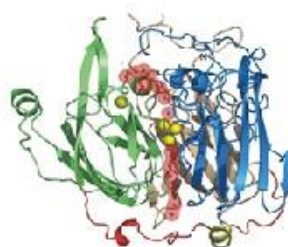
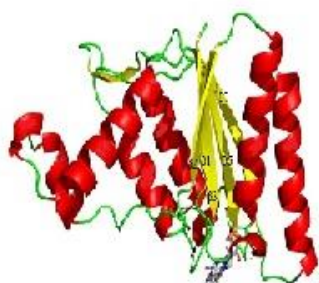




ISEL

INSTITUTO SUPERIOR DE ENGENHARIA DE LISBOA
ÁREA DEPARTAMENTAL DE ENGENHARIA QUÍMICA



Biodegradação Enzimática de Aminas Aromáticas Tóxicas

BRUNA PATRÍCIA VILAS BOAS PINTO
(Licenciada em Engenharia Química e Biológica)

Trabalho Final de Mestrado para obtenção do grau de Mestre
em Engenharia Química e Biológica

Orientadoras:

Doutora Maria Paula Robalo
Doutora Lúcia Martins

Júri:

Presidente: Doutora Rita Pacheco

Vogais:

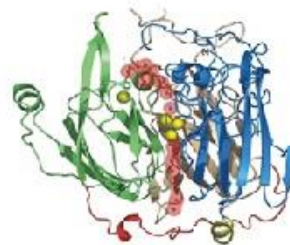
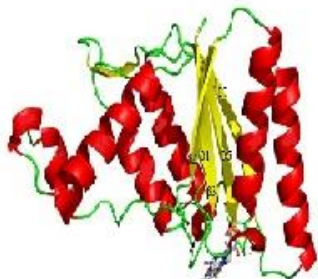
Doutora Cristina Viegas
Doutora Sónia Martins
Doutora Maria Paula Robalo

Dezembro de 2014



ISEL

**INSTITUTO SUPERIOR DE ENGENHARIA DE LISBOA
ÁREA DEPARTAMENTAL DE ENGENHARIA QUÍMICA**



Biodegradação Enzimática de Aminas Aromáticas Tóxicas

BRUNA PATRÍCIA VILAS BOAS PINTO
(Licenciada em Engenharia Química e Biológica)

Trabalho Final de Mestrado para obtenção do grau de Mestre
em Engenharia Química e Biológica

Orientadoras:

Doutora Maria Paula Robalo
Doutora Lúcia Martins

Júri:

Presidente: Doutora Rita Pacheco
Vogais:

Doutora Cristina Viegas
Doutora Sónia Martins
Doutora Maria Paula Robalo

Dezembro de 2014

A realização deste trabalho, não teria sido possível sem a colaboração e o apoio de várias pessoas, a quem desta forma desejo expressar o meu sincero agradecimento:

À Dra. Maria Paula Robalo pela orientação ao longo de todo este trabalho. O seu apoio, orientação e confiança depositada em mim fizeram com que este trabalho fosse possível.

À Doutora Lígia Martins por me ter recebido de braços abertos no seu grupo de trabalho, no laboratório Tecnologia Microbiana e Enzimática (MET) no Instituto de Tecnologia Química e Biológica (ITQB). Os seus conhecimentos, as suas sugestões e a sua boa disposição ajudaram-me a ser melhor, a aprender com os meus erros e a ter um espírito crítico, em tudo o que faço, quer a nível profissional, quer a nível pessoal.

À Sónia Mendes por todo o apoio que me deu durante este trabalho. Por toda a boa disposição, alegria, paciência e sugestões. Por se ter revelado uma pessoa muito especial, com a qual se pode contar sempre. Por me ter apoiado quando estava em dias menos bons e por me ter chamado à atenção quando eu precisava. Muito obrigada pela paciência e compreensão.

À Catarina Sousa por todos os ensinamentos de RMN e por todo o apoio prestado durante todo o processo de preparação e análise de amostras. Por me ter esclarecido todas as dúvidas e pela boa disposição.

À Vânia Brissos, por me ter ajudado sempre que precisei, pelo apoio e compreensão.

A todos os membros do grupo MET: Marcelo Ramires, Diogo Tavares, Joaquim Madeira, Antonieta Gabriel e Lúcia Sabala. Obrigada por tornarem os meus dias tão divertidos e gratificantes. Foi muito bom trabalhar com todos vocês.

Ao Luís Guerra por ter sempre um tempo para me ajudar na escrita da minha tese, mesmo quando esse tempo era precioso para ele. Obrigada pelas sugestões, paciência e compreensão.

À Maria José Francisco, Alfredo Francisco, Nuno Lopes e Ana Lopes, muito obrigada por todo o apoio, compreensão, carinho e afeto que me deram. Sem a vossa força e as vossas palavras, não teria chegado onde cheguei.

À minha família, com a qual construí os meus alicerces, em especial ao meu pai, por acreditar sempre em mim e me incentivar sempre a não desistir, e ao meu irmão por me fazer sorrir quando os meus dias não eram fáceis.

Ao Nuno Francisco quero expressar um agradecimento muito especial. O seu apoio, as suas palavras de incentivo, a confiança depositada em mim, o seu carinho, a sua imensa paciência, ao longo de todo este caminho, foram imprescindíveis para eu alcançar os meus sonhos e as minhas ambições.

A todos vós, muito obrigada.

Resumo

A enzima azoredutase PpAzoR de *Pseudomonas putida* tem uma elevada capacidade de clivagem da ligação azo dos corantes, em condições de anaerobiose. No entanto, é do conhecimento que as aminas aromáticas formadas apresentam, em alguns casos, níveis mais elevados de toxicidade do que a verificada para os corantes iniciais. A utilização da enzima CotA-lacase de *Bacillus subtilis* que oxida vários substratos, incluindo aminas aromáticas, em condições de aerobiose, foi usada para transformar as aminas aromáticas, resultantes da ação da PpAzoR.

Nesta dissertação, o objetivo foi a identificação e caracterização dos produtos formados pela ação sequencial das enzimas PpAzoR e CotA-lacase sobre oito corantes azo (**AR266**, **DB38**, **DR80**, **MB3**, **MB9**, **MB17**, **RB5** e **RY145**) utilizando HPLC e ¹H RMN. Para tal, após transformação das células de *Escherichia coli*, foram obtidas as estirpes recombinantes a superproduzir as enzimas PpAzoR e CotA-lacase, que foram purificadas, e as respetivas atividades determinadas. As velocidades de descoloração para a PpAzoR com os corantes selecionados foram determinadas. Foram realizadas reações em larga escala sendo que, num primeiro passo, os corantes foram degradados por ação da PpAzoR, produzindo-se as aminas aromáticas correspondentes e, sequencialmente foi adicionada CotA-lacase.

O objetivo último deste trabalho é o desenvolvimento de novas estratégias para produzir compostos de elevado valor acrescentado a partir de efluentes contendo corantes, contribuindo deste modo para a criação de uma economia circular e uma inteligente e eficiente utilização de recursos.

Os produtos da reação dos **DR80**, **MB3**, **MB17**, **MB9** e **RY145** com a azoredutase PpAzoR foram identificados como aminas aromáticas. No entanto verificou-se, em todos os casos, a ausência inesperada de pelo menos uma amina nas misturas reacionais, o que se pode prender com alguns fatores, como o desarejamento insuficiente ou o tratamento de amostras para análise por RMN.

Na análise dos produtos resultantes da ação da CotA-lacase sobre as aminas aromáticas, verificou-se que algumas destas são substrato desta enzima, levando à produção de fenazinas e *orto*-quinonas. Estes compostos podem ser utilizados em numerosas aplicações, como indústrias de tintas de cabelo, farmacêutica ou de diagnóstico.

Palavras-chave: Aminas aromáticas, azoredutase, biotransformação, corantes azo, descoloração, lacase, processo enzimático sequencial

Abstract

The azoreductase PpAzoR from *Pseudomonas putida* has the ability to cleave the azo bond of azo dyes, under anaerobic conditions. However it is known that the aromatic amines produced exhibited, in some cases, high levels of toxicity. The laccase CotA-laccase from *Bacillus subtilis* oxidize several substrates, including aromatic amines under aerobic conditions. Therefore, this enzyme was used to transform the aromatic amines, resulting from the PpAzoR activity and it was found that this activity lowers significantly the toxicity of the products.

In this thesis, the aim was to identify and characterize the products of the multi-step enzymatic reactions with eight different synthetic azo dyes (**AR266**, **DB38**, **DR80**, **MB3**, **MB9**, **MB17**, **RB5** and **RY145**) using HPLC and ¹H NMR. To this end, after transformation of *Escherichia coli* cells, the recombinant strains to overproduce the enzymes were obtained. After purification steps, the enzymatic activity for both enzymes, PpAzoR and CotA-laccase, were determined and the decolourisation rates for PpAzoR with the selected dyes were also determined. Large-scale reactions were carried out, where in a first step, the dyes have been degraded by the action of PpAzoR, yielding the corresponding aromatic amines, and sequentially CotA-laccase was added.

The final goal is the development of new strategies to produce high-value compounds from underutilized dye-containing wastewater effluents, contributing for the creation of a circular economy and for the smart and efficient use of resources.

In reaction using **DR80**, **MB3**, **MB9**, **MB17** and **RY145** dyes, aromatic amines have been identified. However the absence of at least one of the amines in the reaction mixtures was noticed, most likely related with the insufficient deaeration or the procedures followed in the sample treatment for NMR analysis.

In the analysis of products resulting from the CotA-laccase activity, it was found that some aromatic amines act as substrate for this enzyme, leading to the formation of phenazines and *orto*-quinones. These are compounds that are currently used in a number of applications in industries of compounds for hair dyeing, pharmaceutical and diagnosis.

Keywords: aromatic amines, azo dyes, azoreductase, biotransformation, decolourization laccase, sequential enzymatic process

Índice

| | |
|--|-----------|
| 1. Introdução | 1 |
| 1.1. Corantes na Indústria Têxtil | 2 |
| 1.1.1. Corantes Azo | 6 |
| 1.2. A Indústria Têxtil | 7 |
| 1.2.1. Processo Industrial..... | 7 |
| 1.2.2. Efluentes têxteis..... | 8 |
| 1.3. Tratamento de efluentes têxteis | 11 |
| 1.3.1. Métodos físicos e químicos | 11 |
| 1.3.2. Métodos Biológicos | 14 |
| 1.3.2.1. Fitorremediação..... | 14 |
| 1.3.2.2. Biosorção | 15 |
| 1.3.2.3. Descoloração e degradação de corantes azo por microrganismos fotossintéticos.. | 16 |
| 1.3.2.4. Descoloração e degradação de corantes azo por leveduras | 17 |
| 1.3.2.5. Descoloração e degradação de corantes azo por fungos | 18 |
| 1.3.2.6. Descoloração e degradação de corantes azo por bactérias | 19 |
| 1.3.2.7. Descoloração e degradação de corantes azo usando consórcios microbianos | 20 |
| 1.3.2.8. Descoloração e degradação de corantes azo por microrganismos ou enzimas geneticamente modificadas..... | 22 |
| 1.3.2.9. Descoloração e degradação de corantes azo usando processos de oxidação avançados (AOPs) combinados com processos microbiológicos | 23 |
| 1.4. Fatores que afetam a descoloração microbiana | 24 |
| 1.5. Degradação Enzimática | 26 |
| 1.5.1. Azoredutases | 26 |
| 1.5.1.1. Azoredutase de <i>Pseudomonas putida</i> MET94..... | 28 |
| 1.5.2. Lacases..... | 30 |
| 1.5.2.1. Lacase de <i>Bacillus subtilis</i> (CotA-lacase)..... | 32 |
| 1.6. Objetivos do trabalho..... | 34 |
| 2. Materiais e Métodos | 35 |
| 2.1. Reagentes químicos | 35 |
| 2.2. Transformação das células hospedeiras | 35 |
| 2.3. Crescimento de células recombinantes e superprodução das enzimas de interesse | 36 |
| 2.4. Preparação dos extratos celulares | 38 |
| 2.5. Determinação da proteína total..... | 38 |
| 2.6. Eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes | 38 |
| 2.7. Purificação das proteínas recombinantes | 40 |
| 2.7.1. Purificação da PpAzoR recombinante..... | 40 |
| 2.7.2. Purificação da CotA-lacase recombinante..... | 41 |
| 2.8. Espectro UV-Vis da PpAzoR recombinante e determinação do coeficiente de extinção molar .. | 41 |
| 2.9. Determinação da absortividade molar dos corantes..... | 41 |
| 2.10. Determinação da atividade enzimática..... | 42 |
| 2.11. Preparação das reações em larga escala | 43 |
| 2.12. Identificação dos produtos das reações de descoloração dos corantes azo e de degradação das aminas aromáticas correspondentes por HPLC | 44 |
| 2.13. Identificação dos produtos das reações de descoloração dos corantes azo e de degradação das aminas aromáticas correspondentes por espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) | 44 |
| 3. Resultados e Discussão | 47 |
| 3.1. Crescimento e superprodução das proteínas recombinantes num hospedeiro heterólogo | 47 |
| 3.2. Purificação das proteínas recombinantes | 49 |
| 3.2.1. Purificação da PpAzoR recombinante..... | 49 |
| 3.2.2. Purificação da CotA-lacase recombinante..... | 50 |
| 3.3. Reações enzimáticas de degradação de corantes | 51 |
| 3.3.1. Determinação dos coeficientes de absortividade molar dos corantes..... | 51 |
| 3.3.2. Reações em pequena escala..... | 52 |
| 3.3.2.1. Ensaios enzimáticos com a PpAzoR recombinante | 52 |
| 3.3.3. Reações em larga escala..... | 54 |
| 3.4. Análise dos produtos das reações de degradação por HPLC | 57 |
| 3.4.1. AR266..... | 58 |
| 3.4.2. DB38..... | 59 |
| 3.4.3. DR80..... | 60 |
| 3.4.4. MB3 | 61 |
| 3.4.5. MB9 | 62 |
| 3.4.6. MB17..... | 63 |

| | | |
|-----------|--|------------|
| 3.4.7. | <i>RB5</i> | 64 |
| 3.4.8. | <i>RY145</i> | 65 |
| 3.5. | Identificação de produtos de reação por ^1H RMN | 67 |
| 3.5.1. | <i>DR80</i> | 68 |
| 3.5.2. | <i>MB3</i> | 76 |
| 3.5.3. | <i>MB17</i> | 85 |
| 3.5.4. | <i>RY145</i> | 96 |
| 3.5.5. | <i>MB9</i> | 102 |
| 3.5.6. | <i>DB38</i> | 107 |
| 3.5.7. | <i>RB5</i> | 111 |
| 3.5.8. | <i>AR266</i> | 113 |
| 4. | Conclusões | 115 |
| 5. | Perspetivas Futuras..... | 121 |
| 6. | Bibliografia..... | 123 |
| 7. | Anexos | 131 |
| 7.1. | Determinação da absortividade dos corantes azo | 131 |
| 7.2. | Espectros ^1H RMN..... | 134 |
| 7.2.1. | <i>DR80</i> | 134 |
| 7.2.2. | <i>RB5</i> | 134 |
| 7.2.3. | <i>AR266</i> | 136 |
| 7.3. | Análise dos produtos da reação dos corantes Methyl Red e Sudan Orange G..... | 137 |

Lista de Abreviaturas

ABTS – 2,2'-azino-bis-(ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico)
AOP – Processos de oxidação avançados
AQS – Antraquinona-2-sulfonato
AR266 – Acid Red 266
BSA – Albumina de soro bovino
CBO – Carência bioquímica de oxigênio
COSY – Correlation Spectroscopy
CQO – Carência química de oxigênio
COT – Carbono orgânico total
DB38 – Direct Black 38
DO_{600nm} – Densidade Ótica a 600 nm
DR80 – Direct Red 80
FAD – Dinucleótido de flavina e adenina
FMN – Mononucleótido de flavina
FMNH₂ – Mononucleótido de flavina na forma reduzida
HPLC – Cromatografia líquida de alta eficiência
IPTG – isopropil-β-D-tiogalactopiranosídeo
LB – Luria Bertani
MB3 – Mordant Black 3
MB9 – Mordant Black 9
MB17 – Mordant Black 17
MCO – Oxidases Multi-Cobre
NAD(P)⁺ – Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina na forma oxidada
NADH – Dinucleótido de nicotinamida e adenina
NADP⁺ – Dinucleótido de nicotinamida e adenina na forma oxidada
NADPH – Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina
RB5 – Reactive Black 5
RMN – Ressonância Magnética Nuclear
Rpm – Rotações por minuto
RY145 – Reactive Yellow 145
SDS-PAGE – Eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes
SOG – Sudan Orange G
UV – Ultravioleta
UV-Vis – Ultravioleta-Visível
WRF – White rot fungi

1. Introdução

A industrialização é considerada um fator-chave para o desenvolvimento da economia global. São necessários desenvolvimentos ao nível da agricultura, medicina, fontes de energia e em todas as indústrias químicas, de forma a cumprir com as necessidades e exigências da população humana em crescimento. No entanto, ao longo dos anos, o aumento da atividade industrial tem provocado a degradação de vários ecossistemas. Quase todos os processos de produção de bens e serviços, desenvolvidos pelo homem, conduzem à produção de poluentes ambientais que podem contaminar o ar, água e solo, podendo ter também efeitos danosos na saúde de plantas, animais, microrganismos e no próprio ser humano (Khan, 2013; Ali, 2010).

A poluição ambiental é um dos maiores e mais importantes problemas do mundo moderno. Devido ao aumento da atividade industrial, é necessário o desenvolvimento de novos compostos químicos que geralmente são sintéticos, isto é, não existem naturalmente na natureza. Contudo, a produção e desenvolvimento de bens e serviços não pode cessar, pois destes dependem as necessidades dos humanos para sobreviverem no planeta Terra. Alternativamente devem ser procuradas soluções e desenvolvidos processos “verdes” – processos que conduzam à produção de bens e serviços amigos do ambiente, não menosprezando a necessidade de erradicar e reduzir a poluição atualmente existente. Assim, para uma sociedade sustentável, precisamos da “química verde” e da remediação ambiental (Rauf & Ashraf, 2012; Ali, 2010).

Desde os anos 80 que existe um aumento da sensibilização para o uso de vários compostos químicos poluentes, nomeadamente para os seus efeitos tóxicos e carcinogénicos, algo que não era feito no passado. Ao contrário dos compostos naturais, que são rapidamente degradados após a sua introdução no ambiente, os compostos químicos sintéticos são extremamente resistentes à biodegradação por microrganismos nativos. Muitos dos compostos recalcitrantes, como pesticidas, organoclorados, conservantes de madeira, polímeros sintéticos e corantes sintéticos, entre outros, são responsáveis por grande parte dos problemas ambientais (Ali, 2010).

1.1. Corantes na Indústria Têxtil

Corantes podem ser definidos como compostos que, quando aplicados a materiais, transmitem cor aos mesmos. Os corantes conseguem absorver a luz na região do visível do espectro eletromagnético (350-700 nm) e, dependendo do comprimento de onda absorvido, emitem uma cor característica. Estes corantes são detetáveis mesmo em pequenas concentrações (1 mg/L) e aderem a superfícies por adsorção física, retenção mecânica ou por formação de ligações covalentes. Um corante deve ter um grupo cromóforo e um grupo auxócromo. Os cromóforos concedem a cor ao corante pois possuem a capacidade de absorver luz na região do visível (**Tabela 1-1**), sendo a cor das substâncias devida à excitação dos elétrons π . Os cromóforos mais importantes são os azo ($-N=N-$), carbonilo ($-C=O$), metino ($-CH=$), nitro ($-NO_2$) e grupos quinóides (**Figura 1-1**). Já os auxócromos são grupos substituintes que, quando introduzidos numa molécula, intensificam a cor da mesma. Os auxócromos mais importantes são os grupos amina ($-NH_2$), carboxilo ($-COOH$), sulfonato ($-SO_3H$) e hidroxilo ($-OH$; Sarayu & Sandhya, 2012; Sudha *et al.*, 2014; Bafana *et al.*, 2011; dos Santos *et al.*, 2007).

Tabela 1-1. Relação entre o comprimento de onda da luz absorvida e a cor emitida (adaptado de Sudha *et al.*, 2014).

| Radiação absorvida (nm) | Cor absorvida | Cor emitida/observada |
|--------------------------------|----------------------|------------------------------|
| 350-435 | Violeta | Amarelo-verde |
| 435-480 | Azul | Amarelo |
| 480-490 | Verde-azul | Laranja |
| 490-500 | Azul-verde | Vermelho |
| 500-560 | Verde | Púrpura |
| 560-580 | Amarelo-verde | Violeta |
| 580-595 | Amarelo | Azul |
| 595-605 | Laranja | Verde-azul |
| 605-750 | Vermelho | Azul-verde |

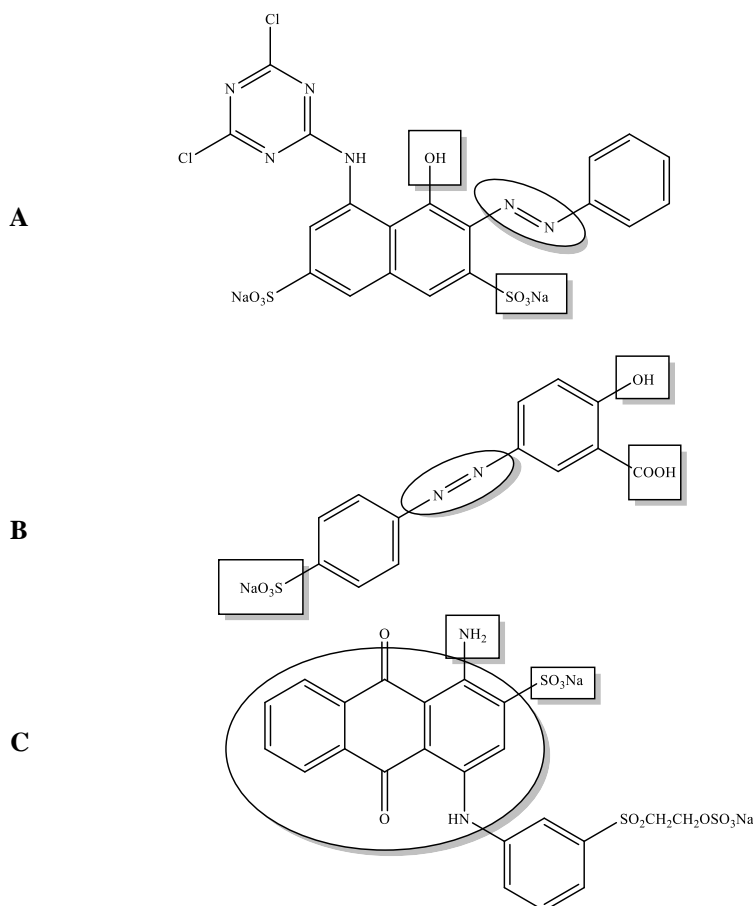


Figura 1-1. Exemplos de cromóforos de corantes (marcados com forma oval) e auxócromos (marcados com forma retangular); (a) Corante azo *Reactive Red 2*; (b) Corante azo *Mordant Yellow 2*; (c) Corante antraquinônico *Reactive Blue 9* (adaptado de dos Santos et al., 2007).

Os corantes podem ser de origem natural ou produzidos por via sintética, e podem ser usados em vários materiais, tais como fibras têxteis, papel, couro, cabelo, pelo de animal e também em alimentos uma vez que, devido à sua estrutura química, os corantes são resistentes ao desaparecimento da cor por exposição à luz, água e outros compostos químicos (Kasiri & Safapour, 2014; Husain, 2006). Os corantes sintéticos são usados nos mais variados produtos, desde têxteis, fotografia, fármacos, couro, cosmética, alimentos, entre outros, com a finalidade de lhes conferir cor (Sudha *et al.*, 2014).

Durante séculos, os corantes naturais foram usados para vários propósitos, incluindo cerimónias tribais, pinturas corporais ou em decoração. Os corantes naturais podem ser extraídos de diferentes partes da planta, incluindo raízes, folhas, cascas, sementes, frutos e flores, e alguns também podem ser extraídos de fungos, algas e bactérias. Os indigóides e as antraquinonas são dois exemplos de corantes naturais. No entanto, foram quase totalmente substituídos por corantes sintéticos pois a sua produção, relativamente aos corantes naturais, é menos dispendiosa e bastante mais rápida (Kasiri & Safapour, 2014; Khan & Fulekar, 2013; Bafana *et al.*, 2011).

Os corantes sintéticos exibem uma significativa diversidade estrutural (**Figura 1-2** e **Figura 1-3**). Tendo em conta a estrutura química do cromóforo, existem vários grupos de corantes sintéticos, sendo que os azo, antraquinonas, ftalocianinas, indigóides e benzodifuranonas são os mais importantes na indústria têxtil (Sudha *et al.*, 2014; dos Santos *et al.*, 2007; Forgacs *et al.*, 2004). Os corantes podem pertencer à classe dos corantes ácidos, básicos, diretos, dispersos, mordentes, reativos e de tina, dependendo da sua aplicação na indústria, como descrito na **Tabela 1-2** (Hussain, 2006; Hunger, 2003).

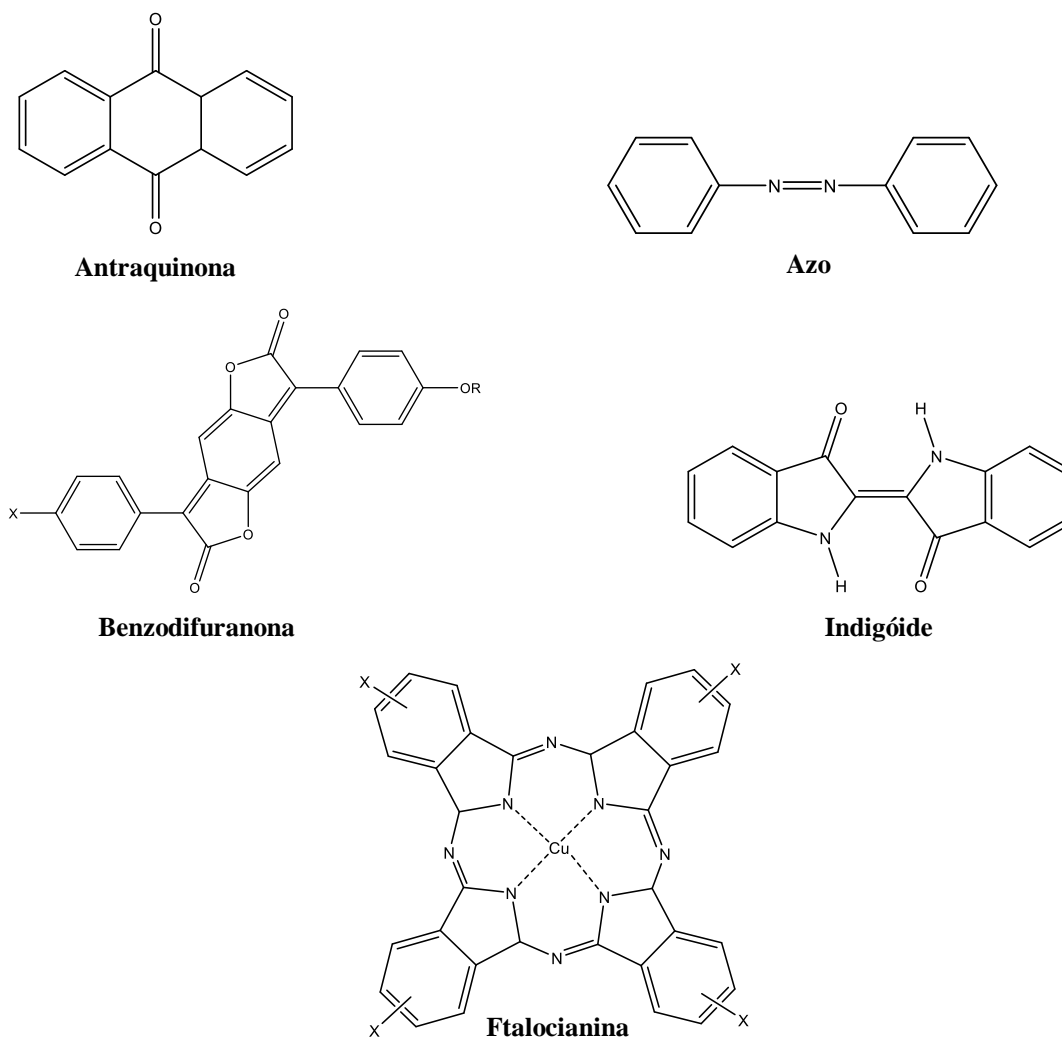


Figura 1-2. Estrutura de algumas das classes de corantes (adaptado de Rauf & Ashraf, 2012; Ali, 2010; Hallas & Yoon, 2001).

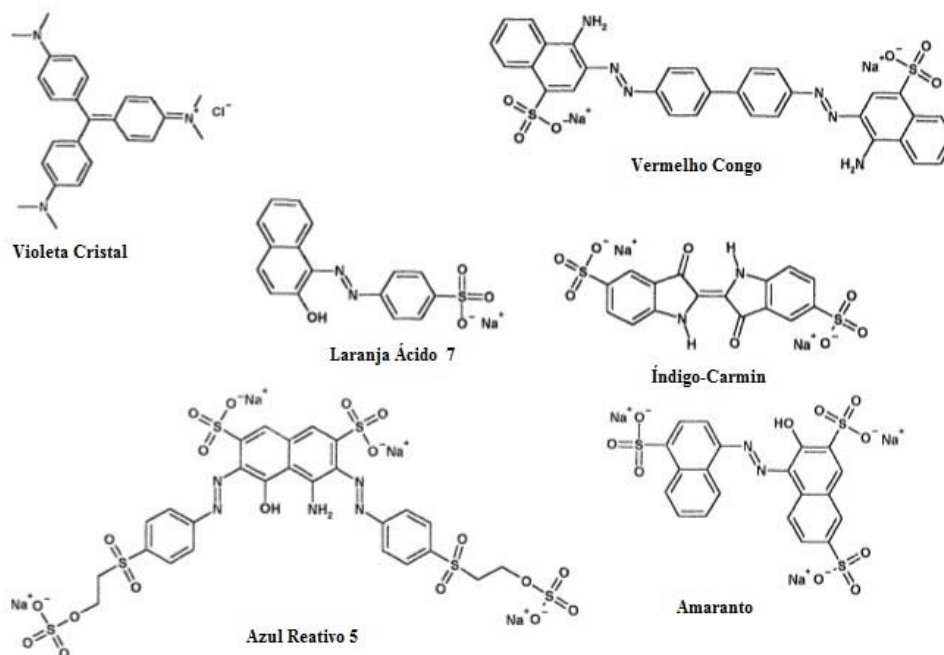


Figura 1-3. Estrutura química de alguns corantes sintéticos (adaptado de Forgacs *et al.*, 2004).

Tabela 1-2. Classe, estrutura e aplicações de corantes sintéticos na indústria (adaptado de Hussain, 2006; Hunger, 2003).

| Classe | Estrutura química | Aplicações | Exemplos |
|----------|------------------------------------|---|-------------------------------------|
| Ácido | Azo | Nylon, lã, seda, papel, couro, tintas | Acid Black 1, Acid Green 16 |
| Básico | Antraquinona, azo, | Papel, nylon, poliéster, tintas | Basic Blue 3, Basic Red 12 |
| Direto | Azo, ftalocioanina | Algodão, papel, couro, nylon | Direct Black 19, Direct Blue 71 |
| Disperso | Antraquinona, azo, benzodifuranona | Poliéster, poliamida, acrílico, plásticos | Disperse Blue 1, Disperse Orange 3 |
| Mordente | Antraquinona, azo | Lã, couro | Mordant Black 11, Mordant Yellow 30 |
| Reativo | Antraquinona, azo, ftalocioanina | Algodão, lã, seda, nylon | Reactive Black 8, Reactive Blue 15 |
| De tina | Antraquinona, Indigóide | Algodão, lã | Vat Black 25, Vat Red 15 |

A escolha da classe do corante a usar em determinada aplicação depende do material, pois estes apresentam maior ou menor afinidade com o mesmo. Os corantes ácidos são corantes aniônicos solúveis em água; os corantes básicos e diretos são catiónicos solúveis em água; os corantes dispersos são, na sua maioria, não iônicos e insolúveis em água, sendo usados para aplicação em fibras hidrofóbicas; os corantes mordentes podem ser ligados a fibras que terão de

passar por um tratamento prévio com mordentes (normalmente metais). Desta forma, o mordente ligado à fibra liga-se também ao corante; os corantes reativos formam ligações covalentes com as fibras e os corantes de tina são insolúveis em água e são aplicados às fibras em banhos alcalinos, geralmente com hidrogenossulfito de sódio (Hunger, 2003; Glover, 1993).

1.1.1. Corantes Azo

A maior parte dos corantes sintéticos são produzidos a partir de fontes petroquímicas, por meio de processos químicos que se pensa, neste momento, representarem uma ameaça para o ambiente e para a saúde humana. A produção anual de corantes sintéticos é estimada em 3.4×10^{10} kg, sendo que 50 % corresponde a corantes do tipo azo, a classe de corantes mais utilizada a nível industrial (Kasiri & Safapour, 2014; Saratale *et al.*, 2011; Cervantes *et al.*, 2011; dos Santos *et al.*, 2007).

Presume-se que existam mais de 2 000 corantes azo diferentes, que são usados nos mais diversos materiais como têxteis, pele, plásticos, cosméticos e alimentos. Estes aderem bem aos tecidos, mantendo as cores por bastante tempo, são simples de sintetizar, existem em quase todas as cores e são muito estáveis (Chengalroyen & Dabbs, 2013; Stolz, 2001).

A estrutura química dos corantes azo caracteriza-se por possuir pelo menos um grupo azo ($-N=N-$), tipicamente conjugado a anéis aromáticos (**Figura 1-4**). Esta estrutura permite a deslocação dos eletrões, em transições no Ultravioleta-Visível (UV-Vis), absorvendo a luz na zona do visível. Podem ainda conter vários grupos substituintes como cloro ($-Cl$), metilo ($-CH_3$), amino ($-NH_2$), hidroxilo ($-OH$) e carboxilo ($-COOH$), resultando em diferentes corantes. Dentro desta classe, dependendo do número de ligações azo na molécula, existem os corantes monoazo, disazo, triazo e poliazo, sendo estes últimos os menos importantes a nível industrial (Leelakriangsak, 2013; Chengalroyen & Dabbs, 2013; Chacko & Subramaniam, 2011; Saratale *et al.*, 2011).

Como foi referido, de todos os corantes usados na indústria, os corantes azo são atualmente os mais usados e, conseqüentemente, são os corantes que estão presentes em maior concentração nos efluentes industriais (Solís *et al.*, 2012; Stolz, 2001).

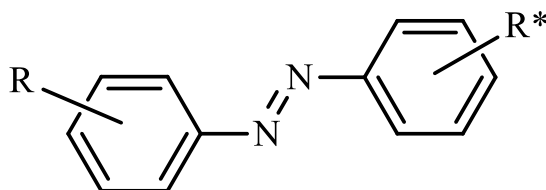


Figura 1-4. Estrutura básica de um corante azo.

1.2. A Indústria Têxtil

1.2.1. Processo Industrial

A indústria têxtil representa um setor económico de elevada importância, a nível mundial. No ano 2000 a indústria têxtil, na Europa, era constituída por 144 mil empresas, sediadas principalmente em Itália, Alemanha, Reino Unido, França e Espanha, com um lucro médio de 198 milhões de euros por ano, tornando o continente europeu o líder na exportação de têxteis. Com o crescimento da economia no continente asiático, a China tornou-se, em 2003, na líder de exportação de roupas e têxteis (dos Santos *et al.*, 2006).

Os vários processos têxteis como branqueamento, coloração, impressão e acabamento enriquecem os produtos com propriedades visuais, físicas e estéticas (**Figura 1-5**). No entanto, a atividade desta indústria produz efluentes, sendo responsável pelas descargas de compostos poluentes em meios aquáticos. A quantidade de efluentes formados varia com o tipo de fábrica, o processo e os compostos químicos usados. É necessário conhecer, com rigor, a composição dos efluentes têxteis, nomeadamente a de compostos corantes nos efluentes, entre outros, bem como o local de descarga dos mesmos, de forma a planear os melhores métodos de tratamento (dos Santos *et al.*, 2006; dos Santos *et al.*, 2007).

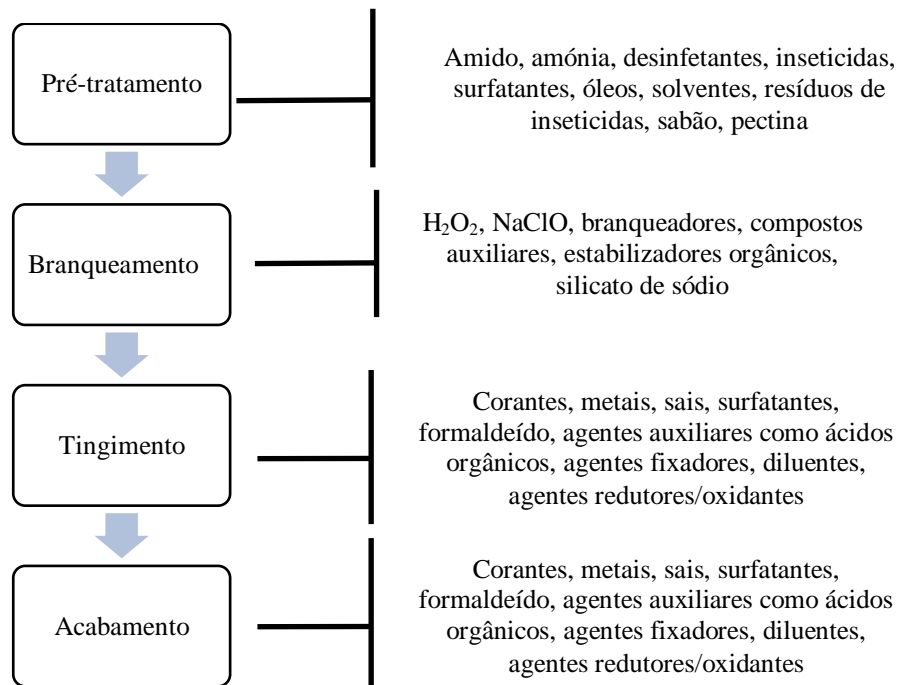


Figura 1-5. Esquema dos processos envolvidos no tratamento das fibras têxteis e os poluentes maioritários de cada passo (adaptado de Ghaly *et al.*, 2014; Sarayu & Sandhya, 2012; dos Santos *et al.*, 2007; dos Santos *et al.*, 2006).

Nos processos de pré-tratamento, são adicionados agentes para minimizar a quebra das fibras no processo de tecelagem. Posteriormente são retirados os compostos químicos das fibras, uma vez que estes podem interferir no processo de tingimento. No processo de branqueamento, os compostos químicos usados incluem hipoclorito de sódio (NaOCl) e peróxido de hidrogénio (H₂O₂), frequentemente usados para remover a cor intrínseca e indesejável das fibras. Em seguida, no processo de tingimento, adiciona-se cor às fibras requerendo, normalmente, a utilização de elevados volumes de água. No entanto, é o processo de acabamento que geralmente influencia mais significativamente o volume de efluentes produzidos, podendo representar cerca de 70-80 % de toda a água consumida no processo (dos Santos *et al.*, 2006; dos Santos *et al.*, 2007).

1.2.2. Efluentes têxteis

A indústria têxtil utiliza uma grande variedade de compostos químicos e uma grande quantidade de água. Por exemplo, para produzir 1 kg de têxtil, são necessários 200 L de água. No entanto, a quantidade exata de água usada depende do processo, desde o tipo de corante usado até ao tipo de têxteis produzidos (**Tabela 1-3**). É estimada uma produção de cerca de 1 000-3 000 m³ de efluentes têxteis, após a produção de 12-20 toneladas de têxteis por dia, estimando-se uma perda anual de 280 000 toneladas de corantes têxteis em efluentes (Ghaly *et al.*, 2014; Ali, 2010).

Tabela 1-3. Consumo de água na produção de têxteis (adaptado de Ghaly *et al.*, 2014).

| Processo | Consumo de água (L/kg de produto) | |
|-----------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|
| | Têxteis de Algodão | Têxteis de fibras sintéticas |
| Pré-tratamento | 500-45 000 | <i>Nylon</i> 50 000 |
| Branqueamento | 2 500-25 000 | <i>Poliéster</i> 25 000-42 000 |
| Tingimento | 10 000-300 000 | 17 000-34 000 |
| Acabamento | ^a | 32 000-48 000 |

^a sem dados

A fixação das moléculas do corante às fibras geralmente é feita em solução aquosa e pode envolver basicamente 4 tipos de interações: ligações iónicas, de hidrogénio, de Van der Waals e covalentes (Glover, 1993). O grau de fixação dos corantes nas fibras não é total (**Tabela 1-4**), sendo que, de acordo com os dados publicados, os corantes reativos, maioritariamente constituídos por corantes azo, são os menos eficientes, enriquecendo os efluentes (Cervantes & dos Santos, 2011).

Os efluentes têxteis descarregados em rios podem conter uma concentração elevada de corantes, que varia entre 10 e 200 mg/L, bem como uma mistura de compostos químicos orgânicos e inorgânicos, aditivos, sais, compostos ácidos e alcalinos. A cor é, normalmente, o primeiro contaminante a ser reconhecido nos efluentes têxteis pois, como já referido, muitos corantes são visíveis na água em concentração inferior a 1 mg/L (Chengalroyen & Dabbs, 2013; Cervantes & dos Santos, 2011; Ali, 2010; Pandey *et al.*, 2007).

Tabela 1- 4. Grau de fixação estimado para as diferentes combinações de corante e fibra (adaptado de Cervantes & dos Santos, 2011).

| Classe do corante | Fibra | Grau de fixação (%) | Perda para efluentes (%) |
|-----------------------|-----------|---------------------|--------------------------|
| Ácido | Poliamida | 80-95 | 5-20 |
| Básico | Acrílica | 95-100 | 0-5 |
| Direto | Celulose | 70-95 | 0-10 |
| Disperso | Poliéster | 90-100 | 2-10 |
| Reativo | Celulose | 50-90 | 10-40 |
| Com grupos sulfônicos | Celulose | 60-90 | 5-20 |
| Tina | Celulose | 80-95 | ^a |

^a sem dados.

A vasta maioria dos corantes azo usados na indústria são compostos xenobióticos ou seja, são compostos químicos estranhos na natureza. São também recalcitrantes, isto é, são resistentes à degradação. A recalcitração destes corantes é atribuída ao seu cromóforo, que não existe naturalmente na natureza e também por poderem conter outros grupos que não são facilmente biodegradáveis como, por exemplo, grupos sulfônicos (SO₃H). Existe apenas um composto, que contém na sua estrutura o grupo azo, identificado como produto natural, o 4,4'-dihidroxiazobenzeno, que existe em cogumelos *Agaricus xanthodermus* (Prasad & Aikat, 2014; Khan *et al.*, 2013; Chengalroyen & Dabbs, 2013; Cervantes & dos Santos, 2011; Pandey *et al.*, 2007; Forgacs *et al.*, 2004; Stolz, 2001, Gill & Strauch, 1984).

Os compostos azo, como já foi referido, são comercialmente importantes e amplamente usados na indústria, devido à sua elevada estabilidade, não sendo por isso fácil a sua eliminação do meio ambiente. Por exemplo, o tempo de meia-vida do corante azo *Reactive Blue 19* hidrolisado é de 46 anos, a pH 7.0 e 25 °C (Prasad & Aikat, 2014; Khan *et al.*, 2013; Chengalroyen & Dabbs, 2013; Cervantes & dos Santos, 2011; Pandey *et al.*, 2007; Forgacs *et al.*, 2004; Stolz, 2001).

Muitos dos corantes azo sintéticos, bem como os produtos resultantes da quebra da ligação azo, são tóxicos, carcinogénicos e mutagénicos. A descarga de corantes pode ter um efeito tóxico no ecossistema aquático, bem como introduzir um potencial perigo de bioacumulação, que pode, eventualmente, afetar o ser humano, através do seu transporte pela cadeia alimentar (Prasad & Aikat, 2014; Cervantes & dos Santos, 2011; Saratale *et al.*, 2011; dos Santos *et al.*, 2007).

A maior parte dos corantes azo são solúveis em água e são rapidamente absorvidos através do contacto com a pele e por inalação, provocando risco de cancro, náuseas, hemorragias, reações alérgicas, são irritantes para os olhos e altamente tóxicos se forem inalados ou consumidos, provocando danos irreversíveis ao nível dos rins, fígados e sistemas reprodutor e nervoso central (Sudha *et al.*, 2014; Sarayu & Sandhya, 2012; Mendes *et al.*, 2011). As várias aminas aromáticas produzidas pela redução da ligação azo são conhecidas por serem mutagénicas e carcinogénicas, tendo um grau de toxicidade mais elevado do que o corante que lhe deu origem (Khan *et al.*, 2013; Chengalroyen & Dabbs, 2013; Cervantes & dos Santos, 2011).

A descarga de efluentes têxteis, contendo corantes azo em ecossistemas aquosos, não só é facilmente detetável e desagradável em termos estéticos, como também leva a uma redução da penetração da luz do sol, provocando a diminuição da atividade fotossintética e, conseqüentemente, da concentração de oxigénio dissolvido e da qualidade da água. Os efeitos são nefastos ao nível da fauna e da flora aquáticas, causando graves problemas ambientais globais (Cervantes & dos Santos, 2001; Ali, 2010; Pandey, 2007).

Adicionalmente, os corantes azo também provocam efeitos adversos em termos de carência química de oxigénio (CQO), carência bioquímica de oxigénio (CBO) e carbono orgânico total (COT). Vários estudos indicam que os corantes têxteis e os efluentes tóxicos têm efeitos graves na germinação das plantas que possuem funções ecológicas importantes na manutenção de habitats para a vida selvagem, proteção do solo da erosão e na provisão de matéria orgânica necessária para manter os solos férteis (Cervantes & dos Santos, 2011; Saratale *et al.*, 2011).

Devido às consequências que a descarga de efluentes têxteis provoca nos ecossistemas, existe uma grande necessidade de desenvolver e implementar novas tecnologias, baratas e efetivas, para lidar com os efluentes têxteis, sem prejudicar a atividade económica associada. A legislação governamental é cada vez mais restrita, especialmente nos países mais desenvolvidos, relativamente à necessidade de remoção de corantes nos efluentes industriais (Ali, 2010).

Em Portugal, a legislação portuguesa aplicável às águas residuais no setor têxtil é a Portaria Setorial nº 432/97 de 25 de junho, que estabelece os valores limite de poluentes em águas residuais, e o decreto-lei nº 236/98 de 1 de agosto (**Tabela 1-5**).

Tabela 1-5. Normas de descarga das águas residuais para o sector dos têxteis, excluindo o subsector dos lanifícios (Portaria Setorial nº 432/97 de 25 de junho).

| Parâmetro | Expressão de resultados | Valor máximo admissível |
|-----------|-------------------------|---------------------------------|
| pH | Escala Sorensen | 5.5-9.0 |
| CBO | mg/L O ₂ | 100 |
| CQO | mg/L O ₂ | 250 |
| Cor | - | Não visível na diluição de 1:40 |

1.3. Tratamento de efluentes têxteis

1.3.1. Métodos físicos e químicos

Vários métodos físicos e químicos, como a adsorção, precipitação química, oxidação química, redução química, tratamento eletroquímico, entre outros, têm sido usados na remoção de corantes dos efluentes têxteis. Na **Tabela 1-6**, estão sumarizadas algumas vantagens e desvantagens destes métodos atualmente usados na remoção de corantes dos efluentes industriais.

Tabela 1-6. Vantagens e desvantagens de alguns métodos atualmente usados na remoção de corantes de efluentes têxteis (adaptado de Chacko & Subramaniam, 2011; Husain, 2006).

| Métodos Físicos/Químicos | Vantagens | Desvantagens |
|-------------------------------------|--|--|
| Reagente de Fenton | Descoloração efetiva de corantes solúveis e insolúveis | Gera resíduos |
| Ozonização | Aplicação no estado gasoso, não alterando o volume | Tempo de meia-vida curto (20 minutos) |
| Fotoquímico | Sem produção de resíduos | Formação de outros produtos mais tóxicos, Taxa de descoloração baixa, Processo lento |
| Hipoclorito de sódio (NaOCl) | Inicia e acelera a quebra da ligação azo | Libertação de aminas aromáticas |
| Osrose inversa | Diminuição da carga orgânica dos efluentes | Elevado custo Processo lento |
| Destruição eletroquímica | Os produtos resultantes da quebra da ligação azo não são perigosos | Elevado custo e consumo de eletricidade Taxa de descoloração baixa |
| Carvão ativado | Boa remoção de vários corantes | Elevado custo Gera uma grande quantidade de resíduos |
| Turfa | Bom adsorvente, devido à sua estrutura | Área específica para adsorção é inferior à área específica do carvão ativado |
| Aparas de madeira | Boa capacidade de sorção para corantes ácidos | Processo moroso |
| Gel de sílica | Efetivo na remoção de corantes básicos | Ocorrem reações secundárias, que impedem a sua comercialização |
| Membrana de filtração | Remoção de todo o tipo de corantes | Gera uma grande quantidade de resíduos altamente concentrados |
| Troca iônica | Regeneração – não há perda de adsorvente | Elevado custo Não é eficaz na remoção de todos os corantes |
| Irradiação | Oxidação efetiva, à escala laboratorial | Requer um elevado volume de oxigênio |

Os métodos físicos baseados na coagulação-floculação de corantes são eficazes na remoção de muitos corantes dispersos e com grupos sulfônicos, mas demonstram ter baixa eficácia na remoção de corantes ácidos, diretos, reativos e de tina. Mais ainda, a baixa taxa de descoloração, bem como a quantidade elevada de resíduos que estes métodos, geram limitam severamente o seu uso (Chacko & Subramaniam, 2011; Saratale *et al.*, 2011).

Os métodos de adsorção são consideravelmente atrativos devido à sua elevada eficiência na remoção de vários tipos de corantes. A seleção de adsorventes é baseada em características como afinidade elevada e na sua capacidade de regeneração dos adsorventes. Embora o carvão ativado seja um adsorvente muito eficaz na remoção de vários tipos de corantes, não é frequentemente usado devido ao seu elevado custo (Chacko & Subramaniam, 2011; Saratale *et al.*, 2011).

De forma a conseguirem-se processos economicamente mais viáveis, utilizam-se materiais de baixo custo, como aparas de madeira, turfa, argila, espigas e caules de milho. No entanto, a aplicação prática destes adsorventes tem sido limitada por problemas associados à sua regeneração, à produção de resíduos, baixa eficiência no que diz respeito à variedade de corantes existentes, e ao seu elevado custo (Chacko & Subramaniam, 2011; Saratale *et al.*, 2011; Husain, 2006).

Os métodos de filtração, como a ultrafiltração, nanofiltração e osmose inversa têm sido usados na reutilização de água e na recuperação de compostos químicos. Na indústria têxtil, o uso de membranas providencia possibilidades interessantes na separação de corantes hidrolisados e auxiliares de coloração. Esta separação permite, simultaneamente, diminuir a cor, o CQO e CBO dos efluentes, e também tem possibilitado a valorização de efluentes, podendo estes ser novamente usados nos processos de branqueamento e coloração. A seleção das membranas de filtração, como a porosidade das mesmas, relaciona-se com a composição química do efluente e temperatura específica do processo. No entanto, estas apresentam algumas desvantagens, que incluem o elevado investimento, a possibilidade de colmatação da membrana e também a produção de caudais de resíduos secundários, que irão necessitar de tratamento posterior (Chengalroyen & Dabbs, 2013; Chacko & Subramaniam, 2011; Saratale *et al.*, 2011; Husain, 2006).

Os métodos de oxidação química ativam a destruição de moléculas de corante. Neste método, são usados vários agentes oxidantes, como ozono (O_3), H_2O_2 e permanganato (MnO_4).

Verificou-se que a ozonização é eficaz na remoção de poluentes devido à elevada reatividade com vários corantes azo, não alterando o volume e apresentando satisfatórias taxas de descoloração. No entanto, o seu tempo de meia-vida curto, ineficácia na degradação de corantes dispersos e de corantes insolúveis em água, a baixa capacidade de remoção do COT, bem como

o elevado custo do O₃, limita a aplicação deste processo (Bafana *et al.*, 2011; Saratale *et al.*, 2011).

O reagente de Fenton consiste numa solução de H₂O₂ e um catalisador de ferro usada na oxidação de impurezas ou águas residuais. É um método relativamente barato, que também apresenta eficácia na diminuição da CQO e na descoloração, quer em corantes solúveis quer em corantes insolúveis. No entanto, leva à formação de elevadas quantidades de resíduos (Chacko & Subramaniam, 2011; Saratale *et al.*, 2011; Husain, 2006).

Os processos fotoquímicos, em que é utilizada radiação UV e H₂O₂ são processos que evitam a formação de resíduos e a uma elevada diminuição da CQO num curto período de tempo. Neste tratamento, a radiação UV ativa o H₂O₂, resultando na produção de radicais hidroxilo, que degradam as moléculas de corante em água e dióxido de carbono. No entanto, é menos eficaz em efluentes extremamente coloridos e, na presença de corantes dispersos, ou de tina, há a formação de produtos indesejáveis, e a utilização de radiação UV encarece bastante o processo (Chengalroyen & Dabbs, 2013; Chacko & Subramaniam, 2011; Bafana *et al.*, 2011; Saratale *et al.*, 2011; Husain, 2006).

A destruição eletroquímica é muito eficaz na destruição de compostos orgânicos. No entanto, o elevado preço da eletricidade também limita o uso deste processo, bem como a baixa remoção de cor em alguns corantes (Chacko & Subramaniam, 2011; Bafana *et al.*, 2011; Saratale *et al.*, 2011; Husain, 2006).

A irradiação requer uma quantidade suficiente de O₂ dissolvida, para permitir que as substâncias orgânicas, como corantes, sejam eficazmente degradadas por radiação. O O₂ dissolvido é consumido rapidamente, pelo que é necessária uma suplementação contínua do mesmo, o que aumenta o custo deste processo (Bafana *et al.*, 2011).

Foi feita uma breve descrição dos vários métodos físicos e químicos usados para a diminuição de corantes em efluentes. Alguns apresentavam vantagens bastante atrativas, mas também várias desvantagens: a maioria não é economicamente viável, muitos são incapazes de remover os corantes azo recalcitrantes e/ou os seus metabolitos resultantes da quebra da ligação azo, e ainda produzem grandes quantidades de resíduos que terão, posteriormente, de ser tratados.

É da maior importância apostar no desenvolvimento de tecnologias amigas do ambiente que sejam eficazes na eliminação de corantes de efluentes têxteis até níveis aceitáveis. Os métodos biológicos são, geralmente, mais específicos, requerem menos energia, e são mais seguros para o meio ambiente (Chacko & Subramaniam, 2011; Saratale *et al.*, 2011; Ali, 2010).

A descoloração biológica de efluentes pode ser feita de duas formas: ou através de adsorção na biomassa microbiana, ou através de biodegradação de corantes por células ou enzimas sendo esta, atualmente, a alternativa mais interessante. Vários estudos reportam o uso de

microrganismos, incluindo fungos, bactérias, leveduras e microalgas, que conseguem quebrar a ligação azo de muitos corantes, em condições ambientais controladas.

1.3.2. Métodos Biológicos

A biorremediação/biodegradação é uma ferramenta biotecnológica que usa células de diversos organismos, ou enzimas isoladas, para degradar contaminantes persistentes a compostos não tóxicos (ou menos tóxicos) e, em muitos casos, pode ser combinado com outros processos físicos, químicos ou mecânicos, de forma a melhorar o desempenho e a eficácia dos processos. Alguns métodos biológicos são “amigos do ambiente”, uma vez que os produtos finais da degradação são menos tóxicos ou são totalmente mineralizados, requerem menos água comparativamente com os processos físico-químicos, conduzindo a uma diminuição do custo e a rendimentos e eficácia elevadas. Uma das desvantagens reside no facto destes processo serem relativamente mais morosos que os métodos convencionais (Rauf & Ashraf, 2012; Solís *et al.*, 2012; Saratale *et al.*, 2011; Alcade *et al.*, 2006).

A eficácia da descoloração depende da adaptação e da eficácia dos organismos selecionados. Consequentemente, ao longo de vários anos, têm sido testadas várias espécies de organismos incluindo bactérias filamentosas e não filamentosas, bolores, leveduras, consórcios microbianos, algas e plantas, na descoloração e degradação de vários corantes. Um dos maiores interesses ao nível da biorremediação de efluentes têxteis é isolar espécies promissoras capazes de descolorar uma grande variedade de corantes (Solís *et al.*, 2012; Saratale *et al.*, 2011).

Como já foi referido, a biodegradação de compostos recalcitrantes pode ocorrer através de dois mecanismos: biosorção ou metabolização/degradação enzimática, ou ainda a combinação de ambos, sendo que a sua eficácia depende da adaptação e da atividade dos organismos selecionados, bem como das características dos efluentes, incluindo a composição e estrutura dos corantes presentes (Solís *et al.*, 2012; Khan *et al.*, 2013; Saratale *et al.*, 2011).

1.3.2.1. Fitorremediação

As plantas podem ser usadas para tratar problemas ambientais, i.e. para a remoção de contaminantes do solo, água ou ar. O método, frequentemente chamado de fitorremediação, reduz o problema ambiental sem descarga de resíduos. É uma tecnologia emergente, que promete ser uma ferramenta eficaz e barata na remediação de solos e águas subterrâneas, ricas em metais pesados e poluentes orgânicos, como os corantes. A fitorremediação usa plantas com raízes profundas e fibrosas e de rápido crescimento. Três espécies de árvores (*Brassica juncea*, *Sorghum vulgare* e *Phaseolus mungo*) foram testadas na descoloração de corantes azo e

efluentes têxteis e as percentagens de descoloração atingiram os 79, 57 e 53 % respetivamente (Rauf & Ashraf, 2012; Saratale *et al.*, 2011).

Estas plantas conseguem degradar ou remover vários tipos de compostos orgânicos e inorgânicos. As maiores vantagens da fitorremediação residem no facto de serem sistemas autotróficos, que podem atingir elevada biomassa, requerem poucos nutrientes, e apresentam uma aplicabilidade ambientalmente sustentável pois não é necessário nenhum tratamento adicional, são fáceis de manter e são, geralmente, aprovadas pelo domínio público por serem esteticamente apelativas (Rauf & Ashraf, 2012; Saratale *et al.*, 2011).

No entanto, a aplicação em larga escala da fitorremediação enfrenta alguns obstáculos, incluindo a capacidade de sobrevivência das plantas no meio envolvente, a evapotranspiração de poluentes orgânicos voláteis, e também o requerimento de uma elevada área superficial e profundidade de solo suficiente para as raízes crescerem (Rauf & Ashraf, 2012; Saratale *et al.*, 2011).

Por todas estas razões, não é muito surpreendente que não existam muitos estudos relacionados com a fitorremediação de efluentes.

1.3.2.2. Biosorção

A biomassa de microalgas, leveduras, fungos filamentosos e bactérias tem sido usada para remover corantes através da biosorção. A capacidade de biosorção de um microrganismo é atribuída aos heteropolissacáridos e lipídios presentes na composição da parede celular, que contêm diferentes grupos funcionais, incluindo grupos amina, carboxilo, hidroxilo, fosfato e outros grupos carregados, e estabelecem interações fortemente atrativas entre o corante azo e a parede celular (Solís *et al.*, 2012).

A eficácia da biosorção depende das seguintes condições: pH, temperatura, força iónica, tempo de contato, adsorvente, concentração de corante, estrutura do corante e tipo de microrganismo. Alguns pré-tratamentos podem modificar a capacidade de adsorção da biomassa, como a autoclavagem, pois as altas temperaturas podem causar a rutura celular (Solís *et al.*, 2012).

O uso de biomassa como adsorventes tem vantagens, principalmente se os efluentes forem muito tóxicos ou quando não existem condições para o crescimento e manutenção das populações microbianas. A utilização de células mortas não requer o gasto de nutrientes e podem ainda ser armazenadas por vários períodos de tempo (Khan *et al.*, 2013; Solís *et al.*, 2012).

Neste método, a estrutura do corante mantém-se intacta, não se degradando. Por outro lado, a biosorção de corantes não elimina o problema da poluição pois, como foi referido, o corante

não é degradado, ficando apenas retido na matriz do adsorvente, neste caso, na biomassa microbiana. Deste modo, existe acumulação da biomassa, tornando-se este num efluente que necessita de tratamento. Desta forma, a biosorção não é uma solução muitas vezes prática (Khan *et al.*, 2013; Solís *et al.*, 2012).

A biosorção pode ser uma alternativa para o tratamento de efluentes têxteis reais. Por exemplo, usando células mortas de *Candida tropicalis* imobilizadas em alginato, é possível obter-se a descoloração total do efluente, e estas esferas de alginato, contendo as células, foram reutilizadas em processos de adsorção-desadsorção, pelo menos, mais oito vezes (Solís *et al.*, 2012).

1.3.2.3. Descoloração e degradação de corantes azo por microrganismos fotossintéticos

As microalgas são organismos fotossintéticos, que estão presentes em praticamente todo o tipo de *habitats* do planeta. Alguns corantes exibem elevada toxicidade para a vida aquática, mas não reduzem significativamente o crescimento e proliferação das microalgas. Portanto, as microalgas podem ser uma boa opção na biorremediação de efluentes com corantes. Estas têm a vantagem de não necessitarem de uma fonte de carbono orgânica adicional, ao contrário das bactérias e dos fungos, pois as microalgas produzem energia a partir da luz solar e retiram carbono e azoto do ar atmosférico (Solís *et al.*, 2012).

As cianobactérias são, como o próprio nome indica, bactérias que, na presença de luz, libertam oxigénio através da respiração. O seu processo de fotossíntese assemelha-se ao das plantas verdes e algas, e são microrganismos extremamente importantes no equilíbrio da Natureza (Ferreira & de Sousa, 2010).

Os mecanismos de descoloração, usando microalgas, envolvem degradação enzimática, adsorção, ou ambas. Em adsorção, podem ser usadas microalgas viáveis e não viáveis. A um pH baixo, a biomassa apresenta uma carga positiva à superfície das células. Por esta razão, estes processos, a um pH baixo, demonstram ser mais eficazes, devido à atração eletrostática entre os grupos aniónicos do corante e a superfície catiónica das células (Solís *et al.*, 2012).

Uma outra alternativa é a utilização de células imobilizadas, por exemplo, em alginato. Está reportado na literatura que algumas microalgas imobilizadas apresentam melhores resultados de descoloração, comparativamente a microalgas em suspensão (Solís *et al.*, 2012).

Alguns géneros, como *Chlorella* sp. ou *Oscillatoria* sp. são capazes de reduzir corantes azo, obtendo-se as aminas aromáticas correspondentes, que são degradadas até à obtenção de compostos mais simples ou dióxido de carbono. Na literatura, foram reportados mais de 30 corantes azo que foram biodegradados por *Chlorella pyrenoidosa*, *Chlorella vulgaris* e *Oscillatoria tenius* em simples aminas aromáticas (Khan *et al.*, 2013).

Na **Tabela 1-7**, apresentam-se alguns exemplos de degradação de corantes usando microalgas:

Tabela 1-7. Descoloração de corantes azo por microalgas e cianobactérias (adaptado de Solís *et al.*, 2012).

| Microrganismos fotossintéticos e sua origem | Processo e condições de descoloração | Concentração inicial do corante e percentagem de descoloração |
|---|---|--|
| <i>Spyrogira</i> sp viável, isolada de efluentes florestais | Adsorção; pH 2.0-10.0, 180 rpm, 20-50 °C, 5 horas | <i>Direct Brown</i> (15 ppm); 70 % de descoloração |
| <i>Spyrogira</i> sp não viável, isolada de um lago | Adsorção; pH 2.0, 100 rpm, 30 °C, 8 horas | <i>Direct Brown</i> (15 ppm); 80 % de descoloração |
| <i>Chlorella vilgari</i> , <i>Lyngbya lagerlerimi</i> , <i>Nostoc linckia</i> , <i>Elkatothrix viridis</i> e <i>Volvox aureus</i> , isoladas de locais poluídos | Degradação enzimática; pH 7.0, 25 °C, 7 dias | <i>Methyl Red</i> (20 ppm); 82 % de descoloração <i>Orange II</i> (20 ppm); 47 % de descoloração <i>G-Red</i> (FN-3G) (20 ppm); 59 % de descoloração |

1.3.2.4. Descoloração e degradação de corantes azo por leveduras

As leveduras também têm sido usadas na descoloração de diferentes corantes azo devido principalmente à sua elevada capacidade de adsorção de corantes e metais pesados, como chumbo e cádmio (Khan *et al.*, 2013; Solís *et al.*, 2012).

Tal como nas microalgas, os mecanismos de descoloração usando leveduras podem ser de adsorção, metabolização/degradação enzimática, ou uma combinação de ambas, quer em condições aeróbias, quer em condições anaeróbias (Solís *et al.*, 2012).

Alguns estudos revelaram que algumas espécies de leveduras são promissoras no que respeita ao tratamento de efluentes contendo elevadas concentrações de corantes, por adsorção, usando, como por exemplo, *Galactomyces geotrichum*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Trichosporon beigelli*, entre outras (Khan *et al.*, 2013).

Na **Tabela 1-8**, apresentam-se alguns exemplos de degradação de corantes usando leveduras:

Tabela 1-8. Descoloração de corantes azo por leveduras (adaptado de Solís *et al.*, 2012).

| Leveduras e sua origem | Processo e condições de descoloração | Concentração inicial do corante e percentagem de descoloração |
|---|--|--|
| <i>Candida tropicalis</i> isolada de efluentes contaminados | Adsorção; pH 3.0-7.0, 120 rpm, 28 °C, 2 dias | <i>Basic Violet</i> (10 ppm); 85.3 % remoção de cor |
| <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> isolada de efluentes têxteis | Adsorção; pH 3.0-6.0, 100 rpm, 30 °C, 6 dias | <i>Remazol Blue</i> (389 ppm); 96 % remoção de cor |
| <i>Candida rugopelliculosa</i> isolada de solos contaminados com corantes | Degradação enzimática em condições de anaerobiose; pH 2.0-8.0, 28 °C, 48 horas | <i>Reactive Blue</i> (2000 ppm); 90 % de remoção da cor |

1.3.2.5. Descoloração e degradação de corantes azo por fungos

Os fungos filamentosos podem ser encontrados em vários ambientes devido à rápida adaptação do seu metabolismo a um grande número de fontes de carbono e azoto. A aplicação de fungos filamentosos em processos de descoloração é uma alternativa muito atrativa devido ao baixo custo e à possibilidade de mineralização total do corante (Khan *et al.*, 2013; Solís *et al.*, 2012).

Os fungos filamentosos foram amplamente estudados na degradação de poluentes devido ao seu complexo sistema enzimático extracelular, não específico, oxidando corantes azo através de peroxidases e fenoloxidasas, evitando a produção de aminas, um problema presente na degradação redutiva destes corantes. A descoloração é mais eficiente em condições de aerobiose e agitação intensa, de forma a promover uma ótima transferência de oxigênio entre as células. A área superficial elevada nos fungos também é uma vantagem nas interações físicas e enzimáticas com o ambiente (Khan *et al.*, 2013; Rauf & Ashraf, 2012; Solís *et al.*, 2012).

Os *white-rot fungi* (WRF), ou fungos causadores da “podridão branca” na madeira, são uma classe de microrganismos que produzem enzimas capazes de decompor corantes em condições de aerobiose. Destes, o mais estudado é o *Penicillium chrysosporum*, embora a atenção também esteja focada em outras espécies, como *Trametes versicolor*, *Bjerkandera adusta*, *Aspergillus ochraceus* ou de *Pleurotus* e *Phlebia*, *Fomes sclerodermeus*, entre outros. No entanto, a aplicação de WRF na remoção de corantes em efluentes têxteis tem algumas desvantagens, tais como o tempo de crescimento elevado e a necessidade de suplementação com fontes de azoto. O longo tempo de retenção requerido para uma taxa de descoloração completa também limita o desempenho deste sistema, bem como a preservação dos fungos em biorreatores (Khan *et al.*, 2013; Rauf & Ashraf, 2012).

Na **Tabela 1-9**, apresentam-se alguns exemplos de degradação de corantes usando fungos:

Tabela 1-9. Descoloração de corantes azo por fungos (adaptado de Solís *et al.*, 2012).

| Fungos e sua origem | Processo e condições de descoloração | Concentração inicial do corante e percentagem de descoloração |
|--|---|---|
| <i>Cunninghamella elegans</i> isolada de sedimentos de manguezal | Adsorção; pH 5.6, 28 °C, 120 horas | <i>Reactive Orange II</i> , <i>Reactive Black 5</i> , <i>Reactive Red 198</i> ; 93 % de descoloração |
| <i>Ganoderma sp.</i> , isolada da floresta | Degradação enzimática; pH 5.5, 150 rpm, 28 °C, 72 horas | <i>Methyl Orange</i> (50 ppm); 96.7 % de descoloração <i>Crystal Violet</i> (50 ppm); 75 % de descoloração <i>Bromophenol Blue</i> (50 ppm); 90 % de descoloração <i>Malachite Green</i> (200 ppm); 91 % de descoloração |
| <i>Aspergillus flavus</i> , <i>Alternaria sp.</i> , <i>Penicillium sp.</i> isoladas de efluentes contaminados com corantes | Adsorção e degradação; 30 °C, 8 dias | <i>Acid Red 151</i> (20 ppm); 85.3 % de descoloração <i>Orange II</i> (20 ppm); 58 % de descoloração |

1.3.2.6. Descoloração e degradação de corantes azo por bactérias

Alguns dos microrganismos usados na biorremediação de efluentes têxteis são bactérias por várias razões: geralmente, o seu crescimento é fácil e rápido, em condições aeróbias ou anaeróbias. Estas conseguem adaptar-se a ambientes extremos de salinidade e temperatura e expressam diferentes enzimas oxidativas e redutoras (Solís *et al.*, 2012).

Em comparação com os fungos, a descoloração usando bactérias é, normalmente, mais rápida. A redução da ligação azo dos corantes ocorre, na maioria dos casos, em condições de anaerobiose, em diferentes espécies de bactérias pois o oxigénio provoca a inativação da atividade das enzimas redutoras envolvidas na degradação de corantes, as azoredutases. No entanto, também existem bactérias que possuem a capacidade de reduzir a ligação azo na presença de oxigénio. Exemplos destas bactérias são *Xenophilus azovorans* KF46 ou *Pseudomonas aeruginosa* (Prasad & Aikat, 2014; Khan *et al.*, 2013; Solís *et al.*, 2012).

Os mecanismos da degradação bacteriana de corantes azo em condições de anaerobiose envolvem enzimas azoredutases que provocam a clivagem da ligação azo ($-N=N-$), resultando na formação de soluções sem cor, contendo aminas aromáticas, potencialmente tóxicas, mutagénicas e carcinogénicas para os animais (Prasad & Aikat, 2014; Ali, 2010; Chung, 2000) que, no entanto, são biodegradáveis em condições aeróbias (Solís *et al.*, 2012; Ali, 2010).

Tendo em conta que os efluentes devem ser tratados antes da descarga para o meio ambiente, é sugerido, após o tratamento anaeróbio, um tratamento aeróbio, de forma a diminuir, ou até eliminar, a carga tóxica dos efluentes (Prasad & Aikat, 2014; Ali, 2010).

A descoloração usando bactérias tem sido considerada uma área de grande interesse, visto que permite obter um elevado grau de biodegradação e mineralização, e é aplicável a vários

grupos de corantes. Este processo é barato e amigável ao ambiente, e produz menos resíduos após o tratamento (Prasad & Aikat, 2014; Khan *et al.*, 2013).

Por exemplo, foi comparada a eficácia da remoção de cor de um efluente têxtil entre *Pseudomonas putida* e um processo de coagulação-floculação: enquanto a *P. putida* consegue reduzir em 86 % a cor do efluente, o processo de coagulação-floculação apenas consegue reduzir em 34.5 %. Os ensaios de toxicidade revelaram também que o processo clássico de coagulação-floculação não é, por si só, suficiente para diminuir a toxicidade do efluente, ao contrário da *P. putida*, que consegue diminuir essa toxicidade (Solís *et al.*, 2012).

Na **Tabela 1-10**, apresentam-se alguns exemplos de degradação de corantes usando bactérias:

Tabela 1-10. Descoloração de corantes azo por bactérias (adaptado de Khan, 2013; Solís *et al.*, 2012).

| Bactérias e sua origem | Processo e condições de descoloração | Concentração inicial do corante e percentagem de descoloração |
|--|---|---|
| <i>P. aeruginosa</i> | Degradação enzimática anaeróbia; pH 7.0, 30 °C, 24 horas | <i>Remazol Orange</i> (200 mg/L), 94 % de descoloração |
| <i>Shewanella putrefaciens</i> isolada de lamas ativadas | Degradação enzimática sem agitação; pH 6.0-8.0, 35 °C, 12 horas | <i>Reactive Black 5</i> (50 µM); 100 % de descoloração <i>Methyl Red</i> (50 µM); 100 % de descoloração <i>Congo Red</i> (50 µM); 100 % de descoloração |
| <i>Bacillus cereus</i> isolada de efluentes têxteis | Degradação enzimática sem agitação; pH 6.0-7.5, 37 °C, 72 horas | <i>Reactive Red 195</i> (200 ppm); 97 % de descoloração |

1.3.2.7. Descoloração e degradação de corantes azo usando consórcios microbianos

Já foi descrito que os microrganismos conseguem descolorar corantes azo. No entanto, os produtos da degradação, na maioria dos casos, são aminas aromáticas frequentemente tóxicas ou metabolitos que são mais difíceis de biodegradar que o corante inicial. Devido à complexidade química dos efluentes têxteis, tem sido estudada a possibilidade de usar mais do que uma estirpe microbiana, permitindo a obtenção de processos de biorremediação mais eficazes, através da construção de consórcios microbianos (Solís *et al.*, 2012).

Uma vantagem significativa de um consórcio na degradação de corantes azo, relativamente ao uso de estirpes individuais, é o facto de as diferentes estirpes poderem degradar as moléculas de corante recorrendo a diferentes reações enzimáticas, ou poderem usar os metabolitos produzidos por outra estirpe para decomposição adicional sendo que, em alguns casos, atinge-se a completa mineralização dos corantes azo (Solís *et al.*, 2012).

Os consórcios podem ser construídos com bactérias, fungos, ou uma mistura dos dois. A atividade enzimática de uma estirpe é altamente influenciada pela presença de outros microrganismos, e a atividade catalítica de um consórcio é diferente da atividade dos microrganismos isolados (Solís *et al.*, 2012).

Os microrganismos de um consórcio cooperam sinergicamente de forma a melhorar o processo de descoloração. Como exemplo, a *Pseudomonas* sp. SUK1 é capaz de descolorar corantes, mas a *Pseudomonas* sp. LBC2 e LBC3 não; no entanto, o consórcio entre estes três microrganismos descolora com melhor eficiência efluentes contaminados do que a estirpe SUK1 isolada. Outro exemplo é a descoloração do corante Orange II a 10 % por *Enterobacter cloacae* em 15 minutos, 23 % por *Enterococcus casseliflavus* e 100 % pelo consórcio entre ambas (Solís *et al.*, 2012).

Tratamentos promissores no tratamento de corantes azo baseiam-se na combinação de processos anaeróbios e aeróbios, usando consórcios microbianos. O passo de anaerobiose envolve geralmente a clivagem redutiva da ligação azo, levando à descoloração, e é esperada uma completa mineralização das aminas aromáticas no passo de aerobiose (Solís *et al.*, 2012).

Na construção do consórcio, a proporção de cada microrganismo é importante para a obtenção de um processo de descoloração de corantes azo eficaz (Solís *et al.*, 2012).

Na **Tabela 1-11**, apresentam-se alguns exemplos de degradação de corantes usando consórcios:

Tabela 1-11. Descoloração de corantes azo usando consórcios microbianos (adaptado de Solís *et al.*, 2012).

| Consórcio | Processo e condições de descoloração | Concentração inicial do corante e percentagem de descoloração |
|---|--|---|
| <i>Sphingomonas paucimobilis</i> isoladas de efluentes têxteis, <i>B.cereus</i> | Degradação enzimática aeróbia; pH 7.0, 150 rpm, 30 °C, 48 horas | <i>Methyl Orange</i> (750 ppm); 100 % de descoloração e 98 % remoção de COT |
| <i>Bacillus vallismortis</i> , <i>Bacillus pumilus</i> , <i>B.cereus</i> , <i>B.subtilis</i> , <i>Bacillus megaterium</i> isoladas de efluentes têxteis | Degradação enzimática aeróbia; 37 °C, 96 horas | <i>Congo Red</i> (10 ppm); 96 % de descoloração <i>Direct Red 7</i> (10 ppm); 89.6 % de descoloração <i>Acid Blue 113</i> (10 ppm); 81 % de descoloração <i>Direct Blue 53</i> (10 ppm); 82.7 % de descoloração |
| <i>P. aeruginosa</i> , <i>Bacillus circulans</i> isoladas de efluentes têxteis | Degradação enzimática; sem agitação, 37 °C, 8 horas na presença de FAD, 48 sem FAD | <i>Reactive Black 5</i> (100 ppm); 93 % de descoloração <i>Reactive Violet 13</i> (100 ppm); 93 % de descoloração <i>Reactive Orange 16</i> (100 ppm); 93 % de descoloração <i>Reactive Red 11</i> (100 ppm); 93% de descoloração <i>Reactive Red 141</i> (100 ppm); 93 % de descoloração <i>Direct Yellow 12</i> (100 ppm); 93% de descoloração |

1.3.2.8. Descoloração e degradação de corantes azo por microrganismos ou enzimas geneticamente modificadas

A biorremediação, como já foi dito, baseia-se em métodos “amigos do ambiente” no tratamento de efluentes têxteis. No entanto, as características dos efluentes, como pH, a concentração de cloreto de sódio e outros sais, temperatura, e a presença de compostos orgânicos, podem resultar na inativação das enzimas e das células dos microrganismos. Por esta razão, é necessário que existam enzimas mais versáteis e microrganismos com elevada estabilidade e produção a baixo custo, e que sejam adequadas aos requerimentos do tratamento de efluentes têxteis industriais (Solís *et al.*, 2012).

As metodologias da biologia molecular, como clonagem, expressão heteróloga, mutagénese aleatória, mutagénese dirigida, evolução direta, técnicas de recombinação genética, entre outros, podem ser usados para acelerar o processo de evolução natural de tal forma que o processo de biorremediação seja melhorado (Solís *et al.*, 2012).

Por exemplo, os genes que codificam para as enzimas azoreductase de *Pseudomonas putida* MET94 (PpAzoR) e a CotA-lacase de *Bacillus subtilis* foram amplificados e inseridos num plasmídeo. Em seguida, as células de um hospedeiro heterólogo, *Escherichia coli*, foram transformadas com este plasmídeo. As enzimas recombinantes foram usadas na descoloração de

efluentes têxteis, resultando numa descoloração significativa (Solís *et al.*, 2012; Mendes *et al.*, 2011b).

Os benefícios de usar células recombinantes incluem o aumento da atividade enzimática, o que é vantajoso na descoloração de efluentes têxteis, evitando os custos associados ao uso de cofatores e purificação das enzimas (Solís *et al.*, 2012).

1.3.2.9. Descoloração e degradação de corantes azo usando processos de oxidação avançados (AOPs) combinados com processos microbiológicos

Os AOPs dependem do uso de reagentes químicos e são eficazes na degradação de corantes azo. No entanto, apenas se observa uma diminuição significativa no COT quando são usadas quantidades significativas de reagentes, como H₂O₂ e compostos de ferro, e uma quantidade significativa de energia nos processos de ozonização, fotoquímicos e eletroquímicos, elevando o custo dos AOPs. É possível contornar algumas desvantagens e melhorar as vantagens destes métodos, combinando-os com métodos biológicos, desenvolvendo-se uma alternativa económica e versátil na descoloração de corantes azo. O objetivo de combinar estes dois métodos é permitir a degradação parcial, através de processos mais avançados de oxidação, que são consequentemente mais caros, seguido do processo biológico, mais económico, para remoção adicional de compostos orgânicos. Desta forma, o objetivo é converter os corantes em intermediários mais pequenos e biodegradáveis por processos biológicos, usando microrganismos isolados de efluentes têxteis e ETARs, ou de solos contaminados com efluentes têxteis (Solís *et al.*, 2012).

Os AOPs são vantajosos como pré-tratamento pois alguns corantes inibem o crescimento e proliferação de bactérias. Desta forma, os efluentes são descolorados por AOPs e completamente mineralizados por microrganismos (Solís *et al.*, 2012).

Na **Tabela 1-12**, apresentam-se alguns exemplos de degradação de corantes usando AOPs combinados com processos microbiológicos:

Tabela 1-12. Descoloração de corantes azo usando AOPs combinados com processos microbiológicos (adaptado de Solís *et al.*, 2012).

| AOP/Processo biológico | Processo e condições de descoloração | Concentração inicial do corante e percentagem de descoloração |
|--|---|--|
| Ultrassons/ <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> | Ultrassons 20 kHz, 5 horas / Degradação enzimática, pH 5.0, 25 °C, 100 rpm, 8 horas | <i>Reactive Red 2</i> (100 ppm); <i>Reactive Blue 4</i> (100 ppm); <i>Basic Yellow 2</i> ; após Ultrassons: 28-48 % de descoloração; após tratamento biológico: 40-93 % de descoloração |
| Ultrassons/ mutante de <i>Pseudomonas putida</i> | Ultrassons 30 kHz, 1 hora / Degradação enzimática, 37 °C, 5 horas | <i>Tectilon Yellow 2G</i> (1000 ppm); após ultrassons: 32 % de descoloração; após tratamento biológico: 10 % de descoloração |
| <i>Aspergillus niger</i> , <i>Penicillium</i> sp., isoladas de efluentes de curtumes/ Ozonização | Degradação enzimática, 280 horas / Ozonização, 4 horas | <i>Acid Black 1</i> ; 94.5 % de descoloração, 52.9 % remoção de COT |

1.4. Fatores que afetam a descoloração microbiana

Os microrganismos são sensíveis à presença de substâncias químicas, como a concentração de corante e estrutura do mesmo, elevada salinidade e elevadas concentrações de compostos orgânicos. Existem vários parâmetros operacionais que afetam a capacidade de descoloração, tais como a intensidade de agitação, oxigênio, pH, temperatura, entre outros. De forma a garantir a eficácia do processo, é necessário conhecer e otimizar estes fatores.

Estrutura do corante – Foi observado que a degradação enzimática de corantes depende da estrutura do mesmo – corantes com grupos aceitadores de elétrons, como o grupo SO_3^- , são mais fáceis de degradar do que os corantes que contêm grupos NH-triazina. Desta forma, os corantes azo que demonstram maior facilidade na biodegradação enzimática são aqueles que contêm grupos aceitadores de elétrons, e se esses grupos estiverem em posição *orto* ou *para* relativamente à ligação azo, a degradação processa-se mais rapidamente do que em posição *meta*, pois providencia um efeito de ressonância mais eficaz. Desta forma, os corantes azo tornam-se em espécies altamente eletrófilas, e a descoloração redutiva é mais rápida. A descoloração ótima foi registada em corantes que tinham menos impedimento estereoquímico perto da ligação azo (Solís *et al.*, 2012).

Fontes de carbono e azoto – Os corantes são pobres em carbono e azoto, pelo que a degradação metabólica, em culturas microbianas, sem a suplementação com uma fonte de carbono exógena é praticamente impossível. Geralmente, para existir descoloração, as culturas requerem glucose, triptona, extrato de levedura, peptona, frutose, sacarose ou melaços (Khan *et al.*, 2013; Solís *et al.*, 2012).

pH – O pH tem um efeito importante na eficácia da adsorção e na descoloração de corantes, sendo que o pH ótimo nas bactérias situa-se, geralmente, entre 6.0 e 10.0. Já os fungos e as

leveduras demonstram ter um melhor desempenho na descoloração em pH ácido ou neutro. A taxa de descoloração é alta ao pH ótimo do microrganismo, tendo tendência para diminuir rapidamente a pH bastante ácido ou alcalino (Khan *et al.*, 2013; Solís *et al.*, 2012).

Temperatura – A temperatura também tem um papel importante no processo de descoloração e na biosorção, pois está relacionada com a viabilidade do microrganismo. Tal como no pH, existe uma temperatura ótima para os microrganismos, sendo que a taxa de descoloração é elevada à temperatura ótima, começando a diminuir quando a temperatura se afasta da mesma (Khan *et al.*, 2013; Solís *et al.*, 2012).

Concentração de corante – Alguns estudos demonstram que, com o aumento da concentração de corante, a taxa de descoloração diminui gradualmente, provavelmente devido aos efeitos tóxicos dos corantes, combinado com uma possível concentração de biomassa inadequada. O bloqueio dos centros ativos das enzimas por moléculas de corante de diferentes estruturas também é uma possibilidade que explica esta diminuição da eficácia do processo (Khan *et al.*, 2013).

Agitação e oxigénio – As condições ambientais podem afetar diretamente os processos de degradação e descoloração dos corantes, pois podem influenciar o metabolismo microbiano. A agitação aumenta a transferência de massa e oxigénio entre as células. Alguns estudos demonstram que, em condições anaeróbias, a atividade das enzimas redutoras é elevada. Já as enzimas oxidativas necessitam de oxigénio para degradar os corantes. Também foi observado que oxigénio tem um efeito inibitório nas enzimas redutoras, ou seja, na presença de oxigénio, estas enzimas não degradam os corantes (Khan *et al.*, 2013; Solís *et al.*, 2012).

Dador de eletrões – Tem-se verificado que a adição de dadores de eletrões induz a clivagem redutiva da ligação azo dos corantes. O tipo de dadores de eletrões é importante na obtenção de boas taxas de descoloração, em condições de anaerobiose. Exemplos de dadores de eletrões são dinucleótido de nicotinamida e adenina (NADH) e fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina (NADPH; Khan *et al.*, 2013; Saratale *et al.*, 2011).

Mediador redox – Os mediadores redox podem melhorar vários processos redutivos, em condições anaeróbias, incluindo a redução de corantes azo. Embora a degradação enzimática seja eficaz para vários corantes, existem alguns substratos que não são facilmente suscetíveis de serem degradados por enzimas. Nesses casos, utilizam-se mediadores redox, cuja função é aumentar a eficácia da reação enzimática, aumentando a velocidade de transferência de eletrões do dador para o aceitador de eletrões. Exemplos de mediadores são antraquinona-2-sulfonato (AQS), 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato) (ABTS), dinucleótido de flavina e adenina (FAD), entre outros (Khan *et al.*, 2013; Saratale *et al.*, 2011).

1.5. Degradação Enzimática

Do ponto de vista ambiental, o uso de enzimas, em vez de reagentes químicos ou de microrganismos, apresenta várias vantagens: a biotransformação não gera produtos secundários tóxicos, como acontece frequentemente em alguns processos químicos e biológicos; é possível, através da tecnologia de DNA recombinante, obter enzimas mais estáveis, com maior atividade e em maior quantidade, a um baixo preço. Como todos os processos, o uso de enzimas também tem desvantagens, nomeadamente o custo associado à purificação das enzimas e baixa atividade e/ou estabilidade em determinadas condições (Alcade *et al.*, 2006).

Apenas algumas enzimas são capazes de degradar corantes azo, devido à variação estrutural destas moléculas. Estas, durante a reação enzimática, formam vários radicais livres e são estes radicais os responsáveis por uma série de reações de clivagem. Algumas enzimas estudadas na biorremediação são redutases, monooxigenases, enzimas envolvidas no metabolismo da lenhina, como lenhina e manganês peroxidases e lacases, enzimas de WRF, entre outras, sendo que as azoredutases e as lacases aparentam ser as enzimas mais promissoras na biorremediação de corantes azo (Rauf & Ashraf, 2012; Alcade *et al.*, 2006).

Atualmente existe um grande interesse em conhecer o mecanismo catalítico exato destas enzimas. Dependendo da enzima usada, verificam-se diferentes mecanismos na degradação dos corantes. Os metabolitos produzidos após a degradação dos corantes azo podem ser, em alguns casos, mais tóxicos do que o corante intacto. Por exemplo, o corante *Acid Violet 7* tem a capacidade de induzir mutações ao nível do DNA (Solís *et al.*, 2012). A toxicidade deste corante aumenta significativamente após a biodegradação com *P. putida*, em condições de anaerobiose, devido à toxicidade dos metabolitos produzidos. Por esta razão, é bastante importante avaliar a toxicidade dos poluentes e dos metabolitos formados após a biodegradação, de forma a avaliar a viabilidade do tratamento de biorremediação (Solís *et al.*, 2012).

1.5.1. Azoredutases

Como já foi referido, os corantes azo são compostos xenobióticos deficientes em eletrões, devido à ligação azo ($-N=N-$) e, em vários casos, contêm grupos sulfónicos (SO_3^-) ou outros grupos aceitadores de eletrões, que diminuem a suscetibilidade de degradação por microrganismos. No entanto, em determinadas condições, estes podem ser degradados por enzimas redutoras, como azobenzeno redutases e redutases NADH - 2,6-dicloroindofenol (NADH-DCIP; Barakat, 2013; Solís *et al.*, 2012).

As azobenzeno redutases (N,N-dimetil-1,4-fenilenediamina, anilina: NADP⁺ oxidoreductase, EC 1.7.1.6), mais conhecidas por azoredutases, são as enzimas envolvidas na clivagem redutiva

da ligação azo para produzir aminas aromáticas incolores; usando NADH e/ou NADPH como doadores de elétrons. As azoredutases conseguem descolorar corantes azo com a produção das aminas correspondentes, em condições anaeróbias ou aeróbias (Mendes *et al.*, 2011b; McMullan *et al.*, 2001; Correia *et al.*, 2010).

Com base na sua atividade enzimática, as redutases estão classificadas como sendo flavino-dependentes ou flavino-independentes. As redutases também são caracterizadas com base no requerimento de doadores de elétrons. Em suma, existem três grupos de redutases: redutases flavina-dependentes com maior atividade na presença de NADPH, redutases flavina-dependentes com maior atividade na presença NADH e redutases flavino-independentes, ou seja, que não contêm flavina no grupo prostético, e aceitam ambos os cofatores como doadores de elétrons (Gonçalves *et al.*, 2013; Chengalroyen & Dabbs, 2013; Leelakriangsak, 2013).

A atividade das azoredutases é, maioritariamente, mediada por enzimas flavino-dependentes, já identificadas em vários microrganismos, como *Rhodobacter sphaeroides*, *Enterococcus faecalis*, *Bacillus* sp. SF, *P. aeruginosa*, *E.coli*, *Bacillus* sp. OY1-2, *Staphylococcus aureus*, e *Geobacillus stearothermophilus*. No entanto, também foram identificadas azoredutases flavino-independentes em *Pigmentiphaga kullae* K24 e *Xenophilus azovorans* (Mendes *et al.*, 2011b).

As azoredutases flavino-dependentes revelaram possuir bastantes semelhanças relativamente à sequência, estrutura e mecanismo reacional, com quinona redutases flavino-dependentes, identificadas em *S. cerevisiae* e em mamíferos, pelo que estas enzimas também degradam eficazmente corantes antraquinónicos (Ryan *et al.*, 2014; Mendes *et al.*, 2011b).

Estas enzimas, para além de serem aplicadas na biorremediação de efluentes corados, também estão envolvidas na degradação de corantes azo a que os humanos estão expostos, quer por contaminação do meio ambiente, quer pelo uso de corantes em alimentos, cosméticos e medicamentos. Desta forma, as reações de degradação de corantes azo por azoredutases expressas na microflora gastro-intestinal humanas são muito importantes, pois estão envolvidas na diminuição da toxicidade e mutagenicidade destes compostos no corpo humano. As azoredutases também conseguem ativar pró-fármacos usados, por exemplo, no tratamento de inflamações intestinais sendo, por isso, alvos de interesse da indústria farmacêutica (Correia *et al.*, 2010; Chen *et al.*, 2004).

A degradação de compostos azo por azoredutases é um processo que apresenta uma maior eficácia em condições de anaerobiose, quer com o uso de microrganismos, quer usando a enzima purificada, pois o oxigénio inibe o mecanismo de redução e oxida, preferencialmente, os mediadores redox (Prasad & Aikat, 2014; Rauf & Ashraf, 2012).

O mecanismo de degradação de corantes azo por microrganismos, em condições de anaerobiose, nas suas aminas correspondentes está representado na **Figura 1-6**. Este inicia-se com a quebra da ligação azo por ação de uma azoredutase. Esta enzima catalisa a reação apenas

na presença de cofatores na forma reduzida, como NADPH e NADH, que transferem elétrons para os corantes azo, resultando na formação de aminas aromáticas incolores (Rauf & Ashraf, 2012; Solís *et al.*, 2012).

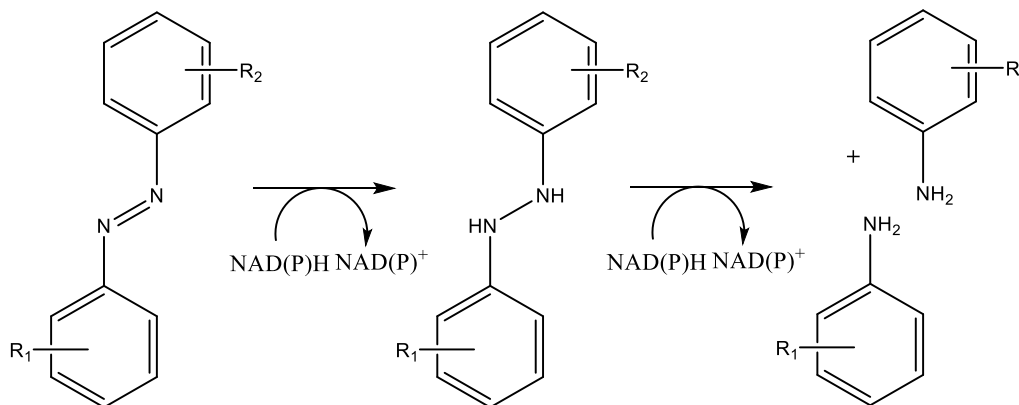


Figura 1-6. Mecanismo proposto para a redução de corantes azo por azoredutases (adaptado de Leelakirangsak, 2013).

As reações envolvendo dois substratos (reações Bi-Bi) podem ocorrer segundo três tipos de mecanismos diferentes: mecanismo de ping-pong, mecanismo sequencial ordenado ou mecanismo sequencial aleatório (Taipa & Gama, 2003). Nos mecanismos de ping-pong, pelo menos um produto é libertado antes de todos os substratos se terem combinado com a enzima; nos mecanismos sequenciais, todos os substratos são adicionados à enzima antes da libertação de qualquer produto da reação (Taipa & Gama, 2003). Estas enzimas demonstraram reduzir compostos azo por um mecanismo ping-pong Bi-Bi que requer dois ciclos de redução de FMN (mononucleótido de flavina) para FMNH₂ (mononucleótido de flavina na forma reduzida), por oxidação de NADPH. No primeiro ciclo, o substrato azo é reduzido a hidrazina e, no segundo ciclo, a hidrazina é reduzida em duas aminas (Leelakriangsak, 2013; Correia *et al.*, 2011; Mendes *et al.*, 2011b).

1.5.1.1. Azoredutase de *Pseudomonas putida* MET94

Neste trabalho, foi estudada a degradação de corantes azo usando a azoredutase flavino-dependente de *P.putida* (PpAzoR), com peso molecular de ~40 kDa que possui FMN como grupo prostético (**Figura 1-7**), sendo este grupo responsável pela cor amarela da enzima. Foi demonstrado que a PpAzoR reduz os corantes azo em dois passos distintos: no primeiro passo, existe a redução completa do cofator FMN e, no segundo passo, ocorre a transferência desses elétrons da flavina para o substrato azo, resultando na formação de intermediários hidrazo. Este

ciclo reacional repete-se uma segunda vez e entrega os quatro elétrons necessários, de forma a obter-se uma redução completa dos corantes azo a aminas (Mendes *et al.*, 2011b).

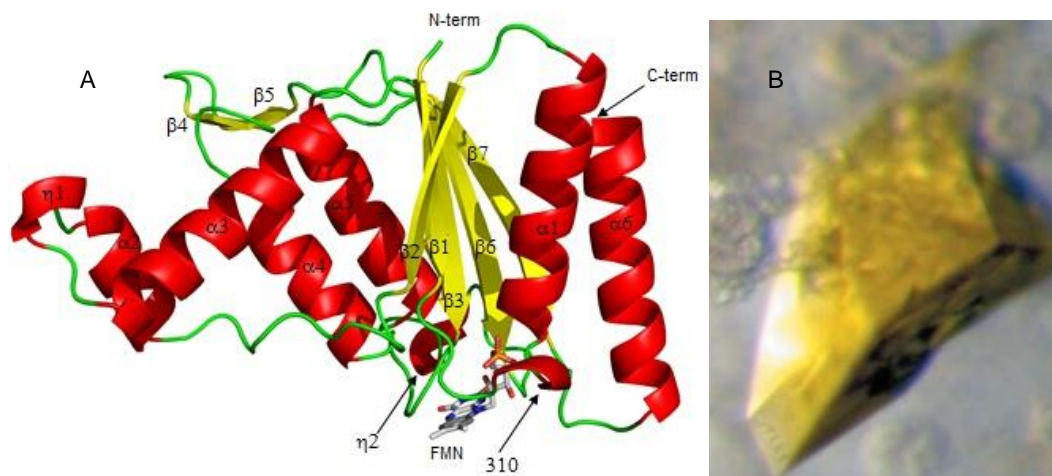


Figura 1-7. (a) Estrutura tridimensional do monómero PpAzoR de *P. putida* MET94 e representação do FMN prostético da PpAzoR; (b) Cristal da PpAzoR (adaptado de Gonçalves *et al.*, 2013; Correia *et al.*, 2010).

Na **Figura 1-8**, está representado o processo de ping-pong Bi-Bi na PpAzoR.

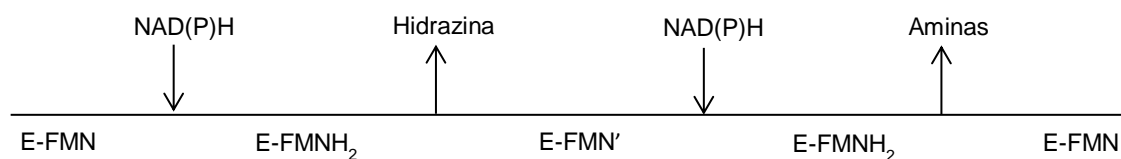


Figura 1-8. Esquema reacional para redutases contendo FMN como grupo prostético (adaptado de Taipa & Gama, 2003).

Vários estudos afirmam que as azoredutases promovem duas reduções obrigatórias: em ambas as reações, existe a transferência de elétrons, em primeiro lugar do NAD(P)H para o FMN e, em seguida, do FMNH₂ para o substrato, reduzindo assim a ligação azo e produzindo as aminas correspondentes (Gonçalves *et al.*, 2013; Mendes *et al.*, 2011b).

No entanto, estas aminas são muito tóxicas e têm um efeito mutagénico e carcinogénico nos seres vivos (Mendes *et al.*, 2011a; Mansour *et al.*, 2009). Normalmente, as aminas aromáticas formadas na redução da ligação azo não são biodegradáveis, mas podem ser degradadas na presença de oxigénio. Desta forma, têm sido propostos, por vários investigadores, tratamentos sequenciais anaeróbio-aeróbio, em que as aminas aromáticas recalcitrantes são transformadas em produtos muito menos tóxicos (Baêta *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2014; Sarayu & Sandhya, 2012; Silva *et al.*, 2012; Mendes *et al.*, 2011a; Cervantes & dos Santos, 2011; Saratale *et al.*, 2011; Pandey *et al.*, 2007; Forgacs *et al.*, 2004).

Uma enzima promissora na transformação de aminas aromáticas tóxicas é a CotA-lacase pois usa como substratos as aminas aromáticas tóxicas produzidas pela enzima PpAzoR (Sousa *et al.*, 2014a; Sousa *et al.*, 2013; Mendes *et al.*, 2011a; Pereira *et al.*, 2009).

Em Mendes *et al.* (2011a), foram realizados ensaios de toxicidade nos corantes e nos produtos resultantes da degradação enzimática por ação da PpAzoR e da CotA-lacase. Para tal, foram utilizadas duas estirpes para avaliar este parâmetro: uma levedura, a *Saccharomyces cerevisiae* e um nematódeo, a *Caenorhabditis elegans*. Neste estudo, foi avaliada a inibição do crescimento da *S. cerevisiae* e a inibição da reprodução da *C. elegans*. Verificou-se que, em alguns casos, a toxicidade do corante era menor que a toxicidade das aminas aromáticas correspondentes, resultantes da ação da enzima PpAzoR. Também se verificou, em alguns casos, que a toxicidade dos produtos resultantes da ação da CotA-lacase apresentavam uma menor toxicidade que as aminas. Por esta razão, as aminas geradas pela clivagem da ligação azo foram usadas como substrato para a CotA-lacase.

1.5.2. Lacases

As lacases (benzenediol oxigénio oxidoreductase, EC 1.10.3.2) são oxidoreductases com um grande potencial em aplicações industriais e ambientais (Sousa *et al.*, 2013; Pereira *et al.*, 2009a). Estas enzimas pertencem à grande família das oxidases de multi-cobre (MCO), e catalisam a oxidação de vários compostos aromáticos, nomeadamente fenólicos, e inorgânicos, com a redução simultânea de oxigénio a água, em soluções aquosas, resultando em reações “amigas do ambiente “ e de baixo custo (Khan *et al.*, 2013; Sousa *et al.*, 2013; Solís *et al.*, 2012; Pereira *et al.*, 2009a).

As enzimas deste grupo foram descritas, pela primeira vez, por Yoshida, em 1883, após observação do rápido endurecimento da resina de *Rhus vernificera*, uma árvore que prolifera no Japão, em contacto com o ar. Dez anos depois, após ser isolada e purificada, a enzima foi denominada lacase. Já foram identificadas lacases em várias plantas, vegetais, frutos e em vários géneros de insetos, como *Bombyx*, *Drosophila*, *Musca*, *Lucilia* entre outros. Também já foram identificadas lacases em vários fungos, como *Basidiomycetes* e bactérias como *Bacillus subtilis* (Fu *et al.*, 2013; Mandhavi & Lele, 2009).

As lacases são proteínas com quatro átomos de cobre presentes nos centros catalíticos das lacases: T1 é um centro ativo mononuclear envolvido na oxidação do substrato e é responsável pela cor azul da enzima; já T2 e T3 formam um centro trinuclear envolvido na redução do oxigénio a água. Desta forma, o cobre do centro ativo T1 oxida o substrato e transfere esses eletrões para os centros ativos T2 e T3, que irão ser usados para reduzir o oxigénio a água (Grover *et al.*, 2013; Pereira *et al.*, 2009b; Enguita *et al.*, 2004).

Na **Figura 1-9** está representado o mecanismo enzimático destas enzimas, para substratos fenólicos:

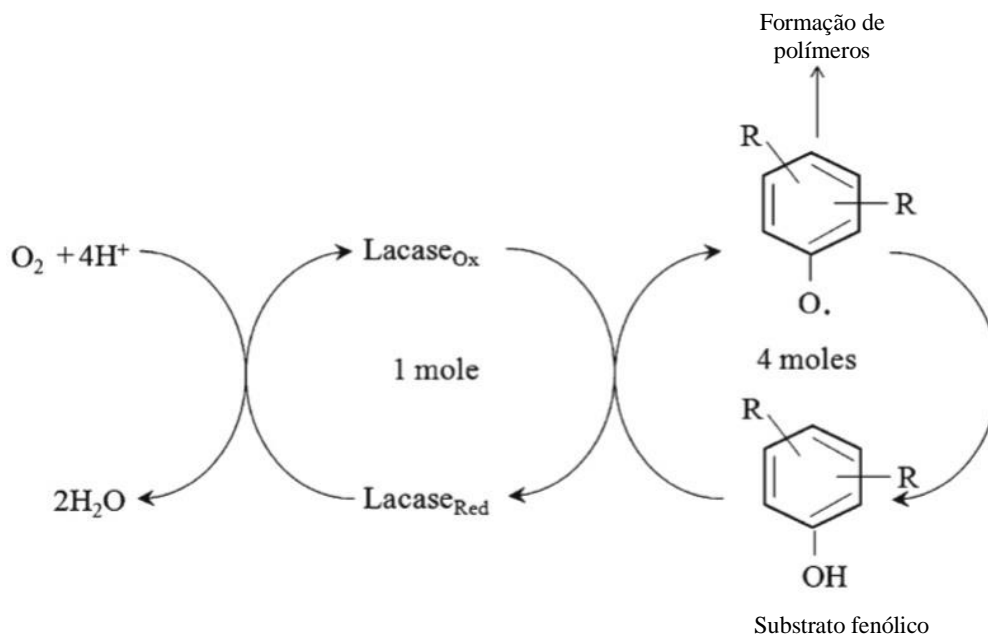


Figura 1-9. Mecanismo enzimático da lacase (adaptado de Grover *et al.*, 2013).

Usando os domínios ativos, a lacase oxida os substratos, captando os elétrons e usando-os para a redução do oxigênio a água. Geralmente, as lacases reagem com substratos fenólicos, que perdem um elétron e um próton, formando radicais livres, que são estabilizados por ressonância. Estes radicais são depois envolvidos em acoplamentos covalentes, originando espécies poliméricas. Tipicamente, uma mole de lacase é oxidada pelo oxigênio e, por sua vez, oxida quatro moles do seu substrato fenólico, formando um radical fenoxil (Grover *et al.*, 2013; Sousa *et al.*, 2013; Cañas & Camarero, 2010).

Entre os compostos fenólicos, que já foram referidos como substratos das lacases, estas enzimas também oxidam lenhinas, fenóis metóxi-substituídos e aminas aromáticas. Também descoloram alguns corantes azo, sem que ocorra a clivagem direta da ligação azo, através de um mecanismo não específico, que envolve a formação de radicais, resultando em dímeros e oligómeros evitando-se, assim, a formação de aminas aromáticas potencialmente tóxicas (Solís *et al.*, 2012; Pereira *et al.*, 2009; Zhukhlistova *et al.*, 2008; Hullo *et al.*, 2001).

As lacases possuem um grande potencial em processos biotecnológicos principalmente devido aos processos de oxidação não específicos, à não necessidade de uso de cofatores, sendo que o oxigênio é o aceitador de elétrons, e por serem bastante estáveis (Khan *et al.*, 2013; Solís *et al.*, 2012; Pereira *et al.*, 2009a).

As lacases são usadas em várias indústrias. Na indústria alimentar, são usadas na eliminação de compostos fenólicos indesejáveis, responsáveis pela cor acastanhada e turbidez dos sumos de

fruta, cerveja e vinho. Na indústria do papel, em processos de remoção de lenhina; na indústria têxtil, são usadas em processos de branqueamento e até em síntese de corantes; na nanobiotecnologia, estas enzimas têm sido estudadas como biossensores de compostos fenólicos, como morfina e codeína. As lacases também são usadas na biorremediação de solos, nomeadamente na degradação de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, como o 2,4,6-trinitrotolueno (TNT), em síntese química e em cosméticos (Couto & Herrera, 2006).

1.5.2.1. Lacase de *Bacillus subtilis* (CotA-lacase)

Os endósporos bacterianos são estruturas de resistência contra fenómenos físico-químicos extremos, como raios-UV, calor ou agentes oxidantes. A bactéria *Bacillus subtilis* é produtora de endósporos, que estão envolvidos por uma *capa* (“coat”) rica em proteínas, que também influencia a germinação dos esporos. Esta *capa* é constituída por mais de trinta polipéptidos, cuja massa molecular varia entre os 5 e os 65 kDa. Uma das enzimas que aparece associada à *capa* é a enzima CotA, uma proteína monomérica com peso molecular de ~65 kDa (Enguita *et al.*, 2002; Martins *et al.*, 2002).

A estrutura molecular da CotA é semelhante à das lacases, enzimas pertencentes à família das MCO (Hullo *et al.*, 2001). A estrutura da enzima é composta por três domínios e inclui um centro de cobre mononuclear no domínio T1 e um centro trinuclear entre os domínios T2 e T3. Esta enzima manifesta uma cor azul a um comprimento de onda de 600 nm (Silva *et al.*, 2012; Martins *et al.*, 2002).

Na **Figura 1-10** estão representados os três domínios da CotA-lacase, a sua estrutura tridimensional e a enzima cristalizada:

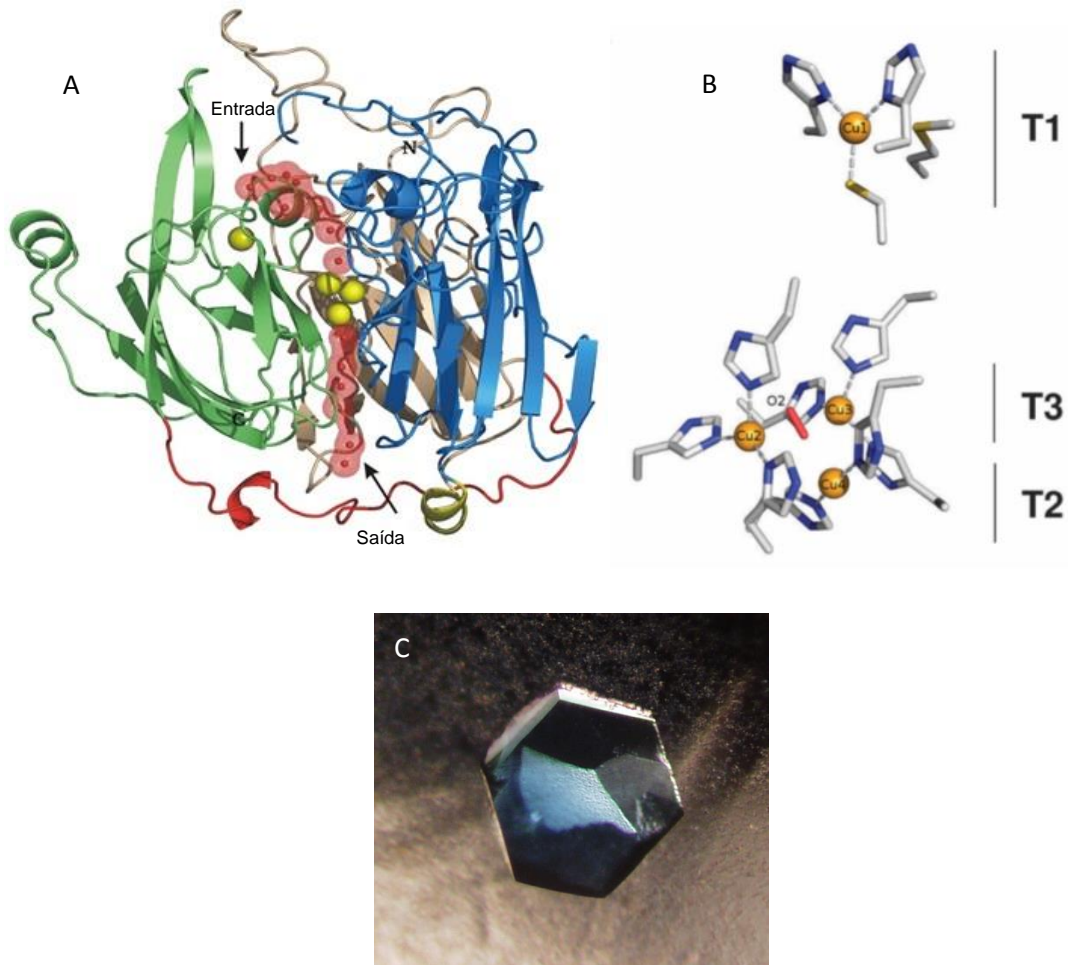


Figura 1-10. (a) Estrutura tridimensional da CotA-lacase. Os terminais C e N estão representados, bem como os locais de entrada do substrato e saída do produto. Os centros de cobre estão representados a amarelo (adaptado de Durão *et al.*, 2006); (b) Organização estrutural do centro catalítico da CotA-lacase (Durão *et al.*, 2006); (c) Cristal de CotA-lacase. A cor azul é característica da presença de cobre no domínio T1 (Martins *et al.*, 2002).

A CotA-lacase é extremamente termoestável, manifestando atividade a uma temperatura de 80 °C durante 2-4 horas; já a lacase do fungo *Chaetomium thermophilum* mantém a atividade durante 8 minutos, à mesma temperatura (Zhukhlistova *et al.*, 2008; Martins *et al.*, 2002). Uma outra vantagem do uso da CotA-lacase é o facto de esta não necessitar de mediadores redox para a descoloração de uma grande variedade de corantes estruturalmente diferentes e apresentar uma atividade ótima em pH alcalino, o que já não acontece com lacases de origem fúngica (Pereira *et al.*, 2009a).

1.6. Objetivos do trabalho

Como os corantes azo são recalcitrantes à degradação, os métodos físico-químicos e biológicos tradicionais não são suficientes, pelo que é necessário investir na Investigação e Desenvolvimento de novos tratamentos.

Vários estudos na área de tratamento de efluentes corados revelam que as azoredutases são eficazes na clivagem da ligação azo dos corantes, resultando em produtos sem cor, nomeadamente nas aminas correspondentes (Prasad & Aikat, 2014; Mendes *et al.*, 2011a; Mendes *et al.*, 2011b; Macwana *et al.*, 2010).

Como foi sendo referido ao longo da Introdução, muitas das aminas aromáticas resultantes da redução da ligação azo são tóxicas e carcinogénicas. A remoção de cor dos efluentes têxteis é importante, mas não se deve descurar o facto de esta descoloração originar efluentes ainda mais tóxicos que os corantes originais, particularmente aminas aromáticas recalcitrantes. Desta forma, conhecer com pormenor os produtos resultantes da biodegradação de corantes sintéticos é importante na avaliação da viabilidade do processo.

Estudos anteriores nos laboratórios envolvidos, do ITQB e do ISEL, revelaram que a toxicidade dos produtos resultantes da transformação de corantes por ação da PpAzoR (aminas aromáticas) era, por vezes superior à apresentada pelos corantes iniciais, e que a ação da CotA-lacase sobre estes reduzia significativamente o nível de toxicidade (Mendes *et al.*, 2011a). Então, um sistema baseado na ação sequencial entre estas duas enzimas foi considerado promissor para a degradação e simultânea desintoxicação de misturas com vários corantes azo.

Neste trabalho as aminas aromáticas, geradas pela degradação dos corantes azo pela enzima PpAzoR, usadas como substrato para a CotA-lacase, foram identificadas, assim como os produtos resultantes da ação da CotA-lacase. Os produtos de ambas as reações foram analisados por técnicas de HPLC e ¹H RMN. Desta forma, tornou-se possível identificar os produtos gerados pela ação de ambas as enzimas, entender melhor o mecanismo de atuação das mesmas, e avaliar o potencial de valorização dos efluentes corados para a produção de compostos aromáticos de elevado valor acrescentado.

2. Materiais e Métodos

2.1. Reagentes químicos

Todos os reagentes químicos usados estão disponíveis comercialmente e são de elevada pureza.

Os corantes usados (**Tabela 2-1**) foram adquiridos à Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), Merck (Darmstadt, Alemanha), Town Ends (Leeds, Reino Unido), DyStar Textilfarben (Alemanha), Yorkshire Europe (Bélgica) e Bezema AG (Montlingen, Suíça). No caso de a pureza não ser referida pelo fornecedor, assumiu-se um grau de pureza de 100 %.

Tabela 2-1. Nomes genéricos dos corantes e conteúdo de corante.

| Corante | Conteúdo de corante (%) |
|------------------------------------|-------------------------|
| <i>Acid red 266 (AR266)</i> | >30 |
| <i>Direct black 38 (DB38)</i> | 50 |
| <i>Direct red 80 (DR80)</i> | NE ^a |
| <i>Mordant black 3 (MB3)</i> | 30 |
| <i>Mordant black 9 (MB9)</i> | 60-85 |
| <i>Mordant black 17 (MB17)</i> | 50 |
| <i>Reactive black 5 (RB5)</i> | 55 |
| <i>Reactive yellow 145 (RY145)</i> | >50 |

^a Não especificado pelo fabricante

O meio LB, cuja composição é de triptona (10 g/L), NaCl (10 g/L) e extrato de levedura (5 g/L) a pH 7.2, foi preparado e esterilizado por autoclave.

2.2. Transformação das células hospedeiras

Neste trabalho, foram usados dois plasmídeos, já existentes, que codificam para duas proteínas diferentes, a PpAzoR (plasmídeo pLP-1; Mendes *et al.*, 2011b) e a CotA-lacase (plasmídeo pLOM10; Martins *et al.*, 2002).

As células de *E. coli* Tuner (DE3; Novagen) foram transformadas com os plasmídeos acima referidos, em que os genes de interesse são expressos sob o controlo do promotor T7lac, por choque térmico. Para tal, adicionaram-se 5 µL de DNA plasmídico a uma alíquota contendo 150 µL de células competentes de *E. coli* Tuner previamente preparadas em CaCl₂ e conservadas em glicerol a -80 °C. Incubou-se esta mistura em

gelo durante 30 min. Após este período, a mistura foi incubada a 42 °C durante 90 segundos e, de seguida, foi colocada novamente em gelo durante 2 minutos. Em seguida, adicionaram-se 600 µL de meio LB e procedeu-se à agitação da mistura, a 37 °C, durante uma hora. Por fim, centrifugou-se esta mistura, durante um minuto, a 13 600 rpm, retiraram-se 600 µL de sobrenadante, ressuspenderam-se as células no restante sobrenadante e plaqueou-se numa placa de agar com LB suplementado com ampicilina (100 µg/mL). Finalmente incubaram-se as placas a 37 °C, durante a noite.

A estirpe LOM528, para a superprodução de PpAzoR, foi construída por introdução do plasmídeo pLP-1 em *E. coli* Tuner (DE3; Mendes *et al.*, 2011b). Já a estirpe AH3517, para a superprodução de CotA-lacase, foi construída por introdução do plasmídeo pLOM10 em *E. coli* Tuner (DE3; Martins *et al.*, 2002).

Foram preparados pré-inóculos contendo meio LB. O meio foi suplementado com ampicilina (100 µg/L). As estirpes recombinantes *E.coli* LOM528 e *E.coli* AH3517 cresceram neste meio, numa incubadora de agitação orbital a 150 rpm, 37 °C, durante a noite.

2.3. Crescimento de células recombinantes e superprodução das enzimas de interesse

Os pré-inóculos dos crescimentos celulares foram realizados em Erlenmeyers de 500 mL contendo 100 mL de meio LB suplementado com ampicilina (100 µg/mL). Colocaram-se os Erlenmeyers num agitador orbital a 37 °C durante a noite. Os crescimentos em larga escala foram realizados em Erlenmeyers de 5 L contendo, cada um, 1 L de meio LB suplementado com ampicilina (100 µg/mL) a 37 °C, com uma agitação de 150 rpm. O crescimento celular foi monitorizado através de medidas de densidade ótica a 600 nm (DO_{600nm}), sendo a DO_{600nm} inicial de 0.05. Quando a DO_{600nm} atingiu 0.60, na superprodução da proteína recombinante PpAzoR, foi adicionado IPTG (0.1 mM), a temperatura baixou para 25 °C e a agitação manteve-se constante. A incubação continuou por mais 5 horas.

Na superprodução da proteína recombinante CotA-lacase, quando a DO_{600nm} atingiu 0.60, foi adicionado IPTG (0.1 mM) e $CuCl_2$ (0.25 mM), a temperatura baixou para 25 °C, mantendo-se a agitação constante por mais 5 horas. A alteração de condições aeróbias (agitação) para condições microaeróbias (estáticas), no decorrer do crescimento foi utilizada para potenciar a incorporação de cobre (Durão *et al.*, 2008).

As células foram recolhidas por centrifugação (8 000 rpm, 10 minutos, 4 °C). O sobrenadante foi removido e as células lavadas com NaCl 0.9 % (m/v). Este procedimento foi repetido três vezes. Por fim, as células foram armazenadas a -20 °C.

Por definição, o tempo de duplicação (t_d) de uma estirpe bacteriana é constante em condições de crescimento fixas, pelo que a velocidade de crescimento, definida pelo aumento da densidade populacional por unidade de tempo, aumenta com o número de gerações (Côrte-Real *et al.*, 2010). Apesar de, numa fase inicial, a velocidade de crescimento poder apresentar um aumento lento, numa chamada fase de latência, numa fase posterior, este aumento revela-se bastante acentuado e ocorre exponencialmente (Côrte-Real *et al.*, 2010).

Com base no conceito de t_d , é possível deduzir a equação básica teórica do crescimento exponencial, de acordo com a **Equação 2-1**:

$$N_t = N_0 \cdot 2^n \quad \text{Equação 2-1}$$

em que N_0 é a densidade populacional inicial, N_t é a densidade populacional ao fim de um dado instante e n é o número de gerações (Côrte-Real *et al.*, 2010).

A densidade populacional varia com o tempo (dN/dt), ou seja, a velocidade de crescimento é proporcional a N (**Equação 2-2**):

$$\frac{dN_t}{dt} = \mu \cdot N_t \quad \text{Equação 2-2}$$

μ é uma constante de proporcionalidade definida por taxa específica de crescimento da população microbiana (Côrte-Real *et al.*, 2010). Através da integração da equação anterior, vem a **Equação 2-3**:

$$N_t = N_0 \cdot e^{\mu(t-t_0)} \quad \text{Equação 2-3}$$

Dada a maior facilidade de ajuste de dados experimentais a uma reta, a possibilidade de linearizar uma função exponencial, por aplicação de logaritmos naturais a ambos os membros da equação é, na prática, muito utilizada na determinação do valor de μ .

Relativamente à curva de crescimento, à fase de latência segue-se uma fase de aceleração associada a um aumento de μ até este atingir um valor que se mantém constante na fase exponencial (Côrte-Real *et al.*, 2010). Então μ pode ser estimado a partir do declive da reta (**Equação 2-4**):

$$\ln N_t = \ln N_0 + \mu(t - t_0) \quad \text{Equação 2-4}$$

Substituindo $(t-t_0)$ por t_d , $N_t=2.N_0$ (Equação 2-5):

$$t_d = \frac{\ln 2}{\mu} \quad \text{Equação 2-5}$$

2.4. Preparação dos extratos celulares

Para a extração do conteúdo intracelular, ressuspenderam-se as células em tampão Tris-HCl 20 mM, pH 7.6, ao qual se adicionou uma mistura de inibidores de proteases, antipainá e leupeptina (2 µg/mL de extrato) e ainda DNase I (10 µL/mL de extrato) e MgCl₂ (5 mM). Posteriormente as células foram submetidas uma pressão de 900 psi utilizando uma Prensa Francesa (Thermo IEC), num processo repetido 3 vezes, permitindo assim a ruptura celular. Por último, centrifugaram-se as células a 18 000 rpm, a 4°C durante 3 horas e o sobrenadante (extrato celular) foi usado para a purificação das proteínas de interesse.

2.5. Determinação da proteína total

A determinação da quantidade de proteína do extrato celular foi efetuada pelo método de Bradford (Bradford, 1976), usando o corante Comassie Brilliant Blue G-250 e albumina de soro bovino (BSA) como padrão.

Foi construída uma curva de calibração recorrendo a concentrações conhecidas de BSA: 0, 0.05, 0.1, 0.15, 0.20, 0.25, 0.30, 0.35, 0.40, 0.45, 0.50, 0.55 e 0.60 mg/mL. A 1 mL de reagente de Bradford (100 mg de Comassie Brilliant Blue G-250 dissolvido em etanol a 45 %, 100 mL de ácido ortofosfórico e 750 mL de água) foram adicionados 20 µL da amostra e, após 10 minutos, a absorvância foi lida a 595 nm, num espectrofotómetro Novaspec III (Amersham Biosciences). Este procedimento foi realizado em triplicado para cada uma das amostras.

2.6. Eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes

A electroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (*Sodium Dodecyl sulfate – PolyAcrylamide Gel Electrophoresis* (SDS-PAGE)) é uma técnica amplamente utilizada na separação de misturas de proteínas com base na sua massa

molecular. O SDS é um detergente aniônico utilizado para assegurar que todas as proteínas têm a mesma carga.

A electroforese é realizada em gel com duas composições: o gel de concentração e o gel de resolução. No gel de concentração, a matriz de poliacrilamida formada é mais larga permitindo que as amostras fiquem alinhadas no final do poço, após a corrente ser aplicada, independentemente do seu peso molecular. No caso do gel de resolução, este forma uma matriz mais pequena, que vai permitir a separação das proteínas com base nas suas massas moleculares. Neste trabalho, a concentração de acrilamida usada no gel de resolução foi de 12.5 %.

Para a preparação de quatro géis de concentração, juntaram-se 3 mL de água, 1.25 mL de *Upper Tris* pH 6.8, 800 µL de acrilamida 30%, 50 µL de SDS (10%), 50 µL de persulfato de amónio (10%) e 5 µL de TEMED. Para os géis de resolução, juntaram-se 6.10 mL de água, 3.80 mL de *Lower Tris* pH 8.8, 6.20 mL de acrilamida (40%), 150 µL de SDS (10%), 150 µL de persulfato de amónio (10%) e 10 µL de TEMED.

Para preparar 200 mL de tampão *Upper Tris* pesaram-se 36.34 g de Tris-base, 0.80 g de SDS, e dissolveu-se em 150 mL de água. Fez-se o acerto do pH para 8.8 e perpez-se o volume para 200 mL de água. No caso do tampão *Lower Tris*, para preparar 200 mL foram pesadas 12.11 g de Tris-base, 0.80 g de SDS e dissolveu-se em 150 mL de água. Fez-se o acerto do pH para 8.8 e perpez-se o restante volume para 200 mL de água.

Foram realizados géis SDS-PAGE para visualizar a presença das proteínas superproduzidas em extratos brutos e monitorizar os passos de purificação. Calculou-se a quantidade de extrato proteico necessário de forma a colocar entre 10 a 20 µg de proteína total em cada poço.

Antes da aplicação das amostras no gel, foi adicionado tampão de aplicação (3 mL de Tris HCl 1 M, pH 6.8, 700 µL de 2-mercaptoetanol, 5 mL de glicerol, 1 g de SDS, 0.05 g de azul de bromofenol e 1.3 mL de água destilada) e as amostras foram fervidas durante 10 minutos. O gel foi inserido numa tina de electroforese contendo tampão (72.1 g de glicina, 15 g de Tris, 5 g de SDS e 1 L de água destilada) e submeteu-se a uma voltagem de 220 V durante 45 minutos. De seguida, corou-se o gel com uma solução de coloração contendo 2.50 g de Comassie Brilliant Blue R-250, 250 mL de etanol, 100 mL de ácido acético glacial e 800 mL de água. Uma vez corado, o gel foi mergulhado numa solução de descoloração contendo 300 mL de metanol, 100 mL de ácido acético glacial e 600 mL de água destilada, de modo a remover o excesso de corante e permitir a visualização das bandas de proteína, e sua comparação com o marcador, uma mistura de proteínas com massa molecular conhecida: xilanase U4 – 96 kDa; albumina de soro bovino – 66 kDa; fosfomanose isomerase – 48 kDa; celulase

5A – 40 kDa; celulase M9 – 32 kDa; família 4 das carbohidrato-esterases – 26 kDa; domínio M6 da ligação do xiloglucano – 18.5 kDa.

2.7. Purificação das proteínas recombinantes

As proteínas recombinantes foram purificadas com utilizando cromatografia líquida de elevada pressão (FPLC). Num primeiro passo, é usada a cromatografia de troca iónica, em que a separação se baseia nas cargas: troca catiónica ou troca aniónica.

As colunas Q-Sepharose e Mono-Q foram usadas para troca aniónica contendo, na sua composição, catiões ($-\text{CH}_2-\text{N}^+-\text{CH}_3$). Já a SP-Sepharose foi usada para troca catiónica contendo, na sua composição, aniões ($\text{CH}_2-\text{SO}_3^-$).

Num segundo passo, foi realizada uma cromatografia de filtração em gel, cuja separação é baseada nas diferentes massas moleculares das moléculas. Para tal, usou-se uma coluna Superdex-75. O objetivo deste passo é remover contaminantes finais.

Todos os passos cromatográficos foram realizados à temperatura ambiente utilizando um AKTA Purifier (GE Healthcare, BioSciences).

2.7.1. Purificação da PpAzoR recombinante

A coluna Q-Sepharose (GE Healthcare Bio-Sciences) foi previamente equilibrada com tampão Tris-HCl 20 mM, pH 7.6, com um fluxo de 3 mL/min. Seguidamente colocou-se a amostra, previamente filtrada usando um filtro de 0.22 μm (Millipore) e todas as proteínas que não interagiram com a coluna foram eluídas. Após a fase de lavagem, procedeu-se à fase de eluição da enzima de interesse, com um gradiente linear crescente, em dois passos, de NaCl (0-0.50 e 0.50-1 M), no mesmo tampão. Juntaram-se as frações de cor amarela, característica da proteína PpAzoR, e concentraram-se antes de serem aplicadas na coluna Mono-QTM 5/50 (GE Healthcare Bio-Sciences), previamente equilibrada com tampão Tris-HCl 20 mM pH 7.6. Nesta coluna, seguiu-se o protocolo de purificação da coluna anterior. Finalmente, as frações recolhidas da coluna anterior foram introduzidas, já concentradas, na coluna SuperdexTM 75 HR 16/60 (GE Healthcare, Bio-Sciences), previamente equilibrada com tampão Tris-HCl 20 mM pH 7.6, contendo NaCl (0.20 M). Juntaram-se as frações com PpAzoR e armazenaram-se em alíquotas a -20 °C até serem usadas.

2.7.2. Purificação da CotA-lacase recombinante

A coluna SP-Sepharose (GE Healthcare Bio-Sciences) foi previamente equilibrada com tampão Tris-HCl 20 mM, pH 7.6, com um fluxo de 3 mL/min. Seguidamente colocou-se a amostra, previamente filtrada usando um filtro de 0.22 µm (Millipore) e todas as proteínas que não adsorveram à coluna foram eluídas. Após a fase de lavagem, procedeu-se à fase de eluição da enzima de interesse, com um gradiente linear crescente, em dois passos, de NaCl (0-0.50 e 0.5-1 M), no mesmo tampão.

Juntaram-se as frações que apresentavam uma cor azul, característica da enzima CotA-lacase, e concentraram-se as mesmas antes de serem aplicadas na coluna Superdex™ 75 HR 16/60 (GE Healthcare Bio-Sciences), previamente equilibrada com tampão Tris-HCl 20 mM pH 7.6, contendo NaCl (0.20 M). Juntaram-se as frações com CotA-lacase e armazenaram-se em alíquotas a -20 °C até serem usadas.

2.8. Espectro UV-Vis da PpAzoR recombinante e determinação do coeficiente de extinção molar

O espectro de UV-Vis da enzima PpAzoR foi efetuado num espectrofotómetro Nicolet Evolution 300 (Thermo Industries), utilizando células de quartzo de duas faces com 1cm de percurso ótico, à temperatura ambiente. O coeficiente de extinção molecular da enzima PpAzoR foi determinado usando a **Equação 2-6**:

$$\varepsilon_{455} = \frac{\varepsilon_{FMN} \times A_{455}}{A_{445}} \quad \text{Equação 2-6}$$

Onde A_{455} é a absorvância da enzima a 455 nm, A_{445} corresponde à absorvância do FMN livre a 445 nm, e ε_{FMN} corresponde ao coeficiente de extinção molecular do FMN livre, a 445 nm ($12\ 500\ \text{M}^{-1}\ \text{cm}^{-1}$). A concentração de proteína purificada foi então determinada através do valor estimado de ε_{455} (Mendes *et al.*, 2011b). A amostra usada foi uma alíquota de proteína pura. O ensaio foi repetido, pelo menos, em triplicado.

2.9. Determinação da absortividade molar dos corantes

Foram preparadas soluções-stock dos corantes estudados (5 mM) em tampão fosfatos (20 mM) pH 7.0. Em seguida, foram feitas várias diluições, a partir das soluções-stock, que variavam entre 0 e 500 µM, e foram colocadas numa placa de 96 poços. A absorvância das várias soluções foi lida entre 300 e 700 nm, no leitor de placas e, a partir

destes valores, foi determinado o coeficiente de absorvidade molar dos corantes. Os ensaios foram realizados, pelo menos, em triplicado.

2.10. Determinação da atividade enzimática

Tipicamente, as atividades enzimáticas foram monitorizadas usando um espectrofotômetro Nicolet Evolution 300 (Thermo Industries, Madison, USA) ou um leitor Synergy2 microplate reader (BioTek, Vermont, USA). Todos os ensaios enzimáticos foram realizados, pelo menos, em triplicado.

A atividade enzimática da PpAzoR em extratos brutos, provenientes dos crescimentos em pequena escala não induzidos (controlo) e induzidos com IPTG, foi determinada seguindo-se a reação de oxidação, a 30 °C, do NADPH (0.25 mM), em tampão fosfatos 20 mM pH 7.0, usando AQS (0.10 mM) como substrato. As reações foram iniciadas com a adição dos extratos celulares tendo a oxidação do NADPH sido monitorizada a 340 nm ($\epsilon_{340\text{nm}} = 6\,220\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

Já a atividade enzimática da CotA-lacase em extratos brutos, provenientes dos crescimentos em pequena escala não induzidos (controlo) e induzidos com IPTG, foi determinada seguindo-se a reação de oxidação, a 37 °C, do ABTS (1 mM), em tampão acetato de sódio 100 mM pH 4.3. As reações foram iniciadas com a adição dos extratos celulares, tendo a oxidação do ABTS sido monitorizada ao comprimento de onda de 420 nm ($\epsilon_{420\text{nm}} = 36\,000\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). Uma unidade (U) de atividade enzimática é definida como sendo a quantidade de enzima necessária para reduzir 1 μmol de substrato por minuto (Mendes *et al.*, 2011b).

As velocidades de descoloração enzimática dos corantes **AR266**, **DB38**, **DR80**, **MB3**, **MB9**, **MB17**, **RB5** e **RY145**, por ação da enzima PpAzoR, foram determinadas através de reações enzimáticas em pequena escala, sendo que a metodologia usada para a preparação das mesmas encontra-se a seguir descrita. Foi preparada uma solução, com a seguinte composição: NADPH (0.25 mM) e corante (2 mM) em tampão fosfatos (0.1M) pH 7.0. Num outro frasco foi adicionada somente PpAzoR purificada. Para garantir as condições de anaerobiose, ambos os frascos foram selados com rolhas de borracha, fechados com cápsulas metálicas e desarejados, borbulhando árgon nos mesmos. As reações foram iniciadas através da injeção da enzima PpAzoR nas misturas reacionais (contendo apenas NADPH e corante em tampão fosfatos), perfazendo um volume final de 2 mL. Com o auxílio de uma seringa, foram retiradas amostras das reações, a intervalos de tempo definidos, e diluídas em tampão fosfatos, para garantir que os valores lidos se encontravam dentro da gama de aplicação da lei de Lambert-Beer. A

absorvância foi lida ao comprimento de onda de absorção máxima de cada corante em estudo.

A velocidade máxima das reações foi determinada através destes dados, que demonstram um decréscimo na absorvância com o tempo. A taxa de descoloração foi calculada através da **Equação 2-7**:

$$\text{Porcentagem de descoloração} = \frac{A_0 - A}{A_0} \times 100 \quad \text{Equação 2-7}$$

Onde A_0 corresponde à absorvância inicial e A corresponde à absorvância registada ao tempo t (Prasad & Aikat, 2014).

2.11. Preparação das reações em larga escala

As reações foram preparadas da mesma forma que foi descrito em **2.10.**, sendo que o volume reacional final foi de 50 mL.

Numa primeira etapa, a enzima PpAzoR foi adicionada ao corante. Em seguida, os frascos foram colocados em banho-maria, a 30 °C e a 90 rpm, durante 24 horas.

Posteriormente foram recolhidos 25 mL de amostra das misturas reacionais e congeladas a -80 °C. Como as reações foram sequenciais, os restantes 25 mL foram transferidos para Erlenmeyers de 100 mL, adicionou-se CotA-lacase, aumentou-se a temperatura para 37 °C e a agitação para 150 rpm, durante 24 horas. Finalmente, as amostras das reações foram congeladas a -80 °C para posterior análise.

Foram também preparados controlos das reações, sendo a sua composição semelhante à composição das misturas reacionais, excetuando a presença de enzima: o controlo da reação catalisada pela enzima PpAzoR contém, na sua composição, NADPH (0.25 mM) e corante (2 mM), em tampão fosfatos pH 7.0, perfazendo um volume final de 50 mL. Este controlo foi, tal como a mistura reacional contendo PpAzoR, colocado em banho-maria a 30 °C e a 90 rpm, durante 24 horas.

Posteriormente foram recolhidos 25 mL de amostra deste controlo, sendo que os restantes 25 mL foram transferidos para Erlenmeyers de 100 mL e, tal como na reação catalisada pela enzima CotA-lacase, aumentou-se a temperatura para 37 °C e a agitação para 150 rpm, durante 24 horas. Finalmente, as amostras deste controlo foram congeladas a -80 °C para posterior análise.

Foi necessário realizar mais estudos, de forma a elucidar alguns resultados obtidos ao longo do trabalho. Para tal, introduziram-se dois novos corantes: *Methyl Red (MR)* e

Sudan Orange G (SOG). Para estes corantes, foi realizada apenas a reação da sua degradação por ação da enzima PpAzoR.

O procedimento usado para a preparação das misturas reacionais em larga escala dos foi semelhante ao descrito neste ponto, com ligeiras modificações, nomeadamente na concentração de corante usada (4 mM, ao invés dos 2 mM), bem como no volume reacional (50 mL, ao invés de 25 mL).

2.12. Identificação dos produtos das reações de descoloração dos corantes azo e de degradação das aminas aromáticas correspondentes por HPLC

A análise dos produtos das reações enzimáticas foi realizada, numa primeira fase, por HPLC (Merck Hitachi LaChrom Elite), utilizando uma coluna de fase reversa C-18 LichroCART®250-4 (Purospher®STAR RP-18e (5 µM; Merck, Darmstad, Alemanha).

As amostras foram centrifugadas a 13 600 rpm, durante 10 minutos. Em seguida, foram eluídas isocraticamente a um caudal de 0.20 mL/min. A fase móvel era constituída por tampão fosfatos (25 mM) pH 7.5 e acetonitrilo (40:60, v/v). O comprimento de onda de deteção dos sinais correspondia ao comprimento de onda de absorção máximo do corante estudado.

2.13. Identificação dos produtos das reações de descoloração dos corantes azo e de degradação das aminas aromáticas correspondentes por espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN)

As soluções foram concentradas num evaporador rotativo Büchi, modelo R210, e a remoção total de água garantida com a secagem em linha de vácuo. A remoção de fosfatos foi feita por lavagem do crude com metanol e evaporação em linha de vácuo, obtendo-se resíduos sólidos.

Os espectros de ressonância magnética nuclear foram obtidos num espectrómetro Bruker 400 MHz, Avance II+ Spectrometer à temperatura da *probe* (ca 295K), com o *software* Topspin 2.1, pertencente à rede portuguesa de ressonância magnética nuclear. Os desvios químicos (δ) de ^1H estão expressos em partes por milhão (ppm) e foram referenciados internamente utilizando as ressonâncias residuais dos solventes deuterados relativamente ao tetrametilsilano ($\delta = 0$ ppm). As constantes de acoplamento (J_{HH}) foram calculadas em Hz e as multiplicidades estão expressas segundo a nomenclatura: s (singleto), d (dupleto), dd (dupleto de dupleto), t (tripleto) e m (multiplete). As amostras

para RMN foram preparadas ao ar e à temperatura ambiente, utilizando os solventes deuterados ($\text{CD}_3\text{OD-}d_4$, $\text{DMSO-}d_6$ e D_2O) tal como adquiridos à *Euriso top* e utilizados em função da solubilidade das amostras.

3. Resultados e Discussão

3.1. Crescimento e superprodução das proteínas recombinantes num hospedeiro heterólogo

Após a transformação das estirpes de *E.coli* Tuner (DE3) com os plasmídeos pPL-1 e pLOM10, foram realizados dois crescimentos utilizando as estirpes recombinantes LOM528 (Figura 3-1) e AH3517 (Figura 3-2), sendo que um destes funcionou como controlo, sem adição de IPTG.

Verificou-se que os crescimentos de ambas as estirpes recombinantes são semelhantes, bem como os valores de taxa de crescimento e tempo de duplicação para cada estirpe (Tabela 3-1).

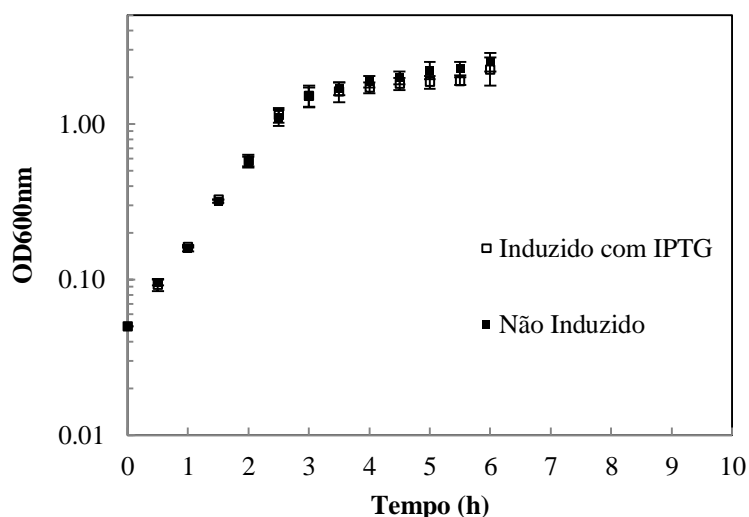


Figura 3-1. Curva de crescimento da estirpe recombinante LOM528, induzida com IPTG e não induzido

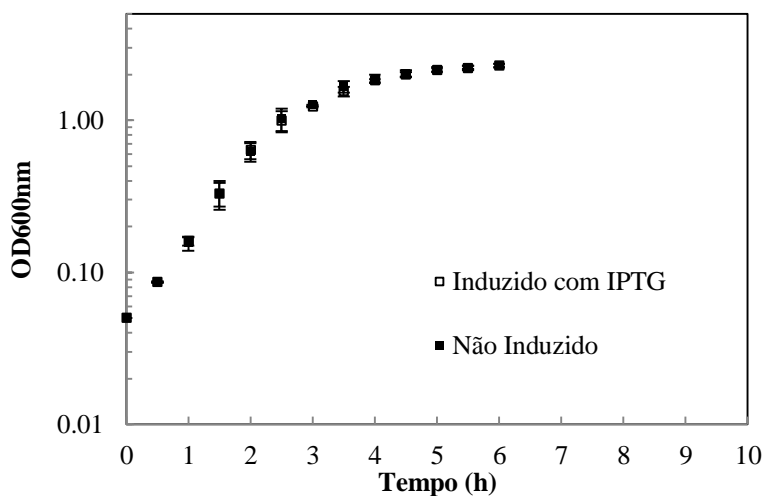


Figura 3-2. Curva de crescimento da estirpe recombinante AH3517, induzida com IPTG e não induzido.

Tabela 3-1. Parâmetros de crescimento das estirpes recombinantes LOM528 e AH3513.

| Estirpe recombinante | μ (h^{-1}) | t_d (h) |
|----------------------|--------------------|----------------|
| LOM528 | 1.2 ± 0.02 | 0.6 ± 0.01 |
| AH3517 | 1.2 ± 0.08 | 0.6 ± 0.03 |

Como se pode verificar, a taxa específica de crescimento e o tempo de duplicação são iguais para ambas as estirpes (Tabela 3-1).

A análise dos extratos celulares das *E. coli* recombinantes por SDS-PAGE revelou que a adição de IPTG ao meio de cultura resulta na acumulação de uma banda a ~23 kDa (Figura 3-3A), no caso da expressão do gene *ppAzoR*; relativamente à expressão do gene *cotA*, verifica-se a presença de uma banda de ~ 65 kDa (Figura 3-3B), concordante com resultados já publicados (Mendes *et al.*, 2011a; Martins *et al.*, 2002).

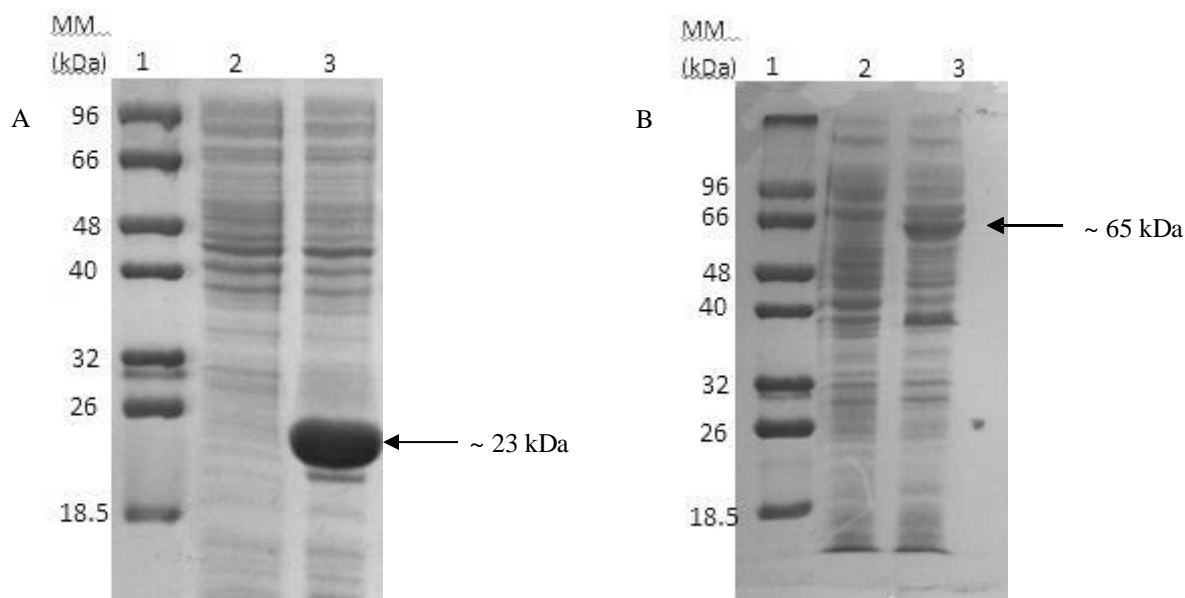


Figura 3-3. (a) Análise SDS/PAGE da superprodução de PpAzoR em *E. coli* Tuner (DE3): Marcador (1), sobrenadante do extrato celular, não induzido (2) e após indução com IPTG 0.1 mM (3); (b) - Análise SDS/PAGE da superprodução de CotA-lacase em *E. coli* Tuner (DE3): Marcador (1), sobrenadante do extrato celular, não induzido (2) e após indução com IPTG 0.1 mM (3).

Para estudar a atividade enzimática das proteínas recombinantes PpAzoR e CotA-lacase, nos extratos celulares, foram seguidas as reações de oxidação de NADPH e do ABTS, respetivamente. Verifica-se que a atividade da PpAzoR, no crescimento induzido, é cerca de 44 vezes maior que no crescimento não induzido (Tabela 3-2); relativamente à CotA-lacase, também se verifica a mesma situação, sendo a atividade enzimática, no crescimento induzido, cerca de 30 vezes maior que no crescimento não induzido (Tabela 3-3).

Tabela 3-2. Atividade da PpAzoR no extrato celular de *E. coli* LOM528.

| PpAzoR | [Proteína] (mg/mL) | Atividade Específica (nmol/min.mg) |
|--------------|--------------------|------------------------------------|
| Induzido | 18.9 | 716 ± 19 |
| Não Induzido | 33.6 | 16 ± 3 |

Tabela 3-3. Atividade da CotA-lacase no extrato celular de *E. coli* AH3517.

| CotA-lacase | [Proteína] (mg/mL) | Atividade Específica (nmol/min.mg) |
|--------------|--------------------|------------------------------------|
| Induzido | 14.5 | 9798 ± 83 |
| Não Induzido | 13.2 | 320 ± 1 |

3.2. Purificação das proteínas recombinantes

3.2.1. Purificação da PpAzoR recombinante

A PpAzoR recombinante foi purificada em três passos cromatográficos, com um rendimento de 14 % e um fator de purificação de 14 (Tabela 3-4).

O espectro de absorvância (Figura 3-4) mostra uma assinatura típica de uma flavoproteína, com dois picos de absorvância máxima a 377 e 455 nm, e um “ombro” a ~ 470 nm (Mendes *et al.*, 2011b).

Observando o gel de eletroforese de poliacrilamida (PAGE), verifica-se que se obtém a proteína pura, com uma única banda em ~ 23 kDa (Figura 3-5).

Tabela 3-4. Purificação da PpAzoR recombinante por cromatografia de troca iônica e exclusão molecular.

| | Proteína total (mg) | Atividade | | Rendimento (%) | Fator de Purificação |
|-----------------|---------------------|------------------------|-------------------|----------------|----------------------|
| | | Total ^a (U) | Específica (U/mg) | | |
| Extrato celular | 1,345.4 | 235 | 0.2 | 100 | 1.0 |
| Q-Sepharose | 332.4 | 143 | 0.4 | 60.7 | 2.0 |
| Mono-Q | 136.5 | 172 | 1.3 | 73.2 | 6.5 |
| Superdex | 13.2 | 32 | 2.5 | 13.8 | 12.5 |

^a As atividade específicas foram determinadas monitorizando a oxidação do NADPH.

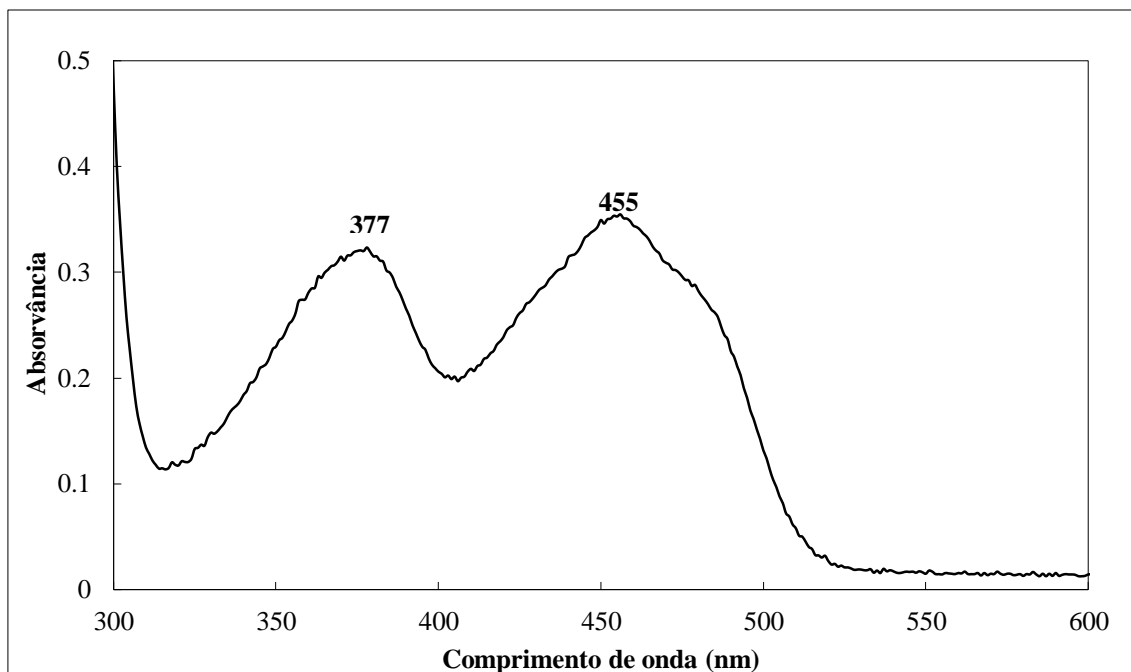


Figura 3-4. Espectro UV-Vis da PpAzoR recombinante.

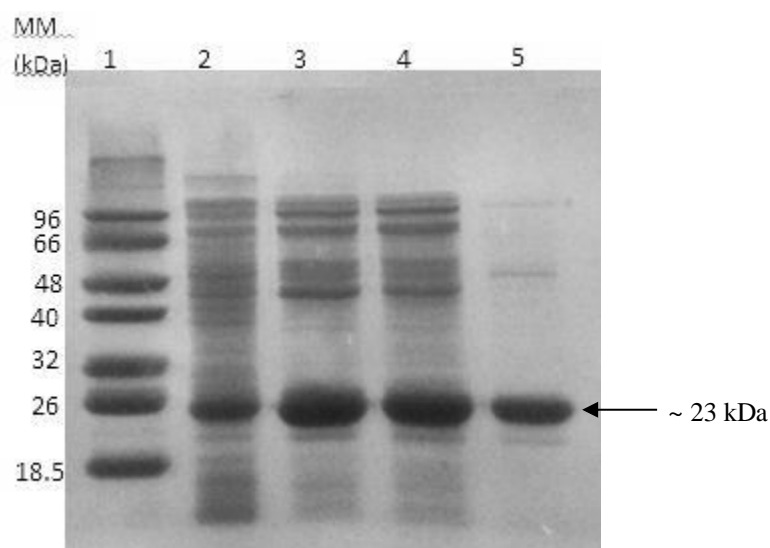


Figura 3- 5. Análise SDS/PAGE da purificação de PpAzoR recombinante: Marcador (1), extrato celular (2), frações com enzima PpAzoR após purificação com Q-Sepharose (3), Mono-Q (4) e Superdex 75 (5).

3.2.2. Purificação da CotA-lacase recombinante

A CotA-lacase recombinante foi purificada em apenas um passo cromatográfico, com um rendimento de 54 % e um fator de purificação de 7 (Tabela 3-5).

Observando o gel de SDS-PAGE, verifica-se que se obtém a proteína pura, com uma única banda em ~ 65 kDa (Figura 3-6).

Tabela 3-5. Purificação da CotA-lacase recombinante por cromatografia de troca iônica.

| | Proteína total (mg) | Atividade | | Rendimento (%) | Fator de Purificação |
|-----------------|---------------------|------------------------|-------------------|----------------|----------------------|
| | | Total (U) ^a | Específico (U/mg) | | |
| Extrato celular | 136 | 1544 | 11.4 | 100 | 1.0 |
| Sp-Sepharose | 11.2 | 837 | 74.8 | 54 | 6.6 |

^a As atividade específicas foram determinadas monitorizando a reação de oxidação do ABTS

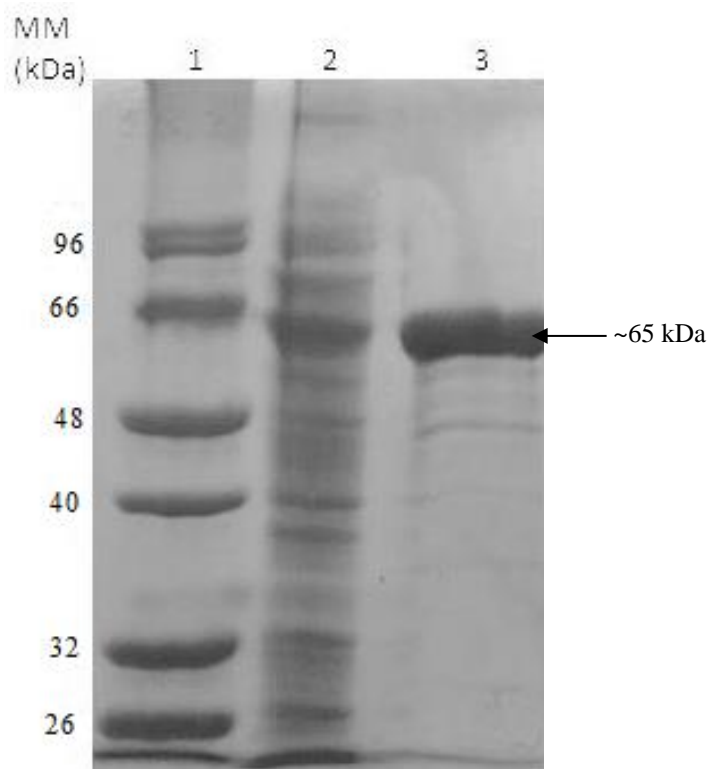


Figura 3-6. Análise SDS/PAGE da purificação de CotA-lacase recombinante: Marcador (1), extrato celular (2) e frações com enzima CotA-lacase após purificação com SP-Sepharose (3).

3.3. Reações enzimáticas de degradação de corantes

3.3.1. Determinação dos coeficientes de absorvidade molar dos corantes

Foi determinado o comprimento de onda de máximo de absorção, bem como o coeficiente de absorvidade molar dos corantes usados para este estudo (ver em anexo **Tabelas 7-1 a 7-8**).

As reações de descoloração dos corantes foram seguidas ao comprimento máximo de cada corante testado (**Tabela 3-6**).

Tabela 3-6. Comprimento de onda de absorção máxima do corante e coeficiente de absortividade molar em tampão fosfatos.

| Corante | λ_{max} (nm) | ϵ ($\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) |
|--------------|-----------------------------|--|
| <i>AR266</i> | 470 | 11 774 |
| <i>DB38</i> | 600 | 14 096 |
| <i>DR80</i> | 540 | 52 068 |
| <i>MB3</i> | 550 | 1 100 |
| <i>MB9</i> | 550 | 9 667 |
| <i>MB17</i> | 520 | 11 163 |
| <i>RB5</i> | 600 | 59 296 |
| <i>RY145</i> | 420 | 47 846 |

3.3.2. Reações em pequena escala

3.3.2.1. Ensaios enzimáticos com a PpAzoR recombinante

Nas reações enzimáticas foi usado NADPH como dador de eletrões, pois a enzima apresenta uma velocidade de redução mais rápida, comparativamente à utilização do NADH. Já a concentração usada foi a que garante que a reação não dependa da concentração do NADPH (10 vezes superior ao K_M da enzima), tal como a concentração de corante usada foi a que garante que a reação não seja limitada pela concentração destes substratos (Mendes *et al.*, 2011b).

A atividade para os corantes foi medida através da velocidade inicial de redução dos corantes azo, usando NADPH como dador de eletrões, observando-se uma diminuição na absorvância ao comprimento de onda máximo dos corantes testados, o que revela que estes estão a ser degradados pela enzima. Como exemplo, foi determinada a velocidade inicial do corante **MB3** (Figura 3-7), através de medidas de absorvância a 550 nm, por um ensaio descontínuo de atividade. Construindo a reta, determinou-se o declive e, assim, a velocidade da reação de degradação. Verifica-se que as velocidades são semelhantes para os corantes testados, com a enzima a apresentar uma velocidade de reação superior para o **MB3**, sendo a degradação do corante **RY145** a que ocorre a uma velocidade mais baixa (Tabela 3-7). Relativamente à percentagem de descoloração (Figura 3-8), apenas o corante **AR266** apresentou uma descoloração abaixo dos 90 %, enquanto os restantes corantes mostraram ser descolorados quase na totalidade.

Fez-se a comparação dos dados obtidos com os dados da literatura (Mendes *et al.*, 2011b), e verificou-se algumas alterações no que diz respeito às percentagens de descoloração e velocidades de reação obtidas (Tabela 3-7).

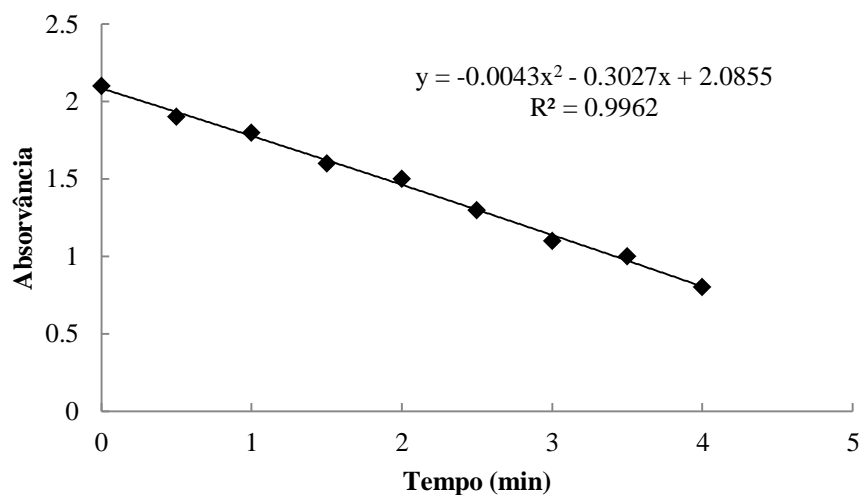


Figura 3-7. Curva representativa do progresso da reação de redução do corante MB3 pela PpAzoR.

Tabela 3-7. Velocidade da reação da degradação de corantes azo por ação da PpAzoR, usando NADPH (0.25 mM) como dador de elétrons. Percentagem de descoloração, após 24 horas de reação.

| Corante | V (U/mg) | | Descoloração (%) | |
|--------------|---------------|---|------------------|---|
| | Este trabalho | Referência (Mendes <i>et al.</i> , 2011b) | Este trabalho | Referência (Mendes <i>et al.</i> , 2011a) |
| AR266 | 0.2 ± 0.01 | 1.0 ± 0.1 | 72 ± 1 | ~ 70 |
| DB38 | 0.1 ± 0.01 | - | 94 ± 2 | ~ 95 |
| DR80 | 0.2 ± 0.04 | - | 99 ± 0.4 | ~ 90 |
| MB3 | 0.9 ± 0.04 | 0.6 ± 0.04 | 99 ± 0.2 | ~ 70 |
| MB9 | 0.1 ± 0.003 | 0.6 ± 0.1 | 86 ± 0.3 | ~ 60 |
| MB17 | 0.5 ± 0.07 | 1.0 ± 0.1 | 89 ± 2 | ~ 90 |
| RB5 | 0.4 ± 0.04 | 2.2 ± 0.1 | 99 ± 0.1 | ~ 95 |
| RY145 | 0.04 ± 0.01 | - | 97 ± 0.4 | ~ 90 |

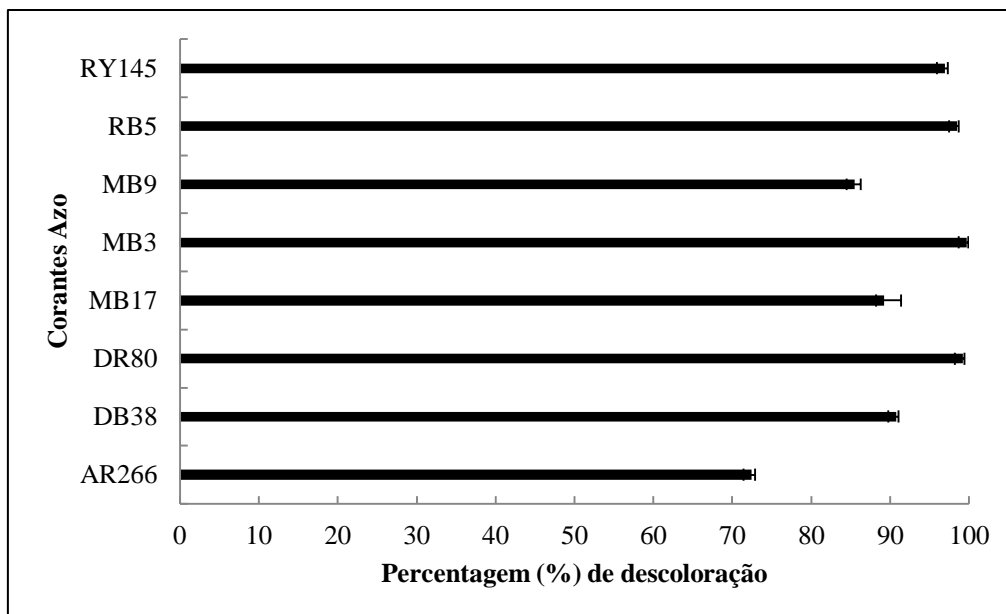


Figura 3- 8. Percentagem de descoloração enzimática com PpAzoR, após 24 horas de reação.

3.3.3. Reações em larga escala

As misturas reacionais foram preparadas como anteriormente descrito nos **Materiais e Métodos**.

A enzima PpAzoR foi introduzida com o auxílio de uma seringa nas misturas já desarejadas, tendo a reação ocorrido durante 24 horas. Após este período de tempo, foi calculada a percentagem de descoloração (**Figura 3-9**), verificando-se que, quando se aumenta a escala das reações, a percentagem de descoloração diminui (**Tabela 3-8**). Após 24 horas, foi adicionada CotA-lacase às misturas reacionais, tendo sido alteradas as condições de oxigenação, inibindo a atividade da PpAzoR e promovendo a ação oxidativa da CotA-lacase.

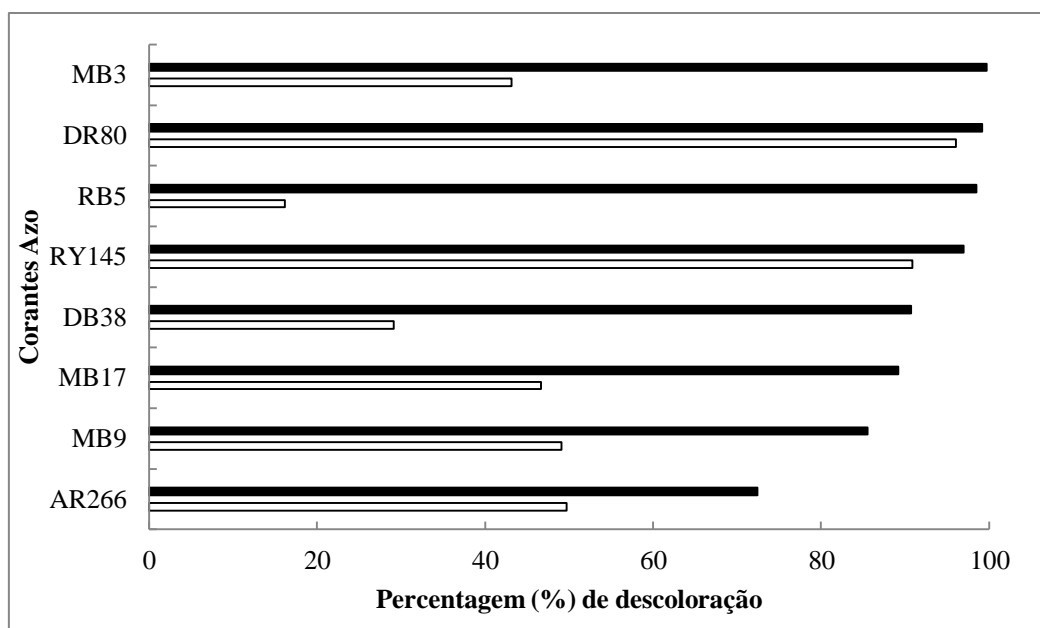


















Figura 3-9. Percentagem de descoloração das reações enzimáticas com PpAzoR em pequena escala (barras fechadas) e em larga escala (barras abertas).

Tabela 3-8. Percentagem de descoloração das reações enzimáticas com PpAzoR, em pequena escala e larga escala.

| Corante | Descoloração após 24 horas com PpAzoR (%) | |
|--------------|---|------------------------|
| | Reação em pequena escala | Reação em larga escala |
| <i>AR266</i> | 72 ± 1 | 50 |
| <i>DB38</i> | 94 ± 2 | 29 |
| <i>DR80</i> | 99 ± 0.4 | 96 |
| <i>MB3</i> | 89 ± 2 | 43 |
| <i>MB9</i> | 99 ± 0.2 | 49 |
| <i>MB17</i> | 86 ± 0.3 | 47 |
| <i>RB5</i> | 99 ± 0.1 | 16 |
| <i>RY145</i> | 97 ± 0.4 | 91 |

Para uma melhor percepção da descoloração conduzida pela enzima recombinante PpAzoR, foram registados dados fotográficos (Tabela 3-9).

Tabela 3-9. Degradação enzimática de corantes com PpAzoR, após 24 horas, em pequena escala e em larga escala.

| Corante | Descoloração após 24 horas | |
|--------------|---|---|
| | Reações em pequena escala | Reações em larga escala |
| <i>AR266</i> |  |  |
| <i>DB38</i> |  |  |
| <i>DR80</i> |  |  |
| <i>MB3</i> |  |  |
| <i>MB9</i> |  |  |
| <i>MB17</i> |  |  |
| <i>RB5</i> |  |  |
| <i>RY145</i> |  |  |

A diminuição da percentagem de descoloração nas reações em larga escala pode dever-se ao deficiente desarejamento das amostras, pois os frascos eram maiores, bem como o volume de corante e enzima usados, ou a uma agitação insuficiente e as reações terem sido limitadas por fenómenos de transferência de massa, diminuindo assim a velocidade de descoloração. O tempo de reação também pode ter influenciado estes resultados pois, em alguns corantes, existiu descoloração quase total enquanto, em outros corantes, tal não se verificou.

3.4. Análise dos produtos das reações de degradação por HPLC

Numa primeira fase de identificação dos produtos das reações enzimáticas catalisadas por PpAzoR e CotA-lacase, as misturas reacionais foram analisadas por HPLC para verificar se, de facto, as enzimas tinham atividade para com os substratos. Esta análise é meramente qualitativa, pois não foram usados padrões para comparação quantitativa com os picos observados nos cromatogramas. O que se pretendeu com esta análise foi identificar os picos referentes ao corante intacto, comparando-os com os picos presentes nas misturas reacionais após ação das enzimas usadas. O que seria expectável observar seria a diminuição da intensidade dos picos do corante, ou mesmo o seu desaparecimento, dando lugar ao aparecimento de novos picos, referentes à produção de aminas aromáticas, no caso de a reação ser catalisada pela PpAzoR. Posteriormente, observar-se-á o desaparecimento destes picos, originando outros picos diferentes, referentes aos produtos da oxidação das aminas aromáticas pela CotA-lacase.

As reações foram seguidas ao comprimento de onda de absorção máxima do corante em estudo.

3.4.1. AR266

Este corante possui uma ligação azo (**Figura 3-10**) o que o torna um substrato adequado para a azoredutase de *Pseudomonas putida* usada. Como já foi referido, da clivagem da ligação azo, são esperadas aminas aromáticas. No caso do **AR266**, são esperadas, como produtos da degradação pela PpAzoR, duas aminas.

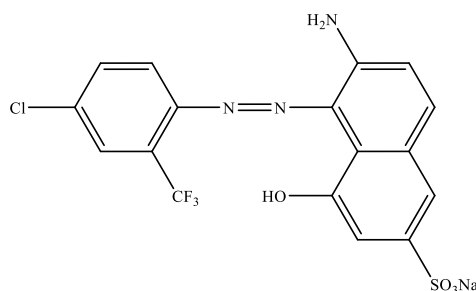


Figura 3-10. Estrutura química do corante azo **AR266**.

A análise de HPLC da mistura reacional na ausência de enzima exibe dois picos, que correspondem ao corante **AR266**, a tempos de retenção 20.3 e 22.2 minutos (**Figura 3-11A**). No cromatograma da mistura reacional contendo a enzima PpAzoR, é possível observar que os picos referentes ao corante desapareceram e aparece um pico com tempo de retenção de 7.3 minutos (**Figura 3-11B**). Finalmente, no cromatograma da mistura reacional contendo a enzima CotA-lacase, observa-se a existência de um pico com tempo de retenção de 7.1 minutos (**Figura 3-11C**). Este último pico pode corresponder ao produto resultante da ação com a PpAzoR, ou seja, a CotA-lacase não o modificou, ou então trata-se de um novo produto proveniente da oxidação da amina aromática produzida pela PpAzoR, com o mesmo tempo de retenção.

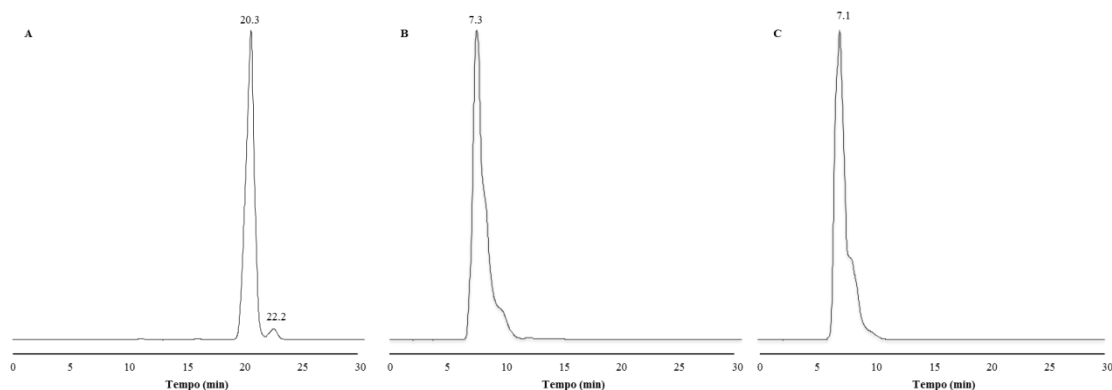


Figura 3-11. Análise por HPLC a 470 nm de (a) Corante **AR266** (2 mM) com NADPH (0.25 mM), (b) Produtos da reação de degradação com PpAzoR e (c) Produtos da degradação com CotA-lacase.

3.4.2. DB38

Este corante possui três ligações azo (**Figura 3-12**) o que o torna um substrato adequado para a azoredutase de *Pseudomonas putida* usada. Como produtos da degradação enzimática pela PpAzoR, são esperadas quatro aminas aromáticas.

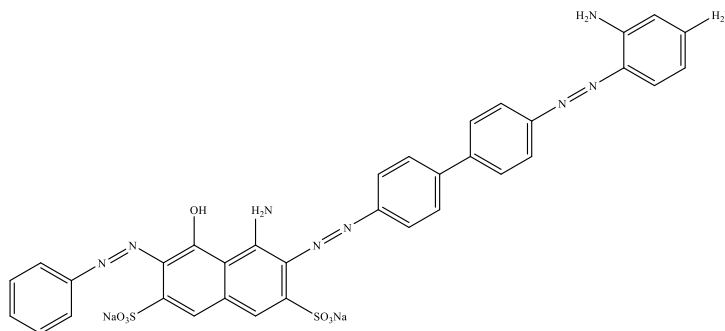


Figura 3-12. Estrutura química do corante azo **DB38**.

A análise de HPLC da mistura reacional na ausência de enzima exibe dois picos, que correspondem ao corante **DB38**, a tempos de retenção 10.8 e 16.4 minutos (**Figura 3-13A**). No cromatograma da mistura reacional contendo a enzima PpAzoR, é possível observar dois picos com tempos de retenção a 10.2 e 13.9 minutos (**Figura 3-13B**). Tendo em atenção a percentagem de descoloração deste corante (29 %), o pico com maior intensidade corresponde ao corante que não foi degradado, a tempo 10.2 minutos. Finalmente, no cromatograma da mistura reacional contendo a enzima CotA-lacase, verifica-se a existência de novos picos, com tempos de retenção 7.3, 8.5 e 19.4 minutos (**Figura 3-13C**). Já os picos com tempo de retenção 9.7 e 13.7 minutos apresentam um padrão semelhante aos picos presentes na reação catalisada pela PpAzoR. Então é provável que a CotA-lacase não tenha oxidado os produtos resultantes da degradação de corantes com PpAzoR, mas tenha ela própria oxidado o corante.

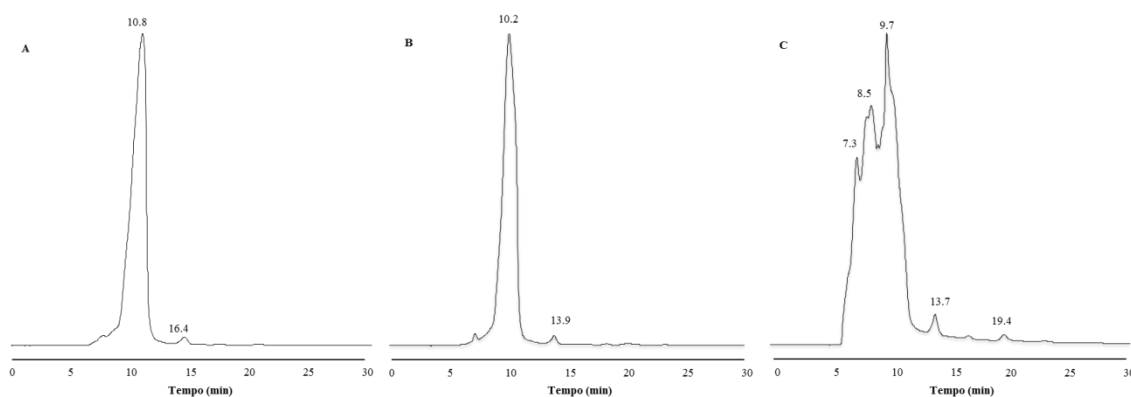


Figura 3-13. Análise por HPLC a 600 nm de (a) Corante **DB38** (2 mM) com NADPH (0.25 mM), (b) Produtos da reação de degradação com PpAzoR e (c) Produtos da degradação com CotA-lacase.

3.4.3. DR80

Este corante é um poliazo, apresentando quatro ligações azo (**Figura 3-14**), o que o torna um substrato adequado para a azoredutase de *Pseudomonas putida* usada. Como produtos da degradação pela PpAzoR, são esperadas três aminas aromáticas.

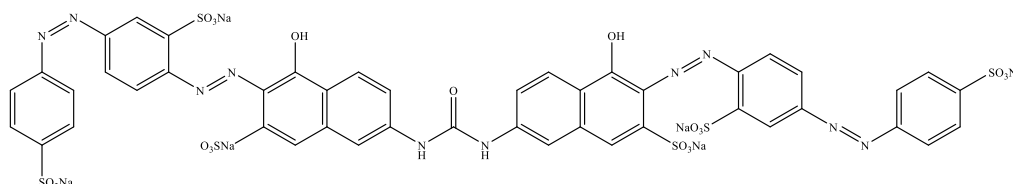


Figura 3-14. Estrutura química do corante azo *DR80*.

A análise de HPLC da mistura reacional na ausência de enzima exibe um pico, correspondente ao corante *DR80* a tempo de retenção 7.1 minutos (**Figura 3-15A**). No cromatograma da mistura reacional contendo a enzima PpAzoR, é possível observar um pico com tempo de retenção 7.3 minutos (**Figura 3-15B**). Tendo em atenção a percentagem de descoloração deste corante (96 %), esse pico pode corresponder a uma amina aromática, com tempo de retenção semelhante ao do corante. Finalmente, no cromatograma da mistura reacional contendo a enzima CotA-lacase, verifica-se a existência de um pico com o mesmo tempo de retenção que a mistura reacional contendo a enzima PpAzoR (**Figura 3-15C**) indicando que, provavelmente não houve transformação enzimática.

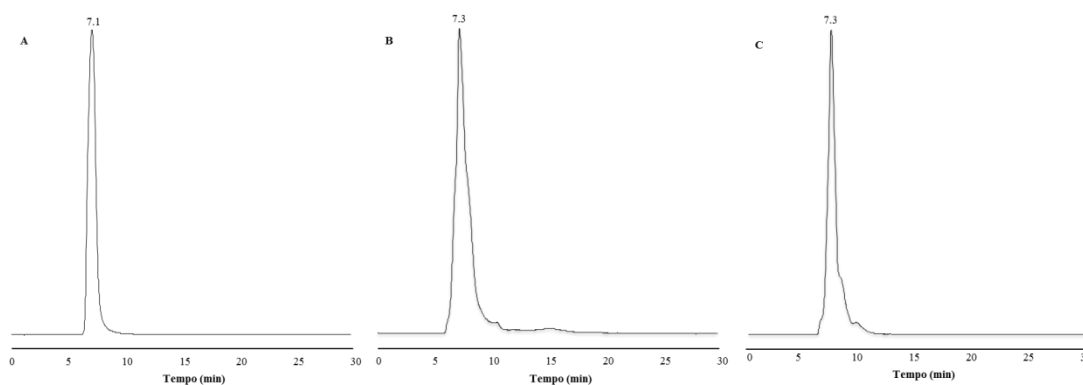


Figura 3-15. Análise por HPLC a 540 nm de (a) Corante *DR80* (2 mM) com NADPH (0.25 mM), (b) Produtos da reação de degradação com PpAzoR e (c) Produtos da degradação com CotA-lacase.

3.4.4. MB3

Este corante possui uma ligação azo (**Figura 3-16**) o que o torna um substrato adequado para a azoredutase de *Pseudomonas putida* usada. Como produtos da degradação pela PpAzoR, são esperadas duas aminas aromáticas.

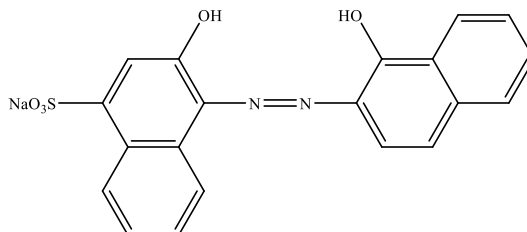


Figura 3-16. Estrutura química do corante azo **MB3**.

A análise de HPLC da mistura reacional na ausência de enzima exibe vários picos, correspondentes ao corante **MB3**, a tempos de retenção 14.6, 20 e 21.7 minutos (**Figura 3-17A**). No cromatograma da mistura reacional contendo a enzima PpAzoR, é possível observar que o pico referente ao corante desapareceu e aparecem outros picos com tempos de retenção 6.6, 11.0 e 16.0 minutos (**Figura 3-17B**). Finalmente, no cromatograma da mistura reacional contendo a enzima CotA-lacase, verifica-se o aparecimento de novos picos a tempos de retenção 6.2, 9.0 e 10.1 minutos, referentes aos compostos produzidos pela oxidação das aminas aromáticas pela CotA-lacase (**Figura 3-17C**). É possível visualizar um pico mais pequeno a 21.7 minutos, que pode corresponder a um pico do corante, pois este não foi completamente degradado, como se pode observar pela análise da percentagem de descoloração.

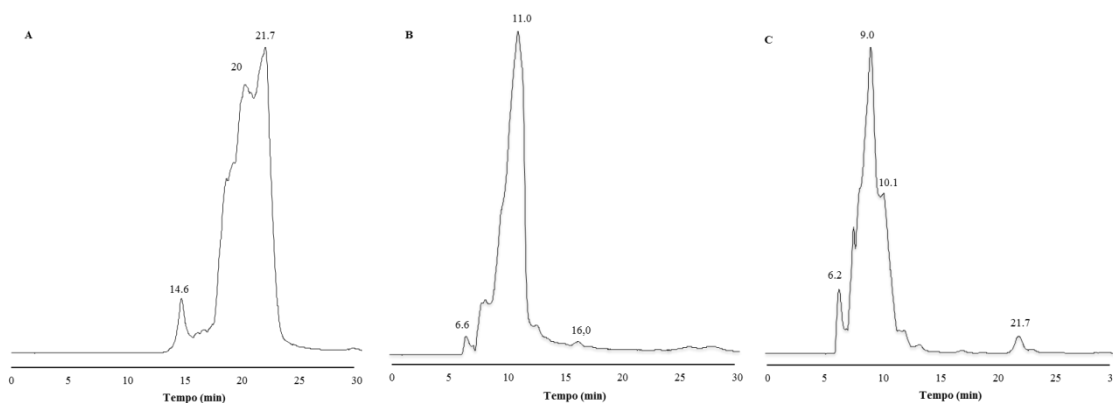


Figura 3-17. Análise por HPLC a 550 nm de (a) Corante **MB3** (2 mM) com NADPH (0.25 mM), (b) Produtos da reação de degradação com PpAzoR e (c) Produtos da degradação com CotA-lacase.

3.4.5. MB9

Este corante possui uma ligação azo (**Figura 3-18**) o que o torna um substrato adequado para a azoredutase de *Pseudomonas putida* usada. Como produtos da degradação pela PpAzoR, são esperadas duas aminas aromáticas.

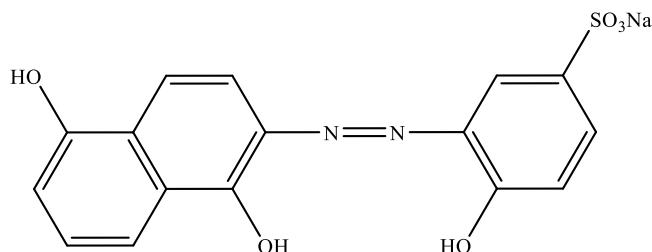


Figura 3-18. Estrutura química do corante azo **MB9**.

A análise de HPLC da mistura reacional na ausência de enzima exibe vários picos, correspondentes ao corante **MB9**, a tempos de retenção 13.5, 15.4 e 19.1 minutos (**Figura 3-19A**). No cromatograma da mistura reacional contendo a enzima PpAzoR, é possível observar que os picos referentes ao corante desapareceram e apareceram dois picos maiores com tempos de retenção 7.5 e 9.8 minutos (**Figura 3-19B**). Finalmente, no cromatograma da mistura reacional contendo a enzima CotA-lacase, verifica-se que os picos referentes aos produtos da PpAzoR desapareceram, dando lugar a um novo pico com tempo de retenção a 7.2 minutos (**Figura 3-19C**), referente ao composto produzido pela oxidação da amina aromática pela CotA-lacase.

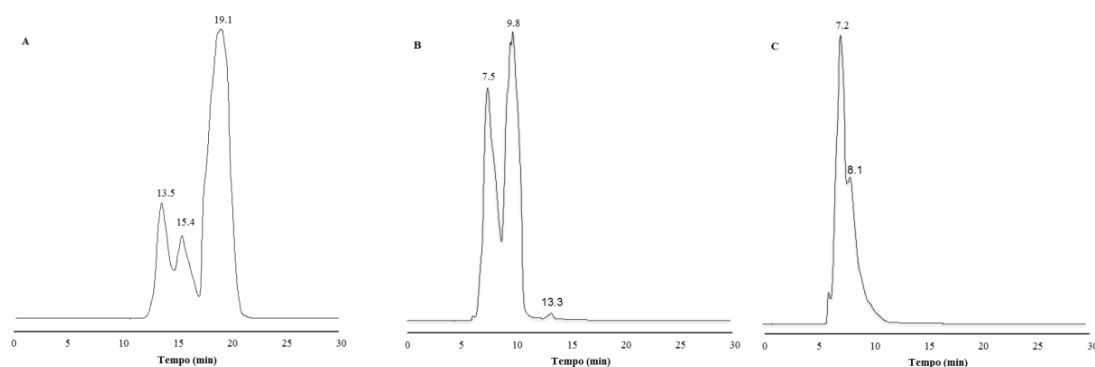


Figura 3-19. Análise por HPLC a 550 nm de (a) Corante **MB9** (2 mM) com NADPH (0.25 mM), (b) Produtos da reação de degradação com PpAzoR e (c) Produtos da degradação com CotA-lacase.

3.4.6. MB17

Este corante possui uma ligação azo (**Figura 3-20**) o que o torna um substrato adequado para a azoredutase de *Pseudomonas putida* usada. Como produtos da degradação pela PpAzoR, são esperadas duas aminas aromáticas.

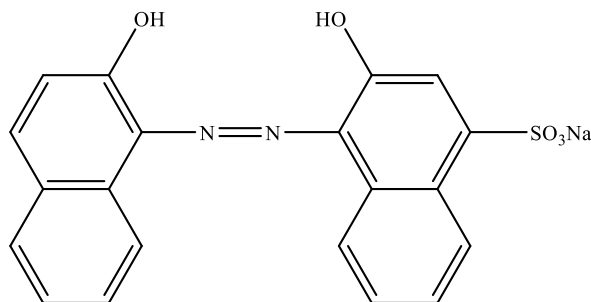


Figura 3-20. Estrutura química do corante azo *MB17*.

A análise de HPLC da mistura reacional na ausência de enzima exibe vários picos, correspondentes ao corante *MB17*, a tempos de retenção 12.4, 18.0 e 22.1 minutos (**Figura 3-21A**). No cromatograma da mistura reacional contendo a enzima PpAzoR, é possível observar que os picos referentes ao corante desapareceram, aparecendo outros picos com tempo de retenção 8.1, 10.8 e 12.6 minutos (**Figura 3-21B**). Finalmente, no cromatograma da mistura reacional contendo a enzima CotA-lacase, verificou-se o aparecimento de novos picos, a tempos de retenção de 6.3, 7.5, 8.6, 10.0 e 19.6 minutos (**Figura 3-21C**), referentes aos compostos produzidos pela oxidação das aminas aromáticas pela CotA-lacase.

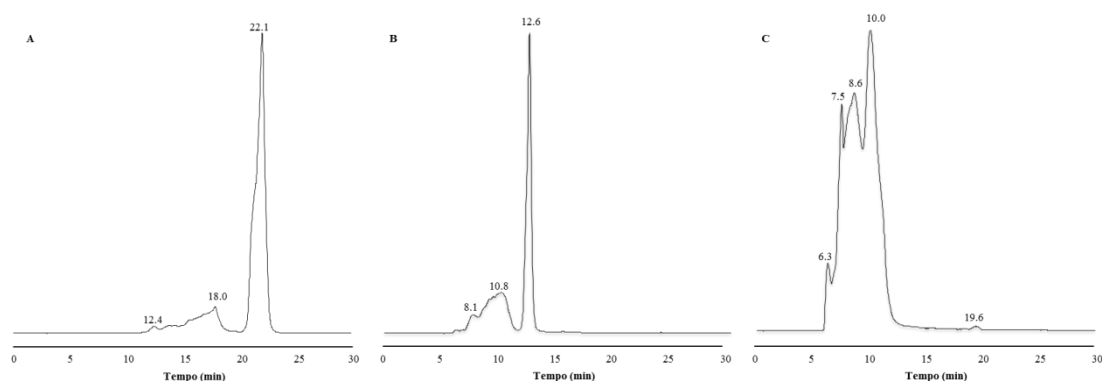


Figura 3-21. Análise por HPLC a 520 nm de (a) Corante *MB17* (2 mM) com NADPH (0.25 mM), (b) Produtos da reação de degradação com PpAzoR e (c) Produtos da degradação com CotA-lacase.

3.4.7. RB5

Este corante possui duas ligações azo (**Figura 3-22**) o que o torna um substrato adequado para a azoredutase de *Pseudomonas putida* usada. Como produtos da degradação pela PpAzoR, são esperadas duas aminas aromáticas.

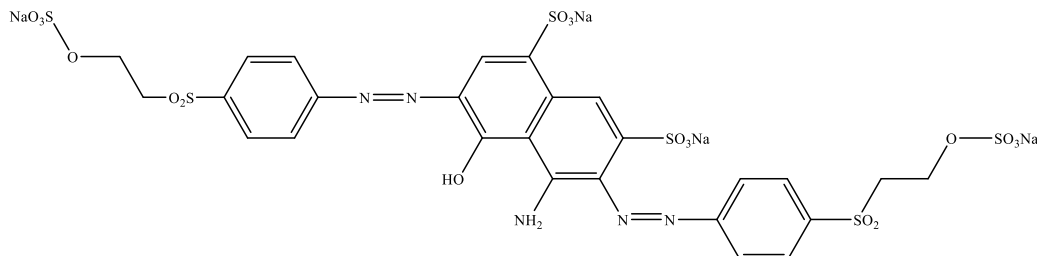


Figura 3-22. Estrutura química do corante azo **RB5**.

A análise de HPLC da mistura reacional na ausência de enzima exibe vários picos, correspondentes ao corante **RB5** a tempos de retenção 10.2 e 13.7 minutos (**Figura 3-23A**). No cromatograma da mistura reacional contendo a enzima PpAzoR, é possível observar que os picos referentes ao corante desapareceram e apareceram dois picos maiores, com tempos de retenção a 7.3 e 8.3 minutos (**Figura 3-23B**). Finalmente, no cromatograma da mistura reacional contendo a enzima CotA-lacase, verifica-se que os picos referentes aos produtos da PpAzoR permanecem na mistura, e aparece um novo pico aos 9.2 minutos (**Figura 3-23C**).

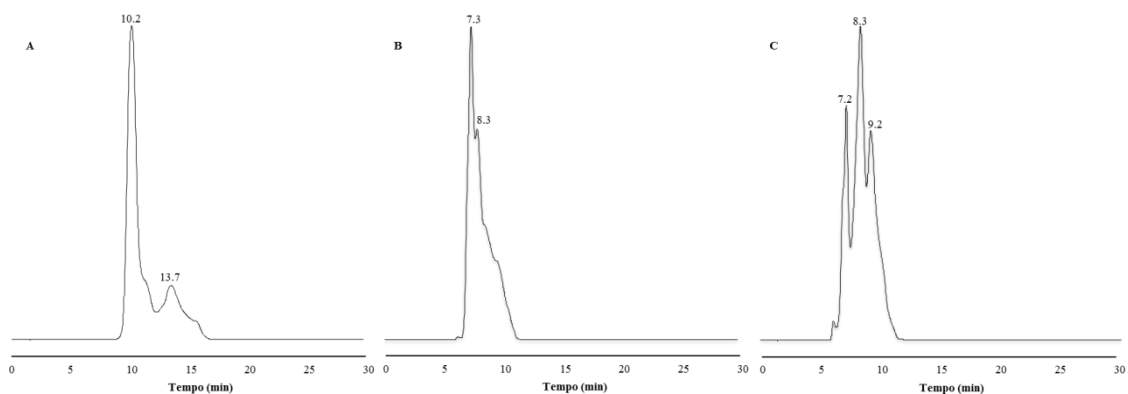


Figura 3-23. Análise por HPLC a 600 nm de (a) Corante **RB5** (2 mM) com NADPH (0.25 mM), (b) Produtos da reação de degradação com PpAzoR e (c) Produtos da degradação com CotA-lacase.

3.4.8. RY145

Este corante possui uma ligação azo (**Figura 3-24**) o que o torna um substrato adequado para a azoredutase de *Pseudomonas putida* usada. Como produtos da degradação pela PpAzoR, são esperadas duas aminas aromáticas.

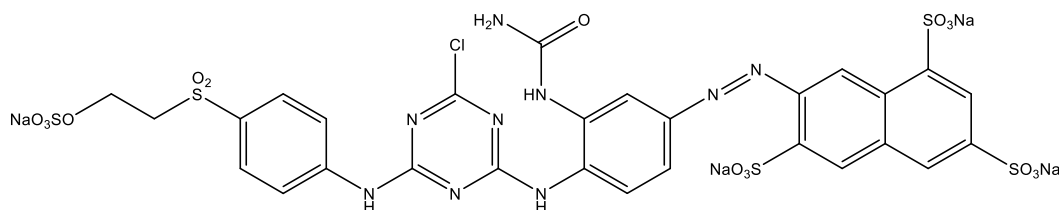


Figura 3-24. Estrutura química do corante azo RY145.

A análise de HPLC da mistura reacional na ausência de enzima exibe vários picos, correspondentes ao corante RY145, a tempos de retenção 7.5 e 8.7 minutos (**Figura 3-25A**). No cromatograma da mistura reacional contendo a enzima PpAzoR, é possível observar um pico com tempo de retenção de 7.4 minutos (**Figura 3-25B**), semelhante ao tempo de retenção do pico correspondente ao corante inicial. No entanto, analisando a percentagem de descoloração (91 %), este pico pode pertencer a uma amina aromática. Finalmente, no cromatograma da mistura reacional contendo a enzima CotA-lacase, verifica-se o aparecimento de dois picos com tempos de retenção de 7.3 e 8.0 minutos (**Figura 3-25C**), referentes aos compostos produzidos pela oxidação das aminas aromáticas pela CotA-lacase.

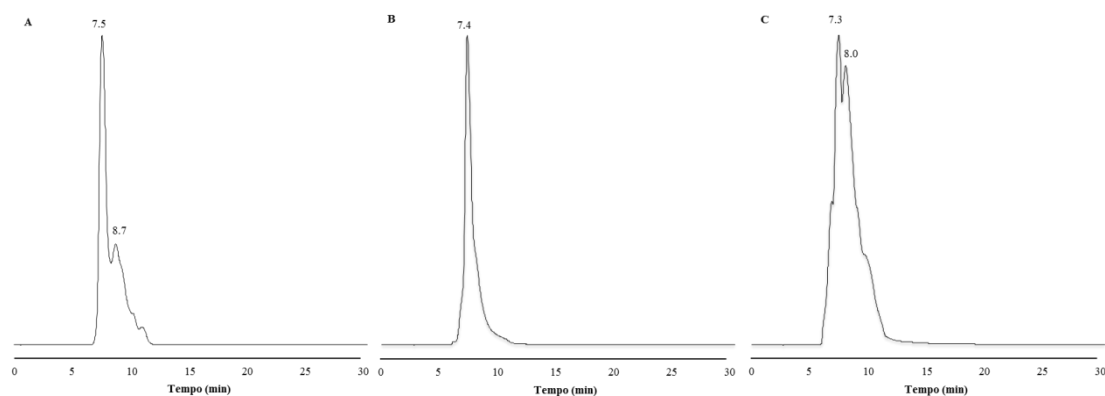


Figura 3- 25. Análise por HPLC a 420 nm de (a) Corante RY145 (2 mM) com NADPH (0.25 mM), (b) Produtos da reação de degradação com PpAzoR e (c) Produtos da degradação com CotA-lacase.

Após a análise dos resultados por HPLC, a conclusão mais evidente é que, de facto, existe transformação do corante pela primeira enzima, a PpAzoR, comprovada com o desaparecimento dos picos relativos ao corante intacto e com a existência de novos picos que, de acordo com a literatura (Prasad & Aikat, 2014; Mendes *et al.*, 2011b; Lin *et al.*, 2010; Mansour *et al.*, 2009; Chen *et al.*, 2005; Moutaouakkil *et al.*, 2003), estão relacionados com as amins aromáticas produzidas. Relativamente à segunda enzima, a CotA-lacase, verifica-se o desaparecimento de alguns picos referentes a produtos da degradação do corante pela PpAzoR, e o aparecimento de novos picos, que estarão relacionados com os produtos da oxidação das amins aromáticas produzidas pela PpAzoR. Não foi possível atribuir os picos a produtos das reações, pois não foram usados padrões.

3.5. Identificação de produtos de reação por ^1H RMN

Para uma análise e caracterização mais profunda dos produtos das reações, foram realizadas análises de RMN a várias amostras, por corante:

1. Controlos das reações, realizados nas mesmas condições experimentais e na ausência de enzima, doravante designados por *Controlo da degradação do corante com PpAzoR* e *Controlo da degradação com a CotA-lacase*, respetivamente,
2. Reação enzimática da degradação do corante por PpAzoR,
3. Reação enzimática da degradação dos produtos da reação produzidos pela PpAzoR, catalisada pela CotA-lacase, doravante designada por *Reação de degradação com a CotA-lacase*, estando implícito que o tratamento com esta enzima é sempre sequencial ao da PpAzoR e aplicado aos seus produtos de reação.

De forma a separar os fosfatos, provenientes do tampão usado, os resíduos sólidos foram extraídos com metanol. Deste tratamento, resultaram duas frações, uma solúvel em metanol e outra insolúvel no mesmo, sendo que esta corresponde aos fosfatos. A fração solúvel em metanol foi analisada por ^1H RMN.

Foi possível caracterizar todos os compostos produzidos pela degradação enzimática nos corantes azo **DR80**, **MB3**, **MB9**, **MB17** e **RY145**. Para os restantes corantes estudados, não foi possível chegar à identificação dos produtos finais das reações enzimáticas, sendo que, no final deste capítulo, estão descritas as dificuldades observadas na caracterização dos compostos relativos aos corantes **AR266**, **DB38** e **RB5**.

Com a análise dos espectros, verificou-se que, de uma forma geral, todos os sinais estavam posicionados na zona entre 6.5 e 9.0 ppm, característica dos compostos aromáticos. Como tal, apenas essa zona será apresentada. Quando as estruturas dos compostos apresentarem sinais relevantes fora desta área, a região do espectro será devidamente ajustada.

3.5.1. DR80

Todo o estudo deste corante foi realizado em metanol deuterado pois, após estudo da solubilidade, quer do corante, quer dos controlos e produtos das reações, verificou-se que este era o solvente mais adequado.

O espectro de ^1H RMN do corante *DR80* original (**Figura 3-26**) foi traçado com o objetivo de atribuir os sinais dos espectros aos prótons correspondentes.

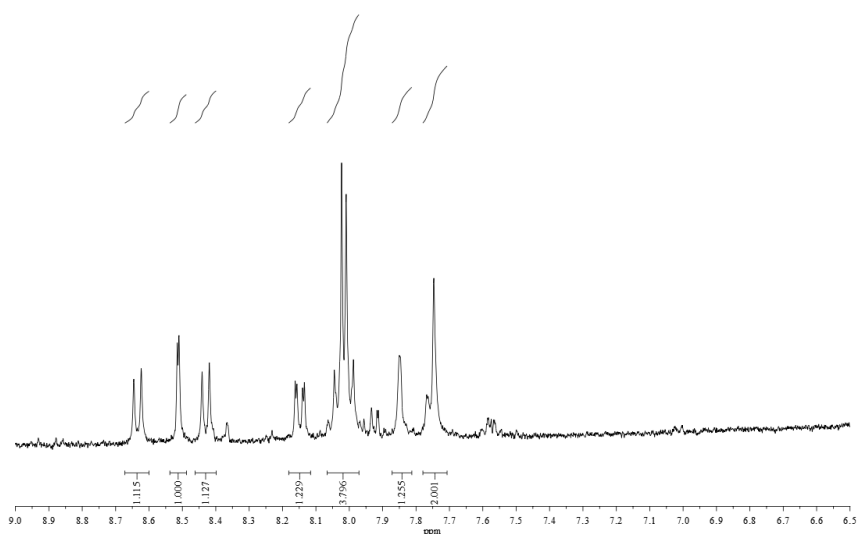


Figura 3-26. Espectro ^1H RMN do corante *DR80*.

Uma vez que o espectro apresenta uma estrutura complexa, a atribuição dos sinais só foi possível recorrendo a uma técnica bidimensional. Neste caso, a técnica escolhida foi a homonuclear: ^1H - ^1H COSY (Correlation Spectroscopy). Através do espectro COSY apresentado, que mostra a correlação entre alguns sinais (**Figura 3-27**), foi possível atribuir os sinais do corante, verificando-se que este tem a estrutura esperada (**Figura 3-28**). Para além dos sinais atribuídos ao corante, aparecem ainda alguns sinais menos intensos que pertencerão a impurezas presentes no corante.

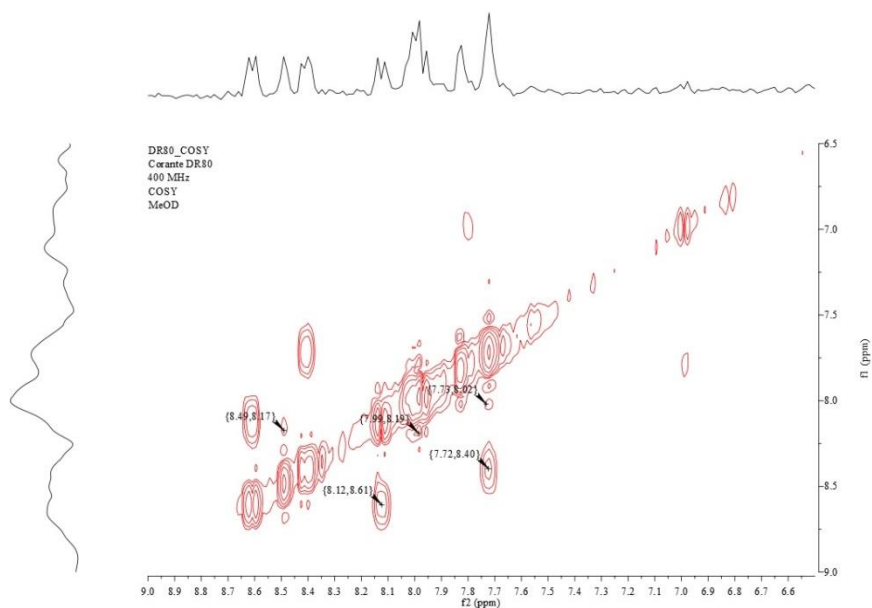


Figura 3-27. Espectro de RMN 2D – COSY do corante *DR80*.

Análise do espectro ^1H RMN em MeOD, na região do espectro entre 6.5 e 9.0 ppm (400 MHz):
 δ (ppm) = 8.61 (d, $J=8.8$ Hz, 2H, H9, H34); 8.51 (d, $J=2.1$ Hz, 2H, H12, H37); 8.43 (d, $J=8.7$ Hz, 2H, H20, H28); 8.15 (dd, $J=8.8$ Hz, $J=2.2$ Hz, 2H, H8, H35); 8.02 (m, 8H, H1, H3, H4, H6, H40, H41, H43, H44); 7.85 (s, 2H, H22, H24); 7.76 (m, 4H, H15, H19, H27, H29).

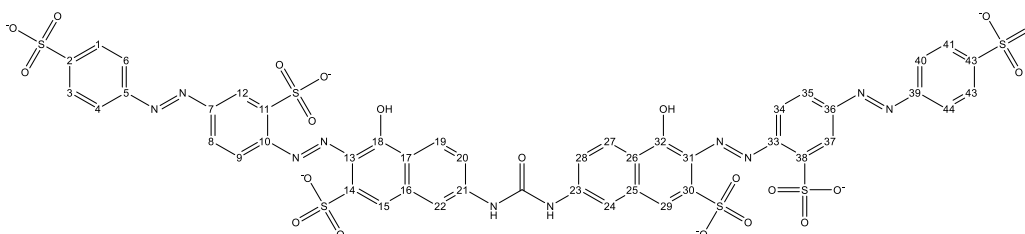


Figura 3- 28. Estrutura do corante *DR80* com os prótons identificados.

Caracterização dos compostos produzidos pela degradação com PpAzoR

Para verificar se o corante sofria alterações ao longo do tempo de reação por ação do tampão ou do NADPH, o espectro do corante (**Figura 3-29A**) e da reação controle referente às condições da PpAzoR (**Figura 3-29B**) foram comparados. Esta análise revela a existência de modificações ao nível da estrutura do corante no controle, com o aparecimento de novos sinais que estão devidamente assinalados com setas. Então, a estrutura do próprio corante altera-se em meio tamponado, mesmo na ausência de enzima.

Foi também realizada a comparação entre os espectros da reação de degradação do corante *DR80* com PpAzoR (**Figura 3-29C**) e os espectros anteriores. Verifica-se que existem alterações, pois alguns sinais característicos do corante desapareceram, dando origem a novos sinais, alguns com intensidade baixa, entre os 8.6 e 7.7 ppm (assinalados com elipses), e outros sinais com maior intensidade, entre os 6.2 e 6.5 ppm, o que revela ação da enzima sobre o corante.

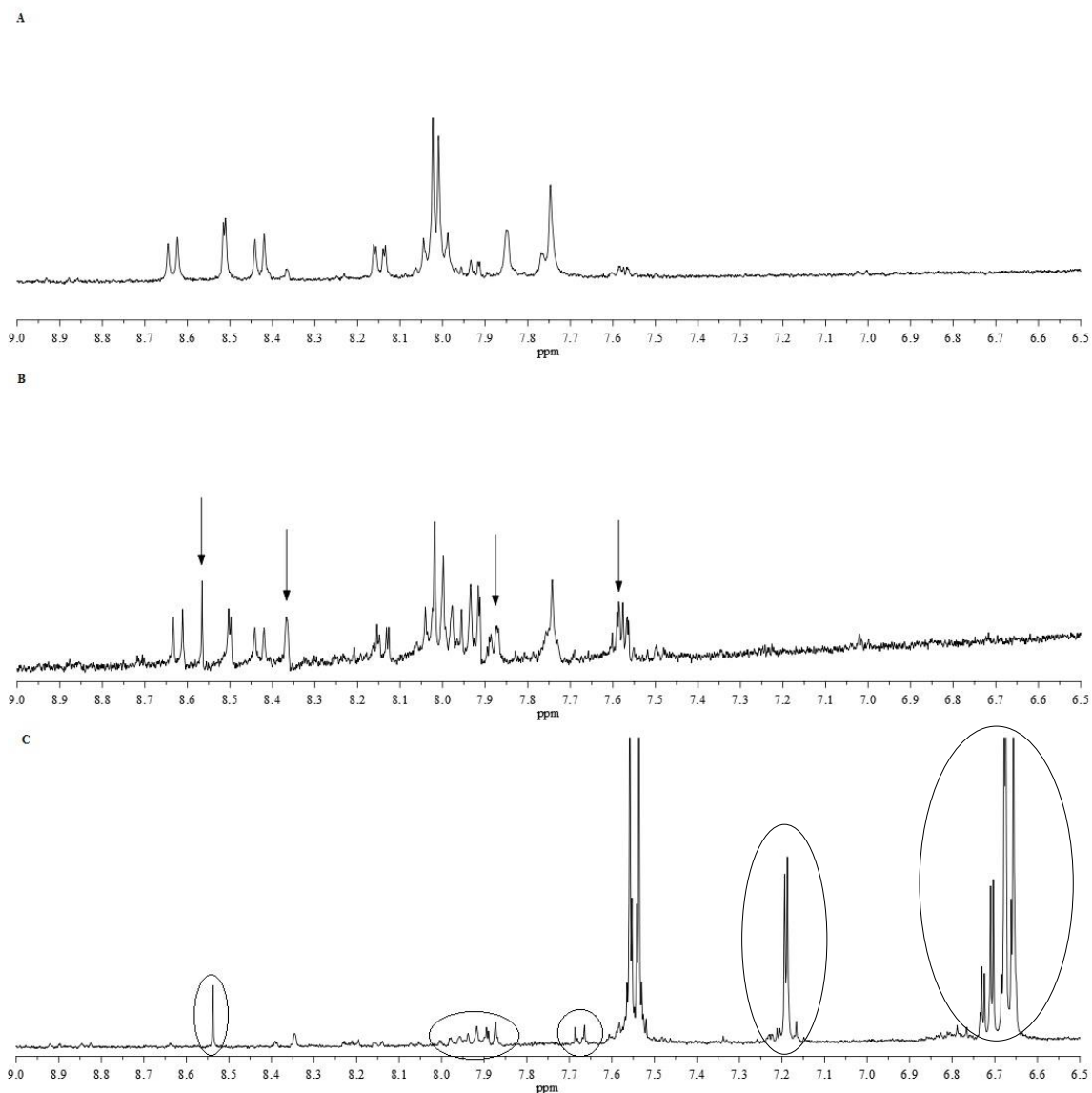


Figura 3- 29. (a) Espectro ¹H RMN do corante *DR80*; (b) Espectro ¹H do controle da degradação de *DR80*; (c) Espectro ¹H RMN da degradação de *DR80* na presença de PpAzoR.

Resultantes da clivagem das ligações azo, pela enzima redutora PpAzoR, são esperadas, como produtos possíveis, três aminas aromáticas (**Figura 3-30**).

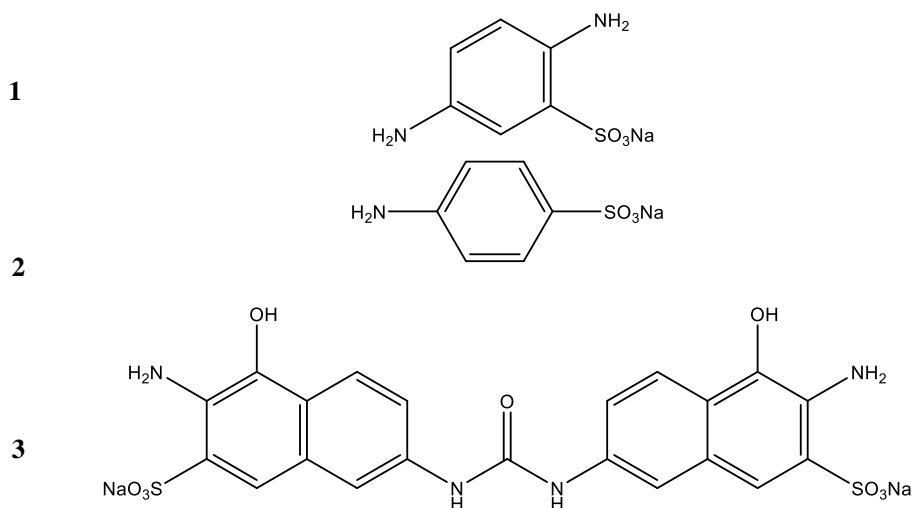
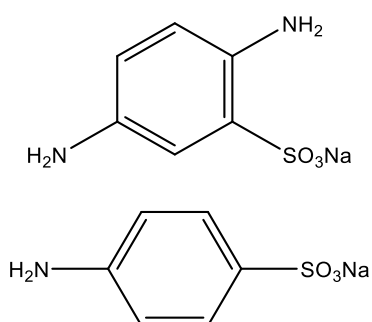


Figura 3-30. Estrutura das aminas aromáticas esperadas como produtos resultantes da degradação do corante *DR80* pela enzima PpAzoR.

A análise dos espectros de ^1H RMN dos produtos da reação com a enzima PpAzoR (**Figura 3-29C**) revelou claramente, como produtos maioritários, a presença de sinais que podem ser atribuídos às seguintes aminas:



δ (ppm) = 7.79 (d, 1H, J = 2.5 Hz,); 6.72 (dd, 1H, J = 8.4 Hz, 2.6 Hz); 6.67 (d, 1H, J = 8.4 Hz)

δ (ppm) = 7.55 (d, 2H, J = 8.7 Hz,); 6.67 (d, 2H, J = 8.6 Hz).

Para além dos sinais identificados, existiam vários sinais com baixa intensidade, provavelmente devido à baixa solubilidade da amostra no solvente usado. Por outro lado, a ausência de sinais atribuíveis à amina **3** esperada pode estar relacionada com problemas de solubilidade. Verificou-se que a amostra também era solúvel em água, pelo que traçou-se um espectro de ^1H RMN em D_2O (ver em anexo **Figura 7-1B**), e comparou-se este espectro com o espectro da reação em metanol deuterado (ver em anexo **Figura 7-1A**). É possível visualizar o aparecimento de outros sinais que não foram atribuídos. No entanto, não parecerem corresponder à estrutura da amina **3**.

Com estas informações, foi possível verificar que, em solução, existem apenas duas das três aminas aromáticas esperadas, sendo estas as aminas aromáticas **1** e **2**. Verificou-se também que

a proporção entre as aminas é diferente, sendo que a proporção entre a amina aromática **1** e a amina aromática **2** é de 1:3, respetivamente.

Caracterização dos compostos produzidos pela degradação com CotA-lacase

A **Figura 3-31** mostra os espectros de ^1H RMN do corante **DR80** (**A**), do controlo da degradação (**B**) e da reação de biotransformação com a CotA-lacase (**C**). Tal como no caso da reação enzimática com a PpAzoR, o espectro do corante **DR80** e do controlo da reação de degradação com CotA-lacase foram comparados. A comparação entre estes espectros revela a existência de modificações ao nível da estrutura do corante no controlo, que estão devidamente assinalados com setas. Então, a estrutura do próprio corante altera-se, mesmo na ausência de enzima, ao longo do tempo.

A comparação dos espectros anteriores com o espectro da reação de biotransformação com CotA-lacase mostra que existem alterações, pois é visível o aparecimento de novos sinais, com intensidade baixa.

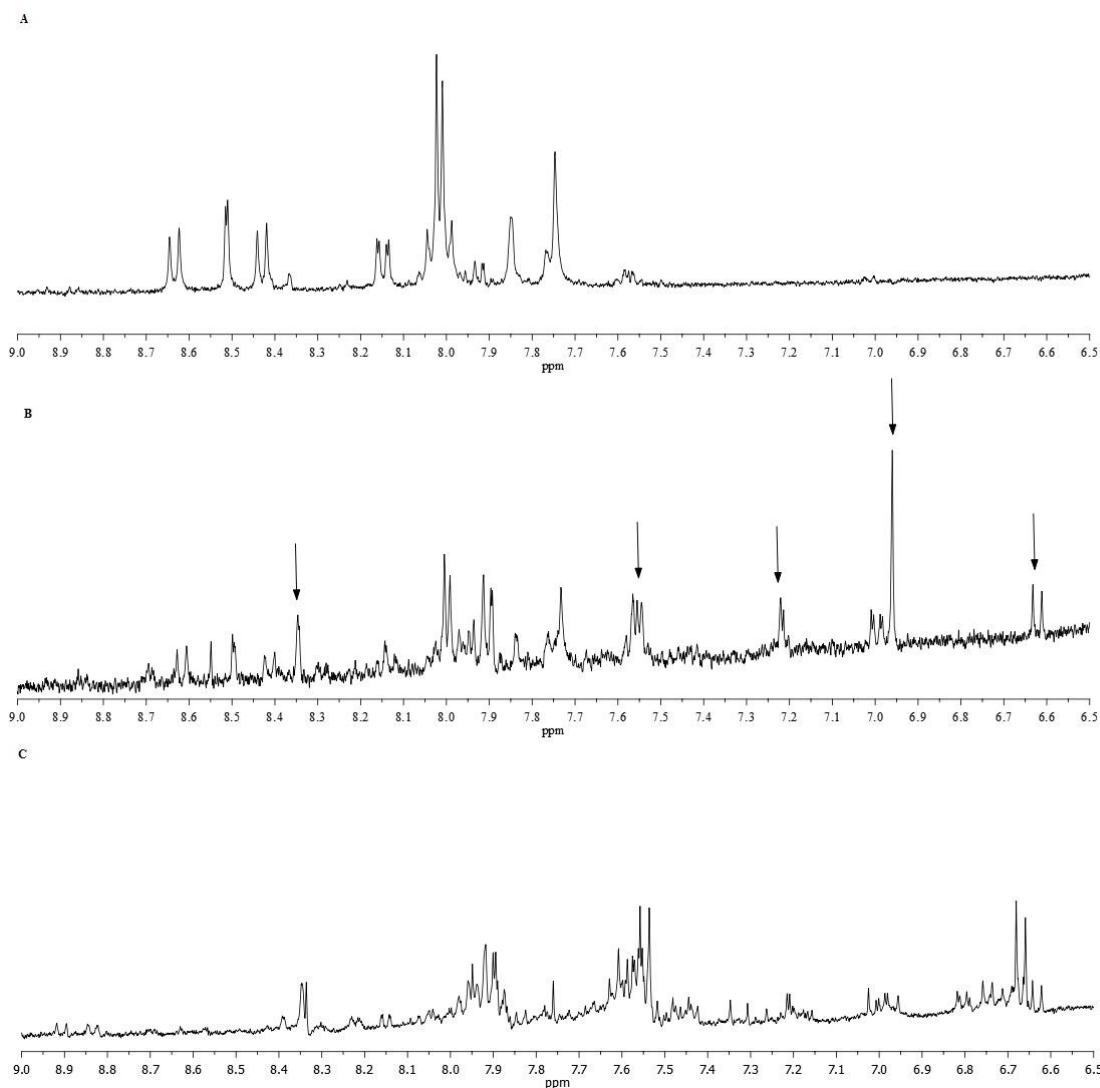


Figura 3- 31. (a) Espectro ^1H RMN do corante DR80; (b) Espectro ^1H RMN do controlo da biotransformação; (c) Espectro ^1H RMN da reação de biotransformação com CotA-lacase.

Relativamente aos controlos das reações enzimáticas com PpAzoR e CotA-lacase, a comparação entre os espectros revela diferenças entre ambos, ou seja, o corante vai sofrendo alterações ao longo do tempo, como é possível observar no controlo da reação com CotA-lacase (**Figura 3-29B** e **Figura 3-31B**), com o aparecimento de novos sinais, na zona do espectro entre 6.5 e 7.6 ppm. Estes sinais correspondem à amina aromática **1**, logo pode-se concluir que, no próprio controlo, há quebra da ligação azo.

Os espectros das reações com as enzimas PpAzoR (**Figura 3-32A**) e CotA-lacase (**Figura 3-32B**) foram também comparados. Esta comparação mostra que alguns dos sinais, presentes no espectro dos produtos da reação com a PpAzoR, se mantêm após a ação da CotA-lacase, o que significa que não foram transformados pela CotA-lacase, mantendo-se no final da reação. Estes sinais correspondem à amina aromática **1**, que não é um substrato para a CotA-lacase (Sousa *et*

al., 2014a). Também se observa o aparecimento de novos sinais, o que é indicativo da existência de novos produtos, ou seja, a CotA-lacase atuou sobre substratos em solução.

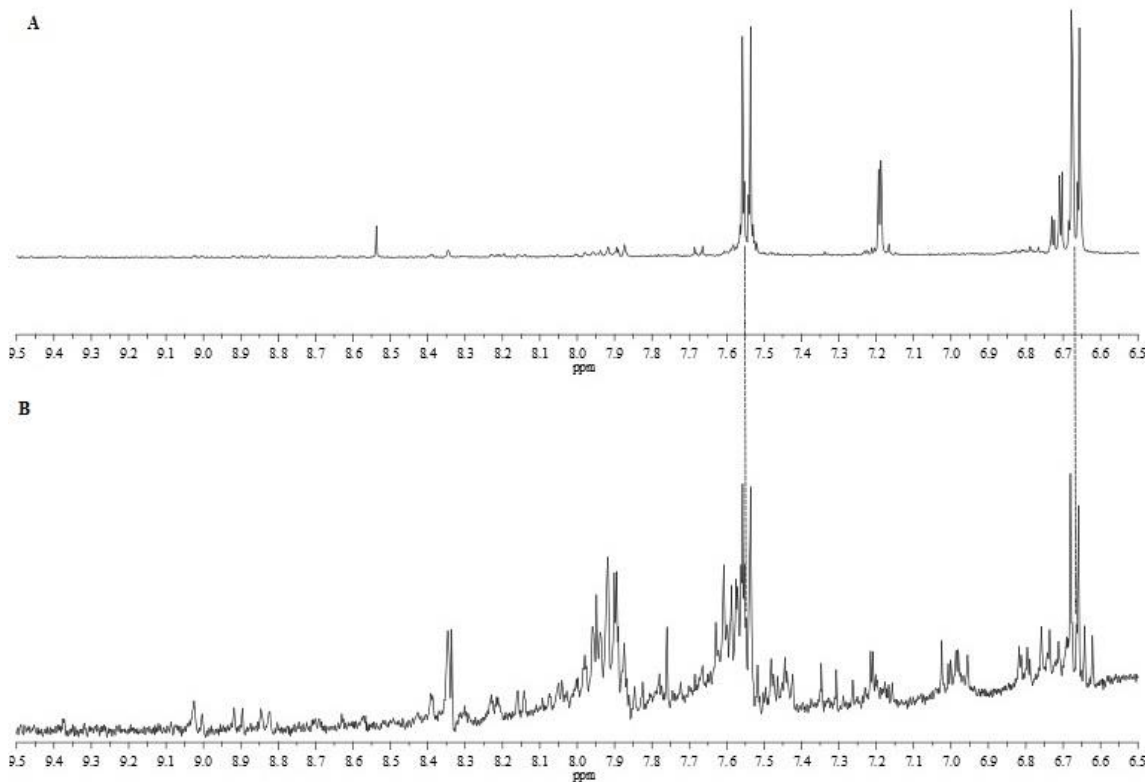


Figura 3-32. (a) Espectro ¹H RMN da reação de degradação do corante *DR80* com PpAzoR; (b) Espectro ¹H RMN da reação de biotransformação com CotA-lacase.

Embora o espectro da reação de biotransformação com a CotA-lacase apresente uma estrutura de sinais bastante complexa, sendo que alguns deles também estavam presentes no controle, indicando a formação de vários produtos, foi possível a identificação de um produto resultante da ação da CotA-lacase, efetuada por comparação com dados da literatura (Sousa *et al.*, 2014a).

Assim, observa-se a presença dos sinais referentes à fenazina como produto da reação, resultante da transformação da amina aromática **2** –2,4-diaminobenzeno sulfonato de sódio – pela CotA-lacase (**Figura 3-33**).

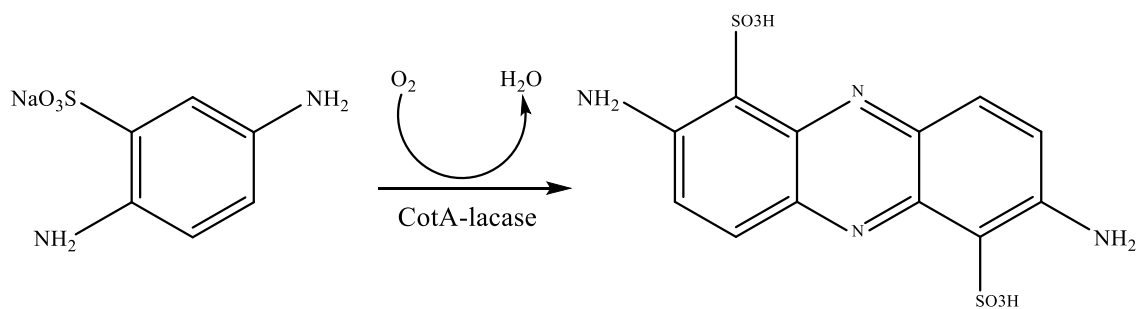


Figura 3-33. Reação de biotransformação da amina aromática 2 pela CotA-lacase (Sousa et al., 2014a).

Como forma de resumo do estudo do corante azo **DR80**, na **Figura 3-34** está apresentado um esquema reacional da degradação enzimática do mesmo, em que a degradação pela enzima PpAzoR originou duas aminas, e a ação sequencial da CotA-lacase sob estas aminas originou uma fenazina, e a outra amina permaneceu intacta.

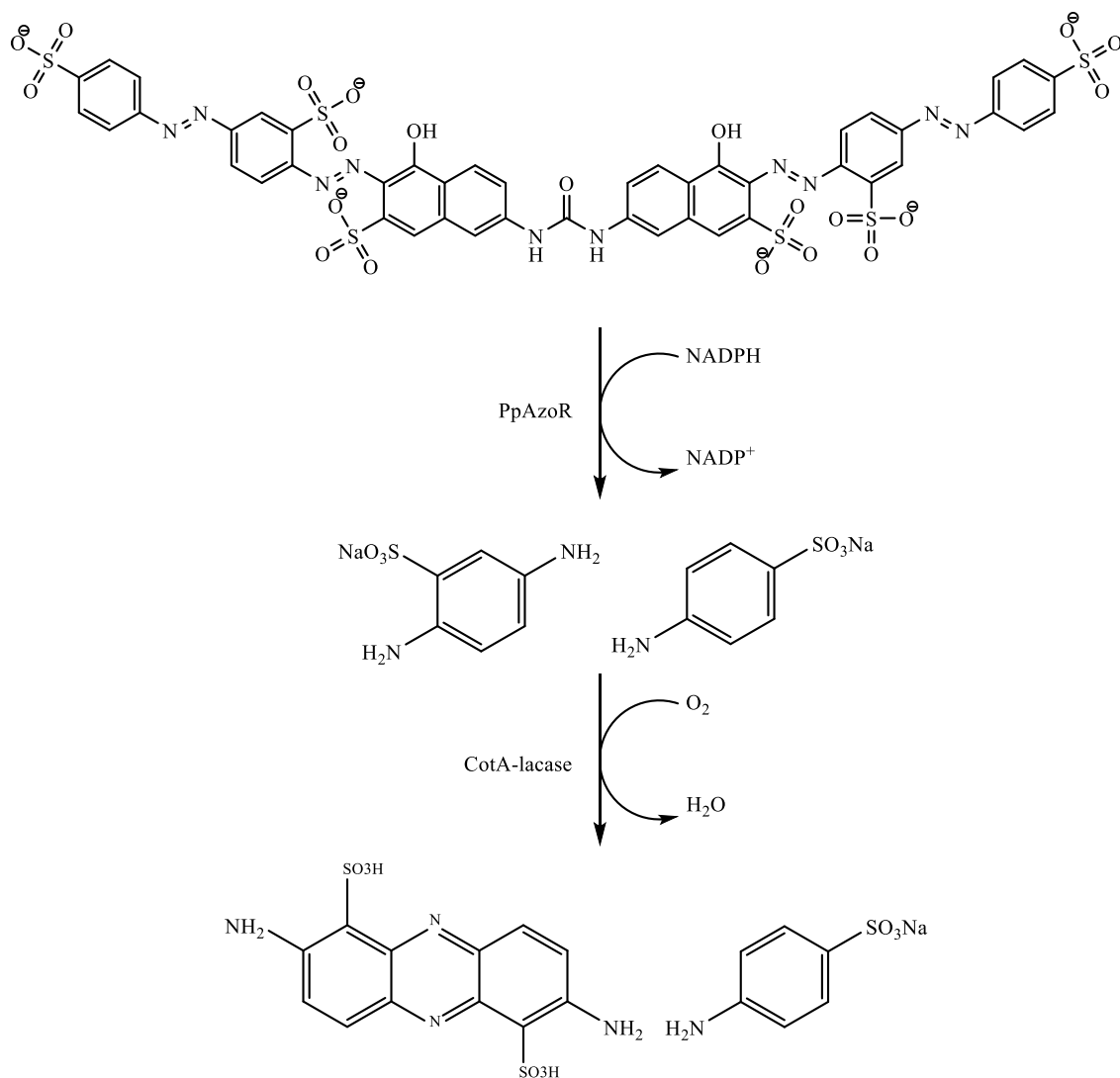


Figura 3-34. Esquema reacional da degradação enzimática do corante azo DR80.

3.5.2. MB3

Todo o estudo deste corante foi realizado em metanol deuterado pois, após estudo da solubilidade, quer do corante, quer dos controlos e produtos das reações, verificou-se que este era o solvente mais adequado.

O espectro de ^1H RMN do corante **MB3** original foi traçado (**Figura 3-35**) com o fim de atribuir os sinais dos espectros aos prótons correspondentes.

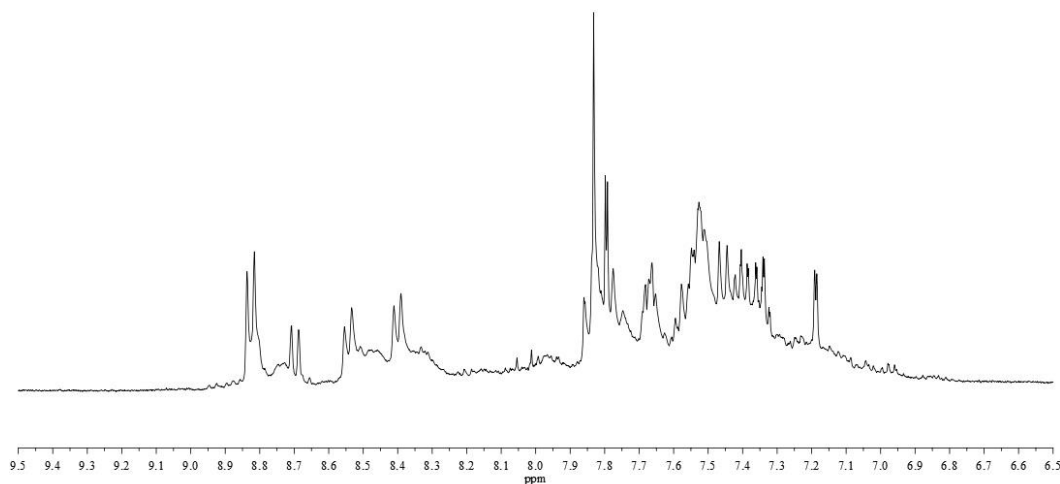


Figura 3-35. Espectro ^1H RMN do corante **MB3**.

Devido à complexidade de sinais do espectro, a atribuição dos sinais só foi possível recorrendo a ^1H - ^1H COSY (Correlation Spectroscopy). Através do espectro COSY apresentado (**Figura 3-36**), foi possível atribuir os sinais do corante, verificando-se que este tem a estrutura esperada (**Figura 3-37**).

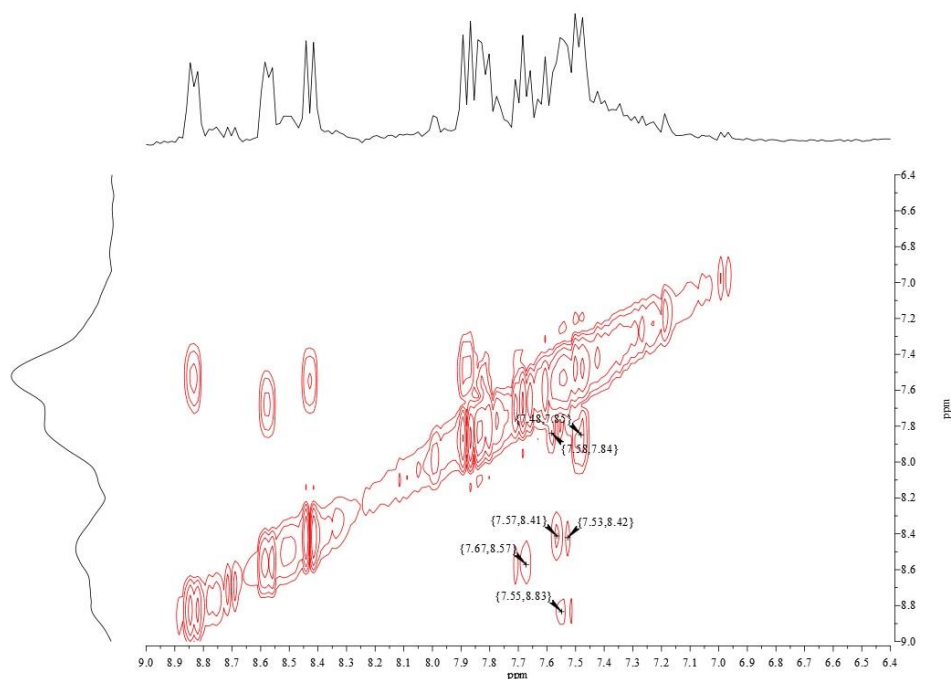


Figura 3-36. Espectro de RMN 2D – COSY do corante *MB3*.

Análise do espectro ^1H RMN em MeOD, na região do espectro entre 6.5 e 9.0 ppm (400 MHz): δ (ppm) = 8.83 (d, 1H, J = 8.8 Hz, H7); 8.57 (d, 1H, J = 8.8 Hz, H20); 8.43 (d, 1H, J = 8.0 Hz, H10); 7.88 (d, 1H, J = 8.8 Hz, H12); 7.84 (s 1H, H5); 7.82 (d, 1H, J = 9.2 Hz, H17); 7.69 (t, 1H, J = 8.4 Hz, H19); 7.60 (t, 1H, J = 8.4 Hz, H18); 7.55 (m, 2H, H8, H9); 7.48 (d, 1H, J = 8.8 Hz, H13).

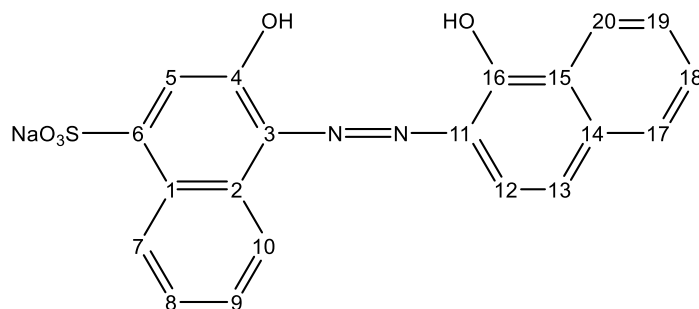


Figura 3-37. Estrutura do corante *MB3* com as posições identificadas.

Caracterização dos compostos produzidos pela degradação com PpAzoR

Para verificar se o corante sofria alterações ao longo do tempo de reação, o espectro do corante (**Figura 3-38A**) e do controle da reação com PpAzoR (**Figura 3-38B**) foram comparados. Esta análise revela a existência de ligeiras modificações ao nível da estrutura do

corante no controlo, com o aparecimento de novos sinais que estão devidamente assinalados com setas. Então, a estrutura do próprio corante altera-se em meio tamponado, mesmo na ausência de enzima.

Foi também realizada a comparação entre os espectros da reação de degradação do corante *MB3* com PpAzoR (Figura 3-38C) e os espectros anteriores. Verifica-se que existem alterações, pois alguns sinais característicos do corante desapareceram, dando origem a novos sinais, assinalados com elipses, o que revela ação da enzima sobre o corante.

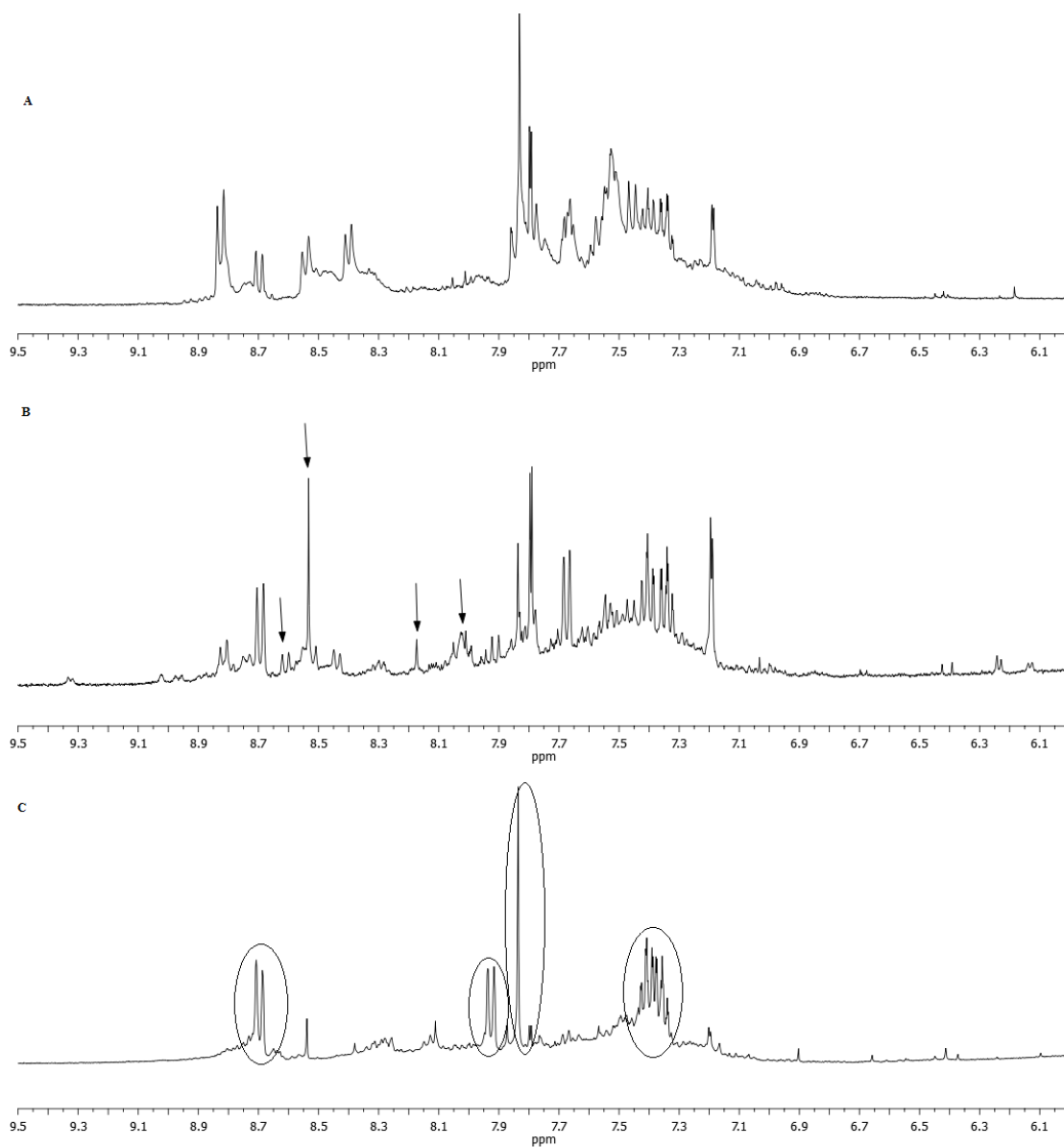


Figura 3-38. (a) Espectro ¹H RMN do corante *MB3*; (b) Espectro ¹H RMN do controlo da degradação de *MB3*; (c) Espectro ¹H RMN da reação de degradação de *MB3* na presença de PpAzoR.

Resultantes da clivagem da ligação azo, pela enzima redutora PpAzoR, são esperadas duas aminas aromáticas (**Figura 3-39**).

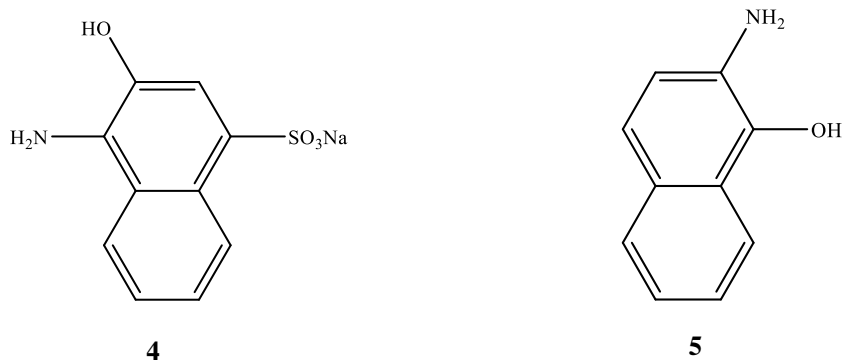


Figura 3-39. Aminas aromáticas esperadas como produtos resultantes da degradação do corante *MB3* pela enzima PpAzoR.

Para facilitar a identificação dos produtos da reação com a PpAzoR, fez-se a comparação dos espectros com amostras comerciais (**Figuras 3-40A e 3-40B**).

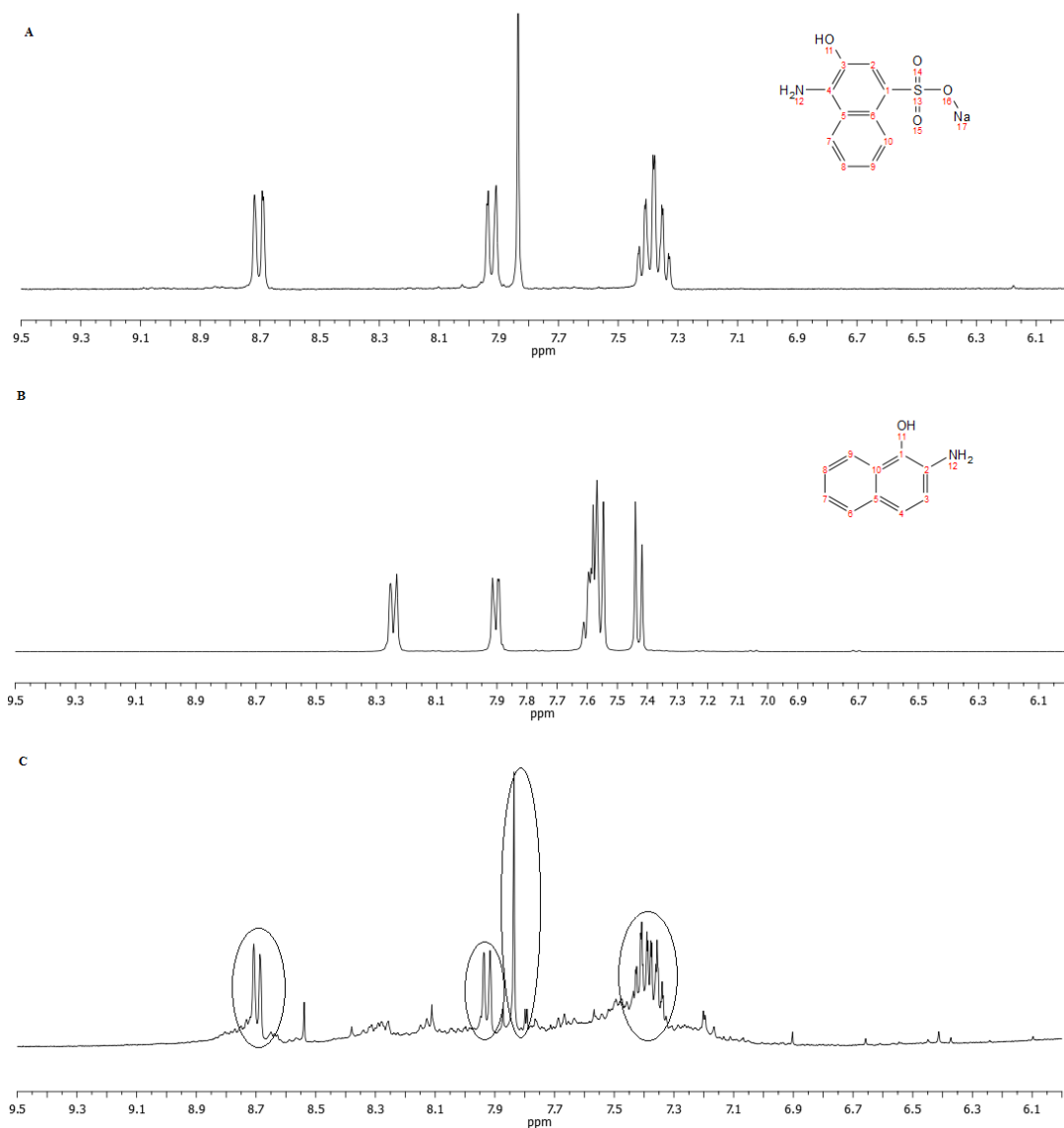
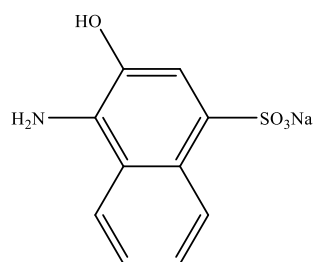


Figura 3-40. (a) Espectro ^1H RMN da amostra-comercial de 4; (b) Espectro ^1H RMN da amostra-comercial de 5; (c) Espectro ^1H RMN da reação de degradação de MB3 na presença de PpAzoR.

Através da análise dos espectros, é possível afirmar que o produto final da degradação do corante MB3 com a PpAzoR é a amina aromática 4. Esta amina também surge no controlo desta reação, o que significa que o meio tamponado também provoca a quebra da ligação azo.



Não há indícios de que a outra amina esteja presente em solução.

Caracterização dos compostos produzidos pela degradação com CotA-lacase

Tal como no caso da reação enzimática com a PpAzoR, o espectro do corante **MB3 (Figura 3-41A)** e do controlo da reação de biotransformação com CotA-lacase (**Figura 3-41B**) foram comparados. A comparação entre estes espectros revela a existência de modificações ao nível da estrutura do corante no controlo, que estão devidamente assinalados com setas. Então, a estrutura do próprio corante altera-se, mesmo na ausência de enzima, ao longo do tempo.

Foi também feita a comparação dos espectros anteriores com o espectro da reação de biotransformação com CotA-lacase (**Figura 3-41C**). A reação da CotA-lacase mostra o aparecimento de novos sinais, assinaladas com elipses, provenientes da transformação da amina aromática.

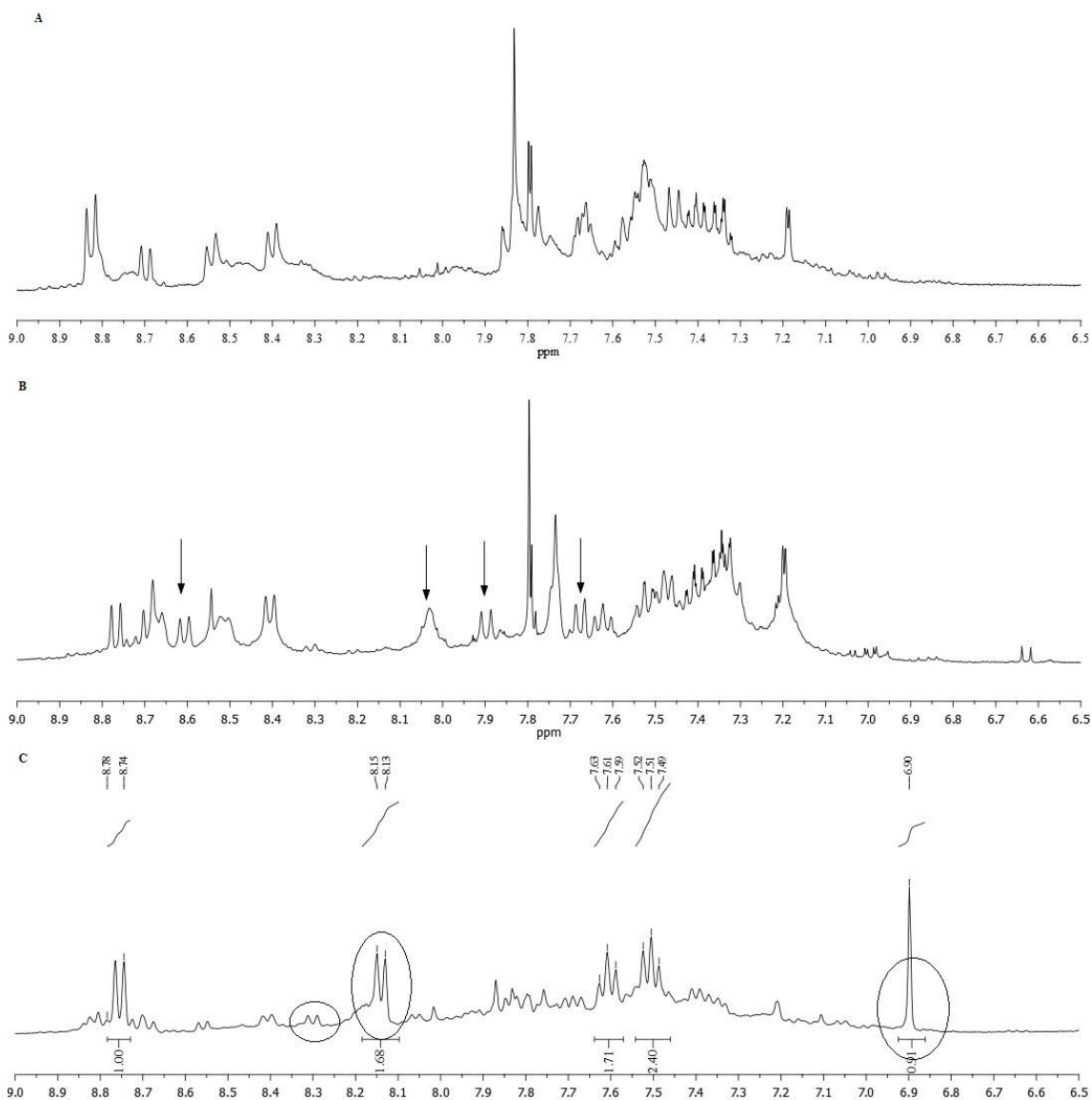


Figura 3-41. (a) Espectro ¹H RMN do corante MB3; (b) Espectro ¹H RMN do controlo da biotransformação; (c) Espectro ¹H RMN da reação de biotransformação com CotA-lacase.

Relativamente aos controlos das reações enzimáticas com PpAzoR e CotA-lacase, a comparação entre os espectros revela diferenças entre ambos, ou seja, o corante vai sofrendo alterações ao longo do tempo, como é possível observar no controlo da reação com CotA-lacase (**Figura 3-41B**), com o aparecimento de sinais, que não existem no controlo da reação com a PpAzoR (**Figura 3-38A**).

Também foi feita a comparação entre os espectros da reação com as enzimas PpAzoR (**Figura 3-42A**) e CotA-lacase (**Figura 3-42B**). É possível observar a existência de novos sinais, o que é indicativo da existência de novos produtos, como resultado da ação da CotA-lacase.

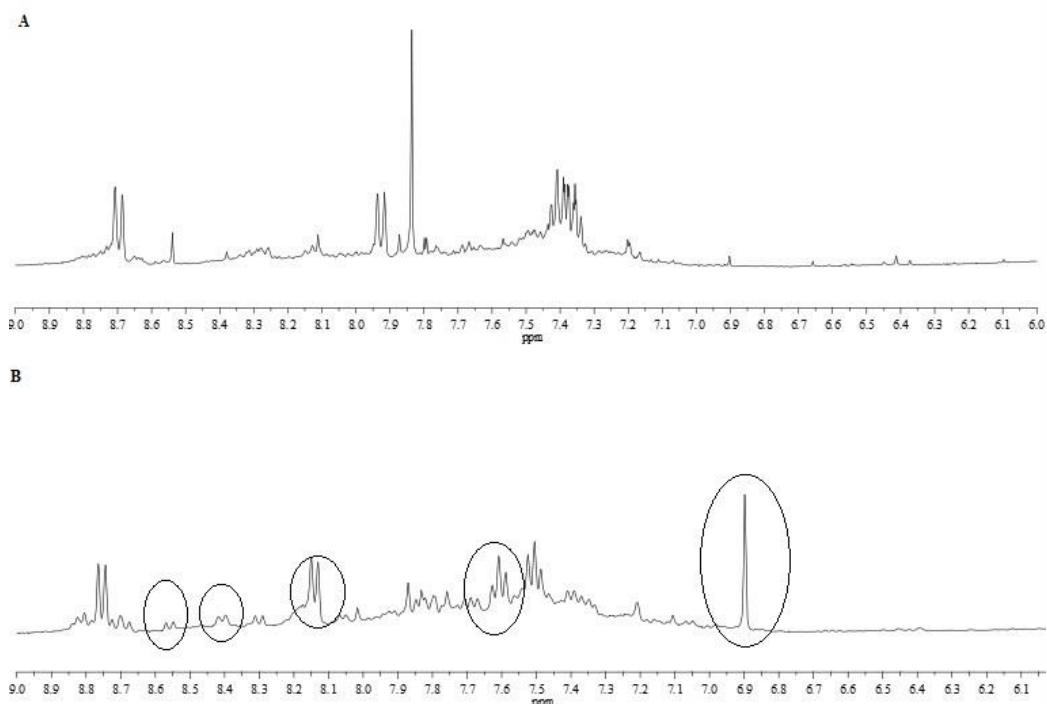


Figura 3-42. (a) Espectro ^1H RMN da reação de degradação de MB3 com PpAzoR; (b) Espectro ^1H RMN da reação de biotransformação com CotA-lacase.

Estudos anteriores com a CotA-lacase, usando as aminas aromáticas **4** e **5** como substratos, mostraram que ambas as aminas são transformadas pela CotA-lacase, originando respectivamente os produtos (Sousa *et al.*, 2014b) apresentados na **Figura 3-43**:

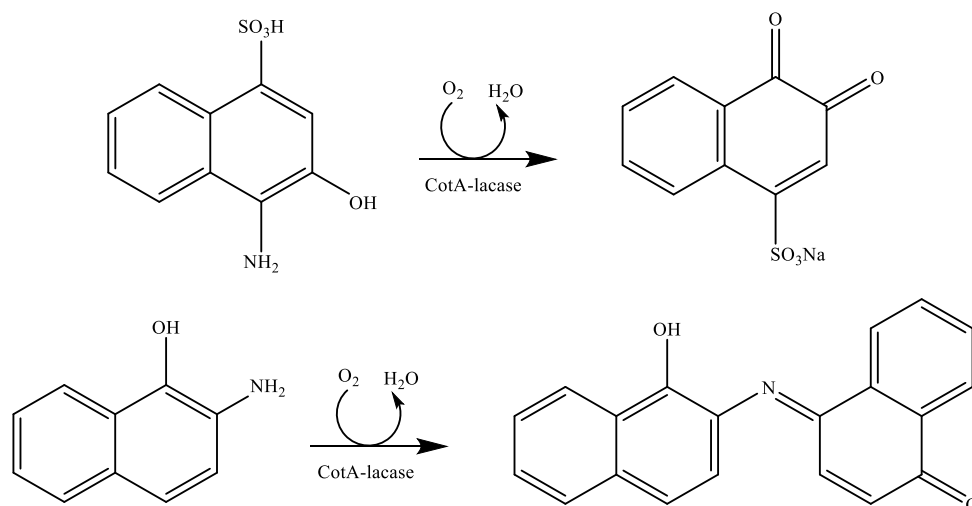


Figura 3-43. Biotransformação das aminas aromáticas **4** e **5** pela CotA-lacase (Sousa *et al.*, 2014a; Sousa *et al.*, 2014b).

Resultados e Discussão

Baseado nesses resultados, os espectros de RMN correspondentes aos produtos foram comparados com os obtidos neste trabalho. Assim, observa-se a presença dos sinais referentes à orto-quinona (**Figura 3-44C**) como produto da reação, resultante da transformação da amina aromática **4** pela CotA-lacase (**Figura 3-44A**). Em contrapartida, os sinais correspondentes ao produto da amina **5** não estão presentes. Este resultado está de acordo com as observações retiradas, pois esta amina não foi observada como produto da reação da degradação do corante **MB3** com a enzima PpAzoR.

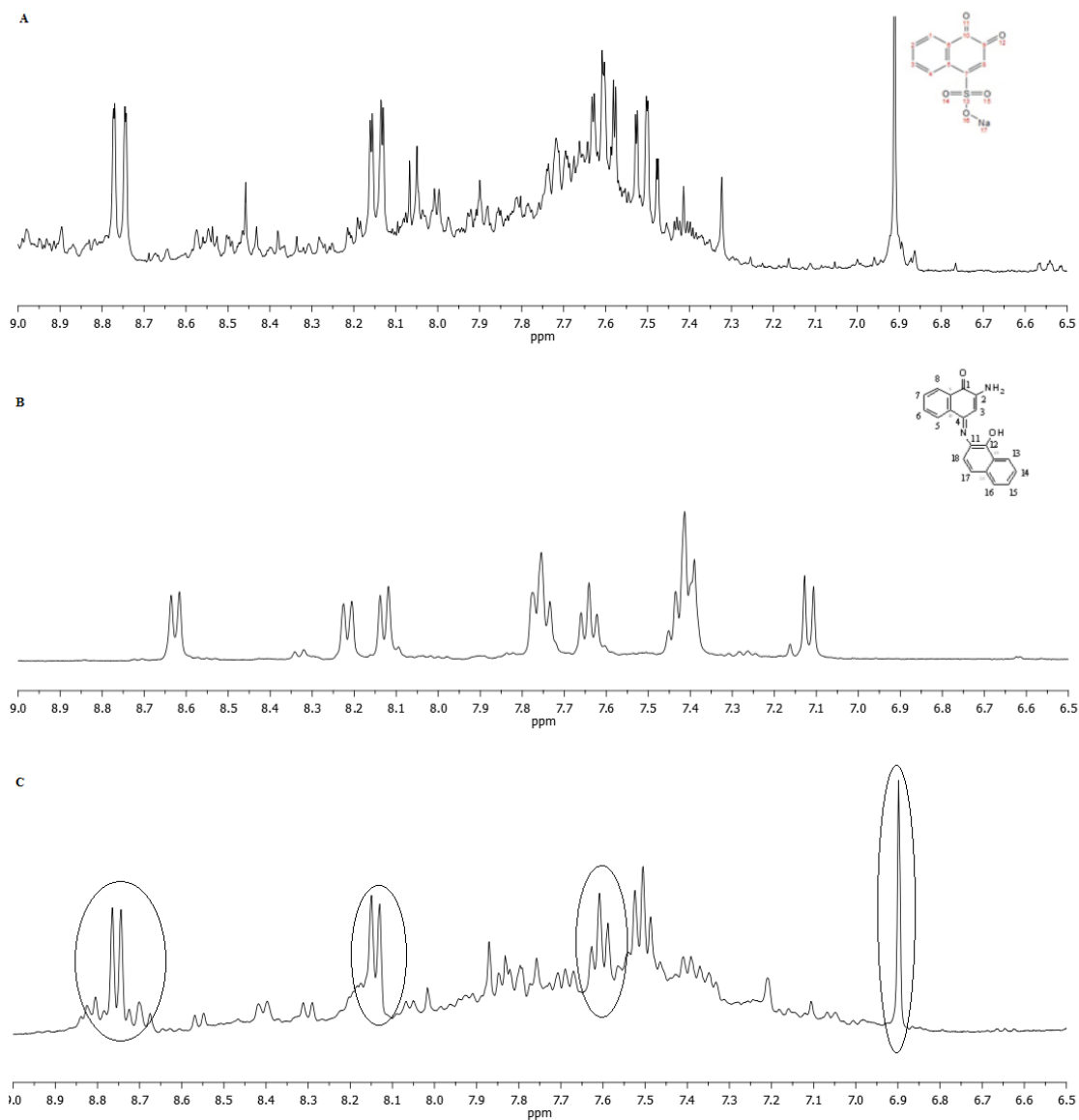


Figura 3-44. (a) Espectro ¹H RMN da reação entre a amina aromática **4** com CotA-lacase; (b) Espectro ¹H RMN da reação entre a amina aromática **5** com CotA-lacase; (c) Espectro ¹H RMN da reação de biotransformação com CotA-lacase.

Como forma de resumo do estudo do corante azo **MB3**, na **Figura 3-45** está apresentado um esquema reacional da degradação enzimática do mesmo, em que a degradação pela enzima PpAzoR originou uma amina, e a ação sequencial da CotA-lacase sob estas aminas originou uma *orto*-quinona.

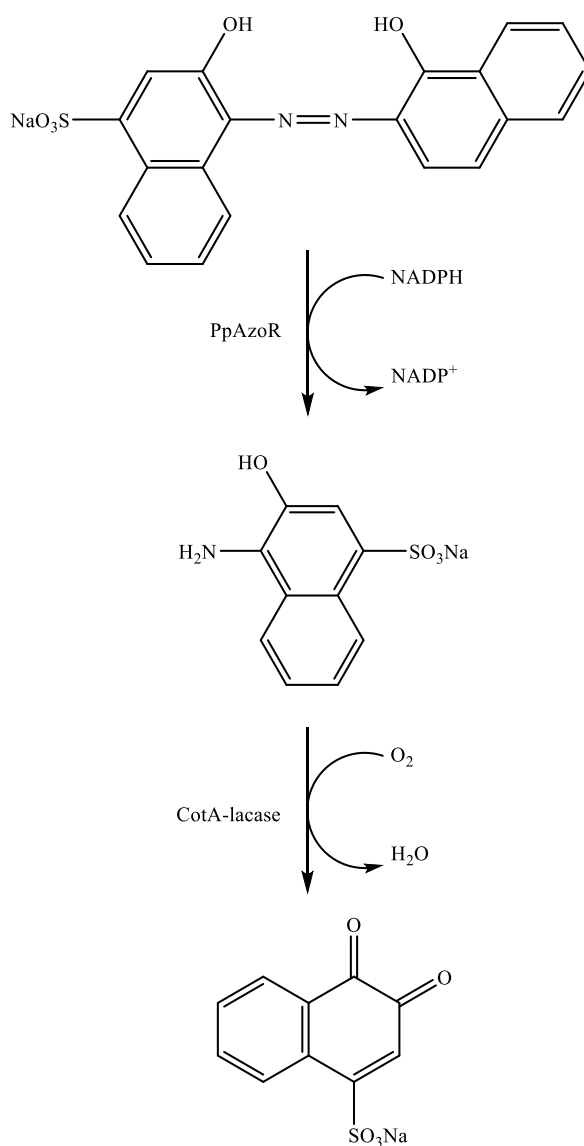


Figura 3-45. Esquema reacional da degradação enzimática do corante azo **MB3**.

3.5.3. MB17

Todo o estudo deste corante foi realizado em metanol deuterado pois, após estudo da solubilidade, quer do corante, quer dos controlos e produtos das reações, verificou-se que este era o solvente mais adequado.

O espectro de ^1H RMN do corante *MB17* original (**Figura 3-46**) foi traçado com o objetivo de atribuir os sinais dos espectros aos prótons correspondentes.

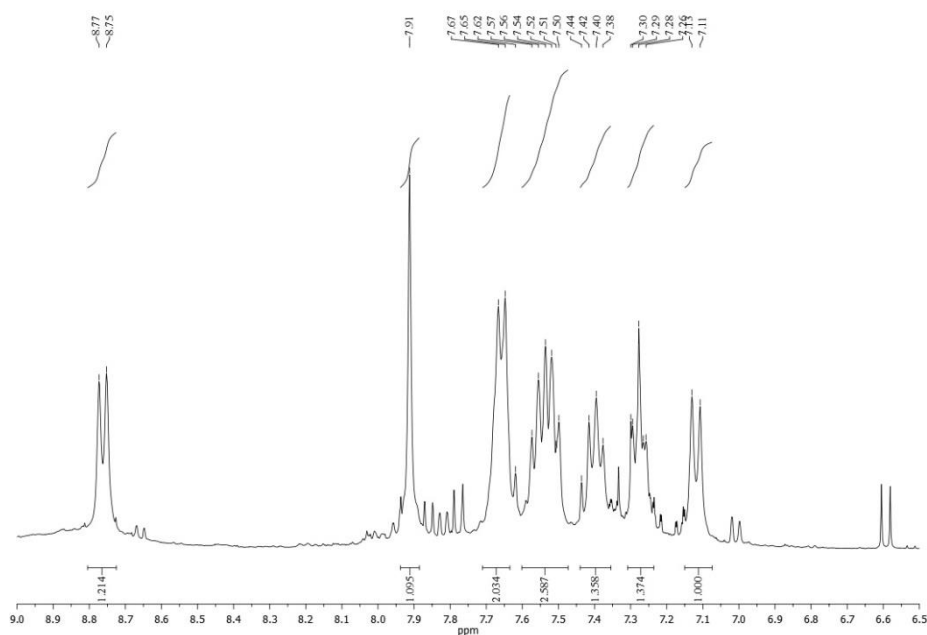


Figura 3-46. Espectro ^1H RMN do corante *MB17*.

Uma vez que o corante apresenta uma estrutura complexa, a atribuição dos sinais só foi possível recorrendo ao ^1H - ^1H COSY (Correlation Spectroscopy). Através do espectro COSY apresentado (**Figura 3-47**), foi possível atribuir os sinais do corante, verificando-se que este tem a estrutura esperada (**Figura 3-48**).

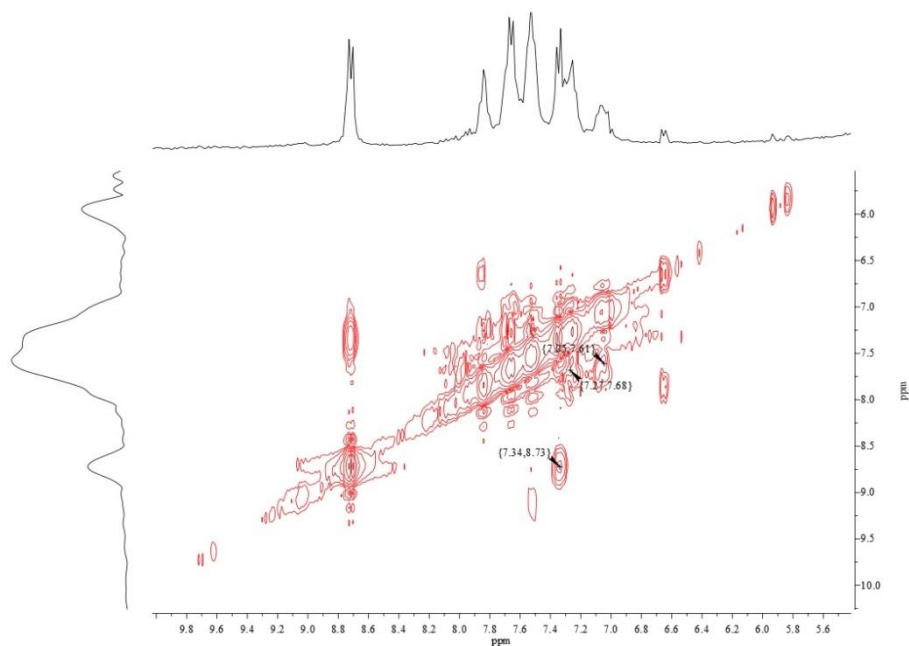


Figura 3-47. Espectro de RMN 2D – COSY do corante MB17.

Análise do espectro ^1H RMN em MeOD, na região do espectro entre 6.5 e 9.0 ppm (400 MHz):
 δ (ppm) = 8.76 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H, H20), 7.91 (s, 1H, H15), 7.66 (m, 2H, H10, H18), 7.53 (m, 2H, H8, H9), 7.41 (t, $J = 7.9$ Hz, 1H, H19), 7.28 (d, 1H, H7), 7.12 (d, $J = 9.0$ Hz, 1H, H17).

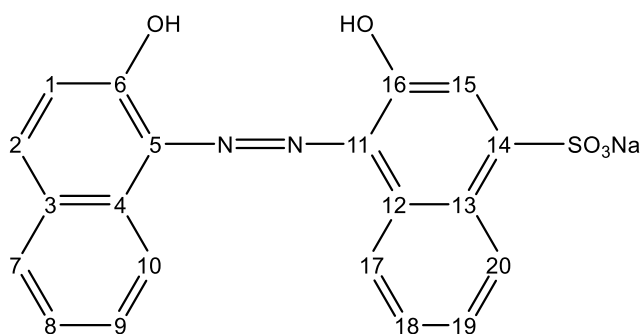


Figura 3-48. Estrutura do corante MB17 com os prótons identificados.

Caracterização dos compostos produzidos pela degradação com PpAzoR

Para verificar se o corante sofria alterações ao longo do tempo de reação, o espectro do corante (Figura 3-49A) e do controlo da reação com PpAzoR (Figura 3-49B) foram comparados. Esta análise revela a existência de modificações ao nível da estrutura do corante no controlo, com o

aparecimento de novos sinais que estão devidamente assinalados com setas. Então, a estrutura do próprio corante altera-se em meio tamponado, mesmo na ausência de enzima.

Foi também realizada a comparação entre os espectros da reação de degradação do corante **MB17** com PpAzoR (**Figura 3-49C**) e os espectros anteriores. Verifica-se que existem alterações, pois alguns sinais característicos do controle desapareceram, dando origem a novos sinais, devidamente assinalados.

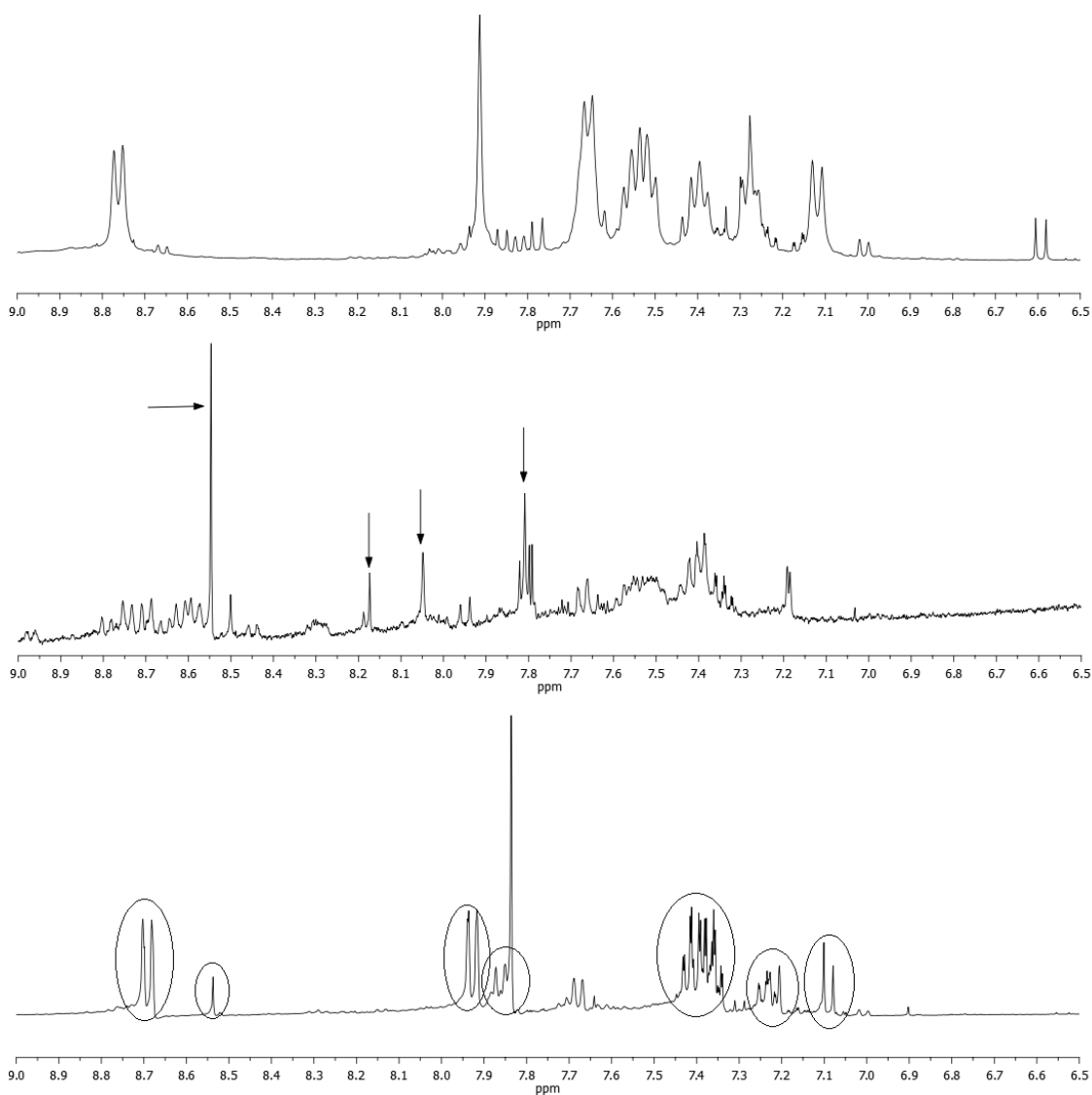


Figura 3-49. Espectro ¹H RMN do corante MB17; (b) Espectro ¹H do controle da degradação de MB17; (c) Espectro ¹H RMN da degradação de MB17 com PpAzoR.

Resultantes da clivagem da ligação azo, pela enzima redutora PpAzoR, são esperados duas aminas aromáticas, uma delas em comum com o corante **MB3** (**Figura 3-50**):

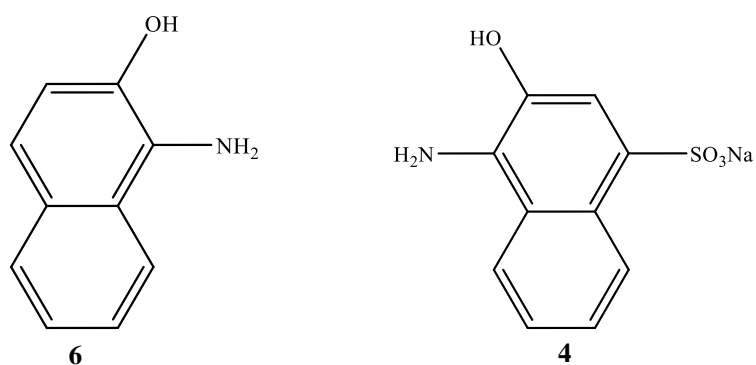
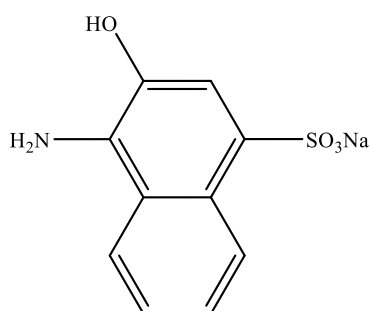


Figura 3-50. Aminas aromáticas esperadas como produtos resultantes da degradação do corante *MB17* pela enzima PpAzoR.

Para facilitar a identificação dos produtos da reação com a PpAzoR, fez-se a comparação dos espectros com as amostras comerciais das aminas **6** (Figura 3-51A) e **4** (Figura 3-51B).

Através da análise dos espectros, é possível afirmar que o produto final da degradação do corante *MB17* com a PpAzoR é a amina aromática **4**, sendo que não existem indícios de que a outra amina esteja presente em solução. A formação deste produto da reação com a PpAzoR é comum com o corante *MB3*.



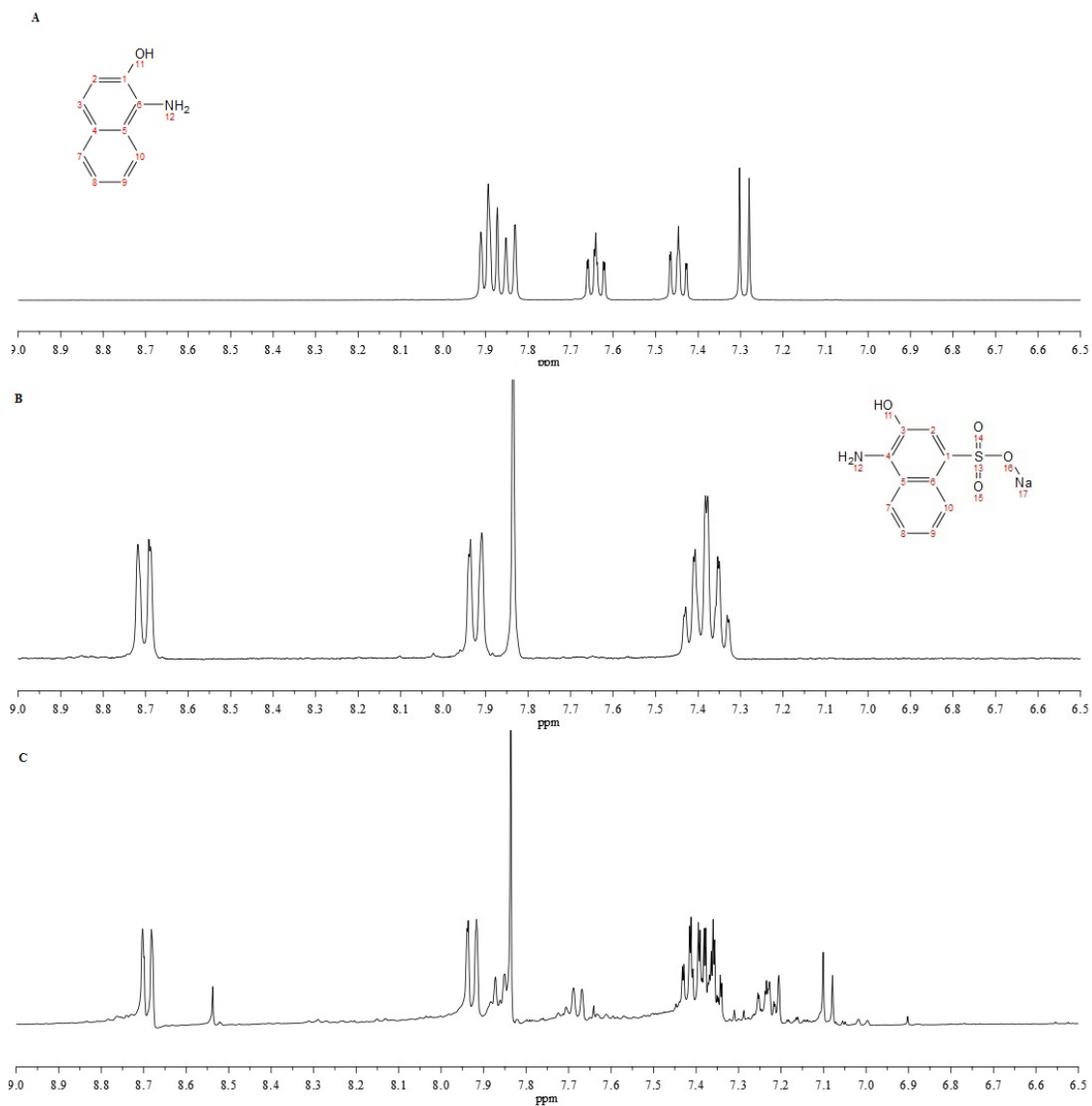


Figura 3-51. (a) Espetro ¹H RMN da amostra comercial de 6; (b) Espetro ¹H RMN da amostra comercial de 4; (c) Espetro ¹H RMN da degradação de MB17 com PpAzoR.

De notar que dos sinais assinalados no espetro da reação de degradação do corante **MB17** com PpAzoR, alguns sinais não foram atribuídos e, aparentemente, não aparecem no espetro de controlo.

Caracterização dos compostos produzidos pela degradação com CotA-lacase

Tal como no caso da reação enzimática com a PpAzoR, o espetro do corante **MB17** (Figura 3-52A) e do controlo da reação de biotransformação com CotA-lacase (Figura 3-52B) foram comparados. A comparação entre estes espetros revela a existência de modificações ao nível da

estrutura do corante no controle, que estão devidamente assinalados com setas. Então, a estrutura do próprio corante altera-se, mesmo na ausência de enzima, ao longo do tempo.

Foi também realizada a comparação dos espectros anteriores com o espectro da reação de biotransformação com CotA-lacase (**Figura 3-52C**). Verifica-se que existem alterações, pois é visível o aparecimento de novos sinais.

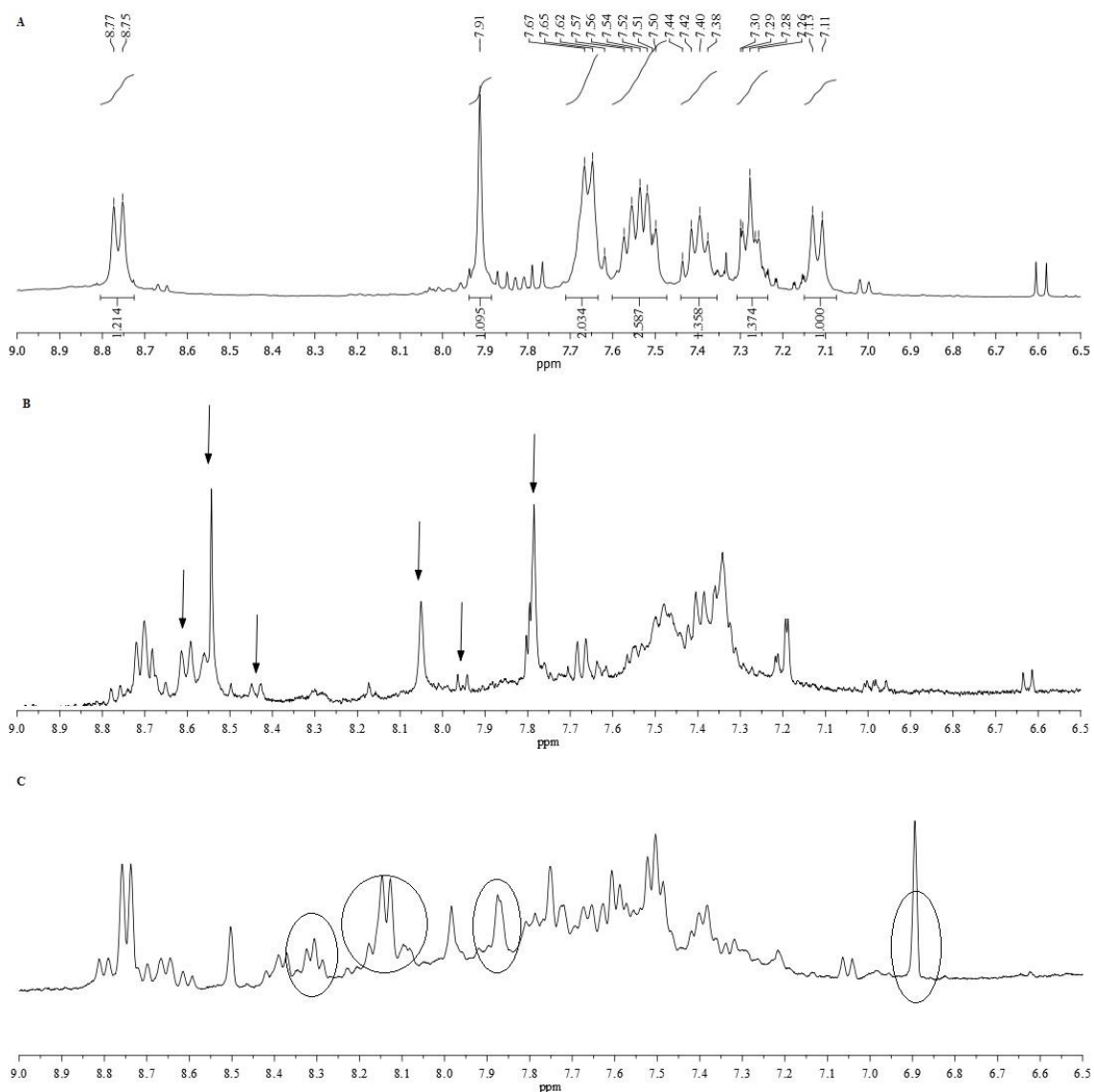


Figura 3-52. (a) Espectro ^1H RMN do corante MB17; (b) Espectro ^1H RMN do controle da reação biotransformação; (c) Espectro ^1H RMN da biotransformação com CotA-lacase.

Relativamente aos controlos das reações enzimáticas com PpAzoR (**Figura 3-49B**) e CotA-lacase (**Figura 3-52B**), a comparação entre os espetros revela diferenças estruturais entre ambos, ou seja, a estrutura do corante vai sofrendo alterações ao longo do tempo.

Foi feita a comparação entre os espetros da reação com as enzimas PpAzoR e CotA-lacase (**Figura 3-53**). Na reação com a CotA-lacase, observam-se novos sinais, que resultam da transformação da amina **4**. No entanto, não existem sinais que coincidam com outros produtos da reação da PpAzoR, ou seja, a amina **6** não está presente em ambas as amostras.

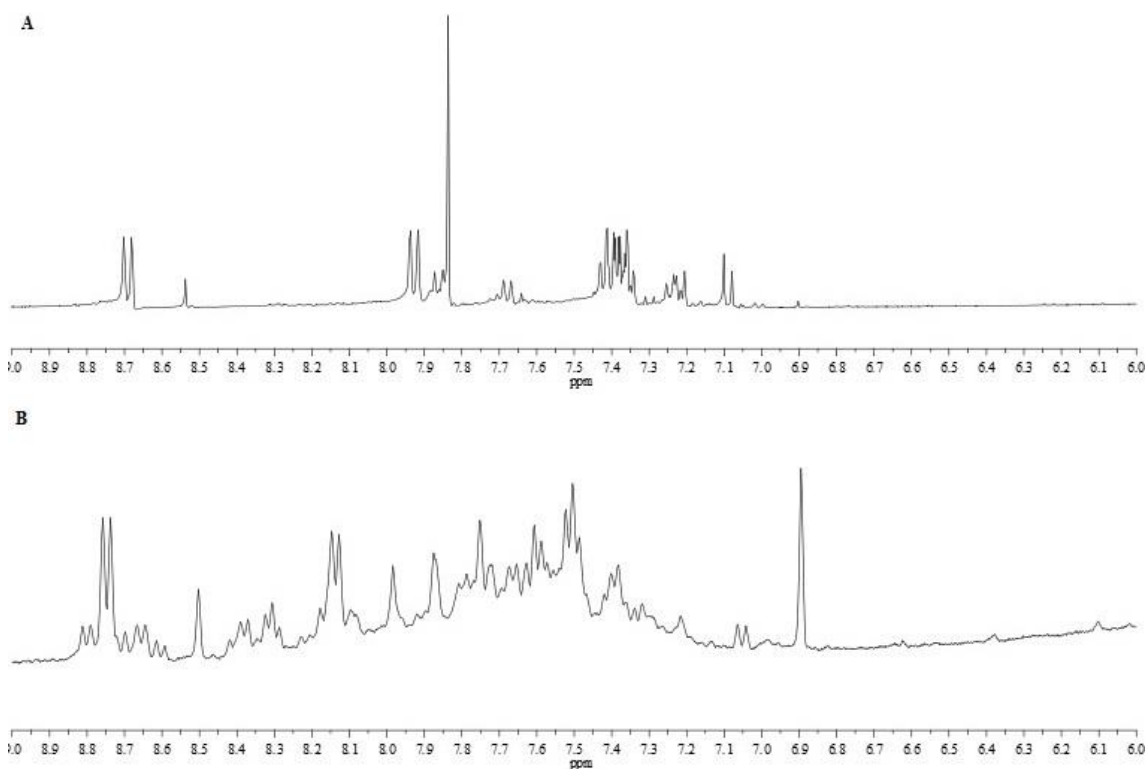


Figura 3-53. (a) Espetro ^1H RMN da degradação do corante *MB17* com PpAzoR; (b) Espetro ^1H RMN da reação de biotransformação com CotA-lacase.

Finalmente, a comparação entre os espetros obtidos dos produtos da reação da CotA com os corantes *MB3* e *MB17* (**Figuras 3-42C** e **3-52C**) revela que existe um produto em comum (que resulta da transformação da amina presente como produto da reação com a PpAzoR), que é o maioritário, e mais alguns sinais menos intensos e que não são comuns aos dois corantes.

Estudos anteriores com a CotA-lacase, usando as aminas aromáticas **4** e **6** como substratos, mostraram que ambas as aminas são transformadas pela CotA-lacase, originando respetivamente os produtos (Sousa *et al.*, 2014a; Sousa *et al.*, 2014b) apresentados na **Figura 3-54**:

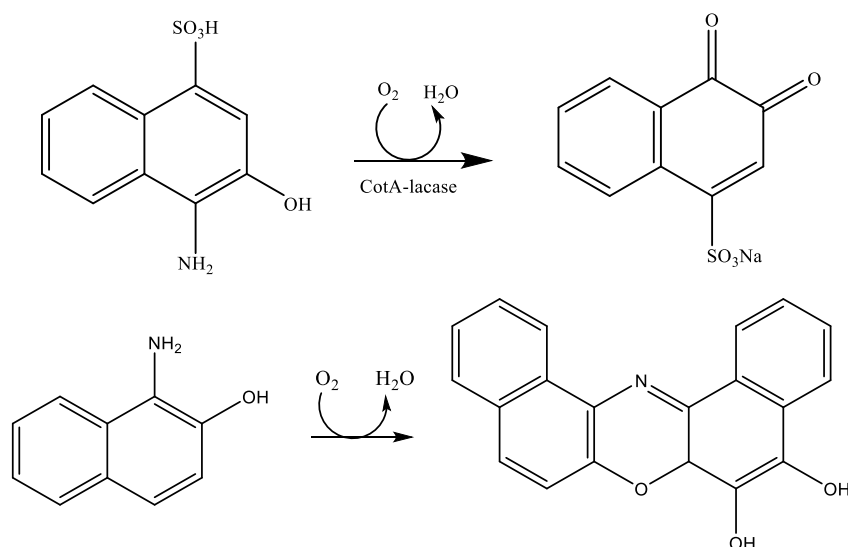


Figura 3-54. Biotransformação das aminas aromáticas 4 e 6 pela CotA-lacase (Sousa *et al.*, 2014a; Sousa *et al.*, 2014b).

Baseado nesses resultados, os espectros de RMN correspondentes aos produtos foram comparados com os obtidos neste trabalho. Assim, observa-se a presença dos sinais referentes à *orto*-quinona como produto da reação, resultante da transformação da amina aromática **4** pela CotA-lacase (**Figura 3-55**). Em contrapartida, os sinais correspondentes ao produto da biotransformação da amina **6** não estão presentes. Este resultado está de acordo com as observações retiradas, pois esta amina não foi observada como produto da reação de degradação do corante **MB17** com a enzima PpAzoR.

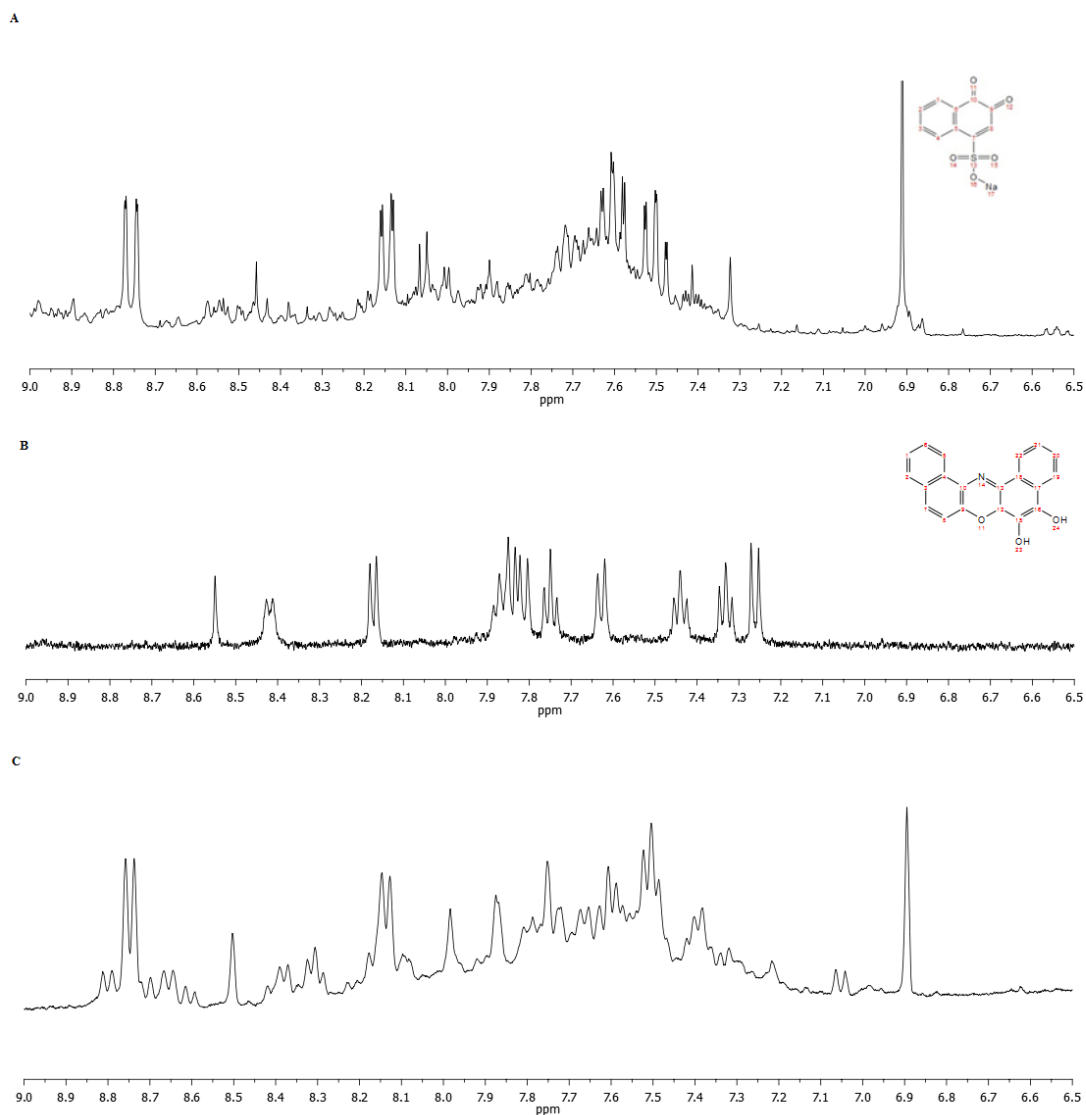


Figura 3-55. (a) Espetro ^1H RMN da reação entre a amostra comercial de 4 com CotA-lacase; (b) Espetro ^{15}N RMN da reação entre a amostra comercial de 6 com CotA-lacase; (c) Espetro ^1H RMN da reação de biotransformação com CotA-lacase.

Como forma de resumo do estudo do corante azo *MB17*, na **Figura 3-56** está apresentado um esquema reacional da degradação enzimática do mesmo, em que a degradação pela enzima PpAzoR originou uma amina, e a ação sequencial da CotA-lacase sob estas aminas originou uma *orto*-quinona.

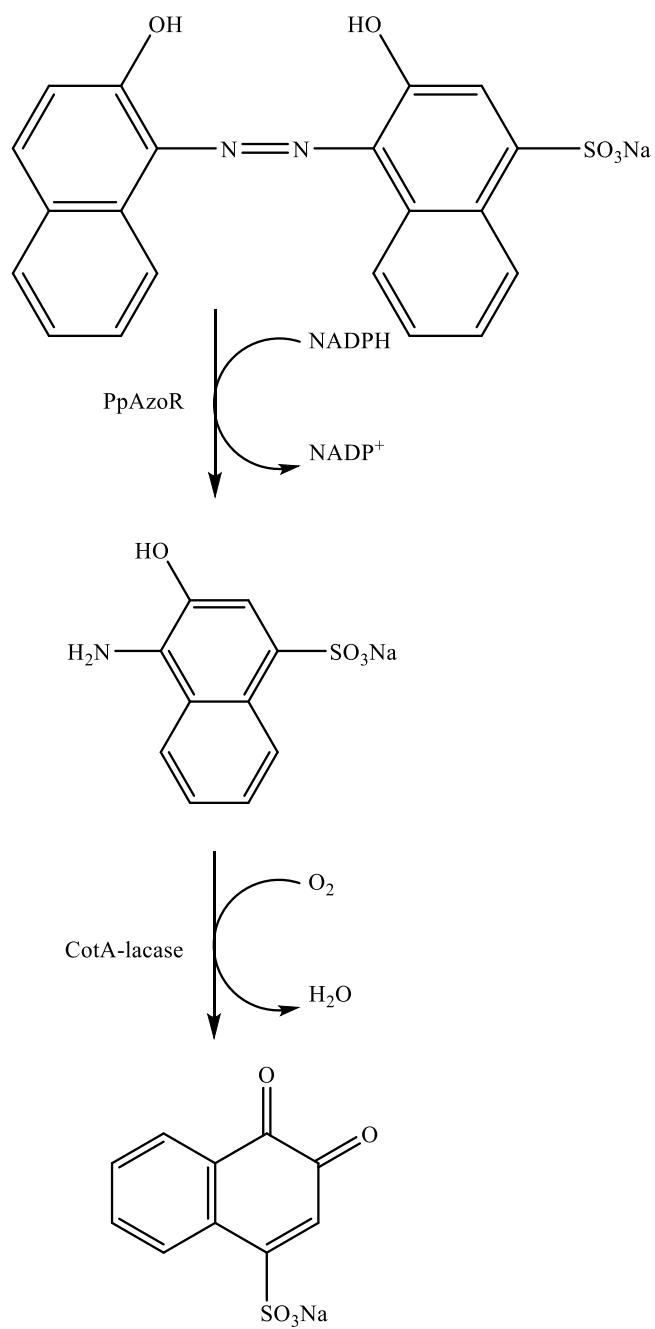


Figura 3-56. Esquema reacional da degradação enzimática do corante azo MB17.

3.5.4. RY145

Todo o estudo deste corante foi realizado em metanol deuterado e DMSO deuterado, pois, após estudo da solubilidade, quer do corante, quer dos controlos e produtos das reações, verificou-se que estes eram os solventes mais adequados.

O espectro de ^1H RMN do corante **RY145** original (**Figura 3-57**) foi traçado com o objetivo de atribuir os sinais dos espectros aos prótons correspondentes.

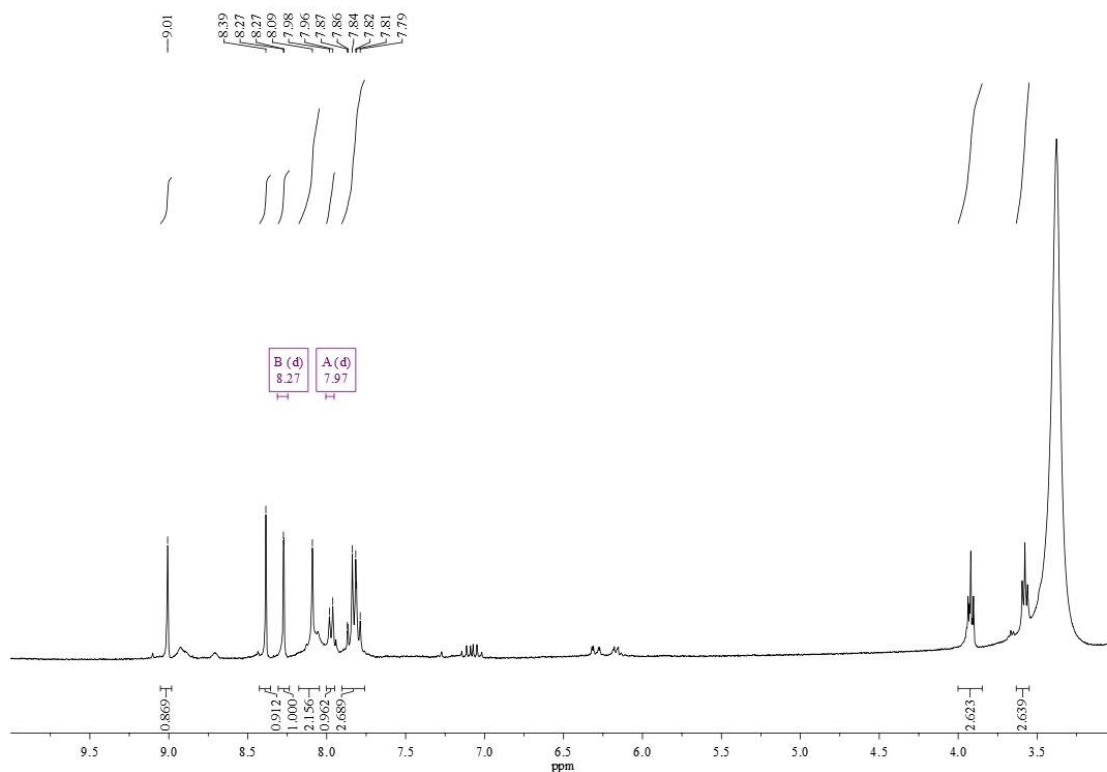


Figura 3-57. Espectro ^1H RMN do corante **RY145** em DMSO deuterado.

Após análise do espectro e comparação com a estrutura química do corante, foi possível atribuir os sinais do corante, verificando-se que este tem a estrutura esperada (**Figura 3-58**).

Análise do espectro ^1H RMN em MeOD, na região do espectro entre 10.0 e 0.0 ppm (400 MHz): δ (ppm) = 9.01 (s, 1H, H7); 8.39 (s, 1H, H10); 8.27 (d, 1H, $J = 1.6$ Hz, H13); 8.09 (s, 2H, H1, H3); 7.96 (d, 1H, $J = 8.5$ Hz, H16); 7.83 (m, 4H, H15, H21, H22, H23); 3.92 (t, 2H, $J = 8.6$ Hz, H27); 3.58 (t, 2H, $J = 8.6$ Hz, H26).

Resultantes da clivagem da ligação azo, pela enzima redutora PpAzoR, são esperados duas aminas aromáticas (**Figura 3-60**):

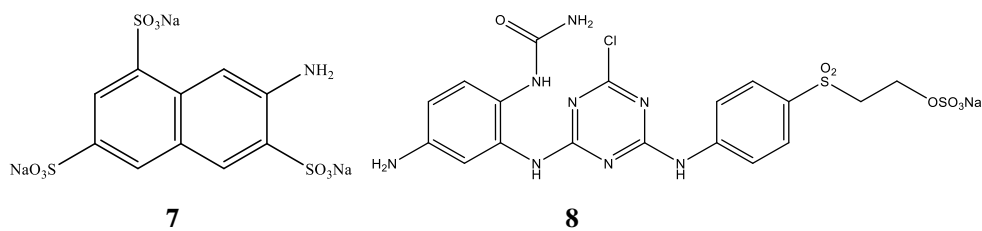


Figura 3-60. Aminas aromáticas esperadas como produtos resultantes da degradação do corante *RY145* pela enzima PpAzoR.

Através da análise dos espectros, é possível afirmar que o produto final da degradação do corante *RY145* com a PpAzoR é a amina aromática **7**, caracterizada por quatro sinais singleto na zona aromática, mais visíveis nos espectros em MeOD, devidamente assinalados com elipses (Figura 3-61B). Não há indícios, em ambos os solventes, de que a outra amina aromática esteja presente em solução.

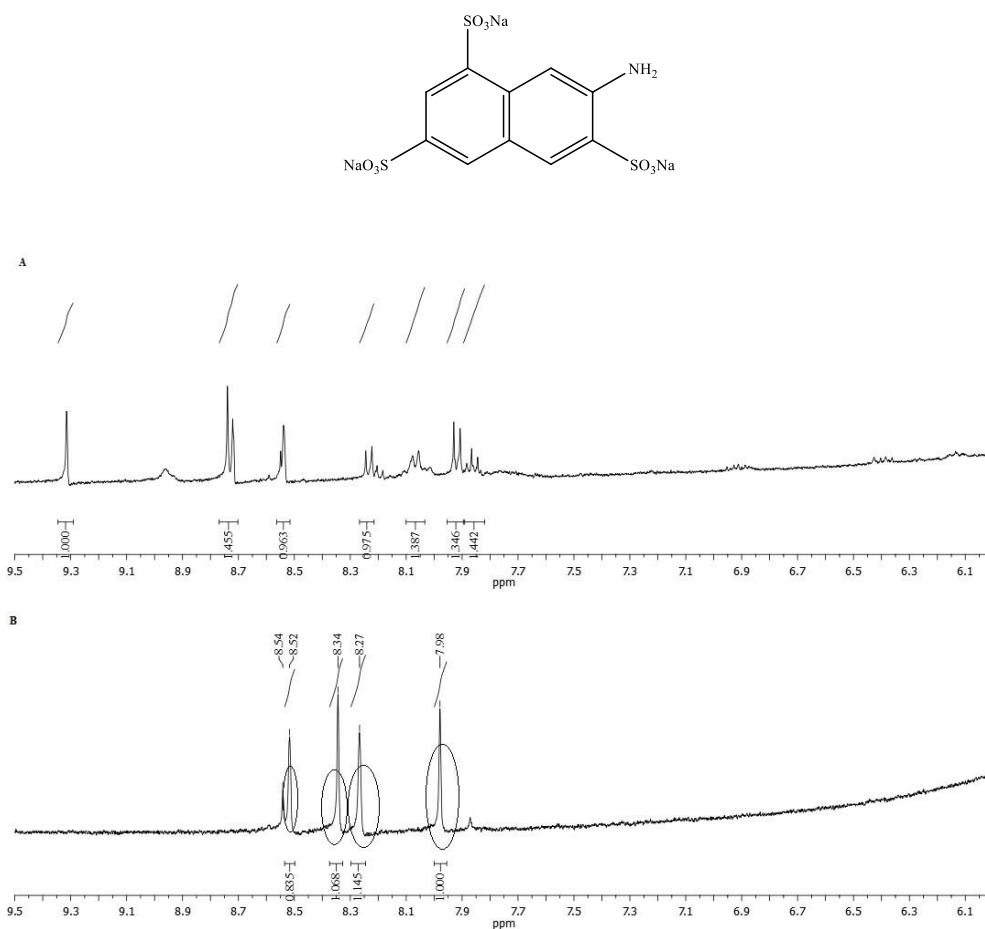


Figura 3-61. (a) Espectro ^1H RMN do controlo da degradação de *RY145* na ausência de enzima, em metanol deuterado; (b) Espectro ^1H RMN da reação de degradação de *RY145* com PpAzoR, em metanol deuterado.

Caracterização dos compostos produzidos pela degradação com CotA-lacase

Os espectros referentes à reação com CotA-lacase foram realizados em metanol deuterado, pois a amostra é totalmente insolúvel em DMSO-d⁶.

Tal como no caso da reação enzimática com a PpAzoR, foram comparados os espectros do corante *RY145* (**Figura 3-62A**) e do controlo da reação de biotransformação, com CotA-lacase (**Figura 3-62B**), em DMSO-d⁶. Apesar da má resolução do espectro, é possível visualizar os sinais no controlo referentes ao corante, o que garante que o corante não sofreu alterações.

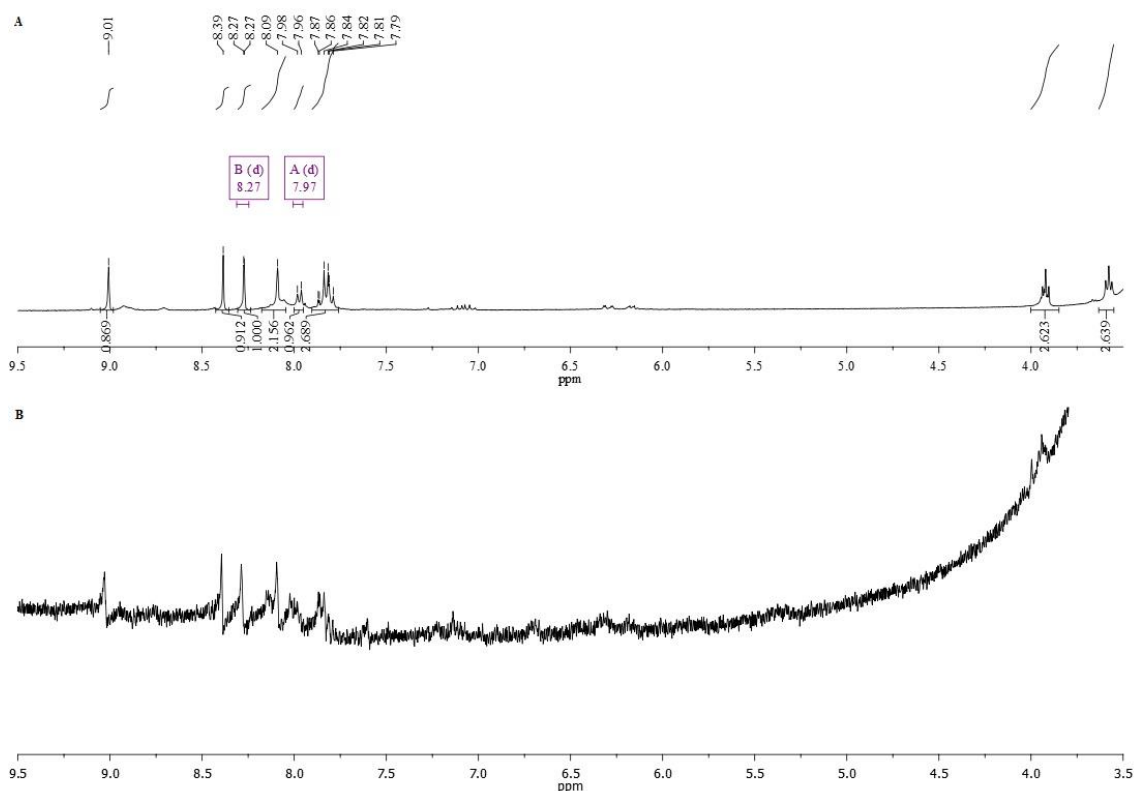


Figura 3-62. (a) Espectro ¹H RMN do corante *RY145*; (b) Espectro ¹H RMN do controlo da biotransformação com CotA-lacase, em DMSO-d₆.

A comparação entre os espectros da reação com as enzimas PpAzoR e CotA-lacase (**Figura 3-63**) revela que, em ambos os espectros, estão presentes quatro singletos, correspondentes ao mesmo produto, neste caso à amina aromática **7**, produzida pela degradação do corante *RY145* por PpAzoR. Desta forma, pode-se concluir que esta amina aromática não foi transformada pela CotA-lacase, pois não é substrato para esta enzima.

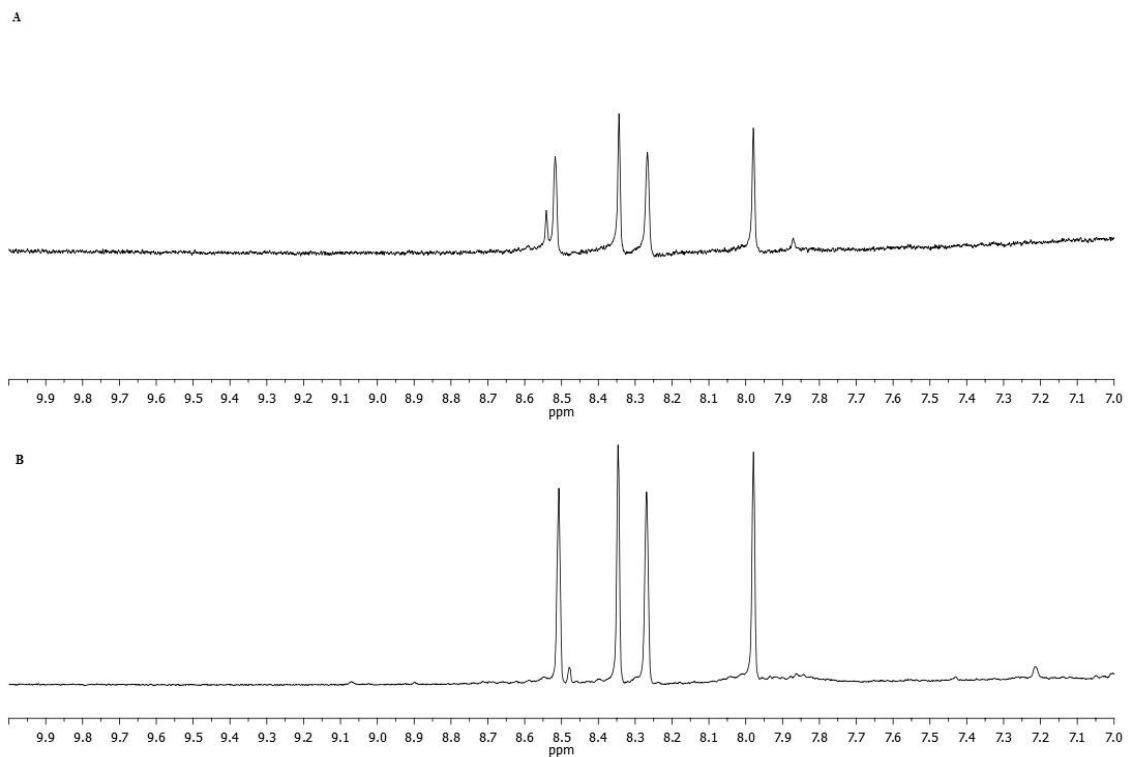


Figura 3-63. (a) Espectro ¹H RMN da degradação do corante *RY145* com PpAzoR; (b) Espectro ¹H RMN da reação de biotransformação com CotA-lacase, em metanol deuterado.

Como forma de resumo do estudo do corante azo **RY145**, na **Figura 3-64** está apresentado um esquema reacional da degradação enzimática do mesmo, em que a degradação pela enzima PpAzoR originou uma amina, sendo que a enzima CotA-lacase não a usou como substrato, ou seja, não houve formação de qualquer produto resultante da biotransformação por esta enzima.

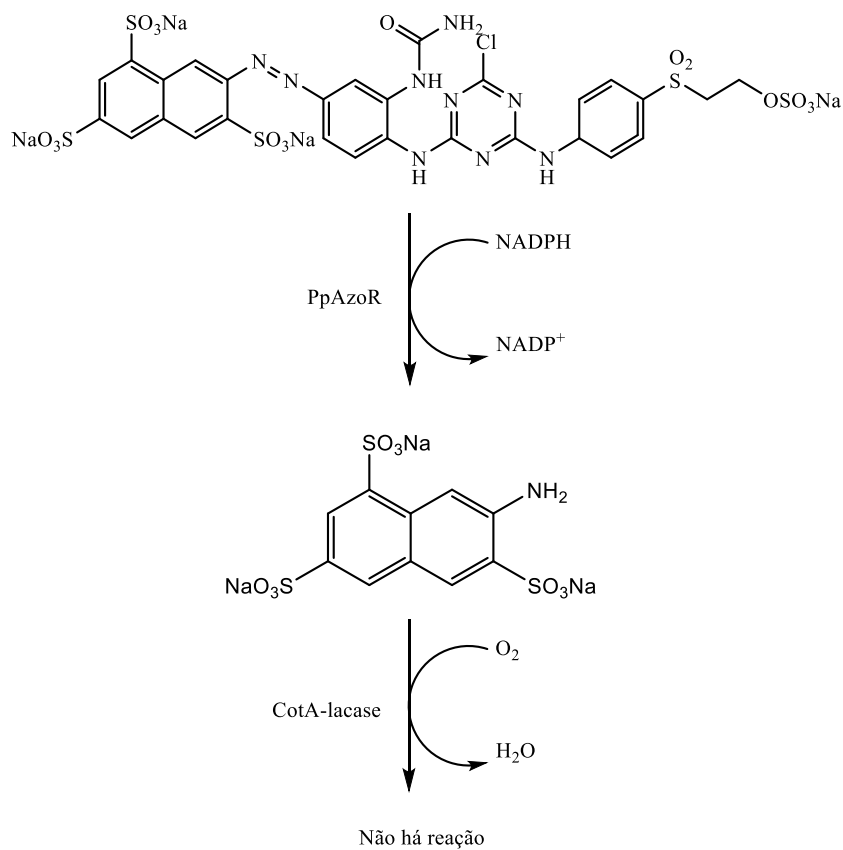


Figura 3-64. Esquema reacional da degradação enzimática do corante azo **RY145**.

3.5.5. MB9

Todo o estudo deste corante foi realizado em metanol deuterado pois, após estudo da solubilidade, quer do corante, quer dos controlos e produtos das reações, verificou-se que este era o solvente mais adequado.

O espectro de ^1H RMN do corante **MB9** original (**Figura 3-65**) foi traçado com o objetivo de atribuir os sinais dos espectros aos prótons correspondentes. Assinalado no espectro estão as impurezas que o corante contém.

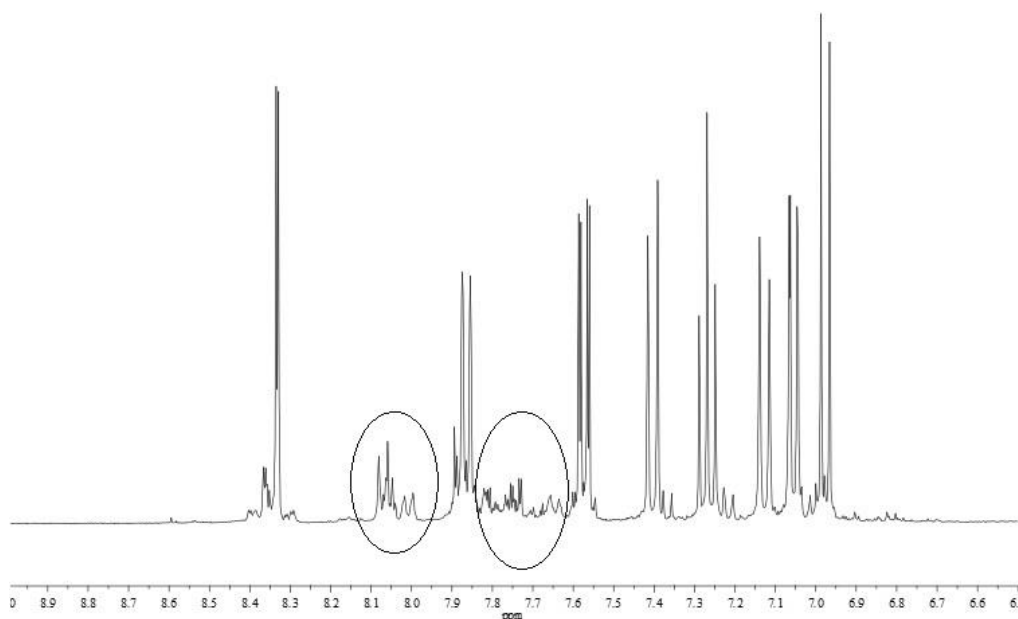


Figura 3-65. (a) Espectro ^1H RMN do corante **MB9**.

Após análise do espectro e comparação com a estrutura química do corante, foi possível atribuir os sinais do corante, verificando-se que este tem a estrutura esperada (**Figura 3-66**).

Análise do espectro ^1H RMN em MeOD, na região do espectro entre 6.5 e 0.0 ppm (400 MHz):
 δ (ppm) = 8.33 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H, H16); 7.86 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H, H6); 7.57 (dd, $J = 8.4, 2.0$ Hz, 1H, H14), 7.40 (d, $J = 9.7$ Hz, 1H, H9); 7.27 (t, $J = 7.9$ Hz, 1H, H5); 7.13 (d, $J = 9.6$ Hz, 1H, H10); 7.05 (dd, $J = 7.8, 1.2$ Hz, 1H, H4); 6.98 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H, H13).

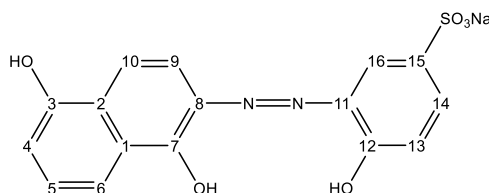


Figura 3-66. Estrutura do corante **MB9** com as posições identificadas.

Caracterização dos compostos produzidos pela degradação com PpAzoR

Para verificar se o corante sofria alterações ao longo do tempo de reação, o espectro do corante (**Figura 3-67A**) e do controle da reação (**Figura 3-67B**) foram comparados. Esta análise revela que não existem modificações ao nível da estrutura do corante ao longo do tempo.

Foi também realizada a comparação entre os espectros da degradação do corante **MB9** com PpAzoR (**Figura 3-67C**) e os espectros anteriores. Verifica-se que existem alterações, pois alguns sinais característicos do corante desapareceram, dando origem a novos sinais, assinalados com elipses, o que revela ação da enzima sobre o corante.

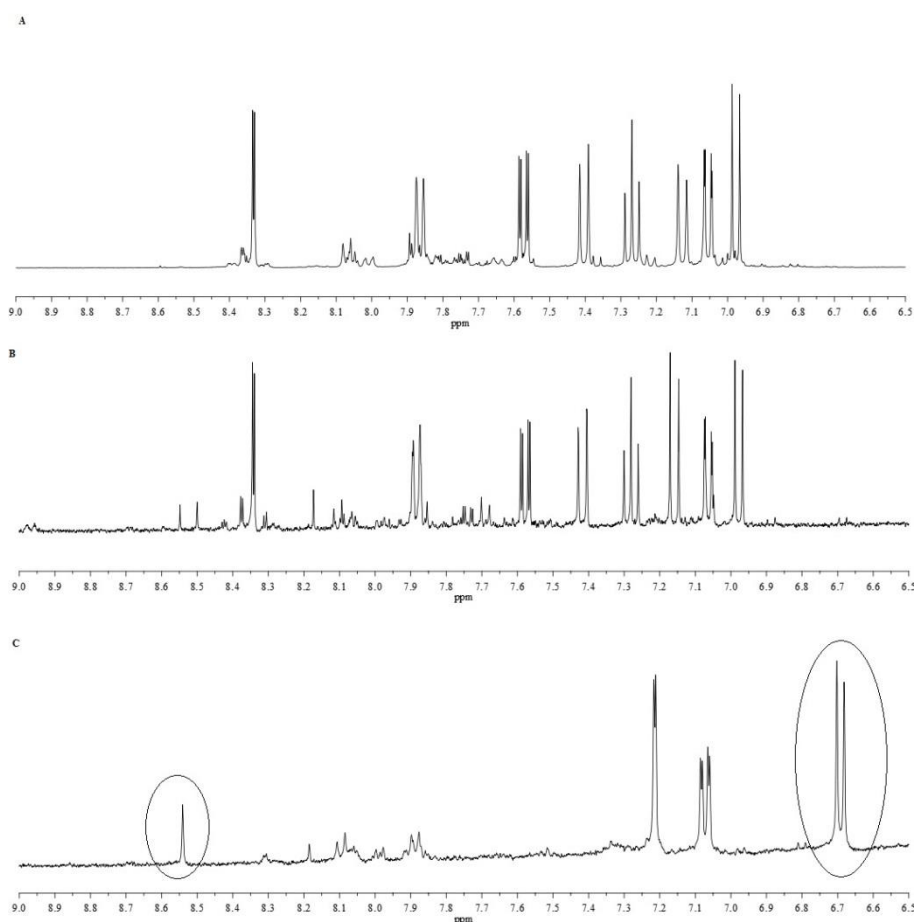


Figura 3-67. (a) Espectro ¹H RMN do corante **MB9I**; (b) Espectro ¹H RMN do controlo da degradação de **MB9** na ausência de enzima; (c) Espectro ¹H RMN da reação de degradação de **MB9** com PpAzoR.

Resultantes da clivagem das ligações azo, pela enzima redutora PpAzoR, são esperadas, como produtos possíveis, duas aminas aromáticas (**Figura 3-68**):

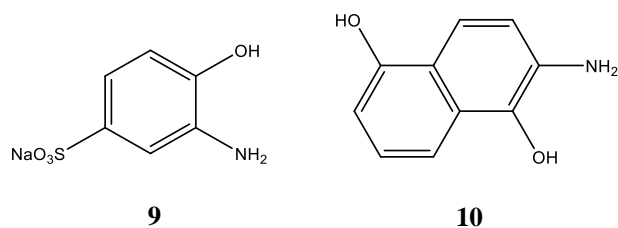
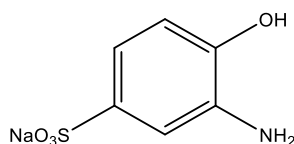


Figura 3-68. Aminas aromáticas esperadas como produtos resultantes da degradação do corante MB9 pela enzima PpAzoR.

A análise dos espectros de ^1H RMN dos produtos das reações com a enzima revelou a presença de sinais que podem ser atribuídos à amina **9**:



Os restantes sinais que aparecem no espectro correspondem a impurezas iniciais no corante que não foram transformadas por ação da enzima PpAzoR. A outra amina não aparece como produto da reação.

Caracterização dos compostos produzidos pela degradação com CotA-lacase

Tal como no caso da reação enzimática com a PpAzoR, o espectro do corante **MB9** (**Figura 3-69A**) e do controlo da reação de biotransformação (**Figura 3-69B**) foram comparados. Esta análise revela que não existem modificações ao nível da estrutura do corante no controlo.

Foi também realizada a comparação entre os espectros da biotransformação com a CotA-lacase (**Figura 3-69C**) e os espectros anteriores. Verifica-se que existem alterações, pois alguns sinais característicos do corante desapareceram, dando origem a novos sinais, o que revela ação da enzima sobre o corante.

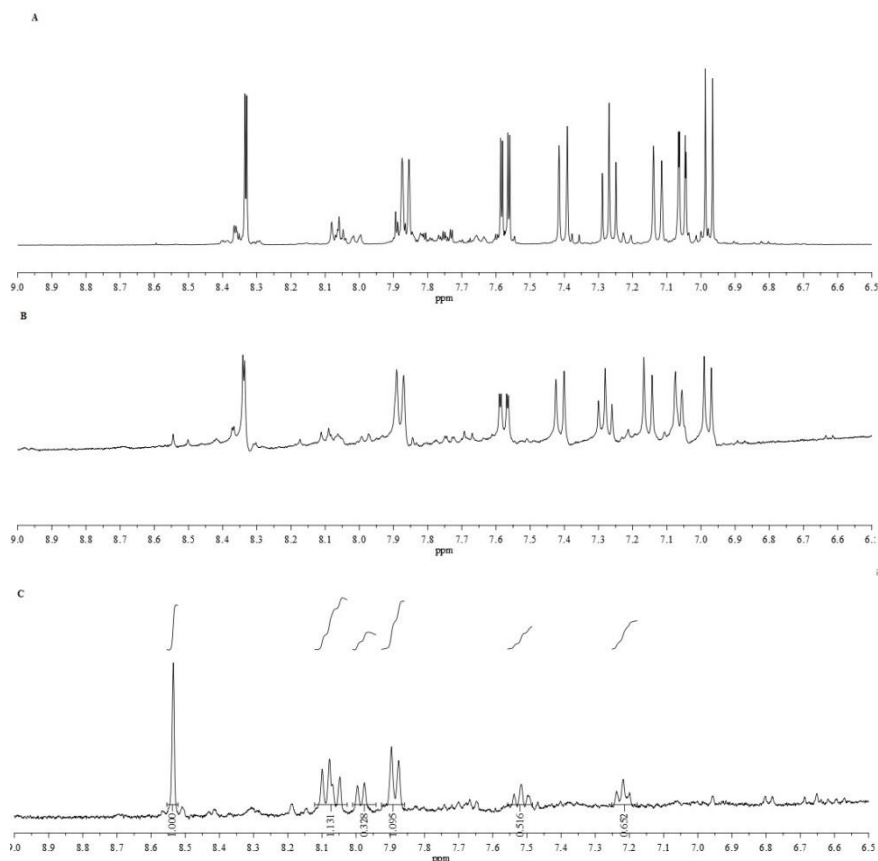


Figura 3-69. (a) Espectro ^1H RMN do corante MB9; (b) Espectro ^1H RMN do controlo da biotransformação; (c) Espectro ^1H RMN da biotransformação com CotA-lacase.

Também foi realizada uma comparação entre os espectros da reação com as enzimas PpAzoR (**Figura 3-70A**) e CotA-lacase (**Figura 3-70B**). É possível observar o desaparecimento de alguns dos sinais, presentes no espectro referente à reação com PpAzoR, e o aparecimento de novos sinais, com intensidade mais fraca. Contudo, não foi possível a identificação do produto resultante da biotransformação da amina aromática com a CotA-lacase.

A biotransformação a amina aromática **9** com uma lacase isolada de *Cerrena unicolor* foi anteriormente reportada (Fortes *et al.*, 2010), dando origem a uma fenoxazina, espécie dimérica de estrutura semelhante às encontradas nas reações com a CotA-lacase (**Figura 3-71**). No entanto, a comparação dos dados de RMN da literatura com os do espectro obtido no mesmo solvente permitem concluir que, neste caso, não há formação deste dímero.

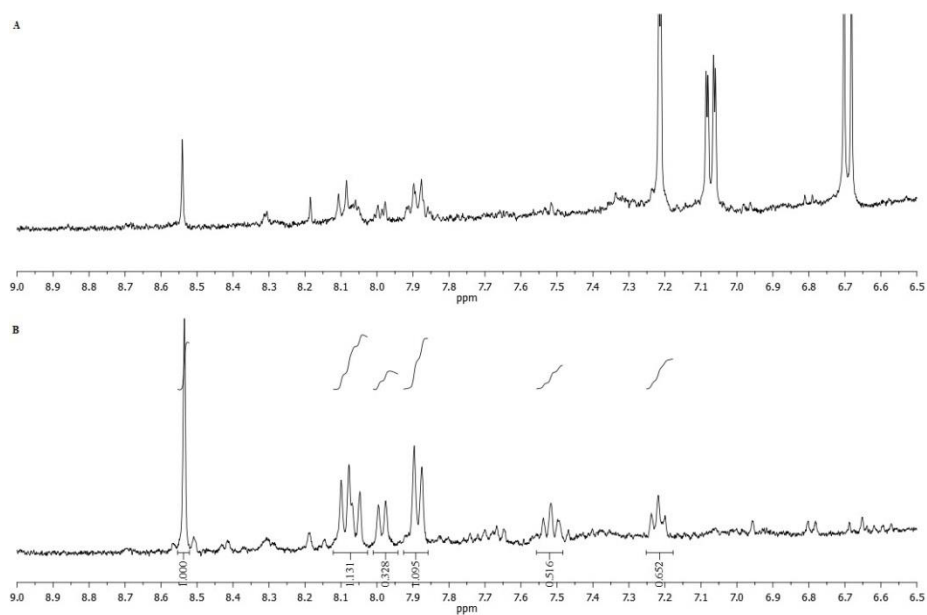


Figura 3-70. (a) Espectro ^1H RMN do controle da reação de degradação de *MB9* com PpAzoR; (b) Espectro ^1H RMN do controle da reação de biotransformação dos produtos da reação de degradação do corante *MB9*, por PpAzoR, com CotA-lacase.

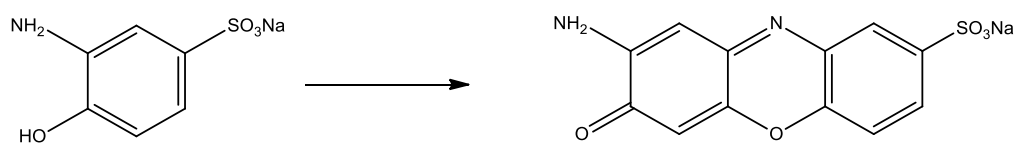


Figura 3-71. Biotransformação da amina aromática **9** pela lacase de *Cerrena unicolor* (Fortes *et al.*, 2010).

3.5.6. DB38

Todo o estudo deste corante foi realizado em metanol deuterado pois, após estudo da solubilidade, quer do corante, quer dos controlos e produtos das reações, verificou-se que este era o solvente mais adequado.

O espetro de ^1H RMN do corante **DB38** original (**Figura 3-72**) foi traçado e, uma vez que este apresenta uma estrutura complexa, a atribuição dos sinais só foi possível recorrendo ao ^1H - ^1H COSY (Correlation Spectroscopy). Através do espetro COSY apresentado (**Figura 3-73**), foi possível atribuir os sinais do corante, verificando-se que este tem a estrutura esperada (**Figura 3-74**).

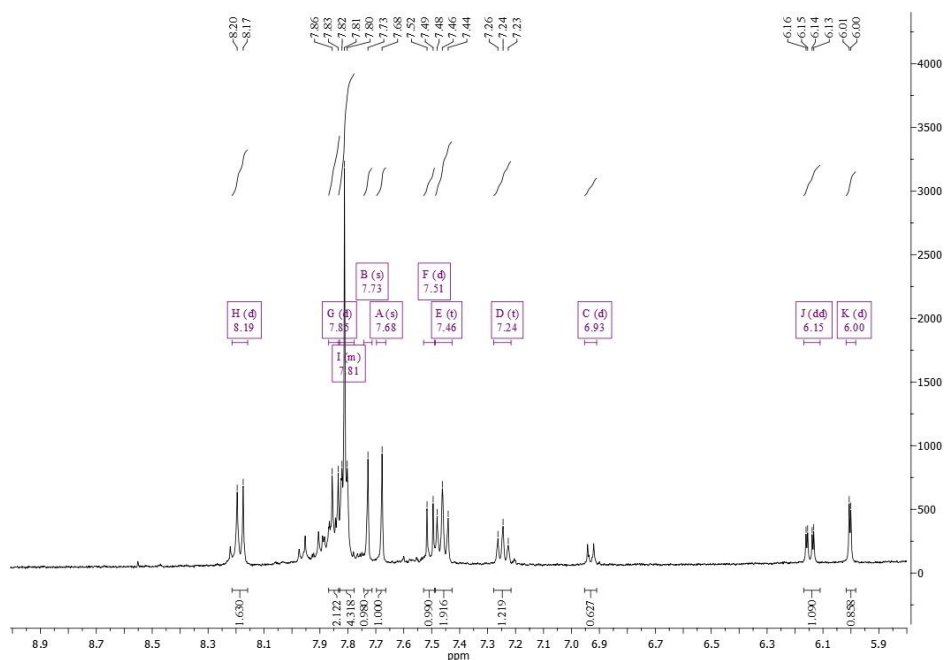


Figura 3-72. Espetro ^1H RMN do corante **DB38**.

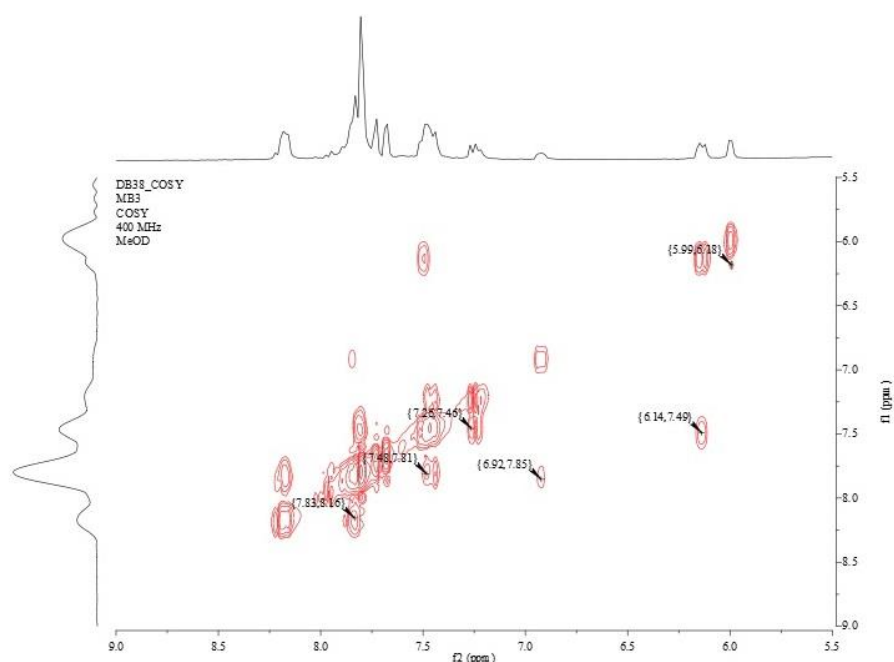


Figura 3-73. Espectro de RMN 2D – COSY do corante *DB38*.

Análise do espectro ^1H RMN em MeOD (400 MHz): δ (ppm) = 8.19 (d, 2H, $J = 8.6$ Hz, H7, H11); 7.85 (d, 2H, $J = 8.7$ Hz, H30, H33); 7.81 (m, 6H, H8, H10, H13, H14, H16, H17); 7.73 (s, 1H, H28); 7.68 (s 1H, H23); 7.51 (d, 1H, $J = 8.8$ Hz, H4); 7.46 (t, 2H, $J = 8.0$ Hz, H31, H33); 7.24 (t, 1H, $J = 7.4$ Hz, H32); 6.15 (dd, 1H, $J = 8.7$ Hz, 2.3 Hz, H5); 6.01 (d, 1H, $J = 2.3$ Hz, H1).

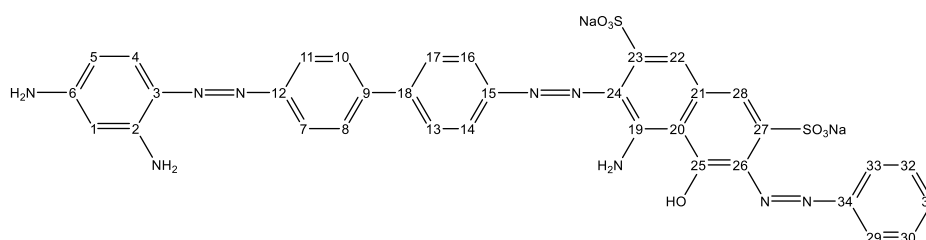


Figura 3-74. Estrutura do corante *DB38* com as posições identificadas.

Caracterização dos compostos produzidos pela degradação com PpAzoR

A comparação dos espectros do corante (**Figura 3-75A**) e do controlo da reação de degradação (**Figura 3-75B**) revela que não existem modificações ao nível da estrutura do corante ao longo do tempo.

A comparação destes espectros com o da reação de degradação do corante *DB38* com PpAzoR (**Figura 3-75C**) mostra que existem alterações, pois alguns sinais

característicos do corante desapareceram, dando origem a novos sinais, assinalados com elipses, o que revela ação da enzima sobre o corante.

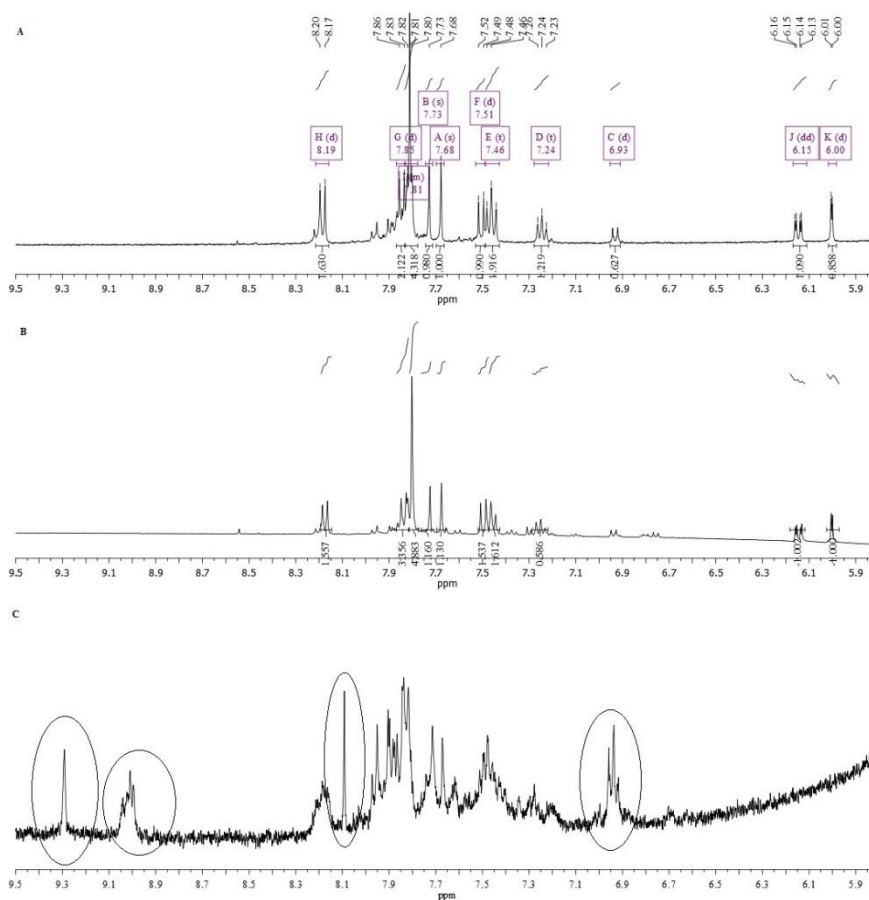


Figura 3-75. (a) Espetro ¹H RMN corante DB38; (b) Espetro ¹H do controle da degradação do corante DB38; (c) Espetro ¹H da degradação do corante DB38 com PpAzoR.

Resultantes da clivagem da ligação azo, pela enzima redutora PpAzoR, são esperados quatro aminas aromáticas (Figura 3-76):

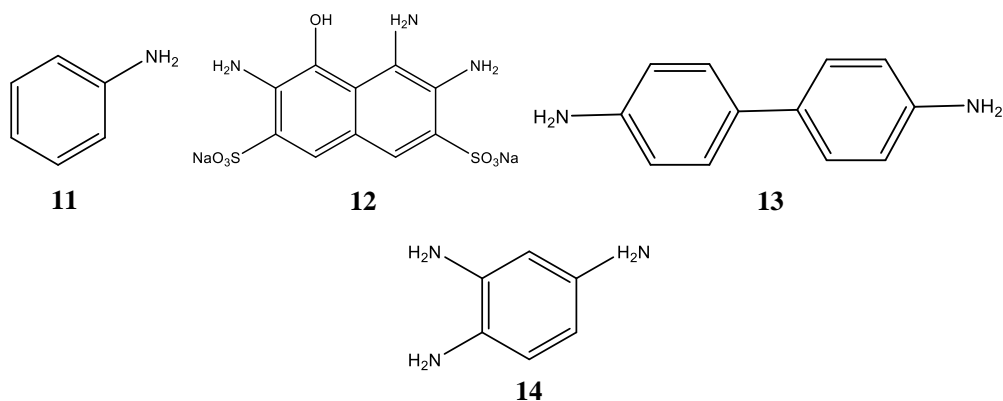


Figura 3-76. Aminas aromáticas esperadas como produtos resultantes da degradação do corante *DB38* pela enzima PpAzoR.

A complexidade de sinais no espectro parece ser indicativa da presença de mais do que um produto. A ausência de amostras padrão para as aminas **12**, **13** e **14** não permitiu a sua comparação com o espectro da reação com a PpAzoR, nem a identificação dos produtos obtidos. A comparação do espectro da reação com o da anilina (**11**) permitiu concluir que esta amina não se encontra presente na mistura final. Será necessário separar os compostos na amostra, para posterior identificação, e só nessa situação é que as possibilidades de reação com a CotA-lacase poderiam ser avaliadas. Desta forma, os resultados não foram conclusivos.

Caracterização dos compostos produzidos pela degradação com CotA-lacase

Tal como no caso da reação enzimática com a PpAzoR, o espectro do corante **DB38** (**Figura 3-77A**) e do controlo da reação de biotransformação com CotA-lacase (**Figura 3-77B**) foram comparados. A comparação entre estes espectros revela que não existem modificações ao nível da estrutura do corante ao longo do tempo. A comparação dos espectros anteriores com o espectro da biotransformação com CotA-lacase (**Figura 3-77C**) mostra que existem alterações, pois é visível o aparecimento de novos sinais, assinalados com setas.

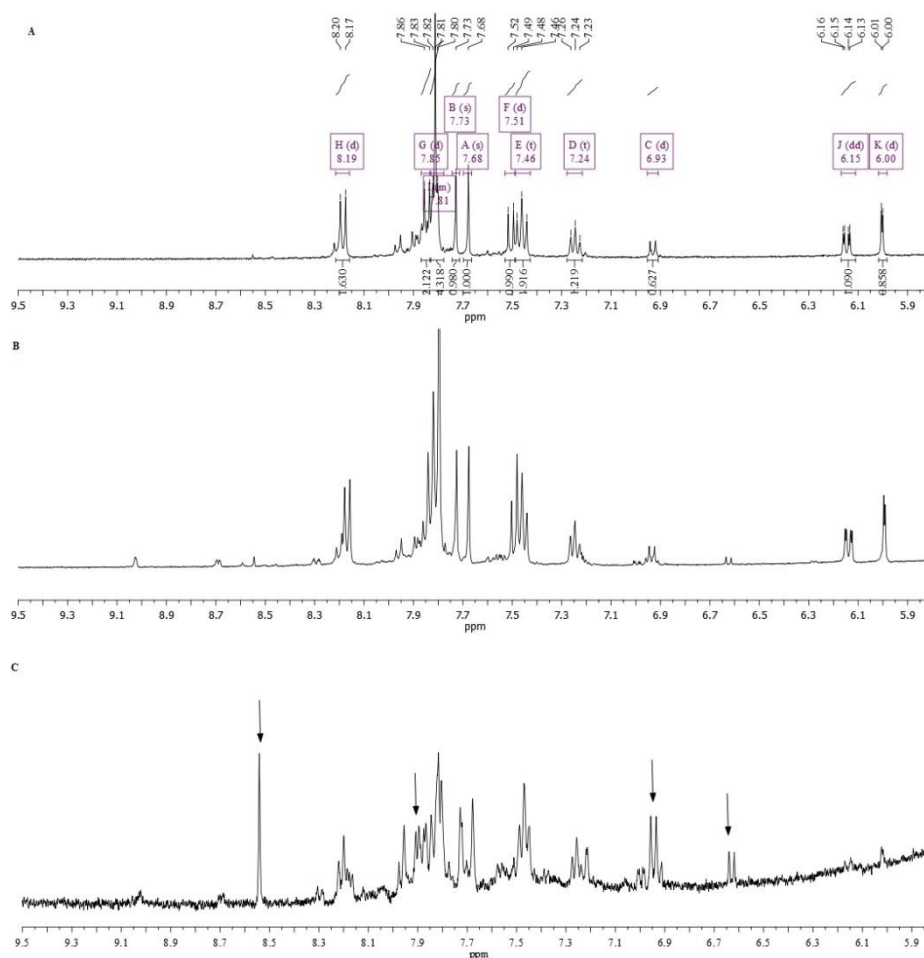


Figura 3-77. (a) Espectro ¹H RMN corante *DB38*; (b) Espectro ¹H RMN do controle da biotransformação; (c) Espectro ¹H RMN da biotransformação com *CotA*-lacase.

A comparação entre os espectros da reação com as enzimas *PpAzoR* (Figura 3-75C) e *CotA*-lacase (Figura 3-77C) mostra que não existem grandes alterações nas estruturas obtidas por ação da *CotA*, ou seja, não houve transformação, por parte da *CotA*-lacase, dos produtos resultantes da degradação pela *PpAzoR*.

3.5.7. *RB5*

O espectro de ¹H RMN do corante *RB5* original (ver em anexo Figura 7-2) foi traçado com o objetivo de atribuir os sinais dos espectros aos prótons correspondentes. Verificou-se, desde logo, que os sinais do espectro do corante em pó não correspondiam aos prótons da estrutura do mesmo (ver em anexo Figura 7-3).

Caracterização dos compostos produzidos pela degradação com PpAzoR

A comparação dos espectros do corante (ver em anexo **Figura 7-4A**) e do controle da degradação (ver em anexo **Figura 7-4B**) revela a existência de modificações na estrutura do corante ao longo do tempo pois, para além dos sinais do próprio corante, aparecem vários sinais novos, assinalados com setas. A comparação destes espectros com o obtido para a comparação entre os espectros da reação de degradação do corante **RB5** com PpAzoR (ver em anexo **Figura 7-4C**) mostra a presença do corante, no final da reação, como produto maioritário, o que significa que, ao fim de 24 horas, este ainda está presente na mistura reacional, tornando este corante mais recalcitrante do que os outros corantes estudados neste trabalho. Os restantes sinais estão igualmente presentes no espectro do controle.

Resultantes da clivagem da ligação azo, pela enzima redutora PpAzoR, são esperados duas aminas aromáticas (**Figura 3-78**):

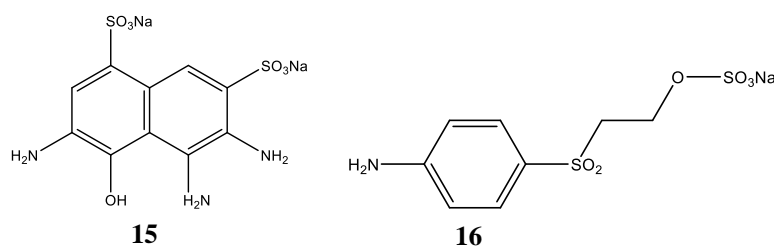


Figura 3-78. Aminas aromáticas esperadas como produtos resultantes da degradação do corante **RB5** pela enzima PpAzoR.

Para além dos sinais presentes no controlo, são visíveis mais alguns sinais vestigiais que podem ser atribuídos à amina **16**, embora este resultado não tenha sido confirmado com uma amostra comercial.

Caracterização dos compostos produzidos pela degradação com CotA-lacase

A comparação dos espectros do corante **RB5** (ver em anexo **Figura 7-5A**) e do controlo da reação de biotransformação (ver em anexo **Figura 7-5B**) revela a existência de modificações na estrutura do corante no controlo pois aparecem vários sinais novos, comuns aos encontrados no controlo da reação enzimática com a PpAzoR. Na reação enzimática (ver em anexo **Figura 7-5C**), verifica-se a presença maioritária do corante no final da reação e a presença dos mesmos sinais encontrados na reação com a PpAzoR, ou seja, não existiu ação por parte da CotA-lacase.

A comparação entre os espectros da reação com as enzimas PpAzoR (ver em anexo **Figura 7-4C**) e CotA-lacase (ver em anexo **Figura 7-5C**) mostra a semelhança entre os espectros, o que significa que não houve qualquer transformação dos produtos resultantes da degradação pela enzima PpAzoR, por parte da CotA-lacase. Como é possível verificar a existência de sinais relativos ao corante inicial em ambos os espectros como produto maioritário, pode-se concluir que o corante não foi degradado totalmente por nenhuma das enzimas.

Uma vez que este corante se revelou o mais recalcitrante à ação das duas enzimas, não se investiu na caracterização dos produtos obtidos.

3.5.8. AR266

Devido à insolubilidade em solventes deuterados e/ou má resolução dos espectros, não foi possível apresentar resultados, quer para a reação da degradação deste corante com a PpAzoR, quer para a reação com a CotA-lacase.

O espectro de H^1 RMN do corante **AR266** original (ver em anexo **Figura 7-6**) foi traçado com o objetivo de atribuir os sinais dos espectros aos prótons correspondentes. Verificou-se, desde logo, que os sinais do espectro do corante em pó correspondem aos prótons da estrutura do mesmo (ver em anexo **Figura 7-7**).

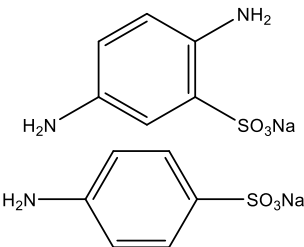
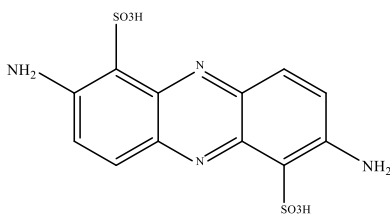
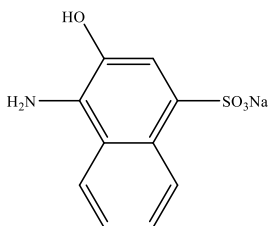
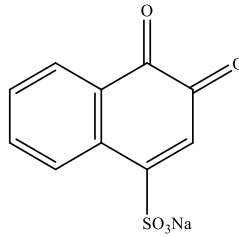
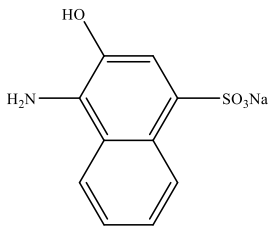
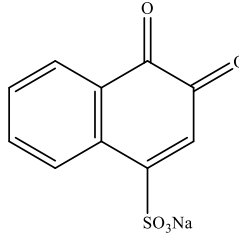
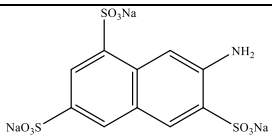
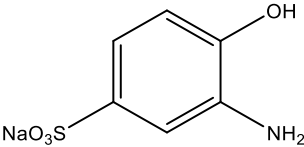
4. Conclusões

Os corantes sintéticos conferem cores intensas aos efluentes gerados em indústrias têxteis, alimentar, farmacêutica, entre outras. Este é um problema ambiental que merece toda a atenção pois as descargas não controladas destes efluentes para os ecossistemas circundantes levam à criação de problemas de saúde, ambientais e até estéticos.

Os tratamentos físico-químicos, para além de serem dispendiosos, não são totalmente eficientes. Já os tratamentos biológicos apresentam-se como “amigos do ambiente”, oferecendo um processo limpo economicamente viável. Neste trabalho, foram caracterizados os produtos resultantes da sinergia de duas enzimas, bem caracterizadas, cujo potencial na degradação de corantes azo está comprovada e documentada: a azoreductase de *Pseudomonas putida* e a lacase de *Bacillus subtilis*. Em quatro dos corantes estudados, **Direct Red 80**, **Mordant Black 3**, **Mordant Black 17** e **Reactive Yellow 145**, foram identificados os produtos das reações de degradação catalisadas por ambas as enzimas. Relativamente aos outros corantes estudados, foi possível a identificação dos produtos de degradação pela enzima PpAzoR, no corante **Mordant Black 9**, sendo que nos corantes **Acid Red 266**, **Reactive Black 5** e **Direct Black 38**, os produtos das duas reações não foram identificados (**Tabela 3-10**). De uma forma geral e num primeiro passo reacional em anaerobiose, foi possível observar que, em praticamente todos os corantes foi obtida, em pequena escala, uma percentagem de descoloração de 100%. Já em larga escala, esta percentagem de descoloração não se observou em todos os corantes azo estudados, provavelmente devido a um deficiente desarejamento das soluções, a um tempo de reação demasiado curto ou a uma deficiente transferência de massa. Após análise da composição das misturas reacionais resultantes, comprovou-se a quebra das ligações azo pela presença de uma ou mais aminas em solução. De uma maneira geral, a degradação enzimática dos corantes usados pela enzima PpAzoR deu origem à quebra das ligações azo, destruindo assim a estrutura original dos corantes que não surge, com exceção do corante **Reactive Black 5**, na mistura final da reação. No entanto, verificou-se sistematicamente a ausência de pelo menos uma das aminas esperadas, que não está de acordo com o descrito da literatura, embora os estudos aqui descritos não sejam suficientes para a proposta de um mecanismo alterativo, pelo que será necessário aprofundar esta questão.

A atividade da CotA-lacase, no segundo passo reacional, em aerobiose, mostrou-se dependente da estrutura das aminas aromáticas formadas. Naturalmente, apenas se observou reação nos casos em que as aminas são substratos para a CotA-lacase obtendo-se, nestes casos, como produtos, fenazinas e *orto*-quinonas.

Tabela 3-10. Produtos resultantes da biodegradação enzimática de corantes azo.

| Corante | Produtos resultantes da degradação enzimática pela enzima PpAzoR | Produtos resultantes da degradação enzimática pela enzima CotA-lacase |
|--------------|---|---|
| DR80 |  |  |
| MB3 |  |  |
| MB17 |  |  |
| RY145 |  | Não houve reação |
| MB9 |  | Produtos não identificados |
| DB38 | Produtos não identificados | |
| RB5 | Produtos não identificados | |
| AR266 | Produtos não identificados | |

O passo limitante da velocidade da reação enzimática em lacases é a oxidação do substrato no centro T1, controlada pela diferença de potencial entre a enzima e o substrato utilizado (Durão *et al.*, 2006). Este potencial traduz-se na tendência que uma espécie química tem em perder elétrons e, desse modo, ser oxidada, sendo que a diferença no potencial entre lacases e os substratos está relacionada com a estrutura do mesmo, nomeadamente com os grupos substituintes e as suas posições na molécula. Por

estas razões, este é um parâmetro importante na determinação da ocorrência e/ou velocidade de reações enzimáticas (Sousa *et al.*, 2013; Sousa *et al.*, 2014a).

Por exemplo, no corante azo **Direct Red 80** estudado, a rutura das duas ligações azo daria origem a três aminas como produtos da biodegradação do corante por ação da enzima PpAzoR. No entanto, apenas foram identificadas duas aminas e somente uma delas se apresentava como substrato adequado para a enzima CotA-lacase, a amina 2,4-diaminobenzeno sulfonato de sódio. Esta amina apresenta dois grupos doadores de eletrões (-NH₂) em posição *para* e um grupo aceitador de eletrões (-SO₃Na) em posição *orto*. A oxidação enzimática deste tipo de aminas dissubstituídas leva à formação de fenazinas (Sousa *et al.*, 2014a).

De acordo com Sousa *et al.* (2013), as aminas aromáticas que contêm grupos doadores de eletrões em posição *para* são facilmente oxidados pela lacase, pois estes grupos estabilizam o catião radicalar que se forma, diminuindo a energia de transição, e aumentando a velocidade da reação enzimática. Já as aminas que contêm grupos aceitadores de eletrões em posição *para*, como é o caso da outra amina identificada como produto da degradação pela PpAzoR, ainda no âmbito do estudo do corante **DR80**, não são tão suscetíveis à degradação, pois estes grupos diminuem a velocidade da reação enzimática, e também possuem um potencial de redução superior ao potencial de redução da CotA-lacase, ou seja, não são transformadas pela enzima (Sousa *et al.*, 2013; Sousa *et al.*, 2014a).

Os corantes azo **Mordant Black 3** e **Mordant Black 17** contêm uma ligação azo, sendo que, em cada corante, seriam esperadas duas aminas aromáticas. Verifica-se que, em ambos os corantes, o produto resultante da degradação da enzima PpAzoR é o mesmo, sendo que a outra amina aromática esperada não foi detetada. A amina aromática possui em posição *orto* um grupo doador de eletrões (-OH) e em posição *para* um grupo aceitador de eletrões. De acordo com Sousa *et al.* (2014a), esta molécula apresenta-se como substrato para a CotA-lacase, pois o grupo -OH diminui o potencial de redução. A oxidação da molécula pela enzima leva à formação de uma *orto* quinona, devido à presença de um grupo -OH na molécula (Sousa *et al.*, 2013).

O corante azo **Reactive Yellow 145** originou apenas uma das duas aminas aromáticas esperadas como produto da ação da enzima PpAzoR, que se revelou não ser um substrato adequado para a CotA-lacase. A presença de vários grupos aceitadores de eletrões na molécula, incluindo na posição *orto*, torna este substrato mais difícil de sofrer oxidação (Sousa *et al.*, 2014a) pois cada grupo -SO₃H aumenta o potencial de redução da molécula.

Como foi anteriormente referido, a ausência de, pelo menos, uma amina em praticamente todos os casos, não está de acordo com o mecanismo descrito na literatura

(Mendes *et al.*, 2011b), nem com os resultados anteriormente obtidos (Mendes *et al.*, 2011b). Por esta razão, foram realizadas novas reações enzimáticas, desta vez com dois corantes azo já estudados anteriormente por Mendes *et al.* (2011b), onde foi comprovada a quebra da ligação azo dos corantes *Methyl Red (MR)* e *Sudan Orange G (SOG)* pela enzima PpAzoR, sendo que os resultados foram comprovados por HPLC, usando como padrões amostras comerciais das aminas aromáticas (ver anexo 7.3).

Relativamente aos resultados de ^1H RMN, apenas são apresentados os resultados para o *MR*, em que se verifica que ambas as aminas estão presentes, embora em proporções diferentes; não foi apresentado qualquer espectro do *SOG*, pois não foi identificada nenhuma amina, sendo necessária a repetição desta reação.

Sendo assim, uma hipótese para as aminas não serem visíveis pode residir no tratamento das amostras para RMN (tratamento com metanol, de forma a retirar os fosfatos, provenientes do tampão). Este tratamento pode não ter sido o mais adequado pois, como foi referido anteriormente, algumas amostras eram pouco, ou mesmo, insolúveis neste solvente e, durante o tratamento, as aminas podem ter sido arrastadas, aquando da remoção dos fosfatos. Outra hipótese remota para as aminas não serem visíveis nos espectros pode dever-se ao facto de ter sido usado um volume reacional pequeno, bem como a concentração de corante.

Assim sendo, será necessário fazer mais estudos, com novos corantes, variar as condições das reações e otimizar o processo de tratamento das amostras para RMN.

Outro dos objetivos deste trabalho focou-se na valorização potencial de efluentes corados, nomeadamente, em dar utilidade aos produtos gerados pela ação sequencial das duas enzimas utilizadas, PpAzoR e CotA-lacase. Como produtos finais deste estudo, obtiveram-se esqueletos fenazina e *orto*-quinona.

As fenazinas substituídas são usadas em antibióticos, agentes antibacterianos e antitumorais, pesticidas, corantes, biossensores e são o material de partida na construção de semicondutores orgânicos ou materiais eletro-fotoquímicos. Desta forma, a oxidação de aminas, cujo produto principal previsto sejam fenazinas, tem um grande interesse, quer a nível químico, biológico, tecnológico e até económico (Sousa *et al.*, 2014a).

A fenazina produzida pela sinergia das enzimas PpAzoR e CotA-lacase, tendo o corante DR80 como substrato, o ácido 2-7-diaminofenazina-1,7-dissulfónico, tem interesse a nível da indústria de tintas de cabelo, pois pode ser usada como molécula precursora de corantes/tintas (Soerensen, 2001; Roure *et al.*, 1992).

As quinonas também possuem atividade biológica, antibacteriana, antitumoral, entre outras (Alves *et al.*, 2008). Particularmente, a quinona produzida pela sinergia das enzimas PpAzoR e CotA-lacase, tendo o corante MB3 e MB17 como ponto de partida, o

ácido 1,2-naftoquinona-4-sulfônico (NQS), pode ser usada em aplicações farmacêuticas, como reagente analítico, por exemplo, na determinação de aminas em amostras biológicas (Elbashir *et al.*, 2012).

Finalmente, a amina gerada pela PpAzoR, tendo o corante RY145 como substrato, não é transformada pela CotA-lacase. Esta amina contém um fluoróforo que, por analogia à definição de cromóforo, é parte da molécula que faz com que esta seja fluorescente. Este reagente foi usado em estudos de fluorescência, nomeadamente na identificação de oligossacáridos (Gao, 2005) e polissacáridos (confirmar) (Kuo *et al.*, 2012).

Estes produtos podem ser valorizados, i.e., podem ser vendidos a outras indústrias, o que valoriza o processo pois, desta forma, não existem descargas para o meio ambiente, tornando esta sinergia entre enzimas um processo limpo, sem produção de resíduos e economicamente atrativo.

5. Perspetivas Futuras

Atualmente são poucas as enzimas conhecidas e bem caracterizadas que sejam eficientes na descoloração de corantes sintéticos. Por esta razão, deve investir-se mais na caracterização de enzimas, de forma a serem desenvolvidos mais processos de biorremediação.

A enzima PpAzoR é uma enzima específica para uma grande variedade de corantes azo como substrato. A maior desvantagem relacionada com esta enzima é a necessidade de usar cofatores, relativamente caros, como NADH ou NADPH. Esta pode ser contornada, com a utilização de células, ao invés de enzimas isoladas, o que permite a reutilização do NADP⁺ e diminui os custos associados à purificação de enzimas. Uma outra desvantagem é a elevada toxicidade das aminas aromáticas, produto resultante da reação desta enzima com o corante azo.

Com a utilização da enzima CotA-lacase, os produtos resultantes da transformação das aminas aromáticas não só apresentam níveis de toxicidade muito mais baixos, como também têm utilidade prática em outras áreas da indústria. Por isso, um processo industrial baseado na sinergia entre estas duas enzimas vale a pena ser considerado.

Outro aspeto que poderá ser desenvolvido diz respeito às sinergias que poderão ser desenvolvidas entre a CotA-lacase e outras enzimas. Há todo um outro conjunto de enzimas cujo efeito conjugado de sinergias com a lacase ainda é uma incógnita. Desta forma, novos substratos poderão ser testados, novos mecanismos descobertos e a valorização de efluentes continuará a ser uma solução atrativa, resultando em processos de tratamento de efluentes economicamente viáveis.

De modo a rentabilizar o processo, técnicas de imobilização de enzimas devem ser consideradas. O desenvolvimento de técnicas que permitam a imobilização destas enzimas permitira a sua reutilização, possibilitando a implementação prática destes processos.

6. Bibliografia

Alcade, M., Ferrer, M., Plou, F.J., Ballesteros, A. (2006) Environmental biocatalysis: from remediation with enzymes to novel green processes, *Trends Biotechnol.* **24**(6), 281-287

Ali, H. (2010) Biodegradation of synthetic dyes - a review, *Water Air Soil Pollut.* **213**, 251-273

Alves, G., Rolim, L., Neto, P., Leite, A., Brondani, D., Medeiros, F., Bieber, L., Junior F. (2008) Purification and characterization of beta-lapachone and stability study of the crystals under different storing conditions, *Quim. Nova* **31**(2), 413-416

Baêta, B.E.L., Lima, D.R.S., Silva, S.Q., Aquino, S.F. (2015) Evaluation of soluble microbial products and aromatic amines accumulation during a combined anaerobic/aerobic treatment of a model azo dye, *Chem. Eng. J.* **259**, 936-944

Bafana, A., Devi, S.S., Chakrabarti, T. (2011) Azo dyes: past, present and the future, *Environm. Rev.* **19**, 350-370

Barakat, K.M. (2013) Decolorization of two azo dyes using marine *Lysobacter* sp. T312D9, *Malaysian J. Microbiol.* **9**(1), 93-102

Bradford, M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.* **72**, 248-254

Bürger, S., Stolz, A. (2010) Characterization of the flavin-free oxygen-tolerant azoreductase from *Xenophilus azovorans* KF46F in comparison to flavin-containing azoreductases, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **87**, 2067-2076

Cervantes, F.J., dos Santos, A.B. (2011) Reduction of azo dyes by anaerobic bacteria: microbiological and biochemical aspects, *Rev. Environm. Sci. Biotechnol.* **10**, 125-137

Chacko, J.T., Subramaniam, K. (2011) Enzymatic degradation of azo dyes - a review, *Int. J. Environ. Sci.* **1**(6), 1250-1260

Chen, H., Hopper, S., Cerniglia, C. (2005) Biochemical and molecular characterization of an azoreductase from *Staphylococcus aureus*, a tetrameric NADPH-dependent flavoprotein, *Microbiology* **151**, 1433-1441

Chen, H., Wang, R., Cerniglia, C.E. (2004) Molecular cloning, overexpression, purification and characterization of an aerobic FMN-dependent azoreductase from *Enterococcus faecalis*, *Protein Express Purif.* **34**, 302-310

Chengalroyen, M.D., Dabbs, E.R. (2013) The microbial degradation of azo dyes: minireview, *World J. Microbiol. Biotechnol.* **29**, 389-399

Chung, K. (2000) Mutagenicity and carcinogenicity of aromatic amines metabolically produced from azo dyes, *J. Environ. Sci. Health. C-Environ. Carcinog. Ecotoxicol. Rev.* **18**(1), 51-74

Correia, B., Chen, Z., Mendes, S., Martins, L., Bento, I. (2011) Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of the azoreductase PpAzoR from *Pseudomonas putida* MET94, *Acta Crystallogr. F-Struct. Biol. Cryst. Commun.* **67**, 121-123

Côrte-Real, M., Johansson, B., Saraiva, L. (2010) Nutrição e crescimento microbiano, em: Ferreira, W.F., de Sousa, J.C., Lima, N., *Microbiologia* (167-171), Lidel, Lousã

Couto, S.R., Herrera, J.L.T. (2006) Industrial and biotechnological applications of laccases: a review, *Biotechnol. Adv.* **24**, 500-513

dos Santos, A.B., Bisschops, I.A.E., Cervantes, F.J. (2006) Closing process water cycles and product recovery in textile industry: perspective for biological treatment, em: Cervantes, F.J., Pavlostathis, S.G., van Haandel, A.C., *Advanced biological treatment processes for industrial wastewaters* (298-320). 1ª Ed., International Water Association, Londres

dos Santos, A.B., Cervantes, F.J., van Lier, J.B. (2007) Review paper on current technologies for decolourisation of textile wastewaters: perspectives for anaerobic biotechnology, *Bioresour. Technol.* **98**, 2369-2385

Durão, P., Bento, I., Fernandes, A.T., Melo, E.P., Lindley, P.F., Martins, L.O. (2006) Perturbations of the T1 copper site in the CotA laccase from *Bacillus subtilis*: structural, biochemical, enzymatic and stability studies, *J. Biol. Inorg. Chem.* **11**, 514-526

Durão, P., Zhenjia, C., Fernandes, A.T., Hildebrandt, P., Murgida, D.H., Todorovic, S., Pereira, M.M., Melo, E.P., Martins, L.O. (2008) Copper incorporation into

recombinant CotA laccase from *Bacillus subtilis*: characterization of fully copper loaded enzymes, *J. Biol. Inorg. Chem.* **13**, 183-193

Elbashir A., Ahmed, A., Ahmed, S., Aboul-Enein, H. (2012) 1,2-naphtoquinone-4-sulphonic acid sodium salt (NQS) as analytical reagent for the determination of pharmaceutical amine by spectrophotometry, *Appl. Spectrosc. Rev.* **47**, 219-232

Enguita, F.J., Marçal, D., Martins, L.O., Grenha, R., Henriques, A.O., Lindley, P.F., Carrondo, M.A. (2004) Substrate and dioxygen binding to the endospore coat laccase from *Bacillus subtilis*, *J. Biol. Chem.* **22**, 23472-23476

Enguita, F.J., Matias, P.M., Martins, L.O., Plácido, D., Henriques, A.O., Carrondo, M.A. (2002) Spore-coat laccase CotA from *Bacillus subtilis*: crystallization and preliminary X-ray characterization by the MAD method, *Acta Crystallogr. D-Biological crystallography.* **58**, 1490-1493

Ferreira, W., de Sousa, J. (2010) Conceitos gerais de microbiologia, em: Ferreira, W.F., de Sousa, J.C., Lima, N., *Microbiologia* (pp. 2-22), Lidel, Lousã

Forgacs, E., Cserhádi, T., Oros, Gyula (2004) Removal of synthetic dyes from wastewaters: a review, *Environm. Int.* **30**, 953-971

Fu, J., Nyanhongo, G.S., Gübitz, G.M., Cavaco-Paulo, A., Kim, S. (2013) Enzymatic colouration with laccase and peroxidases: recent progress, *Biocat. Biotransformation* **30**(1), 125-140

Forte, S., Polak, J., Valensin, D., Taddei, M., Basosi, R., Vanhulle, S., Wilkolazka, A., Pogni, R. (2010) Synthesis and structural characterization of a novel phenoxazinone dye by use of a fungal laccase, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **63**, 116-120

Gao, N (2005) Fluorophore-assisted carbohydrate electrophoresis: a sensitive and accurate method for the direct analysis of dolichol pyrophosphate-linked oligosaccharides in cell cultures and tissues, *Methods* **35**, 323-327

Ghaly, A.E., Ananthashankar, R., Ramakrishnan, V.V. (2014) Production, characterization and treatment of textiles effluents: a critical review, *J. Chem. Eng. Process Technol.* **5**(1), 1-18

Gill, M., Strauch, R.J. (1984) Constituents of *Agaricus xanthodermus* Genevier: the first naturally endogenous azo compound and toxic phenolic metabolites, *Z. Naturforsch* **39c**, 1027-1029

Glover, B. (1993) Dyes, application and evaluation em: Kroschwitz, J.I. (Ed. Exec.), *Kirk-Othmer Encyclopedia of chemical technology*, **Vol.8** (674-680). 4ª Ed., John Wiley & Sons, Nova Iorque

Gonçalves, A.M., Mendes, S., de Sanctis, D., Martins, L.O., Bento, I. (2013) The crystal structure of *Pseudomonas putida* azoreductase - the active site revisited, *FEBS J.* **280**, 6643-6657

Grover, N., Dinu, C.Z., Kane, R.S., Dordick, J.S. (2013) Enzyme-based formulations of decontamination: current state and perspectives, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **97**, 3293-3300

Hallas, G., Yoon, C. (2001) The synthesis and properties of red and blue benzodifuranones, *Dyes and Pigments* **48**, 107-119

Hullo, M., Moszer, I., Danchin, A., Martin-Verstraete, I. (2001) CotA of *Bacillus subtilis* is a copper-dependent laccase, *J. Bacteriol.* **183**(18), 5426-5430

Hunger, K. (2003) Dyes: general survey, em: *Industrial dyes: chemistry, properties, applications* (1-7), John Wiley and Sons, República Federal da Alemanha

Husain, Q. (2006) Potencial application of the oxidoreductive enzymes in the decolorization and detoxification of textiles and other synthetic dyes from polluted water: a review, *Crit. Rev. Biotechnol.* **26**, 201-221

Kasiri, M.H., Safapour, S. (2014) Natural dyes and antimicrobials for green treatment of textiles, *Environ. Chem. Lett.* **12**, 1-13

Khan, R., Fulekar, M.H. (2013) Microbial decolorization and degradation of synthetic dyes: a review, *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.* **12**, 75-97

Kuo, C., Wang, S., Lin, C., Liao, S., Hung, W., Fang, J., Yang, W. (2012) Application of 2,3-naphthalenediamine in labeling natural carbohydrates for capillary electrophoresis, *Molecules* **17**, 7387-7400

Leelakriangsak, M. (2013), Molecular approaches for bacterial azoreductases, *Songklanakarin J. Sci. Technol.* **35**(6), 647-657

Lin, J., Zhang, X., Li, Z., Lei, L. (2010) Biodegradation of reactive blue 13 in a two-stage anaerobic/aerobic fluidized beds system with a *Pseudomonas* sp. isolate, *Bioresour. Technol.* **101**, 34-40

Liu, G., Zhou, J., Lv, H., Xinag, X., Wang, J., Zhou, M., Qv, Y. (2007) Azoreductase from *Rhodabacter sphaeroides* AS1.1737 is a flavodixin tha also functions as nitroreductase and flavin mononucleotide reductase, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **76**, 1271-1279

Macwana, S.R., Punj, S., Cooper, J., Schwenk, E., John, G.H. (2010) Identification and isolation of na azoreductae from *Enterococcus faecium*, *Curr. Issues Mol. Biol.* **12**, 43-48

Madhavi, V., Lele, S.S. (2009) Laccase: properties and applications, *Bioresources* **4**(4), 1694-1717

Mansour, H.B., Mosrati, R., Corroler, D., Ghedira, K., Barillier, D., Chekir, L. (2009) In vitro mutagenicity of Acid Violet 7 and its degradation products by *Pseudomonar putida* mt-2: correlation with chemical structures, *Environm. Toxicol. Pharmacol.* **27**, 231-236

Martins, L., Soares, C., Pereira, M., Teixeira, M., Costa, T., Jones, G., Henriques, A. (2002) Molecular and biochemical characterization of a highly stable bacterial laccase that occurs as a structural component of the *Bacillus subtilis* endospore coat, *J. Biol. Chem.* **277**(21), 18849-18859

McMullan, G., Meehan, C., Connely, A., Kirby, N., Robinson, T., Nigam, P., Banat, I.M., Marchant, R., Smyth, W.F. (2001) Microbial decolourisation and degradation of textile dyes, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **56**, 81-87

Mendes, S., Farinha, A., Ramos, C.G., Leitão, J.H., Veigas, C.A., Martins, L. (2011 a) Sinergistic action of azoreductase and laccase leads to maximal decolourization and detoxification of model dye-containing wastewaters, *Bioresour. Technol.* **102**(21), 9852-9859

Mendes, S., Pereira, L., Batista, C., Martins, L. (2011b) Molecular determinants of azo reduction activity in the strain *Pseudomonas putida* MET94, *Environm. Biotechnol.* **92**(2), 393-405

Bibliografia

Moutaouakkil, A., Zeroual, Y., Dzayri, F., Talbi, M., Lee, K., Blaghen, M. (2003) Purification and partial characterization of azoreductase from *Enterobacter agglomerans*, *Arch. Biochem. Biophys.* **413**, 139-146

Pandey, A., Singh, P., Iyengar, L. (2007) Bacterial decolorization and degradation of azo dyes, *Int. Biodeterior. Biodegrad.* **59**, 73-84

Pereira, L., Coelho, A.V., Viegas, C.A., dos Santos, A.M.C., Robalo, M.P., Martins, L.O. (2009) Enzymatic biotransformation of the azo dye Sudan Orange G with bacterial CotA-laccase, *J. Biotechnol.* **139**, 68-77

Pereira, L., Coelho, A.V., Viegas, C.A., Ganachaud, C., Iacazio, G., Tron, T., Robalo, M.P., Martins, L.O. (2009) On the mechanism of biotransformation of the anthraquinonic dye Acid Blue 62 by laccases, *Adv. Synth.Catal.* **351**, 1857-1865

Prasad, S. S., Aikat, K. (2014) Study of bio-degradation and bio-decolourization of azo dye by *Enterobacter* sp. SXCR, *Environm. Technol.* **35**(8), 956-965

Rai, H.P., Bhattacharyya, M.S., Singh, J., Bansal, T.K., Vats, P., Banerjee, U.C. (2005) Removal of dyes from the effluent of textile and dyestuff manufacturing industry: a review of emerging techniques with reference to biological treatment, *Crit. Rev. Env. Sci. Tec.* **35**, 219-238

Rauf, M.A., Ashraf, S.S. (2012) Survey of recent trends in biochemically assisted degradation of dyes, *Chem. Eng. J.* **209**, 520-530

Roure, M., Delattre, P., Froger, H. (1992) Composition for an enzymic coloration of keratin fibres, especially for hair dyes and its use in a dyeing process, EP/0504/005, submetida a 3 de março de 1992, publicada a 16 de setembro de 1992, acedida a 21 de dezembro de 2014

Ryan, A., Kaplan, E., Nebel, J., Policarpou, E., Crescente, V., Lowe, E., Preston, G.M., Sim, E. (2014) Identification of NAD(P)H quinone oxidoreductase activity in azoreductases from *P.aeruginosa*: azoreductases and NAD(P)H quinone oxidoreductases belong to the same FMN-dependent superfamily of enzymes, *PLoS One* **9**(6), 1-10

Saratale, R.G., Saratale, G.D., Chang, J.S., Govindwar, S.P. (2011) Bacterial decolorization and degradation of azo dyes: a review, *J. Taiwan Inst. Chem. Eng.* **42**, 138-157

Sarayu, K., Sandhya, S. (2012) Current technologies for biological treatment of textile wastewater - a review, *Appl. Biochem. Biotechnol.* **167**, 645-661

Silva, M.E.R., Firmino, P.I.M., Sousa, M.R., dos Santos, A.B. (2012) Sequential anaerobic/aerobic treatment of dye-containing wastewaters: colour and COD removals, and ecotoxicity tests, *Appl. Biochem. Biotechnol.* **166**, 1057-1069

Soerensen, N. (2001) Method for dyeing dry hair, WO/2001/068042, submetida a 13 de março de 2001, publicada a 20 de setembro de 2001, acedida a 21 de dezembro de 2014

Solís, M., Solís, A., Pérez, H.I., Manjarrez, N., Flores, M. (2012) Microbial decolourization of azo dyes: a review, *Process Biochem.* **47**, 1723-1748

Sousa, A.C., Martins, L.O., Robalo, M. P. (2013) Laccase-catalysed homocoupling of primary aromatic amines towards the biosynthesis of dyes, *Adv. Synth. Catal.* **355**, 2908-2917

Sousa, A.C., Oliveira, M.C., Martins, L.O., Robalo, M. P. (2014a) Towards the rational biosynthesis of substituted phenazines and phenoxazinones by laccases, *Green Chem.* **16**, 4127-4136

(Sousa et al., 2014b) = A.C.Sousa, L.O.Martins, M.P.Robalo, resultados não publicados

Stolz, A. (2001) Basic and applied aspects in the microbial degradation of azo dyes, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **56**, 69-80

Sudha, M., Saranya, A., Selvakumar, G., Sivakumar, N. (2014) Microbial degradation of azo dyes: a review, *Int. J. Microbiol. App. Sci.* **3**(2), 670-690

Taipa, M.A., Gama, M. (2003) Estrutura e função dos enzimas, em: Cabral, J.M.S., Aires-Barros, M.R., Gama, M, *Engenharia enzimática* (64-66), Lidel, Lousã

Toogood, H.S., Gardiner, J.M., Scrutton, N.S. (2010) Bicatalytic reductions and chemical versatility of old yellow enzyme family of flavoprotein oxidoreductases, *Chem. Cat. Chem.* **2**, 892-914

Wang, X., Cheng X., Sun, D., Ren, Y., Xu G. (2014) Fate and transformation of naphthylaminesulfonic azo dye reactive black 5 during wastewater treatment process, *Environm. Sci. Pollut. Res.* **21**, 5713-5723

Bibliografia

Zhukhlistova, N.E., Zhukova, N., Lyashenko, A.V., Zaitsev, V.N., Mikhailov, A.M. (2008) Three-dimensional organization of three-domain copper oxidases: a review, *Crystallogr. Reports* **53**(1), 92-109

7. Anexos

7.1. Determinação da absorvância dos corantes azo

Tabela 7-1. Valores de absorvância para o corante *RB5* a 600 nm.

| [RB5] (μM) | Abs ($\lambda=600$ nm) | | | Média | Desvio Padrão |
|-------------------------|-------------------------|-------|-------|-------|---------------|
| 5 | 0.262 | 0.237 | 0.242 | 0.247 | 0.013 |
| 10 | 0.456 | 0.437 | 0.448 | 0.447 | 0.010 |
| 15 | 0.619 | 0.643 | 0.67 | 0.644 | 0.026 |
| 20 | 0.858 | 0.867 | 0.844 | 0.856 | 0.012 |
| 25 | 1.044 | 1.011 | 1.061 | 1.038 | 0.025 |
| 30 | 0.989 | 1.194 | 1.273 | 1.152 | 0.147 |
| 35 | 1.387 | 1.422 | 1.499 | 1.436 | 0.057 |
| 40 | 1.558 | 1.593 | 1.621 | 1.591 | 0.032 |
| 45 | 1.859 | 1.801 | 1.77 | 1.810 | 0.045 |
| 50 | 1.856 | 1.88 | 1.915 | 1.884 | 0.030 |
| 100 | 3.583 | 3.672 | 3.802 | 3.686 | 0.110 |

Tabela 7-2. Valores de absorvância para o corante *DB38* a 600 nm.

| [DB38] (μM) | Abs ($\lambda=600$ nm) | | | Média | Desvio Padrão |
|--------------------------|-------------------------|-------|-------|-------|---------------|
| 5 | 0.180 | 0.076 | 0.078 | 0.111 | 0.060 |
| 7.5 | 0.097 | 0.098 | 0.098 | 0.098 | 0.001 |
| 10 | 0.139 | 0.136 | 0.138 | 0.134 | 0.001 |
| 12.5 | 0.162 | 0.160 | 0.160 | 0.161 | 0.001 |
| 15 | 0.185 | 0.180 | 0.192 | 0.186 | 0.006 |
| 17.5 | 0.205 | 0.208 | 0.202 | 0.205 | 0.003 |
| 20 | 0.225 | 0.226 | 0.231 | 0.227 | 0.003 |
| 22.5 | 0.252 | 0.253 | 0.252 | 0.252 | 0.001 |
| 25 | 0.282 | 0.288 | 0.279 | 0.283 | 0.005 |

Tabela 7-3. Valores de absorvância para o corante *RY145* a 420 nm.

| [RY145] (μM) | Abs ($\lambda=420$ nm) | | | Média | Desvio Padrão |
|---------------------------|-------------------------|-------|-------|-------|---------------|
| 5 | 0.183 | 0.196 | 0.193 | 0.191 | 0.007 |
| 7.5 | 0.254 | 0.258 | 0.268 | 0.260 | 0.007 |
| 10 | 0.330 | 0.341 | 0.347 | 0.334 | 0.007 |
| 12.5 | 0.459 | 0.466 | 0.462 | 0.462 | 0.004 |
| 15 | 0.517 | 0.535 | 0.532 | 0.528 | 0.010 |
| 17.5 | 0.596 | 0.595 | 0.612 | 0.601 | 0.010 |
| 20 | 0.655 | 0.672 | 0.671 | 0.666 | 0.010 |
| 22.5 | 0.729 | 0.709 | 0.755 | 0.731 | 0.023 |
| 25 | 0.772 | 0.816 | 0.829 | 0.806 | 0.030 |

Tabela 7-4. Valores de absorvância para o corante *DR80* a 540 nm.

| [DR80] (μM) | Abs ($\lambda=540$ nm) | | | Média | Desvio Padrão |
|--------------------------|-------------------------|-------|-------|-------|---------------|
| 5 | 0.199 | 0.205 | 0.219 | 0.208 | 0.010 |
| 7.5 | 0.284 | 0.250 | 0.272 | 0.269 | 0.017 |
| 10 | 0.347 | 0.340 | 0.359 | 0.345 | 0.010 |
| 12.5 | 0.475 | 0.471 | 0.478 | 0.475 | 0.004 |
| 15 | 0.548 | 0.548 | 0.532 | 0.543 | 0.009 |
| 17.5 | 0.612 | 0.598 | 0.624 | 0.611 | 0.013 |
| 20 | 0.696 | 0.706 | 0.680 | 0.694 | 0.013 |
| 22.5 | 0.768 | 0.813 | 0.793 | 0.791 | 0.023 |
| 25 | 0.842 | 0.893 | 0.899 | 0.878 | 0.031 |

Tabela 7-5. Valores de absorvância para o corante *MB9* a 550 nm.

| [MB9] (μM) | Abs ($\lambda=550$ nm) | | | Média | Desvio Padrão |
|-------------------------|-------------------------|-------|-------|-------|---------------|
| 10 | 0.111 | 0.115 | 0.117 | 0.114 | 0.003 |
| 20 | 0.186 | 0.175 | 0.173 | 0.178 | 0.007 |
| 30 | 0.296 | 0.247 | 0.238 | 0.260 | 0.031 |
| 40 | 0.305 | 0.304 | 0.298 | 0.302 | 0.004 |
| 50 | 0.365 | 0.370 | 0.367 | 0.367 | 0.003 |
| 60 | 0.418 | 0.430 | 0.412 | 0.420 | 0.009 |
| 70 | 0.484 | 0.478 | 0.481 | 0.481 | 0.003 |
| 80 | 0.583 | 0.566 | 0.571 | 0.573 | 0.009 |
| 100 | 0.674 | 0.687 | 0.689 | 0.683 | 0.012 |

Tabela 7-6. Valores de absorvância para o corante *MB17* a 520 nm.

| [MB17] (μM) | Abs ($\lambda=520$ nm) | | | Média | Desvio Padrão |
|--------------------------|-------------------------|-------|-------|--------|---------------|
| 10 | 0.119 | 0.138 | 0.128 | 0.128 | 0.010 |
| 15 | 0.149 | 0.140 | 0.158 | 0.149 | 0.009 |
| 20 | 0.182 | 0.187 | 0.190 | 0.186 | 0.004 |
| 25 | 0.214 | 0.236 | 0.227 | 0.226 | 0.011 |
| 30 | 0.251 | 0.255 | 0.260 | 0.255 | 0.005 |
| 35 | 0.322 | 0.286 | 0.283 | 0.297 | 0.021 |
| 40 | 0.315 | 0.312 | 0.363 | 0.330 | 0.029 |
| 45 | 0.355 | 0.360 | 0.366 | 0.3603 | 0.006 |
| 50 | 0.438 | 0.388 | 0.447 | 0.424 | 0.032 |

Tabela 7-7. Valores de absorvância para o corante AR266 a 470 nm.

| [AR266] (μM) | Abs ($\lambda=470$ nm) | | | Média | Desvio Padrão |
|---------------------------|-------------------------|-------|-------|-------|---------------|
| 10 | 0.155 | 0.140 | 0.137 | 0.144 | 0.010 |
| 15 | 0.176 | 0.187 | 0.179 | 0.181 | 0.006 |
| 20 | 0.206 | 0.214 | 0.217 | 0.212 | 0.006 |
| 25 | 0.242 | 0.255 | 0.235 | 0.244 | 0.010 |
| 30 | 0.286 | 0.296 | 0.301 | 0.294 | 0.008 |
| 35 | 0.341 | 0.333 | 0.338 | 0.337 | 0.004 |
| 40 | 0.416 | 0.439 | 0.452 | 0.436 | 0.018 |
| 45 | 0.483 | 0.480 | 0.499 | 0.487 | 0.010 |
| 50 | 0.535 | 0.539 | 0.544 | 0.539 | 0.005 |

Tabela 7-8. Valores de absorvância para o corante MB3 a 550 nm.

| [MB3] (μM) | Abs ($\lambda=550$ nm) | | | Média | Desvio Padrão |
|-------------------------|-------------------------|-------|-------|-------|---------------|
| 100 | 0.112 | 0.116 | 0.116 | 0.115 | 0.002 |
| 150 | 0.156 | 0.156 | 0.165 | 0.159 | 0.005 |
| 200 | 0.193 | 0.199 | 0.201 | 0.198 | 0.004 |
| 250 | 0.232 | 0.237 | 0.236 | 0.235 | 0.003 |
| 350 | 0.311 | 0.331 | 0.308 | 0.317 | 0.013 |
| 400 | 0.343 | 0.347 | 0.349 | 0.346 | 0.003 |
| 450 | 0.368 | 0.378 | 0.378 | 0.375 | 0.006 |
| 500 | 0.405 | 0.40 | 0.417 | 0.407 | 0.009 |

7.2. Espectros ^1H RMN

7.2.1. DR80

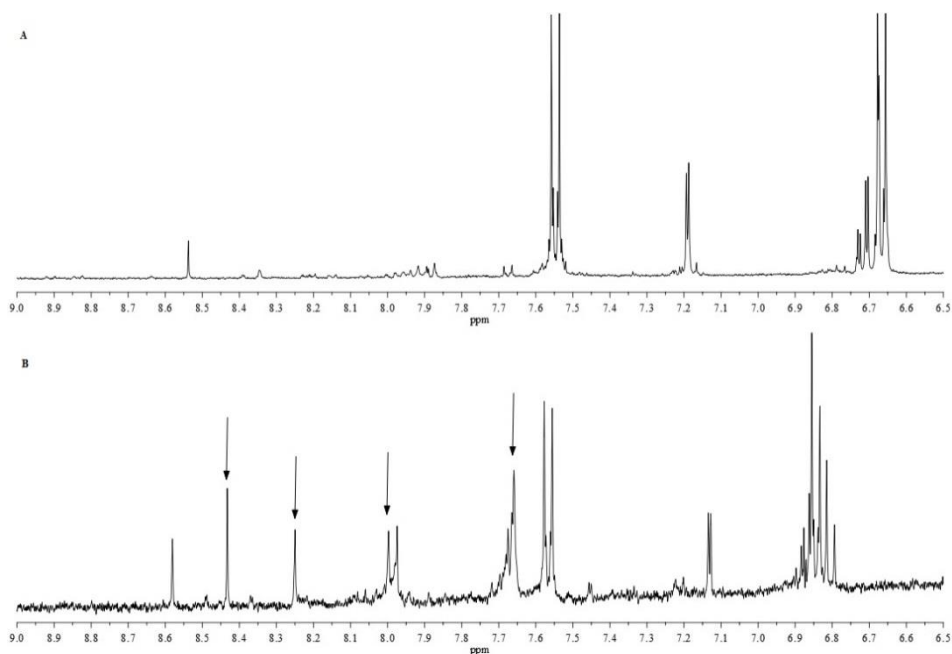


Figura 7-1. (a) Espectro ^1H RMN da degradação de DR80 com PpAzoR em MeOD; (b) Espectro ^1H RMN da degradação de DR80 com PpAzoR em D_2O .

7.2.2. RB5

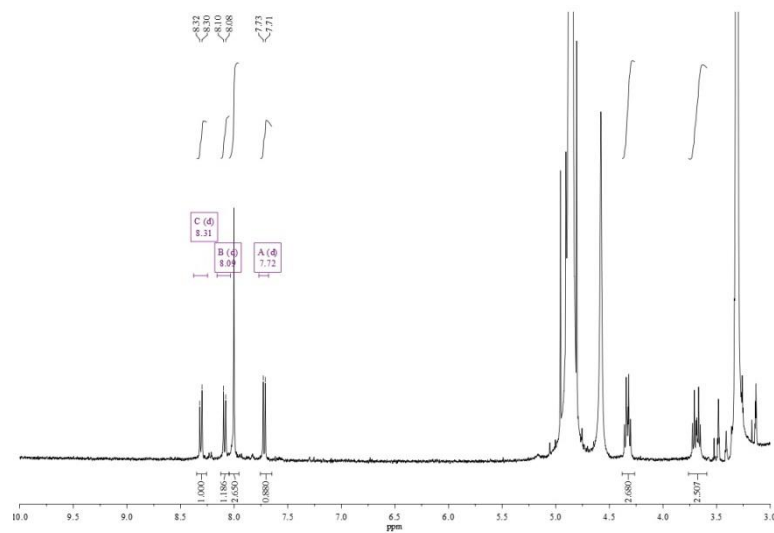


Figura 7-2. Espectro ^1H RMN do corante RB5.

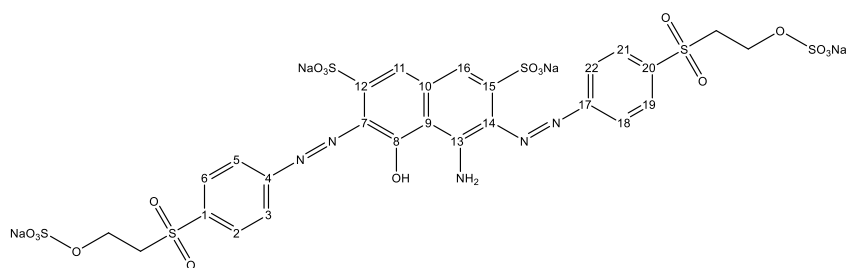


Figura 7-3. Estrutura do corante *RB5* com as posições identificadas.

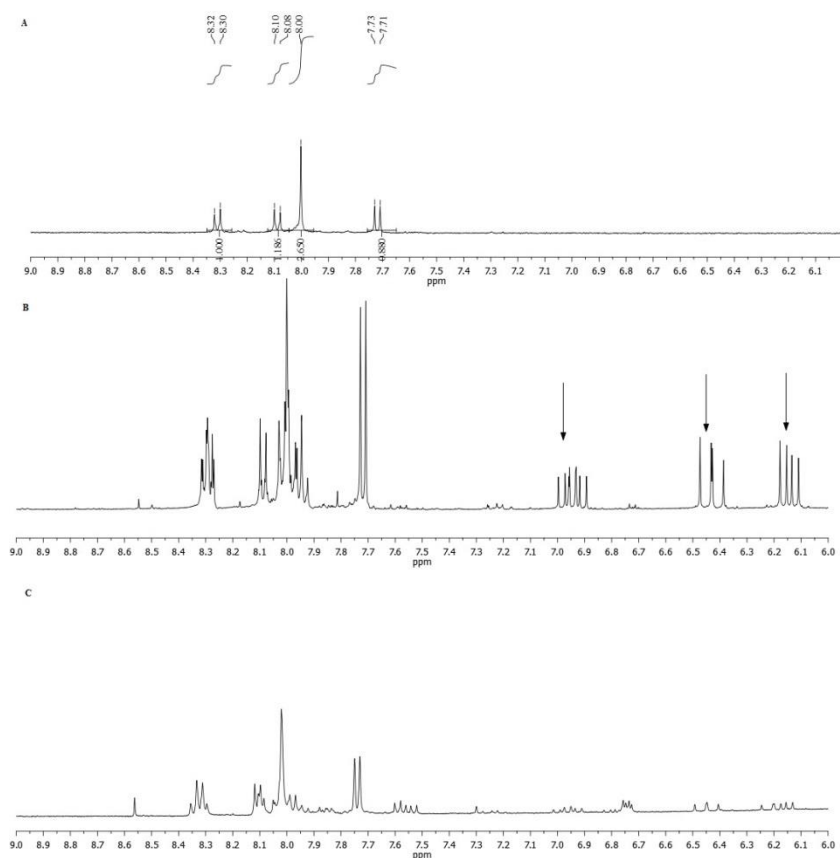


Figura 7-4. (a) Espetro ^1H RMN corante *RB5*; (b) Espetro ^1H do controle da degradação do corante *RB5*; (c) Espetro ^1H da degradação do corante *RB5* com PpAzoR.

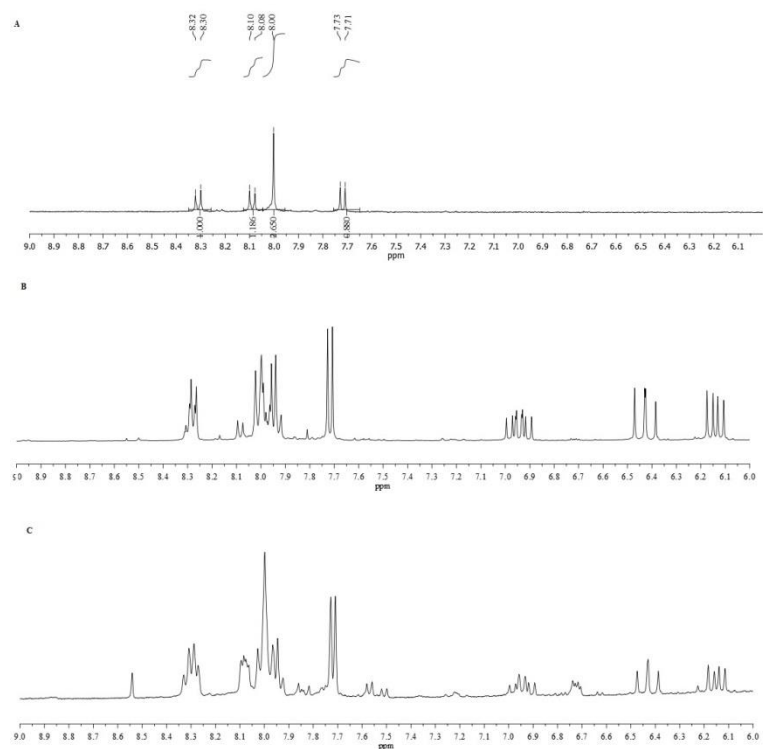


Figura 7-5. (a) Espectro ¹H RMN corante RB5; (b) Espectro ¹H RMN do controle da biotransformação; (c) Espectro ¹H RMN da biotransformação com CotA-lacase.

7.2.3. AR266

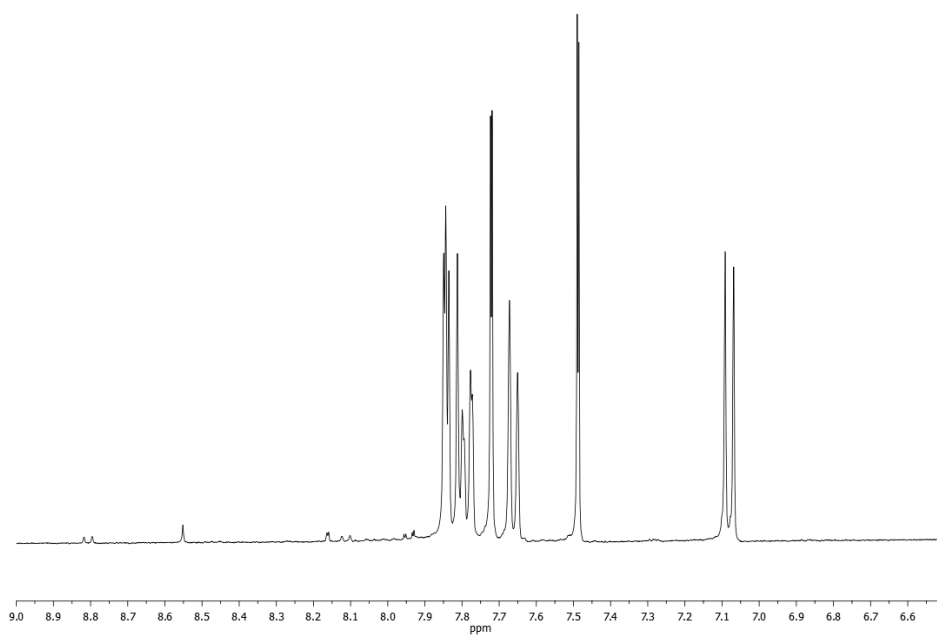


Figura 7-6. Espectro ¹H RMN do corante AR266.

Análise do espectro ^1H RMN em MeOD (400 MHz): δ (ppm) = 7.85 (d, 1H, J = 2.2 Hz, H2); 7.82 (d, 1H, J = 9.2 Hz, H9); 7.79 (dd, J =8.8, 2.0 Hz, 1H, H6); 7.72 (d, 1H, J =1.7 Hz, H16); 7.66 (d, J = 8.8 Hz, 1H, H5); 7.49 (d, 1H, J = 1.8 Hz, H14); 7.08 (d, 1H, J = 9.2 Hz, H10).

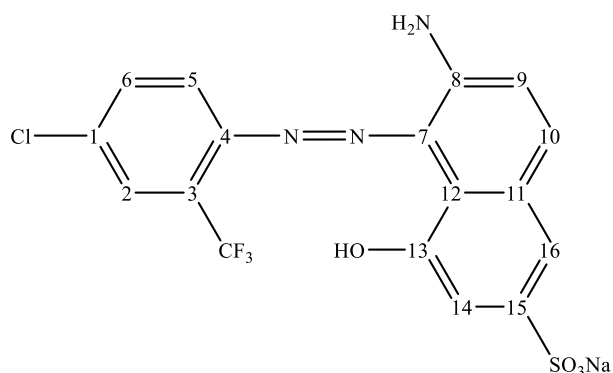


Figura 7-7. Estrutura do corante AR266 com as posições identificadas.

7.3. Análise dos produtos da reação dos corantes Methyl Red e Sudan Orange G

Foram determinadas as percentagens de descoloração e, posteriormente, as misturas reacionais também foram analisadas por HPLC e por ^1H RMN. Visualmente, pode observar-se uma descoloração total dos corantes, na presença da enzima PpAzoR (Figura 7-8).



Figura 7-8. Reação de degradação pela enzima PpAzoR em larga escala e respetivo controlo de (a) corante SOG (4 mM) e (b) corante MR (4 mM).

Tabela 7-9. Percentagem de descoloração dos corantes *MR* e *SOG* após 24 horas de reação com PpAzoR.

| Corante | Descoloração após 24 horas com PpAzoR (%) | |
|---------|---|--|
| | Este trabalho ^a | Referência (Mendes <i>et al.</i> , 2011b) ^b |
| MR | 97 ± 2 | 97 |
| SOG | 99 ± 0.4 | 80 |

^a Após 19 horas de reação.

^b Após 24 horas de reação.

Verifica-se que, ao contrário do que se observou nos corantes estudados, obteve-se uma percentagem de descoloração muito perto de 100 %, em menos de 24 horas (**Tabela 7-9**).

A análise por HPLC foi realizada a 430 nm, que corresponde ao comprimento de onda de absorção máxima de ambos os corantes (Mendes *et al.*, 2011b). Através de comparação com padrões, foi possível confirmar a presença de ambas as aminas na mistura reacional (**Figura 7-9**).

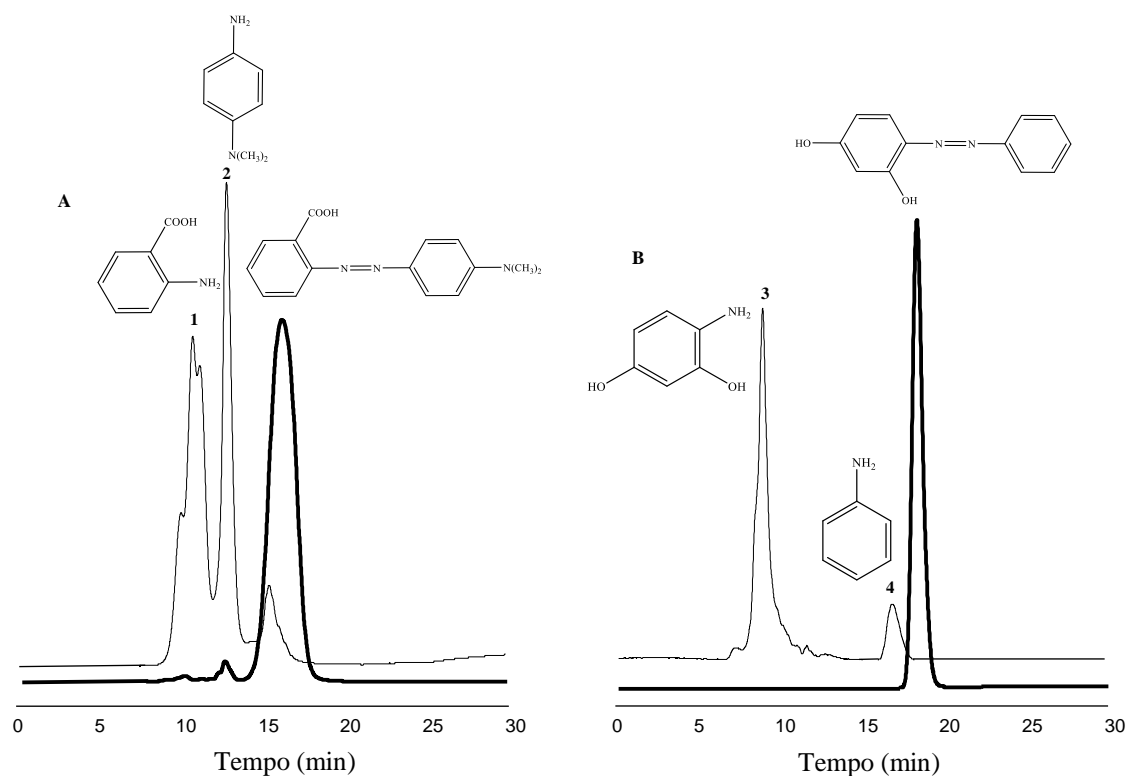


Figura 7-9. Análise por HPLC das misturas reacionais com *MR* (a) e *SOG* (b) após 19 horas de reação com PpAzoR (linha fina) e sem PpAzoR (linha grossa). Os produtos das reações foram identificados com padrões: ácido 2-aminobenzóico (1), *N,N'*-dimetil-*p*-fenilenediamina (2), 4-aminoresorcinol (3), e anilina (4)

Identificação dos produtos da reação de degradação do corante *MR* com PpAzoR, por ^1H RMN

Todo o estudo deste corante foi realizado em metanol deuterado pois, após estudo da solubilidade, quer do corante, quer dos controlos e produtos das reações, verificou-se que este era o solvente mais adequado.

Após análise do espetro e comparação com a estrutura química do corante (**Figura 7-10**), foi possível atribuir os sinais do corante, verificando-se que este tem a estrutura esperada (**Figura 7-11**).

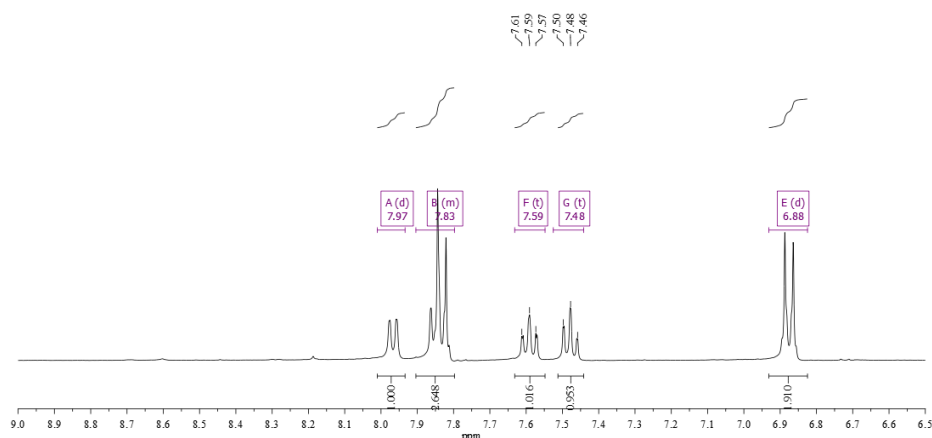


Figura 7-10. Espetro ^1H RMN do controlo da reação de degradação do corante *MR*.

Análise do espetro ^1H RMN em MeOD, na região do espetro entre 10.0 e 0.0 ppm (400 MHz): δ (ppm) = 7.97 (d, $J = 7.0$ Hz, 1H); 7.90 – 7.80 (m, 3H), 7.59 (t, $J = 7.7$ Hz, 1H); 7.48 (t, $J = 7.9$ Hz, 1H); 6.88 (d, $J = 9.2$ Hz, 2H); 3.15 (s, 6H).

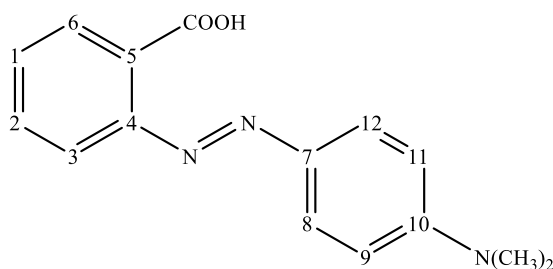


Figura 7-11. Estrutura do corante *MR* com os protões identificados.

Resultantes da clivagem da ligação azo do corante *MR*, pela enzima redutora PpAzoR, são esperadas duas aminas aromáticas (**Figura 7-12**).

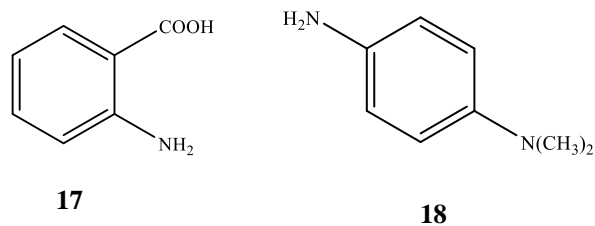


Figura 7- 12. Aminas aromáticas esperadas como produtos resultantes da degradação do corante *MR* pela enzima PpAzoR.

Para facilitar a identificação dos produtos da reação com a PpAzoR, fez-se a comparação do espectro com as amostras comerciais das aminas **17** (**Figura 7-13A**) e **18** (**Figura 7-13B**) com o espectro da reação de degradação por PpAzoR (**Figura 7-13C**).

Através da análise dos espectros, é possível afirmar que os produtos finais da degradação do corante *MR* com a PpAzoR são as aminas aromáticas **17** e **18**. Verificou-se também que a proporção entre as aminas é diferente, sendo que a proporção entre a amina aromática **17** e a amina aromática **18** é de 4:1, respetivamente.

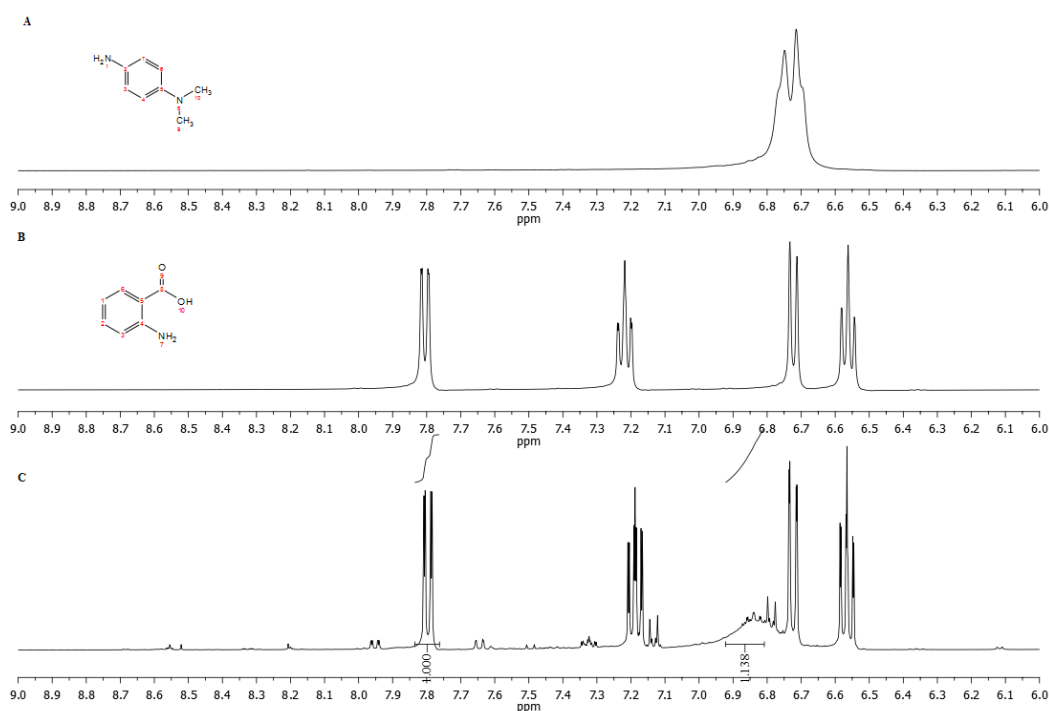


Figura 7-13. (a) Espectro ¹H RMN da amostra comercial de **18**; (b) Espectro ¹H RMN da amostra comercial de **19**; (c) Espectro ¹H RMN da degradação do corante *MR* pela enzima PpAzoR.

