

## Estratégias para remoção de contaminantes emergentes de soluções aquosas: bioissorção e biodegradação enzimática

### RESUMO

**Dayane Moreira Braga**  
[dayanebraga01@gmail.com](mailto:dayanebraga01@gmail.com)  
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, UTFPR, Curitiba, Paraná, Brasil

**Giselle Maria Maciel**  
[gisellemaria@gmail.com](mailto:gisellemaria@gmail.com)  
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, UTFPR, Curitiba, Paraná, Brasil

**OBJETIVO:** Avaliar a eficiência da enzima lacase livre e imobilizada pelo método de CLEAs na biodegradação do corante Preto Reativo 5 como uma proposta de tratamento alternativo, uma vez que os corantes não são eficientemente removidos por processos convencionais de tratamento de efluentes e representam uma forte preocupação ambiental com relação ao seu descarte no meio ambiente. **MÉTODOS:** Os testes foram conduzidos em triplicata em tubos de ensaio contendo 5 mL de solução de corante a 50 mg L<sup>-1</sup>, onde foram adicionados 50 U L<sup>-1</sup> de lacase livre e imobilizada, comparando a eficiência de ambas. Os tubos foram colocados sob agitação a 130 rpm, a 37 °C por um período de 24 h. A descoloração foi avaliada por meio de uma curva analítica e calculada através das absorbâncias das amostras em espectrofotômetro a 584,5 nm. Os CLEAs de lacase foram formados pela adição de sulfato de amônio 55 % e 200 µL de glutaraldeído em 2 mL da solução de enzima. **RESULTADOS:** As atividades enzimáticas do extrato bruto e dos CLEAs de lacase foram 3114 U L<sup>-1</sup> e 98 U L<sup>-1</sup>, respectivamente. No ensaio de biodegradação, a enzima livre descoloriu 5,49 %, enquanto os CLEAs de lacase resultaram em 43,83 % de descoloração. **CONCLUSÕES:** Os CLEAs de lacase mostraram-se mais eficientes na descoloração, uma vez que são mais estáveis em condições variadas. Para a enzima livre, o baixo percentual de descoloração indica a necessidade de adição de mediadores de lacase.

**PALAVRAS-CHAVE:** Descoloração. Imobilização enzimática. Lacase.

## 1 INTRODUÇÃO

Os corantes são largamente utilizados em diversos setores industriais (RATANAPONGLEKA; PHETSON, 2014; CIULLINI et al., 2008). Apesar de não serem classificados como contaminantes emergentes, objetivo inicial deste projeto a quem o título se refere, os corantes também requerem grande atenção quanto ao seu descarte no meio ambiente. Eles representam uma forte preocupação porque uma quantidade expressiva desses compostos é descarregada no ambiente junto aos efluentes industriais (MECHICHI; MHIRI; SAYADI, 2006; RATANAPONGLEKA; PHETSON, 2014). Os corantes são resistentes aos tratamentos convencionais de efluentes e ao atingirem os corpos hídricos alteram diretamente a qualidade das correntes receptoras, bem como as atividades fotossintéticas dos organismos aquáticos (RATANAPONGLEKA; PHETSON, 2014; CIULLINI et al., 2008).

O processo biológico de oxidação enzimática representa uma alternativa para a remoção/degradação dos corantes (GRASSI et al., 2011). Para essa finalidade, as enzimas ligninolíticas, as quais incluem a lacase, destacam-se por apresentarem baixa especificidade, podendo oxidar uma gama variada de xenobióticos estruturalmente relacionados à lignina, o substrato natural dessas enzimas (MECHICHI; MHIRI; SAYADI, 2006; COUTO; HERRERA, 2006).

As lacases (E.C. 1.10.3.2) são produzidas por fungos, especialmente os fungos da podridão branca como o *Pleurotus ostreatus*, durante o metabolismo primário na decomposição de materiais lignocelulósicos (RATANAPONGLEKA; PHETSON, 2014; AGUIAR; FERRAZ, 2011; HOU et al., 2004). São cuproproteínas, classificadas como fenoloxidasas, independentes de peróxido de hidrogênio para atuarem. Esse grupo de enzimas atua pela abstração de 1 elétron de estruturas fenólicas e não fenólicas, em função da redução de  $\text{Cu}^{2+}$  a  $\text{Cu}^+$  que, por sua vez, reduz  $\text{O}_2$  a  $\text{H}_2\text{O}$ , permitindo que a enzima atue de forma cíclica (AGUIAR; FERRAZ, 2011).

Um das dificuldades da técnica de oxidação enzimática é a instabilidade das enzimas sob as condições operacionais. Essas desvantagens podem ser contornadas pela imobilização que pode aumentar a estabilidade da atividade enzimática em condições variáveis e facilitar a recuperação e a reutilização desses biocatalisadores (MATIJOSYTE et al., 2010). Uma das técnicas de imobilização enzimática que pode ser aplicada a uma ampla variedade de enzimas incluindo a lacase, é conhecida por CLEAs – *Cross-Linked Enzyme Aggregates*, que ocorre pela precipitação da enzima seguida da reticulação do precipitado, resultando em agregados enzimáticos mais estáveis (MATIJOSYTE et al., 2010; SHELDON, 2007).

O objetivo deste trabalho foi, portanto, produzir e imobilizar pelo método de CLEAs as lacases de *Pleurotus ostreatus* e avaliar a eficiência da biodegradação do corante têxtil Preto Reativo 5 utilizando a enzima livre e a enzima imobilizada, comparando a eficiência de ambas.

## 2 METODOLOGIA

### 2.1 PRODUÇÃO DOS EXTRATOS RICOS EM LACASE

Os extratos foram produzidos em cultivo líquido estacionário em Erlenmeyers de 150 mL com 35 mL de meio constituído por: glicose  $15 \text{ g L}^{-1}$ , peptona  $0,7 \text{ g L}^{-1}$ , casca de arroz 1,5 %, pó de eucalipto 1,5 %,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$   $4,5 \text{ g L}^{-1}$ ,  $\text{CuSO}_4$   $1,5 \text{ mM}$  e

ácido ferúlico 1,5 mM, onde foram transferidos três discos de ágar contendo o micélio fúngico. Os cultivos foram incubados por sete dias e depois filtrados em papéis de filtro qualitativos.

## 2.2 IMOBILIZAÇÃO DE LACASES POR *CROSS-LINKED ENZYME AGGREGATES*

Os CLEAs foram obtidos pela adição de sulfato de amônio 55% como agente precipitante e 200 µL de glutaraldeído como agente de reticulação em 2 mL de solução de enzima. A solução foi armazenada a 4 °C por 24 h. Subsequentemente, a solução foi centrifugada a 5000 rpm por 15 min e depois foi lavada com água deionizada até que nenhuma atividade fosse detectada no sobrenadante (MATIJOSYTE et al., 2010; CABANA; JONES; AGATHOS, 2007).

## 2.3 ENSAIO DE ATIVIDADE DE LACASE NOS EXTRATOS ENZIMÁTICOS

As atividades enzimáticas do extrato bruto e dos CLEAs de lacase foram determinadas em espectrofotômetro UV-Vis Bel Photonics (UV-M51) a 420 nm pelo monitoramento da oxidação do ABTS [2,2'-azino-bis (3-ethylthiazoline-6-sulphonate)] (HOU et al., 2004).

## 2.4 ENSAIOS DE DESCOLORAÇÃO DO CORANTE PRETO REATIVO 5

Os ensaios de biodegradação foram realizados em triplicata em tubos de ensaio contendo 5 mL de solução aquosa de corante 50 mg L<sup>-1</sup>, onde foram adicionados 50 U L<sup>-1</sup> de enzima livre (extrato bruto) e enzima imobilizada. Concomitantemente, dois tubos controle (sem adição de enzima) foram analisados para avaliar se ocorre a degradação do corante por fatores externos. Os ensaios foram realizados em meio agitado a 130 rpm, por um período de 24 h a 37 °C. A descoloração foi calculada por meio da Equação (1):

$$\text{Descoloração(\%)} = \frac{\text{ABS}_i - \text{ABS}_f}{\text{ABS}_i} \times 100 \quad (1)$$

Onde: ABS<sub>i</sub> corresponde à absorbância inicial da solução do corante antes do tratamento enzimático e ABS<sub>f</sub> é a absorbância das amostras após o ensaio de biodegradação.

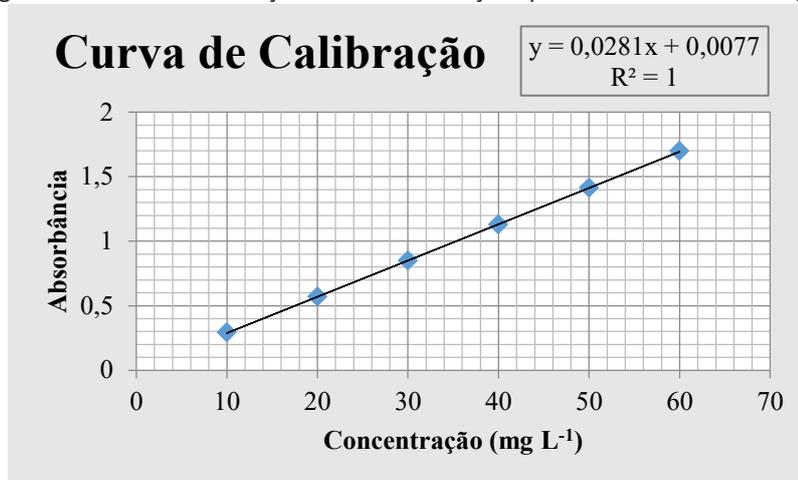
## 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A escolha por avaliar a biodegradação enzimática do corante ao invés de hormônios estrógenos, objetivo inicial deste projeto, se deu em virtude do tempo e dos recursos disponíveis para os ensaios, considerando que as análises de hormônios estrógenos são metodologicamente mais exigentes e demandam mais tempo para a execução dos testes.

As atividades enzimáticas do extrato bruto e dos CLEAs de lacase foram 3114 e 98 U L<sup>-1</sup>, respectivamente. A curva de calibração para monitorar a

biodegradação do corante é mostrada na Figura 1.

Figura 1 – Curva de calibração com concentrações padrões entre 10 e 60 mg L<sup>-1</sup>



Fonte: Autoria própria (2017).

A porcentagem de descoloração das amostras analisadas é mostrada na Tabela 1. Os CLEAs de lacase foram mais eficientes na remoção de cor. A maior descoloração, nesse caso, deve-se à maior estabilidade das enzimas nas condições dos ensaios, que corresponde a um dos grandes propósitos do método de imobilização por CLEAs (MATIJOSYTE et al., 2010; CABANA; JONES; AGATHOS, 2007).

A ineficiência da enzima livre pode ser contornada pela adição de mediadores de lacase, como o HBT (1-hidroxilbenzotriazol) (BALDRIAN, 2005).

Tabela 1 – Descoloração das amostras após 24 h de ensaio

Amostra	Descoloração (%)
Corante + CLEAs de lacase	43,83
Corante + extrato bruto enzimático	5,49
Controle	1,92

Fonte: Autoria própria (2017).

#### 4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste trabalho foi possível imobilizar a enzima lacase de *Pleurotus ostreatus* pelo método de CLEAs, o que é interessante uma vez que a instabilidade das enzimas livres é um dos aspectos que dificultam as reações de oxidação enzimática.

Pelos ensaios de biodegradação enzimática foi possível verificar que os CLEAs de lacase foram mais eficientes na descoloração de uma solução aquosa de corante Preto Reativo 5 a 50 mg L<sup>-1</sup> (43,83 % de descoloração). Enquanto que a baixa remoção de cor utilizando a enzima livre (5,49 %) indica a necessidade da adição de mediadores de lacase.

Além da maior estabilidade outra proposta de se trabalhar com enzima imobilizada é a possibilidade de se recuperar e reciclar os agregados enzimáticos.

---

A obtenção dos CLEAs de lacase é, portanto, uma alternativa promissora porque seu uso pode ser explorado em diversas outras aplicações potencialmente tecnológicas.

## Strategies for removal of emerging contaminants from aqueous solutions: biosorption and enzymatic biodegradation

### ABSTRACT

**OBJECTIVE:** To evaluate the efficiency of free and immobilized laccases by the CLEAs method in the biodegradation of Black Reactive dye 5 as a proposal of alternative treatment, since the dyes are not efficiently removed by conventional effluent treatment processes and the incorrect discharge in waters represent an environmental problem. **METHODS:** The assays were carried out in triplicate in test tubes containing 5 mL of 50 mg L<sup>-1</sup> dye solution, where 50 U L<sup>-1</sup> of free and immobilized laccase were added, in order to compare the efficiency of both treatments. The tubes were shaken at 130 rpm, at 37 °C for a period of 24 h. The discoloration was evaluated by means of an analytical curve and calculated by the absorbance of the samples in a spectrophotometer at 584.5 nm. The laccase CLEAs were produced by the addition of 55 % ammonium sulfate and 200 µL glutaraldehyde in 2 mL of the enzyme solution. **RESULTS:** Enzyme activities of the crude extract and laccase CLEAs were 3114 U L<sup>-1</sup> and 98 U L<sup>-1</sup>, respectively. In the biodegradation assay, the free enzyme removed 5.49 % of the dye, while laccase CLEAs resulted in 43.83 % discoloration. **CONCLUSIONS:** Laccase CLEAs showed to be more efficient in the discoloration of the dye, since they are more stable under varied conditions. For the free enzyme, the low percentage of discoloration indicates the need for addition of laccase mediators.

**KEYWORDS:** Discoloration. Enzymatic immobilization. Laccase.

## AGRADECIMENTOS

A Universidade Tecnológica Federal do Paraná pela bolsa concedida. A minha orientadora Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Giselle Maria Maciel pela oportunidade de realizar este trabalho, pelas orientações e sugestões e pelo apoio e carinho de sempre.

## REFERÊNCIAS

- AGUIAR, A., FERRAZ, A. Mecanismos envolvidos na biodegradação de materiais lignocelulósicos e aplicações tecnológicas correlatas. **Química Nova**, v. 34, n. 10, p. 1729-1738, 2011.
- BALDRIAN, P. Fungal laccases – occurrence and properties. **Federation of European Microbiological Societies**, v. 30, p. 215-242, 2005.
- CABANA, H.; JONES J.P.; AGATHOS, S.N. Preparation and characterization of cross-linked laccase aggregates and their application to the elimination of endocrine disrupting chemicals. **Journal Of Biotechnology**, v.132, p. 23–31, 2007.
- CIULLINI, I.; TILLI, S.; SCOZZAFAVA, A.; BRIGANTI, F. Fungal laccase, cellobiose dehydrogenase, and chemical mediators: Combined actions for the decolorization of different classes of textile dyes. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 7003–7010, 2008.
- COUTO, R.C., HERRERA J.L.T. Industrial and biotechnological applications of laccases: A review. **Biotechnology Advances**, v. 24, p. 500-513, 2006.
- GRASSI, E.; SCODELLER, P.; FILIEL, N.; CARBALLO, R.; LEVIN, L. Potential of *Trametes trogii* culture fluids and its purified laccase for the decolorization of different types of recalcitrant dyes without the addition of redox mediators. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 65, p. 635-643, 2011.
- HOU, H.; ZHOU, J.; WANG, J.; DU, C.; YAN, B. Enhancement of laccase production by *Pleurotus ostreatus* and its use for the decolorization of anthraquinone dye. **Process Biochemistry**, v. 39, p. 1415–1419, 2004.
- MATIJOŠYTE, I., ARENDS, I.W.C.E., DE VRIES, S., SHELDON, R.A. Preparation and use of cross-linked enzyme aggregates (CLEAs) of laccases. **Journal of molecular catalysis b-enzymatic**, v. 62, p. 142-148, 2010.

---

MECHICHI, T.; MHIRI, N.; SAYADI, S. Remazol Brilliant Blue R decolourization by the laccase from *Trametes trogii*. **Chemosphere**, v. 64, p. 998–1005, 2006.

RATANAPONGLEKA, K.; PHETSOM, J. Decolorization of Synthetic Dyes by Crude Laccase from *Lentinus polychrous*. **International Journal of Chemical Engineering and Applications**, v. 5, n. 1, 2014.

SHELDON, R. A. Cross-linked enzyme aggregates (CLEARs): stable and recyclable biocatalysts. **7th International Conference on Protein Stabilization**, p. 1583-1587, 2007.

SHELDON, R.A.; PELT, S.V. Enzyme immobilisation in biocatalysis: why, what and how. **Chem. Soc. Rev.**, v. 42, p. 6223-6235, 2013.

**Recebido:** 31 ago. 2017.

**Aprovado:** 02 out. 2017.

**Como citar:**

BRAGA, D. M.et.al. Estratégias para a remoção de contaminantes emergentes de soluções aquosas: biossorção e biodegradação enzimática. In: SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA E TECNOLÓGICA DA UTFPR, 22., 2017, Londrina. **Anais eletrônicos...** Londrina: UTFPR, 2017. Disponível em:< <https://eventos.utfpr.edu.br/sicite/sicite2017/index>. Acesso em: XXX.

**Correspondência:**

Dayane Moreira Braga

Rua Victor Meireles, número 474, Bairro Uberaba, Curitiba, Paraná, Brasil.

**Direito autoral:**

Este resumo expandido está licenciado sob os termos da Licença Creative Commons-Atribuição-Não Comercial 4.0 Internacional.

