

XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

Efeito da Adsorção por Carvão Ativado sobre a Atividade de Lacases e a Remoção de Cor e Turbidez de um Extrato Enzimático Bruto de *Pleurotus sajor-caju* PS-2001

Simone Zaccaria¹, Nicole Amanda Boff¹, Fernanda Bettin¹, Aldo José Pinheiro Dillon¹

¹Universidade de Caxias do Sul – Instituto de Biotecnologia
Caixa Postal 1352 – 95070-560 – Caxias do Sul/RS – E-mail: szaccaria@ucs.br

RESUMO

*Lacases são enzimas capazes de degradar uma ampla gama de substratos fenólicos e possuem potencial de aplicação em diversas áreas. Carvão ativado é bastante conhecido por sua capacidade de adsorver diferentes compostos, especialmente os que conferem cor. No presente trabalho, foi estudado o efeito da adição de diferentes concentrações de carvão ativado sobre a atividade de lacases e a remoção de cor e turbidez de um extrato enzimático bruto produzido por *Pleurotus sajor-caju* PS-2001. Foram testadas concentrações variando de 2 a 100 g.L⁻¹ de carvão ativado, durante 120 minutos de reação. Os resultados mostraram que a adição de 50 g.L⁻¹ de carvão promoveu aumento na atividade de lacases, possivelmente, devido à adsorção de compostos inibitórios presentes no caldo. Esta concentração também proporcionou a remoção de cor do extrato enzimático, porém, a turbidez apresentou pouca variação em relação às diferentes concentrações de carvão ativado testadas.*

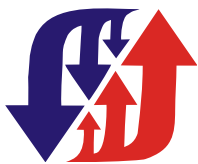
Palavras-chave: *Pleurotus sajor-caju*, lacases, carvão ativado, adsorção, turbidez.

INTRODUÇÃO

Lacases são responsáveis pela oxidação de grupos fenólicos livres, retirando um elétron do substrato aromático, com conseqüente redução de O₂ a H₂O (Esposito & Azevedo, 2010). Os principais produtores dessas enzimas são fungos da degradação branca, como os do gênero *Pleurotus*, tanto em cultivos sólidos como submersos (Said & Pietro, 2004). Atualmente, as principais aplicações biotecnológicas de lacases são nas indústrias têxtil e de papel e celulose (Riva, 2006). Porém, estas enzimas possuem, também, potencial de utilização na biorremediação de solos contaminados e no tratamento de efluentes, uma vez que atuam sobre a uma ampla gama de substratos e compostos xenobióticos, tais como fenóis clorados, pesticidas e hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (Viswanath *et al.*, 2014).

A ampla aplicação de lacases em processos industriais depende de vários fatores, como baixo custo de produção, boa estabilidade quando armazenadas em condições moderadas e capacidade de exercer sua atividade catalítica em velocidade e condições de reação adequadas (Kurniawati & Nicell, 2008). Com isso, o uso de enzimas na remoção e na transformação de compostos tóxicos requer o desenvolvimento de metodologias que mantenham a enzima estável no sistema, além de permitir sua reutilização (Said & Pietro, 2004).

Carvão ativado é produzido a partir de materiais como madeira e alguns subprodutos agrícolas (Kareem *et al.*, 2011). Sua elevada capacidade de adsorção se deve a sua ampla área superficial, à estrutura dos poros e às propriedades químicas, podendo adsorver compostos que conferem cor e odor, além de cloro e compostos orgânicos em geral (Suresh *et al.*, 2012). A utilização de carvão ativado na purificação de enzimas microbianas apresenta vantagens sobre as técnicas convencionais (como precipitação salina, por solventes ou filtração em gel), tais como baixo custo, fácil separação do sobrenadante e elevado percentual de purificação, além



XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

de ser um processo rápido, tornando-o uma alternativa promissora para estes processos (Kareem *et al.*, 2011). Diante disto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a influência de diferentes concentrações de carvão ativado sobre a atividade de lacases e a descoloração de um extrato enzimático bruto de *Pleurotus sajor-caju* PS-2001 produzido em cultivo submerso.

MATERIAL E MÉTODOS

Linhagem e obtenção do extrato enzimático – Foi utilizada a linhagem de *Pleurotus sajor-caju* PS-2001 para a produção de lacases em biorreator com agitação mecânica. O caldo foi produzido, filtrado para a separação do micélio, congelado e, posteriormente, descongelado para a realização dos testes com carvão ativado (Bettin *et al.*, 2009; Bettin *et al.*, 2011).

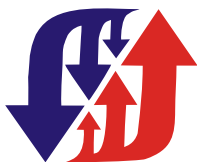
Tratamentos com carvão ativado – Foi utilizado carvão ativado em pó (ECIBRA, Brasil) nas concentrações de 2, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 e 100 g.L⁻¹. Frascos Becker de 250 mL contendo 100 mL de caldo enzimático, aos quais foram acrescidas as diferentes concentrações de carvão, foram mantidos sob agitação magnética em temperatura ambiente ($\pm 25^{\circ}\text{C}$) e amostras de 10 mL foram coletadas aos 15, 30, 60, 90 e 120 minutos. Após, as amostras foram filtradas em papel filtro, centrifugadas a 10.000 rpm para a separação do sobrenadante e a realização dos procedimentos analíticos.

Determinação da atividade de lacases e de proteínas solúveis totais – Lacases foram quantificadas pela oxidação do substrato ABTS em tampão acetato de sódio pH 5,0 por 90 segundos a 25°C, em 420 nm (Wolfenden & Willson, 1982). Proteínas solúveis totais foram mensuradas pelo método de Bradford (1976), utilizando uma curva padrão de albumina bovina, submetida às mesmas condições das amostras, em 595 nm.

Espectrofotometria de varredura do caldo enzimático e quantificação de turbidez – A absorbância do caldo enzimático bruto (475 nm) foi determinada através da obtenção do pico máximo de absorbância, observado no espectro de luz visível (de 350 a 750 nm), em espectrofotômetro *Molecular Devices - SpectraMax 190*. A turbidez do extrato bruto foi quantificada em um turbidímetro *Digimed DM-TU*, utilizando-se 6 mL de amostra diluída em 6 mL de água destilada, em temperatura ambiente ($\pm 25^{\circ}\text{C}$).

RESULTADOS E DISCUSSÕES

Neste trabalho, avaliou-se a influência da utilização de diferentes concentrações de carvão ativado, adicionado ao extrato enzimático bruto, sobre a atividade de lacases de *P. sajor-caju* PS-2001 e a remoção de cor deste extrato. Na Figura 1, são apresentados os dados referentes à atividade de lacases, à concentração de proteínas solúveis totais e à variação do pH durante os tratamentos com carvão ativado. Foi observado um acréscimo na atividade de lacases (Figura 1A), para todas as concentrações testadas, sendo que, na presença de 50 g.L⁻¹ de carvão, foi observado o maior aumento de atividade, passando de cerca de 26 U.mL⁻¹ para aproximadamente 53 U.mL⁻¹ após 120 minutos de reação. A concentração de 50 g.L⁻¹ também apresentou queda considerável nos níveis de proteínas solúveis totais (Figura 1B), assim como as concentrações de 90 e 100 g.L⁻¹, sugerindo que a adsorção de proteínas possa ter favorecido o aumento da atividade enzimática, possivelmente por causarem interferência negativa na ação catalítica das lacases presentes no extrato. Com relação à variação do pH (Figura 1C), é



XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

possível observar que, com o aumento da concentração de carvão ativado, ocorreu um aumento nos valores de pH, variando entre 6,6 e 7,5.

Os 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, observando, também, que o aumento da temperatura do processo proporcionou incremento da capacidade de adsorção de proteínas pelo carvão ativado. Já Poletto *et al.* (2015) 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.

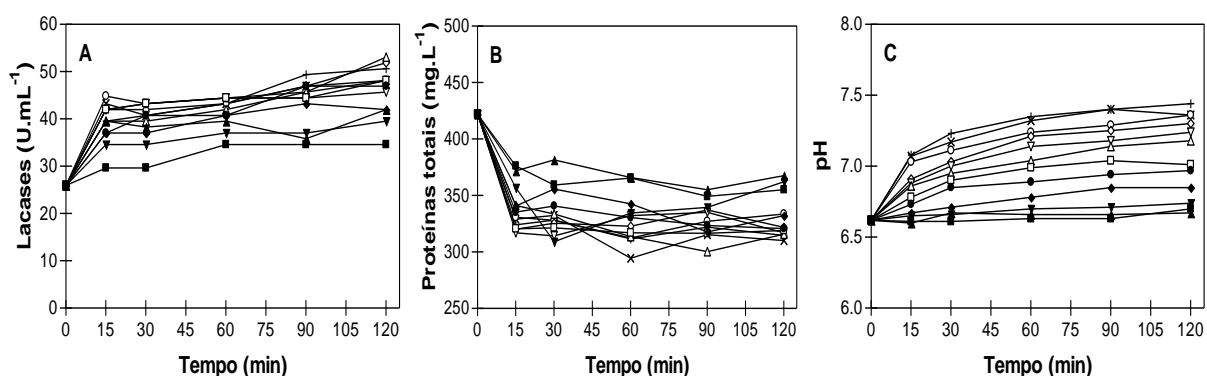


Figura 1. Atividade de lacases (A), concentração de proteínas solúveis totais (B) e variação do pH (C) em função do tempo durante tratamentos com carvão ativado de um extrato enzimático bruto produzido por *Pleurotus sajor-caju* PS-2001 em processo submerso. (■) 2 g.L⁻¹, (▲) 5 g.L⁻¹, (▼) 10 g.L⁻¹, (◆) 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.

Na Figura 2, são apresentados os dados obtidos quanto à descoloração do extrato enzimático e à turbidez. As maiores quedas nos níveis de absorbância (Figura 2A) foram observadas na presença de 50 e 80 g.L⁻¹ de carvão ativado, ambos com cerca de 32% de remoção de cor. Poletto *et al.* (2015) relataram que ocorreu diminuição na absorbância do extrato enzimático bruto de *A. niger* pela adição de carvão ativado, enquanto Kareem *et al.* (2011) observaram que o aumento da temperatura também afeta positivamente o processo de descoloração por carvão, sendo a temperatura um parâmetro não avaliado no presente trabalho.

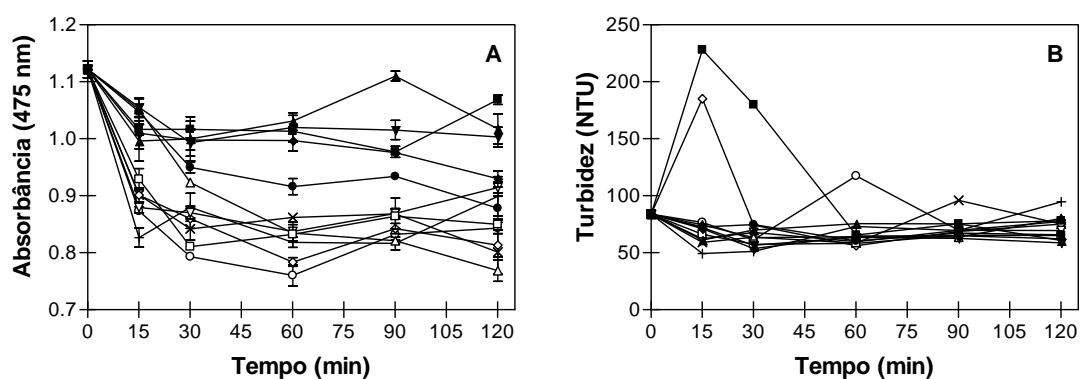
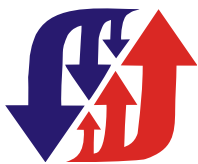


Figura 2. Absorbância (A) e turbidez (B) em função do tempo durante tratamentos com carvão ativado de um extrato enzimático bruto produzido por *Pleurotus sajor-caju* PS-2001 em processo submerso. (■) 2 g.L⁻¹, (▲) 5 g.L⁻¹, (▼) 10 g.L⁻¹, (◆) 20 g.L⁻¹, (●) 30 g.L⁻¹, (□) 40 g.L⁻¹, (Δ) 50 g.L⁻¹, (▽) 60 g.L⁻¹,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



XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

Em relação à turbidez (Figura 2B), concentrações de carvão superiores a 70 g.L^{-1} proporcionaram aumento na turbidez das amostras em determinados tempos avaliados; ainda, com 2 g.L^{-1} de carvão, atingiram-se 228 NTU (*Nephelometric Turbidity Unit* - unidade nefelométrica de turbidez) após 15 minutos de reação. Para as demais concentrações testadas, foi observada uma leve queda na turbidez, não havendo uma diferença relevante entre os diferentes tratamentos, que permaneceram em torno de 65 NTU ao longo do período de tempo avaliado, resultando em redução de aproximadamente 22% na turbidez. Estes resultados foram inferiores aos observados por Kareem *et al.* (2011), que observaram redução de cerca de 90% da turbidez de amostras contendo glicoamilase após adição de 3% (m/v) de carvão ativado.

CONCLUSÕES

Os dados apresentados neste trabalho mostram que o tratamento do extrato enzimático bruto de *P. sajor-caju* PS-2001 com diferentes concentrações de carvão ativado incrementa os níveis de lacases, possivelmente devido à adsorção de compostos inibitórios da atividade catalítica, bem como para a remoção da cor e da turbidez do caldo. Estes resultados apontam a utilização de carvão ativado como uma alternativa viável e de baixo custo para o pré-tratamento enzimático, visando à implementação de uma tecnologia de concentração de lacases, para aplicação em diferentes segmentos industriais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bettin F, Montanari Q, Calloni R, Gaio TA, Silveira MM, Dillon AJP. 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 LO, Montanari Q, Calloni R, Gaio TA, Malvessi E, Silveira MM, Dillon AJP. 2011. Growth, kinetics, production, and characterization of extracellular laccases from *Pleurotus sajor-caju* PS-2001. *Process Biochem* 46:758-764.
- Bradford MM. 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.
- Esposito E, Azevedo JL. 2010. Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia. Caxias do Sul: EDUCS. 510p.
- Kareem SO, Akpan I, Popoola TOS, Sanni LO. 2011. Activated charcoal: a potential material in glucoamylase recovery. *Enzyme Res* 2011:1-4.
- Kurniawati S, Nicell JA. 2008. Characterization of *Trametes versicolor* laccase for the transformation of aqueous phenol. *Bioresour Technol* 99:7825-7834.
- Poletto P, Renosto DR, Baldasso C, Zeni M, Silveira MM. 2015. Activated charcoal and microfiltration as pretreatment before ultrafiltration of pectinases produced by *Aspergillus niger* in solid-state cultivation. *Sep Purif Technol* 151:102-107.
- Riva S. 2006. Laccases: blue enzymes for green chemistry. *Trends Microbiol* 24:221-226.
- Said S, Pietro RCLR. 2004. Enzimas como agentes biotecnológicos. Ribeirão Preto: Legis Summa. 383p.
- Suresh S, Srivastav VC, Mishra IM. 2012. Adsorption of catechol, resorcinol, hydroquinone, and their derivatives: a review. *Int J Energy Environ Eng* 32:1-19.
- Viswanath B, Rajesh B, Janardhan A, Kumar AP, Narasimha G. 2014. Fungal laccases and their applications in bioremediation. *Enzyme Res* 2014:1-21.
- Wolfenden BS, Willson RL. 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.

Apoio: CAPES, FAPERGS e UCS.