), que parece agir como T3, como mostra a Figura 4 (KARHUNEN et al., 1990).

Os potenciais-padrão redox dos três sítios de cobre das lacases (T1, T2 e T3) são um das principais características das cobres-oxidases, incluindo a lacase. Baseando no potencial-

padrão redox do sítio T1 todas as oxidases contendo cobre são subdivididas em enzimas de potencial alto, médio ou baixo (EGGERT et al., 1998; SHLEEV et al., 2003)

A Figura 4 demonstra o sítio T1 da enzima é o aceptor primário dos elétrons do substrato, o qual será reduzido. As lacases conseguem oxidar somente compostos com potencial de ionização menores ou levemente maiores do que o potencial redox do átomo de cobre do sítio T1. O potencial de T1 também determina a eficiência da catálise na oxidação da maioria dos substratos da lacase, fazendo com que enzimas com alto potencial redox do sítio T1 sejam promissoras para aplicações biotecnológicas (XU, 1997).

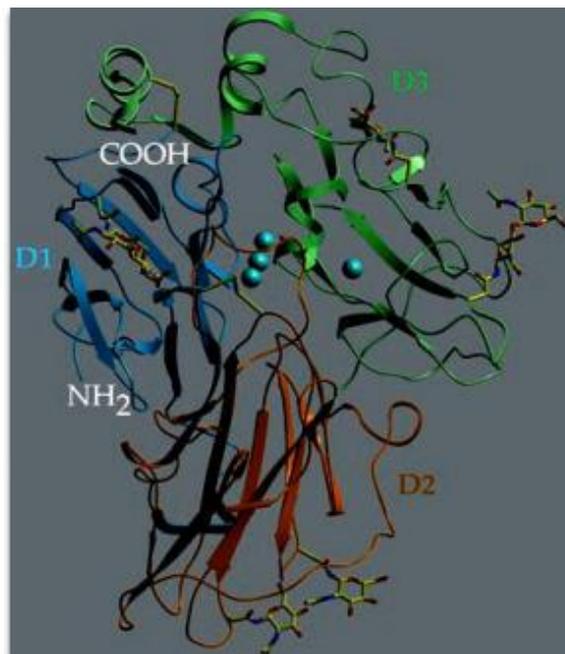


**Figura 4** - Esquema simplificado do sítio ativo de lacase do *Bacillus subtilis*, com as distâncias (em Å) entre os átomos mais importantes (ENGUITA et al., 2003).

A estrutura completa da enzima lacase do fungo *Trametes versicolor* apresenta por Piontek, Antorini e Choinowski (2002), mostrada na Figura 5. O modelo completo do polipeptídeo é apresentado com um monômero organizado em três domínios com dimensões de cerca de 65x 55 x 45 Å.

Na cavidade localizada no domínio 1 (D1) está localizada o cobre T1 (esfera isolada). Entre os domínios 1 e 3 (D3), que possuem resíduos para coordenação dos cobres, localiza-se o cluster trinuclear (T2/T3). O carbono C terminal finaliz o domínio 3. O 13º aminoácido da longa cadeia  $\alpha$ -hélice é estabilizado por pontes dissulfetoco M D1, e uma segunda ponte dissulfeto conectada aos domínios 1 e 2 (D2).

O sítio T2/T3 onde o oxigênio é reduzido tem acesso ao solvente através de dois canais, o que leva para o sítio do cobre tipo 3 e o sítio do cobre tipo 2. A distribuição de potencial eletrostático de superfície revela um domínio de carga negativa que está de acordo com o PI desta enzima que é cerca de 3.5. Pela estrutura cristalina do complexo enzima/substrato, sabe-se que a ligação ocorre em uma cavidade levemente negativa próximo ao sítio T1. A densidade de carga localizada neste sítio pode estabilizar os cátions radicais que são formados durante o ciclo catalítico (PIONTEK, ANTORINI, CHOINOWSKI, 2002).



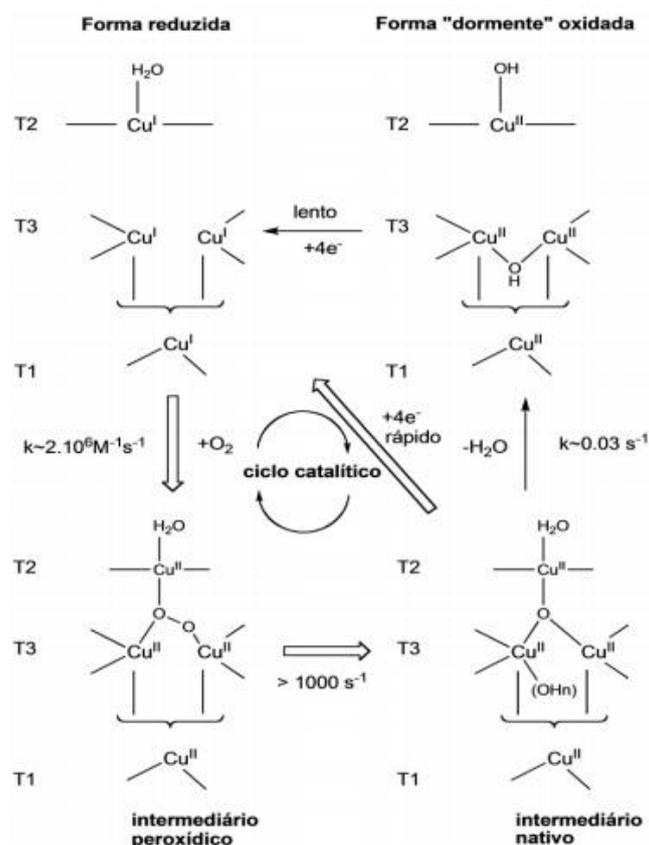
**Figura 5** - Diagrama da estrutura da lacase de *T. versicolor*. Disposições das cadeias polipeptídicas divididas em domínios estruturais, apresentando em diferentes códigos (D1-D3). Íons cobres são representados por esferas. Carboidratos e pontes dissulfetos são postados como barras ("stick models") (PIONTEK, ANTORINI, CHOINOWSKI, 2002).

Embora existam muitos trabalhos com oxidases contendo cobre, incluindo a lacase, não há opinião única sobre os mecanismos de transferência de elétrons e redução do oxigênio molecular. Na Figura 6 assume-se que o sítio T1 da lacase receba elétrons do substrato

(gerando um cátion–radical ou cátion intermediário) e, então, os transfere para os três átomos de cobre cluster, T2/T3, onde o oxigênio molecular é reduzido a água (SOLOMON, SUNDARAM, MACHONKIN, 1996; BENTO et al., 2005). A interação de uma lacase completamente reduzida com oxigênio molecular resulta em diferentes formas da enzima. Duas formas bem estudadas são: o intermediário peróxido e o nativo (figura 8) (MOROZOVA, SHUMAKOVICH, SHLEEV, 2007).

O intermediário nativo desempenha papel importante no ciclo catalítico da lacase, pois via reação com  $O_2$ , comprovou-se que este intermediário age com uma espécie radicalar de oxigênio (REINNHAMMER, 1984). Por EPR observa-se que os quatro íons de cobre no intermediário nativos estão oxidados, CU (II) (PALMER, LEE, SOLOMON, 2001). A estrutura deste intermediário é diferente da forma “dormente” oxidada, pois o cobre do sítio T2 não está conectada com o cobre de T3.

O mecanismo de reação catalisado por lacases envolve a produção de radicais livres altamente reativos pela remoção de um elétron ou hidrogênio de grupos OH ou NH (GIANFREDA et al., 2006).



**Figura 6** - Ciclo catalítico da enzima lacase, mostrando o mecanismo de redução e oxidação dos sítios de cobre (SHLEEV et al., 2003).

Esses radicais podem reagir entre si ou com outras moléculas, em reações catalisadas pela enzima ou não, como polimerização, hidratação ou abstração de hidrogênio. Para compostos fenólicos, a oxidação pela lacase resulta na formação de radicais aril, espécie ativa que é convertida em quinona. Quinonas intermediárias podem sofrer reações adicionais para formar compostos oligômeros coloridos insolúveis dependendo do substrato e parâmetros reacionais. Além disso, pode haver reações de descarboxilação, desmetoxilação e desalogenação de compostos orto e para substituídos (LEONOWICZ EDGEHILL, BOLLAG, 1984; SCHULTZ, et. al., 2001; MAJEANU, BRAR, TYAGI, 2010)

Diversos fatores podem influenciar a reação de oxidação de compostos fenólicos, principalmente a estrutura química dos fenóis, número, natureza e posição de substituintes no anel aromático. Substituintes doadores de elétrons ( $^{-}\text{CH}_3$  ou  $^{-}\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), provocam a diminuição do potencial de oxidação da molécula e aumento da velocidade da reação, o contrário acontece com substituintes eletrofílicos (GIANFREDA et al., 2006)

Vários compostos são descritos como inibidores da lacase. Entre os inibidores incluem-se pequenos ânions inorgânicos como azidas, cianidas, haletos e hidroxilas (NAQUI, VARFOOLOMEV, 1980, XU, 1997). Esses íons ligam-se ao sítio T2/T3 impedindo a transferência de elétrons do sítio T1 para sítios T2/T3, inibindo-se assim a atividade enzimática (XU, 1996a; XU, 1996b; GIANFREDA, XU, BOLLAG, 1999).

A ordem de inibição para os íons haletos ( $\text{F}^{-} > \text{Cl}^{-} > \text{Br}^{-}$ ) é atribuída a diferença de acessibilidade aos átomos de cobre do sítio T2/T3 (NAKI, VARFOOLOMEEV, 1981). Outros inibidores como íons metálicos (Hg), ácidos graxos, detergentes quaternários de amônia têm sido relatados devido a ligação com os íons cobre do sítio ativo da enzima ou devido á desnaturação proteica (LEONOWICZ, MALINOWSKA, 1982).

## 4. MATERIAIS E EQUIPAMENTOS

### 4.1. MICRORGANISMOS

O microrganismo utilizado no desenvolvimento foi o fungo *Pycnoporus sanguineus* isolado e obtido na natureza, na zona rural do município de Cândido Mota - SP, como representado nas Figuras 7 e 8.



**Figura 7** - Fungo *Pycnoporus sanguineus* (Orelha de pau) adquirido da natureza



**Figura 8** - Fungo *Pycnoporus sanguineus* (Orelha de pau) adquirido da natureza, exemplar utilizado no experimento.

## 4.2. REAGENTES PARA PREPARO DOS MEIOS DE CULTIVO

Todos os reagentes empregados para o preparo do meio de cultivo e soluções apresentaram grau analítico.

## 4.3. CORANTE

Foi utilizado o corante sintético Remazol Brilliant Blue 100%.

## 4.4. EQUIPAMENTOS

Para o desenvolvimento do trabalho foram necessários os seguintes equipamentos:

- Autoclave vertical
- Estufa bacteriológica
- Balança analítica
- pH-metro
- meio de cultura ágar batata dextrose

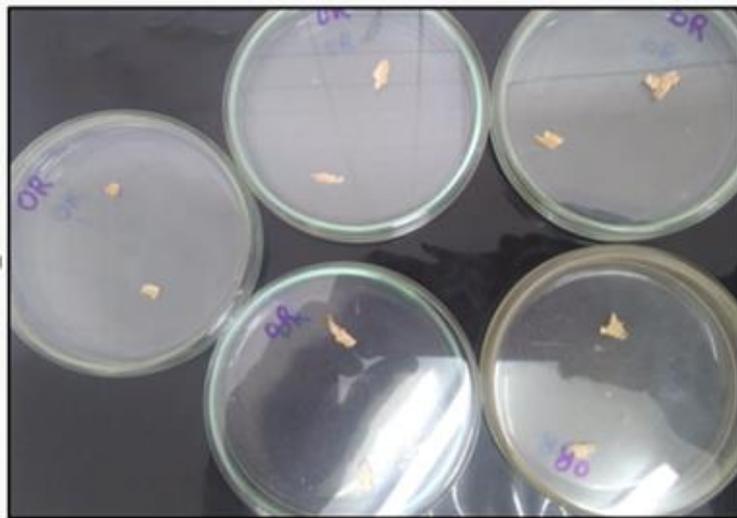
## 5. MÉTODOS

### 5.1. COLETA DO MATERIAL

Foi coletado o fungo *Pycnoporus sanguineus* na zona rural de Candido Mota – SP, em um tronco de madeira exposto ao tempo. O fungo foi removido e transportado em vasilhas plásticas até o laboratório da Faculdade de Ensino do Município de Assis – FEMA, onde foi utilizado um bisturi esterilizado para retirar camadas finas da parte interior do fungo.

### 5.2. PREPARO DO INÓCULO

As camadas coletadas do fungo foram transferidas para cinco placa de Petri contendo meio de cultura ágar-batata-dextrose, sendo mantido a 28°C durante 10 dias como mostra a Figura 9. Foram realizadas três replicações para isolamento do fungo em questão analisado.

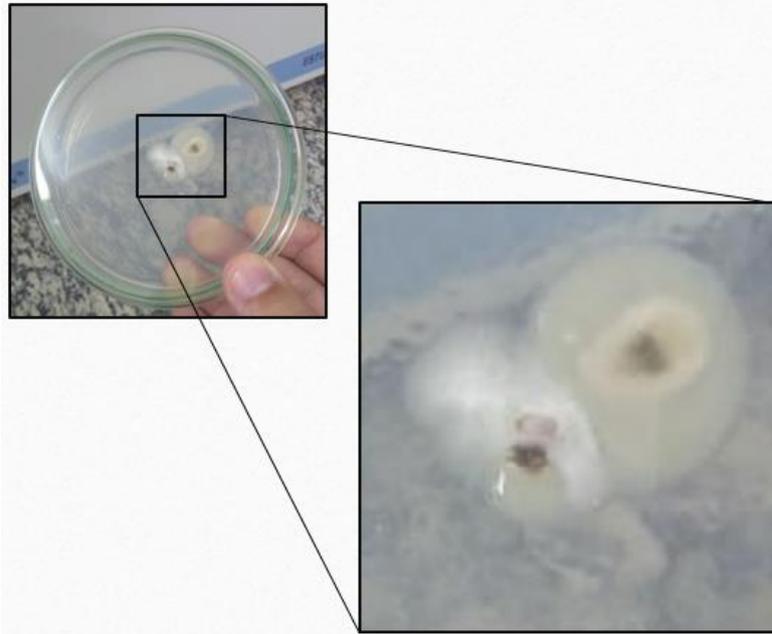


**Figura 9** - Placas petri com meio agar e disco de micélio do fungo *Pycnoporus sanguineus* (orelha de pau).

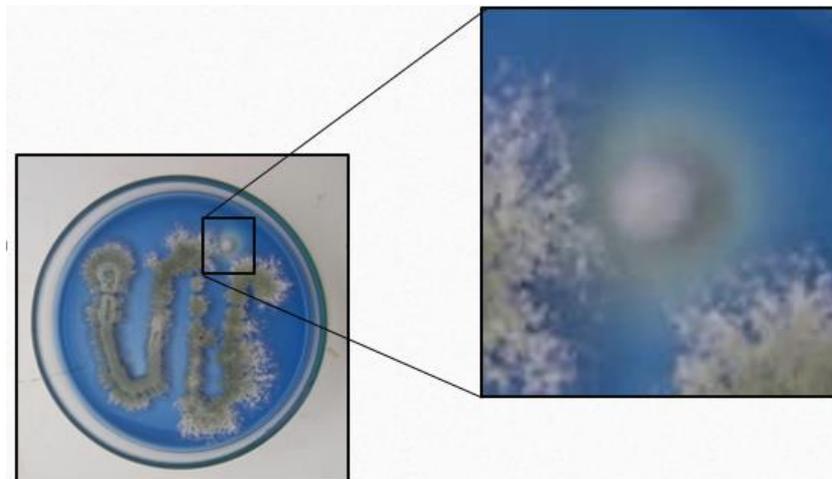
### 5.3. CULTIVO

Após a obtenção das colônias visualmente isoladas, foram refeitos o cultivo, das mesmas, em quatro placas de Petri contendo meios de culturas ágar-batata-dextrose, duas placas com concentrações de 0,01% (Figura 10) e duas com 0,02% (Figura 11) do corante

Ramazol brilhante blue. Este procedimento foi repetido por mais duas vezes na busca de resultados mais expressivos.



**Figura 10** - Colônia isolada do fungo *Pycnoporus sanguineus* (orelha de pau) em placa de petri.



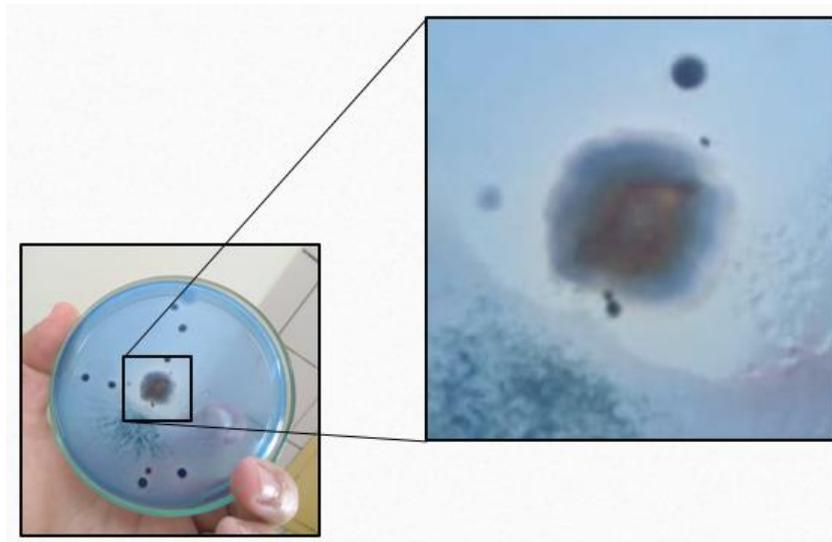
**Figura 11** - Halo de descoloração observado em desenvolvimento de colônia em placa petri contendo meio ágar e corante azul brilliant blue (0,02%).

## 6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Figura 9 mostra das placas de Petri contendo discos de micélios, retirados do centro do fungo *Pycnoporus sanguineus*, afim de isolar as colônias para em seguida cultivá-las nas placas com meio de cultura adicionado de corante (Figura 10). Após, parte das colônias foram transferidas para placas contendo meio ágar-batata-dextrose adicionado de 0,02% e 0,01% do corante Remazol Brilliant Blue (Figuras 11 e 12 respectivamente).

A placa contendo 0,02% de concentração de corante Remazol Brilliant Blue, ocorreu um pequeno halo de descoloração, confirmando a presença da enzima lacase e sua efetividade de descoloração.

Na Figura 12, a placa contendo 0,01% de concentração de corante Remazol Brilliant Blue, também houve um pequeno halo de descoloração, o que também confirma a presença da enzima lacase e sua efetividade de descoloração.



**Figura 12-** Alo de descoloração observado em placa petri contendo corante azul brilliant blue (0,01%) em meio ágar.

É possível observar na Figura 13, em relação ao fungo *Pycnoporus sanguineus* (orelha de pau), utilizado para coleta do material para isolamento das colônias, que há o crescimento de um outro fungo, o *Trichoderma*, também utilizado para controles biológicos. Este *Trichoderma* pode ser o grande causador das alterações dos resultados esperados, o que nos leva a outros experimentos e outras observações para constatar melhores resultados.



**Figura 13** – Fungo *Pycnoporus sanguineus* (orelha de pau) utilizado para coleta do material de análise, contaminado com *Trichoderma*.

## 7. CONCLUSÃO

Concluimos que nos resultados foram observados que a enzima produzida pelo fungo *Pycnoporus sanguineus* possui capacidade de degradação do corante Remazol Brilliant Blue R (RBBR). Porém, contaminações com outros fungos, como por exemplo o *Trichoderma*, que pode ter impedido o desenvolvimento do fungo *Pycnoporus sanguineus* no momento do isolamento da colônia para avaliação, o que provavelmente causou a diminuição da degradação do corante. Outros trabalhos realizados com lacases retiradas de outras fontes mostram a eficiência da descoloração completa em até três dias de permanência de aplicação, porém em condições diferenciadas como a purificação da lacase. Assim como, na presença de outros reagentes, como acetilacetona e ácido violúrico, os quais levam a eficiência da lacase em até 80% da descoloração do RBBR. Isso nos leva a necessidade da utilização de outras técnicas e/ou coletas de exemplares sem contaminantes, ou até mesmo, efetuar outros testes comparativos com outros exemplares, assim como provocar uma colonização contaminada propositadamente com o *Trichoderma* para confirmação dos dados.

## REFERÊNCIAS

ABETA, S.; YOSHIDA, T. E IMADA, K.; **Am. Dyest. Rep.**, 73, 20. 1984.

ABRAHANT, E. N.; **Dyes and their Intermediates**; Edward Arnold Ltd.; London, 1977.

ANJANEYULU, Y.; CHARY, N. S.; RAJ, D.; Samuel S. Decolourization of industrial effluents – available methods and emerging technologies – a review. **Review in Environmental Science and Bio/Technology**. v. 4, p. 245-273, 2005.

ANLIKER, R.; **Ecotoxicology and Environmental Safety**; 1, 211, *Chem. Abstr.* , 88, 84102n., 1978.

ANLIKER, R.; **J. Soc. Dyes Colour**, 95, 317, 1979

AZMI, W.; BANERJEE, U. Biological decoloration of crystal Violet by a newly isolated *Bacillus* sp. And microbial assessment of toxicology of untreated and treated dye. **Scientia Iranica**, Tehran, v. 8, n.3, p.171-178, July 2001.

BALDRIAN, P. 2006. Fungal laccases – occurrence and properties. **FEMS Microbiology Reviews** 30: 215-242.

BARR, D. P.; AUST, S. D. Pollutant degradation by White-rot fungi. **Reviews of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 138, p. 49-72, 1994b.

BARR, D. P.; AUST, S. D. Mechanisms of white-rot fungi use to degrade pollutants. **Environmental Science and Technology**, v. 28, p. 78A-87A, 1994a.

BENTO I.; MARTINS L.O.; LOPES G. G.; CARRONDO M. A.; LINDLEY P. F. **Dye Degrading Fungi**. **Trans.**, 21 , 3507-3513. 2005.

BECKMANN, W.; SEWEKOW, U.; **Textil Praxis**, 4, 346, 1991.

BLAICH, R.; ESSER, K. Função de enzimas em fungos que destroem madeira. 2. Múltiplas formas de lacase em fungos de podridão branca. **ArchMicrobiol** 103: 271-277. 1975.

CAVALLAZZI, J. R. P.; OLIVEIRA, M. G. A.; KASUYA, M.C.M. Laccase production by *Lepistasordida*. **Brazilian Journal of Microbiology**. v. 35, p 261-263, 2004.

CLARKE, E. A. E ANLIKER, R.; **Rev. Prog. Col.**, 14, 84, 1984.

CLARKE, E. A. E STEINLE, D.; **J. Soc. Dyes Colour**, 25, 5, 1995.

CLARKE, E. A.; ANLIKER, R.; **Organic Dyes and Pigments**; O. Hutzinger (Ed.) in Handbook of Environmental chemistry, Vol. 3A, Springer Berlin. 1980

COOPER, P.; **J. Soc. Dyes and Colour**, 100, 98, 1993.

COUTO, S. R.; HERRERA, J. L. T. Industrial and biotechnological applications of laccases: A review. **Biotechnology Advances**. v. 24, p.500-513, 2006.

COUTO, S. R., HERRERA, J. L. Laccase production at reactor scale by filamentous fungi. Elsevier, **Department of Chemical Engineering**. P. 558–569. 2007.

DENISOV, G.; HICKS, R. E.; PROBSTEIN, R. F. **On the kinetics of charged contaminant removal from soils using electric fields**. Journal of Colloid and Interface Science, v. 178, n.1, p.309-323, 1996.

DIAS, F. F. S., LIRA, R. J.; CHIAVONE-FILHO O.; CARVALHO, F. O.; PACHECO, J. G.; Degradação de corante Reative Black 5 via processo foto Fenton em reator PTC com modelagem e otimização utilizando RNA. vol. 9, num. 10, **Scientia Plena**, 2013.

DULLIUS, Carlos Henrique. **Utilização de fungos para biodegradação de corantes têxteis sintéticos**. 2004, 72p. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-graduação em Desenvolvimento Regional. Universidade de Santa Cruz do Sul. Santa Cruz do Sul – RS, 2004.

DURÁN, N.; ROSA, M. A.; D'ANNIBALE, A.; GIANFREDA, L.; **Enzyme Microb. Technol**, 31,907. 2002

EDZWALD, JAMES K. Dissolved Air Flotation and Me. **Water Research**, 2010.

EGGERT C.; LAFAYETTE P. R.; TEMP U .; ERIKSSON K. E. L; DEAN J. F . D. Molecular analysis of a laccase gene from the white rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus* **Appl. Microbiol.**, 64, 1766-1772. 1998.

ENGUITA, F.J., MARTINS, L.O., HENRIQUES, A.O. E CARRONDO, M.A. Estrutura de cristal de um componente de revestimento de endósporos bacteriano - uma lacase com propriedades de termoestabilidade aumentadas. **J Biol Chem** 278: 19416-19425. 2003.

ERKUT, E. A.; ÜNYAYAR, A.; KUMBUR, H. Decolorization of synthetic dyes by White rotfungi, involving laccase enzyme in the process. **Process Biochemistry**. v. 42, p.1429-1435, 2007.

ESTLANDER, T.; **Contact Dermatitis**, 18, 290, 1988.

FERREIRA, L.F.; AGUIAR, M.; POMPEU, G.; MESSIAS, T.G.; MONTEIRO, R.T.R. Selection of vinasse degrading microorganisms. **World J. Microbiol. Biotechnol.** 26, 1613-1621, 2010.

FORGACS, E.; CSERHÁTI, T; OROS, G. Removal of synthetic dyes from wastewater: a review. **Environment International, Belgrad**, v.30, n. 7,p . 953-971, 2004.

GIANFREDA, L.; IAMARINO, G., SCELZA, R., E RAO, M. A. Oxidativecatalysts for the transformacion of phenoliepollutants: A brief review. **Biocatalysis and Biotransformation**, 24, 177-187. 2006.

GIANFREDA, L.; XU F.; BOLLAG, J. M. **Bioremediation J**, 3,1-26, 1999.

GOMES, L. Degradação eletroquímica do corante alaranjado 3R utilizando diferentes eletrodos. Universidade de São Paulo - **Instituto de Química de São Carlos**, São Carlos, 2009.

GUARATINI, C. C. I.; ZANONI, M. V. B. Corantes têxteis. **Revista Química Nova**, São Paulo, v.23, p 71-78, 2000.

GUIMARÃES, J. R. Apostila de Processos Oxidativos Avançados. **Campinas**, 2000.

HAUSEN, B. M.; **Contact Dermatitis**, 28, 169, 1993.

HIGUCHI, T. Mechanisms of lignin degradation by lignin peroxidase and laccase of white-rotfungi. In.:1989.

HOFRICHTER, M.; Review: lignina conversion by manganese peroxidase (MnP). **Enzymeand Microbial Technology**, v. 30, p. 454-466, 2002.

HUNGER, K., **Chimia**, 48, 520, 1994.

JUNG, R.; **Food Chem. Toxicol.**, 30, 635, 1992.

KARHUNEN, E., NIKU-PAAVOLA, M.-E., VIIKARI, L., HALTIA, T., VAN DER MEER, R. A. and DUINE, J. A. A novel combination of prosthetic groups in a fungal laccase: PQQ and two copper atoms. **FEBS Lett.**, 267, 6–8. 1990.

KLASCHKA, F.; **Melliand Textilber**, 75, 193, 1994.

KUNZ, A.; PERALTA- ZAMORA, P.; MORAES, S. G.; DURÁN, N. Novas Tendências no Tratamento de Efluentes Têxteis. **Revista Química Nova**, São Paulo, v.25, p 78-82, 2002.

LEONOWICZ A, CHO NS, J LUTEREK, WILKOLAZKA A, M WOJTASWASILEWSKA, MATUSZEWSKA A, HOFRICHTER M, WESENBERG D E ROGALSKI J. Lacase fúngica: *propriedades e atividade na lignina*. **J Micróbio Básico** 41: 185-227. 2001.

LEONOWICZ, A.; MALINOWSKA, M. Purificação das formas constitutivas e indutíveis de lacase do fungo *Pholiotamutabilis* por cromatografia de afinidade. **Acta Biochim Polon** 29 219-226. 1982.

MADHAVI, V.; LELE, S.S. Laccase: Properties and Applications. **Bio Resources** 4(4): 1694-1717, 2009.

MAJEANU J. A.; BRAR S K.; TYAGI R. D. **Bioresour. Technol**, 101, 2331-2350. 2010

MATSUI, M.; Shibata, K. e Takase, Y.; **Dyes and Pigments**, 5, 321, 1984.

MOLLAH, M. Y. A. Electrocoagulation (EC) – science and applications. **Journal of Hazardous Materials** B84 29-41. 2001.

MOLLAH, M.Y.A., PATHAK, S.R., PATIL, P.K., VAYUVEGULA, M., AGRAWAL, T.S., GOMES, J.A.G., KESMEZ, M. and COCKE, D.L. Treatment of Orange II azo-dye by electrocoagulation (EC) **technique in a continuous flow cell using sacrificial iron electrodes**. **Journal of Hazardous Materials**, 2004.

MONEGO, M. L. C. D. Degradação eletroquímica de corantes e efluentes da indústria têxtil. **Universidade Tecnológica Federal do Paraná**, Curitiba, 2007.

MOREIRA, N. F. F.; SOUSA, J. M.; MACEDO, G.; RIBEIRO, A. R.; BARREIOS, L.; PEDROSA, M.; FARIA, J. L.; PEREIRA, M. F. R.; CASTRO-SILVA, S.; SEGUNDO, M. A.; MANAIA, C. M.; NUNES, O. C.; SILVA, A. M. T. Photocatalytic ozonation of urban wastewater and surface water using immobilized TiO<sub>2</sub> with LEDs: Micropollutants, antibiotic resistance genes and estrogenic activity. **Water Research**, v. 94, p. 10-22, 2016.

MORENO, A. D.; IBARRA, D.; FERNÁNDEZ, J. L.; Ballesteros, M.; **Bioresour. Technol.** 106,101. 2012.

MOROZOVA, O.V., SHUMAKOVICH, G.P., SHLEEV, S.V. **Applied Microbiollogy and Biotechnol**, 43: 523. 2007.

MURUGESAN, K.; NAM, I.H.; KIM, Y.M.; CHANG, Y, S. Decolorization of reactive dyes by a thermos table laccase produced by *Ganoderma lucidum* insolid state culture. **Enzymeand Microbial Technology**, v. 40, p 1662-1672, 2007.

NAKI A.; VARFOOLOMEEV S. D. **Biochemistry** (Engl. Transl.) 46, 1344-1350, 1981

NILSSON, R.; **Brit. J. Ind. Med.**, 50, 65, 1993.

OGAWA, T.; YALONE, C.; IDAKA, E.; KAMIYA, H. **J. Soc. Dyers Colour**, 102, 12. 1986.

PALMER A. E.; LEE S. K.; SOLOMON E. I. **J. Am Chem.**, 123, 6591-6599. 2001.

PALMIERI, G.; CENNAMO, G.; SANNIA, G. Remazol Brilliant Blue R decolourisation by the fungus *Pleurotusostreatus* and its oxidative enzymatic system. **Enzymeand Microbial Technology**, v. 36, p 17-24, 2005.

PAULA, S.L. Clarificação do extrato aquoso de Stevia Rebaudiana (Bert.) Bertoni, utilizando polímeros naturais. 2004. **Dissertação** (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2004

PERUZZO, Lucile Cecília. **Influência de agentes auxiliares na adsorção de corantes de efluentes da indústria têxtil em colunas de leito fixo**. 2003, 93p. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-graduação em Engenharia Química. Centro Tecnológico da Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis – SC. 2003.

PIONTEK K.; ANTORINI M.; CHOINOWSKI T. **J. Biol. Chem.**, 277 , 40 , 37663-37669. 2002.

PLÁCIDO, J.; IMAM, T.; CAPAREDA, S. **Bioresour. Technol**, 139,203. 2013.

POINTING, S. B. Feasibility of bioremediation by white-rotfungi. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 57, p. 20-33, 2001.

REINHAMMAR, B. Copper Proteins and Copper Enzymes, ed. R. Lontie, Vol. 3, 1-36. Boca Raton, Florida, **CRC Press**. 1984

REINHAMMAR, B.; MALMSTROM, B.G. Oxidases azuis contendo cobre. *Proteínas De Cobre. Metal Ions in Biology*, vol. 3 (Spiro TG, ed.), Pp. 109-149. Wiley, Nova Iorque, EUA. 1981.

REVANKAR, M. S.; LELE, S. S. Synthetic dye decolorization by white rot fungus, *Ganoderma sp.*, WR-1. *Bioresource Technology*, v. 98, p 775-780, 2007.

SALES, E. M. Avaliação de um reator eletroquímico utilizando eletrodo DSA (*Ti/Ru0,3Ti0,7O2*) na degradação do corante ar-88. **Dissertação de Mestrado**. Universidade Federal de Campina Grande, Campina Grande, 2014.

SCHULTZ, A.; JONAS, U.; MARTELO E.; SCHAUER, F. Dehalogenation de hydroxybiphenyls clorado pela lacasefungosa. *Appl Environ Microbiol* 67: 4377-4381. 2001.

SHLEEV, S.V., GVON, KHANI, GAZARYAN, I.G., MOROZOVA, O.V., and Yaropolov, A.I., *Appl. Biochem. Biotech.* vol. 111, no. 3, pp. 167–183. 2003.

SOLOMON, E.I., SUNDARAM, U.M. E MACHONKIN, T.E. Multicopper oxidases e oxigenases. *Chem Rev* 96: 2563-2605. 1996.

SPONZA, D. T.; ISIK, M. Decolorization and inhibition kinetics of direct black 38 azo dye with granulated anaerobic sludge. *Enzyme and Microbial Technology*, New York , v.34, n.2, p.147-158, 2004.

THURSTON, C.F. A estrutura e função das lacasesfúngicas. *Microbiologia* 140: 19-26. 1994.

TUOR, U.; WINTERHALTER, K.; FIECHTER, A. Enzymes of white-rotfungi involved in lignina degradation na decoloration determinants for wood decay. *Journal of Biotechnology*, v. 41, p. 1-17, 1995.

VAZOLLER, Rosana Filomena. **Manual Técnico sobre Microbiologia de Lodos Ativados**. CETESB, São Paulo, 2002.

VENKATARAMAN, K.; **The Chemistry of Synthetic Dyes**. The Reactive Dyes; Academic Press; New York, Vol. III (1970), Vol. VII, 1974.

WEBER, E. J. E STICKNEY, V. C.; *Water Res.*, 27, 63. 1993

WIMMER, A.C.S., Aplicação do Processo Eletrolítico no Tratamento de Efluentes de uma Indústria Petroquímica. **Dissertação de Mestrado**, Departamento de Ciência dos Materiais e Metalurgia, PUC-Rio, p. 58 – 101, 2008.

XU, F. **Appl. Biochem. Biotechnol.** ( in press). 1996b

XU, F. **Biochemistry**, 35 , 23, 7608-7614. 1996a

XU, F. **J. Biol. Chem.**, 272, 924-8. 1997.

YOSHIDA, H. **J, Chem. Soc.**, 43, 472. 1883.

ZOLLINGER, H.; **Color Chemistry**, 2a ed., V. C. H. Publishers, New York, 1991.