

PRODUÇÃO DE LIGNINASES POR *Pycnoporus sanguineus*, AVALIAÇÃO DA AÇÃO DAS ENZIMAS SOBRE MOLÉCULAS DE AZO CORANTES. Roberto Joanne Yoshihiro Fujieda, Mauricio Boscolo, Eleni Gomes. – Microbiologia – Química Ambiental – Departamento de Química e Ciências Ambientais – Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas – Campus de São José do Rio Preto.

Fungos ligninolíticos têm sido estudados com muito interesse devido a sua capacidade de modificar ou degradar a lignina. As enzimas envolvidas nesse processo tornaram-se alvo de inúmeras pesquisas visando sua aplicação biotecnológica. Os corantes sintéticos têm sido cada vez mais utilizados pelas indústrias têxtil, papelaria, fotográfica, cosmética, farmacêutica e alimentícia, em razão da fácil utilização, custos, estabilidade e variação de cores comparando-se com os naturais (BALAN; MONTEIRO, 2001; EICHLEROVÁ, 2005). Existe uma variedade de mais de 10.000 corantes, com uma produção mundial de mais de 7×10^5 toneladas, estima-se que entre 10-20% desses corantes sejam perdidos nos efluentes industriais causando sérios problemas de contaminação ambiental (FU; VIRARAGHAVAN, 2001). Uma pequena porção destes na água (10-50 mg/L) é o suficiente para que seus efeitos sejam visíveis, como a alteração na transparência e solubilidade de gases na água (CHUNG; STEVENS, 1993; CAMPOS et al., 2001). A composição química desses compostos são diversificadas e reagem com compostos inorgânicos para formar polímeros e outros produtos de difícil degradação (ROBINSON et al., 2001). Deste modo, resíduos de corantes poderiam ser altamente nocivos quando presentes em qualquer organismo vivo. A inativação destes rejeitos normalmente é realizada através de reações de hidrólise de seus grupos funcionais, que torna o corante quimicamente inerte. Alguns autores têm demonstrado que estes compostos na forma não hidrolisada 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 et al., 1984; WEBER; STICKNEY, 1993).

Os azo corantes constituem uma grande classe de corantes sintéticos e são caracterizados pela presença de um ou mais grupamentos (-N=N-) ligados a sistemas aromáticos. Estes representam cerca de 60% dos corantes atualmente utilizados no mundo, principalmente no tingimento de fibras têxteis (KUNZ et al., 2001). Estes corantes contendo a função azo aromáticos tem atraído grande atenção, pois constituem o maior grupo de corantes orgânicos produzidos mundialmente e a biotransformação destes corantes pode ser responsável pela formação de aminas, benzidinas e outros compostos intermediários com potencialidade carcinogênica (CHAGAS; DURRANT, 2001).

As pesquisas de degradação de compostos químicos têm mostrado vários microrganismos extremamente versáteis em degradar substâncias recalcitrantes. Os caminhos atuais da biotecnologia indicam fungos basidiomicetos como eficientes na descoloração e com alto potencial de ação na recuperação de ambientes contaminados. Estudos demonstram que a capacidade destes fungos em degradar corantes sintéticos está relacionada, por similaridade estrutural desses compostos, com a capacidade do mesmo em degradar a lignina através do seu complexo enzimático ligninolítico. Constituindo uma possível alternativa para o uso na remediação de efluentes industriais contendo corantes (CHET et al., 1985; KIRK; FARREL, 1987; DAVIS; BURNS, 1990).

O objetivo inicial deste trabalho foi avaliar o potencial de descoloração do azo corante Orange II (Figura 1) pelo fungo *Pycnoporus sanguineus*, em pH 3,5 na presença e ausência de ABTS (mediador da lacase), em relação ao tempo (1, 20 e 40 horas). A reação de descoloração foi realizada *in vitro*, em temperatura ambiente e em ausência de luz, consistindo de extrato enzimático bruto extraído na primeira semana de cultivo em farelo de trigo, corante e tampão com ou sem ABTS.

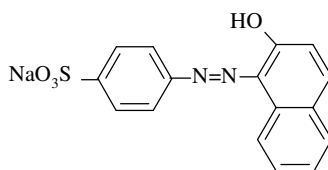


Figura 1. Fórmula estrutural do Orange II.

Nos ensaios de descoloração foram utilizados: 1,6 mL do corante na concentração de 10 mg/L, 0,2 mL de solução enzimática bruta, 0,2 mL de tampão acetato de sódio 0,5 M (pH 3,5) e 0,01 mL de peróxido de hidrogênio 10mM. Para reação utilizando o mediador foram usados: 1,4 mL do corante, 0,2 mL de solução enzimática bruta, 0,2 mL de tampão acetato de sódio 0,5 M (pH 3,5) e 0,2 mL ABTS. Foram feitos dois controles para cada ensaio de descoloração. No primeiro substituiu-se a enzima por água e no segundo, manteve-se o volume da enzima, tampão e substituiu-se o corante por água. Ao final do tempo analisado fez-se a leitura em espectrofotômetro ($\lambda_{\text{max}} = 485 \text{ nm}$), e após 40 horas foram feitas varreduras entre 350 a 800 nm.

A Tabela 1 mostra a porcentagem de descoloração do Orange II em pH 3,5 com e sem ABTS.

Tabela 1. Descoloração do Orange II por extrato enzimático bruto por *Pycnoporus sanguineus*.

Corante	Fungo	Condição	Incubação (horas)	Descoloração (%)
Orange II	<i>P. sanguineus</i>	pH 3,5	1	7%
			20	25%
			40	46%
Orange II	<i>P. sanguineus</i>	pH3,5 +ABTS	1	55%
			20	57%
			40	58%

(-) Não descoloriu

As Figuras 2 e 3 apresentam os espectros eletrônicos dos sistemas estudados após 40 horas de reação.

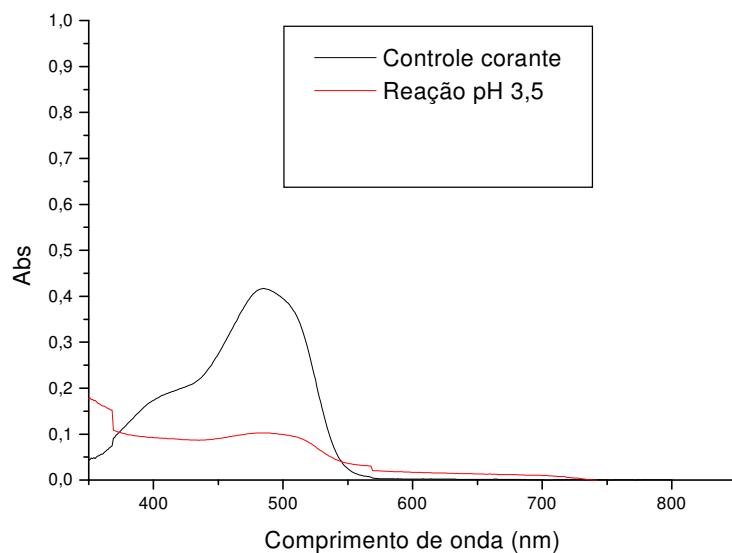


Figura 2. Espectros eletrônicos da reação em pH 3,5 após 40 horas de reação.

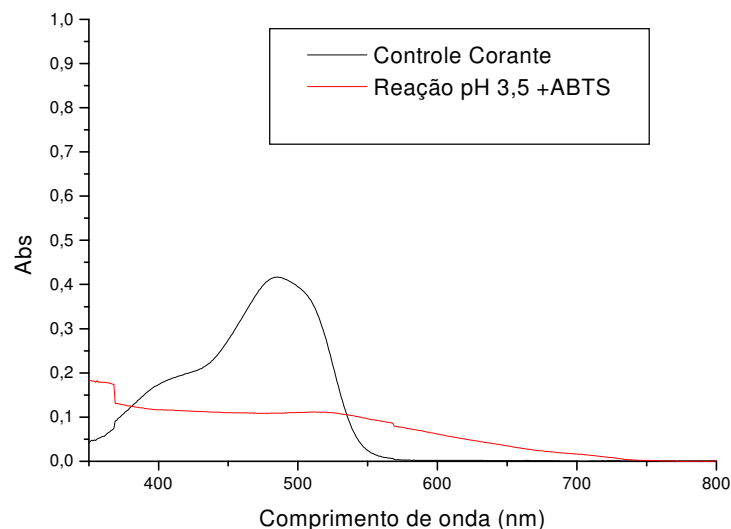


Figura 3. Espectros eletrônicos da reação em pH 3,5 mais ABTS após 40 horas de reação.

Com base nos dados da Tabela 1 e das Figuras 2 e 3 observa-se que o pH 3,5 possibilitou uma atenuação da coloração de 46% em 40 horas, devido as ligninases atuarem pH ácido. A máxima descoloração foi obtida em pH 3,5 na presença de ABTS, 58 % em 40 horas. Através de mediadores específicos como o ABTS, a lacase pode participar de processos de oxidação de outras muitas substâncias não fenólicas, que não são substratos da enzima (TAVARES, 2006). Conclui-se que as enzimas produzidas pelo fungo basidiomiceto *P. sanguineus* utilizado neste trabalho possui potencial para aplicação no tratamento de resíduos industriais, principalmente de indústrias têxteis, visto que, possibilitou significativa descoloração do corante estudado.

Referência Bibliográfica

- BALAN, D. S. L.; MONTEIRO, R. T. R. Decolorization of textile indigo dye by ligninolytic fungi. **Journal of Biotechnology**, v. 89, p. 141-145, 2001.
- CAMPOS, R., KANDELBAUER, A., ROBRA, K. H., CAVACO-PAULO, A., GÜBITZ, G. M. Indigo degradation with purified laccases from *Trametes hirsuta* and *Sclerotium rolfsii*. **Journal of Biotechnology**, v. 89, p. 131-139, 2001.
- CHAGAS, E. L.; DURRANT, L. R. Decolorization of azo dyes by *Phanerochaete chrysosporium* and *Pleurotus sajorcaju*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 29, p. 473-477, 2001.
- CHET, I.; TROJANOWSKI, J.; HUTTERMANN, A. Decolorization of the Poly B-411 and correlation with lignin degradation by fungi. **FEMS Microbiology Letters**, v. 29, p.37-43, 1985.
- CHUNG, K. T.; STEVENS, S. E. Degradation of azo dye by environmental microorganism and helminths. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 12, p. 2121-2132, 1993.
- DAVIS, S., BURNS, R. G. Decolorization of phenolic effluents by soluble and immobilized phenol oxidases. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.32, p. 721-726, 1990.
- EICHLEROVÁ, I., HOMOLKA, L., LISÁ, L., NERUD, F. Orange G and Remazol brilliant Blue R decolorization by white rot fungi *Dichomitus squalens*, *Ischnoderma resinosum* and *Pleurotus calypttratus*. **Chemosphere**, v. 60, p. 398-404, 2005.

FU, Y.; VIRARAGHAVAN, T. Fungal decolourization of dye wastewater: a review. **Bioresourse Technology**, v.79, p. 251-262, 2001.

KIRK, T. K.; FARRELL, R. L. Enzymatic “combustion”: the microbial degradation of lignin. **Annual Review of Microbiology**; v. 41, p. 465-505, 1987.

KUNZ, A.; ZAMORA-PERALTA, P.; MORAES, G. A. S.; DURÁN, N. Novas tendências no tratamento de efluentes têxteis. **Química Nova**, v. 25, n. 1, p. 78-82, 2001.

MATSUI, M.; SHIBATA, K.; TAKASE, Y.; **Dyes and Pigments**; p. 5 – 321, 1984.

ROBINSON, T.; MCMULLAN, G.; MARCHANT, R.; NIGAM, P. Remediation of dyes in Textile effluent: a critical review on current treatment technologies with a proposed alternative. **Bioresourse Technology**, v. 77, p. 247-255, 2001.

TAVARES, A. P. M. Produção de lacase para potencial aplicação como oxidante na indústria papelreira; **Universidade de Aveiro**, Departamento de Química, 2006.

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

Bolsa: FAPESP processo 2006/01092-2