

1 **Análise da eficiência de descoloração de Verde Malaquita e Azure B por lacase**  
2 **imobilizada produzida a partir de subprodutos agro-industriais**

3

4 Verônica Távilla Ferreira Silva<sup>a1</sup>, Bruna Curry Carneiro<sup>a</sup>, Pedro Nascimento<sup>a</sup>

5 *<sup>a</sup>Escola de Engenharia de Lorena – Universidade de São Paulo,*

---

<sup>1</sup> Corresponding author: Tel.: +55 (12) 99661-3444 *Email address:* veronicatfs@usp.br

## 6 **Resumo**

7 Este trabalho avaliou a produção de lacase por *Pleurotus ostreatus* utilizando casca de  
8 arroz suplementada com farelo de soja como substrato. A máxima produção da enzima  
9 atingiu 3,1 UI/g de substrato aos 15 dias de cultivo. A enzima produzida foi imobilizada  
10 por três técnicas diferentes: aprisionamento, adsorção e ligação covalente. A  
11 imobilização por ligação covalente mostrou-se a mais eficiente e foi utilizada para  
12 ensaios de descoloração dos corantes Verde Malaquita e Azure B. Os testes de  
13 descoloração levaram em conta os processos de adsorção do corante ao suporte e a  
14 influência do mediador ABTS no rendimento de descoloração. O sistema redox enzima-  
15 ABTS proporcionou 92% de descoloração em 12 h do Verde de Malaquita. Já a  
16 descoloração do Azure B foi em grande parte devido ao processo de adsorção física ao  
17 suporte. O teste de descoloração do Verde Malaquita em reator de 2 L proporcionou  
18 descoloração máxima de 90%.

## 19 ***Palavras chaves***

20 Lacase, Imobilização, Descoloração, Verde Malaquita, Reator

## 21 **1 Introdução**

22 A indústria têxtil convencional é uma das maiores poluentes ambientais,  
23 principalmente dos ecossistemas aquáticos (Bazin et al., 2012; Hossain et al., 2018). Os  
24 efluentes têxteis são misturas complexas de corantes não utilizados ou não fixados,  
25 incluindo metais pesados carcinogênicos (Bazin et al., 2012; Choudhury, 2017).

26 No intuito de solucionar esta problemática e o efeito de corantes sintéticos no meio  
27 ambiente, pesquisadores como Wong et al. (2017) utilizaram o carvão ativado para a  
28 adsorção dos corantes Azul de Metileno e Reactive Black 5, obtendo valores de  
29 adsorção de 24 e 27%, respectivamente. Já Rangabhashiyam et al. (2018) ao  
30 empregarem madeira de *Carica papaya* como agente adsorvente, atingiram taxas de  
31 adsorção de 87 e 90% para Azul de Metileno e Verde Malaquita, respectivamente.

32 Os sistemas anteriores se limitam a processos de adsorção, sem a descoloração do  
33 corante. Outro caminho é a utilização de sistemas reativos empregando enzimas. Por  
34 exemplo, Ling et al. (2015) utilizando a lacase de *Trametes* sp. LAC-01 na presença de  
35 ABTS alcançaram descoloração de 65 e 76% para o Azul de Bromotimol e Verde  
36 Malaquita, respectivamente. No entanto, Wang et al. (2017) reportaram descolorações  
37 um pouco mais altas ao utilizarem lacase de *Cerrena unicolor* GSM-01, também na  
38 presença de ABTS, 85 e 86% para o Azul de Bromotimol e Verde Malaquita,  
39 respectivamente. Neste sentido, é evidente a correlação entre a fonte da enzima lacase e  
40 seu potencial redox na descoloração de corantes.

41 A efetividade das enzimas livres na descoloração de efluentes têxteis foi  
42 demonstrada anteriormente. Ao contrário do uso de enzimas livres, a imobilização  
43 permite o reuso e estabilização das enzimas (Champagne e Ramsay, 2010). Diversas  
44 pesquisas sobre descoloração e detoxificação de corantes utilizando lacase imobilizada  
45 já foram reportados na literatura. Le et al. (2016) ao aplicarem em efluentes reais a

46 lacase de *Trametes versicolor* imobilizada conseguiram atingir uma descoloração de 76  
47 e 90% para o Ramazol Brilliant Blue R e para o Triclosan, respectivamente. Já  
48 Champagne e Ramsay (2010), ao empregarem a lacase imobilizada, produzida pelo  
49 mesmo microrganismo, observaram um aumento da descoloração em relação a enzima  
50 livre de 146% para o corante Acid Blue 74. Da mesma forma, Osmar et al. (2010) ao  
51 utilizarem lacase de *Trametes pubescens* imobilizada em pellets de alumina, obtiveram  
52 a descoloração total do corante Reactive Black 5 em 36h.

53 A produção de enzimas ainda é um processo de alto custo. No entanto, os gastos  
54 com matéria prima podem ser reduzidos ao se utilizar subprodutos agroindustriais  
55 como substrato. O Brasil é um grande produtor agrícola e, conseqüentemente, existe  
56 um vasto excedente de biomassa como bagaço de cana-de-açúcar, casca de arroz e  
57 farelo de soja. Todavia, recentemente torna-se cada vez mais comum a utilização destes  
58 subprodutos agroindustriais para a obtenção de produtos de alto valor agregado, como  
59 enzimas (Canilha et al., 2012; Neethu et al., 2015; Panesar et al., 2016)

60 Isto posto, decidiu-se analisar a produção da enzima lacase pelo fungo *Pleurotus*  
61 *ostreatus* utilizando casca de arroz suplementada com farelo de soja como substrato.  
62 Além disso, avaliou-se a efetividade da enzima quando imobilizada em alginato de  
63 cobre na descoloração dos corantes Verde Malaquita e Azure B. Foram alcançadas  
64 descolorações de até 92% no sistema lacase imobilizada/ABTS. Deste modo, o  
65 presente trabalho visa oferecer uma nova solução ao tratamento de efluentes  
66 prejudiciais ao meio ambiente.

## 67 2 Materiais e Métodos

### 68 2.1 Materiais

69 Alginato de sódio, sulfato de cálcio, epícloridrina, Azure B, Verde Malaquita e  
70 ABTS adquiridos na Sigma-Aldrich.

71

### 72 2.2 Microrganismo

73 O fungo *Pleurotus ostreatus* foi obtido da coleção de culturas da Embrapa  
74 (Brasília - [http://plataformarg.cenargen.embrapa.br/rede-microbiana/colecoes-de-](http://plataformarg.cenargen.embrapa.br/rede-microbiana/colecoes-de-culturas)  
75 [culturas](http://plataformarg.cenargen.embrapa.br/rede-microbiana/colecoes-de-culturas)). O microrganismo foi cultivado a 30°C em meio BDA (Batata-Dextrose-  
76 Ágar) a 2% (m/v) por 7 dias, estocado a 4°C e repicado a cada 90 dias.

77

### 78 2.3 Substrato sólido

79 Como substrato sólido para o cultivo do *P. ostreatus* foi utilizado casca de arroz  
80 (CA) (obtida junto a uma usina de beneficiamento de arroz localizada na cidade de  
81 Canas, SP). A CA foi imersa em água por 12 h e em seguida filtrada em peneira.  
82 Secou-se a CA em estufa a 60°C até a redução da umidade para 60 a 70%.  
83 Posteriormente utilizou-se farelo de soja (FS) (cedido por um comerciante local da  
84 cidade de Lorena-SP) para suplementar a CA na proporção de 90:10 (CA:FS). A  
85 umidade do substrato foi ajustada para 65% com água destilada. Distribuiu-se 350 g do  
86 substrato em sacos de polipropileno de 15 cm x 25 cm. Introduziu-se um tubo Falcon  
87 de 15 mL no centro de cada saco para criar o canal de inoculação. Os sacos foram  
88 vedados com auxílio de um anel concêntrico de PVC ( $\varnothing = 6$  cm, espessura 2 mm, h =  
89 1,5 cm), folha de papel manteiga (12 cm x 12 cm), sobreposta com folha de papel  
90 alumínio de mesmas dimensões, e fechados com elástico de látex. Posteriormente os  
91 sacos foram esterilizados por 1 h a 120°C/1 atm (duas vezes com um intervalo de 24h).

92 Após resfriamento dos sacos, em ambiente estéril, retirou-se o tubo Falcon e inoculou-  
93 se 10 discos-ágar ( $\varnothing = 7$  mm) do fungo crescido em placa de Petri. Os sacos,  
94 novamente vedados, foram incubados a 30°C por 8, 15 e 20 dias.

95

#### 96 **2.4 Extração da enzima**

97 Com 8, 15 e 20 dias de cultivo, realizou-se a extração enzimática. Foram utilizados  
98 frascos Erlenmeyers de 250 mL contendo 20 g de massa seca do substrato cultivado e  
99 homogeneizado acrescido de 150 mL de tampão citrato-fosfato pH 3,0 a 50 mM  
100 (tampão A). Os frascos foram fechados com folha de papel alumínio e incubados em  
101 shaker sob agitação de 120 rpm a 25°C por 1 hora. Ao término do processo, o extrato  
102 foi separado do substrato por filtração em gaze. O extrato bruto foi posteriormente  
103 centrifugado a 3000 rpm, 25°C por 10 min. Parte do sobrenadante foi congelado e a  
104 outra fração foi concentrada de 300 mL para 160 mL por liofilização durante 14 h. Por  
105 fim, os extratos brutos não concentrado e concentrado foram mantidos sob refrigeração  
106 a 4°C.

107

#### 108 **2.5 Preparo do suporte**

109 O suporte de imobilização da enzima lacase foi preparado a partir de uma solução  
110 de 1,25% (m/v) de alginato de sódio em água destilada, utilizando agitador magnético  
111 para completa solubilização. A solução de alginato foi deixada em repouso por 20 min e  
112 então gotejada manualmente com seringa sobre uma solução de sulfato de cobre (0,2 M)  
113 sob baixa agitação. Utilizou-se uma agulha de 0,45 mm de diâmetro por 13 mm de  
114 comprimento (26G1/2"). Ao término do gotejamento, o sistema foi mantido em repouso  
115 por 30 min para o enrijecimento das esferas. As esferas formadas foram separadas da  
116 solução de  $\text{CuSO}_4$  por filtração em papel de filtro e lavadas com água destilada.

117 Posteriormente foram armazenadas a 4°C em tampão citrato-fosfato pH 3,0 50 mM  
118 (Thakur et al., 2015).

119

## 120 **2.6 Imobilização por aprisionamento**

121 Para a imobilização por aprisionamento foi repetido o processo do item 2.5. No  
122 entanto, antes do gotejamento foi adicionado à solução de alginato de sódio o extrato  
123 bruto da enzima. As esferas foram submetidas à análise de atividade enzimática (item  
124 2.9) e determinação do rendimento de imobilização (item 2.10). Estas análises foram  
125 repetidas para os próximos procedimentos de imobilização.

126

## 127 **2.7 Imobilização por adsorção**

128 Para a imobilização por adsorção as esferas preparadas de acordo com o item 2.5  
129 foram lavadas. Retirou-se o excesso de água com papel absorvente. Posteriormente as  
130 esferas foram imersas no extrato bruto enzimático por 12 h sob refrigeração (4°C).

131

## 132 **2.8 Imobilização por ligação covalente**

133 As esferas utilizadas na imobilização covalente foram preparadas conforme o item  
134 2.5. Posteriormente tratou-se as esferas com epicloridrina (ECH). A solução de ECH  
135 foi preparada a 1,5% (v/v) por diluição em água destilada. Em capela de exaustão  
136 imergiu-se as esferas na solução de epicloridrina, na proporção 1:10 (m/v) por 1 h.  
137 Posteriormente, as esferas ativadas foram lavadas três vezes com água destilada e  
138 armazenadas em tampão A sob refrigeração (4°C). Para a imobilização, removeu-se o  
139 excesso de tampão das esferas com papel absorvente, em seguida estas foram imersas  
140 no extrato concentrado sob refrigeração por 12 h.

## 141 **2.9 Determinação da atividade enzimática da lacase livre e imobilizada**

142 O ABTS (ácido-2,2'-azinobis-3-benzotiazolina-sulfônico) foi utilizado para  
143 determinar a atividade da enzima lacase livre e imobilizada. Para a enzima livre, a  
144 mistura reacional consistiu-se de 400 µL de tampão A, 100 µL de ABTS ( $\epsilon_{420}=36.000$   
145  $M^{-1}.cm^{-1}$ ) 1,0 mM e 500 µL de extrato enzimático bruto (Niku-Paavola et al., 1988).

146 Os ensaios com a enzima imobilizada no suporte foram realizados em béquer  
147 contendo 9 mL de tampão A, 1 mL de ABTS 1,0 mM e 1,03 g de massa das esferas de  
148 alginato de cobre com a enzima imobilizada. A reação foi conduzida sob agitação  
149 suave durante 30 min, com coleta das amostras a cada 1 minuto para leitura  
150 espectrofotométrica. Em ambos os testes, a oxidação do ABTS foi acompanhada em  
151 espectrofotômetro a 420 nm. Todos os ensaios enzimáticos foram realizados a  
152 temperatura ambiente. Definiu-se uma unidade (UI) como a oxidação de 1 µmol de  
153 ABTS por min. A atividade da enzima imobilizada foi definida como UI por grama de  
154 suporte (UI/g).

155

## 156 **2.10 Determinação do rendimento de imobilização**

157 O rendimento de imobilização foi calculado a partir da relação entre a atividade  
158 enzimática do extrato bruto concentrado e a atividade enzimática deste após 14 h de  
159 imersão das esferas de alginato de cobre (Eq. A.1).

160

## 161 **2.11 Descoloração de corantes**

162 Os ensaios de descoloração foram realizados em frascos Erlenmeyer de 125 mL  
163 tampados com folha de alumínio contendo 10 mL de solução de corante e 1,03 g das  
164 esferas de alginato de cobre. As esferas foram previamente pesadas em tubos de ensaio  
165 e conservadas em 1,5 mL de tampão A. O excesso de tampão das esferas foi removido

166 com papel absorvente antes de cada teste. Realizou-se os ensaios de descoloração com  
167 os corantes na concentração de 10 e 15 mg/L em água destilada, para o Azure B e o  
168 Verde Malaquita, respectivamente. O processo de descoloração foi conduzido a 25°C  
169 sob agitação de 50 rpm por 12 h. Foi realizada leitura espectrofotométrica em cubeta de  
170 plástico a cada 2 h e devolução do volume analisado. Utilizou-se água destilada como  
171 branco das amostras. Para análise da influência do mediador ABTS na descoloração,  
172 foram preparadas soluções de corantes contendo 9,9 µM e 14,8 µM de ABTS.

173 Na descoloração de ambos os corantes foram testados dois controles: esferas de  
174 alginato de cobre puras (Branco para Azure B (BA) e Branco para Verde de malaquita  
175 (BV)) e esferas de alginato de cobre tratadas com ECH (Branco com ECH para Azure  
176 B (BEA) e para Verde de Malaquita (BEV)). Para os ensaios, foram preparadas  
177 amostras usando a enzima imobilizada (EI.A/EI.V), enzima imobilizada com 9,9 µM  
178 de ABTS (Enzima imobilizada com mediador 1 (EIM1.A/EIM1.V)) e enzima  
179 imobilizada com 14,8 µM de ABTS (Enzima imobilizada com mediador 2  
180 (EIM2.A/EIM2.V)).

181 Para análise do processo de descoloração foi determinado o comprimento de onda  
182 de máxima absorbância de cada corante pela varredura do espectro UV-VIS de 300 a  
183 700 nm. Obteve-se os valores máximos em 620 nm para o Verde Malaquita e 650 nm  
184 para o Azure B, sendo estes valores utilizados para a determinação da concentração dos  
185 corantes durante a descoloração.

186 Ao final dos ensaios, as esferas foram coletadas e lavadas com água destilada. Foi  
187 realizada nova atividade enzimática para determinação da atividade residual das  
188 enzimas imobilizadas.

## 189 **2.12 Porcentagem de descoloração**

190 Determinou-se a porcentagem de descoloração dos corantes utilizando a equação 2 (Eq.  
191 A.2)

## 192 **2.13 Descoloração em reator tipo cesto**

193 Um reator tipo cesto encamisado com volume de 2 L foi utilizado para o ensaio de  
194 descoloração. Utilizou-se 1 L de solução do corante Verde Malaquita (45 mg/L), 24 g  
195 de enzima imobilizada covalentemente (aprisionadas em cesto) e 15 mL de ABTS (1,0  
196 mM). Após 24 h de reação, adicionou-se mais 15 mL de ABTS 1,0 mM. O processo foi  
197 conduzido a 25°C sob agitação magnética. Foram realizadas leituras da absorvância a  
198 cada 2 h durante as primeiras 24 h, e depois a cada 24 h, concluindo o ensaio em 96 h.  
199 Assim como nos ensaios em menor escala, o volume analisado foi devolvido para o  
200 reator após leitura espectrofotométrica.

201

## 202 **2.14 Análise estatística**

203 Foi aplicada a Análise de Variância (ANOVA) mediante o uso do software  
204 estatístico R v3.4.4. Por meio do procedimento de Tukey, identificou-se dois grupos  
205 homogêneos, posteriormente foi feita uma comparação de médias para determinar  
206 quais testes eram diferentes entre si. Valores de  $p < 0.05$  foram considerados  
207 estatisticamente significativos.

208

## 209 **2.15 Modelagem do experimento**

210 Após a identificação dos grupos homogêneos, selecionou-se o teste que possuía a  
211 maior eficiência de descoloração. Foi analisada a interação das variáveis tempo e  
212 absorvância após as 12 h de ensaio mediante o uso do software estatístico Statgraphics  
213 Centurion XVI.II. Foi considerado um modelo linear com ajuste de logaritmo natural.

## 214 **3 Resultados e discussão**

### 215 **3.1 Produção enzimática**

216 A utilização de subprodutos agroindustriais além de ser sustentável, possibilita a  
217 redução dos custos com matéria prima. Conseqüentemente, o presente trabalho buscou  
218 avaliar o uso da casca de arroz suplementada com farelo de soja como substrato para a  
219 produção da enzima lacase pelo o fungo *P. ostreatus*. O tempo de cultivo analisado foi  
220 de 8 a 20 dias. Em 15 dias de cultivo foi alcançada a maior atividade enzimática ( $3,1 \pm$   
221  $0,3$  UI/g). Tempos mais curtos ou mais longos de cultivo resultaram em menores  
222 atividades ( $2,0 \pm 0,1$  UI/g e  $2,8 \pm 0,2$  UI/g aos 8 e 20 dias, respectivamente). Das et al.  
223 (2016) reportaram que a lacase produzida pelo fungo *P. ostreatus* MTCC 142 alcançou  
224 atividade de  $0,35 \pm 0,02$  UI/g utilizando como substrato palha de arroz e casca de milho  
225 na proporção 1:1. O presente trabalho mostra resultados consideravelmente mais altos  
226 que os obtidos por Das et al. (2016). Estes autores reportam que pode ocorrer variações  
227 na produção da enzima dependendo do substrato e suplementação utilizados. Além  
228 disso, Bettin et al. (2009) reportam que fontes de nitrogênio são indutores na produção  
229 da enzima lacase.

230

### 231 **3.2 Escolha do suporte**

232 Como já relatado por Teerapatsakul et al. (2008), o uso de agentes *cross-linking*  
233 como  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{CuSO}_4$  e  $\text{AlCl}_3$  aumentam a estabilidade da enzima. Além disso, Palmieri  
234 et al. (1994) reportaram que no caso da lacase, por ser uma cuproproteína, o uso do  
235 sulfato de cobre atua tanto na estabilização da enzima devido aos íons cobre, quanto na  
236 solidificação do suporte. Deste modo, o presente trabalho optou pelo uso de  $\text{CuSO}_4$   
237 como agente solidificador do alginato, as esferas produzidas possuíam 3 mm de  
238 diâmetro e apresentaram um formato regular e aspecto rugoso.

### 239 **3.3 Técnicas de imobilização para a Lacase**

240 Foi avaliada a técnica de imobilização por aprisionamento, porém a enzima  
241 imobilizada não apresentou atividade. Teerapatsakul et al. (2008) utilizando  
242 metodologia similar em um processo automatizado obteve êxito na imobilização da  
243 enzima lacase ativa. O longo período requerido para a imobilização manual no presente  
244 trabalho pode ter levado a desnaturação da enzima.

245 Na Tabela 1 pode-se observar as diferenças entre duas técnicas de imobilização:  
246 Adsorção física e Ligação covalente. A imobilização por adsorção apresentou alto  
247 rendimento de imobilização e atividade de 31,63 UI/g. No entanto, mesmo após a  
248 retirada do suporte, o ABTS do meio reacional de teste continuou sendo oxidado. Este  
249 fato indica que a enzima foi lixiviada do suporte para o meio. No trabalho de  
250 imobilização da lacase em alginato de cobre, Palmieri et al. (1994) não observaram a  
251 oxidação do substrato após retirada das esferas. A ideia da imobilização é a recuperação  
252 das enzimas para sua utilização em uma nova reação, no entanto se o desprendimento  
253 enzimático é alto no primeiro uso, grande parte das enzimas não será recuperada.

254 Optou-se por testar a imobilização por ligação covalente utilizando ECH como  
255 funcionalizador do suporte. Segundo Nishad et al. (2017), quanto maior a concentração  
256 de epicloridrina utilizada na funcionalização do suporte, mais grupos epóxidos serão  
257 adicionados a superfície das esferas e maior será o rendimento da imobilização. Em seu  
258 trabalho de Bayramoglu et al. (2010) utilizam concentração de 2% de ECH para  
259 imobilizar a enzima lacase em esferas de quitosana. No entanto, Iype et al. (2017)  
260 afirmam que a epicloridrina pode afetar a atividade enzimática. Dessa forma, o presente  
261 trabalho optou por utilizar a concentração de 1,5%. O rendimento de imobilização foi  
262 menor em relação a técnica de adsorção física, no entanto o desprendimento de lacases

263 foi baixo. Portanto a técnica de imobilização por ligação covalente foi utilizada nas  
264 próximas etapas deste trabalho.

265 Conforme descrito no item 2.9, foram realizados três testes de atividade  
266 enzimática consecutivos para avaliar a viabilidade de reutilização do suporte. Após cada  
267 ensaio as esferas foram lavadas com água destilada e depois utilizadas no teste seguinte.  
268 Os valores obtidos para os testes 1, 2 e 3 foram 41,8 UI/g, 25,2 UI/g e 21,1 UI/g,  
269 respectivamente. Observa-se uma redução de 40% entre os ensaios 1 e 2. No entanto,  
270 entre o ensaio 2 e 3 esta diferença foi de 16%.

271

### 272 **3.4 Teste de descoloração de 12 h**

273 Observa-se (Figura 1) que ao se utilizar o suporte sem a presença de enzima, a  
274 descoloração máxima atingida para o Verde Malaquita foi de 23% alcançada em apenas  
275 2 h, após este tempo o valor se manteve constante. O suporte funcionalizado com  
276 epicloridrina apresentou o mesmo comportamento, porém atingiu 40% de descoloração.  
277 A utilização da enzima imobilizada levou a uma descoloração de apenas 29%, também  
278 em duas h, se mantendo constante até o fim do teste. Na presença do mediador ABTS  
279 em duas diferentes concentrações (9,9  $\mu\text{M}$  e ABTS 14,8  $\mu\text{M}$ ) observa-se um aumento  
280 significativo na descoloração, chegando a 92% para ambos. Desta forma verifica-se que  
281 a enzima imobilizada na presença de ABTS (9,9  $\mu\text{M}$ ) foi responsável pela descoloração  
282 de 52% do Verde Malaquita, pois cerca de 40% foi adsorvido no suporte. Das et al.  
283 (2016) obtiveram uma descoloração de 37% do corante Vermelho Congo ao utilizar  
284 lacase (produzida por *P. Ostreatus*) de forma livre. Ling et al. (2015) alcançaram uma  
285 descoloração do Verde Malaquita de 70% em 12 h utilizando a lacase também de forma  
286 livre (produzida por *Trametes sanguinea*). Teerapatsakul et al. (2017) constataram  
287 descoloração máxima de 82% para Verde Malaquita e de 100% para o corante Índigo

288 Carmine utilizando lacase (produzida por *Ganoderma* sp.) imobilizada em alginato de  
289 cobre. No entanto, ao contrário do que se observou neste trabalho, os autores relatam  
290 que não houve adsorção significativa do corante nas esferas. Para o corante Azure B  
291 obteve-se a maior descoloração (80%) para a esfera tratada com ECH sem enzimas. A  
292 enzima imobilizada apresentou uma descoloração similar (79%). Enquanto que, na  
293 presença do mediador ABTS, a descoloração foi ligeiramente reduzida (76%). Após 4 h  
294 de ensaio a descoloração permaneceu praticamente constante para todos os ensaios.  
295 Desta forma, nota-se que a enzima foi ineficiente na descoloração do Azure B e que a  
296 adsorção pelo suporte é responsável pela descoloração. Ling et al. (2015) utilizaram  
297 lacase de forma livre e constataram 0% de descoloração do Azure B em 4 h. No tempo  
298 máximo de ensaio (24 h) alcançou-se apenas 8% de descoloração. Segundo Claus et al.  
299 (2002) a maior parte das lacases, mesmo estando ativas, não degradam o Azure B  
300 devido a estrutura deste corante. Arantes e Milagres (2007) também reportaram a  
301 ineficiência da lacase na descoloração do Azure B, porém quando realizaram um  
302 tratamento com outras enzimas na presença de  $Fe^{+3}$  e  $H_2O_2$  seguido pelo uso da lacase,  
303 esta degradou 40% do corante. Deste modo, observa-se que lacases produzidas por  
304 diferentes tipos de fungos não são eficientes na descoloração do Azure B quando  
305 utilizadas de forma isolada.

306 Realizou-se a análise estatística do processo utilizando diagrama de caixas. As  
307 médias da absorbância dos testes EIM1.V e EIM2.V (Enzima imobilizada + ABTS 9,9  
308  $\mu$ M e Enzima imobilizada + ABTS 14,8  $\mu$ M, respectivamente) estão localizadas abaixo  
309 de 0,6. Além disso, 75% dos valores destes ensaios são menores que o valor mínimo  
310 dos testes BV, BEV e EI.V. As maiores eficiências de descoloração, obtidas nos testes  
311 EIM1.V e EIM2.V, podem ser explicadas devido a presença do mediador ABTS. Desta  
312 forma, ressalta-se a formação de dois grupos homogêneos, o primeiro grupo, constituído

313 por BV, BEV e EI.V e o segundo por EIM1.V e EIM2.V. Neste ensaio a faixa média de  
314 ação do primeiro grupo foi 30%, enquanto do segundo foi 92%. Isto permite observar a  
315 velocidade de reação e a eficiência da descoloração do segundo grupo em relação ao  
316 primeiro. Balan et al. (2012) constatou que a presença do mediador HBT aumentou a  
317 descoloração do Verde Malaquita, obtendo um valor máximo de 96%. Desta forma,  
318 observa-se que o uso de mediadores como ABTS e HBT intensificam a capacidade da  
319 lacase em atacar os anéis aromáticos de compostos com alto potencial redox (Sun et al.,  
320 2016).

321 Para todos os testes com 24h de ensaio em Erlenmeyers observou-se  
322 intumescimento das esferas, algumas romperam-se e aumentaram a turbidez do meio,  
323 impossibilitando a análise da descoloração por medida de absorvância. Nishad et al.  
324 (2017) apontam o tratamento com epicloridrina como causa do intumescimento do  
325 suporte. Conseqüentemente foi realizada uma modelagem do processo para prever a  
326 descoloração após 12 h.

327

### 328 **3.5 Modelagem do processo de descoloração**

329 A Figura 2 apresenta o modelo matemático com tendência linear ajustado com  
330 logaritmo natural. Este modelo descreve o comportamento do teste EIM1.V (Enzima  
331 imobilizada + ABTS 9,9  $\mu$ M) de acordo com as condições experimentais utilizadas e  
332 simula o possível comportamento após 12 h de ensaio. As linhas vermelhas indicam os  
333 limites superiores e inferiores com 95% de confiança. Este modelo desconsidera a  
334 turbidez que poderia ocorrer no processo devido à quebra das esferas, possibilitando  
335 observar a descoloração real do corante. Por conseguinte, o modelo prevê que em 36 h  
336 de ensaio o valor da absorvância seria menor que 0,01, o que corresponde a 99,9% de  
337 descoloração. Desta forma observa-se que este seria um processo eficiente.

### 338 **3.6 Descoloração em reator tipo cesto**

339       Devido aos resultados da projeção estatística decidiu-se aumentar a escala para  
340 um reator tipo cesto. Na Figura 3 pode-se observar que a descoloração nas primeiras 8 h  
341 foi rápida, após este período a velocidade de descoloração foi reduzida. No entanto, no  
342 tempo de 24 h suplementou-se o volume com 15 mL de ABTS (1 mM), levando a um  
343 aumento na velocidade de descoloração. Em 96 h atingiu-se a descoloração máxima  
344 (90%). Como as esferas estavam confinadas o compartimento limitou a quantidade a ser  
345 utilizada. No entanto, este confinamento evitou a quebra e intumescimento das esferas,  
346 mesmo após 96 h de ensaio. Além disso foi observada adsorção do corante nas paredes  
347 e fundo do reator. Os resultados obtidos nesta etapa não alcançaram o valor estimado  
348 pelo modelo matemático. No entanto, como não houve quebra das esferas o processo foi  
349 mais eficiente em relação aos testes realizados em frascos Erlenmeyers.

350

### 351 **4 Conclusões**

352       A produção da enzima lacase por *P. ostreatus* utilizando casca de arroz  
353 suplementada com farelo de soja como substrato mostrou-se viável. Já a imobilização  
354 da enzima lacase foi mais eficiente no suporte funcionalizado com epícloridrina. Nos  
355 ensaios de descoloração, apenas o mecanismo redox enzima-mediador foi capaz de  
356 descolorir o corante Verde Malaquita, atingindo um valor máximo de 92%. No entanto,  
357 a descoloração do Azure B foi majoritariamente por adsorção física ao suporte. O teste  
358 realizado em reator proporcionou 90% de descoloração do Verde Malaquita,  
359 evidenciando assim a possibilidade de ampliação de escala no tratamento de corantes.

360 **Referências**

- 361 Arantes, V., Milagres, A.M.F., 2007. The synergistic action of ligninolytic enzymes  
362 (MnP and Laccase) and Fe<sup>3+</sup>-reducing activity from white-rot fungi for  
363 degradation of Azure B. *Enzyme Microb. Technol.* 42, 17–22.  
364 <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2007.07.017>
- 365 Balan, K., Sathishkumar, P., Palvannan, T., 2012. Decolorization of malachite green by  
366 laccase: Optimization by response surface methodology. *J. Taiwan Inst. Chem.*  
367 *Eng.* 43, 776–782. <https://doi.org/10.1016/j.jtice.2012.04.005>
- 368 Bayramoglu, G., Yilmaz, M., Arica, M.Y., 2010. Preparation and characterization of  
369 epoxy-functionalized magnetic chitosan beads: Laccase immobilized for  
370 degradation of reactive dyes. *Bioprocess Biosyst. Eng.* 33, 439–448.  
371 <https://doi.org/10.1007/s00449-009-0345-6>
- 372 Bazin, I., Ibn Hadj Hassine, A., Haj Hamouda, Y., Mnif, W., Bartegi, A., Lopez-Ferber,  
373 M., De Waard, M., Gonzalez, C., 2012. Estrogenic and anti-estrogenic activity of  
374 23 commercial textile dyes. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 85, 131–136.  
375 <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2012.08.003>
- 376 Bettin, F., Montanari, Q., Calloni, R., Gaio, T.A., Silveira, M.M., Dillon, A.J.P., 2009.  
377 Production of laccases in submerged process by *Pleurotus sajor-caju* PS-2001 in  
378 relation to carbon and organic nitrogen sources, antifoams and Tween 80. *J. Ind.*  
379 *Microbiol. Biotechnol.* 36, 1–9. <https://doi.org/10.1007/s10295-008-0463-1>
- 380 Canilha, L., Chandel, A.K., Suzane Dos Santos Milessi, T., Antunes, F.A.F., Luiz Da  
381 Costa Freitas, W., Das Graças Almeida Felipe, M., Da Silva, S.S., 2012.  
382 Bioconversion of sugarcane biomass into ethanol: An overview about composition,  
383 pretreatment methods, detoxification of hydrolysates, enzymatic saccharification,  
384 and ethanol fermentation. *J. Biomed. Biotechnol.* 2012, 16.  
385 <https://doi.org/10.1155/2012/989572>
- 386 Champagne, P.P., Ramsay, J.A., 2010. Dye decolorization and detoxification by laccase  
387 immobilized on porous glass beads. *Bioresour. Technol.* 101, 2230–2235.  
388 <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.11.066>
- 389 Choudhury, A.K.R., 2017. Sustainable chemical technologies for textile production, in:  
390 Subramanian Senthilkannan Muthu (Ed.), *The Textile Institute Book Series*  
391 *Sustainable Fibres and Textiles*. Elsevier Inc., pp. 267–322.  
392 <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-08-102041-8.00010-X>
- 393 Claus, H., Faber, G., König, H., 2002. Redox-mediated decolorization of synthetic dyes  
394 by fungal laccases. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 59, 672–678.  
395 <https://doi.org/10.1007/s00253-002-1047-z>
- 396 Das, A., Bhattacharya, S., Panchanan, G., Navya, B.S., Nambiar, P., 2016. Production,  
397 characterization and Congo red dye decolourizing efficiency of a laccase from  
398 *Pleurotus ostreatus* MTCC 142 cultivated on co-substrates of paddy straw and corn  
399 husk. *J. Genet. Eng. Biotechnol.* 14, 281–288.  
400 <https://doi.org/10.1016/j.jgeb.2016.09.007>
- 401 Hossain, L., Sarker, S.K., Khan, M.S., 2018. Evaluation of present and future  
402 wastewater impacts of textile dyeing industries in Bangladesh. *Environ. Dev.*  
403 <https://doi.org/10.1016/j.envdev.2018.03.005>

- 404 Iype, T., Thomas, J., Mohan, S., Johnson, K.K., George, L.E., Ambattu, L.A., Bhati, A.,  
 405 Ailsworth, K., Menon, B., Rayabandla, S.M., Jesudasan, R.A., Santhosh, S.,  
 406 Ramchand, C.N., 2017. A novel method for immobilization of proteins via  
 407 entrapment of magnetic nanoparticles through epoxy cross-linking. *Anal. Biochem.*  
 408 519, 42–50. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2016.12.007>
- 409 Le, T.T., Murugesan, K., Lee, C.S., Vu, C.H., Chang, Y.S., Jeon, J.R., 2016.  
 410 Degradation of synthetic pollutants in real wastewater using laccase encapsulated  
 411 in core-shell magnetic copper alginate beads. *Bioresour. Technol.* 216, 203–210.  
 412 <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.05.077>
- 413 Ling, Z.R., Wang, S.S., Zhu, M.J., Ning, Y.J., Wang, S.N., Li, B., Yang, A.Z., Zhang,  
 414 G.Q., Zhao, X.M., 2015. An extracellular laccase with potent dye decolorizing  
 415 ability from white rot fungus *Trametes* sp. LAC-01. *Int. J. Biol. Macromol.* 81,  
 416 785–793. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.09.011>
- 417 Neethu, C.S., Mujeeb Rahiman, K.M., Rosmine, E., Saramma, A. V., Mohamed Hatha,  
 418 A.A., 2015. Utilization of agro-industrial wastes for the production of lipase from  
 419 *Stenotrophomonas maltophilia* isolated from Arctic and optimization of physical  
 420 parameters. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* 4, 703–709.  
 421 <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2015.09.002>
- 422 Niku-Paavola, M.L., Karhunen, E., Salola, P., Raunio, V., 1988. Ligninolytic enzymes  
 423 of the white-rot fungus *Phlebia radiata*. *Biochem. J.* 254, 877–883.  
 424 <https://doi.org/10.1042/bj2540877>
- 425 Nishad, P.A., Bhaskarapillai, A., Velmurugan, S., 2017. Enhancing the antimony  
 426 sorption properties of nano titania-chitosan beads using epichlorohydrin as the  
 427 crosslinker. *J. Hazard. Mater.* 334, 160–167.  
 428 <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2017.04.009>
- 429 Osma, J.F., Toca-Herrera, J.L., Rodríguez-Couto, S., 2010. Biodegradation of a  
 430 simulated textile effluent by immobilised-coated laccase in laboratory-scale  
 431 reactors. *Appl. Catal. A Gen.* 373, 147–153.  
 432 <https://doi.org/10.1016/j.apcata.2009.11.009>
- 433 Palmieri, G., Giardina, P., Desiderio, B., Marzullo, L., Giamberini, M., Sannia, G.,  
 434 1994. A new enzyme immobilization procedure using copper alginate gel:  
 435 Application to a fungal phenol oxidase. *Enzyme Microb. Technol.* 16, 151–158.  
 436 [https://doi.org/10.1016/0141-0229\(94\)90078-7](https://doi.org/10.1016/0141-0229(94)90078-7)
- 437 Panesar, P.S., Kaur, R., Singla, G., Sangwan, R.S., 2016. Bio-processing of Agro-  
 438 industrial Wastes for Production of Food-grade Enzymes: Progress and Prospects.  
 439 *Appl. Food Biotechnol.* 3, 208–227. <https://doi.org/10.22037/afb.v3i4.13458>
- 440 Rangabhashiyam, S., Lata, S., Balasubramanian, P., 2018. Biosorption characteristics of  
 441 methylene blue and malachite green from simulated wastewater onto *Carica*  
 442 *papaya* wood biosorbent. *Surfaces and Interfaces* 10, 197–215.  
 443 <https://doi.org/10.1016/j.surfin.2017.09.011>
- 444 Sun, H., Huang, W., Yang, H., Zhang, S., 2016. Co-immobilization of laccase and  
 445 mediator through a self-initiated one-pot process for enhanced conversion of  
 446 malachite green. *J. Colloid Interface Sci.* 471, 20–28.  
 447 <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2016.03.009>

- 448 Teerapatsakul, C., Bucke, C., Parra, R., Keshavarz, T., Chitradon, L., 2008. Dye  
449 decolorisation by laccase entrapped in copper alginate. *World J. Microbiol.*  
450 *Biotechnol.* 24, 1367–1374. <https://doi.org/10.1007/s11274-007-9617-y>
- 451 Teerapatsakul, C., Parra, R., Keshavarz, T., Chitradon, L., 2017. Repeated batch for dye  
452 degradation in an airlift bioreactor by laccase entrapped in copper alginate. *Int.*  
453 *Biodeterior. Biodegrad.* 120, 52–57. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2017.02.001>
- 454 Thakur, V., Kumar, P., Verma, A., Chand, D., 2015. Decolorization of dye by alginate  
455 immobilized laccase from *Cercospora* SPF-6: Using compact 5 stage plug flow  
456 reactor. *Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci* 4, 183–200.
- 457 Wang, S.S., Ning, Y.J., Wang, S.N., Zhang, J., Zhang, G.Q., Chen, Q.J., 2017.  
458 Purification, characterization, and cloning of an extracellular laccase with potent  
459 dye decolorizing ability from white rot fungus *Cerrena unicolor* GSM-01. *Int. J.*  
460 *Biol. Macromol.* 95, 920–927. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.10.079>
- 461 Wong, S., Yac'cob, N.A.N., Ngadi, N., Hassan, O., Inuwa, I.M., 2017. From pollutant  
462 to solution of wastewater pollution: Synthesis of activated carbon from textile  
463 sludge for dye adsorption. *Chinese J. Chem. Eng.*  
464 <https://doi.org/10.1016/j.cjche.2017.07.015>
- 465

$$\eta (\%) = [(U_o - U_f) / U_o] * 100 \quad \text{Eq. (A.1)}$$

Onde:

$\eta$  (%) = rendimento de imobilização

$U_o$  = Atividade enzimática do extrato antes da imobilização

$U_f$  = Atividade enzimática do extrato após imobilização

$$D (\%) = [(A_o - A_f) / A_o] * 100 \quad \text{Eq. (A.2)}$$

Onde:

$D$  (%) = Porcentagem de descoloração

$A_o$  = Absorbância do corante no tempo zero

$A_f$  = Absorbância lida nos tempos de ensaio

b

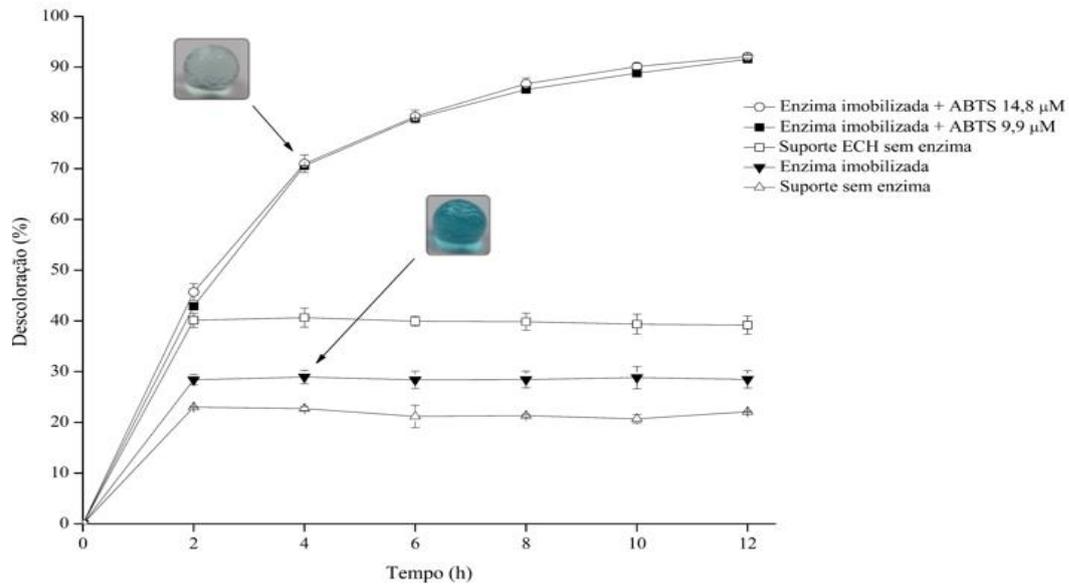


Figura 1. Descoloração do corante Verde Malaquita (45 mg/L) em 12 h

NOTA: O desvio padrão por ser menor que 5% não pode ser observado no gráfico.

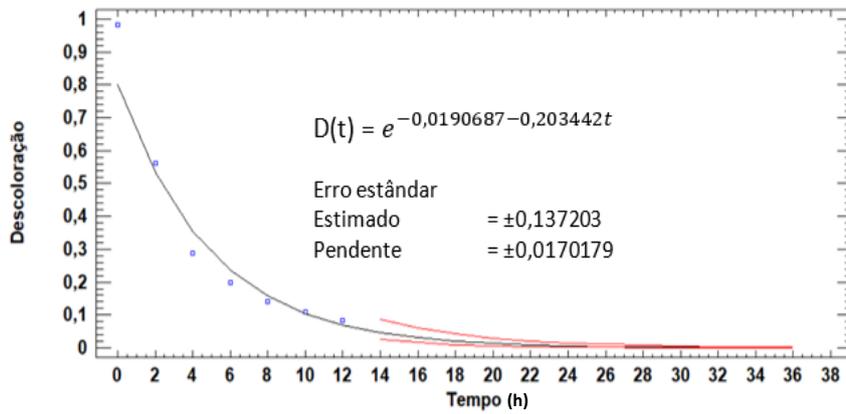


Figura 2. Modelo matemático com tendência linear ajustado com logaritmo natural para previsão do valor de absorvância após 12 h de ensaio.

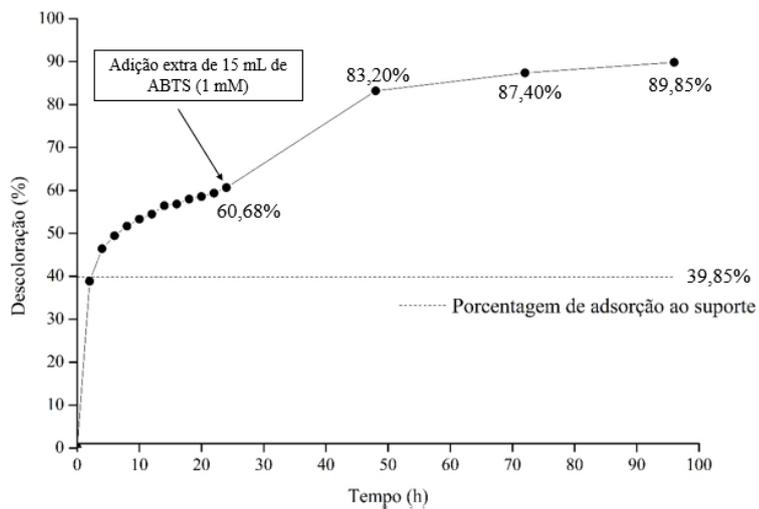


Figura 3 Ensaio de descoloração do corante Verde Malaquita (45 mg/L) em reator tipo cesto contendo a enzima imobilizada em esferas de alginato de cobre tratadas com ECH, com volume inicial de 15 ml de ABTS 1 mM. No tempo de 24 h foi feita nova adição de de 15 ml de ABTS 1 mM.

Tabela 1. Comparação entre duas técnicas de imobilização da enzima lacase utilizando como suporte alginato de cobre 1,25% (m/v).

<b>Técnica de imobilização</b>	<b>Extrato enzimático bruto</b>	<b>Atividade enzimática da lacase imobilizada (UI/g)*</b>	<b>Desprendimento da enzima do suporte</b>	<b>Rendimento da imobilização</b>
Adsorção física	Não liofilizado	31,63	Alto	73,06
Ligação covalente (ECH)	Liofilizado	52,91	Baixa	38,24

\*Atividade da enzima por massa de suporte

### Highlights:

A produção de Lacase por *P. ostreatus* é possível utilizando casca de arroz suplementada com farelo de soja como substrato.

A imobilização por ligação covalente melhora a adesão da enzima ao suporte.

A enzima lacase imobilizada possibilita a descoloração do corante Verde Malaquita.