

UNIVERSIDADE DE CAXIAS DO SUL
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
COORDENADORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA
MESTRADO EM BIOTECNOLOGIA

DESENVOLVIMENTO DE MEMBRANAS COM
LACASES POR IMOBILIZAÇÃO DO EXTRATO
ENZIMÁTICO DE *Pleurotus sajor-caju*

KÁTIA RASERA

CAXIAS DO SUL

2006

KÁTIA RASERA

**DESENVOLVIMENTO DE MEMBRANAS COM
LACASES POR IMOBILIZAÇÃO DO EXTRATO
ENZIMÁTICO DE *Pleurotus sajor-caju***

**Dissertação apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Biotecnologia da Universidade de
Caxias do Sul visando a obtenção do grau de
Mestre em Biotecnologia**

**Orientador: Prof. Dr. Aldo José Pinheiro Dillon
Co-orientadora: Profa. Dra. Mara Zeni Andrade**

**Caxias do Sul
2006**

AGRADECIMENTOS

Agradeço

À minha família, especialmente à minha mãe e ao meu namorado, pela paciência e por estar em sempre ao meu lado.

À Profa. Mara Zeni Andrade pela orientação, apoio e incentivo sem os quais este trabalho não seria possível.

Ao professor Aldo Dillon, pela orientação.

Ao professor Raul Riveros, pela amizade, ajuda e incentivo.

Aos colegas do Laboratório de Química pelo incentivo e pelas horas de descontração.

Aos colegas Laboratório de Processos Biotecnológicos I pela paciência e por estarem sempre disponíveis a ajudar quando foi preciso.

Ao Prof. Nelson Duran e á doutoranda Priscyla Daniely Marcato (UNICAMP) pela análise de MEV-EDS.

A Profa. Regina Célia Reis Nunes (UFRJ) pelas análise de GPC.

À CAPES, pela concessão da Bolsa de Mestrado.

ÍNDICE

RESUMO.....	XVI
ABSTRACT.....	XVII
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1 Basidiomicetes.....	3
2.2 Gênero Pleurotus.....	4
2.3 Cultivo de basidiomicetes.....	6
2.3.1 Cultivo sólido.....	6
2.3.2 Cultivo líquido.....	8
2.4 Celulose, hemicelulose e lignina.....	9
2.5 Lacases.....	12
2.6 Peroxidasas: lignina-peroxidase e manganês-peroxidase.....	17
2.7 Imobilização.....	18
2.7.1 Imobilização por ligação covalente ou cruzada.....	19
2.7.2 Imobilização por métodos físicos.....	21
2.7.3 Suportes para imobilização.....	22
2.7.3.1 Membranas de poliamida 6,6	24
2.7.3.2 Membranas de polissulfona.....	25
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	27
3.1 Linhagem.....	27
3.2 condições de cultivo.....	27
3.2.1 Manutenção de linhagens.....	27
3.2.2 Cultivo em estado sólido.....	27
3.3 Preparo do extrato enzimático.....	28
3.3.1 Precipitação do extrato enzimático.....	28
3.4 Determinações enzimáticas e de proteínas totais.....	28
3.4.1 Lacases.....	28
3.4.2 Peroxidasas totais.....	29
3.4.3 Manganês peroxidase.....	29

3.4.4 Lignina peroxidase.....	30
3.4.5 Oxidases do álcool veratrílico.....	30
3.4.6 Determinação de proteínas totais.....	30
3.5 Termoestabilidade de lacases.....	31
3.6 determinação de pH ótimo para atividade de lacases.....	31
3.7 Determinação de parâmetros cinéticos.....	32
3.8 Ensaio com corantes têxteis.....	32
3.9 Imobilização do extrato enzimático precipitado.....	33
3.9.1 Preparo da solução de glutaraldeído.....	33
3.9.2 Imobilização do extrato enzimático em membranas de poliamida 6,6.....	33
3.9.3 Imobilização em membranas de polissulfona.....	33
3.9.4 Análise do sistema imobilizado.....	34
3.9.5 Determinação da quantidade de proteína imobilizada	34
3.9.6 Determinação de pH ótimo utilizando extrato enzimático imobilizado.....	34
3.10 Análise por MEV – EDS	35
3.11. Determinação do massa molar média de polímero ().....	36
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	37
4.1 Obtenção e caracterização do extrato enzimático com atividade de lacases.....	37
4.1.1 Atividade de lacases em função do pH.....	39
4.1.2 Atividade enzimática de lacases em diferentes concentrações de tampão.....	40
4.1.3 Termoestabilidade de lacases.....	42
4.1.4 Valores de Km e Vmáx para as atividades de lacase.....	44
4.2 Imobilização de proteínas da solução enzimática em membranas de poliamida 6,6 (PA) e polissulfona (PSU).....	47
4.2.1 Determinação de quantidade de proteínas imobilizadas	47
4.2.3 Capacidade oxidativa de membranas com lacase imobilizadas	62
4.2.3 Reutilização de filmes com enzimas imobilizadas.....	65
4.2.4 Descoloração de corantes têxteis por extratos enzimáticos	66
5 Conclusões	75
6 SUGESTÕES PARA CONTINUIDADE.....	76
Como sugestões para a continuidade desta pesquisa, podem ser relacionados os seguintes temas:	76

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	77
Bollag, J.M.; Leonowicz, A. (1984). Comparative Studies of Extracellular Fungal Laccases. Appl. Environ. Microbiol, 48: 849-854.	77
ANEXOS.....	88
Anexo 27. Dados experimentais que compuseram a figura 44.....	107

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Cultivo sólido de <i>Pleurotus sajor-caju</i> (Keller, 2001).....	5
Figura 2. Estrutura de um fragmento de celulose (Tavares, 2006).....	9
Figura 3. Estrutura química da lignina (Barr & Aust, 1994).....	11
Figura 4: Representação da estrutura tridimensional dos centros de cobre da lacase (Claus, 2004).....	14
Figura 5. Ciclo catalítico da lacase (adaptado de Wesenberg et al., 2003).....	14
Figura 6: Utilização de mediador na oxidação de substratos pela lacase. (adaptado de Zille et al. 2005).....	16
Figura 7. Métodos de imobilização de enzimas (Nascimento et al., 2004).....	19
Figura 8. Representação esquemática de membranas com diferentes morfologias: A) membranas porosas e não porosas; B) Membranas porosas simétricas e assimétricas (Queiroz et al., 2001).....	23
Figura 9: Micrografias (MEV) da membrana de PA: 1 – Superfície da membrana (3000X); 2 – secção transversal (1500X); 3 – Poros da membrana (10000X) (Mello, dados não publicados).....	25
Figura 10: Estrutura molecular da PSU (Mistry, 1996).....	26
Figura 11: Cultivo em estado sólido de <i>P. sajor-caju</i> PS2001, com 15 dias de desenvolvimento.	38
Figura 12: Atividade de lacases (U.mL ⁻¹) em diferentes pHs, utilizando tampão acetato pH 2-7 e tampão McIlvaine pH 2-8. Os valores correspondem a média de três replicatas e ao desvio padrão. As legendas referen-se aos tampões MacIlvaine e acetato, 0,1M. Barras com letras distintas indicam que as médias obtidas diferiram à nível de $p < 5$, pelo teste de Tukey.....	39

- Figura 13: Atividade de lacase em diferentes concentrações, utilizando tampão McIlvaine pH 4. Os valores correspondem a média de três replicatas e ao desvio padrão. Barras com letras distintas indicam que as médias obtidas diferiram à nível de $p < 5$, pelo teste de Tukey.....41
- Figura 14: Atividade de lacase em diferentes concentrações, utilizando tampão McIlvaine pH 5. Os valores correspondem a média de três replicatas e as médias ao desvio padrão. Barras com letras distintas indicam que as médias obtidas diferiram à nível de $p < 5$, pelo teste de Tukey.....41
- Figura 15: Atividade de lacase em diferentes concentrações utilizando tampão acetato pH 6. Os valores correspondem a média de três replicatas e as médias ao desvio padrão. Barras com letras distintas indicam que as médias obtidas diferiram à nível de $p < 5$, pelo teste de Tukey.42
- Figura 16: Atividade de lacase em diferentes concentrações utilizando tampão acetato pH 5. Os valores correspondem a média de três replicatas e as médias ao desvio padrão. Barras com letras distintas indicam que as médias obtidas diferiram à nível de $p < 5$, pelo teste de Tukey.42
- Figura 17: Termoestabilidade do extrato de lacases a 20, 30, 40 e 50°C por 24 h, utilizando ABTS como substrato em tampão acetato, pH 5. Os valores correspondem a média de três replicatas e as médias ao desvio padrão.43
- Figura 18: Atividade de lacases variando-se a concentração de ABTS utilizado para extratos obtidos do cultivo de *P. sajor-caju* em serragem de *Pinus sp.*.....45
- Figura 19: Duplo-recíproco para a atividade de lacases em ABTS para extratos obtidos do cultivo de *P. sajor-caju* em serragem de *Pinus sp.*.....46
- Figura 20: Membrana de PA utilizada no processo de imobilização.....47
- Figura 21: Relação entre a quantidade de proteína imobilizada em PA e os tampões: acetato pH 7 e pH 5 (1); McIlvaine pH 7 e pH 5 (2) e McIlvaine pH 7 e acetato pH 5 (3), para dissolução do glutaraldeído e da enzima respectivamente. Os valores correspondem a média

de três replicatas e as médias ao desvio padrão. Tratamentos com as mesmas letras não diferiram significativamente à nível de $p < 5$, pelo teste de Tukey.....	48
Figura 22: Membrana de PSU utilizada no processo de imobilização.....	49
Figura 23: Quantidade de proteína imobilizada em PSU em função dos tampões: acetato pH 7 e pH 5 (1); McIlvaine pH 7 e acetato pH 5 (2); McIlvaine pH 5 e pH 5 (3); McIlvaine pH 7 e pH 5 (4), para dissolução do glutaraldeído e da enzima respectivamente. Os valores correspondem a média de três replicatas e as médias ao desvio padrão. Barras com letras distintas indicam que as repetições diferiram a nível $p < 5$, pelo teste de Tukey.....	50
Figura 24: Quantidade de proteínas imobilizadas em filmes de PA. Os valores correspondem a média de três replicatas e as médias ao desvio padrão. A variação da quantidade de proteínas imobilizadas foi avaliada a nível $p < 5$, pelo teste de Tukey, em relação às diferentes temperaturas de reação.....	51
Figura 25: Quantidade de proteínas imobilizadas por mg de filmes de polissulfona (PSU). Os valores correspondem a média de três replicatas e as médias ao desvio padrão. A variação da quantidade de proteínas imobilizadas foi avaliada a nível $p < 5$, pelo teste de Tukey, em relação às diferentes temperaturas de reação.....	51
Figura 26: Relação entre a atividade de lacase imobilizada em filmes de PA, em função do tempo de reação e temperatura do processo. Os valores correspondem a média de três replicatas e as médias ao desvio padrão. A variação da quantidade de proteínas imobilizadas foi avaliada a nível $p < 5$, pelo teste de Tukey, em relação às diferentes temperaturas de reação.	55
Figura 27: Relação entre a atividade de lacase imobilizada em filmes de PSU, em função do tempo de reação e temperatura do processo. Os valores correspondem a média de três replicatas e as médias ao desvio padrão. A variação da quantidade de proteínas imobilizadas	

foi avaliada a nível $p < 5$, pelo teste de Tukey, em relação às diferentes temperaturas de reação.	56
Figura 28: Atividade de lacase imobilizada em filmes de PA, em função da concentração de ABTS na reação. Os valores correspondem a média de três replicatas e as médias ao desvio padrão.	57
Figura 29: Atividade de lacase imobilizada em filmes de PSU em função da concentração de ABTS na reação. Os valores correspondem a média de três replicatas e as médias ao desvio padrão. A variação da quantidade de proteínas imobilizadas foi avaliada a nível $p < 5$, pelo teste de Tukey, em relação às diferentes temperaturas de reação.....	57
Figura 30: Análise da atividade de lacase imobilizada em PA, utilizando diferentes pHs. Os valores correspondem a média de três replicatas e as médias ao desvio padrão. Barras com letras distintas indicam que as repetições diferiram a nível $p < 5$, pelo teste de Tukey.....	58
Figura 31: Análise da atividade de lacase imobilizada em filmes de PSU em ABTS com variação do pH empregando tampão acetato. Os valores correspondem a média de três replicatas e as médias ao desvio padrão. Barras com letras distintas indicam que as repetições diferiram a nível $p < 5$, pelo teste de Tukey.....	59
Figura 32: Análise da atividade de lacase imobilizada em filmes de PSU em ABTS com variação do pH empregando tampão McIlvaine. Os valores correspondem a uma análise....	61
Figura 33: Análise da atividade de lacase imobilizada em filmes de PA em ABTS com variação do pH empregando tampão McIlvaine. Os valores correspondem a uma análise....	61
Figura 34: Atividade de lacases na solução enzimática e imobilizadas em filmes de PA, em função do tempo de reação.....	63
Figura 35: Análise da atividade de lacase livre e imobilizada em filmes de PSU utilizando tampão acetato pH 3 e pH 5. O ABTS foi utilizado como substrato redutor. Os valores	

- correspondem a média de três replicatas e ao desvio padrão. A variação concentração de ABTS oxidado foi avaliada a nível $p < 5$, pelo teste de Tukey.....64
- Figura 36: Atividade de lacases imobilizadas em filmes de PA e PSU em função do tempo de reação. Os valores correspondem a média de três replicatas e as médias ao desvio padrão. A variação na concentração de ABTS oxidado foi avaliada a nível $p < 5$, pelo teste de Tukey.....65
- Figura 37: Reutilização dos sistema PA/lacase. Em cada utilização o tempo de reação com ABTS foi de trinta minutos, à temperatura de 40°C , com agitação. Os valores correspondem a média de três replicatas e as médias ao desvio padrão. Barras com letras distintas indicam que as repetições diferiram a nível $p < 5$, pelo teste de Tukey.....66
- Figura 38: Reutilização dos sistema PSU/lacase em tempos de reação de trinta minutos, à temperatura de 40°C , com agitação em função da concentração de ABTS oxidado. Os valores correspondem a média de três replicatas e as médias ao desvio padrão. Barras com letras distintas indicam que as repetições diferiram a nível $p < 5$, pelo teste de Tukey.....66
- Figura 39: Descoloração do corante Reactive Blue 220 em solução aquosa 25 mg.L^{-1} com extrato enzimático de *Pleurotus sajor-caju*. Os testes foram realizados a $25^{\circ}\text{C} (\pm 2)$, (A) inicial; (B) 1 hora; (C) 2 horas (D) 4 horas.....67
- Figura 40: Espectro de UV-Vis do corante Reactive Blue 220 25 mg.L^{-1} antes (A) e após (B) descoloração por solução enzimática de lacases68
- Figura 41: Descoloração do corante Reactive Blue 220 por caldo enzimático de lacases em função do tempo ($25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$) a 610 nm69
- Figura 42: Descoloração do corante RBBR em solução aquosa 25 mg/L , com extrato enzimático de *P. sajor-caju*. Os testes foram realizados à $25^{\circ}\text{C} (\pm 2)$, (A) inicial;(B) 24 horas.69
- Figura 43: Espectro de UV-Vis do corante RBBR 25 mg.L^{-1} (A), após 24 h (B) e após 48 h de descoloração por caldo enzimático de lacases.70

- Figura 44: Porcentagem de descoloração do corante Reactive Blue 220 25 mg.L-1 com a solução enzimática livre e imobilizada. A membrana de PA sem a enzima imobilizada (PA); a membrana de poliamida com a enzima imobilizada (PA com enzima) e solução enzimática livre; durante 24 h em reação mantida a 30°C com agitação constante. Os valores correspondem a média de três replicatas e as médias ao desvio padrão. A porcentagem de descoloração foi avaliada a nível $p < 5$, pelo teste de Tukey.....71
- Figura 45: Porcentagem de descoloração do corante RBBR com Reactive Blue 220 25 mg.L-1 utilizando a solução enzimática livre (enzima); a membrana de PA sem a enzima imobilizada (PA); a membrana de poliamida com a enzima imobilizada (PA com enzima) e a solução enzimática livre durante 24 h em reação mantida a 30°C com agitação constante. Os valores correspondem a média de três replicatas e as médias ao desvio padrão.72
- Figura 46: Porcentagem de descoloração do corante RBBR com Reactive Blue 220 25 mg.L-1 utilizando a membrana de PA com a enzima imobilizada a pH 3 e 5 e a membrana de PSU com a enzima imobilizada a pH 3 e 5, utilizando tampão acetato, durante 24 h em reação mantida a 30°C com agitação constante. Os valores correspondem a média de três replicatas e as médias ao desvio padrão.73

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Caracterização dos processos e usos das membranas (adaptado de Sforça, 1995)...	23
Tabela 2: Atividades enzimáticas em soluções obtidas após extração e precipitação de diferentes cultivos de <i>P. sajor-caju</i> em serragem de <i>Pinus spp.</i>	38
Tabela 3: Constante de inativação térmica (Kd) para atividades de lacases, utilizando ABTS como substrato redutor, a temperaturas de 20°C a 50°C.....	44
Tabela 4: Valores de massa molar média estimados por GPC em diferentes etapas da imobilização.	52
Tabela 5: Porcentagem de massa referentes aos elementos analisados por MEV/EDS em membrana de PA com extrato enzimático imobilizado de 0,1 cm ² em análises realizadas em três locais diferentes da mesma membrana.....	53
Tabela 6: Porcentagem de massa referente aos elementos analisados por MEV / EDS em membranas de PSU com extrato de lacases imobilizada (em duas análises realizadas com membranas de PSU de área 0,1 cm ²).....	53

NOMENCLATURA

ABTS – 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato)

APTES - γ -aminopropiltroetonisilano

DCP – 2,4-diclorofenol

GPC – cromatografia de permeação em gel

HFIP – hexafluor isopropanol

K_m – constante de Michaelis-Menten

LiP – lignina peroxidase

MEV – microscopia eletrônica de varredura

Mn - manganês

MnP – manganês peroxidase

M_w – massa molar média

N-HSI – n-hidroxisuccinimida

PA – poliamida 6,6

PAH – hidrocarbonetos aromáticos policíclicos

PVA – poli (álcool vinílico)

PSU – polissulfona

SEM – sistema de energia dispersiva

V_{máx} – velocidade máxima

RBBR – remazol brilliant blue r

RESUMO

As lacases (EC 1.10.3.2) são fenol-oxidases associadas à habilidade de degradar a lignina e outros compostos recalcitrantes, como xenobióticos e vários tipos de corantes sintéticos. Lacases catalisam a oxidação de vários compostos aromáticos com concomitante redução do oxigênio a água. Neste trabalho são apresentados os resultados de imobilização do extrato de lacases de *Pleurotus sajor-caju* PS2001 em filmes poliméricos de poliamida 6,6 (PA) e polissulfona (PSU), utilizando glutaraldeído como agente de ligação.

A solução enzimática de lacases foi obtida em meio sólido contendo serragem de *Pinus* spp cultivado com *P. sajor-caju*. As proteínas da solução enzimática foram imobilizadas em filmes de PA e PSU. O processo de imobilização foi estudado quanto ao pH ótimo, sendo os filmes caracterizados quanto à quantidade de proteínas imobilizadas e atividade de lacases. As membranas de PA apresentaram maior atividade de lacases quando comparadas com as de PSU. Observou-se uma redução do pH ótimo para atividade de lacases imobilizadas, utilizando-se o tampão acetato e um aumento em tampão McIlvaine. A maior atividade de lacases foi obtida após 6 h de imobilização, em reação a 30°C, com agitação constante, tanto para os filmes de PA quanto para os de PSU. Verificou-se descoloração de aproximadamente 90% da solução 25 mg/L do corante Reactive Blue 220, após 24 horas de reação, utilizando membranas de PA com a enzima imobilizada. Aproximadamente 50% da descoloração obtida deve-se a adsorção do corante pela membrana. Resultados semelhantes foram obtidos com a utilização do corante Remazol Brilliant Blue R (RBBR), com adição de Reactive Blue 220. Não foi observada descoloração sem adição do Reactive Blue, sugerindo uma ação semelhante a um mediador, proporcionando a descoloração do RBBR. Apesar de serem observadas atividades de lacases imobilizadas nas membranas de PSU, utilizando-se ABTS como substrato, não foi observada descoloração dos corantes analisados.

ABSTRACT

Laccases (EC 1.10.3.2) are phenol-oxidase enzymes associated to the degradation of lignin and a wide variety of recalcitrant compounds, such as xenobiotics and different types of dyes. Laccases catalyze the oxidation of various aromatic compounds with the concomitant reduction of oxygen to water. In this work, the results of immobilization of *Pleurotus sajor-caju* PS 2001 laccases in polyamide 6,6 (PA) and polysulfone (PSU) films, using glutaraldehyde as linking agent, are presented.

The enzymatic solution containing laccases was obtained from solid medium with *Pinus spp* sawdust cultivated with *P. sajor-caju*. The proteins present in this solution were immobilized in PA and PSU films. The immobilization process was studied with respect to the optimum pH, and the films were evaluated to determine the protein content and laccase activity. PA membranes showed higher laccase activity than PSU ones. With immobilized enzymes, a reduction of the optimum pH for laccase activity was observed, using acetate buffer and an increase using McIlvaine buffer. The higher laccase activity was achieved after 6 h of immobilization, at a reaction temperature of 30°C, under agitation, for both PA and PSU films. Discolouration of approximately 90% of solution 25 mg.L⁻¹ of the dye Reactive Blue 220 was verified, after 24 hours of reaction, using membranes of PA with the immobilized enzyme. Approximately 50% of the discolouration would be attributed from the adsorption process of the dye for the PA membrane. Similar results had been gotten with the use of the dye Remazol Brilliant Blue R (RBBR), with addition of Reactive Blue 220. Discolouration without addition of the Reactive Blue was not observed, suggesting a similar action to a mediator, providing the discolouration of the RBBR. Although to be observed immobilized activities of laccases in the membranes of PSU, using ABTS as substratum, discolouration of the analyzed corantes was not observed.

1 INTRODUÇÃO

A atividade industrial gera grande quantidade de efluentes sólidos e líquidos. Alguns destes efluentes líquidos contêm compostos com grande potencial de contaminação, capazes de provocar alterações no ambiente, além de toxicidade e mutagenicidade em seres vivos.

A legislação ambiental de países desenvolvidos, e mesmo a de países em desenvolvimento, vem exigindo melhor qualidade dos efluentes industriais, estimulando assim o desenvolvimento de pesquisas que conduzam a tratamentos mais eficientes.

Uma das alternativas tecnológicas encontradas para a degradação de compostos orgânicos altamente reativos está baseada no emprego de fenol-oxidases, principalmente lacases e peroxidases, produzidas por vários fungos de degradação branca, que possuem mecanismos eficientes no processo de degradação da lignina.

Estudos realizados utilizando as fenol-oxidases produzidas por fungos basidiomicetos, sugerem que estas enzimas podem ser empregadas em tratamentos de efluentes das indústrias têxtil e de papel e celulose e no biobranqueamento das polpas de celulose. As lacases já têm sido utilizadas industrialmente na clarificação de vinhos e sucos e no clareamento de tecidos.

Os tratamentos enzimáticos com fenol-oxidases apresentam baixa seletividade ao substrato quando comparados aos métodos convencionais de tratamentos utilizados pela indústria. Entretanto, a utilização da tecnologia enzimática ainda apresenta altos custos de produção, de separação e de purificação das enzimas, além de dificuldade na reutilização das enzimas em processos industriais.

A possibilidade de utilizar enzimas imobilizadas representa redução significativa de custos para a indústria, pois elas podem ser reutilizadas e geralmente apresentam uma maior estabilidade a variáveis como temperatura e pH durante o processo.

O objetivo geral do presente trabalho foi caracterizar a atividade de lacases livres e imobilizadas, visando contribuir para o desenvolvimento de novas tecnologias de tratamento de efluentes. Os objetivos específicos foram:

- produzir, extrair e concentrar lacases do extrato bruto, obtido do cultivo sólido de *Pleurotus sajor-caju*;
- imobilizar lacases em membranas poliméricas;
- comparar a atividade das enzimas livres e imobilizadas;
- avaliar a reutilização dos filmes poliméricos com enzimas imobilizadas;
- avaliar a capacidade de degradação de soluções de corantes têxteis por filmes poliméricos com lacases imobilizadas.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Basidiomicetes

Os fungos são organismos eucarióticos quimioorganotróficos, os quais apresentam dois tipos morfológicos principais: os fungos filamentosos, assim chamados por formarem hifas (ou filamentos revestidos de parede rígida), e as leveduras, fungos normalmente unicelulares (Loguercio-Leite & Esposito, 2004).

Ainda segundo Loguercio-Leite & Esposito (2004), os fungos constituem um grupo muito diversificado no que diz respeito à forma, à estrutura e à capacidade metabólica. A maior parte deles desenvolve-se de matéria orgânica morta e seu crescimento é afetado por fatores físicos e químicos como temperatura, umidade, concentração de oxigênio, pH, micronutrientes, fontes de carbono e nitrogênio, entre outros.

Reconhece-se a existência de três classes de fungos filamentosos: os basidiomicetes, os ficomicetes e os ascomicetes. Os fungos basidiomicetes possuem a habilidade de desenvolverem-se em qualquer substância orgânica, fazendo uso de substratos variados. As fontes de carbono como polissacarídeos, lignina, glicose, manose, frutose, óleos e ácidos orgânicos são importantes fornecedores de energia para a atividade metabólica dos cogumelos e constituem a base para a síntese de proteínas e substâncias de reserva (Peralta *et al.*, 2004a; Moda, 2003). Dessa forma, desempenham importante papel de decompositores na natureza, assimilando elementos e transformando-os em substâncias mais simples, permitindo a reciclagem dos nutrientes. Podem ser saprófitas, colonizando matéria orgânica em decomposição ou parasitas, quando as hifas colonizam matéria orgânica viva, sobre ou dentro do hospedeiro (Loguercio-Leite, 2004).

Muitos fungos possuem a capacidade de degradar a celulose. Contudo, é sua capacidade de degradar rapidamente a lignina que tem atraído a atenção de cientistas (Cloete & Malherbe, 2002).

Os fungos podem ser classificados de acordo com sua capacidade de degradar a lignina, celulose e hemicelulose em fungos da degradação branca, fungos da degradação macia e fungos da degradação marrom. Conforme Durán (2004), tanto os fungos da degradação macia (ascomicetes e deuteromicetes) quanto os fungos da degradação marrom (basidiomicetes) possuem capacidade limitada de degradação da lignina, degradando preferencialmente polissacarídeos, celulose e hemicelulose. Para Cloete & Malherbe (2002), os fungos da degradação branca (basidiomicetes) possuem um sistema enzimático capaz de degradar a lignina, permitindo sua utilização no ciclo do carbono. Leonowicz *et al* (1999) consideram os fungos da degradação branca ou basidiomicetes os principais responsáveis pela degradação da lignina, em razão de produzirem as enzimas necessárias para a degradação do substrato em moléculas menores, que podem ser utilizadas pela célula. Eichlerová *et al* (2005) afirmam que o mecanismo de ação desse sistema enzimático não é específico, possibilitando a degradação da lignina e de uma grande variedade de poluentes como hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAH), pesticidas, polímeros sintéticos e corantes sintéticos.

2.2 Gênero *Pleurotus*

Entre os basidiomicetes de degradação branca mais estudados, encontram-se as espécies de *Pleurotus* que se distinguem por apresentar corpos de frutificação com estipes concêntricas e carpóforos em forma de concha de ostra (Rajarathnam & Bano, 1989). Para Furlan *et al.* (2000), o pH de desenvolvimento (crescimento micelial) deve estar em torno de 3,5 sendo capazes de crescer a uma temperatura de 30°C.

Ainda segundo Rajarathnam & Bano (1989), *P. sajor caju* (Fig. 1) tem sido cultivado em muitas partes do mundo devido à sua habilidade saprofítica de colonizar resíduos de plantas rapidamente, com alta produtividade. Sua classificação, segundo Alexopoulos & Mins (1985), é a seguinte:

Reino Fungi

Divisão Basidiomycota

Classe Basidiomycetes

Subclasse Holobasidiomycetidae

Ordem Agaricales

Família Tricholomataceae

Gênero *Pleurotus*

Espécie *Pleurotus sajor-caju* (Fr) Singer.

Segundo Pinkoski & Thomas (1998), os basidiomicetes têm sido estudados na degradação de fenóis e corantes sintéticos contidos em efluentes industriais, por sua capacidade de atacar polifenóis, utilizando seu sistema enzimático não específico.



Figura 1. Cultivo sólido de *Pleurotus sajor-caju* (Keller, 2001).

2.3 Cultivo de basidiomicetes

Pesquisas no cultivo de cogumelos visam o aprimoramento de técnicas que proporcionem a redução dos custos da produção e/ou aumento de produtividade (Maziero, 1999). O tipo e a composição química do substrato, o teor de água, o pH e mesmo as condições do ambiente, como temperatura e luz, podem interferir no desenvolvimento e na eficiência do micélio em transformar o substrato em matéria orgânica comestível (Zanetti & Ranal, 1997).

2.3.1 Cultivo sólido

Cultivos em estado sólido são caracterizados pelo desenvolvimento de microrganismos em meio úmido, sem água livre, contendo materiais insolúveis, que exerçam a função de suporte e fonte de nutrientes (Couto & Sanromám, 2006).

O crescimento dos fungos filamentosos se dá por alongamento das células e ramificação das hifas, que crescem sobre o meio que será colonizado, e ocorre nas suas extremidades, as quais se expandem continuamente devido à chegada do novo material celular, que é transportado às pontas por correntes citoplasmáticas, sendo sintetizado nas zonas subapicais do micélio com capacidade de crescimento. À medida que as hifas crescem em comprimento, contribuem para a biossíntese por adsorção e metabolização dos nutrientes do meio. Fatores ambientais como temperatura, grau de umidade, pH e aeração podem afetar o crescimento, segundo Ferraz (2004).

Para o cultivo sólido de cogumelos, podem ser aproveitados resíduos agroindustriais como substratos a base de cana-de-açúcar, palha de trigo, palha de arroz, gramíneas, serragens, polpa e casca de frutas, folhas de bananeira, etc. (Donini *et al.*, 2005).

Ao revisar a literatura apresentada por Maziero (1990), verifica-se que as espécies do gênero *Pleurotus* já foram cultivadas em mais de 30 diferentes resíduos de origem animal ou

vegetal. Keller (2001), Munari (2003) e Silva (2004) utilizaram serragem de *Eucalyptus* spp. para o cultivo sólido de *Pleurotus sajor-caju* e observaram que este substrato proporcionou bons resultados em relação à produção de biomassa.

Couto & Sanromám (2006) avaliaram a produção de enzimas lignolíticas em cultivos sólidos de *Trametes hirsuta* e observaram que a produção de lacase inicia-se no 6º ou 7º dia de cultivo, alcançando o máximo entre o 14º e o 16º dia. Após a extração da solução enzimática, os autores analisaram a degradação dos corantes Lissamine Green B, Acid Black (azo) e Níquel (II) phthalocyanine, utilizando dois diferentes valores de pH (5,0 e 3,0), em meio líquido, contendo o caldo enzimático. Os resultados demonstraram que os corantes que estavam em pH 3,0 apresentaram uma redução maior de cor que corantes que estavam a pH 5,0, indicando que o processo de descoloração mediado por lacases é fortemente influenciado pelo pH da reação.

Peralta *et al.* (2004b) avaliaram a descoloração de corantes industriais durante o cultivo de *Pleurotus pulmonaris* em estado sólido, em meio composto por espiga de milho, tartarato de amônio e glicose. Após seis dias de análise, observou-se total descoloração da maioria dos corantes analisados.

Segundo Couto & Sanromám (2006), fermentações em estado sólido possuem algumas vantagens em relação à cultura em meio líquido, pois os equipamentos necessários à fermentação são menos sofisticados e o custo dos materiais é menor. Além disso, as fermentações em estado sólido simulam as condições naturais de crescimento dos fungos de degradação branca, estimulando a produção de enzimas lignolíticas. Apesar destas vantagens, podem apresentar dificuldades no controle da temperatura, pH e oxigenação do meio durante o processo.

2.3.2 Cultivo líquido

Apesar da maioria dos produtores comerciais utilizarem métodos tradicionais de cultivo para a produção de *Pleurotus sp.*, outros processos têm sido desenvolvidos utilizando meios de cultivo líquidos, muitas vezes com adição de compostos xenobióticos como corantes ou compostos fenólicos.

Estudos realizados por Bettin (2005), com *P. sajor-caju* crescido em cultivo submerso, mostraram que, na presença de nutrientes, micronutrientes e sacarose, o fungo é capaz de se desenvolver e produzir enzimas. Neste trabalho, foi avaliada a quantidade de biomassa e a produção de lacases em cultivos utilizando frascos agitados e biorreator de bancada de 5 L. Observou-se que, com adição de ácido gálico e CuSO_4 , ocorreu um aumento tanto da biomassa como da produção de lacases em bioreator de bancada.

Welander *et al.* (2006) avaliaram a descoloração dos corantes Reactive Red 2 (corante antraquinônico) e Reactive Blue 4 (corante azo) em bioreator de bancada, utilizando o fungo *T. versicolor* em meios de cultivo líquido contendo glicose, macro e micronutrientes, além dos corantes analisados. Observaram que, após 15 dias de cultivo, ocorreu uma redução de até 85% na absorvância relativa ao corante Reactive Blue 4, indicando modificação na estrutura do corante.

Eichlerová *et al.* (2005) estudaram a descoloração dos corantes Orange G (azo) e Remazol Brilliant Blue R (RBBR) (antraquinona) pelos fungos de degradação branca *Dichomitus squalens*, *Ischnoderma resinsum* e *Pleurotus calypttratus* em frascos agitados, com suplemento e ausência de fontes de nitrogênio. Após 14 dias, foi observada redução da cor do Orange G nos cultivos de *I. resinsum* e *P. calypttratus*, possivelmente relacionados com a quantidade de lacase presente no meio. Já o corante RBBR sofreu efeito da manganês peroxidase, presente nos cultivos de *P. calypttratus*.

Martinez *et al.* (2004) avaliaram a habilidade dos fungos *Pleurotus eryngii*, *Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus pulmonaris* e *P. sajor-caju* de degradar compostos fenólicos e não-fenólicos em meios de cultura líquidos e em palha, pela adição de 2,4-diclorofenol (2,4-DCP) e benzopireno. Os resultados sugerem que as quatro espécies de *Pleurotus* sp. podem ser utilizadas para a degradação de compostos aromáticos poluentes utilizando palha como substrato de crescimento.

2.4 Celulose, hemicelulose e lignina

A celulose é a substância orgânica mais abundante da Terra. É um polímero linear formado por unidades de anidro-glicose unidas por meio de ligações β -(1-4)-glicosídicas (Fig. 2) (Rajarithnam & Bano, 1989).

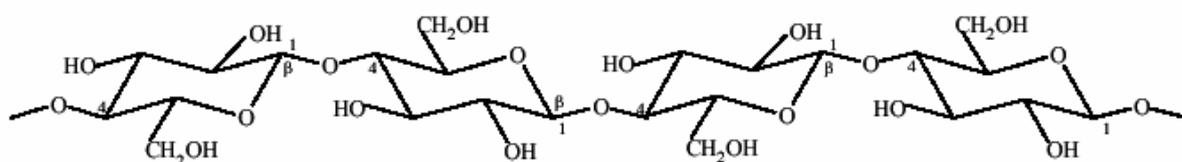


Figura 2. Estrutura de um fragmento de celulose (Tavares, 2006).

A degradação da celulose ocorre pela ação de três grupos de enzimas: as endo-1,4- β -glicanases, que rompem a molécula ao acaso e liberam fragmentos menores; as exo-1,4- β -glicanases, que hidrolisam pelas pontas os fragmentos menores e as 1,4- β -glicanases que hidrolisam a celobiose até a glicose (Ferraz, 2004).

A celulose está estruturalmente ligada à hemicelulose e à lignina, não sendo assim um substrato facilmente acessível. Fisicamente, a celulose é um material sólido e branco que existe no estado amorfo-cristalino. A forma cristalina é resistente ao ataque químico e à

degradação microbiana enquanto que a forma amorfa é primeiramente atacada e degradada (Tavares, 2006).

As hemiceluloses podem representar até 20% dos diferentes tipos de materiais lignocelulósicos. São estruturas compostas por açúcares na forma de pentoses e hexoses, facilmente hidrolisáveis. As pentoses mais encontradas são a xilose e a arabinose, enquanto que as hexoses presentes na hemicelulose são a glicose, manose e galactose (Rajarithnam & Bano, 1989). Assim como as celulases, as endo-hemicelulases hidrolisam o polímero ao acaso; as exo-hemicelulases hidrolisam os fragmentos gerados pelas endo-hemicelulases e as xilosidases hidrolisam dímeros a açúcares monoméricos (Ferraz, 2004).

A lignina é um polímero formado por unidades de fenilpropano unidas por diferentes tipos de ligações (Fig. 3) (Rajarithnam & Bano, 1989), é muito resistente à degradação por microrganismos em condições naturais (Arora & Gill, 2002). Várias enzimas estão associadas direta ou indiretamente à biodegradação da lignina, incluindo-se manganês-peroxidase (MnP), lignina-peroxidase (LiP) e lacases. Estas enzimas podem ser ordenadas segundo seus potenciais de oxidação: $LiP > MnP > Lacases$. As LiPs apresentam potencial de oxidação suficientemente elevado para abstrair elétrons de estruturas fenólicas. As MnP, assim como as lacases, apresentam potencial de oxidação suficiente, somente, para oxidar estruturas fenólicas (Hatakka *et al.*, 2000).

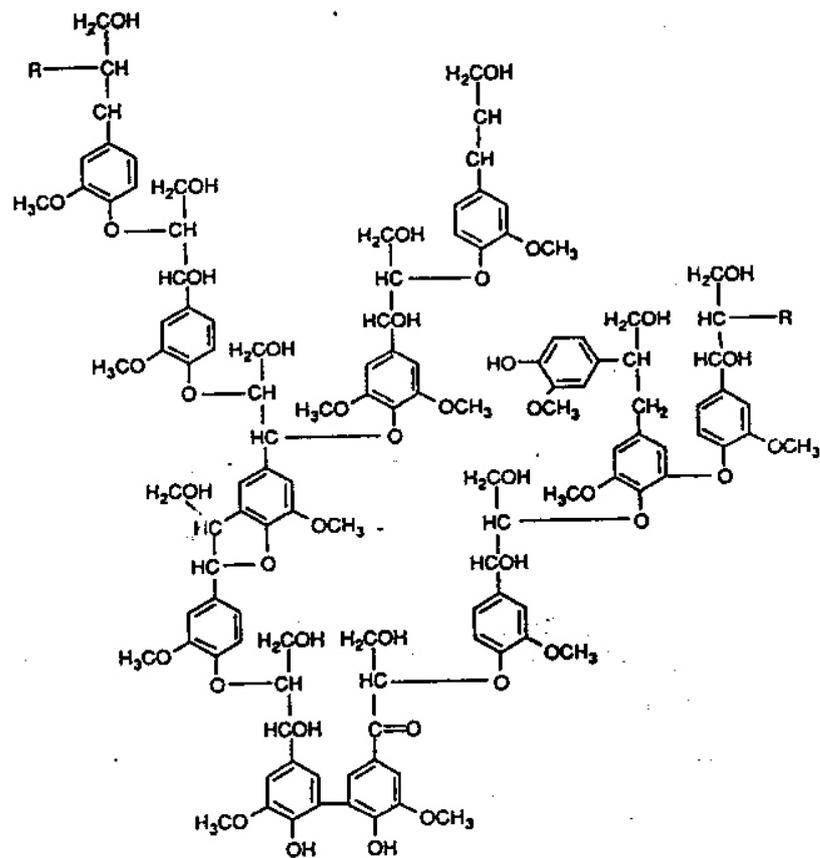


Figura 3. Estrutura química da lignina (Barr & Aust, 1994).

Fungos de degradação branca produzem várias isoformas extracelulares de enzimas oxidases, incluindo lacases, MnP, LiP, que estão envolvidas no processo de degradação da lignina em seus substratos lignocelulósicos naturais. As fenol-oxidases são enzimas não específicas com relação ao substrato, o que permite que os microrganismos produtores sejam

capazes de degradar compostos cujas estruturas sejam semelhantes aos derivados de lignina (Silva & Gomes, 2004).

Com relação à produção, alguns fungos de degradação branca produzem todas as três enzimas, enquanto outros produzem apenas uma ou duas delas afirmam Peralta *et al* (2004a), Hatakka *et al.* (2005) e Arora & Gill, (2000). Fungos de degradação branca como *Phanerochaete chrysosporium*, *Bjerkandera adusta*, *Trametes versicolor* e *Phlebia radiata* já foram descritos como grandes produtores de lacases e capazes de degradar vários corantes (Leonowicz *et al.*, 1999).

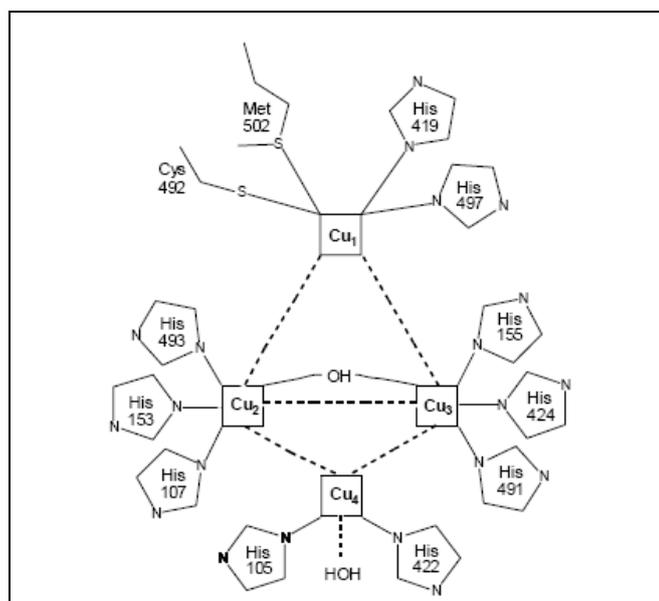
2.5 Lacases

As lacases são cuproproteínas, que fazem parte de um pequeno grupo de enzimas denominadas oxidases azuis (Messerschmidt, 1994; Durán *et al.*, 2002). Inicialmente, as lacases foram descobertas nos exsudatos da árvore japonesa *Rhus vernicifera* e descritas por Yoshida em 1883, sendo posteriormente identificadas em fungos, insetos e eubactérias (Hatakka *et al.*, 2005; Thurtson, 1994). Elas são glicoproteínas que normalmente contêm cobre em seu centro ativo, embora já tenham sido identificadas lacases fúngicas com outro tipo de metal além do cobre (Solomon *et al.*, 1996).

As lacases extraídas de plantas são monômeros extracelulares com conteúdo de carboidratos de 22-45% da massa da proteína, possivelmente envolvidas na biossíntese da lignina e possuem características distintas das lacases fúngicas. Em fungos já foram identificadas diferentes isoenzimas de lacases, sendo que um mesmo fungo pode produzir a enzima intra e extracelular (Durán *et al.*, 2002). Normalmente, seu conteúdo de carboidrato é um pouco menor que o de plantas, 10-25%, podendo apresentar enormes variações (15-41%) (Peralta *et al.*, 2004b). A função fisiológica desses biocatalisadores é diferente nos vários organismos em que estão presentes, mas todas catalisam processos de polimerização ou

despolimerização. Em plantas, estão envolvidas na formação da parede celular e, junto com as peroxidases, na lignificação (Riva, 2006). Estas enzimas também podem estar associadas a fatores de virulência em muitas doenças causadas por fungos (Chattoo & Iver, 2003). Para as lacases fúngicas, foram descritas três possíveis funções: (1) formação do pigmento; (2) degradação da lignina; (3) detoxificação (Sólomon *et al.*, 1996). Uma das possíveis funções da lacase pode ser a detoxificação de quinonas de baixo peso molecular e fenóis produzidos durante a quebra da lignina, sua oxidação e polimerização, pois esses produtos são tóxicos para o fungo (Sanromán *et al.*, 1997). As lacases possuem massas molares entre 60-100 kDa (Durán, 2004). Entre as lacases fúngicas, pode ser observada uma grande variabilidade no mecanismo de indução, grau de polimorfismo e características físico-químicas (massa molecular, ponto isoelétrico e conteúdo de carboidratos) e propriedades cinéticas. Em algumas espécies de fungos, a adição de indutores ao meio de cultura pode resultar na biossíntese de novas formas extracelulares (Bonomo *et al.*, 1988; Durán *et al.*, 2002; Giardina *et al.*, 2003; Shleev *et al.*, 2004).

As lacases são oxidoreduases que catalisam a oxidação de numerosos compostos aromáticos (principalmente fenóis), com concomitante redução de oxigênio para água (Thurtson 1994; Durán & Esposito, 2000; Soden *et al.*, 2001; Riva, 2006) e possuem quatro átomos de cobre ligados ao centro ativo. De acordo com suas características espectroscópicas, podem ocorrer três tipos de cobres: o cobre tipo 1 ou T1, que dá a cor azul às enzimas,



também conhecidas como lacases azuis; o cobre tipo 2 (T2) ou normal e o cobre tipo 3 (T3), binuclear, que é formado por dois átomos de cobre associados entre si (Fig. 4) (Sólomon *et al.*, 1996; Peralta *et al.*, 2004b).

Figura 4: Representação da estrutura tridimensional dos centros de cobre da lacase (Claus, 2004).

De acordo com Call & Mucker (apud Duran & Espósito, 2000), os cobres tipo 1 e 2 estão envolvidos na captura e transferência de elétrons, enquanto os cobres tipo 2 e 3 estão envolvidos na ligação com o oxigênio.

O ciclo catalítico das lacases compreende três passos principais (Fig. 5): redução do cobre tipo 1 pelo substrato; transferência eletrônica interna do cobre tipo 1 para os cobres tipos 2 e 3; transferência de elétrons do cobre para O_2 , reduzindo-o para H_2O (Wesenberg *et al.*, 2003).

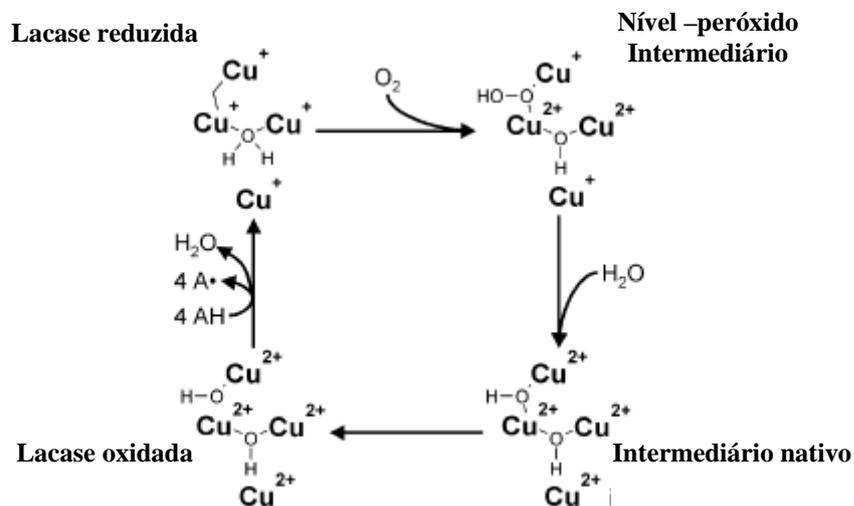


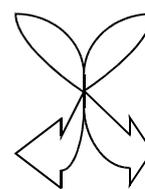
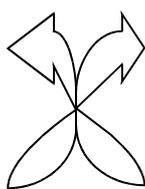
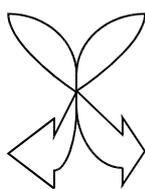
Figura 5. Ciclo catalítico da lacase (adaptado de Wesenberg *et al.*, 2003).

Em geral, as lacases apresentam baixa especificidade para os substratos redutores, quando comparada com sua alta preferência pelo O₂ como substrato oxidante. A oxidação dos substratos redutores tipicamente envolve a formação de radicais livres, após a transferência de um elétron para a lacase, sendo que o radical pode sofrer uma oxidação catalisada pela lacase ou reagir por rotas não enzimáticas (Thurston, *et al.*, 1994; Eriksson *et al.*, 1996; Mayer & Staples, 2002).

Por possuírem uma baixa especificidade ao substrato, a atividade catalítica das lacases depende da fonte. Bifenóis simples como hidroquinona e catecol são bons substratos para a maioria das lacases, mas guaiacol e 2,6-dimetoxifenol geralmente são os melhores substratos. As lacases também são capazes de catalisar a oxidação de outros polifenóis, aminas aromáticas, e uma série de outros compostos como corantes fenólicos, clorofenóis, benzopirenos, organofosforados (Durán *et al.*, 2000; Chen *et al.*; 2002; Denizli *et al.*; 2005). As reações catalisadas por lacases dependem, basicamente, do potencial redox da temperatura e do meio de reação (Elegir *et al.*, 2005)

Freqüentemente, os substratos de interesse não podem ser oxidados diretamente pelas lacases, pois são grandes demais para o sítio ativo da enzima ou possuem um potencial redox particularmente alto (Gonzalez *et al.*, 2005; Riva, 2006). É possível superar essa limitação com a adição de mediadores químicos, compostos que podem ser oxidados por lacases, formando intermediários capazes de interagir com outros substratos que possuem potencial redox mais alto (Fig. 6) (Bourbonais & Paice, 1990; Gentili *et al.*, 2003).

Diferentes compostos naturais ou sintéticos podem atuar como intermediários eletrônicos ou mediadores, expandindo as reações catalisadas por lacases para a produção de espécies ativas de oxigênio, oxidando unidades não fenólicas de lignina, corantes azo e índigo, e outros PAH que não seriam naturalmente oxidados pelas lacases (Saparrat *et al.*, 2002).



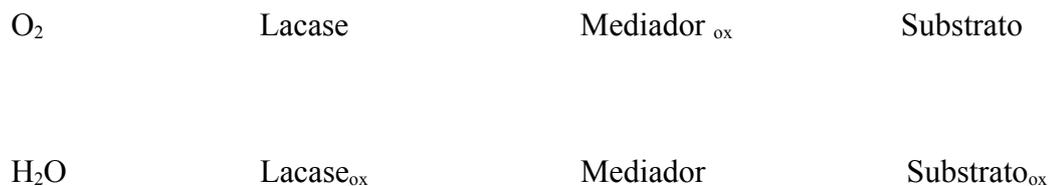


Figura 6: Utilização de mediador na oxidação de substratos pela lacase. (adaptado de Zille *et al.* 2005).

Várias aplicações para lacases já foram propostas. Especificamente, a oxidação de derivados fenólicos tem sido estudada em processos de biorremediação para descontaminação de efluentes industriais. Os derivados polifenólicos poliméricos normalmente são o resultado da ação oxidativa das lacases que, por serem freqüentemente insolúveis, podem ser separados do sistema facilmente por filtração ou sedimentação (Riva, 2006).

O sistema lacase-mediador pode representar uma alternativa para o processo de clareamento de polpa de celulose e papel, competindo com eficientes oxidantes sintéticos como hipoclorito. Sua utilização pode ser rapidamente implementada no processo industrial, além de possuir benefícios ambientais, possibilitando a substituição do ClO_2 nos moinhos de clareamento (Elegir *et al.*, 2005).

Foram sugeridas várias aplicações para lacases nas indústrias têxtil, de corantes ou de impressão – em processos relacionados à descoloração de corantes – e em indústria de papel e de polpa de celulose – para a deslignificação de fibras de madeira, particularmente durante o processo de branqueamento. Em muitas dessas aplicações, as lacases são utilizadas junto com um mediador químico (Guaratini & Zanoni, 2000; Jolivalt *et al.*, 2000; Kunz *et al.*, 2002; Riva, 2006).

Uma das muitas desvantagens de se utilizar enzimas livres em diferentes processos é sua instabilidade frente a alterações térmicas, desnaturação em alguns valores de pH, proteólise e inativação por inibidores. A imobilização de enzimas em suportes sólidos muitas vezes aumenta a estabilidade e possibilita sua reutilização (D'Annibale *et al.*, 2000).

2.6 Peroxidasas: lignina-peroxidase e manganês-peroxidase

As peroxidasas são heme-proteínas, amplamente distribuídas na natureza, que catalisam a oxidação do substrato na presença de peróxido de hidrogênio (H_2O_2). As enzimas conhecidas como lignina-peroxidase (LiP) (E.C. 1.11.1.14) e manganês-peroxidase (MnP) (E.C. 1.11.1.13) foram isoladas, inicialmente de *P. chrysosporium* e, posteriormente, de outros basidiomicetes e ascomicetes (Baker & Sinitsyn, 1993; Durán *et al.*, 1998; Durán & Espósito, 2000; Arora *et al.*; 2000; Martínez, 2002).

Os ciclos catalíticos da LiP e MnP são semelhantes aos de outras peroxidasas (Peralta *et al.*, 2004a). No estado de repouso, o ferro do grupo heme da peroxidase está no estado férrico (Fe III). O H_2O_2 oxida a enzima férrica por dois elétrons para uma forma da enzima conhecida como composto I, um radical catiônico (Fe IV). Então, um composto químico pode ser oxidado por um elétron até um radical e o composto I pode ser reduzido ao composto II. Uma subsequente oxidação de outra molécula pelo composto II faz a peroxidase retornar ao seu estado férrico (Barr & Aust, 1994).

A LiP é uma glicoproteína que contém o grupo heme (ferro protoporfirina IX) em sua estrutura, com massa molar de 38-43 kDa, sendo capaz de mineralizar uma ampla variedade de compostos recalcitrantes aromáticos e oxidar vários compostos fenólicos, não-fenólicos e policíclicos aromáticos (Durán, 2004; Durán & Esposito, 2000).

A MnP é considerada uma das principais enzimas envolvidas no processo de degradação da lignina e compostos xenobióticos aromáticos. São proteínas extracelulares, glicosiladas, expressas em múltiplas formas, com massas moleculares variando de 40 a 48 kDa (Peralta *et al.*, 2004a). A MnP oxida Mn^{+2} para Mn^{+3} na presença de H_2O_2 . Para estabilizar a formação de Mn^{+3} , é necessária a presença de um ácido quelante que, em geral, é um ácido dicarboxílico secretado por fungos. Em reações de peroxidação mediadas por

lipídios, a MnP oxida, preferencialmente, sub-estruturas não fenólicas de lignina (Hatakka *et al.*, 2005).

Hatakka *et al.* (2005) produziram MnP em cultivos sólidos do fungo de degradação branca *Physisporinus rivulosus*. As isoformas de MnP foram purificadas por cromatografia e caracterizadas, indicando a presença de enzimas com massa molecular entre 47 e 52 KDa.

2.7 Imobilização

O desenvolvimento de técnicas de imobilização tem sido importante por proporcionar a reutilização das enzimas, facilitar a separação dos produtos e aumentar a estabilidade em solventes orgânicos (Nascimento *et al.*, 2004).

A obtenção de enzimas imobilizadas foi efetuada, pela primeira vez, por Nelson & Griffin, em 1916, que adsorveram a enzima invertase em carvão ativado e alumina, com retenção de sua atividade catalítica. O desenvolvimento dos processos de imobilização de enzimas ocorreu a partir de 1960. Em 1969, no Japão, foi implantado o primeiro processo industrial utilizando enzimas imobilizadas para produção de L-aminoácidos, seguido da implantação, nos Estados Unidos, em 1972, do processo de isomerização de glicose em frutose, empregando-se glicose-isomerase imobilizada. Desde então, novos processos de imobilização e novas aplicações industriais têm sido relatados na literatura (Zanin & Moraes, 2004).

Vários métodos, baseados principalmente em mecanismos físicos e químicos são utilizados para imobilização de enzimas os quais podem ser aplicados para a imobilização de enzimas em suportes sólidos ou géis (Duran *et al.*, 2002; Giambierini *et al.*, 1994). Os métodos químicos de imobilização incluem ligações covalentes entre a enzima e a matriz, reticulação (*cross-linking*) entre a enzima e a matriz e reticulação enzimática por reagentes

multifuncionais. Os métodos físicos envolvem a adsorção, o encapsulamento de moléculas de enzimas nos poros das fibras, o confinamento em matrizes formadas por géis poliméricos insolúveis ou em micelas (Durán *et al.*, 2002).

A imobilização química envolve ligação covalente entre a enzima e o suporte polimérico. Ocasionalmente, o sítio ativo pode ser bloqueado pela ligação com o suporte. Contudo, se a ligação covalente não inviabilizar o sítio ativo, pode-se obter uma eficiência catalítica maior (Palet *et al.*, 2006). A Figura 7 mostra, esquematicamente, a classificação dos métodos utilizados para a imobilização de enzimas (Nascimento *et al.*, 2004).

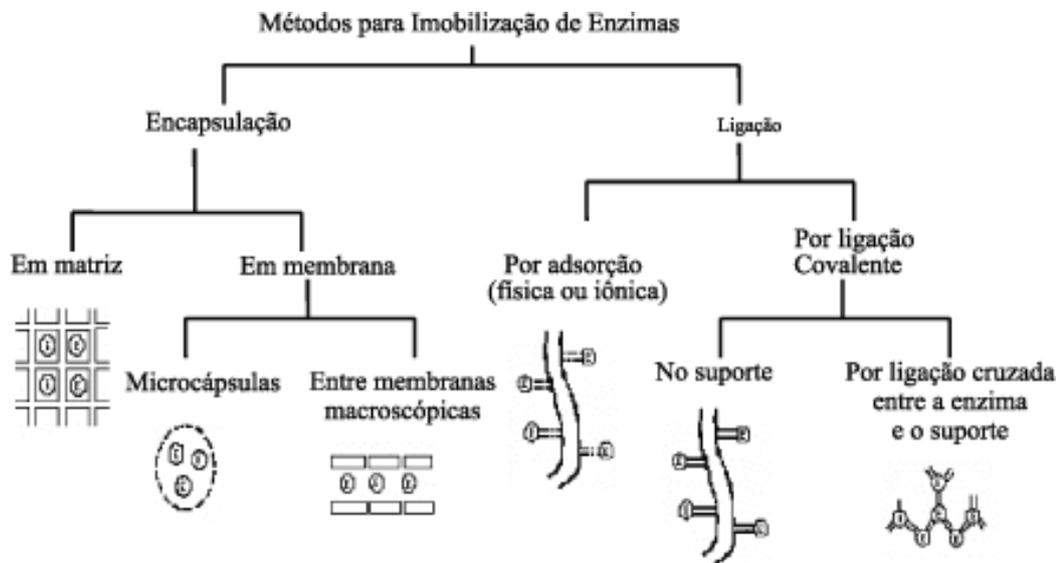


Figura 7. Métodos de imobilização de enzimas (Nascimento *et al.*, 2004).

2.7.1 Imobilização por ligação covalente ou cruzada

O método de imobilização por ligação covalente envolve a modificação química de um resíduo de aminoácido através da formação de uma ligação covalente da enzima com um material insolúvel em água, pela fixação da enzima na matriz por ligação covalente ou pela formação de ligações cruzadas numa matriz contendo a enzima e usando vários agentes bifuncionais, como glutaraldeído, por exemplo (Nascimento *et al.*, 2004).

Rogalski *et al.* (1999) imobilizaram lacase de *Cerrena unicolor* em vidro com porosidade controlada, ativado com γ -aminopropiltriétoxissilano (APTES), utilizando glutaraldeído e carbodiimida como agentes de reticulação. A velocidade máxima ($V_{\text{máx}}$) da enzima imobilizada apresentou redução de 18-26%, dependendo do substrato utilizado. A enzima imobilizada manteve até 100% da atividade em análises feitas com 10% de acetona adicionados à solução tampão.

Leontievsky *et al.* (2001) imobilizaram lacase extraída do fungo de degradação branca *C. versicolor* em Celite R-637 (Bio-Catalyst Carrier) por ligações covalentes utilizando glutaraldeído. Após uma queda inicial de 50% da atividade, a enzima reteve a atividade por um período de 33 dias a 4°C. Um estudo comparativo entre a enzima livre e imobilizada indicou um aumento da estabilidade em pH alcalino, à altas temperaturas e à ação de inibidores.

Jarosz-Wilkolazka *et al.* (2004) imobilizaram lacase extraída de *C. unicolor* na superfície de eletrodos de grafite por adsorção física. Os eletrodos foram testados para detecção de polifenóis, incluindo flavonóides. Nas análises foram utilizados compostos como catequina hidratada e epicatequina como substratos. Os eletrodos modificados produziram respostas para substâncias simples como o ácido cafeico e compostos com três ou mais anéis fenólicos e não-fenólicos, embora com diferente sensibilidade, demonstrando que apenas a adsorção da enzima no grafite é suficiente para a obtenção de medidas simples de polifenóis em solução.

Shiyu *et al.* (2002) imobilizaram lacase de *Panus conchatus* em suportes de poli(álcool vinílico) (PVA) ativados por N-hidroxisuccinimida (N-HSI). A lacase imobilizada reteve 50% da atividade após 17 reutilizações contínuas, removendo aproximadamente 72,5% do 2,4,6-triclorofenol (TCP) presente na solução.

Peczynska-Czoch *et al.* (2002) analisaram a atividade de lacase de *C. unicolor*, *Heterobasidion annosum* e *T. versicolor* imobilizada por ligações covalentes em suportes de celulose modificados (DEAE-Granocel 500, CM-Granocel 500) e suportes acrílicos. Eles constataram que a enzima imobilizada apresentou maior resistência à desnaturação térmica, retendo 70% da atividade a 90°C, sendo que, após 4 meses de armazenamento a 4°C, a ela manteve 98% da atividade inicial.

2.7.2 Imobilização por métodos físicos

O método de adsorção física é a técnica mais antiga de obtenção de enzimas imobilizadas, assim como a mais simples. Consiste em se colocar em contato a solução aquosa contendo a enzima com o suporte poroso, em condições de pH, temperatura e agitação controlados. Após a imobilização, o suporte é lavado para remover as moléculas que não foram adsorvidas (Zanin & Moraes, 2004).

A imobilização enzimática por métodos físicos pode ser benéfica por causar baixas modificações na estrutura nativa da enzima e em sua função. As enzimas podem ser adsorvidas em uma grande variedade de suportes que, em alguns casos, podem ser reutilizados por remoção da enzima inativa e adsorção de uma nova enzima (Durán *et al.*, 2002).

Griebenow *et al.* (2000) imobilizaram lacase por adsorção física em vidro, sílica gel e membranas de poliamida 6,6. A atividade da enzima e a estabilidade foram determinadas nos solventes não-aquosos dietiléter, acetato de etila e cloreto de metila. Observou-se que a

oxidação de siringaldazina variou dependendo do suporte e do solvente utilizado, mas os melhores resultados foram obtidos com membranas de poliamida 6,6.

O sucesso e a eficiência da adsorção de uma enzima em um suporte, que em geral é na superfície, depende de vários fatores, tais como tamanho da proteína a ser adsorvida, área superficial do adsorvente e da porosidade (Nascimento *et al.*, 2004; Zanin & Moraes, 2004).

2.7.3 Suportes para imobilização

Em uma reação com biocatalisadores, variáveis como tipo de solvente, a quantidade de água e a solubilidade de substratos e produtos devem ser avaliadas. As enzimas necessitam de uma pequena quantidade de água para reter sua conformação tridimensional ativa, mesmo quando estão ligadas covalentemente a um suporte (Nascimento *et al.*, 2004).

Na seleção do suporte para uma determinada aplicação, devem ser analisadas suas propriedades físicas e químicas tais como: possibilidade de adsorver ou acumular outras substâncias além da enzima; morfologia; composição; resistência ao ataque microbiológico; resistência mecânica (Zanin & Moraes, 2004).

Para viabilizar a aplicação na indústria de enzimas imobilizadas, é necessário viabilizar o custo de imobilização, a retenção da atividade enzimática, estabilidade da enzima à temperatura, pH e estabilidade operacional, além de projetar um bioreator adequado (Nascimento *et al.* 2004).

Membranas poliméricas podem ser utilizadas em vários processos de separação como microfiltração, ultrafiltração, osmose reversa, diálise, eletrodialise e pervaporação. As diferenças de cada processo estão na força motriz aplicada e na morfologia da membrana (Tabela 1) (Merçon *et al.*, 2003).

Tabela 1: Caracterização dos processos e usos das membranas (adaptado de Sforça, 1995).

Processo	Força Motriz	Poros da Membrana	Mecanismo de Separação
Microfiltração	Pressão (10-100 kPa)	0,2-10 μ m	Tamanho
Ultrafiltração	Pressão (0,1-1 kPa)	0,01-0,02 μ m	Tamanho
Osmose Reversa	Pressão (1-10 kPa)	0,0001-0,001 μ m	Tamanho/Solubilidade/ Difusão
Eletrodialise	Potencial elétrico	Variáveis	Carga
Pervaporação	Concentração	Variáveis	Solubilidade/Difusão
Separação de gás	Concentração	Variáveis	Solubilidade/Difusão

Membranas sintéticas podem ser classificadas quanto ao tipo de material de que são formadas em orgânicas e inorgânicas, ou quanto à sua estrutura morfológica em homogênea ou heterogênea, simétrica ou assimétrica (Fig. 8) (Queiroz *et al.*, 2001).

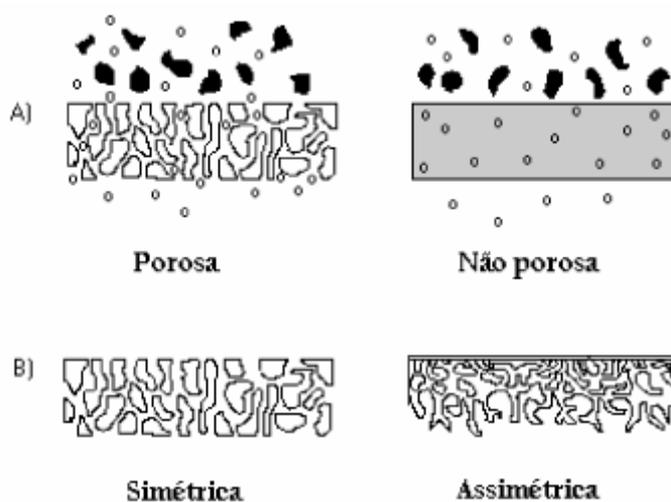


Figura 8. Representação esquemática de membranas com diferentes morfologias: A) membranas porosas e não porosas; B) Membranas porosas simétricas e assimétricas (Queiroz *et al.*, 2001).

A formação de membranas por precipitação de uma solução polimérica é conhecida por inversão de fase, e geralmente produz membranas assimétricas (diferentes tamanhos de

poros) em que a porosidade pode ser variada pelo ajuste da composição da solução polimérica e pela seleção das condições do processo de precipitação. O mecanismo de formação de poros por este processo está assim relacionado à concentração, à variação da temperatura, à umidade do ar e ao tipo de solvente e não solvente utilizado no sistema (Sforça, 1995).

Todo o material utilizado como suporte para a imobilização afeta a quantidade de água total nas proximidades da enzima. A imobilização em suportes hidrofílicos pode reduzir a atividade enzimática, devido a mudanças conformacionais. Em alguns casos, a matriz pode impor uma barreira, resultando em rigidez na estrutura da enzima (Nascimento *et al.*, 2004).

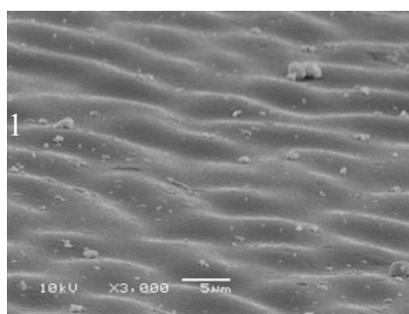
As membranas de poliamida e polissulfona utilizadas neste trabalho foram desenvolvidas no Laboratório de Química da Universidade de Caxias do Sul.

2.7.3.1 Membranas de poliamida 6,6

A poliamida 6,6 (PA) é um polímero semicristalino, com boa estabilidade térmica e resistência mecânica, sendo considerado um importante termoplástico de engenharia. É amplamente utilizado por ser um polímero de baixo custo e por apresentar facilidade em formação de filmes e controle de porosidade (Cheng, *et al.*, 2006).

Esse polímero é obtido pela polimerização de dois monômeros: hexametilenodiamina e ácido adípico em uma reação de policondensação (Gupta, 1989).

As membranas de poliamida porosas são amplamente comercializadas e, atualmente, vêm sendo empregadas em processos de separação. Elas são preparadas a partir de uma solução de poliamida (Alfa), em ácido clorídrico (10% p/v). Sua estrutura é semelhante a do



polímero comercial, apresentando um tamanho de poro adequado para processos de ultrafiltração (Mello *et al.*, 2005).

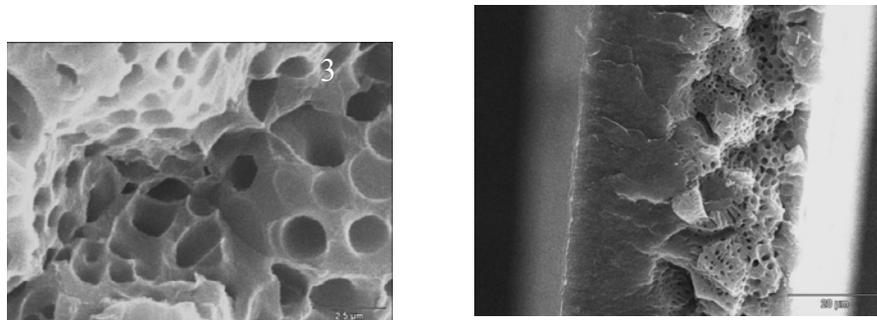


Figura 9: Micrografias (MEV) da membrana de PA: 1 – Superfície da membrana (3000X); 2 – secção transversal (1500X); 3 – Poros da membrana (10000X) (Mello, dados não publicados).

Através de análises de MEV (Fig. 9), pode ser observado que membranas de PA apresentam pequeno tamanho de poro superficial e pouca homogeneidade no interior, podendo ser classificadas como ideais para serem utilizadas em processos de ultrafiltração. Os filmes de PA apresentam espessura variável de 25 a 65 μm e um grau de encharcamento máximo de 60% para o filme de maior espessura e tamanho médio de poro de 8,8 nm (Mello, dados não publicados).

2.7.3.2 Membranas de polissulfona

As polissulfonas (PSU) são polímeros de características predominantemente amorfas em relação à estrutura cristalina (Fig. 10) e apresentam elevada resistência química a ácidos, álcalis, soluções salinas, detergentes, óleos e álcoois (Mistry, 1996). As PSU são atacadas por

solventes orgânicos polares como cetonas, hidrocarbonetos halogenados e hidrocarbonetos aromáticos, sendo altamente hidrofóbicas (Souza *et al.*, 2006).

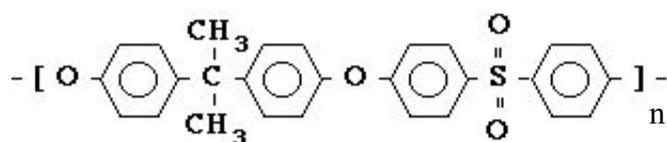


Figura 10: Estrutura molecular da PSU (Mistry, 1996).

Membranas de PSU podem ser utilizadas em processo de ultrafiltração e eletrodialise por apresentarem excelente estabilidade térmica e mecânica e alta resistência à hidrólise e aos agentes oxidantes. Os filmes podem apresentar espessura variável de 40 a 55 μm e um grau de encharcamento máximo de $2,6 \pm 0,43\%$ para o filme de maior espessura e tamanho médio de poros de 7,7 nm (Souza *et al.*, 2006).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Linhagem

Para o desenvolvimento deste trabalho, foi utilizada a linhagem PS 2001 de *Pleurotus sajor-caju*, proveniente da empresa Brasmicel Ltda., localizada em Nova Poá, SP. Esta linhagem atualmente é utilizada pelo Laboratório de Processos Biotecnológicos I do Instituto de Biotecnologia da UCS.

3.2 Condições de cultivo

3.2.1 Manutenção de linhagens

O meio de manutenção da linhagem continha: 20 g de serragem de *Pinus* sp., 20 g de farelo de trigo moído, 2 g de CaCO₃, 20 g de ágar-ágar e 200 mL de água destilada. O meio foi autoclavado a 1 atm por 30 min. As placas com o inóculo foram mantidas em estufa a 28°C até completo crescimento micelial e armazenadas a 4°C.

Os inóculos em placas de manutenção foram feitos por transferência de blocos cilíndricos de ágar (0,5 cm de diâmetro), contendo cultivos.

3.2.2 Cultivo em estado sólido

O substrato utilizado para o cultivo em estado sólido foi preparado com 93 g de serragem de *Pinus* sp, suplementado com 6 g de farelo de trigo e 1 g de carbonato de cálcio (Tan & Wahab, 1997), sendo adicionada água destilada até a obtenção de 66% de umidade. Após, alíquotas do meio homogeneizado foram dispostas em sacos de polipropileno com dimensões de 15,5 cm x 25 cm, sendo estes esterilizados por autoclavagem a 1 atm, durante

2 h. Os sacos com meio foram inoculados com 3 blocos cilíndricos de ágar (1 cm de diâmetro). Os meios foram mantidos a 28°C ($\pm 2^\circ\text{C}$) por 15 dias.

3.3 Preparo do extrato enzimático

Para a extração das enzimas secretadas, o conteúdo dos sacos de cultivo foram homogeneizados e alíquotas de 25 g suspensas em 50 mL de água destilada, agitadas por 30 min, a 160 rpm, em temperatura de 4°C. Os sólidos foram removidos por filtração e centrifugação a 8.000 g, durante 15 min. O sobrenadante foi considerado como extrato enzimático.

3.3.1 Precipitação do extrato enzimático

Para precipitação do extrato enzimático, sulfato de amônio foi adicionado gradualmente, durante 2 h, a 100 mL de extrato enzimático, até a obtenção de 80% de saturação, sob agitação leve, a 4°C. Após, o extrato foi centrifugado a 8.000 g, em temperatura de 4°C, durante 30 min, sendo o precipitado ressuspenso em quantidades variáveis de tampão McIlvaine (fosfato dissódico 0,1 M – ácido cítrico 0,1 M), pH 5,0, dialisado em membranas de acetato de celulose por 24 h, com três trocas do mesmo tampão.

3.4 Determinações enzimáticas e de proteínas totais

3.4.1 Lacases

A atividade de lacases foi determinada com a utilização do substrato ABTS 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato). A mistura reacional continha 0,2 mL do substrato (5 mM), 1,5 mL de tampão acetato de sódio pH 5,0 e 0,5 mL da amostra, em volume final de 2,2 mL. A oxidação do ABTS foi monitorada pelo aumento da banda de

absorção em 420 nm, durante 90 segundos, a 25°C. Para determinação da concentração de ABTS oxidado utilizou-se um $\epsilon_{420} = 3,6 \times 10^4 \text{ cm}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{L}$ (Willson & Woldenden, 1982).

3.4.2 Peroxidases totais

A atividade de peroxidases foi determinada com a utilização do substrato ABTS 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato), em ensaios realizados de forma idêntica aos adotados para lacases, mas com a presença de 200 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ de H_2O_2 , em volume final de 2,4 mL. A oxidação do ABTS foi monitorada pelo aumento da banda de absorção em 420 nm, durante 90 segundos, a 25°C. As atividades de peroxidases foram descontadas das atividades detectadas para lacases (Heinzkill *et al.*, 1998).

3.4.3 Manganês peroxidase

A atividade de manganês peroxidase foi determinada pelo método proposto por Kuwahara *et al.* (1984). A mistura reacional consistia em 50 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ de vermelho de fenol, 50 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ de sulfato de manganês, 50 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ de H_2O_2 , 12,5 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ de lactato de sódio, 500 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ de albumina bovina e tampão succinato de sódio 20 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ pH 4,5, sendo adicionado 0,5 mL de amostra, resultando em volume final de 2 mL. Após 5 min a 30°C, as reações foram interrompidas com adição de 40 μL de NaOH 2 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$. A formação do produto de oxidação foi quantificada pela variação da banda de absorção, utilizando-se $\epsilon_{610} = 4,46 \times 10^4 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$.

3.4.4 Lignina peroxidase

A atividade de lignina peroxidase foi determinada pela formação do aldeído veratrílico ($\epsilon_{310} = 9,3 \times 10^3 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$), numa mistura reacional contendo $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ de álcool veratrílico em presença de $500 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ de H_2O_2 , em meio tamponado com $250 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ de tartarato de sódio pH 3,0, com volume final de 2 mL (Tien & Kirk, 1984). As reações foram iniciadas pela adição de 0,5 mL de amostra; e a variação da banda de absorção, observada por 5 min a 30°C .

3.4.5 Oxidases do álcool veratrílico

Para determinação das atividades de álcool veratrílico foi observada a formação de aldeído veratrílico a partir de uma reação contendo $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ de álcool veratrílico e $250 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ de tampão tartarato de sódio pH 5,0, com volume final de 2 mL, sendo a reação monitorada durante 5 min a 30°C , utilizando-se $\epsilon_{310} = 9,3 \times 10^3 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$ (Bourbonnais & Paice, 1988).

3.4.6 Determinação de proteínas totais

As proteínas totais presentes nas amostras foram determinadas pelo método descrito por Bradford (1976). O complexo azul, resultante da ligação das proteínas presentes nas soluções enzimáticas, ao corante Comassie Brilliant Blue G-250, foi medido em espectrofotômetro de UV-Vis, Beckman modelo DU530.

Para o preparo do reagente de Bradford, 100 mg de Comassie Brilliant Blue G-250 foram dissolvidos em 50 mL de etanol 95%. A esta solução, adicionaram-se 100 mL de ácido fosfórico 85% e o volume foi completado com água destilada para alcançar o volume 1 L. O

reagente foi filtrado em papel filtro e armazenado a 4°C por, pelo menos, dois dias antes de ser utilizado.

As análises foram realizadas como descrito a seguir:

- a 1 mL de amostra devidamente diluída foi adicionado 1mL do reagente de Bradford;
- depois de 10 min da agitação das amostras, foi realizada a medida em espectrofotômetro a 595nm;
- as concentrações de proteínas totais foram estimadas correlacionando a banda de absorção das amostras a uma curva padrão de onze pontos, com concentrações de albumina sérica bovina variando entre 2 a 30 mg.L⁻¹.

3.5 Termoestabilidade de lacases

A análise da termoestabilidade da enzima foi realizada mantendo-se a solução enzimática em temperaturas constantes de 20°C, 30°C, 40°C e 50°C, por um período de 24 horas. A atividade de lacases foi medida como descrito no item 3.4.1.

A constante de inativação térmica (K_d) para lacase livre foi calculada pela Equação 1, sendo, A_{in} = atividade residual após tratamento térmico durante um certo período de incubação, A_{in0} = atividade enzimática inicial. O tempo de meia-vida ($t_{1/2}$) foi calculado pela equação 2 (Zanin & Moraes, 2004).

$$(1) \quad \ln \frac{A_{in}}{A_{in0}} = K_d \cdot t$$

$$(2) \quad t_{1/2} = \frac{0,693}{K_d}$$

3.6 Determinação de pH ótimo para atividade de lacases

Os extratos enzimáticos precipitados foram ressuspensos em tampão acetato pH 2-8, tampão McIlvaine pH 2-7. A atividade de lacases foi determinada utilizando ABTS como

substrato. Após a determinação do melhor tampão, variou-se a molaridade de 0,01 – 1 mol.L⁻¹.

3.7 Determinação de parâmetros cinéticos

Os extratos enzimáticos precipitados obtidos foram utilizados para as determinações dos parâmetros cinéticos (K_m e $V_{máx}$) para lacases. Para tanto, o volume das soluções enzimáticas nas reações foi mantido e as concentrações do substrato variadas (Oliveira *et al.*, 1999). O substrato utilizado para lacase foi ABTS, com concentrações variáveis de 20 a 400 $\mu\text{mol.L}^{-1}$.

A partir dos dados obtidos para cada concentração de substrato foram construídos gráficos de acordo com a relação de Lineweaver-Burk, relacionando o inverso das velocidades de reação com o inverso das concentrações de substrato, para determinação das constantes de Michaelis-Menten (K_m) e velocidades máximas ($V_{máx}$). Os coeficientes angulares e lineares foram determinados com o uso do programa Origin 6.0.

3.8 Ensaio com corantes têxteis

Esses ensaios tiveram como objetivo avaliar a capacidade do extrato precipitado de lacases, na presença de corantes, de oxidar o grupo cromóforo destas substâncias. Foram utilizados os corantes têxteis azóicos Remazol Brilliant Blue R (RBBR) e Reactive Blue 220.

Os comprimentos de onda de máxima absorção de cada corante foram determinados por varredura entre 300 nm e 700 nm, utilizando-se soluções de 50 mg.L⁻¹ de cada corante, em espectrofotômetro Beckman DU 530.

Os ensaios foram realizados em solução aquosa de corantes, nas concentrações de 25 e 50 mg.L⁻¹, com adição do extrato enzimático precipitado, com controle de temperatura e pH, durante o processo.

3.9 Imobilização do extrato enzimático precipitado

O extrato enzimático foi imobilizado em filmes de poliamida 6,6 e de polissulfona. O método de imobilização utilizado baseia-se no emprego de glutaraldeído como agente de reticulação entre a enzima e o polímero (Carta *et al.*, 1990; Knight *et al.*, 2000).

3.9.1 Preparo da solução de glutaraldeído

A solução de glutaraldeído (2,5%) foi preparada diluindo-se uma solução comercial (25%) em tampão acetato 0,1 mol.L⁻¹, pH 7,0 e tampão McIlvaine 0,1 mol.L⁻¹, pH 7,0.

3.9.2 Imobilização do extrato enzimático em membranas de poliamida 6,6

Filmes de 9 cm² foram lavados com água destilada, secos à temperatura ambiente e pesados. O polímero foi mantido por 1 min imerso em solução de ácido acético 6 mol.L⁻¹. Após, foi novamente lavado com água destilada várias vezes e imerso em glutaraldeído 2,5% por 1 h, à temperatura ambiente.

O extrato enzimático foi, então, espalhado sobre a membrana, dentro de um Erlenmeyer, onde permaneceu de 2 a 48 h.

3.9.3 Imobilização em membranas de polissulfona

Filmes de 9 cm² foram lavados com água destilada, secos à temperatura ambiente e pesados. O polímero foi mantido por 5 min imerso em solução de ácido clorídrico 6 mol.L⁻¹. Após, foi novamente lavado várias vezes com água destilada e imerso em glutaraldeído 2,5% por 1 h, à temperatura ambiente.

O extrato enzimático foi, então, espalhado sobre a membrana, onde permaneceu sob agitação de 2 a 48 h.

3.9.4 Análise do sistema imobilizado

A atividade da enzima imobilizada foi determinada utilizando-se ABTS como substrato redutor (Willson & Wolfenden, 1982). Para 15 mL de tampão foram acrescentados 2 mL de ABTS e 0,3 g do polímero com a enzima imobilizada. A oxidação do substrato foi monitorada ($\epsilon_{420} = 3,6 \cdot 10^4 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$) para quantificação do produto.

3.9.5 Determinação da quantidade de proteína imobilizada

A quantidade de proteína fixada foi determinada indiretamente por balanço de massas.

Foi relacionada a diferença entre quantidade de proteína enzimática presente na solução utilizada para imobilização, e a quantidade de proteínas presentes na solução de lavagem. O valor encontrado foi dividido pela massa da membrana sendo a unidade expressa em $\mu\text{g}/\text{mg}$ de membrana. A quantidade de enzima imobilizada foi determinada através do método de Bradford (Bradford, 1976).

O preparo do reagente de Bradford e a análise das alíquotas foram realizadas como descrito no item 3.4.6.

3.9.6 Determinação de pH ótimo utilizando extrato enzimático imobilizado

Os filmes de poliamida e polissulfona contendo os extratos enzimáticos imobilizados foram ressuspensos em tampão acetato pH 2-8, tampão McIlvaine pH 2-7. A atividade de lacase foi determinada, utilizando ABTS como substrato. Após a determinação do melhor tampão, variou-se a concentração de 0,01 – 1 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$.

3.10 Análise por MEV – EDS

Para avaliar a homogeneidade de imobilização das membranas, utilizou-se a análise de MEV (Microscopia Eletrônica de Varredura – Joel JSM-6060) com EDS (Sistema de Energia Dispersiva – Joel JSM-5800). A imagem eletrônica de varredura é formada pela incidência de um feixe de elétrons elemento, sob condições de vácuo. A incidência do feixe de elétrons promove a emissão de elétrons secundários, que são retroespalhados, e absorvidos. A imagem representa, em tons de cinza o mapeamento e a contagem de elétrons secundários (SE – *secondary electrons*) e retroespalhados (BSE – *backscattering electrons*) emitidos pelo material analisado.

Ao MEV, pode ser acoplado o sistema de EDS, que possibilita a determinação da composição qualitativa e semiquantitativa das amostras, a partir da relação entre a energia necessária para retirar um elétron de uma camada e o elemento característico. O limite de detecção é da ordem de 1%, mas pode variar de acordo com as especificações utilizadas durante a análise, como o tempo de contagem, por exemplo. Nessa técnica, é possível determinar a porcentagem de diferentes átomos em áreas delimitadas de 0,1 cm², por exemplo. Os filmes poliméricos utilizados na análise com MEV/EDS apresentavam área 0,1 cm².

Foi avaliada a porcentagem dos elementos N, O, S e Cu, sendo os dois últimos considerados marcadores de proteínas nas membranas de poliamida, e o elemento Cu, nas membranas de polissulfona. As membranas foram cortadas em segmentos de 1 X 0,5 cm, fixadas nos porta-amostras e metalizadas com grafite. As análises foram realizadas no Instituto de Química – Unicamp.

3.11. Determinação do massa molar média de polímero (M_w)

Com o objetivo de verificar a existência de imobilização, foi analisado a massa molar médio das membranas de poliamida nas diferentes fases do processo de imobilização por GPC (*gel permeation chromatography*).

As análises de GPC foram realizadas em duas colunas 10 μ m MIXED B 300 \times 7.5 mm, protegidas por uma pré-coluna Plgel 10 μ m (Polymer laboratories Ltd. UK) usando um sistema PL-GPC 110 (Polymer Laboratories Ltd. UK) e detector de índice de refração. As amostras aplicadas nas colunas foram dissolvidas em Hexafluor isopropanol (HFIP), a temperatura constante, utilizando também um volume de HFIP como eluente, a velocidade constante. As análises foram realizadas no Instituto de Macromoléculas da UFRJ.

3.12. Análise estatística

A análise estatística dos dados foi realizada utilizando o programa Prisma

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo, são apresentados e discutidos os resultados de atividade de lacases não purificadas, produzidas em cultivos de meio sólido pelo fungo de degradação branca linhagem PS 2001, de *Pleurotus sajor-caju*, livres ou imobilizadas em membranas de poliamida e polissulfona, por ligação covalente, utilizando glutaraldeído como agente reticulante.

São apresentados também dados de análises de cromatografia de permeação em gel (GPC) e microscopia eletrônica de varredura (MEV) dos sistemas poliamida/lacases e polissulfona/lacases.

4.1 Obtenção e caracterização do extrato enzimático com atividade de lacases

Para obtenção da solução enzimática com atividade de lacases, foram utilizados cultivos com a linhagem *P. sajor-caju* PS2001, de 15 a 20 dias, em serragem de *Pinus* spp., suplementada com $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (Fig. 11). Segundo Keller (2001) e Silva (2004), neste período, ocorre completa colonização do micélio e as mais altas atividades de lacases.

As soluções enzimáticas forma obtidas por extração com água e precipitação com sulfato de amônio.



Figura 11: Cultivo em estado sólido de *P. sajor-caju* PS2001, com 15 dias de desenvolvimento.

As atividades enzimáticas foram medidas após precipitação com sulfato de amônio e ressuspensão em quantidades variáveis de 10 a 20 mL de tampão McIlvaine 0,1 M, pH 5. Conforme se observa na tabela 2, as atividades de lacases em ABTS, como substrato redutor, variaram nos diferentes cultivos. Segundo Silva (2004) e Keller (2001), o período de maior produção de lacases ocorre entre o 20° e 23° dia de cultivo, sendo que, até o 15° a produção de lacases apresenta uma fase lag (período onde não há um aumento significativo da população). Este comportamento pode explicar a variação nos valores de atividade de lacases obtidos. Não se verificou atividade de lignina peroxidase e de oxidases do álcool veratrílico nos cultivos. Para realização das demais análises, as soluções enzimáticas foram diluídas em solução tampão.

Tabela 2: Atividades enzimáticas em soluções obtidas após extração e precipitação de diferentes cultivos de *P. sajor-caju* em serragem de *Pinus spp.*

Cultivos	Lacase (ABTS)(U.mL ⁻¹)	Mn-peroxidase (U.mL ⁻¹)
1	922	30,4
2	889	67,5
3	176	12,5
4	408	66,7

5	370	15,4
6	109	41,1

4.1.1 Atividade de lacases em função do pH

A máxima atividade de lacases foi observada em tampão acetato pH 5 (Fig. 12). Também pode-se observar uma atividade cerca de 85% da atividade máxima, utilizando pH 6. Verifica-se que, utilizando tampão McIlvaine, as melhores atividades de lacase foram obtidas entre pH 4 e 5. A variação observada para o pH ótimo de lacases, utilizando dois diferentes tampões pode ser explicada pelas características de cada solução tampão. O tampão McIlvaine é formado por solução de ácido cítrico ($pK_a = 3,13; 4,76; 6,40$) e fosfato dissódico, já o tampão acetato, é composto por ácido acético ($pK_a = 4,756$) e acetato de sódio.

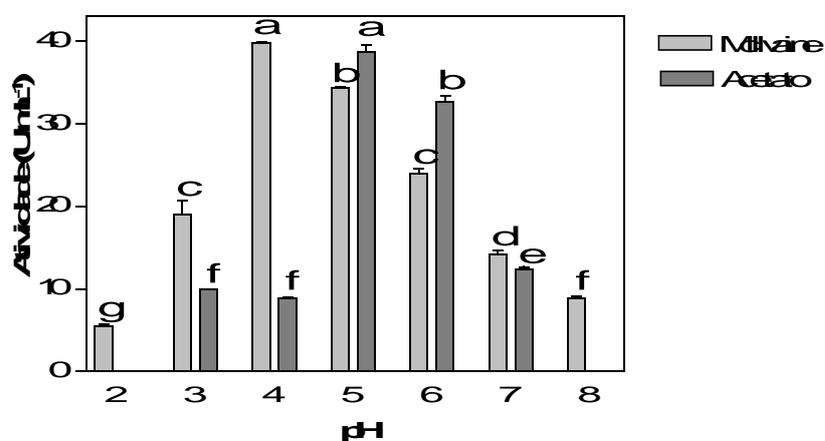


Figura 12: Atividade de lacases (U.mL⁻¹) em diferentes pHs, utilizando tampão acetato pH 2-7 e tampão McIlvaine pH 2-8. Os valores correspondem a média de três replicatas e ao desvio padrão. As legendas referem-se aos tampões McIlvaine e acetato, 0,1M. Barras com letras distintas indicam que as médias obtidas diferiram à nível de $p < 0,05$, pelo teste de Tukey.

Resultados semelhantes, utilizando lacases extraídas do fungo *P. sajor-caju*, em tampão fosfato, foram obtidos por Keller (2001), sendo observada uma atividade igual ou superior a 80% da atividade máxima, entre os pHs 3,6 e 4,8. Al-Adhami *et al.* (2002) caracterizaram o pH ótimo para lacases extraídas de *C. unicolor*, utilizando o tampão McIlvaine, definindo 5,2 como pH de maior atividade enzimática.

Bollag & Leonowicz (1984) caracterizaram lacases extracelulares obtidas dos fungos *Fomes annosus*, *Pholiota mutabilis*, *P. ostreatus*, *T. versicolor*, *Rhizoctonia praticola* e *Botrytis cinerea*. Observaram que o pH ótimo para *P. mutabilis* manteve-se em uma região neutra, enquanto que para os demais fungos, o pH ótimo variou de 3 a 5,2.

Record *et al.* (2002) estudaram pH ótimo para lacases extraídas de *Aspergillus niger*, utilizando como substratos ABTS e siringaldazina, em tampão citrato/fosfato pH 2,5-8. O pH ótimo, para os ensaios realizados com siringaldazina manteve-se em 4,0.

4.1.2 Atividade enzimática de lacases em diferentes concentrações de tampão

Após as análises de atividade de lacases em diferentes valores de pH, estudou-se o efeito na atividade de lacases de diferentes concentrações dos tampões acetato em pH 5 e 6 e McIlvaine em pH 4 e 5.

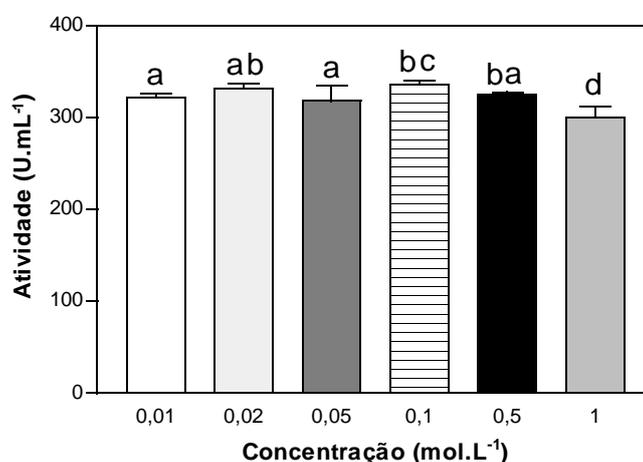


Figura 13: Atividade de lacase em diferentes concentrações, utilizando tampão Mcllvaine pH 4. Os valores correspondem a média de três replicatas e ao desvio padrão. Barras com letras distintas indicam que as médias obtidas diferiram à nível de $p < 5$, pelo teste de Tukey.

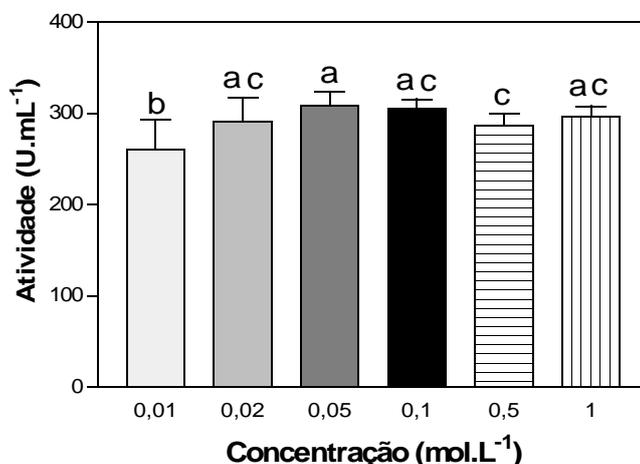


Figura 14: Atividade de lacase em diferentes concentrações, utilizando tampão Mcllvaine pH 5. Os valores correspondem a média de três replicatas e as médias ao desvio padrão. Barras com letras distintas indicam que as médias obtidas diferiram à nível de $p < 5$, pelo teste de Tukey.

Nas figuras 13 e 14, observa-se a atividade de lacases em tampão Mcllvaine pH 4 e 5 em concentrações que variam de 0,01 a 1 mol.L⁻¹. Verifica-se que as atividades de lacases variaram significativamente nas diferentes concentrações do tampão em pH 5 e pH 4. Entretanto, a pH 4, o tampão Mcllvaine possibilita maior atividade enzimática comparativamente ao pH 5 como observado anteriormente na figura 12.

Nas análises com tampão acetato, em pH 5 e 6 (Fig. 15 e 16), observa-se uma menor atividade de lacases em pH 6, nas concentrações de 0,01, 0,5 e 1 mol.L⁻¹. Por outro lado, a pH 5 observa-se atividades similares nas concentrações de 0,01 a 0,2 mol.L⁻¹.

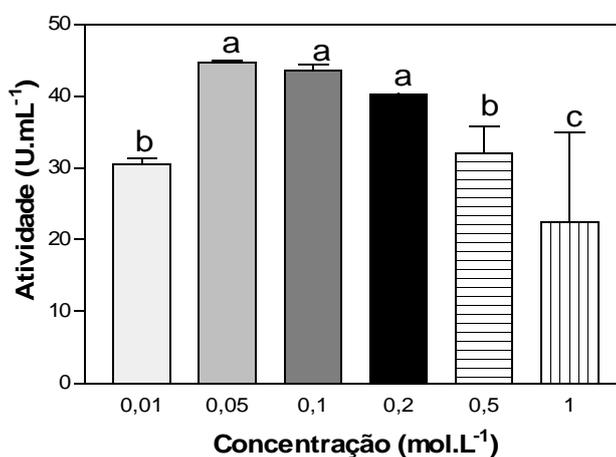


Figura 15: Atividade de lacase em diferentes concentrações utilizando tampão acetato pH 6. Os valores correspondem a média de três replicatas e as médias ao desvio padrão. Barras com letras distintas indicam que as médias obtidas diferiram à nível de $p < 5$, pelo teste de Tukey.

Pela análise dos dados obtidos, verifica-se que o tampão McIlvaine pode ser empregado em concentrações variáveis de 0,01 a 1 mol.L⁻¹ sem alterar a atividade de lacases de *P. sajor-caju*. Porém, algumas concentrações de tampão acetato, em pH 5 e 6 podem ser não ideais para determinar a atividade de lacases. Dados de alteração de atividade enzimática, utilizando diferentes tampões, foram observados por Camassola *et al.* (2004) para atividade de celulases.

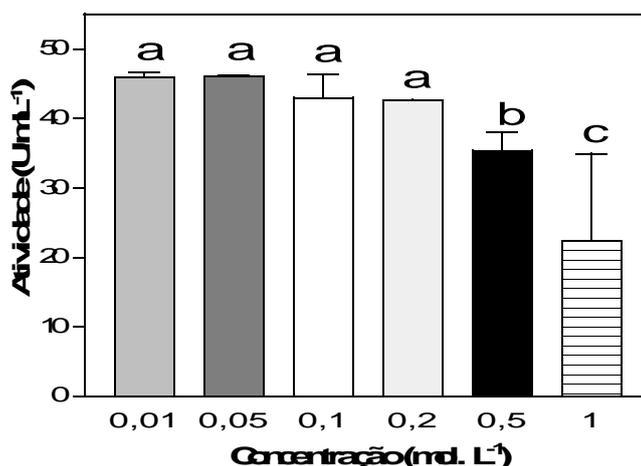


Figura 16: Atividade de lacase em diferentes concentrações utilizando tampão acetato pH 5. Os valores correspondem a média de três replicatas e as médias ao desvio padrão. Barras com letras distintas indicam que as médias obtidas diferiram à nível de $p < 5$, pelo teste de Tukey.

4.1.3 Termoestabilidade de lacases

A manutenção catalítica e estabilidade das enzimas implica na necessidade de que sua estrutura terciária seja mantida, principalmente por um grande número de ligações não covalentes, como pontes de hidrogênio, ligações dissulfeto e interações hidrofóbicas (Gomes *et al.*, 2006). Se a molécula absorve excesso de energia, a estrutura terciária se rompe e a enzima ficará desnaturada, perdendo sua atividade catalítica. À medida que a temperatura

se eleva o aumento esperado na velocidade, resultante do aumento das colisões entre E + S, é contraposto pelo aumento da velocidade de desnaturação. Conseqüentemente, a curva de atividade-temperatura é o resultado líquido dos efeitos opostos resultantes da elevação da temperatura (aceleração da reação) e do aumento da inativação (desnaturação) (Gomes *et al.*, 2006; Zanin & Moraes, 2004).

Na figura 17, são apresentados os dados de termoestabilidade da enzima a 20°, 30°, 40°, 50°C, utilizando o extrato enzimático em tampão acetato 0,2 mol.L⁻¹ a pH 5. Verifica-se que as lacases de *P. sajor-caju* são sensíveis à temperatura, uma vez que, após 2 h, ocorreu uma queda acentuada na atividade enzimática de lacases da solução mantida a 30°C (30%), da solução mantida a 40°C (90%) e perda total da mantida a 50°C.

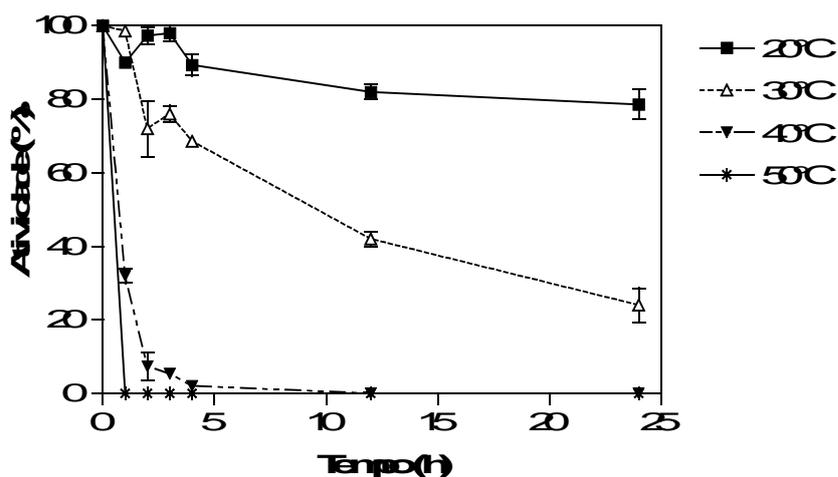


Figura 17: Termoestabilidade do extrato de lacases a 20, 30, 40 e 50°C por 24 h, utilizando ABTS como substrato em tampão acetato, pH 5. Os valores correspondem a média de três replicatas e as médias ao desvio padrão.

Resultados semelhantes foram observados por Keller (2001) que obteve perda de 100% da atividade de lacases após 2,5 h de reação a 50°C. Lo *et al.* (2001) também

observaram uma rápida perda da atividade quando a solução enzimática de lacases foi mantida a 55°C.

Cambria *et al.* (2000) analisaram a termoestabilidade de lacase extraída de *R. lignosus*. A enzima manteve-se estável por 5 h a 45°C, enquanto que apenas metade da atividade de lacases foi observada após 1 h a 55°C, assim como após 30 min, a 65°C.

A partir dos resultados obtidos, calculou-se a constante de inativação térmica (K_d) para lacases e o tempo de meia-vida ($t_{1/2}$). Os resultados podem ser observados na tabela 3. Pelos dados apresentados, verifica-se que o tempo de meia-vida da enzima é reduzido significativamente com o aumento da temperatura, assim como a constante de inativação térmica é aumentada. Este fato comprova a influência da temperatura para a estabilidade enzimática, devido a desnaturação térmica causada ocasionada em altas temperaturas.

Tabela 3: Constante de inativação térmica (K_d) para atividades de lacases, utilizando ABTS como substrato redutor, a temperaturas de 20°C a 50°C.

Temperatura (°C)	$t_{1/2}$ (h)	K_d (h ⁻¹)
20	69,3	0.01
30	11,5	0.06
40	0,7	0.98
50	0,1	5.90

4.1.4 Valores de K_m E $V_{máx}$ para as atividades de lacase

Para caracterizar os extratos enzimáticos por constante de Michaelis-Menten (K_m) e velocidade máxima ($V_{máx}$) utilizaram-se extratos enzimáticos da linhagem PS 2001 de *P. sajor-caju* obtidos em cultivos em serragem de *Pinus* spp. de 15 dias. O substrato foi utilizado nas concentrações de 20 μ M a 450 μ M e a atividade do extrato utilizado para a análise foi de 190 U.mL⁻¹.

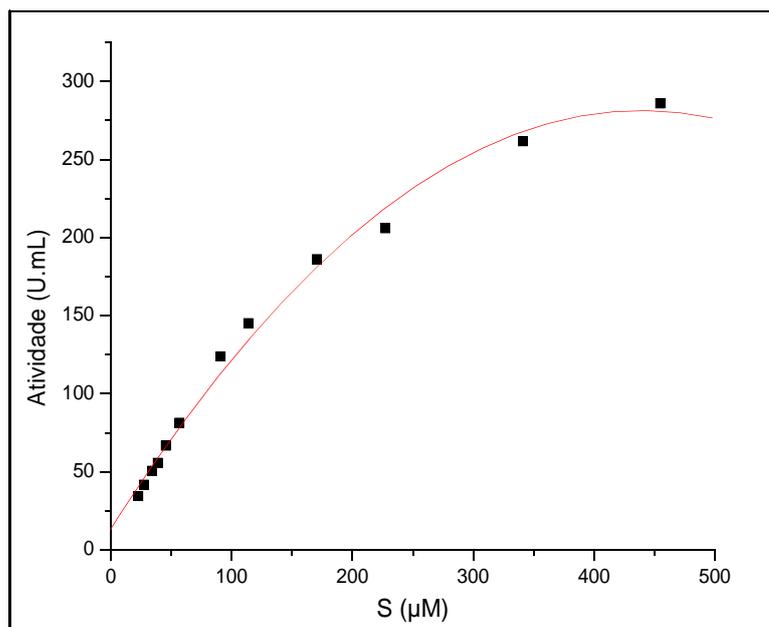


Figura 18: Atividade de lacases variando-se a concentração de ABTS utilizado para extratos obtidos do cultivo de *P. sajor-caju* em serragem de *Pinus* sp.

Na figura 18 são apresentadas as atividades de lacases livre em função da concentração de ABTS presente no meio. Pelo formação da hipérbole a atividade de lacases, em função da concentração de ABTS, segue cinética do tipo Michaelis-Menten. As constantes de afinidade pelo substrato (K_m) e a velocidade máxima de reação (V_{max}) foram calculadas utilizando a inversa da equação de Michaelis-Menten (duplo recíproco).

Na Figura 17, apresenta-se o ajuste obtido com dados de duplo recíproco para atividades de lacases com a utilização do programa Origin 6.0.

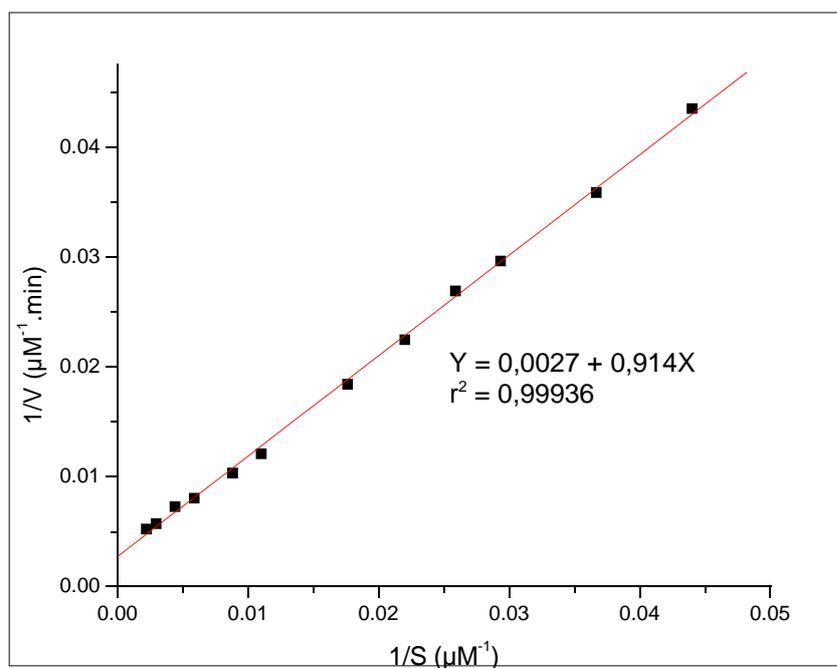


Figura 19: Duplo-recíproco para a atividade de lacases em ABTS para extratos obtidos do cultivo de *P. sajar-caju* em serragem de *Pinus* sp.

Os valores obtidos para K_m e $V_{m\acute{a}x}$ foram de 0,3mM e $365\mu\text{M} \cdot \text{min}^{-1}$. Para o sistema de cultivo em meio s\olido, com serragem de *Pinus* sp., Munari (2003) obteve valores semelhantes de K_m (227 μM) e valores de $V_{m\acute{a}x}$ ($813\mu\text{M} \cdot \text{min}^{-1}$) superiores. A diferen\ca em rela\cao aos dados de $V_{m\acute{a}x}$ pode ser explicada pela presen\ca de inibidores n\ao competitivos no

extrato, devido a utilização de serragens provenientes de diferentes fontes, ou pela formação de diferentes isoenzimas nos diferentes meios utilizados.

4.2 Imobilização de proteínas da solução enzimática em membranas de poliamida 6,6 (PA) e polissulfona (PSU)

A seguir são descritos os resultados obtidos para a determinação da atividade de lacases e quantidade de proteínas imobilizadas em filmes de PA e PSU. A solução enzimática utilizada para a imobilização possuía outras enzimas, além da lacases, assim com outras proteínas. O processo de imobilização por ligação química pode modificar a cinética e as propriedades físico-químicas da enzima analisada. Para verificar as alterações é necessário medir a quantidade de proteínas imobilizadas e a atividade da enzima imobilizada.

4.2.1 Determinação de quantidade de proteínas imobilizadas

Inicialmente foram utilizadas três combinações de tampões, separadamente, para diluir o glutaraldeído e a solução enzimática utilizada, visto que é necessário manter a membrana imersa em solução tampão.



Figura 20: Membrana de PA utilizada no processo de imobilização.

Os tampões utilizados foram: (1^a) acetato 0,2 M, pH 7 para diluir o glutaraldeído e acetato 0,2 M, pH 5 para diluir a solução enzimática; (2^a) McIlvaine 0,1 M, pH 7 para diluir o

glutaraldeído e Mcllvaine 0,1 M, pH 5 para diluir a solução enzimática; (3ª) Mcllvaine 0,1 M, pH 7 para diluir o glutaraldeído e acetato 0,2 M pH 5 para diluir a solução enzimática; A membrana utilizada no processo, que permaneceu a 30°C ($\pm 2^\circ\text{C}$) sob agitação, tinha uma área de 9 cm² (Fig. 20).

A quantidade de proteína retida na membrana foi determinada pela diferença entre a quantidade de proteína inicial da solução e a quantidade total das proteínas presentes nas soluções de lavagem, após a imobilização, sendo as proteínas dosadas pelo método de Bradford (1976).

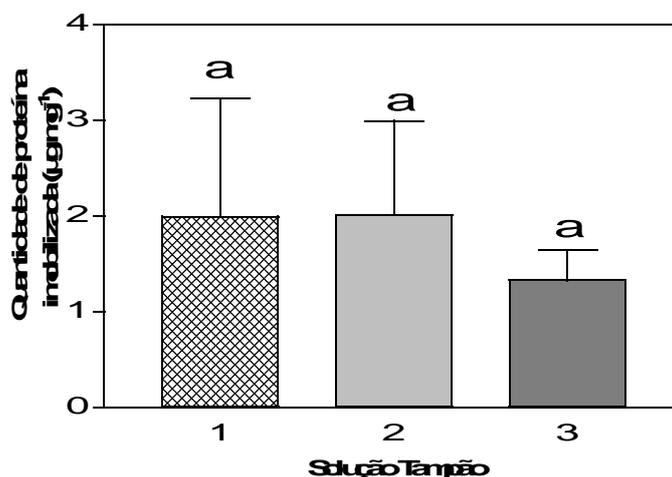


Figura 21: Relação entre a quantidade de proteína imobilizada em PA e os tampões: acetato pH 7 e pH 5 (1); Mcllvaine pH 7 e pH 5 (2) e Mcllvaine pH 7 e acetato pH 5 (3), para dissolução do glutaraldeído e da enzima respectivamente. Os valores correspondem a média de três replicatas e as médias ao desvio padrão. Tratamentos com as mesmas letras não diferiram significativamente à nível de $p < 5$, pelo teste de Tukey.

Os valores de quantidade de proteína imobilizada em membranas de poliamida 6,6 (Fig. 21), não apresentaram diferença significativa. Utilizou-se, então, o tampão Mcllvaine 0,1 M, pH 7 para diluir o glutaraldeído e o tampão Mcllvaine 0,1 M, pH 5, para diluir a

solução enzimática. A solução enzimática utilizada apresentava atividade de lacase de $56,6 \text{ U.mL}^{-1}$. Foram realizados ensaios semelhantes aos realizados com filmes de PSU. Os tampões utilizados foram: (1ª) acetato $0,2 \text{ M}$, pH 7 para diluir o glutaraldeído e acetato $0,2 \text{ M}$, pH 5 para diluir a solução enzimática; (2ª) Mcllvaine $0,1 \text{ M}$, pH 7 para diluir o glutaraldeído e acetato $0,2 \text{ M}$, pH 5 para diluir a solução enzimática; (3ª) Mcllvaine $0,1 \text{ M}$, pH 5 para diluir o glutaraldeído e Mcllvaine $0,1 \text{ M}$, pH 5 para diluir a solução enzimática; (4ª) Mcllvaine $0,1 \text{ M}$, pH 7 para diluir o glutaraldeído e Mcllvaine $0,1 \text{ M}$, pH 5 para diluir a solução enzimática. A membrana utilizada no processo, que permaneceu a 30°C ($\pm 2^\circ\text{C}$) sob agitação, tinha uma área de 9 cm^2 (Fig. 22). A solução enzimática utilizada possuía atividade de lacases de $100,6 \text{ U.mL}^{-1}$



Figura 22: Membrana de PSU utilizada no processo de imobilização.

Pelos dados apresentados na figura 23, pode-se observar que os tampões que apresentaram maior retenção de proteínas na imobilização foram tampão acetato pH 7 e pH 5 (2) e Mcllvaine pH 7 e pH 5 (4). Carta *et al.* (1990) utilizaram tampão fosfato pH 7,0 na segunda e terceira etapas de reação para imobilizar lipases (pH ótimo para a enzima). Vieira e Oliveira (2006) reticularam quitosana com glutaraldeído utilizando tampão fosfato pH 7,0 e assim imobilizaram peroxidases utilizando a mesma solução tampão.

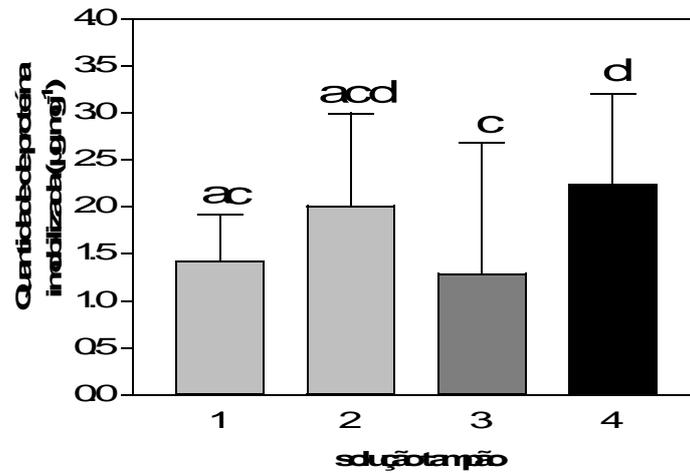


Figura 23: Quantidade de proteína imobilizada em PSU em função dos tampões: acetato pH 7 e pH 5 (1); McIlvaine pH 7 e acetato pH 5 (2); McIlvaine pH 5 e pH 5 (3); McIlvaine pH 7 e pH 5 (4), para dissolução do glutaraldeído e da enzima respectivamente. Os valores correspondem a média de três replicatas e as médias ao desvio padrão. Barras com letras distintas indicam que as repetições diferiram a nível $p < 5$, pelo teste de Tukey.

Para determinação da temperatura e do tempo ideal do processo de imobilização, foram avaliadas as quantidades de enzima imobilizada, em reações de até 48 horas, com temperatura controlada de 20°C, 30°C e 40°C (Fig. 24 e 25). As soluções foram mantidas sob agitação constante e apresentavam atividade de lacase de 56,6 U.mL⁻¹.

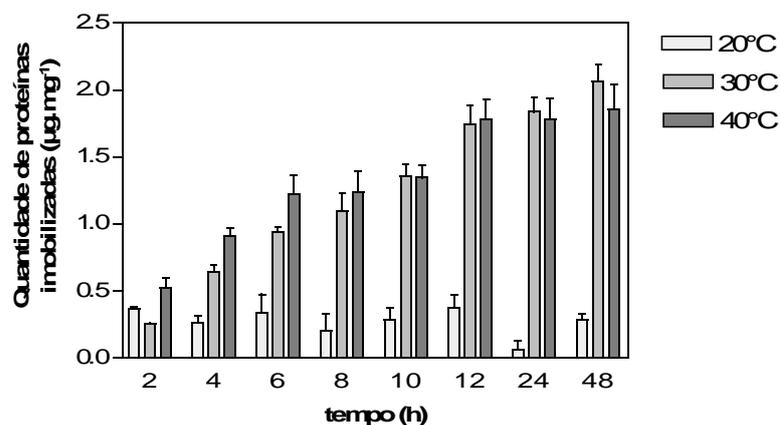


Figura 24: Quantidade de proteínas imobilizadas em filmes de PA. Os valores correspondem a média de três replicatas e as médias ao desvio padrão. A variação da quantidade de proteínas imobilizadas foi avaliada a nível $p < 5$, pelo teste de Tukey, em relação às diferentes temperaturas de reação.

De acordo com os dados obtidos, verificou-se uma variação nas quantidades de proteínas imobilizadas a 20°C, em relação a 30°C e 40°C. O melhor tempo para a imobilização da solução enzimática de lacases nas membranas de poliamida foi encontrado em 12 horas, a temperaturas de 30°C e 40°C.

Na figura 25, pode-se observar a relação entre a quantidade de proteína imobilizada em membranas de PSU e a massa do filme utilizado.

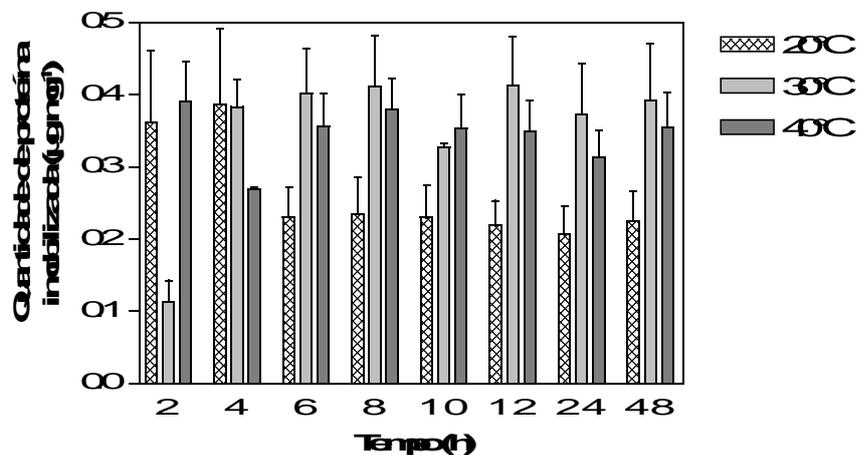


Figura 25: Quantidade de proteínas imobilizadas por mg de filmes de polissulfona (PSU). Os valores correspondem a média de três replicatas e as médias ao desvio padrão. A variação da quantidade de proteínas imobilizadas foi avaliada a nível $p < 5$, pelo teste de Tukey, em relação às diferentes temperaturas de reação.

A partir da sexta hora de imobilização, as quantidades de proteínas apresentaram pouca variação em relação às primeiras horas do processo. A queda observada nas análises realizadas a 20°C, após a 4 h de reação, sugere uma perda de proteínas do filme para o meio, indicando uma possível dessorção das proteínas que permaneceram ligadas fisicamente ao

polímero. Nas análises realizadas a 30°C e 40°C, a imobilização mostrou-se eficiente nas primeiras horas de reação, com poucas alterações nas análises posteriores, demonstrando pequena influência da temperatura no processo de imobilização.

Para comprovar a presença de proteínas nas membranas, foram realizadas análises de cromatografia de permeação em gel (GPC) e microscopia eletrônica de varredura – sistema de energia dispersiva (MEV – EDS).

O GPC tem sido utilizado como uma técnica relativamente rápida e segura para determinação de massa molar média (M_w) de polímeros. As membranas de PA foram avaliadas durante as várias fases do processo de imobilização.

Tabela 4: Valores de massa molar média estimados por GPC em diferentes etapas da imobilização.

Etapa	Amostra	M_w (g.mol ⁻¹)
1	Poliamida comercial “pellete”	161218
2	Membrana de poliamida	122837
3	Membrana com Glutaraldeído	182354
4	Membrana com extrato enzimático imobilizado	487831

As variações de massa molar da PA (Tabela 4) durante o processo de preparação dos filmes por inversão de fase (etapas 1 e 2) e os tratamentos para imobilização de enzimas (etapas 3 e 4) podem demonstrar que ocorreu um aumento significativo da M_w nos filmes com extrato enzimático, sugerindo a ocorrência de ligações entre a estrutura do polímero e as enzimas. A solução enzimática utilizada para a imobilização continha, além de lacases, Mn-peroxidase, além de outras proteínas.

As membranas de PA e PSU foram caracterizadas por MEV/EDS para avaliação das diferenças na composição e na estrutura apresentadas pelos filmes com extrato enzimático imobilizado e sua dispersão na superfície polimérica pela presença dos metais. Com a

utilização dessa técnica, também foi possível avaliar se o processo de imobilização apresentou-se de forma homogênea na superfície dos filmes poliméricos de PA e PSU. Nos filmes de PA foi monitorada a presença de enxofre (S) que não faz parte da composição do polímero mas pode ser encontrado nos aminoácidos cisteína e metionina, presentes tanto nas lacases quanto em várias outras proteínas. Também foi detectada a presença de cobre (Cu) elemento que está presente na estrutura da lacase e manganês (Mn), elemento que pode estar presente juntamente com a manganês-peroxidase.

As Tabelas 5 e 6 indicam a contagem de elementos para N, O, S e Cu presentes na mesma membrana de poliamida, mas em locais diferentes da membrana. Os elementos N e O também estão presentes nos filmes poliméricos utilizados.

Tabela 5: Porcentagem de massa referentes aos elementos analisados por MEV/EDS em membrana de PA com extrato enzimático imobilizado de 0,1 cm² em análises realizadas em três locais diferentes da mesma membrana.

Elemento	% Massa - 1	% Massa - 2	% Massa - 3
N	17,85	18,07	27,08
O	79,85	81,16	67,03
S	1,41	0,05	4,75
Cu	0,84	0,70	0
Mn	0	0	1,14

Pode-se observar a presença de Cu e S nas análises (Tabela 5), sugerindo a ocorrência de imobilização do extrato nas membranas, com grande desvio nessa técnica, talvez devido à heterogeneidade da imobilização, tendo-se, inclusive, Mn em somente um extrato analisado.

Tabela 6: Porcentagem de massa referente aos elementos analisados por MEV / EDS em membranas de PSU com extrato de lacases imobilizada (em duas análises realizadas com membranas de PSU de área 0,1 cm²).

Elemento	% Massa - 1	% Massa - 2
O	15,05	16,20
S	84,78	84,34
Cu	0,17	0,01

Os filmes de PSU (Tabela 6) apresentaram o elemento Cu nas duas análises realizadas em frações da mesma membrana. A grande quantidade de enxofre presente está relacionada à

estrutura do polímero. Não foi possível determinar a homogeneidade da imobilização através desse método pois a solução enzimática utilizada não continha apenas uma enzima e, talvez, o número de amostras tenha sido pequeno para desvios dessa ordem.

4.2.2 Atividade de lacases imobilizadas

Ao iniciar-se os estudos de imobilização de lacases já era de conhecimento que modificações poderiam ocorrer nas propriedades enzimáticas durante o processo de imobilização e que estas poderiam ocorrer devido a vários fatores: efeitos conformacionais – modificação conformacional da molécula da enzima devido à alteração na estrutura terciária do sítio ativo; efeitos estereoquímicos – uma parte da molécula da enzima é imobilizada em uma posição tal que o sítio ativo é relativamente inacessível ao substrato; efeitos microambientais (efeitos de partição) – interações eletrostáticas entre suporte e substrato; neste caso, as condições do microambiente próximo à enzima são diferentes daquelas da solução reacional e, efeitos difusionais ou de transferência de massa – têm origem na resistência de difusão do substrato até o sítio catalítico da enzima, e do produto para a solução (Gomes, *et al.*, 2006; Zanin & Moraes, 2004).

Na Figura 26, são apresentados os dados da capacidade de oxidação de ABTS para os filmes de PA em reações com diferentes tempos de imobilização (2-24 h) e temperaturas (20°C, 30°C e 40°C). Como pode ser verificado, as médias de oxidação do ABTS durante o processo de imobilização, em reação de 6 h, a 30° e 40°C, mostram-se maiores. Não foram observadas diferenças significativas em relação a atividade de lacases, a 30°C e 40°C, devido ao grande desvio obtido. Aparentemente, os maiores valores de oxidação de ABTS, que ocorreram nas primeiras 2 h, podem ter sido, em parte à ação de lacases não imobilizadas presentes nos polímeros, uma vez que as membranas foram lavadas apenas com água destilada e que os valores de atividade reduziram-se às 4 horas.

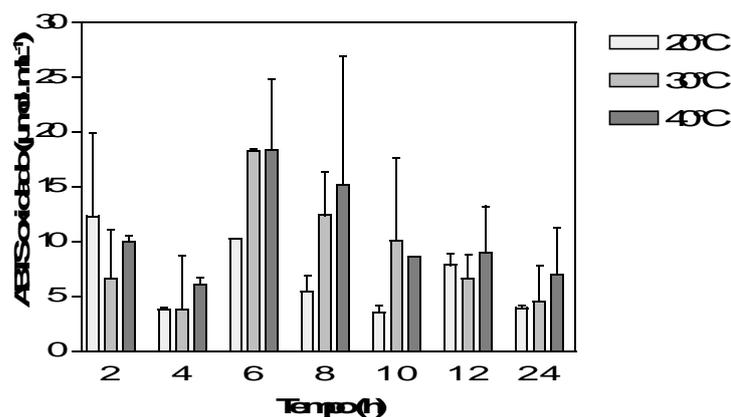


Figura 26: Relação entre a atividade de lacase imobilizada em filmes de PA, em função do tempo de reação e temperatura do processo. Os valores correspondem a média de três replicatas e as médias ao desvio padrão. A variação da quantidade de proteínas imobilizadas foi avaliada a nível $p < 5$, pelo teste de Tukey, em relação às diferentes temperaturas de reação.

Na figura 27, verifica-se que o processo de imobilização em PSU também mostrou resultados semelhantes para os diferentes tempos de imobilização de lacases. A melhor atividade foi observada com 6 horas de imobilização, a 30°C e 40°C. O processo de imobilização mostrou-se mais rápido em relação aos obtidos por Shiyu *et al.* (2002), que imobilizaram lacase extraída de *Panus conchatus* em grânulos de poli (vinil álcool), utilizando glutaraldeído como agente de ligação, quando os melhores valores de imobilização variaram de 12 a 24 h, mantendo-se a reação a 40°C.

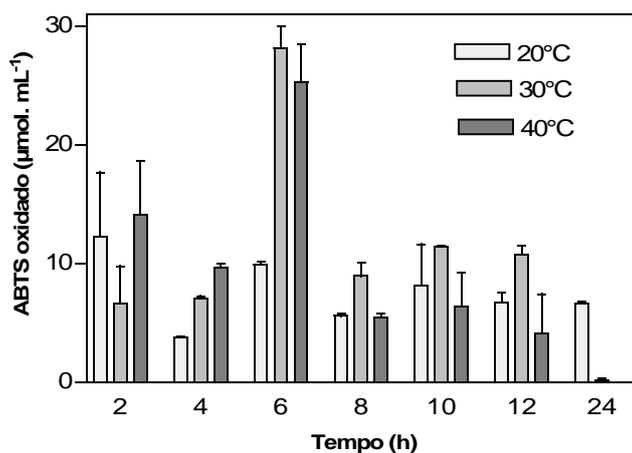


Figura 27: Relação entre a atividade de lacase imobilizada em filmes de PSU, em função do tempo de reação e temperatura do processo. Os valores correspondem a média de três replicatas e as médias ao desvio padrão. A variação da quantidade de proteínas imobilizadas foi avaliada a nível $p < 5$, pelo teste de Tukey, em relação às diferentes temperaturas de reação.

As atividades de lacases imobilizadas em filmes de PA também foram determinadas utilizando ABTS como substrato redutor, em três concentrações diferentes (175, 325 e 375 $\mu\text{mol.L}^{-1}$). A reação foi mantida à temperatura ambiente ($25^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$), com agitação por 10 h. A solução enzimática utilizada possuía atividade de lacase de $100,5 \text{ U.mL}^{-1}$. Pode-se observar na figura 28 que, com o aumento da concentração de substrato no meio reacional, ocorreu um aumento na quantidade de ABTS oxidado.

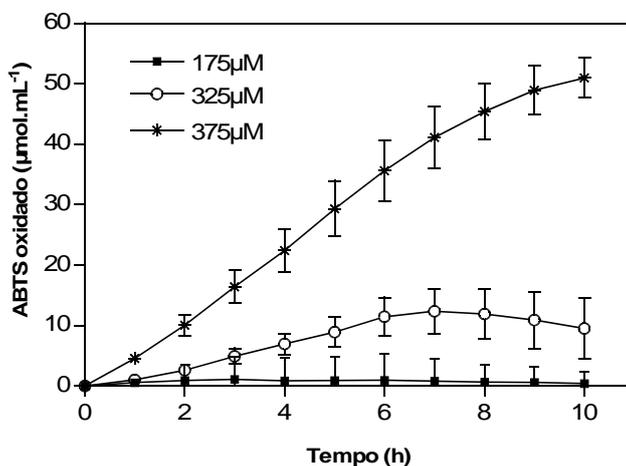


Figura 28: Atividade de lacase imobilizada em filmes de PA, em função da concentração de ABTS na reação. Os valores correspondem a média de três replicatas e as médias ao desvio padrão.

A atividade de lacase imobilizada em PSU foi medida utilizando-se ABTS como substrato redutor, em três concentrações diferentes: 175, 275 e 375 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ (Fig. 29). A reação foi mantida à temperatura ambiente ($25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$), sob agitação, por 10 h.

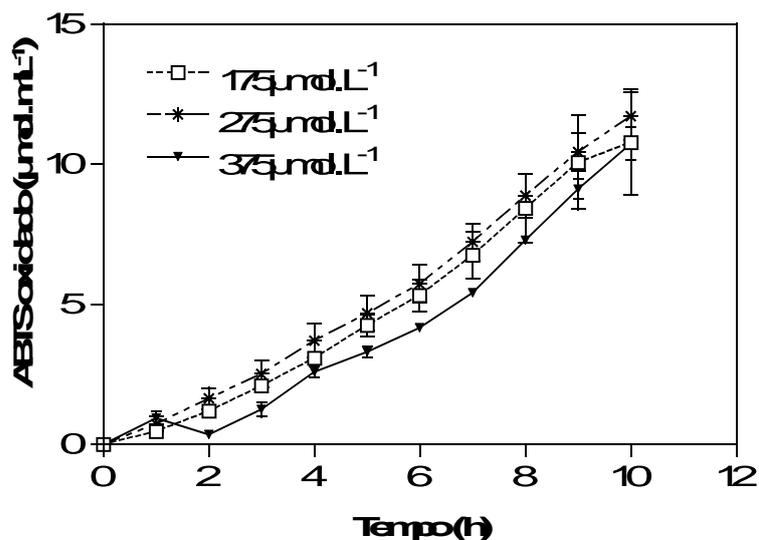


Figura 29: Atividade de lacase imobilizada em filmes de PSU em função da concentração de ABTS na reação. Os valores correspondem a média de três replicatas e as médias ao desvio padrão. A variação da quantidade de proteínas imobilizadas foi avaliada a nível $p < 5$, pelo teste de Tukey, em relação às diferentes temperaturas de reação.

De acordo com os dados obtidos, não foi observada variação significativa na atividade de lacases, nas concentrações de ABTS utilizadas. Mesmo assim, verificou-se que nas concentrações de 175 e 275 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ ocorreu um aumento de ABTS oxidado no meio reacional, enquanto que para a concentração de 375 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ ocorreu uma redução do substrato oxidado. Esse fato sugere a possibilidade de inibição da reação por excesso de substrato.

Devido a sua natureza protéica, as enzimas são altamente sensíveis a variações de pH, temperatura, concentração da própria enzima, entre outros fatores. Portanto, o conhecimento desses parâmetros sobre a reação enzimática permite explorar melhor as propriedades catalíticas (Gomes *et al.*, 2006).

Na figura 30, são apresentados resultados da capacidade oxidante da membrana de PA com as enzimas imobilizadas em função do pH. A solução enzimática utilizada apresentava atividade de lacases de 103 U.mL⁻¹.

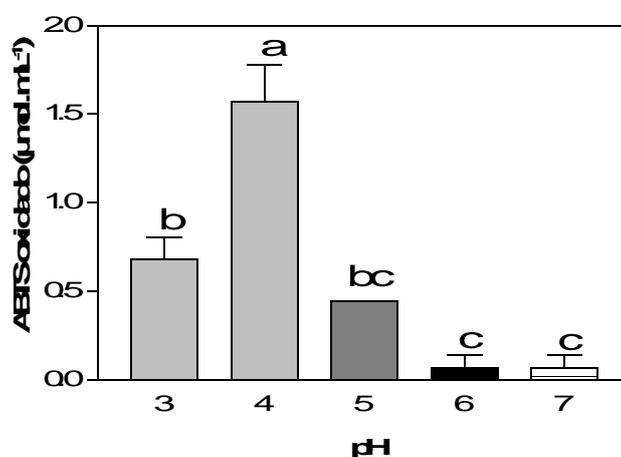


Figura 30: Análise da atividade de lacase imobilizada em PA, utilizando diferentes pHs. Os valores correspondem a média de três replicatas e as médias ao desvio padrão. Barras com letras distintas indicam que as repetições diferiram a nível $p < 5$, pelo teste de Tukey.

Verifica-se que as melhores atividades de lacase foram obtidas utilizando-se tampão acetato pH 4. Como observado, esses dados de atividade da membrana em função do pH não conferem com os observados para enzima livre, apresentados anteriormente (Fig. 12), os

quais mostraram que valores de pH entre 5-6 resultaram em maiores atividades enzimáticas. A solução enzimática utilizada apresentava atividade de lacases de 103 U.mL^{-1}

Foram realizadas análises do pH ótimo para lacase imobilizada em PSU, utilizando ABTS como substrato redutor. Na figura 31, são observados os resultados das atividades de determinação de pH ótimo, para atividade do extrato de lacases imobilizado em filmes de poliamida, utilizando tampão acetato pH 3-6.

Verifica-se que as melhores atividades de lacase foram obtidas utilizando tampão acetato pH 3 (Fig. 31) enquanto que para a enzima livre, as melhores atividades foram em pH 5-6 (Fig. 12).

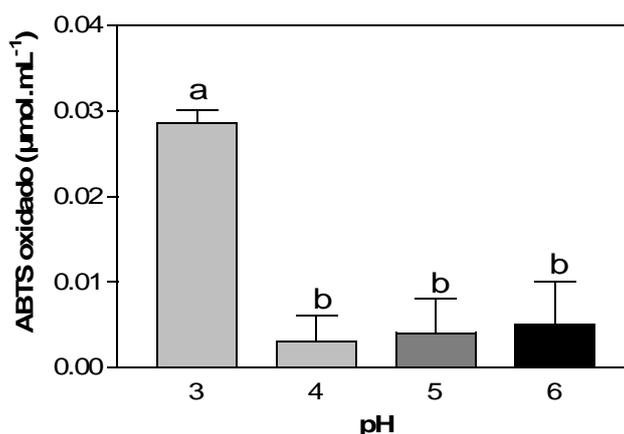


Figura 31: Análise da atividade de lacase imobilizada em filmes de PSU em ABTS com variação do pH empregando tampão acetato. Os valores correspondem a média de três replicatas e as médias ao desvio padrão. Barras com letras distintas indicam que as repetições diferiram a nível $p < 5$, pelo teste de Tukey.

Esta alteração de pH ótimo pode estar relacionada com possíveis mudanças conformacionais da enzima ou alterações de concentração entre as espécies carregadas, substrato, produto, íons hidrogênio, íons hidroxilas, tanto no microambiente da enzima imobilizada quanto no meio reacional (macroambiente) (Zanin & Moraes, 2004).

As membranas de PA apresentam características levemente catiônicas. Segundo Zanin & Moraes (2004), esta característica sugere que os grupos H^+ presentes na estrutura do suporte possuem afinidade pelos grupos hidroxila (-OH) disponíveis no meio reacional, ocasionando um acúmulo destes íons no microambiente da enzima, o que torna necessária a presença de uma quantidade maior de H^+ nas proximidades da enzima, para que esse atinja os valores de pH ótimo, que são ideais para a enzima livre, deslocando seu pH ótimo para valores menores.

As membranas de PSU, por sua vez, são levemente aniônicas, assim, os grupos hidroxilas (-OH) presentes na estrutura do suporte possuem afinidade pelos hidrogênios ionizáveis (H^+) disponíveis no meio reacional, ocasionando um acúmulo desses íons, o que pode afetar o microambiente da lacase e, conseqüentemente, sua faixa de pH ótimo de atuação.

As membranas de PA e PSU foram analisadas quanto à capacidade oxidante, utilizando-se o tampão McIlvaine pH 3-7 (Fig. 32 e 33).

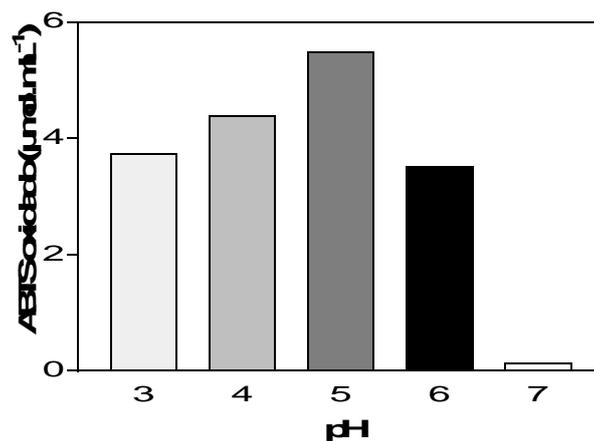


Figura 32: Análise da atividade de lacase immobilizada em filmes de PSU em ABTS com variação do pH empregando tampão Mcllvaine. Os valores correspondem a uma análise.

Tanto para as membranas de PA, quanto para as de PSU, as melhores atividades de lacase foram obtidas com tampão Mcllvaine pH 5, enquanto que para a enzima livre, as melhores atividades foram em pH 4 (Fig. 12).

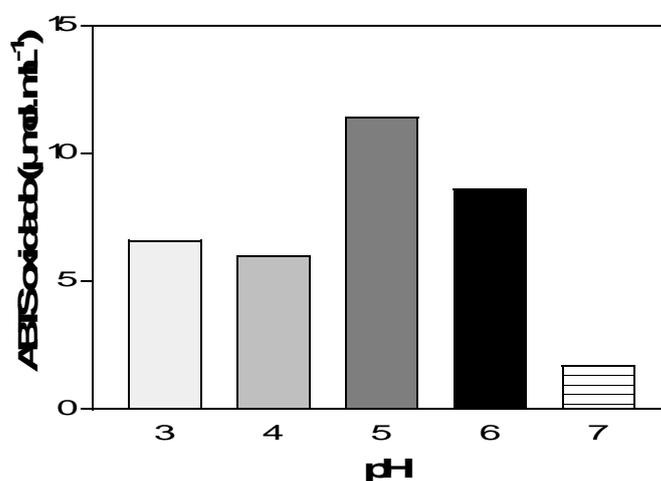


Figura 33: Análise da atividade de lacase immobilizada em filmes de PA em ABTS com variação do pH empregando tampão Mcllvaine. Os valores correspondem a uma análise.

O deslocamento do pH ótimo para valores maiores pode estar relacionado as características do tampão utilizado interferindo na proteína enzimática. Alterações no pH ótimo da enzima já foram observadas para imobilização de lacases (Shiyu *et al.*, 2002), ou outras enzimas (Palet *et al.*, 2006; Vasileva *et al.*, 2004), em relação ao observado para enzima livre. Esse deslocamento pode ocorrer devido a diferentes mecanismos: 1) alteração da estrutura espacial da enzima na região do sítio catalítico em função da ligação da proteína enzimática ao glutaraldeído que por sua vez está ligado ao polímero; 2) imobilização

preferencial de diferentes isoenzimas com valores ótimos de pH diferente da solução enzimática livre.

Al-Adhami *et al.* (2002) observaram um deslocamento de pH ótimo de 6 para 5, quando imobilizaram lacases de *C. unicolor* em resina comercial DEAE-Granocel 500. Spettoli *et al.* (2000) explicaram a alteração do pH ótimo de 6,3 para 6,6 pela presença de grupos ionizados no suporte. Segundo Spettoli, (ibidem) se uma enzima é ligada a um suporte aniônico, o pH ótimo normalmente desloca-se para a direção alcalina.

4.2.3 Capacidade oxidativa de membranas com lacase imobilizadas

Na figura 34, é apresentado o perfil de oxidação de uma solução $325\mu\text{mol.L}^{-1}$ de ABTS, em filmes de PA com lacases imobilizadas. Pode-se observar que uma solução com lacases livres apresenta uma mais rápida atividade oxidativa sobre ABTS em relação à membrana que contém a mesma enzima imobilizada. Verifica-se que somente após 6 horas, tempo total do ensaio, a quantidade de ABTS alcançou 76% da quantidade máxima de ABTS oxidado. Esses resultados sugerem que a difusão da enzima, sendo dificultada pelo processo de imobilização, pode prejudicar a catalise enzimática em relação à enzima livre. Entretanto, segundo Palet *et al.* (2006), o processo de oxidação utilizando lacases imobilizadas, embora seja lento apresenta, interesse cinético, pois a atividade da enzima imobilizada pode se manter estável por mais tempo, dependendo das condições utilizadas.

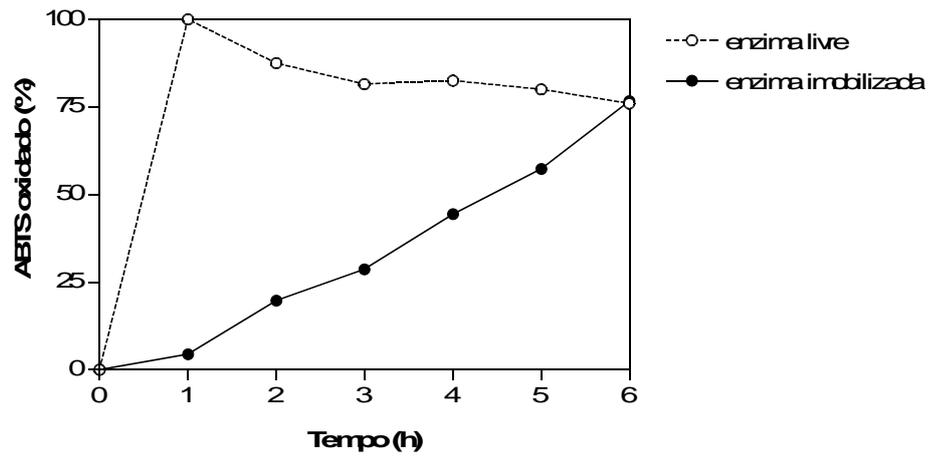


Figura 34: Atividade de lacases na solução enzimática e immobilizadas em filmes de PA, em função do tempo de reação.

Na figura 35, também é apresentado o perfil de oxidação de uma solução $325\mu\text{mol.L}^{-1}$ de ABTS, entretanto, em filmes de PSU com lacases immobilizadas em pH 3 e 5, em tampão acetato. Pôde-se observar variação significativa na concentração de ABTS oxidado a pH 3 e pH 5, em relação a enzima livre. Verifica-se um aumento na porcentagem de ABTS oxidado em relação às reações mantidas em pH 5.

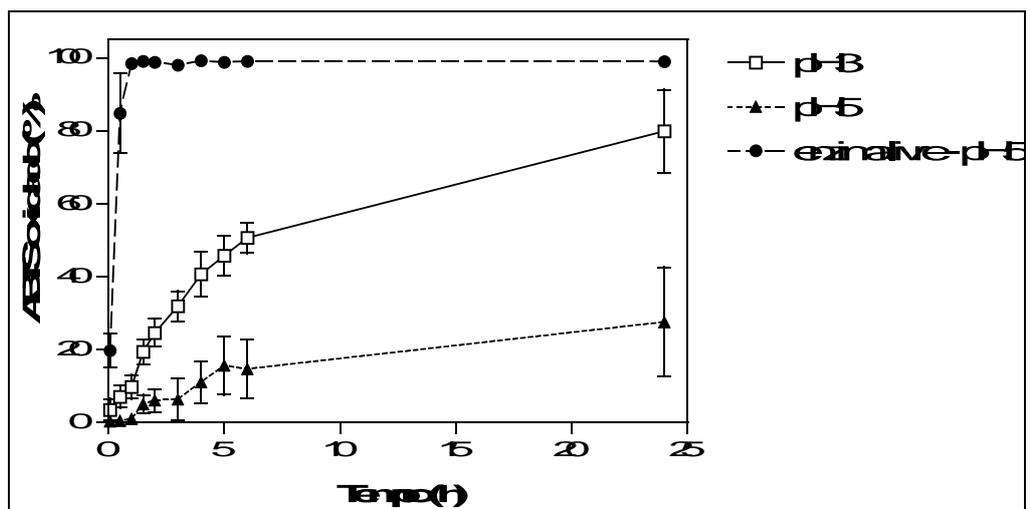


Figura 35: Análise da atividade de lacase livre e imobilizada em filmes de PSU utilizando tampão acetato pH 3 e pH 5. O ABTS foi utilizado como substrato redutor. Os valores correspondem a média de três replicatas e ao desvio padrão. A variação concentração de ABTS oxidado foi avaliada a nível $p < 5$, pelo teste de Tukey.

Na figura 36, verifica-se a comparação entre as atividades oxidativas sobre ABTS de filmes de PA e de PSU com lacases imobilizadas utilizando o mesmo extrato enzimático com atividade de lacase de $114,6 \text{ U.mL}^{-1}$ e o mesmo processo de imobilização. Pôde-se observar variação significativa na concentração de ABTS oxidado a pH 3 e pH 5, em relação a enzima livre. A maior capacidade oxidativa de ABTS nos filmes de PA em relação aos de PSU. Entre os fatores responsáveis pela diferença de atividade oxidativa dos dois filmes com lacases imobilizadas, pode-se sugerir a ocorrência de diferenças na capacidade de ligação das proteínas em função do processo de imobilização empregado e uma possível interferência da natureza polar dos polímeros, uma vez que PA é hidrofílica e PSU hidrofóbica, característica que, segundo Nascimento *et al* (2004), interferem na atividade da enzima imobilizada.

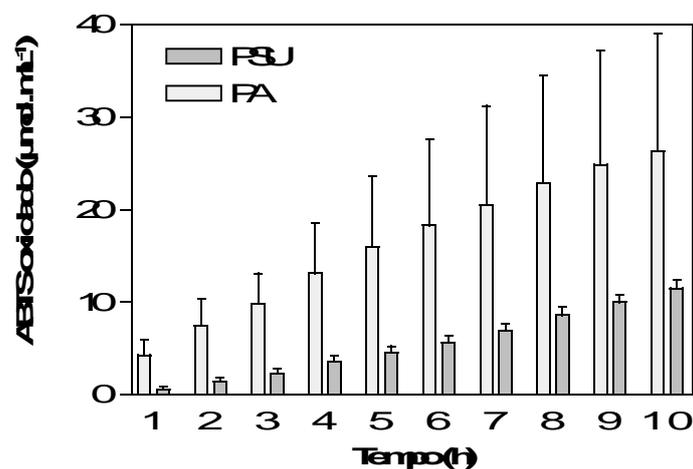


Figura 36: Atividade de lacases immobilizadas em filmes de PA e PSU em função do tempo de reação. Os valores correspondem a média de três replicatas e as médias ao desvio padrão. A variação na concentração de ABTS oxidado foi avaliada a nível $p < 5$, pelo teste de Tukey.

4.2.3 Reutilização de filmes com enzimas immobilizadas

A reutilização das membranas de PA e de PSU teve por objetivo avaliar a estabilidade da atividade de lacase immobilizada em função do número de reutilizações do sistema. Os experimentos foram realizados com um tempo de reação de 30 minutos. A solução enzimática utilizada na reação de imobilização em PA apresentava atividade de lacase de 75 U.mL^{-1} e em PSU, de 50 U.mL^{-1} . Verifica-se, pela análise da figura 37, que as membranas de PA mantiveram cerca de 70% da atividade após quatro reutilizações enquanto que as membranas de PSU (Fig. 38) mantiveram aproximadamente 50% da atividade, comprovando a eficiência do sistema contendo lacases immobilizadas. Os resultados mostraram-se semelhantes aos de Shiyu *et al.* (2002), que aplicaram a lacase immobilizada em grânulos de PVA em 17 reações consecutivas, obtendo uma retenção de até 70% da atividade em quatro reutilizações.

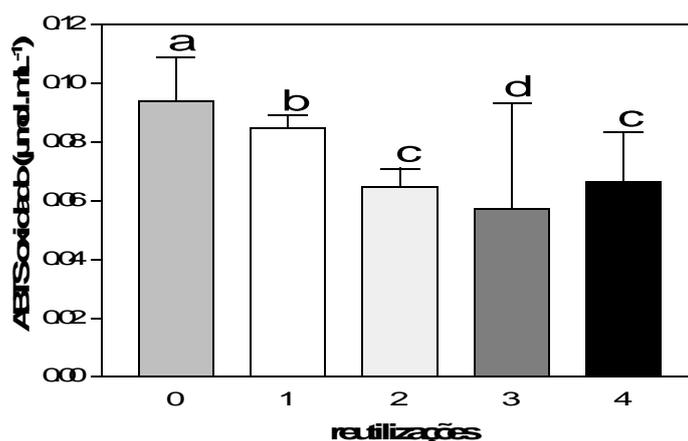


Figura 37: Reutilização dos sistema PA/lacase. Em cada utilização o tempo de reação com ABTS foi de trinta minutos, à temperatura de 40°C, com agitação. Os valores correspondem a média de três replicatas e as médias ao desvio padrão. Barras com letras distintas indicam que as repetições diferiram a nível $p < 5$, pelo teste de Tukey.

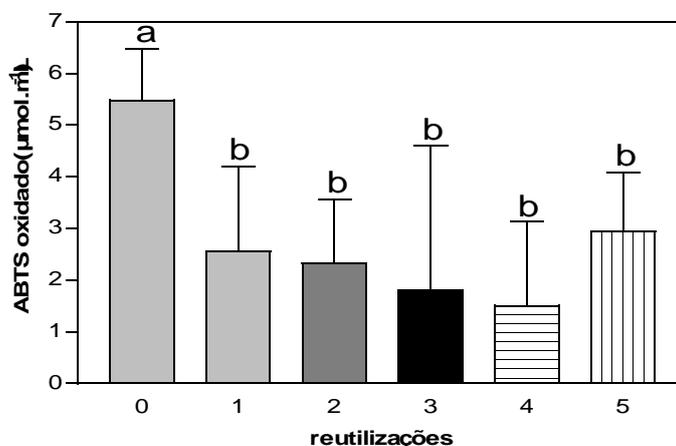


Figura 38: Reutilização dos sistema PSU/lacase em tempos de reação de trinta minutos, à temperatura de 40°C, com agitação em função da concentração de ABTS oxidado. Os valores correspondem a média de três replicatas e as médias ao desvio padrão. Barras com letras distintas indicam que as repetições diferiram a nível $p < 5$, pelo teste de Tukey.

4.2.4 Descoloração de corantes têxteis por extratos enzimáticos

Para verificar a capacidade dos extratos enzimáticos em promover descoloração, foi avaliada a alteração de cor dos corantes Reactive Blue 220 (azo) e Remazol Brilliant Blue R (antraquinona) em solução aquosa a pH 3 e pH 5.

Inicialmente, foram utilizadas soluções enzimáticas livres em reações com agitação e temperatura controlada (30°C). As soluções enzimáticas utilizadas apresentavam atividade de 110 U.mL⁻¹.

Como pode ser observado na figura 35, ocorreu alteração na cor do corante Reactive Blue 220 durante o período analisado, indicando a ação da solução enzimática de lacases sobre a estrutura do corante. Pela análise das soluções em espectrofotômetro de UV-Vis, ocorre decréscimo na absorvância característica do corante (610nm) durante os ensaios (Fig. 39 e 40).

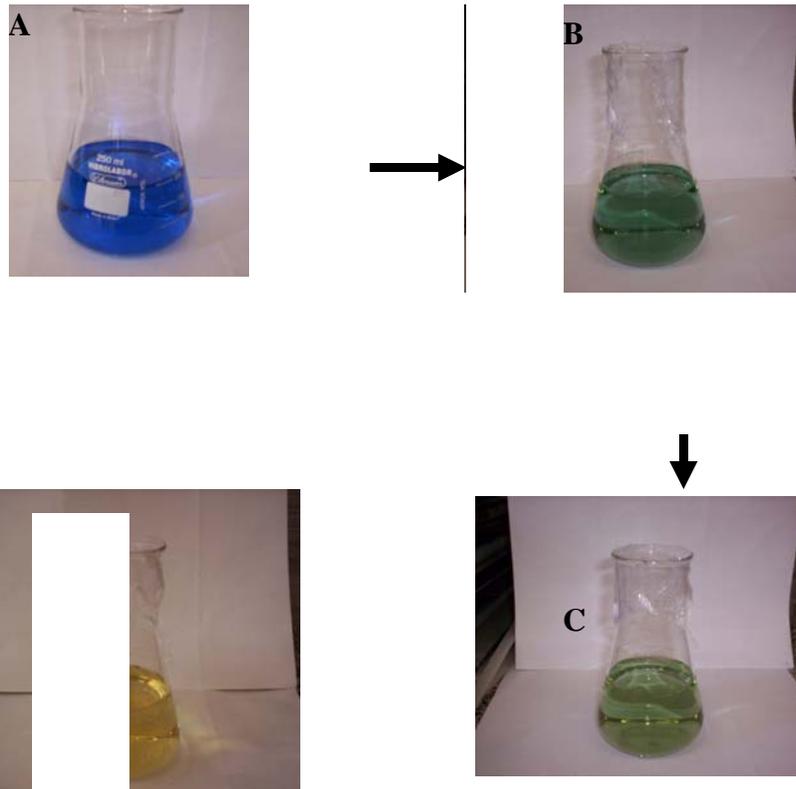
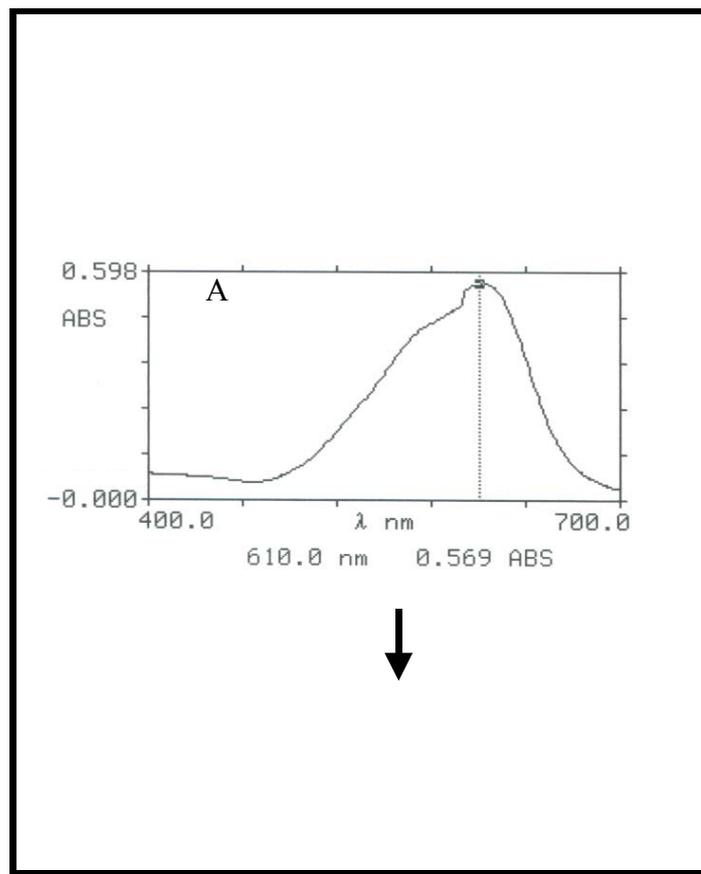


Figura 39: Descoloração do corante Reactive Blue 220 em solução aquosa 25 mg.L^{-1} com extrato enzimático de *Pleurotus sajor-caju*. Os testes foram realizados a $25^\circ\text{C} (\pm 2)$, (A) inicial; (B) 1 hora; (C) 2 horas (D) 4 horas.



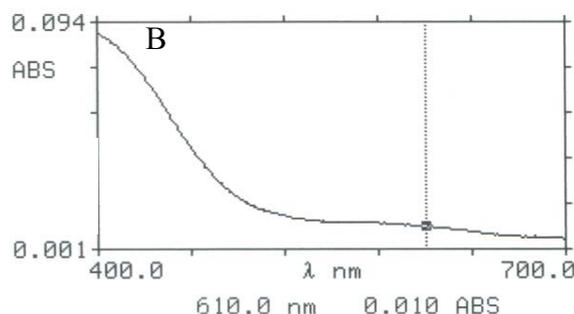


Figura 40: Espectro de UV-Vis do corante Reactive Blue 220 25 mg.L⁻¹ antes (A) e após (B) descoloração por solução enzimática de lacases

Resultados semelhantes de descoloração de Reactive Blue 220 por extratos enzimáticos de *P. sajor-caju* foram observados por Munari (2003), que obteve remoção de 80% da cor em 30 minutos de reação. A diferença no tempo de reação deve-se à maior atividade do caldo enzimático utilizado. Vários autores já observaram a descoloração de corantes azo por lacases (Rodriguez *et al.*, 1999; Baker *et al.*; 2000) e antraquinona (Sannia *et al.*, 2005). Queiroz *et al.* (2003) analisaram a degradação de oito corantes azo em meios de cultura líquidos, contendo inóculos dos fungos *P. ostreatus*, *T. versicolor*, *P. chrysosporium* e *Aureobasidium pullulans* por até 7 dias, obtendo descoloração de até 100%. Jarosz-Wilkolazka *et al.* (2002) observaram 75-100% de descoloração de corantes antraquinonas em meio, contendo três linhagens de fungos, após 14 dias de cultivo.

Pela análise da figura 41 pode-se observar descoloração de até 90% após 5 h de reação, utilizando a enzima livre. Selvan *et al.* (2003) monitoraram a descoloração de corantes azo e corantes presentes em efluentes industriais, utilizando o micélio do fungo de degradação branca *Thelephora sp.* Após 3 dias de análise, obteve-se a descoloração máxima para efluentes industriais de 61%.

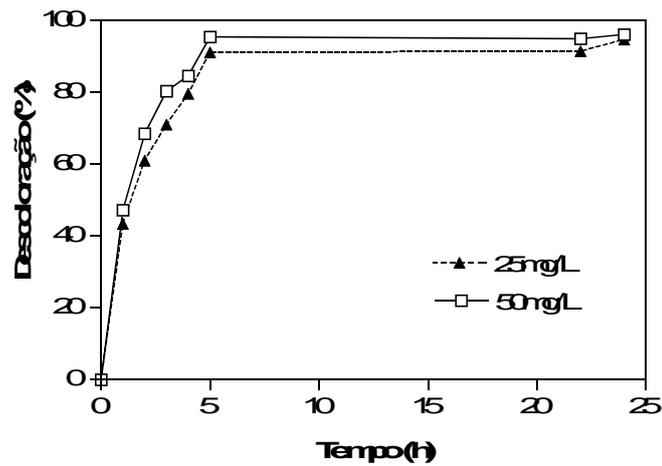


Figura 41: Descoloração do corante Reactive Blue 220 por caldo enzimático de lacases em função do tempo ($25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$) a 610nm .

A descoloração do corante industrial Remazol Brilliant Blue R (RBBR) (antraquinona) foi realizada utilizando a solução enzimática obtida de *P. sajor-caju*. Inicialmente, não ocorreram alterações significativas na cor do RBBR. Adicionaram-se, então, 2 mL do corante Reactive Blue 220 a 20 mL de RBBR para facilitar a reação. A alteração na cor da solução pode ser visulizada da figura 42.

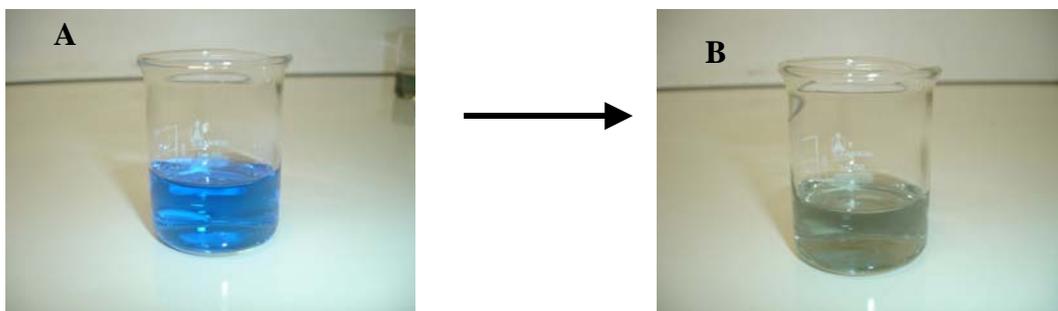


Figura 42: Descoloração do corante RBBR em solução aquosa 25 mg/L , com extrato enzimático de *P. sajor-caju*. Os testes foram realizados à $25^{\circ}\text{C} (\pm 2)$, (A) inicial;(B) 24 horas.

Conforme a figura 43, a descoloração foi monitorada por UV-Vis , constatando-se um deslocamento do pico característico do corante (592nm) para a região de 400nm, indicando alterações na estrutura do corante.

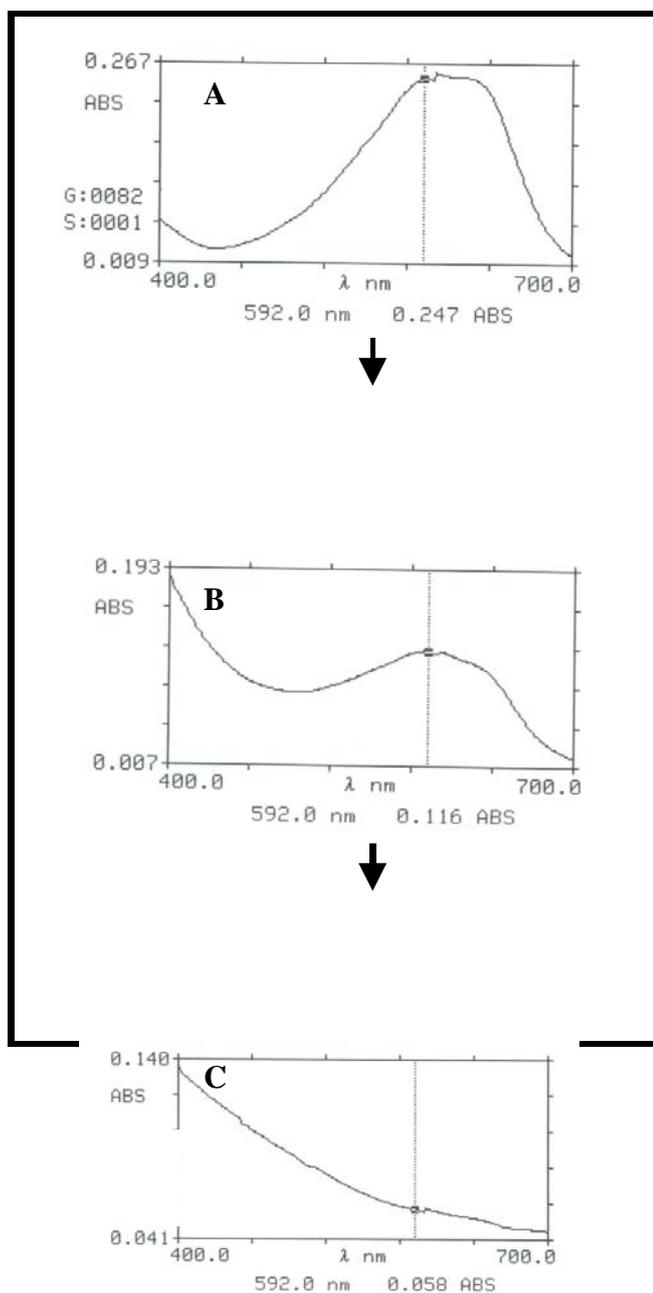


Figura 43: Espectro de UV-Vis do corante RBBR 25 mg.L⁻¹ (A), após 24 h (B) e após 48 h de descoloração por caldo enzimático de lacases.

Eichlerová *et al.*, (2005) monitoraram a descoloração do corante RBBR utilizando os fungos de degradação branca *D. squalens*, *I. resinsum* e *P. calytratus* em meio líquido. Após 14 dias, observaram descoloração de até 90% do corante. Essa capacidade de descoloração foi atribuída à presença de MnP na solução.

As membranas utilizadas para os processo de imobilização também foram avaliadas quanto à capacidade de redução de cor dos corantes Reactive Blue 220 e RBBR.

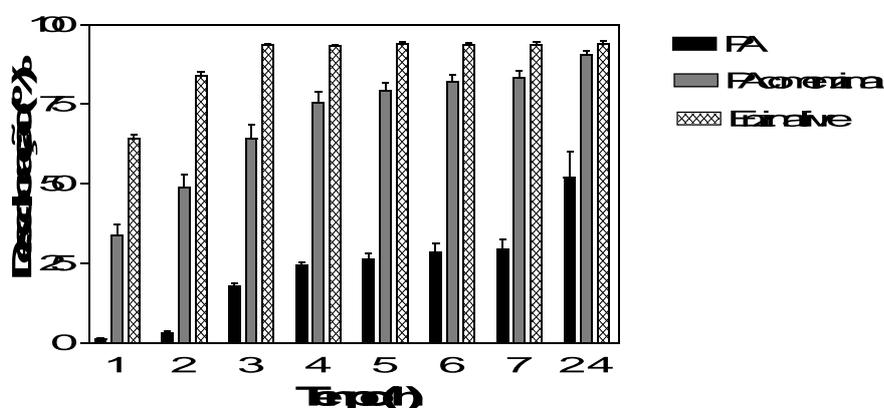


Figura 44: Porcentagem de descoloração do corante Reactive Blue 220 25 mg.L⁻¹ com a solução enzimática livre e imobilizada. A membrana de PA sem a enzima imobilizada (PA); a membrana de poliamida com a enzima imobilizada (PA com enzima) e solução enzimática livre; durante 24 h em reação mantida a 30°C com agitação constante. Os valores correspondem a média de três replicatas e as médias ao desvio padrão. A porcentagem de descoloração foi avaliada a nível $p < 5$, pelo teste de Tukey.

Na figura 44, pode-se observar a variação na descoloração do corante azo Reactive Blue 220. A solução enzimática livre foi capaz de reduzir até 60% da cor na primeira hora de reação e aproximadamente 95% da cor após 3 h. As membranas de PSU e PSU com enzima imobilizada não apresentaram descoloração; já a membrana de PA, mesmo sem a enzima imobilizada, mostrou-se capaz de reduzir em 50% a cor da solução, após 24 h de reação, devido, provavelmente ao processo físico de adsorção. Aliada a essa característica da membrana de PA, a imobilização da solução enzimática mostrou-se eficiente, aumentando, em mais de 50%, a descoloração nas primeiras 7 horas de reação, se comparada à membrana de PA. Verificou-se variação significativa na porcentagem de descoloração do corante entre as membranas de PA com e sem enzima e a enzima livre.

Resultados semelhantes são observados para a descoloração do corante RBBR com Reactive Blue 220 (Fig. 45). Após 24 h de análise, pode-se observar um aumento menor da descoloração comparando-se a membrana de PA com e sem enzima imobilizada. As membranas de PSU não apresentaram descoloração.

Zille (2005) analisou a descoloração de corante e efluentes industriais com lacase livre e imobilizada. Concluiu que para o tratamento de corantes utilizados no tingimento, a estabilidade da enzima livre ou imobilizada depende da natureza do corante e do efluente a ser tratado. Em suas análises, observou que a enzima livre apresentou uma estabilidade maior (194 h) que a enzima imobilizada (74 h) para o tratamento de efluentes. Concluiu, também, que aproximadamente 79% da descoloração provocada pela enzima imobilizada foi possível devido à característica de adsorção presente no suporte utilizado.

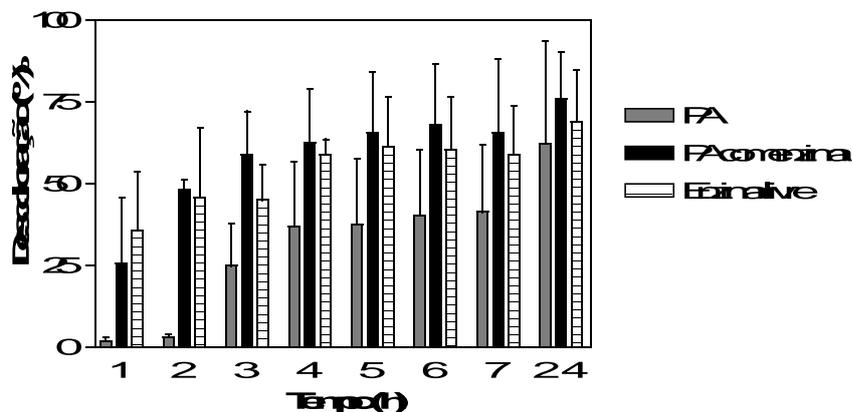


Figura 45: Porcentagem de descoloração do corante RBBR com Reactive Blue 220 25 mg.L⁻¹ utilizando a solução enzimática livre (enzima); a membrana de PA sem a enzima imobilizada (PA); a membrana de poliamida com a enzima imobilizada (PA com enzima) e a solução enzimática livre durante 24 h em reação mantida a 30°C com agitação constante. Os valores correspondem a média de três replicatas e as médias ao desvio padrão.

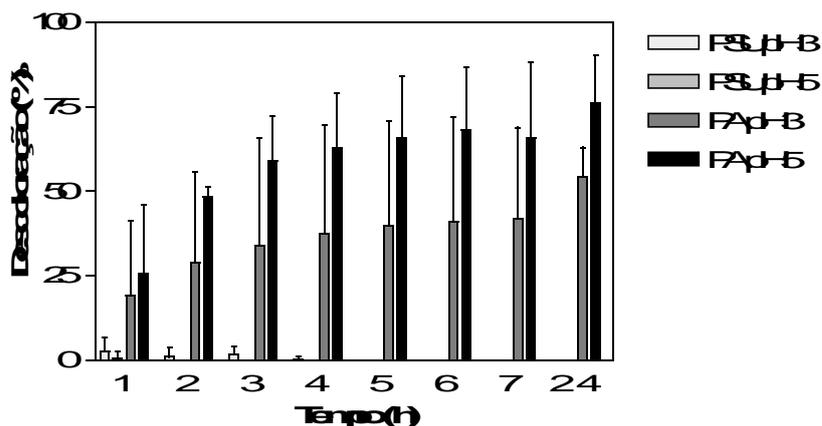


Figura 46: Porcentagem de descoloração do corante RBBR com Reactive Blue 220 25 mg.L^{-1} utilizando a membrana de PA com a enzima imobilizada a pH 3 e 5 e a membrana de PSU com a enzima imobilizada a pH 3 e 5, utilizando tampão acetato, durante 24 h em reação mantida a 30°C com agitação constante. Os valores correspondem a média de três replicatas e as médias ao desvio padrão.

Durante as 24 horas de análise, observou-se um aumento da descoloração provocada pelas membranas de PA com e sem enzima. Verificou-se também aumento da descoloração provocado pela alteração de pH do meio reacional (Fig. 46). As membranas de PSU, com lacase imobilizada apresentaram melhor atividade de lacases a pH 3, utilizando ABTS como substrato, o que não foi verificado utilizando o corante RBBR com Reactive Blue R.

Os resultados do presente trabalho mostram que a linhagem PS 2001 de *P. sajor-caju* secreta lacases em cultivos no estado sólido, utilizando meios de serragem de *Pinus* spp. As soluções enzimáticas em estudo contém outras proteínas, além de lacases, que atuam como impurezas no processo de imobilização, competindo com as lacases pelo suporte. Parte das lacases presentes nos extratos enzimáticos podem ser retidas em filmes de PA e PSU, por processos de imobilização, utilizando glutaraldeído, preservando-se parcialmente a atividade enzimática. A utilização de lacases livres e imobilizadas em membranas de PA demonstrou ser eficiente na descoloração dos corantes Reactive Blue 220 e Remazol Brilliant Blue R,

sugerindo que este tipo de sistema pode vir a ser utilizado na descoloração de compostos recalcitrantes.

5 CONCLUSÕES

O presente trabalho permite as seguintes conclusões:

- os extratos de cultivos da linhagem *Pleurotus* obtidos em serragem de *Pinus spp.* mostraram atividades de lacases;
- os valores de Km (0,3mM) calculados para atividade de lacases foram semelhantes aos dados da literatura;
- é possível imobilizar lacases de *P. sajor-caju* em membranas de PA e PSU, utilizando glutaraldeído como agente de ligação;
- a solução enzimática imobilizada atingiu, aproximadamente, 80% da atividade obtida com a enzima livre;
- a solução enzimática imobilizada apresentou redução da velocidade de oxidação do substrato ABTS, quando comparada com a enzima livre;
- as membranas de PA apresentam 70% da atividade após quatro reutilizações e as membranas de PSU, aproximadamente 50% da atividade após cinco reutilizações;
- as membranas de PA apresentaram capacidade de descoloração dos corantes industriais Reactive Blue 220 e Remazol Brilliant Blue R;
- as técnicas de MEV-EDS e GPC podem ser utilizadas para demonstrar a ocorrência de imobilização de lacases nos filmes de PA e PSU.

6 SUGESTÕES PARA CONTINUIDADE

Como sugestões para a continuidade desta pesquisa, podem ser relacionados os seguintes temas:

- purificação das enzimas presentes no solução enzimática previamente à imobilização;
- imobilização da solução enzimática em outros suportes que não comprometam as características cinéticas da enzima;
- análise da descoloração de outros corante com lacases livres e imobilizadas;
- determinação do percentual de descoloração de efluentes da indústria têxtil com lacases imobilizadas;
- identificação da toxicidade dos corantes ou efluentes tratados com lacases livres e imobilizadas.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alexopoulos, C.J.; Mims, C.W. (1985). **Introducción a la Micología**. Barcelona: Omega.
- Al-Adhami, A.J.H.; Bryjak, J.; Greb-Markiewicz, B.; Peczyńska-Czoch, W. (2002). Immobilization of wood-rotting fungi laccases on modified cellulose and acrylic carriers. **Process Biochemistry**, 37: 1387-1394.
- Almeida, E.; Assalin, M.R.; Rosa, M.A. (2004). Tratamento de efluentes industriais por processos oxidativos na presença de ozônio. **Química Nova**, 27: 818-824.
- Arora, D.S.; Gill, P.K. (2000). Laccase production by some white rot fungi under different nutritional conditions. **Bioresource Technology**, 73: 283-285.
- Arora, D.S.; Chander, M.; Gill, P.K. (2002). Involvement of lignin peroxidase, manganese peroxidase and laccase in degradation and selective ligninolysis of wheat straw. **International Biodeterioration & Biodegradation**, 50: 115-120.
- Baker, W.L.; Schliephake, K.; Mainwaring, D.E.; Lonergan, G.T.; Jones, I.K. (2000). Transformation and degradation of the disazo dye Chicago Sky Blues by a purified laccase from *Pycnoporus cinnabarinus*. **Enzyme and Microbial Technology**, 27: 100-107.
- Baldrian, P. (2003). Interactions of heavy metals with white-rot fungi. **Enzyme and Microbial Technology**, 32: 78-91.
- Barr, D.P.; Aust, S.D. (1994). Mechanisms White rot fungi use to degrade pollutants. **Environ. Sci. Technol.**, 28: 78-87.
- Becker, H.G.; Sinitzyn, A.P. (1993). Mn-peroxidase from *Pleurotus ostreatus*: the action on the lignin. **Biotechnology Letters**, 15: 289-294.
- Bertazzoli, R.; Pelegrini, R. (2002). Descoloração e degradação de poluentes orgânicos em soluções aquosas através do processo fotoeletroquímico. **Química Nova**, 25: 477-482.
- Bettin, F. (2005). Produção de lacases pela linhagem PS-2001 de *Pleurotus sajor-caju* (Fr.) Singer em cultura submersa. **Dissertação de Mestrado**. Instituto de Biotecnologia, Universidade de Caxias do Sul. Caxias do Sul, Brasil.
- Bollag, J.M.; Leonowicz, A. (1984). Comparative Studies of Extracellular Fungal Laccases. **Appl. Environ. Microbiol.**, 48: 849-854.
- Bonomo, R.P.; Boudet, A.M.; Cozzolino, R.; Rizzareli, E.; Santoro, A.M.; Sterjiaides, R.; Zappalà, R. (1998). A comparative study of two isoforms of laccase secreted by the

- “white-rot” fungus *Rigidoporus lignosus*, exhibiting significant structural and functional differences. **Journal of Inorganic Biochemistry**, 71: 205-211.
- Bourbonnais, R.; Paice, M. G. (1988). Veratryl alcohol oxidases from the lignin-degrading basidiomycete *Pleurotus sajor-caju*. **Biochem. J.** 255:445-450.
- Bourbonnais, R.; Paice, M. G. (1990). Oxidation of non-phenolic substrates: an expanded role for laccase in lignin biodegradation. **FEBS Lett.** 267:99-102.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.** 72:248-254.
- Camassola, M.; Bittencourt, L. R.; Sehnem, N. T.; Andreus, J.; Dillon, A. J. P. (2004). Characterization of the cellulase complex of *Penicillium echinulatum*. **Biocatalysis And Biotransformation**, Inglaterra, 22:391-396.
- Cambria, M.T.; Cambria, A.; Ragusa, S.; Rizzarelli, E. (2000). Production, purification and properties of an Extracellular Laccase from *Rigidoporus lignosus*. **Protein Expression and Purification**, 18: 141-147.
- Campbell, M.K. (2000). **Bioquímica**, Artmed Editora, 751p.
- Carta, G.; Gainer, J.L.; Benton, A.H. (1990). Enzymatic synthesis of esters using an immobilized lipase. **Biotechnology and Bioengineering**, 37: 1004-1009.
- Cavaco-Paulo, A.; Zille, A.; Munteanu, F.; Gubitz, G.M. (2005). Laccase Kinetics of degradation and coupling reactions. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, 33: 23-28.
- Chattoo, B.B.; Iyer, G. (2003). Purification and characterization of laccase from the rice blast fungus, *Magnaporthe grisea*. **FEMS Microbiology Letters**, 227: 121-126.
- Chen, K.; Lin, Y.; Chen, W.; Liu, Y. (2002). Degradation of phenol by PAA-immobilized *Candida tropicalis*. **Enzyme and Microbial technology**, 31: 490-497.
- Cheng, L.; Lin, D.; Chang, C.; Lee, C. (2006). Fine structure and crystallinity of porous Nylon 66 membranes prepared by phase inversion in the water/formic acid/Nylon 66 system. **European Polymer Journal**, 42: 356-367.
- Claus, H. (2004). Laccases: structure, reactions, distribution. **Micron**, 35: 93-96.
- Cloete, T.E.; Malherbe, S. (2002). Lignocellulose biodegradation: Fundamentals and applications. **Re/Views in Environmental Science & Bio/Technology**, 1: 105-114.
- Comerlato, M.H. (1995). Imobilização de enzimas no suporte crisotila. **Tese de doutorado**. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, São Paulo, Brasil.

- Couto, S.R.; Sanromán, M.A. (2006). Effect of two wastes from groundnut processing on laccase production and dye decolourisation ability. **Journal of food engineering**, 73: 388-393.
- D'Annibale, A.; Stazi, S.R.; Vinciguerra, V.; Sermanni, G.G. (2000). Oxirane-immobilized *Lentinula edodes* laccase: stability and phenolics removal efficiency in olive Mill wastewater. **Journal of Biotechnology**, 77: 265-273.
- Denizli, A.; Cihangir, N.; Tuzmen, N.; Alsancak, G. (2005). Removal of chlorophenols from aquatic system using the dried and dead fungus *Pleurotus sajor-caju*. **Bioresource Technology**, 96: 59-62.
- Donini, L.P.; Bernardi, E.; Minotto, E.; Nascimento, J.S. (2005). Desenvolvimento *in vitro* de *pleurotus* spp. sob a influência de diferentes substratos e dextrose. **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, 72(3): 331-338.
- Durán, N. (2004). **Enzimas lignolíticas**. In: Espósito, E.; Azevedo, J. L. (Org.). **Fungos – uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia**. Caxias do Sul: UCS. 510 p.
- Durán, N.; Esposito, E. (2000). Potential applications of oxidative enzymes and phenoloxidase-like compounds in wastewater and soil treatment: a review. **Applied Catalysis B: Environmental**, 28: 83-99.
- Durán, N.; Peralta-Zamora, P.; Esposito, E.; Pelegrini, R.; Groto, R.; Reyes, J. (1998). Effluent Treatment of Pulp and Paper, and textile industries using immobilized horseradish peroxidase. **Environmental Technology**, 19: 55-63.
- Durán, N.; Rosa, M.A.; D'Annibale, A.; Gianfreda, L. (2002). Applications of laccases and tyrosinases (phenoloxidases) immobilized on different supports: a review. **Enzyme and Microbial Technology**, 31: 907-931.
- Eichlerová, I.; Homolka, L.; Lisá, L.; Nerud, F. (2005). Orange G and Remazol Brilliant Blue R decolorization by white-rot fungi *Dichomitus squalens*, *Ischnoderma resinsum* and *Pleurotus calyptratus*. **Chemosphere**, 60: 398-404.
- Elegir, G.; Daina, S.; Zoia, L.; Bestetti, G.; Orlandi, M. (2005). Laccase mediator system: Oxidation of recalcitrant lignin model structures present in residual kraft lignin. **Enzyme and Microbial Technology**, 37: 340-346.
- Eriksson, K.L.; Temp, U.; Eggert, C. (1996). The ligninolytic system of the white rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus*: Purification and characterization of the laccase. **Applied and Environmental Microbiology**, 62: 1151-1158.

- Ferraz, A. L. (2004). **Fungos decompositores de materiais lignocelulósicos**. In: Espósito, E.; Azevedo, J. L. (Org.). **Fungos – Uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia**. Caxias do Sul: EDUCS. pp. 215-242.
- Furlan S. A.; Mendonça, M. M.; Germ, R. M. M.; Santos, V. M. C. S.; Araújo, R. P. (2000). Influência da suplementação de palha de arroz na produção de *Pleurotus sajor-caju*. **Revista Saúde e Ambiente**, Univille, Santa Catarina.
- Gentili, P.; Galli, C.; Fabbrini, M.; Barreca, A.M.; Baiocco, P. (2003). Promoting laccase activity towards non-phenolic substrates: a mechanistic investigation with some laccase-mediator systems. **Org. Biomol. Chem.**, 1: 191-197.
- Giamberini, M.; Giardina, P.; Desiderio, B.; Marzullo, L.; Palmieri, G.; Sannia, G. (1994). A new enzyme immobilization procedure using copper alginate gel: application to a fungal phenol oxidase **Enzyme and Microbial Technology**, 16: 151-158.
- Giardina, P.; Palmieri, G.; Cennamo, G.; Faraco, V.; Amoresano, A.; Sannia, G. (2003). Atypical laccase isoenzymes from copper supplemented *Pleurotus ostreatus* cultures. **Enzyme and Microbial Technology**, 33: 220-230.
- Gomes, F.M.; Paula, A.V.; Silva, G.S.; Castro, H.F. (2006). Determinação das propriedades catalíticas em meio aquoso e orgânico da lipase de *Candida rugosa* imobilizada em celulignina quimicamente modificada por carbonildiimidazol, **Química Nova**, 29:710-718.
- Gonzalez, I.; Viniegra-Gonzalez, G.; Solis-Oba, M.; Ugalde-Saldivar, V.M. (2005). An electrochemical-spectrophotometrical study of the oxidized forms of the mediator 2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) produced by immobilized laccase. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, 579: 59-66.
- Griebenow, K.; Ruiz, A.I.; Malave, A.J.; Felby, C. (2000). Improved activity and stability of an immobilized recombinant laccase in organic solvents **Biotechnology Letters**, 22: 229-233.
- Guaratini, C.C.I.; Zanoni, M.V.B. (2000). Corantes têxteis. **Química Nova**, 23: 71-78.
- Gupta, S. K. (1989). Nylon polymerization. In: CHEREMISINOFF, N. **Handbook of polymer science and technology: synthesis and properties**. New York: Marcel Dekker, p. 211-248.
- Hatakka, A.; Hakala, T.K.; Lundell, T.; Galkin, S.; Maijala, P.; Kalkkinen, N. (2005). Manganese peroxidases, laccases and oxalic acid from the selective White-rot fungus *Physisporinus rivulosus* grown on spruce wood chips, **Enzyme and Microbial Technology**, 36: 461-468.

- Hatakka, A.; Itavaara, M.; Vikman, A.; Tuomela, M. (2000). Biodegradation of lignin in a compost environment: a review. **Bioresource Technology**, 72: 169-183.
- Hatakka, A.; Kantelinen, A.; Tervila-Wilo, A.L.M.; Viikari, L. Production of ligninases by *Phlebia radiata* in agitated conditions. In: Odier, E. (ed). (1987). **Lignin: enzymic and microbial degradation**. Paris: INRA., p. 185-189.
- Heinzkill, M.; Bech, L.; Halkier, T.; Scheider, P.; Anke, T. (1998). Characterization of lacases and peroxidases from wood-rotting fungi (Family *Caprinaceae*). **Appl. Environ. Microbiol.**, 49:1040-1045.
- Jarosz-Wilkolazka, A.; Kochmanska-Rdesta, J.; Malarczyka, E.; Wardasb, W.; Leonowicz, A. (2002). Fungi and their ability to decolourize azo and anthraquinonic dyes a. **Enzyme and Microbial Technology**, 30: 566-572.
- Jarosz-Wilkolazka, A.; Ruzgas, T.; Gorton, L. (2004). Use of laccase-modified electrode for amperometric detection of plant flavonoids, **Enzyme and Microbial Technology**, 35: 238-241.
- Jolival, C.; Brenon, S.; Caminade, E.; Mougín, C.; Pontié, M. (2000). Immobilization of laccase from *Trametes versicolor* on a modified PVDF microfiltration membrane: characterization of the grafted support and application in removing a phenylurea pesticide in wastewater. **Journal of Membrane Science**, 180: 103-113.
- Keller, A. (2001). Enzimas lignocelulolíticas durante o desenvolvimento de *Pleurotus* sp. em serragem de *Eucalyptus* sp. **Dissertação de Mestrado**. Instituto de Biotecnologia, Universidade de Caxias do Sul. Caxias do Sul, Brasil.
- Knight, K.; Pimentel, M.C.B.; Morais, M.M.C.; Ledingham, W.M.; Lima Filho, J.L.; Maia, M.M.D. (2000). Immobilization of lipase from *Fusarium solani* FS1. **Brazilian Journal of Microbiology**, 31: 220-222.
- Krzan, A.; Friedrich, J.; Klun, U. (2003). Polyamide-6 fibre degradation by a lignolytic fungus. **Polymer Degradation and Stability**, 79: 99-104.
- Kunz, A.; Peralta-Zamora, P.; Moraes, S.G.; Durán, N. (2002). Novas tendências no tratamento de efluentes têxteis. **Química Nova**, 25: 78-82.
- Kuwahara, M.; Glenn, J. K.; Morgan, M. A.; Gold, M. H. (1984). Separation and characterization of two extracellular H₂O₂ – dependent oxidases from lignolytic cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. **FEBS Lett.** 169: 247-250 .
- Leonowicz, A.; Matuszewska, A.; Luterek, J.; Ziegenhagen, D.; Wojtas-Waslewska, M.; Cho, N.; Hofrichter, M.; Rogalski, J. (1999). Biodegradation of lignin by white rot fungi. **Fungal Genetics and Biology**, 27: 175-185.

- Leontievsky, A.A.; Myasoedova, N.M.; Baskunov, B.P.; Golovleva, L.A.; Bucke, C.; Evans, C.S. (2001). Transformation of 2,4,6-trichlorophenol by free and immobilized fungal laccase. **Appl. Microbiol Biotechnol**, 57: 85-91.
- Loguercio-Leite, C. Taxonomia dos fungos. (2004) In: Espósito, E.; Azevedo, J. L. (Org.). **Fungos – Uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia**. Caxias do Sul: EDUCS. pp. 47-90.
- Loguercio-Leite, C. & Espósito, E.; Fungos: estrutura e ultra-estrutura. (2004) In: Espósito, E.; Azevedo, J. L. (Org.). **Fungos – Uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia**. Caxias do Sul: EDUCS. pp. 15-46.
- Lo, S. C.; Ho, Y. S. Buswell, J. A. (2001). Effect of phenolic monomers on the production of laccases by the edible mushroom *Pleurotus sajor-caju* and partial characterisation of a major laccase. **Mycologia**. 93: 413-421.
- Martinez, A.; Gutiérrez, A.; Pietro, A. (1996). Structural characterization of extracellular polysaccharides produced by fungi from the genus *Pleurotus*. **Carbohydrate Research**, 281: 143-154.
- Martinez, M.J.; Martinez, A.T.; Guillén, F.; Nuero, O.; Rodríguez, E. (2004). Degradation of phenolic and non-phenolic aromatic pollutants by two *Pleurotus* species: the role of laccase and versatile peroxidase. **Soil Biology & Biochemistry**, 36: 909-916.
- Maziero, R. (1990). Substratos alternativos para o cultivo de *Pleurotus* spp. **Dissertação de mestrado**. Universidade de São Paulo, São Paulo.
- Mayer, A.M.; Staples, R.C. (2002). Laccase: new functions for an old enzyme. **Phytochemistry**, 60: 551-565.
- Mello, K.; Riveros, R.; Zeni, M. (2005). Desenvolvimento de membranas poliméricas para eletrodialise. **Anais do XIII Encontro de Jovens Pesquisadores da UCS**, EDUCS, p. 66.
- Merçon, F.; Rodrigues, S. L. C. ; Moreira, R. L. S. ; Cardoso, M. H. (2003). Avaliação de Parâmetros de Ultrafiltração de Suco de Banana. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, 23: 98-101.
- Messerschmidt, A. (1994). Blue copper Oxidases. **Advances in inorganic Chemistry**, 40: 121-185.
- Mistry, A. (1996). Polysulfones resist heat and chemicals. **Advanced Materials and Process**. 12:31-32.

- Moda, E.M. (2003). Produção de *Pleurotus sajor-caju* em bagaço de cana-de-açúcar lavado e o uso de aditivos visando sua conservação in natura. **Dissertação de mestrado**. Escola Superior de Agricultura. Piracicaba, Brasil.
- Munari, F. M. (2003). Produção e caracterização de fenol-oxidases de *Pleurotus sajor-caju*, degradação de corantes têxteis e efluentes da indústria de celulose. **Dissertação de Mestrado**. Instituto de Biotecnologia, Universidade de Caxias do Sul. Caxias do Sul, Brasil.
- Nascimento, M.G.; Soldi, V.; Dalla-Vecchia, R. (2004). Aplicação de lipases imobilizadas em polímeros. **Química Nova**, 27: 623-630.
- Oliveira O. F.; Furlan, M.; França, S. C.; Corsino, J.; Moraes, M. A.; Leite, K.; Assis, S.; Khalil, N. (1999). Determinação de Km e V_{máx} de peroxidases de diferentes fontes. In: **IV Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática**. Rio de Janeiro. Resumos. p. 12.
- Palet, C.; Cano, A.; Minguillón, C. (2006). Immobilization of endo-1,4- β -xylanase on polysulfone acrylate membranes: Synthesis and characterization. **Journal of Membrane Science** (In Press).
- Peczynska-Czoch, W.; Al-Adhami, A.J.H.; Bryjak, J.; Greb-Markiewicz, B. (2002). Immobilization of wood-rotting fungi laccases on modified cellulose and acrylic carriers. **Process Biochemistry**, 37: 1387-1394.
- Peralta, R.M.; Souza, C.G.M.; Bôer, C.G. As principais oxirredutases de uso industrial. In: Said, S.; Pietro, R.C.L.R. (2004a). **Enzimas como agentes biotecnológicos**. Ribeirão Preto: Legis Summa, 412 p. Capítulo 10.
- Peralta, R.M.; Tychanowicz, G.K.; Zilly, A.; Souza, C.G.M. (2004b). Decolourisation of industrial dyes by solid-state cultures of *Pleurotus pulmonaris*. **Process Biochemistry**, 39: 855-859.
- Peralta-Zamora, P.; Pereira, C. M.; Tiburtius, E. L. R.; Moraes, S. G.; Rosa, M. A.; Minussi, R. C.; Duran, N. (2003). Decolorization of reactive dyes by immobilized laccase. **Applied Catalysis B: Environmental**, 42:131-144.
- Pickard, M.A.; Bressler, D.C.; Fedorak, P.M. (2000). Oxidation of carbazole, N-ethylcarbazole, fluorine, and dibenzothiophene by the laccase of *Coriolopsis gallica*. *Biotechnology Letters*, 22: 1119-1125.
- Pinkoski, P.I.; Thomas, R.W.S.P. (1998). Degradação de corantes vermelho congo e verde malaquita pelo fungo *Pycnoporus sanguineus*. In: II Reunião Nacional de Microbiologia Aplicada ao Meio Ambiente. **Anais**, 1998.

- Piontek, K.; Antorini, M.; Herpoel-Gimbert, I.; Choinowski, T.; Sigoillot, C.; Asther, M.; Winterhalter, K. (2002). Purification, crystallisation and X-ray diffraction study of fully functional laccases from two ligninolytic fungi. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1594: 109-114.
- Queiroz, M.J.; Martins, M.A.M.; Lima, N.; Silvestre, A.J.D. (2003). Comparative studies of fungal degradation of single or mixed bioaccessible reactive azo dyes. **Chemosphere**, 52: 967-973.
- Queiroz, S.M.C.; Collins, C.H.; Jardim, I.C.S.F. (2001). Métodos de extração e/ou concentração de compostos encontrados em fluidos biológicos para posterior determinação cromatográfica. **Química Nova**, 24: 68-76.
- Rajaratnam, S.; Bano, Z. (1989). Pleurotus mushrooms. Part III. Biotransformations of natural lignocellulosic wastes: Commercial applications and implications. **Critical Reviews in food science and nutrition**, 28: 31-113.
- Record, E.; Punt, P.J.; Chamkha, M.; Labat, M.; Van Der Hondel, C.A.M.J.J.; Asther, M. (2002). Expression of the *Pycnoporus cinnabarinus* laccase gene in *Aspergillus niger* and characterization of the recombinant enzyme. *Eur. J. Biochem*, 269: 602-609.
- Riva, S. (2006). Laccases: blue enzymes for green chemistry. **Trends in Biotechnology**, 24: 220-226.
- Rodriguez, E.; Pickard, M.A.; Vazquez-Duhalt, R. (1999). Industrial dye decolorization by laccases from lignolytic fungi. **Current Microbiology**, 38: 27-32.
- Rogalski, J.; Leonowicz, A.; Dawidowicz, A.; Jozwik, E. (1999). Immobilization of laccase from *Cerrena unicolor* on controlled porosity glass. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, 6: 29-39.
- Sannia, G.; Palmieri, G.; Cennamo, G. (2005). Remazol Brilliant Blue R decolourisation by the fungus *Pleurotus ostreatus* and its oxidative enzymatic system. **Enzyme and Microbial Technology**, 36: 17-24.
- Sanromán, A.; Rodriguez, C.S.; Santoro, R.; Cameselle, C. (1997). Laccase production in semi-solid cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. **Biotechnology Letters**, 19: 995-998.
- Saparrat, M.C.N.; Cabello, M.N.; Arambarri, A.M. (2002). Extracellular laccase activity in *Tetraploa aristata*. **Biotechnology Letters**, 24: 1375-1377.
- Selcuk, H. (2005). Decolorization and detoxification of textile wastewater by ozonation and coagulation process. **Dyes and Pigments**, 64: 217-222.

- Selvam, K.; Swaminathan, K.; Chae, K. (2003). Decolourization of azo dyes and a dye industry effluent by a White rot fungus *Thelephora sp.* **Bioresource Technology**, 88: 115-119.
- Sforça, M.L. (1995). Membranas de poliamida para ultra e nanofiltração. **Dissertação de mestrado**. Universidade Estadual de Campinas. Campinas, Brasil.
- Shiyu, F.; Yinghui, D.; Quiling, W. (2002). Laccase satilization by covalent binding immobilization on activated polyvinyl alcohol carrier. **Letters in Applied Microbiology**, 35: 451-456.
- Shleev, S.V.; Morozova, O.V.; Nikitina, O.V.; Gorshina, E.S.; Rusinova, T.V.; Serezhenkov, V.A.; Burbaev, D.S.; Gazaryan, I.G.; Yaropolov, A.I. (2004). Comparasion of physico-chemical characteristics of four laccases from differents basidiomucetes. **Biochimie**, 86: 693-703.
- Silva, S. M. (2004). Formulação de meios de crescimento para cultivo sólido de *Pleurotus sajor-caju* a base de serragem de *Pinus spp.* **Dissertação de Mestrado**. Instituto de Biotecnologia, Universidade de caxias do Sul. Caxias do Sul, Brasil.
- Silva, R.; Gomes, E. Ligninases. In: Said, S.; Pietro, R.C.L.R. (eds). (2004). Enzimas como agentes biotecnológicos. Ribeirão Preto: Legis Summa, p. 349-379.
- Soden, D.M.; Dodson, A.D.W. (2001). Differential regulation of laccase gene expression in *Pleurotus sajor-caju*. **Microbiology**, 147: 1755-1763.
- Solomon, E.I.; Sundaram, U.M.; Machonkin, T.E. (1996). Multicopper oxidases and oxygenases. **Chem. Rev.**, 96: 2563-2605.
- Souza, J.; Ferrarini, E.; Riveros, R.; Zeni, M. (2006). Imobilização de lipase em filmes de polissulfona. **Anais do XIII Encontro de Jovens Pesquisadores da UCS, EDUCS**, p. 41.
- Sparrat, M.C.N.; Cabello, M.N.; Arambarri, A.M. (2002). Extracellular laccase activity in *Tetraploa aristata*. **Biotechnology Letters**, 24: 1375-1377.
- Spettoli, P.; Lante, A.; Crapisi, A.; Krastanov, A. (2000). Biodegradation of phenols by laccase immobilized in a membrane reactor. **Process Biochemistry**, 36: 51-58.
- Tan, Y. H.; Wahab, M. N. (1997). Extracellular enzyme production during anamorphic growth in the edible mushroom *Pleurotus sajor-caju*. **World J. Microbiol. Biotechnol.** 13: 613-617.
- Tavares, A. P. M. (2006). Produção de lacases para potencial aplicação como oxidante na indústria papeleira. **Tese de doutorado**. Universidade de Aveiro, Portugal.

- Thomas, J.L.; Olzog, M.; Drake, C.; Shih, C.; Gryte, C.C. (2002). Polyamide membrane precipitation studied by confocal backscattering microscopy. **Polymer**, 43: 4156-4157.
- Thurston, C.F. (1994). The structure and function of fungal laccases. **Microbiology**, 140: 19-26.
- Tien, M.; Kirk, T. K. (1984). Lignin-degrading enzyme from *Phanerochaete cryosporium*: purification, characterization and catalytic properties of a unique H₂O₂-requiring oxygenases. **Proc. Natl. Acad. Sci.** 81: 2280-2284.
- Ting, Y.; Toh, Y.; Yen, J.J.L.; Obbard, J.P. (2003). Decolourisation of azo dyes by white-rot fungi (WRF) isolated in Singapore. **Enzyme and Microbial Technology**, 33: 569-575.
- Vasileva, N.; Godjevargova, Ts. (2004). Study on the behaviour of glucose oxidase immobilized on microfiltration polyamide membrane. **Journal of Membrane Science**, 239: 157-161.
- Vieira, I.C. & Oliveira, I.R.W.Z. (2006). Construção e aplicação de biosensors utilizando diferentes procedimentos de imobilização da peroxidase de vegetal em matriz de quitosana. **Química Nova**, 29: 932-939.
- Welander, U.; Nilsson, I.; Moller, A.; Mattiasson, B.; Rubindamayugi, M.S.T. (2006). Decolorization of synthetic and real textile wastewater by the use of white-rot fungi. **Enzyme and Microbial Technology**, 38: 94-100.
- Wesenberg, D.; Kyriakides, I.; Agathos, S.N. (2003). White-rot fungi and their enzymes for the treatment of industrial dye effluents. **Biotechnology Advances**, 22: 161-187.
- Willson, R.L.; Wolfenden, B.S. (1982). Radical-cations as Reference Chromogens in Kinetic studies of One-electron transfer reactions: Pulse radiolysis studies of 2,2'-azinobis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonate). **J. Chem. Soc. Perkin Trans.**, 2: 805-812.
- Xu, F. (1997). Effects of redox potential and hydroxide inhibition on the pH activity profile of fungal laccases. **The Journal of Biological Chemistry**, 272: 924-928.
- Zanetti, A.L.; Ranal, M.A. (1997). Suplementação da cana-de-açúcar com guandu no cultivo de *pleurotus* sp. **Revista PAB Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 32.
- Zanin, G.M.; Moraes, F.F. Enzimas imobilizadas. In: Said, S.; Pietro, R.C.L.R. (2004). **Enzimas como agentes biotecnológicos**. Ribeirão Preto: Legis Summa, 412 p. Capítulo 4.
- Zille, A. (2005). Laccase reactions for textile applications. **Tese de doutorado**. Universidade do Minho, Portugal.

Zille, A.; Munteanu, A.D.; Gubitz, G.M.; Cavaco-Paulo, A. (2005). Laccase kinetics of degradation and coupling reactions. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, 33: 23-28.

ANEXOS

Resultados Experimentais

Anexo 1. Dados experimentais que compuseram a figura 12.

Tabela A 1. Atividade de lacases (U.mL⁻¹) em diferentes pHs, utilizando tampão Mellvaine pH 2-8.

<i>pH</i>	<i>Análise 1</i>	<i>Análise 2</i>	<i>Análise 3</i>
2	5,57	5,88	5,17
3	21,04	20,36	15,65
4	39,96	39,76	39,76
5	34,35	34,52	34,11
6	22,93	24,47	24,64
7	15,10	13,86	13,62
8	8,61	8,58	9,31

Tabela A 2. Atividade de lacases (U.mL⁻¹) em diferentes pHs, utilizando tampão acetato pH 2-7.

<i>pH</i>	<i>Análise 1</i>	<i>Análise 2</i>	<i>Análise 3</i>
2	0	0	0
3	10,00	10,52	10,03
4	9,02	9,00	8,76
5	40,00	37,15	39,02
6	34,10	32,03	32,00
7	13,10	13,00	12,00

Anexo 2. Dados experimentais que compuseram a figura 13.

Tabela A 3. Atividade de lacases (U.mL⁻¹) em diferentes concentrações utilizando o tampão Mellvaine pH 4.

<i>Concentração (mol.L⁻¹)</i>	<i>Análise 1</i>	<i>Análise 2</i>	<i>Análise 3</i>
0,01	324,13	321,20	321,20
0,02	334,4	330,73	330,75
0,05	310,93	323,40	321,20
0,1	338,06	335,13	335,13
0,5	326,33	324,86	324,13
1	297,73	305,80	297,73

Anexo 3. Dados experimentais que compuseram a figura 14.

Tabela A 4. Atividade de lacases (U.mL⁻¹) em diferentes concentrações utilizando o tampão Mellvaine pH 5.

<i>Concentração (mol.L⁻¹)</i>	<i>Análise 1</i>	<i>Análise 2</i>	<i>Análise 3</i>
0,01	247,86	262,53	273,53
0,02	280,13	295,53	299,93
0,05	302,13	310,20	313,86
0,1	300,66	309,46	305,46
0,5	280,86	288,20	291,13
1	291,13	299,93	298,46

Anexo 4. Dados experimentais que compuseram a figura 15.

Tabela A 5. Atividade de lacases (U.mL⁻¹) em diferentes concentrações utilizando o tampão acetato pH 6.

<i>Concentração (mol.L⁻¹)</i>	<i>Análise 1</i>	<i>Análise 2</i>	<i>Análise 3</i>
0,01	30,41	30,81	30,15
0,05	44,84	44,69	44,78
0,1	43,65	43,28	43,89
0,2	40,26	40,13	40,16
0,5	30,81	33,71	31,75
1	24,58	16,59	25,96

Anexo 5. Dados experimentais que compuseram a figura 16.

Tabela A 6. Atividade de lacases (U.mL⁻¹) em diferentes concentrações utilizando o tampão acetato pH 5.

<i>Concentração (mol.L⁻¹)</i>	<i>Análise 1</i>	<i>Análise 2</i>	<i>Análise 3</i>
0,01	46,10	45,65	46,07
0,05	46,16	46,05	46,07
0,1	44,27	43,04	41,54
0,2	42,53	42,60	42,60
0,5	35,21	36,52	34,37
1	24,58	16,59	25,96

Anexo 6. Dados experimentais que compuseram a figura 17.

Tabela A 7. Termoestabilidade do extrato de lacases a 20°C por 24 h, utilizando ABTS como substrato em tampão acetato, pH 5. Atividade expressa em U.mL⁻¹.

<i>Concentração (mol.L⁻¹)</i>	<i>Análise 1</i>	<i>Análise 2</i>	<i>Análise 3</i>
0	0.005	0.006	0.004
1	337	330	323
2	374	352	345
3	359	345	374
4	345	308	330
12	293	293	315

Tabela A 8. Termoestabilidade do extrato de lacases a 30°C por 24 h, utilizando ABTS como substrato em tampão acetato, pH 5. Atividade expressa em U.mL⁻¹.

<i>Concentração (mol.L⁻¹)</i>	<i>Análise 1</i>	<i>Análise 2</i>	<i>Análise 3</i>
1	359	359	367
2	315	220	257
3	293	264	279
4	257	249	249
12	169	147	147
24	117	59	88

Tabela A 9. Termoestabilidade do extrato de lacases a 40°C por 24 h, utilizando ABTS como substrato em tampão acetato, pH 5. Atividade expressa em U.mL⁻¹.

<i>Concentração (mol.L⁻¹)</i>	<i>Análise 1</i>	<i>Análise 2</i>	<i>Análise 3</i>
1	125	125	103
2	0	37	44
3	22	22	15
4	0	7	15
12	0	0	0
24	0	0	0

Tabela A 10. Termoestabilidade do extrato de lacases a 50°C por 24 h, utilizando ABTS como substrato em tampão acetato, pH 5. Atividade expressa em U.mL⁻¹.

<i>Concentração (mol.L⁻¹)</i>	<i>Análise 1</i>	<i>Análise 2</i>	<i>Análise 3</i>
1	1	0	1
2	0	0	0
3	0	0	0
4	0	0	0
12	0	0	0
24	0	0	0

Anexo 7. Dados experimentais que compuseram as figuras 18 e 19.

Tabela A 11. Atividade de lacases e concentração de ABTS utilizados.

<i>S (μM)</i>	<i>Atividade (U. mL)</i>
22.72727	34.46667
27.27273	41.8
34.09091	50.6
38.63636	55.73333
45.45455	66.73333
56.81818	81.4
90.90909	123.93334
113.63636	145.19999
170.45454	186.26666
227.27273	206.06666
340.90913	261.79998
454.54545	286.00001

Anexo 9. Dados experimentais que compuseram a figura 21.

Tabela A 12. Relação entre a quantidade de proteína imobilizada em PA e os tampões: acetato pH 7 e pH 5 (1); Mcllvaine pH 7 e pH 5 (2) e Mcllvaine pH 7 e acetato pH 5 (3), para dissolução do glutaraldeído e da enzima respectivamente.

<i>Solução tampão</i>	<i>Análise 1</i>	<i>Análise 2</i>	<i>Análise 3</i>
1	1,65	2,56	1,76
2	1,98	2,42	1,63
3	1,40	1,40	1,18

Anexo 10. Dados experimentais que compuseram a figura 23.

Tabela A 13. Quantidade de proteína imobilizada em PSU em função dos tampões: acetato pH 7 e pH 5 (1); Mcllvaine pH 7 e acetato pH 5 (2); Mcllvaine pH 5 e pH 5 (3); Mcllvaine pH 7 e pH 5 (4), para dissolução do glutaraldeído e da enzima respectivamente.

<i>Solução tampão</i>	<i>Análise 1</i>	<i>Análise 2</i>	<i>Análise 3</i>
1	1,65	1,27	1,35
2	1,98	2,40	1,65
3	1,40	1,18	1,79
4	2,38	2,53	2,36

Anexo 11. Dados experimentais que compuseram a figura 24.

Tabela A 14. Quantidade de proteínas imobilizadas em filmes de PA (20°C)

<i>Tempo (h)</i>	<i>Análise 1</i>	<i>Análise 2</i>	<i>Análise 3</i>
2	0,35	0,35	0,39
4	0,31	0,15	0,31
6	0,49	0,46	0,05
8	0,11	0,05	0,45
10	0,44	0,15	0,26
12	0,25	0,29	0,56
24	0,19	0,01	0
48	0,24	0,24	0,37

Tabela A 15. Quantidade de proteínas imobilizadas em filmes de PA (30°C)

<i>Tempo (h)</i>	<i>Análise 1</i>	<i>Análise 2</i>	<i>Análise 3</i>
2	0,24	0,26	0,26
4	0,55	0,64	0,73
6	0,9	0,9	1,01
8	0,89	1,05	1,35
10	1,23	1,31	1,52
12	1,58	1,61	2,02
24	1,73	1,72	2,05
48	1,91	1,94	2,31

Tabela A 16. Quantidade de proteínas imobilizadas em filmes de PA (40°C)

<i>Tempo (h)</i>	<i>Análise 1</i>	<i>Análise 2</i>	<i>Análise 3</i>
2	0,5	0,4	0,66
4	0,93	1,0	0,8
6	1,47	1,18	1,0
8	1,39	1,39	0,92
10	1,44	1,44	1,11
12	1,9	1,94	1,48
24	1,94	1,92	1,46
48	2,07	2,01	1,48

Anexo 12. Dados experimentais que compuseram a figura 25.

Tabela A 17. Quantidade de proteínas imobilizadas em filmes de PSU (20°C)

<i>Tempo (h)</i>	<i>Análise 1</i>	<i>Análise 2</i>	<i>Análise 3</i>
2	0,17	0,40	0,51
4	0,17	0,49	0,49
6	0,21	0,30	0,16
8	0,21	0,33	0,16
10	0,20	0,31	0,16
12	0,21	0,28	0,15
24	0,18	0,28	0,15
48	0,20	0,30	0,17

Tabela A 18. Quantidade de proteínas imobilizadas em filmes de PSU (30°C)

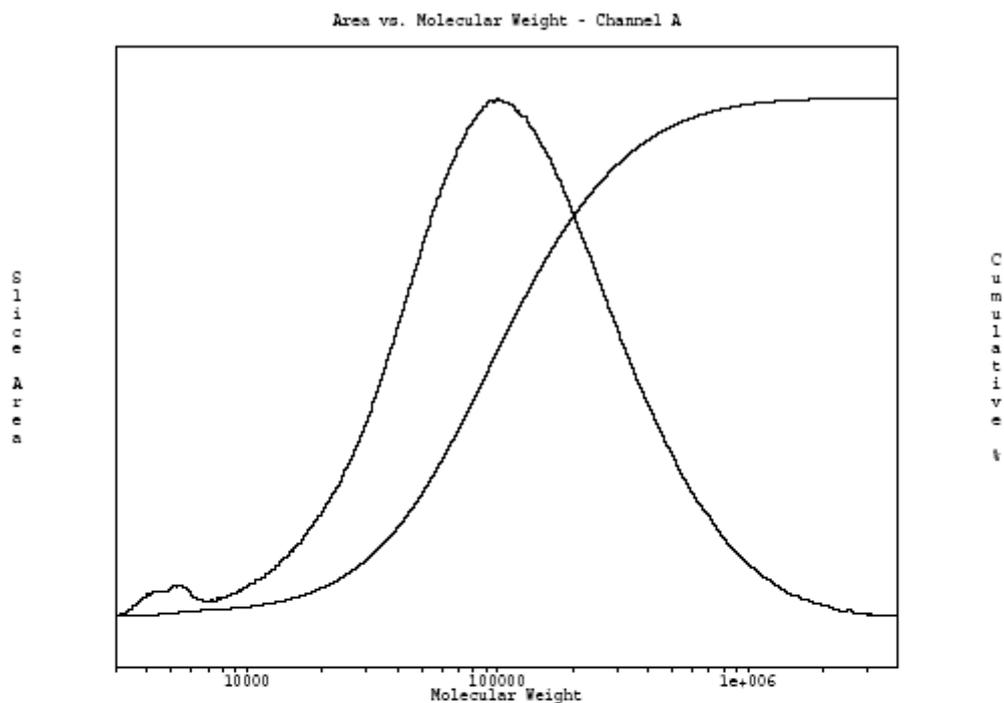
<i>Tempo (h)</i>	<i>Análise 1</i>	<i>Análise 2</i>	<i>Análise 3</i>
2	0,06	0,1	0,17
4	0,35	0,34	0,46
6	0,32	0,36	0,52
8	0,33	0,35	0,52
10	0,32	0,33	0,32
12	0,34	0,35	0,56
24	0,28	0,32	0,51
48	0,29	0,34	0,54

Tabela A 19. Quantidade de proteínas imobilizadas em filmes de PSU (40°C)

<i>Tempo (h)</i>	<i>Análise 1</i>	<i>Análise 2</i>	<i>Análise 3</i>
2	0,28	0,47	0,41
4	0,27	0,26	0,30
6	0,31	0,40	0,35
8	0,33	0,42	0,37
10	0,30	0,40	0,42
12	0,30	0,39	0,37
24	0,27	0,35	0,34
48	0,30	0,40	0,33

Anexo13. Dados experimentais da tabela 4.

Figura A 1 - GPC – Poliamida comercial “pellete”

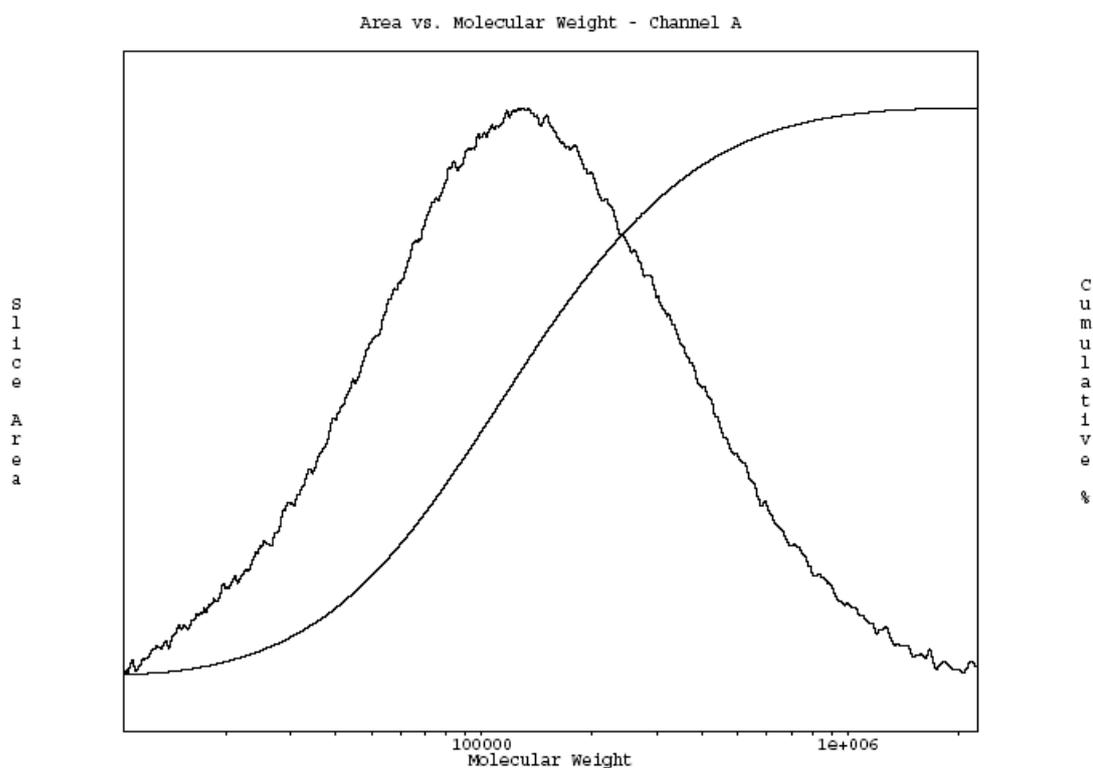


SEC Summary Information - Channel A

Processing Start Time = 28,080 min
 Processing Stop Time = 40,750 min
 Number Of Slices = 761

Weight Average Molecular Weight (Mw) = 161218
 Number Average Molecular Weight (Mn) = 56554
 Z Average Molecular Weight (Mz) = 434639
 Z+1 Average Molecular Weight (Mz+1) = 963536
 Polydispersity Index = 2,851
 Peak Molecular Weight = 99861
 Mz / Mw = 2,696
 Mz+1 / Mw = 5,977

Figura A 3 - GPC – Membrana com glutaraldeído

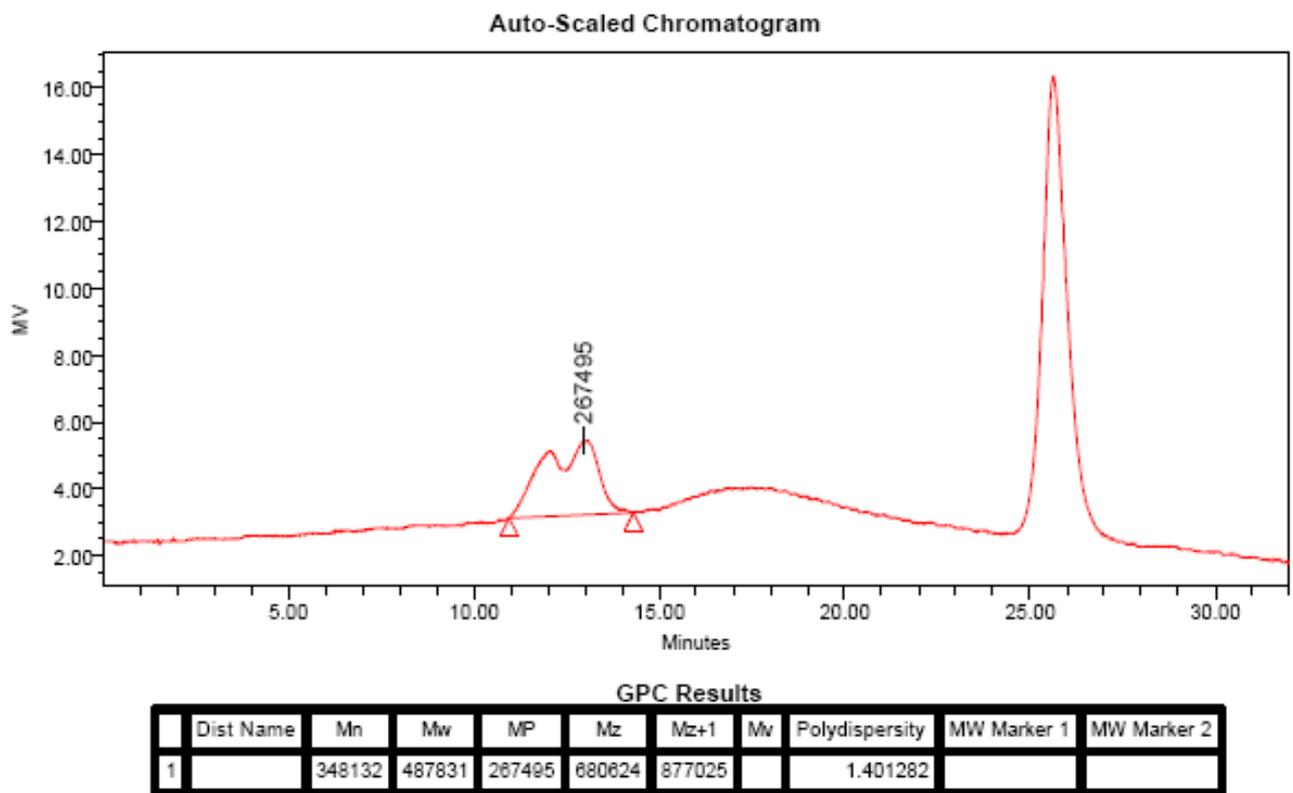


SEC Summary Information - Channel A

Processing Start Time = 28,730 min
 Processing Stop Time = 38,400 min
 Number Of Slices = 581

Weight Average Molecular Weight (Mw) = 182354
 Number Average Molecular Weight (Mn) = 80216
 Z Average Molecular Weight (Mz) = 406712
 Z+1 Average Molecular Weight (Mz+1) = 739397
 Polydispersity Index = 2,273
 Peak Molecular Weight = 128839
 Mz / Mw = 2,230
 Mz+1 / Mw = 4,055

Figura A 4 - GPC – Membrana com solução enzimática



Anexo 14. Dados experimentais que compuseram a figura 26.

Tabela A 20. Relação entre a atividade de lacase imobilizada em filmes de PA, em função do tempo de reação e temperatura do processo (20°C)

<i>Tempo (h)</i>	<i>Análise 1</i>	<i>Análise 2</i>
2	17,72	6,88
4	3,75	3,91
6	10,25	10,25
8	6,47	4,41
10	3,0	3,9
12	7,1	8,6
24	4,13	3,75

Tabela A 21. Relação entre a atividade de lacase imobilizada em filmes de PA, em função do tempo de reação e temperatura do processo (30°C)

<i>Tempo (h)</i>	<i>Análise 1</i>	<i>Análise 2</i>
2	9,8	3,52
4	0,38	7,3
6	18,38	18,19
8	15,25	9,63
10	4,77	15,41
12	8,19	5,08
24	2,27	6,83

Tabela A 22. Relação entre a atividade de lacase imobilizada em filmes de PA, em função do tempo de reação e temperatura do processo (40°C)

<i>Tempo (h)</i>	<i>Análise 1</i>	<i>Análise 2</i>
------------------	------------------	------------------

2	10,36	9,63
4	6,53	5,62
6	13,77	22,95
8	6,88	23,5
10	8,66	8,60
12	6,0	12,0
24	4,0	10,0

Anexo 15. Dados experimentais que compuseram a figura 27.

Tabela A 23. Relação entre a atividade de lacase imobilizada em filmes de PSU, em função do tempo de reação e temperatura do processo (20°C)

<i>Tempo (h)</i>	<i>Análise 1</i>	<i>Análise 2</i>
2	17,72	6,88
4	3,75	3,91
6	9,72	10,25
8	5,83	5,47
10	11,66	4,72
12	7,58	6,0
24	6,52	6,83

Tabela A 24. Relação entre a atividade de lacase imobilizada em filmes de PSU, em função do tempo de reação e temperatura do processo (30°C)

<i>Tempo (h)</i>	<i>Análise 1</i>	<i>Análise 2</i>
2	9,8	3,52
4	6,94	7,3
6	26,38	3,0
8	10,11	7,91
10	11,41	11,55
12	10,05	11,52
24	0	0,38

Tabela A 25. Relação entre a atividade de lacase imobilizada em filmes de PSU, em função do tempo de reação e temperatura do processo (40°C)

<i>Tempo (h)</i>	<i>Análise 1</i>	<i>Análise 2</i>
------------------	------------------	------------------

2	18,69	9,63
4	10,0	9,47
6	22,22	28,50
8	5,19	5,86
10	3,63	9,25
12	7,44	0,86
24	0	0

Anexo 16. Dados experimentais que compuseram a figura 28.

Tabela A 26. Atividade de lacase imobilizada em filmes de PA, em função da concentração de ABTS na reação (175 μ M).

<i>Tempo (h)</i>	<i>Análise 1</i>	<i>Análise 2</i>	<i>Análise 3</i>
0	0	0	0
1	0,69	0,55	0,5
2	2,08	0,71	0,69
3	2,77	0,8	0,52
4	2,63	0,7	0,48
5	2,72	0,53	0
6	2,97	0	0
7	2,52	0	0
8	1,97	0	0
9	1,80	0	0
10	1,30	0	0

Tabela A 27. Atividade de lacase imobilizada em filmes de PA, em função da concentração de ABTS na reação (325 μ M).

<i>Tempo (h)</i>	<i>Análise 1</i>	<i>Análise 2</i>	<i>Análise 3</i>
0	0	0	0
1	1,52	0,41	1,19
2	3,52	1,13	3,16
3	6,55	2,36	5,88
4	9,25	3,47	8,13
5	12,25	4,13	10,33

6	15,69	5,33	13,36
7	17,27	5,22	14,66
8	17,41	3,8	14,50
9	17,41	1,77	13,58
10	16,72	0	11,88

Tabela A 28. Atividade de lacase imobilizada em filmes de PA, em função da concentração de ABTS na reação (375 μ M).

<i>Tempo (h)</i>	<i>Análise 1</i>	<i>Análise 2</i>	<i>Análise 3</i>
0	0	0	0
1	5,05	2,94	5,78
2	9,69	7,33	13,13
3	14,91	12,61	21,77
4	20,08	17,8	29,36
5	25,97	23,66	38,38
6	31,88	29,36	45,63
7	37,66	34,58	51,13
8	42,8	39,05	54,38
9	47,5	42,69	56,52
10	51,88	44,86	56,22

Anexo 17. Dados experimentais que compuseram a figura 29.

Tabela A 29. Atividade de lacase imobilizada em filmes de PSU, em função da concentração de ABTS na reação (175 μ M).

<i>Tempo (h)</i>	<i>Análise 1</i>	<i>Análise 2</i>	<i>Análise 3</i>
0	0,00	0,00	0,00
1	0,69	0,52	0,19
2	1,44	1,13	1,00
3	2,22	2,13	1,91
4	3,44	2,72	3,08
5	4,61	3,50	4,63
6	5,72	4,19	6,02
7	7,58	5,08	7,61
8	9,33	6,00	9,94
9	11,25	6,75	12,22
10	7,58	10,69	14,08

Tabela A 30. Atividade de lacase imobilizada em filmes de PSU, em função da concentração de ABTS na reação (275 μ M).

<i>Tempo (h)</i>	<i>Análise 1</i>	<i>Análise 2</i>	<i>Análise 3</i>
0	0,00	0,00	0,00
1	0,30	0,70	1,19
2	1,02	1,56	2,33
3	1,75	2,40	3,41
4	2,97	3,25	4,88

5	3,88	4,23	5,91
6	4,88	5,23	7,08
7	6,13	7,12	8,41
8	7,75	8,52	10,38
9	9,27	10,40	11,61
10	10,55	11,23	13,38

Tabela A 31. Atividade de lacase imobilizada em filmes de PSU, em função da concentração de ABTS na reação (375 μ M).

<i>Tempo (h)</i>	<i>Análise 1</i>	<i>Análise 2</i>	<i>Análise 3</i>
0	0,00	0,00	0,00
1	0,47	1,16	1,18
2	0,38	0,30	0,36
3	1,75	1,00	1,00
4	2,83	2,19	2,74
5	3,50	2,94	3,46
6	4,36	3,91	4,23
7	5,47	5,33	5,45
8	7,11	7,52	7,23
9	8,80	9,83	8,70
10	10,11	11,88	10,23

Anexo 18. Dados experimentais que compuseram a figura 30.

Tabela A 32. Análise da atividade de lacase imobilizada em PA, utilizando tampão acetato a diferentes pHs

<i>pH</i>	<i>Análise 1</i>	<i>Análise 2</i>	<i>Análise 3</i>
3	0,55	0,80	0,63
4	1,36	1,77	1,57
5	0,44	0,44	0,46
6	0	0,13	0,10
7	0	0,11	0,13

Anexo 19. Dados experimentais que compuseram a figura 31.

Tabela A 33. Análise da atividade de lacase imobilizada em PSU, utilizando tampão acetato a diferentes pHs

<i>pH</i>	<i>Análise 1</i>	<i>Análise 2</i>	<i>Análise 3</i>
3	0,02	0,03	0,02
4	0,006	0	0
5	0,008	0	0
6	0,01	0	0,007

Anexo 20. Dados experimentais que compuseram as figuras 32 e 33.

Tabela A 34. Análise da atividade de lacase imobilizada em PA e PSU, utilizando tampão McIlvaine a diferentes pHs

<i>pH</i>	<i>PA</i>	<i>PSU</i>
3	6,58	3,73
4	5,98	4,38
5	11,38	5,47
6	8,59	3,5
7	1,69	0,14

Anexo 21. Dados experimentais que compuseram a figura 34.

Tabela A 35. Atividade de lacases na solução enzimática e imobilizadas em filmes de PA, em função do tempo de reação.

<i>Tempo (h)</i>	<i>Livre</i>	<i>Imobilizada</i>
1	0	0
2	144,44	6,41
3	126,38	28,58
4	117,72	41,41
5	119,16	64,16
6	115,55	82,83

Anexo 22. Dados experimentais que compuseram a figura 35.

Tabela A 36. Análise da atividade de lacase livre (U.mL⁻¹)

<i>Tempo (h)</i>	<i>Análise 1</i>	<i>Análise 2</i>	<i>Análise 3</i>
0	2,13	5,03	3,67
0,5	11,51	17,87	16,95
1	17,70	18,04	18,01
1,5	18,01	18,00	18,09
2	17,91	17,98	18,06
3	17,84	17,90	17,79
4	18,07	18,04	18,06
5	17,98	18,01	17,95
6	17,97	18,12	18,00
24	18,20	17,94	17,93

Tabela A 37. Análise da atividade de lacase imobilizada em filmes de PSU utilizando tampão acetato pH 3

<i>Tempo (h)</i>	<i>Análise 1</i>	<i>Análise 2</i>	<i>Análise 3</i>
0	0,13	0,05	1,72
0,5	1,36	0,55	2,36
1	1,83	0,75	2,77
1,5	4,05	2,30	4,30
2	5,27	3,11	5,08
3	6,80	4,36	6,30
4	8,27	5,22	8,72
5	9,52	6,41	9,05

6	10,75	8,30	8,63
24	18,52	13,5	11,61

Tabela A 38. Análise da atividade de lacase imobilizada em filmes de PSU utilizando tampão acetato pH 5

<i>Tempo (h)</i>	<i>Análise 1</i>	<i>Análise 2</i>	<i>Análise 3</i>
0	0,22	0	0,12
0,5	0,33	0	0,37
1	0,58	0	0,50
1,5	1,44	1,33	1,84
2	1,55	1,80	1,70
3	0,27	3,25	0,50
4	2,61	3,47	3,02
5	3,91	4,66	4,23
6	3,08	4,97	3,95
24	5,75	9,33	6,35

Anexo 23. Dados experimentais que compuseram a figura 36.

Tabela A 39. Atividade de lacases imobilizadas em filmes de PA em função do tempo de reação

<i>Tempo (h)</i>	<i>Análise 1</i>	<i>Análise 2</i>	<i>Análise 3</i>
1	3,30	3,60	6,27
2	5,88	5,50	10,77
3	7,97	7,05	13,61
4	10,02	10	19,41
5	11,63	11,74	24,80
6	12,94	11,93	29,11
7	14,33	13,63	32,88
8	16,16	16,15	36,33
9	17,69	17,69	39,22
10	19	18,85	40,97

Tabela A 40. Atividade de lacases imobilizadas em filmes de PSU em função do tempo de reação

<i>Tempo (h)</i>	<i>Análise 1</i>	<i>Análise 2</i>	<i>Análise 3</i>
1	0,30	0,54	1,19
2	1,02	1,85	2,33
3	1,75	2,06	3,41
4	2,97	2,91	4,88
5	3,88	3,95	5,91
6	4,88	4,32	7,08
7	6,13	6,53	8,41
8	7,75	7,96	10,38

9	9,27	9,20	11,61
10	10,56	10,55	13,38

Anexo 24. Dados experimentais que compuseram a figura 37.

Tabela A 41. Reutilização dos sistema PA/lacase. Em cada utilização o tempo de reação com ABTS foi de trinta minutos, à temperatura de 40°C, com agitação.

<i>Utilizações</i>	<i>Análise 1</i>	<i>Análise 2</i>	<i>Análise 3</i>
Inicial	0,09	0,09	0,08
1	0,08	0,08	0,08
2	0,06	0,06	0,06
3	0,05	0,06	0,05
4	0,06	0,06	0,06

Anexo 25. Dados experimentais que compuseram a figura 38.

Tabela A 42. Reutilização dos sistema PSU/lacase. Em cada utilização o tempo de reação com ABTS foi de trinta minutos, à temperatura de 40°C, com agitação.

<i>Utilizações</i>	<i>Análise 1</i>	<i>Análise 2</i>	<i>Análise 3</i>
Inicial	5,13	5,38	5,91
1	2,33	2,05	3,3
2	1,75	2,63	2,58
3	1,83	2,91	0,66
4	1,36	2,22	0,94
5	3,2	2,41	3,22

Anexo 26. Dados experimentais da figura 41.

Tabela A 43. Descoloração do corante Reactive Blue 220 por caldo enzimático de lacases em função do tempo (25°C ±2°C) a 610nm.

<i>Tempo (h)</i>	<i>50mg.L⁻¹</i>	<i>25 mg.L⁻¹</i>
0	0,608	0,279
1	0,321	0,158
2	0,192	0,109

3	0,12	0,081
4	0,094	0,057
5	0,028	0,025

Anexo 27. Dados experimentais que compuseram a figura 44.

Tabela A 44. Descoloração do corante Reactive Blue 220 25 mg.L⁻¹ PA imobilizada (610nm)

<i>Tempo (h)</i>	<i>Análise 1</i>	<i>Análise 2</i>	<i>Análise 3</i>
0	0,27	0,259	0,31
1	0,214	0,186	0,247
2	0,156	0,118	0,178
3	0,112	0,076	0,123
4	0,096	0,066	0,102
5	0,083	0,057	0,086
6	0,078	0,053	0,08
7	0,07	0,049	0,07
24	0,049	0,033	0,037

Tabela A 45. Descoloração do corante Reactive Blue 220 25 mg.L⁻¹ PA (610nm)

<i>Tempo (h)</i>	<i>Análise 1</i>	<i>Análise 2</i>	<i>Análise 3</i>
0	0,44	0,451	0,462
1	0,436	0,442	0,457
2	0,429	0,432	0,45
3	0,367	0,362	0,384
4	0,336	0,333	0,353
5	0,33	0,316	0,35
6	0,323	0,298	0,348
7	0,32	0,29	0,343
24	0,279	0,189	0,177

Tabela A 46. Descoloração do corante Reactive Blue 220 25 mg.L⁻¹ enzima livre (610nm)

<i>Tempo (h)</i>	<i>Análise 1</i>	<i>Análise 2</i>	<i>Análise 3</i>
0	0,142	0,151	0,159
1	0,059	0,071	0,072
2	0,024	0,028	0,03
3	0,026	0,028	0,031
4	0,032	0,024	0,022
5	0,033	0,024	0,024
6	0,033	0,023	0,023
7	0,031	0,023	0,022
24	0,032	0,021	0,022

Anexo 28. Dados experimentais que compuseram a figura 45.

Tabela A 47. Descoloração do corante RBBR com Reactive Blue 220 25 mg.L⁻¹ PA imobilizada (610nm)

<i>Tempo (h)</i>	<i>Análise 1</i>	<i>Análise 2</i>	<i>Análise 3</i>
0	0,329	0,345	0,332
1	0,274	0,233	0,239
2	0,172	0,181	0,167
3	0,147	0,151	0,116
4	0,142	0,133	0,1
5	0,134	0,125	0,087
6	0,127	0,114	0,079
7	0,142	0,121	0,083
24	0,101	0,07	0,07

Tabela A 48. Descoloração do corante RBBR com Reactive Blue 220 25 mg.L⁻¹ PA (610nm)

<i>Tempo (h)</i>	<i>Análise 1</i>	<i>Análise 2</i>	<i>Análise 3</i>
0	0,316	0,327	0,317
1	0,31	0,319	0,312
2	0,305	0,317	0,308
3	0,25	0,226	0,243
4	0,222	0,178	0,205
5	0,219	0,175	0,203
6	0,214	0,169	0,188
7	0,212	0,165	0,184
24	0,156	0,129	0,077

Tabela A 49. Descoloração do corante RBBR com Reactive Blue 220 25 mg.L⁻¹ enzima livre (610nm)

<i>Tempo (h)</i>	<i>Análise 1</i>	<i>Análise 2</i>	<i>Análise 3</i>
0	0,344	0,341	0,346
1	0,152	0,201	0,205
2	0,149	0,137	0,138
3	0,113	0,129	0,156
4	0,114	0,134	0,16
5	0,164	0,136	0,124
6	0,141	0,163	0,118
7	0,108	0,126	0,152
24	0,087	0,102	0,131

Anexo 29. Dados experimentais que compuseram a figura 46.

Tabela A 50. Descoloração do corante RBBR com Reactive Blue 220 25 mg.L⁻¹ com PSU imobilizada a pH 3 (610nm)

<i>Tempo (h)</i>	<i>Análise 1</i>	<i>Análise 2</i>	<i>Análise 3</i>
0	0,338	0,357	0,343
1	0,335	0,342	0,334
2	0,34	0,349	0,341
3	0,336	0,348	0,338
4	0,342	0,355	0,346

5	0,35	0,365	0,352
6	0,358	0,373	0,36
7	0,362	0,378	0,369
24	0,411	0,424	0,42

Tabela A 51. Descoloração do corante RBBR com Reactive Blue 220 25 mg.L⁻¹ com PSU imobilizada a pH 5 (610nm)

<i>Tempo (h)</i>	<i>Análise 1</i>	<i>Análise 2</i>	<i>Análise 3</i>
0	0,342	0,347	0,341
1	0,357	0,342	0,349
2	0,356	0,35	0,366
3	0,357	0,348	0,37
4	0,364	0,355	0,371
5	0,372	0,362	0,378
6	0,382	0,375	0,395
7	0,388	0,387	0,408
24	0,476	0,444	0,474

Tabela A 52. Descoloração do corante RBBR com Reactive Blue 220 25 mg.L⁻¹ com PA imobilizada a pH 3 (610nm)

<i>Tempo (h)</i>	<i>Análise 1</i>	<i>Análise 2</i>	<i>Análise 3</i>
0	0,331	0,32	0,331
1	0,268	0,23	0,297
2	0,258	0,188	0,255
3	0,251	0,165	0,234
4	0,236	0,153	0,228
5	0,228	0,147	0,219
6	0,221	0,143	0,218
7	0,214	0,146	0,213
24	0,156	0,134	0,161

Tabela A 53. Descoloração do corante RBBR com Reactive Blue 220 25 mg.L⁻¹ com PA imobilizada a pH 5 (610nm)

<i>Tempo (h)</i>	<i>Análise 1</i>	<i>Análise 2</i>	<i>Análise 3</i>
0	0,329	0,345	0,332
1	0,274	0,233	0,239
2	0,172	0,181	0,167
3	0,147	0,151	0,116
4	0,142	0,133	0,1

5	0,134	0,125	0,087
6	0,127	0,114	0,079
7	0,142	0,121	0,083
24	0,101	0,07	0,07
