



**Franciele Braga Machado Túllio  
Lucio Mauro Braga Machado  
(Organizadores)**

# **A Aplicação do Conhecimento Científico nas Engenharias 3**

**Atena**  
Editora  
Ano 2020





**Franciele Braga Machado Túllio  
Lucio Mauro Braga Machado  
(Organizadores)**

# **A Aplicação do Conhecimento Científico nas Engenharias 3**

**Atena**  
Editora  
Ano 2020



2020 by Atena Editora

Copyright © Atena Editora

Copyright do Texto © 2020 Os autores

Copyright da Edição © 2020 Atena Editora

**Editora Chefe:** Profª Drª Antonella Carvalho de Oliveira

**Diagramação:** Geraldo Alves

**Edição de Arte:** Lorena Prestes

**Revisão:** Os Autores



Todo o conteúdo deste livro está licenciado sob uma Licença de Atribuição *Creative Commons*. Atribuição 4.0 Internacional (CC BY 4.0).

O conteúdo dos artigos e seus dados em sua forma, correção e confiabilidade são de responsabilidade exclusiva dos autores. Permitido o download da obra e o compartilhamento desde que sejam atribuídos créditos aos autores, mas sem a possibilidade de alterá-la de nenhuma forma ou utilizá-la para fins comerciais.

### **Conselho Editorial**

#### **Ciências Humanas e Sociais Aplicadas**

Profª Drª Adriana Demite Stephani – Universidade Federal do Tocantins  
Prof. Dr. Álvaro Augusto de Borba Barreto – Universidade Federal de Pelotas  
Prof. Dr. Alexandre Jose Schumacher – Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Mato Grosso  
Prof. Dr. Antonio Carlos Frasson – Universidade Tecnológica Federal do Paraná  
Prof. Dr. Antonio Gasparetto Júnior – Instituto Federal do Sudeste de Minas Gerais  
Prof. Dr. Antonio Isidro-Filho – Universidade de Brasília  
Prof. Dr. Carlos Antonio de Souza Moraes – Universidade Federal Fluminense  
Prof. Dr. Constantino Ribeiro de Oliveira Junior – Universidade Estadual de Ponta Grossa  
Profª Drª Cristina Gaio – Universidade de Lisboa  
Profª Drª Denise Rocha – Universidade Federal do Ceará  
Prof. Dr. Deyvison de Lima Oliveira – Universidade Federal de Rondônia  
Prof. Dr. Edvaldo Antunes de Farias – Universidade Estácio de Sá  
Prof. Dr. Eloi Martins Senhora – Universidade Federal de Roraima  
Prof. Dr. Fabiano Tadeu Grazioli – Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões  
Prof. Dr. Gilmei Fleck – Universidade Estadual do Oeste do Paraná  
Profª Drª Ivone Goulart Lopes – Istituto Internazionale delle Figlie di Maria Ausiliatrice  
Prof. Dr. Julio Candido de Meirelles Junior – Universidade Federal Fluminense  
Profª Drª Keyla Christina Almeida Portela – Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Mato Grosso  
Profª Drª Lina Maria Gonçalves – Universidade Federal do Tocantins  
Profª Drª Natiéli Piovesan – Instituto Federal do Rio Grande do Norte  
Prof. Dr. Marcelo Pereira da Silva – Universidade Federal do Maranhão  
Profª Drª Miranilde Oliveira Neves – Instituto de Educação, Ciência e Tecnologia do Pará  
Profª Drª Paola Andressa Scortegagna – Universidade Estadual de Ponta Grossa  
Profª Drª Rita de Cássia da Silva Oliveira – Universidade Estadual de Ponta Grossa  
Profª Drª Sandra Regina Gardacho Pietrobon – Universidade Estadual do Centro-Oeste  
Profª Drª Sheila Marta Carregosa Rocha – Universidade do Estado da Bahia  
Prof. Dr. Rui Maia Diamantino – Universidade Salvador  
Prof. Dr. Urandi João Rodrigues Junior – Universidade Federal do Oeste do Pará  
Profª Drª Vanessa Bordin Viera – Universidade Federal de Campina Grande  
Prof. Dr. William Cleber Domingues Silva – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro  
Prof. Dr. Willian Douglas Guilherme – Universidade Federal do Tocantins

#### **Ciências Agrárias e Multidisciplinar**

Prof. Dr. Alexandre Igor Azevedo Pereira – Instituto Federal Goiano  
Prof. Dr. Antonio Pasqualetto – Pontifícia Universidade Católica de Goiás  
Profª Drª Daiane Garabeli Trojan – Universidade Norte do Paraná

Profª Drª Diocléa Almeida Seabra Silva – Universidade Federal Rural da Amazônia  
Prof. Dr. Écio Souza Diniz – Universidade Federal de Viçosa  
Prof. Dr. Fábio Steiner – Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul  
Prof. Dr. Fágner Cavalcante Patrocínio dos Santos – Universidade Federal do Ceará  
Profª Drª Girlene Santos de Souza – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia  
Prof. Dr. Júlio César Ribeiro – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro  
Profª Drª Lina Raquel Santos Araújo – Universidade Estadual do Ceará  
Prof. Dr. Pedro Manuel Villa – Universidade Federal de Viçosa  
Profª Drª Raissa Rachel Salustriano da Silva Matos – Universidade Federal do Maranhão  
Prof. Dr. Ronilson Freitas de Souza – Universidade do Estado do Pará  
Profª Drª Talita de Santos Matos – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro  
Prof. Dr. Tiago da Silva Teófilo – Universidade Federal Rural do Semi-Árido  
Prof. Dr. Valdemar Antonio Paffaro Junior – Universidade Federal de Alfenas

### **Ciências Biológicas e da Saúde**

Prof. Dr. André Ribeiro da Silva – Universidade de Brasília  
Profª Drª Anelise Levay Murari – Universidade Federal de Pelotas  
Prof. Dr. Benedito Rodrigues da Silva Neto – Universidade Federal de Goiás  
Prof. Dr. Edson da Silva – Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri  
Profª Drª Eleuza Rodrigues Machado – Faculdade Anhanguera de Brasília  
Profª Drª Elane Schwinden Prudêncio – Universidade Federal de Santa Catarina  
Prof. Dr. Ferlando Lima Santos – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia  
Prof. Dr. Gianfábio Pimentel Franco – Universidade Federal de Santa Maria  
Prof. Dr. Igor Luiz Vieira de Lima Santos – Universidade Federal de Campina Grande  
Prof. Dr. José Max Barbosa de Oliveira Junior – Universidade Federal do Oeste do Pará  
Profª Drª Magnólia de Araújo Campos – Universidade Federal de Campina Grande  
Profª Drª Mylena Andréa Oliveira Torres – Universidade Ceuma  
Profª Drª Natiéli Piovesan – Instituto Federaci do Rio Grande do Norte  
Prof. Dr. Paulo Inada – Universidade Estadual de Maringá  
Profª Drª Vanessa Lima Gonçalves – Universidade Estadual de Ponta Grossa  
Profª Drª Vanessa Bordin Viera – Universidade Federal de Campina Grande

### **Ciências Exatas e da Terra e Engenharias**

Prof. Dr. Adélio Alcino Sampaio Castro Machado – Universidade do Porto  
Prof. Dr. Alexandre Leite dos Santos Silva – Universidade Federal do Piauí  
Prof. Dr. Carlos Eduardo Sanches de Andrade – Universidade Federal de Goiás  
Profª Drª Carmen Lúcia Voigt – Universidade Norte do Paraná  
Prof. Dr. Eloi Rufato Junior – Universidade Tecnológica Federal do Paraná  
Prof. Dr. Fabrício Menezes Ramos – Instituto Federal do Pará  
Prof. Dr. Juliano Carlo Rufino de Freitas – Universidade Federal de Campina Grande  
Prof. Dr. Marcelo Marques – Universidade Estadual de Maringá  
Profª Drª Neiva Maria de Almeida – Universidade Federal da Paraíba  
Profª Drª Natiéli Piovesan – Instituto Federal do Rio Grande do Norte  
Prof. Dr. Takeshy Tachizawa – Faculdade de Campo Limpo Paulista

### **Conselho Técnico Científico**

Prof. Msc. Abrãao Carvalho Nogueira – Universidade Federal do Espírito Santo  
Prof. Msc. Adalberto Zorzo – Centro Estadual de Educação Tecnológica Paula Souza  
Prof. Dr. Adailson Wagner Sousa de Vasconcelos – Ordem dos Advogados do Brasil/Seccional Paraíba  
Prof. Msc. André Flávio Gonçalves Silva – Universidade Federal do Maranhão  
Profª Drª Andreza Lopes – Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento Acadêmico  
Profª Msc. Bianca Camargo Martins – UniCesumar  
Prof. Msc. Carlos Antônio dos Santos – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro  
Prof. Msc. Cláudia de Araújo Marques – Faculdade de Música do Espírito Santo  
Prof. Msc. Daniel da Silva Miranda – Universidade Federal do Pará  
Profª Msc. Dayane de Melo Barros – Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Edwaldo Costa – Marinha do Brasil  
Prof. Msc. Eliel Constantino da Silva – Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita  
Prof. Msc. Gevair Campos – Instituto Mineiro de Agropecuária  
Prof. Msc. Guilherme Renato Gomes – Universidade Norte do Paraná  
Prof<sup>a</sup> Msc. Jaqueline Oliveira Rezende – Universidade Federal de Uberlândia  
Prof. Msc. José Messias Ribeiro Júnior – Instituto Federal de Educação Tecnológica de Pernambuco  
Prof. Msc. Leonardo Tullio – Universidade Estadual de Ponta Grossa  
Prof<sup>a</sup> Msc. Lilian Coelho de Freitas – Instituto Federal do Pará  
Prof<sup>a</sup> Msc. Liliani Aparecida Sereno Fontes de Medeiros – Consórcio CEDERJ  
Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Lívia do Carmo Silva – Universidade Federal de Goiás  
Prof. Msc. Luis Henrique Almeida Castro – Universidade Federal da Grande Dourados  
Prof. Msc. Luan Vinicius Bernardelli – Universidade Estadual de Maringá  
Prof. Msc. Rafael Henrique Silva – Hospital Universitário da Universidade Federal da Grande Dourados  
Prof<sup>a</sup> Msc. Renata Luciane Polsaque Young Blood – UniSecal  
Prof<sup>a</sup> Msc. Solange Aparecida de Souza Monteiro – Instituto Federal de São Paulo  
Prof. Dr. Welleson Feitosa Gazel – Universidade Paulista

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
(eDOC BRASIL, Belo Horizonte/MG)**

A642 A aplicação do conhecimento científico nas engenharias 3 [recurso eletrônico] / Organizadores Franciele Braga Machado Túllio, Lucio Mauro Braga Machado. – Ponta Grossa, PR: Atena Editora, 2020. – (A Aplicação do Conhecimento Científico nas Engenharias; v. 3)

Formato: PDF

Requisitos de sistema: Adobe Acrobat Reader

Modo de acesso: World Wide Web

Inclui bibliografia

ISBN 978-85-7247-910-3

DOI 10.22533/at.ed.103201301

1. Engenharia – Pesquisa – Brasil. 2. Inovação. I. Túllio, Franciele Braga Machado. II. Machado, Lucio Mauro Braga. III. Série.

CDD 620.0072

**Elaborado por Maurício Amormino Júnior – CRB6/2422**

Atena Editora  
Ponta Grossa – Paraná - Brasil  
[www.atenaeditora.com.br](http://www.atenaeditora.com.br)  
[contato@atenaeditora.com.br](mailto:contato@atenaeditora.com.br)

## APRESENTAÇÃO

A obra “Pesquisa Científica e Inovação Tecnológica nas Engenharias 3” apresenta dezessete capítulos em que os autores abordam pesquisas científicas e inovações tecnológicas aplicadas em diversas áreas de engenharia, priorizando as áreas de ecologia, saneamento e saúde.

Nestes capítulos os autores utilizam a pesquisa científica para produzir conhecimento e inovação visando contribuir para bom uso de nossos recursos ambientais, cuidando da saúde de nosso planeta e dos que nele habitam.

A engenharia sendo usada para manejo de nossos mananciais, priorizando a exploração salutar de um de nossos maiores recursos naturais: a água.

A saúde da população sendo analisada pelo viés científico, a fim de orientar as políticas públicas na área.

Esperamos que o leitor faça bom uso das pesquisas aqui expostas e que estas possam embasar novos estudos na área. Boa Leitura!

Franciele Braga Machado Túllio  
Lucio Mauro Braga Machado

## SUMÁRIO

<b>CAPÍTULO 1</b> .....	<b>1</b>
A RELEVÂNCIA DA DISTÂNCIA FÍSICA DA UNIDADE BÁSICA DE SAÚDE NA PREVENÇÃO E TRATAMENTO DE PATOLOGIAS NO SETOR JARDIM DAS PEROBEIRAS DE MINEIROS - GO	
Raffael de Carvalho Gonçalves Viviane Caldera Juliana Alves Burgo Godoi	
<b>DOI 10.22533/at.ed.1032013011</b>	
<b>CAPÍTULO 2</b> .....	<b>5</b>
ANÁLISE DOS REGISTROS DE ACIDENTES DE TRABALHO NA PREVIDÊNCIA SOCIAL EM JUAZEIRO DO NORTE NO PERÍODO DE 2008 A 2018	
Esdras Alex Freire de Oliveira Thays Lorranny da Silva Januário Correio José Gonçalves De Araújo Filho	
<b>DOI 10.22533/at.ed.1032013012</b>	
<b>CAPÍTULO 3</b> .....	<b>27</b>
CONTRIBUIÇÃO PARA O PROCESSO DE MONITORAMENTO DE IMPACTOS AMBIENTAIS NA FASE OPERACIONAL DE ESTAÇÕES DE TRATAMENTO DE ESGOTOS SANITÁRIOS	
Poliana Arruda Fajardo Nemésio Neves Batista Salvador	
<b>DOI 10.22533/at.ed.1032013013</b>	
<b>CAPÍTULO 4</b> .....	<b>40</b>
ESTUDOS HIDROGEOLÓGICOS PARA AVALIAR A DISPONIBILIDADE DE UM RECURSO HÍDRICO SUBTERRÂNEO QUENTE NAS TERMAS DA AREOLA	
Pedro Jorge Coelho Ferreira Luis Manuel Ferreira Gomes Alcino Sousa Oliveira Rui Miguel Marques Moura José Martinho Lourenço	
<b>DOI 10.22533/at.ed.1032013014</b>	
<b>CAPÍTULO 5</b> .....	<b>55</b>
FERRAMENTAS DA GESTÃO NA QUALIDADE DA CADEIA PRODUTIVA DOS SUÍNOS SOB SERVIÇO DE INSPEÇÃO MUNICIPAL DO MUNICÍPIO DE SÃO LUIS – MA	
Herlane de Olinda Vieira Barros Célia Maria da Silva Costa Viviane Correa Silva Coimbra Larissa Jaynne Sameneses de Oliveira Zaira de Jesus Barros Nascimento Michelle Lemos Vargens Hugo Napoleão Pires da Fonseca Filho Nathana Rodrigues Lima	
<b>DOI 10.22533/at.ed.1032013015</b>	

<b>CAPÍTULO 6</b> .....	<b>61</b>
GESTÃO AMBIENTAL DE RESÍDUOS SÓLIDOS URBANOS ESTRATIFICADA POR TERRITÓRIOS DE DESENVOLVIMENTO EM MINAS GERAIS	
Denise Marília Bruschi Juliana Oliveira de Miranda Pacheco	
<b>DOI 10.22533/at.ed.1032013016</b>	
<b>CAPÍTULO 7</b> .....	<b>77</b>
LICENCIAMENTO AMBIENTAL - SISTEMA DE COLETA, MONITORAMENTO E ANÁLISE DE DADOS AMBIENTAIS APLICADOS A FERROVIA	
Patricia Ruth Ribeiro Stefani Gabrieli Age Renata Twardowsky Ramalho	
<b>DOI 10.22533/at.ed.1032013017</b>	
<b>CAPÍTULO 8</b> .....	<b>87</b>
MODELAGEM COMPUTACIONAL DE PROCESSOS DE CONTAMINAÇÃO EM MEIOS POROSOS	
Marcelo Lemos da Silva Grazione de Souza Boy	
<b>DOI 10.22533/at.ed.1032013018</b>	
<b>CAPÍTULO 9</b> .....	<b>101</b>
MODELAGEM DE UM FERMENTADOR CILÍNDRICO PARA O CACAU	
Marcelo Bruno Chaves Franco Jorge Henrique de Oliveira Sales Rafaela Cristina Ferreira Brito	
<b>DOI 10.22533/at.ed.1032013019</b>	
<b>CAPÍTULO 10</b> .....	<b>115</b>
O NASCIMENTO DE UMA NOVA ÁGUA MINERAL PARA TERMALISMO E ASPETOS BÁSICOS PARA O ESTABELECIMENTO DE SUAS INDICAÇÕES TERAPÊUTICAS: O CASO DAS TERMAS DE SÃO MIGUEL EM PORTUGAL	
Luís Manuel Ferreira Gomes Luís José Andrade Pais Paulo Eduardo Maia de Carvalho	
<b>DOI 10.22533/at.ed.10320130110</b>	
<b>CAPÍTULO 11</b> .....	<b>129</b>
PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS E CONSTITUINTES METÁLICOS NA AVALIAÇÃO AMBIENTAL DE ECOSSISTEMA LÊNICO	
Maria da Graça Vasconcelos Hugo Gomes Amaral Arthur Dias Freitas Angélica Pereira da Cunha Bruna Fernanda Faria Oliveira	
<b>DOI 10.22533/at.ed.10320130111</b>	

<b>CAPÍTULO 12</b> .....	<b>140</b>
PLANTIOS DE ESPÉCIES NATIVAS DO BIOMA CERRADO EM ÁREAS DEGRADADAS NA ESTAÇÃO ECOLÓGICA DE ÁGUAS EMENDADAS – ESECAE, DISTRITO FEDERAL	
<p>Maria Goreth Goncalves Nobrega  Henrique Cruvinel Borges Filho  Vladimir de Alcântara Puntel Ferreira</p>	
<b>DOI 10.22533/at.ed.10320130112</b>	
<b>CAPÍTULO 13</b> .....	<b>154</b>
PROPOSTA DE BANCO DE ÁREAS PARA RESTAURAÇÃO FLORESTAL DE MATA CILIAR EM TRECHO DO RIO RIBEIRA DE IGUAPE, ESTADO DE SÃO PAULO.	
<p>Marcelo Bento Nascimento da Silva  Ives Simões Arnone  Hugo Portocarrero</p>	
<b>DOI 10.22533/at.ed.10320130113</b>	
<b>CAPÍTULO 14</b> .....	<b>167</b>
PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE LACASES PRODUZIDAS POR <i>Pleurotus ostreatus</i> EM CULTIVO SÓLIDO	
<p>Juliana Cristina da Silveira Vieira  Verônica Távilla Ferreira Silva  Ezequiel Marcelino da Silva  Adriane Maria Ferreira Milagres</p>	
<b>DOI 10.22533/at.ed.10320130114</b>	
<b>CAPÍTULO 15</b> .....	<b>185</b>
QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DA ÁGUA DOS POÇOS DO BAIRRO DA CERÂMICA - CIDADE DA BEIRA, MOÇAMBIQUE	
<p>Albertina Amélia Alberto Nhavoto António Guerner Dias  Daniel Agostinho  Nivaldo Alfredo José Zandamela</p>	
<b>DOI 10.22533/at.ed.10320130115</b>	
<b>CAPÍTULO 16</b> .....	<b>198</b>
RECOMENDAÇÕES BIOCLIMÁTICAS PARA O MUNICÍPIO DE SINOP-MT	
<p>Emília Garcez da Luz  Cristiane Rossato Candido  Érika Fernanda Toledo Borges Leão</p>	
<b>DOI 10.22533/at.ed.10320130116</b>	
<b>CAPÍTULO 17</b> .....	<b>212</b>
RESÍDUOS DE SERVIÇOS DE SAÚDE: COLETA E TRATAMENTO E DESTINAÇÃO FINAL	
<p>Marcela Avelina Bataghin Costa  Fernando Antonio Bataghin  Tatiane Fernandes Zambrano  Rita de Cássica Arruda Fajardo</p>	
<b>DOI 10.22533/at.ed.10320130117</b>	

<b>CAPÍTULO 18</b> .....	<b>226</b>
<b>USO DE GEOCÉLULA PEAD E GABIÃO TIPO COLCHÃO COMO REVESTIMENTOS DE CANAIS PARA DESCARACTERIZAÇÃO DE BARRAGENS DE REJEITO</b>	
Rafael Freitas Rodrigues	
Michel Moreira Morandini Fontes	
João Augusto de Souza Pinto	
Luiz Henrique Resende de Pádua	
Luany Maria de Oliveira	
Cristian Chacon Quispe	
<b>DOI 10.22533/at.ed.10320130118</b>	
<b>SOBRE OS ORGANIZADORES</b> .....	<b>237</b>
<b>ÍNDICE REMISSIVO</b> .....	<b>238</b>

## PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE LACASES PRODUZIDAS POR *Pleurotus ostreatus* EM CULTIVO SÓLIDO

Data de aceite: 02/12/2019

Data de submissão: 09/10/2019

### **Juliana Cristina da Silveira Vieira**

Universidade Federal do Tocantins  
Gurupi - Tocantins

### **Verônica Távilla Ferreira Silva**

Universidade Federal do Tocantins  
Gurupi - Tocantins

### **Ezequiel Marcelino da Silva**

Universidade Federal do Tocantins  
Gurupi - Tocantins

### **Adriane Maria Ferreira Milagres**

Universidade de São Paulo  
Lorena – São Paulo

**RESUMO:** Enzimas têm uma participação importante no mercado de produtos biotecnológicos, atuando como catalisadores específicos e de alto valor agregado. Os resíduos agroindustriais são subprodutos que apresentam potencial para serem aproveitados tanto em escala laboratorial quanto industrial. Dentro deste cenário, o presente trabalho visou utilizar a casca de arroz, resíduo gerado em grande proporção na região no sul do Estado do Tocantins, como substrato para o cultivo em estado sólido do fungo da podridão branca *Pleurotus ostreatus*. A casca de arroz foi aplicada utilizando como suplementos os

farelos de arroz e de soja, nas proporções 70:30 e 90:10 de substrato e farelos, respectivamente, as quais foram determinadas como ótimas para a produção enzimática em estudos anteriores. Dentre as enzimas lignolíticas produzidas por *P. ostreatus*, a Lacase foi investigada pela oxidação do reagente ABTS, a qual se mostrou presente em cada amostra coletada na forma de quatro isoenzimas (LacA1, LacA2, LacS1 e LacS2), obtendo atividade elevada após 15 dias de cultivo ( $1.372,2 \pm 78,2$  UI/L). Lacase foi isolada do extrato bruto por cromatografia de troca iônica usando resina DEAE-Sephacel, assim como a ultrafiltração em membrana (50kDa), sendo eficiente a purificação da LacS1 (Fator de purificação de 1,33). Eletroforese por SDS-PAGE apresentou única banda para cada amostra de isoenzima. Zimograma confirmou as bandas únicas com o substrato ABTS. Testes físico-químicos e termodinâmicos evidenciaram as diferenças catalíticas das enzimas LacA1 e LacS1 das demais isoenzimas em relação às suas temperaturas ideais, energia de ativação e variação de entalpia.

**PALAVRAS-CHAVE:** Casca de Arroz. Farelo de Cereais. Enzimas Lignolíticas.

### PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF FUNGAL LACCASE FROM SOLID-STATE

*Pleurotus ostreatus*

**ABSTRACT:** Enzymes presents a major role in the market for biotechnological products, acting as catalysts, with high added value. Agro-industrial wastes are by-products of low added value, though they have the potential to be applied both in laboratory and industrial scale. In this context, the present study aimed to use the rice husk, residue generated in great proportion in the Tocantins State as substrate for solid-state cultivation of white rot fungus *Pleurotus ostreatus*. The rice husk was applied using rice and soybean bran as supplements, in proportion of 70:30 and 90:10 substrate:bran, respectively, which were determined as the best proportions on previous studies. Among the ligninolytic enzymes produced by *P. ostreatus*, the laccase was investigated by oxidation of ABTS, which proved to be present in each collected sample as four isozymes (LacA1, LacA2, LacS1 e LacS2), obtaining his best after yields 15 days of cultivation ( $1.372,2 \pm 78,2$  UI/L for rice bran and  $4.606,4 \pm 366,6$  UI/L for soybean bran). The enzyme purification was initiated with ion-exchange chromatography applying the DEAE-Sephacel resin, followed by membrane ultrafiltration, which allowed the purification of LacS1 isozymes (Purification fold of 1.33). SDS-PAGE electrophoresis confirmed a single band from each sample at the end of the purification steps, and zymography confirmed this unique bands as laccase through success with ABTS. Physical-chemical and thermodynamics tests exhibited essential catalyst differences on both LacA1 and LacS1, with different ideal temperature, activation energy and enthalpy variation.

**KEYWORDS:** Rice Husk. Bran cereals. Ligninolytic Enzymes.

## 1 | INTRODUÇÃO

Com o aumento da demanda alimentar e energética mundial, nota-se a necessidade de uma busca por alternativas limpas e fontes de energias sustentáveis, como a energia solar, energia hidroelétrica, energia eólica e as bioenergias, assim como o manejo adequado dos resíduos gerados nessa busca (CHU, MAJUMDAR, 2012). Anualmente, a quantidade mundial de resíduos lignocelulósicos originada é de  $2 \times 10^{11}$  toneladas, oriundos principalmente de cascas de arroz e bagaço de cana de açúcar, com geração de 120 e 220 toneladas métricas (Mt) de resíduos, respectivamente (TUCK, et al., 2012). Esta biomassa residual, no entanto, representa um recurso renovável de carbono neutro abundante para a produção de bioenergia (LEE, et al., de 2008).

Os avanços na genética, biotecnologia, processos químicos e de engenharia estão conduzindo a um novo conceito de produção e conversão de biomassa para produtos de alto valor agregado (RAGAUSKAS, et al., 2006). Uma das vertentes exploradas é a aplicação desses resíduos como substratos para o cultivo de microrganismos hábeis na degradação da matéria vegetal. O *Pleurotus* sp., fungo da podridão branca, vem tendo um papel de destaque na biodegradação de lignocelulósicos. O gênero *Pleurotus*, popularmente conhecido como Shimeji, abrange um grande número de espécies de cogumelos comestíveis, apresentando

um importante papel gastronômico, medicinal e biotecnológico a nível mundial (CARBONERO, et al., 2012).

O *Pleurotus* é preferencialmente cultivado em resíduos lignocelulósicos, visto à sua capacidade de oxidar a lignina. Nesse cenário, o Brasil se encontra em uma posição de destaque, apresentando um grande potencial para se tornar uma referência mundial na produção de cogumelos. No país, a produção anual destes resíduos chega a 96,3 milhões de toneladas de palha de cereais e outros 278,4 milhões de toneladas de outros subprodutos lignocelulósicos, os quais são, em geral, destinados à caldeiras ou para a alimentação animal (AGUIAR, et al., 2013).

A ação enzimática eficiente promovida pelos cogumelos do gênero *Pleurotus* resulta na expressão de um complexo enzimático de interesse industrial e com grande potencial a ser explorado (TUCK, et al., 2012). De acordo com o último senso realizado pelo IBGE (2007), a cidade de Gurupi possui uma produção média de 700 toneladas de arroz por ano, o que resulta em uma grande quantidade de resíduos ao final do processo de beneficiamento destes grãos. Resíduos agroindustriais oferecem matéria lignocelulósica suficiente para aplicação industrial. A proposta aqui apresentada se mostra como uma alternativa para direcionamento deste excesso de resíduo.

A Lacase (EC 1.10.3.2) é classificada como uma fenoloxidase, catalizando a oxidação de compostos fenólicos. O potencial redox da lacase, quando comparado com as demais enzimas lignocelulolíticas, é menor e isto implica na oxidação apenas das unidades fenólicas da lignina, as quais constituem apenas 10% do total desse polímero. No entanto, a produção eficaz da lacase por *P. ostreatus* a torna essencial na degradação da lignina pelo fungo (GIL, et al., 2012).

A purificação enzimática permite a caracterização da enzima produzida. A partir da amostra isolada da enzima, é possível determinar parâmetros físico-químicos da mesma, indicando a influência da temperatura, pH e presença de íons na atividade enzimática, o que estipulam as condições ótimas para a atuação da enzima, tanto em escala laboratorial quanto industrial (MOIN e OMAR, 2014). A purificação permite ainda a designação das constantes cinéticas, como  $K_m$ ,  $V_{max}$ , e  $k_{cat}$ , e dos parâmetros termodinâmicos de atuação enzimática, como energia de ativação ( $E_a$ ) e desativação ( $E_{a(d)}$ ), variação de entalpia ( $\Delta H$ ), energia livre de Gibbs ( $\Delta G$ ) e entropia ( $\Delta S$ ), essenciais para avaliar a eficiência catalítica da enzima e a energia absorvida do meio necessária para sua ação (JAVED, et al., 2009).

## 2 | MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 Inóculo

O pré-inóculo de *Pleurotus ostreatus* em meio inclinado foi reativado em placas

de Petri contendo 2% de meio BDA (batata-dextrose-ágar). O repique foi feito em capela de fluxo laminar, utilizando um plug-ágar de aproximadamente 7 mm em cada placa de Petri. As placas inoculadas foram então incubadas a temperatura de  $28^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  por 7 dias em estufa biológica (SILVA, et al., 2005).

O pré-inóculo utilizado no projeto pertence ao prof. Dr. Ezequiel Marcelino da Silva, e o processo de repique, bem como a incubação e crescimento micelial foram conduzidos inicialmente no Laboratório de Análise de Alimentos e Purificação de Produtos – LABAP, da Universidade Federal do Tocantins, e repetidos posteriormente no Laboratório de Microbiologia e Bioquímica I - USP, coordenado pela prof. Dra. Adriane Maria Ferreira Milagres.

## 2.2 Pré-tratamento da casca de arroz

A casca de arroz adquirida na cidade de Piquete-SP, cedida por um agricultor local, foi deixada em molho “*overnight*”, com a finalidade de o excesso de sujidades e compostos metálicos presentes serem retirados. Após esse período, o excesso de água foi drenado e a casca foi posta para secar em estufa, assim como proposto por Kumar, et al. (2010).

## 2.3 Cultivo em Substrato Sólido

Com a casca do arroz já seca, o meio de cultivo em substrato sólido foi elaborado misturando a casca aos farelos de arroz e soja, os quais foram adquiridos no mercado local, seguindo a proporção de 90:10 (arroz:farelo de cereal) para o cultivo suplementado com farelo de soja, e 70:30 para o suplementado com farelo de arroz, considerando a massa seca dos constituintes do composto. Após a pesagem nas proporções corretas de casca de arroz e de cada farelo individualmente, o meio de cultivo teve sua umidade ajustada para 65% com a adição de água destilada à mistura. Em seguida, essa mistura foi devidamente homogeneizada para melhor absorção da água, e pesou-se 350 g da mistura úmida para cada saco de polipropileno (15 x 25 cm). No intuito de facilitar a inoculação do fungo, foi introduzido um tubo Falcon no centro do substrato sólido, que formou um canal de inoculação. Os sacos então foram fechados com o auxílio de um anel de PVC, papel impermeável, folha de alumínio e elástico de látex, sendo identificados quanto a suplementação, farelo de soja (S) e de arroz (A). Os sacos fechados foram então autoclavados a  $121^{\circ}\text{C}$  durante 1 hora, por duas vezes consecutivas, obedecendo a um intervalo de 24 horas entre cada ciclo. Após o resfriamento, fez-se a inoculação em capela de fluxo laminar, com a retirada do tubo Falcon e a introdução de 10 plugs-ágar do inóculo preparado em placa de Petri no canal formado, sendo em seguida fechados como anteriormente descrito. Finalizado a inoculação de todos os cultivos, os sacos foram

incubados em estufa biológica por 8, 15 e 30 dias à temperatura de  $28 \pm 2$  °C, para posterior extração do extrato enzimático (SILVA, et al., 2005).

## 2.4 Obtenção dos Extratos Enzimáticos

A amostragem foi realizada utilizando-se três sacos de cada cultivo (S) e (A), seguindo a metodologia adaptada de Arantes, et al. (2011). O conteúdo de cada saco foi desfragmentado em bandejas dentro da capela de fluxo laminar, homogeneizado e uma pequena fração foi coletada para quantificação da massa seca. A partir do valor de umidade obtido, foi pesado 20 g de massa seca de cada cultivo em Erlenmeyers de 250 mL. Para a extração enzimática, adicionou-se em cada Erlenmeyer 150 mL de tampão acetato de sódio pH 5.0 à 50 mM previamente autoclavado. Os Erlenmeyers identificados foram levados ao agitador orbital numa agitação de 120 rpm por 1 hora e meia à  $25 \pm 2$  °C. Após este período de agitação, o conteúdo de cada Erlenmeyer foi filtrado em gaze, em seguida, o conteúdo de cada Erlenmeyer foi distribuído em tubos Falcon e centrifugados a 2500 rpm, 4°C por 20 minutos no intuito de precipitar partículas insolúveis no meio, e o volume de cada extrato foi quantificado antes e após a centrifugação.

## 2.5 Métodos Analíticos

### 2.5.1 Determinação da Atividade de Lacase

A atividade de lacase foi determinada pela oxidação de ABTS (ácido-2,2'-azinobis-3-benzotiazolina-sulfônico) (Sigma – St. Louis, USA) 1,0 mM (NIKUPAAVOLA, et al., 1988). Neste este ensaio, as cinéticas foram acompanhadas em cubetas de vidro de 1 mL contendo 100  $\mu$ L do substrato (ABTS), 300  $\mu$ L de tampão citrato-fosfato (50 mM, pH 3,0), 100  $\mu$ L de água destilada e 500  $\mu$ L de extrato enzimático. O aumento da absorbância, ocasionado pela oxidação do substrato, foi acompanhado durante 2 minutos em espectrofotômetro a 420 nm ( $\epsilon_{420} = 36 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ). Todos os ensaios foram realizados a 25°C.

### 2.5.2 Quantificação de Proteínas

A quantificação de proteínas foi determinada pelo método de Bradford (1976) empregando albumina bovina como padrão. A reação consiste da adição de 100  $\mu$ L da amostra de enzima livre e 1mL do reagente de Bradford por 15 min e a leitura da absorbância realizada a 595 nm.

## 2.6 Purificação Enzimática

O processo de purificação, realizado no Laboratório de Microbiologia e Bioquímica I – USP, foi procedido em coluna cromatográfica (10 x 100 mm, 10 mL)

preenchida com resina DEAE-Sephacel (Pharmacia, Uppsala, Sweden) equilibrada com tampão fosfato (pH 7,0; 50 mM) até atingir a condutividade de 2,8 mS, de acordo com o procedimento realizado por Moin e Omar (2014). Aplicou-se em seguida 10 mL da amostra de cada extrato enzimático bruto a um fluxo aproximado de 6  $\mu\text{L/s}$ , gerando um volume coletado de aproximadamente 2 mL em cada tubo de ensaio. Para a eluição da enzima de interesse, 20 mL de tampão citrato-fosfato (pH 3,0; 50 mM) foi adicionado à coluna, seguido por mais 20 mL de tampão fosfato (pH 7,0; 50 mM). Cada tubo coletado foi submetido ao ensaio enzimático para detecção de lacase e à leitura em espectrofotômetro com comprimento de onda de 280 nm em luz UV para amostragem de proteínas totais na amostra. Por fim, as frações que apresentaram atividade enzimática foram reunidas e posteriormente concentradas em membrana Amicon de 50 kDa.

## 2.7 Concentração em Membrana

As frações reunidas após a cromatografia foram concentradas para posteriores ensaios de caracterização. A concentração foi realizada em centrífuga refrigerada a 4°C numa rotação de 3500 rpm por 10 minutos, utilizando membranas Amicon com corte de 50 kDa com capacidade para 500  $\mu\text{L}$ . Após a centrifugação, foi realizado o ensaio enzimático em ambas as partes eluídas e concentradas, visando identificar a presença da lacase em ambas as amostras.

## 2.8 Caracterização Físico-Química

As enzimas purificadas foram caracterizadas a partir das análises do efeito do pH, temperatura e de íons metálicos.

### 2.8.1 Efeito do pH

A caracterização quanto ao pH ótimo utilizou-se uma faixa experimental de pH de 3 a 9. Os pHs de 3 a 6 foram formulados com tampão citrato-fosfato (50 mM) e os pHs de 7 a 9 foram formulados com tampão fosfato (50 mM). O teste consistiu em realizar a atividade da lacase como descrito no item 2.1 alterando o tampão próprio para cada um dos pHs (KUMAR, et al., 2010).

### 2.8.2 Efeito da Temperatura

Após certificação do pH ótimo para a atividade enzimática, este valor foi mantido como pH padrão para realizar os testes variando a temperatura. As temperaturas analisadas foram de 25, 30, 40, 50, 60, 70 e 80 °C. Após estabilização do banho-maria na temperatura desejada, as amostras foram incubadas, e alíquotas de 20  $\mu\text{L}$  das mesmas foram retiradas em intervalos de 5 minutos, sendo em seguida

depositadas em cubeta de vidro resfriada em banho de gelo, para realização seguinte da atividade da lacase (KUMAR, et al., 2010).

### 2.8.3 Efeito de Íons Metálicos

Para verificação do efeito dos íons metálicos, foram preparados as concentrações dos íons  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  e  $\text{Mn}^{2+}$  de 0,5; 1 ; 1,5 ; 2 e 2,5 mM para cada íon, no tampão de pH ótimo determinados nas etapa anterior, a partir dos reagentes  $\text{CuSO}_4$ ;  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{MgCl}_2$  e  $\text{MnCl}_2$ , respectivamente. Em seguida, realizou-se a atividade enzimáticas substituindo o tampão citrato-fosfato pH 3,0 pelas soluções de íons preparadas. Os ensaios foram feitos sob a temperatura ótima de cada enzima (ATALLA, et al., 2013).

## 2.9 Eletroforese

A eletroforese em gel de poliacrilamida 30% (SDS-PAGE) foi realizada para a caracterização da lacase, com o gel de corrida a 12% e o de concentração a 5%, conforme descrito por Sambrook e Russell (2006). Após a corrida completa das bandas no gel, este foi corado com prata (CHEVALLET, et al., 2006), escaneado e digitalizado por meio do software Epson Scan.

## 2.10 Zimograma

O zimograma foi feito seguindo o mesmo protocolo utilizado para a eletroforese, com exceção da retirada do SDS, em condições não-desnaturantes. Após corrida completa das amostras no gel, este foi lavado com água destilada e em seguida incubado por 40 minutos em 50 mL de ABTS 0,5 M (KANDASAMY, et al., 2016). O gel foi então escaneado e digitalizado utilizando o software Epson Scan.

## 2.11 Análise Estatística

Para a escolha do tempo de cultivo que apresentou a maior produção de enzimas em casca de arroz, utilizou-se um delineamento inteiramente casualizado. Os dados de atividade enzimática dos três períodos de crescimento foram submetidos à análise de variância múltipla “LSD de Fisher” com o objetivo de se verificar a menor diferença significativa entre as médias dos tratamentos realizados em triplicata ( $p < 0,05$ ). O mesmo procedimento foi realizado para os cultivos com as diferentes suplementações de farelo de arroz e soja. A análise dos dados foi estudada utilizando o programa estatístico STATGRAPHICS-6.0.

## 3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

O cultivo do *P. ostreatus* em substrato sólido utilizando casca de arroz

suplementado com farelo de arroz e de soja mostrou-se uma alternativa conveniente para o uso destes resíduos agrícolas, além de apresentar um bom crescimento fúngico e eficiente produção de lacase, responsável pela deslignificação de resíduos lignocelulósicos. O objetivo inicial do trabalho foi induzir a produção das enzimas lacase, manganês-peroxidase, lignina-peroxidase e peroxidase versátil. No entanto, os ensaios enzimáticos realizados mostraram a produção apenas da lacase, de modo que as etapas posteriores de purificação foram no intuito de purificar e caracterizar.

Os testes realizados com 8, 15 e 30 dias mostraram que a enzima teve sua maior produção após 15 dias de cultivo (Tabela 1), sendo estes valores estatisticamente semelhantes aos cultivos de 30 dias. Devido a isto, somente as amostras de 15 dias foram utilizadas nas etapas posteriores de purificação. A escolha do tempo de cultivo ideal de 15 dias remete à viabilidade econômica do processo, visto que fermentações em estado sólido necessitam de um controle oneroso nas condições ambientais de crescimento fúngico (NETO, 2001). De acordo com Silva, et al. (2005), a suplementação com fonte de nitrogênio em meios de cultivo influencia diretamente no crescimento micelial, que pode resultar em um aumento da expressão enzimática. O farelo de soja é constituído por 40% de proteínas, frente a 9% no arroz (SILVA et al., 2006), as quais atuam como fonte de nitrogênio para o crescimento fúngico. Da Luz, et al. (2012) ainda ressalta a necessidade da suplementação com fontes adicionais de nitrogênio visando diminuir a alta proporção C:N característica dos meios lignocelulósicos.

Amostra	Tempo (dias)	Atividade Enzimática (UI/L)	$p < 0,05$
A	8	319,4 ± 27,8	a
	15	1.372,2 ± 78,2	b
	30	1.037,8 ± 51,9	b
S	8	1.310,7 ± 154,2	b
	15	4.606,4 ± 366,6	c
	30	4.351,0 ± 606,3	c

Tabela 1 - Atividade enzimática dos extratos brutos obtidos com 8, 15 e 30 dias de cultivo do *P. ostreatus* em casca de arroz suplementada com farelo de arroz (A) ou soja (S).

A etapa de purificação com a resina DEAE-Sephacel mostrou-se eficiente não apenas na purificação das enzimas como também na remoção do pigmento contido no extrato bruto. Logo, esta resina apresenta-se como um fator importante em cromatografias que objetivem a redução significativa de compostos cromófilos de baixa massa (MOIN, OMAR, 2014). A análise dos dados cromatográficos (Fig. 1) dos extratos enzimáticos dos cultivos suplementados com farelo de arroz (A) e farelo de soja (S) evidenciaram a eluição de quatro isoenzimas da lacase, duas isoenzimas em cada cultivo, sendo elas nomeadas neste trabalho como LacS1, LacS2, LacA1 e LacA2 para os cultivos S e A, respectivamente. É recorrente na literatura os relatos

que o basidiomiceto *P. ostreatus* produz diferentes isoenzimas da lacase em função do substrato utilizado, tempo e forma de cultivo (submerso ou sólido) (BALDRIAN, 2006.; ASLAM, ASGHER, 2011).

A resina DEAE-Sephacel é carregada com o grupo dietilaminoetil, que realiza troca aniônica devido à sua carga positiva (MOIN, OMAR, 2014). As isoenzimas LacS1 e LacA1 foram eluídas em tampão fosfato pH 7,0 (50 mM), o que pode ser atribuído ao fato das mesmas possuírem carga elétrica positiva neste pH, explicando assim a não adsorção à resina carregada positivamente. Quando as enzimas estão em um pH inferior ao seu ponto isoelétrico (PI), estas apresentam carga líquida positiva; logo, pode-se concluir que o PI das isoenzimas LacS1 e LacA1 encontra-se acima do pH 7,0 (NETO, 2001). Para a eluição das isoenzimas LacS2 e Lac A2, utilizou-se o tampão citrato-fosfato pH 3,0 (50 mM), caracterizando estas enzimas como carregadas positivamente neste pH, permitindo concluir que seu PI encontra-se entre os valores de pH 7,0 e 3,0.

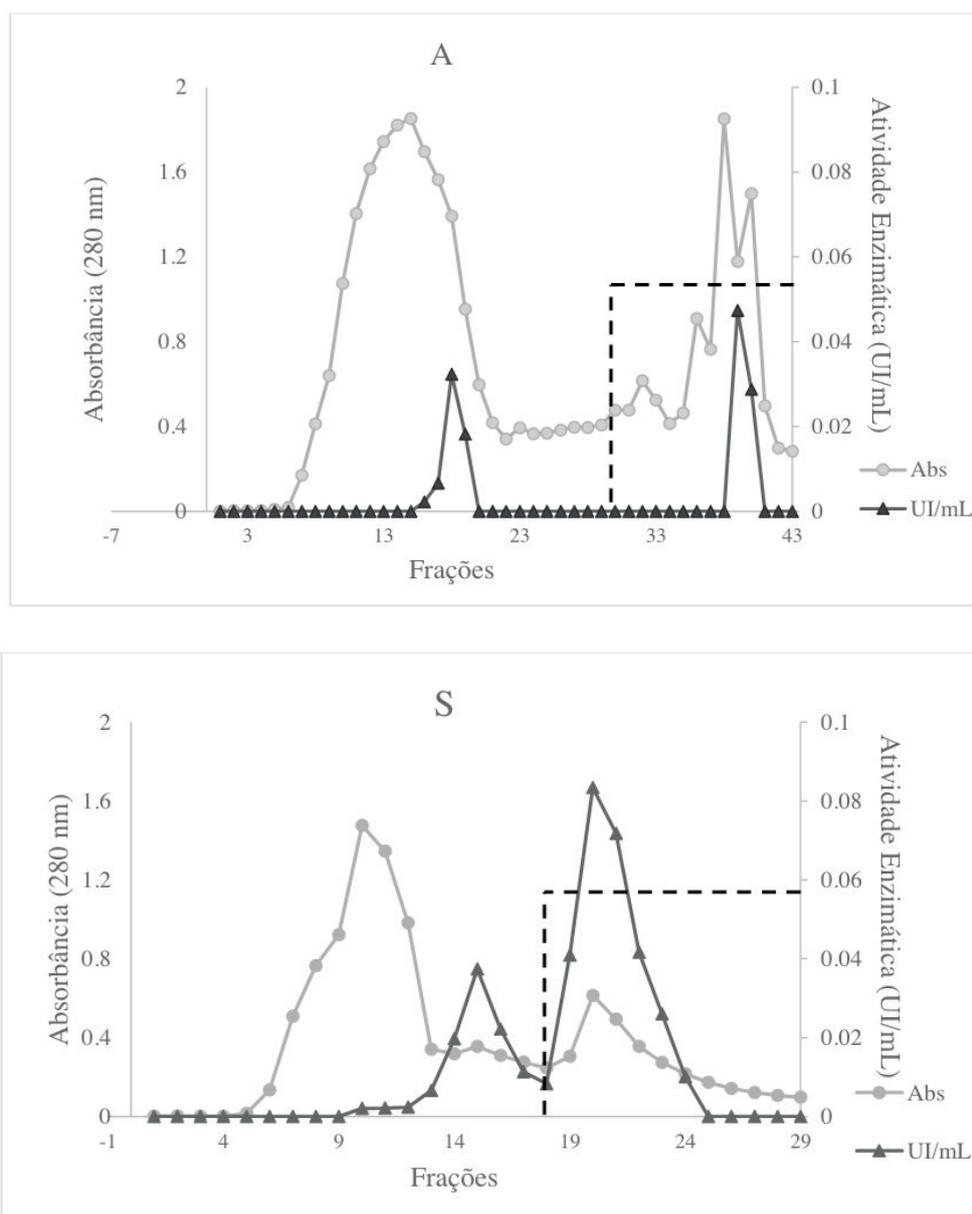


Figura 1 - Isoenzimas da lacase obtidas dos extratos enzimáticos de (A) arroz e (S) soja em DEAE-Sephacel. A linha tracejada indica a fração onde ocorreu a mudança de pH 7,0 para 3,0.

Na figura 1, observa-se a presença de dois picos distintos em ambos os cultivos (A) e (S), que representam as quatro isoenzimas descritas acima, eluídas no pH 7,0 e no pH 3,0. Com a determinação da atividade enzimática dos extratos antes e após a purificação, e das enzimas concentradas, compôs-se a tabela de purificação em função de cada suplemento utilizado (Tabelas 2 e 3), no qual nota-se um aumento na atividade específica no decorrer das etapas. Estudos anteriores determinam o peso molecular da lacase entre 58 e 110 kDa para fungos da podridão branca, de modo que a passagem das amostras purificadas por uma membrana de filtração com corte de 50 kDa colaborou na redução da concentração de proteínas totais (ASLAM, ASGHER, 2011; GUJJALA, et al., 2016).

Etapa	Amostra	Atividade Enzimática (UI)	Proteínas Totais (mg)	Atividade Específica (U/mg)	Fator de Purificação	Rendimento (%)
<b>Extrato Bruto</b>		41,17	2,99	13,75	1	100
<b>CTI+Filtração</b>	<b>LacA1</b>	0,294	0,045	6,507	0,4734	0,71
	<b>LacA2</b>	0,197	0,062	3,176	0,2310	0,48

Tabela 2 - Valores da purificação do extrato enzimático do meio suplementado com farelo de arroz (A) (Legenda: CTI = Cromatografia de Troca Iônica).

Etapa	Amostra	Atividade Enzimática (UI)	Proteínas Totais (mg)	Atividade Específica (U/mg)	Fator de Purificação	Rendimento (%)
<b>Extrato Bruto</b>		184,26	14,84	12,413	1	100
<b>CTI+Filtração</b>	<b>LacS1</b>	1,73	0,104	16,531	1,340	0,94
	<b>LacS2</b>	0,93	0,089	10,356	0,8343	0,51

Tabela 3 - Valores da purificação do extrato enzimático do meio suplementado com farelo de soja (S) (Legenda: CTI = Cromatografia de Troca Iônica).

O fator de purificação indica quantas vezes a amostra enzimática foi purificada em relação ao extrato inicial (NETO, 2001). A partir dos valores deste fator apresentados nas Tabelas 2 e 3, nota-se que a única amostra eficientemente purificada foi a LacS1, a qual obteve um fator de purificação de 1,34 após a última etapa de purificação. No entanto, é necessário considerar que este fator é calculado em função da atividade enzimática do extrato bruto. Os altos valores de atividade enzimáticas obtidos nos ensaios de lacase para os extratos brutos, como descritos previamente (BALDRIAN, 2006), podem ser explicados pela presença de extrativos e derivados da lignina, os quais podem resultar em uma oxidação excessiva do substrato, superestimando os valores de atividade enzimática obtidos nestas amostras ainda não purificadas, o que resulta em um baixo fator de purificação nas etapas posteriores.

### 3.1 Eletroforese

Com os perfis de bandas obtidos na eletroforese em condições desnaturantes, foi possível determinar o tamanho aproximado para cada isoenzima. Na Figura 2, é possível observar bandas distintas para cada enzima, onde nota-se o valor aproximado de peso molecular (PM) semelhante para as isoenzimas LacA1 e LacA2. Assim, determinou-se que as enzimas LacA1 e LacA2 têm seu PM igual a 59 kDa, bem como 66 kDa para LacS2 e 70 kDa para LacS1, todas dentro dos intervalos descritos anteriormente para o PM de lacases (ASLAM, ASGHER, 2011; GUJJALA, et al., 2016).

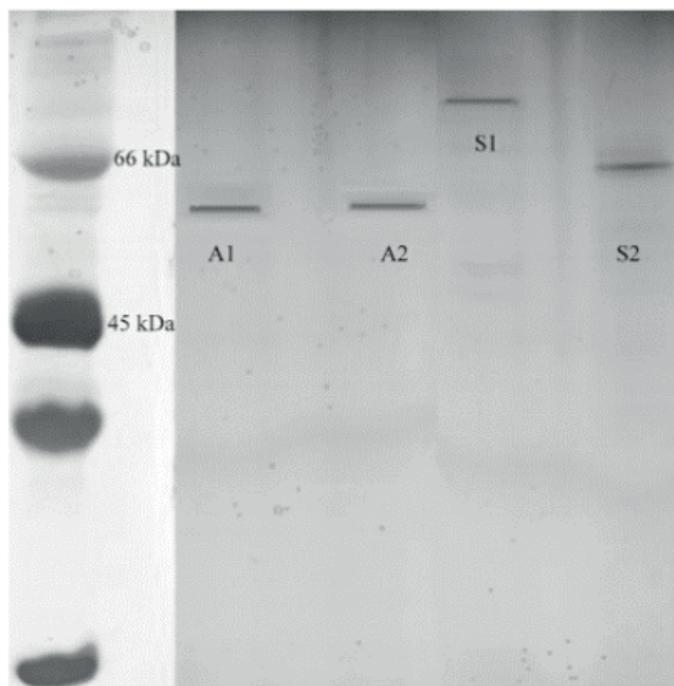


Figura 2 - Perfis de banda da eletroforese em gel de poliacrilamida das isoenzimas LacA1, LacA2, LacS1 e LacS2, destacando os valores de PM determinados pelo padrão.

### 3.2 Zimograma

Os perfis de bandas obtidos após incubação do gel em ABTS mostraram o aparecimento mais expressivo da banda LacA1, e de forma menos acentuada das enzimas LacA2 e LacS2 (Fig. 3). A banda apresentada, quando comparada com o padrão molecular, confirma o PM de 59 kDa da LacA1 (dado não apresentado). A isoenzima LacS1, apesar de apresentar dentre estas a maior atividade enzimática, não foi detectada visualmente, o que pode ter sido devido a sua degradação antes da realização do ensaio em eletroforese, degradação esta ocorrida durante as etapas de armazenamento devido a fatores externos ou instabilidade da enzima. A presença do detergente SDS no tampão de corrida do gel é outro fator que contribui com a desnaturação das enzimas, visto ser ele o agente responsável pela linearização das enzimas no ensaio SDS-PAGE (KANDASAMY, et al., 2016).

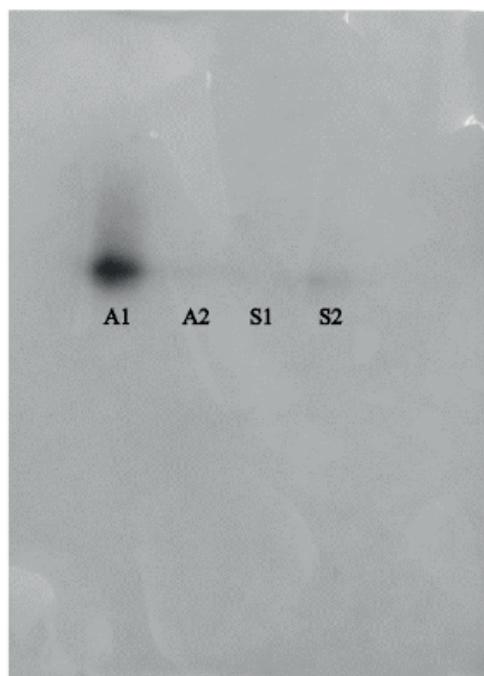


Figura 3 - Zimograma em gel de poliacrilamida após encubação em ABTS 5 mM dos cultivos S e A.

### 3.3 Efeito do pH e temperatura sobre a atividade enzimática

Os dados apresentados para o efeito do pH sobre a atividade das isoenzimas (Fig. 4) mostram um maior pico de atividade quando os ensaios foram realizados utilizando o tampão citrato-fosfato pH 3,0 (50mM) em temperatura de 25 °C (temperatura esta definida como padrão neste trabalho), sendo estas caracterizadas como acidófilas. Este dado é condizente com os encontrados na literatura, os quais destacam a característica de atuação da lacase em pH ácidos (ATALLA, et al., 2013).

A temperatura ótima definida para cada isoenzima (LacA1, LacA2, LacS1 e LacS2) foi estabelecida a partir dos ensaios de atividade enzimática utilizando o pH ótimo obtido no ensaio anterior (pH 3,0). A análise do gráfico da atividade relativa (AR) em função da temperatura apresentado na Figura 4 define a temperatura de 40°C como ótima para as enzimas LacA1, LacA2, LacS2 e 50°C para a LacS1, caracterizando as isoenzimas obtidas neste trabalho como mesófilas (NELSON, COX, 2011). A atividade ótima das isoenzimas encontradas em pH ácido e temperaturas superiores à ambiente corroboram com as características anteriormente descritas para enzimas produzidas por fungos filamentosos, as quais tendem a ser adaptadas à condições menos favoráveis de atuação (ATALLA, et al., 2013; GUJJALA, et al., 2016).

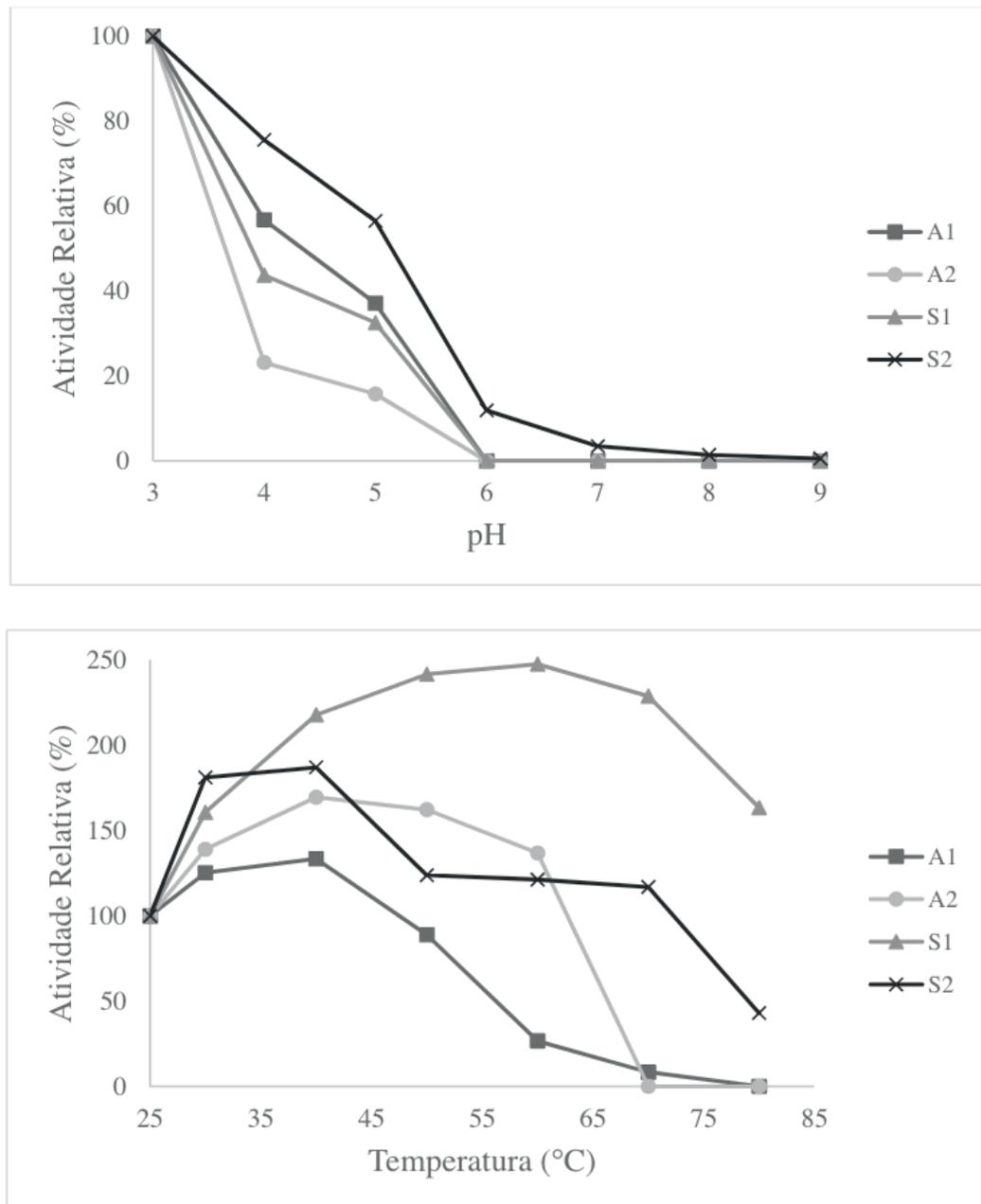


Figura 4 - Efeito de diferentes pH e Temperaturas sobre as atividades enzimáticas das isoenzimas.

### 3.4 Efeito dos íons metálicos sobre a atividade enzimática

O efeito das concentrações de 0,5 a 2,5mM dos íons  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  e  $\text{Mn}^{2+}$  sobre a atividade enzimática foi avaliado apenas para a enzima LacS1, devido ao fato desta apresentar maior atividade enzimática e conseqüentemente resultar em dados mais expressivos da variação da atividade enzimática em função do íon metálico e da concentração empregada. Outro fator determinante para esta decisão foi a baixa concentração das enzimas purificadas do cultivo com farelo de arroz. Os íons metálicos são elementos de importante efeito sobre as enzimas, podendo ativar ou inativar a ação catalítica que depende de cada enzima (NELSON, COX, 2011).

A Figura 5 mostra o efeito de cada íon metálico e sua respectiva concentração sobre a atividade enzimática da LacS1, sendo possível a constatação de que, com

exceção do íon cobre, os demais íons tiveram um efeito oscilatório na atividade da enzima com o aumento gradual da concentração. Dentre as concentrações de cada íon, as maiores atividades foram observadas para as concentrações de 1,0 mM de  $Mg^{2+}$ , 0,5 mM de  $Mn^{2+}$ , 1,0 mM de  $Ca^{2+}$  e 2,5 mM de  $Cu^{2+}$ . O íon  $Cu^{2+}$  não apresenta uma variação significativa na atividade enzimática, sendo este efeito crescente com o aumento da concentração utilizada. O ensaio com este íon confirma os dados contidos na literatura (ASGHER, et al., 2012; ATALLA, et al., 2013) de que o cobre, além de indutor na produção da lacase, também age como um potencializador de sua ação catalítica quando em comparação com outros íons metálicos.

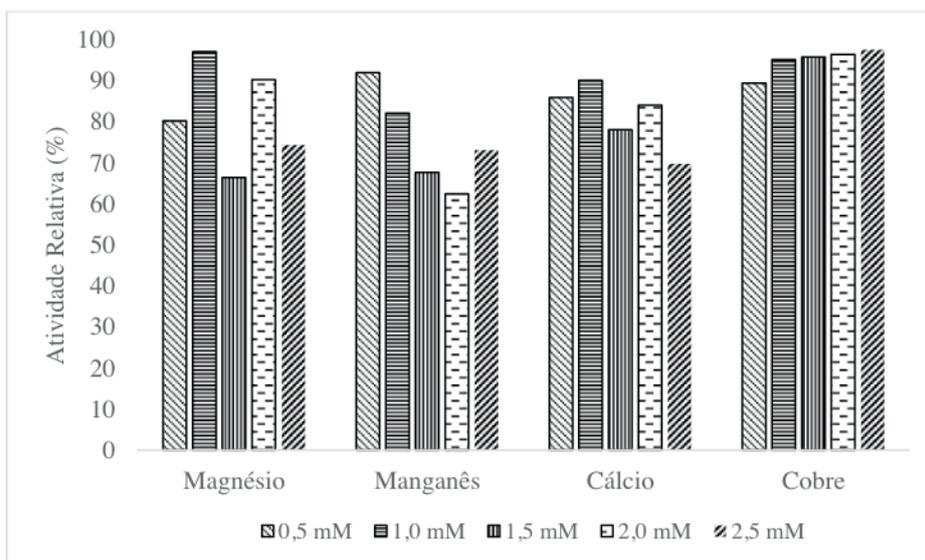


Figura 5 - Efeito de diferentes concentrações dos íons  $Cu^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$  e  $Mn^{2+}$  sobre a atividade da enzima LacS1 comparados com a atividade sem adição de íons (100%).

### 3.5 Estabilidade térmica e Parâmetros Termodinâmicos

A Figura 6 apresenta o comportamento de cada enzima durante os ensaios de estabilidade térmica. Nos ensaios a 50°C para todas as enzimas, observou-se que a esta temperatura as enzimas LacA1, LacA2 e LacS2 demonstraram rápida queda de atividade, assim como a inativação completa da enzima LacS1. Este fato pode ser devido à mudança conformacional das enzimas pelo aumento da temperatura e conseguinte excitação das moléculas, acarretando assim na perda de sua capacidade catalítica (GUJJALA, et al., 2016).

A temperatura em que as enzimas se mostraram mais estáveis, com uma queda suave de atividade, foi a de 35°C. Já a 50°C, houve um rápido declínio na atividade das enzimas após os cinco primeiros minutos do ensaio, com uma queda similar para as enzimas LacA1 e LacA2, inativação com 5 minutos para a LacS1 e uma queda acentuada na atividade da enzima LacS2. Como já citado anteriormente, a utilização de diferentes meios ou suplementação resulta em diferentes isoenzimas. A suplementação com o farelo de soja possivelmente resultou em uma lacase menos

glicosilada (LacS1), apresentando uma menor estabilidade térmica devido ao menor número de carboidratos em sua estrutura (GUJJALA, et al., 2016). Baldrian (2006) relata ainda que fungos do gênero *Pleurotus*, quando cultivado em meios que induzam a produção de isoenzimas de lacase, tendem a produzir isoenzimas menos glicosiladas, com grau de glicosilação variando entre 7% a 1%.

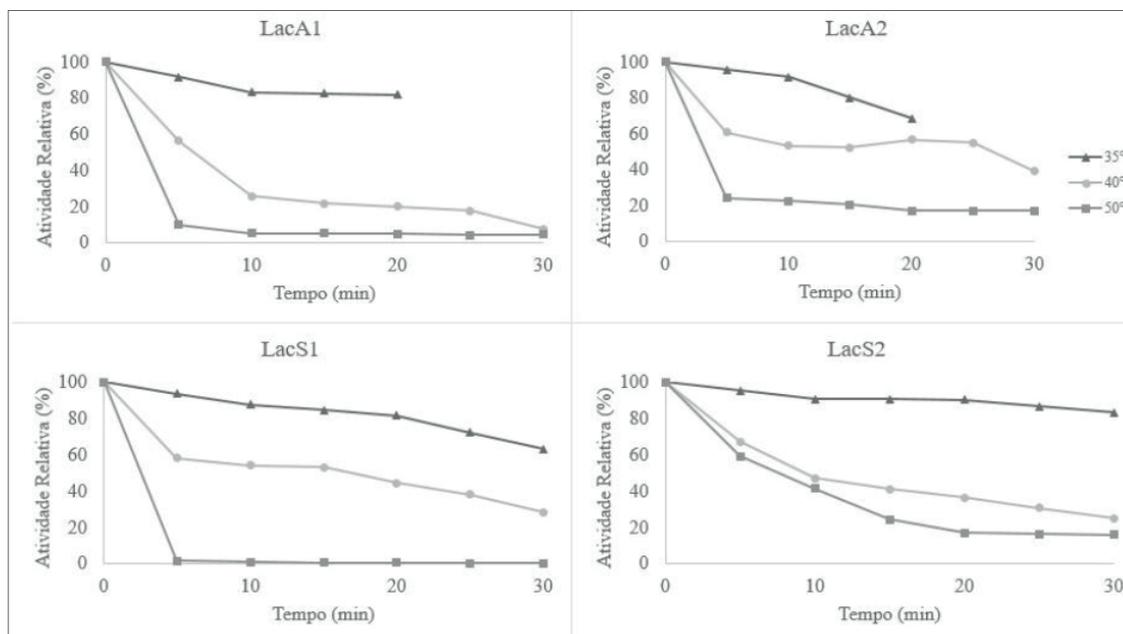


Figura 6. Estabilidade térmica para cada isoenzima nas temperaturas de 35, 40 e 50 °C por 30 minutos.

A partir dos dados de temperatura ótima (Fig. 4) e de estabilidade térmica (Fig. 6), realizou-se a caracterização termodinâmica das isoenzimas produzidas, calculando a energia de ativação ( $E_a$ ), energia de desativação ( $E_{a(d)}$ ), constante de catálise ( $k_{cat}$ ) e as variações de entalpia ( $\Delta H$ ), energia livre de Gibbs ( $\Delta G$ ) e entropia ( $\Delta S$ ) (Tabela 4). Estes valores foram calculados a partir das fórmulas apresentadas por Javed, et al. (2009). Os valores da  $E_a$  demonstram que, dentre as enzimas obtidas, a LacA1 é a que necessita de um menor gasto energético para a formação do estado de transição, resultando igualmente em um menor valor de  $\Delta H$ , caracterizando uma menor absorção de energia do meio por parte do sistema (NELSON, COX, 2011).

Amostra	$E_a$ (kJ/mol)	$E_{a(d)}$ (kJ/mol)	$k_{cat}$ ( $\text{min}^{-1}$ )	$\Delta H$ (kJ/mol)	$\Delta G$ (kJ/mol)	$\Delta S$ (kJ/molK)
LacA1	13.578	123.596	383.961	10.975	61.328	-0.161
LacA2	25.763	115.764	187.373	23.160	63.196	-0.128
LacS1	26.456	159.770	1173.673	23.770	60.369	-0.113
LacS2	28.518	115.124	683.529	25.914	59.826	-0.108

Tabela 4 - Parâmetros termodinâmicos de ativação e desativação das isoenzimas produzidas pelo *P. ostreatus*.

Outro parâmetro a ser analisado referente a estabilidade térmica das enzimas é

o tempo de meia vida ( $t_{1/2}$ ), que corresponde ao tempo em que há perda de metade da atividade da enzima, baseando-se na atividade enzimática inicial desta (JAVED, et al., 2009). Na Tabela 5, observa-se uma diminuição mais rápida nos valores de  $t_{1/2}$  de todas as enzimas nas temperaturas de 40 e 50°C. Na temperatura de 35°C as enzimas apresentam  $t_{1/2}$  de 0,41; 0,44; 0,61 e 0,41 minutos para as enzimas LacA1, LacA2, LacS1 e LacS2, respectivamente. Já a 50°C este tempo diminui consideravelmente para 0,038; 0,045; 0,035 e 0,038 minutos, respectivamente. Estes dados corroboram a constatação de enzimas oxidativas não são estáveis em temperaturas acima de 40°C, e que esta estabilidade diminui proporcionalmente ao aumento da temperatura (DODDAPANENI, et al, 2013).

Temperatura (°C)	Lac A1	Lac A2	LacS1	LacS2
35	0,41604	0,44380	0,61106	1,43090
40	0,09342	0,08857	0,29089	0,14180
50	0,03859	0,04588	0,03522	0,13110

Tabela 5 - Tempo de meia vida ( $t_{1/2}$ ) em minutos das amostras sob as diferentes temperaturas.

Quando analisadas a 35°C (308,15 K), nota-se que as enzimas extraídas dos meios suplementados com soja (LacS1 e LacS2) apresentaram maior  $t_{1/2}$ , em especial a LacS2, constatando uma maior estabilidade térmica desta isoenzima. Este padrão pode ser igualmente observado na queda menos acentuada desta isoenzima nos testes de estabilidade térmica (Fig. 6). A LacS1, no entanto, apresentou um  $t_{1/2}$  semelhante às demais isoenzimas a 50°C (323,15 K), o que explica a rápida queda da sua atividade sob esta temperatura (Fig. 6), assim como a sua desnaturação quando realizado o zimograma (Fig. 3).

#### 4 | CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos, conclui-se que a casca de arroz foi eficiente na indução da produção de lacase na forma de isoenzimas pelo fungo *Pleurotus ostreatus*. A produção enzimática é acentuada pela adição do farelo de soja como fonte adicional de nitrogênio para o crescimento fúngico. Na etapa de purificação enzimática, notou-se a eficiência da resina DEAE-Sephacel como única etapa de purificação, o que se mostra importante no sentido de reduzir gastos na produção enzimática

A determinação das características físico-químicas e termodinâmicas foi importante na diferenciação das isoenzimas, atestando suas particularidades catalíticas. A produção ainda não é otimizada, mas apresenta perspectivas positivas para a aplicação do resíduo gerado em excesso.

## REFERÊNCIAS

- AGUIAR, L.; SALES, C.; DE CARVALHO, C.; MINHONI, M.; DE ANDRADE, M.. **Use of wood residues and fruit from Amazon for the in vitro cultivation of edible mushroom Shiitake.** *Interciencia*, v. 38 (8), p. 585-589. 2013.
- ARANTES, V.; SILVA, E.M.; MILAGRES, A.M. **Optimal recovery process conditions for manganese-peroxidase obtained by solid-state fermentation of eucalyptus residue using *Lentinula edodes*.** *Biomass and Bioenergy*, v. 35, p. 4040-4044. 2011.
- ASGHER, M.; IQBAL, H.; ASAD, M. **Kinetic characterization of purified laccase produced from *Trametes versicolor* IBL-04 in solid state bio-processing of corncobs.** *BioResources*, v. 7 (1), p. 1171-1188. 2012.
- ASLAM, S.; ASGHER, M. **Partial Purification and Characterization of Ligninolytic Enzymes Produced by *Pleurotus ostreatus* during Solid State Fermentation.** *African Journal of Biotechnology*, v. 10, p. 17875-17883. 2011.
- ATALLA, M.; ZEINAB, H.; EMAN, R.; AMANI, A.; ABEER, A. **Characterization and kinetic properties of the purified *Trematosphaeria mangrovei* laccase enzyme.** *Saudi Journal of Biological Sciences*, v. 20, p. 373-381. 2013.
- BALDRIAN, P. **Fungal laccases – occurrence and properties.** *FEMS Microbiology Letters*, v. 30, p. 215-242. 2006.
- BRADFORD, M.M. **A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.** *Anal Biochemistry*, v. 7 (72), p. 248-254. 1976.
- CARBONERO, E.; RUTHES, A.; FREITAS, A.; UTRILLA, P.; GÁLVEZ, J.; SILVA, E.; SASSAKI, G.; GORIN, P.; IACOMINI, M.. **Chemical and biological properties of a highly branched -glucan from edible mushroom *Pleurotus sajor-caju*.** *Carbohydrate Polymers*, v. 90, p. 814-819. 2012.
- CHU, S.; MAJUMDAR, A. **Opportunities and challenges for a sustainable energy future.** *Nature*, v. 488, n. 7411, p. 294-303, 2012.
- DODDAPANENI, H.; SUBRAMANIAN, V.; FU, B.; CULLEN, D. **A comparative genomic analysis of the oxidative enzymes potentially involved in lignin degradation by *Agaricus bisporus*.** *Fungal Genetics and Biology*, v. 55, p. 22-31. 2013.
- GIL, L.M.; MANJARRES-PINZON, K.; PIÑEROS-CASTRO, Y.; RODRIGUEZ-SANDOVAL, E. **Influencia de la adición de una fuente de nitrógeno em La producción de ligninasas.** *Biocología em El Sector Agropecuario y Agroindustrial*, v. 10 (1), p. 173-181. 2012.
- GUJJALA, L.; GIL, L.M.; MANJARRES-PINZON, K.; PIÑEROS-CASTRO, Y.; BANDYOPADHYAY, T.; BANERJEE, R. **Kinetic modelling of laccase mediated delignification of *Lantana camara*.** *Bioresource Technology*, v. 212, p. 47-54. 2016.
- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE. 2007. **Produção agrícola municipal – Cereais, leguminosas e oleaginosas.** Disponível em: <http://www.cidades.ibge.gov.br/xtras/temas.php?lang=&codmun=170950&idtema=18&search=tocantins%7Cgurupi%7Cproducao-agricola-municipal-cereais-leguminosas-e-oleaginosas-2007>. Acessado em: 18/09/2016.
- JAVED, M.R.; RASHID, M.H.; NADEEM, H.; RIAZ, M.; PERVEEN, R. **Catalytic and thermodynamic characterization of endoglucanase (CMCase) from *Aspergillus oryzae* cmc-1.** *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 157, p. 483-497. 2009.
- KANDASAMY, S.; MUNIRAJ, I.; PURUSHOTHAMAN, N.; SEKAR, A.; SHARMILA, D.; KUMARASAMY, R.; UTHANDI, S. **High Level Secretion of Laccase (LccH) from a Newly Isolated White-Rot**

**Basidiomycete, *Hexagonia hirta* MSF2.** *Frontiers in Microbiology*, v. 7, p. 707-717. 2016.

MOIN, S.; OMAR, M. **Laccase enzymes: purification, structure to catalysis and tailoring.** *Protein & Peptide Letters*, v. 12 (8), p. 7007-713. 2014.

NELSON, D.; COX, M. 2011. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**, Artmed, 5ª ed., Porto Alegre.

NETO, J.A. Purificação de enzimas. In: LIMA, U.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDEL, W. **Biotecnologia Industrial – processos fermentativos e enzimáticos.** 1 ed. São Paulo: Blucher, 2001, v. 3, cap. 17, p. 377-390.

NIKU-PAAVOLA, M.-L.; KARHUNEN, E.; SALOLA, M.; RAUNIO, V. **Lignolytic enzymes of the white-rot fungus *Phlebia radiata*.** *Biochemical Journal*, v.254, p.977-984, 1988.

RAGASKAS, A.J.; WILLIAMS, C.; DAVISON, B.; BRITOVSEK, G.; CAIRNEY, J.; ECKERT, J.; TEMPLER, R.; TSCHAPLINSKI, T. **The path forward for biofuels and biomaterials.** *Science*, v. 311, n. 5760, p. 484-489, 2006.

SILVA, E.M.; MACHUCA, A.; MILAGRES, A.M. **Effect of cereal brans on *Lentinula edodes* growth and enzyme activities during cultivation on forestry waste.** *Letters in Applied Microbiology*, v. 40, p. 283–288. 2005.

SILVA, M.S.; NAVES, M.M.; OLIVEIRA, R.B.; LEITE, O.S.. **Composição Química e Valor Protéico do Resíduo de Soja em Relação ao Grão de Soja.** *Ciências e Tecnologia de Alimentos*, v 26(3), p. 571-576. 2006.

TUCK, C.O.; PÉREZ, E.; HORVÁTH, I.; SHELDON, R.; POLIAKOFF, M. **Valorization of biomass: deriving more value from waste.** *Science*, v. 337, n. 6095, p. 695-699, 2012.

## **SOBRE OS ORGANIZADORES**

**Franciele Braga Machado Tullio** - Engenheira Civil (Universidade Estadual de Ponta Grossa - UEPG/2006), Especialista em Engenharia de Segurança do Trabalho (Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR/2009, Mestre em Ensino de Ciências e Tecnologia (Universidade Tecnológica federal do Paraná – UTFPR/2016). Trabalha como Engenheira Civil na administração pública, atuando na fiscalização e orçamento de obras públicas. Atua também como Perita Judicial em perícias de engenharia. E-mail para contato: francielebmachado@gmail.com

**Lucio Mauro Braga Machado** - Bacharel em Informática (Universidade Estadual de Ponta Grossa – UEPG/1995), Licenciado em Matemática para a Educação Básica (Faculdade Educacional da Lapa – FAEL/2017), Especialista em Desenvolvimento de Aplicações utilizando Tecnologias de Orientação a Objetos (Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR/ 2008). É coordenador do Curso Técnico em Informática no Colégio Sant’Ana de Ponta Grossa/PR onde atua também como professor desde 1992, também é professor na Faculdade Sant’Ana atuando na área de Metodologia Científica, Metodologia da Pesquisa e Fundamentos da Pesquisa Científica e atua como coordenador dos Sistemas de Informação e do Núcleo de Trabalho de Conclusão de Curso da instituição. E-mail para contato: machado.lucio@gmail.com

## ÍNDICE REMISSIVO

### A

Acidentes de trabalho 5, 6, 7, 10, 12, 13, 14, 16, 17, 25, 26

Água 33, 34, 41, 42, 43, 45, 46, 47, 48, 49, 51, 52, 54, 58, 87, 88, 89, 91, 93, 97, 115, 116, 117, 118, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 146, 150, 156, 157, 170, 171, 173, 185, 186, 187, 188, 189, 190, 191, 192, 193, 194, 195, 196, 197, 209, 210, 217, 218, 222, 228, 229, 231, 236

Águas sulfúreas quentes 40

Água subterrânea 115, 123, 186, 188, 194, 197

Aquíferos 45, 47, 48, 49, 87, 88, 89, 90, 97, 99, 185, 196

Áreas de preservação permanente 155, 158

Arquitetura bioclimática 198, 209

Arquivos climáticos 198, 202, 210, 211

Avaliação de impacto ambiental 27, 28, 38, 39

### B

Barragem de rejeito 226, 228

### C

Cacau 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 111, 113, 114

Canais 226, 227, 228, 230, 231, 232, 233, 234, 235

Casca de arroz 167, 170, 173, 174, 182

Clandestino 55, 58

Coleta 1, 4, 7, 14, 15, 27, 29, 36, 77, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 132, 134, 135, 138, 212, 214, 215, 220, 221, 224

Contaminação 29, 58, 87, 88, 89, 90, 97, 99, 137, 185, 186, 187, 188, 192, 193, 194, 195, 196, 197, 224

Contaminação por coliformes 186, 193, 195

### D

Dados meteorológicos 198, 199, 202

Descaracterização 226, 227, 228, 229, 230, 235

Destinação de resíduos 61

Drenagem 48, 79, 85, 129, 226, 227, 228, 229, 230, 232

### E

Ecossistema aquático 130

Enzimas lignolíticas 167

Estação de tratamento de esgotos sanitários 27, 39

Estresse hídrico 140, 150, 151

## F

Farelo de cereais 167

Fermentador 101, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113

## G

Gabião 226, 227, 233, 234

Geocélula 226, 230, 231, 232, 233, 235, 236

Gestão de resíduos sólidos urbanos 61, 75

## I

Impactos ambientais 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 35, 36, 37, 38, 77, 78

Inspeção 55, 57, 58, 59, 88

## L

Licenciamento ambiental 27, 28, 29, 30, 33, 66, 74, 76, 77, 78, 215

## M

Matas ciliares 147, 155, 156

Meda 40, 41, 42, 43, 44, 54

Metais dissolvidos 129, 130, 131, 135

Método de diferenças finitas 87, 94

Minas gerais 61, 62, 63, 64, 65, 68, 69, 70, 74, 75, 76, 226

Modelagem computacional 87, 101

Monitoramento ambiental 27, 29, 36, 37, 38

Mudas 140, 142, 144, 145, 148, 149, 150, 151, 160, 164, 165

## O

Origem da contaminação 186

## P

Poços de captação 186

Política de resíduos sólidos 61

Previdência social 5, 6, 7, 11, 12, 13, 14, 15, 18, 19, 20, 24, 25

## R

Recuperação de áreas degradadas 140, 141, 142, 144, 145, 148, 152, 153, 155, 165

Resíduos de serviços de saúde 212, 213, 214, 215, 219, 223, 224, 225

Restauração ecológica 140, 142

Restauração florestal 154, 155, 159, 160, 161, 163, 164

## S

Saúde do trabalhador 5, 7, 8, 9, 11, 12, 17, 21, 24, 25

Sedimentos 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 156, 226, 227, 228, 229, 236

Simulação numérica 87, 99  
Sistema aquífero profundo 40  
Sistema de informações geográficas 77, 155  
Suíno 55, 56, 58

## T

Taxa de sobrevivência 140, 151  
Termas da areola 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 50, 51, 54  
Territórios de desenvolvimento 61, 63, 64, 65, 66, 74  
Transferência de calor 101, 103, 110, 111, 114  
Tratamento 1, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 36, 38, 39, 58, 62, 75, 81, 84, 89, 125, 126, 135, 137, 143, 170, 188, 194, 197, 201, 210, 212, 213, 214, 215, 216, 217, 218, 219, 223, 224

## U

Unidade de conservação 140, 143

