



UNIVERSIDADE DE CAXIAS DO SUL
ÁREA DO CONHECIMENTO DE CIÊNCIAS DA VIDA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**CONCENTRAÇÃO, FORMULAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE
EXTRATOS ENZIMÁTICOS DE LACASES PRODUZIDAS POR
Pleurotus sajor-caju PS-2001 EM PROCESSO SUBMERSO**

SIMONE ZACCARIA

Orientador: Prof. Dr. Aldo José Pinheiro Dillon

Coorientadora: Dra. Fernanda Bettin

Caxias do Sul

2017

SIMONE ZACCARIA

**CONCENTRAÇÃO, FORMULAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE
EXTRATOS ENZIMÁTICOS DE LACASES PRODUZIDAS POR
Pleurotus sajor-caju PS-2001 EM PROCESSO SUBMERSO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul, visando à obtenção de grau de Mestre em Biotecnologia

Orientador: Prof. Dr. Aldo José Pinheiro Dillon
Coorientadora: Dr^a. Fernanda Bettin

Caxias do Sul

2017

Z13c Zaccaria, Simone

Concentração, formulação e caracterização de extratos enzimáticos de lacases produzidas por *Pleurotus sajor-caju* PS-2001 em processo submerso / Simone Zaccaria. – 2017.

113 f.: il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de Caxias do Sul, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, 2017.

Orientação: Aldo José Pinheiro Dillon.

Coorientação: Fernanda Bettin.

1. Lacases. 2. Processos de separação por membranas. 3. Concentração. 4. Formulação. 5. Descoloração de corantes. I. Dillon, Aldo José Pinheiro, orient. II. Bettin, Fernanda, coorient. III. Título.

SIMONE ZACCARIA

CONCENTRAÇÃO, FORMULAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE
EXTRATOS ENZIMÁTICOS DE LACASES PRODUZIDAS *POR Pleurotus*
sajor-caju PS-2001 EM PROCESSO SUBMERSO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul, visando à obtenção do título de Mestra em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Aldo José Pinheiro Dillon

Coorientadora: Dra. Fernanda Bettin

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 30 DE OUTUBRO DE 2017.

Orientador: Prof. Dr. Aldo José Pinheiro Dillon

Coorientadora: Dra. Fernanda Bettin

Prof. Dra. Aneli de Melo Barbosa Dekker

Prof. Dr. Marcio Antonio Mazutti

Prof. Dr. Mauricio Moura da Silveira

*"A estrada em frente vai seguindo,
deixando a porta onde começa.
Agora longe já vai indo,
devo seguir nada me impeça,
em seu encalço vão meus pés,
até a junção com a Grande Estrada,
de muitas sendas através.
Que vem depois? Não sei mais nada"*

J. R. R. Tolkien, O Senhor dos Anéis.

Dedico este trabalho aos meus pais Nair e Denir, e aos meus irmãos Cedenir, Cedinei, Silvane e Edilso, por serem meu porto seguro e fonte de inspiração e força. Dedico também aos meus amigos, por estarem ao meu lado em todos os momentos desta caminhada.

AGRADECIMENTOS

A todos que me apoiaram durante a realização deste trabalho, meus sinceros agradecimentos.

- Primeiramente, agradeço a Deus e a Nossa Senhora de Lourdes, por guiarem meus passos e iluminarem meu caminho, orientando-me em qual direção seguir.

- Agradeço ao meu orientador, Prof. Dr. Aldo José Pinheiro Dillon, pela confiança em mim depositada, pelo incentivo e pelo amor que demonstra pela pesquisa, que nos contagia e faz buscar cada vez mais conhecimento.

- Agradeço à minha coorientadora, Dra. Fernanda Bettin, pela paciência, confiança, disponibilidade, ensinamentos, amizade, e por sempre acreditar em mim nos momentos em que duvidei de mim mesma. Para mim, tu és um exemplo a ser seguido.

- Aos professores da banca de acompanhamento, Prof. Dr. Mauricio Moura da Silveira, Profa. Dra. Patrícia Poletto e Profa. Dra. Mara Zeni Andrade, bem como aos membros da banca de avaliação, Profa. Dra. Aneli de Melo Barbosa Dekker e Prof. Dr. Marcio A. Mazutti pela disponibilidade em avaliar este trabalho.

- A todos os colegas do Laboratório de Enzimas e Biomassas, por todos os momentos compartilhados e pela troca de conhecimentos.

- À Universidade de Caxias do Sul e aos órgãos de fomento CAPES e FAPERGS.

- Um agradecimento especial à Nicole Amanda Boff, bolsista de iniciação científica, não só pela ajuda inestimável na realização das diversas atividades deste trabalho, mas principalmente pela amizade que cresceu e se fortaleceu neste período. Sem a tua ajuda e companheirismo esta realização não teria sido possível.

- Agradeço imensamente ao pessoal da “salinha”, Camila Cantele, Júlia M. dos Santos, Rochele S. Conceição, Matheus M. Froes e Eduardo E. Reis. Obrigada por estarem ao meu lado em todos os momentos, compartilhando gargalhadas, discutindo os mais variados temas, me incentivando e consolando nas horas difíceis. Vocês são incríveis e muito especiais.

- Agradeço aos meus pais, Nair e Denir, meus maiores exemplos e meus heróis, por me cercarem de carinho e bons princípios. E aos meus irmãos Edilso, Cedenir, Cedinei e Silvane, pelo companheirismo e apoio incondicional, durante toda a minha vida. Sem vocês eu não estaria concluindo mais esta etapa de minha vida.

- À Claudia Bruscato, pela amizade sincera, compreensão, conselhos e “puxões de orelha”. Pelos cafés de madrugada, regados a muitas gargalhadas, teorias malucas e até mesmo algumas lágrimas. Obrigada por ser minha família longe de casa e por compartilhar tantos momentos bons e também os ruins, afinal é para isso que existem amigos. Você também faz parte desta conquista.

- Agradeço a todos os demais amigos, mas em especial à Rubiane Cortelini, Laís Bavaresco, Cátia Eliane, Patrícia Marciolin e Sandra Magnagnin, a turma da engenharia. Obrigada por sempre estarem ao meu lado e por sempre torcerem que o mestrado com os “bichinhos” desse certo.

Enfim, meu imenso agradecimento a todos por mais essa conquista.

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO	17
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
2.1	BASIDIOMICETOS	19
2.1.1	Gênero <i>Pleurotus</i>.....	19
2.2	ENZIMAS.....	20
2.2.1	Fenol-oxidases	20
2.2.1.1	Lacases.....	22
2.3	PROCESSOS DE PRODUÇÃO DE LACASES	23
2.4	PROCESSOS DE RECUPERAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE LACASES	25
2.4.1	Emprego de carvão ativado	25
2.4.2	Processos de separação por membranas	26
2.4.2.1	Microfiltração e ultrafiltração.....	28
2.5	ESTABILIDADE DE EXTRATOS ENZIMÁTICOS	29
2.6	POTENCIAL DE APLICAÇÃO DE LACASES.....	32
3	MATERIAIS E MÉTODOS	35
3.1	MICROORGANISMO E MANUTENÇÃO DA LINHAGEM.....	35
3.2	PREPARAÇÃO DO CALDO ENZIMÁTICO	35
3.3	PROCEDIMENTOS ANALÍTICOS.....	36
3.3.1	Determinação da atividade de lacases (Lac)	36
3.3.2	Determinação da atividade de peroxidases totais (Per)	37
3.3.3	Determinação da atividade de lignina peroxidases (LiP).....	37
3.3.4	Determinação da atividade de oxidases do álcool veratrílico (OAV).....	38
3.3.5	Determinação da atividade de manganês peroxidases (MnP)	38
3.3.6	Determinação da atividade proteolítica.....	38
3.3.7	Determinação de proteínas solúveis totais.....	39
3.3.8	Espectrofotometria de varredura para o caldo enzimático	39
3.3.9	Determinação da viscosidade do caldo enzimático	40
3.3.10	Determinação da turbidez do caldo enzimático	40
3.4	CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE LACASES E PROTEÍNAS	40
3.4.1	Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)	40
3.5	TESTES DE CARACTERIZAÇÃO DAS MEMBRANAS	41
3.5.1	Compactação da membrana	41

3.5.2	Permeabilidade da membrana.....	41
3.5.3	Queda e recuperação do fluxo de permeado	41
3.6	PURIFICAÇÃO PARCIAL E CONCENTRAÇÃO DE LACASES	42
3.6.1	Pré-tratamento do caldo enzimático com carvão ativado.....	42
3.6.2	Microfiltração do caldo enzimático.....	42
3.6.3	Ultrafiltração do caldo enzimático	43
3.7	FORMULAÇÃO DE EXTRATOS ENZIMÁTICOS DE LACASES	46
3.7.1	Testes de conservação de atividade enzimática.....	46
3.7.2	Testes de termoestabilidade	46
3.7.3	Testes de estabilidade frente ao pH.....	47
3.7.4	Testes de estabilidade frente a íons	47
3.8	TESTES DE DESCOLORAÇÃO DE CORANTES	47
3.9	ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS	50
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	51
4.1	PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DAS LACASES	51
4.2	AVALIAÇÃO DO PRÉ-TRATAMENTO DO EXTRATO ENZIMÁTICO DE LACASES UTILIZANDO CARVÃO ATIVADO	52
4.3	AVALIAÇÃO DO PRÉ-TRATAMENTO DO EXTRATO ENZIMÁTICO DE LACASES UTILIZANDO MEMBRANA DE MICROFILTRAÇÃO.....	56
4.3.1	Caracterização da membrana de microfiltração	56
4.3.2	Determinação da pressão de operação para membrana de microfiltração ...	58
4.4	AVALIAÇÃO DA PRESSÃO A SER UTILIZADA NA CONCENTRAÇÃO DE LACASES POR MEIO DE ULTRAFILTRAÇÃO	61
4.4.1	Caracterização da membrana de ultrafiltração.....	61
4.4.2	Determinação da pressão de operação para membrana de ultrafiltração	63
4.5	DEFINIÇÃO DO PROTOCOLO A SER UTILIZADO NA CONCENTRAÇÃO DE LACASES	65
4.5.1	Influência dos protocolos de concentração no fluxo de permeado.....	65
4.5.2	Influência dos protocolos na concentração de lacases e de proteínas durante a ultrafiltração	68
4.6	CONCENTRAÇÃO E FORMULAÇÃO DO EXTRATO ENZIMÁTICO DE LACASES	70
4.7	AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DO EXTRATO ENZIMÁTICO DE LACASES	73
4.7.1	Estabilidade ao longo do tempo.....	73
4.7.2	Estabilidade e atividade de lacases frente à temperatura.....	83
4.7.3	Estabilidade e atividade de lacases frente ao pH	86

4.7.4	Estabilidade e atividade de lacases frente a íons.....	90
4.8	AVALIAÇÃO DA DESCOLORAÇÃO DE CORANTES UTILIZANDO EXTRATO ENZIMÁTICO CONCENTRADO DE LACASES	95
4.8.1	Influência da carga enzimática de lacases	95
4.8.2	Descoloração de corantes utilizando o mediador redox hidroxibenzotriazol (HBT)	98
4.8.3	Descoloração de corantes utilizando o mediador redox siringaldazina (SYR)	102
5	CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS.....	106
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	108

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Massas moleculares de algumas lacases fúngicas purificadas.....	22
Quadro 2. Processos de separação por membranas.....	28
Quadro 3. Corantes e misturas utilizados nos testes de descoloração com suas respectivas classes cromóforas e comprimento de onda de leitura.....	49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Resultados obtidos com a utilização de 5 g.L ⁻¹ de carvão ativado (CA) durante quinze minutos sobre o extrato enzimático bruto produzido por <i>Pleurotus sajor-caju</i> PS-2001.....	55
Tabela 2. Principais resultados obtidos na corrente de permeado após processo de microfiltração (MF) em membrana polimérica sob diferentes pressões de operação.....	58
Tabela 3. Principais resultados obtidos na corrente de concentrado após processo de ultrafiltração em membrana polimérica sob diferentes pressões de operação.....	63
Tabela 4. Valores de fluxo de permeado e recuperação de fluxo para as membranas de ultrafiltração e microfiltração durante a aplicação dos diferentes protocolos de concentração do extrato enzimático de <i>Pleurotus sajor-caju</i> PS-2001.....	66
Tabela 5. Resumo dos principais resultados obtidos para os diferentes protocolos aplicados na concentração de lacases produzidas por <i>Pleurotus sajor-caju</i> PS-2001.....	68
Tabela 6. Resumo dos principais resultados obtidos na corrente de permeado durante o processo de pré-tratamento por microfiltração de lacases produzidas por <i>Pleurotus sajor-caju</i> PS-2001.....	71
Tabela 7. Resumo dos principais resultados obtidos durante o processo de concentração por ultrafiltração de lacases produzidas por <i>Pleurotus sajor-caju</i> PS-2001 e pré-tratadas por microfiltração.....	72
Tabela 8. Atividade relativa de lacases após 40 e 52 semanas de armazenamento em diferentes concentrações de glicerol, na presença ou na ausência de KCl, em temperaturas de 4°C e 28°C.....	77
Tabela 9. Picos de atividade observados para as enzimas lignina peroxidase, oxidases do álcool veratrílico, manganês peroxidases e peroxidases totais em formulações contendo diferentes concentrações de glicerol, em presença ou ausência de KCl, nas temperaturas de 4°C e 28°C.....	79
Tabela 10. Percentual de descoloração de corantes das classes antraquinona, azo e trifenilmetano em presença de diferentes concentrações de lacases.....	96
Tabela 11. Percentual de descoloração de corantes das classes antraquinona, azo e trifenilmetano em presença de 75 e 150 U.mL ⁻¹ de lacases e de diferentes concentrações do mediador redox hidroxibenzotriazol (HBT).....	100
Tabela 12. Percentual de descoloração de corantes das classes antraquinona, azo e trifenilmetano em presença de 75 e 150 U.mL ⁻¹ de lacases e de diferentes concentrações do mediador redox siringaldazina (SYR).....	103

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Representação esquemática do ciclo catalítico de lacases para oxidação de substratos (a) sem a presença de medidor e (b) na presença de mediador redox (Riva, 2006).....21
- Figura 2.** (a) Cartucho filtrante de microfiltração (PAM Membranas, Brasil) e (b) configuração do modo de operação da membrana de fibra oca.....43
- Figura 3.** Representação esquemática dos sistemas de separação por membranas utilizados nos processos de concentração de lacases..... 43
- Figura 4.** (a) Cartucho filtrante de ultrafiltração (MILLIPORE, EUA) e (b) configuração do modo de operação da membrana espiral.....44
- Figura 5.** Protocolos propostos para a concentração dos extratos enzimáticos de lacases.....44
- Figura 6.** Gel de atividade e eletroforese em gel de poli(acrilamida) de lacases produzidas por *Pleurotus sajor-caju* PS-2001 em processo submerso na presença de diferentes indutores enzimáticos. (AB) ácido benzoico, (AG) ácido gálico, (Fe) fenol, (Xy) xilidina e (M) marcador molecular.....52
- Figura 7.** Atividade de lacases (a) e concentração de proteínas solúveis totais (b) em função do tempo durante tratamentos com carvão ativado de um extrato enzimático bruto produzido por *Pleurotus sajor-caju* PS-2001 em processo submerso. (■) 2 g.L⁻¹, (▲) 5 g.L⁻¹, (▼) 10 g.L⁻¹, (◆) 20 g.L⁻¹, (●) 30 g.L⁻¹, (□) 40 g.L⁻¹, (Δ) 50 g.L⁻¹, (▽) 60 g.L⁻¹, (◇) 70 g.L⁻¹, (○) 80 g.L⁻¹, (x) 90 g.L⁻¹ e (I) 100 g.L⁻¹ de carvão ativado.....53
- Figura 8.** Variação do pH (a), absorvância (b) e turbidez (c) em função do tempo durante tratamentos com carvão ativado de um extrato enzimático bruto produzido por *Pleurotus sajor-caju* PS-2001 em processo submerso. (■) 2 g.L⁻¹, (▲) 5 g.L⁻¹, (▼) 10 g.L⁻¹, (◆) 20 g.L⁻¹, (●) 30 g.L⁻¹, (□) 40 g.L⁻¹, (Δ) 50 g.L⁻¹, (▽) 60 g.L⁻¹, (◇) 70 g.L⁻¹, (○) 80 g.L⁻¹, (x) 90 g.L⁻¹ e (I) 100 g.L⁻¹ de carvão ativado.....54
- Figura 9.** Compactação da membrana de microfiltração sob a pressão de operação de 4 bar.....57
- Figura 10.** Testes de permeabilidade hidráulica (a) e permeabilidade ao caldo (b) da membrana de microfiltração sob diversas pressões de operação.....58
- Figura 11.** Atividade total de lacases (a) e total de proteínas (b) presentes no extrato inicial bruto (I), permeado (P) e concentrado (C) em processo de microfiltração em membrana polimérica em diferentes pressões de operação.....60
- Figura 12.** Compactação da membrana de ultrafiltração sob a pressão de operação de 4 bar.....62
- Figura 13.** Testes de permeabilidade hidráulica (a) e permeabilidade ao caldo (b) da membrana de ultrafiltração sob diferentes pressões de operação.....63

- Figura 14.** Atividade total de lacases (a) e total de proteínas (b) presentes no extrato inicial bruto (I), permeado (P) e concentrado (C) em processo de ultrafiltração em membrana polimérica em diferentes pressões de operação.....64
- Figura 15.** Total de proteínas presentes no extrato inicial bruto (I), extrato pré-tratado com carvão ativado (CA), permeado da microfiltração (PMF), permeado da ultrafiltração (PUF), concentrado da microfiltração (CMF) e concentrado da ultrafiltração (CUF) na aplicação dos protocolos de concentração do extrato enzimático de *Pleurotus sajor-caju* PS-2001.....69
- Figura 16.** Atividade relativa de lacases em formulações contendo diferentes concentrações de glicerol em função do tempo, sob diferentes condições de armazenamento, por um período de 52 semanas. (●) 4°C em presença de KCl, (○) 4°C sem KCl, (▲) 28°C em presença de KCl e (Δ) 28°C sem KCl.....74
- Figura 17.** Atividade relativa de lacases das melhores condições selecionadas para a manutenção da estabilidade enzimática após 40 (a) e 52 (b) semanas de armazenamento em diferentes concentrações de glicerol, presença ou ausência de KCl, na temperatura de 4°C, onde os valores percentuais referem-se à concentração de glicerol em (m/v) e letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa em nível de significância de 5% ($p < 0,05$), para análises em triplicata.....78
- Figura 18.** Concentração de proteínas solúveis totais em formulações contendo diferentes concentrações de glicerol em função do tempo, sob diferentes condições de armazenamento, por um período de 52 semanas. (●) 4°C em presença de KCl, (○) 4°C sem KCl, (▲) 28°C em presença de KCl e (Δ) 28°C sem KCl.....80
- Figura 19.** Atividade de proteases em formulações contendo diferentes concentrações de glicerol em função do tempo, sob diferentes condições de armazenamento, por um período de 52 semanas. (●) 4°C em presença de KCl, (○) 4°C sem KCl, (▲) 28°C em presença de KCl e (Δ) 28°C sem KCl.....82
- Figura 20.** Termoestabilidade do extrato concentrado (a) e formulado (b) de lacases em função do tempo, sob diferentes temperaturas, durante um período de 96 horas. (●) 25°C, (■) 30°C, (▲) 35°C, (○) 40°C, (□) 45°C e (Δ) 50°C.....83
- Figura 21.** Atividade de lacases dos extratos concentrado (●) e formulado com 30% (m/v) de glicerol (○) em função da temperatura.....85
- Figura 22.** Atividade relativa dos extratos concentrado (●) e formulado (○) de lacases em função do tempo, sob diferentes valores de pH em temperatura de 25°C por um período de 96 horas.....87
- Figura 23.** Atividade de lacases dos extratos concentrado (●) e formulado com 30% (m/v) de glicerol (○) em função do pH.....89
- Figura 24.** Atividade relativa dos extratos concentrado (●) e formulado (○) de lacases em função do tempo, em meios contendo diferentes íons, em temperatura de 25°C, por um período de 96 horas.....92
- Figura 25.** Atividade relativa de lacases dos extratos concentrado (C) e formulado com 30% (m/v) de glicerol (F) em meios contendo diferentes íons.....94

RESUMO

No presente trabalho, a concentração de lacases produzidas por *Pleurotus sajor-caju* PS-2001 em processo submerso foi estudada utilizando membrana de ultrafiltração (UF), bem como o uso de pré-tratamentos por carvão ativado (CA) e microfiltração (MF). Adicionalmente, a formulação do extrato concentrado através da adição de glicerol e KCl foi avaliada, a fim de determinar a conservação da atividade enzimática ao longo do tempo. A termoestabilidade, estabilidade frente ao pH e em presença de íons dos extratos concentrados e formulados também foi avaliada, assim como a utilização do extrato concentrado na descoloração de corantes. Com respeito ao pré-tratamento com CA, foram avaliadas diferentes concentrações, variando de 2 a 100 g.L⁻¹, e diferentes tempos de processo, de 15 a 120 minutos. A utilização de baixas concentrações de carvão, como 5 g.L⁻¹, resultou em incrementos na atividade de lacases, passando de 26 U.mL⁻¹ para cerca de 40 U.mL⁻¹ após 15 minutos de reação. Quanto ao pré-tratamento por MF e a concentração por UF, após testes realizados em pressões variando entre 3,5 e 0,5 bar, a pressão intermediária de 2,5 bar foi considerada a mais indicada para ambos os processos, sendo que os percentuais de recuperação da enzima na UF foram superiores a 100%, possivelmente devido à retirada de compostos inibitórios do meio, o que aumentou a atividade enzimática. A concentração do extrato enzimático por UF sem qualquer tratamento prévio resultou em maiores percentuais de recuperação da enzima, com 141%, porém, em baixo fluxo de permeado (20 L.m⁻².h⁻¹) e maiores tempos de processo. Por outro lado, o protocolo de operação com a utilização de MF como pré-tratamento resultou em recuperação moderadamente inferior, com 109%, entretanto, o fluxo de permeado foi superior (24 L.m⁻².h⁻¹), bem como a recuperação do fluxo na membrana, e o tempo de processo foi reduzido, o que demonstra a importância da utilização de pré-tratamentos em processos de UF. Previamente à preparação das formulações enzimáticas, 109,9 L de extrato bruto foram concentrados 60 vezes por UF, separados em sete lotes, com recuperação enzimática média de 183% e fator de concentração de atividade de 102 vezes, resultando em um extrato com cerca de 3033 U.mL⁻¹ de lacases. Este extrato concentrado foi formulado utilizando sete diferentes concentrações de glicerol, 0 (condição controle), 10, 15, 20, 30, 40 e 50% (m/v), em presença ou ausência de 2% (m/v) de KCl, e mantido em duas diferentes temperaturas, de 4 e 28°C, sendo avaliado por 52 semanas quanto à conservação da atividade de lacases. A adição de glicerol ao extrato provocou um aumento na atividade de lacases, sendo que, na temperatura de 28°C, este incremento manteve-se por algumas semanas. A temperatura de 4°C promoveu manutenção da atividade enzimática por períodos de tempo mais longos, sendo que a condição contendo 30% (m/v) de glicerol apresentou a maior estabilidade durante o período, com atividade relativa oscilando próxima a 100%, encerrando com 88% da atividade e sendo utilizada para os demais testes. Os testes de termoestabilidade mostraram que a adição de glicerol ao extrato concentrado não promoveu proteção à enzima, enquanto os testes de estabilidade frente ao pH e em presença de íons apresentaram estabilidade superior para o extrato formulado com 30% (m/v) de glicerol. A adição de glicerol também resultou em aumentos na atividade perante essas condições, com destaque para a atividade da enzima em valores de pH mais ácidos, com incrementos superiores a 60% em relação ao pH 5. Quanto aos testes de descoloração de corantes, a utilização de 150 U.mL⁻¹ de lacases em presença de 0,3 µmol.L⁻¹ do mediador redox siringaldazina resultou em percentuais de descoloração médios superiores quando comparada às demais condições testadas, sendo a mais indicada para a utilização em processos de remoção de cor.

Palavras-chave: lacases; microfiltração; ultrafiltração; concentração; formulação; estabilidade; descoloração de corantes.

ABSTRACT

In the present work, the concentration of laccases produced by *Pleurotus sajor-caju* PS-2001 in submerged process was studied by using ultrafiltration membrane (UF), as well as pre-treatments with activated charcoal (AC) and by microfiltration (MF). Additionally, the formulation of the concentrated extract through the addition of glycerol and KCl was evaluated in order to determine the conservation of the enzymatic activity over time. The thermostability, pH and ions stability of the concentrated and formulated extracts were also evaluated, as well as the use of the concentrated extract in the discoloration of dyes. With respect to pre-treatment with AC, different concentrations ranging from 2 to 100 g.L⁻¹ and different process times were evaluated from 15 to 120 minutes. The use of low concentrations of charcoal, such as 5 g.L⁻¹, resulted in increases in laccase activity, from 26 U.mL⁻¹ to about 40 U.mL⁻¹ after 15 minutes of reaction. Regarding the pre-treatment by MF and the concentration by UF, after tests carried out in pressures ranging from 3.5 to 0.5 bar, the intermediate pressure of 2.5 bar was considered the most suitable for both processes, and the percentages of recovery of the enzyme in the UF were higher than 100%, possibly due to the withdrawal of inhibitory compounds from the medium, which increased the enzymatic activity. The concentration of the enzyme extract by UF without any previous treatment resulted in a higher percentages of enzyme recovery, with 141%, but with a low permeate flux (20 L.m⁻².h⁻¹) and longer process times. On the other hand, the protocol of operation with the use of MF as pretreatment resulted in a moderately lower recovery, with 109%, however, the permeate flux was higher (24 L.m⁻².h⁻¹), as well as recovery of the flux in the membrane, and the process time has been reduced, which demonstrates the importance of the use of pre-treatments in UF processes. Prior to the preparation of the enzymatic formulations, 109.9 L of crude extract were concentrated 60 times by UF, separated into seven batches, with mean enzyme recovery of 183% and activity factor of 102 fold, resulting in an extract with about 3033 U.mL⁻¹ laccases. This concentrated extract was formulated using seven different concentrations of glycerol, 0 (control condition), 10, 15, 20, 30, 40 and 50% (w/v), in the presence or absence of 2% (w/v) of KCl, and maintained at two different temperatures, of 4 and 28°C, being evaluated by 52 weeks for the conservation of laccases activity. The addition of glycerol to the extract caused an increase in the activity of laccases, being that, in the temperature of 28°C, this increment was maintained for some weeks. The temperature of 4°C promoted maintenance of the enzymatic activity for longer periods of time, and the condition containing 30% (w/v) of glycerol showed the highest stability during the period, with relative activity oscillating close to 100%, closing with 88% of the activity and being used for the other tests. The thermostability tests showed that the addition of glycerol to the concentrate extract did not promote enzyme protection, while stability tests against pH and presence of ions showed superior stability for the extract formulated with 30% (w/v) of glycerol. The addition of glycerol also resulted in increases in activity against these conditions, with emphasis on the activity of the enzyme at pH values more acid, with increments higher than 60% in relation to pH 5. Regarding the tests of dye discoloration, the use of 150 U.mL⁻¹ of laccases in the presence of 0.3 μmol.L⁻¹ of the redox mediator syringaldazine resulted in higher mean discoloration percentages when compared to the other conditions tested, being the most suitable for use in color removal processes.

Keywords: laccases; microfiltration; ultrafiltration; concentration; formulation; stability; discoloration of dyes.

1 INTRODUÇÃO

Lacases (EC 1.10.3.2) vêm recebendo cada vez mais atenção no mundo todo devido a sua ação catalítica inespecífica, que lhes permite agir sobre uma ampla gama de substratos, dentre os quais compostos tóxicos, como fenóis e corantes. A busca por novos processos de tratamento de efluentes nas indústrias têxtil e papelreira, que sejam mais eficientes e causem menos impactos na natureza, tem incentivado ainda mais novas pesquisas que visem promover tecnologias que utilizem estes catalisadores “verdes”. Sua aplicação nos próprios processos industriais também vem sendo buscada, sendo que alguns produtos à base de lacases purificadas e liofilizadas já são comercializados por diferentes empresas.

Algumas tecnologias emergentes utilizando lacases incluem o branqueamento da polpa de celulose, a conversão de lignocelulose em ração animal e em biocombustível e o tratamento de diversos efluentes tóxicos, ricos em compostos fenólicos, que são gerados em vários processos industriais. Compostos altamente tóxicos são tratados, atualmente, por processos de extração, adsorção com carvão ativado, floculação, precipitação, sistemas de filtração e lodos ativados, que não são totalmente eficazes e geram novos subprodutos, que também necessitam de um novo destino. A utilização de lacases apresenta como vantagens a baixa seletividade em relação ao substrato, o emprego em temperaturas e pH amenos e a formação de água como um dos subproduto da reação, mas tendo como desvantagens, ainda, altos custos de produção e a escassa disponibilidade de tecnologias de concentração e purificação.

Para tentar minimizar ou solucionar estas questões, estudos vêm sendo realizados a fim de otimizar a produção enzimática, visando futuras aplicações dessas enzimas em escala industrial, no tratamento de efluentes e em biorremediação, bem como ampliar sua utilização em indústrias de papel e celulose e têxtil, entre outras. A utilização de membranas para a concentração enzimática é uma alternativa para processos em larga escala, uma vez que esses sistemas podem operar em fluxo contínuo e com eficiência.

Outro aspecto relevante quanto à utilização de lacases na indústria é a estabilidade destas enzimas, uma vez que devem apresentar uma vida útil longa para que possam ser comercializadas, além de serem estáveis durante o processo no qual forem empregadas, a fim de garantir a manutenção da eficiência catalítica. Em função disso, a busca por formulações que as tornem estáveis, bem como alternativas de comercializá-las na forma líquida ou liofilizada, necessitam de maiores estudos.

Para contribuir com a pesquisa e o desenvolvimento de tecnologias para remoção de compostos fenólicos e/ou aromáticos presentes em efluentes, bem como para suas demais aplicações, são relevantes os estudos acerca da concentração de fenol-oxidases utilizando membranas e da formulação dos extratos enzimáticos. Assim, o objetivo geral desse projeto foi desenvolver um processo de concentração e posterior formulação de extratos enzimáticos à base de lacases produzidas por *Pleurotus sajor-caju* PS-2001 em processo submerso, tendo como objetivos específicos:

- caracterizar os extratos enzimáticos de lacases quanto à massa molecular por meio de eletroforese;
- analisar o efeito do uso de carvão ativado na purificação parcial e na remoção de cor e de turbidez dos caldos enzimáticos brutos;
- avaliar a utilização de membrana de microfiltração como pré-tratamento dos extratos enzimáticos, bem como sua melhor pressão de operação;
- avaliar a recuperação de lacases e a eficiência do processo de concentração dos extratos enzimáticos por ultrafiltração, bem como sua melhor pressão de operação;
- elaborar formulações enzimáticas e avaliar a conservação da atividade dos extratos enzimáticos em médio e longo prazos sob diferentes temperaturas;
- avaliar a termoestabilidade e a estabilidade frente ao pH e na presença de íons das lacases concentradas e formuladas;
- aplicar o extrato enzimático concentrado em processos de descoloração de corantes.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 BASIDIOMICETOS

A diversidade microbiana é uma fonte importante de recursos para o avanço da biotecnologia, sendo que várias classes de organismos produzem diferentes produtos como resultado de seu metabolismo (Torres *et al.*, 2008; Bastos, 2010). Entre os microrganismos eucariotos, leveduras e fungos filamentosos são os mais utilizados para a produção de enzimas biotecnologicamente interessantes. Fungos filamentosos são utilizados há séculos como fontes de muitos metabólitos e enzimas, estando envolvidos no processamento de frutas e legumes, na clarificação de sucos e na extração de cafés, entre tantos outros processos (Torres *et al.*, 2008).

A biodegradação de compostos lignocelulósicos constitui um dos mais importantes ciclos de carbono na natureza e representa um importante processo biotecnológico. Os organismos mais efetivos na degradação deste tipo de material são os fungos de degradação branca e de degradação parda, em sua grande maioria, pertencentes ao filo Basidiomycota (Ferraz, 2010).

Na área de tratamento biológico de efluentes da indústria papelreira, existem diversos estudos sobre aplicação de fungos, destacando-se os de degradação branca, por sua capacidade de mineralização de compostos fenólicos e aromáticos (Silva & Esposito, 2010). Estes fungos são os mais amplamente utilizados, pois possuem alta capacidade de degradar lignina, componente responsável pela cor dos efluentes (Peralta *et al.*, 2004).

Diante disto, a utilização de fungos, especialmente basidiomicetos, no tratamento dos mais diversos tipos de efluente tem sido alvo de inúmeros estudos, devido a sua capacidade de produzir enzimas extracelulares inespecíficas, que são capazes de interagir com uma ampla gama de substratos (Silva & Esposito, 2010).

2.1.1 Gênero *Pleurotus*

O gênero *Pleurotus* é um grupo cosmopolita de macrofungos pertencentes à ordem Agaricales, classe Basidiomycetes e filo Basidiomycota, que produzem uma ampla gama de moléculas com interessantes atividades biológicas, destacando-se as enzimas ligninolíticas. Apresentam corpos de frutificação (basidiomas) com hastes concêntricas em forma de concha

de ostra, possuindo propriedades terapêuticas e medicinais, além de aplicações ambientais e biotecnológicas (Cohen *et al.*, 2002).

Este gênero compreende um grupo de cogumelos comestíveis, como *Pleurotus ostreatus* e *Pleurotus eryngii*, com alto valor nutritivo e gastronômico (Cohen *et al.*, 2002). Além disso, os cogumelos deste gênero são capazes de colonizar e de degradar uma ampla variedade de substratos lignocelulósicos, além de resíduos agrícolas e industriais, uma vez que produzem o complexo enzimático das fenol-oxidases e, devido a isso, vem sendo intensamente estudados (Sánchez, 2010).

A linhagem PS-2001 de *Pleurotus sajor-caju*, comercializada para a produção de cogumelos, tem demonstrado grande potencial para produção de fenol-oxidases. Em cultivos sólidos, este cogumelo apresenta basidiomas com coloração clara que varia do bege ao cinza (Bettin *et al.*, 2014c). Também pode ser cultivado em processo submerso, apresentando composição nutricional muito semelhante à do corpo de frutificação gerado em cultivo sólido (Confortin *et al.*, 2008).

A obtenção de altos níveis de atividade enzimática em cultivos submersos de *P. sajor-caju* PS-2001 sugere que este microrganismo apresenta potencial de aplicação industrial por ser um importante produtor de lacases (Bettin *et al.*, 2014c). Resultados de descoloração de corantes e de remoção de fenol obtidos utilizando lacases desta linhagem demonstraram seu potencial de aplicação biotecnológica para o tratamento de efluentes, especialmente das indústrias têxtil e de papel e celulose (Bettin *et al.*, 2013; Bettin *et al.*, 2015).

2.2 ENZIMAS

A substituição de catalisadores químicos por enzimas em processos industriais é devida, principalmente, às condições brandas de pH e temperatura em que atuam (Said & Pietro, 2004). A produção de enzimas em escala industrial é realizada, principalmente, em cultivos submersos, utilizando meios compostos por substâncias sintéticas quimicamente conhecidas e/ou por matérias primas naturais (Sant'Anna, 2001).

2.2.1 Fenol-oxidases

O complexo enzimático das fenol-oxidases está subdividido em dois subgrupos: as

enzimas dependentes de peróxido (peroxidases) e as enzimas dependentes de oxigênio (lacases) (Durán, 2010). As peroxidases são amplamente distribuídas na natureza e apresentam sítios ativos contendo grupos prostéticos, capazes de catalisar a oxidação de diversos substratos, incluindo os aromáticos, como fenóis e derivados de benzidina, utilizando o peróxido de hidrogênio no ciclo catalítico (Peralta *et al.*, 2004).

As principais enzimas do complexo das fenol-oxidases são lignina peroxidase (LiP – EC 1.11.1.14), manganês peroxidase (MnP – EC 1.11.1.13) e lacase (Lac – EC 1.10.3.2), que estão relacionadas com a degradação da lignina (Durán, 2010). A baixa especificidade e o alto potencial redox permitem sua utilização na degradação de diversos poluentes orgânicos, como compostos aromáticos organoclorados, pesticidas, corantes sintéticos e resíduos da indústria do petróleo (Anselmo *et al.*, 2008).

Lacases são glicoproteínas que contêm cobre em seu centro ativo, capazes de oxidar grupos fenólicos livres formando radicais fenóxi e podendo, também, mediante a ação de mediadores, atuar sobre grupos não fenólicos, conforme apresentado na Figura 1. Já LiP é uma glicoproteína que requer peróxido de hidrogênio para sua atividade catalítica, com capacidade para degradar compostos fenólicos e não fenólicos. Foi relatada pela primeira vez em basidiomicetos no cultivo de *Phanaerochaete chrysosporium*, em 1984, por dois diferentes grupos de estudos (Peralta *et al.*, 2004; Riva, 2006; Durán, 2010).

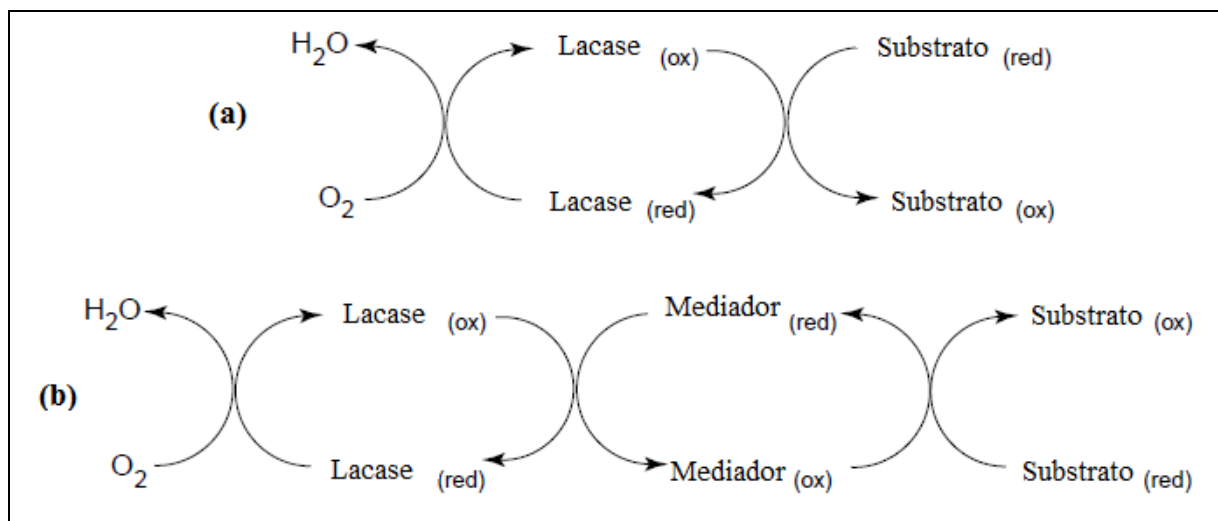


Figura 1. Representação esquemática do ciclo catalítico de lacases para oxidação de substratos (a) sem a presença de mediador e (b) na presença de mediador redox (Riva, 2006).

MnP é uma enzima muito semelhante à LiP, sendo dependente, além do peróxido de hidrogênio, da presença do íon Mn^{2+} (Durán, 2010). É uma heme-proteína extracelular

glicosilada, expressa em múltiplas isoformas. Foi descoberta em *P. chrysosporium*, tendo recebido mais atenção que a LiP no últimos anos (Peralta *et al.*, 2004; Anselmo *et al.*, 2008).

Sendo as lacases as enzimas produzidas em maior quantidade pelo microrganismo utilizado no presente estudo, além de ser o foco deste trabalho, a produção, recuperação e aplicação destas enzimas serão detalhadas a seguir.

2.2.1.1 Lacases

Estas enzimas foram primeiramente identificadas em plantas, sendo produzidas também por insetos e algumas bactérias, mas são os fungos, principalmente basidiomicetos, sua principal fonte de produção (Peralta *et al.*, 2004). No Quadro 1, estão apresentadas as massas moleculares de lacases provenientes de diferentes microrganismos.

Quadro 1. Massas moleculares de algumas lacases fúngicas purificadas.

Microrganismo	Número de isoenzimas	Massa molecular (kDa)	Referência
<i>Cerrena unicolor</i>	2	64 / 57	Bryjak & Rekuć (2010)
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	1	71,2	Halaburgi <i>et al.</i> (2011)
<i>Corioloropsis gallica</i> 1184	1	66	Songulashvili <i>et al.</i> (2016)
<i>Myrothecium verrucaria</i> NF-05	1	66	Zhao <i>et al.</i> (2012)
<i>Pleurotus ostreatus</i>	2	72 / 40	Kumar <i>et al.</i> (2012)
<i>Pycnoporus cinnabarinus</i>	1	63	Schliephake <i>et al.</i> (2000)
<i>Shiraia</i> sp. SUPER-H168	1	69	Yang <i>et al.</i> (2013)

Lacases atuam diretamente sobre estruturas fenólicas por meio da oxidação dos fenóis, pela abstração de um elétron mediada pela redução de Cu^{2+} a Cu^{1+} , que por sua vez reduz O_2 a H_2O , permitindo à enzima atuar de forma cíclica; porém, também está demonstrado que lacases podem degradar estruturas não fenólicas por meio da oxidação de mediadores, como 2,2-azino-bis-(3-etil-benzotiazolona-6-ácido sulfônico) (ABTS) e hidroxibenzotriazol (HBT), que podem ser reduzidos oxidando estruturas não fenólicas (Durán, 2010). Tipicamente

extracelulares, podem ser produzidas em cultivos sólidos ou líquidos, sendo os meios sólidos, geralmente compostos por materiais lignocelulósicos, semelhantes ao habitat natural dos microrganismos produtores (Peralta *et al.*, 2004).

2.3 PROCESSOS DE PRODUÇÃO DE LACASES

As condições de cultivo e a composição do meio desempenham um papel importante na produção de lacases, sendo que parâmetros como tempo de cultivo, a forma de condução do processo, concentração de compostos orgânicos e inorgânicos, adição de indutores, temperatura, pH e percentual de saturação em oxigênio dissolvido são os que possuem maior influência (Viswanath *et al.*, 2014).

Cultivos em estado sólido se assemelham ao meio natural de crescimento dos fungos basidiomicetos e, em geral, possibilitam a obtenção de elevadas atividades de enzimas por volume de meio, sendo que o crescimento do microrganismo pode ocorrer na superfície ou em todo substrato (Alexandrino *et al.*, 2007). *Coriolus versicolor* apresentou sua máxima produtividade em estado sólido em meio contendo palha e farelo de trigo, com atividade de lacases superior a 25 U.g⁻¹, após 30 dias de colonização (Ullah *et al.*, 2000). *P. ostreatus*, quando cultivado em estado sólido, teve sua produção de lacases positivamente afetada pelo aumento de umidade do meio, chegando a 56 U.g⁻¹ em 85% de umidade a 28°C (Alexandrino *et al.*, 2007).

Muitas pesquisas têm sido realizadas a fim de suprir as exigências fisiológicas dos fungos da degradação branca em culturas submersas (Viswanath *et al.*, 2014). A produção de lacases em meio líquido pode ocorrer após o esgotamento das fontes de carbono e nitrogênio no meio de cultivo, ou concomitantemente ao seu consumo e ao crescimento fúngico, sendo que a atividade pode ser consideravelmente aumentada pela adição de indutores enzimáticos, tais como ácido ferúlico, 2,5 xilidina, álcool veratrílico, vanilina, cobre, entre outros (Bettin *et al.*, 2011; Peralta *et al.*, 2004). A produção de lacases por *Trametes versicolor* em biorreator *airlift* é afetada pela adição de indutores, sendo as atividades mais elevadas da enzima observadas em presença de 2,5-xilidina, com valores cerca de quatorze vezes superiores ao observados em meio sem indutores (Rancaño *et al.*, 2003).

O cobre é um dos micronutrientes indispensáveis para a maioria dos organismos vivos, sendo tóxico quando presente em concentrações mais elevadas. Entretanto, estudos relatam que esse composto pode, também, estimular a produção de lacases (Viswanath *et al.*, 2014).

Este efeito foi observado em *Myrothecium verrucaria* NF-05 cultivado em frascos sob agitação de 140 rpm, a 30°C, em meio BDA (batata-dextrose-ágar), que apresentou atividade máxima de lacases em presença de cobre, alcançando 40 U.mL⁻¹ (Zhao *et al.*, 2012). Já *P. sajor-caju* PS-2001 produz consideráveis níveis de lacases em cultivo submerso em frascos agitados, em meio suplementado com os indutores sulfato de cobre, ácido benzoico, ácido gálico e fenol, enquanto que a presença de xilidina e vanilina apresentam menor influência (Bettin *et al.*, 2014c). Isto porque compostos aromáticos de baixa massa molecular também exercem influência relevante sobre o crescimento e a produção enzimática de microrganismos ligninolíticos, sendo que alguns destes compostos afetam a taxa de crescimento, enquanto outros desencadeiam a produção de lacases (Viswanath *et al.*, 2014). *P. sajor-caju* PS-2001 demonstra capacidade de crescimento e produção de lacases em meios contendo diferentes concentrações de fenol, quando cultivado em biorreator *airlift* de circulação interna, sendo que elevadas concentrações de fenol proporcionam um aumento na produção enzimática, chegando a um máximo de 285 U.mL⁻¹ em presença de 4 mmol.L⁻¹ de fenol (Bettin *et al.*, 2015). A presença de antiespumantes no meio de cultivo, como polipropilenoglicol, pode afetar negativamente a produção de lacases; entretanto, provoca um aumento na produção de peroxidases totais, LiP e oxidases do álcool veratrílico (Bettin *et al.*, 2009).

Outro importante fator na produção enzimática é a fonte de carbono, uma vez que libera a energia para o crescimento do microrganismo. A fonte de carbono mais facilmente assimilável por fungos de degradação branca é a glicose (Viswanath *et al.*, 2014). *Trametes hirsuta* produz elevadas atividades de lacases em biorreator *airlift* operado em regime de batelada alimentada, tendo glicose e glicerol como fontes de carbono (Couto *et al.*, 2006). Do mesmo modo, a utilização de farelo de trigo como principal fonte de carbono no cultivo de *T. versicolor* em biorreator *airlift* resultou em elevada atividade enzimática, mostrando que esta formulação de meio pode ser utilizada com sucesso (Souza *et al.*, 2010).

Temperatura e pH também são parâmetros que influenciam fortemente a produção de lacases, sendo que a maioria dos relatos presentes na literatura indicam que níveis de pH estabelecidos entre 5,0 e 6,0 ocasionam uma produção ótima destas enzimas, enquanto que sua temperatura ótima de produção varia entre 25 e 30°C (Viswanath *et al.*, 2014). Bettin *et al.* (2014b) observaram que o pH influencia tanto a produção de lacases como o crescimento de *P. sajor-caju* PS-2001, sendo que o pH 6,5 proporcionou os níveis mais elevados de atividade de lacases, tanto em biorreator com agitação mecânica como em *airlift*, atingindo picos de 80 e 132 U.mL⁻¹, respectivamente, sendo superiores às observadas em valores de pH de 6,0 e 7,0, que promoveram maiores concentrações de biomassa.

Em casos onde a purificação ou a concentração da enzima é necessária, os extratos enzimáticos são, após a etapa de produção, separados da biomassa e submetidos a etapas de pré-tratamento, concentração e purificação, como será discutido a seguir.

2.4 PROCESSOS DE RECUPERAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE LACASES

A definição dos processos de recuperação e purificação a serem utilizados é dependente do uso da molécula alvo, bem como de suas características físico-químicas. Um dos métodos mais tradicionais utilizados para concentração e purificação enzimática é a precipitação (*salting-out*), cujo poder de separação de diferentes proteínas é considerado baixo, além de ser um método agressivo, uma vez que pode afetar a estrutura tridimensional da enzima, interferindo no seu funcionamento (Kilikian & Pessoa, 2001).

Outros métodos amplamente conhecidos são a purificação por cromatografia, onde as proteínas presentes em um meio líquido são retidas em uma matriz porosa empacotada na coluna cromatográfica, sendo, posteriormente, removidas através da adição de um eluente, e a extração em fases aquosas imiscíveis, compostas por uma fase aquosa e por diferentes solventes, sendo um método utilizado em proteínas altamente sensíveis à desnaturação (Kilikian & Pessoa, 2001).

Estes processos, apesar de eficientes, são difíceis de aplicar a um volume elevado de extrato enzimático, apresentando, também, um alto custo. Considerando estes fatos, a utilização de carvão ativado em processos de purificação parcial de enzimas surge como uma alternativa viável, uma vez que apresenta menores custos se comparada aos processos já citados. A aplicação de processos de separação por membranas também representa uma alternativa, considerando sua relativa facilidade em ser utilizada para grandes volumes de extratos, o que possibilitaria seu uso em processos em larga escala. Em vista disso, a seguir, serão discutidos mais detalhadamente estes processos de recuperação e purificação parcial, os quais foram utilizados no presente trabalho.

2.4.1 Emprego de carvão ativado

Carvão ativado é produzido a partir de diversos materiais, tais como madeira, cascas de árvores, carvão, além de subprodutos agrícolas, como resíduos de algodão (Kareem *et al.*, 2011). Sua elevada capacidade de adsorção se deve a sua ampla área superficial, estrutura de

poro e propriedades químicas. Sua superfície é dividida em três diferentes zonas: planos basais, grupos heterogêneos (principalmente contendo oxigênio) e cinzas inorgânicas, sendo que a maioria dos sítios de adsorção de compostos aromáticos se encontra nos planos basais. Contudo, são os grupos heterogêneos que definem a maioria das características químicas superficiais do carvão ativado (Suresh *et al.*, 2012).

O carvão ativado é amplamente utilizado para tratamento de águas residuais, devido a sua capacidade de adsorver compostos que conferem cor e odores, além de compostos orgânicos, cloro e compostos tóxicos em geral (Suresh *et al.*, 2012). Entretanto, relatos de sua utilização na purificação de enzimas microbianas são escassos (Kareem *et al.*, 2011).

Kareem *et al.* (2011) observaram um aumento relevante na atividade específica de glucoamilase com o aumento da concentração de carvão para 3% (m/v), porém, em concentrações maiores, ocorreu diminuição da atividade específica, observando, também, redução de cerca de 90% da turbidez das amostras. A utilização de carvão ativado em extratos enzimáticos brutos provenientes do cultivo sólido de *Aspergillus niger* acarretou em uma diminuição da absorvância e da concentração de proteínas, porém, sem efeito representativo sobre a atividade enzimática (Poletto *et al.*, 2015a). Temperaturas mais elevadas melhoram a capacidade de adsorção de proteína pelo carvão ativado, também influenciando positivamente no processo de descoloração (Kareem *et al.*, 2011).

Apesar de não terem sido encontrados dados sobre utilização de carvão ativado para purificação de lacases, esta alternativa deve ser investigada. A utilização desse composto mostra vantagens sobre as técnicas convencionais de purificação enzimática (precipitação salina, por solventes ou filtração em gel), como baixo custo e fácil separação do sobrenadante, podendo, em certos casos, alcançar elevado percentual de purificação, além de ser um processo rápido, tornando-o uma alternativa promissora como estratégia de purificação parcial de proteínas (Kareem *et al.*, 2011).

2.4.2 Processos de separação por membranas

Membranas são definidas como fases permeáveis ou semipermeáveis, que controlam o transporte e a concentração de várias substâncias através delas, podendo ser constituídas por polímeros, cerâmicos ou metais (Scott, 1998). Membranas poliméricas podem ser preparadas a partir de uma vasta variedade de polímeros, tais como acetato de celulose, nitrato de celulose, poliacrilonitrila, poliamida, poliéter, polisulfona, álcool de polivinilo e fluoreto de

polivinilo (Li, 2007). A função primária de uma membrana é agir como uma barreira seletiva, permitindo que o permeado ou o retido sejam ricos em um determinado componente (Cheryan, 1998). A permeabilidade da membrana é determinada pelas suas características, bem como as dos solutos. No entanto, a área permanente e a espessura da membrana também são variáveis importantes do projeto, além de condições operacionais, tais como a pressão transmembrana e a velocidade do fluxo (Li, 2007).

Membranas podem ser classificadas de acordo com sua natureza (natural ou sintética), estrutura (porosa ou densa), aplicação (separação de gases, líquidos ou misturas de ambos) e mecanismo de ação (difusiva, adsortiva, troca de íons, osmótica e não seletiva) (Cheryan, 1998). Podem, também, ser classificadas em isotrópicas e anisotrópicas, o que significa que podem ou não apresentar a mesma morfologia ao longo de sua espessura. Membranas anisotrópicas se caracterizam por apresentarem uma parte superior muito fina e mais fechada (com ou sem a presença de poros), chamada de pele, que é suportada por uma estrutura porosa (Habert *et al.*, 2006).

O desenvolvimento de processos de separação por membranas (PSM) é relativamente recente, mesmo levando-se em consideração que fenômenos envolvendo membranas são estudados há mais de um século. PSM deixaram de ser uma curiosidade científica e de laboratório no final da década de 50, quando os Estados Unidos decidiram investir em projetos de pesquisa que visavam à dessalinização de águas (Habert *et al.*, 2006). Processos com membranas tornaram-se, então, comuns em diversos tipos de separações industriais, sendo diferenciados de acordo com o tipo de força motriz utilizada, tamanho molecular ou tipo de operação (Li, 2007).

PSM têm sido utilizados em diversos setores, tais como nas indústrias química, farmacêutica e alimentícia, em procedimentos médicos, biotecnologia, purificação de água e tratamento de águas residuais (Habert *et al.*, 2006). Em biotecnologia, há diversos exemplos do uso de membranas na recuperação de enzimas, utilizando tanto ultrafiltração como microfiltração (Cheryan, 1998).

Quando são utilizadas membranas porosas, sua seletividade está diretamente relacionada ao tamanho das moléculas presentes e ao tamanho dos poros, como é o caso dos processos de microfiltração, ultrafiltração, nanofiltração e diálise. Já no caso das membranas densas, a seletividade depende da afinidade das diferentes moléculas com o material da membrana e da difusividade das mesmas através da membrana, como ocorre nos processos de osmose reversa, pervaporação e permeação de gases (Habert *et al.*, 2006). No Quadro 2, são apresentados alguns processos de separação por membranas.

Quadro 2. Processos de separação por membranas.

Processo	Força motriz média (bar)	Material retido	Material permeado	Aplicações
Osmose reversa	ΔP (15 a 81)	Todo material solúvel ou em suspensão.	Água.	Dessalinização e demineralização de águas, concentração de sucos de frutas.
Nanofiltração	ΔP (5 a 25)	Moléculas com massa molecular entre 0,5 e 2 kDa.	Água, sais e moléculas de baixa massa molar.	Purificação de enzimas, reatores de membrana.
Ultrafiltração	ΔP (1 a 7)	Coloides, macromoléculas com massa molar superior a 5 kDa.	Água, sais, açúcares e moléculas de baixa massa molar.	Fracionamento / concentração de proteínas, recuperação de pigmentos, óleos.
Microfiltração	ΔP (0,5 a 2)	Material em suspensão, bactérias com massas molares superiores a 500 kDa (0,01 μm)	Água e sólidos dissolvidos.	Esterilização bacteriana, clarificação de vinhos e cervejas, concentração de células.

Adaptado de Habert *et al.* (2006).

2.4.2.1 Microfiltração e ultrafiltração

Processos de separação por membranas têm sido utilizados para separação, concentração e purificação de produtos biotecnológicos devido a sua alta eficiência (Lütz *et al.*, 2006). A recuperação de enzimas por esses processos é afetada pela força iônica, pH e temperatura, e isso se deve, provavelmente, à mudança de carga, hidratação e interações soluto-soluto, que afetam a forma molecular e o tamanho destas proteínas, restringindo sua permeação (Cheryan, 1998).

A utilização de processos de microfiltração em etapa anterior à ultrafiltração elimina partículas em suspensão no meio, auxiliando na diminuição do tempo de processo, como foi observado por Poletto (2015), que verificou a retenção de 99% das pectinases presentes no meio de cultivo de *A. niger* LB-02-SF, ao empregar esta técnica utilizando membranas poliméricas. Songulashvili *et al.* (2016) utilizaram o mesmo procedimento em 2 L de caldo bruto de *Corioloopsis gallica* 1184, obtendo uma recuperação de 97,4% do total de lacases, com uma purificação de 1,13 vezes na microfiltração, enquanto que, na ultrafiltração, o percentual de recuperação de lacases foi de 86,5%, com purificação de 2,9 vezes. Ainda utilizando microfiltração como pré-tratamento, Bryjak & Rekuć (2010) observaram que o

processo reduziu parcialmente a quantidade de proteases e pigmentos castanhos presentes no extrato enzimático de *Cerrena unicolor*, com uma recuperação de proteínas quase completa e baixa perda de atividade de lacases, também observando que parte das enzimas é adsorvida de forma reversível à superfície da membrana. Já para a concentração realizada através de ultrafiltração, os autores observaram uma elevada pureza de lacases associada a um alto rendimento (Bryjak & Rekuć, 2010).

Processos de ultrafiltração com membranas de 10 kDa mostraram-se eficazes na concentração de lacases, lignina peroxidases e manganês peroxidases produzidas por fungos ligninolíticos em fermentação em estado sólido, ao passo que a utilização de uma membrana de 30 kDa apresentou perdas no processo (Pant & Adholeya, 2009). Rajeeva & Lele (2010) obtiveram um extrato enzimático de lacases de *Ganoderma* sp. duas vezes mais concentrado e com rendimento de 97% ao aplicar ultrafiltração, com membranas poliméricas. Lacases de *Pycnoporus cinnabarinus* purificadas a partir de 7,9 L de extrato bruto em duas etapas de ultrafiltração apresentaram um percentual de recuperação de 87%, com uma purificação de 5,01 vezes (Schliephake *et al.*, 2000).

2.5 ESTABILIDADE DE EXTRATOS ENZIMÁTICOS

Enzimas podem sofrer diversas reações de desnaturação durante seu armazenamento e aplicação na indústria, e, portanto, o desenvolvimento de metodologias para estabilizar a estrutura das mesmas é um desafio interessante. A estabilidade termodinâmica ou conformacional de uma enzima diz respeito a sua resistência à desnaturação devido a agentes químicos ou físicos, enquanto que a estabilidade cinética se refere à sua estabilidade à longo prazo. Compreender os mecanismos de inativação da enzima e a reversibilidade ou irreversibilidade das reações envolvidas permite um melhor controle sobre o processo de estabilização dessas proteínas. Estudos de inativação enzimática podem ser de natureza bioquímica ou estrutural, incidindo no efeito da temperatura e outros agentes sobre as estruturas secundárias e terciárias de enzimas (Iyer & Ananthanarayan, 2008).

A estabilidade térmica de uma enzima é um dos fatores mais importantes do ponto de vista do processamento. O extrato bruto de lacases proveniente do cultivo de *C. unicolor* manteve sua atividade inicial superior a 20% após duas horas de incubação a 70°C, porém, sua tolerância térmica não foi mantida após as etapas de concentração e purificação com membranas (Bryjak & Rekuć, 2010). O mesmo efeito foi observado para lacases de *G.*

lucidum, que apresentaram atividade ótima em temperatura de 55°C, quando em extrato bruto, e de 30°C após as etapas de purificação (Manavalan *et al.*, 2013). Porém, lacases purificadas de *P. cinnabarinus* não sofreram inativação ao serem incubadas a 60°C durante uma hora, e reteram 50% de sua atividade após duas horas de incubação a 80°C, enquanto que a enzima bruta permaneceu ativa por 245 dias a 37°C (Schliephake *et al.*, 2000). Para *C. gallica* 1184, a maior atividade de lacases purificadas ocorreu a 70°C, decaindo em 80°C, provavelmente devido à desnaturação enzimática (Songulashvili *et al.*, 2016).

Lacases de um extrato bruto de *P. sajor-caju* PS-2001 mostraram boa estabilidade térmica de 20 a 40°C, quando em pH 3,2; entretanto, sua temperatura ótima de reação é de 50°C, utilizando ABTS como substrato (Bettin *et al.*, 2011). Já lacases purificadas de *P. ostreatus* permaneceram ativas sob uma ampla gama de temperaturas, apresentando temperatura ótima de 45°C, com um período de meia-vida de 8 h (Kumar *et al.*, 2012). A temperatura ideal determinada para lacases purificadas do ascomiceto *Shiraia* sp. SUPER-H168 permaneceu entre 50°C e 60°C, dependendo do substrato utilizado (Yang *et al.*, 2013).

Quanto ao efeito do pH sobre a atividade e estabilidade de lacases purificadas, foi observado que, para *P. ostreatus*, as enzimas permaneceram ativas em uma ampla faixa de pH, variando de 4 a 8 (Kumar *et al.*, 2012). O pH ótimo de lacases produzidas por *G. lucidum* foi identificado como 5, sendo que a enzima permaneceu estável em valores de pH variando de 4 a 7,5 (Manavalan *et al.*, 2013). Resultado semelhante foi observado para lacases de *P. cinnabarinus*, cujo pH ótimo variou entre 4,4 e 5, dependendo do substrato (Schliephake *et al.*, 2000). O valor ótimo de pH de lacases purificadas de *Shiraia* sp. SUPER-H168 foi de 3 para ABTS e 6 para siringaldazina como substratos, sendo que as enzimas permaneceram estáveis em valores de pH variando entre 6 e 7 e sua atividade residual permaneceu em 80% após 96 h (Yang *et al.*, 2013). A maior atividade de lacases de *M. verrucaria* NF-05 foi detectada em pH 4 a 30°C (Zhao *et al.*, 2012). Já o pH ótimo para lacases de *C. gallica* 1184 situou-se entre 2,5 e 3, com a enzima sendo completamente inativada em pH 8 (Songulashvili *et al.*, 2016).

Lacases também podem ser inativadas pela presença de íons metálicos e de outros inibidores. Estas substâncias são de grande importância para a aplicação industrial da enzima, uma vez que, dependendo de sua concentração, podem interromper a degradação enzimática do substrato. A inibição de lacases pode ocorrer por meio da modificação de resíduos de aminoácidos, quelação de cobre ou alteração conformacional da enzima (Kumar *et al.*, 2012). Halaburgi *et al.* (2011) observaram que lacases provenientes de *C. cladosporioides* mostraram baixa inibição por íons metálicos como K^+ e Hg^{+2} , enquanto que íons de Na^+ , Zn^{+2} , Mn^{+2} , Fe^{+2} e Ba^{+2} aumentaram sua atividade; porém, as enzimas foram completamente inibidas em

presença de azida sódica, ditioneitol, dodecil sulfato de sódio (SDS) e mercaptoetanol, o que sugere que as pontes dissulfeto são essenciais para a atividade da enzima. Para lacases de *P. ostreatus*, Kumar *et al.* (2012) observaram que ocorreu inibição moderada em presença de Mg^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , K^+ , Na^+ , Co^{2+} e Cd^{2+} , ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), ácido oxálico, ácido cítrico e mercaptoetanol, enquanto que, em presença de íons Mn^{2+} , a atividade da enzima foi ativada, sendo completamente inibida na presença de Hg^{2+} , Pb^{2+} e Fe^{2+} , azida sódica e SDS. Os efeitos inibidores de vários íons metálicos também foram testados para lacases purificadas de *Shiraia* sp. SUPER-H 168, sendo que a atividade relativa diminuiu em presença de Fe^{2+} , Fe^{3+} , Ag^+ , EDTA, fluoreto de sódio (NaF) e ácido etilenoglicol tetra-acético (EGTA), entre outros, sendo fortemente inibida por SDS e azida sódica (Yang *et al.*, 2013).

O tempo de prateleira de enzimas purificadas permanece como sendo um campo exploratório importante, necessitando o desenvolvimento de formulações estáveis e econômicas (Kumar *et al.*, 2012). Uma técnica amplamente empregada na conservação de enzimas é a liofilização, em que o solvente é removido da solução por sublimação, resultando em um produto em forma de pó que mantém suas atividades biológicas estáveis por um longo período de tempo, quando comparadas com a conservação em solução aquosa. Porém, a liofilização pode causar a desnaturação de algumas enzimas, quando não planejada de forma adequada (Kilikian & Pessoa, 2001). Outra abordagem que tem se mostrado eficiente para a estabilização enzimática é a utilização de aditivos, sendo a técnica mais utilizada nas formulações das enzimas comerciais (Iyer & Ananthanarayan, 2008).

Segundo Naushad *et al.* (2012), líquidos iônicos, devido a sua natureza hidrofóbica e à baixa viscosidade, geralmente, causam um aumento da atividade e da estabilidade enzimática, demonstrando seu potencial para preservação das proteínas. Porém, apesar de diversas enzimas terem mostrado excelente estabilidade quando em presença de líquidos iônicos, tais como termolisina, lisozima e quimotripsina, o fato de que muitas outras são insolúveis em tais meios representa um obstáculo, necessitando-se de maiores estudos nesta área (Moniruzzaman *et al.*, 2010).

Outra opção para conservação de enzimas é a sua manutenção em soluções de glicerol, sorbitol ou sacarose, em concentração de 50% (m/v), com posterior congelamento das mesmas (Kilikian & Pessoa, 2001). Glicerol, que é usado principalmente como agente de preservação, promoveu estabilidade e incremento na atividade de lacases, sendo que um aumento da concentração de glicerol para 10 mmol.L^{-1} resultou em um aumento de 1,99 vezes na atividade enzimática. Portanto, o glicerol pode ser recomendado para a preservação de lacases durante seu armazenamento (Kumar *et al.*, 2012).

2.6 POTENCIAL DE APLICAÇÃO DE LACASES

Em 1996, foi lançado o produto comercial à base de lacase *Denilite*[®] pela empresa Novozymes[®], para ser utilizada no processo “denim” de fabricação de *jeans*, sendo reformulada em 1999 e lançada no mercado como *Denilite*[®] II. Outros produtos à base de lacases lançados no mercado pela Novozymes[®] são *Novozym*[®], utilizado como biossensor, e *Suberase*[®], usado no tratamento de rolhas de cortiça para o envase de vinhos, sendo produzidos a partir do gênero *Aspergillus* (Peralta *et al.*, 2004; Andraus & Cavaco-Paulo, 2008; Bon *et al.*, 2008).

Atualmente, as principais aplicações biotecnológicas de lacases estão nas indústrias têxteis, em processos relacionados com a descoloração de corantes e em branqueamento de tecidos *denin* utilizados em *jeans*, bem como nas indústrias de papel e celulose, na deslignificação de fibras, especialmente durante o processo de branqueamento da polpa de celulose (Riva, 2006; Andraus & Cavaco-Paulo, 2008). Outra aplicação potencial para estas enzimas é a biorremediação de solos contaminados. Lacases apresentam atividade frente a uma ampla gama de substratos, podendo oxidar uma grande variedade de compostos xenobióticos, tais como compostos fenólicos clorados, pesticidas e hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (Viswanath *et al.*, 2014).

Na indústria de bebidas, a utilização de lacases impede a descoloração, turvação, embaçamento ou alterações de sabor em cervejas, sucos de frutas e vinhos, aumentando seu tempo de prateleira e removendo fenóis (Viswanath *et al.*, 2014). Recentemente, lacases têm sido comercializadas para a preparação de rolhas de cortiça utilizadas em garrafas de vinho, uma vez que diminuem a adstringência, evitando que esta característica seja transmitida para o vinho envelhecido (Riva, 2006).

Lacases também podem ser utilizadas como biossensores ambientais, já que a ampla gama de substratos passíveis de oxidação por essas enzimas permite a detecção de diversos compostos fenólicos, e em células de biocombustível, uma vez que lacases utilizam oxigênio como substrato, que é convertido em água (Viswanath *et al.*, 2014). Estas enzimas também possuem potencial de aplicação nas áreas farmacêutica e cosmética, devido a suas propriedades antioxidantes, que podem ser comparadas às do resveratrol (Antonopoulou *et al.*, 2016).

A utilização de processos biotecnológicos alternativos para o tratamento de efluentes industriais através do emprego direto de microrganismos ou das enzimas por eles produzidas está sendo considerada (Said & Pietro, 2004). Fenol-oxidases podem atuar sobre poluentes

recalcitrantes específicos por precipitação ou por transformação em outros produtos, permitindo maior facilidade para o tratamento final dos rejeitos quando comparados aos tratamentos químicos e físicos tradicionalmente utilizados (Silva & Esposito, 2010).

Entretanto, a utilização destas enzimas em processos industriais depende de vários fatores, como baixo custo de produção, boa estabilidade durante o armazenamento em condições moderadas e capacidade de exercer sua atividade catalítica em velocidade e condições de reação adequadas (Kurniawati & Nicell, 2008). A utilização de lacases juntamente com mediadores em processos de degradação de lignina em indústrias de papel e celulose tem sido largamente estudada. Um processo onde o mediador HBT foi usado juntamente com lacases foi patenteado e sua eficácia foi comprovada em diversos ensaios realizados em planta piloto (Riva, 2006).

Na indústria papelreira, além da utilização no branqueamento de polpa *kraft*, lacases também demonstraram potencial para biorremediação de seus resíduos (Viswanath *et al.*, 2014). O emprego de lacases e peroxidases no tratamento de efluentes deste ramo industrial pode ser uma alternativa para a remoção de cor e para a oxidação de fenóis (Peralta *et al.*, 2004). *P. sajor-caju* PS-2001 encontra-se entre os microrganismos capazes de produzir fenol-oxidases, demonstrando eficiência na remoção de cor e de compostos fenólicos presentes em efluentes da indústria de papel e celulose (Munari *et al.*, 2007).

Quanto a sua utilização na descoloração de efluentes, alguns aspectos são de extrema importância e devem ser avaliados. De acordo com Schmitt *et al.* (2012), temperatura, pH, concentração de corante, concentração enzimática, tipo e concentração do mediador utilizado são fatores com forte influência na degradação de corantes têxteis. Lacases produzidas em biorreator *ailift* de circulação externa por células livres de *T. versicolor* se mostraram capazes de descolorir o corante vermelho de fenol (Rancaño *et al.*, 2003). O potencial de descoloração de corantes têxteis por lacases e peroxidases de *P. sajor-caju* PS-2001 também foi avaliado, resultando em bons níveis de descoloração para corantes dispersos, em especial o *Disperse Red 343* (Schmitt *et al.*, 2012).

Os corantes são classificados de acordo com sua natureza, podendo ser aniônicos, catiônicos e não iônicos, e quanto a sua estrutura química, sendo os principais das classes azo e antraquinona (Peralta *et al.*, 2004). A descoloração de corantes dos grupos cromóforos antraquinona, azo e trifenilmetano utilizando diferentes concentrações de lacases produzidas por *P. sajor-caju* PS-2001 em biorreator com agitação mecânica foi avaliada, sendo constatado que maiores concentrações de lacases afetam positivamente, de um modo geral, a descoloração destes corantes (Bettin *et al.*, 2013).

Efluentes que contêm resíduos fenólicos necessitam ser tratados antes do seu despejo no meio ambiente, e este tratamento pode ser eletroquímico, biológico, por adsorção com carvão ativado ou por oxidação química (Bayramoglu *et al.*, 2009). Entretanto, fatores como o alto custo, baixa eficiência e geração de subprodutos tóxicos limitam a utilização de alguns destes métodos (Hu & Duvnjak, 2004). Como alternativa, surge a utilização de polifenol-oxidases, como LiP, MnP, tirosinases, peroxidases e lacases, que possuem capacidade de transformar uma ampla gama de compostos aromáticos (Kurniawati & Nicell, 2008). Entretanto, o uso de enzimas na remoção e transformação de compostos tóxicos no tratamento de efluentes requer o desenvolvimento de metodologias que mantenham a enzima estável no sistema, além de permitir sua reutilização (Peralta *et al.*, 2004).

Diante do contexto apresentado, é importante ressaltar que existem poucos estudos relativos à utilização de membranas para a concentração e purificação de lacases, bem como pesquisas visando à formulação de extratos estáveis dessas enzimas. Assim, o desenvolvimento do presente trabalho representa uma relevante contribuição acadêmica/científica/tecnológica, permitindo avaliar as etapas e condições em que são realizados estes processos e possibilitando a obtenção de maiores informações que, futuramente, viabilizem a implementação de uma tecnologia de utilização de lacases em escala industrial para o tratamento de efluentes, bem como facilitar sua utilização em processos já existentes.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 MICRORGANISMO E MANUTENÇÃO DA LINHAGEM

O basidiomiceto *Pleurotus sajor-caju* PS-2001, disponibilizado pela empresa BRASMICEL – Biotecnologia em Fungicultura (Poá/SP) e pertencente à coleção do Laboratório de Enzimas e Biomassas do Instituto de Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul, foi utilizado como produtor de enzimas neste trabalho.

O meio de manutenção da linhagem continha, em sua composição, 2 g de serragem de *Pinus* spp. moída, 2 g de farelo de trigo moído, 0,2 g de CaCO₃, 2 g de ágar-ágar e H₂O q.s.p. 1 L. A esterilização foi realizada por autoclavagem a 121°C e 1 atm e, posteriormente, o meio foi vertido em placas de Petri; após esfriar, um disco de 0,5 cm de diâmetro com a linhagem foi colocado no centro das placas, que foram mantidas em estufa a 28°C até completa colonização, sendo, após, armazenadas a 4°C (Bettin *et al.*, 2009).

3.2 PREPARAÇÃO DO CALDO ENZIMÁTICO

Para a produção do caldo enzimático, foram realizados, previamente a este trabalho, cultivos em biorreatores com agitação mecânica e *airlift* de circulação interna. Foram preparados inóculos de *P. sajor-caju* PS-2001, em meio de cultivo com a seguinte composição: 5 g de glicose, 1,5 g de caseína pura, 5 mL de solução mineral (KH₂PO₄, (NH₄)SO₄, MgSO₄.7H₂O, ureia, CaCl₂, MnSO₄.H₂O, FeSO₄, ZnSO₄ e CoCl₂ - Mandels & Reese, 1957) e H₂O destilada q.s.p 1 L. Os meios foram preparados em frascos Erlenmeyer com capacidade de 500 mL, contendo 100 mL do meio, sendo esterilizados por autoclavagem. Após, três discos de micélio fúngico com 1,5 cm de diâmetro foram raspados de placas de Petri e acrescentados ao meio. Os frascos foram mantidos sob agitação recíproca de 180 rpm a 28°C durante seis dias para o crescimento micelial (Bettin *et al.*, 2011).

A produção de enzimas em biorreatores foi realizada em meio de cultivo semelhante ao utilizado nos inóculos, com adição dos indutores enzimáticos CuSO₄ e ácido benzoico, ácido gálico, fenol ou xilidina. Nos biorreatores, o meio de cultivo foi composto por 5 g.L⁻¹ de glicose, 1,5 g.L⁻¹ de caseína pura, 100 mg.L⁻¹ de ácido benzoico, ácido gálico, fenol ou xilidina, 100 mg.L⁻¹ de CuSO₄, além de 100 mL.L⁻¹ de solução mineral (Mandels & Reese,

1957). A temperatura dos cultivos foi controlada em 28°C e o pH fixo em 6,5, através da adição de NH_4OH 2 mol.L⁻¹ e H_2SO_4 2 mol.L⁻¹ (Bettin, 2010; Bettin *et al.*, 2011).

Após 90 horas de cultivo, o micélio foi separado por filtração e os caldos enzimáticos brutos foram congelados para posterior utilização nos processos de caracterização de lacases, purificação parcial, concentração e formulação enzimática.

O descongelamento dos extratos brutos foi realizado em lotes de quinze litros, conforme a demanda necessária para a realização dos experimentos. Após o descongelamento, os caldos foram filtrados em tecido de microfibras e sua viscosidade foi determinada.

3.3 PROCEDIMENTOS ANALÍTICOS

Na realização dos procedimentos analíticos, foi utilizado um espectrofotômetro *Molecular Devices - SpectraMax 190*, para leituras em placas de 96 poços.

3.3.1 Determinação da atividade de lacases (Lac)

A atividade de lacases foi determinada com o substrato ABTS, em mistura reacional contendo 0,45 mmol.L⁻¹ do substrato, 90 mmol.L⁻¹ de tampão acetato de sódio pH 5 e 0,18 mL de amostra adequadamente diluída, quando necessário, em volume final de 0,4 mL. A oxidação do ABTS foi monitorada pelo aumento da absorbância em 420 nm, durante 90 segundos, a 25°C. Para a determinação da concentração do ABTS oxidado, foi utilizado um $\epsilon_{420} = 3,6 \times 10^4 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ (Wolfenden & Willson, 1982).

Uma unidade de atividade enzimática corresponde à quantidade (μmol) de produto liberada por minuto, por mL de amostra. As atividades enzimáticas foram expressas em unidades por mL ($\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$), definidas como a quantidade de enzima que libera 1 μmol de produto por mL, por minuto ($\text{U} = \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1}$). O cálculo de atividade de lacases foi realizado conforme a Equação 1.

$$\text{Lac} = \frac{\text{Abs.t.Vt.}10^6}{\epsilon \cdot V_A} \quad \text{Equação 1}$$

Onde:

Abs – absorbância;

t – tempo (60 segundos);
 V_t – volume total (mL);
 V_A – volume de amostra (mL);
 ε – coeficiente de extinção molar;

3.3.2 Determinação da atividade de peroxidases totais (Per)

As análises de peroxidases totais foram realizadas de maneira semelhante às lacases, utilizando-se na mistura reacional o extrato enzimático adequadamente diluído quando necessário, tampão acetato de sódio (0,2 mol.L⁻¹) pH 5, substrato ABTS (5 mmol.L⁻¹) e peróxido de hidrogênio (2 mmol.L⁻¹), também totalizando um volume final de 0,4 mL. A leitura em espectrofotômetro foi conduzida de forma similar às lacases, com cálculo da atividade realizado de acordo com a Equação 1, após descontar da absorbância verificada o valor de absorbância obtido para lacases. A atividade também foi expressa em U.mL⁻¹.

3.3.3 Determinação da atividade de lignina peroxidases (LiP)

Lignina peroxidases foram quantificadas utilizando-se 0,15 mL de extrato enzimático, 0,10 mL de peróxido de hidrogênio (2 mmol.L⁻¹) e 0,15 mL de álcool veratrílico (4 mmol.L⁻¹) em tampão tartarato de sódio (250 mmol.L⁻¹) pH 3, em placa de 96 poços. As leituras foram realizadas em comprimento de onda de 310 nm, em cinética de cinco minutos, em temperatura de 30°C. A determinação da concentração do álcool veratrílico oxidado foi realizada utilizando um ε₃₁₀ = 9,3 x 10³ mol⁻¹.cm⁻¹ e o cálculo da atividade enzimática foi realizado conforme a Equação 2.

$$\text{LiP} = \frac{\text{Abs.} \cdot \text{Vt} \cdot 10^6}{\varepsilon \cdot \text{V}_A} \quad \text{Equação 2}$$

Onde:

Abs – absorbância;
 V_t – volume total (mL);
 V_A – volume de amostra (mL);
 ε – coeficiente de extinção molar;

3.3.4 Determinação da atividade de oxidases do álcool veratrílico (OAV)

Oxidases do álcool veratrílico foram quantificadas de forma semelhante à LiP, utilizando placa de 96 poços, com 0,20 mL do extrato enzimático e 0,20 mL de álcool veratrílico (2 mmol.L⁻¹) em tampão tartarato de sódio (250 mmol.L⁻¹) pH 5. As leituras em espectrofotômetro também foram realizadas a 310 nm, em cinética de cinco minutos, a 30°C e o cálculo da concentração de álcool veratrílico calculada com $\epsilon_{310} = 9,3 \times 10^3 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$, também de acordo com a Equação 2.

3.3.5 Determinação da atividade de manganês peroxidases (MnP)

Análises de manganês peroxidases foram realizadas em tubos de ensaio contendo 0,5 mL de amostra de extrato enzimático adequadamente diluída e 1 mL de tampão succinato de sódio 20 mmol.L⁻¹ pH 4,5, aos quais foi acrescentado 0,5 mL de um reagente preparado no momento da análise. O reagente continha, para cada amostra, 0,1 mL de vermelho de fenol 0,1% (m/v), 0,1 mL de tampão lactato de sódio 250 mmol.L⁻¹, 0,2 mL de albumina bovina 0,5% (m/v), 0,05 mL de MnSO₄ 2 mmol.L⁻¹ e 0,05 mmol.L⁻¹ de peróxido de hidrogênio 2 mmol.L⁻¹.

Foram preparados controles (brancos) para cada amostra, onde foram utilizados os mesmos compostos da amostra, com a adição de 0,04 mL de NaOH 2 mol.L⁻¹ para inativar a reação. Todos os tubos de ensaio, tanto os contendo enzima ativa quanto os brancos, foram mantidos em banho-maria por cinco minutos a 30°C. Decorrido este intervalo de tempo, NaOH foi adicionado também aos tubos contendo a amostra, para interromper da reação. Para a leitura, 0,4 mL das amostras e dos brancos foram transferidos para placas de 96 poços, onde foi realizada leitura em espectrofotômetro, em 610 nm. Os valores de absorbância observados para os brancos foram descontados dos valores observados para as amostras, a fim de obter a quantificação real das enzimas presentes no meio. O cálculo da atividade enzimática foi realizado de acordo com a Equação 2.

3.3.6 Determinação da atividade proteolítica

Proteases foram quantificadas através de reação realizada em tubos *Eppendorf* de 2 mL, com a adição de 0,15 mL de extrato enzimático adequadamente diluído e 0,25 mL de

substrato azocaseína 2% (m/v) dissolvida em tampão fosfato de sódio 50 mmol.L⁻¹ pH 7. Brancos foram preparados de forma similar, para todas as amostras, sendo as enzimas inativadas através da adição de 1,2 mL de ácido tricloroacético – TCA 10% (m/v).

Os tubos *Eppendorf* foram mantidos em banho-maria por 40 minutos a 40°C e, após o término deste intervalo de tempo, TCA também foi acrescentado aos tubos contendo enzima ativa. Então os tubos foram centrifugados a 10.000 rpm por dez minutos e 0,2 mL das amostras e brancos foram transferidas para placas de 96 poços, aos quais foram acrescentados 0,2 mL de NaOH 1 mol.L⁻¹. As leituras em espectrofotômetro foram realizadas em 440 nm e os valores de absorbância observados para o branco foram descontados do valor das amostras, sendo posteriormente utilizados para o cálculo da atividade de proteases, através de sua divisão pelo volume de amostra utilizado.

3.3.7 Determinação de proteínas solúveis totais

Proteínas solúveis totais foram quantificadas em tubos de ensaio contendo 1 mL da amostra adequadamente diluída, quando necessário, e 0,5 mL de reagente de Bradford. Os tubos de ensaio foram agitados utilizando um agitador do tipo vórtex e, após dez minutos, foi realizada a leitura em espectrofotômetro em 595 nm. Uma curva padrão foi preparada utilizando soluções de albumina bovina com concentrações conhecidas e submetida às mesmas condições, sendo posteriormente utilizada para o cálculo da concentração de proteínas.

3.3.8 Espectrofotometria de varredura para o caldo enzimático

A determinação da absorbância do caldo enzimático bruto foi realizada utilizando espectrofotômetro, através do pico máximo de absorbância observado no espectro de luz visível (380 a 750 nm). O comprimento de onda determinado foi, posteriormente, utilizado para verificar a remoção de cor dos extratos pré-tratados com carvão ativado e filtrados em membrana de microfiltração.

3.3.9 Determinação da viscosidade do caldo enzimático

A determinação da viscosidade do caldo enzimático bruto foi realizada utilizando viscosímetro Brookfield modelo LDV-II+, a 60 rpm, com 20 mL de amostra em temperatura de 30°C.

3.3.10 Determinação da turbidez do caldo enzimático

A turbidez do caldo enzimático foi realizada em turbidímetro Digimed Modelo Dm TU utilizando 12 mL de amostra em temperatura ambiente ($25\pm 2^\circ\text{C}$).

3.4 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE LACASES E PROTEÍNAS

Os caldos enzimáticos brutos produzidos nos biorreatores foram utilizados na realização dos testes de caracterização enzimática de lacases.

3.4.1 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

O extrato enzimático produzido em biorreatores foi submetido à análise de eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE), com dodecil sulfato de sódio (SDS), segundo metodologia descrita por Laemmli (1970). Foi utilizado marcador de massa molecular *Precision Plus Protein TM Standards All Blue (BioRad®)* e a corrida eletroforética foi realizada em cuba vertical *BioRad Mini-Protean Tetra System®*. Após a corrida, o gel foi incubado durante 30 minutos em solução 0,2% (m/v) de *Coomassie Brilliant Blue G-250*, 50% (v/v) de etanol e 10% (m/v) de ácido acético, para revelação das bandas de proteínas. Após, o gel foi lavado com água destilada e imerso em solução de 50% (v/v) de etanol e 10% (m/v) de ácido acético por 30 minutos, repetindo-se este processo por duas vezes. Já para a detecção de lacases em gel de atividade, o gel de poliacrilamida foi colocado sobre um gel de ágar contendo o substrato ABTS, até o surgimento das bandas (Yaver *et al.*, 1996).

3.5 TESTES DE CARACTERIZAÇÃO DAS MEMBRANAS

3.5.1 Compactação da membrana

Ambas as membranas, de microfiltração (MF) e de ultrafiltração (UF), foram compactadas em pressão de 4 bar até que o fluxo de permeado fosse estabilizado. O volume de permeado foi determinado através de medições realizadas a cada dez minutos. A determinação do fluxo foi realizada por meio da Equação 3 (Cheryan, 1998).

$$J = \frac{V}{A \cdot \Delta t} \quad \text{Equação 3}$$

Onde:

J – fluxo de permeado ($L \cdot m^{-2} \cdot h^{-1}$);

V – volume de permeado (L);

A – área da membrana (m^2);

Δt – tempo de permeação (h).

3.5.2 Permeabilidade da membrana

Os testes de permeabilidade hidráulica das membranas de microfiltração e ultrafiltração foram realizados variando-se a pressão de 0,5 bar a 4 bar e medindo-se o volume de permeado após dez minutos. Foram realizados dois testes para cada membrana, um utilizando água e outro com o caldo enzimático bruto. O fluxo de permeado foi calculado, também, utilizando-se a Equação 3.

3.5.3 Queda e recuperação do fluxo de permeado

Após a determinação da pressão ideal de operação, o fluxo de água inicial (J_{w1}), o fluxo de permeado do extrato enzimático (J_P) e os fluxos de água pós extrato (J_{w2}) e pós limpeza da membrana (J_{w3}) foram mensurados. O fluxo foi novamente calculado a partir da Equação 3, sendo posteriormente calculada a queda percentual do fluxo de permeado.

A recuperação do fluxo de permeado pós-limpeza, dada pela razão entre J_{w1} e J_{w3} , foi determinada por meio da Equação 4 (Cheryan, 1998).

$$R_F = (J_{w3}/J_{w1}) \times 100 \quad \text{Equação 4}$$

Onde:

R_F – recuperação do fluxo (%);

J_{w1} – fluxo de permeado inicial ($L.m^{-2}.h^{-1}$);

J_{w3} – fluxo de permeado pós limpeza ($L.m^{-2}.h^{-1}$);

A limpeza das membranas foi realizada circulando NaOH ($0,1 \text{ mol.L}^{-1}$) a 45°C durante o período de uma hora e, posteriormente, água foi recirculada no sistema.

3.6 PURIFICAÇÃO PARCIAL E CONCENTRAÇÃO DE LACASES

3.6.1 Pré-tratamento do caldo enzimático com carvão ativado

A purificação parcial e a remoção de cor do extrato bruto de lacases foram avaliadas utilizando carvão ativado granulado de 6 a 10 mm (VETEC, Brasil) em diferentes concentrações (Poletto *et al.*, 2015a). As concentrações de carvão utilizadas foram de 2, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 e 100 g.L^{-1} . O caldo enzimático foi mantido sob agitação magnética por 120 minutos e amostras foram coletadas aos 15, 30, 60, 90 e 120 minutos. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 10.000 rpm e o sobrenadante utilizado para realização das análises de remoção de cor, proteínas solúveis totais, turbidez e atividade de lacases.

3.6.2 Microfiltração do caldo enzimático

O extrato enzimático foi submetido ao processo de microfiltração (MF) em membrana polimérica de configuração de fibras ocas. Foi utilizado um cartucho filtrante de membrana de poliimida, com área permeante de $0,2 \text{ m}^2$ e tamanho de poro de $0,4 \mu\text{m}$ (PAM Membranas, Brasil), apresentado na Figura 2, operando em fluxo tangencial.

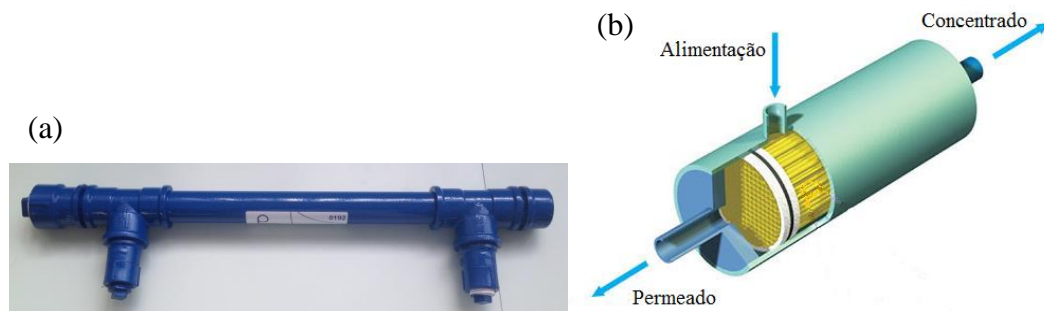


Figura 2. (a) Cartucho filtrante de microfiltração (PAM Membranas, Brasil) e (b) configuração do modo de operação da membrana de fibra oca.

A pressão ótima de operação foi definida variando-se a pressão de 0,5 a 3,5 bar, utilizando uma bomba diafragma da marca Shurflo (México) e a corrente de concentrado foi recirculada para o tanque de alimentação. O sistema de filtração foi montado conforme mostrado na Figura 3.

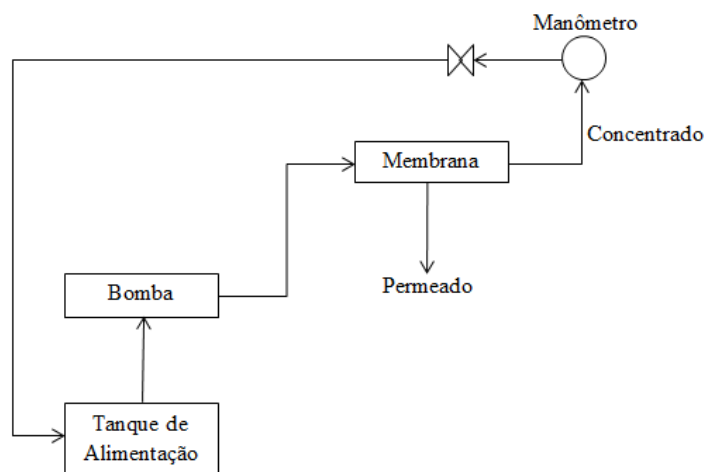


Figura 3. Representação esquemática dos sistemas de separação por membranas utilizados nos processos de concentração de lacases.

3.6.3 Ultrafiltração do caldo enzimático

Para os testes com membrana de ultrafiltração (UF), foi utilizada uma membrana de módulo espiral de polietersulfona (MILLIPORE, EUA), com $0,1 \text{ m}^2$ de área filtrante e tamanho molecular de corte de 10 kDa (Figura 4). Os testes foram realizados variando-se a pressão de 3,5 a 0,5 bar, a fim de determinar a pressão de operação ótima para a concentração do extrato enzimático, resultando nas menores perdas enzimáticas e tempo de processo moderado. Foi utilizada a mesma bomba de diafragma da marca Shurflo (México) e a corrente de concentrado foi recirculada para o tanque de alimentação, conforme a Figura 3.

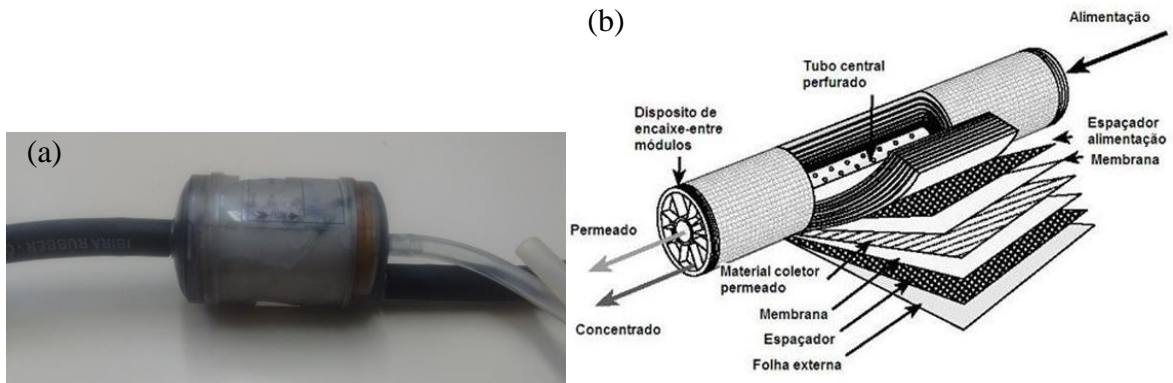


Figura 4. (a) Cartucho filtrante de ultrafiltração (MILLIPORE, EUA) e (b) configuração do modo de operação da membrana espiral.

Para determinar o melhor processo de concentração final do extrato enzimático por ultrafiltração, foram testados quatro protocolos, sempre submetidos à pressão de operação ótima determinada para cada membrana, bem como a melhor concentração de carvão ativado. Os protocolos que foram testados estão apresentados na Figura 5, baseados nos estudos realizados por Poletto *et al.* (2015a). O protocolo que apresentou a melhor recuperação de lacases e o melhor tempo de processo foi utilizado para a concentração efetiva do extrato.

Protocolo 1	Protocolo 2	Protocolo 3	Protocolo 4
Ultrafiltração	Carvão ativado	Microfiltração	Carvão ativado
	Ultrafiltração	Ultrafiltração	Microfiltração
			Ultrafiltração

Figura 5. Protocolos propostos para a concentração dos extratos enzimáticos de lacases.

As equações utilizadas para descrever o grau de concentração e recuperação de lacases presentes no extrato enzimático bruto durante o processo de ultrafiltração estão apresentadas a seguir (Cheryan, 1998).

O fator de concentração volumétrico (FCV) durante a concentração do extrato enzimático foi determinado através da razão entre o volume inicial da alimentação e o volume do concentrado ao final do processo, de acordo com a Equação 5:

$$FCV = V_0 / V_C \tag{Equação 5}$$

Onde:

FCV – fator de concentração volumétrico;

V_0 – volume inicial (mL);

V_C – volume do concentrado (mL).

O fator de concentração de atividade enzimática (FCA) foi calculado dividindo o valor da atividade de lacases no concentrado pelo valor da atividade inicial, conforme apresentado na Equação 6:

$$FCA = Lac_C / Lac_0 \quad \text{Equação 6}$$

Onde:

FCA – fator de concentração da atividade enzimática;

Lac_C – atividade de lacases no concentrado ($U \cdot mL^{-1}$);

Lac_0 – atividade de lacases inicial na alimentação ($U \cdot mL^{-1}$).

A eficiência de recuperação foi calculada como a relação entre a atividade de lacases total presente no concentrado e a atividade presente no extrato inicial, conforme a Equação 7:

$$R = (Lac_C \times V_C) / (Lac_0 \times V_0) \quad \text{Equação 7}$$

Onde:

V_0 – volume de alimentação (mL);

V_C – volume de concentrado (mL);

Lac_0 – atividade no caldo de alimentação ($U \cdot mL^{-1}$);

Lac_C – atividade no caldo concentrado ($U \cdot mL^{-1}$).

A atividade específica no concentrado e no caldo bruto foi calculada por meio da relação entre a atividade enzimática de lacases e a concentração de proteínas (Pro), conforme a Equação 8, e posteriormente foi utilizada para o cálculo do fator de purificação, apresentado na Equação 9:

$$AE = Lac/Pro \quad \text{Equação 8}$$

$$FP = AE_C/AE_0 \quad \text{Equação 9}$$

Onde:

AE – atividade específica de lacases ($\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$);

Lac – atividade de lacases ($\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$);

Pro – concentração de proteínas ($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$);

FP – fator de purificação de lacases;

AE_C – atividade específica no concentrado ($\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$);

AE_0 – atividade específica no caldo de alimentação ($\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$);

3.7 FORMULAÇÃO DE EXTRATOS ENZIMÁTICOS DE LACASES

3.7.1 Testes de conservação de atividade enzimática

Testes foram realizados a partir da utilização de diferentes concentrações de glicerol [0, 10, 15, 20, 30, 40 e 50% (m/v)] e cloreto de potássio [sem a presença de KCl e em presença de 2% (m/v)] (Kumar *et al.*, 2012; Poletto *et al.*, 2015a), a fim de verificar a melhor formulação para armazenamento do extrato enzimático obtido após as etapas de concentração. Análises de atividade enzimática foram realizadas semanalmente e comparadas à atividade inicial, com o objetivo de avaliar a conservação e a estabilidade catalítica das lacases durante o período de um ano. As formulações foram submetidas a temperaturas de 4°C e 28°C.

3.7.2 Testes de termoestabilidade

O extrato concentrado e a formulação enzimática que se apresentou mais estável após nove meses foram submetidas a testes de termoestabilidade, sendo as mesmas submetidas a temperaturas de 25, 30, 35, 40, 45 e 50°C, durante 96 horas. Amostras foram coletadas a cada oito horas e, posteriormente, foram mensuradas as atividades de lacases para cada condição testada, sendo os resultados comparados com as atividades iniciais, para estimar o grau de termoestabilidade das enzimas.

3.7.3 Testes de estabilidade frente ao pH

O extrato concentrado e a formulação enzimática mais estável foram submetidos a testes de estabilidade frente ao pH, sendo os mesmos submetidos a diferentes valores de pH (2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5, 5, 5,5, 6, 6,5, 7, 7,5 e 8) em tampão Mc'Ilvaine (fosfato de sódio – ácido cítrico) na temperatura pré-definida nos testes de termoestabilidade, durante 96 horas, com coleta de amostras em intervalos de oito horas. Após, foram mensuradas as atividades de lacases para cada condição testada e os resultados foram comparados com as atividades iniciais para estimar o grau de estabilidade das enzimas.

3.7.4 Testes de estabilidade frente a íons

O extrato concentrado e a formulação enzimática mais estável foram submetidos a testes de estabilidade frente a íons. Os mesmos foram submetidos à presença dos íons NH_4^+ ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$), K^+ (KCl), Ag^+ (AgNO_3), Na^+ (NaCl), Ba^{2+} ($\text{Ba}(\text{OH})_2$), Ca^{2+} (CaCl_2), Co^{2+} (CoCl_2), Cu^{2+} (CuSO_4), Sr^{2+} (SrCl_2), Fe^{2+} (FeCl_2), Mg^{2+} (MgCl_2), Mn^{2+} (MnSO_4), Ni^{2+} (NiSO_4), Ti^{2+} (TiO_2), Zn^{2+} (ZnCl_2) e Cr^{3+} ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$), em concentração de 10 mmol.L^{-1} , na temperatura pré-definida nos testes de termoestabilidade, durante 96 horas. Amostras foram coletadas a cada oito horas e as atividades de lacases foram mensuradas para cada condição testada. Os resultados obtidos foram comparados com as atividades iniciais a fim de estimar o grau de estabilidade das enzimas.

3.8 TESTES DE DESCOLORAÇÃO DE CORANTES

Foram realizados testes de descoloração de corantes de diferentes classes cromóforas, bem como de suas misturas, conforme apresentado no Quadro 3. Os testes foram realizados em frascos Duran, mantidos em banho estático a 35°C , sem controle de pH, por 168 horas. Foram realizadas coletas diárias e o percentual de descoloração foi avaliado através da leitura de absorbância das amostras no comprimento de onda específico para cada corante, determinado após testes de varredura (Bettin *et al.*, 2014a).

As misturas reacionais continham a solução de corante e o extrato enzimático concentrado, utilizando concentrações enzimáticas de 75 e 150 U.mL^{-1} . Em alguns testes

foram, também, adicionados os mediadores hidroxibenzotriazol (HBT) ou siringaldazina (SYR), nas concentrações de 0,1 e 0,3 $\mu\text{mol.L}^{-1}$.

A determinação do percentual de descoloração foi realizada utilizando a Equação 10 (Schmitt *et al.*, 2012), onde Abs_{inicial} corresponde à leitura de absorvância inicial (tempo 0) e Abs_{final} à leitura de absorvância nos diferentes tempos avaliados.

$$\text{Percentual de descoloração (\%)} = \frac{(Abs_{\text{inicial}} - Abs_{\text{final}})}{Abs_{\text{inicial}}} \times 100 \quad \text{Equação 10}$$

Quadro 3. Corantes e misturas utilizados nos testes de descoloração com suas respectivas classes cromóforas e comprimento de onda de leitura.

Grupo cromóforo	Corante	λ (nm)
Antraquinona	<i>Acid Blue 80</i>	628
	<i>Acid Green 28</i>	685
	<i>Reactive Blue 220</i>	609
	<i>Remazol Brilliant Blue R</i>	591
Azo	<i>Acid Red 315</i>	493
	<i>Congo Red</i>	494
	<i>Disperse Blue 79</i>	539
	<i>Disperse Orange 30</i>	464
	<i>Disperse Red 324</i>	470
	<i>Levafix Brilliant Red E-4BA</i>	513
	<i>Levafix Golden Yellow E-G</i>	434
	<i>Methyl Red</i>	520
	<i>Methylene Blue</i>	549
	<i>Neutral Red</i>	467
	<i>Orange G</i>	478
	<i>Reactive Red 198</i>	518
	<i>Reactive Yellow 15</i>	411
Trifenilmetano	<i>Brilliant Green</i>	610
	<i>Bromocresol Green</i>	616
	<i>Bromophenol Blue</i>	590
	<i>Bromothymol Blue</i>	493
	<i>Coomassie Brilliant Blue G-250</i>	579
	<i>Gentian Violet</i>	582
	<i>Malachite Green</i>	610
	<i>Methyl Violet</i>	584
	<i>Phenol Red</i>	433
Misturas	Antraquinona	624
	Azo	479
	Trifenilmetano	562
	Geral	588

3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS

A análise estatística para os dados obtidos neste trabalho foi realizada por meio da análise de variância (*one-way* ANOVA) e pós-teste de Tukey, com intervalo de confiança de 95% ($p < 0,05$), com auxílio do software GraphPad Prism 5.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A seguir, são apresentados e discutidos os resultados obtidos durante a realização deste trabalho. Inicialmente, estão relatados os resultados referentes à caracterização das lacases, seguido dos dados de utilização de carvão ativado como pré-tratamento para a concentração destas enzimas. Após, estão apresentados e discutidos os resultados obtidos na caracterização das membranas e na definição da melhor pressão de operação para a concentração de lacases, bem como a definição de um protocolo específico para sua concentração. Em seguida, os resultados apresentados se referem à concentração do extrato utilizando o protocolo definido, à formulação deste extrato enzimático concentrado, bem como aos testes de estabilidade ao longo do tempo, termoestabilidade e estabilidade frente ao pH e a íons. Finalmente, são relatados e discutidos os dados obtidos nos testes descoloração de corantes.

4.1 PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DAS LACASES

Em uma etapa inicial aos processos de concentração, o extrato enzimático bruto foi descongelado e foi coletada uma pequena amostra dos extratos que continham os quatro diferentes indutores no meio de cultivo (ácido benzoico, ácido gálico, fenol e xilidina), a fim de determinar a massa molecular das lacases produzidas por *Pleurotus sajor-caju* PS-2001 presentes nas amostras. Essa determinação ocorreu através da utilização de eletroforese em SDS-PAGE.

Os resultados obtidos estão apresentados na Figura 6, onde pode-se observar que lacases com massas moleculares próximas a 25 kDa estão presentes em todos os extratos analisados. O extrato contendo o indutor enzimático ácido gálico apresentou, também, uma banda de lacases com massa molecular entre 50 e 75 kDa. Resultados similares foram observados por Bettin *et al.* (2011) utilizando a mesma linhagem fúngica e ácido gálico como indutor enzimático, porém em meio contendo sacarose como fonte de carbono, sendo relatada a presença de três isoformas de lacases, com massa molares próximas a 35, 45 e 70 kDa.

Os resultados também são semelhantes aos observados por Kumar *et al.* (2012), para lacases produzidas por *Pleurotus ostreatus* em duas isoformas, com massas moleculares de 72 e 40 kDa. Já Libardi Jr. (2010) observou a presença de três isoformas de lacases para essa mesma espécie, com massas moleculares de 18, 23 e 67 kDa.

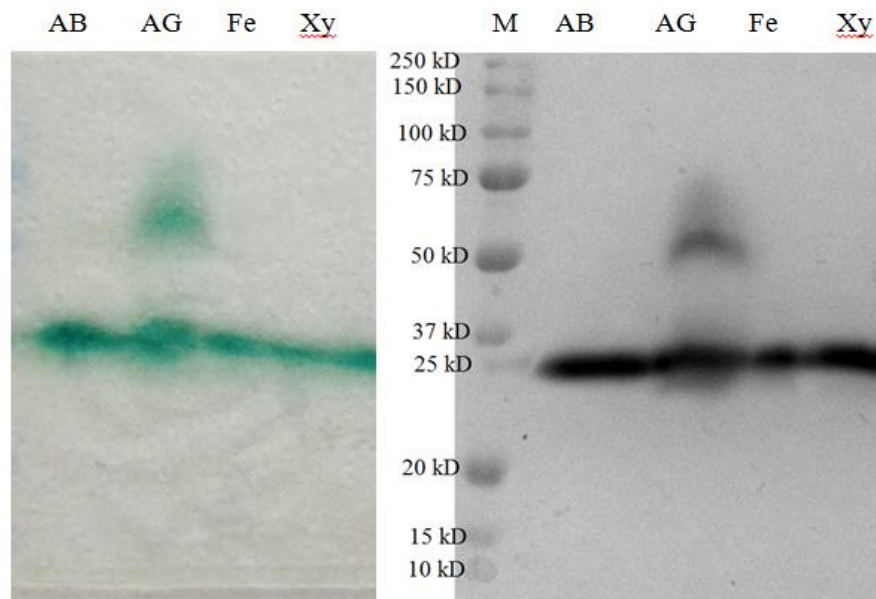


Figura 6. Gel de atividade e eletroforese em gel de poliacrilamida de lacases produzidas por *Pleurotus sajor-caju* PS-2001 em processo submerso na presença de diferentes indutores enzimáticos. (AB) ácido benzoico, (AG) ácido gálico, (Fe) fenol, (Xy) xilidina e (M) marcador molecular.

As massas moleculares das lacases presentes no meio permitem a utilização de processos de microfiltração como pré-tratamento, uma vez que as enzimas, teoricamente, não devem ficar retidas na membrana. Já para o processo de ultrafiltração, a utilização de uma membrana com tamanho de corte menor que 25 kDa é necessária, para evitar que as lacases passem para o permeado, evitando a perda da enzima.

4.2 AVALIAÇÃO DO PRÉ-TRATAMENTO DO EXTRATO ENZIMÁTICO DE LACASES UTILIZANDO CARVÃO ATIVADO

A fim de verificar a viabilidade da remoção de pigmentos e de possíveis substâncias inibitórias presentes nos extratos enzimáticos brutos, bem como de algumas proteínas, avaliou-se a utilização de um pré-tratamento com adição de diferentes concentrações de carvão ativado.

Na Figura 7, são apresentados os dados referentes à variação da atividade de lacases e da concentração de proteínas solúveis totais ao longo do tempo durante os tratamentos com carvão ativado. Em todas as concentrações testadas, a adição do carvão ativado resultou em um aumento da atividade enzimática e na queda dos níveis de proteínas solúveis totais presentes no meio. Acréscimo mais elevado na atividade de lacases foi observado em presença de 50 g.L⁻¹ de carvão, passando de cerca de 26 U.mL⁻¹ para aproximadamente

53 U.mL⁻¹ após 120 minutos de reação, tempo em que também foram observados picos de atividade para as concentrações de 60 e 100 g.L⁻¹ de carvão ativado, alcançando cerca de 52 e 50 U.mL⁻¹, respectivamente (Figura 7a). Já para concentrações mais baixas de carvão, como 5 e 30 g.L⁻¹, picos de atividade de cerca de 40 U.mL⁻¹ foram alcançados em tempos menores (15 e 30 minutos, respectivamente). Também foi possível observar que o aumento nos níveis de atividade enzimática está relacionado com a queda na concentração de proteínas presentes no meio (Figura 7b), sugerindo que a adsorção de proteínas pelo carvão ativado, bem como de proteases que possivelmente estão presentes no caldo, possa ter favorecido o aumento da atividade enzimática, provavelmente devido ao fato dessas proteínas causarem interferência negativa na ação catalítica das lacases presentes no extrato. Além disso, embora não tenham sido realizados testes para avaliar sua remoção, o carvão ativado, por ter afinidade com compostos fenólicos, pode tê-los adsorvido, diminuindo seu efeito inibidor sobre as enzimas (Guilarduci *et al.*, 2006).

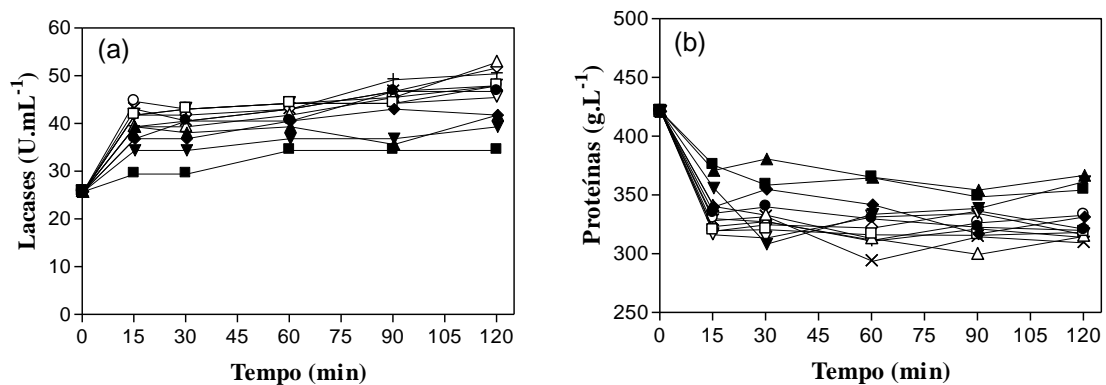


Figura 7. Atividade de lacases (a) e concentração de proteínas solúveis totais (b) em função do tempo durante tratamentos com carvão ativado de um extrato enzimático bruto produzido por *Pleurotus sajor-caju* PS-2001 em processo submerso. (■) 2 g.L⁻¹, (▲) 5 g.L⁻¹, (▼) 10 g.L⁻¹, (◆) 20 g.L⁻¹, (●) 30 g.L⁻¹, (□) 40 g.L⁻¹, (Δ) 50 g.L⁻¹, (▽) 60 g.L⁻¹, (◇) 70 g.L⁻¹, (○) 80 g.L⁻¹, (x) 90 g.L⁻¹ e (I) 100 g.L⁻¹ de carvão ativado.

Estes resultados estão de acordo com os obtidos por Kareem *et al.* (2011), que observaram aumento na atividade específica de glicoamilase com o respectivo aumento da concentração de carvão até 3% (m/v), diminuindo em concentrações maiores do composto. Poletto *et al.* (2015a) observaram que a utilização de carvão ativado em extratos brutos provenientes de *Aspergillus niger* promoveu uma diminuição na concentração de proteínas solúveis totais, porém, sem efeito representativo sobre a atividade de pectinases totais presentes no extrato obtido em cultivo sólido. Já Silva *et al.* (2007) observaram perda de 16% na atividade de uma exo-poligalacturonase presente em um extrato pectinolítico após seu

tratamento utilizando 40 g.L^{-1} de caolin (um argilo-mineral), porém com remoção de 71% das proteínas totais, resultado contrário ao observado no presente estudo com relação à atividade enzimática.

Os dados referentes ao pH, à descoloração e à turbidez dos extratos enzimáticos após o tratamento com carvão ativado estão apresentados na Figura 8. Com relação à variação do pH (Figura 8a), é possível observar que, com o aumento da concentração de carvão ativado e do tempo de reação, ocorreu também um aumento nos valores de pH, variando entre 6,6 e 7,5, estando acima do pH ótimo da enzima, geralmente estimado ente 4 e 5 (Schliephake *et al.*, 2000; Zhao *et al.*, 2012; Manavalan *et al.*, 2013).

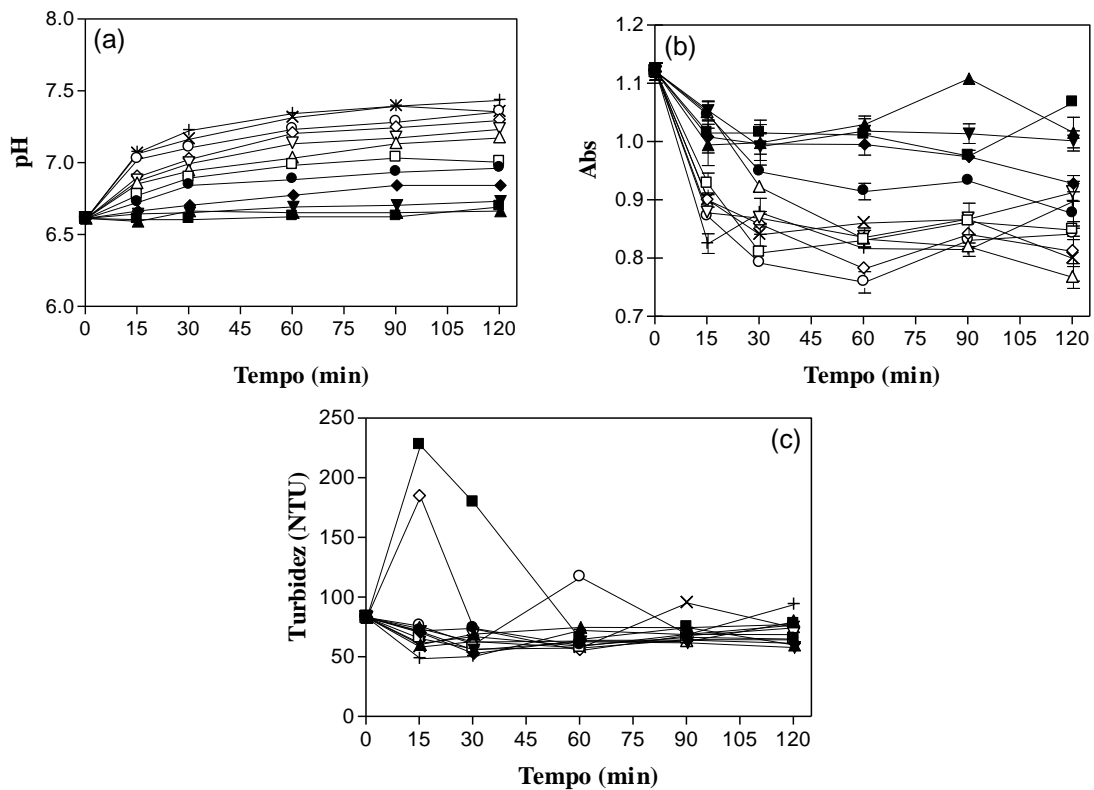


Figura 8. Variação do pH (a), absorvância (b) e turbidez (c) em função do tempo durante tratamentos com carvão ativado de um extrato enzimático bruto produzido por *Pleurotus sajor-caju* PS-2001 em processo submerso. (■) 2 g.L^{-1} , (▲) 5 g.L^{-1} , (▼) 10 g.L^{-1} , (◆) 20 g.L^{-1} , (●) 30 g.L^{-1} , (□) 40 g.L^{-1} , (Δ) 50 g.L^{-1} , (▽) 60 g.L^{-1} , (◇) 70 g.L^{-1} , (○) 80 g.L^{-1} , (x) 90 g.L^{-1} e (l) 100 g.L^{-1} de carvão ativado.

Os níveis de absorvância (Figura 8b) apresentaram tendência a diminuir com o aumento da concentração de carvão ativado, sendo as maiores quedas observadas em presença de 50 e 80 g.L^{-1} de carvão ativado, ambos apresentando cerca de 32% de remoção de cor em relação ao extrato bruto, após 120 e 60 minutos de reação, respectivamente. Resultados semelhantes foram observados por Nakkeeran *et al.* (2010), que constataram que a redução de cor de um extrato enzimático de *Aspergillus carbonarius* aumentou gradualmente em

maiores concentrações de carvão ativado, chegando a 83% na presença de 5 g.L⁻¹ do mesmo. Poletto *et al.* (2015a) também relataram diminuição da absorvância do extrato enzimático bruto de *A. niger* pela adição de carvão ativado.

Com relação à turbidez (Figura 8c), concentrações de carvão ativado superiores a 70 g.L⁻¹, bem como a concentração de 2 g.L⁻¹, proporcionaram aumento na turbidez das amostras em determinados tempos avaliados, atingindo, após quinze minutos de reação, pico de 228 NTU (*Nephelometric Turbidity Unit* - unidade nefelométrica de turbidez). Para as demais concentrações, foi observada uma leve queda na turbidez, permanecendo em torno de 65 NTU ao longo do período de tempo avaliado em todos os testes, resultando em redução de aproximadamente 22% na turbidez. Estes resultados foram inferiores aos observados por Kareem *et al.* (2011), que obtiveram redução de cerca de 90% da turbidez de amostras contendo glicamilase após adição de 3% (m/v) de carvão ativado.

Em altas concentrações de carvão ativado, foi possível obter um maior acréscimo na atividade de lacases. Entretanto, esse fato só foi observado quando utilizados grandes volumes, o que, visando um processo industrial, acarretaria em grandes quantidades de resíduos gerados e em elevados gastos em energia. Adicionalmente, houve um aumento do pH em concentrações e tempos elevados, sugerindo que, se o teste fosse prolongado, ocorreria um aumento ainda maior do pH, podendo ocasionar a desnaturação da enzima devido à alcalinidade do meio. Portanto, optou-se pela concentração de 5 g.L⁻¹ e pelo tempo de reação de 15 minutos para a sequência deste trabalho, cujo resumo dos resultados está apresentado na Tabela 1.

Tabela 1 – Resultados obtidos com a utilização de 5 g.L⁻¹ de carvão ativado (CA) durante quinze minutos sobre o extrato enzimático bruto produzido por *Pleurotus sajor-caju* PS-2001.

Condição	Lacases (U.mL ⁻¹)	Proteínas totais (mg.mL ⁻¹)	Atividade específica (U.mg ⁻¹)	Fator de purificação	Remoção de cor (%)	Turbidez (NTU)
Extrato Bruto	25,9	0,422	61,37	-	-	83,8
5 g.L⁻¹ CA	39,5	0,371	106,5	1,73	11,2	61,2

Como é possível observar na Tabela 1, as condições utilizadas resultaram em um aumento acentuado na atividade específica, alcançando um fator de purificação satisfatório da enzima, uma vez que sua possível utilização futura não necessitaria de uma pureza elevada. Também foram observados bons níveis de remoção de cor e de turbidez do extrato enzimático.

4.3 AVALIAÇÃO DO PRÉ-TRATAMENTO DO EXTRATO ENZIMÁTICO DE LACASES UTILIZANDO MEMBRANA DE MICROFILTRAÇÃO

O processo de microfiltração é utilizado para retirar sólidos suspensos e moléculas de grande massa molecular do extrato a ser tratado, permitindo que o processo de formação de *fouling* (deposição de resíduos e moléculas sobre a membrana, que resulta na obstrução de seus poros) seja reduzido na etapa de ultrafiltração. A fim de utilizar a microfiltração como um pré-tratamento, primeiramente, foram realizados testes de avaliação e caracterização da membrana, sendo, posteriormente, testadas diferentes pressões de operação para o sistema de microfiltração utilizando o extrato enzimático.

4.3.1 Caracterização da membrana de microfiltração

A membrana foi caracterizada por meio de três etapas de testes de microfiltração, que compreendem a compactação, a permeabilidade à água e a permeabilidade ao extrato proveniente das fermentações.

Para o teste de compactação da membrana, água foi circulada através da mesma em temperatura ambiente sob pressão de 4 bar, a máxima pressão de operação especificada pelo fabricante, com medição do volume de permeado a cada dez minutos. A prévia compactação da membrana é importante para evitar que a compactação dos poros ocorra durante o processo em si, causando queda no fluxo de permeado. No presente trabalho, a água foi circulada pelo período de 3,5 horas, tempo no qual foi atingido fluxo de permeado constante, em torno de $45 \text{ L.m}^{-2}.\text{h}^{-1}$. Este fluxo foi 95% inferior ao fluxo inicial medido quando a membrana estava sem compressão, apresentando uma queda de fluxo ainda mais acentuada que a observada por Diel (2010), com queda de 40% do fluxo inicial, comprovando que, efetivamente, ocorreu a compactação dos poros da membrana. O perfil de compactação da membrana de MF está apresentado na Figura 9.

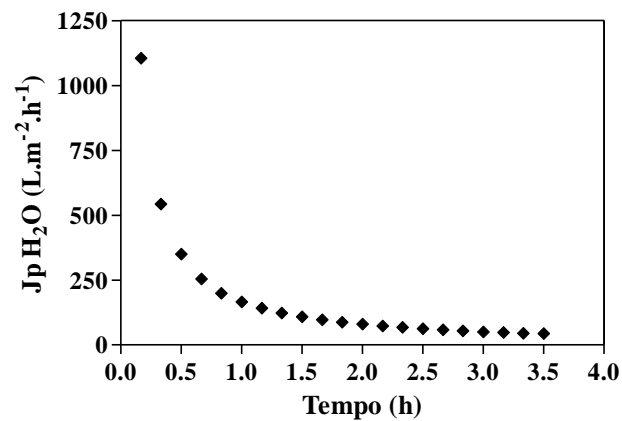


Figura 9. Compactação da membrana de microfiltração sob a pressão de operação de 4 bar.

Os testes de permeabilidade consistem na passagem de água (permeabilidade hidráulica) e do caldo fermentado (permeabilidade ao caldo) através da membrana, sob diferentes pressões de operação. Segundo Diel (2010), é importante determinar a permeabilidade de uma membrana para poder avaliar o comportamento de seu fluxo de permeado sob diferentes pressões. No presente estudo foram utilizadas as pressões de operação de 0,5, 1, 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5 e 4 bar. Ambos os testes foram realizados em temperatura ambiente e os volumes de permeado referentes a cada pressão foram mensurados após dez minutos, para posterior cálculo do fluxo de permeado.

A permeabilidade de uma membrana pode ser determinada pela inclinação da reta obtida através dos pontos referentes ao fluxo nas diferentes pressões testadas. A permeabilidade hidráulica observada para a membrana de MF foi de $194 \text{ L.m}^{-2}.\text{h}^{-1}.\text{bar}^{-1}$, sendo inferior à informada pelo fabricante, de $259,6 \text{ L.m}^{-2}.\text{h}^{-1}.\text{bar}^{-1}$, possivelmente devido a diferenças nas condições ambientais (temperatura) e no equipamento utilizado (bombas e mangueiras) para o desenvolvimento dos testes, o que pode resultar em diferentes perdas de carga. Foi possível observar, também, que a permeabilidade hidráulica aumenta linearmente de acordo com a pressão, fato também observado por Diel (2010).

A permeabilidade da membrana ao caldo foi de $8,9 \text{ L.m}^{-2}.\text{h}^{-1}.\text{bar}^{-1}$ e também aumentou linearmente em relação à pressão aplicada. Entretanto, seu valor foi bem inferior ao observado para a água, o que já era esperado, devido às características do caldo fermentado, que possui sólidos em suspensão e diversas moléculas de elevada massa molar, possuindo, também, uma viscosidade superior à da água, sendo as mesmas de 1,7 e 1,12 cp, respectivamente. Na Figura 10, estão apresentados os dados obtidos para a permeabilidade hidráulica (a) e ao caldo (b) da membrana de microfiltração.

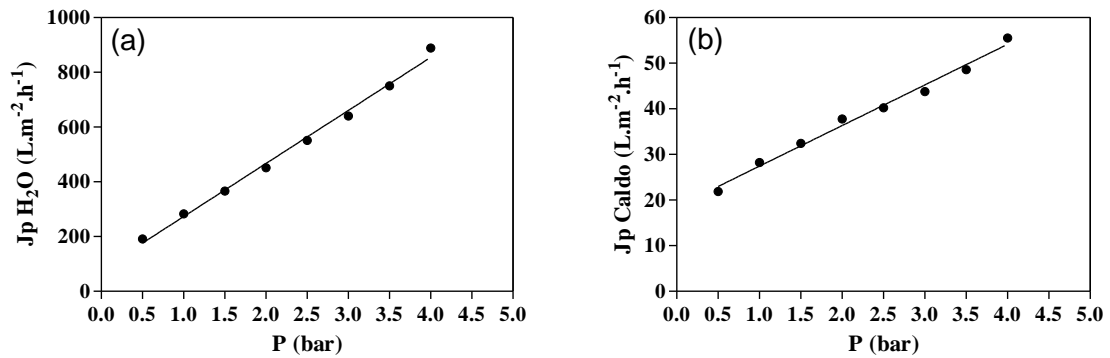


Figura 10. Testes de permeabilidade hidráulica (a) e permeabilidade ao caldo (b) da membrana de microfiltração sob diversas pressões de operação.

4.3.2 Determinação da pressão de operação para membrana de microfiltração

Após a caracterização da membrana, foram realizados testes em diferentes pressões de operação utilizando o extrato enzimático, a fim de determinar qual a mais indicada para o processo de pré-tratamento das lacases. Para os testes, foi utilizado um fator de concentração volumétrico de dez vezes o volume inicial do caldo (dois litros), resultando em um volume de permeado de 1,8 litros, e ao final do processo, foram mensurados a atividade de lacases, os níveis de proteínas e o percentual de descoloração do extrato. Na Tabela 2, estão apresentados os principais resultados obtidos na corrente de permeado durante o processo de microfiltração.

Tabela 2. Principais resultados obtidos na corrente de permeado após processo de microfiltração (MF) em membrana polimérica sob diferentes pressões de operação.

Pressão (bar)	Lac (U.mL ⁻¹)	Proteínas (mg.mL ⁻¹)	AE (U.mg ⁻¹)	Recuperação (%)	FCA	FP	Remoção de cor (%)	Fluxo (L.m ⁻² .h ⁻¹)
-	23,46	0,827	28,36	-	-	-	-	-
0,5	25,93	0,606	42,79	99,47	1,10	1,51	61,04	21,90
1,0	13,58	0,649	20,92	52,11	0,58	0,74	52,51	28,20
1,5	12,35	0,646	19,11	47,37	0,52	0,67	53,94	32,40
2,0	14,82	0,633	23,41	56,84	0,63	0,82	56,58	37,80
2,5	23,46	0,667	35,17	90,00	1,00	1,24	51,20	40,20
3,0	19,75	0,612	32,27	75,79	0,84	1,14	61,98	43,80
3,5	16,05	0,694	23,12	61,58	0,68	0,81	52,93	48,60

Legenda: Lac (atividade de lacases); AE (atividade específica); FCA (fator de concentração de atividade); FP (fator de purificação).

A partir dos resultados apresentados, foi possível observar que as pressões de 0,5 e 2,5 bar mostraram valores superiores para todos os parâmetros avaliados, exceto remoção de proteínas, onde a pressão de 2,5 bar apresentou uma menor remoção. A atividade de lacases nestas pressões foi superior à apresentada no extrato bruto, mesmo que não tenha sido atingido 100% do percentual de recuperação. Isso se deve, possivelmente, à retirada de substâncias inibitórias presentes no extrato, o que possibilitou um aumento na atividade enzimática, o que está de acordo com Charcosset (2006), que sugere que o processo de microfiltração pode remover polissacarídeos, sólidos suspensos e outras substâncias presentes na suspensão líquida.

Essas pressões também proporcionaram os maiores fatores de purificação, de 1,51 e 1,24 vezes, bem como os maiores fatores de concentração enzimática. Estes resultados foram semelhantes aos observados por Poletto *et al.* (2015b), que obtiveram 94% de recuperação de enzimas pectinolíticas, com fator de purificação de 1,23 vezes. Já Songulashvili *et al.* (2016) apresentaram uma perda de apenas 2,6% na atividade de lacases ao utilizar processo de microfiltração como pré-tratamento a fim de evitar incrustações na membrana de ultrafiltração. Enzimas amilolíticas de *A. niger* foram microfiltradas utilizando membrana plana com 0,4 μm de poro, resultando em um aumento de cerca de 38% na atividade enzimática, possivelmente devido à eliminação de moléculas de baixa massa molecular, responsáveis pela inibição da atividade enzimática, também apresentando aumento na atividade específica destas enzimas (Rodrigues *et al.*, 2017). Quanto ao fluxo de permeado, ocorreu incremento conforme o aumento da pressão, sendo que a pressão de 2,5 bar resultou em um fluxo duas vezes superior ao obtido para a pressão de 0,5 bar.

A fim de verificar as perdas da corrente de permeado, a corrente de concentrado também foi avaliada, sendo constatada a presença de lacases e proteínas; porém, ao realizar-se um balanço de massa global, tanto a soma da atividade total de lacases quanto do total de proteínas presentes nas duas correntes não foram iguais ao extrato bruto, conforme apresentado na Figura 11.

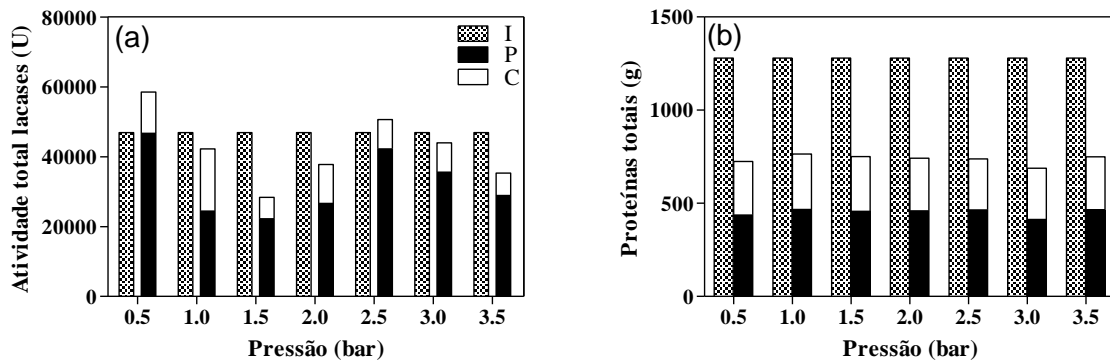


Figura 11. Atividade total de lacases (a) e total de proteínas (b) presentes no extrato inicial bruto (I), permeado (P) e concentrado (C) em processo de microfiltração em membrana polimérica em diferentes pressões de operação.

Para a atividade de lacases, o uso das pressões de 0,5 e 2,5 bar resultou em um valor superior na soma de permeado e de concentrado quando comparado ao extrato inicial bruto. Conforme já mencionado, isso pode ter ocorrido devido à retirada de substâncias inibitórias na corrente de permeado, influenciada por estas pressões, o que ocasionou elevação nas atividades enzimáticas. Já para as proteínas, todas as condições testadas apresentaram soma inferior ao total presente no extrato bruto. A fim de elucidar os motivos que ocasionaram estas perdas, a água de enxague da membrana também foi analisada, constatando-se a presença de lacases e proteínas. Diante deste fato, é provável que as perdas tenham ocorrido devido a sua retenção sobre a superfície da membrana e entre seus poros, acarretando na formação de *fouling*. Fato semelhante foi observado por Bryjak & Rekuć (2010), que constataram a presença de uma elevada quantidade de substâncias na água de lavagem da membrana, após uma concentração de cerca de 27 vezes de um extrato enzimático de lacases, sendo os resultados similares aos observados na corrente de concentrado.

Outro fator que pode ter acarretado na perda de atividade enzimática e de proteínas é a desnaturação decorrente da pressão. Gottschalk *et al.* (2008) ressaltaram a importância da pressão e de forças de cisalhamento na desnaturação enzimática, relatando que a utilização de pressões mais baixas resultou em menores perdas na atividade de LiP, bem como um melhor rendimento, quando comparada a pressões mais elevadas. Diante dos resultados obtidos neste trabalho para as pressões de 0,5 e 2,5 bar, tanto em relação à recuperação de lacases quanto ao fluxo, optou-se pela utilização da pressão de 2,5 bar nas etapas subsequentes, uma vez que o fluxo desta pressão foi superior, reduzindo, assim, o tempo de processo. Entretanto, testes adicionais devem ser realizados futuramente a fim de confirmar os resultados observados para estas pressões, visando verificar se são, de fato, as mais indicadas para o processo de pré-

tratamento do extrato de enzimático de lacases por microfiltração, tendo em vista que a modificação de alguns parâmetros, como a viscosidade e a composição do extrato utilizado, o tipo de membrana e alterações na montagem do sistema, por exemplo, podem alterar os resultados do processo.

4.4 AVALIAÇÃO DA PRESSÃO A SER UTILIZADA NA CONCENTRAÇÃO DE LACASES POR MEIO DE ULTRAFILTRAÇÃO

A ultrafiltração é um processo de concentração de substâncias que vem sendo cada vez mais utilizado, devido ao seu sucesso na consecução dos seus objetivos, o que estimulou o emprego desta técnica neste trabalho. Com o intuito de avaliar qual a melhor pressão a ser utilizada neste processo, primeiramente, foram realizados testes de avaliação e caracterização da membrana. Posteriormente, foram testadas diferentes pressões de operação para o sistema, utilizando o extrato enzimático.

4.4.1 Caracterização da membrana de ultrafiltração

A membrana de ultrafiltração também foi caracterizada por meio de três testes, sendo os mesmos utilizados para a membrana de microfiltração: compactação, permeabilidade hidráulica e a permeabilidade ao extrato enzimático.

Para o teste de compactação da membrana, foi utilizado o mesmo procedimento aplicado para a microfiltração, circulando água através da membrana, em temperatura ambiente, sob pressão de 4 bar, com medição do volume de permeado a cada dez minutos. A água foi circulada pelo período de três horas, tempo no qual foi atingido fluxo de permeado constante, em torno de $9 \text{ L.m}^{-2}.\text{h}^{-1}$, sendo 92% inferior ao fluxo inicial mensurado, conforme pode ser observado na Figura 12. Este tempo de compactação foi superior ao observado para a membrana de microfiltração, isto porque, segundo Diel (2010), os tempos de compactação são específicos para cada membrana, relacionando-se com a estrutura e tamanho dos poros, sendo que quanto maiores os poros, menor o tempo de compactação.

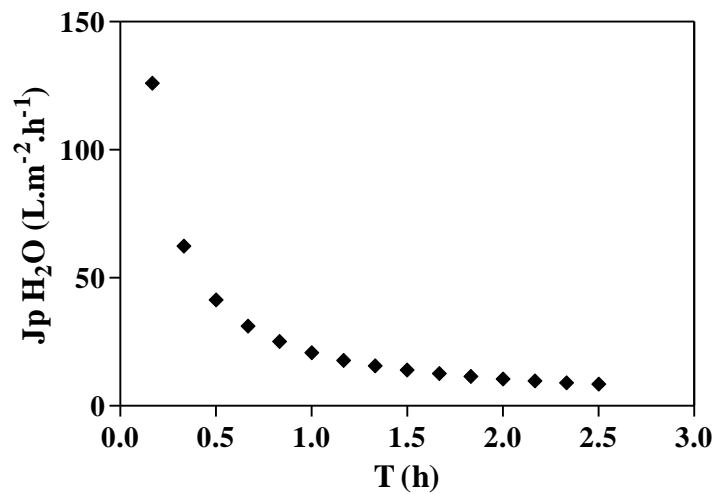


Figura 12. Compactação da membrana de ultrafiltração sob a pressão de operação de 4 bar.

Para os testes de permeabilidade, foram utilizadas as mesmas pressões de operação dos testes de microfiltração: 0,5, 1, 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5 e 4 bar. Ambos os testes foram realizados em temperatura ambiente e os volumes de permeado referentes a cada pressão foram mensurados após dez minutos, para posterior cálculo do fluxo de permeado. A permeabilidade hidráulica observada para a membrana de UF foi de $37,24 \text{ L.m}^{-2}.\text{h}^{-1}.\text{bar}^{-1}$, sendo que não há informações do fabricante quanto à permeabilidade nominal da membrana. Já a permeabilidade ao caldo foi de $3,83 \text{ L.m}^{-2}.\text{h}^{-1}.\text{bar}^{-1}$, também inferior à observada para a água, devido à presença de sólidos suspensos e moléculas de elevada massa molar, uma vez que para o teste foi utilizado o extrato bruto. Na Figura 13, estão apresentados os dados obtidos para a permeabilidade hidráulica (a) e ao caldo (b) da membrana de ultrafiltração, onde é possível observar que, para o extrato enzimático, o aumento no fluxo não foi linear em relação ao aumento da pressão, tendo sido bastante inferior ao fluxo de água. Resultados semelhantes foram observados por Toderó *et al.* (2015), que também avaliaram quedas drásticas do fluxo de permeado de extrato enzimático quando comparado aos testes com água.

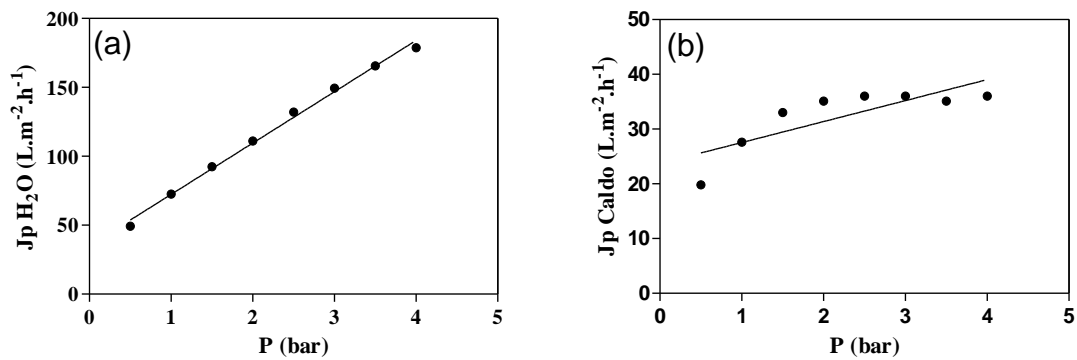


Figura 13. Testes de permeabilidade hidráulica (a) e permeabilidade ao caldo (b) da membrana de ultrafiltração sob diferentes pressões de operação.

4.4.2 Determinação da pressão de operação para membrana de ultrafiltração

A fim de determinar a melhor pressão de operação para a membrana de UF, também foram realizados testes sob diferentes pressões, utilizando-se as mesmas aplicadas à membrana de MF. Para tanto, novamente, foram utilizados 2 L do extrato enzimático bruto para cada uma das condições testadas, com fator de concentração de dez vezes do volume inicial do caldo e volume final de concentrado de 200 mL. Ao final do processo, foram mensurados a atividade de lacases e os níveis de proteínas solúveis totais. Na Tabela 3 estão apresentados os resultados obtidos durante o processo de ultrafiltração nas diferentes pressões testadas.

Tabela 3. Principais resultados obtidos na corrente de concentrado após processo de ultrafiltração em membrana polimérica sob diferentes pressões de operação.

Pressão (bar)	Lac (U.mL ⁻¹)	Proteínas (mg.mL ⁻¹)	AE (U.mg ⁻¹)	Recuperação (%)	FCA	FP	Fluxo (L.m ⁻² .h ⁻¹)
-	32,10	0,639	50,23	-	-	-	-
0,5	370,37	1,440	257,20	115,38	11,53	5,12	19,80
1,0	358,03	1,490	244,22	111,54	11,15	4,86	27,60
1,5	345,68	1,466	235,80	107,69	10,77	4,69	33,00
2,0	370,37	1,416	261,56	115,38	11,54	5,20	35,10
2,5	419,75	1,369	306,61	130,77	13,07	6,10	36,00
3,0	382,72	1,376	278,14	119,23	11,92	5,54	36,00
3,5	419,75	1,419	295,80	130,77	13,07	5,89	35,10

Legenda: Lac (atividade de lacases); AE (atividade específica); FCA (fator de concentração de atividade); FP (fator de purificação).

A atividade de lacases apresentou-se superior em relação ao extrato bruto para todas as condições testadas, como era esperado, com fatores de concentração de atividade variando entre 10 e 13 vezes. A atividade específica também foi elevada, com destaque para a pressão de 2,5 bar, que também apresentou o maior fator de purificação (6,10) e o maior percentual de recuperação de lacases, cerca de 130%, juntamente com a pressão de 3,5 bar.

Ao analisar-se a corrente de permeado, não foi constatada a presença de lacases, porém, a atividade presente na corrente de concentrado foi superior à presente na alimentação (Figura 14). Novamente, supõe-se que isso ocorra devido à retirada de algum agente inibitório, de massa molecular inferior à enzimática, o que resulta em percentuais de recuperação de lacases superiores a 100%. Esta hipótese corrobora os resultados obtidos por Bryjak & Rekuć (2010), que constataram que a utilização de uma membrana de ultrafiltração com diâmetro de poro de 0,22 μm permitiu a passagem para a corrente de permeado de diversas substâncias presentes na alimentação. A corrente de permeado também mostrou a presença de proteínas e, em relação a sua soma em ambas as correntes, a mesma foi inferior ao total da alimentação, sendo que novamente a água de lavagem foi analisada, constatando-se a presença de lacases e proteínas. Estes resultados implicam que, conforme ocorrido com a membrana de microfiltração, houve formação de *fouling* e concentração por polarização sobre a superfície da membrana, ocasionando a perda de proteínas. Neste caso, também, deve-se ressaltar a possível perda por desnaturação. Iyer & Ananthanarayan (2008) relataram que a desestabilização induzida pela pressão é um fenômeno importante, porém pouco compreendido, sendo um potencial desnaturante devido aos seus efeitos sobre as interações moleculares individuais das proteínas, incluindo interações hidrofóbicas, eletrostáticas e forças de van der Waals.

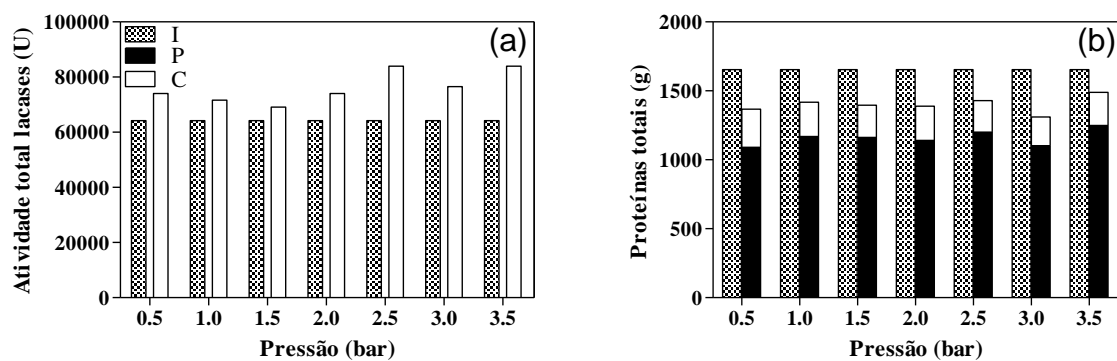


Figura 14. Atividade total de lacases (a) e total de proteínas (b) presentes no extrato inicial bruto (I), permeado (P) e concentrado (C) em processo de ultrafiltração em membrana polimérica em diferentes pressões de operação.

Para dar prosseguimento ao presente estudo, a pressão de 2,5 bar foi escolhida em detrimento à de 3,5 bar, considerando os resultados satisfatórios, o fluxo de permeado superior e a possível desnaturação que pode ser causada pela utilização de pressões elevadas ao longo do tempo. Entretanto, conforme já citado para microfiltração, a realização de testes adicionais será de grande importância para confirmar que estas pressões são as mais indicadas para a concentração de lacases por ultrafiltração, devido às possíveis variações de parâmetros, conforme já mencionado, que podem ocorrer tanto para o extrato enzimático quanto para o processo de separação por membranas e interferir definitivamente nos resultados.

4.5 DEFINIÇÃO DO PROTOCOLO A SER UTILIZADO NA CONCENTRAÇÃO DE LACASES

Após definir a melhor concentração de carvão ativado (5 g.L^{-1}), bem como a melhor pressão de operação para as membranas de MF e UF (2,5 bar), a próxima etapa do trabalho foi definir o melhor protocolo para a concentração das lacases. Nesta etapa, foram testados quatro diferentes protocolos: Protocolo 1, nenhum pré-tratamento antes da UF; Protocolo 2, pré-tratamento por carvão ativado (CA) antes da UF; Protocolo 3, pré-tratamento com MF, antes da UF; Protocolo 4, pré-tratamentos com CA e MF antes da UF. O volume de extrato utilizado em cada ensaio foi de dois litros, com fator de concentração volumétrico de dez vezes, sendo os resultados discutidos a seguir.

4.5.1 Influência dos protocolos de concentração no fluxo de permeado

O termo *fouling* é utilizado para explicar a perda de fluxo durante um determinado processo de filtração por membrana, sendo caracterizado pela deposição de substâncias sobre a sua superfície, não permitindo que o fluxo seja recuperado pela alteração de parâmetros do processo, diferentemente da polarização por concentração, onde alterações na vazão e na pressão, entre outros fatores, acarretam na recuperação do fluxo mesmo durante o processo (Mulder, 1995). Análises do fluxo de permeado para ambas as membranas, durante a permeação de extrato enzimático e de água pura, mostraram que, além da resistência oferecida pela própria membrana, há a formação de uma nova resistência, o que causou a diminuição do fluxo de permeado. Esta resistência também foi observada por Poletto (2015) e pode estar relacionada com a formação de *fouling* e/ou polarização por concentração sobre a superfície

da membrana. Estes resultados fortalecem ainda mais a suspeita da formação de *fouling* sobre a superfície das membranas, o que já havia sido sugerido pela presença de proteínas e enzimas na água de lavagem durante os testes anteriores de MF e UF, que possivelmente foram removidas durante o enxágue.

Os resultados obtidos para os fluxos de permeado e a recuperação do mesmo após a limpeza da membrana são apresentados na Tabela 4. As reduções no fluxo de permeado do extrato enzimático para a membrana de MF foram de aproximadamente 67 e 74%, para os Protocolos 3 e 4, respectivamente. Resultados semelhantes foram observados por Toderó *et al.* (2015), com redução de até 68% nos ensaios realizados com extrato enzimático devido à formação de *fouling* sobre a superfície das membranas. Já para a membrana de UF, a maior redução no fluxo foi observada no Protocolo 1, com cerca de 53%, possivelmente devido à maior presença de sólidos suspensos e moléculas de elevada massa molecular presentes no extrato, que não foi submetido a nenhum pré-tratamento.

Os dados também mostram que a utilização de MF como pré-tratamento único foi mais benéfica que a utilização de carvão ativado, quando analisado o fluxo de permeado, conforme evidenciado pelo fluxo superior para UF obtido no Protocolo 3 em relação ao Protocolo 2 (cerca de 24 e 21 $\text{L.m}^{-2}.\text{h}^{-1}$, respectivamente). Entretanto, a utilização dos dois pré-tratamentos em conjunto resultou no fluxo mais elevado, sendo superior a 27 $\text{L.m}^{-2}.\text{h}^{-1}$. Estes resultados estão de acordo com Poletto *et al.* (2015a), que também verificaram o efeito positivo da utilização de CA e MF como pré-tratamentos na concentração de pectinases sobre o fluxo de permeado.

Tabela 4. Valores de fluxo de permeado e recuperação de fluxo para as membranas de ultrafiltração e microfiltração durante a aplicação dos diferentes protocolos de concentração do extrato enzimático de *Pleurotus sajor-caju* PS-2001.

Protocolo	Etapa	Jw_1 ($\text{L.m}^{-2}.\text{h}^{-1}$)	J_E ($\text{L.m}^{-2}.\text{h}^{-1}$)	Jw_2 ($\text{L.m}^{-2}.\text{h}^{-1}$)	Jw_3 ($\text{L.m}^{-2}.\text{h}^{-1}$)	R_F (%)
1	UF	42,90	20,11	25,44	38,72	90
2	UF	38,72	21,45	23,09	37,39	97
3	MF	470,15	153,66	271,55	583,33	124
	UF	39,65	24,06	28,48	39,19	99
4	MF	583,33	150,86	265,15	514,71	88
	UF	39,27	27,69	28,74	39,68	101

Legenda: Jw_1 – fluxo de água pura inicial; J_E – fluxo de extrato enzimático; Jw_2 – fluxo de água após o caldo; Jw_3 – fluxo de água após a limpeza; R_F – recuperação de fluxo.

Após a passagem do extrato enzimático, água foi circulada pela membrana sob a mesma pressão de operação e o fluxo foi novamente medido, constatando-se reduções no mesmo quando comparados ao fluxo de água pura inicial, devido à incrustação sobre a superfície da membrana. Para a membrana de MF, a redução mais drástica foi observada para o Protocolo 4, com 54,5% de queda no fluxo, enquanto que para a membrana de UF, as maiores quedas foram apresentada nos Protocolos 1 e 2, com cerca de 40%. A fim de remover as incrustações depositadas sobre sua superfície, a membrana foi submetida à limpeza utilizando NaOH. A circulação de soluções ácidas, cáusticas e surfactantes através do sistema de filtração por membranas são procedimentos padrão utilizados na sua limpeza (Gottschalk *et al.*, 2008). Assim, após a limpeza, o fluxo foi novamente medido e a recuperação (R_F) foi, então, calculada, sendo apresentada na Tabela 4.

A menor recuperação de fluxo observada foi para a membrana de MF, durante sua utilização no Protocolo 4, com 88%, sugerindo que parte do *fouling* formado durante o Protocolo 4 foi irreversível, uma vez que, para o protocolo 3, a mesma apresentou o maior percentual de recuperação observado, com 124%. Para a membrana de UF, todos os percentuais de recuperação foram considerados satisfatórios, estando situados entre 90 e 101%, sendo o menor resultado observado para o Protocolo 1, novamente devido à maior presença de impurezas neste extrato, o que pode ter causado a aderência permanente de certas substâncias sobre a superfície da membrana. A utilização de NaOH também foi considerada eficiente para o processo de limpeza de membranas por Poletto (2015) e por Gottschalk *et al.* (2008), que obtiveram resultados muito semelhantes aos deste trabalho, com recuperação de 93% de seu fluxo inicial.

A formação de *fouling* sobre a superfície da membrana é um dos fatores limitantes dos processos de separação por membranas e, por isso, a queda de fluxo de permeado deve ser considerada para a escolha da melhor forma de operação (Diel, 2010; Forest, 2014). Diante disso, os protocolos que apresentaram menor *fouling* e que se mostraram mais eficientes quanto ao fluxo de permeado foram 3 e 4.

4.5.2 Influência dos protocolos na concentração de lacases e de proteínas durante a ultrafiltração

A Tabela 5 apresenta os efeitos da aplicação dos diferentes protocolos testados para a concentração do extrato enzimático de lacases, constando um resumo com os principais resultados observados em cada uma das etapas realizadas.

Tabela 5. Resumo dos principais resultados obtidos para os diferentes protocolos aplicados na concentração de lacases produzidas por *Pleurotus sajor-caju* PS-2001.

Protocolo 1									
Etapa	V (mL)	Lacases (U.mL ⁻¹)	Proteínas (mg.mL ⁻¹)	AE (U.mg ⁻¹)	Recuperação (%)	FCA	FP	Fluxo (L.m ⁻² .h ⁻¹)	Tempo (h)
EB	2000	50,62	0,651	77,76	-	-	-	-	-
UF	200	716,05	1,344	532,78	141,46	14,15	6,85	20,11	0,497
Protocolo 2									
Etapa	V (mL)	Lacases (U.mL ⁻¹)	Proteínas (mg.mL ⁻¹)	AE (U.mg ⁻¹)	Recuperação (%)	FCA	FP	Fluxo (L.m ⁻² .h ⁻¹)	Tempo (h)
EB	2000	50,62	0,651	77,76	-	-	-	-	-
CA	2000	56,79	0,671	84,63	112,20	1,12	1,09	-	0,250
UF	200	619,753	1,168	530,61	122,44	12,24	6,82	21,45	0,466
Protocolo 3									
Etapa	V (mL)	Lacases (U.mL ⁻¹)	Proteínas (mg.mL ⁻¹)	AE (U.mg ⁻¹)	Recuperação (%)	FCA	FP	Fluxo (L.m ⁻² .h ⁻¹)	Tempo (h)
EB	2000	50,62	0,651	77,76	-	-	-	-	-
MF	1800	69,14	0,533	129,72	122,93	1,36	1,66	153,66	0,065
UF	180	617,28	0,862	716,10	109,76	12,19	9,21	24,06	0,416
Protocolo 4									
Etapa	V (mL)	Lacases (U.mL ⁻¹)	Proteínas (mg.mL ⁻¹)	AE (U.mg ⁻¹)	Recuperação (%)	FCA	FP	Fluxo (L.m ⁻² .h ⁻¹)	Tempo (h)
EB	2000	50,62	0,651	77,76	-	-	-	-	-
CA	2000	66,67	0,674	98,92	131,71	1,32	1,27	-	0,250
MF	1800	44,44	0,609	72,97	79,02	0,88	0,93	150,86	0,066
UF	180	617,28	1,029	599,88	109,76	12,19	7,71	27,69	0,361

Legenda: EB - extrato bruto; CA - carvão ativado; MF – microfiltração; UF - ultrafiltração; Lac - lacases; AE - atividade específica; FCA - fator de concentração de atividade; FP - fator de purificação.

Todos os protocolos testados resultaram em aumento de atividade de lacases, quando comparadas ao extrato bruto, conforme esperado. O Protocolo 1 apresentou o maior fator de concentração de atividade, aumentando 14,15 vezes, enquanto que, nos demais protocolos, essa concentração foi de cerca de 12 vezes. Estes resultados são inferiores aos observados por

Poletto *et al.* (2015a), que alcançaram fatores de concentração de atividade de pectinases de até 18 vezes usando carvão ativado e microfiltração como pré-tratamentos.

Quanto aos fatores de purificação, o mais elevado foi obtido utilizando-se o Protocolo 3, atingindo 9,21 vezes. A utilização somente de UF, apesar de conferir bons níveis de concentração de atividade, resultou em baixa purificação (6,85 vezes), isso porque a ultrafiltração é considerada um método de baixa resolução, uma vez que se baseia na rejeição de moléculas apenas por sua massa molecular (Poletto *et al.*, 2015b). Estes resultados estão de acordo com os obtidos em outros trabalhos, que utilizaram membranas para concentração de enzimas, onde foram obtidos resultados de purificação de 5,14 vezes (Nakkeeran *et al.*, 2008), 7 vezes (Silva *et al.*, 2007) e 4,07 vezes (Poletto *et al.*, 2015b). Entretanto, o grau de purificação desejado na solução depende da aplicação da mesma e uma vez que a utilização de lacases no tratamento de efluentes ou na indústria têxtil não necessita de purificação, os baixos fatores de purificação apresentam importância relativamente baixa.

A atividade específica de lacases apresentou considerável aumento após os tratamentos com microfiltração e ultrafiltração, que resultaram em elevada remoção de proteínas, sendo os resultados condizentes aos obtidos por Poletto *et al.* (2015a; 2015b), utilizando os mesmos pré-tratamentos. A análise dos permeados revelou a presença de proteínas, em maior concentração do que no concentrado, porém seu balanço de massa global novamente não atingiu a totalidade de proteínas presentes no extrato inicial. Esta perda, provavelmente, está relacionada à retenção de proteínas na superfície da membrana. Os resultados obtidos com relação à presença de proteínas totais em todas as soluções estão apresentados na Figura 15.

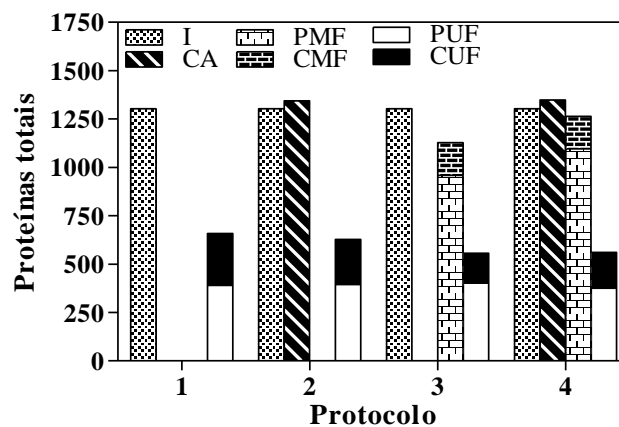


Figura 15. Total de proteínas presentes no extrato inicial bruto (I), extrato pré-tratado com carvão ativado (CA), permeado da microfiltração (PMF), permeado da ultrafiltração (PUF), concentrado da microfiltração (CMF) e concentrado da ultrafiltração (CUF) na aplicação dos protocolos de concentração do extrato enzimático de *Pleurotus sajor-caju* PS-2001.

Após a análise de todos os dados obtidos durante a aplicação dos protocolos, o Protocolo 3 foi escolhido para ser utilizado durante o processo de concentração de lacases. Este protocolo apresentou bom fluxo de permeado, baixa formação de *fouling*, elevado fator de concentração de atividade e fator de purificação e atividade específica satisfatórios, além de utilizar somente um processo de pré-tratamento, o que o torna economicamente mais viável.

4.6 CONCENTRAÇÃO E FORMULAÇÃO DO EXTRATO ENZIMÁTICO DE LACASES

Com o protocolo definido, o processo de concentração de lacases foi iniciado. Foram descongelados e submetidos ao pré-tratamento sete lotes de extrato bruto, sendo que seis deles continham 15 litros e o último 19,9 litros. Os caldos foram submetidos à microfiltração até ser atingido um fator de concentração volumétrico de 60 vezes. O resumo dos principais resultados obtidos está apresentado na Tabela 6.

A média dos resultados obtidos durante o processo de microfiltração foi semelhante aos resultados observados durante o teste com a pressão de 2,5 bar, tanto para a recuperação quanto para o fator de concentração de atividade. Entretanto, estes resultados finais, em geral, foram inferiores aos observados durante o teste do Protocolo 3. Quanto ao fator de purificação de lacases, os resultados alcançados durante o processo de microfiltração foram superiores aos testes realizados anteriormente, utilizando a mesma condição, passando de cerca uma vez para cerca de três vezes. Fato semelhante foi observado por Poletto (2015), que sugeriu que um dos fatores responsáveis por estas diferenças é o tempo de processo, que se torna mais longo devido ao aumento do volume a ser filtrado, o que pode acarretar em uma formação de camada de *fouling* ainda maior sobre a superfície da membrana. Outros fatores a serem considerados são o fator de concentração volumétrico, que passou de 10 para 60 vezes, e as diferenças na composição do meio dos diferentes lotes utilizados nesta etapa, bem como nas etapas anteriores, uma vez que os extratos são provenientes de cultivos realizados com diferentes modos de operação e com presença de diferentes indutores.

Tabela 6. Resumo dos principais resultados obtidos na corrente de permeado durante o processo de pré-tratamento por microfiltração de lacases produzidas por *Pleurotus sajor-caju* PS-2001.

Lote		V (L)	Lac (U.mL ⁻¹)	Proteína (mg.mL ⁻¹)	AE (U.mg ⁻¹)	Recuperação (%)	FCA	FP	Remoção de cor (%)
1	EB	15	35,80	1,242	28,82	-	-	-	-
	MF	14,75	56,79	0,561	101,23	155,98	1,58	3,51	ND
2	EB	15	13,58	1,380	9,84	-	-	-	-
	MF	14,75	23,46	0,580	40,45	169,85	1,72	4,11	ND
3	EB	15	17,28	1,188	14,54	-	-	-	-
	MF	14,75	18,52	0,424	43,68	105,36	1,07	3	ND
4	EB	15	80,25	1,162	69,06	-	-	-	-
	MF	14,75	25,93	0,361	71,83	31,78	0,32	1,04	35,3
5	EB	15	82,75	1,295	63,90	-	-	-	-
	MF	14,75	71,60	0,409	175,06	85,12	0,86	2,77	31
6	EB	15	75,31	1,196	62,97	-	-	-	-
	MF	14,75	54,32	0,402	135,12	70,93	0,72	2,14	20,6
7	EB	19,9	54,32	1,172	46,35	-	-	-	-
	MF	19,56	37,04	0,358	103,46	67,02	0,68	2,23	27,2
Média	EB	15,7	51,85	1,234	42,02	-	-	-	-
	MF	15,44	45,68	0,358	127,60	86,64	0,88	3,03	10,437

Legenda: EB - extrato bruto; MF – microfiltração; V – volume; Lac - lacases; AE - atividade específica; FCA - fator de concentração de atividade; FP - fator de purificação; ND - descoloração não determinada.

Após o processo de microfiltração, o extrato permeado foi novamente congelado, uma vez que o pré-tratamento de todo o volume de extrato levou cerca de uma semana para ser realizado. Estes extratos foram descongelados novamente para o processo de concentração por ultrafiltração, entretanto, os lotes utilizados para o processo de ultrafiltração não são necessariamente provenientes do lote de mesmo número do processo de microfiltração. O processo foi realizado em sete lotes, sendo seis deles de 15 litros e o sétimo de 17,4 litros, com fator de concentração volumétrico de cerca de 60 vezes. Os principais resultados obtidos estão apresentados na Tabela 7.

Novamente, os resultados obtidos apresentaram diferenças quando comparados ao teste do Protocolo 3, realizado sob a mesma condição, possivelmente devido aos fatos já relatados, como o uso de um volume superior de extrato enzimático, que pode ter se depositado sobre a membrana, impedindo que algumas substâncias fossem retiradas do extrato. Este fato pode ser observado mais acentuadamente para a concentração por ultrafiltração, onde o fator de purificação foi inferior ao observado anteriormente, decaindo de

cerca de 9,0 para 4,2 vezes, em média, enquanto a recuperação e o fator de concentração de atividade aumentaram consideravelmente (109 para 183% e de 12,19 para 102,37 vezes, em média, respectivamente). Estes resultados são superiores aos relatados por Rajeeva & Lele (2011), que obtiveram 91% de recuperação de lacases e fator de concentração de duas vezes, utilizando o processo de ultrafiltração para sua concentração. Os resultados finais da concentração de lacases, que atingiram atividade de cerca de 3033 U.mL⁻¹, em média, podem ser considerados satisfatórios quando comparados a algumas lacases comerciais, como as produzidas pela Sigma-Aldrich® a partir de *Trametes versicolor*, que possuem atividade variando entre 0,5 e 10 U.mg⁻¹ em sua forma liofilizada.

Tabela 7. Resumo dos principais resultados obtidos durante o processo de concentração por ultrafiltração de lacases produzidas por *Pleurotus sajor-caju* PS-2001 e pré-tratadas por microfiltração.

Lote		V (L)	Lac (U.mL ⁻¹)	Proteína (mg.mL ⁻¹)	AE (U.mg ⁻¹)	Recuperação (%)	FCA	FP
1	EB	15	17,28	1,161	14,88	-	-	-
	UF	0,390	2098,76	19,764	106,19	315,7	121,45	7,13
2	EB	15	29,63	0,923	32,10	-	-	-
	UF	0,260	2098,76	21,839	96,10	122,8	70,83	3
3	EB	15	34,57	1,119	30,90	-	-	-
	UF	0,250	3827,16	22,788	167,94	184,5	110,71	5,43
4	EB	15	32,10	0,847	37,90	-	-	-
	UF	0,240	3333,33	23,514	141,76	166,2	103,84	3,74
5	EB	15	35,80	0,888	40,31	-	-	-
	UF	0,265	3456,79	23,396	147,75	170,6	96,56	3,34
6	EB	15	43,21	0,977	44,23	-	-	-
	UF	0,285	3333,33	24,789	134,47	146,6	77,14	3,04
7	EB	17,4	12,35	0,896	13,78	-	-	-
	UF	0,230	2716,05	28,450	95,47	290,8	219,92	6,93
Média	EB	15,34	29,63	0,953	31,09	-	-	-
	UF	0,274	3033,33	23,514	129,00	183	102,37	4,15

Legenda: EB - extrato bruto; UF – filtração; V – volume; Lac - lacases; AE - atividade específica; FCA - fator de concentração de atividade; FP - fator de purificação.

4.7 AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DO EXTRATO ENZIMÁTICO DE LACASES

Após o processo de concentração, parte do extrato foi utilizada na produção de diferentes formulações enzimáticas que foram, posteriormente, submetidas a testes de estabilidade ao longo do tempo, durante o período de um ano. A outra parte do extrato concentrado foi utilizada para a caracterização das lacases por meio de testes de termoestabilidade, estabilidade frente ao pH e estabilidade na presença íons.

A formulação que se apresentou mais estável depois de decorridos nove meses também foi submetida aos mesmos testes de caracterização, a fim de verificar se os aditivos utilizados para preservar a estabilidade cinética da enzima também afetam sua estabilidade conformacional. Os resultados observados são apresentados e discutidos a seguir.

4.7.1 Estabilidade ao longo do tempo

O tempo de estocagem de uma enzima é de suma importância para sua comercialização. Uma formulação enzimática deve ser capaz de manter sua atividade durante longos períodos de tempo, tornando possível sua comercialização e aplicação na indústria. O glicerol é um poliol conhecido por sua capacidade de remover efetivamente a água das proteínas, mantendo sua estrutura proteica com uma região superficial mínima, auxiliando na manutenção da sua estabilidade conformacional (Ban *et al.*, 2017). A fim de aumentar o tempo de prateleira das lacases concentradas no presente trabalho, foram testadas sete diferentes concentrações de glicerol em sua formulação, em presença e ausência de KCl, nas temperaturas de 4 e 28°C. Atividades de lacases foram mensuradas semanalmente, durante um período de 52 semanas, expressas em atividade relativa em relação ao tempo zero, sendo os resultados obtidos apresentados na Figura 16.

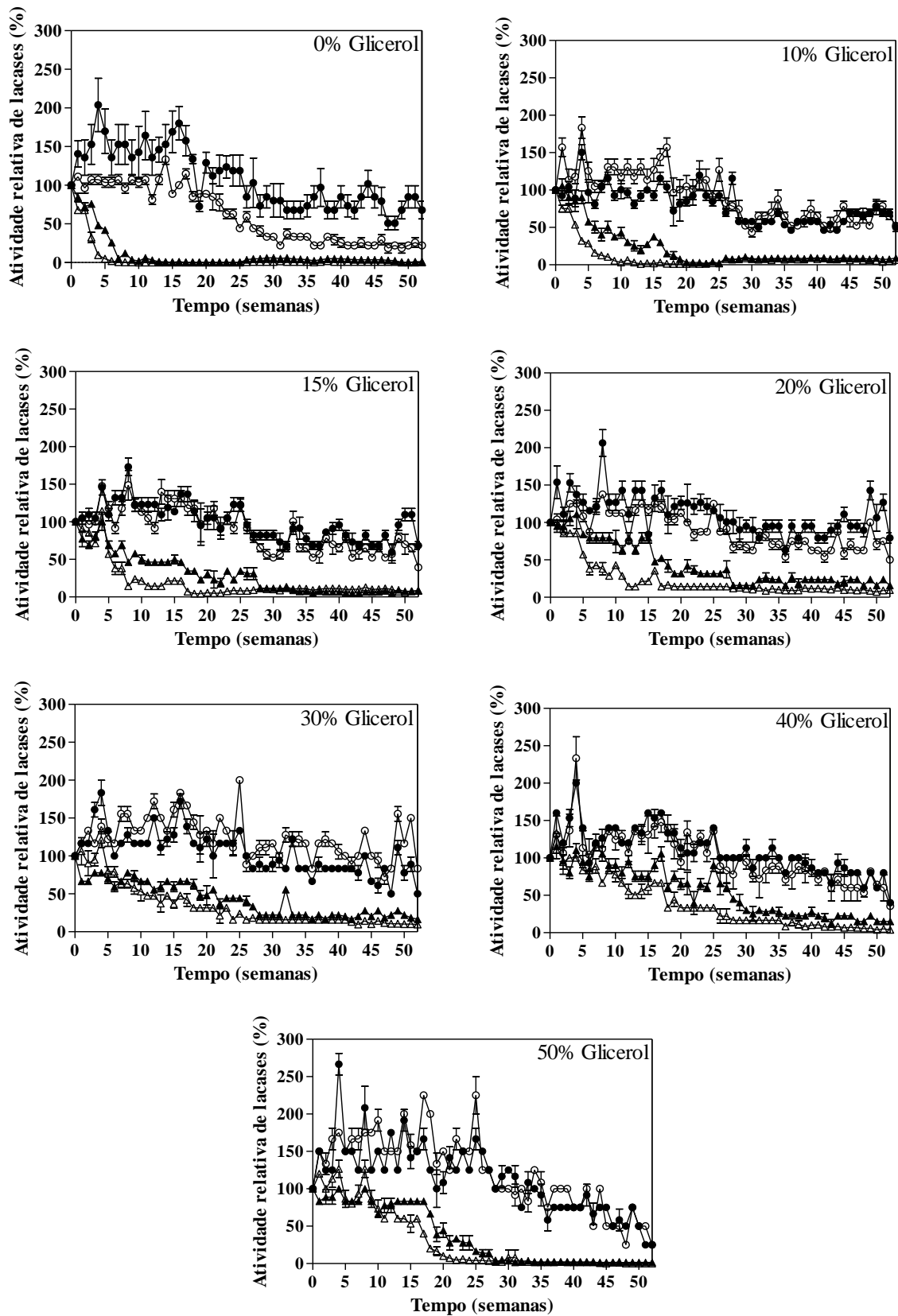


Figura 16. Atividade relativa de lacases em formulações contendo diferentes concentrações de glicerol em função do tempo, sob diferentes condições de armazenamento, por um período de 52 semanas. (●) 4°C em presença de KCl, (○) 4°C sem KCl, (▲) 28°C em presença de KCl e (Δ) 28°C sem KCl.

Logo após a adição de glicerol ao extrato concentrado de lacases, foi possível observar que houve um incremento na atividade enzimática, o que sugere que o glicerol favorece a atividade da enzima. Efeito semelhante também foi observado por Bagewadi *et al.* (2017) com lacases de *Trichoderma harzianum* HZN10, quando glicerol foi adicionado, e por Kumar *et al.* (2012), com incremento de cerca de duas vezes na atividade de lacases purificadas de *P. ostreatus* quando a concentração de glicerol passou de 1 para 10 mmol.L⁻¹. Rodríguez-Fernández *et al.* (2013) sugerem que este efeito de ativação ocorre devido à reorganização das cadeias de peptídeos da enzima, bem como devido à estabilização de suas estruturas terciárias e quaternárias, sendo esse processo é resultado das forças de interação criadas entre a enzima, o glicerol e a água. No presente trabalho, o aumento foi observado para todas as concentrações de glicerol testadas, tanto em presença quanto em ausência de KCl, sendo mantido por longos períodos de tempo em temperatura de 4°C. Entretanto, vale ressaltar que, mesmo no controle (sem glicerol), ocorreu um aumento na atividade de lacases ao longo das primeiras semanas, o que sugere que o próprio processo de concentração aumentou a atividade da enzima, possivelmente, após a retirada de compostos inibitórios.

Apesar dos resultados satisfatórios observados para todas as condições testadas mantidas a 4°C, a utilização de 30% (m/v) de glicerol em ausência de KCl resultou em atividade relativa mais elevada, com cerca de 105% de atividade após 40 semanas, e 83% da atividade inicial após as 52 semanas de estocagem. Resultados positivos para a manutenção de atividade enzimática através da utilização de glicerol também foram observados por Poletto *et al.* (2015b), que observaram que este mesmo composto foi capaz de preservar a atividade de pectinases por um período de 59 semanas, nas concentrações de 20 e 40% (m/m), também na presença de 2% (m/m) de KCl. Já Ban *et al.* (2017) observaram que a adição de somente glicerol apresentou efeito negativo sobre a atividade de uma enzima de ramificação de glucano produzida por *Geobacillus thermoglucosidasius*, tendo sido este efeito revertido após a adição de íons K⁺ e Na⁺ à solução, com aumento de 32% na atividade em presença de K⁺ e 10% (v/v) de glicerol.

Para a temperatura de 28°C, queda nas atividades relativas de lacases foi observada já nas primeiras cinco semanas, sendo mais acentuadas nas concentrações inferiores de glicerol, bem como na concentração de 50% (m/v). Para a condição controle (0% de glicerol e ausência de KCl), a atividade atingiu níveis não detectáveis na quinta semana, enquanto que, para a concentração de 10% (m/v) de glicerol, também em ausência de KCl, atividade nula foi observada na décima semana. Já a condição contendo somente 50% (m/v) de glicerol perdeu sua atividade após 23 semanas de exposição à temperatura de 28°C. Apesar de também terem

apresentado quedas prematuras da atividade, as condições na presença de KCl em 28°C perderam completamente sua atividade algumas semanas após as condições na ausência do sal, ocorrendo na oitava semana para a condição controle (0% de glicerol e presença de KCl) e na vigésima semana em presença de 10% (m/v) de glicerol. Para todas essas condições, a atividade de lacases permaneceu oscilando próxima a zero até o término do tempo de estocagem pré-determinado.

Para as demais condições mantidas à 28°C, atividades residuais foram observadas mesmo após as 52 semanas de estocagem, tendo sido obtido o melhor resultado nas concentrações de 20, 30 e 40% (m/v) de glicerol, que mantiveram cerca de 15% da atividade relativa inicial. A perda da atividade a 28°C já era esperada, uma vez que a exposição a esta temperatura mais elevada por longos períodos de tempo pode causar a inativação da enzima, tal como foi observado. Entretanto, vale ressaltar que a presença de glicerol e, principalmente, a combinação de glicerol com KCl, retardou esta perda de atividade, possivelmente, devido as suas propriedades estabilizantes e inibitórias para o crescimento de diversos microrganismos, que poderiam causar a contaminação do extrato armazenado. Estes resultados corroboram os obtidos por Kumar *et al.* (2012), que constataram a viabilidade da utilização de glicerol para a preservação destas enzimas. Contudo, apesar da queda da atividade após algumas semanas, sua manutenção nos extratos formulados durante esse período de tempo é importante para a logística operacional relativa ao transporte dessas enzimas para comercialização, permitindo que sejam transportadas em temperatura ambiente, como ocorre normalmente.

Um resumo dos dados obtidos após 40 semanas, bem como no tempo final, estão apresentados na Tabela 8, onde também está apresentada a análise estatística dos dados para cada concentração de glicerol, a partir da qual foram selecionadas as condições (temperatura e presença ou ausência de KCl) estatisticamente superiores de cada concentração para a realização de nova análise dos dados.

Tabela 8. Atividade relativa de lacases após 40 e 52 semanas de armazenamento em diferentes concentrações de glicerol, na presença ou na ausência de KCl, em temperaturas de 4°C e 28°C.

Condição			Atividade relativa de lacases (%)	
Glicerol (m/v)	T (°C)	KCl (m/v)	Semana 40	Semana 52
0%	4	2%	84,92 ^a ± 14,35	67,93 ^a ± 11,48
		-	25,92 ^b ± 6,41	22,22 ^b ± 0,00
	28	2%	4,81 ^c ± 0,32	1,20 ^c ± 0,08
		-	0,97 ^c ± 0,52	0,33 ^c ± 0,57
10%	4	2%	57,87 ^a ± 11,00	50,00 ^a ± 5,56
		-	65,47 ^a ± 5,15	52,38 ^a ± 4,12
	28	2%	9,04 ^b ± 0,82	9,04 ^b ± 0,82
		-	7,52 ^b ± 0,45	6,44 ^b ± 0,38
15%	4	2%	95,83 ^a ± 7,21	68,45 ^a ± 5,15
		-	65,47 ^b ± 5,15	39,28 ^b ± 3,09
	28	2%	6,94 ^c ± 0,48	8,10 ^c ± 0,56
		-	11,43 ^c ± 0,00	8,57 ^c ± 0,00
20%	4	2%	95,23 ^a ± 8,25	79,36 ^a ± 6,87
		-	62,50 ^b ± 0,00	50,00 ^b ± 0,00
	28	2%	23,81 ^c ± 2,06	15,87 ^c ± 1,37
		-	11,43 ^d ± 0,00	9,52 ^c ± 9,52
30%	4	2%	83,33 ^b ± 0,00	50,00 ^b ± 0,00
		-	105,56 ^a ± 9,62	83,33 ^a ± 0,00
	28	2%	22,22 ^c ± 0,00	16,67 ^c ± 0,00
		-	15,87 ^c ± 1,37	9,52 ^d ± 0,82
40%	4	2%	86,66 ^a ± 11,54	40,00 ^a ± 0,00
		-	82,22 ^a ± 1,92	35,55 ^a ± 3,85
	28	2%	27,77 ^b ± 5,99	15,08 ^b ± 1,37
		-	10,00 ^c ± 0,00	3,88 ^c ± 0,96
50%	4	2%	75,00 ^a ± 0,01	25,00 ^a ± 0,00
		-	75,00 ^a ± 0,00	25,00 ^a ± 0,00
	28	2%	1,67 ^c ± 0,01	1,67 ^b ± 0,01
		-	2,00 ^b ± 0,01	0,00 ^c ± 0,00

Legenda: letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa em nível de significância de 5% ($p < 0,05$) para análises em triplicata.

A partir dos resultados obtidos na Tabela 8, as condições significativamente superiores foram, então, comparadas entre si, sendo os resultados apresentados na Figura 17. Todas as condições analisadas foram a 4°C e, a partir dos dados, é possível confirmar que a condição de 30% (m/v) de glicerol sem adição de KCl é significativamente superior às demais condições testadas, em um intervalo de confiança de 95%, em ambas as semanas, sendo, portanto, utilizada nos testes de termoestabilidade, estabilidade frente ao pH e em presença de íons metálicos, realizados com o extrato formulado. Estes resultados também apontam a concentração de 30% (m/v) de glicerol como a mais indicada para uma formulação comercial da enzima.

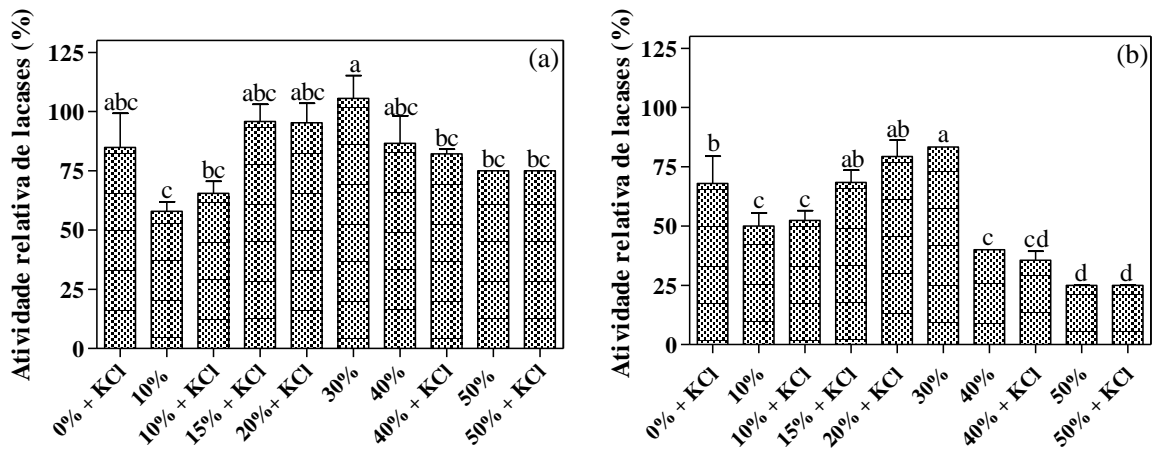


Figura 17. Atividade relativa de lacases das melhores condições selecionadas para a manutenção da estabilidade enzimática após 40 (a) e 52 (b) semanas de armazenamento em diferentes concentrações de glicerol, presença ou ausência de KCl, na temperatura de 4°C, onde os valores percentuais referem-se à concentração de glicerol em (m/v) e letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa em nível de significância de 5% ($p < 0,05$), para análises em triplicata.

A fim de verificar o efeito da adição de glicerol sobre a estabilidade de outras fenoloxidas presentes no extrato, lignina peroxidases (LiP), oxidases do álcool veratrílico (OAV), manganês peroxidases (MnP) e peroxidases totais também foram quantificadas, com análises realizadas a cada doze semanas, bem como na semana 52, sendo os resultados apresentados na Tabela 9, onde podem ser observados os picos de atividade de cada uma das enzimas, bem como seu respectivo tempo de ocorrência. Vale ressaltar que essas enzimas estão presentes em baixas unidades por volume no extrato utilizado, uma vez que o meio de cultivo foi otimizado para a produção de lacases.

A adição de glicerol não apresentou influência sobre a estabilidade de LiP e OAV, sendo os picos máximos de LiP observados no tempo zero (cerca de $0,1 \text{ U.mL}^{-1}$), perdendo completamente sua atividade no decorrer das semana para quase todas as condições testadas. Já para OAV, não foi detectada atividade da enzima no tempo zero, sendo observados alguns picos de atividade na temperatura de 28°C para o extrato concentrado e em presença de 10, 40 e 50% (m/v) de glicerol, enquanto que, para a temperatura de 4°C, foram observados picos de atividade da enzima na presença de 30 e 50% (m/v) de glicerol, em ausência de KCl.

Tabela 9. Picos de atividade observados para as enzimas lignina peroxidase, oxidases do álcool veratrílico, manganês peroxidases e peroxidases totais em formulações contendo diferentes concentrações de glicerol, em presença ou ausência de KCl, nas temperaturas de 4°C e 28°C.

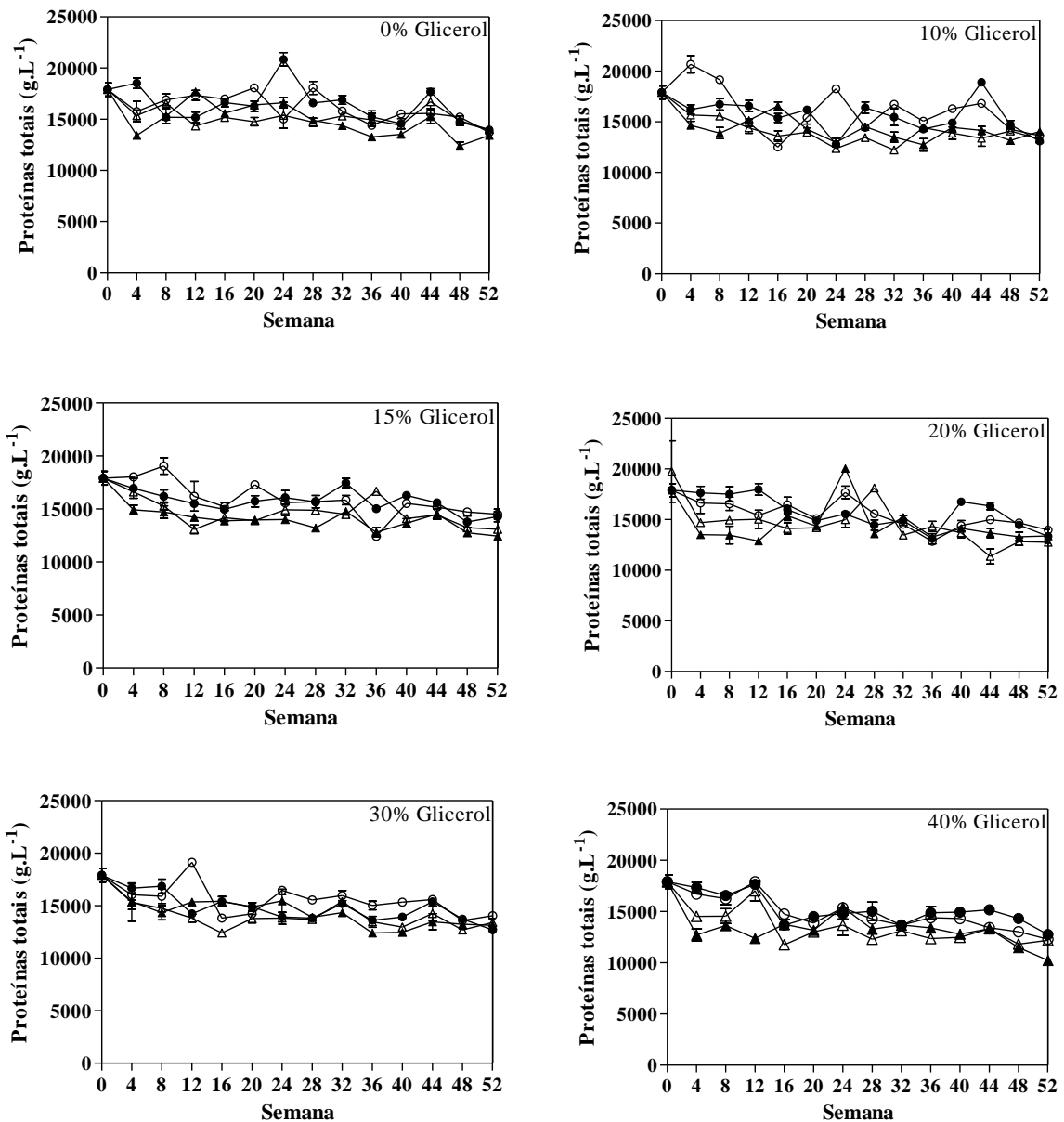
Condição					Enzima					
Glicerol (m/v)	T (°C)	KCl (m/v)	LiP (U.mL ⁻¹)	S	OAV (U.mL ⁻¹)	S	MnP (U.mL ⁻¹)	S	Per (U.mL ⁻¹)	S
0%	4	2%	0,096	0	ND	-	16,28	36	246,91	12
		-	0,096	0	ND	-	10,98	48	617,28	12
	28	2%	0,096	0	ND	-	18,29	48	37,04	52
		-	0,478	24	0,072	12	4,88	48	ND	-
10%	4	2%	0,096	0	ND	-	16,77	48	370,37	12
		-	0,191	24	ND	-	25,50	52	370,37	12
	28	2%	0,096	0/12	ND	-	41,53	24	12,34	24
		-	0,096	0/12	0,358	-	18,72	24	37,04	12
15%	4	2%	0,096	0/24	ND	-	12,02	24	370,37	12
		-	0,096	0	ND	-	22,56	48	370,37	12/52
	28	2%	0,096	0	ND	-	32,69	24	ND	-
		-	0,096	0	ND	-	19,15	24	37,04	24
20%	4	2%	0,096	0	ND	-	8,54	24	246,91	12/52
		-	0,096	0	ND	-	16,95	24	246,91	12
	28	2%	0,096	0	ND	-	12,50	24	185,18	36
		-	0,096	0/24	ND	-	16,77	24	ND	-
30%	4	2%	0,096	0	ND	-	40,43	24	246,91	24
		-	0,096	0	0,143	12	17,87	52	123,45	12/24
	28	2%	0,096	0	ND	-	29,33	24	123,45	24
		-	0,096	0	ND	-	9,75	48	370,04	24
40%	4	2%	0,096	0	ND	-	9,57	24	370,37	24
		-	0,096	0	ND	-	4,88	48	493,83	12
	28	2%	0,191	24	ND	-	14,21	24	ND	-
		-	0,096	0/12	0,143	12	24,70	48	185,18	36
50%	4	2%	0,096	0	ND	-	7,93	24	123,46	24/52
		-	0,096	0/12	0,072	12	30,86	24	246,91	48
	28	2%	0,096	0/12	ND	-	6,71	48	74,07	36
		-	0,096	0	0,072	12	1,83	48	24,70	24/48

Legenda: LiP – Lignina peroxidase; OAV – Oxidases do álcool veratrílico; MnP- Manganês peroxidase; Per – Peroxidases totais; S – Tempo em semanas; ND – Atividade não observada.

Para a enzima MnP, a adição de glicerol teve efeito semelhante ao observado para lacases, com incremento da atividade após sua adição. Entretanto, este incremento foi mantido apenas em algumas condições, com destaque para a temperatura de 4°C em ausência de KCl, onde os picos de atividade foram observados após 48 e 52 semanas para a maioria das concentrações de glicerol testadas, com exceção de 20 e 50% (m/v) de glicerol, condições que não resultaram em boa estabilidade para a enzima. O pico máximo de atividade para MnP foi observado em presença de 10% (m/v) de glicerol e 2% (m/v) de KCl em temperatura de 28°C, atingindo 41,5 U.mL⁻¹, porém, após 24 semanas de estocagem, perdendo sua atividade após este período. Peroxidases totais também tiveram sua atividade aumentada após a adição de glicerol, porém sua estabilidade foi inferior à apresentada por MnP, com picos máximos atingidos após 12 e 24 semanas, para a maioria das condições testadas, com destaque para a concentração de 50% (m/v) de glicerol, que se apresentou mais estável que as demais em

ambas as temperaturas, bem como em presença ou ausência de KCl, com atividade de 296 U.mL⁻¹ após 48 semanas armazenadas na temperatura de 4°C em ausência de KCl.

Com o intuito de elucidar as causas que levam à queda na atividade relativa das enzimas ao longo do tempo, a concentração de proteínas solúveis totais e a atividade proteolítica também foram quantificadas durante o período de armazenamento. As análises foram realizadas em intervalos de tempo de quatro semanas e os resultados obtidos nas diferentes condições testadas estão apresentados nas Figuras 18 e 19, respectivamente.



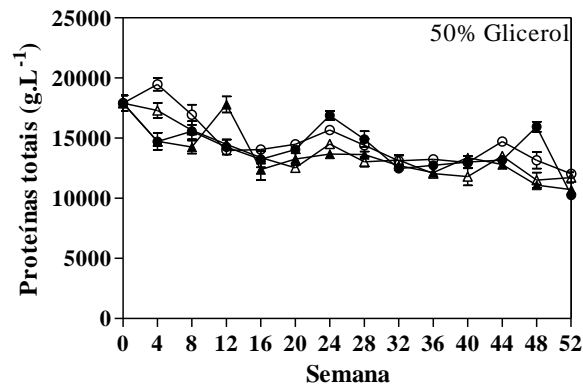


Figura 18. Concentração de proteínas solúveis totais em formulações contendo diferentes concentrações de glicerol em função do tempo, sob diferentes condições de armazenamento, por um período de 52 semanas. (●) 4°C em presença de KCl, (○) 4°C sem KCl, (▲) 28°C em presença de KCl e (△) 28°C sem KCl.

A concentração de proteínas presentes nos extratos formulados apresentou-se relativamente estável ao longo das 52 semanas em que os testes foram realizados, enquanto que a atividade de proteases apresentou comportamento semelhante às lacases, peroxidases totais e manganês peroxidases, mostrando aumento de atividade após a adição de glicerol. Entretanto, este incremento foi aumentando ao longo do tempo, propiciando as maiores atividades proteolíticas nos tempos finais de estocagem. Este aumento na atividade de proteases pode ter contribuído com a degradação das lacases, bem como das demais enzimas, ocasionando, assim, as perdas de atividade observadas.

Outro fator interessante observado é que a temperatura, bem como a presença ou a ausência de KCl na formulação, não apresentaram efeitos relevantes sobre a atividade de proteases, exceto para o controle (0% de glicerol), onde apenas as amostras a 4°C mantiveram sua atividade. Estes resultados sugerem que a atividade proteolítica se mantém em baixas temperaturas, sem a presença de aditivos, e, quando glicerol é adicionado ao extrato, a atividade se mantém mesmo em temperatura ambiente. Diante disso, o desenvolvimento de processos que possam remover as proteases do meio se torna bastante interessante, tendo em vista que a ausência destas enzimas pode resultar em uma maior estabilidade das preparações enzimáticas de uma forma geral.

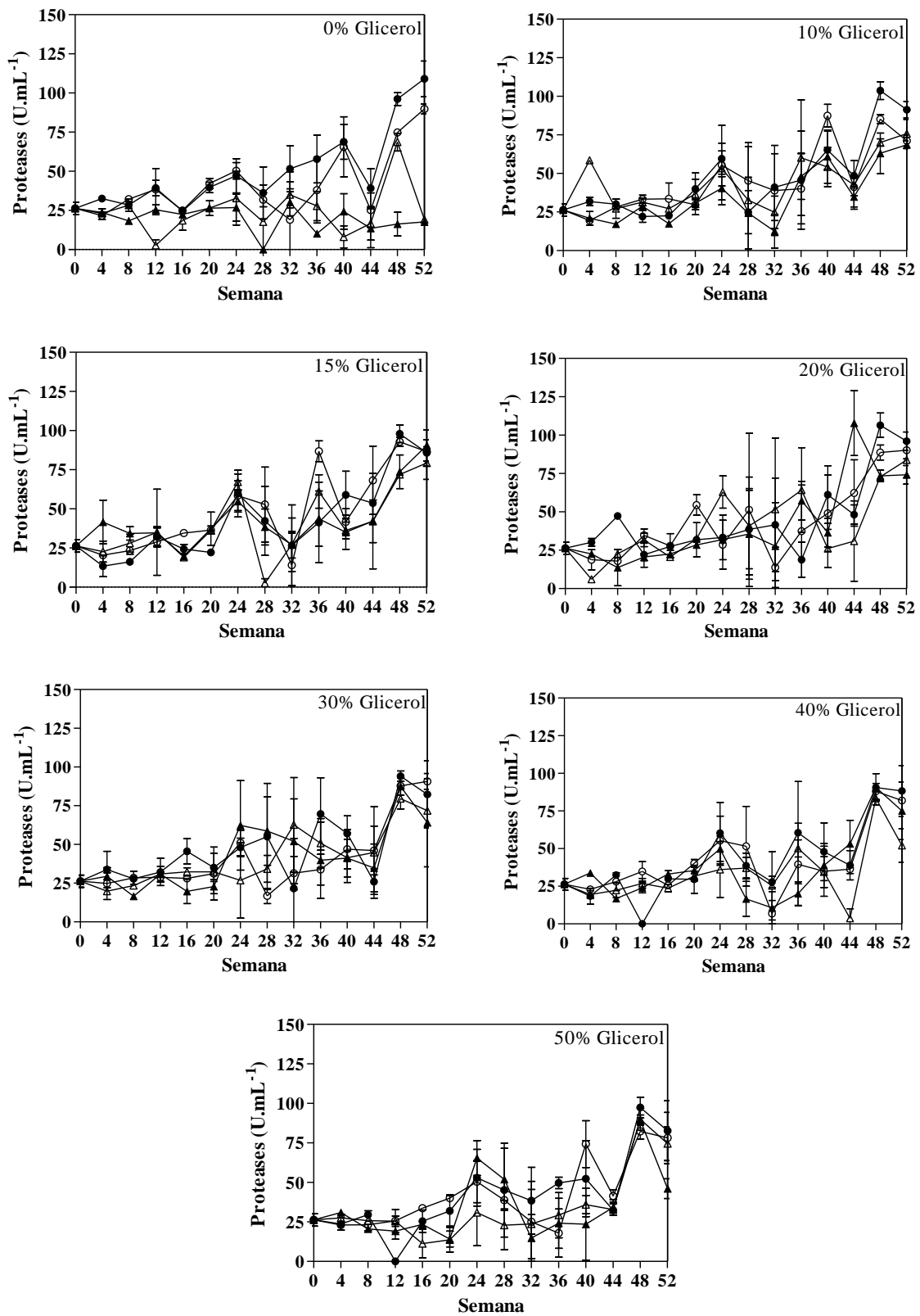


Figura 19. Atividade de proteases em formulações contendo diferentes concentrações de glicerol em função do tempo, sob diferentes condições de armazenamento, por um período de 52 semanas. (●) 4°C em presença de KCl, (○) 4°C sem KCl, (▲) 28°C em presença de KCl e (Δ) 28°C sem KCl.

Os resultados observados no presente trabalho indicam que, apesar do efeito positivo sobre a atividade da enzima, a utilização de aditivos como estabilizantes em formulações enzimáticas de lacases de *P. sajor-caju* PS-2001 estaria condicionada, à longo prazo, ao seu armazenamento em baixas temperaturas. A concentração de 30% (m/v) de glicerol foi a mais indicada, uma vez que apresentou a maior estabilidade e não resultou em diluição muito elevada do extrato na formulação, como no caso de concentrações superiores, necessitando de menores volumes do produto em sua aplicação.

4.7.2 Estabilidade e atividade de lacases frente à temperatura

A estabilidade térmica de uma enzima é um fator de extrema importância quando se leva em conta sua futura aplicação. Segundo Iyer & Ananthanarayan (2008), a presença de calor desnatura enzimas através da quebra das ligações de hidrogênio, resultando em uma estrutura altamente desordenada. Bryjak & Rekuć (2010) sugerem que algumas moléculas presentes no extrato bruto podem ser potenciais estabilizadores ou desestabilizadores da enzima, sendo que sua remoção pode afetar a tolerância térmica das mesmas. Diante disto, a termoestabilidade dos extratos de lacases concentrado e formulado com 30% (m/v) de glicerol foi avaliada durante um período de 96 horas, sem nenhum controle de pH. Os resultados estão apresentados na Figura 20, representados como atividade relativa em relação à observada no início do processo.

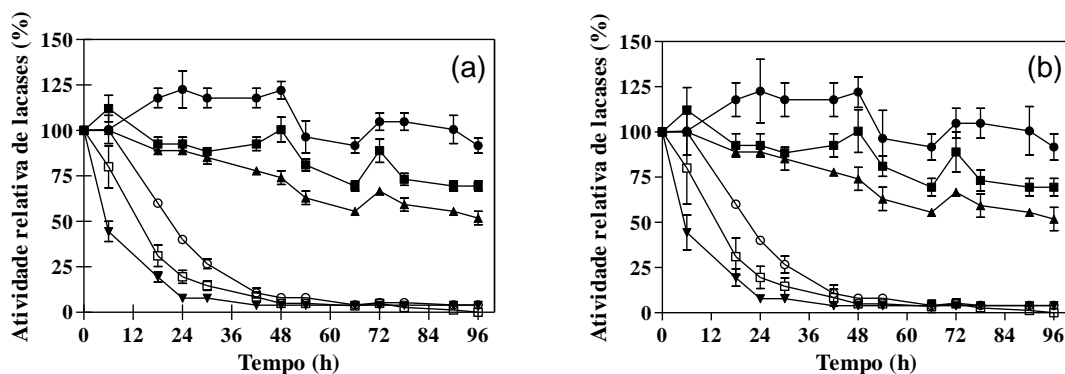


Figura 20. Termoestabilidade do extrato concentrado (a) e formulado (b) de lacases em função do tempo, sob diferentes temperaturas, durante um período de 96 horas. (●) 25°C, (■) 30°C, (▲) 35°C, (○) 40°C, (□) 45°C e (△) 50°C.

Para o extrato concentrado, estabilidade superior foi observada à 25°C, mantendo cerca de 90% de estabilidade ao término do tempo estimado. As temperaturas de 30 e 35°C

resultaram em estabilidade moderada das lacases, com cerca de 75 e 56% de atividade relativa mantida após 96 horas, respectivamente. Em temperaturas superiores, as lacases apresentaram quedas bruscas em sua atividade já nas primeiras horas, apresentando menos de 50% da atividade após 24 horas. Bettin *et al.* (2011) também avaliaram a termoestabilidade de lacases produzidas por *P. sajor-caju* PS-2001, porém no extrato bruto e em pH 3,2, observando estabilidade superior nas temperaturas de 20 e 30°C, com quedas drásticas na atividade nas temperaturas de 50 e 60°C, nas primeiras horas de processo. Os resultados mostram que o processo de concentração não interfere na termoestabilidade das lacases, uma vez que o extrato concentrado apresentou termoestabilidade semelhante ao extrato bruto.

Os resultados obtidos no presente trabalho também estão de acordo com outros relatados na literatura para extratos purificados de lacases. Em comparação, lacases purificadas de *G. lucidum* mantidas em pH 5 permaneceram estáveis a 30°C, porém, a estabilidade diminuiu a 40°C e caiu drasticamente em temperaturas superiores a 60°C (Manalavan *et al.*, 2013). Yang *et al.* (2013) relataram que lacases purificadas de *Shiraia* sp. SUPER - H168 mantiveram sua atividade após incubadas por três horas em temperaturas de até 50°C, porém, sua estabilidade foi perdida rapidamente em temperaturas superiores a 60°C. Bagewadi *et al.* (2017) avaliaram a estabilidade térmica de lacases de *T. harzianum* HZN10, observando que as mesmas mantiveram 90% de sua atividade a 50°C, porém em quatro horas de incubação. A termoestabilidade de lacases purificadas de *P. ostreatus* foi analisada por Kumar *et al.* (2012), que observaram que a enzima permaneceu estável a 25°C, perdeu 50% de sua atividade após 14 horas de incubação a 37°C, após oito horas a 45°C, decaindo ainda mais drasticamente a 60°C. Bryjak & Rekuć, (2010) observaram que a tolerância térmica de lacases de *C. unicolor* diminuiu gradualmente após consecutivas etapas de purificação por membranas, preservando 20% da atividade inicial após duas horas de incubação a 70°C. Lacases de *P. cinnabarinus* foram inativadas a temperatura de 60°C após uma hora, porém, mantiveram 50% da sua atividade após incubação a 80°C pelo período de duas horas e permaneceram ativas a 37°C durante 245 dias (Schliephake *et al.*, 2000). Já uma lacase purificada de *Trametes orientalis* permaneceu estável em temperaturas inferiores a 50°C, mantendo cerca de 80% de sua atividade máxima após duas horas de incubação, no entanto, em temperaturas superiores, sua atividade relativa foi reduzida, tornando-se nula em 100°C, sendo que este declínio da atividade pode ter sido causado pela destruição da enzima sob o calor extremo (Zheng *et al.*, 2017).

Com relação ao extrato formulado com 30% (m/v) de glicerol, os resultados foram semelhantes aos observados para o extrato concentrado, sendo que a temperatura de 25°C

apresentou 91% de atividade relativa após 96 horas, enquanto que as temperaturas de 30 e 35°C mantiveram 70 e 52%, respectivamente, de sua atividade relativa ao término do processo, tendo sido estes valores levemente inferiores aos observados para o extrato concentrado. Quanto às demais temperaturas testadas, novamente, foram observadas quedas bruscas em sua atividade logo nas primeiras horas de processo. Os resultados obtidos indicam que a presença de glicerol no extrato não interfere na termoestabilidade das lacases. Estes dados diferem dos observados por Ban *et al.* (2017), que observaram aumento na termoestabilidade de uma enzima de ramificação de 1,4- α -glucano em presença de 5 a 20% (v/v) de glicerol, chegando a incrementar 3,5 vezes a atividade residual em presença de 10% (v/v) do aditivo. Já Poletto *et al.* (2015b) também não observaram aumento na termoestabilidade de pectinases produzidas por *A. niger* formuladas com glicerol, quando comparada ao extrato concentrado.

A atividade frente à temperatura das lacases concentradas e formuladas com glicerol também foi avaliada, utilizando tampão fosfato de sódio em pH 5. Os resultados obtidos estão apresentados na Figura 21, sendo referentes à atividade relativa de lacases no controle, realizado a 25°C, sendo esta condição a utilizada no procedimento padrão de determinação de atividade de lacases.

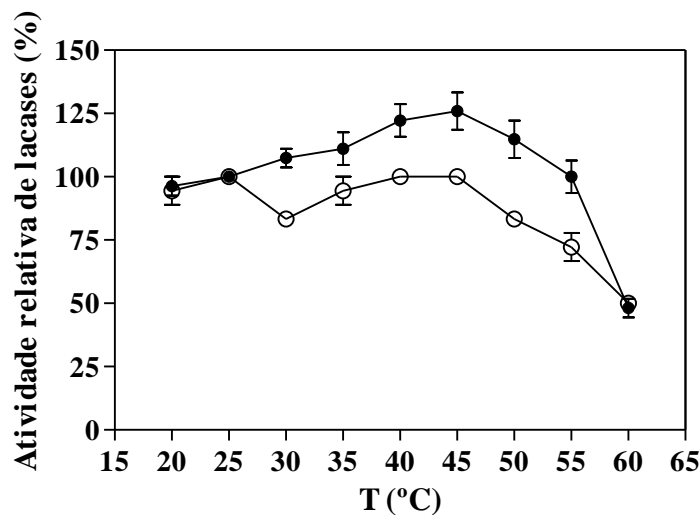


Figura 21. Atividade de lacases dos extratos concentrado (●) e formulado com 30% (m/v) de glicerol (○) em função da temperatura.

Atividade superior foi observada em temperatura de 45°C para o extrato concentrado, com 126% de atividade em relação à condição controle, estando muito próxima às observadas em 40 e 50°C, enquanto que a temperatura de 60°C apresentou a menor atividade enzimática (Figura 21). Já para o extrato formulado com 30% (m/v) de glicerol, apesar da curva de

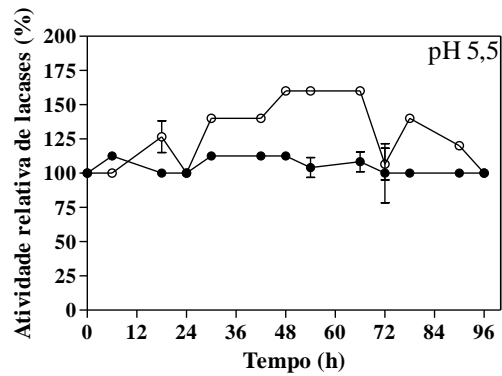
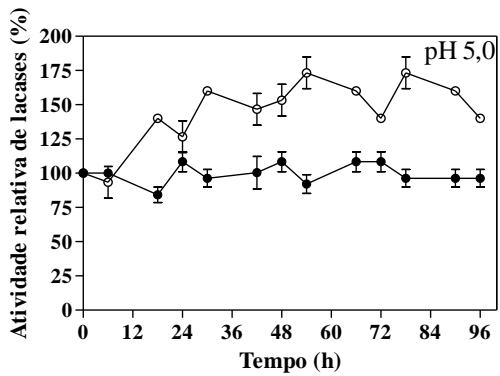
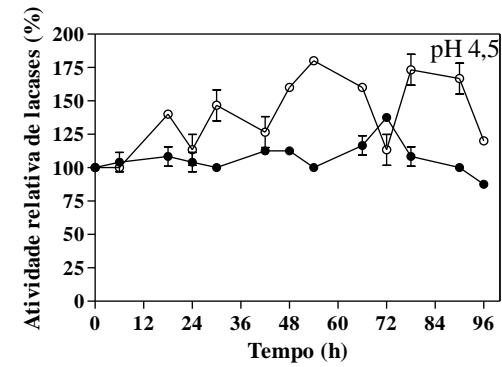
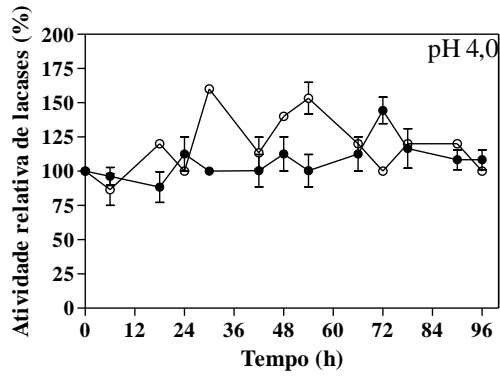
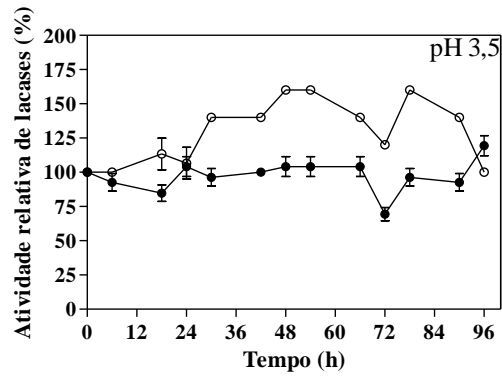
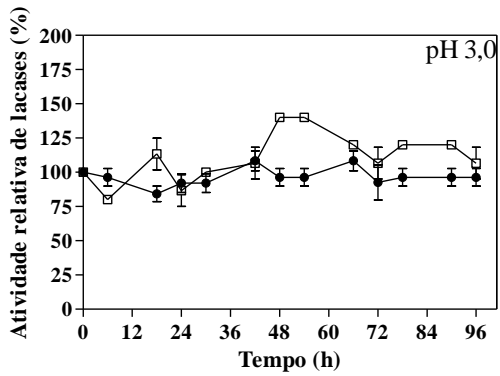
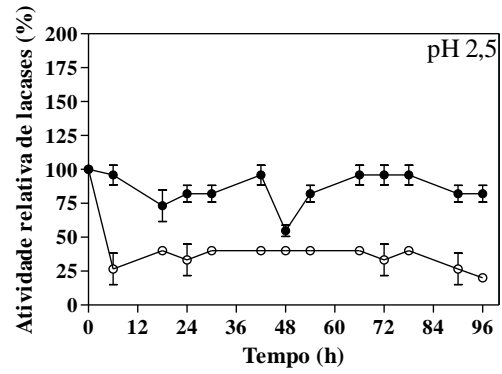
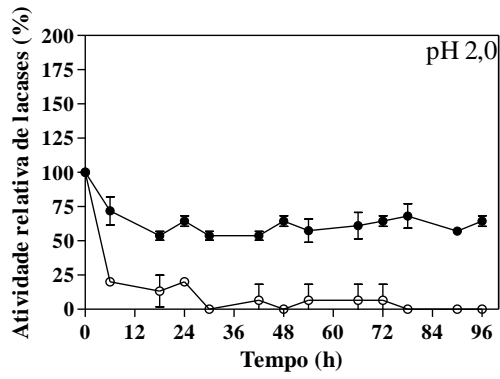
atividade apresentar um perfil semelhante ao extrato concentrado, a atividade máxima observada foi inferior, também apresentando queda acentuada após 50°C, indicando que a presença de glicerol também não apresentou efeitos relevantes sobre a atividade da enzima.

Os resultados do presente trabalho foram semelhantes aos obtidos por Bettin *et al.* (2011), que verificaram atividade máxima de lacases brutas de *P. sajor-caju* PS-2001 a 50°C, porém em pH 3,2 utilizando tampão Mc'Ilvaine (fosfato de sódio / ácido cítrico). Lacases purificadas de *P. ostreatus* apresentaram uma temperatura ótima de reação de 45°C (Kumar *et al.*, 2012). Temperatura semelhante também foi observada por Manalavan *et al.* (2013), que determinaram a temperatura ótima de lacases purificadas de *G. lucidum* a 55°C em tampão acetato de sódio pH 5, reduzindo drasticamente a atividade em temperaturas superiores. A temperatura ideal observada para lacases de *T. harzianum* HZN10 foi 50°C, sendo que sua atividade relativa manteve-se em cerca de 90% em temperaturas de 55 e 60°C (Bagewadi *et al.*, 2017).

Entretanto, de acordo com Songulashvili *et al.* (2016), a temperatura ótima da maioria das lacases fúngicas está entre 50 e 80°C, sendo que, para *C. gallica* 1184, a temperatura ótima observada foi de 70°C, decaindo em temperaturas abaixo de 60°C. Elevada temperatura ótima de lacases purificadas também foram observadas por Yang *et al.* (2013) para *Shiraia* sp. SUPER - H168, sendo de 60°C com o substrato ABTS. Zheng *et al.* (2017) constataram que a temperatura ótima de uma lacase purificada de *T. orientalis* foi de 80°C, sendo mantida uma atividade de cerca de 47% em temperatura de 100°C.

4.7.3 Estabilidade e atividade de lacases frente ao pH

A estabilidade frente ao pH de lacases produzidas por *P. sajor-caju* PS-2001 em processo submerso, ainda em sua forma bruta, foi estudada por Bettin *et al.* (2011), que constataram maior estabilidade da enzima utilizando tampão Mc'Ilvaine 3,2, em temperaturas de 20 e 30°C, enquanto que em pH 5,0 (em tampões acetato de sódio e citrato de sódio), a perda de atividade foi mais acentuada. No presente trabalho, tampão Mc'Ilvaine (fosfato de sódio / ácido cítrico) também foi utilizado para verificar a estabilidade de lacases, porém, após a concentração e formulação das enzimas, com escala de pH variando de 2 a 8, à 25°C, a fim de verificar se o processo de concentração e a posterior adição de glicerol e KCl possuem influência sobre a atividade. Os resultados estão apresentados na Figura 22, sendo a atividade de lacases apresentada como atividade relativa em relação à observada no início do processo.



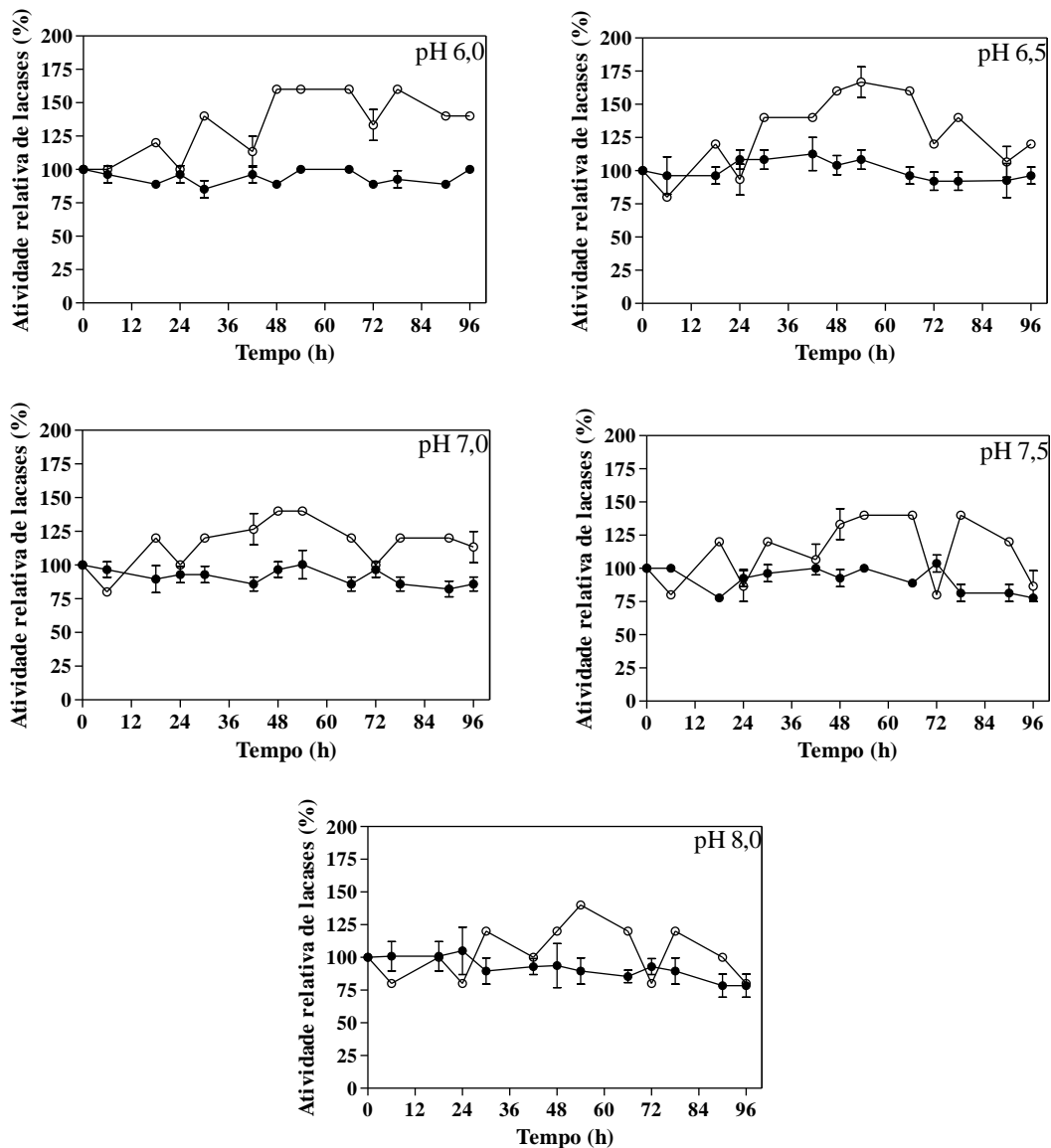


Figura 22. Atividade relativa dos extratos concentrado (●) e formulado (○) de lacases em função do tempo, sob diferentes valores de pH em temperatura de 25°C por um período de 96 horas.

O extrato concentrado de lacases apresentou boa estabilidade para uma ampla faixa de pH, variando entre 2,5 e 7, retendo entre 85 (pH 2,5) e 112% (pH 4) de sua atividade inicial após 96 horas. Já o pH 2 resultou na menor estabilidade da enzima, que manteve apenas 60% de sua atividade inicial, enquanto que, para os valores de pH de 7,5 e 8, 77% da atividade inicial foi mantida após decorridas 96 horas. Estes resultados estão de acordo com Yang *et al.* (2013) que verificaram que lacases purificadas de *Shiraia* sp. SUPER - H168 mantiveram 80% de sua atividade em valores de pH variando entre 6 e 7, após 96 horas. Já lacases purificadas de *P. ostreatus* incubadas a 40°C mantiveram 97% de sua atividade em pH 6, porém após cinco horas de incubação, enquanto que, em pH 8, a estabilidade foi bastante reduzida, com 22% de sua atividade inicial (Kumar *et al.*, 2012). Para lacases purificadas de

G. lucidum, Manalavan *et al.* (2013) observaram que a estabilidade foi mantida para uma ampla gama de valores de pH, variando entre 4 e 7,5. Extrato purificado de lacases de *T. orientalis* mostrou-se altamente estável em valores de pH 4 e 5, retendo mais de 80% de sua atividade após 72 horas, com estabilidade significativamente reduzida para 19,49% em pH 6, fato que pode ser explicado pela troca de ligações dissulfeto que ocorrem em condições quase neutras e alcalinas (Zheng *et al.*, 2017).

Quanto aos resultados obtidos para o extrato formulado, é possível observar que a adição de glicerol não apresentou grande influência sobre a atividade relativa de lacases em seis valores de pH testados (3, 3,5, 4, 5,5, 7,5 e 8), permanecendo próxima ou igual à observada para o extrato concentrado após as 96 horas de processo. Entretanto, para os valores de pH mais ácidos, a estabilidade diminuiu com a presença de glicerol, perdendo completamente sua atividade em pH 2 e mantendo apenas 20% de sua atividade em pH 2,5. Já para os demais valores de pH, a presença do aditivo resultou em um incremento na estabilidade da enzima, chegando a picos de 140% de atividade relativa em pH 5 e 6, e 120% em pH 4,5 e 6,5.

A atividade de lacases frente ao pH também foi avaliada, sendo apresentada como atividade relativa em relação à condição controle (pH 5), utilizada no procedimento padrão de análise de lacases. Os resultados estão apresentados na Figura 23.

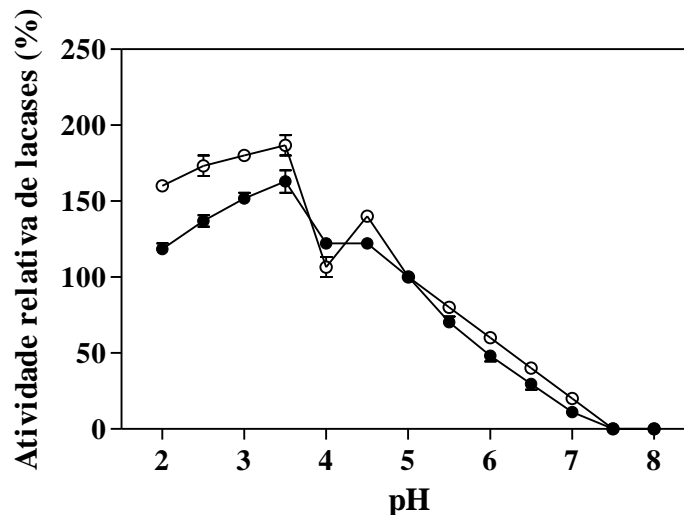


Figura 23. Atividade de lacases dos extratos concentrado (●) e formulado com 30% (m/v) de glicerol (○) em função do pH.

Bettin *et al.* (2011) observaram que, para o extrato bruto de lacases produzidas por *P. sajor-caju* PS-2001, existem três valores de pH considerados ótimos para a atividade da enzima utilizando ABTS como substrato, sendo eles 2,4, 3,2 e 4,4, decrescendo

consideravelmente acima de pH 5. No presente estudo, após a concentração e purificação parcial destas enzimas, o pico de atividade foi obtido em pH 3,5, com 163% de atividade em relação ao controle, decaindo consideravelmente acima deste valor, enquanto que valores inferiores apresentaram atividade de lacases superior em relação aos mesmos. As lacases foram totalmente inativadas em pH 7,5 e 8. A formulação contendo 30% (m/v) de glicerol apresentou perfil semelhante, porém, a adição de glicerol apresentou efeito positivo sobre a atividade de lacases, alcançando um pico de atividade de 186% em relação ao controle em pH 3,5 e atividades relativas de 173, 160 e 180% para os valores de pH de 2, 2,5 e 3, respectivamente.

Resultados semelhantes foram observados por Songulashvili *et al.* (2016), que determinaram o pH ótimo para lacases de *C. gallica* 1184 situado entre 2,5 e 3, perdendo completamente a atividade em pH 8. Para lacases purificadas de *P. ostreatus*, o pH ótimo de reação foi 4 (Kumar *et al.*, 2012), mesmo valor observado por Zheng *et al.* (2017) para uma lacase de *T. orientalis*, sendo que esta enzima foi mais ativa numa faixa de pH variando entre 2 e 5, valor a partir do qual a atividade decaiu. Já para lacases purificadas de *G. lucidum*, o valor ótimo de pH determinado para atividade da enzima foi 5 (Manavalan *et al.*, 2013). Yang *et al.* (2013) determinaram o valor ótimo de pH de lacases purificadas de *Shiraia* sp. SUPER - H168 em 3, utilizando ABTS como substrato. Entretanto, lacases purificadas de *T. harzianum* HZN10 apresentaram atividade ótima em pH 6, decaindo em pH mais alto, sendo esta queda devida, possivelmente, à mudança na forma iônica do sítio ativo da enzima, bem como na sua estrutura tridimensional (Bagewadi *et al.*, 2017).

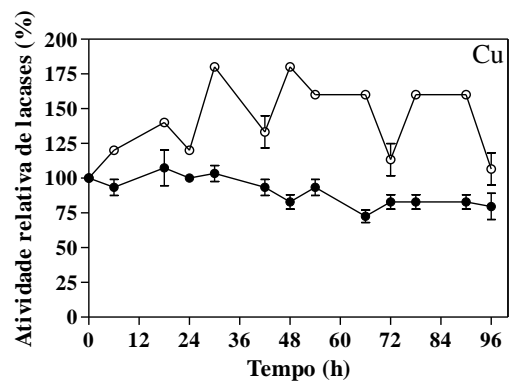
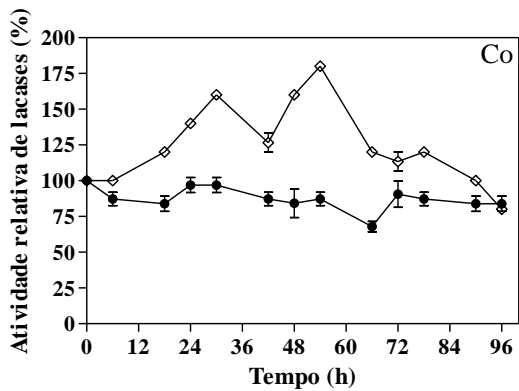
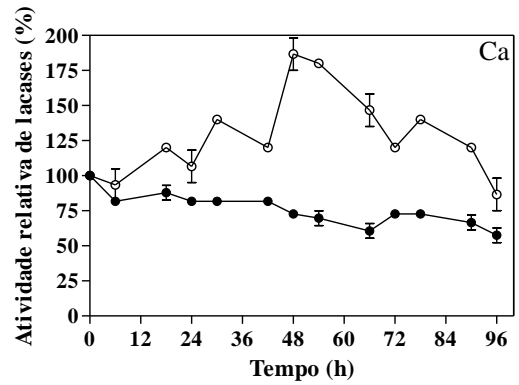
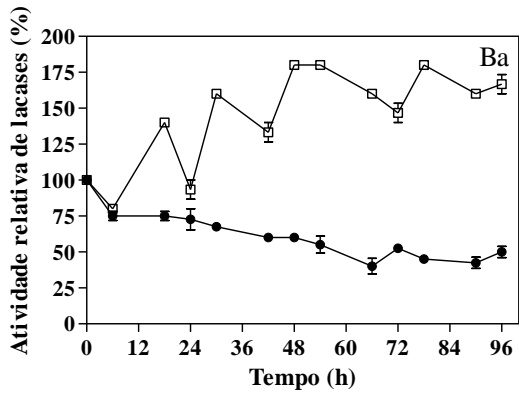
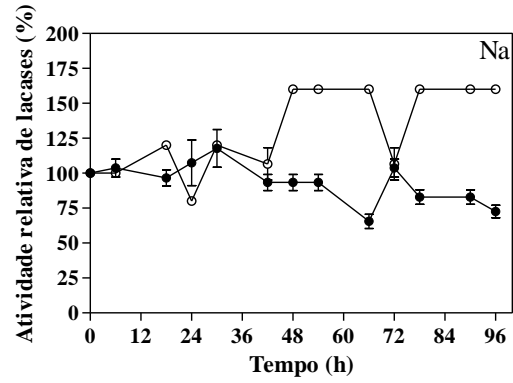
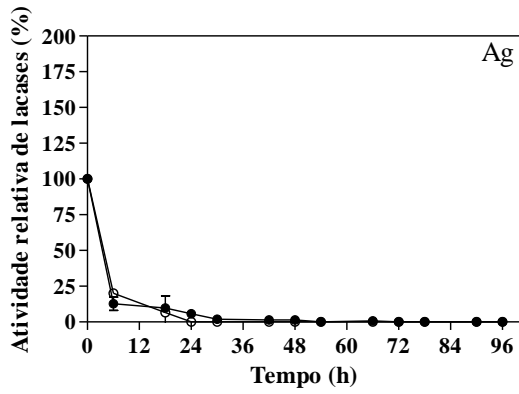
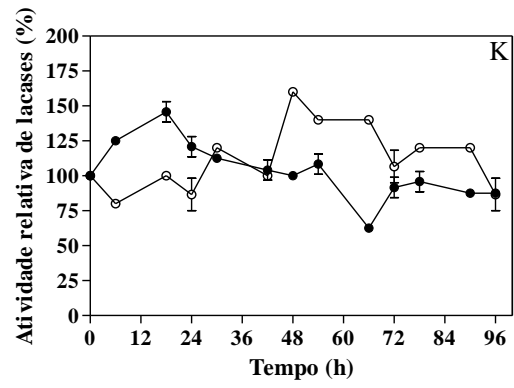
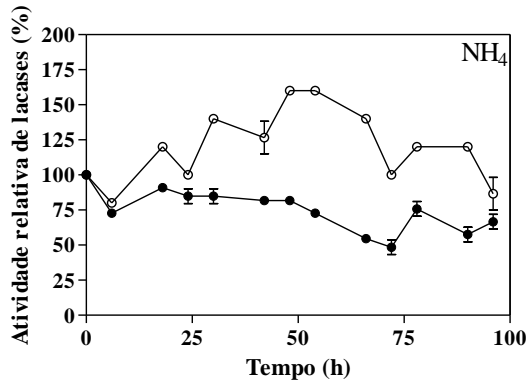
4.7.4 Estabilidade e atividade de lacases frente a íons

Visando sua posterior utilização em processos industriais e de tratamento de efluentes, a estabilidade de lacases frente a diversos íons é de extrema importância, visto que estas moléculas podem estar presentes em grande quantidade nos meios reacionais. Kumar *et al.* (2012) relatam que efluentes têxteis são conhecidos por seus elevados teores de sais e que, portanto, o efeito de diferentes íons metálicos é vital para o correto funcionamento da enzima, uma vez que se os mesmos estiverem presentes em quantidade elevada, a degradação enzimática do substrato poderá não ocorrer. No presente estudo, a concentração de 10 mmol.L⁻¹ de quinze diferentes íons, em sua maioria metálicos, foi testada. Os resultados obtidos são apresentados na Figura 24, em termos de atividade relativa em relação à atividade

inicial, tanto para o extrato concentrado, quanto para o formulado.

Para o extrato concentrado, a presença de Fe^{2+} não afetou a estabilidade das lacases concentradas durante o período de 96 horas, enquanto que a presença de Ag^+ resultou em uma queda de 90% da atividade inicial logo nas seis primeiras horas de processo, ocasionando sua completa inibição após 48 horas. Baixo efeito sobre a estabilidade do extrato concentrado foi observado para os íons Co^{2+} , Cu^{2+} , Mn^{2+} e K^+ , que mantiveram sua atividade relativa superior a 80% após decorridas 96 horas de incubação. Estabilidade moderada foi observada para os íons NH_4^+ , Na^+ , Sr^{2+} , Mg^{2+} , Ni^{2+} , Ti^{2+} e Zn^{2+} que mantiveram entre 60 e 80% da atividade inicial de lacases, enquanto que, para os íons de Ca^+ , Ba^{2+} e Cr^{2+} , a queda na estabilidade foi mais acentuada, apresentando cerca de 50% da atividade inicial após 96 horas em contato com os mesmos.

A adição de 30 % (m/v) de glicerol ao extrato concentrado ocasionou um aumento na atividade relativa após algumas horas de processo, sendo que este incremento na atividade foi mantido até o término das 96 horas para a maioria dos íons testados, com destaque para os extratos na presença dos íons Ba^{2+} , Na^+ e Zn^{2+} , que apresentaram uma atividade relativa final de 167, 160 e 153%, respectivamente, bem como para os íons Mn^{2+} e Ti^{2+} , com cerca de 146% de atividade relativa após 96 horas. Já para os íons NH_4^+ , K^+ , Co^{2+} , Fe^{2+} , Cr^{2+} e Ag^+ , a presença do aditivo não resultou em diferenças relevantes na estabilidade da enzima em comparação com o extrato concentrado, apresentando, novamente, queda acentuada na atividade quando em presença do íon prata logo nas primeiras horas de processo. Apesar disso, os resultados apresentam-se favoráveis à utilização do extrato formulado em processos cujas soluções contenham íons, uma vez que a presença do glicerol torna a enzima mais estável.



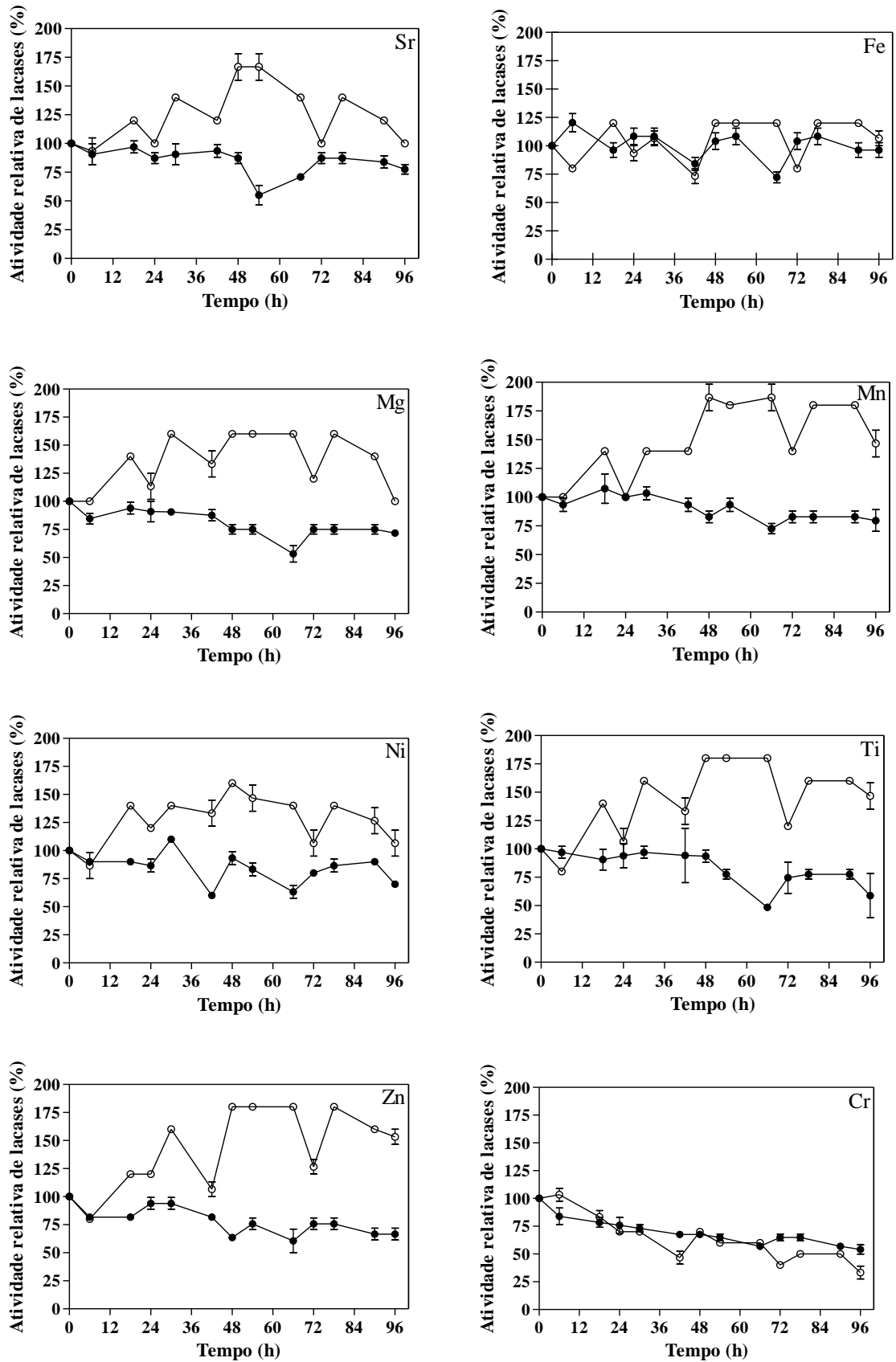


Figura 24. Atividade relativa dos extratos concentrado (●) e formulado (○) de lacases em função do tempo, em meios contendo diferentes íons, em temperatura de 25°C, por um período de 96 horas.

A atividade enzimática dos extratos concentrado e formulado na presença destes íons também foi avaliada, sendo os resultados apresentados na Figura 25. Para o extrato concentrado, todas as atividades foram inferiores ao controle, realizado em presença de água destilada, porém, para os íons NH_4^+ , Mn^{2+} e Ti^{2+} , a queda na atividade foi menos acentuada, mantendo cerca de 88, 85 e 93%, respectivamente, da atividade presente no controle, resultados semelhantes aos observados por Kumar *et al.* (2012), que constataram aumento da atividade de lacases produzidas por *P. ostreatus* na presença de 2 mmol.L^{-1} de íons Mn^{2+} .

A adição de glicerol proporcionou um aumento na atividade de lacases para todos os íons, em relação ao extrato concentrado, demonstrando que este composto apresenta um efeito ativador da enzima, mesmo em presença de metais, o que pode ser interessante para sua utilização em tratamento de efluentes têxteis, onde concentrações variadas desses íons podem ser encontradas. Nesta condição, a atividade enzimática foi superior ao controle na presença do íon K^+ , atingindo 120%, enquanto que, para os íons NH_4^+ , Ba^{2+} , Cu^{2+} e Ni^{2+} , 100% da atividade relativa foi mantida.

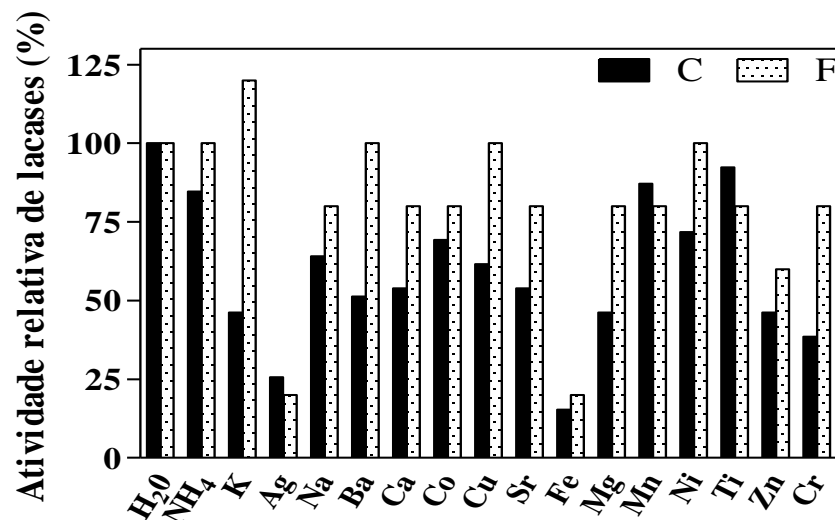


Figura 25. Atividade relativa de lacases dos extratos concentrado (C) e formulado com 30% (m/v) de glicerol (F) em meios contendo diferentes íons.

Efeitos inibitórios mais elevados foram observados para Fe^{2+} e Ag^{2+} , tanto para o extrato concentrado, quanto para o formulado, apresentando atividades relativas inferiores a 26%. Este efeito inibitório já era esperado para Ag^{2+} , uma vez que este íon também afetou drasticamente a estabilidade da enzima (Figura 21), entretanto, o mesmo não era esperado para Fe^{2+} , que não mostrou efeito negativo sobre a estabilidade (Figura 21). Kumar *et al.* (2012) relataram completa inibição de lacases em presença de 10 mmol.L^{-1} de Hg^{2+} , Pb^{2+} e Fe^{2+} , e inibição de cerca de 90% quando em presença de 2 mmol.L^{-1} destes mesmos íons. Já

Yang *et al.* (2013) não observaram inibição de lacases para o íon Fe^{2+} e diminuição de apenas 8,13% da atividade para Ag^+ , ambos na concentração de 10 mmol.L^{-1} . Halaburgui *et al.* (2011) observaram este mesmo efeito para lacases de *C. cladosporioides* purificada quando em presença de 1 mmol.L^{-1} de Fe^{2+} , relatando aumento na atividade também para os íons Na^+ , Zn^{2+} , Mn^{2+} e Ba^{2+} . Por outro lado, uma lacase purificada de *T. orientalis* testada por Zheng *et al.* (2017), apresentou uma sensível ativação da enzima por Mg^{2+} , Zn^{2+} e Cu^{2+} , aumentando sua atividade em 7,42%, 3,86% e 1,88%, respectivamente, enquanto que, para Mn^{2+} , esse aumento foi de 136,12%, sendo inibida, porém, em presença de Na^+ , K^+ , Ba^{2+} , Ca^{2+} e Fe^{2+} , Al^{3+} e Fe^{3+} , o que pode estar relacionado à competição entre os íons metálicos e as enzimas pelos sítios de ligação ao substrato.

Para os demais íons testados neste trabalho, a inibição da atividade de lacases foi moderada em ambas as condições testadas. Kumar *et al.* (2012) também observaram inibição moderada para Mg^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , K^+ , Na^+ , Co^{2+} e Cd^{2+} , relatando, também, que o efeito destes íons é dependente da sua concentração na solução. Já a adição de 5 mmol.L^{-1} de Cu^{2+} aumentou significativamente a atividade de lacases de *T. harzianum* HZN10, sendo que as enzimas também foram ativadas em presença de Ca^{2+} , Mg^{2+} e Mn^{2+} , enquanto que Fe^{2+} , Hg^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} , Al^{3+} e Cd^{2+} provocaram sua inibição (Bagewadi *et al.*, 2017).

4.8 AVALIAÇÃO DA DESCOLORAÇÃO DE CORANTES UTILIZANDO EXTRATO ENZIMÁTICO CONCENTRADO DE LACASES

A descoloração de diversos corantes e misturas das classes cromóforas antraquinona, azo e trifenilmetano pelo extrato concentrado de lacases de *P. sajor-caju* PS-2001 também foi avaliada neste trabalho. Foram utilizadas duas diferentes concentrações finais de lacases no meio reacional, de 75 e 150 U.mL^{-1} . A influência da adição dos mediadores redox hidroxibenzotriazol (HBT) e siringaldazina (SYR) também foi analisada, utilizando concentrações finais de 0,1 e $0,3 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$ na solução. Os resultados obtidos são apresentados e discutidos a seguir.

4.8.1 Influência da carga enzimática de lacases

Os resultados obtidos para o processo de descoloração de corantes utilizando diferentes atividades de lacases, de 75 U.mL^{-1} e 150 U.mL^{-1} , estão apresentados na Tabela 10.

Tabela 10. Percentual de descoloração de corantes das classes antraquinona, azo e trifenilmetano em presença de diferentes concentrações de lacases.

Classe cromófora	Corante	pH	75 U.mL ⁻¹		150 U.mL ⁻¹	
			Descoloração (%)	Tempo (h)	Descoloração (%)	Tempo (h)
Antraquinona	<i>Acid Blue 80</i>	6,65	36,35	168	47,30	168
	<i>Acid Green 28</i>	5,15	39,52	96	42,84	168
	<i>Reactive Blue 220</i>	5,64	54,64	72	37,22	168
	<i>Remazol Brilliant Blue R</i>	6,44	22,13	168	14,82	168
	<i>Mistura Antraquinona</i>	5,98	52,17	168	30,76	168
Azo	<i>Acid Red 315</i>	5,43	4,27	168	41,02	168
	<i>Congo Red</i>	6,30	32,51	168	38,78	168
	<i>Disperse Blue 79</i>	6,30	37,30	168	21,73	168
	<i>Disperse Orange 30</i>	6,09	36,26	168	12,97	168
	<i>Disperse Red 324</i>	6,30	42,16	168	32,61	168
	<i>Levafix Brilliant Red E-4BA</i>	5,70	24,83	168	13,72	168
	<i>Levafix Golden Yellow E-G</i>	5,34	10,95	168	13,43	168
	<i>Methyl Red</i>	3,86	31,40	168	16,29	72
	<i>Methylene Blue</i>	5,40	12,75	168	13,55	168
	<i>Neutral Red</i>	5,21	6,89	168	29,57	168
	<i>Orange G</i>	3,41	2,15	24	8,70	168
	<i>Reactive Red 198</i>	4,29	19,78	168	15,34	168
	<i>Reactive Yellow 15</i>	5,32	28,52	168	31,30	168
	<i>Mistura Azo</i>	5,58	18,87	168	12,88	168
	Trifenilmetano	<i>Brilliant Green</i>	4,20	63,90	168	26,80
<i>Bromocresol Green</i>		3,95	0,11	168	6,93	168
<i>Bromophenol Blue</i>		3,92	2,15	48	11,30	168
<i>Bromothymol Blue</i>		3,79	54,18	168	47,66	168
<i>Comassie Brilliant Blue G-250</i>		5,93	14,91	168	30,95	168
<i>Gentian Violet</i>		6,96	12,61	168	10,73	168
<i>Malachite Green</i>		6,00	39,29	168	29,71	168
<i>Methyl Violet</i>		4,28	7,32	168	28,20	168
<i>Phenol Red</i>		3,75	4,90	168	13,57	168
<i>Mistura Trifenilmetano</i>		7,93	6,47	24	19,74	168
<i>Mistura geral</i>		4,67	21,30	96	47,41	168

Ao analisar os resultados obtidos para as duas concentrações enzimáticas testadas, é possível observar que 75 U.mL^{-1} de lacases proporcionou percentuais isolados superiores à concentração de 150 U.mL^{-1} , alcançando cerca de 64% de descoloração do corante trifenilmetano *Brilliant Green* após 168 horas de reação. Percentuais de descoloração superiores a 50% também foram observados para os corantes *Bromothymol Blue*, também pertencente à classe trifenilmetano e para *Reactive Blue 220*, um corante antraquinona, bem como para a mistura de corantes desta classe, que atingiu cerca de 52% de descoloração. Para esta mesma condição, entretanto, para oito dos corantes testados, sendo cinco pertencentes à classe trifenilmetano, bem como para a mistura desta classe, os percentuais de descoloração foram inferiores a 10%. Bagewadi *et al.* (2017) sugerem que alguns corantes apresentam menores percentuais de descoloração devido a sua estrutura, uma vez que o processo de descoloração de corantes com menor número de anéis aromáticos é mais rápido e eficiente do que para os corantes de moléculas mais complexas. Outro fator que pode ter influenciado no processo de descoloração de alguns corantes foi o pH, uma vez que, para a maioria dos corantes que apresentaram descoloração inferior, o valor do pH da solução foi inferior a 4, com exceção de *Bromothymol Blue*, que apresentou bons percentuais de descoloração mesmo em pH 3,79.

Para a atividade de 150 U.mL^{-1} , não foram observados percentuais de descoloração superiores a 50%, porém, os resultados para todos os corantes testados foram mais próximos entre si, com nove corantes atingindo percentual de descoloração entre 30 e 50%, com destaque para os corantes *Acid Blue 80* e *Bromothymol Blue*, que alcançaram cerca de 47% de descoloração. Nesta condição, percentual de descoloração inferior a 10% foi apresentado somente por dois corantes, *Bromocresol Green* e *Orange G*, possivelmente, devido à maior concentração de lacases presentes no meio, o que facilitou o ataque às estruturas mais complexas. Nesta condição, todas as misturas de corantes atingiram descoloração superior a 10%, alcançando um máximo de 47% na mistura geral. Diante destes resultados e dos percentuais de descoloração médios para ambas as condições, as duas foram mantidas como controles para os testes das diferentes concentrações de mediador.

A descoloração de corantes dessas classes cromóforas utilizando extrato bruto de *P. sajor-caju* PS-2001 a 35°C e pH 3,2 foi estudada por Bettin *et al.* (2013), que observaram que utilizando 30 e 45 U.mL^{-1} de lacases, somente *Brilliant Green*, *Malachite Green* e *Methyl Violet* apresentaram descoloração. Porém ao aumentar a concentração enzimática para 60 U.mL^{-1} todos os corantes foram parcialmente descoloridos, com destacando-se *Reactive Blue 220*, *Remazol Brilliant Blue R*, *Disperse Blue 79*, *Disperse Orange 30* e *Reactive Red 198* que

atingiram descoloração de cerca de 30%. Schmitt *et al.* (2012) avaliaram a descoloração de *Disperse Red 343* em concentrações entre 5 e 20 mg.L⁻¹ utilizando 10 U.mL⁻¹ de lacases de *P. sajor-caju* PS-2001, constatando que o aumento da concentração de corante influencia negativamente o processo de descoloração, sendo a máxima remoção de cor de 35%, em pH 3 a 50°C. Já Zheng *et al.* (2017) alcançaram mais de 50% de descoloração para os corantes *Acid Black 172*, *Congo Red*, *Neutral Red*, *Naphthol Green B* e *Crystal Violet* utilizando uma lacase purificada de *T. orientalis*.

Kumar *et al.* (2012) obtiveram percentuais de descoloração de corantes bastante superiores aos observados neste estudo, porém com a utilização de lacases purificadas de *P. ostreatus* em meio controlado em pH 4,5, atingindo, em média, 90% de descoloração para corantes trefenilmetano e 70% para os corantes azo. Lacase purificada de *C. cladosporioides* foi capaz de descolorir onze azo-corantes, sendo que diferentes corantes *Acid Blue* alcançaram 100% de descoloração após decorridos dez minutos de reação (Halaburgi *et al.*, 2011). Percentuais elevados de descoloração também foram observados para lacase purificada de *G. lucidum*, em concentrações de lacase de 30 U.mL⁻¹ e 30 mol.L⁻¹ de corante, para *Acid Fast Red A*, *Remazol Yellow G* e *Methyl Violet 2B*, alcançando 90% após 24 horas de incubação, sendo também observado que os percentuais de descoloração diminuíram com o aumento da concentração de corante no meio (Manalavan *et al.*, 2013).

4.8.2 Descoloração de corantes utilizando o mediador redox hidroxibenzotriazol (HBT)

A utilização de mediadores redox nos processos de descoloração facilita a ação catalítica da enzima sobre a estrutura do corante, uma vez que o mesmo é oxidado pelo mediador, que posteriormente é oxidado pelas lacases, auxiliando no processo de descoloração de corantes mais complexos (Riva, 2006).

Os resultados obtidos durante o processo de descoloração de corantes utilizando o mediador redox HBT estão apresentados na Tabela 11. A utilização de HBT aumentou os percentuais de descoloração para a maioria dos corantes testados na presença de 75 U.mL⁻¹ de lacases, porém, o mesmo efeito não foi observado em presença de 150 U.mL⁻¹ da enzima.

Quando em presença de 0,1 µmol.L⁻¹ de HBT e 75 U.mL⁻¹ de lacases, quinze dos vinte e seis corantes testados apresentaram descoloração superior ao controle, bem como as misturas de corantes azo e antraquinona, e em presença de 0,3 µmol.L⁻¹ de HBT, dezoito corantes e as misturas azo e antraquinona, apresentaram percentuais de descoloração superior

ao controle. Ao comparar as duas concentrações de HBT entre si, quinze corantes apresentaram descoloração superior quando em presença de $0,3 \mu\text{mol.L}^{-1}$, em relação a $0,1 \mu\text{mol.L}^{-1}$, bem como a mistura de corantes trifenilmetano, o que demonstra que a concentração superior de HBT é mais favorável à descoloração de um maior número dos corantes testados para esta concentração de lacases.

Já para a condição com 150 U.mL^{-1} de lacases em presença de $0,1$ e $0,3 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de HBT, percentuais de descoloração superiores foram observados no controle (sem mediador) para quinze dos corantes testados, sendo que, entre os onze corantes que apresentaram maior descoloração em presença de HBT, sete foram superiores com $0,1 \mu\text{mol.L}^{-1}$. Somente os corantes *Brilliant Green*, *Phenol Red*, *Reactive Blue 220* e *Reactive Red 198* apresentaram percentuais de remoção de cor superiores em presença de $0,3 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de HBT, o que sugere que a presença de elevada concentração de lacases em combinação com uma maior concentração do mediador pode causar algum tipo de inibição na enzima, prejudicando o processo de degradação dos corantes. Efeitos semelhantes em concentrações elevadas de HBT foram observados por Schmitt *et al.* (2012).

O maior percentual de descoloração observado para a classe cromófora antraquinona na condição controle com 75 U.mL^{-1} de lacases foi para o corante *Reactive Blue 220*, com 61% de descoloração após 168 horas em presença de $0,3 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de HBT, enquanto que a mistura de corantes desta classe apresentou sua maior descoloração na condição controle, com cerca de 52% de remoção de cor. A condição controle também resultou no percentual máximo de descoloração da mistura da classe azo, com cerca de 19% de remoção de cor, com destaque também para o corante *Congo Red*, que apresentou 44% de remoção de cor em presença de $0,3 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de HBT após 168 horas. À classe trifenilmetano pertence o corante com maior percentual de descoloração para esta condição controle, *Brilliant Green*, com cerca de 66% de remoção de cor nas duas concentrações de HBT testadas. A mistura da classe antraquinona apresentou maior descoloração em presença de $0,1 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de HBT, com apenas 14% de descoloração após 96 horas. A condição de $0,3 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de HBT foi a mais eficiente na descoloração da mistura de todos os corantes testados, alcançando em torno de 26% de remoção de cor. Somente o corante *Bromocresol Green*, em presença de $0,1 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de HBT, não apresentou descoloração.

Tabela 11. Percentual de descoloração de corantes das classes antraquinona, azo e trifenilmetano em presença de 75 e 150 U.mL⁻¹ de lacases e de diferentes concentrações do mediador redox hidroxibenzotriazol (HBT).

Classe	Corante	pH	75 U.mL ⁻¹		HBT 0,1 µmol.L ⁻¹		HBT 0,3 µmol.L ⁻¹		150 U.mL ⁻¹		HBT 0,1 µmol.L ⁻¹		HBT 0,3 µmol.L ⁻¹	
			Desc. (%)	t (h)	Desc. (%)	t (h)	Desc. (%)	t (h)	Desc. (%)	t (h)	Desc. (%)	t (h)	Desc. (%)	t (h)
ANT	<i>Acid Blue 80</i>	6,65	36,35	168	24,30	168	39,32	96	47,30	168	25,74	168	31,16	168
	<i>Acid Green 28</i>	5,15	39,52	96	50,51	168	55,96	168	42,84	168	37,81	168	40,40	168
	<i>Reactive Blue 220</i>	5,64	54,64	72	59,47	168	61,91	168	37,22	168	41,83	168	47,24	168
	<i>Remazol Brilliant Blue R</i>	6,44	22,13	168	18,27	168	20,85	168	14,82	168	15,26	168	5,82	168
	<i>Mistura ANT</i>	5,98	52,17	168	29,82	168	29,22	96	30,76	168	18,00	168	28,37	168
AZO	<i>Acid Red 315</i>	5,43	4,27	168	21,33	96	20,12	96	41,02	168	10,49	168	13,78	168
	<i>Congo Red</i>	6,30	32,51	168	35,08	168	44,83	168	38,78	168	22,06	168	13,93	168
	<i>Disperse Blue 79</i>	6,30	37,30	168	42,00	96	37,28	168	21,73	168	36,68	72	31,83	96
	<i>Disperse Orange 30</i>	6,09	36,26	168	15,80	48	13,95	48	12,97	168	39,86	72	37,21	72
	<i>Disperse Red 324</i>	6,30	42,16	168	18,64	168	41,32	168	32,61	168	22,34	168	26,02	168
	<i>Levafix Brilliant Red E-4BA</i>	5,70	24,83	168	21,04	168	22,88	72	13,72	168	20,14	96	17,15	168
	<i>Levafix Golden Yellow E-G</i>	5,34	10,95	168	5,77	168	4,91	168	13,43	168	1,39	168	10,16	168
	<i>Methyl Red</i>	3,86	31,40	168	17,93	168	14,62	168	16,29	72	ND	-	ND	-
	<i>Methylene Blue</i>	5,40	12,75	168	14,80	168	20,44	168	13,55	168	2,89	24	5,08	168
	<i>Neutral Red</i>	5,21	6,89	168	10,92	168	15,20	168	29,57	168	8,85	168	16,11	168
	<i>Orange G</i>	3,41	2,15	24	18,03	96	8,84	168	8,70	168	11,60	168	9,84	168
	<i>Reactive Red 198</i>	4,29	19,78	168	20,84	168	19,87	168	15,34	168	14,58	168	20,09	168
	<i>Reactive Yellow 15</i>	5,32	28,52	168	30,63	168	25,83	168	31,30	168	18,17	168	18,30	168
<i>Mistura AZO</i>	5,58	18,87	168	9,74	168	12,34	168	12,88	168	16,56	96	6,73	168	
TRI	<i>Brilliant Green</i>	4,20	63,90	168	66,84	168	66,16	168	26,80	168	10,79	96	29,49	168
	<i>Bromocresol Green</i>	3,95	0,11	168	ND	168	1,50	168	6,93	168	2,77	168	2,71	72
	<i>Bromophenol Blue</i>	3,92	2,15	48	13,46	72	3,20	168	11,30	168	4,27	168	2,39	168
	<i>Bromothymol Blue</i>	3,79	54,18	168	35,39	168	55,96	72	47,66	168	37,28	168	28,79	168
	<i>Comassie Brilliant Blue G-250</i>	5,93	14,91	168	16,29	96	19,80	168	30,95	168	8,57	96	10,05	168
	<i>Gentian Violet</i>	6,96	12,61	168	10,77	96	22,20	168	10,73	168	61,48	72	60,71	72
	<i>Malachite Green</i>	6,00	39,29	168	47,40	168	42,49	168	29,71	168	46,94	168	44,07	168
	<i>Methyl Violet</i>	4,28	7,32	168	4,91	168	2,65	96	28,20	168	6,08	168	5,69	168
	<i>Phenol Red</i>	3,75	4,90	168	19,73	168	33,01	168	13,57	168	14,31	96	26,69	96
	<i>Mistura TRI</i>	7,93	6,47	24	13,55	96	9,15	168	19,74	168	9,81	168	23,38	168
	<i>Mistura geral</i>	4,67	21,30	96	24,03	168	26,45	168	47,41	168	18,76	168	15,29	168

Os resultados obtidos com a utilização de 75 U.mL^{-1} de lacases estão de acordo com os observados por Bettin *et al.* (2014a), que constataram que a utilização de HBT na concentração de $0,1 \mu\text{mol.L}^{-1}$ como mediador, juntamente com o extrato enzimático bruto de *P. sajor-caju* PS-2001, a 35°C , resulta em percentuais de descoloração superiores aos observados sem a presença do mediador para a maioria dos corantes testados, alcançando percentuais de 35% e 47%. A remoção de cor de *Disperse Red 167* por lacases de *P. sajor-caju* PS-2001 aumentou de 10,8% para 18,3%, quando em presença de HBT, enquanto que para *Disperse Blue 148*, o maior percentual de descoloração foi 23,4%, também em presença de HBT (Schmitt *et al.*, 2012). Já a descoloração de corantes por lacases purificadas de *T. harzianum* HZN10 foi avaliada por Bagewadi *et al.* (2017), alcançando cerca de 48% para *Malachite Green*, 30% para *Methylene Blue* e 22% para *Congo Red*, sendo que estes percentuais aumentaram para 54, 36 e 28% em presença de HBT, respectivamente, após decorridas 24 horas.

O maior percentual de descoloração para os testes realizados utilizando 150 U.mL^{-1} como condição controle foi observado para o corante trifenilmetano *Gentian Violet*, com cerca de 61% de remoção de cor após 72 horas de reação em presença de $0,1 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de HBT, enquanto que a mistura desta classe cromófora mostrou descoloração máxima em presença de $0,3 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de HBT, com 23% de remoção de cor. Em relação à classe antraquinona, sua mistura apresentou o maior percentual de descoloração na condição controle, bem como a maioria dos corantes desta classe, com cerca de 31% de remoção de cor. Somente o corante *Reactive Blue 220* apresentou descoloração superior em presença de HBT, com cerca de 47%, em $0,3 \mu\text{mol.L}^{-1}$ do mediador. O controle também apresentou o melhor resultado para a mistura geral, que atingiu 47% de descoloração. A classe azo apresentou o menor percentual de descoloração entre as misturas, alcançando cerca de 17% em presença de $0,1 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de HBT, com destaque para o corante *Disperse Orange 30*, que atingiu percentual de descoloração próximo a 40% em presença de $0,1 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de HBT.

Resultados semelhantes aos obtidos para a concentração de 150 U.mL^{-1} foram obtidos por Yang *et al.* (2013), que observaram que lacase purificada de *Shiraia* sp. SUPER - H168 apresentou percentuais de descoloração superiores para os corantes *Acid Red 1* e *Reactive Black 5* após a adição de HBT ao meio reacional, apresentando, entretanto, um efeito inibitório sobre a descoloração de *Acid Blue 129*. A remoção de cor de *Disperse Red 343* por lacases na presença de 11 mmol.L^{-1} de HBT foi estudada por Schmitt *et al.* (2012), que constataram que a adição do mediador não proporcionou efeito significativo na descoloração, enquanto que a adição de 16 mmol.L^{-1} causou um efeito inibitório, conforme foi observado no

presente trabalho.

Pela comparação dos resultados obtidos para ambas as condições controle e todas as concentrações de HBT avaliadas, é possível observar que a condição mais favorável para a descoloração de corantes é a utilização de 150 U.mL^{-1} , sem a presença do mediador, uma vez que nove dos corantes avaliados apresentaram maior descoloração nesta condição, bem como a mistura de todos os corantes. Já a utilização de 75 U.mL^{-1} de lacases resultou em percentuais de descoloração superiores para quatro dos corantes testados e para as misturas de corantes azo e antraquinona, resultado semelhante ao alcançado pela adição de $0,3 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de HBT, que foi mais eficiente em descolorir seis dos corantes testados, atingindo alguns dos maiores percentuais de descoloração do presente estudo. Percentuais elevados de remoção de cor também foram atingidos pela adição de $0,1 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de HBT, novamente na concentração de 75 U.mL^{-1} de lacases, porém, apenas para quatro corantes. Resultados inferiores foram observados com a adição de ambas as concentrações de HBT ($0,1$ e $0,3 \mu\text{mol.L}^{-1}$) para as soluções com 150 U.mL^{-1} de lacases.

4.8.3 Descoloração de corantes utilizando o mediador redox siringaldazina (SYR)

Os resultados obtidos para ambas as condições controle (75 e 150 U.mL^{-1} de lacases) na presença de $0,1$ e $0,3 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de siringaldazina são apresentados na Tabela 12.

Apesar de, na condição controle de 75 U.mL^{-1} de lacases, a concentração de $0,1 \mu\text{mol.L}^{-1}$ ter mostrado os maiores percentuais de descoloração, atingindo cerca de 69% para o corante antraquinona *Acid Blue 80*, 73% para *Brilliant Green* e 75% para *Malachite Green* (ambos da classe trifenilmetano), não foram observadas diferenças relevantes entre as concentrações de siringaldazina, de um modo geral. Oito dos 26 corantes testados apresentaram maiores percentuais de descoloração na condição controle; outros nove corantes, além das misturas antraquinona, trifenilmetano e geral, apresentaram descoloração superior em presença de $0,1 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de siringaldazina; nove corantes e a mistura azo foram mais descoloridos em presença de $0,3 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de siringaldazina.

Tabela 12. Percentual de descoloração de corantes das classes antraquinona, azo e trifenilmetano em presença de 75 e 150 U.mL⁻¹ de lacases e de diferentes concentrações do mediador redox siringaldazina (SYR).

Classe	Corante	pH	75 U.mL ⁻¹		SYR 0,1 µmol.L ⁻¹		SYR 0,3 µmol.L ⁻¹		150 U.mL ⁻¹		SYR 0,1 µmol.L ⁻¹		SYR 0,3 µmol.L ⁻¹	
			Desc. (%)	t (h)	Desc. (%)	t (h)	Desc. (%)	t (h)	Desc. (%)	t (h)	Desc. (%)	t (h)	Desc. (%)	t (h)
ANT	<i>Acid Blue 80</i>	6,65	36,35	168	68,68	48	60,72	96	47,30	168	54,13	24	68,68	168
	<i>Acid Green 28</i>	5,15	39,52	96	42,64	24	39,75	168	42,84	168	40,28	24	54,49	168
	<i>Reactive Blue 220</i>	5,64	54,64	72	60,36	72	40,10	168	37,22	168	42,05	24	61,40	168
	<i>Remazol Brilliant Blue R</i>	6,44	22,13	168	35,31	24	34,98	168	14,82	168	33,67	96	49,05	168
	<i>Mistura ANT</i>	5,98	52,17	168	55,39	48	40,79	168	30,76	168	40,21	24	59,29	168
AZO	<i>Acid Red 315</i>	5,43	4,27	168	ND	-	8,95	168	41,02	168	8,40	72	15,80	96
	<i>Congo Red</i>	6,30	32,51	168	42,13	24	52,37	96	38,78	168	27,30	24	49,96	168
	<i>Disperse Blue 79</i>	6,30	37,30	168	13,89	48	1,66	96	21,73	168	10,74	96	25,68	168
	<i>Disperse Orange 30</i>	6,09	36,26	168	13,81	96	ND	-	12,97	168	15,10	96	20,02	96
	<i>Disperse Red 324</i>	6,30	42,16	168	16,97	24	6,10	168	32,61	168	9,12	24	21,31	168
	<i>Levafix Brilliant Red E-4BA</i>	5,70	24,83	168	7,79	24	ND	-	13,72	168	13,73	48	19,93	168
	<i>Levafix Golden Yellow E-G</i>	5,34	10,95	168	11,94	48	0,23	24	13,43	168	5,46	96	10,67	168
	<i>Methyl Red</i>	3,86	31,40	168	ND	-	ND	-	16,29	72	ND	-	23,29	168
	<i>Methylene Blue</i>	5,40	12,75	168	7,98	72	0,66	24	13,55	168	12,64	168	21,80	96
	<i>Neutral Red</i>	5,21	6,89	168	9,69	48	17,85	168	29,57	168	11,38	96	20,27	168
	<i>Orange G</i>	3,41	2,15	24	33,92	48	50,93	168	8,70	168	24,76	48	55,06	168
	<i>Reactive Red 198</i>	4,29	19,78	168	32,01	24	46,40	168	15,34	168	28,39	96	52,17	168
	<i>Reactive Yellow 15</i>	5,32	28,52	168	7,80	24	10,51	96	31,30	168	7,71	96	13,56	168
<i>Mistura AZO</i>	5,58	18,87	168	18,30	24	19,94	168	12,88	168	10,81	24	30,42	168	
TRI	<i>Brilliant Green</i>	4,20	63,90	168	73,27	48	73,40	168	26,80	168	69,37	96	74,98	168
	<i>Bromocresol Green</i>	3,95	0,11	168	50,68	168	ND	-	6,93	168	24,95	168	10,94	168
	<i>Bromophenol Blue</i>	3,92	2,15	48	14,15	168	ND	-	11,30	168	4,25	24	0,92	72
	<i>Bromothymol Blue</i>	3,79	54,18	168	23,50	48	ND	-	47,66	168	14,23	24	42,39	168
	<i>Comassie Brilliant Blue G-250</i>	5,93	14,91	168	42,96	24	50,22	96	30,95	168	21,60	24	53,94	168
	<i>Gentian Violet</i>	6,96	12,61	168	19,86	48	38,61	168	10,73	168	21,10	96	44,87	168
	<i>Malachite Green</i>	6,00	39,29	168	74,81	168	70,51	168	29,71	168	63,48	72	69,93	168
	<i>Methyl Violet</i>	4,28	7,32	168	18,51	96	13,18	48	28,20	168	14,63	168	29,76	168
	<i>Phenol Red</i>	3,75	4,90	168	7,26	96	9,18	168	13,57	168	8,80	168	1104	168
	<i>Mistura TRI</i>	7,93	6,47	24	13,85	96	13,03	168	19,74	168	17,12	48	40,09	168
<i>Mistura geral</i>	4,67	21,30	96	27,14	96	23,28	168	47,41	168	25,45	168	38,96	168	

Os maiores percentuais de descoloração para a condição com $0,3 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de SYR e 75 U.mL^{-1} foram observados para os corantes trifenilmetano *Brilliant Green* e *Malachite Green*, e para o antraquinona *Acid Blue 80*, com cerca de 73, 70 e 60% de remoção de cor, respectivamente. Nesta mesma condição, o corante azo *Acid Red 315* alcançou descoloração de cerca de 9%, um percentual baixo, porém, relevante se comparado ao controle e à condição com $0,1 \mu\text{mol.L}^{-1}$ do mediador, que não mostrou remoção de cor para este corante. Entretanto, na condição de maior concentração de SYR, foram observados mais casos em que não houve remoção de cor, tendo este fato ocorrido para seis dos corantes testados.

Para a concentração de 150 U.mL^{-1} de lacases, a presença de $0,3 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de siringaldazina mostrou remoção de cor superior para dezessete dos corantes testados, bem como para as misturas de corantes das classes azo, antraquinona e trifenilmetano, com cerca de 30, 59 e 40% de descoloração, respectivamente. Dentre os corantes que apresentaram elevada remoção de cor para esta condição, destacam-se os quatro corantes antraquinona (*Acid Blue 80*, *Acid Green 28*, *Reactive Blue 220* e *Remazol Brilliant Blue R*), os corantes trifenilmetano *Brilliant Green*, *Comassie Brilliant Blue G-250* e *Malachite Green*, bem como *Orange G*, *Congo Red* e *Reactive Red 198*, da classe cromófora azo, cujos percentuais de descoloração foram próximos ou superiores a 50%. Entretanto, na presença de $0,1 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de SYR, apenas o trifenilmetano *Bromocresol Green* (com cerca de 25% de descoloração) apresentou melhores resultados com relação aos observados no controle e na condição com $0,3 \mu\text{mol.L}^{-1}$. Já oito dos corantes testados, bem como a mistura de todos os corantes, apresentaram melhores resultados na condição controle.

A influência da adição de siringaldazina ao extrato enzimático bruto de *P. sajor-caju* PS-2001 contendo 30 U.mL^{-1} de lacases sobre a descoloração de corantes foi avaliada por Bettin *et al.* (2014a), que observaram níveis de descoloração superiores aos observados para o controle para diversos corantes, destacando-se *Brilliant Green* e *Malachite Green*, com percentuais superiores a 64%, sendo estes resultados semelhantes aos observados no presente trabalho. Por outro lado, Schmitt *et al.* (2012) observaram que a utilização deste mediador causou inibição de lacases da mesma linhagem fúngica para a remoção de cor do corante *Disperse Red 343*. Este fato só foi observado no presente estudo para sete corantes, porém, somente em algumas das condições testadas.

Ao comparar todos os testes realizados na presença do mediador SYR, é possível constatar a eficiência superior da concentração de 150 U.mL^{-1} de lacases e de $0,3 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de siringaldazina na descoloração de corantes, uma vez que esta condição foi superior para doze dos 26 corantes testados e para as três misturas das classes cromóforas. Esta condição também

apresentou resultados superiores aos observados para o mediador HBT, sendo, portanto, a mais favorável para a remoção de cor dos corantes avaliados. A condição controle de 150 U.mL⁻¹ de lacases também mostrou resultados relevantes, tendo em vista o elevado percentual de descoloração obtido para a mistura de todos os corantes (condição mais próxima à presente em efluentes industriais) e o fato de que a adição de mediadores pode tornar mais onerosos os processos de tratamento de efluentes.

5 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Os estudos realizados no presente trabalho propiciaram o delineamento de um processo de concentração de lacases produzidas por *P. sajor-caju* PS-2001 em processo submerso, utilizando sistemas de microfiltração e ultrafiltração, bem como o desenvolvimento de uma formulação enzimática a ser aplicada em processos de descoloração de corantes. Os resultados obtidos em escala de bancada podem ser úteis para a realização de um possível escalonamento do processo para plantas piloto e, posteriormente, para níveis industriais.

Analisando-se os resultados, foram formuladas as conclusões que são listadas a seguir.

- O pré-tratamento do extrato enzimático bruto com carvão ativado resultou em incremento da atividade de lacases (de 26 U.mL⁻¹ para até 53 U.mL⁻¹), com remoção de proteínas e de cor do extrato, porém, com pequena variação na turbidez.
- A utilização de microfiltração como pré-tratamento do extrato enzimático bruto resultou em elevados percentuais de recuperação da enzima, manutenção da atividade inicial e remoção de cor em percentuais superiores a 50% para todas as concentrações testadas, porém, com perdas de proteínas, possivelmente devido à formação de *fouling*.
- O processo de ultrafiltração resultou em incremento da atividade de lacases em relação ao extrato bruto, com percentuais de recuperação superiores a 100% e purificação de até seis vezes, nas condições testadas.
- A utilização do pré-tratamento (microfiltração ou carvão ativado com posterior microfiltração) anteriormente à ultrafiltração resultou em fluxos de permeado superiores quando comparados à utilização somente de carvão ativado ou de nenhum pré-tratamento. Entretanto, não apresentou diferenças relevantes em relação aos percentuais de recuperação de lacases.
- Quanto às formulações enzimáticas, a temperatura de 4°C proporcionou manutenção da atividade de lacases por períodos de tempo mais longos, mesmo para a condição controle. A adição de glicerol, em qualquer concentração, ocasionou aumento na atividade enzimática. Dentre todas as concentrações de glicerol testadas, 30% (m/v) em ausência de KCl apresentou estabilidade superior em comparação às demais, com 83% da atividade após 52 semanas de incubação, sendo a mais indicada para a preparação de uma formulação comercial da enzima.
- A adição de glicerol não causou nenhum efeito protetor sobre a enzima em relação à termoestabilidade, resultando em atividades inferiores frente a diferentes temperaturas,

quando comparada ao extrato concentrado.

- A adição de glicerol resultou em maior estabilidade do extrato enzimático de lacases frente ao pH, propiciando, também, incremento da atividade, principalmente em valores de pH mais ácidos.
- A adição de glicerol causou um efeito protetor sobre lacases quando avaliada sua estabilidade em presença de diversos íons, sendo este um resultado importante para sua possível aplicação no tratamento de efluentes têxteis, resultando, também, em um leve aumento de atividade quando em contato com estes mesmos íons.
- A utilização de lacases na descoloração de corantes se mostrou eficiente para determinados corantes, sendo que uma maior atividade de lacases, bem como a adição do mediador redox siringaldazina no meio reacional resultou em incremento nos percentuais de descoloração.

As perspectivas para dar continuidade aos estudos relativos à concentração de lacases por ultrafiltração, bem como à formulação e aplicação dos extratos enzimáticos, estão apresentadas a seguir.

- Realização de testes utilizando membrana de ultrafiltração com massa molecular de corte de 20 kDa, a fim de verificar se esta resultaria em menores tempos de processo e na manutenção da recuperação enzimática.
- Realização de testes utilizando membranas cerâmicas, a fim de avaliar seu comportamento durante o processo de concentração enzimática.
- Realização de testes adicionando compostos inibidores de atividade de proteases na formulação, a fim de avaliar se ocasionariam incremento na atividade de lacases.
- Realização de testes de remoção de cor de efluentes da indústria têxtil utilizando o extrato formulado de lacases.
- Avaliação dos produtos de degradação formados após o processo de descoloração de corantes por lacases, bem como de sua toxicidade anteriormente e após o processo de descoloração enzimática.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alexandrino, A.M.; Faria, H.G.; Souza, C.G.M.; Peralta, R.M. (2007). Aproveitamento do resíduo de laranja para a produção de enzimas lignocelulolíticas por *Pleurotus ostreatus* (Jack: Fr.). **Ciênc. Tecnol. Aliment.** 27: 364-368.
- Andreus, J.; Cavaco-Paulo, A. (2008). **Enzimas no processamento de fibras têxteis**. In: Bon, E.P.S.; Ferrara, M.A.; Corvo, M.L. (Coord.). **Enzimas em biotecnologia: produção, aplicações e mercado**. 1 ed. Rio de Janeiro: Editora Interciência. pp 179-204.
- Anselmo, A.M.; Almeida-Vara, E.; Sena-martins, G.; Ferreira-Leitão, V.S. (2008). **Enzimas em catálise ambiental**. In: Bon, E.P.S.; Ferrara, M.A.; Corvo, M.L. (Coord.). **Enzimas em biotecnologia: produção, aplicações e mercado**. 1 ed. Rio de Janeiro: Editora Interciência. pp 387-406.
- Antonopoulou, I.; Varriale, S.; Topakas, E.; Rova, U.; Christakopoulos, P.; Faraco, V. (2016). Enzymatic synthesis of bioactive compounds with high potential for cosmeceutical application. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 100: 6519-6543.
- Ban, X.; Dhoble, A.S.; Li, C.; Zhang, Y.; Gu, Z.; Cheng, L.; Hong, Y.; Li, Z. (2017). Potassium and sodium ions enhance the activity and thermostability of 1,4- α -glucan branching enzyme from *Geobacillus thermoglucosidasius* in the presence of glycerol. **Int. J. Biol. Macromol.** 102: 712-717.
- Bagewadi, Z.K.; Mulla, S.I.; Ninnekar, H.Z. (2017). Purification and immobilization of laccase from *Trichoderma harzianum* strain HZN10 and its application in dye decolorization. **J. Genet. Eng. Biotechnol.** 15: 139-150.
- Bastos, R.G. (2010). **Tecnologia das fermentações: fundamentos de bioprocessos**. 1 ed. São Carlos: EdUFSCar. 162p.
- Bayramoglu, G.; Gursel, I.; Tunali, Y.; Arica, M.Y. (2009). Biosorption of phenol and 2-chlorophenol by *Funalia trogii* pellets. **Bioresour. Technol.** 100: 2685-2691.
- Bettin, F. (2010). Cinética de crescimento e produção de lacases do fungo *Pleurotus sajor-caju* PS-2001 (Fr.) Singer em processo submerso em biorreator com agitação mecânica. **Tese de doutoramento**. Instituto de Biotecnologia, Universidade de Caxias do Sul. Caxias do Sul, Brasil.
- Bettin, F.; Boff, N.A.; Zaccaria, S.; Silveira, M.M.; Dillon, A.J.P. (2015). Degradação de fenol durante o crescimento de *Pleurotus sajor-caju* PS-2001 em biorreator *airlift* de circulação interna. In: XX Simpósio Nacional de Bioprocessos e XI Simpósio de Hidrólise Enzimática de Biomassas. **Anais**. pp. 1-6. Fortaleza, 2015.
- Bettin, F.; Cousseau, F.; Martins, K.; Zaccaria, S.; Silveira, M.M.; Dillon, A.J.P. (2014a). Aplicação de mediadores redox na descoloração de corantes utilizando caldo enzimático bruto de *Pleurotus sajor-caju* PS-2001. In: XX Congresso Brasileiro de Engenharia Química. **Anais**. pp. 1-8. Florianópolis, 2014.
- Bettin, F.; Cousseau, F.; Martins, K.; Zaccaria, S.; Silveira, M.M.; Dillon, A.J.P. (2014b). Crescimento fúngico e produção de lacases de *Pleurotus sajor-caju* PS-2001 em diferentes configurações de biorreatores sob efeito do pH. In: XX Congresso Brasileiro de Engenharia Química. **Anais**. pp. 1-8. Florianópolis, 2014.
- Bettin, F.; Cousseau, F.; Martins, K.; Zaccaria, S.; Silveira, M.M.; Dillon, A.J.P. (2013). Descoloração de corantes utilizando diferentes concentrações de lacases produzidas pelo

- fungo *Pleurotus sajor-caju* PS-2001 em processo submerso. In: XIX Simpósio Nacional de Bioprocessos e X Simpósio de Hidrólise Enzimática de Biomassas. **Anais**. pp. 1-4. Foz do Iguaçu, 2013.
- Bettin, F.; Montanari, Q.; Calloni, R.; Gaio, T.A.; Silveira, M.M.; Dillon, A.J.P. (2014c). Additive effects of CuSO₄ and aromatic compounds on laccase production by *Pleurotus sajor-caju* PS-2001 using sucrose as a carbon source. **Braz. J. Chem. Eng.** 31: 335-346.
- Bettin, F.; Montanari, Q.; Calloni, R.; Gaio, T.A.; Silveira, M.M.; Dillon, A.J.P. (2009). Production of laccases in submerged process by *Pleurotus sajor-caju* PS-2001 in relation to carbon and organic nitrogen sources, antifoams and Tween 80. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.** 36:1-9.
- Bettin, F.; Rosa, L.O.; Montanari, Q.; Calloni, R.; Gaio, T.A.; Malvessi, E.; Silveira, M.M.; Dillon, A.J.P. (2011). Growth, kinetics, production, and characterization of extracellular laccases from *Pleurotus sajor-caju* PS-2001. **Process Biochem.** 46: 758-764.
- Blum, H.; Beier, H.; Gross, H.J. (1987). Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. **Electrophoresis.** 8: 93-99.
- Bon, E.P.S.; Costa, R.B.; Silva, M.V.A.; Ferreira-Leitão, V.S.; Freitas, S.P.; Ferrara, M.A. (2008). **Mercado e perspectivas de uso de enzimas industriais e especiais no Brasil**. In: Bon, E.P.S.; Ferrara, M.A.; Corvo, M.L. (Coord.). **Enzimas em biotecnologia: produção, aplicações e mercado**. 1 ed. Rio de Janeiro: Editora Interciência. pp 463-488.
- 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.
- Bryjak, J.; Rekuć, A. (2010). Effective purification of *Cerrena unicolor* laccase using microfiltration, ultrafiltration and acetone precipitation. **Appl. Biochem. Biotechnol.** 160: 2219-2235.
- Charcosset, C. (2006). Membrane processes in biotechnology: an overview. **Biotechnol. Adv.** 24: 482-492.
- Cheryan, M. (1998). **Ultrafiltration and microfiltration handbook**. 2 ed. Boca Raton: CRC Press. 526p.
- Cohen, R.; Persky, L.; Hadar, Y. (2002). Biotechnological applications and potencial of wood-degrading mushrooms of the genus *Pleurotus*. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 58: 582-594.
- Confortin, F.G.; Marchetto, R.; Bettin, F.; Camassola, M.; Salvador, R.M.; Dillon, A.J.P. (2008). Production of *Pleurotus sajor-caju* strain PS-2001 biomass in submerged culture. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.** 35: 1149-1155.
- Couto, S.R.; Rodríguez, A.; Paterson, R.R.M.; Lima, M.; Teixeira, J.A. (2006). Laccase activity from the fungus *Trametes hirsute* using an *air-lift* bioreactor. **Lett. Appl. Microbiol.** 42: 612-616.
- Diel, J.L. (2010). Caracterização funcional de membranas cerâmicas de micro e ultrafiltração. **Dissertação de Mestrado**. Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, Brasil.
- Durán, N. (2010). **Enzimas ligninolíticas**. In: Esposito, E.; Azevedo, J.L. (Coord.). **Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia**. 1 ed. Caxias do Sul: EDUCS. pp 243-260.

- Ferraz, A.L. (2010). **Fungos decompositores de materiais lignocelulósicos**. In: Esposito, E.; Azevedo, J.L. (Coord.). **Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia**. 1 ed. Caxias do Sul: EDUCS. pp 213-242.
- Forest, P.F. (2014). Emprego de membrana na separação de células de *Zymomonas mobilis* em bioprocessos associados para a produção de etanol e ácido lactobiônico. **Dissertação de Mestrado**. Centro de Ciências Exatas e Tecnologias, Universidade de Caxias do Sul. Caxias do Sul, Brasil.
- Gottschalk, L.M.F.; Bom, E.P.S.; Nobrega, R. (2008). Lignin peroxidase from *Streptomyces viridosporus* T7A: Enzyme concentration using ultrafiltration. **Appl. Biochem. Biotechnol.** 147: 23-32.
- Guilarduci, V.V.S.; Mesquita, J.P.; Martelli, P.B.; Gorgulho, H.F. (2006). Adsorção de fenol sobre carvão ativado em meio alcalino. **Quim. Nova.** 29: 1226-1232.
- Habert, A.C.; Borges, C.P.; Nobrega, R. (2006). **Processos de separação por membranas**. 1 ed. Rio de Janeiro: e-papers. 181p.
- Halaburgi, W. M.; Sharma, S.; Sinha, M.; Singh, T.P.; Karegoudar, T.B. (2011). Purification and characterization of a thermostable laccase from the ascomycetes *Cladosporium cladosporioides* and its applications. **Process Biochem.** 46: 1146 -1152.
- Hu, J.; Duvnjak, Z. (2004). The production of a laccase and the phenolic content in canola meal during the growth of the fungus *Pleurotus ostreatus* in solid state fermentation processes. **Eng. Life Sci.** 1: 50-55.
- Iyer, P.V.; Ananthanarayan, L. (2008). Enzyme stability and stabilization - Aqueous and non-aqueous environment. **Process Biochem.** 43: 1019-1032.
- Kareem, S.O.; Akpan, I.; Popoola, T.O.S.; Sanni, L.O. (2011). Activated charcoal: a potential material in glucoamylase recovery. **Enzyme Res.** 2011: 1-4.
- Kilikian, B.V.; Pessoa, A. (2001). **Purificação de produtos biotecnológicos**. In: Schmidell, W.; Lima, U.A.; Aquarone, E.; Borzani, W. (Coord.). **Biotecnologia industrial: engenharia bioquímica**. 1 ed. São Paulo: Edgard Blücher Ltda. pp 493-522.
- Kumar, V.V.; Sathyaselvabala, V.; Premkumar, M.P.; Vidyadevi, T.; Sivanesan, S. (2012). Biochemical characterization of three phase partitioned laccase and its application in decolorization and degradation of synthetic dyes. **J. Mol. Catal. B - Enzym.** 74: 63-72.
- Kurniawati, S.; Nicell, J.A. (2008). Characterization of *Trametes versicolor* lacase for the transformation of aqueous phenol. **Bioresour. Technol.** 99: 7825-7834.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature.** 227: 680-685.
- Li, K. (2007). **Ceramic membranes for separation and reaction**. 1 ed. Londres: John Wiley & Sons. 315p.
- Libardi Jr., N. (2010). Estudo de lacases fúngicas para degradação de compostos interferentes endócrinos. **Dissertação de Mestrado**. Departamento de Engenharia de Processos, Universidade da Região de Joinville. Joinville, Brasil.
- Lütz, S.; Rao, N.N.; Wandrey, C. (2006). Membranes in biotechnology. **Chem. Eng. Technol.** 12: 1404-1415.
- Manavalan, T.; Manavalan, A.; Thangavelu, K. P.; Heese, K. (2013). Characterization of optimized production, purification and application of laccase from *Ganoderma lucidum*. **Biochem. Eng. J.** 70: 106-114.

- Mandels, M.; Reese, E.T. (1957). Induction of cellulase in *Trichoderma viride* as influenced by carbon source and metals. **J. Bacteriol.** 73: 269-278.
- Moniruzzaman, M.; Nakashima, K.; Kamiya, N.; Goto, M. (2010). Recent advances of enzymatic reactions in ionic liquids. **Biochem. Eng. J.** 48: 295-314.
- Munari, F.M.; Gaio, T.A.; Calloni, R.; Dillon, A.J.P. (2008). Decolorization of textile dyes by enzymatic extract and submerged cultures of *Pleurotus sajor-caju*. **World J. Microbiol. Biotechnol.** 24: 1383-1392.
- Nakkeeran, E.; Subramanian, R.; Umesh-Kumar, S. (2010). Purification of polygalacturonase from solid-state cultures of *Aspergillus carbonarius*. **J. Biosci. Bioeng.** 109: 101-106.
- Naushad, M.; AlOthman, Z.A.; Khan, A.B.; Ali, M. (2012). Effect of ionic liquid on activity, stability, and structure of enzymes: a review. **Int. J. Biol. Macromol.** 51: 555-560.
- Mulder, M.H.V. (1995). **Polarization phenomena and membrane fouling**. In: Noble, R.D.; Stern, S.A. (Coord.). **Membrane separations technology: principles and applications**. 1 ed. Amsterdam: Elsevier Science B.V. pp 45-83.
- Pant, D.; Adholeya, A. (2009). Concentration of fungal ligninolytic enzymes by ultrafiltration and their use in distillery effluent decolorization. **World J. Microbiol. Biotechnol.** 25: 1793-1800.
- Peralta, R.M.; Souza, C.G.M.; Boer, C.G. (2004). **As principais oxidoredutases de uso industrial**. In: Said, S.; Pietro, R.C.L.R. (Coord.). **Enzimas como agentes biotecnológicos**. 1 ed. Ribeirão Preto: Legis Summa. pp 161-184.
- Poletto, P. (2015). Produção, recuperação e avaliação de pectinases de *Aspergillus niger* LB-02-SF obtidas em biorreator de tambor rotativo. **Tese de doutoramento**. Instituto de Biotecnologia, Universidade de Caxias do Sul. Caxias do Sul, Brasil.
- Poletto, P.; Renosto, D.R.; Baldasso, C.; Zeni, M.; Silveira, M.M. (2015a). Activated charcoal and microfiltration as pretreatment before ultrafiltration of pectinases produced by *Aspergillus niger* in solid-state cultivation. **Sep. Purif. Technol.** 151: 102-107.
- Poletto, P.; Borsóci, C.; Zeni, M.; Silveira, M.M. (2015b). Downstream processing of pectinase produced by *Aspergillus niger* in solid state cultivation and its application to fruit juices clarification. **Food Sci. Technol.** 35(2): 391-397.
- Rajeeva, S.; Lele, S.S. (2010). Bioprocessing of laccase produced by submerged culture of *Ganoderma* sp. WR-1. **Sep. Purif. Technol.** 76: 110-119.
- Rancaño, G.; Lorenzo, M.; Molares, N.; Couto, S.R.; Sanromán, M.A. (2003). Production of laccase by *Trametes versicolor* in an airlift fermentor. **Process Biochem.** 39: 467-473.
- Riva, S. (2006). Laccases: blue enzymes for green chemistry. **Trends Microbiol.** 24: 221-226.
- Rodrigues, E.F.; Ficanha, A.M.M.; Dallago, R.M.; Treichel, H.; Reinehr, C.O.; Machado, T.P.; Nunes, G.B. (2017). Production and purification of amylolytic enzymes for saccharification of microalgal biomass. **Bioresour. Technol.** 225: 134-141.
- Rodríguez-Fernández, D.E.; Parada, J.L.; Medeiros, A.B.P.; Carvalho, J.C.; Lacerda, L.G.; Rodríguez-Léon, J.A.; Soccol, C.R. (2013). Concentration by ultrafiltration and stabilization of phytase produced by solid-state fermentation. **Process Biochem.** 48:374-379.

- Said, S.; Pietro, R.C.L.R. (2004). **Generalidades sobre a aplicação industrial de enzimas.** In: Said, S.; Pietro, R.C.L.R. (Coord.). **Enzimas como agentes biotecnológicos.** 1 ed. Ribeirão Preto: Legis Summa. pp 1-7.
- Sánchez, C. (2010). Cultivation of *Pleurotus ostreatus* and other edible mushrooms. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 85: 321-1337.
- Sant'Anna, G.L. (2001). **Produção de enzimas microbianas.** In: Schmidell, W.; Lima, U.A.; Aquarone, E.; Borzani, W. (Coord.). **Biotecnologia industrial: processos fermentativos e enzimáticos.** 1 ed. São Paulo: Edgard Blücher Ltda. pp 351-362.
- Schliephake, K.; Mainwaring, D.E.; Lonergan, G.T.; Jones, I.K.; Baker, W.L. (2000). Transformation and degradation of the disazo dye Chicago Sky Blue by a purified laccase from *Pycnoporus cinnabarinus*. **Enzyme Microb. Technol.** 27: 100-107.
- Schmitt, S.; Souza, R.; Bettin, F.; Dillon, A.J.P.; Valle, J.A.B.; Andreus, J. (2012). Decolorization of aqueous solutions of disperse textile dyes by oxidoreductases. **Biocatal. Biotransform.** 30: 48-56.
- Scott, K. (1998). **Handbook of industrial membranes.** 2 ed. Oxford: Elsevier Science Publishers Ltd. 894p.
- Silva, M.; Esposito, E. (2010). **O papel dos fungos na recuperação ambiental.** In: Esposito, E.; Azevedo, J.L. (Coord.). **Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia.** 1 ed. Caxias do Sul: EDUCS. pp 335-376.
- Silva, D. Martins, E.S., Leite, R.S.R., Silva, R. Ferreira, V., Gomes, E. (2007). Purification and characterization of an exo-polygalacturonase produced by *Penicillium viridicatum* RFC3 in solid-state fermentation. **Process Biochem.** 42: 1237-1243.
- Songulashvili, G.; Flahaut, S.; Demarez, M.; Tricot, C.; Bauvois, C.; Debaste, F.; Penninckx, M.J. (2016). High yield production in seven days of *Coriolopsis gallica* 1184 laccase at 50 L scale; enzyme purification and molecular characterization. **Fungal Biol.** 120: 481-488.
- Souza, J.V.B.; Silva, E.S.; Cavallazzi, J.R.P.; Sobrinho, A.S. (2010). Formulation of a liquid medium with wheat bran for the production of laccase by *Trametes versicolor* in an air-lift bioreactor. **J. Food Agric. Environ.** 8: 394-396.
- Suresh, S.; Srivastav, V. C.; Mishra, I. M. (2012). Adsorption of catechol, resorcinol, hydroquinone, and their derivatives: a review. **Int. J. Energy Environ. Eng.** 32: 1-19.
- Todero, C.E.; Bonatto, J.; Zortea, R.; Duarte, J.; Zeni, M.; Dillon, A.J.P. (2015). Retenção de enzimas celulolíticas por membranas tubulares impregnadas com solução de PVDF e PA. **Rev. Iberoam. Polímeros.** 16(2): 132-139.
- Torres, F.A.G.; Moraes, L.M.P.; Marco, J.L.; Poças-Fonseca, M.J.; Felipe, M.S.S. (2008). **O uso de leveduras e fungos filamentosos para expressão heteróloga de enzimas.** In: Bon, E.P.S.; Ferrara, M.A.; Corvo, M.L. (Coord.). **Enzimas em biotecnologia: produção, aplicações e mercado.** 1 ed. Rio de Janeiro: Editora Interciência. pp 55-70.
- Ullah, M.A.; Kadhim, H.; Rastall, R.A.; Evans, C.S. (2000). Evaluation of solid substrates for enzyme production by *Coriolus versicolor*, for use in bioremediation of chlorophenols in aqueous effluents. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 54: 832 -837.
- Viswanath, B.; Rajesh, B.; Janardhan, A.; Kumar, A.P.; Narasimha, G. (2014). Fungal laccases and their applications in bioremediation. **Enzyme Res.** 2014: 1-21.
- Wolfenden, R.S.; Willson, R.L. (1982). Radical-cations as reference chromogens in the kinetic studies of one-electron transfer reactions: Pulse radiolysis studies of 2,2'-azinobis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonate). **J. Chem. Soc. Perkin Trans. II.** 02: 805-812.

- Yang, Y.; Ding, Y.; Liao, X.; Cai, Y. (2013). Purification and characterization of a new laccase from *Shiraia* sp. SUPER-H168. **Process Biochem.** 48: 351-357.
- Yaver, D.S.; Xu, F.; Golightly, E.J.; Brown, K.M.; Brown, S.H.; Rey, M.W.; Schneider, P.; Halkier, T.; Mondorf, K.; Dalboge, H. (1996). Purification, characterization, molecular cloning, and expression of two laccase genes from the white rot basidiomycete *Trametes villosa*. **Appl. Environ. Microbiol.** 62: 834-841.
- Zhao, D.; Zhang, X.; Cui, D.; Zhao, M. (2012). Characterisation of a novel white laccase from the deuteromycete fungus *Myrothecium verrucaria* NF-05 and its decolourisation of dyes. **Plos One.** 7: 1-8.
- Zheng, F.; An, Q.; Meng, G.; Wu, X.; Dai, Y.; Si, J.; Cui, B. (2017). A novel laccase from white rot fungus *Trametes orientalis*: Purification, characterization, and application. **Int. J. Biol. Macromol.** 102: 758-770.