



VII SIMPÓSIO DE BIOQUÍMICA E BIOTECNOLOGIA
11 a 13 de setembro de 2019, Londrina - PR

Degradação do Corante Vermelho do Congo pela Lacase de *Oudemansiella canarii*: Identificação dos Metabólitos e Avaliação da Toxicidade

Daiane Iark¹, Ana Júlia dos Reis Buzzo¹, Jéssica Amanda Andrade Garcia¹, Vanesa Gesser Côrrea¹, Cristiane Vieira Helm², Rúbia Carvalho Gomes Corrêa¹, Rosely A. Peralta³, Regina de Fátima Peralta Muniz Moreira³, Adelar Bracht¹, Rosane Marina Peralta¹

¹Universidade Estadual de Maringá– CEP 87 020 - 900 Maringá – Paraná - E-mail: (rmperalta@uem.br)

²EMBRAPA-FLORESTAS, Colombo, PR

³Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina

RESUMO

Neste trabalho, uma lacase de *Oudemansiella canarii* foi utilizada na degradação do corante azo vermelho do Congo. Análise por espectrometria de massa permitiu concluir que a lacase atuou não apenas no grupo cromóforo do corante, mas também clivando diferentes ligações covalentes, causando uma fragmentação efetiva da molécula, com produção de vários metabólitos. A ação da lacase causou uma redução significativa na toxicidade, conforme indicado pelo teste Microtox. Em conclusão, a lacase *O. canarii* pode ser útil em futuras estratégias biológicas visando à degradação de corantes azo.

Palavras-chave: corantes sintéticos; lacase; vermelho do Congo; *Oudemansiella canarii*.

INTRODUÇÃO

Os corantes azo são amplamente utilizados na indústria têxtil. Eles possuem um ou mais ligações azo (N=N) entre compostos de diazônio e anilina, fenol ou outros compostos aromáticos. Uma parte considerável, em torno de 10 a 15%, dos corantes azo é liberada como efluente nas correntes abertas, apresentando perigo ecotóxico (PRASAD & RAO, 2013). A poluição da água com corante é claramente visível e, obviamente, impede a penetração de luz na água, o que interfere diretamente na sobrevivência de organismos aquáticos. O azo corante vermelho do Congo (C.I. No. 22120, Direct Red 28) é abundante nos efluentes das indústrias têxtil e do papel e tem sido relatado como sendo extremamente carcinogênico e tóxico tanto para o ambiente como para os seres humanos (CHUNG, 2016). Todos esses fatos tornam sua degradação e desintoxicação altamente desejáveis. Entre vários métodos físicos, químicos e biológicos para a degradação do vermelho do Congo, métodos utilizando a enzima lacase (oxireductase de oxigênio de benzenodiol, EC 1.10.3.2) tem se mostrado atraente pela eficiência e baixo impacto ambiental. Até agora, as lacases mais frequentemente utilizadas na degradação e desintoxicação de corantes sintéticos, incluindo o Vermelho do Congo, são as obtidas dos fungos *Trametes versicolor*, *Pleurotus ostreatus*, *Ganoderma lucidum* e *Picnoporus sanguineus* (PERALTA et al., 2017). *Oudemansiella canarii*, um cogumelo comestível da ordem Agaricales, é comum em vários biomas brasileiros, incluindo a Mata Atlântica, a Amazônia e o Pantanal. Estudos prévios realizados em nosso laboratório tem demonstrado sua habilidade em produzir

Universidade Estadual de Londrina - Rodovia Celso Garcia Cid, Pr 445, Km 380 - Campus Universitário
Caixa Postal 10.011 CEP 86057-970 Centro de Ciências Exatas - Departamento de Bioquímica e Biotecnologia
Fone +55 (43) 3371.4270 - biq@uel.br



VII SIMPÓSIO DE BIOQUÍMICA E BIOTECNOLOGIA 11 a 13 de setembro de 2019, Londrina - PR

lacase capaz de descolorir eficientemente o vermelho do Congo. O objetivo do presente estudo foi identificar os metabólitos resultantes da ação da lacase de *O. Canarii* sobre o vermelho do Congo e avaliar a toxicidade destes metabólitos.

MATERIAL E MÉTODOS

Oudemansiella canarii foi identificado e gentilmente cedido pela Embrapa-Floresta, Colombo, PR. O fungo foi mantido em laboratório através de repiques sucessivos em ágar-batata-dextrose. Para a produção de lacase, discos miceliais de *O. canarii* (diâmetro de 10 mm) foram transferidos para frascos Erlenmeyer (0,25 L) contendo uma mistura de 2,5 g de bagaço de cana e 2,5 g de farelo de trigo como substrato e 15 mL de solução mineral. Os cultivos foram mantidos por 14 dias a 28 °C na ausência de luz. Lacase foi extraída pela adição de água aos cultivos. Após centrifugação o extrato enzimático foi dialisado contra água destilada e concentrada por liofilização.

Os ensaios de descoloração foram conduzidos em tampão acetato 50 mM (pH 5,5) em frascos Erlenmeyer de 250 mL, com volume total de 50 mL contendo 50 mg/L de vermelho Congo e 5 U de lacase. As misturas foram incubadas a 30 °C no escuro num agitador rotativo a 100 rpm. Após 24 h de incubação, os espectros de absorção foram registrados sobre a faixa de luz visível (400-800 nm). Os valores de absorbância a 497 nm foram utilizados para avaliar a descoloração em termos de porcentagem.

As amostras antes e após a ação da lacase foram submetidas a análise por espectrometria de massas para avaliação dos metabólitos produzidos. Para análise da toxicidade dos metabólitos, foi utilizado um teste comercial de bioensaio (kit de teste Microtox), baseado na inibição da luz emitida pela *Vibrio fischeri* (bioluminescência), de acordo com o protocolo ISO 11348-3: 2007.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A lacase de *O. canarii* foi eficiente na descoloração do vermelho do Congo, ficando a solução corante gradativamente incolor em função do tempo de incubação. Após 24 h de incubação, a absorbância inicial a 497 nm foi reduzida em torno de 80%.

Para se avaliar as transformações do vermelho do Congo catalisada pela lacase, utilizou-se como ferramenta a espectrometria de massa. A maior parte dos dados de espectrometria de massa indica que uma clivagem assimétrica da ligação azo ocorreu durante o processo de degradação, promovendo o aparecimento de vários produtos de degradação (Fig. 1). Consistente com uma clivagem assimétrica da ligação azo e em paralelo com a oxidação do terceiro grupo NH_2 e oxigenação é o aparecimento de dois compostos com valores m/z de 447,12 e 339,21. É também provável que a molécula vermelha do Congo tenha sido oxidada, levando a espécies com uma nitrificação do grupo NH_2 e uma perda do grupo SO_3 . Os derivados naftaleno liberados com os menores valores de m/z , ou seja, 311,21 ($\text{C}_{10}\text{H}_6\text{N}_3\text{O}_7\text{S}^-$), 297,16 ($\text{C}_{10}\text{H}_5\text{N}_2\text{O}_7\text{S}^-$) e 283,25 ($\text{C}_{10}\text{H}_7\text{N}_2\text{O}_6\text{S}^-$), que são nitrificados e/ou espécies hidroxiladas, podem ser atribuídos à oxidação dos grupos amina presentes no vermelho do Congo e os outros intermediários. Finalmente, na última etapa da degradação, o anel de benzeno foi aberto e um composto totalmente oxigenado foi formado, com um valor de m/z de 255,23 ($\text{C}_8\text{H}_3\text{N}_2\text{O}_8^-$). Metabólitos similares do vermelho do Congo foram obtidos em estudos anteriores usando

células de *Aspergillus niger* (ASSES et al., 2018) e uma lacase de *Ganoderma lucidum* (MOTA et al., 2015).

Como vários intermediários foram acumulados durante a degradação do vermelho do Congo pela lacase, torna-se necessário descobrir se os produtos de degradação formados são mais tóxicos do que o vermelho parental do Congo. A Fig. 2 apresenta a toxicidade relativa dos sistemas de incubação contendo vermelho do Congo antes e depois de um tratamento de 24 h com lacase e com uma forma desnaturada de lacase. O ensaio Microtox detectou uma diminuição da toxicidade de 92,5% em relação à inicial após 24 horas de degradação do vermelho do Congo pela lacase nativa de *O. canarii*. Os resultados indicam que a toxicidade estava intimamente associada com a presença do vermelho do Congo, uma vez que foi praticamente removido em paralelo à remoção do vermelho do Congo da incubação. Além disso, estes resultados sugerem que os produtos de degradação do vermelho do Congo são muito menos tóxicos do que o composto original. Também é interessante notar que, quando se utilizou lacase desnaturada, não foi observada redução significativa na toxicidade ($p \geq 0,05$). Este fato reforça a ideia de que a degradação do vermelho do Congo e a diminuição da toxicidade são fenômenos ligados à atividade da lacase.

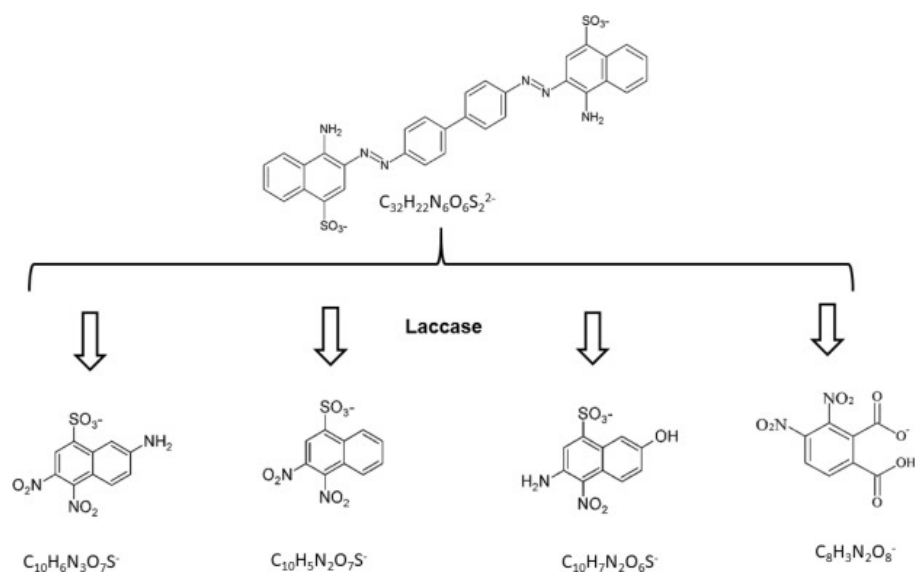


Figura 1. Metabólitos com os menores valores de m/z formados na degradação do vermelho do Congo pela lacase de *O. canarii*: m/z 311,21 ($C_{10}H_6N_3O_7S^-$), m/z 297,16 ($C_{10}H_5N_2O_7S^-$), m/z 283,25 ($C_{10}H_7N_2O_6S^-$) e 255,23 ($C_8H_3N_2O_8^-$).

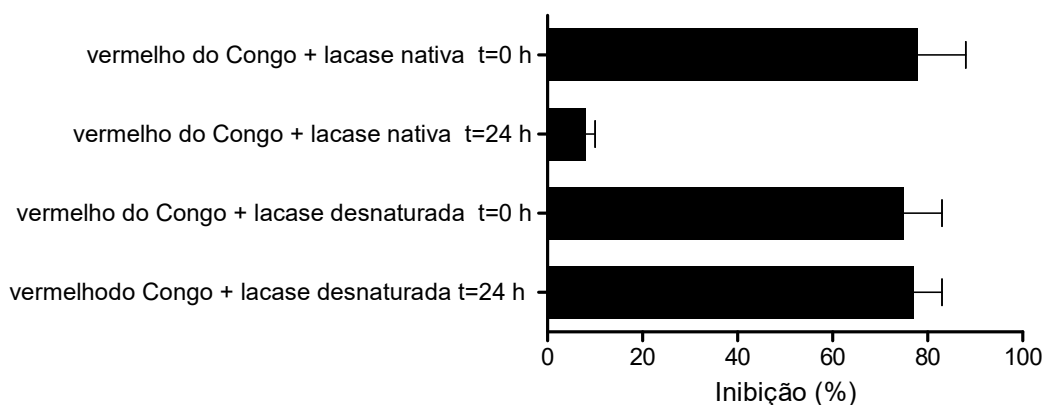


Figura 2. Mudanças na inibição da luminescência *Vibrio fischeri* causada pelo vermelho do Congo tratado por 0 e 24 h com lacase nativa e desnaturada de *O. canarii*.

CONCLUSÕES

A lacase de *O. canarii* foi eficiente na degradação do vermelho do Congo. A degradação efetiva foi confirmada por espectrometria de massa. É importante enfatizar que conseguimos identificar os produtos de degradação do vermelho do Congo e que uma redução na toxicidade foi encontrada em consequência da ação da lacase. Em conclusão, a lacase *O. canarii* pode ser usada em estratégias de biorremediação de azo corante.

Agências de Fomento: Capes, CNPQ e UEM.

REFERÊNCIAS

- ASSES, N., AYED, L., HKIRI, N., HAMDI, M. Congo red decolorization and detoxification by *Aspergillus niger*: removal mechanisms and Dye Degradation Pathway. **BioMed Research International** Article ID 3049686, 9 pages. <https://doi.org/10.1155/2018/3049686>, 2018
- CHUNG, K.-T. Azo dyes and human health: A review. **Journal of Environmental Science and Health, Part C**, v. 34(4), p. 233–261, 2016.
- MOTA, T.R., KATO, C.G.K., PERALTA, R.A., BRACHT, A., MORAIS, G.R., BAESSO, M.L., SOUZA, C.G.M., PERALTA, R.M. Decolourization of Congo Red by *Ganoderma lucidum* laccase: Evaluation of degradation products and toxicity. **Water, Air, Soil and Pollution**, v. 226, p. -351-362, 2015.
- PERALTA, R.M., SILVA, B.P., CÔRREA, R.C.G., KATO, C.G., SEIXA, F.A.V.S., BRACHT, A. Enzymes from Basidiomycetes: peculiar and efficient tools for biotechnology. In: G Brahmachari, A.L. Demain and J.L. Adrio (Eds), **Biotechnology of Microbial Enzymes-Production, Biocatalysis and Industrial Applications**. (pp. 119-150). Elsevier, 2017
- PRASAD, A.S.A., RAO, K.V.B. Aerobic biodegradation of azo dye by *Bacillus cohnii* MTCC 3616: an obligately alkaliphilic bacterium and toxicity evaluation of metabolites by different bioassay systems. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, p. 7469–7481, 2013