



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Estágio de monografia II

ATIVIDADE DE LACASE E DESCOLORAÇÃO DE CORANTES INDUSTRIAIS
POR EXTRATO ENZIMÁTICO DE *LEIOTRAMETES MENZIESII* (BERK.) WELTI &
COURTEC. CULTIVADO EM MEIO LÍQUIDO E EM CASCA DE TUCUMÃ.

Douglas Costa de Oliveira Filho

Manaus – AM
Julho 2023

Douglas Costa de Oliveira Filho

ATIVIDADE DE LACASE E DESCOLORAÇÃO DE CORANTES INDUSTRIAIS
POR EXTRATO ENZIMÁTICO DE *LEIOTRAMETES MENZIESII* (BERK.) WELTI &
COURTEC. CULTIVADO EM MEIO LÍQUIDO E EM EM CASCA DE TUCUMÃ.

Monografia de Graduação apresentada ao
Instituto de Ciências Biológicas da Universidade
Federal do Amazonas como requisito parcial
para a obtenção do grau de bacharel em
Ciências Biológicas.

Orientador

Prof. Dr. José Renato Pereira Cavallazzi

Universidade Federal do Amazonas
Instituto de Ciências biológicas

Manaus-AM
Julho 2023

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Oliveira Filho, Douglas Costa de
O48a Atividade de lacase e descoloração de corantes industriais por extrato enzimático de *Leiotrametes menziesii* (Berk.) Welti & Courtec. cultivado em meio líquido e em casca de tucumã. / Douglas Costa de Oliveira Filho . 2023
17 f.: il. color; 31 cm.

Orientador: José Renato Pereira Cavallazzi
TCC de Graduação (Ciências Biológicas) - Universidade Federal do Amazonas.

1. Biorremediação. 2. Corantes têxteis. 3. Fungos. 4. Fenoloxidasas. 5. Podridão branca. . I. Cavallazzi, José Renato Pereira. II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

Resumo

Os fungos de podridão branca são organismos decompositores de madeira que sintetizam uma gama de enzimas que podem ser aplicadas em processos biotecnológicos e industriais. Tais enzimas podem ser utilizadas em processos de biorremediação de efluentes poluídos com corantes industriais. A lacase é uma das enzimas sintetizadas por esses organismos que atua na degradação da lignina, substância recalcitrante que confere rigidez às fibras vegetais. O objetivo do presente trabalho foi determinar a atividade de lacase e a capacidade de descolorir corantes industriais de um extrato enzimático de *Leiotrametes menziesii* cultivado em meio líquido e em casca de tucumã. Seis corantes foram utilizados: Acid Red 1, Remazol Brilliant Blue R, Acid Blue 129, Reactive Blue 4, Reactive Black 5 e Verde Malaquita. Testes qualitativos com guaiacol e ácido tânico confirmaram a presença de fenoloxidasas. Atividade de lacase foi determinada em meio líquido após 14 dias de cultivo, atingindo 762,92 UI/L em pH 2,5. O extrato foi capaz de degradar todos os corantes com exceção de Acid Red1. Na segunda etapa do estudo o isolado foi cultivado em cascas de tucumã e o extrato utilizado para determinar a atividade da lacase e ensaios de descoloração em pH 2,5. Não foi detectada atividade de lacase no extrato enzimático, bem como também não foi capaz de causar descoloração, indicando que talvez exista uma correlação entre a atividade de lacase e a degradação destas substâncias.

Palavras-chave: biorremediação, corantes têxteis, fungos, fenoloxidasas, podridão branca.

Introdução

Corantes artificiais são empregados em diferentes indústrias, tais como: têxtil, papel e celulose, farmacêutica e cosmética, entre outras. Seu descarte inadequado afeta negativamente toda a cadeia alimentar por interferir na fotossíntese, além de causar efeitos mutagênicos e carcinogênicos (AFENA et al., 2021). Os processos abióticos convencionais de tratamento de água, sejam físicos, químicos ou físico-químicos, como ozonização, osmose reversa, ultrafiltração, coagulação e floculação, geralmente são ineficazes e/ou caros (YI et al., 2018) e apresentam limitações, como alta demanda de produtos químicos, eficiência limitada na remoção de substâncias orgânicas recalcitrantes e menor adaptabilidade em comparação com os processos bióticos, que possuem capacidade de se ajustar às mudanças nas condições ambientais (CRINI & LICHTFOUSE., 2019).

Os fungos basidiomicetos de podridão branca são organismos decompositores capazes de degradar a madeira, incluindo uma substância recalcitrante presente nas fibras vegetais chamada lignina (DO CARMO et al., 2022). Estes organismos recebem essa denominação devido à aparência clara e esponjosa que a madeira adquire após a decomposição. As enzimas que degradam a lignina são chamadas de ligninases, sendo as mais estudadas as lacases, manganês peroxidases e lignina peroxidases (SILVA & SILVA, 2006).

A lacase é uma oxidase pertencente à família multicobre, capaz de catalisar a oxidação de uma ampla variedade de compostos fenólicos e outros compostos aromáticos, incluindo ligninas e flavonoides (MAYER & STAPLES, 2002). Esta enzima é produzida por seres vivos como plantas, animais e bactérias, mas são os fungos os maiores produtores (MAINARDI et al., 2015). As lacases fúngicas são amplamente utilizadas em diversas aplicações industriais, incluindo a produção de papel e polpa, tratamento de efluentes, biodescoloração de corantes têxteis, síntese de compostos químicos, produção de alimentos e bebidas (WIDSTEN & KANDELBAUER, 2008), tornando-as importantes em processos como deslignificação, produção de etanol, modificação de fibras de madeira, branqueamento de corantes, plásticos e produtos farmacêuticos, além da remediação de solos (DURÁN et al., 2002; MAYER & STAPLES, 2002).

Estudos anteriores, (Do Carmo et al., 2022), indicaram que a lacase pode ter um papel importante na degradação de corantes industriais. Nesse estudo em particular, os resultados revelaram a capacidade dos fungos de podridão branca em descolorir os corantes, sugerindo que a lacase pode ser um dos agentes responsáveis por esse processo. No entanto, é importante ressaltar que outros tipos de fenoloxidasas também podem ser sintetizados por esses fungos e contribuir para a degradação dos corantes. No estudo em questão, foram utilizados diversos corantes, como o Acid Red 1 (AR1), Remazol Brilliant Blue R (RBBR), Acid Blue 129 (AB129), Reactive Blue 4 (RB4) e Reactive Black 5 (RB5).

o gênero *Trametes* sp. tem se mostrado promissor em relação aos estudos envolvendo a produção de lacases e outras fenoloxidasas (MSWAKA & MAGAN,

1998). *Leiotrametes menziesii* (= *Trametes menziesii* de acordo com Welti et al. (2012)) foi utilizado em estudos anteriores no tratamento de chorume (RAZARINAH et al., 2015), mas durante a pesquisa bibliográfica do presente trabalho não foi encontrado nenhuma pesquisa visando sua capacidade de degradar corantes têxteis.

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a atividade de lacase e a capacidade de descolorir corantes industriais do extrato enzimático de *L. menziesii* cultivado em meio líquido e em casca de tucumã.

Materiais e métodos

1. Isolado fúngico

O isolado de *L. menziesii* utilizado neste estudo foi obtido a partir de basidiocarpos coletados na mata do campus da Universidade Federal do Amazonas

2. Indicadores e corantes

Foram utilizados dois indicadores de atividade ligninolítica: ácido tânico e guaiacol. Diferentes corantes pertencentes a três classes de corantes também foram utilizados. Antraquinonas: Remazol Brilliant Blue R (RBBR), Acid Blue 129 (AB129) e Reactive Blue 4 (RB4). Azo: Reactive Black 5 (RB5) e Acid Red 1 (AR1). Triarilmetanos: Verde malaquita (VM).

3. Investigação qualitativa de atividade de lacase

O isolado foi repicado para placas de petri contendo meio batata dextrose ágar (BDA) acrescido ácido tânico (5g/L) ou guaiacol (500ppm) e incubado em temperatura ambiente. O aparecimento de um halo marrom ao redor das colônias crescendo nas placas contendo ácido tânico ou de um halo vermelho nas placas com guaiacol foi considerado positivo para produção de lacases.

4. Cultivo de *L. menziesii* em meio sólido

Foi realizado o preparo do meio de cultura (BDA) e, em seguida, acrescentadas as soluções dos seis diferentes corantes utilizados, na concentração de 500ppm. O isolado foi cultivado em meio sólido com o objetivo de testar sua capacidade de descoloração. Essa etapa foi realizada em temperatura ambiente, com duração de 21 dias ou até que ocorresse a descoloração completa do meio de cultura.

5. Cultivo de *L. menziesii* em meio líquido

O isolado foi cultivado em meio líquido visando à obtenção do extrato para a determinação da atividade de lacases e descoloração. O isolado foi repicado para placas de petri contendo meio BDA e, após 10 dias de incubação em temperatura ambiente, discos de meio de cultura contendo micélio foram transferidos para frascos Erlenmeyer (150mL) contendo 50mL de meio caldo batata dextrose (BD) adicionado de $MnSO_4$ (0,5g/L) e $CuSO_4$ (250ppm), pH 4,9. Para cada frasco foi transferido um disco de 8mm com três replicatas. As culturas foram incubadas por 18 dias em modo estático, no escuro e em temperatura ambiente.

6. Determinação da massa micelial seca

Após 18 dias de cultivo os micélios foram retirados para a determinação da massa micelial seca. Para tanto, os micélios foram depositados em círculos de papel filtro previamente secados e pesados. Posteriormente, os discos de papel contendo micélios frescos foram acondicionados em uma estufa de secagem, na qual permaneceram por 24h a 60°C. Após esse período, os discos, juntamente com o micélio seco foram pesados e da massa total foi subtraída da massa dos discos para então obter a massa micelial.

7. Cultivo de *L. menziesii* em condições de fermentação em estado sólido

Frutos do tucumazeiro foram comprados em comércio local e então descascados em laboratório de modo a ter certeza de que as cascas obtidas eram frescas. As cascas foram cortadas em pedaços de 5mm x 5mm e então secas em estufa por 24h a 60°C. Para frascos Erlenmeyer de 250mL foram transferidos 7g de cascas de tucumã secas e então foi adicionada solução de CuSO₄ (250ppm) de modo a ajustar a umidade do substrato em 80%. Os frascos então foram fechados com tampões de algodão cobertos com papel alumínio e esterilizados em autoclave por 15 minutos a 121°C. Após o resfriamento, três discos de meio de BDA contendo micélio do isolado em crescimento ativo (culturas com cinco dias de incubação) foram transferidos para cada frasco. As culturas foram então incubadas em temperatura ambiente no escuro por 7, 14 e 21 dias. Em cada um desses períodos, três frascos foram utilizados para a preparação do extrato enzimático.

8. Preparo do extrato enzimático a partir das culturas de fermentação em estado sólido

Para cada frasco foram transferidos 50mL de tampão acetato de sódio (pH 5,0; 1mM). O sobrenadante foi coletado e armazenado em freezer até sua utilização.

9. Atividade de lacase

A atividade de fenoloxidasas do tipo lacase (F_{LAC}) foi determinada pela oxidação de 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazoline-6-sulfonato, ABTS) de acordo com Buswell *et al.* (1995). A mistura de reação (1 mL) continha 600 μ L de extrato enzimático, 300 μ L de tampão acetato de sódio (pH 5,0; 0,1 M) e 100 μ L de solução de ABTS (1 mM). A oxidação foi determinada pelo aumento na absorvância a 420 nm ($\epsilon_{420} = 36000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima capaz de oxidar 1 μ mol de ABTS por minuto.

10. Ensaio de descoloração

A porcentagem de descoloração de cada corante foi determinada de acordo com a metodologia descrita por Araújo et al. (2019). A descoloração foi monitorada em espectrofotômetro nos respectivos comprimentos de onda (nm) (RBBR, 592; AB129, 629; RB4, 595; RB5, 597; AR1, 506 e VM, 617) durante duas horas em uma mistura de reação contendo 600µL de extrato enzimático, 250µL de tampão acetato de sódio (pH 5,0; 0,1M), 100µL de solução do corante (200mg/L), e com 50µL de solução 1mM de sulfato de cobre. Nas amostras controle não foi adicionado extrato enzimático e tampão foi utilizado para completar o volume. A porcentagem de descoloração foi calculada da seguinte forma:

$$\text{Descoloração (\%)} = 100 - \left(\frac{100 * ABSf}{ABSi} \right)$$

Em que:

$ABSi$ = absorvância inicial;

$ABSf$ = absorvância final

Resultados e discussão

O cultivo dos isolados em meios contendo ácido tânico e guaiacol demonstrou a presença de fenoloxidasas (Figura 01).



Figura 01 – Halo de oxidação formado durante o crescimento do fungo em meio contendo ácido tânico e guaiacol, respectivamente.

No teste de descoloração em BDA o isolado foi capaz de descolorir o meio de cultura contendo diferentes corantes, no entanto foi possível observar que o corante VM apresentou ligeiro atraso em relação aos outros corantes (Figura 02).

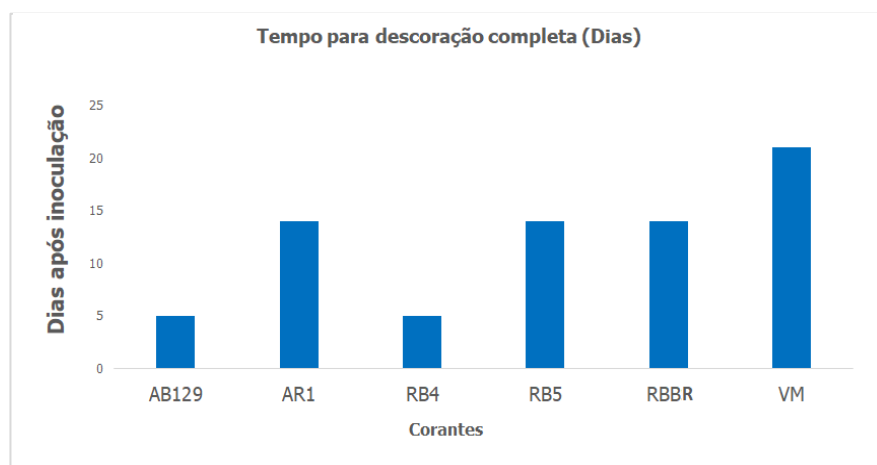


Figura 02 – Tempo (dias) para descoloração total do meio de cultura BDA contendo os corantes.

Os corantes AB129 e RB4 foram degradados pelo fungo antes da primeira semana de inoculação. Os corantes AR1, RB5 e RBBR foram degradados com duas semanas a partir da inoculação e o corante VM foi descolorido após três semanas. Das três replicatas contendo VM o isolado conseguiu se desenvolver em apenas uma (Figura 03), e nesse caso ocorreu a descoloração do corante.

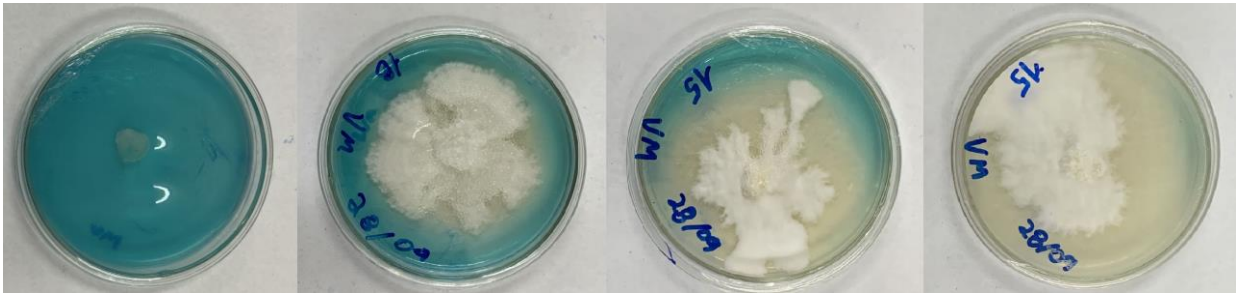


Figura 03 – Degradação do corante VM após 1, 5, 14 e 21 dias de cultivo

Outro exemplo de degradação pode ser evidenciado pelo corante AR1 no qual o micélio tomou conta do meio de cultura contendo o corante (Figura 04).

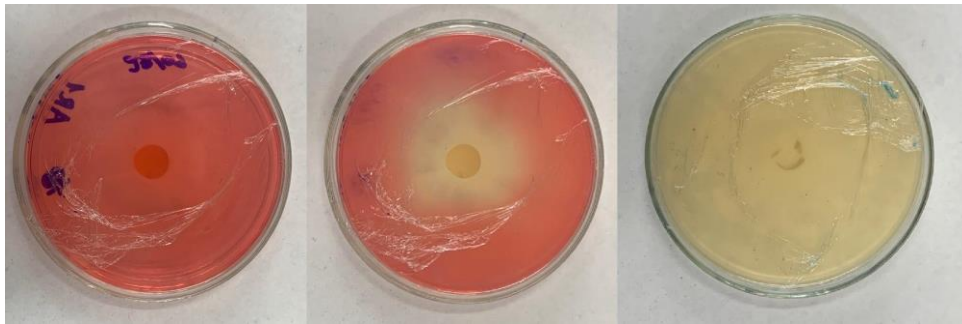


Figura 04 - Degradação progressiva do corante AR1 a 1, 5 e 14 dias de cultivo

A partir do primeiro terceiro dia foi possível observar que o inóculo do disco micelial estava se desenvolvendo no meio de cultura líquido (Figura 05). Após 14 dias de cultivo a massa micelial foi separada do extrato e pesada obtendo-se na média das amostras 0,16g.

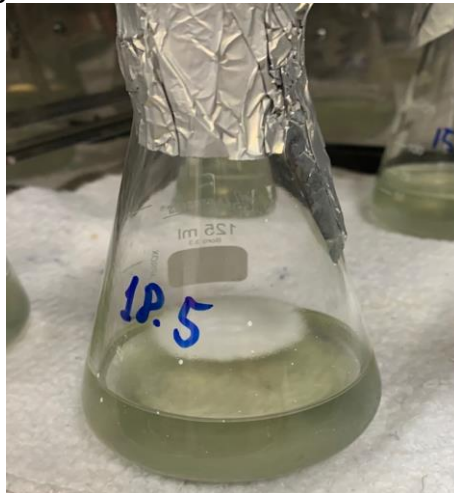


Figura 05 – Cultura de *Trametes menziesii* em meio líquido após 3 dias de inoculação.

Apesar do micélio se desenvolver bem no meio com cascas de tucumã, (Figura 06) o extrato obtido a partir da fermentação sólida não apresentou atividade de lacase e também não causou descoloração de nenhum corante, talvez isso ocorra por este meio não estimular a produção de lacases e outras fenoloxidasas.



Figura 06 – Desenvolvimento micelial de *Trametes menziesii* em casca de tucumã à 5 e 14 dias.

A atividade de lacase foi determinada em três níveis de pH (2,5; 3,5; 4,5) e foi detectada maior atividade em pH 2,5, que foi decaindo conforme o meio se tornava menos ácido (Figura 07).

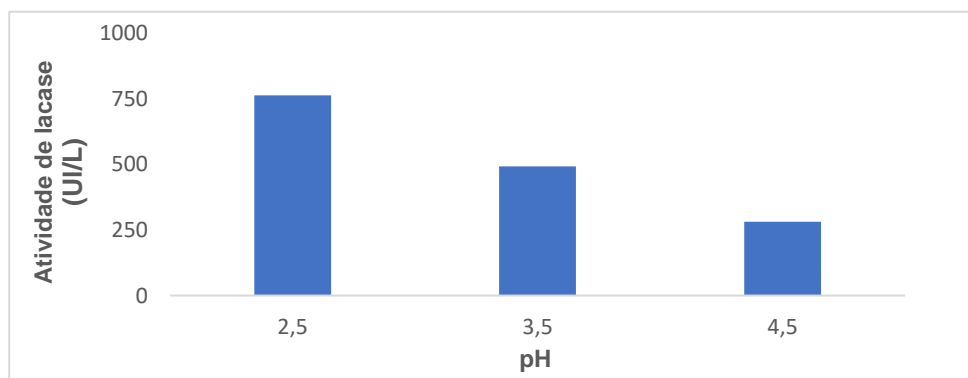


Figura 07 – Atividade de lacase de *L. menziesii* após 14 dias de cultivo em meio líquido em três níveis de pH.

O pH ótimo da lacase varia entre 2,4 e 7,0 de acordo com o isolado e o substrato utilizado (SILVA & SILVA, 2006). Por exemplo, Ryan et al. (2003) encontraram o pH ótimo de 2,5 para lacase de *Sclerotium rolfsii* utilizando como substrato ABTS. Em contrapartida, Brown et al. (2002), também utilizando ABTS determinou em 5,5 o pH ótimo para lacase de *Trametes versicolor*. Porém, espera-se que o pH ótimo seja ligeiramente ácido devido aos ácidos orgânicos geralmente produzidos pelos fungos de podridão branca durante seu crescimento na madeira

(MÄKELÄ et al., 2002).O extrato obtido a partir do cultivo em meio líquido foi submetido ao teste de descoloração utilizando diferentes níveis de pH (Figura 08).

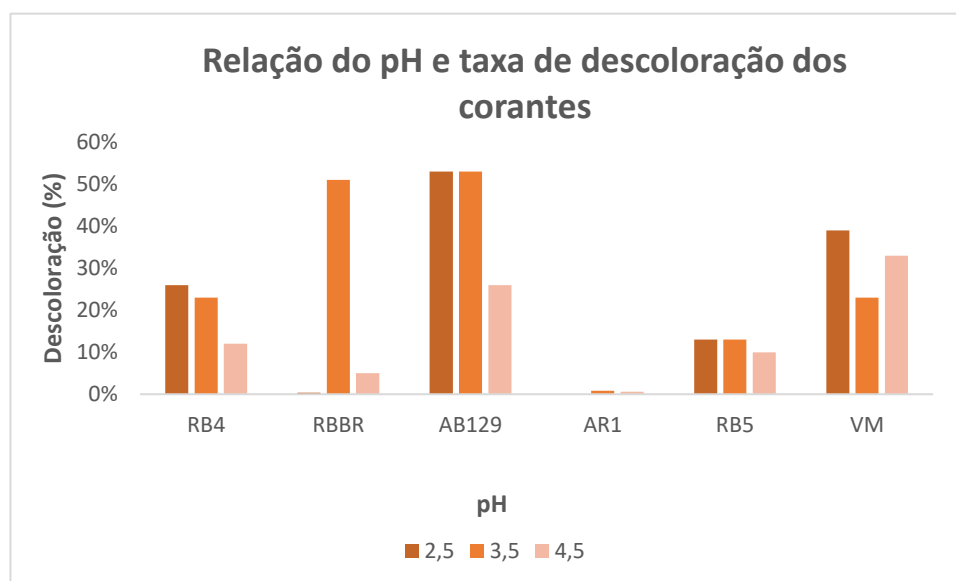


Figura 07 – Taxa de descoloração dos corantes utilizando extrato do isolado cultivado em meio líquido

O corante RB4 seguiu a tendência de pH ótimo da lacase mostrando uma maior de descoloração no pH 2,5. RBBR foi descolorido no pH 3,5 e pouco no pH 2,5 indicando que talvez a lacase não fez parte da descoloração deste corante, estudos usando este mesmo corante como o de Sumandono et al. (2015) sugerem uma alta atividade de manganês peroxidase (MnP) na degradação do corante RBBR podendo 3,5 ser o pH ótimo da enzima em questão. AB129 foi o corante mais degradado chegando a níveis de 50% e mostrando que o fungo utilizado no estudo é eficiente para degradação deste corante e possivelmente indicando uma atividade de lacase na degradação no mesmo. O corante AR1 não respondeu aos testes de descoloração, possivelmente este corante não consegue ser degradado utilizando lacase; RB5 seguiu a tendencia de atividade da lacase; VM apresentou degradação, porém menor no pH 3,5 indicando que talvez duas enzimas podem fazer parte de degradação deste corante, uma com atividade ótima no pH 2,5 que pode ser o caso da lacase e outra com atividade ótima no pH 4,5.

Conclusão

O isolado se mostrou capaz de produzir lacase o seu extrato propiciou a degradação de cinco dos seis corantes utilizados no estudo. Essa enzima possuiu um papel fundamental na degradação dos corantes, mas se mostra necessário a investigação de outras enzimas que podem também atuar na degradação dos corantes. O isolado se mostrou potencialmente eficiente para utilização em sistemas de biorremediação visto que foi capaz de degradar corantes de três classes distintas mostrando versatilidade e adaptabilidade, características que são buscadas neste campo. São necessários mais estudos que investiguem as capacidades enzimáticas de *L. menziesii*.

Referências

AFENA, A. S., BOATENG, D. K., DARKWAH, L., & ADJAOTTOR, A. A. **Decolourisation of textile wastewater by dye degrading microorganisms isolated from textile effluent.** Journal of Environmental Protection, v. 12, p. 767-783. 2021.

BROWN, M.A.; ZHAO, Z. & MAUK, A.G. **Expression and characterization of a recombinant multicopper oxidase: laccase IV from *Trametes versicolor*.** Inorganica Chimica Acta, v. 331, p. 232-238., 2002.

CRINI, GRÉGORIO; LICHTFOUSE, ERIC. **Advantages and disadvantages of techniques used for wastewater treatment.** Environmental Chemistry Letters, v. 17, p. 145-155, 2019.

DO CARMO, M.A.; MUNIZ, A. W.; CAVALLAZZI, J.R.P. **Atividade ligninolítica e descoloração de corantes industriais por fungos de podridão branca isolados no campus da UFAM.** Scientia Amazonia, v. 11, n. 1, CB1-CB13, 2022.

DURÁN, N.; ESPÓSITO, E. **Biodegradação de lignina e tratamento de efluentes por fungos ligninolíticos.** Microbiologia ambiental. Jaguariúna: Embrapa - CNPMA. Documentos, v. 11, p. 269-292, 1997.

HARITASH, A. K., & KAUSHIK, C. P. **Biodegradation of hazardous organic pollutants by fungi: An overview.** Applied Microbiology and Biotechnology, 83(6), p. 961-971, 2009.

MAINARDI, P. H. **Produção de lacases pelo fungo filamentososo de origem marinha *Peniophora* sp. CBMAI 1063 em biorreator de bancada.** 65 f. Dissertação mestrado, Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro, 2015.

MÄKELÄ, M., Galkin, S., Hatakka, A., & Lundell, T. **Production of organic acids and oxalate decarboxylase in lignin-degrading white rot fungi.** Enzyme and Microbial technology, v. 30, n. 4, p. 542-549, 2002.

MAYER, A.M.; STAPLES, R.C. **Laccase: New functions for na old enzyme** Phytochemistry, v. 60, p. 551-565, 2002.

MSWAKA, A. Y.; MAGAN, N. **Wood degradation, and cellulase and ligninase production, by Trametes and other wood-inhabiting basidiomycetes from indigenous forests of Zimbabwe.** Mycological Research, v. 102, n. 11, p. 1399-1404, 1998.

RAZARINAH, W. A. R. W.; ZALINA, M. NOOR; ABDULLAH, NOORLIDAH. **Utilization of the white-rot fungus, *Trametes menziesii* for landfill leachate treatment.** Sains malays, v. 44, p. 309-316, 2015.

RYAN, S.; SCHNITZHOFER, W.; TZANOV, T.; CAVACO-PAULO, A. & GUBITZ, G.M. **An acid-stable laccase from *Sclerotium rolfsii* with potential for wood dye decolourization.** Enzyme and Microbial Technology, v. 33, p. 766-774., 2003.

SILVA, E. A. da; SILVA, A. C. e. **Atividade Enzimática da Lacase em Três Fungos Amazônicos Degradadores de Madeira.** Dissertação de mestrado, Universidade do Estado do Amazonas. p.112, 2006.

SUMANDONO, T., SARAGIH, H., WATANABE, T., & AMIRTA, R. **Decolorization of Remazol Brilliant Blue R by new isolated white rot fungus collected from tropical rain forest in East Kalimantan and its ligninolytic enzymes activity.** Procedia Environmental Sciences, v. 28, p. 45-51, 2015.

WELTI, S.; MOREAU, P.A.; FAVEL, A.; COURTECUISSÉ, R.; HAON, M.; NAVARRO, D.; TAUSSAC, S.; LESAGE-MEESSEN, L. **Molecular phylogeny of *Trametes* and related genera, and description of a new genus *Leiotrametes*.** Fungal Divers. 55, 47-64. 2012.

WIDSTEN, PETRI; KANDELBAUER, ANDREAS. **Laccase applications in the forest products industry: a review.** Enzyme and microbial technology, v. 42, n. 4, p. 293-307, 2008.

YI, H.; HUANG, D.; QIN, L.; ZENG, G.; LAI, C.; CHENG, M.; YE, S.; SONG, B.; REN, X.; GUO, X. **Selective prepared carbon nanomaterials for advanced**

photocatalytic application in environmental pollutant treatment and hydrogen production. Applied Catalysis B: Environmental, v. 239, p. 408–424, 2018.