

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 Távila Ferreira Silva^{a1}, Bruna Curry Carneiro^a, Pedro Nascimento^a

5 ^a*Escola de Engenharia de Lorena – Universidade de São Paulo,*

¹ 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

1 Introdução

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

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

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

A efetividade das enzimas livres na descoloração de efluentes têxteis foi demonstrada anteriormente. Ao contrário do uso de enzimas livres, a imobilização permite o reuso e estabilização das enzimas (Champagne e Ramsay, 2010). Diversas pesquisas sobre descoloração e detoxificação de corantes utilizando lacase imobilizada 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.

2 Materiais e Métodos

2.1 Materiais

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

2.2 Microrganismo

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

2.3 Substrato sólido

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

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

2.4 Extração da enzima



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

2.5 Preparo do suporte

O suporte de imobilização da enzima lacase foi preparado a partir de uma solução de 1,25% (m/v) de alginato de sódio em água destilada, utilizando agitador magnético para completa solubilização. A solução de alginato foi deixada em repouso por 20 min e então gotejada manualmente com seringa sobre uma solução de sulfato de cobre (0,2 M) sob baixa agitação. Utilizou-se uma agulha de 0,45 mm de diâmetro por 13 mm de comprimento (26G1/2"). Ao término do gotejamento, o sistema foi mantido em repouso por 30 min para o enrijecimento das esferas. As esferas formadas foram separadas da solução de CuSO_4 por filtração em papel de filtro e lavadas com água destilada.

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

2.6 Imobilização por aprisionamento

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

2.7 Imobilização por adsorção

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

2.8 Imobilização por ligação covalente

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



2.9 Determinação da atividade enzimática da lacase livre e imobilizada

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

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

2.10 Determinação do rendimento de imobilização

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

2.11 Descoloração de corantes

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

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

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

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

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

2.12 Porcentagem de descoloração

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

2.13 Descoloração em reator tipo cesto

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

2.14 Análise estatística

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

2.15 Modelagem do experimento

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

3 Resultados e discussão

3.1 Produção enzimática

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

3.2 Escolha do suporte

Como já relatado por Teerapatsakul et al. (2008), o uso de agentes *cross-linking* como CaCl_2 , CuSO_4 e AlCl_3 aumentam a estabilidade da enzima. Além disso, Palmieri et al. (1994) reportaram que no caso da lacase, por ser uma cuproproteína, o uso do sulfato de cobre atua tanto na estabilização da enzima devido aos íons cobre, quanto na solidificação do suporte. Deste modo, o presente trabalho optou pelo uso de CuSO_4 como agente solidificador do alginato. Esferas produzidas possuíam 3 mm de diâmetro e apresentaram um formato regular e aspecto rugoso.

3.3 Técnicas de imobilização para a Lacase

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

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

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

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

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

3.4 Teste de descoloração de 12 h

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

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

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

3.5 Modelagem do processo de descoloração

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

3.6 Descoloração em reator tipo cesto

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

4 Conclusões

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

Referências

- Arantes, V., Milagres, A.M.F., 2007. The synergistic action of ligninolytic enzymes (MnP and Laccase) and Fe³⁺-reducing activity from white-rot fungi for degradation of Azure B. *Enzyme Microb. Technol.* 42, 17–22. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2007.07.017>
- Balan, K., Sathishkumar, P., Palvannan, T., 2012. Decolorization of malachite green by laccase: Optimization by response surface methodology. *J. Taiwan Inst. Chem. Eng.* 43, 776–782. <https://doi.org/10.1016/j.jtice.2012.04.005>
- Bayramoglu, G., Yilmaz, M., Arica, M.Y., 2010. Preparation and characterization of epoxy-functionalized magnetic chitosan beads: Laccase immobilized for degradation of reactive dyes. *Bioprocess Biosyst. Eng.* 33, 439–448. <https://doi.org/10.1007/s00449-009-0345-6>
- Bazin, I., Ibn Hadj Hassine, A., Haj Hamouda, Y., Mnif, W., Bartegi, A., Lopez-Ferber, M., De Waard, M., Gonzalez, C., 2012. Estrogenic and anti-estrogenic activity of 23 commercial textile dyes. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 85, 131–136. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2012.08.003>
- 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. <https://doi.org/10.1007/s10295-008-0463-1>
- Canilha, L., Chandel, A.K., Suzane Dos Santos Milessi, T., Antunes, F.A.F., Luiz Da Costa Freitas, W., Das Graças Almeida Felipe, M., Da Silva, S.S., 2012. Bioconversion of sugarcane biomass into ethanol: An overview about composition, pretreatment methods, detoxification of hydrolysates, enzymatic saccharification, and ethanol fermentation. *J. Biomed. Biotechnol.* 2012, 16. <https://doi.org/10.1155/2012/989572>
- Champagne, P.P., Ramsay, J.A., 2010. Dye decolorization and detoxification by laccase immobilized on porous glass beads. *Bioresour. Technol.* 101, 2230–2235. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.11.066>
- Choudhury, A.K.R., 2017. Sustainable chemical technologies for textile production, in: Subramanian Senthilkannan Muthu (Ed.), *The Textile Institute Book Series Sustainable Fibres and Textiles*. Elsevier Inc., pp. 267–322. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-102041-8.00010-X>
- Claus, H., Faber, G., König, H., 2002. Redox-mediated decolorization of synthetic dyes by fungal laccases. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 59, 672–678. <https://doi.org/10.1007/s00253-002-1047-z>
- Das, A., Bhattacharya, S., Panchanan, G., Navya, B.S., Nambiar, P., 2016. Production, characterization and Congo red dye decolourizing efficiency of a laccase from *Pleurotus ostreatus* MTCC 142 cultivated on co-substrates of paddy straw and corn husk. *J. Genet. Eng. Biotechnol.* 14, 281–288. <https://doi.org/10.1016/j.jgeb.2016.09.007>
- Hossain, L., Sarker, S.K., Khan, M.S., 2018. Evaluation of present and future wastewater impacts of textile dyeing industries in Bangladesh. *Environ. Dev.* <https://doi.org/10.1016/j.envdev.2018.03.005>

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

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

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

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

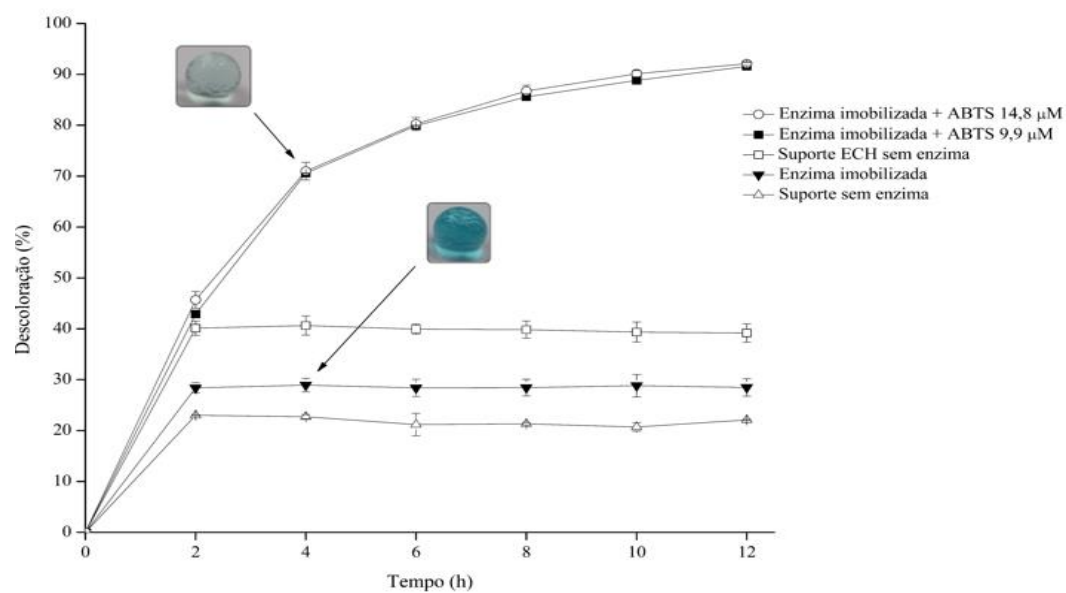


Figura 1. Descoloração do corante Verde Malaquita (45 mg/L) em 12 h

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

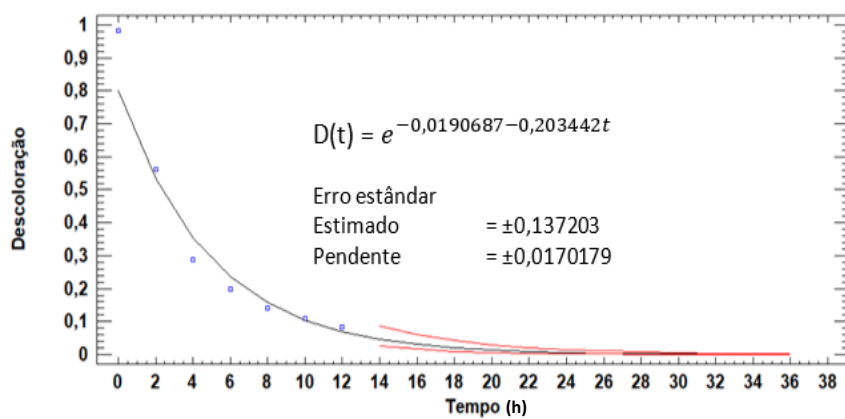


Figura 2. Modelo matemático com tendência linear ajustado com logaritmo natural para previsão do valor de absorbância após 12 h de ensaio.

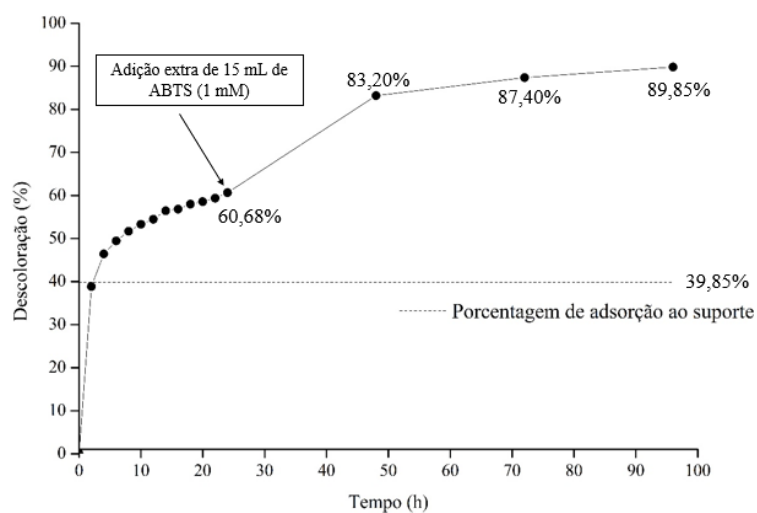


Figura 3 Ensaio de descoloração do corante Verde Malaquita (45 mg/L) em reator tipo cesto contendo a enzima imobilizada em esferas de alginato de cobre tratadas com ECH, com volume inicial de 15 ml de ABTS 1 mM. No tempo de 24 h foi feita nova adição de de 15 ml de ABTS 1 mM.

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

Técnica de imobilização	Extrato enzimático bruto	Atividade enzimática da lacase imobilizada (UI/g)*	Desprendimento da enzima do suporte	Rendimento da imobilização	*
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.