

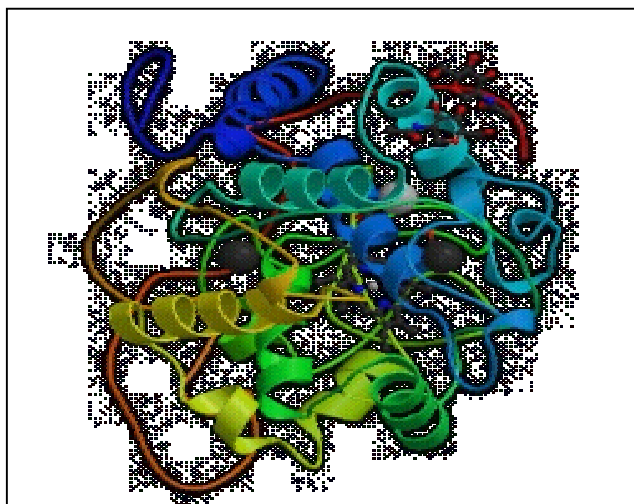


UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS FÍSICAS E MATEMÁTICAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

ESTÁGIO CURRICULAR

CURSO DE QUÍMICA

BACHARELADO



***Título : “ Estudo da Atividade Enzimática de Lacase
Imobilizada em Quitosana”***

Aluno : Américo Cruz Júnior

Orientador : Prof. Dr. Carlos Henrique Lemos Soares- CCB/BQA-UFSC

Florianópolis, Julho de 2003

SUMÁRIO

1. LISTA DE ABREVIATURAS	4
2 - RESUMO	5
3- INTRODUÇÃO	6
3.1 – ENZIMAS	6
3.2- HISTÓRIA	6
3.3- MECANISMO DA AÇÃO ENZIMÁTICA	7
3.3.1 - ENZIMA COMO CATALISADOR.....	7
3.3.2 - O MODELO DE MECANISMO SEGUNDO MICHAELIS-MENTEN..	8
3.4 - NATUREZA E ESTRUTURA ENZIMÁTICA.....	11
3.5 - NOMENCLATURA E CLASSIFICAÇÃO DAS ENZIMAS.....	13
FORMAÇÃO da FOSFOCREATINA.....	14
3.6 - CLASSIFICAÇÃO DAS ENZIMAS SEGUNDO A COMISSÃO DE ENZIMAS	14
3.7- ENZIMAS LIGNOLÍTICAS DE INTERESSE BIOTECNOLÓGICO.....	17
3.8- ENZIMAS OXIDATIVAS APLICADAS A BIORREMEDIAÇÃO	18
3.8.1 - ASPECTOS GERAIS.....	18
3.9- ENZIMA LACASE	22
4.0. MÉTODOS DE IMOBILIZAÇÃO	26
4.1. ADSORÇÃO	27
4.2. LIGAÇÃO COVALENTE	28
5- OBJETIVOS	29
6 - MATERIAIS E MÉTODOS	30
6.3.1 EFEITO DO PH:.....	31
6.3.2 ESTABILIDADE TÉRMICA DA ENZIMA LACASE.....	32
7.2. ESTABILIDADE TÉRMICA DA ENZIMA LACASE.....	34
7.3. Resultados cinéticos - imobilização DA ENZIMA LACASE em quitosana	35
7 - CONCLUSÃO	38
8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	39

1. LISTA DE ABREVIATURAS

RNA	Ácido ribonucleico
LiP	Lignina peroxidase
MnP	Manganês peroxidase
FO	Fenol oxidase
Kraft E1	Efluente tipo Kraft (Estágio 1)
DQO	Demanda química de oxigênio
AOX	Compostos fenólicos halogenados
KDa	KDaltons, Unidade de massa molar de enzimas

2 - RESUM0

Este trabalho teve como principal objetivo caracterização da enzima Lacase. Foi medida a atividade enzimática da Lacase com a siringaldazina como substrato, em tampões tartarato de sódio (pH= 3,0 ; 3,5; 4,0 ; 4,5 e 5,0) e fosfato de sódio (pH= 6,0 ; 6,5; 7,0 e 7,5). Verificou-se que para o tampão tartarato a pH= 4,0 a enzima apresentou o maior valor de atividade enzimática. Foi avaliada ainda a estabilidade térmica da enzima lacase a várias temperaturas (25 a 70 °C). Os resultados obtidos revelaram que a melhor atividade foi obtida a 60°C. Foi observado a desnaturação da enzima a 70°C.

A segunda parte do trabalho visou a imobilização, via adsorção física, da Lacase em quitosana. O efeito de imobilização no perfil de pH foi avaliado em tampão tartarato e o melhor valor para a atividade obtido foi no pH= 5,0.

3- INTRODUÇÃO

3.1 –ENZIMAS

As enzimas são catalisadores das reações que ocorrem nos sistemas biológicos; elas possuem uma eficiência catalítica extraordinária, que é muito maior comparada aos catalisadores químicos. As enzimas aceleram reações químicas específicas e limitadas a um determinado grupo de substratos. Funcionam em soluções aquosas e mistas (aquoso/solvente) em condições também limitada de variação de pH. As enzimas aumentam a velocidade de reação proporcionando um novo mecanismo de reação onde o valor de energia de ativação do sistema é menor. Com exceção de um pequeno grupo de moléculas de RNA, com propriedades catalíticas (ribozimas), todas as enzimas são proteínas (Voet & Voet,1995).

3.2- HISTÓRIA

O nome enzima provém de "in yeasts", no qual suspeitava-se que as catálises biológicas estavam envolvidas com a fermentação do açúcar em álcool.

A primeira descoberta foi feita por Payen e Persoz em 1833, quando encontraram uma substância termo lábil no precipitado do álcool, extrato de malte, que convertia amido em açúcar, mais tarde denominada amilase. A primeira teoria foi publicada em 1835 por Berzelius. Pasteur em 1860 postulou que as enzimas estão associadas à estrutura e a vida da célula.

Em 1877 Buchener obteve sucesso na extração de enzimas de células de leveduras que catalisavam a fermentação alcóolica. Isto demonstrou que

estas enzimas catalisavam a maioria das vias metabólicas energéticas e podem funcionar independentemente da sua estrutura (Voet&Voet).

A enzima foi primeiramente isolada na forma cristalina, mas isto foi compreendido melhor quando Summer em 1926 isolou urease de feijão e evidenciou que estes cristais consistem em proteínas.

Hoje 2000 diferentes enzimas são conhecidas, nas quais muitas são isoladas na forma pura homogeneizada e 200 na forma cristalizada.

3.3- MECANISMO DA AÇÃO ENZIMÁTICA

3.3.1 - ENZIMA COMO CATALISADOR

O princípio de catalisador é diminuir a energia de ativação. A enzima se liga a uma molécula de substrato em uma região específica denominada sítio ativo de ligação. Esta região da molécula da enzima apresenta um trecho representado por cadeias de aminoácidos que ajudam a ligar o substrato, e um outro trecho desta cadeia que age na catálise.

Em 1894 Emil Fischer propôs o modelo chave – fechadura para explicar a ação enzimática. A enzima se encaixa com o substrato específico no sítio ativo, como uma chave e fechadura (Fig.1).

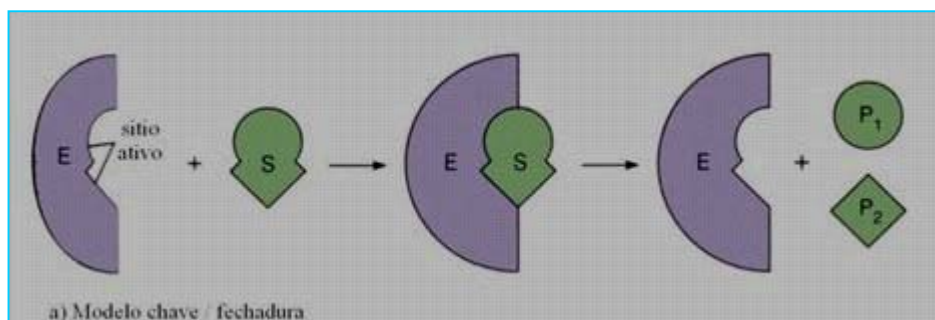


FIG.1- Modelo chave-fechadura.

No modelo do ajuste induzido, tanto a enzima quanto o substrato sofrem modificações de conformação para o encaixe, assumindo novas conformações.

O substrato sofre uma tensão estereoquímica na conformação do estado de transição, sendo que este processo é denominado encaixe por indução, o qual foi proposto por **Koshland** (1958) (Fig.2).

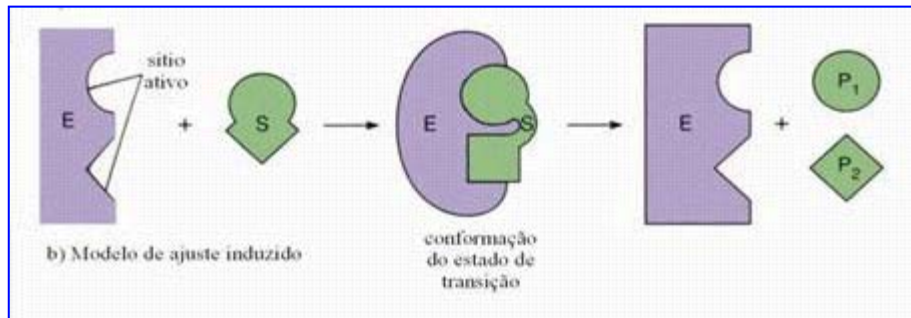


FIG.2- Modelo de Koshland.

A enzima também sofre modificação conformacional posicionando sua cadeia favoravelmente para o processo catalítico. Em algumas reações, a catálise pode ser básica ou ácida, promovendo a adição ou remoção de prótons. Em outras circunstâncias a enzima se agrupa a um íon metálico ou molécula orgânica na posição correta para a ocorrência da catálise.

Ao completar a reação catalítica a enzima libera o produto e retorna a forma original. O processo ocorre em etapas.

3.3.2 - O MODELO DE MECANISMO SEGUNDO MICHAELIS-MENTEN



Em 1913, Leonor Michaelis e Maud Menten propuseram um modelo simples para explicar as características cinéticas para uma reação enzimática o modelo proposto foi:



onde **E** é uma enzima livre, **S** o substrato, **ES** o complexo enzima-substrato e **P** é o produto obtido desta reação.

O complexo ES tem dois caminhos possíveis: ele pode se dissociar em E e S, com uma constante de velocidade k_2 , ou pode prosseguir para formar o produto P, com uma constante de velocidade k_3 (Stryer, 1996).

Para enzimas, a velocidade de catálise V_0 (velocidade inicial) varia com a concentração do substrato [S]. Para uma concentração fixa de enzima, a velocidade é diretamente proporcional a [S], quando esta é pequena. Em alta [S], a velocidade é independente da [S] e proporcional à concentração do complexo ES (Stryer,1996).

$$V_0 = K_3 [ES] \quad (2)$$

E se expressarmos [ES] em termos de quantidades conhecidas, as taxas de formação e de quebra do complexo ES, podem ser dadas pelas equações 3 e 4:

$$\text{Vel. formação de } ES = K_1 [E] [S] \quad (3)$$

$$\text{Vel. de quebra de } ES = (K_2 + K_3 [ES]) \quad (4)$$

Do ponto de vista de um estado estacionário (steady-state), a concentração do intermediário (ES) permanece a mesma na unidade de tempo, enquanto as dos materiais reagentes e dos produtos estão variando. Isto só ocorre quando as velocidades de formação e de quebra do complexo ES são iguais. Assim temos:

$$K_1 [E] [S] = (K_2 + K_3) [ES] \quad (5)$$

A partir da equação 5, podemos simplificá-la, definindo uma nova constante, $K_M = (K_2 + K_3)/K_1$

$$[ES] = [E] [S] / (K_2 + K_3) / K_1 \longrightarrow [ES] = [E] [S] / K_M \quad (6)$$

A concentração de substrato não combinado [S] é quase igual à concentração do substrato total, desde que a concentração de enzima seja bem menor do que a do substrato. A concentração de enzima livre ou não combinada [E] é igual à concentração de enzima total [E_t] menos a concentração do complexo ES. Então obtemos :

$$[E] = [E_t] - [ES] \quad (7)$$

Aplicando-se esta expressão para [E] na equação 6, temos:

$$[ES] = ([E_t] - [ES])[S]/K_M \quad (8)$$

Resolvendo a equação 8 para [ES], obtemos:

$$[ES] = [E_t] \cdot [S] / K_M / 1 + [S] / K_M \quad (9)$$

ou

$$[ES] = [E_t] \cdot [S] / [S] + K_M \quad (10)$$

Pela aplicação desta expressão para [ES] na equação 2, temos:

$$V = K_3 [E_t] \cdot [S] / [S] + K_M \quad (11)$$

A velocidade máxima (V_{max}) é obtida quando os centros catalíticos da enzima estão todos saturados com o substrato, ou seja, quando [S] é muito maior do que K_M, de tal forma que [S]/([S] + K_M) é próximo de 1, e [E_T] ≅ [ES], nesta condição temos:

$$V_{Max} = K_3 [E_t] \quad (12)$$

Aplicando a equação 12 na equação 11, obtém-se a equação de Michaelis-Menten para a velocidade inicial de uma reação enzimática:

$$V_o = V_{Max} [S] / [S] + K_M \quad (13)$$

O valor do K_M obtido de uma enzima depende do substrato em particular e também das condições, tais como, pH, temperatura e força iônica. A constante de Michaelis (K_M), tem dois significados: o primeiro, é a concentração do substrato na qual a velocidade da reação é igual a $\frac{1}{2}$ da V_{Max} ; Segundo, K_M é igual à constante de dissociação do complexo ES, se K_3 for muito menor do que K_2 . Quando esta condição é satisfeita, $K_3 \ll K_2$, K_M então é uma medida da força do complexo ES: um K_M alto indica uma ligação fraca; um baixo valor de K_M indica uma ligação forte (Stryer, 1996).

A partir do valor dessa constante podemos calcular outra, chamada de eficiência catalítica : K_{cat}/K_M (14)

Onde K_{cat} é o número de transformação (*turnover*) da enzima (Voet & Voet, 1995):

$$K_{cat} = V_{Max}/[E_t] = K_3 \quad (15)$$

Onde (*turnover*), é o número de moléculas de substrato que sofrem catálise por unidade de tempo (Seg^{-1}).

3.4 - NATUREZA E ESTRUTURA ENZIMÁTICA

Todas as enzimas são proteínas, mas nem todas as proteínas são enzimas. As proteínas, como um todo, ocupam um papel de destaque na dinâmica e estruturação dos organismos vivos.

As enzimas, parte deste grupo de proteínas, funcionam como catalisadores, permitindo que uma reação química venha a ocorrer dentro dos limites das temperaturas biológicas.

Para um perfeito entendimento sobre a estrutura de uma enzima e como esta funciona, devemos considerá-la tanto como uma proteína quanto um catalisador biológico.

Como uma proteína, a enzima apresenta blocos de construção denominados aminoácidos. Algumas proteínas, tais como ribonucleases,

quimiotripsina e tripsina, são constituídas apenas de aminoácidos. Outras proteínas, além dos aminoácidos, contêm componentes orgânicos e inorgânicos e são denominadas de proteínas conjugadas. A peroxidase e a catalase são exemplos de enzimas com estrutura conjugada e que apresentam um grupamento Heme como cofator.

As ligações peptídicas que ligam cadeias lineares de aminoácidos caracterizam a estrutura primária das proteínas.

Considerando-se apenas a estrutura primária de uma proteína, a molécula deveria ser muito extensa e muito fina. Porém, muitas enzimas apresentam uma forma globular em vez da fina fita linear, evidenciando estruturas de ordem superior, conhecidas como estrutura secundária, terciária e quaternária, que ocorrem em função de interações intrínsecas entre os blocos constituintes da molécula.

Somente esta estrutura adicional explica como uma molécula de proteína pode ser tão compacta. Quando as quatro pontes de dissulfeto que estabilizam a estrutura de uma ribonuclease são reduzidas em uma solução de uréia, a cadeia polipeptídica assume uma conformação espiralada randômica e perde toda a sua atividade enzimática (desnaturação). Removendo-se a uréia e o agente redutor e deixando-se as pontes de dissulfeto restabelecerem-se, mais de 90% da atividade enzimática volta a ocorrer e as propriedades da molécula retornam àquelas do estado original (renaturação).

Na estrutura terciária, a proteína está enrolada de uma maneira complexa e irregular, formando um prisma compacto, triangular e às vezes achatado. Nesta conformação os grupamentos Heme e quase todos os resíduos de aminoácidos polares estão na superfície enquanto que quase todos os resíduos de aminoácidos não polares estão orientados para o interior da molécula. Conseqüentemente, os resíduos hidrofílicos estão expostos ao solvente, água, enquanto os resíduos hidrófobos são removidos da água o quanto possível. Um número grande de diferentes ligações está envolvido na estabilização desta conformação terciária. Estas incluem ligações eletrostáticas, pontes de hidrogênio, interações hidrófobas, pontes dipolares e pontes de dissulfeto.

Muitas enzimas são compostas de uma cadeia polipeptídica simples. Este é caso de enzimas como a ribonuclease, lisosima, tripsina, pepsina e algumas

alfa-amilases. Ao contrário, existe um grande número de enzimas que são compostas por mais de uma cadeia peptídica. A enzima lactatodesidrogenase é composta por quatro cadeias polipeptídicas. A repetição das cadeias polipeptídicas na construção de uma macromolécula de proteína caracteriza a estruturação quaternária que esta pode assumir.

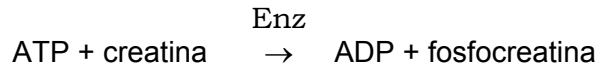
3.5 - NOMENCLATURA E CLASSIFICAÇÃO DAS ENZIMAS

A nomenclatura das enzimas tem sido utilizada de várias maneiras. A mais utilizada é feita pela adição do sufixo ase ao nome do substrato (chamada de Nome Recomendado), ou seja, a molécula na qual a enzima exerce sua ação catalítica. Neste caso, a enzima urease catalisa a hidrólise da uréia em amônia e CO_2 . A arginase catalisa a hidrólise da arginina em ornitina e uréia, e a fosfatase catalisa a hidrólise de ésteres de fosfato.

Entretanto, esta nomenclatura simples não tem se mostrado uma boa prática uma vez que muitas enzimas recebem denominações que, do ponto de vista químico, são muito pouco informativas. Por esta razão, e também devido à descoberta de novas enzimas, foi proposta uma classificação sistemática recomendada por uma comissão internacional de especialistas no estudo de tais macromoléculas.

O novo sistema de classificação divide as enzimas em seis Classes principais, nas quais estão inclusas subclasses de acordo com o tipo de reação catalisada. De acordo com esta sistemática, cada enzima é designada por um nome recomendado, usualmente pequeno e apropriado para o uso diário, um Nome Sistemático, o qual identifica a reação catalisada, e um Número de Classificação, o qual é usado quando uma identificação precisa é necessária. Como exemplo do novo sistema de classificação, considere a reação abaixo catalisada por uma enzima:

FORMAÇÃO DA FOSFOCREATINA



O nome recomendado para esta enzima, que é o normalmente usado, é creatinaquinase e o nome sistemático, baseado na reação catalisada, é ATP:creatina fosfotransferase. Seu número de classificação é **EC 2.7.3.2**, onde EC representa Enzyme Commission of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology - IUBMB, o primeiro dígito, 2, a Classe (transferase), o segundo dígito, 7, a Subclasse (fosfotransferase), o terceiro dígito, 3, a subclasse em que a fosfotransferase apresenta um grupo nitrogenado como acceptor, e o quarto dígito, 2, designa uma creatinaquinase. Abaixo relaciona-se os códigos utilizados para a aplicação do número de identificação das enzimas.

3.6 - CLASSIFICAÇÃO DAS ENZIMAS SEGUNDO A COMISSÃO DE ENZIMAS

1. Oxido-redutases (reações de oxido-redução ou transferência de elétrons).

Desidrogenases e Oxidases)

1.1- atuando em **CH-OH**

1.2- atuando em **C=O**

1.3- atuando em **C=O-**

1.4- atuando em **CH-NH₂**

1.5- atuando em **CH-NH-**

1.6- atuando em **NADH, NADPH**

2. Transferases (transferem grupos funcionais como amina, fosfato, acil, carboxil – Quinases e Transaminases).

2.1- grupos com um carbono

2.2- grupos aldeído ou cetona

2.3- grupos acil

2.4- grupos glicosil

2.7- grupos fosfatos

2.8- grupos contendo enxofre

3.0- Hidrolases (reações de hidrólise de ligação covalente - Peptidases)

3.1- ésteres

3.2- ligações glicosídicas

3.4- ligações peptídicas

3.5- outras ligações **C-N**

3.6- anidridos ácidos

4.0- Liases (catalisam a quebra de ligações covalentes e a remoção de moléculas de água, amônia e gás carbônico – Deidratases e Descarboxilases).

4.1. =C=C=

4.2. =C=O

4.3. =C=N-

5.0- Isomerases (reações de interconversão entre isômeros óticos ou geométricos - Epimerases).

5.1- Racemases

6.0- Ligases (catalisam reações de formação de novas moléculas a partir da ligação entre duas pré-existentes, sempre às custas de energia - Sintetases).

6.1. C-O

6.2. C-S

6.3. C-N

6.4. C-C

3.7- ENZIMAS LIGNOLÍTICAS DE INTERESSE BIOTECNOLÓGICO

Lignina, celulose e hemicelulose são os principais componentes estruturais da madeira e particularmente lignina é o mais abundante polímero de caráter aromático e renovável na biosfera. Em função de sua natureza recalcitrante com relação a biodegradação, lignina fornece proteção a tecidos vegetais, contra infecção por microrganismos e ainda atua como um cimento adesivo entre as células vegetais, proporcionando a rigidez necessária para sua sustentação. Desta maneira, a degradação de lignina em vegetais é um fator de extrema importância no ciclo global de carbono, uma vez que é o fator limitante na degradação de celulose, hemicelulose e outros polímeros vegetais. Pelas mesmas razões, do ponto de vista ambiental, subprodutos industriais contendo lignina e derivados, como por exemplo efluentes de indústrias de papel e celulose, são bastante problemáticos, pois apresentam bioacumulação e alta toxicidade (Lindstrom e colab., 1989).

Fungos degradadores de madeira, tais como “White-rot” fungos, podem degradar lignina nativa (na madeira), bem como lignina modificada industrialmente, como por exemplo lignina Kraft e cloroligninas contidas em efluentes de indústrias de papel e celulose (Kringstad e Lindstrom, 1984). Por este motivo, a utilização biotecnológica dos mesmos tem sido proposta por vários pesquisadores (Eriksson, 1990; Leisola e Fiechter, 1985; Trotter, 1990).

Embora existam numerosos estudos com relação aos mecanismos de ação enzimática para a biodegradação de matérias lignocelulósicas por fungos e outros organismos (Kirk e Farrell, 1987; Hatakka, 1984; Fiechter, 1993), bem como estudos de viabilidade de aplicação biotecnológica, tais processos até o momento não tem sido utilizados em larga escala. Uma das limitações é o fato de que o conhecimento sobre a fisiologia e bioquímica da produção destas enzimas e sua respectiva regulação apresentam muitas lacunas. A compreensão exata dos fatores que estimulam ou limitam estes processos possibilitaria construir bioreatores eficientes que poderiam operar em larga escala.

3.8- ENZIMAS OXIDATIVAS APLICADAS A BIORREMEDIAÇÃO

3.8.1 - ASPECTOS GERAIS

Os fungos de decomposição branca possuem um sistema enzimático extracelular capaz de tolerar altas concentrações de poluentes tóxicos. A utilização de fungos objetiva a descontaminação destes efluentes (efluente têxtil e de papel e celulose). A eficiência destes processos está diretamente relacionada com a capacidade do fungo degradar lignina. Enzimas como lignina peroxidase (LiP) e manganês peroxidase (MnP), são produzidas por estes fungos. Existem evidências indicando que estas enzimas são responsáveis pela fragmentação inicial do polímero de lignina. Manganês e peroxidases dependentes de manganês foram relacionadas na degradação enzimática. Foi demonstrado que a atividade lignolítica de *Lentinula edodes*, atualmente selecionado para tratamento de efluentes, é dependente da adição de manganês. A principal peroxidase extracelular detectada em culturas de *L. edodes* foi MnP. O efeito de vários compostos fenólicos derivados da lignina sobre o crescimento e degradação por *L. edodes* foi estudado por Shuen *et al* (1992). A eficiência deste organismo na descontaminação de efluentes provenientes da indústria de papel e polpa, foi previamente demonstrada. *L. edodes* foi selecionado entre 51 cepas de fungos lignolíticos para descoloração de efluente Kraft E₁ (Esposito *et al*, 1992). Após 5 dias de tratamento biológico, sem fonte adicional de carbono e nitrogênio, obteve-se 60% redução de DQO e 73% de descoloração, deste total apenas 13% foi devido a adsorção micelial. Em um trabalho posterior com *L. edodes* UEC-2021, obtiveram-se valores de 83% de descoloração, 53% de remoção de fenóis, 60% de redução de carbono total após 5 dias de tratamento (Esposito, 1995). Este fungo mostrou-se altamente eficiente na descontaminação de efluente E₁.

Enzimas com MnP participam de reações de despolimerização de ligninas sintéticas (Wariishi *et al.*, 1991), degradação de cloroligninas de alta massa molar (Lacker *et al.*, 1991), e descoloração de efluentes tipo Kraft (Michel *et al.*, 1991).

O papel da LiP e MnP na descoloração de efluentes de branqueamento, foi estudado por Michel *et al.*, (1991). Neste estudo foi evidenciada a importância das peroxidases extracelulares na descontaminação de efluentes, entretanto MnP parece ter um papel predominante sobre LiP. Estes resultados foram corroborados por outros autores (Perez & Jeffries,1990; Lee *et al.*, 1994, Jaspers *et al.*,1994). Neste último, foi demonstrado que MnP, e não LiP, foi produzida por *P. chrysosporium* (Basidiomycete) no efluente E₁ e que o tipo de *pellet* formado pelo fungo, tem importância significativa sobre a produção enzimática. Lee *et al.*, (1994) observaram que durante o tratamento do efluente E₁, com o fungo lignolítico KS-62 foram produzidas altas taxas de MnP e muito pouco ou nada de LiP. Este fato associado a eficiência do processo (80% de descoloração em 10 dias, 34% de redução de DQO e 40% de redução de AOX) levou os autores à conclusão de que MnP tem um papel relevante sobre LiP. Experimentos com as enzimas purificadas demonstraram que MnP é capaz de catalisar parcialmente a descoloração do efluente E₁, o mesmo não foi observado com LiP (Fig.3).

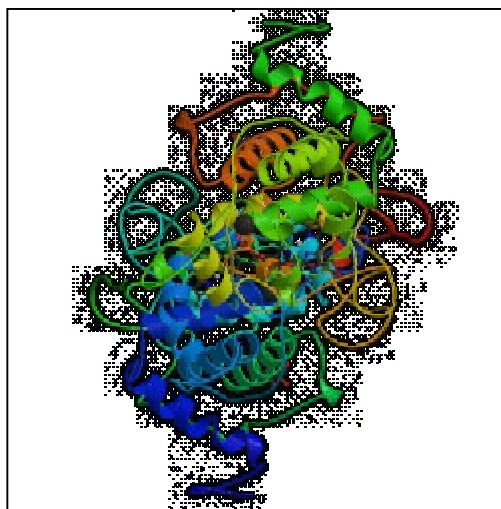


FIG.3-Estrutura em 3D(cristalografia RX)Enzima Lignina Peroxidase, fungo *P. chrysosporium*.

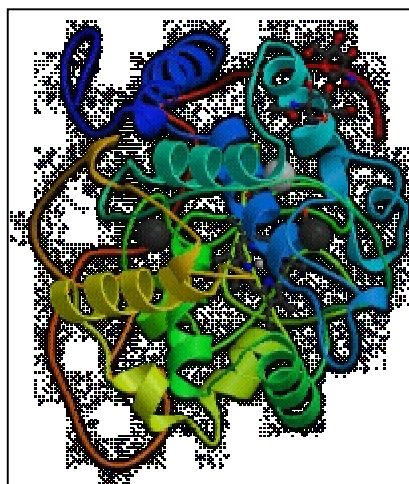


FIG.4- Estrutura em 3D (cristalografia RX) da enzima Lacase, do fungo *Trametes versicolor*.

Porém também foi demonstrado que LiP produzida por *Chrysonilia sitophila* TFB-27441 (Ascomycete) era capaz de remover a cor de efluentes E₁ (Ferrer *et al.*, 1991; Durán *et al.*, 1991; Dezotti *et al.*, 1995). LiP purificada a partir de cultura de *C. sitophila* TFB-27441 (LiP-I e LiP-III) foram estudadas nas formas livres e imobilizadas para descoloração de efluentes. Os resultados demonstraram que após 72 horas, a enzima imobilizada em sefarose remove 45,7% da cor do efluente. Ao que tudo indica, as condições para a aplicação desta enzima são muito importantes, bem como o tipo de microrganismo produtor de LiP. Recentemente, Soares & Durán (1998) questionaram a importância de MnP sobre a descoloração do efluente Kraft E₁ em um estudo levado a cabo com *Trametes villosa*. O fungo secreta uma quantidade significativa de lacases (120-418 U/L), β -glicosidase (30 –145 U/L) e insignificantes quantidades de peroxidases (LiP, MnP e álcool veratrílico oxidase) e em um período de 48 horas descolora 70-80% do efluente e consome cerca de 75% de fenóis totais. As lacases oxidam compostos fenólicos até radicais ariloxila, os quais polimerizam espontaneamente formando complexos insolúveis, que facilmente podem ser removidos por precipitação, filtração ou centrifugação. A remoção da cor de efluentes E₁ por enzimas lignolíticas, entre estas lacases, foi estudada por vários autores (Davis & Burns 1990 , 1992; Lankinen *et al.*, 1991, Esposito *et al.*, 1991, 1993; Esposito e Inocentini-Mei,1996). A lacase produzida por *P. radiata* e *M.*

tremellosus aumenta a cor do efluente nos primeiros dias de cultivo, possivelmente devido a oxidação de estruturas fenólicas à quinonas que polimerizam originando complexos insolúveis, conforme mencionado acima (Lankinen *et al.*, 1991). Nunca foi estudado em detalhe o papel da lacase detectada no *Phanerochaete chrysosporium* (Esposito *et al.*, 1991; Durán *et al.*, 1993; Srinivasan *et al.*, 1995) relacionado com sua alta efetividade em descontaminar efluentes industriais.

Acredita-se que os fungos considerados de decomposição branca, que utilizam MnP para mediar a degradação de lignina na natureza, também produzam agentes quelantes tais como oxalato para estabilizar Mn^{3+} .

Tanto LiP quanto MnP são dependentes de peróxido de hidrogênio. O peróxido de hidrogênio extracelular, produzido a partir do oxigênio molecular, é suplementado por enzimas oxidativas, que utilizam glicose, glioxal, metil glioxal, e outros produtos da degradação da celulose e lignina como substrato (Barr & Aust, 1994ab). A LiP após sofrer oxidação por H_2O_2 , oxida núcleos aromáticos na lignina (fenólicos e não fenólicos) por extração de um elétron, gerando radicais cátions. Estes reagem com nucleófilos e com oxigênio molecular. O resultado é uma “combustão enzimática” na qual as ligações C-C e C-O, são clivadas, causando a despolimerização do polímero e a abertura dos anéis aromáticos. O álcool veratrílico é um excelente substrato para LiP e aparentemente atua como um “mediador” na troca de elétron entre LiP e seu substrato. Acredita-se que o álcool veratrílico proteja a enzima da possível inativação provocada pelo excesso de H_2O_2 . A oxidação do álcool veratrílico para aldeído veratrílico pela LiP, na presença de H_2O_2 é a reação mais utilizada como método de determinação da atividade catalítica da enzima.

A enzima MnP tipicamente oxida Mn^{2+} a Mn^{3+} o qual pode oxidar vários grupos de compostos químicos. Por exemplo, aparentemente Mn^{3+} pode oxidar hidroquinonas a radicais semiquinonas, as quais podem atuar como agentes redutores. MnP possui um forte potencial de oxiredução ($E^0 = 1,54V$ em água) e pequeno tamanho, comparado à proteínas, o que favorece a penetração de Mn^{3+} em substratos lignocelulósicos e conseqüente oxidação da lignina.

Além das enzimas lignolíticas mencionadas, outras enzimas oxidativas, ainda não identificadas, podem ser importantes. Em 1993 Vares *et al.* (Vares *et al.*, 1993) documentaram a existência de uma nova enzima fúngica, a qual é

capaz de processar atividades de oxidase e peroxidase. Também foi considerada a participação de β -glicosidase (Esposito *et al* 1991, Esposito,1992), no processo de descontaminação, tornando as ligninas cloradas (no caso de efluentes E₁) um substrato mais atrativo para as enzimas lignolíticas. As lacases, polifenóis oxidases que contém cobre no seu sítio ativo e catalisam a redução de O₂ para água com simultânea oxidação de substratos fenólicos, também parecem importantes na degradação de lignina (Rodriguez *et al.*, 1996) e nos tratamentos biológicos de efluentes (Limura *et al.*, 1996).

A partir destas colocações pode-se concluir que fungos lignolíticos apresentam um excelente potencial na biodegradação de contaminantes, neste caso efluentes da indústria papelreira. Aparentemente, algumas enzimas como MnP e lacase são mais importantes no processo de descontaminação do que outras como LiP.

Recentemente foi mostrado que metabólitos de fungos (sideróforos) podem se comportar como fenoloxidasas na presença de ferro degradando significativamente os efluentes kraft E₁ (Duran & Machuca,1995, Duran,1996). Modelos destas reações (sideróforos de bactérias) tem permitido estudar seu mecanismo de ação. O modelo estudado, Ferroxamina B (DF) sideróforo, é um ácido triidroxâmico e um quelante específico de ferro. Estudos mostraram que nestas condições o DF reduz Fe(III) a Fe(II), quando acompanhado a reação com o-fenantrolina ou ferrozina (Santiago *et al.*, 1996^a). Este composto com atividade de fenoloxidase (FO) atua sobre o efluente E₁ em condições ácidas (pH 3,0). Neste estudo o sistema de DF-FO/Fe(III) atua sobre o efluente Kraft E₁, aumenta a cor e o teor de fenóis totais. Não foi observada neste caso uma mineralização, isto se deve a um novo cromóforo que aparece na região de 280 nm, como mostrado por espectros de ultravioleta e por HPLC. Um deslocamento da distribuição de massas moleculares para valores menores foi observado (Santiago *et al.*, 1996).

3.9- ENZIMA LACASE

Lacases (EC 1.10.3.2, *benzenodiol: oxigênio oxidoreductase*) constituem um grupo de enzimas encontrado principalmente em fungos e plantas superiores, onde são abundantes. A maioria das diferentes lacases

(diferentes fontes) conhecidas apresentam: I) massa molecular(MM) na faixa de 60-70 kDa, sendo conhecidas lacases com MM na faixa de 60-100 kDa. II) apresentam-se na forma de 2 ou 3 isoenzimas, em geral denominadas La (ou /cc) I, II e III. III) possuem estrutura de glicoproteína, com 15-20% de conteúdo relativo de carboidratos IV) Todas as lacases conhecidas contém cobre , em geral 4 átomos de cobre por molécula, os quais apresentam um número de oxidação 2^+ . Tais átomos de cobre estão diferentemente coordenados, podendo assim ser distinguidos três tipos ou estados de coordenação denominados tipo I, II e III, sendo que este último é constituído por um par de átomos de cobre. Estudos da estrutura cristalina de lacases mostraram que existe uma proximidade entre os átomos de cobre tipo II e tipo III, formando uma estrutura trinuclear, coordenada por oito resíduos de histidina, a qual está envolvida na ligação do átomo de oxigênio. Os átomos do tipo I estão coordenados por um resíduo de cisteína e dois resíduos de histidina. A estrutura tipo I parece estar envolvida no processo de captura de elétrons e transferência dos mesmos para a estrutura trinuclear (tipo II e III). Poucos estudos mostram com precisão a estrutura cristalina tridimensional e topologia do sítio ativo de lacases e parte de inferições feitas para o sítio ativo destas enzimas são baseadas nos estudos realizados para a enzima ascorbato oxidase, com a qual lacases mostram uma grande similaridade.

O ciclo catalítico desta enzima envolve portanto sucessivas transferências de um elétron entre os átomos de cobre, podendo ser distinguidas duas etapas, uma anaeróbia (reduzora) e outra aeróbia (oxidante).

Em suma, lacase é tipicamente uma oxidase que catalisa reações de oxidação, na ausência de H_2O_2 utilizando portanto oxigênio (O_2) como oxidante, o qual é reduzido a H_2O num processo de oxidação envolvendo no total quatro elétrons. Não apresenta uma especificidade muito estrita quanto a estrutura do substrato, podendo catalisar a oxidação de uma grande variedade de estruturas aromáticas, especialmente estruturas fenólicas, como mono, di, polifenóis e metoxi-fenóis. O mecanismo de oxidação do substrato é via retirada de um elétron com a formação inicial de fenoxi-radical e cátion radical, os quais subseqüentemente podem reagir através de mecanismos não enzimáticos (Fig.5). Neste caso, são freqüentes as reações de acoplamento

radical-radical, desproporcionamento, retirada de próton e ataque nucleofílico à H_2O , resultando em :

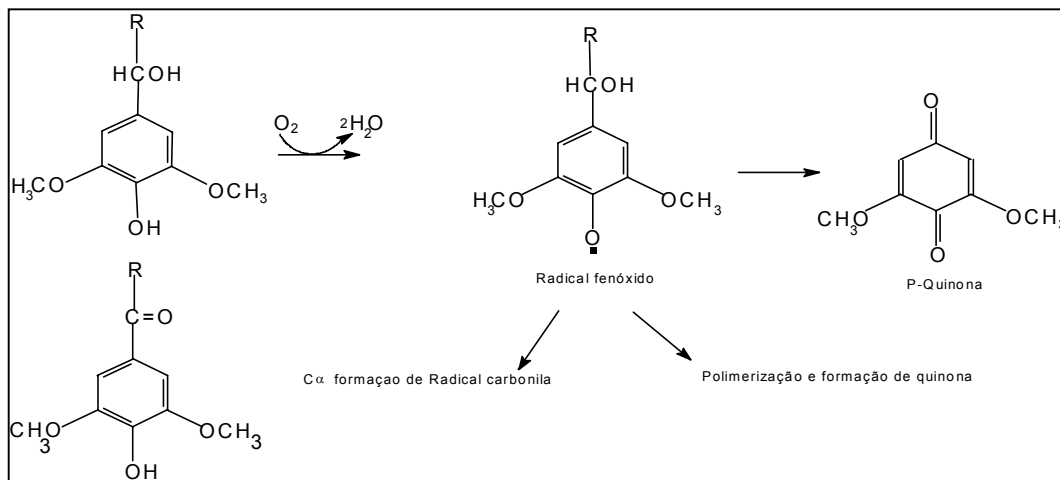


FIG.5 – Mecanismo de ação da Lacase.

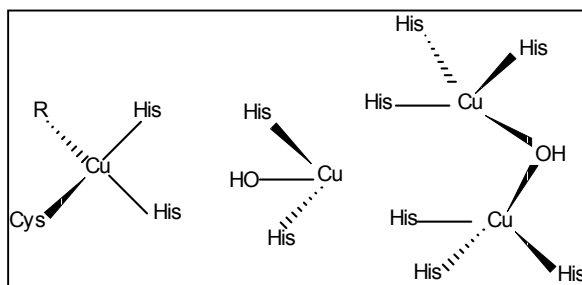
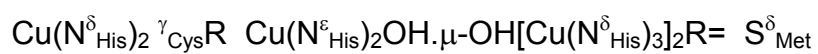


FIG.6 – Sítio ativo da Lacase.

Tipo 1- Centro Trinuclear (Tipo 2I +Tipo 3)



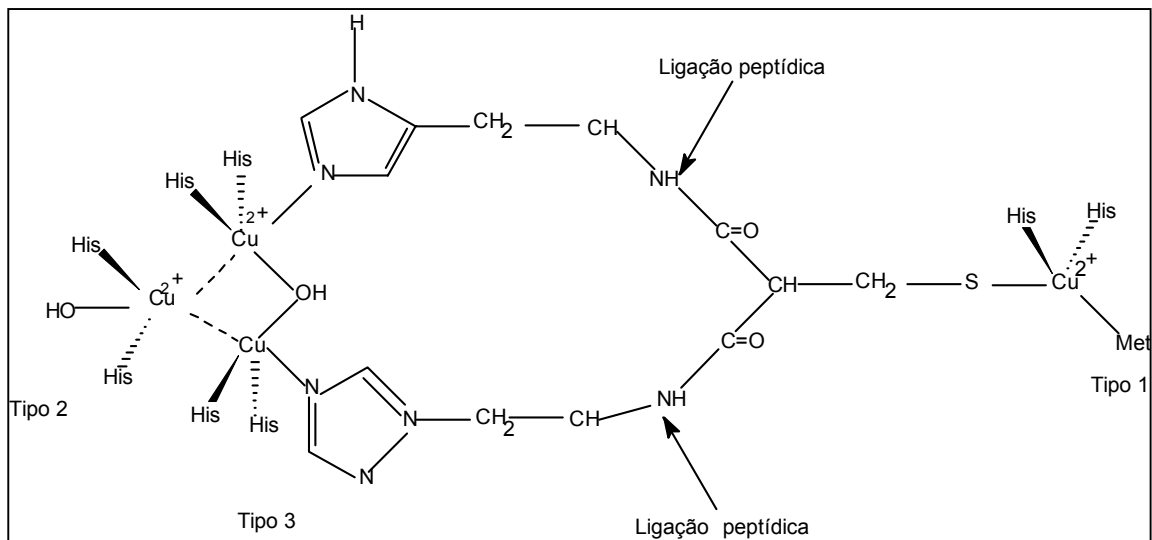


FIG.7- Modelo mais provável da lacase com centro ativo contendo cobre.

Polimerização, clivagem de ligações tipo alquil-aril, C_{α} - oxidação e desmetoxilação das estruturas fenólicas.

Diversos estudos com substâncias modelo de subestruturas de lignina mostram que lacases podem catalisar a clivagem de ligações tipo C_{α} - C_{β} das cadeias laterais de estruturas diméricas tipo β -1 e β -O-4, bem como catalisar a clivagem de anéis aromáticos de estruturas como 4,6-di(tert-butil) guaiacol. Estes resultados demonstram que lacases poderiam degradar e despolimerizar lignina. Por outro lado, estudos com *Trametes versicolor* demonstram que a degradação de lignina por este fungo não é alterada quando a atividade de lacase é inibida especificamente usando-se anticorpos. Assim diversos outros fungos, que são eficientes degradadores de lignina, não produzem lacases.

Estudos com várias isoenzimas de lacase de *T. versicolor* demonstram que todas as formas foram capazes de degradar clorofenóis existentes em efluentes tipo E₁, promovendo a perda de cloro-substituintes destes substratos. A reação com diferentes clorofenóis padrão demonstrou que a reatividade relativa destes substratos depende do número de cloro-substituintes, sendo que policlorofenóis foram mais reativos ou mais rapidamente metabolizados do que os respectivos derivados monoclorados.

Foi evidenciada ainda a formação de estruturas poliméricas. Em complementação os mesmos estudos demonstraram que a degradação destes

clorofenóis foi mais eficiente na presença de estruturas de alta massa molecular obtidas a partir do efluente E₁.

Outros autores relataram que lacase isolada de *T. Versicolor* catalisa a degradação de tetracloroguaiacol, através da desmetilação inicial e subsequente formação de um cátion radical intermediário, o qual por substituição nucleofílica perde Cl⁻ reagindo com H₂O. Portanto, pelo mecanismo proposto, este substrato sofre descloração, sem envolver o acoplamento de fenoxyradicais intermediários, portanto sem polimerização, e gerando quinonas intermediárias.

A capacidade polimerizante de lacase tem sido utilizada para justificar outras possíveis funções para esta enzima, diferentes da degradação de lignina, na ação de fungos degradadores de madeira. Como por exemplo a função de desintoxicação do meio, pela retirada de intermediários do processo de degradação, que seriam potencialmente tóxicos para os fungos.

Embora bioquimicamente seja possível distinguir pelo menos dois tipos de atividade catalítica de lacases de fungos, o que poderia sugerir a existência de várias famílias de genes, somente uma família foi clonada para a maioria dos fungos estudados, como por exemplo para *Neurospora crassa*, *Cryphonectria parasitica*, *Aspergillus nidulam*, *Agaricus bisporus*, *Coriolus hirsutus*, *Phlebia radiata*, *Trametes versicolor* e *Trametes villosa*.

Dentre estes fungos, lacases de *T. versicolor* são as mais intensamente estudadas em função da eficiência de degradação de materiais lignocelulósicos e grande potencial de aplicação biotecnológica apresentado por este fungo.

A utilização de lacases em processos biotecnológicos, particularmente em processos de bi branqueamento de polpas, desponta como um processo promissor.

4.0. MÉTODOS DE IMOBILIZAÇÃO

A imobilização é geralmente conseguida através do contato de um material utilizado para a imobilização, denominado suporte, com a enzima que se pretende imobilizar, sob condições ambientais controladas.

As principais características de um suporte para a imobilização enzimas são as seguintes: a) não toxicidade às células; b) alta capacidade de retenção;

c) resistência ao ataque químico e microbiano; d) pouca sensibilidade às possíveis tensões mecânicas, seja de compressão por peso, de tensões de cisalhamento ou eventuais pressões internas e externas de gases, e) alta difusividade de substratos e produtos.

Os suportes mais utilizados na imobilização de células vivas estão apresentados na Tabela 1.

Deve-se destacar que existe possibilidade de se utilizar uma combinação desses materiais para produção de novas matrizes imobilizadoras e de se proceder à modificação da superfície dos suportes, com a finalidade de se introduzir grupos funcionais que serão responsáveis pela imobilização.

Existem basicamente três métodos de imobilização de enzimas em suportes, a saber, *adsorção*, *ligação covalente* e *oclusão*.

Os mecanismos de interação enzima-suporte são diferenciados para cada uma dessas técnicas.

4.1. ADSORÇÃO

Segundo MESSING ², as forças de interação entre a superfície celular e a superfície do suporte no método da **adsorção** são complexas e envolvem múltiplos tipos de formação de ligações. Deve-se destacar aqui as interações eletrostáticas entre cargas opostas da parede celular e superfície do suporte, bem como a formação de ligações iônicas entre os grupos amínicos e carboxílicos da parede celular e um grupo reativo da superfície do suporte. Além destas também a formação de ligações covalentes parciais entre grupos amínicos da parede celular e grupo hidroxila ou silano (SiO^-) da superfície do suporte podem ser citadas. Considera-se, então, adsorção e adesão de enzimas em suportes que não foram especialmente funcionalizados para a ocorrência de ligação covalente. A principal limitação da técnica reside no fato de que existe influência bastante acentuada das condições ambientais promovidas pelo meio de cultivo na capacidade de retenção das células no suporte, mormente as relacionadas com concentração iônica, pH.

Os materiais mais comumente utilizados na adsorção são os inorgânicos e os polímeros sintéticos mostrados na Tabela 1. Deve-se salientar que esses materiais têm sido submetidos a tratamentos superficiais, visando a obtenção

de estruturas macroporosas, com o intuito de se incrementar a capacidade de retenção do suporte.

Tabela 1-Materiais utilizados na produção de suportes para imobilização de enzimas.

Polímeros naturais	Polímeros sintéticos	Materiais inorgânicos
Alginato	Poliacrilamida	Alumina
K-carrejenana	Cloreto de polivinila	Sílica
Agar	Poliestireno	zircônia
Pectina	Poliuretano	Vidro
Celulose	Poliétileno glicol	Diatomita
Dextrana		Vermiculita
Quitina e Quitosana		
Colágeno		

4.2. LIGAÇÃO COVALENTE

No método da *ligação covalente*, os suportes são especialmente funcionalizados para conter um grupamento químico, que será responsável pela imobilização da enzima ao suporte. A literatura descreve várias técnicas que se utilizam desse princípio. Uma das mais utilizadas é a silanização de esferas de vidro, seguida de reação com glutaraldeído e também de microesferas de quitosana seguida de reação com glutaraldeído.

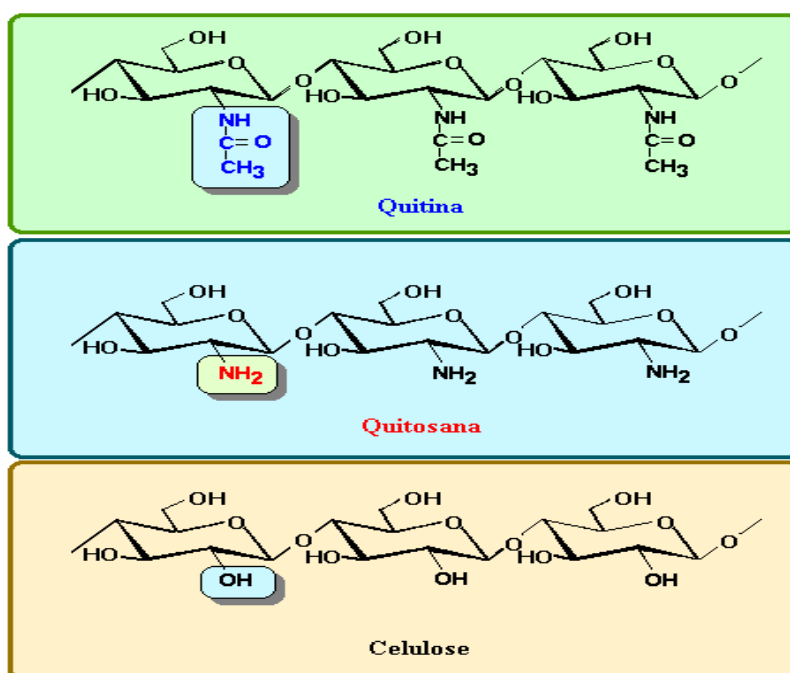


FIG.8- Fórmulas estruturais : quitina , quitosana e celulose.

5- OBJETIVOS

- Caracterização cinética, relativo aos parâmetros pH e estabilidade térmica, da atividade enzimática de um extrato comercial da enzima lacase.
- Avaliar a atividade de enzima lacase imobilizada em quitosana em pó, quanto ao parâmetro pH e estabilidade térmica.

6 - MATERIAIS E MÉTODOS

6.1. Reagentes

A enzima lacase foi obtida comercialmente da Novozyme , produzida por fermentação submersa do microrganismo *Aspergillus* sp. geneticamente modificado.

- Ácido tartárico (Reagen)
- Tartarato monossódico (Synth)
- Fosfato monossódico (Merck)
- Fosfato dissódico (Merck)
- Água deionizada
- Álcool Etílico Absoluto (REAGEN)
- Siringaldazina (Sigma)

6.2. Equipamentos:

- UV-VIS HP 8452 A DIODE SPECTROPHOTOMETER;
- CROMATOGRAFIA LÍQUIDA SHIMADZU LC-10AS (HPLC)
- QUANTACHROME AUTOSORB AUTOMATED GAS SORPTION SYSTEM REPORT (BET) ;
- AGITADOR MAGNÉTICO FISATON .;
- ESTUFA DE SECAGEM;
- CENTRÍFUGA REFRIGERADA SIGMA .
- BANHO TERMOSTATIZADO MICROQUÍMICA .

6.3. Estudo Cinético

Foi preparada uma solução enzimática 200mg enzima Novozyme/5mL de H₂O, para um volume de 50mL. Esta solução foi centrifugada para análise espectrofotométrica para medir a atividade enzimática. A cinética enzimática foi avaliada através da reação com o substrato siringaldazina [HOC₆H₆(OC₃)₂CH=N-]₂,4-hidroxi-3,5-dimetoxi-hidrobenzaldeído - Método de Ander e Eriksson(1976).

(Fig.8 e 9).

Foram preparados vários tampões a pH diferentes, para verificar o seu efeito na atividade enzimática. Estes tampões foram de tartarato a pH= 3,0; 3,5; 4,0; 4,5 e 5,0 e tampão fosfato a pH= 6,0; 6,5; 7,0 e 7,5.

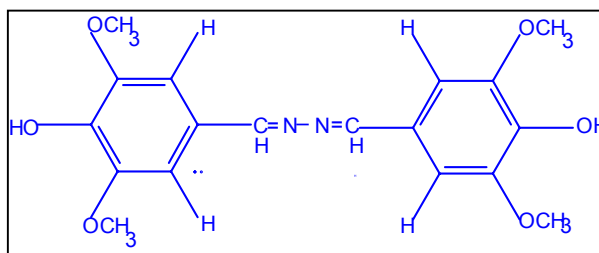


FIG. 9 – Fórmula estrutural da Siringaldazina.

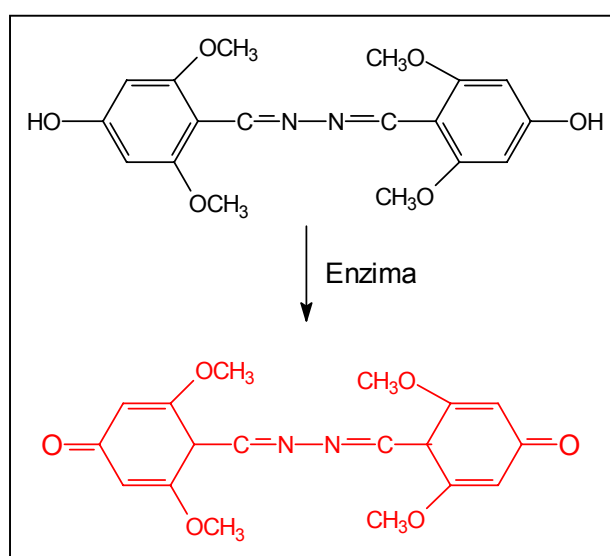


FIG.10 - Reação da Siringaldazina catalisada pela enzima

A solução de siringaldazina utilizada continha 5mg/10 mL em etanol absoluto.

6.3.1 EFEITO DO PH:

Foram utilizadas soluções tampões de valor de pH diferentes para verificar o melhor pH para a atividade enzimática.

Esta análise foi feita no espectrofotômetro a 525 nm e utilizando-se como absorvidade molar $\epsilon=65000\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ para o produto formado. O sistema de reação continha 2,0 mL de tampão (tartarato e fosfato) + 25 μL de siringaldazina + 50 μL de enzima lacase Novozyme.

Uma vez determinado o pH de maior valor de atividade enzimática, foi pesquisado o efeito da temperatura (estabilidade térmica da enzima lacase). Para expressar a atividade enzimática utilizou-se **U** = unidade internacional de atividade enzimática:

1 U = 1 $\mu\text{mol}/\text{min}$ - quantidade de enzima que converte 1 μmol de substrato por minuto em condições padronizadas.

6.3.2 ESTABILIDADE TÉRMICA DA ENZIMA LACASE

A estabilidade térmica foi medida a várias temperaturas (25⁰C, 30⁰C, 40⁰C, 50⁰C, 60⁰C e 70⁰C) e a reação com Siringaldazina 25 μL + 2,0 mL de tampão tartarato a pH= 4,0; Nestas temperaturas a enzima foi pré-incubada por 25 minutos em banho termostaticado Microquímica Mod., com sistema de termostatização de cubeta. Após 25 minutos de incubação a estas temperaturas, adicionou-se 25 μL de solução de siringaldazina e foram medidas as suas atividades com o tempo.

6.4. IMOBILIZAÇÃO DA ENZIMA

Na imobilização da enzima foi utilizado como suporte a quitosana. A quitosana é um polímero policatiônico obtido da desacetilação alcalina da quitina (N-acetil-glicosamina), que é o segundo mais abundante polissacarídeo, encontrado no exoesqueleto dos crustáceos. A quitosana foi gentilmente cedida pelo Laboratório QUITEC do Departamento de Química da UFSC.

Uma solução de enzima lacase 1000 mg em 50 mL em água deionizada foi preparada e deixando-se sob agitação magnética com 500 mg de quitosana em pó por 3h. Após a agitação e filtração, a quitosana retida foi seca a 35⁰ C. O filtrado, contendo lacase não adsorvida, foi avaliado quanto a sua atividade enzimática em tampões tartarato a pH (3,0- 3,5- 4,5 e 5,0).

Adicionalmente, utilizando-se cerca de 0,020g de quitosana/lacase imobilizada foi avaliada também a atividade enzimática em vários valores de pH e diferentes tampões, tartarato e fosfato.

A enzima lacase foi caracterizada e a sua massa molecular foi obtida por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), fornecendo um resultado de 66-97Kda. O equipamento utilizado foi o LC-10AS LIQUID CHROMATOGRAPH SHIMADZU, usando coluna Diol-150 Shimadzu, com detector de UV-VIS SPD-10 A em 280 nm e fase móvel de tampão tris pH= 9,0 com fluxo de 1mL por minuto.

Também foi realizado análise de área superficial da quitosana e sua isoterma no equipamento, Quantachrome Autosorb Automated Gas Sorption System Report. Esta análise nos mostra o valor da área superficial da quitosana e também a sua isoterma (ANEXO).

7. RESULTADOS E DISCUSSÃO

7.1. Sistema contendo lacase não imobilizada

Os resultados obtidos no estudo do efeito de pH na atividade enzimática são descritos nas Figuras 10 e 11.

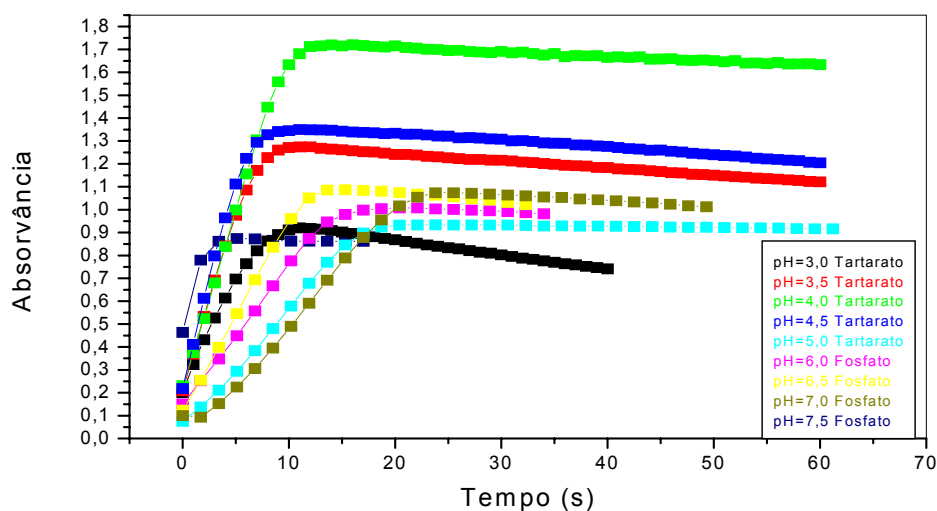


Fig.11 – Efeito do pH sobre a atividade enzimática da lacase utilizando-se diferentes tampões, tartarato e fosfato, monitorada a 525 nm.

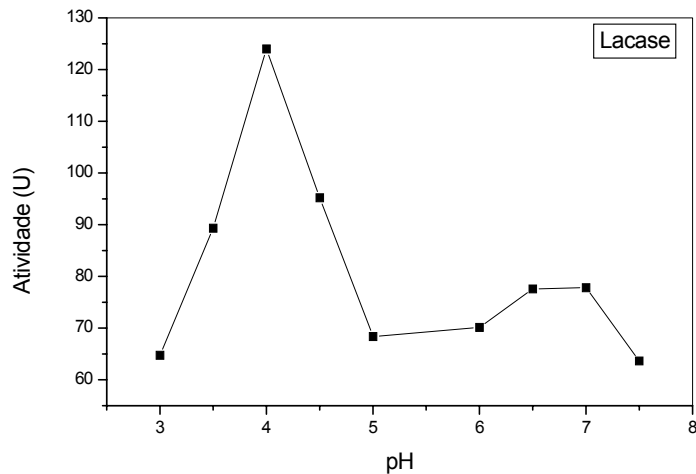


FIG.12 – Variação da atividade da enzima em função do pH.

Quanto ao pH, a enzima lacase apresentou a melhor atividade quando utilizado o tampão tartarato a pH= 4,0. Este é um resultado bastante conhecido para lacases fúngicas, porém, na maior parte dos casos, esta atividade mantém-se em níveis relativamente elevados até valores de pH em torno de 6,5 em discordância com os resultados acima.

7.2. ESTABILIDADE TÉRMICA DA ENZIMA LACASE

O efeito da temperatura na atividade obtido demonstrou que a enzima possui boa estabilidade térmica para temperaturas entre 25 a 60°C com valor de atividade de lacase a 285 U. A lacase perdeu a atividade a 70°C, isto é, desnaturou-se a esta temperatura, como mostram as Fig.12 e 13:

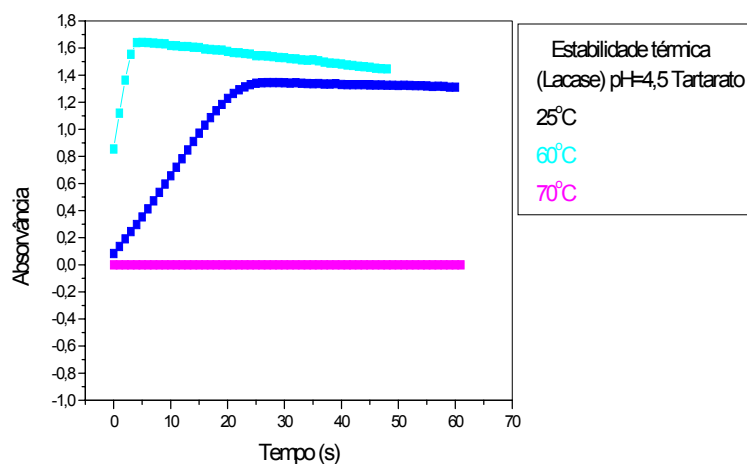


Fig.13– Gráfico da atividade com o efeito da temperatura

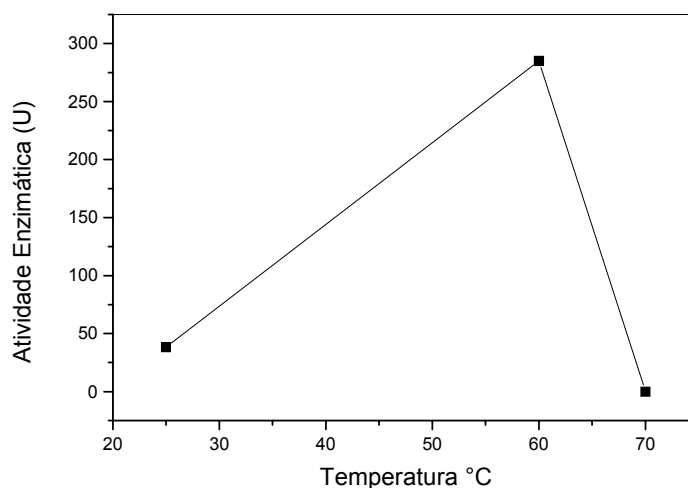


Fig.14- Gráfico da atividade com o efeito da temperatura

Este é um resultado bastante interessante do ponto de vista de aplicação biotecnológica, uma vez que diversos processos industriais, como por exemplo na indústria têxtil (45 a 50 °C), utilizam temperaturas mais elevadas, o que na maioria dos processos poderia inviabilizar o uso de enzimas.

7.3. RESULTADOS CINÉTICOS - IMOBILIZAÇÃO DA ENZIMA LACASE EM QUITOSANA

Para o sobrenadante do processo de imobilização, a atividade enzimática (AE) apresentou maior valor em pH 5,0 para tampão tartarato (Fig. 19). Porém, o maior valor de atividade foi observado em tampão fosfato a pH = 6,5. Este resultado demonstrou um perfil AE x pH bastante diferente do que observado para a enzima não imobilizada. Uma possível explicação para este fato é que em solução restaram pequenos fragmentos de quitosana (maior solubilidade), que associados a enzima, modificaram as características cinéticas da mesma. Em termos de aplicação biotecnológica, estes resultados são interessante uma vez que a enzima adquiriu boa atividade numa faixa de pH bem mais ampla, aumentando assim a sua aplicabilidade.

A quitosana tem uma área superficial muito pequena $3,09\text{m}^2/\text{g}$ comparada com outros suportes, como carvão ativo que tem cerca de $1000\text{m}^2/\text{g}$ de área superficial. Tendo que ser utilizados neste caso outros reagentes para imobilização química ou cruzada como o glutaraldeído à quitosana.

Outros suportes estão sendo utilizados atualmente em imobilização de enzimas e deve-se pesquisar suportes de maneira que eles sejam eficazes e tenham uma área superficial melhor a adsorção física.

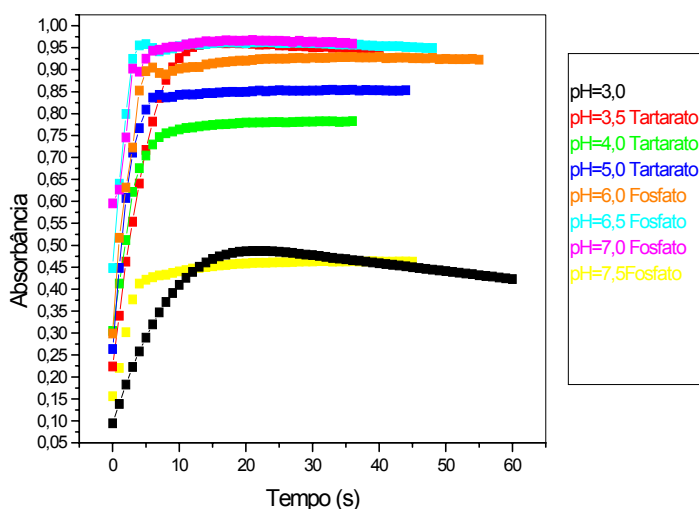


Fig.14- – Atividade do sobrenadante da solução de enzima com quitosana

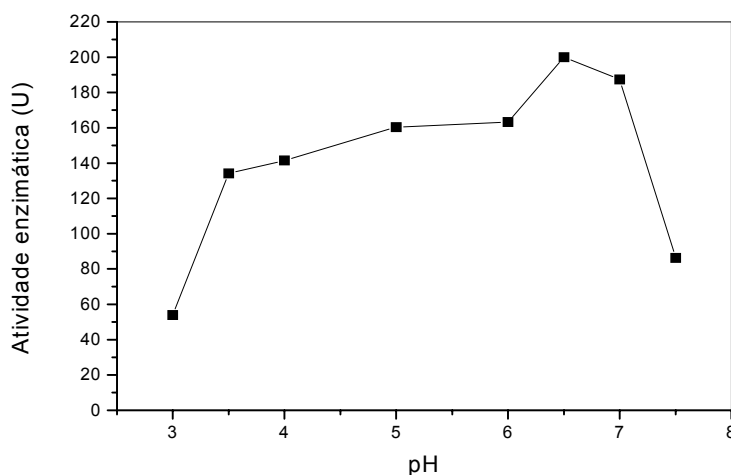


FIG.15- Variação da atividade enzimática x pH para o sistema Lacase / quitosana em solução

Para o sistema quitosana/lacase adsorvida os resultados obtidos são descritos pela Figura 16.

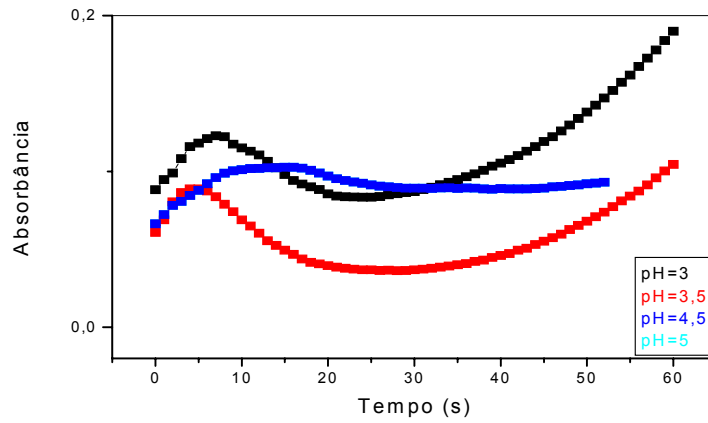


Fig.16 – Atividade da quitosana imobilizada.

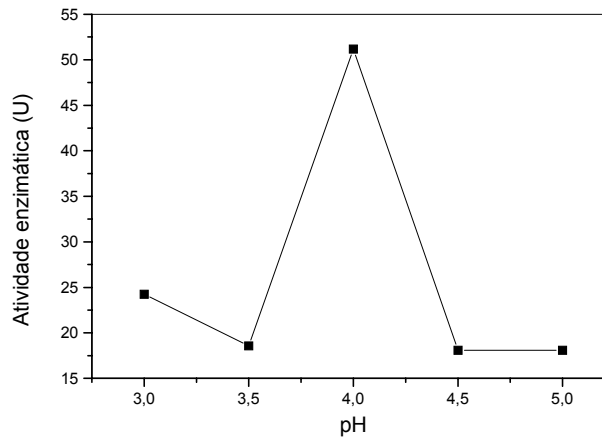


Fig. 17 - Variação da atividade enzimática x pH para o sistema Lacase / quitosana adsorvida.

Curiosamente o perfil obtido neste caso evidencia uma melhor atividade em torno de pH 4,0, assemelhando-se a enzima livre.

7 - CONCLUSÃO

A enzima lacase obteve uma maior atividade enzimática em tampão tartarato a pH=4,0 como enzima livre. No estudo de sua estabilidade térmica, observamos uma boa atividade enzimática em tampão tartarato a pH= 4,5 em temperaturas de 60⁰C, sendo que houve desnaturação a 70⁰C.

O efeito da imobilização da enzima em quitosana foi bastante pronunciado aumentando-se a faixa de pH, com atividade elevada.

8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1-Suurnakki, T., Riistieg, K., Krunuus, K., Guebitz, G., Buchert, J. and Suortti, T. Investigations on the laccase-catalyzed polymerization of lignin model compounds using size-exclusion HPLC. *Enzyme and Microbial Technology*, **11** (2002).
- 2-Siso, G., Lang, E., Carrenô, B., Becerraf, M., Espinar, O. and Méndez, J.B. Enzyme encapsulation on chitosan microbeads. *Process Biochemistry*, Vol. 32, **3**, 221-216 (1997).
- 3- Riistieg, K., Suurnakki, A., Suortti, T., Krunuus, K., Guebitz, G and Buchert J. Investigations on the laccase-catalyzed polymerization of lignin model compounds using size-exclusion HPLC, *Enzyme and Microbial Technology* , **11** (2002).
- 4-M.I. González Siso, E. Lang, B. Carrenô –Gomez, M.Becerraf. Otero Espinar and J.Blanco Méndez. Enzyme encapsulation on chitosan microbeads. *Process Biochemistry*, Vol.32, **3** , pp.221-216 (1997).
- 5- Enzymatic gelation of the natural polymer chitosan, Kumar, G., Bristow, F.J , Smith, J.P and Payne, F.G, *Polimer, Biopolymer* (1999).
- 6 -Mayer, M., Alfred , Staples, C., Richard. Laccase :Review new functions for a old enzyme, *Phytochemistry* **60** 551- 565 (2002).
- 7- Fabbrini., M, Galli., C. , Gentili., P., Comparing the catalytic of mediators of laccase , *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **16** 231-240 (2002).
- 8-Minussi, C. R., Pastore, M.G. Duran, N. Potential applications of laccase in the food industry, *Trends in Food Science & Technology* **13** (2002) 205-216.
- 9 -Bertrand, T., Jolivat, C., Briozzo, P., Caminade,E., Joly, N., Madzak, C., Mougín, C., Crystal Structure of a Four-Copper Laccase Complexed with an Arylamine : Insights into Substrate Recognition and Correlation with Kinetics., *Biochemistry* 2002 **41**,7325-7333.
- 10- *Biotecnologia Industrial*, Willibaldo Schmidell, Urgel de Almeida Lima, Eugênio Aquarone e Walter Borzani, Vol.2, Ed.Edgard Blücher Ltda ,2001, *Engenharia Bioquímica* pág.356-358.
- 11-Lehninger A.L.,”*Bioquímica*”, v.2, 2o edição, Editora Edgard Blucher LTDA, 1976.

12- Enzimas. Disponível em <www.biomania.com.br> Acesso em Julho de 2003.

13- Gallo, L.A., Enzimas. Disponível em <<http://www.ciagri.usp.br/~luagallo/Enzimas2.htm>> Acesso em Abril de 2003.

14 -Duran, N., Rosa, M.A., D'Annibale and Gianfreda, L. Applications of Laccase and Tyrosinases (phenoloxidases) immobilized on different supports: a review. *Enzyme and Microbiol Technology* **31**, 907-931 (2002).

15- Enzyme Structures Database. Disponível em <<http://www.biochem.ucl.ac.uk/bsm/enzymes/ec1/ec11/ec01/ec0007/>> Acesso em Junho de 2003.

16- Cantorella, G., Galli, C and Gentili, P., Free radical versus electron-transfer routes of oxidation of hydrocarbons by Laccase/Mediator systems - catalytic or stoichiometric procedures. *Journal of Molecular Catalysis* **863**, 1-10 (2003).

17 - APHA AWWA., Standard Methods for Examination of Water and Wastewater 5550, 17th edition. American Public Health Association, New York, pp. 5.58-5.69 (1989).

18- Chen, C., Gratzl J and Kirkman A., Oxidation of Organic Compounds by Laccase-Mediator System – Reactions, Mechanism, and Applications. Fifth brazilian symposium on the chemistry of lignins and other wood components. 547 pp. (1999).

19 - Moraes, S.G., Peralta-Zamora, P., Espósito, E. e Duran, N. (1997). Enzimas oxidativas aplicadas a bioremediação. Em Anais da I Reunião Nacional de Microbiologia Aplicada ao Meio Ambiente, Campinas-SP, Agosto (29-31), pg. 183-187.

20- Lindstrom, Seppa P.;Oikari A(1989) Biotransformation and other physiological responses in whitefish caged in a lake receiving pulp and paper mill effluents. *Ecotoxicol Environ Saf* **18**: 191-203.

21- Leisola , S.A and Fiechter, A (1985) New-Trends in Lignin Biodegradation in "Advances in Biotechnological Processes 5, pag. 59-89 Alan R. Liss, Inc.

22- Tien,M. and Kirk, T K. (1984) Lignin-degrading enzyme from *Phanerochaete chrysosporium*: Purification, characterization and catalytic properties of the unique H₂ O₂ – requiring oxygenase. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **81** :2280-2284.

23- Tan, L.U.L.;Mayers, P. and Saddler, J.N.(1987) Purification and characterization of thermostable xylanase from a thermophilic fungus *Thermoascus aurantiacus*. *Can. J. Microbiol.* **33** : 689-694.

24- Trotter, P. (1990) Biotechnology in the pulp and paper industry : a review *Tappi J.* **198** – 204.

- 25- Eriksson, K.E.L.(1990) Biotechnology in the pulp and paper industry wood Sci Technol. 24 : 79- 101.
- 26- Fiechter, A (1993) Function and synthesis of enzymes involved in Lignin degradation. J. Biotechnol. 30: 49-55.
- 27- Hatakka, A (1984) Lignin-modifying enzymes from selected white-rot fungi: production and role in lignin degradation FEMS Microbiol Rev 13 : 125-135.
- 28- Bradford, M.M.(1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding Anal. Biochem. 72 : 248-254.
- 29- Kirk, T.K and Farrell, R.L. (1987) Enzymatic "combustion " : the microbial degradation Annu. Ver. Microbiol. 41 : 465-505.
- 30- Kuwahara, M.; Glenn, J.K.; Morgan , M.^a and Gold, M. (1984) Separation and characterization of two extracellular H₂O₂- dependent oxidase from ligninolytic culture of Phanerochaete chrysosporium. FEBS Lett. 169 (2) : 247-249.
- 31- Krinstad, K.P.;Lindstron, K. (1984) Spent liquors from pulp bleaching Environ. Sci. Technol. 18(8) : 236 A -284^a A .
- 32- Al-Kassin, L., Taylor, V.E., Nicell, J. A ., Bewtra, J.R. & Biswa, N. (1994). J. Chem. Tech. Biotechnol. 61, 179-182.
- 33- Barr, D.P.& Aust, S.D (1994^a). Environ. Sci.Technol.; 28, 78-87.
- 34- Barr, D.P & Aust, S.D. (1994b). Arch. Biochem.Biophys.312, 511-515.
- 35- Davis, S. & Burns, R.G.(1990). Aplied Microbiol. Biotechnol. 32, 721-726.
- 36- Dezotti, M., Innocentini-Mei, L.H. & Durán, N. (1995). J. Biotechnol. 43, 161-167.
- 37- Durán, N. (1996). Proc. 4th. Brazil . Symp. On Chem. Lignin and Other Wood Comp., (Recife, PE).
- 38- Durán, N., Dezotti, M. & Rodriguez, J (1991). J. Photochem. Photobiol. A . Chem. 62, 269-279.
- 39- Durán, N., Esposito, E. & Canhos, V.P.(1993). Em Cellulosic : Pulp, Fibre and Environmental Aspects (J.F. Kennedy, G.O. Phillips and P.A Williams, Eds.) Ellis Horwood Ser.73, 493-498.
- 40- Durán, N. & Machuca, A (1995). Holz als Roh-und Werstoff, 53, 346.
- 41- Esposito, E. (1992). Dissertação de Mestrado , Eng. Quim. UNICAMP.
- 42- Esposito, E. (1995). Dissertação de Doutorado, Eng. Quím. UNICAMP.

- 43- Esposito, E., Canhos, V.P. & Durán, N. (1991). *Biotechnol. Lett.* 13, 571-576.
- 44- Esposito, E. & Innocentini-Mei, L.H. (1996). *Proc. Fourth Brazil. Symp. On the Chem. Lignins and Other Wood Comp.* (Recife, PE).
- 45- Esposito, E., Durán, N., Freer, J., Baeza, J. & Innocentini-Mei, L.H. (1993^a). *Proc. Intern. Chem. Engineering Conf.- CHEMPOR -93* (Porto, Portugal), 201-207.
- 46- Esposito, E., Speranza, M., Benar, P. & Gonçalves, A. R (1996). *Proc. Third Intern. Non-Wood Fibre Pulping and Papermaking Conference* (Beijin, China).
- 47- Esposito, E., Innocentini-Mei, L.H., Ferraz, A., Canhos, V.P. & Durán, N. (1993b) *J. Biotechnol.*, 29, 219-228.
- 48- Ferrer, I., Esposito, E. & Durán, N. (1992). *Enzyme Microb. Technol.* 14, 402-406.
- 49- Forrester, I.T., Grabski, A. C., Burgess, R.R & Leatham, G.F. (1998). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 157, 992-999.
- 50- Forrester, I.T, Grabski, A. C., Mishra, C., Kelly, B.D., Strickland, W.N., Leatham, G.F. & Burgess, R.R. (1990). *Appl. Microbial. Biotechnol.* 33, 359-363.

ANEXO I