



## XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

### Efeito dos Mediadores Acetilacetona e Ácido Violúrico na Descoloração do Corante *Remazol Brilliant Blue R* pelas Lacases de *Ganoderma lucidum* e *Pleurotus ostreatus*

Tatiane Brugnari, Jéssica Amanda Andrade Garcia, Emanuele Parreira de Lima,  
Camila Gabriel Kato, Adelar Bracht, Rosane Marina Peralta

Universidade Estadual de Maringá – Departamento de Bioquímica  
Cep –87020-900 Maringá – PR - E-mail: tatiane.bru@gmail.com

#### RESUMO

*Lacases de Ganoderma lucidum e Pleurotus ostreatus tem sido largamente estudadas em diversos processos de biorremediação, incluindo descoloração de corantes sintéticos. Este trabalho teve como objetivo estudar o efeito dos mediadores acetilacetona e ácido violúrico na capacidade das lacases de G. lucidum e P. ostreatus descolorir o corante Remazol Brilhante Blue R (RBBR). A descoloração máxima encontrada após 4 h de tratamento em meio reacional contendo 150 ppm de RBBR e 1 U de lacase de G. lucidum aumentou de 55% para 76% pela adição de 0,62 mmol/L de acetilacetona. Quando se utilizou a enzima de P. ostreatus, a presença de 200 mmol/L de ácido violúrico aumentou a descoloração de 40% para 80%.*

Palavras-chave: Lacase; Acetilacetona; Descoloração; Biorremediação.

#### INTRODUÇÃO

As lacases (benzenodiol:oxigênio oxidoredutases, EC 1.10.3.2) são oxido-redutases que utilizam o oxigênio para oxidar uma série de substratos orgânicos incluindo fenóis, polifenóis e anilinas, por um mecanismo de transferência de um elétron (Riva, 2006). Tais enzimas, associadas às Mn-peroxidases e lignina-peroxidases, são responsáveis pela degradação do polímero recalcitrante lignina, sendo produzidas por diversos microrganismos, especialmente pelos fungos da podridão branca da madeira. *Ganoderma lucidum* e *Pleurotus ostreatus* são considerados excelentes produtores de lacases tanto em cultivos em estado sólido quanto em cultivos submersos.

Apesar dos substratos fenólicos serem mais facilmente oxidados pelas lacases, sua ação oxidativa pode ser estendida a substratos não fenólicos pela inclusão de mediadores. Mediadores são compostos orgânicos de baixa massa molecular que primeiro são oxidados pela lacase e depois oxidam os compostos não fenólicos que a lacase sozinha não é capaz de oxidar (Fig. 1) (Christopher *et al.*, 2014). Duas destas moléculas mediadoras são a acetilacetona, uma molécula de baixo custo e de baixa toxicidade, já descrita como eficiente mediador em reações de polimerização de radicais livres (Yang *et al.*, 2015) e o ácido violúrico (Fig. 2).

As lacases são muito empregadas em diversos processos de biorremediação, incluindo fármacos, derivados de petróleo, pesticidas e corantes sintéticos. Até 20% dos corantes sintéticos utilizados nas tinturarias podem ser encontrados nas águas residuais, sendo



## XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

considerados, portanto, contaminantes ambientais sérios (Ryan *et al.*, 2003). Além de serem tóxicos, a presença dos corantes em elevadas concentrações impede a entrada de luz nos corpos aquáticos, inibindo assim a fotossíntese. O *Remazol Brilliant Blue R (RBBR)* é um corante antraquinônico amplamente utilizado na indústria têxtil (Baughman & Weber, 1994). O presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito dos mediadores acetilacetona e ácido violúrico na descoloração do corante RBBR pelas lacases de *G. lucidum* e *P. ostreatus*.

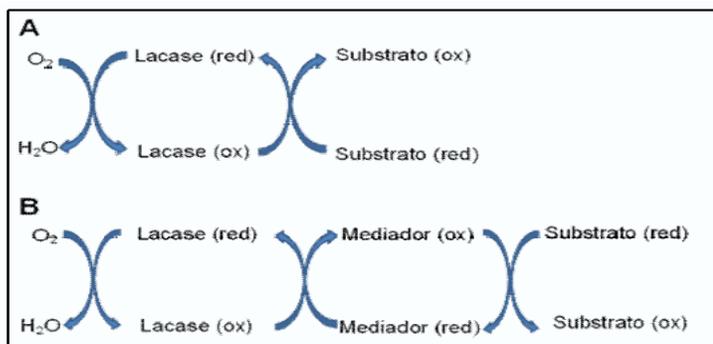


Figura 1. Esquema geral de ação das lacases na ausência e presença de mediadores.

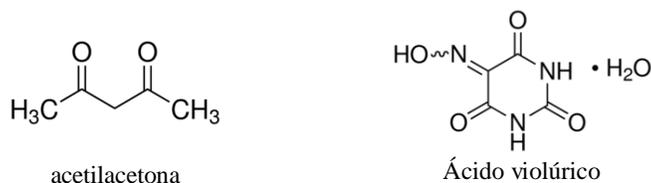


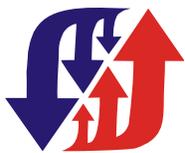
Figura 2. Estrutura química dos mediadores acetilacetona e ácido violúrico

### MATERIAL E MÉTODOS

Para a produção de lacases, *G. lucidum* e *P. ostreatus* foram cultivados por 14 dias a 28° C no resíduo de laranja (casca e bagaço) a uma umidade inicial de 90%. Os extratos enzimáticos brutos foram obtidos adicionando-se 20 mL de água destilada a cada 5 g de cultura (peso úmido), seguido de agitação por 30 min. Restos de micélio e substrato foram removidos por centrifugação (12 min a 8000 rpm). Os extratos enzimáticos límpidos foram dialisados contra água destilada em saco de diálise com *cut-off* de 12 kDa, liofilizados e congelados a -20 °C até uso.

A atividade da lacase foi determinada utilizando-se com o substrato 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico) (ABTS) em 50 mmol/L de tampão acetato de sódio, pH 5,0. A oxidação do ABTS foi determinada pelo aumento da absorbância a 420 nm ( $\epsilon = 36 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) (Shin & Lee, 2000). As atividades enzimáticas foram determinadas a 40 °C e expressas em unidade enzimática internacional (U).

As reações de descoloração do RBBR foram conduzidas a 40 °C em tampão acetato de sódio 50 mmol/L, pH 5,0 contendo (concentrações finais) 150 ppm do corante RBBR e 1,0 U

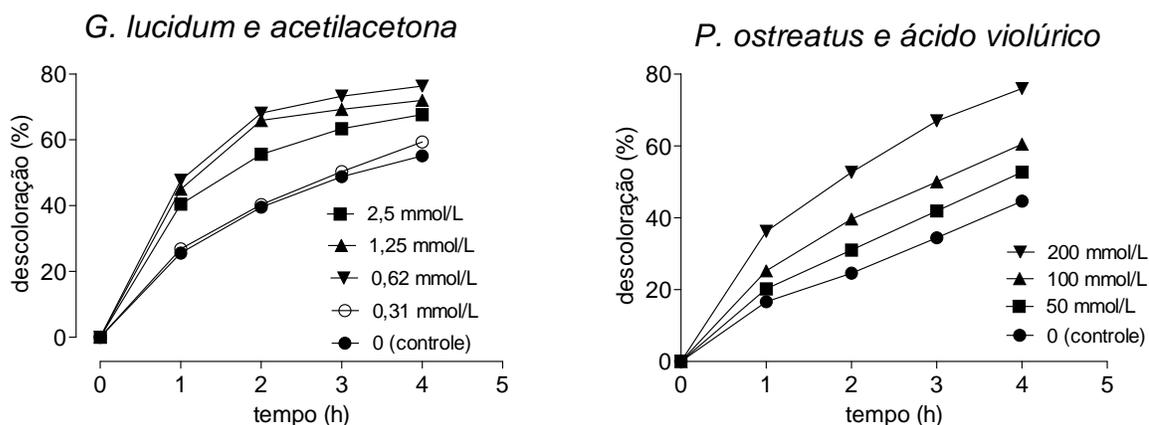


## XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

de enzima bruta. Acetilacetona foi adicionada nas concentrações variando de zero a 2,5 mmol/L e ácido violúrico nas concentrações variando de zero a 200 mmol/L. A cada hora, amostras foram retiradas e submetidas a varreduras em espectrofotômetro entre 400 e 800 nm. A porcentagem de descoloração foi avaliada em 593 nm, considerando-se como 100% a absorbância obtida nos meios reacionais onde foram utilizados iguais quantidades de extratos enzimáticos inativados por fervura. Os experimentos foram conduzidos em triplicata.

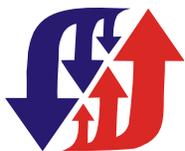
### RESULTADOS E DISCUSSÕES

*G. lucidum* e *P. ostreatus* quando cultivados em estado sólido utilizando resíduo de laranja como substrato produzem lacase como principal enzima ligninolítica. *G. lucidum* produz uma única lacase com massa molecular de 43 kDa (Mota *et al.*, 2015) enquanto *P. ostreatus* produz diversas isoenzimas (Karp *et al.*, 2012). Lacases brutas foram utilizadas nos experimentos de descoloração do corante RBBR na presença de diferentes concentrações dos mediadores acetilacetona ou ácido violúrico (Fig. 3). Utilizando-se a lacase de *G. lucidum*, na ausência do mediador, máximo de 55% de descoloração foi obtido após 4 h de tratamento. A adição de acetilacetona na concentração de 0,62 mmol/L ao meio reacional, aumentou a descoloração para 76%. Adições maiores de acetilacetona não melhoraram a descoloração, tendo um efeito negativo. Utilizando-se a lacase de *P. ostreatus*, na ausência do mediador, máximo de 40% descoloração foi obtida após 4 h de tratamento. Adição de 200 mmoles/L de ácido violúrico ao meio reacional, a descoloração aumentou para 80%.



**Figura 3.** Efeito dos mediadores na descoloração do RBBR pelas lacases de *G. lucidum* e *P. ostreatus*. A descoloração foi conduzida em tampão acetato de sódio 50 mmol/L, pH 5,0. O meio reacional continha, para um volume total de 25 mL, 150 ppm de RBBR e 1,0 U de lacase.

Lacase de *G. lucidum* tem sido utilizada em vários trabalhos de descoloração de corantes sintéticos. A título de comparação, em trabalho prévio foi descrita uma descoloração de 40% e 95% do corante RBBR (50 ppm) em meio reacional contendo 25 U/mL de enzima após 2 h e 12 h de incubação, respectivamente (Murugesan *et al.*, 2007). Neste mesmo



## XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

trabalho, a adição de mediador *N*-hidroxibenzotriazol (HBT) ao meio reacional elevou a descoloração para 92% após 2 h de tratamento.

### CONCLUSÕES

As lacases brutas de *G. lucidum* e *P. ostreatus* na presença de acetilacetona e ácido violúrico como mediadores, respectivamente, foram bastante eficientes na descoloração do corante RBBR, considerando que o meio reacional continha apenas 1 U de enzima e chegou-se em ambos os casos a 80% de descoloração .

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Baughman GL, Weber EJ. 1994. Transformation of dyes and related compounds in anoxic sediment: kinetics and products. *Environ Sci Technol* 28:267-276.
- Christopher LP, Yao B, Ji Y. 2014. Lignin biodegradation with laccase-mediator systems. *Front Ener Res* 2:12. Doi 10.3389/fenrg.2014.00012. Accessed on 29 February 2016.
- Karp SG, Faraco V, Amore A, Birolo L, Giangrande C, Soccol VT, Pandey A, Soccol CR. 2012. Characterization of laccase isoforms produced by *Pleurotus ostreatus* in solid state fermentation of sugarcane bagasse. *Bioresour Technol* 114:735-739.
- Mota TR, Kato CGK, Peralta RA, Bracht A, Morais GR, Baesso ML, Souza CGM, Peralta RM. 2015. Decolourization of Congo Red by *Ganoderma lucidum* laccase: evaluation of degradation products and toxicity. *Water Air Soil Pollut* 226:351-362.
- Murugesan K, Nam I-Y, Kim Y-M, Chang Y-S. 2007. Decolorization of reactive dyes by a thermostable laccase produced by *Ganoderma lucidum* in solid state culture. *Enzyme Microb Tech* 40:1662-1672.
- Riva S. 2006. Laccases: blue enzymes for green chemistry. *Trends Biotechnol* 24: 219-226.
- Ryan S, Schnitzhofer W, Tzanov T, Cavavopaulo A, Gubitza GM. 2003. An acid-stable laccase from *Sclerotium rolfsii* with potential for wool dye decolourization. *Enzyme Microb Technol* 33:766-774.
- Shin KS, Lee YJ. 2000. Purification and characterization of a new member of the laccase family from the white-rot basidiomycete *Coriolus hirsutus*. *Arch Biochem Biophys* 384:109-115.
- Yang H, Sun H, Zhang H, Wu B, Pan B. 2015. Potential of acetylacetone as a mediator for *Trametes versicolor* laccase in enzymatic transformation of organic pollutants. *Environ Sci Pollut Res Int* 22:10882-10889.