



**Ana Paula Mora  
Tavares**

**Produção de lacase para potencial aplicação como  
oxidante na indústria papelreira**

tese apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutor em Engenharia Química, realizada sob a orientação científica da Dra. Ana Maria Barreto Rebelo Xavier, Professora Auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro e do Professor Dr. João Manuel da Costa Araújo Pereira Coutinho, Professor Associado do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Apoio financeiro da FCT e do FSE no  
âmbito do III Quadro Comunitário de  
Apoio

## **o júri**

### **presidente**

**Prof. Doutor Fernando Manuel Bico Marques**

professor catedrático do Departamento de Engenharia Cerâmica e Vidro da Universidade de Aveiro

**Prof. Doutor José Joaquim C. Cruz Pinto**

professor catedrático do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

**Prof<sup>a</sup>. Doutora Maria Ascensão Carvalho Fernandes de Miranda Reis**

professora associada do Departamento de Química da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa

**Prof. Doutor Dmitry Victorovich Evtugin**

professor associado do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

**Prof. Doutor João Manuel da Costa Pereira Coutinho**

professor associado do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

**Prof<sup>a</sup>. Doutora Maria Alice Zarur Coelho**

professora adjunta do Departamento Engenharia Bioquímica da Universidade Federal do Rio de Janeiro

**Prof<sup>a</sup>. Doutora Ana Maria Rebelo Barreto Xavier**

professora auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

## agradecimentos

À Professora Doutora Ana M.R.B. Xavier agradeço pela orientação de todo este trabalho, pelo seu apoio, pela sua confiança, pela convivência e pela amizade de todos estes anos.

Ao Professor Doutor João A.P. Coutinho agradeço pela orientação deste trabalho, pelo seu apoio, pela sua confiança.

À Professora Doutora Maria Alice Zarur Coelho agradeço pela orientação na realização da parte experimental de produção de lacase e de biopolímeros assim como a sua orientação na parte de modelação matemática dos resultados da optimização da produção da lacase e pela sua amizade.

Ao Professor Doutor Dmitry Evtuguin agradeço pela sua orientação durante o trabalho realizado com o branqueamento da pasta de papel, pela realização das análises de GPC.

Ao Doutor José Gamelas agradeço pelo seu apoio na parte experimental com a pasta de papel, pela realização das análises de voltametria cíclica, de RMN e de espectroscopia UV/Vis, além da sua amizade durante este trabalho.

Ao Doutor Armindo Gaspar agradeço pelo seu apoio na parte experimental com a pasta de papel.

À Professora Doutora Ana Barro-Timmons agradeço pela sua ajuda durante a realização do trabalho com os biopolímeros, pelas análises de ICP, termogravimétrica, de FTIR e análise elementar.

Ao Professor Doutor José A. Lopes da Silva agradeço pela sua ajuda durante a realização do trabalho com os biopolímeros, pela análise de reologia e de açúcares neutros.

Aos colegas e amigos de laboratório Margarida, Marta, Sofia, Daniel, Ana Sofia, Priscila, Alexandre, Juliana, Elisabete e Alzira pela amizade e pela ajuda durante a parte experimental desta tese.

À PORTUCEL, Cacia, Portugal agradeço pela disponibilização da pasta de papel utilizada neste trabalho.

À Universidade de Aveiro pelo apoio financeiro através da concessão da bolsa de Doutoramento concedida durante o primeiro ano de Doutoramento.

À Fundação para Ciência e Tecnologia (FCT) pelo apoio financeiro através da concessão da bolsa de Doutoramento e pelo apoio financeiro dos deslocamentos em congressos Internacionais.

Finalmente, desejo agradecer ao meu marido que sempre me apoiou durante a realização desta tese e aos meus pais e irmã que sempre me incentivaram na concretização deste trabalho.

## palavras-chave

lacase, *Trametes versicolor*, modelação matemática, planeamento de experiências, biobranqueamento da pasta kraft, polioxometalatos, exopolissacarídeo.

## resumo

A biocatálise enzimática apresenta um grande potencial para o branqueamento da pasta, como um tratamento alternativo ao convencional. Proporciona importantes benefícios ambientais além de introduzir propriedades únicas às fibras do papel. A chave para o sucesso na aplicação industrial está na identificação de novas enzimas e na pesquisa das condições específicas de trabalho.

Para este trabalho escolheu-se o fungo *Trametes versicolor* conhecido como fungo da podridão branca da madeira, que é capaz de produzir enzimas oxidativas, nomeadamente a enzima lacase. A primeira parte do trabalho envolveu a optimização da produção da lacase em matraz e em bioreactor e a modelação matemática dos resultados experimentais obtidos. Para a optimização da produção da lacase em matraz, diferentes indutores foram utilizados: cobre, 2.5-xilidina e uma mistura fenólica. Estudou-se também a situação de limitação de carbono. Para a fermentação em bioreactor fez-se um planeamento factorial de experiências que consistiu de dois níveis (máximo e mínimo) e três factores: concentração de glucose, agitação e controlo do pH do meio de cultura.

A segunda parte do trabalho envolveu a aplicação da lacase no branqueamento da pasta kraft para o fabrico de papel. Neste estudo, diferentes tipos de polioxometalatos (POMs) foram testados, juntamente com a lacase, como mediadores da deslenhificação da pasta kraft não branqueada. As condições do branqueamento estudadas foram a temperatura de reacção em um único estágio de branqueamento e o branqueamento em estágios alternados: Este tipo de branqueamento permitiu uma deslenhificação significativa da pasta de papel com uma redução no índice kappa de cerca de 50% para o POM  $\text{SiW}_{11}\text{Mn}^{\text{II}}(\text{H}_2\text{O})\text{O}_{39}^{5-}$ , após 5 estágios de branqueamento e, para o  $\text{SiW}_{11}\text{V}^{\text{V}}\text{O}_{40}^{5-}$  após três estágios de branqueamento. Os espectros de UV-Vis e de RMN mostraram que estes dois POMs se mantiveram estáveis durante o processo de branqueamento da pasta de papel.

Para além de produzir a lacase, o fungo *T. versicolor* também é conhecido como produtor de exopolissacarídeos (EPSs). A terceira parte deste trabalho constituiu na produção e optimização de um EPS. A optimização da produção do EPS foi feita através da selecção de cinco diferentes meios de cultura e do planeamento factorial de experiências  $2^2$  com ponto central com o meio seleccionado. As variáveis estudadas no planeamento foram a concentração inicial de glucose e o pH do meio de cultura. A concentração inicial de glucose foi o principal factor para a optimização da produção do EPS e para o crescimento celular.

Realizaram-se alguns estudos para conhecer a natureza do EPS que envolveram análise elementar, análise dos iões por ICP, análise estrutural por FTIR, determinação do peso molecular por GPC, análise termogravimétrica, análise dos açúcares neutros e dos ácidos hexourónicos.

**key words**

laccase, *Trametes versicolor*, mathematical modelling, factorial design, kraft pulp biobleaching, polyoxometalates, exopolysaccharide.

**abstract**

Enzymatic biocatalyst has a significant potential for improving pulp biobleaching as an alternative treatment to conventional. It allows for the development of environmentally benign processes and may introduce unique properties into the paper fibre. The challenge for the success on the industrial application is the identification of new enzymes and the development of specific and optimized working conditions.

On this work the fungus *Trametes versicolor*, known as white rot fungus, which produces oxidative enzymes namely laccase was used. The first part of the work addresses the optimization of laccase production in Erlenmeyer and bioreactor and the mathematical modelling of the experimental results. To optimise the laccase production in Erlenmeyer different inducers were tested: copper, 2,5-xylidine and a phenolic mixture. The situation of carbon limitation was also studied. For bioreactor fermentation a factorial design with two levels (maximum and minimum) and three factors: initial glucose concentration, agitation and medium pH was used.

The second part of the work involved the application of laccase on kraft pulp biobleaching. In this study different polyoxometalates (POMs) were tested, with laccase, as mediators on kraft pulp bleaching. The conditions of bleaching were reaction temperature of the single bleaching stage and the multi-stage bleaching. The alternative treatment in a multi-stage process allowed a sustainable eucalypt kraft pulp delignification with more than 50% of kappa number reduction to POM  $\text{SiW}_{11}\text{Mn}^{\text{III}}(\text{H}_2\text{O})\text{O}_{39}^{5-}$ , after five stages of bleaching, and to the POM  $\text{o-SiW}_{11}\text{V}^{\text{V}}\text{O}_{40}^{5-}$  after three stages of bleaching. The UV/VIS spectrum and RMN showed that these two POMs maintain stable during the biobleaching process of pulp paper.

In addition to the production of laccase the fungus *T. versicolor* is also known as exopolysaccharides (EPSs) producer. The third part of this work deals with the optimization of the EPS production. This was optimized by a selection of five culture media and by a  $2^2$  factorial design with a central point of selected medium. The factors of factorial design were initial glucose concentration and initial media pH. The initial glucose concentration was found to be the most important factor in EPS production and also in cell growth.

Some studies were carried in order to characterize the EPS using elementary analysis, ions analysis by ICP, structural analysis by FTIR, analysis of molecular weight by GPC, thermal gravimetric analysis, neutral sugars and hexouronic acids.

## Índice Geral

<b>Introdução</b> .....	xx
<b>Capítulo 1 - Revisão bibliográfica</b> .....	1
1.1 A indústria de pasta de papel.....	1
1.1.1 Composição da madeira.....	3
1.1.1.1 Celulose.....	4
1.1.1.2 Hemiceluloses .....	5
1.1.1.3 Lenhina .....	6
1.1.2 O processo de fabricação da pasta de papel.....	11
1.1.3 Branqueamento da pasta kraft.....	12
1.1.3.1 O papel da lacase no branqueamento da pasta.....	14
1.1.3.2 Uso de mediadores .....	15
1.1.3.2.1 Os polioxometalatos.....	18
1.2 A natureza dos fungos.....	22
1.2.1 Fungos da podridão branca da madeira.....	24
1.2.2 O sistema lenhicolítico dos fungos da podridão branca da madeira.....	24
1.2.3 O fungo <i>Trametes versicolor</i> .....	26
1.3 Enzimas lenhicolíticas.....	27
1.3.1 Lenhina Peroxidase (LiP) .....	28
1.3.2 Manganês Peroxidades (MnP) .....	29
1.3.3 Lacases .....	29
1.3.3.1 Caracterização estrutural da lacase.....	29
1.3.3.2 Mecanismos de catálise da lacase.....	31
1.3.3.3 Aplicações da lacase.....	32
1.3.3.4 Produção da lacase.....	33
1.3.4 Produção industrial de enzimas.....	36
1.4 Polissacarídeos produzidos por fungos.....	37
1.4.1 Polissacarídeos.....	38
1.4.2 Produção de Exopolissacarídeos.....	42
1.4.2.1 Processo de recuperação de exopolissacarídeos	

de origem microbiana .....	44
1.4.3 Compostos comercializados.....	46
1.5 Planeamento de experiências e modelação matemática.....	48
1.5.1 Planeamento factorial a dois níveis .....	48
1.5.1.1 Cálculo dos principais efeitos e interacções.....	49
1.5.1.2 Metodologia de superfície de resposta.....	50
1.5.2 Modelação matemática.....	51
1.5.2.1 Cinética de crescimento microbiano.....	52
1.5.2.2 Modelos para a formação do produto – A taxa específica de produção.....	55
<b>Capítulo 2 - Materiais e Métodos.....</b>	<b>57</b>
2.1 Microorganismo e condições de manutenção.....	57
2.2 Preparação do inóculo para culturas líquidas.....	58
2.3 Fermentações com <i>Trametes versicolor</i> para a produção enzimática... 59	
2.3.1 Meio de produção enzimática.....	59
2.3.2 Fermentações em matraz.....	60
2.3.2.1 Estudo do efeito da concentração inicial de glucose.....	60
2.3.2.2 Estudo do efeito da adição de cobre.....	60
2.3.2.3 Fermentações com diferentes indutores.....	60
2.3.2.4 Fermentações com limitação por carbono .....	61
2.3.2.5 Testes de estabilidade da lacase.....	61
2.3.3 Fermentações em Bioreactor.....	63
2.3.3.1 Planeamento factorial a dois níveis.....	64
2.3.3.2 Modelação matemática da produção de lacase em bioreactor.....	66
2.3.4 Métodos analíticos.....	69
2.3.4.1 Determinação do consumo de substrato pelo método DNS.....	69
2.3.4.2 Determinação da actividade de lacase.....	69
2.3.4.3 Determinação da actividade de manganês	





2.5.5.4	Determinação do peso molecular.....	84
2.5.5.5	Determinação dos ácidos urónicos.....	84
2.5.5.6	Análise elementar do EPS.....	85
<b>Capítulo 3</b>	<b>- Resultados e discussão.....</b>	<b>86</b>
3.1	Produção de lacase em matraz.....	86
3.1.1	Efeito da concentração inicial de glucose.....	86
3.1.2	Efeito da adição de cobre.....	90
3.1.3	Produção de lacase com diferentes indutores.....	92
3.1.4	Efeito da limitação por carbono com diferentes indutores.....	95
3.2	Produção de lacase em fermentador.....	98
3.2.1	Optimização da produção da lacase por planeamento de experiências.....	98
3.2.2	Modelação matemática da produção de lacase em bioreactor.....	106
3.3	Aplicação da lacase para o bi branqueamento da pasta de papel.....	112
3.3.1	Comparação dos mediadores da lacase para o branqueamento da pasta.....	112
3.3.1.1	Ensaios de bi branqueamento da pasta.....	112
3.3.1.2	Estudo de oxidação dos POMs pela lacase.....	119
3.3.2	Branqueamento da pasta kraft com $\text{SiW}_{11}\text{Mn}^{\text{III}}$ e lacase $\text{SiW}_{11}\text{V}^{\text{V}}$ e lacase num sistema de multi-estágios .....	123
3.4	Produção de exopolissacarídeo (EPS) por <i>Trametes versicolor</i> .....	129
3.4.1	Seleção do meio de produção do EPS.....	129
3.4.2	Optimização do meio de cultura YM para a produção de EPS.....	132
3.4.3	Análises do EPS.....	138
3.4.3.1	Análise dos açúcares neutros.....	138
3.4.3.2	Análise Termogravimétrica.....	139
3.4.3.3	Análise de cromatografia de permeação em gel (GPC) .....	140
3.4.3.4	Análise reológica do meio de cultura.....	141

3.4.3.5 Análise do EPS produzido no meio YM por Espectrometria no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) .....	145
3.4.3.6 Análise do EPS por Espectrometria de Emissão de Plasma Induzido (ICP) e por Análise elementar..	145
<b>Capítulo 4 – Conclusões.....</b>	<b>147</b>
<b>Bibliografia.....</b>	<b>151</b>
<b>Anexos.....</b>	<b>164</b>
<b>Lista de publicações.....</b>	<b>168</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS

ABTS	Ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotriazolina-6-sulfónico)
ANOVA	Análise de variância
BSA	albumina de soro bovino
CBQ	celobiose:quinona oxidoreductase
CDH	celobiose dehidrogenase
CED	cupri – etilenodiamina
DMCA	N,N-dimetilacetamida
DNS	ácido 3,5-dinitrosalicílico
E	potencial redox efectivo
$E_{pc}$	potencial de pico catódico
$E_{pa}$	potencial de pico anódico
ENH	eléctrodo normal de hidrogénio
EPR	ressonância paramagnética electrónica
EPS	exopolissacarídeo
FE	fibrilas elementares
FTIR	espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier
GIOx	glioxalacto oxidase
GPC	cromatografia de permeação em gel
GPY	meio de glucose, peptona e extracto de levedura
IPA	isopolianiões
HBT	1-hidroxilbenzotriazol
HPA	heteropolianiões
$K$	constante de decaimento exponencial
$K_s$	constante de saturação
$K_1$	taxa de síntese da lacase
$K_2$	taxa de decaimento da lacase

L	razão entre a taxa específica de crescimento no início da fase de desaceleração e a taxa específica de crescimento na fase exponencial (factor de sobrevivência)
LiP	lenhina peroxidase
MCM	meio completo para fungos
MDT	meio definido para <i>Trametes</i>
MF	mistura fenólica
MnP	manganês peroxidase
MSR	metodologia de superfícies de resposta
P	produto
POM	polioxometalato
RMN	ressonância magnética nuclear
s	segundo
S	substrato
SLM	sistema lacase-mediador
t	tempo
TaK	meio Tien <i>and</i> Kirk
TEMPO	N-oxil-2,2,6,6-tetrametilpiperidina
UV/VIS	espectrofotómetro de ultravioleta/visível
VAO	álcool veratrílico oxidase
X	biomassa
YM	meio extracto de levedura e extracto de malte
$\alpha$	constante associada ao crescimento da biomassa
$\beta$	constante não associada ao crescimento da biomassa
$\mu$	taxa específica de crescimento
$\varepsilon$	coeficiente de extinção molar
v	velocidade de varrimento
$\lambda$	comprimento de onda

## ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1.1 - Estrutura de alguns mediadores orgânicos da lacase.....	16
Tabela 1.2 – Formas diferencial e integrada de várias equações de crescimento <sup>a</sup> .....	53
Tabela 2.1 – Composição do meio de cultura Tien & Kirk.....	58
Tabela 2.2 – Composição do meio de cultura MDT.....	59
Tabela 2.3 – Condições de cultura para a produção de lacase por <i>Trametes versicolor</i> em Erlenmeyer.....	62
Tabela 2.4 - Factores e níveis estudados no planeamento factorial 2 <sup>3</sup> .....	65
Tabela 2.5 – Matriz do planeamento de experiências 2 <sup>3</sup> .....	66
Tabela 2.6 - Mediadores utilizados no branqueamento da pasta kraft.....	73
Tabela 2.7 – Cor e comprimento de onda do estado reduzido e do estado oxidado dos POMs .....	78
Tabela 2.8 – Composição dos meios de cultura usados na produção do EPS .....	80
Tabela 2.9 - Factores e níveis estudados no planeamento factorial 2 <sup>2</sup> com ponto central.....	81
Tabela 2.10 – Matriz do primeiro planeamento de experiências 2 <sup>2</sup> com ponto central.....	81
Tabela 2.11 – Matriz do segundo planeamento de experiências 2 <sup>2</sup> com ponto central .....	82
Tabela 3.1- Produtividade de lacase e aumento da produtividade de lacase para os indutores cobre, xilidina e mistura fenólica em condições de limitação por carbono e sem limitação por carbono.....	97
Tabela 3.2 – Planeamento de experiências 2 <sup>3</sup> e repostas da produção da lacase por <i>Trametes versicolor</i> .....	99
Tabela 3.3 – Efeitos estimados e teste ANOVA para a produção de lacase por <i>Trametes versicolor</i> através do planeamento de experiências 2 <sup>3</sup> .....	100
Tabela 3.4 – Parâmetros cinéticos da fermentação de <i>Trametes</i>	

<i>versicolor</i> em matraz.....	107
Tabela 3.5 – Parâmetros para a produção de lacase em bioreactor por <i>Trametes versicolor</i> .....	112
Tabela 3.6 – Branqueamento da pasta kraft catalisado por lacase (L) na presença de diferentes mediadores a 45°C.....	114
Tabela 3.7 – Branqueamento da pasta kraft catalisado por lacase (L) na presença de diferentes mediadores a 60 °C.....	116
Tabela 3.8 – Oxidação dos polioxometalatos pela lacase.....	121
Tabela 3.9 – Branqueamento da pasta kraft em estágios sequenciais catalisado por SiW <sub>11</sub> Mn <sup>III</sup> e lacase .....	124
Tabela 3.10 - Branqueamento da pasta kraft em estágios sequenciais catalisado por SiW <sub>11</sub> V <sup>V</sup> e lacase.....	127
Tabela 3.11 - Resultados do cultivo de <i>Trametes versicolor</i> nos meios de cultura TaK, MCM e YM.....	130
Tabela 3.12 – Planeamento de experiências 2 <sup>2</sup> e repostas da produção de EPS por <i>Trametes versicolor</i> .....	135
Tabela 3.13 - Resultados para o segundo planeamento de experiências 2 <sup>2</sup> e repostas da produção de EPS por <i>Trametes versicolor</i> .....	135
Tabela 3.14 - Efeitos individuais calculados e ANOVA para o planeamento de experiências 2 <sup>2</sup> .....	137
Tabela 3.15 - Açúcares neutros presentes no EPS produzido por <i>Trametes versicolor</i> nos meios YM, MCM e TaK.....	139
Tabela 3.16 - Ácidos hexourónicos presentes no EPS produzido por <i>Trametes versicolor</i> nos meios YM, MCM e TaK.....	139
Tabela 3.17 – Teor em iões e análise elementar do EPS produzido por <i>Trametes versicolor</i> nos meios YM, MCM e TaK.....	146

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1 – Representação da cadeia principal da estrutura de celulose (Higuchi, 1993). .....	4
Figura 1.2 – Diagrama estrutural da celulose mostrando as ligações $\beta$ -(1,4) dos resíduos de D-glucose e as ligações de hidrogénio inter e intra molecular (a) e representação das microfibrilas da celulose (b) (Adaptado de Voet & Voet, 1990).....	5
Figura 1.3 – Álcoois percursores da lenhina (Adaptado de Biermann, 1996).....	7
Figura 1.4- Estrutura de uma lenhina resinosa (Sipilä <i>et al.</i> , 2005).....	8
Figura 1.5 - Principais subestruturas na lenhina; $\beta$ -O-4' (a); $\beta$ -O-4' degradada (b); $\alpha$ -O-4' acíclica (c); $\beta$ -5' cíclica e $\alpha$ -O-4' (d); $\alpha$ -2'/6' e $\beta$ -2'6' (e); 5,5' (f); 4-O-5'(g); $\beta$ -1' (h); $\beta$ - $\beta$ ' (i); éster $\alpha$ -HC-hidroxicinamato de arilglicerilo (com ligação $\alpha$ -4) (j); éster $\gamma$ -HC-hidroxicinamato de arilglicerilo (com ligação $\gamma$ -4) (k) (Sjöström, 1981). .....	10
Figura 1.6 - Representação esquemática da degradação da lenhina por lacase num sistema com mediador (Adaptado de Bourbonnais <i>et al.</i> , 1998). .....	17
Figura 1.7– Representação bola-bastão e poliedro da unidade fundamental de $MO_6$ (Fernandez, 2003). .....	19
Figura 1.8 – Modelos poliédricos representam as três possíveis uniões entre duas unidades octaédricas $MO_6$ . A) união de vértice, B) união de aresta e C) união de face (Fernandez, 2003).....	19
Figura 1.9 - Representação poliédrica da estrutura do anião de Keggin. O centro externo $M_{12}O_{40}$ encapsula a unidade interna, representada pelo tetraedro $XO_4^{n-}$ (Jeannin, 1998).....	20
Figura 1.10 - Ciclos redox do POM na reacção catalítica da oxidação da lenhina (Balakshin <i>et al.</i> , 2001).....	21
Figura 1.11 – Ciclos redox no sistema catalítico de oxidação da lenhina com POM-lacase- $O_2$ (Balakshin <i>et al.</i> , 2001).....	22
Figura 1.12 - Esquema da função desempenhada pelas enzimas degradadoras	

de materiais lenhinoceulósicos dos basidiomicetos (Adaptado de Rajarathnam <i>et al.</i> , 1992). .....	25
Figura 1.13 – O fungo <i>Trametes versicolor</i> na forma de “cauda de peru” .....	26
Figura 1.14 - Diagrama de da estrutura da lacase de <i>Trametes versicolor</i> . Os três domínios (T1, T2 e T3) estão mostrados a cores diferentes. Os átomos de cobre são as esferas azuis e a porção de hidrato de carbono são os modelos em bola-e-bastão. A parte cinzenta é o N-terminal e a verde o C-terminal. O sítio T1 é a esfera isolada. (Piontek <i>et al.</i> , 2002).....	30
Figura 1.15 – Esquema de reacção da lacase com um substrato (Adaptado de Call & Muck, 1997). .....	31
Figura 1.16 – Uma reacção típica da lacase com um difenol  (Adapado de Thurston, 1994). .....	32
Figura 1.17 – Representação de alguns monómeros de polissacarídeos.....	39
Figura 1.18- Representação dos monómeros de $\alpha$ e de $\beta$ D- glucose.....	39
Figura 1.19 – Diagrama molecular de um D-glucano de origem fúngica. Representação das ligações glicosídicas (1→4) com ramificações (1→6). .....	39
Figura 1.20 - Conformação de tripla hélice da cadeia de $\beta$ -(1→3)-D-glucanos.....	41
Figura 1.21 – Opções de recuperação e purificação de polissacariéis de <i>Trametes versicolor</i> (Adaptado de Cui & Chisti, 2003).....	45
Figura 1.22 – PSP comercializado pela <i>JHS Natural Products</i> .....	47
Figura 1.23 - VPS comercializado pela <i>JHS Natural Products</i> .....	47
Figura 1.24 – Vários perfis cinéticos de crescimento: (A) exponencial; (B) logístico; (C) linear; (D) rápida-aceleração/lenta-desaceleração (Adaptado de Mitchell <i>et al.</i> , 2004).....	53
Figura 2.1 – <i>Trametes versicolor</i> após 7 dias de crescimento em placa de Petri...	57
Figura 2.2- Bioreactor usado na produção da lacase por <i>Trametes versicolor</i> .....	64
Figura 2.3 - Reactor e controlador de temperatura e de agitação usado no branqueamento da pasta kraft de papel. ....	74
Figura 2.4 - Condições do branqueamento da pasta kraft com os POMs $\text{SiW}_{11}\text{Mn}^{\text{III}}$	



e SiW <sub>11</sub> V <sup>V</sup> através do sistema de multi-estágios.....	75
Figura 2.5 - EPS obtido após precipitação por etanol, lavado e liofilizado.....	83
Figura 3.1 - Actividade de lacase produzida por <i>Trametes versicolor</i> em diferentes concentrações iniciais de glucose. ....	87
Figura 3.2 - Consumo de glucose do meio de cultura durante a produção de lacase por <i>Trametes versicolor</i> em diferentes concentrações iniciais de glucose.....	87
Figura 3.3 - Evolução da proteína total do meio de cultura durante a produção de lacase por <i>Trametes versicolor</i> em diferentes concentrações iniciais de glucose. ....	88
Figura 3.4 – Evolução do pH do meio de cultura durante a produção de lacase por <i>Trametes versicolor</i> em diferentes concentrações iniciais de glucose.....	89
Figura 3.5 – Biomassa final de <i>Trametes versicolor</i> , máxima actividade de lacase e pH do meio para diferentes concentrações iniciais de glucose.....	90
Figura 3.6 - Efeito da adição de cobre ao primeiro dia na produção da lacase por <i>Trametes versicolor</i> .....	92
Figura 3.7 – Efeito da adição de cobre ao terceiro dia na produção da lacase por <i>Trametes versicolor</i> .....	92
Figura 3.8 – (a) Produção de lacase por <i>Trametes versicolor</i> na presença de cobre, xilidia (xil) e mistura fenólica (MF). (b) amplificação da Figura 3.7 (a).....	94
Figura 3.9 - pH do meio de cultura (a) e consumo de glucose (b) durante a produção de lacase por <i>Trametes versicolor</i> com diferentes indutores. ....	95
Figura 3.10 – Produção de lacase por <i>Trametes versicolor</i> na presença de cobre e xilidia (xil) e de cobre, xilidia (xil) e mistura fenólica (MF) com e sem limitação por carbono (LM).....	96
Figura 3.11 - Diagrama de Pareto para o planeamento factorial 2 <sup>3</sup> .....	101
Figura 3.12- Correlação entre os valores observados e os valores previstos da produção da lacase.....	101

Figura 3.13 – Superfícies de resposta para o planeamento de experiências 2 <sup>3</sup> .....	103
Figura 3.14 - Consumo de glucose e pH do meio durante a produção de lacase por <i>Trametes versicolor</i> para uma concentração inicial de glucose de 9 g/L e sem controlo de pH. ....	104
Figura 3.15 - Dados experimentais e modelados para o cultivo de <i>Trametes versicolor</i> em matraz com o meio com carbono. (X) biomassa; (S) glucose. ....	109
Figura 3.16 - Dados experimentais e modelados para o cultivo de <i>Trametes versicolor</i> em matraz com o meio com limitação por carbono. (X) biomassa; (S) glucose.....	109
Figura 3.17 - Dados experimentais e modelados para a produção de lacase em bioreactor por <i>Trametes versicolor</i> em diferentes condições de fermentação: F1, F2, F5 e F6 (meios com limitação por carbono). Os dados experimentais estão representados por símbolos e os modelados por linhas.....	110
Figura 3.18 - Dados experimentais e modelados para a produção de lacase em bioreactor por <i>Trametes versicolor</i> em diferentes condições de fermentação: F3, F4, F7 e F8 (meios com carbono). Os dados experimentais estão representados por símbolos e os modelados por linhas.....	110
Figura 3.19 – Dados experimentais e modelados para o consumo de glucose e dados modelados para o crescimento da biomassa em bioreactor por <i>Trametes versicolor</i> em diferentes condições de fermentação: F3, F4, F7 e F8 (meios com glucose). Os dados experimentais estão representados por símbolos e os modelados por linhas. ....	111
Figura 3.20 – Variação da viscosidade intrínseca e do índice kappa para o sistema de branqueamento da pasta de papel a 45°C com diferentes mediadores. ....	114
Figura 3.21 – Variação da viscosidade intrínseca e do índice kappa para o sistema de branqueamento da pasta de papel a 60°C com diferentes mediadores. ....	116

Figura 3.22 – Espectros de UV-Vis da solução de $\text{SiW}_{11}\text{Mn}^{\text{III}}$ antes do branqueamento (controlo), ao final do branqueamento a 45°C com lacase e a 60°C com ou sem lacase: (a) controlo; (b) $\text{L}+\text{SiW}_{11}\text{Mn}^{\text{III}}$ 45°C; (c) $\text{L}+\text{SiW}_{11}\text{Mn}^{\text{III}}$ 60°C; (d) $\text{SiW}_{11}\text{Mn}^{\text{III}}$ 60°C. ....	117
Figura 3.23 – Percentual de $\text{SiW}_{11}\text{Mn}^{\text{III}}$ , $\text{SiW}_{11}\text{V}^{\text{V}}$ e $\text{PW}_{11}\text{Mn}^{\text{III}}$ no estado oxidado ao final da reacção para as diferentes condições de branqueamento. ....	118
Figura 3.24 – Espectro UV-Vis para as soluções aquosas (3.0 mmol/L) de $\text{SiW}_{11}\text{Mn}^{\text{II}}$ ( <b>A</b> ) e $\text{SiW}_{11}\text{V}^{\text{IV}}$ ( <b>B</b> ) a pH=4.5 e com adição de lacase (380 U/L) a temperatura ambiente e pressão atmosférica (a). <b>A</b> : 4h (b); 8 h (c); 24 h (d); 50 h (e); <b>B</b> : 15 min. (b); 30 min. (c); 60 min. (d); 120 min. (e).....	119
Figura 3.25 – Espectro de $^{51}\text{V}$ RMN da solução original de $\text{SiW}_{11}\text{V}^{\text{V}}$ (a) da solução obtida após a reacção do $\text{SiW}_{11}\text{V}^{\text{IV}}$ (3.0mmol/l) com a lacase (b).....	120
Figura 3.26 – Voltametria cíclica ( $v=10$ mV/s) dos POMs $\text{SiW}_{11}\text{V}^{\text{IV}}$ (a) e $\text{SiW}_{11}\text{Mn}^{\text{II}}$ (b) ([POM]=1.0 mmol/l, pH=4.5, 25°C).....	123
Figura 3.27 – Espectros de UV-VIS da solução de $\text{SiW}_{11}\text{Mn}^{\text{III}}$ antes do branqueamento (a); depois de um estágio de branqueamento POM (b); depois de dois estágios de branqueamento POM-L (c) seguido de uma semana de armazenamento do efluente (d); depois de cinco estágios de branqueamento POM-L-POM-L-POM (e).....	126
Figura 3.28 – Espectros de UV-Vis da solução de $\text{SiW}_{11}\text{V}^{\text{V}}$ antes do branqueamento (a), depois de um estágio POM de branqueamento (b), depois de dois estágios POM-L (45°C) de branqueamento (c), depois de dois estágios POM-L (60°C) de branqueamento (d), e depois de três estágios POM-L(60°C)-POM de branqueamento (e).....	127
Figura 3.29 – Espectro de $^{51}\text{V}$ RMN da solução obtida após dois estágios	

de branqueamento: SiW <sub>11</sub> V-L (60°C).....	128
Figura 3.30 – Crescimento da biomassa (a), consumo de açúcares redutores (b), produção de EPS (c) durante a fermentação de <i>Trametes versicolor</i> nos meios TaK, MCM e YM.....	131
Figura 3.31 – Crescimento da biomassa (a), consumo de açúcares redutores (b) e produção de EPS (c) durante o cultivo de <i>Trametes versicolor</i> em diferentes concentrações (g/L) de glucose (G) e valores de pH.....	133
Figura 3.32 – Superfície de resposta para o planejamento de experiências 2 <sup>2</sup> .....	134
Figura 3.33 – Superfície de resposta para a produção do EPS do segundo planeamento de experiências 2 <sup>2</sup> com ponto central.....	138
Figura 3.34 – Análise termogravimétrica do EPS produzido nos meios YM, MCM e TaK. ....	140
Figura 3.35 – Análise de cromatografia de permeação em gel (GPC) do EPS produzido nos meios YM, MCM e TaK.....	141
Figura 3.36 – Viscosidade aparente dos meios de culturas YM (a), MCM (b) e TaK (c) durante a produção de EPS por <i>Trametes versicolor</i> . ....	143
Figura 3.37 – Viscosidade aparente dos meios de cultura TaK, MCM e YM durante a produção do EPS por <i>Trametes versicolor</i> .....	144
Figura 3.38 - Concentração do EPS em relação à viscosidade aparente do meio de cultura. ....	144
Figura 3.39 - Espectro de absorção na região do Infravermelho do EPS produzido por <i>Trametes versicolor</i> no meio YM.....	145

## INTRODUÇÃO

A indústria da pasta e do papel tem sofrido uma grande pressão no sentido do desenvolvimento de novas tecnologias ambientalmente aceites e de poupança de energia. Décadas de investigação na biodegradação de polímeros lenhinoceulósicos, no avanço das ciências biológicas e nos estudos dos mecanismos das reacções enzimáticas, têm conduzido ao sucesso da aplicação da biotecnologia no processamento das fibras de papel. Hoje em dia, a biotecnologia pode oferecer à indústria da pasta e do papel grandes vantagens que podem aumentar a eficiência dos processos já existentes, na manufactura da pasta e do papel e aprimorar a qualidade do produto através de tecnologias ecológicas à base de microorganismos e enzimas.

Devido à sua elevada especificidade, baixos custos de investimento e à sua origem natural, as enzimas produzidas pelos fungos da podridão branca da madeira (entre eles o do género *Trametes*) têm-se tornado uma potente ferramenta de pesquisa na caracterização de fibras. Estas enzimas são biocatalisadores competitivos que podem reduzir ou substituir o uso de compostos químicos agressivos, que tornam esta indústria poluente em muitas operações do fabrico da pasta e do papel. Deste modo, estas enzimas constituem uma alternativa ecológica potencial ao branqueamento químico da pasta de papel.

Aplicações de enzimas em grande escala, com um custo efectivo, podem ser possíveis através do aumento da capacidade da produção das enzimas em grandes quantidades. A aceitação destas tecnologias tem vindo a crescer com o conhecimento da microbiologia, enzimologia, biologia molecular e com o aumento da experiência industrial. Na indústria papeleira já há um número de aplicações biotecnológicas implementadas, nomeadamente o biobranqueamento com enzimas hidrolíticas ou oxidativas (xilanase), aumentos de controlo dos *pitches* com a lipase.

O cultivo de fungos do género *Trametes* também tem atraído um considerável interesse comercial devido ao grande potencial na área terapêutica. Sabe-se que na antiguidade muitos povos já utilizavam fungos com finalidade medicinal e as suas aplicações são mantidas até hoje na medicina popular, principalmente nos países orientais. Actualmente, a existência de substâncias terapêuticamente activas de fungos do género *Trametes* tem sido comprovada, com efeitos como actividades antiinflamatória, antiviral, antimicrobiana, antitumoral, entre outras. Dentre estas, a actividade antitumoral tem-se

mostrado a mais interessante dado o número crescente de pesquisas envolvendo este tema e a busca incessante do combate ao cancro. Uma das possibilidades de obtenção de substâncias com potencialidades terapêuticas, é a partir da produção destes fungos em cultura submersa. Neste tipo de processo, os fungos produzem um polissacarídeo extracelular, ou exopolissacarídeo que devido às possibilidades de aplicação na indústria farmacêutica, tem vindo a despertar grande interesse na sua produção.

Este trabalho teve como objectivo geral estudar o fungo da podridão branca da madeira, *Trametes (Coriolus) versicolor* nos processos de degradação da lenhina, na produção de enzimas lenhinolíticas e na produção de um exopolissacarídeo. Os objectivos específicos foram: i) otimizar a produção da enzima lacase por *Trametes versicolor* em matraz através da adição de diferentes indutores (Cu, xilidina e mistura fenólica) e do emprego da limitação por carbono no meio de cultura; ii) Determinar os efeitos da concentração inicial de glucose, pH inicial do meio de cultura e agitação na produção de lacase po *Trametes versicolor* em bioreator, através do planeamento de experiências 2<sup>3</sup>; iii) Aplicação da lacase juntamente com diferentes mediadores no branqueamento da pasta kraft de papel; iv) Optimizar a produção do exopolissacarído por *Trametes versicolor* através da seleção de diferentes meios de cultura e posterior optimização do meio de cultura seleccionando.

## Capítulo 1 - Revisão bibliográfica

### 1.1 A indústria de pasta de papel

A indústria da pasta e do papel compreende uma grande e crescente porção da economia mundial. A produção de pasta e de papel tem aumentado globalmente e irá continuar a aumentar num futuro próximo, comprovado pelo aumento contínuo da produção e do consumo de pasta e papel nas últimas décadas. Trata-se de uma indústria de capital intensivo que acompanha de perto os desenvolvimentos tecnológicos, procurando responder às exigências dos consumidores, nomeadamente através do cumprimento de critérios ambientais.

A actividade principal desta indústria tem que ver com as várias etapas do processo produtivo do papel iniciando-se na produção de madeira (a indústria papelreira portuguesa é responsável pela gestão directa de cerca de 200.000 ha de floresta), a sua exploração e transformação em pasta para papel, e a transformação de pasta em diferentes tipos de papeis. Duas visões opostas se confrontam quanto ao futuro da indústria do papel. Os defensores das novas tecnologias de informação e comunicação prevêm o declínio da utilização do papel, enquanto a indústria do papel contrapõe com a experiência do passado, afirmando que a procura de papel continuará a crescer a nível mundial, induzida em parte pelas novas aplicações decorrentes do desenvolvimento da electrónica e das telecomunicações (Gouveia, 2005).

Entre 1980 e 1997 a média anual de crescimento da produção de papel e cartão na Europa foi de 3,3%, acompanhando o progresso económico. Estima-se que a procura de papel, na Europa Ocidental, cresça a uma taxa estável de 2% ao ano até 2010. Em 1998, da produção de papel na U.E., 52% refere-se a papel de uso gráfico, 38% a papel de embalagem e os restantes 10% são papéis para usos sanitários e outras espécies (Gouveia, 2005).

Os maiores países produtores mundiais de pasta para papel localizam-se na América do Norte (E.U.A. e Canadá), na Ásia (República Popular da China e Japão) e na

Europa. Os principais países produtores de pasta para papel de zonas económicas emergentes são o Brasil (7ª posição mundial) e a Indonésia (9ª posição mundial). Portugal ocupa a 16ª posição (Melo & Gouveia, 2005).

A população global utilizou aproximadamente 300 milhões de toneladas de papel em 1996 (Akhtar *et al.* 1997), e as estimativas mostram que este número está a aumentar gradualmente com o passar dos anos e que poderá chegar a 420 milhões de toneladas/ano no ano de 2010, o que corresponde a uma taxa de crescimento de 2.4% ao ano (MBendi, 2005).

Em Portugal, a indústria papelreira é um sector estratégico para a economia nacional, e tem apresentado um desempenho particularmente positivo ao longo dos últimos 20 anos. A produção de pasta ocupa a 6ª posição e a produção de papel a 12ª, em termos da U.E., registando-se, entre 1992 e 1998, um crescimento médio anual de 1,2% e 2,9%, respectivamente. Trata-se de uma indústria que exporta o grosso da sua produção para os países da U.E., com predominância das pastas branqueadas de eucalipto ao sulfato, de grande qualidade. No ano de 2000 a produção total de pasta para papel foi de 1 774 mil toneladas (Gouveia, 2005) e em 2004 de 1 949 mil toneladas (CELPA, 2005).

A crescente consciência ambiental e a exigência de qualidade e segurança ao nível dos produtos de origem florestal foram, numa fase inicial, os factores que levaram o sector a actuar de uma forma ecologicamente responsável. Como em outras indústrias de grande escala, a indústria papelreira exerce o seu próprio impacto no meio ambiente. Embora a situação esteja a melhorar de ano para ano, as fábricas de pasta e de papel ainda libertam compostos de enxofre no ar e descargas de efluentes que aumentam a eutrofização e que têm efeitos tóxicos no biota em seu redor. Compostos organoclorados são formados durante o branqueamento químico da pasta, e têm atraído muita atenção das indústrias e dos investigadores.

Durante as últimas décadas, vários estudos têm sido desenvolvidos na área do branqueamento do papel, de modo a desenvolver novas tecnologias sustentáveis para minimizar a poluição ambiental, aumentar a qualidade da pasta e obter melhorias económicas. A biotecnologia tem emergido com grande potencial tecnológico para a modernização da indústria da pasta e do papel, com o uso de enzimas de origem microbiana. Devido aos grandes problemas ambientais, têm-se criado oportunidades no



ramo da biotecnologia para substituir o uso de cloro nas etapas do branqueamento da pasta, reduzindo assim, uma parte dos compostos tóxicos, assim como a coloração escura dos efluentes, que são gerados durante o processamento da pasta e do papel, minimizando o impacto ambiental.

Actualmente, o objectivo geral da indústria da pasta e do papel é aumentar a eficiência do processo, reduzindo os custos, desenvolvendo processos benignos ao meio ambiente e aumentando a qualidade do produto. A biocatálise tem apresentado um grande potencial para melhorar o processo tradicional de manufactura da pasta e do papel, além de introduzir propriedades únicas à fibra do papel. As fibras podem ser modificadas por enzimas ou microorganismos para melhorar os processos químicos ou mecânicos da indústria papelreira. O grande desafio para o sucesso comercial é identificar enzimas, microorganismos e as condições para desenvolver às suas aplicações. A actividade catalítica e a estabilidade de potenciais enzimas podem ser melhoradas pelos novos métodos que estão a ser desenvolvidos. Durante os últimos anos, o número de novas aplicações de enzimas tem crescido e algumas têm alcançado aplicações comerciais ou aproximações, onde se inclui o branqueamento com xilanase ou microorganismos, deslenhificação directa com enzimas oxidativas, redução do consumo de energia com celulases, redução de *pitches* com lipases entre outras (Viikari & Lantto, 2002).

O uso da enzima xilanase no branqueamento da pasta de papel foi o primeiro passo essencial da aplicação da biotecnologia, demonstrando que as enzimas são um meio tecnológico eficiente e que podem ser introduzidos nas plantas industriais já existentes, sem grandes investimentos. Entretanto, verificou-se que o efeito da xilanase no branqueamento é limitado e que se obtém somente uma redução de cerca de 25% dos compostos químicos (Bourbonnais *et al.*, 1997). Recentemente, outras enzimas como a lipase e a glucanase também foram testadas em aplicações de grande escala (Messer *et al.*, 1997).

### **1.1.1 Composição da madeira**

A madeira é um biocompósito natural constituído principalmente por fibras. É um tecido biológico altamente organizado a nível celular e molecular. Sua composição

química apresenta cerca de 20-30% de lenhina, 65-80% de polissacarídeos (dos quais 40-50% são celulose e 20-35% são hemiceluloses), de outras substâncias de baixo peso molecular (1-3%) representadas essencialmente por extractáveis (compostos alifáticos: alcanos, álcoois, ácidos gordos; terpenos e terpenóides: esteróis e compostos fenólicos: ácidos fenólicos, flavonóides, taninos, lenhanos e estilbenos), de cinzas (menos que 1%) e por compostos minerais presentes em pequenas quantidades (Sjöström, 1981). As quantidades relativas dos componentes da madeira variam com o tipo de madeira e com o tipo de parede celular. Geralmente classifica-se a madeira em dois tipos: as gimnospérmicas ou madeira dura (*hardwood*), ex. folhosas e as angiospérmicas ou mole (*softwood*), ex. resinosas.

#### 1.1.1.1 Celulose

A celulose é um polissacarídeo, um homopolímero linear constituído por unidades repetidas de celobiose  $\beta$ -D-glucopirranose, que são ligadas umas as outras por ligações glicosídicas  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4). As suas cadeias apresentam entre 4000 a 10000 unidades de D-glucose anidra. A Figura 1.1 mostra a cadeia principal da celulose.

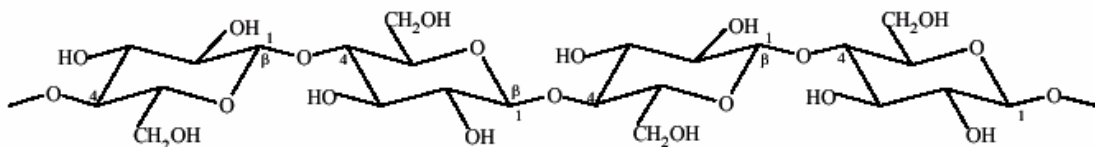


Figura 1.1 – Representação da cadeia principal da estrutura de celulose (Higuchi, 1993).

A celulose está estruturalmente ligada à hemicelulose e à lenhina, não sendo assim um substrato facilmente acessível. Fisicamente, a celulose é um material sólido e branco que existe no estado amorfo-cristalino. A forma cristalina é resistente ao ataque químico e à degradação microbiana enquanto que a forma amorfa é primeiramente atacada e degradada (Biermann, 1996).

As moléculas de celulose são lineares e ligam-se umas as outras por pontes de hidrogénio intra e intermoleculares, formando fibrilas elementares (FE) (Figura 1.2).

Várias FE de celulose são agregadas umas as outras formando as microfibrilas. Estas microfibrilas são constituídas por regiões cristalinas rigorosamente ordenadas alternando com regiões amorfas menos ordenadas. Microfibrilas formam as macrofibrilas e estas formam fibras. As suas estruturas lineares e cristalinas são responsáveis pela rigidez atribuída à madeira (Kirk & Fareel, 1987).

Os mais eficientes degradadores biológicos da celulose são os fungos filamentosos. Tipicamente, as endoglucanases e as celobiohidrolases hidrolisam a celulose cristalina em celobiose e a  $\beta$ -endoglucanase degrada a celobiose em glucose (Teeri, 1997).

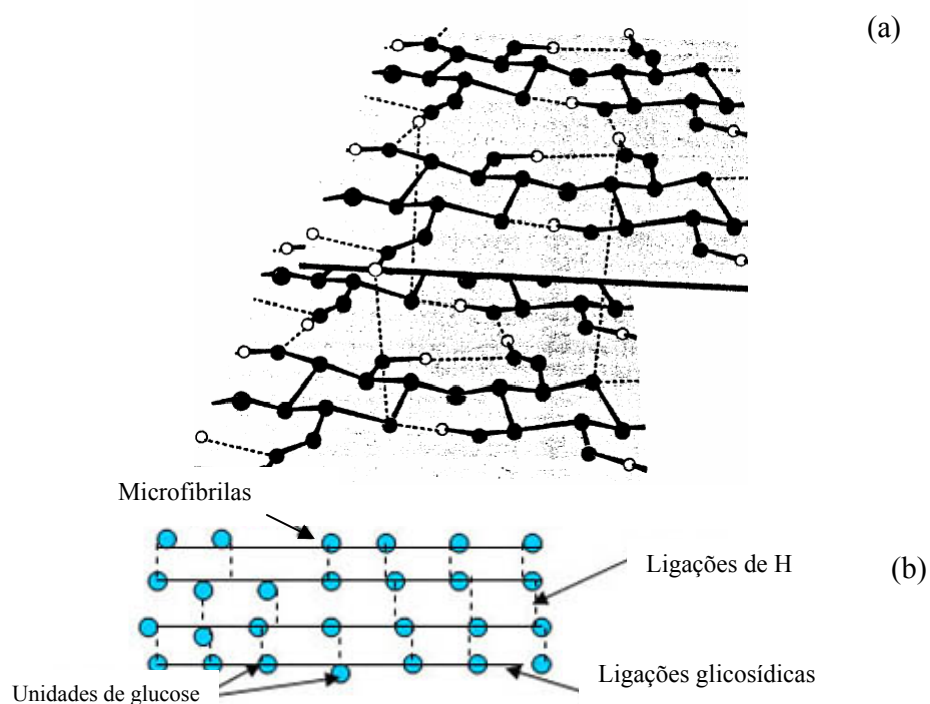


Figura 1.2 – Diagrama estrutural da celulose mostrando as ligações  $\beta$ -(1,4) dos resíduos de D-glucose e as ligações de hidrogénio inter e intra molecular (a) e representação das microfibrilas da celulose (b) (Adaptado de Voet & Voet, 1990).

### 1.1.1.2 Hemiceluloses

As hemiceluloses são um grupo misto de polissacarídeos não celulósicos lineares e/ou ramificado que compreende dois grandes grupos: pentosanos e hexosanos. Os pentosanos são constituídos de unidades de pentoses (D-xilose, L-arabinose) e os hexosanos são constituídos de unidades de hexoses (D-glucose, D-galactose, D-manose). Também apresentam pequenas quantidades de L-ramnose, L-fucose e ainda desoxi-

hexoses e ácidos urónicos: ácido D-glucurónico, ácido 4-*O*-metil-D-glucurónico e ácido D-galacturónico.

Os monossacarídeos ligam-se uns aos outros essencialmente por ligações glicosídicas  $\beta$ -(1→4), mas também se podem encontrar ligações glicosídicas  $\beta$ -(1→3),  $\beta$ -(1→6),  $\alpha$ -(1→2),  $\alpha$ -(1→3) e  $\alpha$ -(1→6). As hemiceluloses e a lenhina são ligadas covalentemente. Devido ao baixo grau de polimerização e à sua natureza amorfa, as hemiceluloses são degradadas mais facilmente do que a celulose. Apesar disso, ainda é necessário um sistema enzimático complexo para a sua degradação, devido à sua estrutura variável e ramificada (Sjöström, 1981).

Tal como a celulose, grande parte da função das hemiceluloses é dar resistência à parede celular, actuando como matriz de suporte para as microfibrilhas de celulose (Kirk & Fareel, 1987). Fisicamente, são um material sólido e branco, raramente cristalino ou fibroso. As hemiceluloses aumentam a resistência do papel e o rendimento da pasta. São muito mais solúveis e susceptíveis a degradação química. O baixo peso molecular faz com que sejam solúveis em soluções alcalinas diluídas a altas temperaturas, como acontece no cozimento kraft (Biermann, 1996). A sua estrutura varia de acordo com o tipo de madeira. Nas madeiras resinosas a hemicelulose consiste principalmente de glucomanas, galactoglucomanas, arabinanas enquanto que nas madeiras folhosas consiste de glucuroxilano e pequenas quantidades de glucomanas (2-5%).

### ***1.1.1.3 Lenhina***

A lenhina é o segundo maior componente celular da madeira. Ela estabelece as ligações entre as fibras da madeira, conferindo firmeza e rigidez às fibras. Ela é encontrada entre as células e a parede celular e é resistente ao ataque biológico, uma vez que não apresenta ligações que sejam hidrolizáveis. É um polímero de estrutura amorfa, aromática, altamente ramificada e insolúvel em água. Apresenta-se sob uma rede tridimensional com ligações cruzadas (Sjöström, 1981).

É um heteropolímero complexo constituído por unidades de fenilpropano (C<sub>9</sub>) que apresenta um elevado peso molecular (600-10000 kDa). Durante o tratamento químico, a sua remoção permite que as fibras de celulose e hemicelulose sejam separadas facilmente

(Kirk & Cullen, 1998). Ela apresenta um carácter hidrofóbico, que na presença de pastas inibe a absorção de água e o inchamento das fibras.

A lenhina é formada a partir dos álcoois *p*-cumarílico, coniferílico e sinapílico (Kuad *et al.* 1997), os quais formam respectivamente as subunidades hidroxifenilo (H), guaiacilo (G) e seringilo (S) que compõem a lenhina (Boudet *et al.*, 1995). O álcool coniferílico é precursor das unidades guaiacilo e o álcool sinapílico origina as unidades seringilo e o álcool cumarílico dá origem às unidades *p*-hidroxifenilo (Kirk & Fareel, 1987). Estes precursores são formados a partir da glucose por uma variedade de reacções enzimáticas que envolvem oxidações, reduções, aminações, descaboxilação entre outras. A Figura 1.3 mostra os álcoois precursores da lenhina. A lenhina de madeiras moles é constituída principalmente de unidade de G, enquanto que as duras de G e de S.

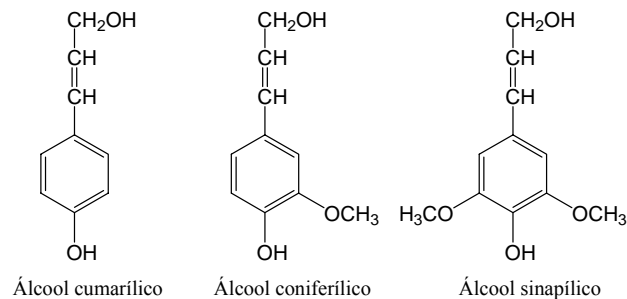


Figura 1.3 – Álcoois precursores da lenhina (Adaptado de Biermann, 1996).

Estudos recentes mostram que a polimerização desidrogenativa de monómeros de lenhina é causada por uma classe de enzimas, as peroxidases ou o sistema peroxidase-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Estas enzimas são capazes de oxidar um precursor, criando radicais livres estabilizados por ressonância, que se polimerizam por acoplamento destes de radicais. (Kilpeläinen *et al.*, 1994). A combinação de radicais monoméricos com os grupos fenólicos conduz à formação de um polímero linear, enquanto que as ramificações do polímero ocorrem através da formação de estruturas benzil aril éter.

A Figura 1.4 mostra a estrutura da lenhina. A ligação dominante é do tipo  $\beta$ -O-4. Mais de dois terços da unidade de fenilpropano na lenhina está ligada por ligações éter C-

O-C e as unidades restantes por ligações carbono-carbono C-C. Os principais tipos de ligações são alquil-O-aryl, alquil-O-alquil, aril-O-aryl, alquil-alquil, aril-aryl e alquil-aryl. Estas ligações explicam as fortes condições necessárias para a despolimerização da lenhina e a incapacidade de originar a reversão para monómeros (Sjöström, 1981).

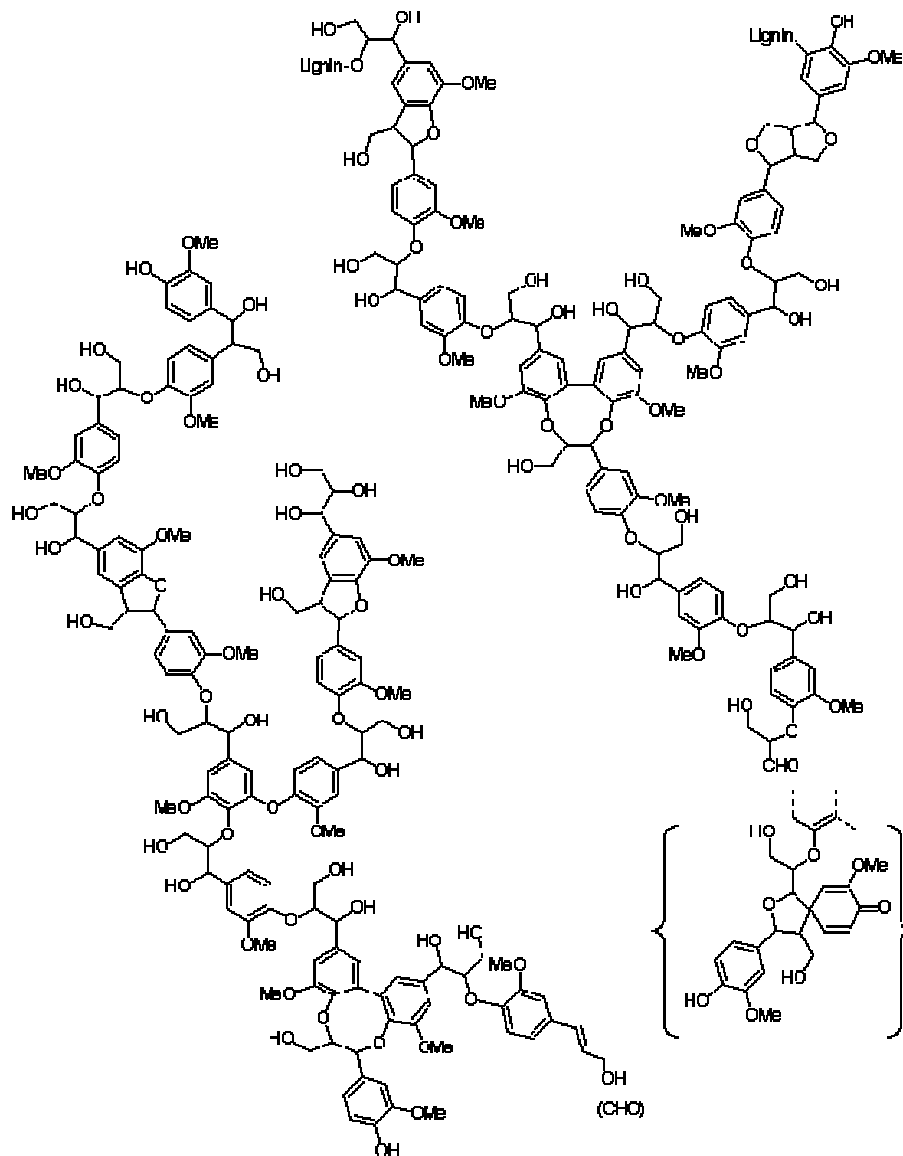


Figura 1.4- Estrutura de uma lenhina resinosa (Sipilä et al., 2005).

Os grupos funcionais da lenhina com maior influência sobre a reactividade da lenhina consiste de grupos carbonilo, grupos hidroxilos fenólicos e grupos metoxilos (Sjostron, 1981).

As lenhinas são diferentes consoante a espécie de madeira e variam de acordo com o conteúdo de unidades de seringilo, guaiacilo e *p*-hidroxifenilo e podem ser classificadas em várias classes de acordo com os seus elementos estruturais. A lenhina é covalentemente associada à hemicelulose, na parede celular, por numerosos tipos de ligações. As mais importantes são as ligações éter entre o carbono benzílico da lenhina e uma das partes do hidrato de carbono e as ligações éster entre o carbono benzílico da lenhina e os resíduos de ácidos (Hammel, 1997).

A lenhina é uma molécula altamente irregular que não tem nenhuma estrutura precisa, mas contém uma série de variadas subestruturas, conforme mostra a Figura 1.5.

Considerando que o polímero da lenhina é grande e altamente ramificado, deduz-se que os mecanismos lenhinolíticos devam ser extracelulares. Estes mecanismos devem ser oxidativos em lugar de hidrolíticos, uma vez que o polímero é interligado por ligações estáveis de éter e de carbono-carbono. Como a lenhina consiste numa mistura estereoirregular de unidades, os agentes lenhinolíticos certamente serão muito menos específicos que os catalisadores biológicos típicos (Hammel, 1997). Somente uma classe de microorganismo é capaz de degradar a lenhina, os basidiomicetes.

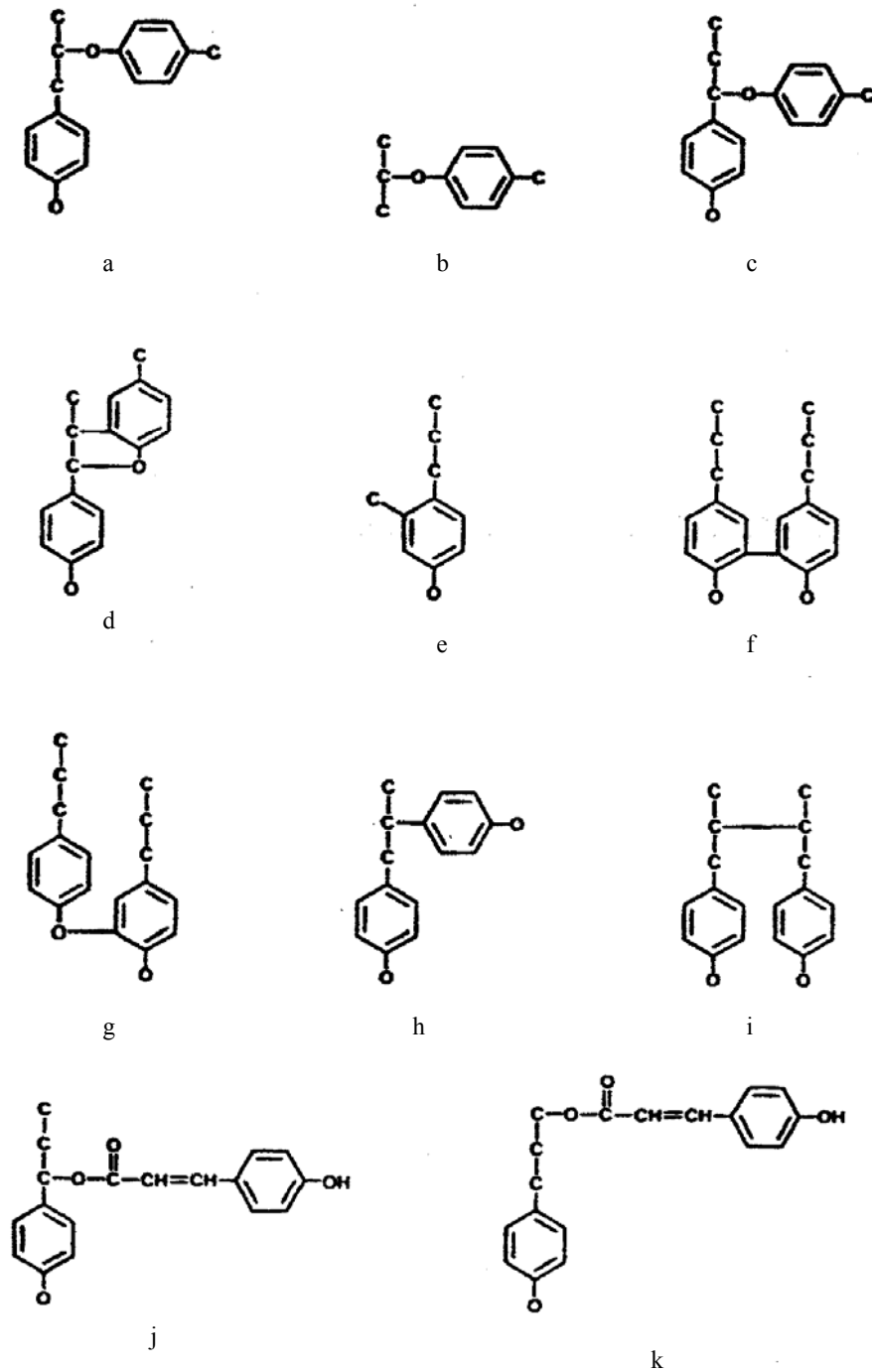


Figura 1.5 - Principais subestruturas na lenhina;  $\beta$ -O-4' (a);  $\beta$ -O-4' degradada (b);  $\alpha$ -O-4' acíclica (c);  $\beta$ -5' cíclica e  $\alpha$ -O-4' (d);  $\alpha$ -2'6' e  $\beta$ -2'6' (e); 5,5' (f); 4-O-5' (g);  $\beta$ -1' (h);  $\beta$ - $\beta$ ' (i); éster  $\alpha$ -HC-hidroxicinamato de arilglicerilo (com ligação  $\alpha$ -4) (j); éster  $\gamma$ -HC-hidroxicinamato de arilglicerilo (com ligação  $\gamma$ -4) (k) (Sjöström, 1981).



### 1.1.2 O processo de fabricação da pasta de papel

As pastas de madeira são o material de partida para a produção do papel. A produção da pasta pode ser dividida em quatro partes principais: preparação de matérias-primas, deslenhificação, branqueamento e sistema de tratamento de águas residuais.

Durante o processamento de produção da pasta, os seguintes processos podem ser utilizados (Akhtar *et al.*, 1997; Ander *et al.*, 1998):

(i) *mecânico* → a madeira é destrocada, as cascas são trituradas e as fibras reduzidas à uma pasta fibrosa denominada “pasta mecânica”. Neste processo não ocorre uma separação completa das fibras dos demais constituintes, obtendo-se então uma pasta com baixa qualidade, cuja aplicação é limitada.

(ii) *termomecânico* → a madeira, sob forma de aparas, sofre um aquecimento com vapor (em torno de 140° C), seguindo para o processo de desfibramento em refinador a disco. A pasta obtida desta forma resulta em celulose para a produção de papéis de melhor qualidade, pois proporciona maior resistência mecânica.

(iii) *semi-químico* → neste processo acrescentam-se produtos químicos em baixas porcentagens para facilitar ainda mais a desfibragem. O mais comum desses processos é conhecido na Europa com a sigla **NSSC** (*neutral sulphite semi chemical*).

(iv) *quimiotermicomecânico* → a pasta derivada do processo mecânico sofre um pré-tratamento com sulfito de sódio ou álcali antes da desfibragem.

(v) *químico – kraft (ou ao sulfato)* → é processo de fabricação da pasta de papel mais utilizado. Pode ser utilizado em quase todas as espécies de madeira. A madeira é tratada em vasos de pressão, denominados digestores, com hidróxido de sódio e sulfeto de sódio. É um processo químico que visa dissolver a lenhina, preservando a resistência das fibras, obtendo-se dessa maneira uma pasta forte (*kraft* significa forte em alemão), com rendimento entre 50 - 60% (Kirk & Farrell, 1987).

(vi) *químico – sulfito* → é um processo em que os cavacos são cozidos em digestores com um licor ácido, preparado com compostos de enxofre (SO<sub>2</sub>) e uma base Ca(OH)<sub>2</sub>, NaOH, NH<sub>4</sub>OH etc. A pasta obtida desta maneira tem um rendimento entre 40 e

60 % e é de branqueamento muito fácil, apresentando uma coloração clara que permite o seu uso mesmo sem ser branqueada. Este processo, que era muito utilizado para a confecção de papéis para imprimir e escrever, está sendo substituído pelo processo sulfato (principalmente após a introdução do dióxido de cloro no branqueamento), devido à dificuldade de regeneração dos produtos químicos e as conseqüentes contaminações das águas.

### **1.1.3 Branqueamento da pasta kraft**

O branqueamento é um processo químico aplicado à pasta crua para aumentar a sua brancura por remoção da lenhina residual da fibra. Neste processo deseja-se que um mínimo possível ou nenhum dano ocorra aos polissacarídeos, particularmente a celulose, que é a substância primária da parede celular da madeira e o constituinte chave das fibras naturais do qual o papel é feito.

A determinação do conteúdo de lenhina na pasta é importante para a produção de papel branco. O alto conteúdo de lenhina dificulta e encarece o branqueamento da pasta, enquanto que o baixo conteúdo de lenhina pode favorecer o branqueamento (McDonald, 1970).

A determinação rápida do conteúdo de lenhina, durante o processamento da pasta, nem sempre é fácil. A oxidação da madeira ou da pasta com soluções padrão de permanganato de potássio constitui um método convencional para a determinação do conteúdo de lenhina, e foi aprovado pela *Technical Association of the Pulp and Paper Industry* (TAPPI). A lenhina da pasta reage com permanganato e a quantificação do permanganato consumido é determinada por titulação com iodeto de potássio. Esse método determina o Índice Kappa, que é o método industrial padrão de determinação do conteúdo de lenhina. O Índice Kappa é definido como a quantidade de permanganato que é consumido pela pasta. Uma vez que o permanganato é consumido pela lenhina, o Índice Kappa é uma medida indirecta da percentagem de lenhina na pasta (Smook, 1989).

A maioria dos sistemas de deslenhificação são agressivos, particularmente quando o nível de lenhina diminui, de forma que a deslenhificação a níveis desejáveis faz com que ocorra alguma degradação nas propriedades da fibra.

Os agentes químicos oxidantes utilizados podem ser o hipoclorito de sódio (NaClO), o oxigênio (O<sub>2</sub>), os peróxidos de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), o dióxido de cloro (ClO<sub>2</sub>), o cloro (Cl<sub>2</sub>) e o ozono (O<sub>3</sub>).

Os estágios de branqueamento são designados por símbolos de acordo com o agente químico utilizado: Z - ozono – usado na forma de gás; O – oxigênio; P – peróxido de hidrogênio – em estado líquido em meio alcalino; D - dióxido de cloro – em solução (ClO<sub>2</sub>); C – cloro; E - extração alcalina – usando NaOH; E/O - extração alcalina usando oxigênio; E/P - extração alcalina usando peróxido; Q - Estágio ácido onde é adicionado um agente quelante (EDTA ou DTPA);

Dependendo do agente de branqueamento e da sequência utilizada, o branqueamento da pasta é denominado: STD - *Standard* (com uso de cloro molecular, sequência (C+D)(EO)DED); ECF - *Elementary chlorine free* (sem uso do cloro molecular, sequência D(EO)DED), TCF - *Totally chlorine free* (sem uso de compostos clorados, sequência OQP), entre outros (Dence & Reeve, 1996).

A sequência de branqueamento típico com ClO<sub>2</sub> pode ser descrita com uma sequência de operações do tipo DEDED em que são aplicados agentes químicos sequencialmente, com extracções intermédias. Na primeira etapa (D) ocorre a oxidação e fragmentação da lenhina, mas como a dissolução é apenas parcial, é necessário a etapa de extracção alcalina posterior. Este procedimento é realizado duas vezes e termina com uma terceira etapa com ClO<sub>2</sub>. No final do processo DEDED a pasta é lavada. A pasta branca resultante é essencialmente constituída por celulose e hemiceluloses e contem quantidades vestigiais de lenhina (0.1-0.3% no processo kraft) (Biermann, 1996; Reeve, 1989).

Uma das alternativas mais atractivas ao dióxido de cloro e ao cloro, no que respeita ao impacto ambiental e aos custos, são o oxigênio, o peróxido de hidrogênio e o ozono. Entretanto a limitação do uso destes compostos é geralmente a sua selectividade para a lenhina (vs. celulose). A alta selectividade é importante para manter as propriedades de resistência física da fibra. O oxigênio não é suficientemente selectivo para remover mais de metade da lenhina residual da pasta kraft. O peróxido de hidrogênio não deslenhifica efectivamente. O ozono é muito efectivo, no entanto limitações de transferência de massa impostas pela necessidade de empregar ozono em concentrações diluídas de lenhina,

presentes dentro das fibras primárias da parede celulósica, dificultam a selectividade do processo em escala industrial (Weinstock *et al.*, 1997). No entanto, numerosas tecnologias alternativas e de biobranqueamento estão a ser consideradas. Têm sido desenvolvidos vários estudos visando obter um processo de tratamento da pasta que seja adaptável às instalações já existentes e compatível com a legislação ambiental em vigor.

Estudos da biodegradação da lenhina têm grandes implicações não só no entendimento do ciclo do carbono global, como também no desenvolvimento de técnicas não prejudiciais ao meio ambiente para a remoção selectiva da lenhina da madeira na indústria do papel. Diferentes tipos de microorganismos são capazes de degradar a madeira, no entanto os fungos da podridão branca da madeira são os microorganismos mais eficientes em degradar a lenhina, conforme discutido anteriormente. Estudos com os fungos da podridão branca da madeira e suas enzimas têm revelado três tipos diferentes de potenciais enzimas lenhínicas: lenhina peroxidase (LiP), manganês peroxidase (MnP) e lacase. *T. versicolor* é um dos fungos mais extensivamente estudado na biodegradação da lenhina. O uso de enzimas para a remoção da lenhina tem sido proposto como uma via para a redução do consumo de dióxido de cloro na indústria do papel (Tolan & Thibault, 1997)

#### ***1.1.3.1 O papel da lacase no branqueamento da pasta***

Muitas enzimas são conhecidas por actuar sobre a lenhina, especialmente as oxidativas como é o caso da lacase. Ela pertence ao grupo da polifenol oxidase e esta usualmente é considerada como sendo somente capaz de oxidar compostos fenólicos da lenhina devido ao seu baixo potencial redox, quando comparada com a MnP ou LiP (Kersten *et al.*, 1990).

Nas últimas décadas, tem-se feito um forte esforço para se compreender os mecanismos da biodegradação da lenhina pela lacase e para encontrar uma aplicação enzimática industrial, principalmente no branqueamento da pasta kraft (Call & Mucke, 1997). Muitos estudos têm descrito a aplicação da lacase ao branqueamento de pasta kraft.

Katayama *et al.* (1989) produziram a primeira evidência de quebra do anel aromático de um tipo de estrutura bifenólica da lenhina (DDVA; 2,2'-dihidroxi-3,3'-dimetoxi - 5,5' -dicarboxi bifenil) por *T. versicolor*.

### **1.1.3.2 Uso de mediadores**

Juntamente com a lacase, certos compostos químicos, chamados de mediadores, podem ser utilizados no branqueamento da pasta de papel, uma vez que o efeito catalítico da lacase é insuficiente para muitos processos industriais. O tamanho molecular da lacase não permite a sua penetração na parede celular do material lenhinocelulósico. O uso de compostos mediadores torna possível a biodeslenhificação de pastas, uma vez que os compostos não fenólicos da lenhina podem ser oxidados com o uso em conjunto da lacase e de mediadores.

O sistema lacase-mediador (SLM) constitui uma alternativa promissora às convencionais tecnologias de branqueamento da pasta de papel (Leonowicz *et al.* 2001). Este sistema apresenta as seguintes vantagens (Smith & Ragauskas, 2005):

- Remove selectivamente a lenhina da pasta;
- Aumenta o rendimento da produção de pasta;
- Reduz o capital e despesas operacionais da deslenhificação;
- Minimiza a geração de ião cloreto durante o branqueamento;
- Reduz o uso de água fresca;
- Exibe verdadeiras propriedades catalíticas.

A Tabela 1.1 mostra o nome e a estrutura dos principais mediadores orgânicos da lacase já estudados.

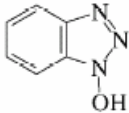
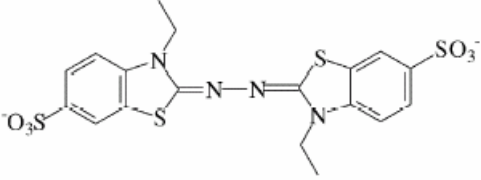
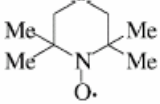
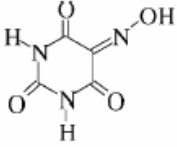
Call (1994), mostrou que é possível obter mais de 55% de deslenhificação da pasta kraft com lacase e mediador (1-hidroxilbenzotriazol (HBT)).

Na presença do mediador, HBT, um composto modelo de subestrutura de lenhina

$\beta$ -O-4, não fenólico, foi oxidado pela lacase de *T. versicolor* originando quatro produtos. Os resultados mostram que três tipos de reacções, quebra  $\beta$ -éter, quebra C $\alpha$ -C $\beta$  e oxidação do C $\alpha$  foram catalisadas pelo par lacase-HBT (Shingo, 1999).

O entendimento do mecanismo de oxidação da lenhina pelo SLM deverá facilitar a comercialização desse sistema pela indústria do papel. Estes mediadores formam radicais reactivos que podem penetrar nas fibras da pasta alcançando a lenhina melhor do que a grande molécula de lacase. Deste modo a lenhina é degradada e sua repolimerização é evitada. Estudos avaliam o papel de diferentes mediadores juntamente com a lacase, principalmente em reacções de oxidação de compostos modelo da lenhina (Fabbrini *et al.* 2002; Bourbonnais *et al.*, 1997; Castro, 2001). Os mediadores mais frequentemente estudados são: HBT (Li *et al.* 1998; Castro *et al.*, 2003; Majcherczyk *et al.*, 1998, Bourbonnais *et al.*, 1997), Ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotriazolina-6-sulfónico) (ABTS) (Bourbonnais *et al.*, 1997), N-oxil-2,2,6,6-tetrametilpiperidina (TEMPO), Ácido violúrico e Polioxometalatos (Castro *et al.*, 2003).

Tabela 1.1 - Estrutura de alguns mediadores orgânicos da lacase

Mediador	Estrutura
1-hidroxilbenzotriazol (HBT)	
Ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotriazolina-6-sulfónico) (ABTS)	
N-oxil-2,2,6,6-tetrametilpiperidina (TEMPO)	
Ácido violúrico	

O mecanismo da oxidação da lenhina com SLM está apresentado na Figura 1.6, onde os electrões que saem da lenhina são transferidos para o oxigénio, que apresenta o papel de aceitador final de electrões. O mediador funciona como um transportador de electrões difusível entre a lenhina e a enzima. Uma vez oxidado pela enzima, ele difunde-se da porção enzimática e volta a oxidar a lenhina, que devido ao tamanho, não entra na porção enzimática.

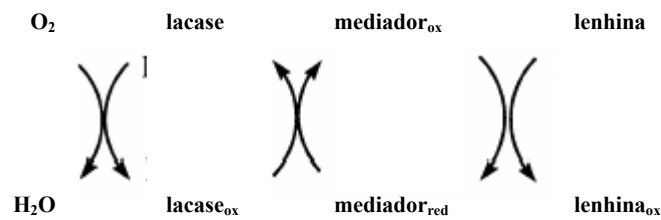


Figura 1.6 - Representação esquemática da degradação da lenhina por lacase num sistema com mediador (Adaptado de Bourbonnais *et al.*, 1998).

Um estudo com uma série de lacases de origem fúngica demonstrou uma correlação entre o potencial redox da enzima e actividade frente a um determinado substrato. A lacase apresentou um potencial próximo a 0.7-0.8 V (vs. ENH). Este estudo mostrou que a actividade da lacase face à lenhina em sistemas com mediador é dependente de uma combinação de dois principais factores: o potencial redox da enzima e a estabilidade e reactividade dos radicais gerados pela oxidação da lenhina com o mediador (Xu *et al.*, 1996).

A investigação por voltametria cíclica de alguns mediadores da lacase mostrou que um importante papel na determinação do mecanismo da oxidação de um substrato pode estar relacionado por um lado com a estabilidade da forma oxidada do mediador e por outro com o seu potencial redox (Fabbrini *et al.*, 2002).

Além da aplicação à pasta de papel, tem-se descrito o uso de mediadores e lacase na degradação de hidratos de carbono aromático policíclicos, na síntese química e no branqueamento de corantes têxteis (Bourbonnais *et. al*, 1998).

A deslenhificação catalítica das pastas kraft com POMs e lacase é uma tecnologia não nociva ao meio ambiente e muito selectiva, que constitui uma alternativa promissora ao convencional branqueamento (Call & Mucke, 1997).

#### 1.1.3.2.1 Os polioxometalatos

As potencialidades económicas e ambientais dos polioxometalatos (POMs) tornam-se muito promissores (Kozhevnikov, 1998). Outras capacidades específicas fazem dos POMs uma nova tecnologia para o branqueamento e o processamento da pasta da madeira, em particular (Evtuguin & Neto, 1997; Weinstock *et al.*, 1997). Esta tecnologia promete tanto vantagens económicas como ambientais sobre as actuais práticas na indústria papelreira. O principal objectivo no uso de POMs é a sua aplicação em condições tais que se consiga obter um alto nível de selectividade. Uma grande vantagem no uso dos POMs como mediadores é que eles podem ser regenerados e reutilizados no processo de deslenhificação.

Os POMs são caracterizados por apresentar um centro metálico, M, que é rodeado por alguns átomos ou grupo de átomos. Nos POMs, os átomos ligantes são os átomos de oxigénio. Em geral, eles apresentam unidades MO<sub>y</sub>, onde y indica o número de coordenação de M. Além de M e O, outros elementos, que usualmente são designados como X, podem fazer parte do estrutura do POM. Podem ser classificados como isopolianiões (IPAs) ou heteropolianiões (HPAs).

Apresentam a fórmula geral:



onde  $x \leq m$ ,  $M_m = \text{Mo, W, V, Nb, Ta}$  e  $X \text{ variável} = \text{P, Si, Ge, B, As}$  entre outros (Gamelas *et al.*, 2003).  $X_x$  representa o heteropolíátomo introduzido na estrutura e está localizado no centro da molécula e  $M_m$  o adenoátomo. Os POMs apresentam uma estrutura



organizada em unidades discretas. Apesar das fórmulas 1.2 e 1.3 serem simples, a composição de um grupo pode ser altamente complexa com vários elementos M fazendo parte da estrutura. A unidade básica de construção desses POMs é o octaédro formado por um metal rodeado de seis oxigénios ( $MO_6$ ). A Figura 1.7 mostra a unidade fundamental da estrutura do POM.

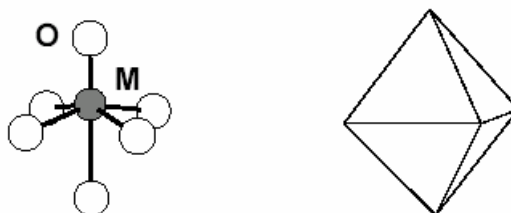


Figura 1.7– Representação bola-bastão e poliedro da unidade fundamental de  $MO_6$  (Fernandez, 2003).

Essas unidades unem-se umas às outras. A Figura 1.8 mostra a união das unidades de  $MO_6$ .

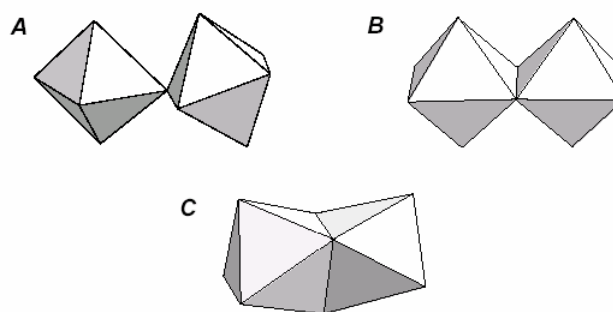


Figura 1.8 – Modelos poliédricos representam as três possíveis uniões entre duas unidades octaédricas  $MO_6$ . A) união de vértice, B) união de aresta e C) união de face (Fernandez, 2003).

Os POMs com estrutura de Keggin são os mais importantes e estudados actualmente (Weinstock *et al.*, 1997). A estrutura desses POMs é baseada em um tetraedro

central  $XO_4$ , rodeado por doze octaedros  $MO_6$  arranjados em quatro grupos de três octaedros cada ( $M_3O_{13}$ ) (Pope, 1983). O heteroátomo encontra-se no centro formando a estrutura tetraédrica  $XO_4$ . Cada uma das unidades  $M_3O_{10}$  compartilha os átomos de oxigénio dos vértices com as outras três, formando assim o POM com estrutura de Keggin e fórmula geral de:



onde  $X$  é o heteroátomo ( $P^V$ ,  $As^V$ ,  $Ge^{IV}$ ,  $Si^{IV}$ ,  $B^{III}$ ,  $Fe^{III}$ ,  $Co^{II}$ , entre outros) e  $M$  é o adendo átomo ( $Mo^{IV}$ ;  $W^{VI}$ ). Os heteroátomos mais comuns nos aniões de Keggin são os heteropolitungstatos  $[XW_{12}O_{40}]^{n-}$  e os heteropolimolibdatos  $[XMo_{12}O_{40}]^{n-}$ . O centro externo de  $M_mO_y$  é livre de elétrons metálicos se o arranjo é totalmente oxidado. A Figura 1.9 mostra a representação de um anião de Keggin.

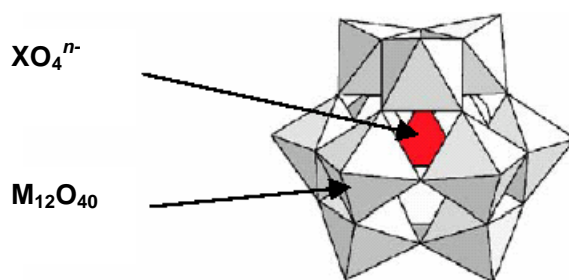


Figura 1.9 - Representação poliédrica da estrutura do anião de Keggin. O centro externo  $M_{12}O_{40}$  encapsula a unidade interna, representada pelo tetraedro  $XO_4^{n-}$  (Jeannin, 1998).

Em solução, os potenciais de redução dos POMs com estrutura de Keggin são altos, e por isso são reduzidos facilmente, mesmo em condições brandas, podendo depois ser reoxidados pelo oxigénio, ar, ozono,  $H_2O_2$ , enzimas ou outro oxidante apropriado. Os elétrons são aceites pelos adeniões do HPA (Sadakane & Steckhan, 1998). Entretanto, apresentam algumas propriedades diferentes entre si como estabilidade, solubilidade, acidez e potencial óxido-redução, que irão depender da espécie metálica ( $Mo^{VI}$ ,  $W^{VI}$ , etc.), da presença ou ausência de algum outro metal incorporado, ( $V^V$ ,  $Mn^{II}$ , etc.) e do heteroátomo central.

Uma característica dos POMs é a sua elevada solubilidade em água, que é importante para a realização de experiências em catálise em fase líquida (Gamelas *et al.*, 2003; Hill, 1998 ). Outra característica bastante marcante é o potencial de óxido-redução, que é mais influenciado pelo tipo de metal, do que pelo heteroátomo em si. Em relação aos metais que compõe os POMs potenciais, o potencial redox é decrescente na seguinte ordem:  $V > Mo > W$ . Os potenciais redox do POMs de Si são menores do que os de P. Uma das maiores vantagens do uso dos POMs é que após serem reduzidos durante a reacção de oxidação, eles podem ser reoxidados e reutilizados.

No branqueamento da pasta do papel, os POMs podem remover eléctrons dos substratos orgânicos (reduzem-se) oxidando os fragmentos da lenhina dissolvida no licor de branqueamento e ainda facilitando a transferência de eléctrons para o oxigénio. Na etapa do branqueamento, aquece-se a altas temperaturas, uma mistura de água, pasta e POM totalmente oxidado ( $POM_{ox}$ ). Nestas condições de reacção, o POM é reduzido enquanto a lenhina é oxidada. Após a reacção, o licor de branqueamento é separado da pasta e reoxidado com o oxigénio conforme mostram as equações 1.5 e 1.6 (Katsoulis, 1998) e o esquema apresentado na Figura 1.10:

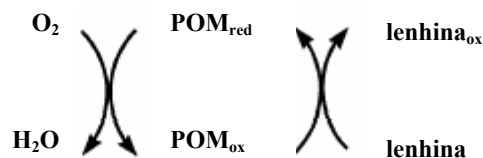
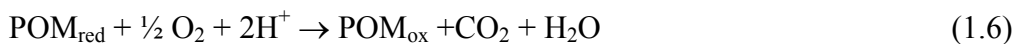


Figura 1.10 - Ciclos redox do POM na reacção catalítica da oxidação da lenhina (Balakshin *et al.* 2001).

Além dos mediadores orgânicos, os POMs também podem actuar como mediador no processo de deslenhificação da pasta com lacase. A deslenhificação catalítica das pastas kraft com POM e lacase (SLM) não é agressiva ao meio ambiente e é um processo

selectivo de deslenhificação. A Figura 1.11 mostra o mecanismo da oxidação da lenhina pelo POM. A correspondente forma reduzida passa pela reoxidação directa pela lacase.

Do ponto de vista técnico, o SLM é eficiente e decompõe selectivamente a lenhina residual sem significativa perda de viscosidade. Entretanto, uma das principais desvantagens do SLM é a baixa estabilidade dos mediadores orgânicos (ABTS; HBT; etc.) no sistema reaccional e a absorção de alguns mediadores coloridos na fibra. Adicionalmente, considerando o alto custo dos mediadores, o SLM com mediadores orgânicos não é viável ao contrário dos POMs que são muito efectivos como catalisadores e podem ser reciclados no ciclo catalítico (Evtuguin *et al.*, 1998).

Balakshin *et al.* (2001), demonstraram pela primeira vez a possibilidade de usar o sistema catalítico de POM com lacase para a deslenhificação da pasta kraft em condições aeróbicas e a temperaturas moderadas (40-60 °C). A lacase mostrou ser capaz de reoxidar diferentes POMs, mesmo os que não são reoxidados pelo oxigénio a altas temperaturas.

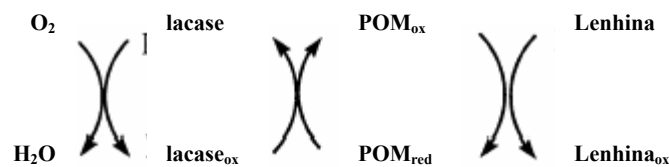


Figura 1.11 – Ciclos redox no sistema catalítico de oxidação da lenhina com POM-lacase- $O_2$  (Balakshin *et al.*, 2001).

## 1.2 A natureza dos fungos

Os fungos são organismos eucarióticos quimioorganotróficos. Apresentam dois tipos morfológicos principais: os fungos filamentosos, assim chamados por formarem hifas (ou filamentos revestidos de parede rígida) e as leveduras, fungos normalmente unicelulares.

Os fungos constituem um grupo muito diversificado no que diz respeito à forma, estrutura e capacidade metabólica. A maior parte desenvolve-se de matéria orgânica morta. O seu crescimento é afectado por factores físicos e químicos como temperatura, humidade,

concentração de oxigénio, pH, micronutrientes, fontes de carbono e nitrogénio, entre outros.

Nos fungos, os núcleos estão dispersos em um micélio (conjunto de hifas) contínuo ou septado. Não possuem plastos ou pigmentos fotossintéticos e sua nutrição é obtida por absorção. São saprófitas, parasitas facultativos ou biotróficos. São predominantemente filamentosos, mas algumas espécies são leveduriformes.

Os fungos filamentosos são morfológicamente complexos e heterogêneos, e podem exibir diferentes formas estruturais durante o seu ciclo de vida. A sua estrutura vegetativa básica de crescimento é constituída por um filamento tubular, a hifa, que é originada a partir de um único esporo reprodutivo (Papagianne, 2004). A colónia de um fungo filamentoso é uma estrutura muito repetitiva. É composta de uma rede tridimensional ramificada de hifas interconectadas e possui um indefinido número de pontos de crescimento (Read, 1994). A área superficial relativa faz com que as hifas estejam bem adaptadas para a absorção, segregação e excreção de substâncias. Quando crescem em culturas submersas, os fungos filamentosos exibem diferentes formas morfológicas, dispendo-se desde filamentos miceliares dispersos até densas massas miceliares agregadas, chamadas de “*pellets*” (Papagianne, 2004). Os *pellets* são agregados de hifas apresentando uma forma esférica ou elipsoidal, com uma estrutura interna variável. A forma particular exibida é determinada não somente pelo material genético, mas também pelas condições físicas e químicas do meio de cultura em que se encontram (Kossen, 2000; Znidarsic & Pavko, 2001)

Reconhece-se a existência de três classes nesse grupo: basidiomicetes, ficomicetes e ascomicetes. Os basidiomicetes (fungos superiores) são seres heterotróficos, necessitam de meios eficientes de segregação de enzimas digestivas extracelulares. São providos de talo pluricelular formado de hifas septadas. Seu micélio pode ter crescimento indefinido ou formar, nos tipos mais evoluídos, corpos frutíferos de estrutura constante. A estrutura reprodutora característica do grupo é o basídio, que é a extremidade de uma hifa dilatada, uni ou pluricelular, e que emite ramificações, cada uma suportando em sua extremidade um esporo, ou basidiósporo. Este grupo apresenta uma grande importância económica pois compreende as espécies causadoras de uma série de doenças nas plantas cultivadas. Os basidiomicetes superiores separam-se em dois grupos: os himenomicetes e os gasteromicetes. Entre os primeiros estão os fungos destruidores da madeira.

### 1.2.1 Fungos da podridão branca da madeira

Os fungos da podridão branca da madeira e suas enzimas lenhínicas têm sido muito estudados devido à sua grande eficiência em degradar a lenhina e as possíveis aplicações na indústria papelreira (Akhtar *et al.*, 1997), além de apresentar grande potencial para a bioremediação de poluentes com estruturas similares a lenhina (Pointing, 2001).

Os substratos de crescimento para este tipo de fungo são a celulose e a hemicelulose. A degradação da lenhina, que é altamente recalcitrante, ocorre no fim do crescimento primário, através de um metabolismo secundário quando há deficiência em nutrientes (Pointing, 2001). O ataque do fungo à lenhina é um processo oxidativo aeróbio, onde são oxidados compostos fenólicos, metóxidos e alifáticos da lenhina através do rompimento de anéis aromáticos e da criação de novos grupos carbonilo. Estas mudanças na estrutura da lenhina resultam na sua despolimerização e na produção de dióxido de carbono (Kirk & Farrell 1987).

Os fungos da podridão branca da madeira degradam a lenhina tanto selectivamente como não selectivamente. Na degradação selectiva, tanto a lenhina como a hemicelulose são significativamente mais degradadas do que a celulose, enquanto que na degradação não-selectiva, quantidades iguais de todos os componentes de lenhinocelulose são degradados. Alguns fungos como *Ganoderma applanatum*, *Heterobasidion annosum* e *Phellinus pini*, são capazes de realizar ambos os tipos de degradação (Blanchette, 1995).

### 1.2.2 O sistema lenhínico dos fungos da podridão branca da madeira

Vários tipos de enzimas lenhínicas, envolvidas na degradação da lenhina, são produzidas pelos fungos da podridão branca da madeira. Além dessas, eles também podem produzir celulasas, xilanasas e outras hemicelulasas (Hatakka, 1994). Quase todos os fungos da podridão branca da madeira produzem MnP e lacase, mas somente alguns produzem LiP (Hatakka, 1994). LiP oxida as unidades não-fenólicas da lenhina (Kirk & Farrell, 1987). MnP oxida  $Mn^{2+}$ , que pode ser encontrado na madeira e no solo, a  $Mn^{3+}$ . A alta reactividade de  $Mn^{3+}$  faz oxidar os anéis fenólicos da lenhina em radicais livres instáveis, que se decompõe espontaneamente (Hofrichter, 2002). A Lacase oxida os anéis fenólicos em radicais fenoxílicos. Outras enzimas como a celobiose:quinona oxidoreductase (CBQ), celobiose dehidrogenase (CDH), glioxalacto oxidase (GIOx),

glucose oxidase, álcool veratrílico oxidase (VAO) e algumas esterases também podem apresentar algum papel no complexo processo da degradação da madeira, mas não actuam sozinhas. Enquanto as enzimas lenhinolíticas oxidam compostos fenólicos e criam radicais fenólicos, os compostos não fenólicos são oxidados via catião radical (Call & Mucke, 1997; Garg & modi, 1999).

O sistema de degradação de materiais lenhinocelulósicos envolve uma série de reacções. As espécies de basidiomicetos, incluindo as do género *Trametes*, são capazes de realizar tal degradação, devido ao complexo enzimático lenhinocelulolítico específico. Um esquema ilustrativo, onde se observa a função desempenhada pelas enzimas degradadoras de materiais lenhinocelulósicos proposto por Rajarathnam *et al.* (1992) está apresentado na Figura 1.12.

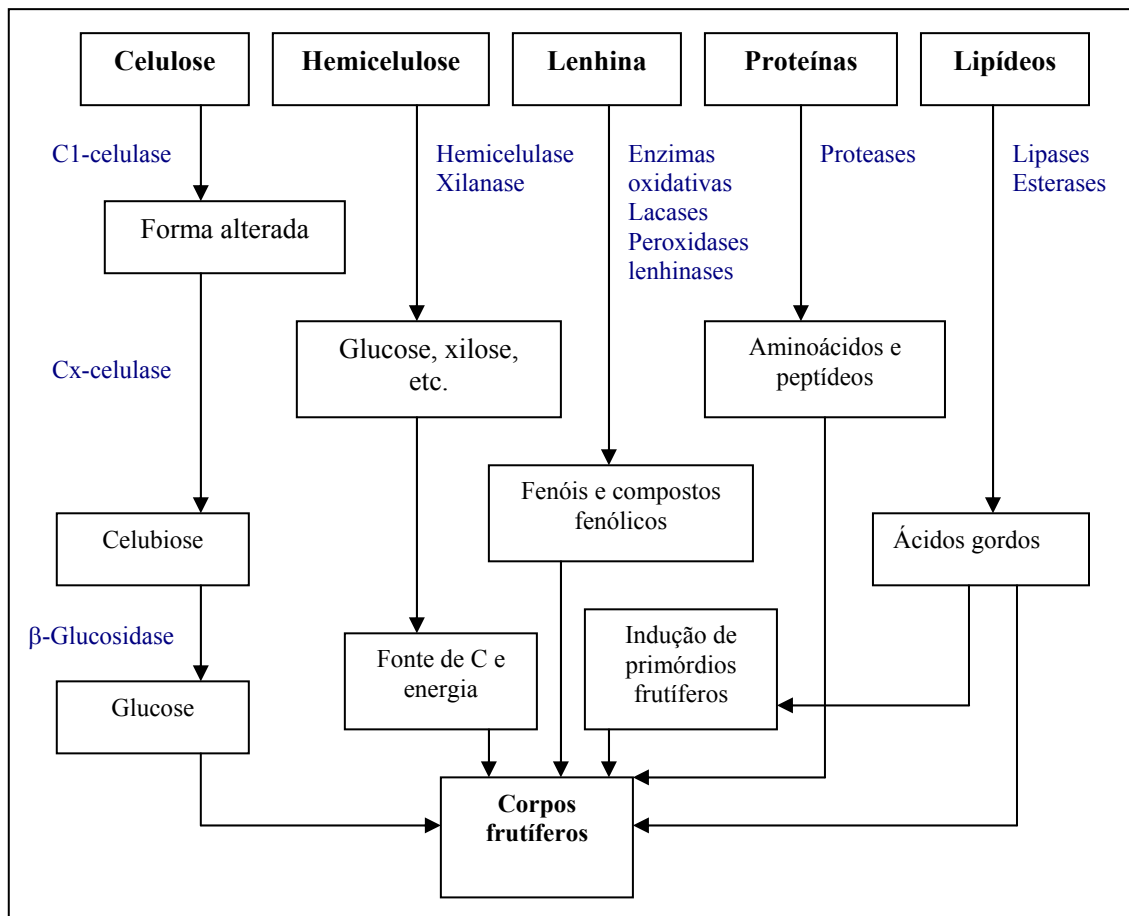


Figura 1.12 - Esquema da função desempenhada pelas enzimas degradadoras de materiais lenhinocelulósicos dos basidiomicetos (Adaptado de Rajarathnam *et al.*, 1992).

### 1.2.3 O fungo *Trametes versicolor*

*Trametes versicolor*, por vezes classificado como *Coriolus*, *Polyporus* e *Polysticus* é o mais comum habitante encontrado na madeira, causando a podridão branca (Alexopoulos & Mims, 1979; Archibald *et al.*, 1997). Este fungo pertence à classe dos Basidiomycetes, ordem Polyporales, família Polyporaceae (Alexopoulos & Mims, 1979). Existem cerca de 100 géneros nesta família.

É um cogumelo facilmente reconhecido pelo seu corpo frutífero (ou basidiocarpo) que se apresenta em forma de “cauda de peru”, como mostra a Figura 1.13. As cores das bandas podem variar dependendo da sua genética e do ambiente onde se encontram. A maior parte das bandas são de cor castanha escura a clara, alternando-se com as bandas de cores claras (as hifas).



Figura 1.13 – O fungo *Trametes versicolor* na forma de “cauda de peru”.

O seu ciclo de vida inicia-se com um esporo produzido pelo corpo frutífero (cogumelo). Os esporos germinam e tornam-se hifas, que se agrupam formando o micélio (fase vegetativa). Este por sua vez cresce originando o cogumelo (fase sexual) (Alexopoulos & Mims, 1979).

*T. versicolor* é um dos mais eficientes fungos degradadores da madeira que promove a deterioração simultânea da lenhina, celulose e hemicelulose (Tanaka *et al.*



1999). As enzimas oxidativas extracelulares produzidas por este fungo iniciam o ataque à madeira. Esta espécie lenhínolítica é chamada de fungo da podridão branca porque confere um aspecto esbranquiçado à madeira a medida que esta apodrece (Lewin & Goldstein, 1991). Estas características fazem com que este fungo e as suas enzimas lenhínolíticas sejam estudados e/ou aplicados como alternativa ao branqueamento químico da pasta de papel, na indústria têxtil para a remoção de cor (Swamy & Ramsay, 1999; Wong & Yu, 1999; Amaral *et al.* 2004), no tratamento de efluentes industriais (Modi *et al.* 1998) e na bioremediação de uma série de poluentes orgânicos (Pointing, 2001).

Este fungo também é bastante usado na medicina tradicional do Este Asiático devido às suas propriedades medicinais (Cui & Chisti, 2003). No Japão é chamado de “Kawaratake” ou “cogumelo junto ao rio” e na China como “Yun Zhi” ou “cogumelo nuvem”. Na medicina tradicional este fungo é colhido, seco, moído e extraído com água quente. Ele é usado no tratamento de infecções pulmonares, hepatite e em doentes com cancro devido às suas propriedades imunomoduladoras (moduladoras do sistema imunológico). Estas propriedades são atribuídas aos polissacarídeos do *T. versicolor* (Sugiura *et al.* 1980; Ng, 1998).

### **1.3 Enzimas lenhínolíticas**

Enzimas são proteínas globulares que actuam como catalisadores biológicos conduzindo as reacções bioquímicas nas células dos organismos vivos. Estão grandemente distribuídas na natureza. Quimicamente, as enzimas contêm uma ou mais cadeias de centenas de aminoácidos numa complexa estrutura tri-dimensional, que é muito importante para a sua acção. Como em toda a catálise, uma catálise enzimática é definida como uma reacção de “parceria” que aumenta a velocidade de uma reacção química, sem que o catalizador sofra mudanças em todo o processo. Esta definição implica que uma única molécula de enzima é capaz de converter muitas moléculas de substrato durante o seu tempo de vida. A taxa de conversão destas reacções é chamada de actividade de uma enzima. As enzimas diferem dos catalisadores químicos em muitos aspectos, tais como: (i) altas taxas de reacção; (ii) condições de reacção não agressivas e (iii) alta especificidade de reacção (Call & Mucke, 1997). As enzimas são classificadas pela IUBMB (*International*

*Union of Biochemistry and Molecular Biology*) através do número EC, que as classifica de acordo com a sua classe e com a reação que catalisa.

A interacção de uma enzima com o substrato pode ser ilustrada pelo modelo “chave-e-fechadura”. Somente um substrato (chave), que pode encaixar no centro activo (fechadura), será convertido no centro catalítico, que é uma parte do centro activo. A respeito desta imagem simplista, as reacções são certamente muito mais complicadas e só podem ser descritas por modelos muito mais complexos. Ao contrário da catálise química, as enzimas podem direccionar-se para reacções específicas através da combinação de métodos altamente sofisticados com a engenharia genética e *design* computacional de proteínas.

As enzimas são grandemente utilizadas como catalisadores na indústria, tal como acontece na indústria da pasta do papel. Os fungos da podridão branca da madeira são os principais produtores de enzimas lenhicolíticas. As principais enzimas lenhicolíticas são a lacase, a manganês peroxidase e a lenhina peroxidase, mas outras enzimas como a CBQ, a GIOx e algumas esterases também podem apresentar um papel significativo no processo de degradação da madeira.

### **1.3.1 Lenhina Peroxidase (LiP) (EC 1.11.1.14)**

A LiP é uma glicoproteína hémica que catalisa uma variedade de compostos fenólicos, não fenólicos, hidratos de carbono aromáticos e outros compostos que são resistentes ao ataque microbiano. Requer peróxido de hidrogénio como cofactor e a reacção ocorre através do mecanismo de oxidação de um electrão seguido por uma série de reacções não enzimáticas (Garg & modi, 1999). Estas reacções incluem a degradação oxidativa das ligações  $\beta$ -O-4,  $C_{\alpha}$ - $C_{\beta}$  e outras ligações na lenhina. Os fungos segregam para o meio de cultura várias isoenzimas que apresentam uma massa molecular entre 39 e 43 kDa e propriedades espectrais e catalíticas semelhantes (Kirk & Farrell, 1987).

Alguns estudos mostram que, no *T. versicolor*, a LiP não é importante no biobranqueamento da pasta de papel (Paice *et al.*, 1993).

### 1.3.2 Manganês Peroxidase (MnP) (EC 1.11.1.13)

A MnP constitui o segundo grupo de glicoproteínas hémica que requer iões de manganês livres para a sua actividade. A actuação desta enzima requer também a presença de peróxido de hidrogénio. Inicialmente catalisa a oxidação do  $Mn^{2+}$  para o  $Mn^{3+}$ , que subsequentemente oxida vários compostos fenólicos (Garg & modi, 1999). Os fungos também segregam várias isoenzimas da MnP para o meio de cultura, embora algumas também possam estar ligadas à parede celular (Hatakka, 1994). A MnP purificada pode desencadear a despolimerização de lenhinas sintéticas e também degradar clorolenhinas. Verificou-se que inicialmente o sistema MnP pode igualar a extensão de branqueamento obtida com o fungo, mas com o decorrer do tempo, os seus níveis diminuem.

### 1.3.3 Lacase (EC 1.10.3.2)

Lacase benzenodiol:oxigénio reductase, é uma polifenol oxidase, pertencente à classe de enzimas oxidoreductase, também conhecida como oxidase de cobre azul. Pode ser dividida principalmente em duas categorias segundo a sua origem: plantas e fungos. Foi descoberta por Yoshida em 1883 nas plantas e caracterizada como um oxidase de cobre por Bertrand em 1985 (Mayer & Staples, 2002). A lacase de fungos foi descoberta alguns anos depois (Call & Mucke, 1997).

Os principais microorganismos produtores de lacase são os fungos da podridão branca da madeira. *T. versicolor* é um dos mais estudados fungos da podridão branca da madeira produtor de lacase (Garg & modi, 1999). Neste tipo de fungo, a lacase é produzida dentro das células e excretada para o exterior dos filamentos das hifas.

O número de isoenzimas da lacase pode ser superior a 5, dependendo da espécie do fungo e das condições ambientais de crescimento.

#### 1.3.3.1 Caracterização estrutural da Lacase

A lacase pertence a família das enzimas de cobre azul, que pode ser definida pela sua espectroscopia característica, pela sua sequência homologa e pela sua reactividade. Em termos estruturais, esta enzima é uma glicoproteína que exhibe uma heterogeneidade adicional devido ao conteúdo variável de hidratos de carbono e de cobre (Yaropolov *et al.*,

1994). Compreende entre 520-550 aminoácidos, apresenta um peso molecular que varia de 60-80 kDa e é constituída por 15-20% de hidratos de carbono (Thurston, 1994).

Usualmente as lacases de fungos contêm 4 átomos de cobre distribuídos em 3 sítios de ligação diferentes, que são identificados por densidade electrónica. O Cobre é coordenado por duas histidinas e uma cisteína, que se encontra em um arranjo triangular plano. Cada íão de cobre parece desempenhar um papel importante no mecanismo catalítico (Thurston, 1994; Solomon *et al.*, 1996). O primeiro sítio, tipo 1 (T1), é responsável pela cor azul da enzima devido à máxima absorvância a 605 nm e é coordenado com a cisteína; o tipo 2 (T2) não exibe sinal no visível e funciona como aceitador de um electrão e o tipo 3 (T3) incorpora dois centros de cobre fortemente acoplados, sendo responsável pela banda a 330 nm e funciona como aceitador de dois electrões (Solomon *et al.*, 1996). Diferentemente das outras oxidases de cobre, o quarto ligante é substituído pela fenilalanina. Ela está organizada em três domínios arranjados sequencialmente. A Figura 1.14 mostra a estrutura tridimensional da lacase obtida pelo *T. versicolor*.

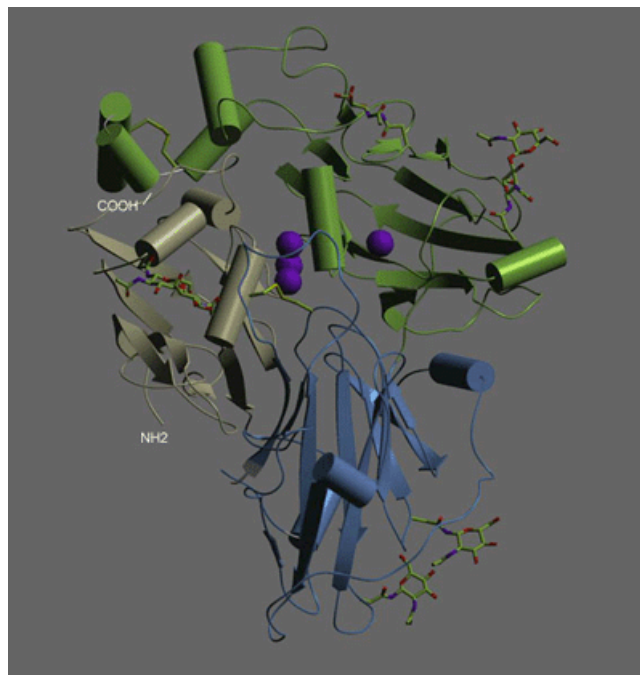


Figura 1.14 - Diagrama de da estrutura da lacase de *Trametes versicolor*. Os três domínios (T1, T2 e T3) estão mostrados a cores diferentes. Os átomos de cobre são as esferas azuis e a porção de hidrato de carbono são os modelos em bola-e-bastão. A parte cinzenta é o N-terminal e a verde o C-terminal. O sítio T1 é a esfera isolada. (Piontek *et al.*, 2002).

### 1.3.3.2 Mecanismos de catálise da Lacase

A lacase catalisa a oxidação de uma variedade de substratos como os polifenóis, diaminas e alguns compostos inorgânicos. As reacções de oxidação com a lacase envolvem a transferência de electrões de uma molécula para outra. Por outro lado, a lacase sozinha não é capaz de oxidar compostos não fenólicos.

As reacções de catálise são feitas através da oxidação de um electrão do substrato reduzido, com concomitante redução de quatro electrões do oxigénio a água (Leitner *et al.*, 2002). Embora o exacto papel da lacase na degradação da lenhina esteja por esclarecer, tem-se provado que, na presença de mediadores, compostos não fenólicos da lenhina podem ser degradados. O aceitador de electrões da lacase é o cobre e não a proteína. No centro trinuclear de cobre, os electrões são transferidos para a água.

O mecanismo de reacção ainda não está, como referido, completamente esclarecido. A partir de estudos espectroscópicos e de Ressonância Paramagnética Electrónica (EPR) mostrou-se que a enzima é primeiro completamente reduzida, e então o oxigénio é reduzido a duas moléculas de água juntamente com a formação de radicais intermediários e que existem diferentes locais de ligação ao cobre. Os cobres T1 e T2 estão envolvidos na captura e transferência electrónica (oxidações do substrato, por transferência de electrão, ocorrem no T1) e o T2 e o T3 participam na ligação do oxigénio (Thurston, 1994; Call & Muck, 1997). A Figura 1.15 propõe um esquema de reacção.

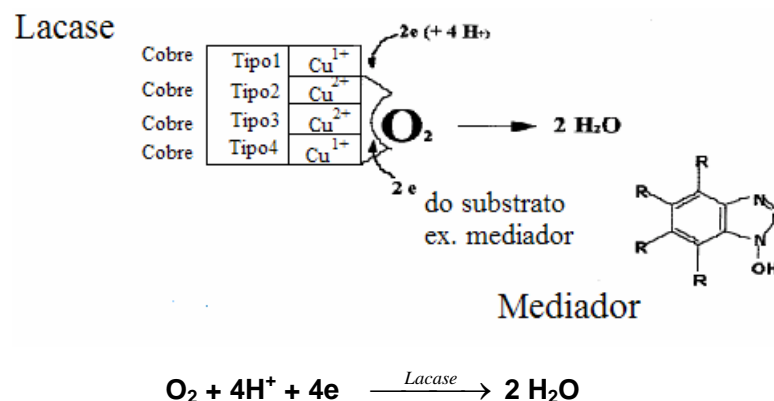
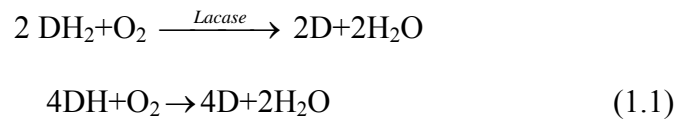


Figura 1.15 – Esquema de reacção da lacase com um substrato (Adaptado de Call & Muck, 1997).

As reacções típicas (de todas as oxidases azuis) podem ser descritas de acordo com a seguinte reacção (1.1):



Este tipo de reacção pertence aos fundamentos da biologia/bioquímica no metabolismo do oxigénio (Call & Muck, 1997).

Uma reacção típica da lacase está apresentada na Figura 1.16 onde um difenol sofre uma oxidação, com a perda de um electrão, para formar um radical livre. Esta espécie pode ser convertida em quinona numa segunda catálise enzimática.

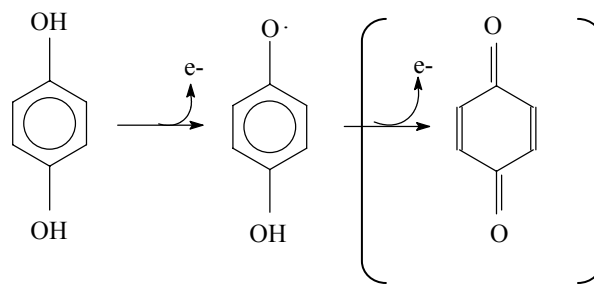


Figura 1.16 – Uma reacção típica da lacase com um difenol (Adapado de Thurston, 1994).

Independentemente da sua origem, a lacase pode ser fortemente inibida por muitos aniões que são capazes de interagir com os sítios de cobre como a azida, o cianeto e o fluoreto. Os agentes complexantes removem o cobre do centro activo inibindo a actividade.

### 1.3.3.3 Aplicações da lacase

As aplicações práticas da lacase têm conduzido a um incremento da pesquisa nas fontes produtoras da enzima, nomeadamente fungos da podridão branca, e no uso de mediadores, que facilitam a acção catalítica do sistema. Basicamente, todas as aplicações da lacase podem estar relacionadas com uma propriedade da enzima, que é a habilidade para produzir um radical livre a partir de um substrato adequado. É conhecido durante as

últimas décadas que a lacase catalisa a oxidação directa de fenóis e amins tais como os clorofenóis e corantes, conforme descrito nos itens acima. Actualmente tem-se estudado a degradação de compostos xenobióticos como os pesticidas e efluentes domésticos e industriais.

A remoção da lenhina é um processo que tem desencadeado uma grande quantidade de investigações, especialmente devido à sua importância na indústria da pasta do papel.

Para se aumentar a produção de etanol combustível, lacase obtida pelo *T. versicolor* foi expressa em *Saccharomyces cerevisiae* de modo a aumentar a sua resistência à inibidores fenólicos nos hidrolisados lenhinoceulósicos (Larsson *et al.* 2001).

Em análise de fármacos, um novo método baseado na lacase foi desenvolvido para distinguir morfina de codeína em amostras de medicamentos (Bauer *et al.*, 1999).

Lacase imobilizada tem sido utilizada com sucesso na remoção de fenóis da uva branca para a clarificação de vinhos (Servili *et al.* 2000).

Em bioremediação, as enzimas de fungos tem-se mostrado muito eficazes na degradação de uma variedade de poluentes ambientais. A lacase tem aumentado a eficiência de processos de bioremediação (Gelo *et al.*, 1999; Pointing, 2001) para a degradação de triclorofenol (Leontievsky, 2000), alcenos (Niku & Viikari, 2000), efluentes industriais (Fukuda *et al.*, 2001), descoloração de pigmentos (Yesilada *et al.*, 2003; Zamora *et al.*, 2003, Amaral *et al.*, 2004; Blanquez *et al.*, 2004; Couto *et al.*, 2004a) e degradação de herbicidas (Mougin *et al.*, 2001).

#### **1.3.3.4 Produção da lacase**

A produção da lacase por microorganismos é uma característica de muitos basidiomicetos, particularmente os associados à decomposição da madeira, entre eles o *T. versicolor*. São muitos os factores que afectam a sua produção. Nomeadamente:

- concentração de inóculo;
- composição do meio de cultura;
- concentração e proporções relativas de carbono e nitrogénio;
- pH, temperatura, taxa de arejamento e agitação do meio de cultura;
- presença de indutor;
- ausência de inibidores.

Para que a aplicação da lacase seja realizada com sucesso, é necessário que a sua produção seja feita em grandes quantidades. Por isso, além de se estudar os factores ambientais da produção, muitos autores têm considerado a adição de indutores ao meio de cultura. O indutor pode ser o substrato da própria enzima ou um composto estruturalmente análogo. No caso da lacase os compostos aromáticos são os mais promissores. Deste modo, pode-se aumentar a produção da lacase numa grande variedade de fungos lenhicolíticos pela indução por compostos como 2.5-xilidina, álcool veratrílico, ácido felúrico, guaiacol, etanol, cobre e produtos secundários da indústria do papel como a xilidina e lenhinosulfonados, entre outros.

O composto 2.5-xilidina tem sido o mais estudado e mais comum indutor da produção de lacase. Quando comparado com álcool veratrílico em fermentação semi-sólida por *T. versicolor*, xilidina mostrou ser um melhor indutor (Couto *et al.*, 2002). Um outro estudo desenvolvido com *T. versicolor* em fermentador “air lift” comparou a adição de xilidina, etanol e álcool veratrílico na produção da lacase e mostrou que todos os indutores aumentaram a produção enzimática, entretanto a xilidina apresentou melhores resultados de actividade enzimática (cerca de 1500U/L), com um aumento de 14 vezes em relação ao controlo (nenhum indutor adicionado ao meio) (Rancaño *et al.*, 2003). A indução por etanol e álcool veratrílico apresentou um menor aumento na actividade da lacase, não passando de 400 U/L. Bollag & Leonowicz (1984) também verificaram que a xilidina estimulou a produção de lacase em *Fomes annosus*, *Pholiota mutabilis*, *Pleurotus ostreatus* e *T. versicolor*. Com o fungo *T. modesta*, a adição de xilidina, entre muitos indutores testados, foi a que conduziu a maiores actividades enzimáticas (Nyanhongo *et al.*, 2002). A adição de ABTS juntamente com xilidina na produção de lacase por *Trametes* sp. mostrou ser um indutor mais eficiente, com um aumento na actividade de 3.59 vezes em relação ao controlo, enquanto que a xilidina sozinha apresentou um aumento de 2.84 vezes (Jang *et al.*, 2002). A indução da produção da lacase por *Pycnoporus cinnabarinus* com lenhinosulfonatos e álcool veratrílico aumentou a actividade em cerca de 2 a 3 vezes enquanto que o guaiacol não apresentou nenhuma indução. Obteve-se um aumento de 9 vezes na actividade da lacase quando se empregou xilidina como indutor e não se observou nenhuma alteração na estrutura da lacase (Eggert *et at.* 1996).

A introdução de álcool veratrílico em diferentes meios de cultura aumentou a produção da lacase desde 1.6 até 16 vezes em diferentes fungos utilizados. Similarmente a



adição de guaiacol aumentou a produção enzimática até 38 vezes. Entretanto, a maior produção de lacase foi obtida com a adição de “preparados de lenhinha” (indulina AT, polifom, reax e lenhinosulfonato) com um aumento na produção até 100 vezes com o fungo *Phlebia floridensis* (Arora & Gill, 2000). A adição de pirogalol ao quarto dia da fermentação com *T. versicolor* aumentou em 3 vezes a produção da lacase (Osiadacz *et al.*, 1999). A adição de álcool veratrílico aumentou 10 vezes a produção da lacase pelo fungo do género *Trametes* (Mansur *et al.*, 1997)

Como a lacase é uma enzima que contém cobre, estudos têm mostrado que a sua adição ao meio de cultura, aumenta a produção da enzima. Giardina *et al.* 1999, observaram que a adição de sulfato de cobre ao meio de cultura de *P. ostreatus* aumentou a actividade da enzima e que este aumento foi proporcional à quantidade de cobre adicionado, atingindo um valor máximo com 150 µM de sulfato de cobre. Outro estudo, também com *P. ostreatus*, mostrou um aumento de 8 vezes na actividade da lacase com a adição de cobre (1mM) ao meio de cultura (Baldrian & Gabriel, 2002). Com o fungo *Trametes*, o cobre induziu produção da lacase nas seguintes espécies: *T. versicolor* (Collins & Dobson, 1997), *T. pubescens* (Galhaup & Haltrich, 2001; Galhaup *et al.* 2002a), *T. modesta* (Nyanhongo *et al.*, 2002) e *T. hirsuta* (Couto *et al.*, 2004b).

Como todos os fungos, os fungos filamentosos são heterotróficos. Isto significa que eles necessitam de compostos orgânicos como fonte de carbono e de energia, embora alguns casos indiquem que alguns fungos filamentosos possam fixar dióxido de carbono (Papagianne, 2004). Deste modo, a composição do meio de cultura também é um factor importante na produção da lacase. Jang *et al.* (2002) estudaram o efeito das seguintes fontes de carbono: glucose, glicerol, xilose, dextrana e verificaram que a glucose foi a melhor fonte de carbono para a produção de lacase por *Trametes* sp. Nyanhongo *et al.* (2002) avaliaram diferentes concentrações de glucose na produção da lacase por *T. modesta* e observaram que a concentração ideal foi de 0.87 g/L e que concentrações acima de 1 g/L inibem a sua produção.

Outro importante factor na produção da enzima é o pH do meio de cultura. Ele pode afectar a actividade e estabilidade da enzima (O’Callaghan *et al.* 2002). A maioria dos fungos tolera o pH num intervalo alargado de 4-9, enquanto que a enzima é mais sensível as variações do pH (Papagianne, 2004). A maior parte das enzimas extracelulares são produzidas em maiores quantidades a pH próximo do pH ótimo da sua actividade.

Jonsson *et al.* (1997) mostrou que o meio de crescimento tamponado em pH 6.0 foi necessário para se obter actividade de lacase em culturas líquidas durante o cultivo de *Pichia pastoris* e que a manutenção do pH foi extremamente importante para a produção de altas concentrações de lacase. Outro estudo mostrou que o pH inicial do meio cultura de *Trametes* sp. afectou a produção da lacase. Dos diferentes valores de pH testados (de 3 a 9), o pH de 4.5 foi encontrado como o óptimo (Jonsson *et al.* 1997) enquanto que para *T. modesta* o pH ideal foi de 6.9 (Nyanhongo *et al.* 2002).

Em fermentações submersas, a agitação é importante para se obter uma boa mistura do meio evitando limitações na transferência de massa e de calor. Em processos aeróbicos, a mistura é necessária para se garantir uma suficiente transferência de oxigénio.

### 1.3.4 Produção industrial de enzimas

A produção industrial de enzimas faz-se principalmente pelo processo de fermentação submersa (em meio líquido), que envolve o crescimento de microorganismos num meio rico e com elevadas concentrações de oxigénio. Actualmente este é o método mais divulgado. Devido ao desenvolvimento de tecnologias de fermentação em grande escala, a produção de enzimas microbianas representa uma parcela significativa nas indústrias de biotecnologia. As fermentações em meio líquido podem ser divididas em diversas fases nomeadamente: preparação de inóculo, formulação do meio de cultura e condições de fermentação. Os processos mais utilizados para a produção são o processo de fermentação em contínuo e o processo em “feed batch”. Parâmetros operacionais como temperatura, pH, taxa de alimentação, consumo de oxigénio e formação de dióxido de carbono são medidos e controlados para otimizar o processo de fermentação. O primeiro passo para a remoção da enzima do meio é a remoção das células, que normalmente é feito por centrifugação ou microfiltração. A maioria das enzimas industriais são extracelulares e permanecem no meio fermentado após a remoção da biomassa. A enzima remanescente é concentrada por evaporação, filtração por membrana ou cristalização, dependendo da sua aplicação, e comercializada.

Por outro lado, as enzimas também podem ser produzidas por fermentações em estado sólido. As fermentações de substratos sólidos ocorrem em materiais insolúveis em água. O mais tradicional processo para a produção de enzimas é o Koji, que foi desenvolvido a partir da arte oriental de fermentação de grãos de cereais e de soja, por

fungos. Apresenta como vantagens a simplicidade, a redução nos custos energéticos e no volume do fermentador, facilidade em arejamento e a pequena quantidade de água usada permite a obtenção de metabólitos de forma concentrada, tornando a recuperação dos mesmos mais rápida e económica. Entretanto, apresenta os seguintes inconvenientes: lentidão, dificuldade em dissipar energia, em controlar a homogeneidade e parâmetros de funcionamento e de operação contínua (Pereira, 1996). Estudos mais recentes (Schutyser *et al.*, 2003) mostram a utilização de modelos matemáticos para uma melhor transferência de calor e melhor distribuição de água por pulverização está a ser desenvolvido.

#### 1.4 Polissacarídeos produzidos por fungos

Na medicina tradicional do Este Asiático têm-se usado diversos fungos com propriedades medicinais. Modernas práticas clínicas, desenvolvidas nos países asiáticos, aplicam preparados a partir de fungos. Os efeitos terapêuticos têm sido demonstrado para muitos fungos tais como: *Favolus alveolarius*, *Phellinus linteus*, *Agaricus campestris*, *Pestalotiopsis sp.*, *Lentinus edodes*, *Pleurotus ostreatus*, *Tricholoma sp.*, *T. versicolor* entre outros (Cui & Chisti, 2003). Das terapêuticas com base nos fungos, os polissacarídeos obtidos a partir do fungo *T. versicolor* já se encontram comercializados. Ambos os polissacarídeos, intracelular e extracelular, de *T. versicolor* são fisiologicamente activos (Cui & Chisti, 2003). Nas práticas medicinais da China e do Japão, o fungo *T. versicolor* é colhido, seco, triturado e utilizado como chá. As propriedades de cura do extracto de *T. versicolor* foram noticiadas por cientistas Japoneses e Chineses e deste modo iniciou-se um extensivo controlo nas investigações clínicas do extracto de *T. versicolor*.

Os compostos primários activos produzidos por *T. versicolor* são polissacarídeos ligados a proteínas, também chamados de glicoproteínas, os quais são constituídos por glucanas  $\beta$ -(1→4) com quantidades menores de glucanas  $\beta$ -(1→3) e  $\beta$ -(1→6). Essas glicoproteínas são de difícil extracção, de onde a maioria dos produtos comercialmente disponíveis no mercado contém apenas cerca de 1-2% destes polissacarídeos com excepção do Coriolus VPS (JHS Natural Products) que contém cerca de 34%.

### 1.4.1 Polissacarídeos

Os polissacarídeos são macromoléculas complexas de hidratos de carbono, formadas por milhares de unidades monossacarídicas ligadas entre si por ligações glicosídicas, unidas em longas cadeias lineares ou ramificadas (polímeros de açúcares). Estas ligações são formadas pela eliminação de moléculas de água entre o grupo hidroxilo hemiacetil de um resíduo e um grupo hidroxilo primário ou secundário do resíduo adjacente (Sutherland, 1985). Os polissacarídeos possuem duas funções biológicas principais: como constituintes de reserva e como elementos estruturais. Eles diferem entre si nas unidades de monossacarídeos que os constituem, no comprimento da cadeia e no grau de ramificação. São classificados como homopolissacarídeos, quando constituído por um só tipo de unidade monomérica, e de heteropolissacarídeo, quando são constituídos por duas ou mais unidades monoméricas diferentes.

Os polissacarídeos são caracterizados em termos de composição (tipo e quantidade dos monómeros), estrutura primária (disposição dos monómeros e tipo de ligações química entre eles), média da massa molecular relativa ( $M_r$ ) e tipo e disposição dos substituintes. Estes parâmetros determinam as propriedades funcionais dos polissacarídeos tais como solubilidade em água, viscosidade e comportamento Newtoniano (Dumitriu, 1998).

A unidade monossacarídica predominante na estrutura dos polissacarídeos é a D-glucose, seguido por D-manose, D-frutose, D e L-galactose, D-xilose, D-arabinose, D-glucosamina, D-galactosamina, D-ácido glucurónico, N-acetil ácido murâmico e N-acetil ácido neuraminico (Dumitriu, 1998).

Os monossacarídicos podem formar uma variedade de estruturas lineares ou ramificadas, conterem um número pequeno ou grande de resíduos monossacarídicos e serem homogêneos ou heterogêneos. A Figura 1.17 mostra alguns desses monómeros e a Figura 1.18 mostra a unidade do monómero de  $\alpha$ -D-glucose e  $\beta$ -D-gucose.

O grupo dos glucanos, polímeros formados por moléculas de glucose, é o mais abundante dentro dos polissacarídeos, pois inclui a celulose, o amido, o glicogénio e muitas outras macromoléculas produzidas pelos seres vivos. A unidade básica do  $\beta$ -glucano é a uma estrutura repetida de glucose ligada por ligações beta ( $\beta$ ) formando uma cadeia linear. As ligações vão desde carbono 1 da molécula de glucose ao carbono 3 da próxima ( $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3)), do carbono 1 ao carbono 4 ( $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)) ou do carbono 1 ao carbono 6 ( $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 6)). A maioria apresenta na cadeia principal as ligações  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3),  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4) ou

mistura  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3),  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4) com  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 6) nas cadeias laterais. A estrutura básica repetitiva de um  $\beta$ -glucano com cadeias laterais  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 6) está mostrada na Figura 1.19.

Nos polissacarídeos de fungos, os  $\beta$ -glucanos mais importantes são os  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3)-glucanos com cadeias laterais  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 6). Além destes, muitos outros tipos de polissacarídeos podem ser sintetizados por fungos, tais como outras estruturas de  $\beta$ -glucanos,  $\alpha$ -glucanos, mananos, galactanos, fosfogalactanos e vários heteropolímeros com manose ou galactose na cadeia principal (Karnezis *et al.*, 2000).

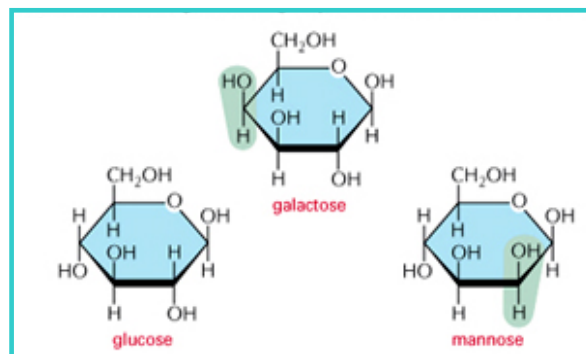


Figura 1.17 – Representação de alguns monómeros de polissacarídeos

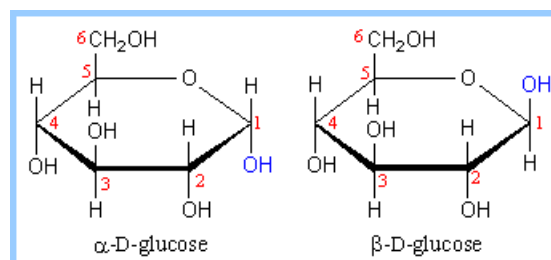


Figura 1.18- Representação dos monómeros de  $\alpha$  e de  $\beta$  D- glucose

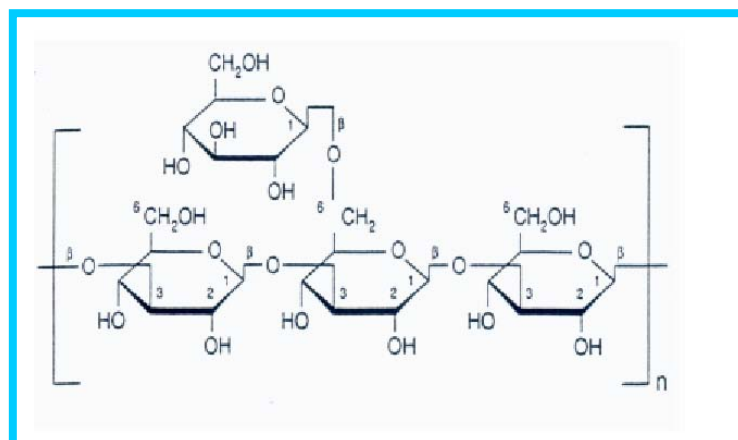


Figura 1.19 – Diagrama molecular de um D-glucano de origem fúngica. Representação das ligações glicosídicas (1 $\rightarrow$ 4) com ramificações (1 $\rightarrow$ 6).

Os polissacarídeos podem apresentar ligações a vários outros componentes químicos, como lipídeos, formando os lipopolissacarídeos, ou proteínas, formando as glicoproteínas (associação covalente de glucanos a proteínas, sendo a cadeia principal da molécula constituída de proteína) e proteoglicanos (cadeia principal constituída de glucanos e ligações com proteínas). Os tipos de ligações entre os monómeros, a variação de composição, tipo e quantidade de ramificações, influenciam na estrutura secundária e terciária dos polissacarídeos determinando suas propriedades físicas e, conseqüentemente, suas actividades biológicas (Daba & Ezeronye, 2003).

Devido à capacidade de certos polissacarídeos em formar géis, eles são utilizados em diversos sectores industriais, como o alimentar, farmacêutico, cosmético, químico, têxtil e petrolífero, na função de emulsificantes, texturizantes, estabilizantes, espessantes, controladores da formação de cristais de gelo, agentes gelificantes e coagulantes, lubrificantes, entre outros (Sutherland, 1990).

Nas últimas décadas, vários polissacarídeos têm apresentado efeitos biológicos como propriedades anti-inflamatórias, imunoestimulante, antitrombótica, antidiabética e como protector às infecções. O primeiro polissacarídeo apresentado como tendo actividade biológica foi o que continha  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3)-glucanos. O primeiro teste foi feito em 1969 onde a utilização deste polissacarídeo em tumores transplantados fez com que o tumor parasse de crescer (Paulsen, 2002).

Os polissacarídeos de origem fúngica podem ser extraídos do corpo frutífero, do micélio e do caldo fermentado por fungos, podendo variar a composição química, estrutural e a actividade antitumoral (Mizuno *et al.*, 1995). A maioria dos polissacarídeos produzidos por basidiomicetos e com actividade antitumoral são o  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3)-D-glucanos, também chamados de “pleuran” (Nosál’ová *et al.*, 2001).

A acção antitumoral dos  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3)-D-glucanos parece estar relacionada com a conformação de tripla hélice da cadeia (a estrutura em hélice é mantida pelas ligações de hidrogénio, Figura 1.20), com a razão entre o número de ramificações e com o comprimento da cadeia. Por esta razão nem sempre os  $\beta$ -glucanos presentes em fungos apresentam actividade antitumoral (Paulsen, 2002). Os  $\beta$ -glucanos apresentam diferentes modos de acção quando comparados com as terapias convencionais, inibindo o crescimento das células cancerígenas e reforçando o sistema imunitário. As diferenças na actividade podem também estar relacionadas com a habilidade da molécula do

polissacarídeo em se solubilizar na água, tamanho da molécula e forma das ramificações. No entanto, alguns  $\beta$ -glucanos insolúveis em água, solúveis em soluções alcalinas diluídas, apresentam uma importante actividade antitumoral (Bohn & BeMillar, 1995).

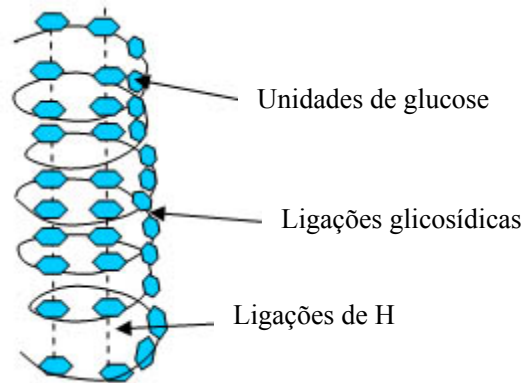


Figura 1.20 - Conformação de tripla hélice da cadeia de  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3)-D-glucanos.

As proteínas ligadas aos glucanos apresentam um maior potencial imunológico do que os correspondentes glucanos (Daba & Ezeronye, 2003)

De acordo com Gutiérrez *et al.* (1996), existe uma correlação entre os polissacarídeos componentes da parede celular, ou seja, os extraídos do corpo frutífero, com os polissacarídeos extracelulares produzidos por fungos. Verificou-se que os polissacarídeos extraídos do corpo frutífero apresentaram os mesmos tipos de monómeros e de ligações que os dos polissacarídeos extracelulares obtidos em cultura submersa, havendo, no entanto, alguma variação na proporção dos tipos de ligações presentes nos biopolímeros.

Vários efeitos fisiológicos têm sido descritos com o uso dos polissacarídeos de *T. versicolor*. Alguns dos principais efeitos são: efeitos imunossupressivos da quimioterapia, radioterapia e transfusão de sangue; antagonização da imunossupressão induzida por tumores; inibição da proliferação de vários tipos de cancro; aumento do apetite e de funções vitais; acalmia do sistema nervoso central entre outras. Em adição esses polissacarídeos podem curar os desarranjos intestinais e também beneficiar a terapia de infecções microbianas que enfraquece a resposta imunológica.

#### 1.4.2 Produção de Exopolissacarídeos

O termo exopolissacarídeo (EPS) é utilizado para designar os polissacarídeos que se encontram exteriores à célula ou livres no meio circundante. Os monossacarídeos mais comumente encontrados nos EPSs são D-glucose, D-galactose, D-manose, L-fucose e L-ramnose (Rosado *et al.* 2003). Os EPSs microbianos oferecem várias vantagens como a possibilidade de uma produção controlada, velocidade e rendimento elevados, maior pureza e consistência na composição, conduzindo a produtos específicos. Eles podem ser utilizados como emulsificantes, estabilizantes, agentes formadores de géis, adsorventes selectivos e como aditivo no controlo reológico. Apesar do elevado custo de produção são utilizados comercialmente na indústria alimentar, na medicina e na indústria do petróleo (Dumitriu, 1998).

A biossíntese dos exopolissacarídeos produzido por fungos é ainda pouco conhecida. Karnezis *et al.* (2000) em uma revisão sobre a síntese de  $\beta$ -glucanos, verificaram que a maioria dos exopolissacarídeos isolados de fungos são  $\beta$ -glucanos e que a biossíntese envolve uma série de reacções: iniciação, alongamento da cadeia e ramificação. A etapa de alongamento é a mais estudada e é catalisada por uma glucano-sintetase cujas propriedades são específicas para cada espécie de fungo.

Os polissacarídeos comercializados de *T. versicolor* são extractos de cogumelos ou micélio cultivado em substrato sólido (Yadav & Tripathi, 1991) ou micélio produzido em fermentações submersas (Ng, 1998; Kim *et al.*, 2002a; Cui & Chisti, 2003). Os mais importantes polissacarídeos que já estão aprovados clinicamente são o polissacaropeptídeo Krestin (PSK) e o polissacaropeptídeo PSP. Ambos são obtidos a partir do micélio cultivado em fermentações submersas. Em alguns casos, utilizou-se o micélio formado na superfície de meio líquido estático, para extrair-se os compostos activos, no entanto este tipo de cultura não é satisfatória, em termos de rendimento, para a sua produção comercial (Cui & Chisti, 2003).

Normalmente utiliza-se a glucose ou a sacarose como fonte de carbono nas fermentações submersas, entretanto estudos com outras fontes de carbono alternativas têm sido realizados. Num estudo comparativo entre a sacarose e a maltose encontrou-se uma diferença significativa na produção de um EPS durante o cultivo de *Paecilomyces japonica*. A concentração máxima de EPS foi encontrada no meio com maltose, enquanto



que a máxima concentração de biomassa apresentou um comportamento inverso (Bae *et al.* 2001). Kim *et al.* (2002b) estudou o efeito de nove fontes de carbono e verificou que a sacarose apresentou-se como sendo a melhor fonte de carbono na produção de EPS por *P. sinclairii*.

As fontes de nitrogénio incluem a peptona, o extracto de levedura, a farinha de amendoim e uréia. Os fosfatos são usados para tamponar o meio e o sulfato de magnésio é normalmente o único nutriente inorgânico adicionado. As fermentações são normalmente realizadas entre 24-28°C sob condições aeróbicas. O pH na maioria das vezes não é controlado durante o cultivo.

Em culturas submersas, as condições favorecem um tipo de morfologia, e as condições hidrodinâmicas apresentam um papel importante. A cultura miceliar de *T. versicolor* tende a ser altamente viscosa devido aos filamentos da biomassa em suspensão e aos polímeros extracelulares dissolvidos no meio. Neste tipo de cultivo, muitos fungos filamentosos podem crescer como micélios livres ou como *pellets* e a forma do crescimento é determinada por diversos factores tais como: meio de crescimento, concentração do inóculo e condições físicas (Sinha *et al.* 2001 a). A agitação do meio de cultura apresenta uma variedade de efeitos nos fungos, que podem incluir a ruptura da parede celular, mudanças na morfologia, variação na eficiência e taxa de crescimento e variação na taxa de formação do produto desejado. Park *et al.* (2002) estudaram o efeito da intensidade de agitação no crescimento miceliar e na produção de um exobiopolímero por *Cordyceps militaris* e observaram que a maior agitação estudada (300 rpm) não favoreceu a produção do exobiopolímero e sim a produção miceliar. Um aumento na produção foi obtido quando uma agitação de 150 rpm foi empregue.

Durante a excreção do EPS, a mudança na reologia do cultivo é uma consequência directa da formação do produto. Um aumento na viscosidade ocorre com o aumento da concentração do EPS. Durante a produção do EPS, o meio de cultivo desenvolve características não-Newtonianas e pode-se apresentar como um fluido pseudoplástico, onde a viscosidade diminui com o aumento da tensão de corte. Estas características resultam em mudanças no comportamento microbiano e formação do produto devido à falta de homogeneidade em termos de mistura, oxigenação, e transferência de massa e de calor durante a fermentação. Devido a estas condições, a qualidade dos polissacarídeos poderá ser

heterogénea, ou seja, mudanças no tamanho da cadeia, nas ramificações e na reologia (Dumitriu, 1998).

#### **1.4.2.1 Processo de recuperação de exopolissacarídeos de origem microbiana**

A recuperação de exopolissacarídeos de microorganismos é importante na determinação dos custos de produção e das suas propriedades físico-químicas. Os principais passos na obtenção de EPS produzido por fermentação são a extracção, precipitação e purificação. O passo limitante no processo de recuperação do EPS é a separação das células do meio fermentado devido à grande viscosidade do meio fermentado e ao grau de associação do EPS às células (Ex. Cápsula) (Dumitriu, 1998).

A maioria dos polissacarídeos comerciais de *T. versicolor* usam somente o polímero intracelular recolhido do cogumelo ou do micélio produzido em culturas submersas. O cogumelo contém aproximadamente 59% dos polissacaropeptídeos em peso. A biomassa miceliar contém cerca de 30% em peso seco. Entretanto, a composição deste polissacarídeo é dependente do método de recuperação usado. A sua extracção com água quente parece ser necessária para se remover os polímeros activos em quantidade suficiente para uso comercial. Tipicamente, a biomassa é extraída com água quente e o extracto obtido é concentrado por evaporação sob vácuo ou ultrafiltração. O concentrado é então precipitado com sulfato de amónio ou álcool. Os precipitados são redissolvidos, dializados e podem posteriormente ser purificado por métodos de cromatografia. A solução do produto purificado é concentrada e seca num secador *spray*. A remoção de substâncias de baixo peso molecular é importante uma vez que essas substâncias além de não apresentarem actividade fisiológica, conferirem um odor desagradável ao produto final.

O processo típico de recuperação de glicoproteínas está mostrado na Figura 1.21. A sua recuperação dá-se por agitação do micélio com água destilada a 98°C durante cerca de 3h. O extracto é então concentrado por evaporação. A solução concentrada é saturada com sulfato de amónio para a precipitação do polissacaropeptídeo. O precipitado é dissolvido em água e dessalgado por diálise. Esta solução é concentrada a 5% do volume original. Uma segunda precipitação com sulfato do amónio é realizada. O precipitado final é dessalgado, dissolvido em água e purificado por cromatografia. Mais uma precipitação

com sulfato do amónio é feita e então o precipitado dessalgado é concentrado e seco num secador *spray* (Cui & Chisti, 2003).

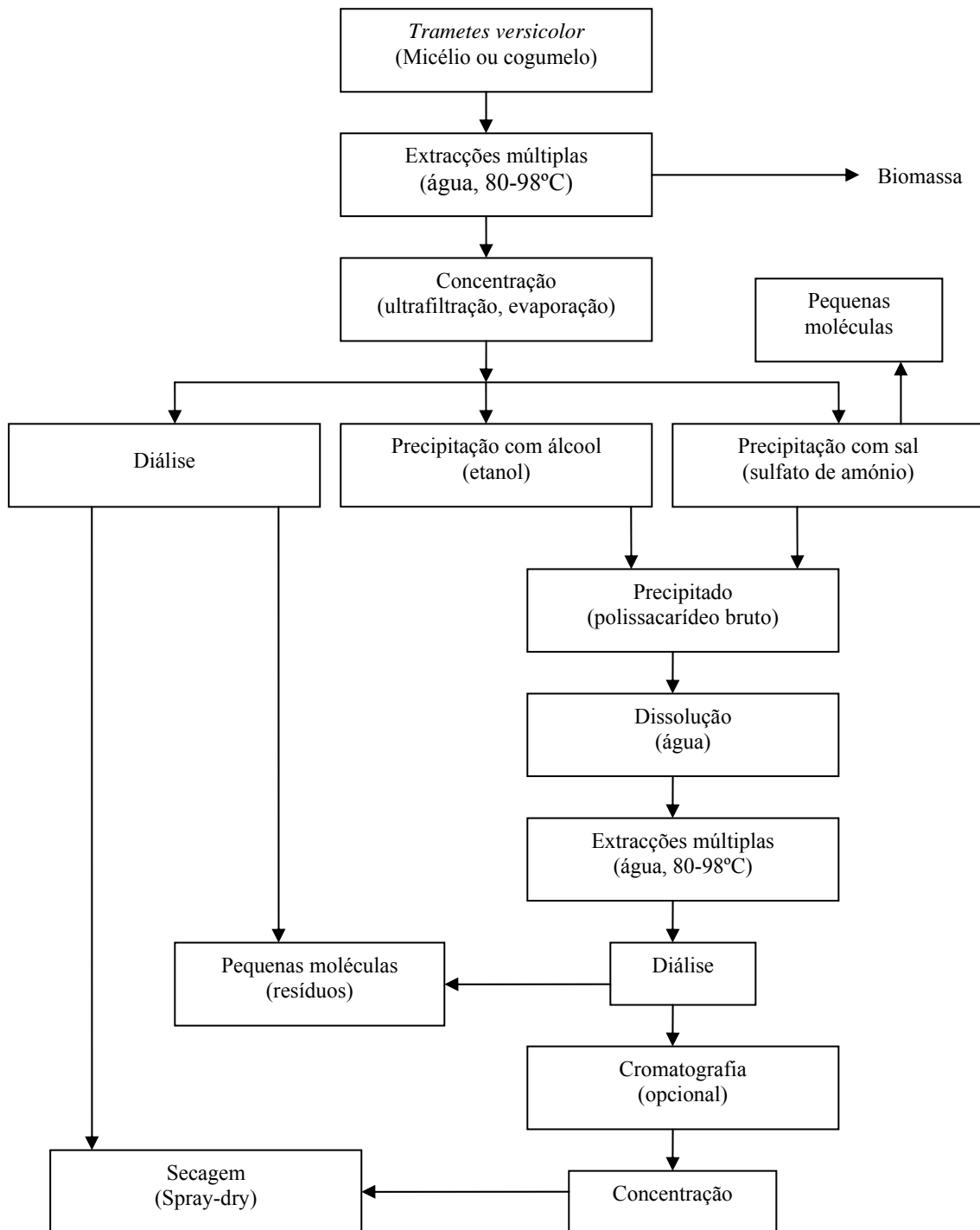


Figura 1.21 – Opções de recuperação e purificação de polissacarídeos de *Trametes versicolor* (Adaptado de Cui & Chisti, 2003)

### 1.4.3 Compostos comercializados

Os compostos comerciais obtidos a partir dos polissacarídeos de *T. versicolor* são o polissacaropeptídeo (glicoproteína), PSP e o polissacaropeptídeo Krestin, PSK. Ambos polissacarídeos são obtidos a partir da extracção do micélio de *T. Versicolor*, são respectivamente produtos Japonês e Chinês. Eles apresentam actividade fisiológica similar mas estruturalmente são diferentes. PSK e PSP são produzidos a partir das linhagens CM-101 e Cov-1 de *T. versicolor*, respectivamente. Estes compostos são produzidos em fermentações descontínuas. O tempo de fermentação do PSK é de 10 dias, enquanto que a produção do PSP é de 64h. PSK é recuperado através da extracção da biomassa com água quente e sulfato de amónio enquanto que o PSP é recuperado por precipitação alcoólica a partir do extracto obtido com água quente.

PSK foi comercializado pela *Kureha Chemicals*, Japão. Após extensivos testes clínicos, o PSK foi aprovado para uso no Japão em 1977, e em 1985 foi considerado o décimo nono da lista dos produtos comercializados com mais sucesso no mundo. Ele é uma mistura de polissacarídeos ligados covalentemente a proteínas. A análise elementar do PSK mostrou, aproximadamente, a seguinte composição: oxigénio 47.5%, carbono 40.5%, hidrogénio 6.2% e nitrogénio 5.2%. O extracto pulverizado tipicamente contém 34–35% de hidrato de carbono solúvel (91– 93%  $\beta$ -glucana), 28–35% proteína, ~7% humidade, 6–7% cinzas, e os resíduos são açúcares livres e amino ácidos. D-glucose é o principal monossacarídeo presente além de fucose, galactose, manose e xilose. Apresenta ligações glicosídicas  $\alpha$ -1,4 e  $\beta$ -1,3 na porção do polissacarídeo (Cui & Chisti, 2003).

O PSP apareceu no mercado cerca de 10 anos após o PSK. PSP é usado para estimular as funções de imunidade antes ou após aos tratamentos operatórios de cancro e para auxiliar a imunidade durante o tratamento do cancro. D-glucose é o principal monossacarídeo presente, no entanto também existem raminose e arabinose. A porção polissacarídica é altamente ramificada. A Figura 1.22 mostra o produto PSP comercializado.



Figura 1.22 – PSP comercializado pela *JHS Natural Products*.

O Coriolus VPS é um produto de *T. versicolor* também comercializado pela *JHS Natural Products* e é utilizado na América do Norte. Quando comparado com outros produtos, tem uma maior concentração de polissacarídeos activos. A Figura 1.23 mostra o produto comercializado. Segundo a *JHS Natural Products*, o Coriolus VPS contém compostos mais valiosos e mais difíceis de se obter, encontrados na parede e no micélio de *T. versicolor* (JHS Natural Products, 2005).



Figura 1.23 - VPS comercializado pela *JHS Natural Products*.

## 1.5 – Planeamento de experiências e modelação matemática

### 1.5.1 Planeamento factorial a dois níveis

O planeamento de experiências é uma ferramenta importante para se determinar quais os factores (variáveis) que são importantes num determinado processo, assim como os seus limites inferior e superior e as suas interacções, obtendo-se informações relevantes para a optimização deste processo.

No planeamento de experiências muitos factores podem ser variados simultaneamente, de acordo com um plano experimental. Através dele, podem-se determinar os factores que exercem maior influência no desempenho de um determinado processo. Existem muitas vantagens do planeamento de experiências quando comparado com outras aproximações estatísticas, como sejam:

- ✓ Habilidade de detectar e estimar as interacções dos factores em estudo;
- ✓ Possibilidade de reduzir o número de testes necessários para se obter informações suficientes;
- ✓ Redução no tempo e custo do processo;
- ✓ Melhoria do processo.

Quando o objectivo principal é optimizar o sistema, ou seja maximizar ou minimizar algum tipo de resposta, uma técnica conveniente a ser utilizada é a metodologia de superfícies de resposta (MSR).

Os métodos estatísticos requerem que as observações sejam variáveis aleatórias distribuídas independentemente, portanto as experiências devem ser realizados de modo aleatório. Qualquer planeamento começa com uma série inicial de experiências com o objectivo de definir os factores e os níveis importantes. Podem-se ter factores qualitativos (tipo de equipamento, operador, catalisador, etc.) e quantitativos (temperatura, concentração, pH do meio, etc.). Os resultados devem ser analisados e devem introduzir-se modificações no planeamento experimental quando necessário. Antes de se iniciar as experiências, os objectivos e os critérios devem estar bem estabelecidos, de modo a permitir a escolha dos factores envolvidos, a faixa de variação dos factores, os níveis escolhidos dos factores e a variável da resposta (Calado & Montgomery, 2003).

O planeamento factorial é uma técnica muito utilizada quando se tem dois ou mais factores independentes. Ele permite uma combinação de todos os factores a todos os níveis, obtendo-se uma análise de um factor, sujeito a todas combinações. Esta técnica é importante para se medirem os efeitos, de um ou mais factores, na resposta de um determinado processo. O usual é realizar um planeamento com dois níveis (um limite máximo e um mínimo) no máximo de três níveis, uma vez que mais factores aumentariam em demasiado o número de pontos experimentais, facto esse que se quer evitar quando se deseja realizar um planeamento. O planeamento factorial é a única maneira de prever a interacção entre os factores estudados. A primeira coisa a fazer num planeamento factorial é determinar quais são os factores e as respostas de interesse para o sistema que se deseja estudar. Dependendo do problema pode haver mais do que uma resposta de interesse. Eventualmente essas repostas também podem ser qualitativas.

Um planeamento factorial requer a execução de experiências para todas as possíveis combinações dos níveis dos factores. A representação de um planeamento factorial em dois níveis é  $2^k$ , onde 2 significa o número de níveis e k o número de factores. Por exemplo: um planeamento factorial com três factores é um  $2^3$  ou seja,  $2 \times 2 \times 2 = 8$  experiências. Um planeamento factorial com apenas dois factores é um  $2^2$  ou seja,  $2 \times 2 = 4$  experiências.

Este tipo de planeamento é de grande utilidade na investigação preliminar, quando se deseja saber se determinados factores têm ou não influência sobre a resposta. São planeamentos simples de se executar e podem ser ampliados, quando se quer conhecer melhor a relação funcional existente entre a resposta e os factores.

#### ***1.5.1.1- Cálculo dos principais efeitos e interacções***

O efeito principal de um factor1 ( $F_1$ ), no caso de um planeamento factorial  $2^2$  (2 factores), é por definição a média dos efeitos (resposta) deste factor1 (nível superior e no nível inferior) nos dois níveis do factor2 ( $F_2$ ). Sendo  $y_i$  a resposta observada no  $i$ -ésimo ensaio, podemos escrever o efeito de  $F_1$  como:

$$F_1 = (1/2) ((y_2 - y_1) + (y_4 - y_3)) \quad (2.2)$$

onde

$y_1$  = resposta de  $F_2$  (no nível superior) no nível inferior de  $F_1$  (+,-)  
 $y_2$  = resposta de  $F_2$  (no nível superior) no nível superior de  $F_1$  (+,+)  
 $y_3$  = resposta de  $F_2$  (no nível inferior) no nível inferior de  $F_1$  (-,-)  
 $y_4$  = resposta de  $F_2$  (no nível inferior) no nível superior de  $F_1$  (-,+)

O resultado mostra que a resposta pode aumentar ou diminuir em  $X$  valores quando  $F_1$  passa de seu nível inferior para seu nível superior.

Se não houvesse interacção, o efeito do  $F_1$  seria o mesmo para os dois níveis do  $F_2$ . Quando as respostas de  $F_1$  são diferentes nos dois níveis de  $F_2$ , significa que ocorre interacção entre os dois factores. O efeito da interacção é dado por  $F_1 \times F_2$  e é dado por:

$$F_1 \times F_2 = (1/2) ((y_4 - y_3) - (y_2 - y_1)) \quad (2.3)$$

As equações 2.2 e 2.3 mostram que tanto os efeitos principais quanto o efeito das interacções são calculados utilizando-se todas as respostas observadas. Cada um dos efeitos é a diferença de duas médias. Metade das observações pertence a uma das médias, enquanto a metade restante aparece na outra média. Não há portanto informações ociosas no planeamento de experiências. Essa é uma importante característica nos planeamentos factoriais a dois níveis (Neto *et al.*, 1995)

### **1.5.1.2 Metodologia de superfície de resposta**

A metodologia de superfície de resposta é uma técnica de optimização baseada no emprego de planeamento factorial. É utilizada quando as variáveis de resposta são influenciadas por muitos factores independentes e o objectivo é optimizar essas respostas.

A primeira etapa no uso da metodologia de resposta é determinar a relação matemática entre a variável de resposta e os factores independentes. A primeira etapa é constituída pela modelação, normalmente feita ajustando-se modelos lineares ou quadráticos a resultados obtidos a partir de planeamentos experimentais factoriais. O deslocamento dá-se sempre ao longo do caminho de máxima inclinação de um determinado modelo, trajectória na qual a resposta varia de forma mais pronunciada.

A relação mais simples é uma recta. Se esse polinómio de menor grau se ajustar bem a resposta, então a função será dada por um modelo chamado de modelo de primeira ordem ou linear:



$$Y = \beta_0 + \beta_1x_1 + \beta_2x_2 + \dots + \beta_kx_k \quad (2.4)$$

onde  $\beta$  são as estimativas dos parâmetros do modelo e  $x$  representam os factores codificados.

O procedimento do uso de superfícies de resposta é sequencial, isto é, quando se está longe do ponto óptimo de resposta, o modelo de primeira ordem ajusta-se bem aos dados. No entanto, quando se quer determinar um ponto óptimo deve-se procurar uma estratégia operacional que leve a isso. Quando se encontra a possível região de óptimo, o modelo de segunda ordem deve ser adoptado. Se houver uma curvatura no sistema então um modelo de segunda ordem ou seja, quadrático deve ser utilizado, e a expressão geral para dois factores será:

$$Y = \beta_0 + \beta_1x_1 + \beta_2x_2 + \beta_{11}x_1^2 + \beta_{22}x_2^2 + \beta_{12}x_1x_2 \quad (2.5)$$

Na metodologia de superfícies de resposta o número de variáveis não é uma restrição nem o número de respostas. Esta metodologia pode ser aplicada a qualquer número de factores independentes e pode modelar simultaneamente várias respostas. Esta característica é importante em muitas situações práticas, principalmente na indústria onde vários critérios têm de ser satisfeitos ao mesmo tempo (Neto *et al.*, 1995).

### 1.5.2 Modelação matemática

Modelos matemáticos são uma ferramenta útil para a optimização da produção e aumento de escala de bioreactores, devido à quantidade de informações quantitativas sobre o rendimento e produtividade da biomassa e produtos. Também desempenham um papel importante na síntese e projecto de sistemas de controlo, além de poderem ser utilizados em simulação do processo.

Os modelos não estruturados constituem uma classe de modelos onde não há qualquer interesse de descrição da estrutura da população a modelar. No caso de uma população microbiana, nada é dito acerca da composição ou qualidade da biomassa. O crescimento é expresso unicamente como sendo o aumento da biomassa. Esse tipo de modelos é usado na descrição de fenómenos de crescimento, em que num dado intervalo

de tempo, todas as propriedades extensivas aumentem com o mesmo factor (Takamatsu *et al.*, 1981).

Utiliza-se modelo estruturado quando a composição da população celular muda significativamente e que esta mudança influencia na cinética de crescimento. No caso da biomassa, esta é compartimentada em pequenos números de componentes. Às vezes estes componentes podem ser um componente sintético (ARN e precursores) e um componente estrutural (ADN e proteínas) ou então um componente assimilatório e um componente sintético (Bailey & Ollis, 1986).

Num modelo descritivo, utiliza-se um ajuste numérico de dados experimentais para fins interpolativos. Deve ser usado somente dentro da região onde o modelo foi testado experimentalmente. Um modelo preditivo tem como finalidade a extrapolação de dados. Existem diferentes tipos de modelos matemáticos para microrganismos filamentosos descritos na literatura. Normalmente, os modelos envolvem a taxa específica de crescimento ( $\mu$ ) como uma função da concentração de substrato (S), produto (P) e biomassa (X). Os modelos descrevem a conversão de substratos em produtos através das concentrações conhecidas dos metabólitos. Em muitos processos, a formação do produto está relacionada com o crescimento da biomassa através da equação de Luedeking–Piret ou suas modificações.

Crescimento e formação de produtos de fungos filamentosos estão associados num processo complexo e não completamente esclarecido. A estrutura multicelular do micélio, a heterogeneidade morfológica e diferenças no comprimento da hifa ao longo da fermentação fazem com que se torne difícil construir modelos matemáticos para fermentações de fungos. Levando-se em conta estas variações no estado da biomassa, características estruturais devem ser adicionadas nos modelos de crescimento e formação de produto (Papagianni, 2004).

#### ***1.5.2.1 Cinética de crescimento microbiano***

Vários modelos cinéticos têm sido descritos para o crescimento de fungos filamentosos incluindo linear, exponencial, logístico e rápida-aceleração/lenta-desaceleração no crescimento. As curvas típicas destes modelos estão mostradas na Figura

1.24. As equações que descrevem estes modelos estão apresentadas na Tabela 1.2 (Ikasari & Michell, 2000).

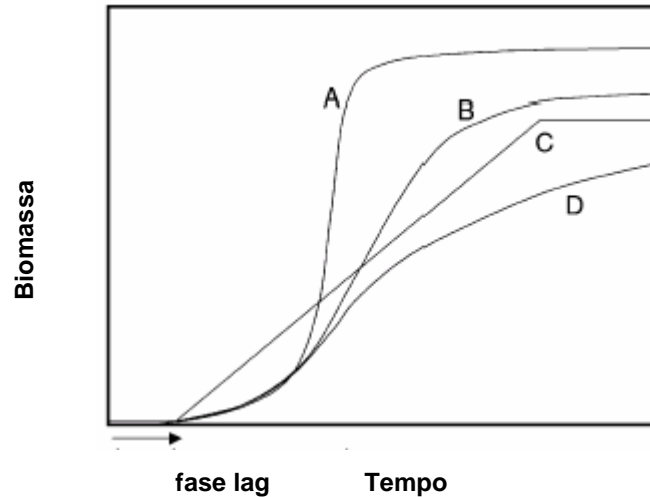


Figura 1.24 – Vários perfis cinéticos de crescimento: (A) exponencial; (B) logístico; (C) linear; (D) rápida-aceleração/lenta-desaceleração (Adaptado de Mitchell *et al.*, 2004)

Tabela 1.2 – Formas diferencial e integrada de várias equações de crescimento<sup>a</sup>

	Forma diferencial		Forma integrada	
Linear	$\frac{dX}{dt} = K$	(2.6)	$X = Kt + X_0$	(2.10)
Exponencial	$\frac{dX}{dt} = \mu X$	(2.7)	$X = X_0 e^{\mu t}$	(2.11)
Logística	$\frac{dX}{dt} = \mu X \left(1 - \frac{X}{X_m}\right)$	(2.8)	$X = \frac{X_m}{1 + ((X_m / X_0) - 1)e^{-\mu t}}$	(2.12)
Duas fases	$\frac{dX}{dt} = \mu X, t < t_a$	(2.9a)	$X = X_0 e^{\mu t}, t < t_a$	(2.13a)
	$\frac{dX}{dt} = [\mu L e^{-K(t-t_a)}] X,$ $t \geq t_a$	(2.9b)	$X = X_A \exp\left[\frac{\mu L}{K} (1 - e^{-K(t-t_a)})\right],$ $t \geq t_a$	(2.13b)

<sup>a</sup> X é a biomassa microbiana, t é o tempo, K é a taxa linear de crescimento, μ é a taxa específica de crescimento, X<sub>0</sub> é a biomassa inicial, X<sub>m</sub> é a máxima possível biomassa, t<sub>a</sub> é o tempo quando se inicia a fase de desaceleração do crescimento, L é a razão entre a taxa específica de crescimento no início da fase de desaceleração e a taxa específica de crescimento na fase exponencial e k é ia taxa específica do decaimento exponencial (Mitchell *et al.*, 2004).

Quando a cinética de crescimento é directamente proporcional à concentração da biomassa, traduz-se pela seguinte equação:

$$\mu = \frac{1}{X} \frac{dX}{dt} \quad (2.14)$$

Esta equação é válida para meios definidos, nos quais a taxa específica de crescimento durante a fase exponencial apresenta um valor constante para um dado microorganismo em determinadas condições de fermentação.

A tradução matemática da dependência de  $\mu$  com diversos factores (substrato, biomassa, produto, etc.) tem originado os mais diversos modelos. O proposta de Monod (1942) para a taxa específica de crescimento é o mais conhecido e utilizado nas áreas de biotecnologia e microbiologia. Não inclui o efeito das diferenças entre as células, nem as alterações da composição celular. Ele representa a dependência de  $\mu$  com a concentração de um substrato limitante e tem a forma de uma equação hiperbólica:

$$\mu = \frac{\mu_{max} S(t)}{K_s + S(t)} \quad (2.15)$$

onde  $\mu_{max}$  é a taxa específica de crescimento máxima,  $K_s$  é o parâmetro de afinidade do microorganismo com o substrato (constante do substrato) e  $S$  a concentração do substrato. Quanto maior a constante do substrato menor é a sua afinidade.

O trabalho de Ikasari & Mitchel (2000) desenvolveu o crescimento de um fungo filamentoso em fermentação semi-sólida considerando duas fases de crescimento, conforme mostrado nas equações 2.9a e 2.9b. Neste modelo cinético, a fase exponencial de crescimento é seguida por uma fase de desaceleração no crescimento. A parte entre parênteses da equação 2.10a representa a taxa específica de crescimento durante a fase de desaceleração, que diminui devido a dois factores. Primeiro uma repentina desaceleração é assumida no instante em que termina a fase exponencial para iniciar a fase de desaceleração com o parâmetro  $L$ . Segundo, a posterior desaceleração é seguida por um decaimento exponencial do crescimento, descrito pelo termo  $K$ .

### 1.5.2.2 Modelos para a formação do produto – A taxa específica de produção

O crescimento de microorganismos é muitas vezes acompanhado pela formação de produtos. Essa formação pode estar associada ou não ao crescimento. Os produtos podem estar solúveis na cultura, podem emergir numa forma gasosa ou ser um componente celular não excretado. Neste caso, há necessidade de ruptura e extracção nas células.

A formação do produto pode ocorrer de três formas diferentes:

- a) associada ao crescimento: ocorre quando o produto é formado juntamente com o crescimento celular (metabolito primário);
- b) dissociada do crescimento: ocorre quando o produto só começa a formar-se no fim da fase exponencial de crescimento (metabolito secundário);
- c) cinética mista: ocorre quando o produto começa a se formar a meio da fase exponencial de crescimento.

Segundo o modelo de Pirt (1975), o produto está associado ao metabolismo energético como catabolito da fonte de substrato limitante. Este considera que a fonte de carbono limitante é utilizada para a formação de produto, para a formação de biomassa e para a manutenção celular. O modelo relaciona a taxa específica de consumo de substrato ( $q_s$ ) com a taxa específica de formação de produto ( $q_p$ ), conforme a equação abaixo:

$$q_p = Y_{P/S} q_s = \frac{Y_{P/S}}{Y_{X/S}} \mu + Y_{P/S} m \quad (2.16)$$

O modelo também relaciona a formação de produto com o crescimento dizendo que a formação de produto por unidade de tempo é função da taxa específica de formação deste produto e da concentração da biomassa.

$$\frac{dP}{dt} = q_p X \quad (2.17)$$

O modelo de Luedeking e Piret (2000) é um modelo muito útil pois relaciona todas as situações reais. Ele é baseado na seguinte equação:

$$\frac{dP}{dt} = \alpha \frac{dX}{dt} + \beta X \quad (2.18)$$

onde  $\alpha$  é a constante associada ao crescimento e  $\beta$  é a constante não associada ao crescimento e sim com a concentração de biomassa. Dividindo toda a equação pela concentração de biomassa vem:

$$\frac{1}{X} \frac{dP}{dt} = \alpha \mu + \beta \quad (2.19)$$

## **Capítulo 2 - Materiais e Métodos**

### **2.1 Microorganismo e condições de manutenção**

Este trabalho foi realizado com o fungo da podridão branca da madeira, *Trametes versicolor* obtido pelo Instituto Nacional de Engenharia, Tecnologia e Inovação (INETI, Portugal). Manteve-se a cultura estoque (mãe) em placas de Petri com o meio sólido Tien and Kirk, TaK (Tien & Kirk, 1988). Armazenou-se a cultura a 4 °C e mensalmente transferiu-se para uma nova placa. Fez-se a transferência através de um pequeno corte (com uma ansa previamente estéril) do meio sólido juntamente com o fungo crescido para uma nova placa de crescimento. A composição do meio de cultura TaK está descrita na Tabela 2.1. O fungo crescido em placa de Petri durante 7 dias é mostrado na Figura 2.1. Utilizou-se este meio de manutenção nos ensaios de produção enzimática e de produção do EPS.



Figura 2.1 – *Trametes versicolor* após 7 dias de crescimento em placa de Petri.

Tabela 2.1 – Composição do meio de cultura Tien & Kirk

Nutriente	Concentração (g/L)	
	Meio líquido	Meio sólido
Glucose	10	10
Extracto de malte	10	10
Peptona	2	2
Extracto de levedura	2	2
Asparagina	1	1
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2	2
Tiamina	0.001	0.001
MgSO <sub>4</sub>	1	1
Agar	-	20

## 2.2 Preparação do inóculo para culturas líquidas

Para a preparação do inóculo, fez-se uma cultura de *T. versicolor* crescida durante 7 dias em placas de Petri contendo o meio sólido Tak. Adicionaram-se 10,0 mL do meio de cultura específico em cada placa de Petri. Com uma ansa de inoculação previamente estéril, removeu-se o micélio crescido no meio sólido e suspendeu-se no meio líquido. Transferiu-se a suspensão de micélios da placa para um matraz, a fim de obter-se uma suspensão concentrada de micélios, o inóculo. Usaram-se determinações de peso seco, descritas seguidamente, para determinar a concentração da suspensão. Filtrou-se 8,0 mL desta suspensão de micélios em papel de filtro de fibra de vidro (GF/C, 0.45 µm), colocou-se o papel de filtro numa lâmpada de infravermelho durante 2 h. Determinou-se a concentração da suspensão e calculou-se o volume de inóculo necessário para se obter uma concentração inicial de 70 mg/L de micélios. Para se garantir a homogeneidade da suspensão, realizaram-se testes preliminares, fazendo-se várias réplicas da mesma suspensão e os respectivos pesos secos e o erro obtido foi inferior a 15%. Usou-se este método de inoculação em todas as experiências deste trabalho nos meios de cultura específicos utilizados.



## **2.3 Fermentações com *Trametes versicolor* para a produção enzimática**

### **2.3.1 Meio de produção enzimática**

Para a produção da lacase em matraz e em bioreactor utilizou-se o meio definido para *Trametes* (MDT) (Roy & Archibald, 1993) com algumas modificações que serão definidas posteriormente, consoante o tipo de experiência a ser realizada. A composição do meio MDT é apresentada na Tabela 2.2. Também se inclui na composição deste meio 1,0 mL/L da solução de elementos vestigiais apresentada na Tabela 2.2. Neste trabalho adicionou-se Tween 80 (0.5% m/v) para estimular a excreção da enzima. Nas fermentações sem controlo de pH, o pH do meio de cultura foi ajustado em 5.0 antes de ser autoclavado. A glucose foi autoclavada separadamente para evitar reacção de Maillard (formação de produtos castanhos, Crueger & Crueger, 1990). Todos os meios de cultura, soluções e materiais foram esterilizados a 120°C durante 20 minutos.

Tabela 2.2 – Composição do meio de cultura MDT

Composição do meio MDT		Composição da solução de elementos vestigiais do meio MDT	
Nutriente	Concentração (mM)	Nutriente	Concentração (µM)
Glucose	83	FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	20
Glutamina	5	CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	2
NaCl	5	ZnCl <sub>2</sub>	5
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	5	CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	6
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	1	NiCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0.1
CaCl <sub>2</sub>	0.1	MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	20
2,2-dimetilsuccinato	10	(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> MO <sub>7</sub> O <sub>24</sub> .4H <sub>2</sub> O	0.5

### **2.3.2 Fermentações em matraz**

Para otimizar a produção da lacase, fizeram-se modificações no meio de cultura MDT. Variou-se a concentração inicial de glucose, adicionaram-se diferentes indutores e empregou-se a estratégia da limitação por carbono. Estas modificações estão mais detalhas nos tópicos abaixo e na Tabela 2.3. Para cada experiência, determinou-se a proteína total, o valor de pH do meio de cultura, actividade da lacase, concentração de glucose e concentração final de biomassa.

Realizaram-se as fermentações em matraz de 500 mL com 250 mL de meio de cultura. Introduziram-se os frascos numa câmara de incubação a 28°C com agitação orbital de 180 rpm durante 12 dias.

#### ***2.3.2.1 Estudo do efeito da concentração inicial de glucose***

Modificou-se a concentração inicial de glucose do meio MDT para as seguintes concentrações: 0, 1.5, 2, 3, 5 e 9 g/L. 2.5-xilidina (30µM) foi adicionada como indutor da lacase ao terceiro dia de fermentação.

#### ***2.3.2.2 Estudo do efeito da adição de cobre***

Adicionou-se CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O ao meio MDT obtendo-se concentrações de 2.5, 16.0, 75.0 e 150 µM no primeiro dia da experiência para testar o seu efeito como micronutriente e no terceiro dia da experiência para testar o seu efeito como indutor da lacase. A concentração de 75.0 µM como micronutriente foi seleccionada para as experiências posteriores com o meio MDT.

#### ***2.3.2.3 Fermentações com diferentes indutores***

Para se avaliar o efeito da adição de indutores na produção da lacase, 2.5-xilidina (30µM), uma mistura fenólica (450 mg/L) e etanol (20 e 40 g/L) foram testados no meio MDT, para além do cobre em diferentes concentrações (já descrito em 2.3.2.2). A mistura

fenólica era composta por 150 ppm (1:1:1 mg/L) dos seguintes corantes: *Procion Orange* MX-2R, *Remazol Red* 3B e *Remazol Black* GF. Três experiências foram realizadas com estes indutores:

1. adição de xilidina ao terceiro dia;
2. adição de xilidina ao terceiro dia e de cobre (75.0  $\mu$ M) ao primeiro dia;
3. adição de xilidina e mistura fenólica ao terceiro dia e de cobre (75.0  $\mu$ M) ao primeiro dia.

#### ***2.3.2.4 Fermentações com limitação por carbono***

Nos estudos com limitação por carbono a glucose foi removida do meio MDT após 3 dias de cultivo. Ao terceiro dia, o meio de cultura foi filtrado esterilmente em papel de fibra de vidro (GF/C, 0.45  $\mu$ m) sob vácuo e a biomassa retida no filtro foi transferida para um novo meio MDT sem glucose. As três experiências realizadas no item 2.3.2.3 foram também realizadas com limitação por carbono.

#### ***2.3.2.5 Testes de estabilidade da lacase***

O efeito do pH na estabilidade da lacase foi avaliado para pH 3.0 e pH 4.5. Uma amostra do meio de cultura, ao final da fermentação, com uma actividade de lacase inicial de 2500 U/L foi colectada. Esta amostra foi então incubada a 28 °C durante 3 dias em tampão citrato/fosfato (0.05 mM/0.1 mM) com um pH de 3.0 e também com um pH de 4.5. A actividade da lacase remanescente foi medida a cada dia nas condições padrões.

Tabela 2.3 – Condições de cultura para a produção de lacase por *Trametes versicolor* em matraz

Fonte de carbono		Indutores		
Glucose (g/L)	Cobre ( $\mu\text{M}$ )	Cobre ( $\mu\text{M}$ )	Xilidina (mM)	Mistura fenólica (mg/L)
9.0	-	-	-	-
-	-	-	30.0	-
1.5	-	-	30.0	-
3.0	-	-	30.0	-
5.0	-	-	30.0	-
9.0	-	-	30.0	-
9.0	2.5	-	-	-
9.0	16.0	-	-	-
9.0	75.0	-	-	-
9.0	150.0	-	-	-
9.0	-	2.5	-	-
9.0	-	16.0	-	-
9.0	-	75.0	-	-
9.0	-	150.0	-	-
9.0	-	75.0	30.0	-
-	-	75.0	30.0	-
9.0	-	75.0	30.0	450.0
-	-	75.0	30.0	450.0

### **2.3.3 Fermentações em Bioreactor**

As fermentações foram efectuadas no bioreactor BIOLAB, B. BRAUN (capacidade de 1L) operado em descontinuo. O bioreactor apresenta controlo de temperatura, a qual foi mantida a 28°C através de uma resistência de aquecimento, agitação mecânica e controlo de pH. O arejamento fez-se através de uma alimentação contínua de ar comprimido filtrado num filtro estéril com porosidade de 0.2 µm. Nas experiências com controlo de pH, a fermentação foi monitorada continuamente com eléctrodo de pH, e o pH foi mantido em 5 por adição automática (através de duas bombas peristálticas) com uma solução de NaOH 1M ou com uma solução de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 1M.

Inoculou-se o fermentador com biomassa crescida durante três dias em matraz (o crescimento da biomassa em matraz fez-se de acordo com o item 2.2). Adicionou-se 2.5-xilidina (concentração final de 30.0 µM) juntamente com o inóculo. As experiências decorreram durante 9 dias e o volume de trabalho foi de 1.0 L. Retiraram-se cerca de 5 mL de amostra com seringas estéreis em cada dia e removeram-se os vestígios de células e fragmentos celulares das amostras por filtração sob vácuo com papel de fibra de vidro ou por centrifugação numa centrifuga *Ependorff* a 10000 rpm durante 10 minutos. Determinaram-se a actividade da lacase, o pH do meio (nas experiências sem controlo de pH), a concentração de glucose, a proteína total e no fim do ensaio a concentração da biomassa final.

As experiências no bioreactor foram realizadas com base no planeamento experimental que está descrito no item a seguir. Neste planeamento analisou-se o efeito da concentração inicial de glucose, o efeito do controlo de pH do meio e o efeito da agitação na actividade da lacase.



Figura 2.2- Bioreactor usado na produção da lacase por *Trametes versicolor*.

### 2.3.3.1 Planeamento factorial para a produção de lacase em bioreactor

Para otimizar a produção da lacase em bioreactor utilizou-se o planeamento experimental ( $2^3$ ) sem repetição, com dois níveis e três variáveis (Box *et al.*, 1978) perfazendo um total de 8 experiências. Neste planeamento experimental escolheram-se três factores: controlo de pH do meio de cultura, concentração inicial de glucose e agitação. Os factores estudados para avaliar a produção da lacase e seus respectivos níveis estão apresentados na Tabela 2.4. Os sinais (-1) e (+1) representam os níveis inferior e superior dos factores, respectivamente. A concentração inicial de glucose apresenta um limite inferior de 0 g/L e um limite superior de 9 g/L (a concentração dos outros componentes do meio MDT permanece constante), a agitação apresenta um limite inferior de 100 rpm e um limite superior de 180 rpm. Para o pH este estudo foi qualitativo, considerando-se o limite inferior o não controlo de pH (pH permanece em  $\pm 3.0$ ) e o limite superior o controlo de pH em 5.0. A matriz do planeamento experimental encontra-se na Tabela 2.5. Os resultados foram analisados estatisticamente de acordo com o planeamento pré-estabelecido a fim de verificar-se qualitativamente o efeito dos factores e suas interações

na produção da lacase. Os cálculos dos principais efeitos e das interações entre os factores, a análise estatística e os gráficos foram realizados com o *software* estatística version 5.5 (StatSoft, inc.), considerando-se os níveis de significância de 10%. A resposta do planeamento foi a máxima actividade da lacase. Os resultados foram expressos em gráficos de superfície de resposta, gráfico de pareto, gráfico de valor observado *vs* valor previsto, assim como na tabela de análise de variância (ANOVA).

As experiências foram realizadas de forma aleatória. A melhor condição para a produção da lacase, estimada pela MSR, foi realizada experimentalmente a fim de se confirmar os resultados previstos.

A equação (2.1) descreve o modelo de regressão utilizado no planeamento factorial com 3 variáveis e inclui os termos de interacção:

$$\hat{Y} = \beta_0 + \beta_1 x_G + \beta_2 x_{pH} + \beta_3 x_A + \beta_{12} x_G x_{pH} + \beta_{13} x_G x_A + \beta_{23} x_{pH} x_A \quad (2.1)$$

onde:

$\hat{Y}$  a resposta, *i.e.* a produção da lacase;

$x_G$ ,  $x_{pH}$  e  $x_A$  as variáveis independentes.

e os coeficientes da regressão são:

$\beta_0$  o termo de interceptação;

$\beta_1$ ,  $\beta_2$  e  $\beta_3$  os coeficientes dos efeitos lineares;

$\beta_{12}$ ,  $\beta_{13}$ ,  $\beta_{23}$  os coeficientes dos efeitos de interacção.

Tabela 2.4 - Factores e níveis estudados no planeamento factorial  $2^3$

Factores	Níveis	
	(-1)	(+1)
Concentração de glucose g/L (G)	0	9
Controlo de pH (pH)	sem	com
Agitação rpm (A)	100	180

Tabela 2.5 – Matriz do planeamento de experiências 2<sup>3</sup>

Experiência	Factores Originais			Factores Codificados		
	A (rpm)	pH	G (g/L)	A (rpm)	pH	G (g/L)
F1	180	sem	0	+	-	-
F2	100	com	0	-	+	-
F3	180	sem	9	+	-	+
F4	180	com	9	+	+	+
F5	100	sem	0	-	-	-
F6	180	com	0	+	+	-
F7	100	sem	9	-	-	+
F8	100	com	9	-	+	+

### 2.3.3.2 Modelação matemática da produção de lacase em bioreactor

Para fazer a modelação matemática em bioractor foi necessário realizar experiências em matraz uma vez que não foi possível determinar a concentração de biomassa ao longo da fermentação em bioreactor. Este fungo quando se encontra em meio líquido apresenta-se como *pellets* fazendo com que a cultura não seja homogénea o que não permite a determinação directa da concentração da biomassa. Fizeram-se as fermentações em 12 matrizes, onde cada matraz correspondeu a 1 dia de fermentação, ou seja, cada matraz representou a biomassa de 1 dia de crescimento do fungo. Cada dia, 1 matraz foi retirado do agitador e o meio de cultura foi filtrado em papel de fibra de vidro sob vácuo e a biomassa retida no filtro foi medida por peso seco. De acordo com as experiências do bioreactor foi necessário realizar 2 fermentações em matraz: a primeira com glucose no meio e a segunda com supressão de glucose.

Os modelos da fermentação em bioreactor foram baseados nos parâmetros de crescimento estimados a partir das fermentações em matraz. Para determinar os parâmetros em matraz, o modelo de crescimento descrito por Mitchell (Mitchell *et al.*, 2000) para crescimento de fungos filamentos em fermentações semi-sólida foi utilizado. Os



parâmetros de crescimento da biomassa foram determinados de acordo com as equações 2.2 e 2.3. Este modelo considera duas fases de crescimento. A primeira, uma fase exponencial, que é descrita pela equação de Monod (eq. 2.2a). A segunda, uma fase de desaceleração no crescimento, que é representada pela equação de Mitchell (eq. 2.2b). O consumo de substrato e produção da enzima são representados pelas equações 2.3 e 2.4, respectivamente. A produção de lacase foi considerada como sendo parcialmente associada ao crescimento, e utilizou-se o modelo de Luedeking e Piret (Luedeking & Piret, 2000) para descrever.

$$\frac{dX}{dt} = \left( \frac{\mu_{\max} S}{(K_s + S)} \right) X \quad \text{para } t < t_a \quad (2.2a)$$

$$\frac{dX}{dt} = \left( \frac{\mu_{\max} S}{K_s + S} \right) (Le^{-k(t-t_a)}) X \quad \text{para } t \geq t_a \quad (2.2b)$$

$$-\frac{dS}{dt} = \frac{1}{Y_{X/S}} \frac{dX}{dt} \quad (2.3)$$

$$\frac{dP}{dt} = \alpha \frac{dX}{dt} + \beta X \quad (2.4)$$

onde

$X$ : biomassa (g/L)

$S$ : substrato (g/L)

$t$ : tempo (dias)

$t_a$ : tempo do fim da fase exponencial (dia 3),

$\mu_{\max}$  taxa específica de crescimento máxima (d<sup>-1</sup>)

$K_s$ : constante de saturação (g/L)

$L$ : factor de sobrevivência

$K$ : constante de decaimento exponencial (d<sup>-1</sup>)

$\alpha$ : constante associada ao crescimento (U/g)

$\beta$ : constante não associada ao crescimento (U g<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>)

Os parâmetros calculados para a fermentação em matraz foram usados como constantes nas equações descritas no modelo do bioreactor. Nestas equações acrescentou-se o parâmetro  $A$  que representa a mudança ambiental do matraz para o bioreactor.

O modelo da produção de lacase, do crescimento de biomassa e de consumo de substrato em bioreactor está representado pelas equações 2.5-2.8.

$$\frac{dX}{dt} = A \left( \frac{\mu_{\max} S}{K_S + S} \right) X \quad \text{para } t < t_a \quad (2.5)$$

$$\frac{dX}{dt} = A \mu_{\max} \left( \frac{S}{K_S + S} \right) (L e^{-k(t-t_a)}) X \quad \text{para } t \geq t_a \quad (2.6)$$

$$-\frac{dS}{dt} = \frac{1}{Y_{X/S}} \frac{dX}{dt} \quad (2.7)$$

$$\frac{dP}{dt} = K_1 e^X - K_2 P \quad (2.8)$$

onde,

$K_1$ : taxa de síntese da lacase (U por g cel por dia)

$K_2$ : taxa de decaimento da lacase ( $\text{dia}^{-1}$ )

As equações diferenciais foram resolvidas usando o programa MATLAB (The Mathworks Inc.). Os parâmetros  $\mu_{\max}$ ,  $K_S$ ,  $Y_{X/S}$ ,  $K$ ,  $L$ ,  $A$ ,  $K_1$  e  $K_2$  foram estimados com o programa MATLAB *Optimization Toolbox* através da minimização do quadrado dos resíduos entre os dados experimentais e os modelados, usando a função objectiva mostrada na equação (2.9). Os programas utilizados encontram-se no anexo 5. Utilizou-se o método Simplex-Nelder & Mead no procedimento de otimização. Os erros experimentais foram estimados em 10% através das replicatas realizadas no shaker. A significância estatística dos parâmetros estimados foi determinada pelo *test t-student* com um intervalo de confiança de 90%.

$$\text{Minimize} \sum_i^{ne} \sum_j^{np} ([X]_{\text{exp}} - [X]_{\text{mod}})^2 + ([S]_{\text{exp}} - [S]_{\text{mod}})^2 + ([P]_{\text{exp}} - [P]_{\text{mod}})^2 \quad (2.9)$$

onde,

$np$ : número de parâmetros

$ne$ : número de experiências

subscrito *exp*: dados experimentais

subscrito *mod*: dados modelados

### **2.3.4 Métodos analíticos**

#### ***2.3.4.1 Determinação do consumo de substrato pelo método DNS***

Determinou-se a concentração de substrato (glucose) quantificando a redução do ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) por reacção com os açúcares redutores, o que se detecta por mudança de cor, ou seja, por variações da absorvância no visível ( $\lambda=540$  nm) (Miller, 1959).

A 1.0 mL de amostra devidamente diluída adicionou-se 1.0 mL de reagente de DNS. Agitou-se no vortex e aqueceu-se a mistura em banho-maria (água a ferver) durante 5.0 minutos. Após este tempo, colocou-se o tubo contendo a mistura em banho gelado. Adicionaram-se 10.0 mL de água destilada, agitou-se o tubo e leu-se a absorvância a 540 nm.

Para a realização da curva de calibração (Anexo 1) procedeu-se do mesmo modo, substituindo a amostra por soluções de glucose de concentração conhecida (0.10-1.00 g/L).

#### ***2.3.4.2 Determinação da actividade da Lacase***

Mediu-se a actividade da lacase nos meios fermentados através da oxidação do ABTS pela enzima tal como descrito por Ander e Messner, 1998. Adicionaram-se 100  $\mu$ L de extracto enzimático ao tampão citrato/fosfato (0,05M/0,1M, pH 4.5) com ABTS (0,4 mM), que estavam previamente termostatizados a 40°C durante 15 min., perfazendo um volume final de 2.0 mL.

A actividade da lacase é determinada através da taxa de formação do produto da oxidação do ABTS pela enzima em espectrofotómetro (Jenway 6405 UV/VIS) a 420nm. O radical catiónico do ABTS possui um coeficiente de extinção molar ( $\epsilon$ ) a 420 nm de 36 000  $M^{-1}cm^{-1}$ . Uma unidade de lacase corresponde à quantidade de enzima existente que oxida 1  $\mu$ mol de substrato por minuto. Para a conversão de abs/s em U/L efectua-se o seguinte cálculo através da equação 2.10:

$$\frac{U}{L} = \frac{\Delta \text{Abs} \times 60 \times f_{\text{dil.}} \times 10^6}{\epsilon} \quad (2.10)$$

**onde,**

$\Delta \text{Abs}$ : valor medido no espectrofotómetro

60: conversão de segundo para minuto

$f_{\text{dil.}}$ : factor de diluição da amostra

$10^6$ : conversão de  $\mu\text{L}$  para L

$\epsilon$ : coeficiente de extinção molar ( $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ )

#### **2.3.4.3 Determinação da actividade da Manganês peroxidase (MnP)**

Mediu-se a actividade da MnP por 2 métodos. No primeiro, a actividade foi determinada seguindo a variação da densidade óptica resultante da formação do complexo malonato- $\text{Mn}^{3+}$  a 270 nm, com 50 mM de tampão malonato de sódio pH 5.2, 0.2 mM de  $\text{MnSO}_4$  e 0.1 mM de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , com um coeficiente de extinção molar de  $11.59 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$  (Addleman *et al.*, 1993). No segundo, a actividade foi determinada medindo a oxidação do vermelho de fenol por variação da densidade óptica a 431 nm. A mistura reaccional continha 0.2mM de  $\text{MnSO}_4$ , 0.1 mM de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , tampão malonato de sódio pH 4.5, 50 mM e 0.067 mM de vermelho de fenol, com um coeficiente de extinção molar de  $22751\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  (Roy & Archibald, 1993).

#### **2.3.4.4 Determinação da actividade celulásica total**

Este método quantifica os açúcares redutores libertados por hidrólise enzimática da celulose (Mandels *et al.* 1976).

Num tubo de ensaio colocou-se 1.0 mL de tampão citrato 0.05M pH4.8 e uma tira de papel equivalente nº1. Adicionou-se 0.5 mL da amostra de extracto enzimático. Incubaram-se os tubos de ensaio durante 1h a 50 °C. Em seguida, adicionou-se 1.0 mL do reagente de DNS. Colocaram-se os tubos num banho de água a ferver por 5 min. e em seguida adicionaram-se 10.0 mL de água destilada. Mediu-se a absorvância a 540 nm. Uma

unidade de actividade enzimática corresponde à quantidade de enzima que liberta 1 mmol de açúcar redutor por minuto.

#### **2.3.4.5 Determinação da proteína total pelo método de Folin-Lowry**

Este método baseia-se na reacção do “biureto” das proteínas com o cobre, em condições fortemente alcalinas, com a formação dum complexo entre o cobre e os aminoácidos aromáticos das proteínas, o qual é reduzido a um heteropolímero azul, por adição do ácido fosfomolibdicofosfotúngstico. Desta reacção resulta a coloração azul intensa (Haris & Angal, 1989) que pode ser quantificada espectrofotometricamente a 750 nm. Este método é sensível a concentrações de proteína acima de 0.25 mg mL<sup>-1</sup>.

Reagentes *stock*: **A** - 1% m/v de sulfato de cobre (CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O);

**B** - 2% m/v de tartarato de sódio potássio;

**C** - 0.2M de hidróxido de sódio;

**D** - 4% m/v de carbonato de sódio.

A 49.0mL do reagente C adicionam-se 49.0mL do reagente D, 1.0 mL do reagente A e 1.0 mL do reagente B. Estes formam o reagente **F**, a solução cobre-alcalina, extemporânea.

O reagente **E** é obtido por adição de 10.0mL do reagente Folin-Ciocalteu a 10.0mL de água. A 0.50mL de amostra, adicionaram-se 2.5 mL de reagente **E** deixando reagir durante 10 minutos. De seguida, adicionaram-se 0.25mL de reagente **F** ficando 30 minutos a reagir. A proteína total foi determinada pela conversão da absorvância a 750 nm contra um branco (0.5 mL de tampão da amostra em lugar da própria amostra) pela recta de calibração respectiva (Anexo 2).

Para a realização da curva de calibração procedeu-se do mesmo modo, substituindo a amostra por soluções de proteína (BSA) de concentração conhecida.

#### **2.3.4.6 Determinação da biomassa**

Calculou-se a concentração da biomassa por determinação do peso seco. No fim de cada experiência filtrou-se o meio de cultura em filtros de microfibras de vidro (GF/C, 0.45

µm) sob vácuo. A biomassa retida no filtro foi seca em estufa a 104 °C durante 72 h. Ao fim desse período, os filtros foram arrefecidos num exsiccador durante 2 a 3 horas e só depois pesados. O peso seco final da biomassa fez-se por subtracção do peso da membrana seca ao peso da membrana com a biomassa. Esse método quantifica todas as células e é indicado para meios com altas concentrações celulares e para fungos filamentosos.

#### **2.3.4.7 Determinação do pH**

Fez-se a determinação do pH do meio de cultura através de um medidor de pH (Crison, micropH 2000), previamente calibrado com soluções tampão conhecidas (pH = 4 e pH = 7).

## **2.4 Aplicação da lacase na pasta kraft**

### **2.4.1 Preparação da pasta kraft**

As experiências de branqueamento da pasta de papel foram realizadas com pasta kraft de *Eucalyptus globulus* fornecida pela indústria papeleira PORTUCEL, Cacia, Portugal. A pasta apresentava um índice kappa de 12.4 e viscosidade intrínseca de 1180 cm<sup>3</sup>g<sup>-1</sup>.

Em todas as experiências, antes do branqueamento, a pasta kraft seca foi impregnada em água destilada durante uma noite. Acertou-se o pH em 4.5 utilizando uma solução de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0.8 M) e em seguida filtrou-se a pasta sob vácuo para posterior utilização no branqueamento.

### **2.4.2 Produção da lacase**

A lacase utilizada nas experiências de branqueamento da pasta foi produzida em matraz ou em bioreactor nas condições optimizadas. Utilizou-se uma concentração de 6U de lacase por g de pasta.

### 2.4.3 Mediadores utilizados

Os mediadores utilizados no branqueamento da pasta de papel encontram-se na Tabela 2.6. Os mediadores orgânicos (Tabela 2.6) utilizados foram reagentes comerciais, fornecidos pela Aldrich Chem. Comp. (Madrid). Os polioxometalatos foram sintetizados em laboratório. Os métodos de síntese dos polioxometalatos estão descritos por Gamelas *et al.* (2005).

Tabela 2.6 – Mediadores utilizados no branqueamento da pasta kraft.

Mediadores inorgânicos (POM)	Mediadores orgânicos
$[\text{SiW}_{11}\text{Mn}^{\text{III}}(\text{H}_2\text{O})\text{O}_{39}]^{5-}$ ou $(\text{SiW}_{11}\text{Mn}^{\text{III}})^*$	ABTS
$[\text{PW}_{11}\text{Mn}^{\text{III}}(\text{H}_2\text{O})\text{O}_{39}]^{4-}$ ou $(\text{PW}_{11}\text{Mn}^{\text{III}})^*$	HBT
$[\text{SiW}_{11}\text{V}^{\text{V}}\text{O}_{40}]^{5-}$ ou $(\text{SiW}_{11}\text{V}^{\text{V}})^*$	TEMPO
$[\text{BCo}^{\text{III}}\text{W}_{11}(\text{H}_2\text{O})\text{O}_{35}]^{6-}$ ou $(\text{BW}_{11}\text{Co}^{\text{III}})^*$	Ácido violúrico
$(\text{PW}_9)_2\text{Mn}^{\text{III}}\text{O}_{54}$ ou $(\text{PW}_9)_2\text{Mn}^{\text{III}}^*$	
$[\text{SiCo}^{\text{III}}\text{W}_{11}(\text{H}_2\text{O})\text{O}_{39}]^{5-}$ ou $(\text{SiW}_{11}\text{Co}^{\text{III}})^*$	

\* Forma abreviada do POM

### 2.4.4 Branqueamento da pasta kraft em reactor

As experiências de branqueamento foram realizadas num reactor PARR modelo 4843 com 250 mL de volume total, equipado com um sistema automático de controlo de temperatura, pressão e agitação mecânica. O reactor e o controlador podem ver-se na Figura 2.3. A velocidade de agitação foi mantida constante. Em todas as experiências, adicionou-se um tampão fosfato ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) de pH 4.5 com uma concentração final de 0.1M. A pasta kraft (7.2g à base de pasta seca), a lacase, os mediadores e a solução tampão fosfato foram introduzidos no reactor à temperatura ambiente, com um volume final de trabalho de 113 mL. O reactor foi pressurizado com oxigénio. O tempo requerido para atingir a temperatura de trabalho não foi contabilizado no tempo de branqueamento. No final da reacção, o reactor foi rapidamente arrefecido com água fria, a pasta kraft filtrada

sob vácuo e neste filtrado analisou-se a actividade da lacase. Finalmente a pasta foi lavada com sucessivas adições de água destilada e foi novamente filtrada sob vácuo. Fez-se então a extracção alcalina da pasta (descrição no item 2.4.5) e colocou-se ao ar livre para secar durante 1 semana, para posterior análises.

Inicialmente fez-se a selecção dos mediadores. As experiências foram realizadas em uma única etapa de branqueamento com temperatura de 45 °C com lacase e os seguintes mediadores: ABTS, HBT, ácido violúrico, TEMPO,  $\text{SiW}_{11}\text{Mn}^{\text{III}}$ ,  $\text{PW}_{11}\text{Mn}^{\text{III}}$  e  $\text{SiW}_{11}\text{V}^{\text{V}}$  e com a temperatura de 60°C com lacase e os seguintes mediadores:  $\text{SiW}_{11}\text{Mn}^{\text{III}}$ ,  $\text{PW}_{11}\text{Mn}^{\text{III}}$ ,  $\text{SiW}_{11}\text{V}^{\text{V}}$ , ácido violúrico,  $\text{BW}_{11}\text{Co}^{\text{III}}$ ,  $(\text{PW}_9)_2\text{Mn}^{\text{III}}$  e  $\text{SiW}_{11}\text{Co}^{\text{III}}$ .

As reacções de branqueamento decorreram durante 4h. A pressão de oxigénio foi mantida em 0.3 MPa. Os testes em branco foram realizados com lacase sem a adição de mediador.



Figura 2.3 – Reactor e controlador de temperatura e de agitação usado no branqueamento da pasta kraft de papel.

As experiências com multi-estágios foram realizadas com os POMs  $\text{SiW}_{11}\text{Mn}^{\text{III}}$ ,  $\text{SiW}_{11}\text{V}^{\text{V}}$  e  $\text{PW}_{11}\text{Mn}^{\text{III}}$ . O primeiro estágio de branqueamento foi realizado com uma temperatura de 110°C e  $P^0(\text{O}_2) = 0.6 \text{ MPa}$  durante 2h. Ao fim deste estágio, o reactor foi arrefecido com água fria e despressurizado. Em seguida, iniciou-se o segundo estágio com adição de lacase, temperatura de 45°C e  $P^0(\text{O}_2) = 0.3 \text{ MPa}$  durante 4h. Os estágios foram alternados até perfazer um total de 5 estágios conforme mostra a Figura 2.4.



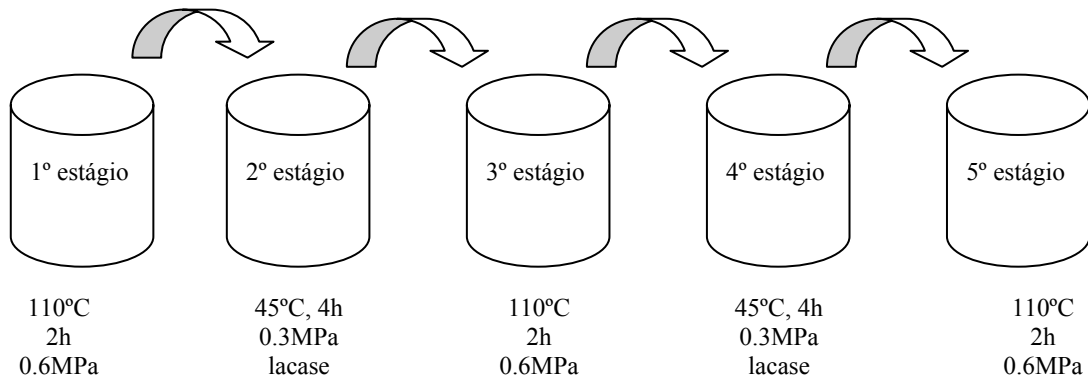


Figura 2.4 – Condições do branqueamento da pasta kraft com os POMs  $\text{SiW}_{11}\text{Mn}^{\text{III}}$  e  $\text{SiW}_{11}\text{V}^{\text{V}}$  através do sistema de multi-estágios.

#### 2.4.5 Extracção alcalina da pasta

A extracção alcalina da pasta foi realizada a 70°C durante 1h, com uma solução de NaOH (concentração final de 2 g/L). O volume de solução no reactor foi de 71 mL. No final da reacção, arrefeceu-se o reactor, lavou-se a pasta com sucessivas adições de água destilada (sob vácuo) até se obter a neutralidade no filtrado. Por fim, esfarelou-se a pasta e colocou-se numa caixa, onde foi guardada e seca à temperatura ambiente durante 7 dias, para posteriores análises de índice kappa e de viscosidade intrínseca.

#### 2.4.6 Métodos analíticos

##### 2.4.6.1 Determinação do índice kappa

Determinou-se o índice kappa da pasta através do método padrão TAPPI T 236cm-99. Este método envolve a oxidação da pasta com o permanganato de potássio, no qual permite determinar o grau de deslenhificação da pasta. O permanganato reage com a lenhina da pasta e não com os polissacarídeos. O índice kappa é o volume (mL) de uma solução de permanganato 0.1N consumido por uma grama de pasta. Os resultados são corrigidos para 50% do consumo de permanganato adicionado.

**Reagentes:** Solução de permanganato de potássio (0.1 N) ( $\text{KMnO}_4$ )

Solução de tiosulfato de sódio (0.2 N) ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ )

Solução de iodeto de potássio (1.0 N) (KI)

Ácido sulfúrico (4.0 N) ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ )

Indicador (solução de amido, 2 –3 %)

Pesam-se 1.1 a 1.3 g da pasta seca. Adicionam-se 125 mL de água destilada à pasta que é triturada. Adicionam-se sob agitação contínua 25 mL do  $\text{KMnO}_4$  e 25 mL do  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . Após 10 minutos sob agitação, adicionam-se 5 mL de KI, algumas gotas do amido (indicador) e titulou-se com  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ . Determinou-se o volume gasto. O teste branco foi feito sem a pasta.

**Cálculo do índice kappa:**

$$K = \frac{P}{w} \times 10^{(0.0093 \times (p-50))} \times (1 + 0.013(25 - t)) \quad (2.11)$$

$$p = \frac{((b - a) \times N)}{0.1} \quad (2.12)$$

Onde :

**K** = índice kappa

**p** = quantidade de  $\text{KMnO}_4$  efectivamente consumido no teste (mL)

**w** = peso da pasta (amostra) (g)

**a** = quantidade de  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  consumido no teste (mL)

**b** = quantidade de  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  consumido no teste do branco (mL)

**N** = normalidade do  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$

**t** = temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ ).

### **2.4.6.2 Determinação da viscosidade intrínseca**

Determinou-se a viscosidade intrínseca da pasta através do método padrão SCAN – CM15:99. Este método é utilizado para determinar a degradação da celulose da pasta durante o seu branqueamento ou cozimento.

Pesam-se cerca de 0.16 – 0.18 g de pasta, adicionam-se 25 mL de água destilada, 3 fios de cobre e agita-se o frasco durante 40 minutos a 600 rpm. Em seguida, adiciona-se 25 mL de solução aquosa de cupri – etilenodiamina 1M (CED). Completa-se o volume do frasco com uma solução de CED e água destilada 1:1, tapa-se sem deixar bolhas de ar e agita-se novamente por 30 minutos a 600 rpm. Por fim, determinou-se o tempo de escoamento da solução de CED com a pasta no viscosímetro capilar a uma temperatura controlada de 25° C.

Cálculo da viscosidade intrínseca

$$\eta = \frac{h \times t \times v}{m} \quad (2.13)$$

onde,

$\eta$ : viscosidade intrínseca

h: constante do viscosímetro (s<sup>-1</sup>)

t: tempo de escoamento (s)

v: volume do frasco (mL)

m: massa de pasta (g)

### **2.4.6.3 Determinação do estado de oxidação dos POMs por espectroscopia no visível**

Todas as medidas espectrofotométricas foram realizadas num espectrofotómetro (Jasco V-560 UV/Vis) com célula de 10 mm a temperatura ambiente. As medidas de todas as amostras foram determinadas imediatamente após a reacção de branqueamento.

Determinou-se o estado de oxidação dos POMs ao final das experiências com um único estágio e temperaturas de 45 e 60°C. Nas reacções a 110°C não foi preciso determinar o estado de oxidação uma vez que o POM encontra-se totalmente no estado reduzido. A Tabela 2.7 mostra as cores dos POMs no estado reduzido e no estado oxidado.

Realizaram-se também estudos da re-oxidação dos POMs reduzidos  $\text{SiW}_{11}\text{Mn}^{\text{II}}$ ,  $\text{SiW}_{11}\text{Mn}^{\text{II}}$  e  $\text{SiW}_{11}\text{V}^{\text{IV}}$  por reacções com lacase sem pasta de papel. Num matrás, colocou-se a solução aquosa do POM no estado reduzido e lacase, a temperatura ambiente e pressão atmosférica sob agitação. Retiraram-se amostras a determinados intervalos de tempo e mediu-se o estado de oxidação do POM por espectro de UV/Vis. Este mesmo procedimento foi realizado no reactor de branqueamento da pasta a pressão de 0.3 MPa e agitação mecânica a temperatura ambiente. Em ambos estudos, o POM apresentava uma concentração de 3.0 mM, o tampão fosfato 0.1 M (pH=4.5) e a lacase numa concentração de 380 U/L ou 1330 U/L.

Tabela 2.7 – Cor e comprimento de onda ( $\lambda$ ) do estado reduzido e do estado oxidado dos POMs

POM	Cor e $\lambda$ (nm)	
	Estado reduzido	Estado oxidado
$\text{SiW}_{11}\text{Mn}$	Amarela*	Cor de rosa (495)
$\text{SiW}_{11}\text{V}$	Púrpura (490)	amarela*
$\text{BW}_{11}\text{Co}$	Cor de rosa (550)	Verde (680)
$(\text{PW}_9)_2\text{Mn}$	Amarela*	Castanho escuro (600)**
$\text{PW}_{11}\text{Mn}$	Amarela*	Cor de rosa (490)

\* Não apresenta máximo de absorvância bem definido; \*\* apresenta um ombro de absorvância

#### **2.4.6.4 Análise de espectroscopia de ressonância magnética nuclear - RMN**

As análises de RMN foram feitas num espectrómetro Bruker MSL 400 (105.2 MHz, 9.4 T, 298 K). Os desvios químicos são referenciados em relação ao  $\text{VOCl}_3$  líquido. Fizeram-se as análises de RMN para os POMs  $\text{SiW}_{11}\text{Mn}^{\text{III}}$  e  $\text{SiW}_{11}\text{V}^{\text{V}}$  para verificar se ocorreu alguma alteração molecular durante o branqueamento da pasta de papel.

#### **2.4.6.5 Análise de voltametria cíclica**

As medidas de voltametria cíclica foram feitas em um analisador electroquímico BAS 100BW, utilizando uma célula convencional de 3 eléctrodos fornecida pela BAS Inc. O eléctrodo de trabalho foi um eléctrodo de carbono vítreo (BAS) e os eléctrodos de referência e auxiliar foram Ag/AgCl e Pt, respectivamente. A superfície do eléctrodo de trabalho foi polida com alumina (0.3 µm) e lavada com água destilada antes de cada experiência. As medidas foram feitas a temperatura ambiente, num intervalo de potencial de +1300 mV a 0 mV. As soluções foram desgaseificadas com azoto puro durante 5 minutos antes de serem medidas e mantidas com azoto gasoso durante a voltametria. As soluções dos POMs tinham uma concentração de  $1.0 \times 10^{-3}$  M e tampão fosfato ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) 0.5 M (pH=4.5).

## **2.5 Fermentações para produção do Exopolissacarídeo**

### **2.5.1 Meios de produção**

Estudaram-se 5 meios de cultura diferentes para seleccionar o melhor meio de cultura para a produção do exopolissacarídeo. A composição de cada meio de cultura é apresentada na Tabela 2.8. As experiências foram realizadas em matraz es de 500 mL com 250 mL de meio de cultura, a 28°C e 180 rpm durante 9 dias. O inóculo tinha uma concentração inicial de 70 mg/L, conforme descrito no item 2.2. O consumo de açúcares reductores, o crescimento da biomassa e a viscosidade do meio de cultura foram monitorados. Retiraram-se cerca de 5 mL de amostra diariamente. Removeram-se as células e fragmentos celulares das amostras por filtração com papel de fibra de vidro sob vácuo. Determinou-se a viscosidade do meio e o consumo de açúcares reductores. No fim de cada ensaio, determinaram-se a concentração da biomassa (peso seco) e a concentração do EPS (peso seco, item 2.5.3) depois de devidamente separados por centrifugação (15000 rpm, 4°C e 20 min.).

**2.5.2 Optimização do meio de cultura**

Após a selecção do meio de cultura mais favorável para a produção do EPS, fez-se a sua optimização através de um primeiro planeamento de experiências 2<sup>2</sup> com um ponto central perfazendo um total de 5 experiências. Fizeram-se as fermentações em *shaker* com matraz de 500 mL contendo 250 mL do meio de cultura YM durante 8 dias. A temperatura foi mantida a 28°C e a agitação foi de 180 rpm. Neste planeamento escolheram-se as variáveis concentração inicial de glucose e pH do meio de cultura. A glucose tinha um nível inferior de 5 g/L, um nível superior de 15 g/L e o ponto central de 10 g/L. O pH tinha um nível inferior de 4, um nível superior de 7 e o ponto central de 5.5, como mostra a Tabela 2.9. A composição dos outros componentes do meio de cultura permaneceu constantes

Tabela 2.8 - Composição dos meios de cultura usados na produção do EPS

Componente (g/L)	Meios de cultura				
	MDT	GPY	YM	MCM	TaK
Glucose	9	40	10	20	10
Extracto de malte	-	-	3	-	10
Extracto de levedura	-	3	3	2	2
Peptona	-	10	5	2	2
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.68	-	-	0.46	2
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	-	-	-	1	-
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0.25	-	-	-	1
Asparagina	-	-	-	-	1
Tiamina	0.081	-	-	-	0.001
NaCl	0.28	-	-	-	-
CaCl <sub>2</sub>	0.015	-	-	-	-
Dimetilsuccinato	0.0013	-	-	-	-

**MDT**, Meio definido para *Trametes*

**GPY**, Meio de glucose, peptona e extracto de levedura (Khondkar *et al.*, 2002)

**YM**, Meio extracto de levedura e extracto de malte (Kim *et al.*, 2002a)

**MCM**, Meio completo para fungos (Kim *et al.*, 2002a)

**TaK**, meio Tien & Kirk

Tabela 2.9 - Factores e níveis estudados no planeamento factorial 2<sup>2</sup> com ponto central

Factores	Níveis		
	(-1)	0	(+1)
Glucose inicial g/L (G)	5	10	15
pH do meio (pH)	4	5.5	7

A matriz do primeiro planeamento experimental encontra-se na Tabela 2.10. Os resultados foram analisados estatisticamente de acordo com o planeamento preestabelecido a fim de verificar qualitativamente o efeito dos factores e suas interacções na produção da lacase. Os cálculos dos principais efeitos e das interacções entre as variáveis e os gráficos foram realizados pelo *software* Statistica version 5.5 (StatSoft, inc.), considerando-se os níveis de significância de 10%. A resposta do planeamento foi o peso seco do EPS. Os resultados foram expressos em gráficos de superfície de resposta, assim como pela tabela de análise de variância (ANOVA).

A equação 2.14 descreve o modelo de regressão utilizado no planeamento factorial com 2 factores e inclui os termos de interacção:

$$\hat{Y} = \beta_0 + \beta_1 x_G + \beta_2 x_{pH} + \beta_{12} x_G x_{pH} \quad (2.14)$$

onde  $\hat{Y}$  é a resposta, *i.e.* o peso seco do EPS;  $x_G$ ,  $x_{pH}$  são as variáveis independentes e os coeficientes de regressão são:  $\beta_0$  o termo de interceptação;  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  os coeficientes dos efeitos lineares e  $\beta_{12}$ , o coeficientes do efeito de interacção.

Tabela 2.10 – Matriz do primeiro planeamento de experiências 2<sup>2</sup> com ponto central

Experiência	Factores originais		Factores Codificados	
	pH	G (g/L)	pH	G (g/L)
E1	7	5	+	-
E2	4	15	-	+
E3	4	5	-	-
E4	7	15	+	+
E5	5.5	10	0	0

No Segundo planeamento de experiências os níveis dos factores passaram a ser: glucose com um nível inferior de 5 g/L, um nível superior de 25 g/L e um ponto central de 15 g/L e o pH com um nível inferior de 4, um nível superior de 7 e um ponto central de 5.5. Nesta experiência um outro ponto central foi adicionado com uma concentração de glucose de 15 g/L e pH de 4.0 totalizando 6 experiências, como mostra a matriz apresentada na Tabela 2.11. A resposta do planeamento foi o peso seco do EPS.

A equação 2.15 descreve o modelo de regressão utilizado no planeamento factorial com 2 factores e inclui somente os efeitos lineares e quadráticos:

$$\hat{Y}y = \beta_0 + \beta_1x_G + \beta_2x_{pH} + \beta_3x_G^2 + \beta_4x_{pH}^2 \quad (2.15)$$

onde  $\hat{Y}y$  é a resposta, *i.e.* o peso seco do EPS;  $x_G, x_{pH}$  são as variáveis independentes; e os coeficientes de regressão são:  $\beta_0$  o termo de intercepção;  $\beta_1, \beta_2$  os coeficientes dos efeitos lineares,  $\beta_3, \beta_4$  os coeficientes dos efeitos de segunda ordem.

Tabela 2.11 – Matriz do segundo planeamento de experiências 2<sup>2</sup> com ponto central

Experiência	Factores originais		Factores Codificados	
	pH	G (g/L)	pH	G (g/L)
A1	5	4	-	-
A2	5	7	-	+
A3	15	5.5	0	0
A4	15	4	0	-
A5	25	4	+	-
A6	25	7	+	+

### 2.5.3 Extracção do EPS do meio de cultura

Para a extracção do EPS do meio de cultura, removeram-se as células por centrifugação a 15000 rpm, 4°C durante 20 min. Ao sobrenadante adicionou-se etanol (4



vezes), agitou-se e deixou-se durante uma noite a 4°C. O EPS precipitado foi centrifugado a 10000 rpm, 4°C durante 20 minutos e o sobrenadante foi descartado. O EPS precipitado foi sequencialmente lavado com etanol a 50, 60, 70 80 e 90%, liofilizado e o peso seco determinado. A Figura 2.5 mostra o EPS obtido.



Figura 2.5 - EPS obtido após precipitação por etanol, lavagem e liofilização.

#### **2.5.4 Análise reológica do meio de cultura**

A viscosidade aparente dos meios de cultura foi determinada por análises em reómetro (Rheometer AR 1000, T.A. Instruments), em diferentes tensões de corte e com controlo de temperatura.

#### **2.5.5 Métodos analíticos para caracterização do EPS**

##### ***2.5.5.1 Espectroscopia de Infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)***

Fez-se a análise de transformada de infravermelho num aparelho MATTSON 7000 FTIR (como transformação de função de Fourier). O espectro foi obtido a partir de 2 mg de biopolímero em 200 mg de KBr. 64 scans foram acumulados com uma resolução de 4.0  $\text{cm}^{-1}$ . A espectroscopia de infravermelho utilizada foi na região do infravermelho médio, que se estende num intervalo de 4000-400  $\text{cm}^{-1}$ .

##### ***2.5.5.2 Análise Termogravimétrica***

A análise termogravimétrica do EPS foi realizada em um termo-analisador, TGA-50 (Shmadzu), sob atmosfera de  $\text{N}_2$  para se investigar o comportamento térmico do biopolímero. A taxa de aquecimento foi de 10  $^{\circ}\text{C}/\text{min}$  e aqueceu-se até 700  $^{\circ}\text{C}$ .

### **2.5.5.3 Análise dos açúcares neutros**

A quantidade relativa dos monossacarídeos foi determinada por cromatografia gás-líquido depois da hidrólise com ácido sulfúrico e derivatização a acetato de alditol (Blakeney *et al.*, 1983). Analisou-se as amostras derivatizadas num cromatógrafo gasoso (Carlo Erba 6000).

### **2.5.5.4 Determinação do peso molecular**

O peso molecular médio dos EPSs produzidos nos meios YM, TaK e MCM foi determinado através da cromatografia de permeação em gel (GPC – *gel permeation chromatography*). As análises de GPC foram realizadas em duas colunas 10 $\mu$ m MIXED B 300 $\times$ 7.5 mm protegidas por uma pré coluna Plgel 10 $\mu$ m (Polymer laboratories Ltd. UK) usando um sistema PL-GPC 110 (Polymer laboratories Ltd. UK) e detector de índice de refração. Dissolveu-se a amostra do EPS em N,N-dimetilacetamida (DMCA) contendo 0.5% (p/v) LiCl. Manteve-se as colunas e o sistema de injeção em 70°C. Bombeou-se o eluente (0.5% p/v LiCl em DMAC) com caudal de 0.9 mL/min. Como GPC é um método relativo, é necessário fazer uma curva de calibração. Deste modo, calibrou-se as colunas do GPC com o material de referência pululana. A curva de calibração se encontra no anexo 3.

### **2.5.5.5 Determinação dos ácidos urónicos**

Determinaram-se os ácidos urónicos do EPS produzido nos meios YM, TaK e MCM usando o método m-fenilfenol (Blumenkrantz & Asboe-Hansen, 1973).

Pesaram-se 2-3 mg do EPS que se incubaram durante 3 horas com 200 $\mu$ L de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 72% e hidrolisadas durante 1 hora com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1M. Diluiu-se 7 vezes 0.5 mL do hidrolisado com água destilada. Adicionaram-se 3 mL de solução de borato de sódio 12.5 mM em H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado a tubos de ensaio arrefecidos em gelo. A cada tubo adicionaram-se 500  $\mu$ L de amostra e em seguida aqueceu-se em banho fervente durante 10 minutos. Arrefeceram-se em gelo os tubos e adicionou-se 100  $\mu$ L de solução de m-fenilfenol a 0.5%. Agitaram-se os tubos e deixou-se em ausência de luz durante 30 minutos. Leu-se a absorvância das amostra a 520 nm. As amostras padrão foram feitas com

concentrações conhecidas do ácido D-galacturónico. Determinou-se a quantidade de ácido urónico presente na amostra por interpolação gráfica da curva padrão (Anexo 4).

#### ***2.5.5.6 Análise elementar do EPS***

A percentagem relativa de C, N e H foi determinada através de um analisador elementar Leco CHNS-932. Uma amostra sólida de 2 mg do EPS produzido nos meios YM, MCM e TaK foi encapsulada e colocada no forno para se iniciar a combustão. Os ajustes para o branco e calibração são aplicados ao sinal integrado final e as respostas são obtidas como percentagem de peso de carbono, hidrogénio e nitrogénio.

## Capítulo 3 – Resultados e discussão

### 3.1 – Produção de lacase em matraz

#### 3.1.1 Efeito da concentração inicial de glucose

Para verificar o efeito da fonte de carbono na produção da lacase por *T. versicolor* em fermentação descontínua, empregaram-se diferentes concentrações iniciais de glucose no meio MDT. Adicionou-se 2.5-xilidina como indutor da lacase ao terceiro dia de cada experiência.

A Figura 3.1 mostra o efeito da concentração inicial de glucose na produção da lacase. Os resultados mostram que uma produção significativa de lacase se inicia a partir do quarto dia de cultivo, com actividades variando entre 100 e 500 U/L. A sua produção foi fortemente dependente da concentração inicial de glucose do meio de cultura. Durante a fase inicial de produção da enzima, que ainda coincide com a fase de consumo de glucose (para concentrações acima de 2 g/L), a produção de lacase é muito baixa (dia 3). As maiores actividades de lacase (entre 600 e 650 U/L) foram obtidas a partir do sétimo dia de cultivo, quando a glucose não estava presente no meio de cultura, ou seja em condições de limitação por carbono, Figura 3.2. As menores actividades de lacase foram detectadas para as maiores concentrações iniciais de glucose empregues (5 e 9 g/L), mostrando que altos níveis de glucose reprimem a produção da lacase. Um aumento de quase 2 vezes na actividade da lacase foi observado quando a concentração inicial de glucose passou de 9 g/L para nenhuma glucose no meio. Galhaup *et al.* (2002b), mostrou que quando a glucose está presente acima de certas concentrações, a síntese da lacase é reprimida em *T. pubescens*. A repressão da glucose em fungos e leveduras é grandemente conhecida e acredita-se que a glucose pode inibir ou induzir os genes de produção enzimática (Ronne, 1995).

Os dados de proteína total do meio de cultura durante a produção da lacase em diferentes concentrações iniciais de glucose estão apresentados na Figura 3.3. Contrariamente aos resultados obtidos para a actividade da lacase, maiores quantidades de proteína total foram determinadas para as maiores concentrações de glucose e além

disso, o perfil da evolução da proteína total não coincide com o perfil da produção da lacase para uma mesma concentração de glucose. Esses resultados indicam que outras proteínas estão a ser sintetizadas durante o cultivo do fungo e não é possível, desta maneira, fazer uma correlação entre a concentração de lacase e de proteína total no meio de cultura.

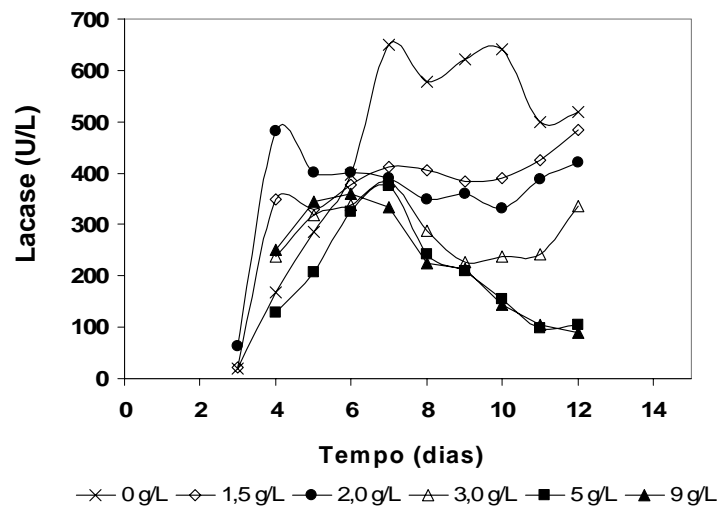


Figura 3.1 - Actividade de lacase produzida por *Trametes versicolor* em diferentes concentrações iniciais de glucose.

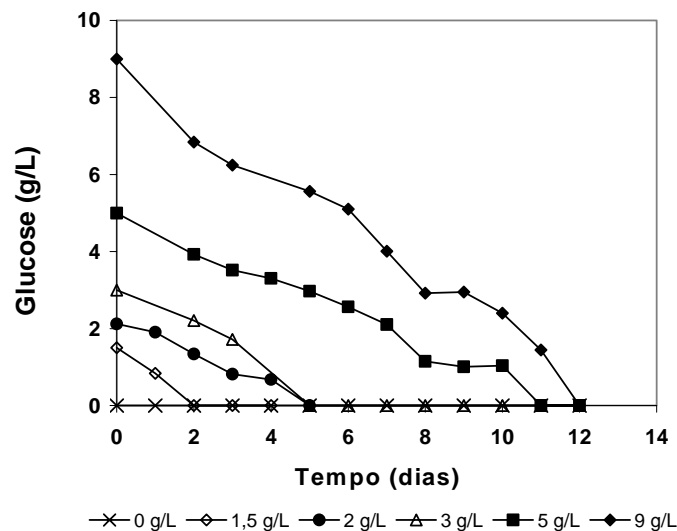


Figura 3.2 - Consumo de glucose do meio de cultura durante a produção de lacase por *Trametes versicolor* em diferentes concentrações iniciais de glucose.

A evolução do pH do meio de cultura para as diferentes concentrações de glucose está apresentada na Figura 3.4. O perfil da evolução do pH mostra que existem dois

comportamentos distintos para as diferentes concentrações de glucose testadas. Em todos os casos, o pH diminui de aproximadamente 5 até 3, enquanto o fungo consome a glucose (Figura 3.2) e estabiliza assim que a glucose termina. Depois desta estabilização, inicia-se um novo período associado à uma subida de pH, excepto no ensaio com maior concentração de glucose (9 g/L) onde esta somente se esgota no penúltimo dia de fermentação. Estes resultados indicam claramente uma associação entre a queda do pH do meio de cultura e o consumo de glucose por *T. versicolor*, indicando uma mudança no metabolismo do fungo quando ocorre o consumo total da fonte de carbono. Galhaup *et al.* (2002b), também mostrou uma queda de pH de 5.0 até 3.6 durante a fase de crescimento de *T. pubescens* e que o pH volta a subir rapidamente quando a glucose é totalmente consumida do meio. De acordo com vários estudos da literatura, esta queda de pH do meio ocorre devido à síntese de vários ácidos orgânicos como o malónico, o oxálico, o fumárico, o succínico entre outros. Estes são produzidos através do metabolismo primário dos basidiomicetos (Roy & Archibald, 1993; Milagres *et al.* 2002; Humar *et al.*, 2001; Urzúa *et al.*, 1998; Hofrichter *et al.*, 1999) e o posterior aumento do pH indica a mudança para um metabolismo secundário alternativo.

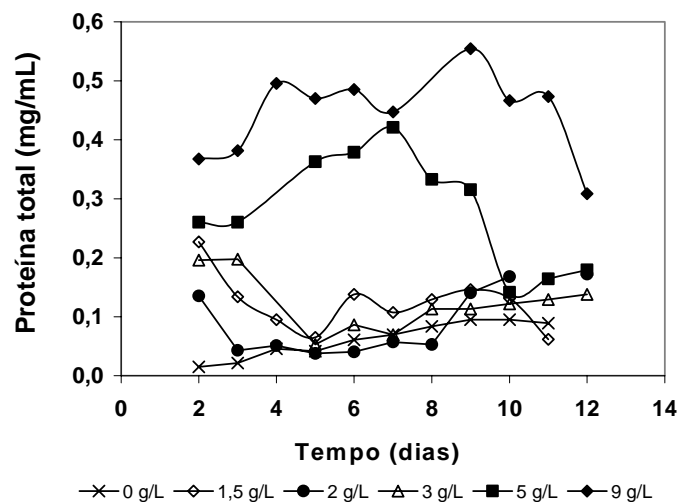


Figura 3.3 - Evolução da proteína total do meio de cultura durante a produção de lacase por *Trametes versicolor* em diferentes concentrações iniciais de glucose.

A Figura 3.5 apresenta, para cada ensaio, a máxima actividade da lacase obtida, o respectivo valor de pH e a biomassa final para as diferentes concentrações de glucose

estudadas. Os resultados mostram que a concentração final de biomassa, um resultado directo do crescimento celular e do metabolismo primário, foi directamente dependente da concentração inicial de glucose. Verifica-se também que a máxima produção de lacase também está claramente associada ao pH do meio. De facto, existe um sincronismo quando se compara a máxima actividade de lacase e o respectivo valor de pH, quanto menor o pH, menor a produção de lacase. Nas experiências com elevadas concentrações de glucose, onde o fungo realiza o seu metabolismo primário, por um maior período de tempo, o pH diminui e provavelmente inibe a produção da lacase. Galhaup *et al.* (2002b) também mostrou que a produção da lacase por *T. pubescens* era somente significativa quando a glucose era totalmente consumida do meio, devido à repressão pelo substrato. Ruel *et al.* (1999) sugerem que o metabolismo primário, na ausência de indutores, produz pequenas concentrações de lacase e que a produção de enzimas lenhicolíticas está associada com o metabolismo secundário. Portanto, a produção de lacase em elevadas concentrações parece ser resultado do metabolismo secundário do fungo, que não é dependente do seu crescimento, mas sim de algum estímulo externo (Moreira *et al.*, 1998).

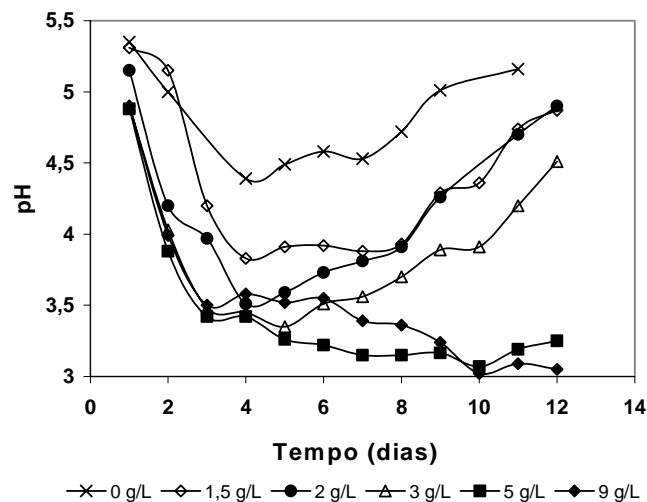


Figura 3.4- Evolução do pH do meio de cultura durante a produção de lacase por *Trametes versicolor* em diferentes concentrações iniciais de glucose.

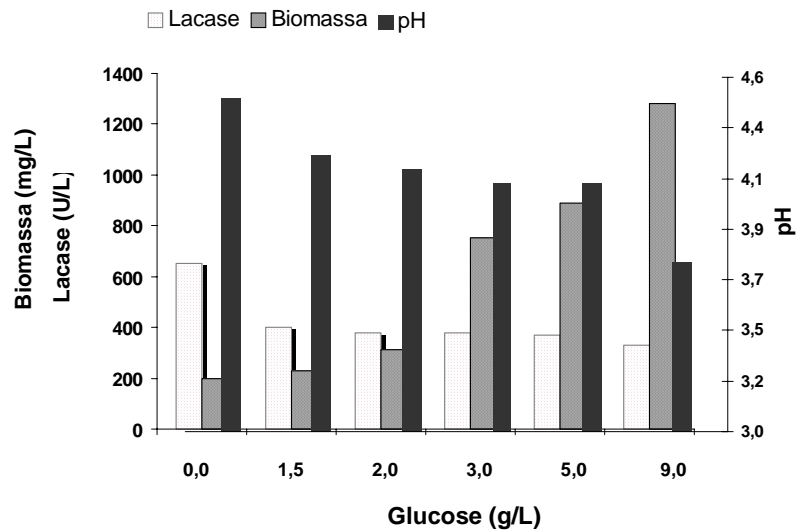


Figura 3.5 – Biomassa final de *Trametes versicolor*, máxima actividade de lacase e pH do meio para diferentes concentrações iniciais de glucose.

### 3.1.2 Efeito da adição de cobre

Como a lacase é uma proteína que contém cobre na sua estrutura, um aumento da actividade da lacase em culturas suplementadas com cobre é esperado. A adição de cobre em diferentes meios de cultura tem sido usada para aumentar a produção da lacase por fungos (Collins & Dobson, 1997; Galhaup *et al.*, 2002a; Giardina *et al.*, 1999; Baldrian & Gabriel, 2002).

Neste estudo, para se verificar o efeito da adição de cobre como micronutriente, na produção da lacase por *T. versicolor*, diferentes concentrações iniciais (2.5, 16, 75 e 150  $\mu\text{M}$ ) de cobre foram empregues no meio de cultura MDT (Figura 3.6). Neste conjunto de experiências, nenhum indutor foi adicionado para estimular a produção da lacase. A concentração óptima de cobre encontrada foi de 75  $\mu\text{M}$ . Esta conduziu a um aumento de 3 vezes na produção da lacase quando comparado com o controlo, sem adição de cobre. Para a maior concentração de cobre (150  $\mu\text{M}$ ), a actividade da lacase diminuiu, provavelmente devido a um efeito tóxico do cobre no metabolismo deste fungo.

Contrariamente aos resultados aqui obtidos, Collins & Dobson (1997) mostraram que um aumento na concentração de cobre desde 0.4 até 400  $\mu\text{M}$  promoveu um aumento



de 0.5 a 2.5 U/ml na actividade da lacase produzida por *T. versicolor*, respectivamente. Um outro estudo com *P. ostreatus* também encontrou o mesmo resultado, onde o aumento da concentração de cobre aumentou proporcionalmente a produção de lacase (Giardina *et al.*, 1999). Por outro lado, Couto *et al.* (2004b) estudaram o efeito da adição de cobre na produção de lacase por *T. versicolor* e por *T. hirsuta* e verificaram que um aumento muito pouco significativo ocorreu com *T. versicolor* e um aumento de 3 vezes na actividade da lacase foi obtido com *T. hirsuta*. Isto pode significar que o efeito do cobre sobre a produção de lacase é dependente do fungo e da estirpe do fungo utilizada.

O efeito da adição de cobre ao terceiro dia na produção, como indutor da lacase, está mostrado na Figura 3.7. Para todas as concentrações de cobre estudadas, a produção da lacase foi praticamente a mesma, apresentando uma actividade máxima de cerca de 170 U/L, que corresponde a um aumento de 105 U/L em relação ao controlo (65 U/L).

As actividades máximas obtidas pela adição de cobre como micronutriente (adição ao meio de cultura) e como indutor (adição ao 3º dia) da lacase foram muito semelhantes. Galhaup & Haltrich (2001) estudaram o efeito da adição de cobre em diferentes dias de cultivo (0, 4 e 8 dias) na produção da lacase por *T. pubescens* e observaram um ligeiro aumento na actividade (de 55 para 65 U/mL) quando o cobre foi adicionado ao quarto dia de cultivo, em comparação ao primeiro dia, e uma drástica diminuição na actividade foi observada pela adição do cobre ao oitavo dia.

Trupkin *et al.* (2003) também estudaram o efeito do cobre como indutor da lacase e um aumento na produção da lacase foi mostrado com o aumento das concentrações de cobre. O trabalho sugere que o cobre é tóxico para a maioria dos fungos, mas que ele pode agir como indutor da produção de lacase por *T. versicolor* e que a produção da lacase é um mecanismo de defesa em situações de stress oxidativo.

De acordo com os resultados obtidos da adição de cobre, seleccionou-se a adição de cobre ao primeiro dia numa concentração de 75 µM para as posteriores experiências de indução da produção da lacase por *T. versicolor*.

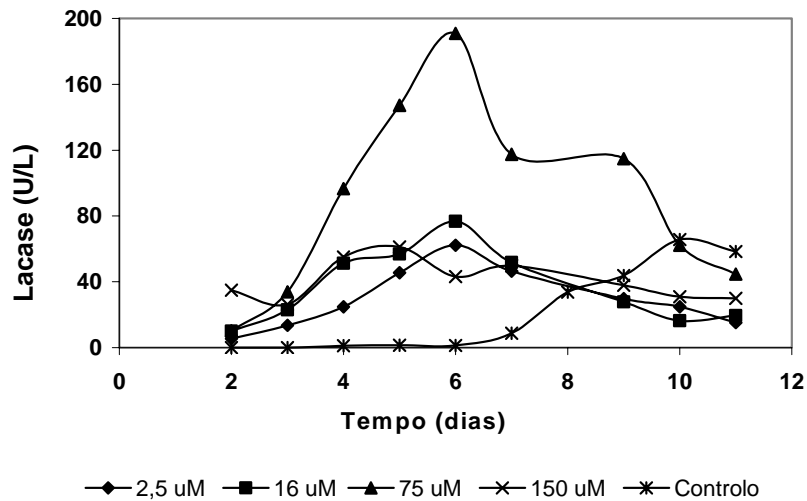


Figura 3.6 – Efeito da adição de cobre ao primeiro dia na produção da lacase por *Trametes versicolor*.

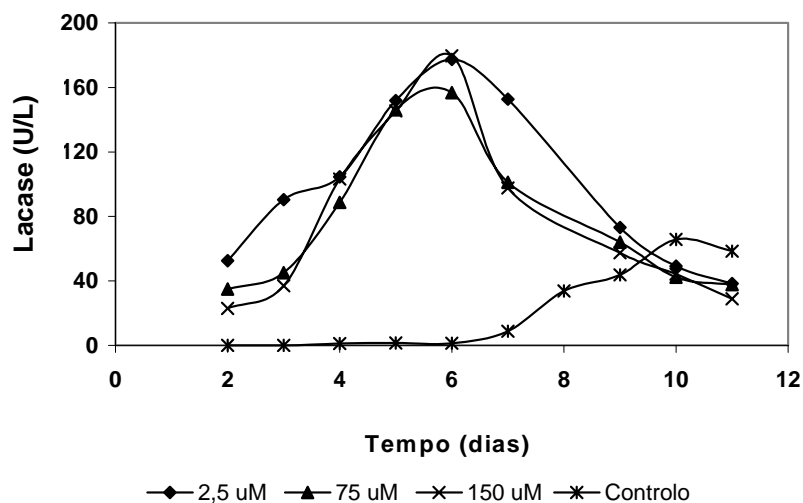


Figura 3.7 - Efeito da adição de cobre ao terceiro dia na produção da lacase por *Trametes versicolor*.

### 3.1.3 Produção de lacase com diferentes indutores

A indução e optimização da produção de lacase tem sido extensivamente estudada com diferentes tipos de indutores e respectivas concentrações e tempo de adição (Muñoz *et al.*, 1997). A maior parte desses indutores são compostos aromáticos ou fenólicos,

muitas vezes relacionados com a lenhina ou seus derivados. Neste trabalho, avaliou-se cobre, 2,5-xilidina (xil), uma mistura fenólica (MF) e etanol como indutores da lacase no meio MDT por *T. versicolor*. Nestas condições estudadas não foram detectadas actividades de MnP e de LiP.

A adição de etanol ao meio de cultura não favoreceu a produção da enzima para as duas concentrações estudadas, 20 e 40 g/L. Embora o etanol não seja um composto aromático, ele tem sido estudado como indutor da lacase. Em oposição aos nossos resultados, Lee *et al.* (1999) mostraram que a adição de etanol (40 g/L) estimulou a produção da lacase a níveis significativos, com um aumento de 2.6 U/mL quando comparado com meio sem adição de etanol.

A Figura 3.8 (a) mostra o efeito dos diferentes indutores no meio MDT, contendo 9 g/L de glucose e a Figura 3.8 (b) mostra a amplificação da escala da Figura 3.8 (a) para uma melhor visualização nas diferenças da produção da lacase com indução de cobre, xilidina e cobre + xilidina. Os picos de actividade máxima de lacase foram obtidos em diferentes dias, dependendo do indutor ou da combinação entre eles, não havendo assim nenhuma relação com o dia da actividade máxima e a adição de diferentes indutores.

A adição de xilidina produziu uma maior actividade de lacase quando comparada com a adição de cobre (de 170 para 360 U/L), o que corresponde um aumento de 1.9 vezes. Muitos trabalhos mostram a indução de lacase por xilidina em fungos (Garzillo *et al.*, 1998; Koroljova-Skorobogat'ko *et al.*, 1998; Couto *et al.*, 2002). Entretanto, um efeito cooperativo entre o cobre e a xilidina foi observado. A presença simultânea de ambos os indutores levou a um maior aumento na produção de lacase (800 U/L) do que o efeito individual de cada um deles (4.4 vezes em relação ao cobre e 2.3 em relação à xilidina). O mesmo efeito de cooperação entre esses indutores foi observado na produção de lacase por *T. versicolor* (Collins & Dobson, 1997) e por *T. hirsuta* e *T. versicolor* em culturas sólida (Couto *et al.*, 2004b)

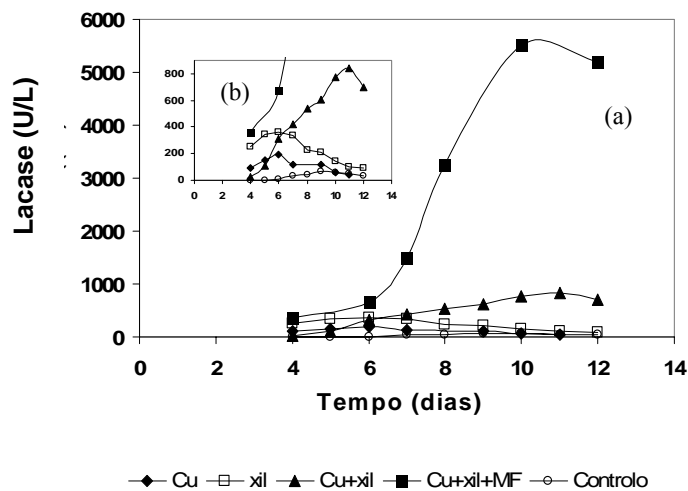


Figura 3.8 – (a) Produção de lacase por *Trametes versicolor* na presença de cobre, xilidia (xil) e mistura fenólica (MF). (b) amplificação da Figura 3.8 (a).

Uma vez que a lacase actua como uma enzima oxidativa em compostos fenólicos, uma complexa mistura fenólica (mistura de três corantes) foi empregada para favorecer o aumento dos indutores previamente testados. Esta mistura fenólica foi utilizada por Amaral *et al.* (2004) na descoloração de corantes têxteis e promoveu altas concentrações de lacase por *T. versicolor*. Neste trabalho, obteve-se um aumento significativo na actividade enzimática, de 850 U/L no meio com adição de cobre e xilidina, para 5500 U/L (6.5 vezes) na presença desta mistura fenólica (Figura 3.8).

Indutores com estruturas fenólicas parecem permitir a este tipo de fungo reconhecer um sinal que conduz a uma intensiva resposta biológica que activa o metabolismo secundário responsável pelo aumento da produção de enzimas lenhicolíticas.

A Figura 3.9 mostra o valor de pH do meio de cultura e o consumo de glucose durante a produção de lacase com os diferentes indutores. Com a adição de cobre, um baixo consumo de glucose foi observado, com uma taxa de consumo de 0,48 g/d, quando comparado com os demais indutores que apresentaram as seguintes taxas: 0.67 g/d para a xilidina, 0.66 g/d para cobre, xilidina e mistura fenólica e de 0.93 g/d para cobre e xilidina. Os resultados indicam que quando a xilidina está presente, o fungo consegue assimilar mais rapidamente a glucose. Como nos resultados anteriores, o pH do meio desce juntamente com o consumo da glucose até um valor aproximado e constante de 3.0,

excepto para o meio suplementado com cobre, onde o pH desceu e manteve-se constante em 3.6, provavelmente devido à baixa taxa de consumo de glucose. No meio onde os três indutores estavam presentes, o pH do meio aumentou muito rapidamente quando a glucose foi totalmente consumida (dia 9).

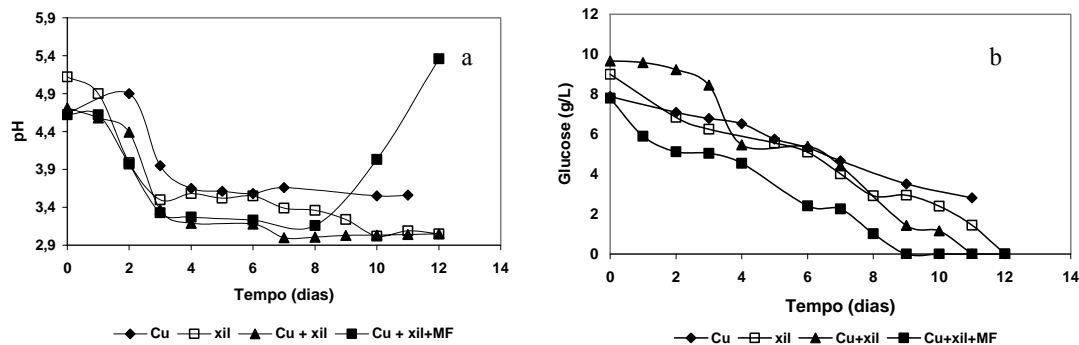


Figura 3.9 – pH do meio de cultura (a) e consumo de glucose (b) durante a produção de lacase por *Trametes versicolor* com diferentes indutores.

### 3.1.4 Efeito da limitação por carbono com diferentes indutores

Como mostrado no item 3.1.1, a limitação por carbono (LC) estimulou a produção da lacase por *T. versicolor*. Deste modo, fez-se a estratégia da limitação por carbono para os melhores resultados da adição de indutores: cobre+xilidina (xil) e cobre+xilidina+mistura fenólica (MF). Os resultados com e sem limitação por carbono estão apresentados na Figura 3.10.

A actividade da enzima com a adição de cobre+xilidina aumentou cerca de 3 vezes ou 1850 U/L (de 850 para 2700 U/L) em condições de limitação por carbono. Um efeito similar, embora menos significativo, também ocorreu quando a mistura fenólica foi empregue (de 5520 para 6080 U/L), o que corresponde a um aumento de 560 U/L ou 1.1 vezes na actividade máxima da lacase. Além disso, observou-se ainda uma antecipação de 2 dias na actividade máxima da lacase.

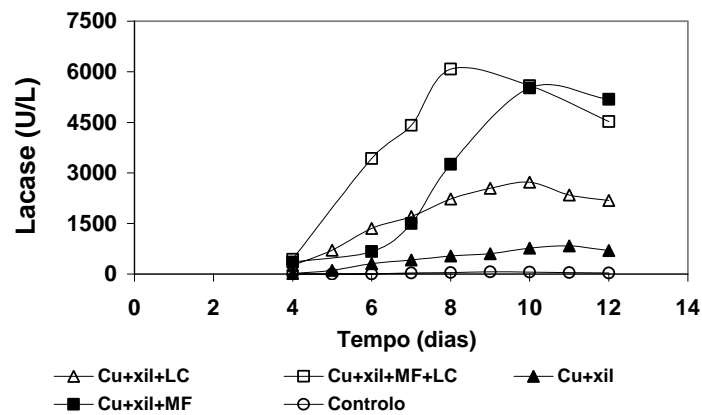


Figura 3.10 - Produção de lacase por *Trametes versicolor* na presença de cobre e xilidia (xil) e de cobre, xilidia (xil) e mistura fenólica (MF) com e sem limitação por carbono (LM).

A Tabela 3.1 mostra a produtividade e o aumento da produtividade da lacase para os diferentes indutores com e sem limitação por carbono. O emprego da estratégia da limitação por carbono e o emprego da mistura fenólica conduziram aos melhores resultados da produtividade da lacase. Um aumento de 75.5 vezes em relação ao controle foi obtido nas condições de sem limitação por carbono e um aumento de 103.9 vezes para combinação de todos os indutores nas condições de limitação por carbono.

Os resultados indicam que compostos fenólicos estimulam o fungo a desenvolver mecanismos de protecção aos efeitos tóxicos, fazendo com que mais enzima seja produzida de forma a tentar eliminar a toxicidade do meio onde se encontra e/ou pelo facto do fungo reconhecer estruturas similares da madeira. É conhecido da literatura que os compostos mais eficientes na indução de enzimas lenhínicas são os preparados de lenhina e os compostos fenólicos tais como álcoois, aldeídos e ácidos (Muñoz *et al.* 1997). A indução desses compostos na produção da lacase vem da capacidade natural do fungo *T. versicolor* em degradar a lenhina através de mecanismos específicos de ataque às madeiras. A presença desse tipo de indutor faz com que o fungo os reconheça e desenvolva um metabolismo de defesa ao *stress* oxidativo (Trupkin *et al.*, 2003) produzindo uma maior quantidade de enzima.

Tabela 3.1 - Produtividade de lacase e aumento da produtividade de lacase para os indutores cobre, xilidina e mistura fenólica em condições de limitação por carbono e sem limitação por carbono

<b>Indutores</b>	<b>Produtividade (U/ (L. dia))</b>	<b>Aumento da produtividade</b>
<b>Sem limitação por carbono</b>		
Controlo	7.3	1.0
Cobre	31.8	4.4
xilidina	60.0	8.2
Cobre + xilidina	76.0	10.4
Cobre + xilidina + Mistura fenólica	552.1	75.5
<b>Com limitação por carbono</b>		
Cobre + xilidina	272.3	37.3
Cobre + xilidina + Mistura fenólica	759.8	103.9

## 3.2 – Produção de lacase em fermentador

### 3.2.1 – Otimização da produção da lacase por planeamento de experiências

Após estudar-se as diferentes condições de produção da lacase por *T. versicolor* em matraz, fez-se um planeamento de experiências com três factores: concentração inicial de glucose, pH do meio de cultura e agitação, e dois níveis para aplicar em fermentador. A finalidade é a optimização da produção enzimática, uma vez que a produção enzimática é muito dependente das condições de cultivo. A variável de resposta foi a máxima actividade de lacase obtida durante o processo de fermentação. O planeamento totalizou 8 experiências com as diferentes combinações dos três factores em estudo. Os ensaios foram efectuados em conformidade com o delineamento experimental proposto no item 2.3.3.1. Para a glucose escolheu-se um limite inferior de 0 g/L e um limite superior de 9 g/L, para a agitação um limite inferior de 100 rpm um limite superior de 180 rpm e para o pH um limite inferior de 3.0 e um limite superior de 5.0, onde se considerou o limite inferior o não controlo do pH e o limite superior o controlo do pH em  $5.0 \pm 0.1$ .

Os resultados das fermentações de *T. versicolor* pelo planeamento de experiências estão resumido na Tabela 3.2. Os valores obtidos mostram que os meios com glucose (9 g/L) e sem controlo de pH (experiências F3 e F7) não favoreceram a formação da lacase, resultando em actividades inferiores a 1000 U/L e com elevadas concentrações de biomassa ( $\approx 1.5$  g/L).

Obtiveram-se os melhores resultados quando glucose estava presente no meio de cultura e o pH controlado (F4 e F7), o que correspondeu a actividades acima de 7000 U/L para ambos valores de agitação. Quando se comparam experiências similares, com a mesma concentração de glucose e a mesma agitação (F3 e F4; F7 e F8), onde somente se varia o pH, obteve-se um aumento na actividade máxima da lacase de 16 vezes para uma agitação de 100 rpm (de F3 para F4) e um aumento de 9 vezes para uma agitação de 180 rpm (de F7 para F8). Em todas as experiências a produtividade da lacase seguiu a mesma tendência que a actividade máxima.



A biomassa final apresentou baixos valores para os meios sem glucose, de 0.3 a 0.6 g/L, o que era esperado uma vez que não havia fonte de carbono para o crescimento. Para as experiências com glucose no meio, a biomassa final apresentou concentrações próximas a 1.5 g/L.

Tabela 3.2 – Planeamento de experiências  $2^3$  e repostas da produção da lacase por *Trametes versicolor*

Experiência	Agitação (rpm)	Controlo de pH	Glucose (g/L)	Biomassa final (g/L)	Máxima actividade de lacase (U/L)	Produtividade de lacase (U/(L.d))
F1	180	3	0	0.37	1493	249
F2	100	5	0	0.60	2178	260
F3	180	3	9	1.51	444	37
F4	180	5	9	1.59	7113	889
F5	100	3	0	0.29	1410	117
F6	180	5	0	0.27	1781	184
F7	100	3	9	1.28	771	70
F8	100	5	9	1.54	7217	902

Os efeitos estimados de cada factor e suas interacções para o planeamento de experiências estão descritos na Tabela 3.3. As respostas mostram que o controlo de pH, concentração inicial de glucose e as suas interacções apresentam um grande efeito na actividade máxima da lacase, enquanto que a agitação não apresenta nenhum efeito significativo na produção da lacase. A significância dos efeitos estimados foi avaliada através da análise de variância (ANOVA). Os testes ANOVA indicam que o modelo linear descreve adequadamente o rendimento da síntese de lacase. O efeito significativo de cada coeficiente foi determinado através do teste  $p$  ( $p < 0.1$ ), considerando 90% de intervalo de confiança. Baixos valores de  $p$  indicam um coeficiente muito significativo. As variáveis que apresentaram um efeito significativo similar foram o pH e a interacção Glucose  $\times$  pH. O coeficiente de regressão ( $R^2 = 0,99625$ ) indica também que o modelo de primeira ordem (linear) pode representar adequadamente os dados experimentais referentes ao rendimento em lacase.

Tabela 3.3 – Efeitos estimados e teste ANOVA para a produção de lacase por *Trametes versicolor* através do planeamento de experiências  $2^3$

Efeitos	Estimado	Valor de $p$	Valor de $t$	Soma quadrática (SQ)	Graus de liberdade df	Média quadrática (MQ)	$F$
<b>Efeitos principais</b>							
Controlo de pH	3452.7	0.0579	10.9515	232214 10 <sup>2</sup>	1	232214 10 <sup>2</sup>	119.93
Glucose (G)	2170.8	0.0965	6.5420	8286928	1	8286928	42.80
Agitação (A)	186.4	0.8962	0.1643	5233	1	5233	0.0270
<b>Interacção de dois factores</b>							
A x pH	64.4	0.6368	0.6416	79720	1	79720	0.4117
A x G	29.1	0.6906	0.5282	54022	1	54022	0.2790
G x pH	3014.8	0.0626	10.1239	19845630	1	19845630	102.49
Erro				193629	1	193629	
Total SQ				516866 10 <sup>2</sup>	7		

$$R^2 = 0,99625$$

O diagrama de Pareto apresentado na Figura 3.11 mostra os efeitos que são estatisticamente importantes na produção da lacase. Os efeitos cujos rectângulos estiverem à direita da linha divisória ( $p = 0.1$ ) devem ser considerados no modelo matemático. O diagrama de Pareto mostra claramente que o factor pH apresenta o efeito mais pronunciado na produção da lacase seguido pela interacção glucose x pH e pela glucose. A agitação não é um factor relevante na produção da lacase. Os valores ao lado do rectângulo representam os valores da estatística do test  $t$ .

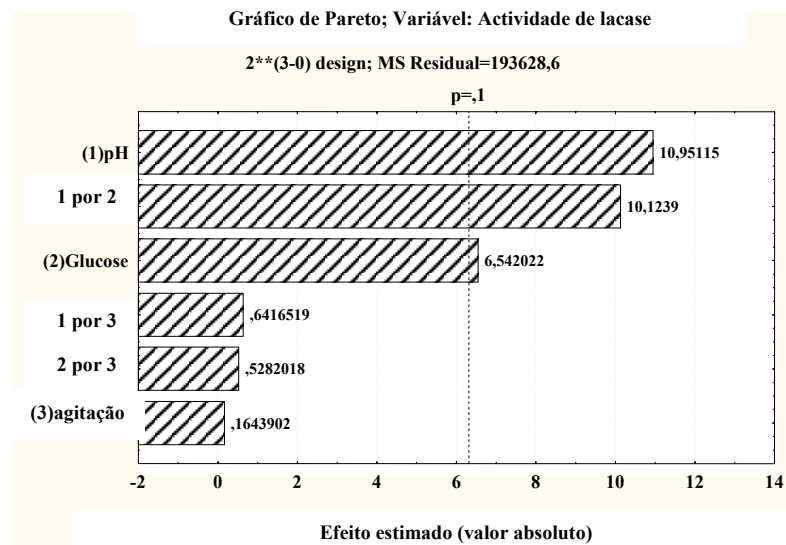


Figura 3.11 – Diagrama de Pareto para o planejamento factorial 2<sup>3</sup>.

Adicionalmente, a correlação entre os valores previstos no modelo para a actividade máxima da lacase e os dados experimentais é apresentada na Figura 3.12. Os resultados mostram que os dados estão muito próximos da linha, o que caracteriza um bom ajuste, mostrando que o modelo linear descreve bem os dados experimentais.

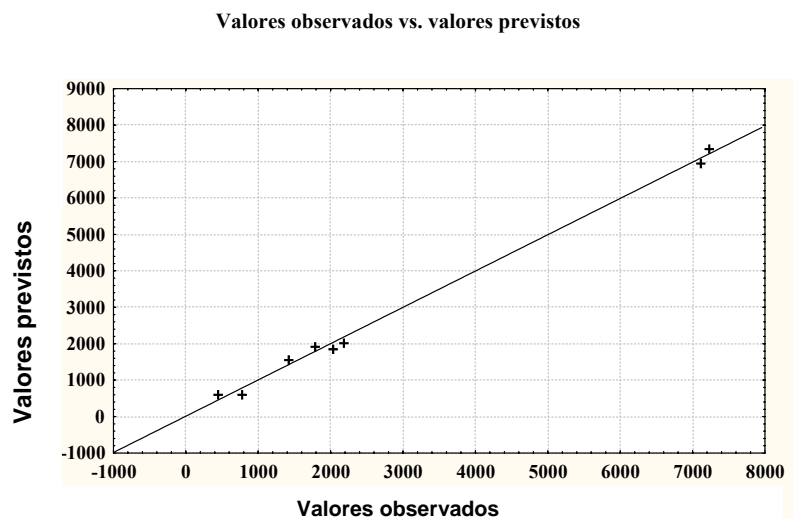


Figura 3.12 - Correlação entre os valores observados e os valores previstos da produção da lacase.

Os resultados do planeamento de experiências apresentados acima podem também ser visualizados através de uma superfície, chamada de superfície de resposta, que no caso deste trabalho, é um planeamento factorial comum e por isso tem a forma de um plano, visto que o modelo matemático é linear. As superfícies de resposta resultantes e a respectiva relação matemática entre a variável de resposta (actividade da lacase; z) e as variáveis independentes (factores) estão mostradas nas Figuras 3.12a-c. Os gráficos mostram o efeito de duas variáveis enquanto que a terceira permanece constante. A respectiva função que representa estas figuras é dada pela seguinte equação:

$$\begin{aligned} \text{Actividade da lacase (U/L): } & 2931.55 - 220.69 \text{ pH} - 1237.77 \text{ G} - 11.40 \text{ A} + 350.01 \\ & \text{pH} \times \text{G} + 2.46 \text{ pH} \times \text{A} + 0.46 \text{ G} \times \text{A} \end{aligned} \quad (3.1)$$

As Figuras 3.13a-c representam um gráfico tri-dimensional das seguintes variáveis: concentração de glucose e pH (a uma agitação de 180 rpm), agitação e concentração de glucose (a um pH de 3) e agitação e pH (a uma concentração de glucose de 9 g/L). A cor castanha representa as elevadas actividades de lacase. O modelo de primeira ordem (linear) ajusta bem a resposta e é mostrado nas equações apresentadas na Figura 3.13. Na Figura 3.13a observa-se que quando se usa o nível inferior de ambos os factores (glucose de 0 g/L e sem controlo de pH) a actividade da lacase cai atingindo o mínimo valor observado no intervalo estudado (cerca de 400 U/L). As condições óptimas encontradas para a produção da lacase foram uma concentração de glucose e um pH de 11 g/L e 5.2, respectivamente. Nessas condições, uma actividade de lacase de cerca de 10000 U/L é prevista pelo modelo. Após obter as condições optimizadas, realizou-se uma nova experiência nas condições óptimas (glucose inicial de 11 g/L e pH 5.2). Nestas condições, obteve-se a máxima actividade de lacase de 11403 U/L, que está de acordo com o valor previsto pelo modelo, o que mostra a adequação da MSR utilizada.

As Figuras 3.13b e 3.13c mostram que a agitação não apresenta nenhum efeito individual, nem interacção com os outros factores na produção da lacase, conforme já discutido anteriormente.

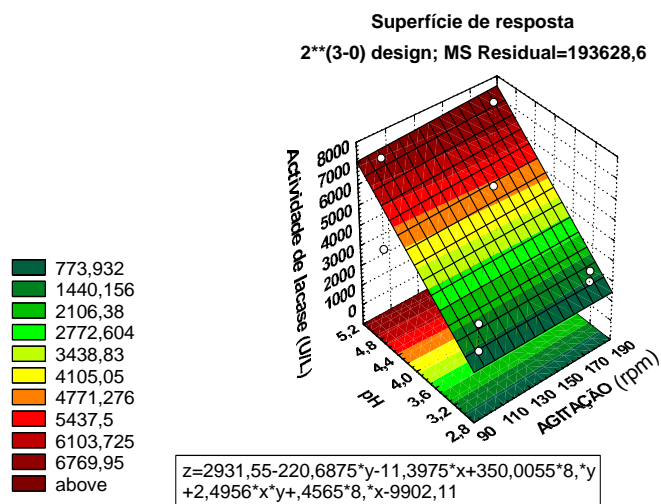
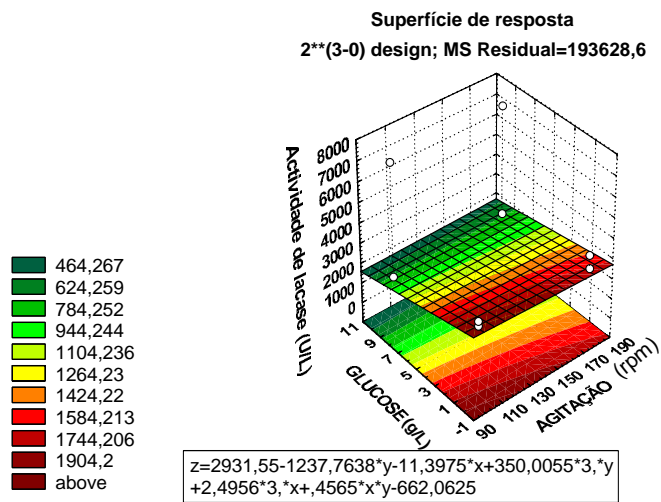
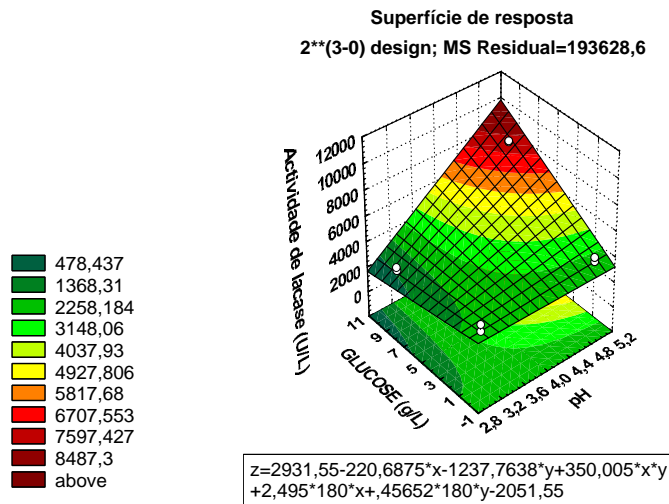


Figura 3.13 - Superfícies de resposta para o planejamento de experiências 2<sup>3</sup>.

Os resultados obtidos mostram claramente que é necessário o controlo do pH do meio de cultura para a obtenção de elevadas actividades de lacase. Durante as fermentações sem controlo de pH e com concentrações de glucose de 9 g/L, observou-se que o pH diminuiu até um valor de 3.0, e que essa diminuição do pH ocorre simultaneamente ao consumo de glucose (Figura 3.14), como aconteceu no cultivo em matraz descrito anteriormente.

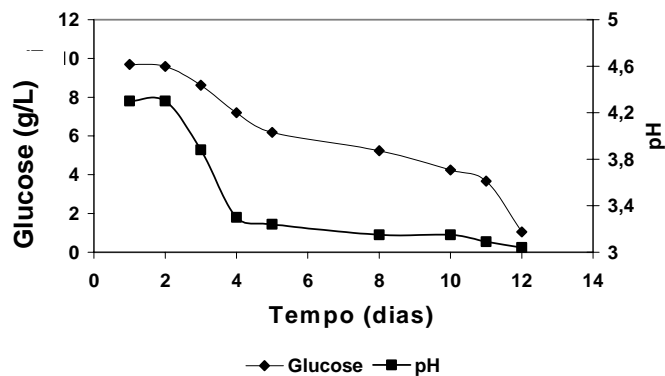


Figura 3.14 – Consumo de glucose e pH do meio durante a produção de lacase por *Trametes versicolor* para uma concentração inicial de glucose de 9 g/L e sem controlo de pH.

Conforme já discutido anteriormente há ácidos orgânicos que são produzidos durante a fermentação. Os resultados mostraram que baixos valores de pH não são favoráveis à produção de lacase por *T. versicolor*. Este facto pode ter duas explicações: Pode o metabolismo da produção de lacase ser reprimido pelos baixos valores de pH; ou mudanças conformacionais na estrutura tri-dimensional podem ser promovidas pelo baixo pH, afectando o sítio activo da enzima e não permitindo assim a ocorrência de reacções biocatalíticas de oxidação.

Com a finalidade de avaliar a perda de actividade da enzima a baixos pHs, estudou-se a sua estabilidade para valores de pH de 3.0, 4.5 e 5.0 (controlo). A pH 3.0 observou-se uma perda de 50% na actividade da lacase durante o primeiro dia de incubação, atingindo-se um valor de 80% de perda de actividade após três dias. Para o pH de 4.5 observou-se uma perda de apenas 11% após os três dias de incubação. Para o controlo, a pH 5.0, não foi observada qualquer redução na actividade da lacase durante os três dias, o que mostra que pH de 5.0 é o ideal para a manutenção da actividade da lacase. Quando se comparam os resultados para as fermentações com glucose, com e sem

controlo de pH (F3 e F4; F7 e F8), verifica-se pela actividade obtida que houve uma redução correspondente de 90-93% na actividade da lacase para as fermentações sem controlo de pH. Estes resultados parecem indicar que a hipótese considerada em relação à pouca estabilidade da lacase a valores de pH baixos seja mais favorável, embora não excluam por completo que haja alguma inibição metabólica de produção da lacase pelo fungo nestas condições.

Estudos recentes, mostram que a estabilidade da lacase é muito dependente do pH e da temperatura (Palonen *et al.*, 2003; Galhaup *et al.* 2002a, Souza *et al.*, 2002). Nyanhongo *et al.* (2002) mostra que a actividade da lacase produzida por *Trametes modesta* foi significativamente inibida a pH 3 e acima de 5, mostrando um óptimo a pH 4. Jonsson *et al.* (1997) observaram que pH abaixo de 4 é prejudicial para a produção da lacase e sugere que essa perda é devido à susceptibilidade para proteases ácidas nessas condições.

Galhaup *et al.* (2002b) relatam que para *Trametes pubescens*, quando a concentração de glucose está presente no meio de cultura acima de um valor crítico (0.25 g/L), a síntese da lacase é reprimida e que a produção somente aumenta quando a glucose é esgotada no meio. Neste estudo em bioreactor, quando o pH do meio não era controlado e com glucose inicial de 9 g/L, a máxima produção da lacase foi obtida quando se esgotou a glucose. No entanto, quando se controlou o pH, mesmo com 9 g/L de glucose no meio cultura, obteve-se um grande aumento na actividade da lacase no meio. Contrariamente ao mostrado por Galhaup *et al.* (2002b) para *T. pubescens*, a produção de lacase não é inibida pela presença de glucose em altas concentrações, mas sim pelo baixo valor do pH do meio de cultura, que é resultante do consumo de glucose. É importante salientar que o estudo de Galhaup *et al.* (2002b) não foram efectuados em biorreactor e portanto só estudaram situações sem controlo de pH.

Os resultados mostrados em bioreactor explicam as altas produções de lacase em matraz em condições de limitação por carbono, quando se estuda o efeito de diferentes concentrações iniciais de glucose. Pode-se afirmar que quando não havia glucose no meio, em condições de limitação por carbono, se obtiveram as maiores produções de lacase devido ao mais elevado valor de pH, e as menores actividades observadas com as

maiores concentrações de glucose não são devidas aos mecanismos de repressão por glucose, mas sim ao baixo valor de pH do meio nestas condições.

### **3.2.2 – Modelação matemática da produção de lacase em bioreactor**

Os resultados até aqui apresentados mostram a importância da adição de indutores, assim como da concentração inicial de glucose no meio de cultura e do controlo de pH. Para estudar o comportamento do fungo em bioreactor, nomeadamente o crescimento celular, o consumo de glucose e a produção de lacase, foi-se avaliar o efeito da limitação e ausência de limitação por carbono em matraz. A determinação dos parâmetros cinéticos da fermentação em matraz foi necessária, uma vez que a biomassa não pode ser medida directamente ao longo do tempo no bioreactor. De facto o fungo cresce em agregados (*pellets*) quando se encontra num meio líquido, pelo que as culturas não são homogêneas. Para se estimar os parâmetros da biomassa em bioreactor, assumiu-se o crescimento em condições similares em matraz. Realizaram-se fermentações em 12 matrizes nas mesmas condições onde cada matraz correspondeu a um dia da fermentação. Deste modo, os parâmetros cinéticos de crescimento foram obtidos e posteriormente utilizados para a modelação matemática do bioreactor.

Para o desenvolvimento do modelo de crescimento celular, consumo de substrato e produção enzimática em matraz, foi necessário considerar a existência de duas fases de crescimento miceliar: uma fase rápida de crescimento exponencial seguida por uma fase lenta de desaceleração no crescimento. Na fase exponencial de crescimento, ocorre o metabolismo primário que está associado ao aumento da biomassa. Na fase de desaceleração do crescimento, um diferente perfil de enzimas é produzido devido às condições necessárias para o desenvolvimento de diferentes vias metabólicas. Este modelo é descrito pelas equações 2.2a e 2.2b apresentadas anteriormente. Foi proposto por Ikasari & Mitchell (2004), para fermentação em estado sólido, e é aqui adaptado para fermentação em meio líquido, uma vez que o crescimento celular apresenta um perfil muito semelhante ao estudado em estado sólido. As equações do modelo para as duas fases foram desenvolvidas separadamente sendo o modelo ajustado aos dados experimentais.



Os parâmetros cinéticos para a produção da lacase por *T. versicolor* com e sem limitação por carbono, em matraz, estão apresentados na Tabela 3.4.

Tabela 3.4 – Parâmetros cinéticos da fermentação de *Trametes versicolor* em matraz

Parâmetros cinéticos	Meio sem limitação por carbono	Meio com limitação por carbono
$\mu_{max}$ (d <sup>-1</sup> )	0.87	0.82
$K_s$ (g/L)	4.21	1.30
$Y_{x/s}$ (g/g)	0.17	0.38
$L$	0.37	0.41
$k$ (d <sup>-1</sup> )	0.0921	0.253
$\alpha$ (U/ g biomassa)	0.059	0.147
$\beta$ (U/ g biomassa. d)	62.9	499

Os resultados da Tabela 3.4 mostram que a taxa específica de crescimento máxima,  $\mu_{max}$ , é muito similar para ambos os meios de cultura: 0.87 dia<sup>-1</sup> para o meio com carbono e 0.82 dia<sup>-1</sup> para o meio com limitação por carbono. Por outro lado, a constante de saturação do substrato ( $K_s$ ) é 3 vezes maior para o meio com carbono, uma vez que esta constante está relacionada com a biomassa máxima obtida (1.7 g/L para o meio com carbono e 0.8 g/L para o meio com limitação por carbono). O valor do parâmetro  $k$ , constante de decaimento exponencial, obtida no meio com limitação por carbono, é 2.7 vezes maior do que no meio com carbono, o que indica que ocorre uma grande desaceleração no crescimento celular quando o carbono está presente. Uma vez que durante a fase exponencial de crescimento, o meio de cultura é o mesmo, o parâmetro  $L$  (razão entre a taxa específica de crescimento no início da fase de desaceleração e a taxa específica de crescimento durante a fase exponencial prévia), é semelhante para ambos os meios.

Para a produção da lacase, o modelo de Luedeking-Piret (equação 2.4, capítulo 2) foi adotado, uma vez que a formação da lacase não é produto do metabolismo primário,

mas sim do metabolismo secundário. Os resultados apresentados na Tabela 3.4 mostram que o valor da constante associada ao crescimento,  $\alpha$ , é muito baixo ( $\alpha = 0.059$  ou  $\alpha = 0.147$  U/g de biomassa) quando comparado com o valor de  $\beta$ , constante não associada ao crescimento ( $\beta = 62,9$  ou  $\beta = 499$  U g<sup>-1</sup> de biomassa d<sup>-1</sup>), o que mostra que em ambos os meios a produção da lacase somente se inicia na fase de desaceleração lenta no crescimento, que se inicia após o terceiro dia. Este modelo de produção de lacase está de acordo com a definição das duas fases distintas para o crescimento da biomassa previamente adoptado.

Os resultados do modelo, juntamente com os dados experimentais para os meios com e sem limitação por carbono para cultivo em matraz, estão apresentados nas Figuras 3.15 e 3.16. Os modelos utilizados correlacionam com grande aproximação o crescimento da biomassa, o consumo de substrato e a síntese da lacase em cultivo submerso não homogéneo.

Os dados das Figuras 3.15 e 3.16 mostram que a produção da lacase em matraz somente tem início a partir do 5º dia de cultivo, quando o crescimento da biomassa se encontra na fase de desaceleração, tanto para o meio com carbono como para o meio com limitação por carbono, conforme já mostrado através dos parâmetros  $\alpha$  e  $\beta$ .

Os resultados da modelação matemática em bioreactor para as oito experiências realizadas com planeamento factorial (Tabela 2.5), onde se avalia a concentração da biomassa, consumo de substrato e produção de lacase, são mostrados nas Figuras 3.17-3.19. Assim como na modelação dos resultados em matraz, também aqui se obteve uma boa descrição dos dados experimentais. O perfil da produção de lacase no meio com limitação por carbono (F1, F2, F5 e F6) e sem limitação por carbono (F3, F4, F7 e F8) é mostrado nas Figuras 3.17 e 3.18, respectivamente. A Figura 3.19 mostra a modelação matemática do consumo de glucose e do crescimento da biomassa. O modelo utilizado parece permitir uma previsão adequada do perfil de crescimento da biomassa, uma vez que a curva do modelo descreve correctamente o único valor acessível experimentalmente que é o da biomassa final.

Nas melhores condições de fermentação, ou seja, para o meio com glucose e controlo de pH (F4 e F8), a produção da lacase atinge uma actividade máxima ao 5º dia, apesar do meio de cultura apresentar ainda glucose e crescimento de biomassa. Para

meios sem controlo de pH (F3 e F7) o perfil da actividade da lacase apresenta um aumento contínuo sem chegar a ser atingido um pico de actividade máxima.

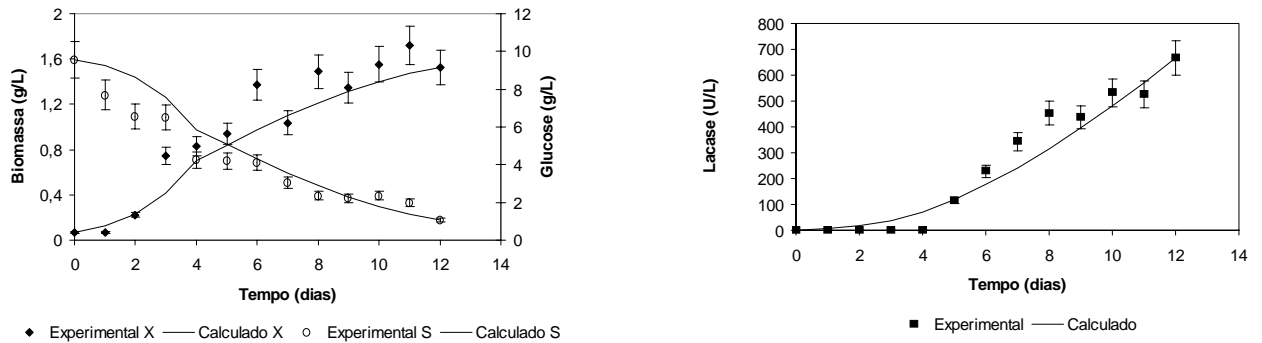


Figura 3.15- Dados experimentais e modelados para o cultivo de *Trametes versicolor* em matraz com o meio com carbono. (X) biomassa; (S) glucose.

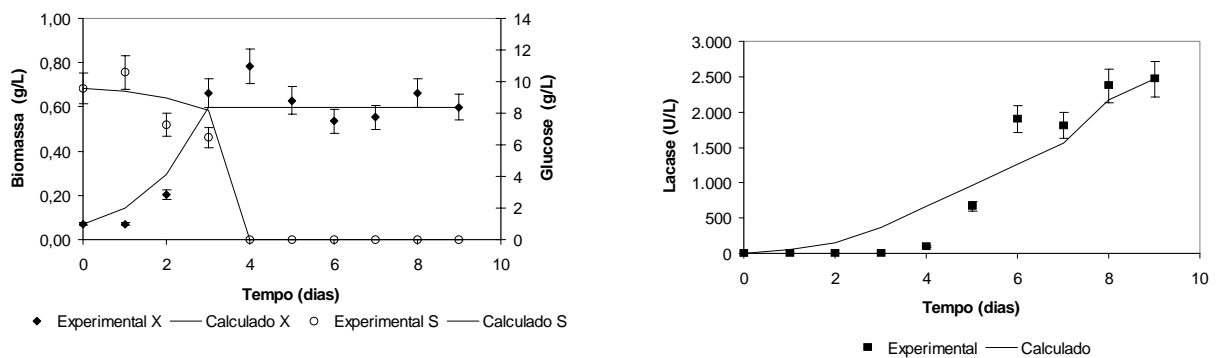


Figura 3.16 - Dados experimentais e modelados para o cultivo de *Trametes versicolor* em matraz com o meio com limitação por carbono. (X) biomassa; (S) glucose.

De acordo com os resultados modelados e a concentração da biomassa final, para as experiências com glucose, o crescimento da biomassa não foi influenciado pelas condições estudadas, em todos os casos, a concentração final de biomassa obtida foi de 1.5 g/L aproximadamente indicando que o aumento na actividade da lacase não foi devido ao aumento da biomassa, mas sim às diferenças nas condições de cultivo. O perfil de crescimento da biomassa foi o mesmo para todas as condições estudadas, com a fase estacionária a ter início no final da fermentação.

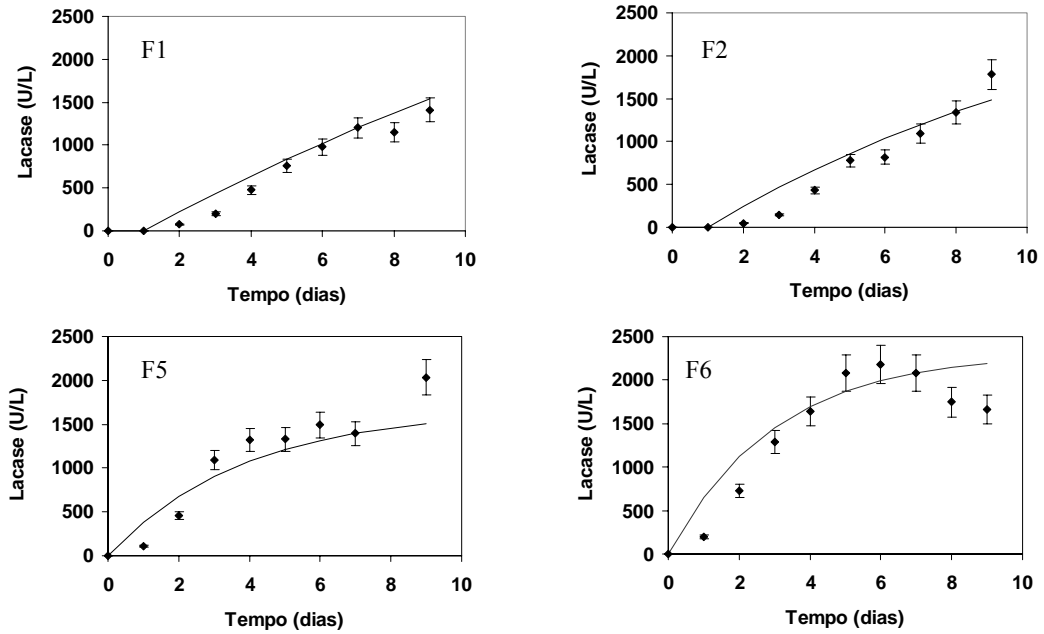


Figura 3.17 - Dados experimentais e modelados para a produção de lacase em bioreactor por *Trametes versicolor* em diferentes condições de fermentação: F1, F2, F5 e F6 (meios com limitação por carbono). Os dados experimentais estão representados por símbolos e os modelados por linhas.

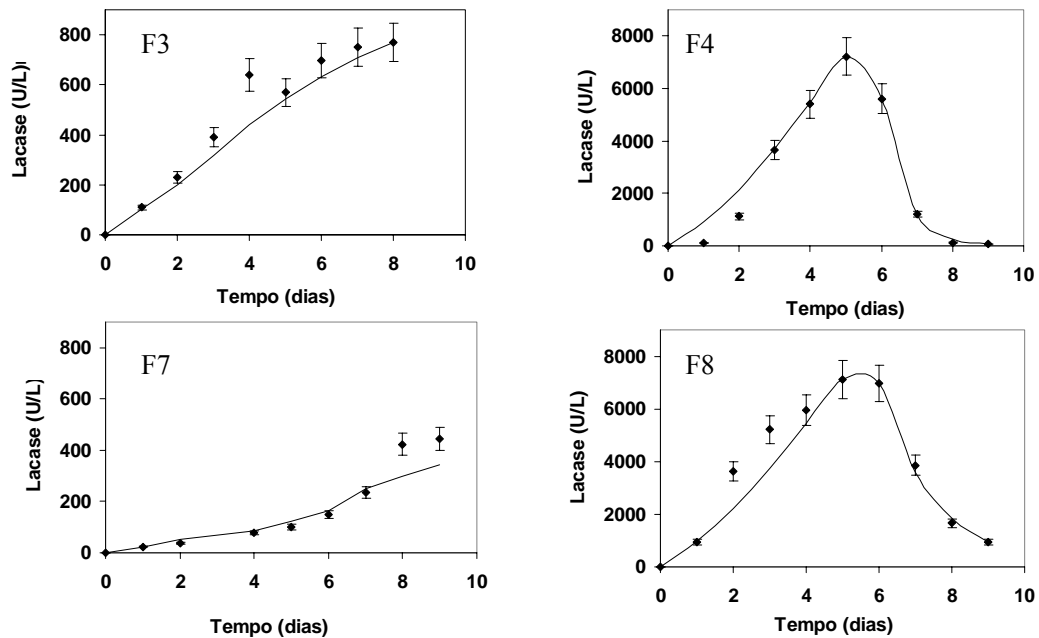


Figura 3.18 - Dados experimentais e modelados para a produção de lacase em bioreactor por *Trametes versicolor* em diferentes condições de fermentação: F3, F4, F7 e F8 (meios com carbono). Os dados experimentais estão representados por símbolos e os modelados por linhas.

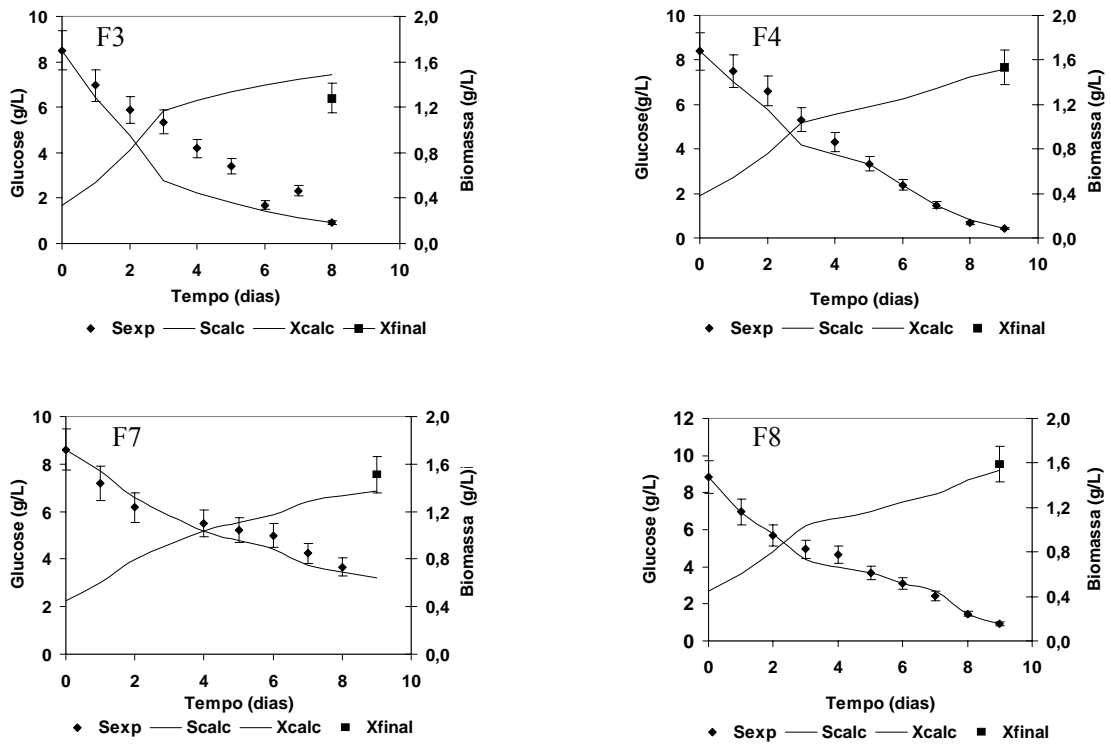


Figura 3.19 - Dados experimentais e modelados para o consumo de glucose e dados modelados para o crescimento da biomassa em bioreactor por *Trametes versicolor* em diferentes condições de fermentação: F3, F4, F7 e F8 (meios com glucose). Os dados experimentais estão representados por símbolos e os modelados por linhas.

Os parâmetros cinéticos para a síntese da lacase ( $K_1$ ), degradação da lacase ( $K_2$ ) e o parâmetro  $A$  estão apresentados na Tabela 3.5. Para as fermentações com limitação por carbono, o parâmetro  $A$  foi tomado como 1, uma vez que a mudança do matraz para o ambiente do bioreactor pode afectar somente o crescimento do fungo e não a síntese enzimática e sob estas condições nenhum crescimento da biomassa foi observado. Dos resultados apresentados na Tabela 3.5, é possível afirmar que a síntese de lacase por *T. versicolor* é essencialmente determinada pela relação entre a presença de carbono no meio de cultura e o controlo de pH, uma vez que nestas experiências foram obtidos valores elevados de  $K_1$  (F4 e F8). Também se pode verificar que a influência da agitação na fermentação não determina a produção enzimática no intervalo estudado. Os valores de  $K_2$  apresentam um perfil similar aos obtido por  $K_1$ , i.e. altos valores de  $K_1$  indicam altos valores de  $K_2$ , como esperado. Este resultado indica a existência de altos níveis de inativação enzimática.

Tabela 3.5 – Parâmetros para a produção de lacase em bioreactor por *Trametes versicolor*

Experiência	A	$K_1$ (U/ (g biomassa.d)	$K_2$ (d <sup>-1</sup> )
F1	1	1443	0.263
F2	1	1293	0.335
F3	0.51	14.3	0.026
F4	0.54	1932	0.667
F5	1	771.3	0.039
F6	1	564.4	0.084
F7	0.85	78.9	0.377
F8	0.64	2088	1.55

### 3.3 – Aplicação da lacase para o bi branqueamento da pasta de papel

#### 3.3.1 – Comparação dos mediadores da lacase para o branqueamento da pasta

##### 3.3.1.1 – Ensaios de bi branqueamento da pasta

Embora a lacase seja uma enzima oxidativa, quando directamente aplicada nas pastas não proporciona uma oxidação eficaz. A sua aplicação no branqueamento das pastas tem sido muito estudada, mas ainda não se conseguiram resultados satisfatórios. De facto a lacase sozinha apresenta um baixo potencial de oxidação-redução, podendo apenas oxidar os fragmentos fenólicos da lenhina (Fabbrini *et al.*, 2002). No entanto, ultimamente a aplicação da lacase tem sido estudada em sistemas com mediadores desempenhando o papel de reoxidante dos mediadores.

Neste estudo, fez-se uma comparação da aplicação da lacase nas pastas com diferentes mediadores orgânicos, já estudados por diversos autores (Bourbonnais & Paice, 1996; Bourbonnais *et al.*, 1997; Bourbonnais *et al.*, 1998; Call & Mucke, 1997; Fabbrini *et al.*, 2002, Ander *et al.*, 1998; Li *et al.*, 1999) e com mediadores inorgânicos, nomeadamente polioxometalatos (Balakshin *et al.*, 1998; Balakshin *et al.*, 2001; Gamelas *et al.* 2005). As principais vantagens dos POMs em relação aos mediadores orgânicos são

os altos potenciais redox, a capacidade de reoxidação, alta selectividade (capacidade de deslenhificação com um mínimo de degradação dos polissacarídeos).

Todos os testes foram realizados a 45°C e pH 4.5 que é aceitável do ponto de vista da estabilidade/actividade da lacase. A redução do índice kappa traduz a oxidação dos compostos insaturáveis nas pastas e a perda de viscosidade intrínseca está directamente associada à degradação dos polissacarídeos da pasta. Esta perda de viscosidade não é desejável para o fabrico de papel, uma vez que altera as propriedades mecânicas da pasta branqueada. É o balanço deste binómio que dita a eficiência do processo de branqueamento.

Na Tabela 3.6 e na Figura 3.20 encontram-se resultados dos branqueamentos da pasta de papel com lacase e sem mediador; com lacase (L) e mediadores orgânicos TEMPO, ABTS, HBT e ácido violúrico; e com lacase e mediadores inorgânicos POMs ( $PW_{11}Mn^{III}$ ,  $SiW_{11}Mn^{III}$  e  $SiW_{11}V^V$ ). Conforme o previsto, quando a lacase se encontra sem mediador no sistema de branqueamento de pasta de papel, os resultados da redução no índice kappa são baixos, com apenas 11% de redução, quando comparados com o sistema lacase-mediador (SLM), onde a redução no índice kappa variou de 13.0 a 26.2%, dependendo do mediador utilizado. Houve sempre uma deslenhificação semelhante ao trabalhar com este sistema SLM, sendo o melhor resultado obtido pelo ácido violúrico, que apresenta uma maior redução no índice kappa e simultaneamente uma perda de viscosidade de 8.4%, o que corresponde a uma boa selectividade de oxidação. Dos mediadores testados, o TEMPO apresentou uma baixa viscosidade da pasta de 575 cm<sup>3</sup>/g (perda de viscosidade de 51.4%), indicando uma extensa degradação dos polissacarídeos, não sendo portanto, um mediador eficaz.

Todos os POMs estudados nestas condições apresentaram uma reduzida deslenhificação, o que não permite distinguir qual o POM que apresenta a melhor capacidade de branqueamento da pasta nestas condições. É importante notar que o pH utilizado encontra-se dentro do intervalo de estabilidade (3-7) destes POMs (Tourné *et al.*, 1970).

Tabela 3.6 – Branqueamento da pasta kraft catalisado por lacase (L) na presença de diferentes mediadores a 45°C

Sistema de branqueamento	Índice Kappa	Viscosidade Intrínseca (cm <sup>3</sup> /g)	Redução do índice kappa (%)	Perda de viscosidade intrínseca (%)	POM oxidado (%)
Pasta kraft (controlo)	12.3	1185	-	-	-
Lacase	10.9	1170	11.0	1.4	-
TEMPO+L	10.5	575	14.2	51.4	-
ABTS+L	10.2	1130	16.2	4.6	-
HBT+L	10.1	1100	17.5	7.2	-
Ácido violúrico +L	9.0	1085	26.2	8.4	-
PW <sub>11</sub> Mn <sup>III</sup> +L	10.2	1160	17.0	2.0	4.0
SiW <sub>11</sub> Mn <sup>III</sup> +L	10.3	1155	15.8	2.6	47
SiW <sub>11</sub> V <sup>V</sup> +L	10.6	1145	13.0	3.0	100

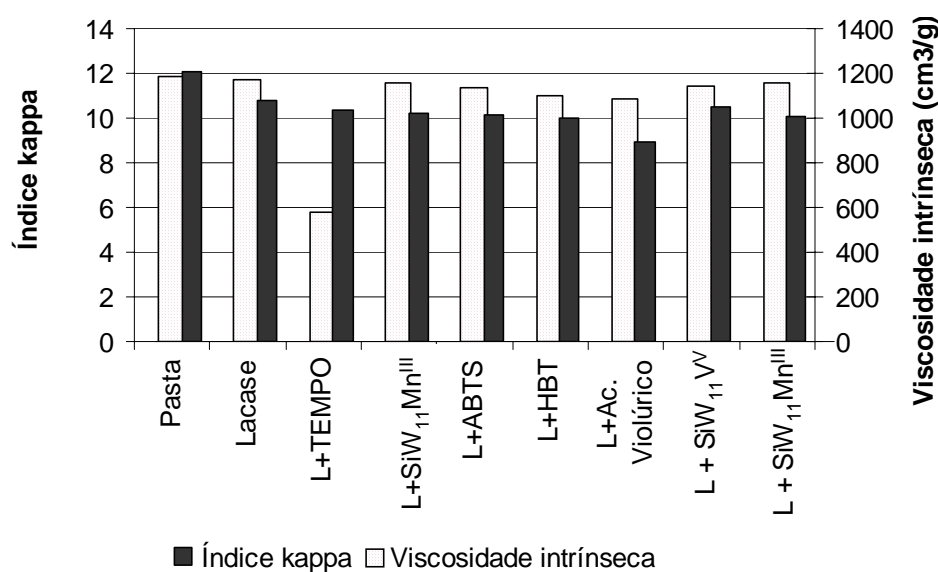


Figura 3.20 – Variação da viscosidade intrínseca e do índice kappa para o sistema de branqueamento da pasta de papel a 45 °C com diferentes mediadores.

Com a finalidade de se aumentar o grau de deslenhificação no SLM, uma vez que os branqueamentos com POMs são referidos a elevadas temperaturas (Gaspar *et al.* 2003), acima de 100°C, fez-se uma nova experiência com 60°C no sistema reacional, dado que a lacase não permite operar a temperaturas mais elevadas. Testaram-se ainda



outros POMs tais como:  $BW_{11}Co^{III}$ ,  $(PW_9)_2Mn^{III}$  e  $SiW_{11}Co^{III}$ . Conforme os resultados apresentados na Tabela 3.7 e na Figura 3.21 o aumento da temperatura do sistema de 45 °C para 60 °C não favoreceu a deslenhificação da pasta ocorrendo um aumento no índice kappa quando se utilizaram os POMs  $PW_{11}Mn^{III}+L$  e  $SiW_{11}Mn^{III}+L$ . Somente para o POM  $SiW_{11}V^V+L$  foi observado um ligeiro aumento na redução do índice kappa, de 13% para 15%. Os demais mediadores estudados também não apresentaram reduções significativas no índice kappa. A menor redução do índice kappa com o aumento da temperatura para os sistemas  $PW_{11}Mn^{III}+L$  e  $SiW_{11}Mn^{III}+L$  é justificado pelo estado de oxidação destes POMs no fim da reacção. De facto a 60 °C a concentração de POM no estado oxidado é menor. Este facto pode ser explicado pela menor eficiência da lacase na reoxidação dos POMs a 60 °C possivelmente devido à sua inactivação ou sua parcial desnaturação a esta temperatura mais elevada. O ligeiro aumento na redução do índice kappa conseguido com o POM  $SiW_{11}V^V$  está relacionado com a sua grande facilidade em ser reoxidado pela lacase, apresentando uma percentagem de reoxidação de 79% no fim do branqueamento.

O processo de oxidação da lenhina ocorre pela acção da forma oxidada do POM, sendo a forma reduzida resultante, reoxidada directamente pela lacase. As condições termodinâmicas das reacções redox podem ser apresentadas da seguinte forma:

$$E^{\circ} \text{ lenhina} < E^{\circ} \text{ POM} < E^{\circ} \text{ lacase} (\sim 0.8 \text{ V}) \text{ ( Balakshin } et \text{ al.}, 2001) \text{ (3.2)}$$

Para se compreender melhor este processo de oxidação – redução dos POMs pela lacase fizeram-se espectros UV-Vis no final dos branqueamentos e determinou-se a percentagem de POM no estado oxidado. Além disso, fez-se um estudo em separado, sem a pasta de papel, de reoxidação directa dos POMs pela lacase.

Tabela 3.7 – Branqueamento da pasta kraft catalisado por lacase na presença de diferentes mediadores a 60 °C

Sistema de branqueamento	Índice kappa	Viscosidade Intrínseca (cm <sup>3</sup> /g)	Redução do índice kappa (%)	Perda de viscosidade intrínseca (%)	POM oxidado (%)
Pasta kraft					-
(controlo)	12,3	1190	-	-	
Lacase	11,1	1150	7,5	2,8	-
B W <sub>11</sub> Co <sup>III</sup> +L	11,3	1110	9,0	6,7	-
(PW <sub>9</sub> ) <sub>2</sub> <sup>III</sup> +L	10,9	1140	11,9	3,9	-
SiCoW <sub>11</sub> +L	10,2	1060	16,5	10,6	-
Ac. violúrico+L	8,9	1110	27,1	6,5	-
SiW <sub>11</sub> Mn <sup>III</sup>	10,4	1080	15,1	9,0	12
PW <sub>11</sub> Mn <sup>III</sup> +L	10,7	1140	12,7	4,3	4
SiW <sub>11</sub> Mn <sup>III</sup> +L	10,5	1100	13,8	7,3	33
SiW <sub>11</sub> V <sup>V</sup> +L	10,4	1130	15,50	3,0	79

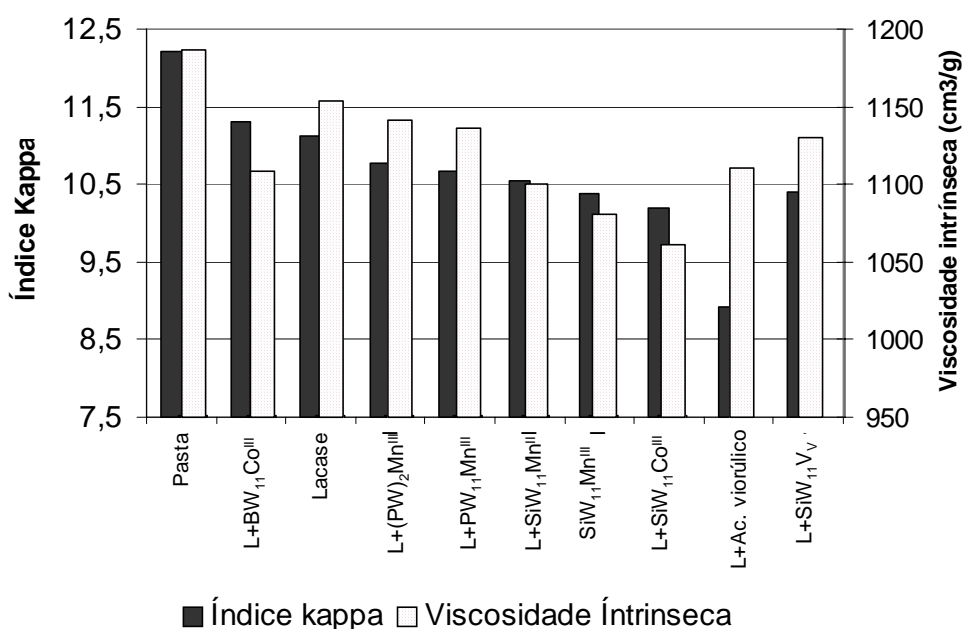


Figura 3.21 – Variação da viscosidade intrínseca e do índice kappa para o sistema de branqueamento da pasta de papel a 60 °C com diferentes mediadores.

Na Figura 3.22 pode ver-se o espectro de absorção do  $\text{SiW}_{11}\text{Mn}^{\text{III}}$  100% no estado oxidado (controlo) e os resultados obtidos com este POM no final das diferentes condições de branqueamentos (testes a 45 °C e a 60 °C). A banda característica deste POM tem um máximo de absorção a 490nm permitindo calcular a percentagem deste POM que permanece no estado oxidado no final de cada ensaio. Os resultados mostram que o aumento deste POM no estado oxidado seguiu a seguinte ordem:  $\text{SiW}_{11}\text{Mn}^{\text{III}}$  a 60 °C (12 % no estado oxidado) < L+  $\text{SiW}_{11}\text{Mn}^{\text{III}}$  a 60 °C (33 % no estado oxidado) < L+  $\text{SiW}_{11}\text{Mn}^{\text{III}}$  a 45 °C (47 % no estado oxidado). Para o branqueamento sem lacase (60°C) uma pequena quantidade de POM no estado oxidado foi encontrado. Quando se adicionou lacase ao sistema de branqueamento com o POM, a percentagem de POM no estado oxidado aumentou para 33% a 60 °C e para 47% a 45 °C. Estes resultados mostram que a oxidação da pasta é mais eficiente quando para além do POM se usa a lacase. Por outro lado, os resultados mostram ainda que a oxidação do POM pela lacase é mais eficiente a 45 °C do que a 60 °C, o que justifica os resultados apresentados anteriormente.

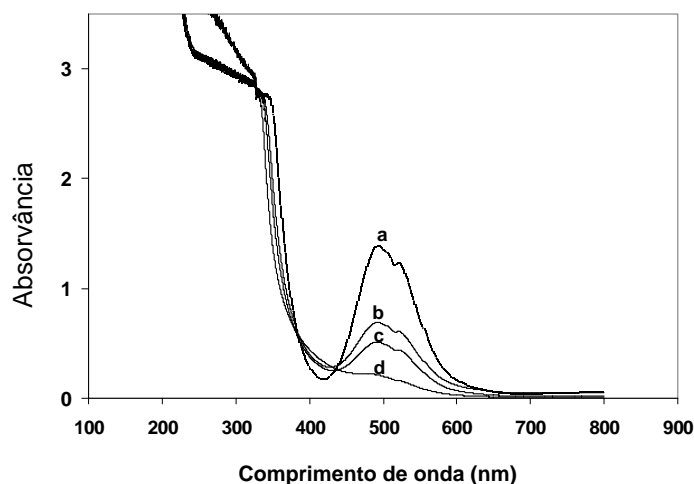


Figura 3.22 – Espectros de UV-Vis da solução de  $\text{SiW}_{11}\text{Mn}^{\text{III}}$  antes do branqueamento (controlo) e ao final do branqueamento em diferentes condições de reacção: (a) controlo; (b) L+ $\text{SiW}_{11}\text{Mn}^{\text{III}}$  a 45°C; (c) L+ $\text{SiW}_{11}\text{Mn}^{\text{III}}$  a 60°C; (d)  $\text{SiW}_{11}\text{Mn}^{\text{III}}$  a 60°C.

A Figura 3.23 compara o estado de oxidação no final da reacção para os POMs  $\text{PW}_{11}\text{Mn}^{\text{III}}$ ,  $\text{SiW}_{11}\text{Mn}^{\text{III}}$  e  $\text{SiW}_{11}\text{V}^{\text{V}}$ . Estes resultados também mostram que para qualquer

POM, o aumento da temperatura faz com que uma menor concentração de POM seja oxidada, devido à perda de actividade da lacase com a subida da temperatura. O  $\text{SiW}_{11}\text{V}^{\text{V}}$  é o POM que se reoxida de um modo mais eficaz atingindo 100% de reoxidação a 45°C, seguido do  $\text{SiW}_{11}\text{Mn}^{\text{III}}$  que atinge 47% a 45°C e finalmente o  $\text{PW}_{11}\text{Mn}^{\text{III}}$  que apenas chega a 4% de reoxidação a 45°C.

Com a finalidade de verificar se a lacase apresentava perda de actividade com o aumento da temperatura, a sua actividade foi determinada ao fim de cada branqueamento. Para as experiências com  $\text{SiW}_{11}\text{Mn}^{\text{III}}$ , a lacase apresentou uma perda na actividade de 21% (de 380.5 U/L inicial para 300 U/L no final) para o branqueamento a 45°C e de 58% (de 380.5 U/L inicial para 158 U/L no fim) para o branqueamento a 60°C. Estes resultados estão de acordo com a percentagem de  $\text{SiW}_{11}\text{Mn}^{\text{III}}$  no estado oxidado a 45°C e a 60°C, confirmando a perda da actividade da lacase com o aumento da temperatura. Nos sistemas com lacase e com os POMs  $\text{PW}_{11}\text{Mn}^{\text{III}}$  e  $\text{SiW}_{11}\text{V}^{\text{V}}$  não foi possível determinar a actividade da lacase no final da reacção, uma vez que estes POMs reagem com o substrato que avalia a actividade enzimática.

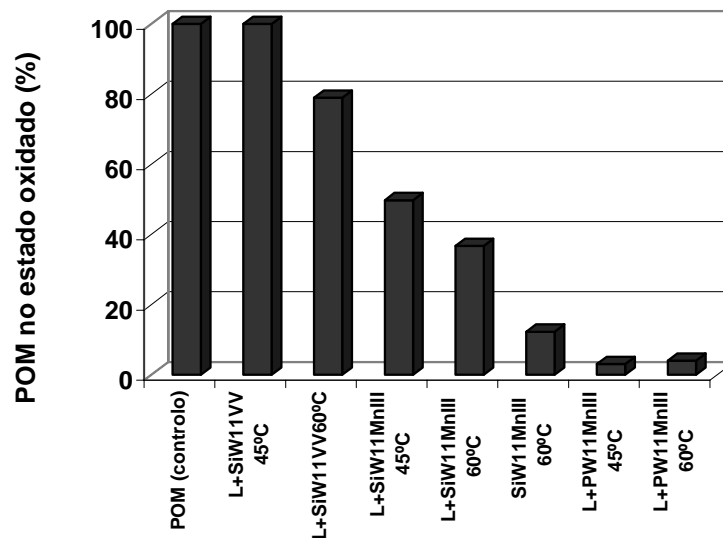


Figura 3.23 –Percentual de  $\text{SiW}_{11}\text{Mn}^{\text{III}}$ ,  $\text{SiW}_{11}\text{V}^{\text{V}}$  e  $\text{PW}_{11}\text{Mn}^{\text{III}}$  no estado oxidado ao final da reacção para as diferentes condições de branqueamento.

### 3.3.1.2 Estudo de oxidação dos POMs pela lacase

No estudo comparativo de oxidação do  $\text{SiW}_{11}\text{V}^{\text{IV}}$ ,  $\text{SiW}_{11}\text{Mn}^{\text{II}}$  e  $\text{PW}_{11}\text{Mn}^{\text{II}}$  pela lacase avaliou-se a eficiência do sistema catalítico na ausência da pasta de papel. As condições das reacções foram seleccionadas levando-se em consideração a estabilidade da lacase e dos POMs (temperatura ambiente,  $\text{pH}=4.5$ , concentração de POM 3.0 mmol/L, actividade inicial de lacase de 380 U/L). O estado de oxidação dos POMs também foi monitorado através dos espectros de UV-Vis e os resultados são apresentados na Figura 3.24. A forma reduzida do  $\text{SiW}_{11}\text{Mn}^{\text{II}}$  apresenta uma coloração amarela, que se foi alterando gradualmente para cor de rosa (forma oxidada) com o decorrer da reacção. A banda de transição tem um máximo de absorção ao comprimento de onda de 490-495 nm (Figura 3.24A). Do mesmo modo, a cor rosa escuro característica do  $\text{SiW}_{11}\text{V}^{\text{IV}}$  na forma reduzida alterou-se para amarela, a cor da forma oxidada, apresentando uma banda característica no espectro visível com um máximo de absorção em 490 nm (Figura 3.24B). Um comportamento semelhante foi observado para o  $\text{PW}_{11}\text{Mn}^{\text{II}}$ , embora com uma baixíssima taxa de reoxidação (espectro não apresentado). A oxidação do  $\text{SiW}_{11}\text{V}^{\text{IV}}$  para  $\text{SiW}_{11}\text{V}^{\text{V}}$  pela lacase também foi monitorada por espectroscopia  $^{51}\text{V}$  RMN, que confirma que a estrutura do  $\text{SiW}_{11}\text{V}^{\text{V}}$  (Figura 3.25) manteve-se inalterada.

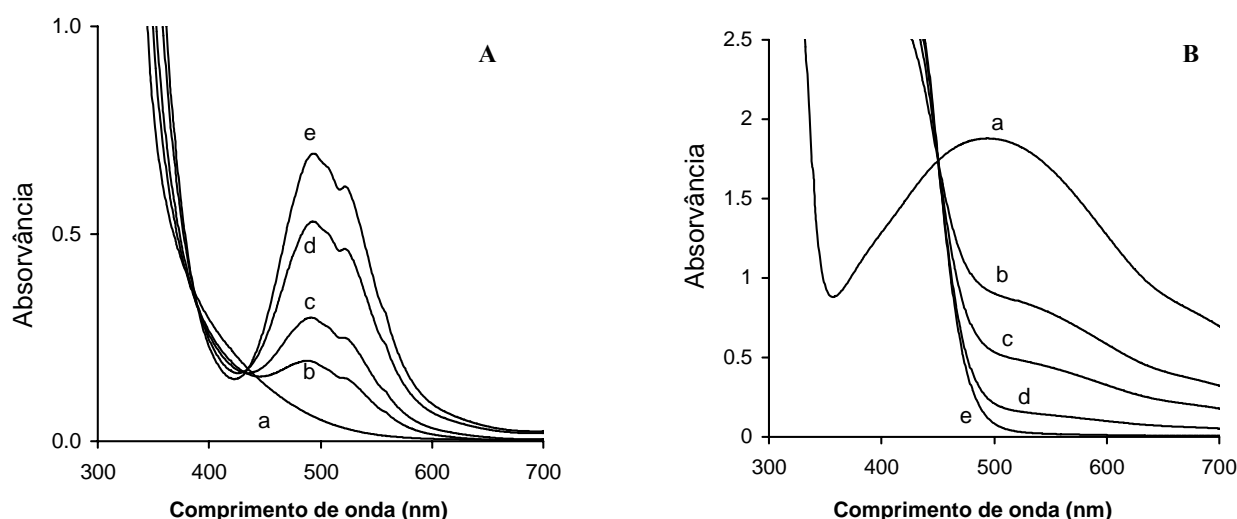


Figura 3.24 – Espectro UV-Vis para as soluções aquosas (3.0 mmol/L) de  $\text{SiW}_{11}\text{Mn}^{\text{II}}$  (A) e  $\text{SiW}_{11}\text{V}^{\text{IV}}$  (B) a  $\text{pH}=4.5$  e com adição de lacase (380 U/L) a temperatura ambiente e pressão atmosférica (a). **A**: 4h (b); 8 h (c); 24 h (d); 50 h (e); **B**: 15 min. (b); 30 min. (c); 60 min. (d); 120 min. (e).

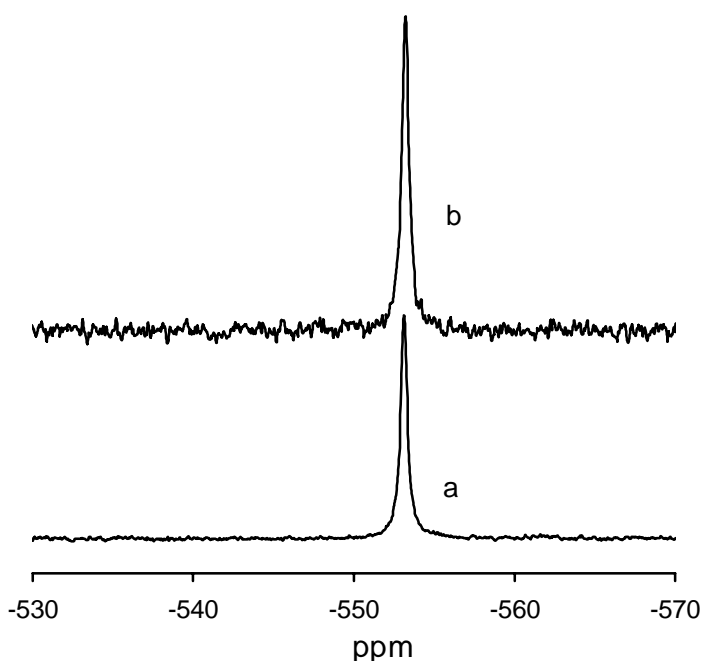


Figura 3.25 – Espectro de  $^{51}\text{V}$  RMN da solução original de  $\text{SiW}_{11}\text{V}^{\text{V}}$  (a) da solução obtida após a reacção do  $\text{SiW}_{11}\text{V}^{\text{IV}}$  (3.0 mmol/L) com a lacase (b).

A reacção de reoxidação dos diferentes POMs pela lacase também foi estudada variando a actividade inicial de lacase, a pressão de oxigénio e a temperatura, uma vez que a subida de temperatura de 45°C para 60°C se revelou desfavorável nos branqueamentos, testou-se a temperatura de 25°C. A Tabela 3.8 mostra os resultados da percentagem de cada POM no estado oxidado. O  $\text{PW}_{11}\text{Mn}^{\text{II}}$ , apresenta a menor reoxidação pela lacase, uma vez que mesmo no final de 24h de reacção com a lacase, somente 5% foi oxidado. Para o mesmo período de tempo, cerca de 55% do  $\text{SiW}_{11}\text{Mn}^{\text{II}}$  já se encontrava na forma oxidada e após 15 min de reacção mais de 50 % do  $\text{SiW}_{11}\text{V}^{\text{IV}}$  já se encontrava na sua forma oxidada. Observando a Figura 3.24B verifica-se que se obteve uma reoxidação praticamente completa do  $\text{SiW}_{11}\text{V}^{\text{IV}}$  logo após 2h de reacção. Desta forma, o poder de oxidação destes três POMs pela lacase pode ser ordenado do seguinte modo:  $\text{PW}_{11}\text{Mn}^{\text{II}} \ll \text{SiW}_{11}\text{Mn}^{\text{II}} < \text{SiW}_{11}\text{V}^{\text{IV}}$ .

É interessante notar que a reoxidação do  $\text{PW}_{11}\text{Mn}^{\text{II}}$  e do  $\text{SiW}_{11}\text{Mn}^{\text{II}}$  foi mais eficaz na presença da pasta kraft (Tabela 3.6 e 3.7) do que nas experiências sem a pasta (Tabela 3.8). Uma das possíveis explicações pode ser o facto de ocorrer estabilização/activação

da lacase com os compostos fenólicos removidos da degradação parcial da lenhina. Mai *et al.* (2000), mostrou que a presença de compostos fenólicos ou derivados da lenhina aumentam a estabilidade e actividade da lacase, e sugere que esta estabilização pode ser devido à ligação dos compostos ao centro activo da enzima ou a outra parte da cadeia da proteína. Deste modo, certamente a reoxidação do  $PW_{11}Mn$  e do  $SiW_{11}Mn$  na presença da pasta de papel, consegue ser mais eficaz devido à lacase se encontrar mais estável.

Os resultados mostram claramente que o efeito do aumento da concentração de lacase de 380 U/L para 1330 U/L foi o mais significativo. O aumento da pressão de oxigénio de 0.02 MPa para 0.3 MPa também melhorou a oxidação do POM pela lacase como se vê no resultado obtido com o  $SiW_{11}Mn^{II}$ . A temperatura apresentou um efeito menor na reacção de oxidação deste mesmo POM. A temperatura máxima de reacção foi limitada em 45°C nestas experiências, uma vez que ocorreu uma diminuição na actividade da lacase em temperaturas superiores a 50°C. O POM que apresentou melhores resultados quando oxidado pela lacase foi o  $SiW_{11}V^{IV}$  chegando até 82% após 15 min. de reacção. O  $SiW_{11}Mn^{II}$  também apresentou resultados significativos, uma vez que se oxidou em cerca de 50% após 4 horas nas melhores condições de actividade inicial de lacase, pressão de  $O_2$  e de temperatura. O  $PW_{11}Mn^{II}$  apresentou um resultado insignificante uma vez que só chegou a 5% de oxidação após 24 horas.

Tabela 3.8 – Oxidação dos polioxometalatos pela lacase em diferentes condições de reacção

POM	Lacase (U/L)	Pressão de $O_2$ (MPa)	Temperatura (°C)	POM oxidado (%)
$SiW_{11}Mn^{II}$	380	~0.02	25	16 (55) <sup>a</sup>
$SiW_{11}Mn^{II}$	1330	~0.02	25	35 (84) <sup>a</sup>
$SiW_{11}Mn^{II}$	1330	0.3	25	48 (88) <sup>a</sup>
$SiW_{11}Mn^{II}$	1330	0.3	45	52 (95) <sup>a</sup>
$SiW_{11}Mn^{II}$	380	0.3	45	36 (69) <sup>a</sup>
$SiW_{11}V^{IV}$	380	~0.02	25	52 (72) <sup>b</sup>
$SiW_{11}V^{IV}$	1330	~0.02	25	82 (96) <sup>b</sup>
$PW_{11}Mn^{II}$	380	~0.02	25	<1 (5) <sup>a</sup>

<sup>a</sup> Medidas após 4 h ou após 24 h (dados entre parênteses).

<sup>b</sup> Medidas após 15 min ou após 30 min (dados entre parênteses).

Considerando-se os potenciais redox destes POMs, a difícil oxidação do  $PW_{11}Mn^{II}$  pela lacase pode ser justificada pelo seu elevado potencial ( $E=+0.91$  V vs. ENH) (Zhang *et al.*, 1995). Uma vez que o potencial redox da lacase é muito próximo deste, cerca de  $+0.8-0.9$  V (vs. ENH) (Solomon *et al.*, 1996; Mayer & Staples, 1996), este POM é dificilmente reoxidado por esta enzima. Para os outros dois POMs, as diferenças significativas no comportamento de oxidação do  $SiW_{11}Mn^{II}$  e do  $SiW_{11}V^{IV}$  não podem ser formalmente explicadas pelos potenciais redox descritos na literatura, uma vez que são muito próximos. Para o  $SiW_{11}V$  o potencial redox efectivo ( $E=(E_{pc}+E_{pa})/2$ ) do par redox  $V^{V/IV}$  foi apresentado como  $+0.64$  V (vs. ENH, pH=5) (Altenau *et al.*, 1975) e, em outro estudo, como  $+0.72$  V (vs. ENH, pH=4.5) (Harmalkar & Pope, 1986). Recentemente, Weinstock *et al.* (1997) mostrou o valor de potencial redox efectivo de  $E = +0.69$  V para pH=5. Para o  $SiW_{11}Mn$  o potencial redox do par  $Mn^{III/II}$  foi medido como  $+0.65$  V (vs. ENH) (Tourné *et al.*, 1970) e, mais recentemente, como  $+0.70-0.73$  V (vs. ENH) (Zhang *et al.*, 1995; Sadakane & Steckhan, 1999; Sadakane & Steckhan, 1996). Desta forma, uma comparação dos dados sobre os potenciais redox destes dois POMs não é clara para se avaliarem as diferenças nos resultados. Além disso, sabe-se que os potenciais redox dos POMs podem ser muito sensíveis a factores tais como o pH, os contra iões e outros (Grigoriev *et al.*, 2000).

Para se tentar esclarecer as diferenças nos potenciais redox desses dois POMs ( $SiW_{11}Mn^{II}$  e  $SiW_{11}V^{IV}$ ) fez-se uma análise de voltametria cíclica em condições similares às utilizadas nas experiências de branqueamento. Pelos resultados apresentados na Figura 3.26, pode-se observar que o par  $V^{V/IV}$  no  $SiW_{11}V^{IV}$  é eletroquimicamente reversível (Figura 3.26a) apresentando um  $E=+0.67$  V ( $E_{pa}=+0.70$  V,  $E_{pc}=+0.64$  V,  $E_{pa}-E_{pc}=60$  mV). O correspondente par  $Mn^{III/II}$  no  $SiW_{11}Mn$  é quase - reversível (Figura 3.24b) e apresenta um  $E=+0.76$  V com  $E_{pa}=+0.88$  V,  $E_{pc}=+0.64$  V, e  $E_{pa}-E_{pc}=240$  mV (vs. ENH). Deste modo, a fácil oxidação do  $SiW_{11}V^{IV}$  pela lacase está relacionada com a sua alta reversibilidade e com o baixo potencial de oxidação ( $E_{pa}=+0.70$  V) do vanádio, quando comparado com o do manganês, que apresenta um potencial de oxidação de  $E_{pa}=+0.88$  V, o que torna a sua reoxidação pela lacase mais difícil do que para o vanádio.



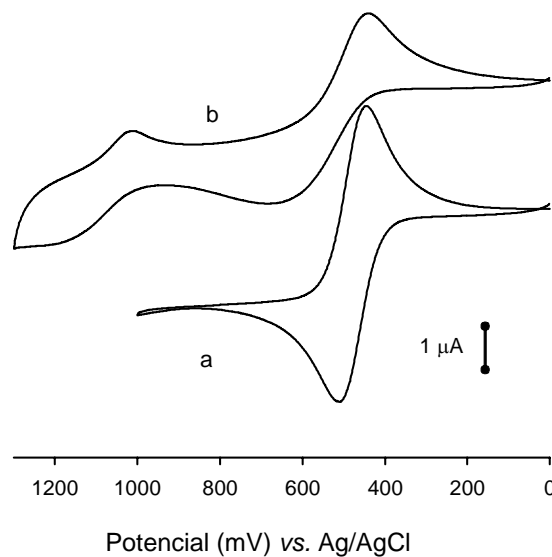


Figura 3.26 – Voltametria cíclica ( $v=10$  mV/s) dos POMs  $\text{SiW}_{11}\text{V}^{\text{IV}}$  (a) e  $\text{SiW}_{11}\text{Mn}^{\text{II}}$  (b) ( $[\text{POM}]=1.0$  mmol/L,  $\text{pH}=4.5$ ,  $25^\circ\text{C}$ ).

### 3.3.2 – Branqueamento da pasta kraft com $\text{SiW}_{11}\text{Mn}^{\text{III}}$ e lacase $\text{SiW}_{11}\text{V}^{\text{V}}$ e lacase num sistema de multi-estágios

Como mostrado nos resultados anteriores, os POMs  $\text{SiW}_{11}\text{Mn}^{\text{III}}$  e  $\text{SiW}_{11}\text{V}^{\text{V}}$  são facilmente reoxidados pela lacase a baixas temperaturas. Entretanto, sabe-se que estes POMs actuam de forma mais eficiente quando as reacções de branqueamento com pasta ocorrem a temperaturas superiores a  $100^\circ\text{C}$ . Para se tentar solucionar esta incompatibilidade de temperaturas óptimas, para o POM e para a lacase, realizou-se um estudo catalítico de deslenhificação da pasta de papel em estágios separados e alternados. Realizou-se o primeiro estágio de branqueamento com a temperatura óptima para o POM (estágio POM a  $110^\circ\text{C}$ ) na ausência de lacase, seguido de um segundo estágio de reoxidação do POM com a adição de lacase (estágio L) em difentes temperaturas ( $30$ ,  $45$  e  $60^\circ\text{C}$ ). Neste processo utilizaram-se os POMs  $\text{SiW}_{11}\text{Mn}^{\text{III}}$ ,  $\text{SiW}_{11}\text{V}^{\text{V}}$  e  $\text{PW}_{11}\text{Mn}^{\text{III}}$ .

Os resultados obtidos com os estágios sequenciais de branqueamento com o  $\text{SiW}_{11}\text{Mn}^{\text{III}}$  estão mostrados na Tabela 3.9. O tratamento prosseguiu até um total de 5 estágios POM e L alternados. Com um único estágio de branqueamento, o estágio POM, pouca redução no índice kappa foi observada, resultando numa deslenhificação de apenas 23%, além do POM estar predominantemente no estado reduzido no final da reacção (somente 4% encontrava-se no estado oxidado).

Quando a lacase foi adicionada no segundo estágio (L), um aumento de 5% no grau de deslenhificação foi obtido e o POM passou a estar 68% no estado oxidado no final do segundo estágio, o que foi importante para se obter uma maior deslenhificação no estágio posterior. Adicionalmente, realizou-se um espectro de UV-vis do efluente deste branqueamento depois de armazenado por uns dias (Figura 3.27). Nesta altura quase 100% do POM se encontrava no estado oxidado. De qualquer modo, os dois estágios de branqueamento mostraram melhores resultados, com um aumento de aproximadamente duas vezes no grau de deslenhificação, do que um único estágio de POM+L 45°C (já apresentados na Tabela 3.8) por outro lado, demonstrou uma menor selectividade devido a maior perda na viscosidade.

Tabela 3.9 – Branqueamento da pasta kraft em estágios sequenciais catalisado por  $\text{SiW}_{11}\text{Mn}^{\text{III}}$  (POM) e lacase

Sistema de branqueamento	Índice Kappa	Viscosidade Intrínseca ( $\text{cm}^3/\text{g}$ )	Redução no índice kappa (%)	Perda de viscosidade Intrínseca (%)	$\text{SiW}_{11}\text{Mn}^{\text{III}}$ (% oxid.)
Pasta kraft	12.3	1185	-	-	-
Sem catalisador	10.6	1140	14	4	-
POM	9.5	1130	23	5	4*
POM-L (45°C)	8.9	1080	28	9	68* (98)**
POM-L-(45°C)- POM	6.9	1075	44	9	7*
POM-L-(45°C)- POM-L(45°C)-POM	6.0	1020	51	14	11*
POM-L (30°C)- POM	7.1	1065	42	10	-
POM-L (60°C)- POM	7.5	1065	39	10	-
$\text{PW}_{11}\text{Mn-L}$	9.0	1085	27	8	4*

\* Dados para o último estágio da sequência.\*\* Solução armazenada durante uma semana.

Ao fim do terceiro estágio de branqueamento (POM-L-POM), uma grande deslenhificação foi obtida, com 44% de redução no índice kappa e ao mesmo tempo

houve baixa perda de viscosidade, apenas 9%. A adição de mais um estágio POM na sequência de branqueamento não demonstrou uma perda de viscosidade tão significativa como quando se adicionou um estágio L. Este facto sugere que os estágios L são responsáveis por uma maior perda de viscosidade. De facto esta enzima, para além de oxidar o POM, oxida também a celulose pelo que promove a perda de viscosidade da pasta de papel (Thurston, 1994; Accunzo & Galli, 2003).

Após 5 estágios consecutivos de branqueamento (POM-L-POM-L-POM), obtiveram-se os melhores resultados, com um índice kappa de 6.0, que corresponde mais de 50% de deslenhificação da pasta, com apenas 14% de perda de viscosidade da pasta (Tabela 3.9).

Para avaliar se a temperatura do estágio L apresenta algum efeito neste processo de branqueamento em multi-estágios, testou-se a temperatura do estágio L também a 30°C. Os resultados mostraram que a variação da temperatura no estágio L de 45°C para 30 °C e 60°C não apresentaram nenhum benefício para os três estágios de branqueamento da pasta (Tabela 3.9). Isto pode ser explicado pela menor reoxidação do  $\text{SiW}_{11}\text{Mn}^{\text{II}}$  a 30°C do que a 45°C e pela parcial desnaturação da lacase a 60°C.

Os espectros UV-Vis, apresentados na Figura 3.27, foram determinados para um estágio, para dois estágios e para cinco estágios de branqueamento. Observa-se que nos branqueamentos que não terminam num estágio L, o POM encontra-se praticamente todo no estado reduzido (Figura 3.27 b, e).

O  $\text{PW}_{11}\text{Mn}^{\text{III}}$  também foi testado nas experiências de multi-estágios. Com dois estágios de branqueamento, o grau de deslenhificação obtido foi similar ao  $\text{SiW}_{11}\text{Mn}^{\text{III}}$  nas mesmas condições experimentais (Tabela 3.9). No entanto, a reoxidação do  $\text{PW}_{11}\text{Mn}^{\text{III}}$  após o estágio com a lacase foi muito baixa, apenas 4% no estado oxidado, o que não justificou o uso deste catalisador com 3 e 5 estágios de branqueamento.

É importante notar que a diminuição do índice kappa da pasta não branqueada é determinada não somente pela oxidação da lenhina, mas também devido à hidrólise dos resíduos de ácido hexourónico (HexA) ligados aos polissacarídeos da pasta. A pasta kraft de eucalipto contém cerca de 30-40 mmol de HexA/kg de pasta seca, o que corresponde a 3-4 unidades de índice kappa (Furtado *et al.*, 2001). Então, a 110°C e pH 4.5 uma parcial

hidrólise do HexA contribui para a diminuição do índice kappa. Este facto foi confirmado pela experiência em branco sem a adição de nenhum catalisador (Tabela 3.9).

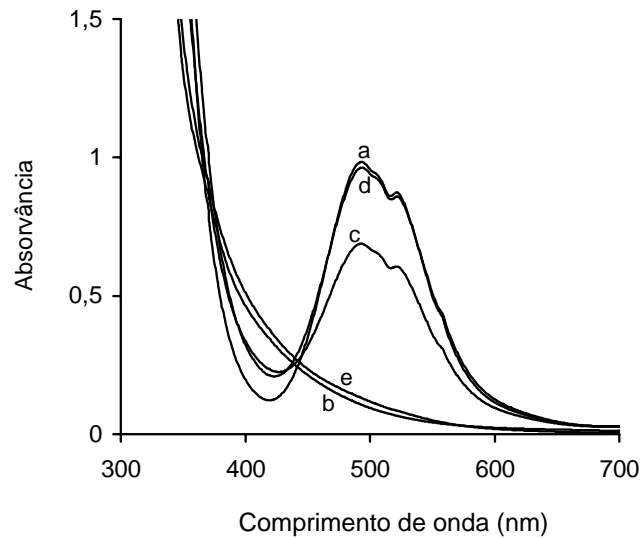


Figura 3.27 – Espectros de UV-VIS da solução de  $\text{SiW}_{11}\text{Mn}^{\text{III}}$  antes do branqueamento (a); depois de um estágio de branqueamento POM (b); depois de dois estágios de branqueamento POM-L (c) seguido de uma semana de armazenamento do efluente (d); depois de cinco estágios de branqueamento POM-L-POM-L-POM (e).

O mesmo tratamento de branqueamento da pasta em multi-estágios foi aplicado para o POM  $\text{SiW}_{11}\text{V}^{\text{V}}$ . Os resultados mostrados na Tabela 3.10 indicam que este POM foi mais eficiente na deslenhificação da pasta do que o  $\text{SiW}_{11}\text{Mn}^{\text{III}}$ , entretanto apresentou uma menor selectividade. Os resultados mais próximos entre estes dois POMs foram obtidos com dois estágios de branqueamento (POM-L), Tabelas 3.9 e 3.10. Com apenas três estágios de branqueamento, o  $\text{SiW}_{11}\text{V}^{\text{V}}$  apresentou o mesmo grau de deslenhificação, cerca de 50%, do que o  $\text{SiW}_{11}\text{Mn}^{\text{III}}$  com cinco estágios de branqueamento. O aumento da temperatura também não favoreceu o branqueamento.

Tabela 3.10 - Branqueamento da pasta kraft em estágios sequenciais catalisado por  $\text{SiW}_{11}\text{V}^{\text{V}}$  e lacase

Sistema de branqueamento	Índice Kappa	Viscosidade Intrínseca ( $\text{cm}^3/\text{g}$ )	Redução no índice kappa (%)	Perda de Viscosidade Intrínseca (%)	$\text{SiW}_{11}\text{V}^{\text{V}}$ oxidado (%)
Pasta Kraft	12.3	1185	---	---	---
POM	9.0	1055	26	11	6
POM-L (45°C)	8.2	1035	33	13	98
POM-L (60°C)	7.7	1010	37	15	80
POM-L (45°C)-POM	6.9	1005	44	15	15
POM-L (60°C)-POM	6.2	935	50	21	12

Similarmente ao  $\text{SiW}_{11}\text{Mn}$ , o  $\text{SiW}_{11}\text{V}$  foi encontrado predominantemente na forma reduzida após os estágios POM e POM-L-POM, como mostrado na Figura 3.28, que apresenta os espectros de UV/Vis no final das reacções. Após o estágio POM-L cerca de 80-100 % do  $\text{SiW}_{11}\text{V}$  ficou no estado oxidado que corresponde a uma taxa de reoxidação mais rápida do que para o  $\text{SiW}_{11}\text{Mn}$  nas mesmas condições reacionais. O espectro de RMN confirma a estabilidade do  $\text{SiW}_{11}\text{V}$  após as reacções em multi-estágios (Figura 3.28).

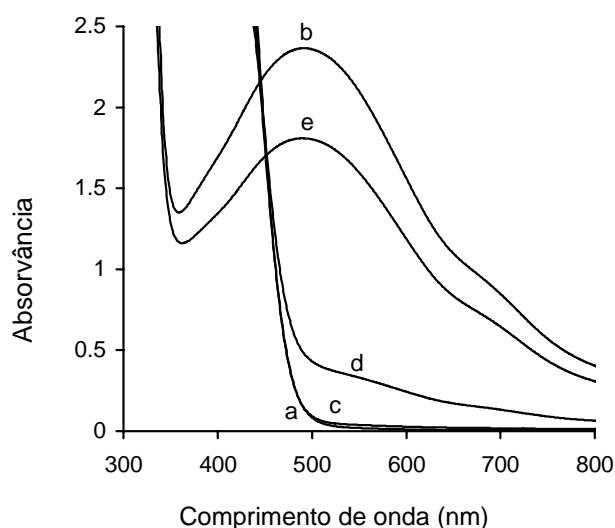


Figura 3.28 – Espectros de UV-Vis da solução de  $\text{SiW}_{11}\text{V}^{\text{V}}$  antes do branqueamento (a), depois de um estágio POM de branqueamento (b), depois de dois estágios POM-L (45°C) de branqueamento (c), depois de dois estágios POM-L (60°C) de branqueamento (d), e depois de três estágios POM-L (60°C)-POM de branqueamento (e).

A menor selectividade do  $\text{SiW}_{11}\text{V}^{\text{V}}$  no branqueamento da pasta quando comparada com o  $\text{SiW}_{11}\text{Mn}^{\text{III}}$  pode ser explicada pela parcial dissociação, com a libertação dos iões  $\text{VO}_2^+$  do  $\text{SiW}_{11}\text{V}^{\text{V}}$  em condições acidificadas que favorecem a degradação dos polissacarídeos da pasta de papel. Embora as espécies de  $\text{VO}_2^+$  não terem sido detectadas pela análise de RMN (Figura 3.29) ao fim do branqueamento, a sua formação durante o branqueamento pode ter ocorrido. Esses iões causam a despolimerização oxidativa da pasta de papel. Os iões livres  $\text{VO}_2^+$  apresentam um potencial de redução mais alto,  $E^\circ = 0.9 \text{ V}$ , do que o POM correspondente, além de exibir um forte actividade catalítica em reacções com compostos orgânicos. Deste modo,  $\text{VO}_2^+$  pode ser considerado como uma das espécies catalíticas mais activas, além de apresentar um efeito pronunciado na oxidação da celulose durante a catálise do branqueamento da pasta com o  $\text{SiW}_{11}\text{V}^{\text{V}}$  (Shatalov *et al.*, 2000).

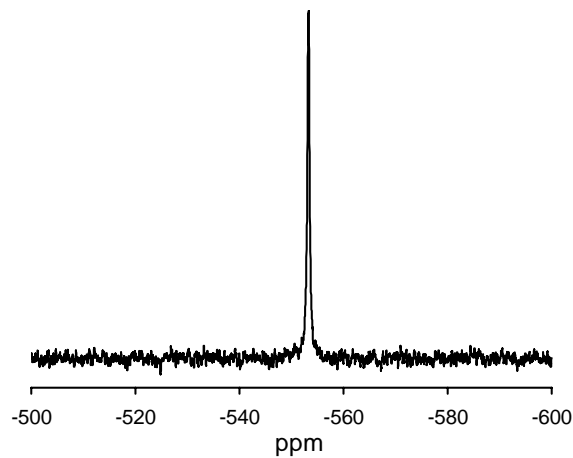


Figura 3.29 – Espectro de  $^{51}\text{V}$  RMN da solução obtida após dois estágios de branqueamento:  $\text{SiW}_{11}\text{V-L}$  ( $60^\circ\text{C}$ ).

### 3.4 – Produção de exopolissacarídeo (EPS) por *Trametes versicolor*

#### 3.4.1 Selecção do meio de produção do exopolissacarídeo

Com a finalidade de seleccionar o melhor meio de cultura para a produção de EPS por *T. versicolor* estudaram-se em cinco diferentes meios já descritos: meio Tien & Kirk (TaK) (utilizado na manutenção do fungo); meio definido para *Trametes* (MDT) (meio utilizado na produção da lacase); meio extracto de malte e levedura (YM); meio completo para fungos (MCM) e meio glucose extracto de levedura e peptona (GPY).

Dos cinco meios testados no cultivo, nenhuma produção de EPS por *T. versicolor* foi observada para os meios MDT e GPY. O meio MDT, por ser um meio definido e pobre, provavelmente não possui as fontes de nutrientes necessárias para sintetizar o EPS pelo fungo. Por outro lado, o meio GPY apresenta uma alta concentração de glucose (40 g/L) que provavelmente inibe ou reprime o mecanismo de produção do EPS pelo fungo. Os outros três meios usados, TaK, YM e MCM mostraram-se promissores para a produção do EPS.

A Figura 3.30 mostra o crescimento da biomassa (a), o consumo de açúcares redutores (b) e a produção do EPS (c) para os meios MCM, TaK e YM. Os resultados mostram que a concentração dos açúcares redutores diminui durante a fermentação com o correspondente aumento da biomassa. A curva da biomassa (Figura 30a) apresenta uma fase de crescimento linear da biomassa entre o segundo e o quarto dia de cultivo e uma fase de desaceleração no crescimento entre o quarto e o sétimo dia de cultivo. Este perfil de crescimento da biomassa, com duas fases, foi o mesmo observado durante a produção de lacase pelo *T. versicolor* neste estudo.

A produção do EPS somente se iniciou ao quarto dia de cultivo (Figura 3.30c), o que mostra que a formação deste EPS não é associada à fase exponencial de crescimento da biomassa (Figura 3.30a). A produção do EPS desencadeia-se quando termina o crescimento celular mais activo e as células iniciam a fase de desaceleração do crescimento. Este comportamento é típico dos produtos que não são produzidos pelo metabolismo primário, cuja produção é associada com o crescimento exponencial da biomassa, mas sim dos produtos do metabolismo secundário. Usualmente, os produtos

secundários dos fungos filamentosos estão relacionados com a produção dos metabólitos secundários no início da fase de desaceleração no crescimento (Waites *et al.* 2001).

Comparando-se a produção do EPS nos três meios de cultura (Figura 3.30c), observa-se que a produção termina após o sétimo dia de cultivo para os três meios estudados. A produção máxima é obtida numa concentração de aproximadamente 700 mg/L (Tabela 3.11) no último dia de cultivo para o meio YM, enquanto que para os meios TaK e MCM a concentração máxima de EPS obtida foi de 590 e 460 mg/L, respectivamente. É de salientar que para ambos os meios a produção do EPS terminou antes do consumo total de substrato.

A produção do EPS obtida com o meio YM (700 mg/L; Tabela 3.11) foi superior do que a mostrada por Kim *et al.* (2002a) para o cultivo de *C. versicolor*, cuja máxima produção do EPS no meio YM foi de 504 mg/L.

Tabela 3.11 - Resultados do cultivo de *Trametes versicolor* nos meios de cultura TaK, MCM e YM.

Parâmetros de cultivo	Meio de cultura		
	TaK	MCM	YM
Concentração máxima da biomassa (g/L)	4.4	3.3	3.8
Concentração máxima do EPS (mg/L)	590	460	700
Máxima viscosidade aparente (mPa.s)	26.0	16.0	47.1
Máxima produtividade do EPS (g/L d <sup>-1</sup> )	0.073	0.068	0.094
Rendimento (g de biomassa/g de açúcares redutores consumidos)	0.24	0.17	0.23
Máximo EPS/biomassa (g/g)	0.16	0.14	0.24



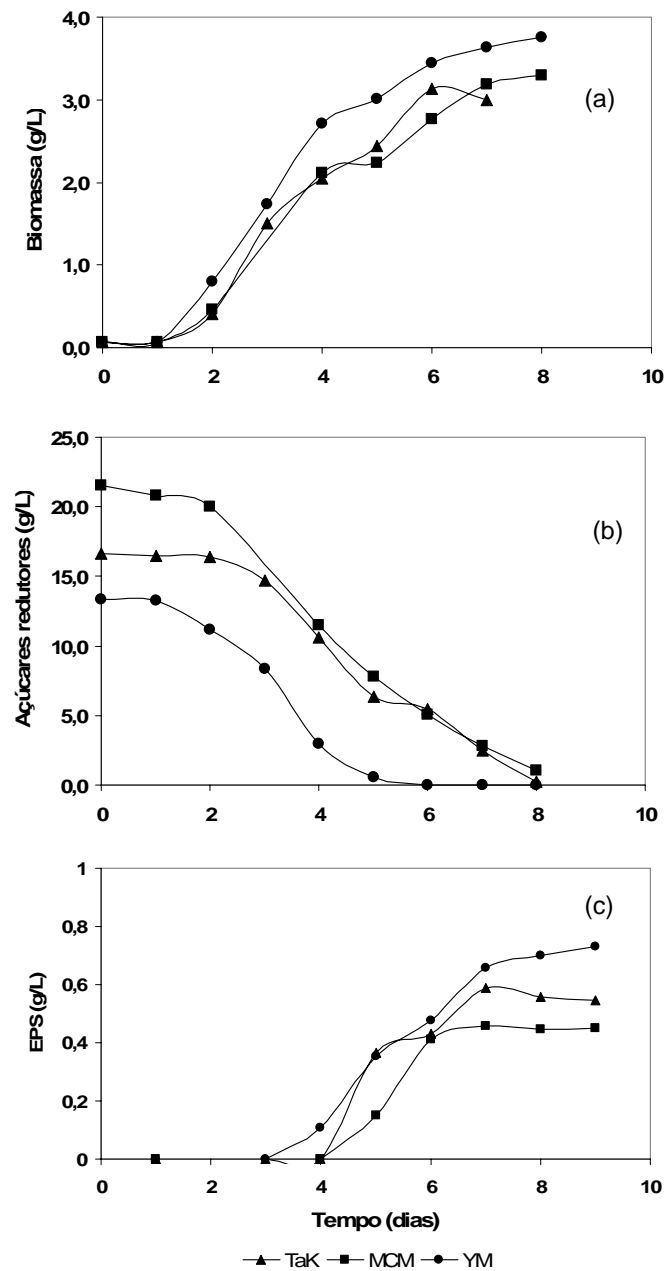


Figura 3.30 – Crescimento da biomassa (a), consumo de açúcares redutores (b), produção de EPS (c) durante a fermentação de *Trametes versicolor* nos meios TaK, MCM e YM.

A Tabela 3.11 mostra os resultados do cultivo de *T. versicolor* para a produção do EPS nos meios de cultivo TaK, MCM e YM. Embora a alta concentração e o rendimento da biomassa (g de biomassa/g de açúcares redutores consumidos) sejam obtidos com o meio TaK, a máxima concentração e a máxima produtividade de EPS são conseguidas usando-se o meio YM, conforme discutido anteriormente. Calculando-se a razão máxima

de EPS/biomassa (g/g), claramente se mostra que o meio YM apresenta os melhores resultados com 0.24 g/g que é 1.5 e 1.7 vezes superior quando comparado com os meios TaK e MCM, respectivamente. Por outro lado, TaK é o melhor meio para a produção de biomassa, com concentrações finais de 4.4 g/L, enquanto que os meios YM e MCM obtiveram concentrações finais de biomassa de apenas 3.8 e 3.3 g/L, respectivamente.

Estudos com o fungo do género *Tremella* mostraram que o YM foi o melhor meio para a produção de polissacarídeo extracelular em termos de rendimento do polímero, tanto para cultivos líquidos como para cultivos sólidos, quando comparado com o meio GPY e com o meio *potato dextrose agar* (PDA) (Khondkar *et al.* 2002).

### **3.4.2 Optimização do meio de cultura YM para a produção de EPS**

Os resultados discutidos anteriormente indicaram que YM foi o melhor meio de cultura para a produção de EPS por *T. versicolor* e por isso foi seleccionado para a optimização da produção do EPS. Os resultados apresentados para a produção da lacase mostraram que, a concentração de glucose como fonte de carbono e o pH do meio de cultura como um factor físico, são as duas principais condições de cultivo que podem afectar tanto o crescimento celular como a formação do produto. Para optimizar o pH e a concentração de glucose para a produção do EPS, o cultivo de *T. versicolor* foi estudado no meio YM, partindo-se um planeamento de experiências  $2^2$  com um ponto central. Para a glucose escolheu-se um nível inferior de 5 g/L, um nível superior de 15 g/L e um ponto central de 10 g/L. Para o pH testou-se um nível inferior de 4, um nível superior de 7 e um ponto central de 5.5.

A Figura 3.31 mostra os resultados da produção do EPS por *T. versicolor* em diferentes valores de pH e concentrações iniciais de glucose no meio de cultura, conforme o planeamento de experiências. Os meios com a maior concentração inicial de glucose apresentaram um maior crescimento celular e maior produção de biopolímero. Os meios com valor de pH de 4 apresentaram um consumo de açúcares redutores mais lento pelo fungo, entretanto este facto resultou numa maior quantidade de biomassa formada. Para os meios com concentração inicial de glucose 15 g/L, nota-se claramente que o valor de pH de 4 favoreceu a produção da biomassa enquanto que o pH de 7 favoreceu a

produção do EPS. Para os meios com concentração inicial de glucose de 5 g/L já não é possível notar-se este facto, uma vez que a produção do EPS pelo fungo é muito aproximada durante o cultivo.

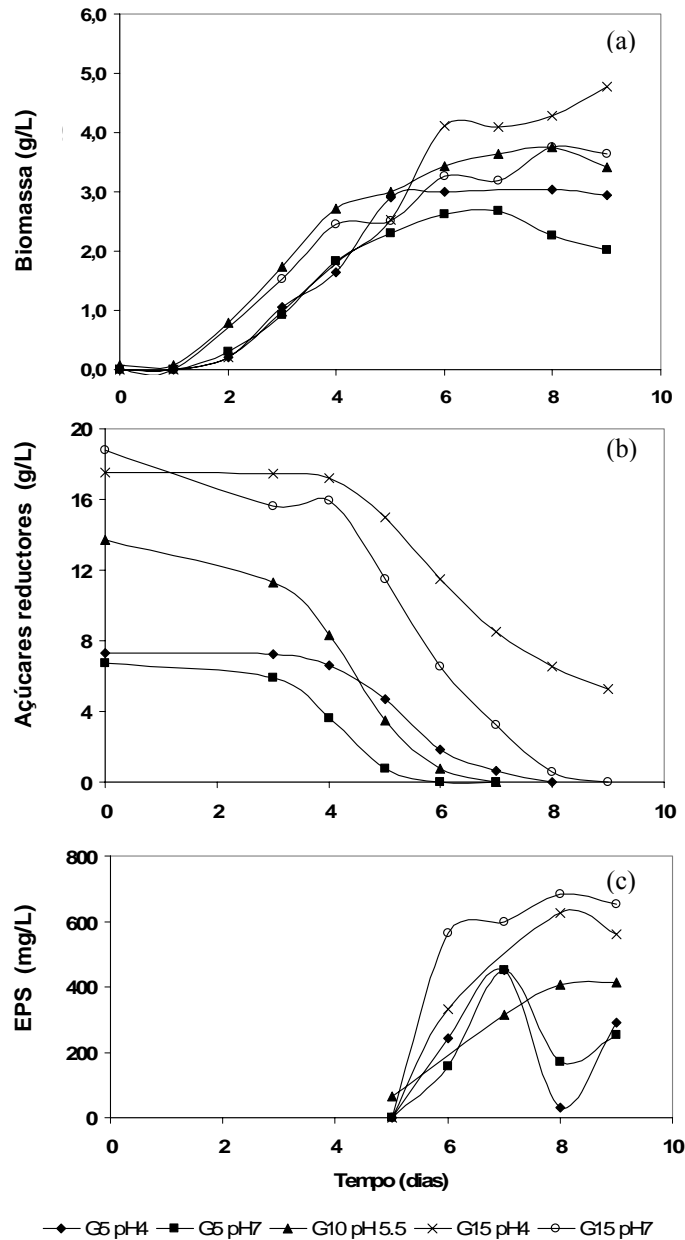


Figura 3.31 – Crescimento da biomassa (a), consumo de açúcares redutores (b) e produção de EPS (c) durante o cultivo de *Trametes versicolor* em diferentes concentrações (g/L) de glucose (G) e valores de pH.

A optimização do EPS foi realizada através do planeamento de experiências  $2^2$  com um ponto central conforme se encontra no gráfico de superfície de resposta na Figura 3.32 e na Tabela 3.12. A resposta do planeamento foi a máxima produção de EPS produzida no decorrer do cultivo. De acordo com a Figura 3.32 o pH não exerce uma grande influencia na máxima produção do EPS, ao contrário do aumento da concentração inicial de glucose que apresentou um grande aumento na máxima produção do EPS.

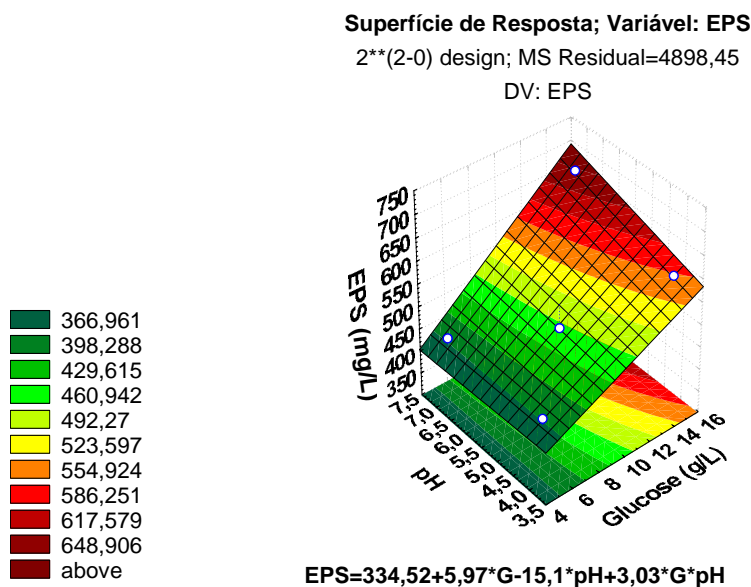


Figura 3.32 – Superfície de resposta para o planeamento de experiências  $2^2$ .

De acordo com os resultados deste planeamento de experiências não foi possível obter o ponto de máxima curvatura para a máxima produção de EPS com os níveis de pH e de glucose seleccionados. Deste modo, um segundo planeamento de experiências foi realizado, onde os níveis dos factores passaram a ser: glucose com um nível inferior de 5 g/L, um nível superior de 25 g/L e um ponto central de 15 g/L e o pH com um nível inferior de 4, um nível superior de 7 e um ponto central de 5.5.

Tabela 3.12 – Planejamento de experiências 2<sup>2</sup> e repostas da produção de EPS por *Trametes versicolor*

<b>Experiência</b>	<b>pH inicial</b>	<b>Glucose inicial (g/L)</b>	<b>Biomassa final (g/L)</b>	<b>Máxima concentração de EPS (mg/L)</b>
E1	4	5	3.0	380
E2	7	5	2.0	380
E3	5.5	10	3.4	415
E4	4	15	4.8	561
E5	7	15	3.6	652

Os resultados do segundo planejamento de experiências para a produção do EPS estão mostrados na Tabela 3.13.

Tabela 3.13 - Resultados para o segundo planejamento de experiências 2<sup>2</sup> e repostas da produção de EPS por *Trametes versicolor*

<b>Experiência</b>	<b>Glucose inicial (g/L)</b>	<b>pH inicial</b>	<b>Biomassa final (g/L)</b>	<b>Máxima concentração de EPS (mg/L)</b>	<b>Produtividade do EPS (mg / (L.d))</b>
A1	5	4	3.0	380	47.5
A2	5	7	2.7	380	47.5
A3	15	5.5	4.2	640	80.0
A4	15	4	3.8	520	74.3
A5	25	4	2.5	274	34.3
A6	25	7	2.3	300	37.5

A análise dos resultados da Tabela 3.13 mostra que os meios com uma concentração inicial de glucose de 15 g/L promoveram as melhores produções e

produtividades do EPS, com 640 mg/L e 80 mg /L.d) respectivamente, assim como o melhor crescimento celular. Esses resultados indicam que esta concentração de glucose foi a mais favorável para a produção do EPS provavelmente devido à uma concentração celular elevada nestas condições. Para a maior concentração inicial de glucose, 25 g/L, a produção do EPS não foi estimulada, resultando em baixas concentrações, menores que 300 mg/L e também em baixos crescimentos celulares. Elevadas concentrações de glucose (acima de 20 g/L) provavelmente afectam o metabolismo da síntese do EPS por *T. versicolor* assim como o próprio crescimento celular. Fang & Zhong (2002) sugerem que na presença de altas concentrações de glucose (acima de 50 g/L) o crescimento do fungo *Ganoderma lucidum* e a produção de um polissacarídeo intracelular foram inibidos devido à pressão osmótica desfavorável do meio de cultura, entretanto a alta concentração de glucose favoreceu a produção de polissacarídeo extracelular. Num outro estudo, a produção do EPS pelo fungo *Paecilomyces japonica* também mostrou que a concentração da fonte de carbono é um factor importante para a produção de um biopolímero e para o crescimento do fungo, além de influenciar a morfologia do fungo e a reologia do meio, que determina as características de transporte em altas concentrações (acima de 40 g/L) (Sinha *et al.* 2001b).

Nesse segundo planeamento de experiências, o modelo de superfície de resposta de segunda ordem é adoptado e mais um ponto no planeamento (ponto A4, Tabela 3.13) foi adicionado. Este ponto correspondeu a mais um ponto central para não afectar as estimativas usuais dos efeitos. O modelo usado contém somente os termos lineares (L) e quadráticos (Q) dos efeitos principais. O modelo que contém os termos lineares e quadráticos dos efeitos principais e a interacção dos dois factores também foi aplicado e mostrou-se inadequado para representar os dados experimentais obtidos.

A significância de cada coeficiente foi determinada através do valor de  $p$  ( $p < 0.1$ ), considerando-se 90% de intervalo de confiança, onde os baixos valores de  $p$  indicam um valor significativo do efeito de cada factor (Tabela 3.14).

Tabela 3.14- Efeitos individuais calculados e ANOVA para o planeamento de experiências 2<sup>2</sup>

<b>Efeitos</b>	<b>Estimado</b>	<b>Valor de t</b>	<b>Valor de p</b>	<b>SS</b>	<b>df</b>	<b>MS</b>	<b>F</b>
Glucose (L)	<b>-93.0</b>	<b>-7.1538</b>	<b>0.0884</b>	<b>8649.00</b>	<b>1</b>	<b>8649.00</b>	<b>51.1775</b>
Glucose (Q)	<b>-386.0</b>	<b>-12.1218</b>	<b>0.0524</b>	<b>24832.67</b>	<b>1</b>	<b>24832.67</b>	<b>146.9389</b>
pH (L)	13.0	1.0000	0.500	169.00	1	169.00	1.0000
pH (Q)	-227.0	-5.8205	0.1083	5725.44	1	5725.44	33.8784
Error				169.00	1	169.00	
Total SS				97203.33	5		

R<sup>2</sup>=0.99826

O gráfico de superfície de resposta (Figura 3.33) mostra o efeito da variação da concentração inicial de glucose e do pH na produção do EPS. Tanto a variação da glucose como a do pH afectaram a concentração máxima do EPS obtido. Neste caso foi possível observar a curvatura do plano, ou seja, verificou-se a existência dos termos quadráticos no modelo de regressão. As curvas de nível da Figura 3.33 servem para definir melhor a região de máximo do rendimento. O máximo valor previsto para a produção do EPS foi de 642.9 mg/L a uma concentração de glucose de 13.8 g/L e de pH de 5.5. A equação 3.3 representa o modelo da superfície de resposta para a produção do EPS (Figura 3.32):

$$\text{EPS (mg/L)} = -1274.28 + 53.25 \times G - 1.93 \times G^2 + 559.22 \times \text{pH} - 50.44 \times \text{pH}^2 \quad (3.3)$$

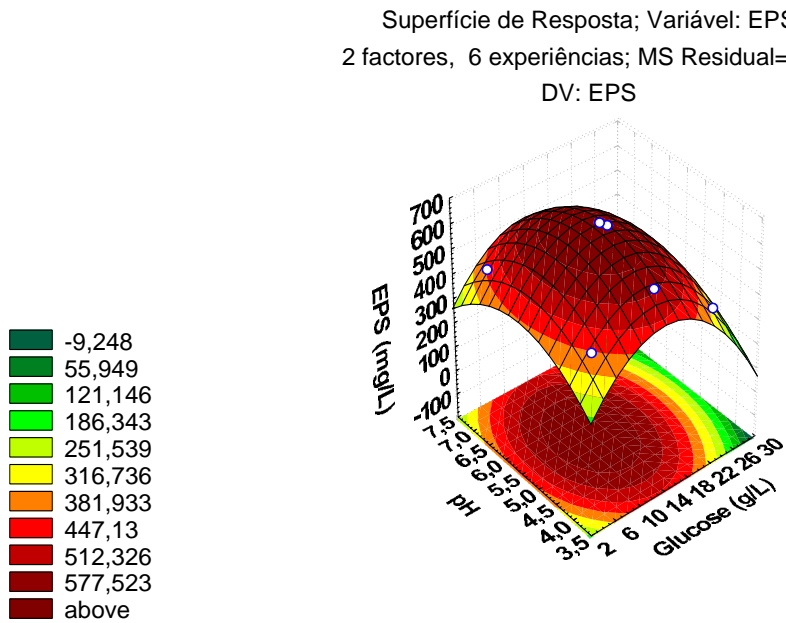


Figura 3.33 – Superfície de resposta para a produção do EPS do segundo planeamento de experiências  $2^2$  com ponto central.

### 3.4.3 Análises do EPS

#### 3.4.3.1 Análise dos açúcares neutros

A análise dos açúcares neutros presentes no EPS produzido nos três diferentes meios YM, MCM e TaK foi realizada usando-se a metodologia de Blakeney *et al.* (1983) e os resultados estão resumidos na Tabela 3.15. O açúcar predominante no EPS produzido nos três meios de cultura foi a glucose, com quantidades relativas de 98%, 95% e 88% para os meios YM, TaK e MCM, respectivamente. Pequenas quantidades de manose e xilose também foram detectadas no EPS produzido nestes meios em diferentes quantidades. O EPS produzido no meio MCM contém 3% de outros açúcares, que incluem a ramnose, a arabinose, a galactose e a fucose. Estes resultados indicam que o meio de cultura influencia a composição dos açúcares neutros do EPS produzido por *T. versicolor*. Entretanto, sem levar em consideração o meio de cultura, o açúcar predominante é a glucose que está de acordo com os dados previamente publicados por Miyazaki *et al.* (1974) para este fungo, onde o açúcar predominante foi a glucose com



um conteúdo estimado de 97.2%. Também Sugira *et al.* (1980) referiram que a glucose é o principal açúcar do EPS extraído do micélio deste fungo.

Tabela 3.15- Açúcares neutros presentes no EPS produzido por *Trametes versicolor* nos meios YM, MCM e TaK

Meios	Açúcares neutros (% p/p)			
	Glucose	Manose	Xilose	Outros(*)
MCM	88%	7.4%	1.6%	3%
YM	98%	1.2%	0.8%	traços (§)
TaK	95%	3.4%	1.6%	traços (§)

(\*) Rarnnose, Arabinose, Galactose, Fucose

(§) ≤ 0.1%

Os ácidos hexurónicos presentes no EPS produzido pelo *T. versicolor* foram quantificados pelo total de ácido galacturónico (Anexo A4). Os resultados estão apresentados na Tabela 3.16. Nota-se que o teor em ácidos hexurónicos do EPS produzido no meio TaK é inferior aos dos outros EPSs produzidos nos meios YM e MCM.

Tabela 3.16 - Ácidos hexourónicos presentes no EPS produzido por *Trametes versicolor* nos meios YM, MCM e TaK

Meio	Ácidos Hexurónicos (mg/mg EPS)
MCM	59.6
YM	53.4
TaK	31.8

### 3.4.3.2 Análise Termogravimétrica

A análise termogravimétrica do EPS produzido nos meios YM, MCM e TaK pode ser observada na Figura 3.34. O EPS foi termicamente estável até uma temperatura de

280°C para os meios TaK e YM e de 250°C para o meio MCM. Acima destas temperaturas a decomposição do EPS ocorreu em dois estágios: o primeiro ocorreu entre aproximadamente 270°C e 350°C observando-se uma rápida perda de peso, que representa uma perda de massa do EPS de 50%, 60% e 57% para o EPS produzido nos meios YM, TaK e MCM, respectivamente; o segundo estágio de decomposição iniciou-se a partir de 350°C até 560°C, onde uma decomposição mais lenta e gradual do EPS foi registada, possivelmente devido à decomposição dos agregados de polissacarídeos. A partir de 700°C nenhuma perda de peso foi observada, indicando um resíduo inorgânico de 7.5 % para o EPS produzido nos meios YM e TaK e de 1.5% para o EPS produzido no meio MCM.

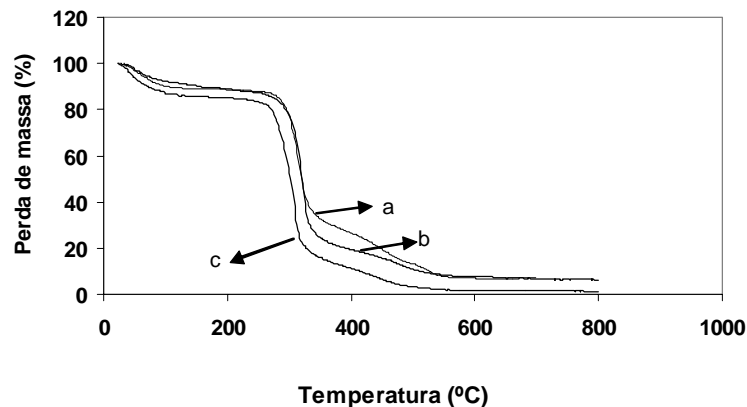


Figura 3.34 – Análise termogravimétrica do EPS produzido nos meios YM (a), TaK (b) e MCM (c).

#### 3.4.3.3 Análise de cromatografia de permeação em gel (GPC)

A distribuição do peso molecular médio do EPS obtido nos meios YM, MCM e TaK está apresentada no cromatograma da Figura 3.35. Os perfis da distribuição do peso molecular foram muito semelhantes para o EPS produzido nos meios TaK e MCM, enquanto que o EPS do meio YM apresentou um perfil de distribuição mais distinto, com uma banda mais alargada o que pode representar a presença de agregados.

Os pesos moleculares médios obtidos foram: 67 KDa para o meio YM, 21 KDa para o meio TaK e 25 KDa para o meio MCM. Comparando estes valores dos pesos moleculares médios, com os polissacarídeos de *T. versicolor* PSK e PSP que apresentam

um peso molecular de 100 KDa (Cui & Chisti 2003), o peso molecular médio do EPS produzido no meio YM foi o que mais se aproximou a este valor .

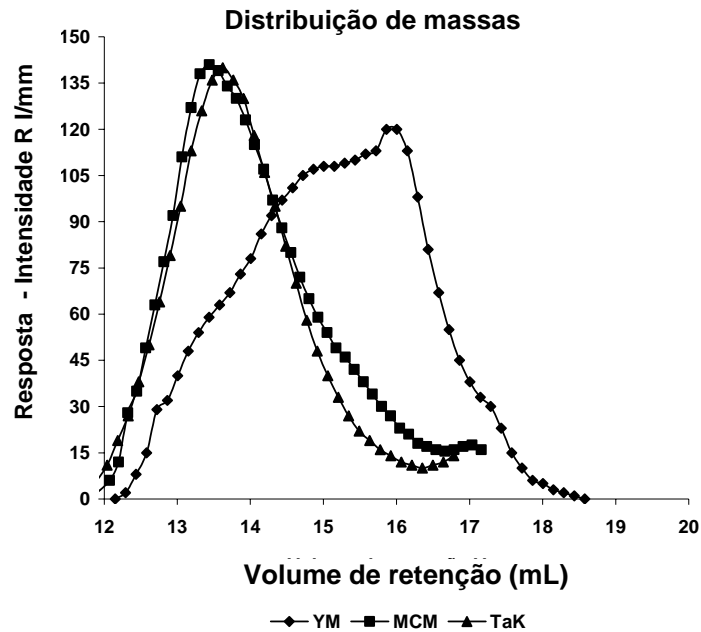


Figura 3.35 – Análise de cromatografia de permeação em gel (GPC) do EPS produzido nos meios YM, MCM e TaK.

#### 3.4.3.4 Análise reológica do meio de cultura

O comportamento reológico dos meios de cultura YM, MCM e TaK durante a produção do EPS por *T. versicolor* está mostrado na Figura 3.36. Em termos qualitativos, o comportamento reológico foi similar para todos os meios de cultura. Durante os quatro primeiros dias, antes que significativa quantidade de EPS no meio fosse produzida, o comportamento reológico do meio apresentou-se essencialmente Newtoniano. Após este período, ocorreu uma mudança no comportamento reológico dos meios, passando de Newtoniano para o comportamento Pseudoplástico, que é o comportamento esperado para dispersões de polissacarídeos em meio aquoso (Whistler *et al.* 1997), onde o grau da pseudoplasticidade do polímero é dependente da concentração presente.

A Figura 3.37 mostra a viscosidade aparente dos três meios de cultura durante toda fermentação para uma taxa de cisalhamento de  $10\text{s}^{-1}$ . Os resultados mostram que a viscosidade aparente do cultivo aumenta rapidamente a partir do quarto dia da fermentação. Para o meio YM a viscosidade aparente aumentou continuamente até o oitavo dia de cultivo, em concordância com os resultados obtidos de peso seco do EPS ao longo da fermentação (3.31c).

Para os meios MCM e TaK a viscosidade aparente aumentou até ao sexto e sétimo dia respectivamente (Figura 3.37), permanecendo a viscosidade constante até ao fim da fermentação para o meio MCM enquanto que para o meio TaK houve uma ligeira diminuição na viscosidade.

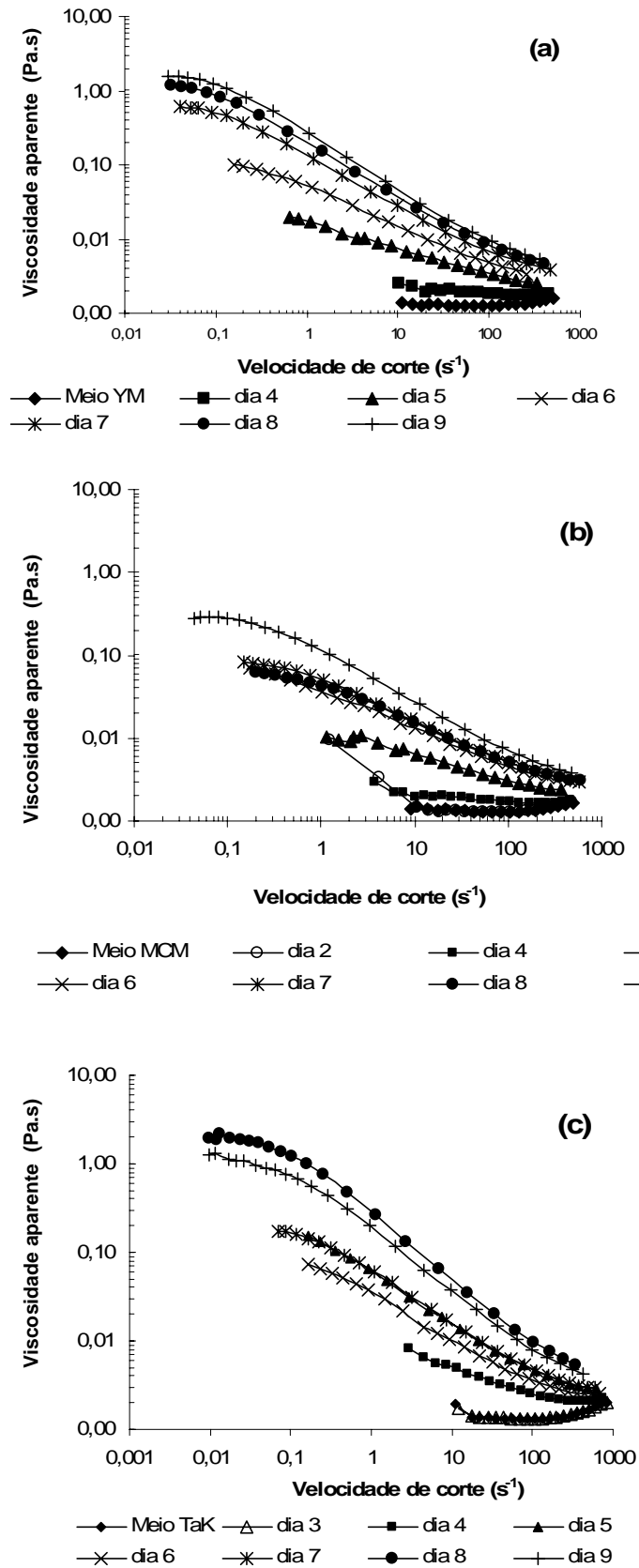


Figura 3.36 – Viscosidade aparente dos meios de culturas YM (a), MCM (b) e TaK (c) durante a produção de EPS por *Trametes versicolor*.

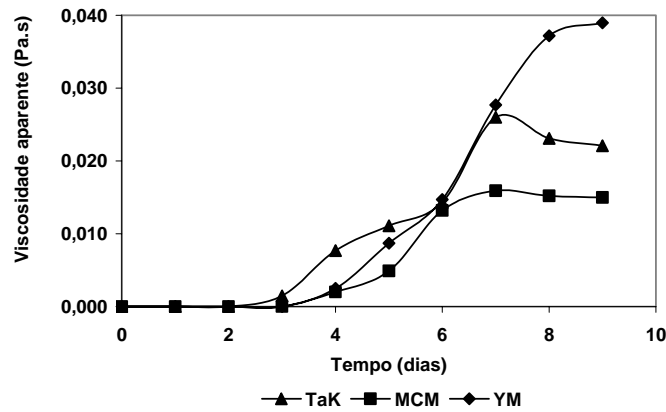


Figura 3.37 – Viscosidade aparente dos meios de cultura TaK, MCM e YM durante a produção do EPS por *Trametes versicolor*.

Comparando-se as Figuras 3.31c e 3.37 observa-se uma boa relação entre a concentração do EPS e a viscosidade do meio de cultura. Uma vez que a quantificação do EPS por peso seco é uma metodologia trabalhosa e que demora bastante tempo, a avaliação da produção do EPS durante o tempo de fermentação pode ser determinada através da análise reológica do meio de cultura, sendo esta metodologia com muito mais precisão e rapidez. Deste modo, procurou-se uma correlação entre o peso seco do EPS e a viscosidade aparente do meio de cultura YM e obteve-se uma correlação logarítmica mostrada na Figura 3.38 e pela equação 3.4 ( $R^2 = 0.9903$ ):

$$Y = 235.64 \ln(X) + 1495.5 \tag{3.4}$$

onde X é a concentração do EPS (mg/L) e Y é a viscosidade aparente (Pa.s).

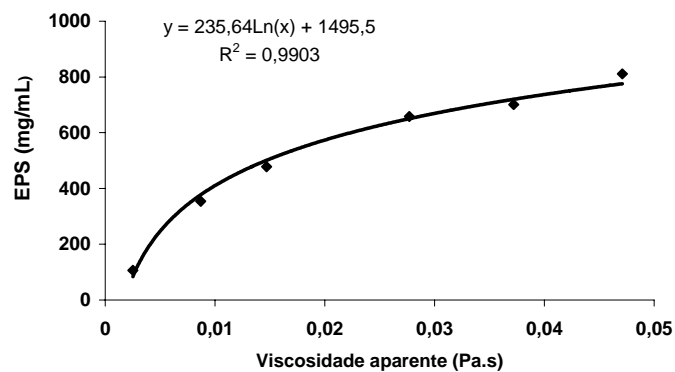


Figura 3.38 – Concentração do EPS em relação à viscosidade aparente do meio de cultura.

### 3.4.3.5 Análise do EPS produzido no meio YM por Espectrometria no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

O espectro de FTIR obtido a partir do EPS produzido no meio YM está mostrado na Figura 3.39. O espectro é consistente com os espectros obtidos de polissacarídeos, de acordo com as seguintes bandas observadas: banda a  $3400\text{ cm}^{-1}$  larga e forte devido aos grupos hidroxilo ( $\nu$  O-H) e umidade residual do EPS; pequena banda a  $2925\text{ cm}^{-1}$  característica da vibração dos grupos metino e metileno ( $\nu$  C-H); banda a  $1076\text{ cm}^{-1}$  típica das ligações éter ( $\nu$  C-O-C) e finalmente uma pequena banda a  $894\text{ cm}^{-1}$  indicando a presença de ligações glicosídicas, banda das estruturas polissacarídicas. A banda a  $1635\text{ cm}^{-1}$  pode ser designada por  $\delta$  N-H, sendo correspondente à vibração de grupos de proteína residual ou à presença de umidade residual.

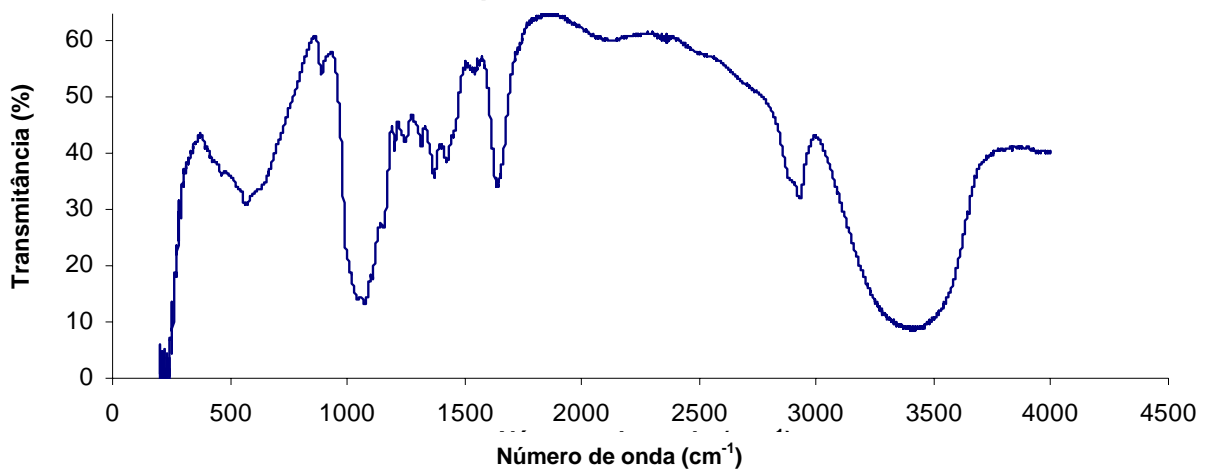


Figura 3.39 – Espectro de absorção na região do infravermelho do EPS produzido por *Trametes versicolor* no meio YM.

### 3.4.3.6 Análise do EPS por Espectrometria de Emissão de Plasma Induzido (ICP) e por Análise elementar

O teor em íons do EPS produzido nos meios YM, MCM e TaK está apresentado na Tabela 3.17. O EPS que apresentou uma maior quantidade de íons foi o produzido no

meio MCM, seguido pelo EPS produzido no meio TaK e no meio YM. Estes resultados não puderam ser associados com a análise termogravimétrica uma vez que no meio MCM o EPS apresentou uma menor quantidade de resíduos (1.5%) quando comparado com o EPS produzido nos meios YM e TaK com 7.5% de massa residual (Figura 3.34).

Os dados da análise elementar do EPS mostram que este apresenta praticamente a mesma composição em C, N e H para os três meios de produção. O EPS é composto por uma maior percentagem em C, aproximadamente 35%, uma concentração em H entre 5 e 7% e um baixo teor em N com cerca de 1%.

Tabela 3.17 – Teor em íões e análise elementar do EPS produzido por *Trametes versicolor* nos meios YM, MCM e TaK

Meios	Íões (mg/g) (ICP)						Análise elementar (%)		
	P	Fe	Mg	Ca	Na	K	C	H	N
<b>YM</b>	2,08	0,15	0,15	1,52	0,69	2,29	34,45	5,65	0,9
<b>MCM</b>	8,10	0,27	8,32	2,57	0,91	10,4	35,98	7,05	0,97
<b>TaK</b>	8,66	0,08	5,24	6,75	0,09	1,01	35,91	6,4	1,1



## Capítulo 4 - Conclusões

Através deste trabalho, pode-se concluir que o fungo da podridão branca da madeira, *Trametes versicolor*, foi capaz de produzir a enzima lacase em concentrações significativas em matraz e em bioreactor:

- I. A concentração inicial de glucose foi extremamente importante para a optimização da produção da lacase em matraz, as menores actividades de lacase foram observadas para as maiores concentrações iniciais de glucose (5 e 9 g/L), mostrando que altos níveis de glucose reprimem a produção da lacase, enquanto que a limitação por carbono favoreceu a produção enzimática;
- II. O perfil da evolução da concentração de proteína total do meio de cultura não coincide com o perfil da produção da lacase, o que indica que o fungo produz outras proteínas certamente necessárias ao seu desenvolvimento;
- III. A queda do pH durante a produção da lacase está directamente relacionada com o consumo de glucose por *T. versicolor* devido à produção de ácidos orgânicos pelo fungo;
- IV. A adição do cobre ao meio de cultura foi mais favorável como micronutriente do que como indutor da produção da lacase;
- V. Dos diferentes indutores testados na produção da lacase, o etanol não favoreceu a produção da enzima enquanto que o cobre, 2,5-xilidina e a mistura fenólica apresentaram um aumento na actividade da lacase, e uma maior actividade foi obtida quando foi empregue em simultâneo a mistura fenólica com 2,5 xilidina e cobre em condições de limitação por carbono.

A optimização da produção da lacase em bioreactor por planeamento de experiências apresentou as maiores actividades enzimáticas:

- I. Controlo de pH, concentração inicial de glucose e as suas interacções apresentam um grande efeito na actividade máxima da lacase;

- II. A máxima actividade de lacase foi obtida quando o pH do meio de cultura estava controlado e a concentração inicial de glucose era de 9 g/L;
- III. A agitação não apresenta nenhum efeito significativo na produção da lacase;
- IV. Com a modelação matemática da produção da lacase em bioreactor foi possível determinar os parâmetros cinéticos da fermentação e de estimar-se o crescimento da biomassa ao longo do tempo;
- V. A lacase é produzida durante a fase de desaceleração do crescimento da biomassa, ou seja, durante o metabolismo secundário do fungo.

Para além da optimização da produção, aplicou-se a lacase produzida pelo *T. versicolor* no branqueamento da pasta kraft de papel onde diferentes mediadores da enzima e diferentes condições experimentais foram avaliados:

- I. Dos mediadores orgânicos (TEMPO, ABTS, HBT e ácido violúrico) e inorgânicos POMs ( $PW_{11}Mn^{III}$ ,  $SiW_{11}Mn^{III}$ ,  $BW_{11}Co^{III}$ ,  $(PW_9)_2Mn^{III}$ ,  $SiW_{11}Co^{III}$  e  $SiW_{11}V^V$ ) testados num único estágio de branqueamento, os POMs  $SiW_{11}Mn^{III}$  e  $SiW_{11}V^V$  apresentaram os melhores resultados de branqueamento com uma maior selectividade;
- II. Os espectros de UV-Vis e de voltametria cíclica das soluções de  $SiW_{11}Mn^{III}$  e de  $SiW_{11}V^V$  mostram que estes POMs são facilmente reoxidados pela lacase, principalmente para o  $SiW_{11}V^V$ ;
- III. Os POMs actuam mais facilmente no branqueamento da pasta a temperaturas elevadas (110°C) enquanto que a lacase actua preferencialmente a baixas temperaturas (45°C);
- IV. Os branqueamentos em estágios sequenciais, com a oxidação da lenhina pelo POM a 110°C e a reoxidação do POM pela lacase num estágio separado a 45°C, apresentaram uma redução no índice kappa da pasta de cerca de 50% para o POM  $SiW_{11}Mn^{III}$  com 5 estágios de branqueamento e para o  $SiW_{11}V^V$  com apenas 3 estágios de branqueamento, com uma pequena perda da viscosidade intrínseca reduzida para ambos os POMs utilizados;

- V. O  $\text{SiW}_{11}\text{Mn}^{\text{III}}$  apresentou-se como sendo o catalisador mais selectivo enquanto que o  $\text{SiW}_{11}\text{V}^{\text{V}}$  apresentou-se como sendo o mais efectivo no branqueamento da pasta durante o branqueamento em estágios sequenciais.

Para a selecção, optimização e análise do exopolissacarídeo produzido por *T. versicolor* foram estudados:

- I. Os meios de cultura apresentam um papel importante na produção do exopolissacarídeo. Dos cinco diferentes meios de cultura empregados (MCM, TaK, YM, GPY e MDT), os meios MDT e GPY não favoreceram a produção do EPS enquanto que os meios MCM, TaK e YM produziram EPS. Destes três, o meio YM foi o que apresentou a maior produção de EPS;
- II. As análises de reologia dos meios MCM, TaK e YM mostram que qualitativamente estes três meios são similares, apresentando um comportamento pseudoplástico a partir do quarto dia de fermentação. A análise de reologia do meio de cultura surge como sendo uma metodologia rápida e eficaz para o acompanhamento da produção do EPS ao longo da fermentação;
- III. A metodologia do planeamento de experiências permitiu otimizar a produção do EPS no meio de cultura YM. Para a maior e menor concentração inicial de glucose (5 e 25 g/L) a produção do EPS não foi favorecida. Com a concentração de 15g/L de glucose é que se optimizou a produção de EPS;
- IV. O açúcar predominante no EPS produzido nos meios de cultura MCM, TaK e YM é a glucose embora também existam pequenas quantidades de manose e xilose. O EPS produzido no meio MCM contem 3% de outros açúcares, que incluem ramnose, arabinose, galactose e fucose;
- V. O EPS foi termicamente estável até uma temperatura de 250-280°C para os meios MCM e YM. Acima destas temperaturas a decomposição do EPS ocorreu em dois estágios: no primeiro uma rápida perda de peso é observada, enquanto que no segundo estágio se observou uma lenta decomposição. A partir de 700°C nenhuma perda de peso é obtida;
- VI. Os pesos moleculares médios do EPS nos diferentes meios são 67 KDa para o meio YM, 21 KDa para o meio TaK e 25 KDa para o meio MCM;

- VII. O EPS no meio YM apresenta grupos hidroxilas ( $\nu$  O-H), grupos metino e metileno ( $\nu$  C-H), ligações de éter ( $\nu$  C-O-C), ligações glicosídicas e ligações  $\delta$  N-H, que correspondem à vibração de grupos de proteína residual ou a presença de humidade residual.

**Bibliografia**

1. Accunzo, F., Galli, C. First evidence of catalytic mediation by phenolic compounds in the laccase-induced oxidation of lignin models. *European Journal of Biochemistry* 270: 3634-3640 (2003).
2. Addleman, K., Archibald, F.S. Kraft pulp bleaching and delignification by dikaryons and monokaryons of *Trametes versicolor*. *Applied and Environmental Microbiology* 59:266-273 (1993).
3. Akhtar, M., Blanchette, R. A., Kirt T. K. Fungal Delignification and Biomechanical Pulping of Wood. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, (T. Scheper, ed.), Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg (1997).
4. Alexopoulos, C.L., Mims, C.W. Introductory Micology, 3<sup>o</sup>Ed. Cap.21:429-533 (1979).
5. Altenau, J., Pope, M.T., Prados, R.A., So, H. Models for heteropoly blues. Degrees of valence trapping in vanadium(IV)- and molybdenum(V)-substituted Keggin anions *Inorganic Chemistry* 14: 417- 421 (1975).
6. Amaral, PFF, Fernandes DLA, Tavares APM, Xavier ABMR, Cammarota MC, Coutinho JAP and Coelho MAZ, Decolorization of Dyes from textile wastewater by *Trametes versicolor*. *Environmental Technology* 25:1313-1320 (2004).
7. Ander, P., Grabner, K., Kandioller, G., Srebotnik, E., Poppius-levlin, K., Semar, S., Anke, H., Niku-Paavola, M., Viikari, L., Messner, K. The in vitro <sup>14</sup>C-labelled kraft pulp assay as used for evaluation of laccases and mediators intended for pulp bleaching, 7<sup>th</sup> International Conference of Biotechnology in Pulp and Paper Industry, Vancouver, A111-115 (1998).
8. Ander, P., Messner K, Oxidation of 1-hydroxybenzotriazole by Laccase and Lignin Peroxidase. *Biotechnology Techniques* 12(3):191-195 (1998).
9. Archibald, F.S., Bourbonnais, R., Jurasek, L, Paice, M.G, Reid, I.D. Kraft pulp bleaching and delignification by *Trametes versicolor*. *Journal of Biotechnology* 53: 215-236 (1997).
10. Arora D. S.; Gill, P. K. Laccase production by some white rot fungi under different nutritional conditions. *Bioresource Technology*, 73:283-285 (2000).
11. Bae, J.T., Park, J.P., Song, C.H., Yu, C.B., Park, M.K., Yun J.W. Effect of carbon source on the mycelial growth and exo-biopolymer production by submerged culture of *Paecilomyces japonica*. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 91 (5): 522-524 (2001).
12. Bailey, J.E., Ollis, D.F. Biochemical Engineering Fundamentals. 2<sup>a</sup> ed, MacGraw-Hill, NY, (1986).
13. Balakshin, M., Chen, C., Gratzl, J.S., Kirkman, A.G., Jakob, H. Kinetics of pulp delignification with laccase-mediator system. 5<sup>th</sup> European Workshop on Lignocellulosics and pulp. 585-588 (1998).

14. Balakshin, M.Y., Evtuguin, D.V., Neto, C. P., Cavaco-Paulo, A. Polyoxometalates as mediators in the laccase catalyzed delignification. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 16: 131–140. (2001).
15. Baldrian P, Gabriel, J. Copper and cadmium increase laccase activity in *Pleurotus ostreatus*. *FEMS Microbiology Letters* 206: 69-74 (2002).
16. Bauer, C. G.; Kuehn, A.; Gajovic, N.; Skorobogatko, O.; Holt, P.-J.; Bruce, N. C.; Makower, A.; Lowe, C. R.; Schelier, F. New enzyme sensors for morphine and codeine based on morphine dehydrogenase and laccase. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*, 364:179-183. 1999
17. Biermann, J. Handbook of pulping and papermaking, 2<sup>nd</sup> ed. Academic Press (1996).
18. Blakeney, A.B., Harris P.J., Henry R.J., Stone B.A. A simple and rapid preparation of alditol acetates for monosaccharide analysis. *Carbohydrate Research* 113: 291-299 (1983).
19. Blanchette, R.A. Degradation of lignocellulose complex in wood. *Canadian Journal of Botany* 73: 999-1010 (1995).
20. Blázquez, P., Casas, N., Font, X., Gabarrell, X., Sarrà, M., Caminal, G., Vicent, T. Mechanism of textile metal dye biotransformation by *Trametes versicolor*. *Water Research* 38 (8): 2166-2172 (2004).
21. Blumenkrantz N, Asboe-Hansen G. New method for quantitative determination of uronic acids. *Analytical Biochemistry*, 54(2):484-489(1973).
22. Bohn, J.A., BeMiller, J.N. (1-3)-  $\beta$ -D-glucans as biological response modifiers: a review of structure-functional activity relationships. *Carbohydrate Polymers* 28: 3-14 (1995).
23. Bollag, J. M., Leonowicz, A. Comparative studies of extracellular fungal laccases. *Applied Environmental Microbiology* 48: 849-854 (1984).
24. Boudet, A.M., Lapierre, C., Grima-Pettenati, J. Biochemistry and molecular biology of lignification. *New Phytologist* 129: 203-236 (1995).
25. Bourbonnais, R., Paice, M. G., Reid, I. D., Lanthier, P., Yaguchi, M. Lignin Oxidation by Laccase Isozymes from *Trametes versicolor* and Role of the Mediator 2,2'-Azinobis(3-Ethylbenzthiazoline-6-Sulfonate) in Kraft Lignin Depolymerization. *Applied and Environmental Microbiology* 61(5): 1876–1880 (1995).
26. Bourbonnais, R., Paice, M.G., Enzymatic delignification of kraft pulp using laccase and a mediator. *Tappi Journal* 79(6): 199-204 (1996).
27. Bourbonnais, R., Paice, M.G., Freiermuth, B. Bodie,E., Borneman S. Reactivities of Various Mediators and Laccases with Kraft Pulp and Lignin Model Compounds. *Applied and Environmental Microbiology* 63(12): 4627–4632 (1997).
28. Bourbonnais, R., Leech, D., Paice, M.G., Electrochemical analysis of the interactions of laccase mediators with lignin model compounds. *Biochimica et Biophysica Acta* 1379: 381–390 (1998).

29. Box, G.E.P., Hunter, W.G., Hunter, J.S., (1978) *Statistics for experimenters. An introduction to design, data analysis and model building*. New York, USA.
30. Calado, V., Montgomery, D. Planejamento de experimentos usando o *Statistica*. E-papers, Rio de Janeiro, ISBN 85-87922-83-1 (2003).
31. Call, H.P., PCT. World Patent Application: WO 94/29510 (1994).
32. Call H.P., Mucke I. History, overview and applications of mediated lignolytic systems, especially laccase-mediator-systems (Lignozym<sup>®</sup>-process). *Journal of Biotechnology* 53:163–202 (1997).
33. Castro, A., Estudo da biodegradação da lenhina pelo fungo *Trametes versicolor*, Tese de Doutorado, Universidade de Aveiro, Departamento de Química, (2001).
34. Castro, A., Evtuguin, D. V., Xavier, A. M. B. Degradation of biphenil lignin model compounds by laccase of *Trametes versicolor* in the presence of 1-hydroxybenzotriazole and heteropolyanion [SiW<sub>11</sub>VO<sub>40</sub>]<sup>5-</sup>. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 22:13-20 (2003).
35. CELPA, Associação da Indústria Papeleira, Boletim Estatístico 2004. Disponível em <http://www.celpa.pt/images/pdf/boletim2004.pdf>.
36. Collins, P.J., Dobson A.D.W. Regulation of laccase Transcription in *Trametes versicolor*. *Applied Environmental and Microbiology* 63(9):3444-3450 (1997).
37. Couto, S. R., Gundín, M., Lorenzo, M., Sanromán, M. A. Screening of supports and inducers for laccase production by *Trametes versicolor* in semi-solid-state conditions. *Process Biochemistry* 38: 249- 255 (2002).
38. Couto, S. R., Sanromán, M. A., Hofer, D., Gundín, M. Stainless steel sponge: a novel carrier for the immobilization of the white-rot fungus *Trametes hirsuta* for decolourisation of textile dyes. *Bioresource Technology*, 95(1): 67-72 (2004a).
39. Couto, S.R., Rosales, E., Gundín, M., Sanromán, M. Exploitation of a waste from the brewing industry for laccase production by two *Trametes* species. *Journal of Food Engineering* 64: 423–428 (2004b).
40. Crueger, W., Crueger A. (1990) *Biotechnology, a text book of industrial microbiology*. 2<sup>nd</sup> Ed. p.60, Sunderland, Sinauer Associates ISBN 0-87893-131-7.
41. Cui, J., Chisti, Y. Polysaccharopeptides of *Coriolus versicolor*: physiological activity, uses and production. *Biotechnology Advances* 21: 109-122 (2003).
42. Daba, A.S., Ezeronye, O.U. Anti-cancer effect of polysaccharides isolated from higher basidiomycetes mushrooms *African Journal of Biotechnology* 2 (12) 672-678 (2003). (Disponível online em <http://www.academicjournals.org/AJB>).
43. Dence, C. W. and Reeve, D. W. (Eds.), *Pulp Bleaching – Principles and Practice*, 1996, Tappi Press, Atlanta.

44. Domaille, P. J. The 1- and 2-dimensional tungsten-183 and vanadium-51 NMR characterization of isopolymetalates and heteropolymetalates. *Journal of the American Chemical Society* 106 (25): 7677-7687 (1984).
45. Dumitriu, S. Polysaccharides: structural diversity and functional versatility. New York: Marcel Dekker ISBN: 0-8247-0127-5 cap.8 (1998).
46. Eggert, C., Temp U., Eriksson K.E.L. The Ligninolytic System of the White Rot Fungus *Pycnoporus cinnabarinus*: Purification and Characterization of the Laccase. *Applied and Environmental Microbiology* 62(4): 1151–1158 (1996).
47. Evtuguin, D.V., Pascoal Neto, C. New polyoxometalate promoted method of oxygen delignification. *Holzforschung* 51(4): 338-342 (1997).
48. Evtuguin, D.V., Pascoal Neto, C., Pedrosa de Jesus, J.D. Bleaching of kraft pulp by oxygen in the presence of polyoxometalates. *Journal of Pulp Paper Science* 24(4): 133-140 (1998).
49. Fabbrini, M., Galli, C., Gentili, P. Comparing the Catalytic Efficiency of Some Mediators of Laccase *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 16: 231-240 (2002).
50. Fang, Q.H., Zhong, J.J. Submerged fermentation of higher fungus *Ganoderma lucidum* for production of valuable bioactive metabolites—ganoderic acid and polysaccharide. *Biochemical Engineering Journal* 10: 61-65 (2002).
51. Fernandez, J.L. Theoretical Study of the Basicity and the Redox Properties of Heteropolyanions. Tese de Doutoramento, Departament de Química Física i Inorgànica de la Universitat Rovira i Virgili, Tarragona, (2003).
52. Fukuda, T., Uchida, H., Takashima, Y., Uwajima, T., Kawabata, T., Suzuki, M. Degradation of isphenol A by purified laccase from *Trametes villosa*. *Biochemical and Biophysical Research Communication* 284: 704– 706 (2001).
53. Furtado, F.P., Evtuguin, D.V., Gomes, T.M. *Pulp & Paper Canada* 102 (2001).
54. Galhaup, C., Haltrich, D. Enhanced formation of laccase activity by the white-rot fungus *Trametes pubescens* in the presence of copper. *Applied and Microbiology Biotechnology* 56: 225–232 (2001).
55. Galhaup, C., Goller, S. Peterbauer, C. K. Strauss, J. Haltrich, D. Characterization of the major laccase isoenzyme from *Trametes pubescens* and regulation of its synthesis by metal ions, *Microbiology* 148: 2159-2169 (2002a).
56. Galhaup, C., Wagner, H., Hinterstoisser, B. Haltrich, D. Increased production of laccase by the wood-degrading basidiomycete *Trametes pubescens*. *Enzyme Microbiology and Technology* 30: 529-536 (2002b).
57. Gamelas, J., Cavaleiro, A., Santos, I., Balula, M. Os polioxometalatos. Do anião de keggin às nanocápsulas. *Boletim da Sociedade Portuguesa de Química*, 90: 45-51 (2003).
58. Gamelas, J., Gaspar, A., Evtuguin, D.V., Pascoal Neto, C. Transition metal substituted polyoxotungstates for the oxygen delignification of kraft pulp. *Applied Catalysis A: General* 295 (2): 97-230 (2005).



59. Garg, S.K., Modi, D.R. Decolorization of pulp-paper mill effluents by white-rot fungi. *Critical Reviews in Biotechnology* 19 (2): 85-112 (1999).
60. Garzillo, A.M.V., Colao, M.C., Caruso, C., Caporale, C., Celletti, D., Buonocore, V. Laccase from the white-rot fungus *Trametes trogii*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 49: 545-551 (1998).
61. Gaspar, A., Evtuguin, D.V., Pascoal Neto, C. Oxygen bleaching of kraft pulp catalysed by Mn(III)-substituted polyoxometalates. *Applied Catalysis A: General* 239: 157-168 (2003).
62. Gelo, P.M., Kim, H., Butlin, N., Palmore, G. Electrochemical Studies of a Truncated Laccase Produced in *Pichia pastoris*. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(12): 5515-5521 (1999).
63. Giardina, P., Palmieri, G., Scaloni, A., Fontanella, B., Faraco, V., Cennamo, G., Sannia, G. Protein and gene structure of a blue laccase from *Pleurotus ostreatus*. *Biochemical Journal* 341:655-663 (1999).
64. Gouveia, M. em <http://www.gee.min-economia.pt/resources/docs/publicacao/Imprensa/20000601.pdf> (2005).
65. Grigoriev, V., Hill, C. L., Weinstock, I. Role of cation size in the energy of electron-transfer to 1:1 polyoxometalate ion pairs  $\{(M^+)(X^{n+}VW_{11}O_{40})\}^{(8-n)-}$  (M = Li, Na, K). *Journal of American Chemical Society* 122: 3544-3545 (2000).
66. Gutiérrez, A., Prieto, A., Martínez, A.T. Structural characterization of extracellular polysaccharides produced by fungi from the genus *Pleurotus*. *Carbohydrate Research* 281: 143-154 (1996).
67. Hammel, K.E. 2 Fungal Degradation of Lignin, Cab International Driven by Nature: Plant Litter Quality and Decomposition, pp. 33-45 (1997).
68. Harmalkar, S. P., Pope, M. T. Heteropolyanions in nonpolar solvents as quasi-metalloporphyrins: slow proton transfer and kinetic stabilization of hydroxovanadium(IV). *Journal of Inorganic Biochemistry* 28: 85-95 (1986).
69. Harris, E.L.V., Angal, S. (1989) Protein purification methods: a practical approach, Oxford University Press.
70. Hatakka, A. Lignin-modifying enzymes from selected white-rot fungi: production and role in lignin degradation. *FEMS Microbiology Reviews* 13:125-135 (1994).
71. Hergert, H.L., Infrared spectra, in lignins: occurrence, formation, and reactions, (K.V. Sarkanen and C.H.Ludwig, Eds) Chap. 7, Wiley Interscience, New York. (1971).
72. Higuchi, T. Biodegradation mechanisms of lignin by white rot Basidiomycetes. *Journal of Biotechnology* 30:1-8 (1993).
73. Hill, C.L. Introduction: Polyoxometalates multicomponent molecular vehicles to probe fundamental issues and practical problems. *Chemical Reviews* 98:1-2 (1998).
74. Hofrichter, M. Review: lignin conversion by manganese peroxidase (MnP). *Enzyme Microbiology and Technology* 30: 454-466 (2002).

75. Humar., M. Petrič, M., Pohleven, F. Changes of the pH value of impregnated wood during exposure to wood-rotting fungi. *Holz als Roh- und Werkstoff* 59:288 – 293 (2001).
76. Ikasari, L., Michell, D. Two-Phase Model of the Kinetics of Growth of *Rhizopus oligosporus* in Membrane Culture. *Biotechnology and Bioengineering* 68(6): 619-627 (2000).
77. Jang, M., Ryu, W., Cho, M. Laccase production from repeated batch cultures using free mycelia of *Trametes* sp. *Enzyme and Microbial Technology* 30:741–746 (2002).
78. Jeannin, Y. P. The Nomenclature of Polyoxometalates: How To Connect a Name and a Structure. *Chemical Reviews* 98:51-76 (1998).
79. JHS Natural Products, disponível em <http://www.jhsnp.com/store/vpscoriolusversicolor.html> (consultado em fev. 2005).
80. Jönsson, L.J., Saloheimo M., Penttilä M., Laccase from the white-rot fungus *Trametes versicolor*: cDNA cloning of *lcc1* and expression in *Pichia pastori*. *Current Genetics* 32: 425–430 (1997).
81. Karnezis, T., McIntosh, M., Wardak, A. Z., Stanisich, V.A., Stone, B.A. The Biosynthesis of b-Glycans. *Trends in Glycoscience and Glycotechnology* 12(66): 211–227 (2000).
82. Katayama, Y., Nishida, T., Morohoshi N., Kuroda, K. The metabolism of biphenyl structures in lignin by the wood-rotting fungus *Coriolus versicolor*. *FEMS Microbiology Letters* 61: 307-314 (1989).
83. Katsoulis, D.E. A Survey of Applications of Polyoxometalates. *Chemical Reviews* 98:359-387 (1998).
84. Kersten, P.J., Kalyanaraman, B., Hammel, K.E., Reinhammar, B., Kirk T.K. Comparison of lignin peroxidase, horseradish peroxidase and laccase in the oxidation of methoxybenzenes. *Biochemical Journal* 268:475–480 (1990).
85. Khondkar, P. Aidoo, K.E. Tester, R.F. Sugar profile of extracellular polysaccharides from different *Tremella* species. *International Journal of Food Microbiology* 79: 121-129 (2002).
86. Kilpelainen, I., Sipila, J., Brunow, G., Lundquist, K., Ede, R. Application of Two-Dimensional NMR Spectroscopy to Wood Lignin Structure Determination and Identification of Some Minor Structural Units of Hard- and Softwood Lignins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 42: 2790-2794 (1994).
87. Kim, S.W., Hwang, H.J., Park, J.P, Cho, Y.J., Song, C.H., Yun, J.W. Mycelial growth and exo-biopolymer production by submerged culture of various edible mushrooms under different media. *Letters in Applied Microbiology* 34: 56-61 (2002a).
88. Kim S.W., Hwang H.J., Xu, C.P., Na, Y.S., Song, S.K., Yun, J.W. Influence of nutritional conditions on the mycelial growth and exopolysaccharide production in *Paecilomyces sinclairii*. *Letters in Applied Microbiology* 34(6):389-93 (2002b).

89. Kirk, T, Cullen, D. Enzymology and molecular genetics of wood degradation by white rot fungi *In* Young, R. A., Atkhar, M., (eds.) *Environmentally Friendly Technologies for Pulp and Paper Industry*, John Wiley & Sons, Inc (1998).
90. Kirk, T., Farrell, R. Enzymatic "combustion": the microbial degradation of lignin. *Annual Review of Microbiology* 41:465-505 (1987).
91. Kossen, N.W.F. The morphology of filamentous fungi. *Advances in Biochemical Engineering and Biotechnology* 70:1– 33 (2000).
92. Kozhevnikov, I.V. Catalysis by heteropoly acids and multicomponent polyoxometalates in liquid-phase reactions. *Chemical Reviews* 98:171-198 (1998).
93. Kuhad, R.C., Singh, A. Eriksson, K. Microorganisms and enzymes involved in the degradation of plant fiber cell walls in biotechnology in pulp and paper industry, Scheper, T., Springer.
94. Larsson, S., Cassland, P., Jönsson L.J. Development of a *Saccharomyces cerevisiae* Strain with Enhanced Resistance to Phenolic Fermentation Inhibitors in Lignocellulose Hydrolysates by Heterologous Expression of Laccase. *Applied and Environmental Microbiology*. 67: 1163-1170 (2001).
95. Lee, I.Y., Jung, K.H., Lee, C.H., Park, Y.H. Enhanced production of laccase in *Trametes versicolor* by the addition of ethanol. *Biotechnology Letters* 21: 965-969 (1999).
96. Leitner, C., Hess J, Galhaup C, Ludwig R, Nidetzky B, Kulbe KD, Haltrich D. Purification and characterization of a laccase from the white-rot fungus *Trametes multicolor*. *Applied Biochemistry and Biotechnology* (98-100):497-507 (2002).
97. Leonowicz, A., Cho, N.S., Luterek, J., Wilkolazka, A., Wojtas-Wasilewska, M., Matuszewska, A., Hofrichter, M., Wesenberg, D., Rogalski, J. Fungal laccase: properties and activity on lignin. *Journal of Basic Microbiology* 41(3-4):185-227 (2001).
98. Leontievsky, A.A., Myasoedova, N.M., Baskunov, B.P., Evans, C.S., Golovleva, L.A. Transformation of 2,4,6-trichlorophenol by the white rot fungi *Panus tigrinus* and *Coriolus versicolor*. *Biodegradation* 11:331–340 (2000).
99. Leparulo-Loftus, M. Pope, M. T. Vanadium-51 NMR spectroscopy of tungstovanadate polyanions. Chemical shift and line-width patterns for the identification of stereoisomers. *Inorganic Chemistry* 26: 2112-2120 (1987).
100. Lewin, M., Goldstein I. *Wood structure and composition*, Marcel Dekker Inc. (1991).
101. Li, K., Helmä, R.F., Eriksson, K.E. Mechanistic studies of the oxidation of a non-phenolic lignin model compound by the laccase/1-hydroxybenzotriazole redox system. *Biotechnology Applied Biochemistry* 27: 239-243 (1998).
102. Li, K., Xu, F., Eriksson, K.E. Comparison of fungal laccases and redox mediators in oxidation of a nonphenolic lignin model compound. *Applied and Environmental Microbiology* 65:2654–2660 (1999).

103. Luedeking, R. Piret, E.L. A kinetic study of the lactic acid fermentation. Batch process at controlled pH. *Biotechnology and Bioengineering* 67(6):393-401 (2000).
104. Majcherczyk, A., Johannes, C., Hüttermann, A. Oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) by laccase of *Trametes versicolor*. *Enzyme Microbiology and Biotechnology* 22:335-341 (1998).
105. Mandels M, Andreotti, R., Roche, C. Measurement of saccharifying cellulase. *Biotechnology Bioengineering Symposium* 6:21-33 (1976).
106. Mansur, M., Suarez, T., Fernandez-Larrea, J. B., Brizuela, M. A. & Gonzalez, A. E. Identification of a laccase gene family in the new lignin-degrading basidiomycete CECT 20197. *Applied and Environmental Microbiology* 63:2637–2646 (1997).
107. Martinez-Inigo, M.J., Kurek, B. Oxidative Degradation of Alkali Wheat Straw Lignin by Fungal Lignin Peroxidase, Manganese Peroxidase and Laccase: A Comparative Study. *Holzforschung* 51:543-548 (1997).
108. Mayer, A.M., Staples, R.C. Laccase: new functions for an old enzyme. *Phytochemistry* 60:551-565 (2002).
109. MBendi, disponível em <http://www.mbendi.co.za/indy/pulp/p0005.htm> (consultado em fev. 2005).
110. McDonald, R.G. (Ed.) *Pulp and paper manufacture*. Vol. II, Chap.4, McGraw-Hill, New, York. (1970).
111. Melo, M., Gouveia, M. Pasta e Papel em Portugal. disponível em <http://www.gee.min-economia.pt/resources/docs/publicacao/DT/dt37.pdf>. (2005)
112. Messer, E., Srebotnik, E., Fiechter, A. Editorial. *Journal of Biotechnology* 53: 91–92 (1997).
113. Miyazaki, T., Yadomae, T., Sgiura, M., Ito, H., Fujii, K., Naruse, S. & Kuniyama, M. Chemical Structure of Antitumor Polysaccharide, Coriolan, produced by *Coriolus versicolor*. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* 22, 1739-1742 (1974).
114. Milagres, A.M.F., Arantes V., Medeiros C.L., Machuca A. Production of metal chelating compounds by white and brown-rot fungi and their comparative abilities for pulp bleaching. *Enzyme and Microbial Technology* 30:562–565 (2002).
115. Miller, G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry* 31:426-431 (1959).
116. Mitchell, D.A., Meien, O.F., Krieger, N., Dalsenter, F.D.H. A review of recent developments in modeling of microbial growth kinetics and intraparticle phenomena in solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal* 17:15-26 (2004).
117. Mizuno, T., Wang, G., Zhang, J., Kawagishi, H., Nishitoba, T., Li, J. Reishi, *Ganoderma lucidum* and *Ganoderma tsugae*: Bioactive substances and medicinal effects. *Food Reviews International* 11: 151-166 (1995).

118. Modi, D.R., Chandra, H., Garg, S.K., Decolourization of bagasse-based paper mill effluent by the white-rot fungus *Trametes versicolor*. *Bioresource Technology* 66:79-81 (1998).
119. Moreira, M.T., Palma, C., Feijoo, G., Lema, J.M. Strategies for the continuous production of lignolytic enzymes in fixed and fluidised bed bioreactors. *Journal of Biotechnology*, 66:27-39 (1998).
120. Mougin, C., Boyer, F.D., Caminade, E., Rama, R. Cleavage of the diketonitrile derivative of the herbicide isoxa.utole by extracellular fungal oxidases. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48: 4529–4534 (2000).
121. Mougin, C., Jolival C., Briozzo P., Madzak, C. Fungal laccases: from structure-activity studies *Environmental Chemistry Letter* 1:145–148 (2003).
122. Muñoz, C., Guillen, F, Martinez, A.T., Martinez, M.J. Laccase isoenzymes of *Pleurotus eryngii*: characterization, catalytic properties, and participation in activation of molecular oxygen and Mn<sup>2+</sup> oxidation *Applied and Environmental Microbiology* 63: 2166-2174 (1997).
123. Neto, B.B., Scarmino, I., Bruns, R. Planejamento e otimização de experimentos, Editora da Unicamp, Campinas, SP, ISBN 85-268-0336-0 (1995).
124. Ng, T.B. A review of research on the protein-bound polysaccharide (polysaccharopeptide, PSP) from the mushroom *Coriolus versicolor* (Basidiomycetes: Polyporaceae). *General Pharmacological* 30 (1), 1-4 (1998).
125. Niku, P.M.L., Viikari, L. Enzymatic oxidation of alkenes. *Journal of Molecular Catalysis B Enzymatic* 10:435–444 (2000).
126. Nosal'ova, V., Bobek, P., Cerna, S., Galbavy, S., Stvrtina, S. Effects of pleuran (beta-glucan isolated from *Pleurotus ostreatus*) on experimental colitis in rats. *Physiological Research* 50(6):575-581 (2001).
127. Nyanhongo, G.S., Gomes, J., Gubitz G., Zvauya R., Read, J.S., Steiner, W. Production of laccase by a newly isolated strain of *Trametes modesta*. *Bioresource Technology* 84:259–263 (2002).
128. O'Callaghan, J., O'Brien M.M., McClean K., Dobson, A.D.W. Optimisation of the expression of a *Trametes versicolor* laccase gene in *Pichia pastoris*. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 29:55–59 (2002).
129. Osiadacz, J., Al-Adhami, J.H., Bajraszewska, D., Fischer, P., Peczyńska-Czoch, W. On the use of *Trametes versicolor* laccase for the conversion of 4-methyl-3-hydroxyanthranilic acid to actinocin chromophore. *Journal of Biotechnology* 72:141-149 (1999).
130. Paice, M.G., Reid, I.D., Bourbonnais, R., Archibald, F. S., Jurasek, L. Manganese peroxidase, produced by *Trametes versicolor* during pulpbleaching, demethylates and delignifies kraft pulp. *Applied and Environmental Microbiology* 59 (1): 260-265 (1993).
131. Papagianni, M. Fungal morphology and metabolite production in submerged mycelial processes. *Biotechnology Advances* 22:189–259 (2004).

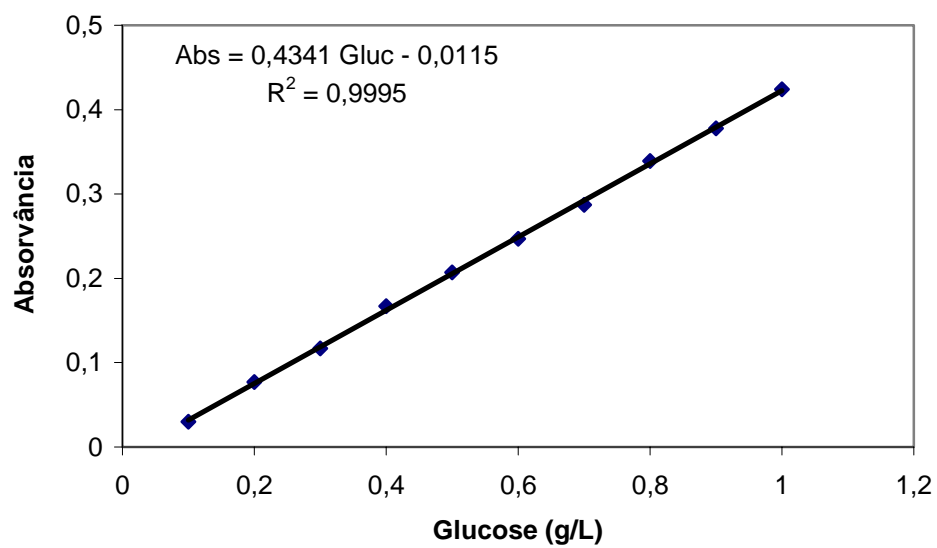
132. Paulsen, B.S. Biologically active polysaccharides as possible lead compounds. *Phytochemistry Reviews* 1:379–387 (2002).
133. Park, J.P., Kim, Y.M., Kim, S.W., Hwang, H.J., Cho, Y.J., Lee, Y.S., Song, C.H. and Yun, J.W. Effect of agitation intensity on the exo-biopolymer production and mycelial morphology in *Cordyceps militaris*. *Letters in Applied Microbiology* 34: 433–438 (2002).
134. Pereira, N. P. Biotecnologia e Agricultura. Universidade Aberta. Lisboa. p. 101. (1996) ISBN: 972-674-182-3.
135. Piontek, K., Antorini, M., Choinowski, T. Crystal structure of a laccase from the fungus *Trametes versicolor* at 1.90-Å resolution containing a full complement of coppers. *The journal of biological chemistry* 277:40: 37663–37669 (2002).
136. Pointing, S.B. Feasibility of bioremediation by white-rot fungi. *Applied Microbiology Biotechnology* 57: 20-33 (2001).
137. Pope, M. T. Heteropoly and Isopoly Oxometalates, Springer-Verlag, Berlin. (1983).
138. Rancaño, G., Lorenzo, M., Molares, N., Rodriguez, S., Sanromán, M. Production of laccase by *Trametes versicolor* in an airlift fermentor. *Process Biochemistry* 39: 467-473 (2003).
139. Rajarathnam, S., Shashireka, M.N., Bano, Z. Biopotentialities of the Basidiomycetes. *Advances in Applied Microbiology* 37: 233-361 (1992).
140. Read, N.D. Cellular nature and multicellular morphogenesis of higher fungi In Ingran, D., Hudson, A. (eds.) Shape and form in plants and fungi, The linnean Society of London, Academic Press, Cap.15:251-269 (1994).
141. Reid, I., Paice, M., Ho, C., Jurasek, L. Biological bleaching of softwood kraft pulp with the fungus *Trametes (Coriolus) versicolor*. *Tappi Journal* 149-153 (1990).~
142. Ronne, H. Glucose repression in fungi. *Trend in Genetics* 1:12-17 (1995).
143. Rosado, F.R., Germano, S., Carbonero, E.R., Da Costa, S.M., Iacomini, M., Kimmelmeier, C. Biomass and exopolysaccharide production in submerged cultures of *Pleurotus ostreatoroseus* Sing. and *Pleurotus ostreatus* “florida” (Jack.:Fr.) Kummer. *Journal of Basic Microbiology* 43 (3): 230-237 (2003).
144. Roy, B. Archibald, F. Effects of kraft Pulp and Lignin on *Trametes versicolor* Carbon Metabolism. *Applied and Environmental Microbiology* 59(6):1855-1863 (1993).
145. Ruel, K., Zhang, H., Niku-Paavola, M., Soloheimo, M., Moukha, S., Joseleau, J.P. *In situ* hybridization and immunocytochemistry in electron microscopy to study the expression of lignolytic enzymes in fungi growing in wood, *10th International Symposium on Wood and Pulping Chemistry*, Yokohama, Japão, 1:534-538 (1999).
146. Sadakane, M., Steckhan, E. Investigation of the manganese-substituted  $\alpha$ -Keggin-heteropolyanion  $K_6SiW_{11}O_{39}Mn(H_2O)$  by cyclic voltammetry and its application as oxidation catalyst. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical* 114: 221-228 (1996).

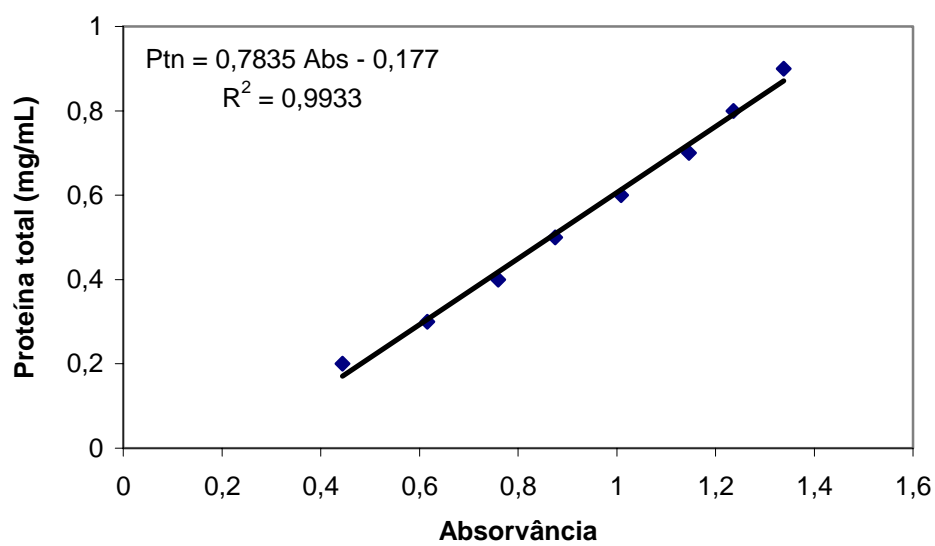
147. Sadakane, M., Steckhan, E. Electrochemical properties of polyoxometalates as electrocatalysts *Chemical Reviews* 98:219-237 (1998).
148. Sadakane, M., Steckhan, E., Co-solvent Effects on the Redox Potential of Manganese-substituted -a-Keggin type Silicon Polyoxotungstate  $K_6SiW_{11}O_{39}Mn(H_2O)$ : First Electrochemical Generation of the Manganese (V) Redox System in Aqueous Environment. *Acta Chemical Scandinavica* 53: 837 (1999).
149. Schutyser, M.A.I., Weber, F.J., Briels, W.J., Rinzema, A., Boom, R.M. Heat and water transfer in a rotating drum containing solid substrate particles. *Biotechnology and Bioengineering* 82 (5): 552-563 (2003).
150. Servili, M., DeStefano, G., Piacquadio, P., Sciancalepore, V. A novel method for removal phenols from grape must. *American Journal of Enology and Viticulture*. 51:357-361 (2000).
151. Shatalov, A.A., Evtuguin, D., Pascoal Neto, C. Cellulose degradation in the reaction system  $O_2$ /heteropolyanions of series  $[PMo_{(12-n)}V_nO_{40}]^{(3+n)-}$ . *Carbohydrate Polymers* 43:23-32 (2000).
152. Shingo, K., Masanori, A., Noriko, O., KyoKo, O., Takashi, I., Hideo, O. Degradation of a non-phenolic B-O-4 substructure and of polymeric lignin model compounds by laccase of *Coriolus versicolor* in the presence of 1-hydroxybenzotriazole. *FEMES Microbiology Letters* 170: 51-57 (1999).
153. Shreve, R.N., Brink, J.A. *Indústrias de processos químicos*. 4ª Ed. Editora Guanabara Koogan, 498-499. (1977)
154. Sigoillot, J., Petit, M., Ruel, K., Moukha, S., Comtat, J., Laugero, C., Joseleau, J., Choudens, C., Asther, M. Enzymatic treatment with manganese peroxidase from *Phanerochatae chrysosporium* for enhancing wheat straw pulp characteristics *Holzforschung*, 51:549-556 (1997).
155. Sinha, J., Bae, J.T., Park, J.P., Kim, K.H., Song, C.H., Yun, J.W. Changes in morphology of *Paecilomyces japonica* and their effect on broth rheology during production of exo-biopolymers. *Applied Microbiology and Biotechnology* 56: 88-92 (2001a).
156. Sinha, J., Bae, J.T., Park, J.P., Song, C.H., Yun, J.W. Effect of substrate concentration on broth rheology and fungal morphology during exo-biopolymer production by *Paecilomyces japonica* in a bioreactor. *Enzyme Microbiology and Technology* 29: 392-399 (2001b).
157. Sipilä, J., Karhunen, P., Brunow G. em [http://www.helsinki.fi/~orgkm\\_ww/Lignin.html](http://www.helsinki.fi/~orgkm_ww/Lignin.html), (2005).
158. Sjöström, E., *Wood chemistry: Fundamentals and application*, Academic Press Inc., Cap. 1, 3 e 4, (1981).
159. Smith, M., Ragauskas, A.J. em <http://www.eere.energy.gov/industry/forest/pdfs/biobleaching.pdf> (2005).

160. Smook, G.A. The technical association of the pulp and paper industry (TAPPI), test method (T236) (30). In: *Handbook for Pulping & Paper Technology* (M.J. Kocurek, Tech.. Ed.), 7<sup>th</sup> printing. TAPPI, Technology Park, Atlanta, Georgia. (1989).
161. Solomon, E. I., Sundaram, U. M. and Machonkin, T. E. Multicopper oxidases and oxygenases. *Chemical Review* 96: 2563-2605 (1996).
162. Souza, C. G. M., Zilly, A., Peralta, R. M. Production of laccase as the sole phenoloxidase by a Brazilian strain of *Pleurotus pulmonarius* in solid state fermentation. *Journal of Basic Microbiology* 42: 83–90 (2002).
163. Sugiura, M., Ohno, H., Kunihisa, M., Hirata, F., Ito, H. Studies on Antitumor Polysaccharides, Especially D-II, from Mycelium of *C. versicolor*. *Japanese Journal of Pharmacology* 30: 503-513 (1980).
164. Sutherland, I.W. Biosynthesis and composition of gram-negative bacterial extracellular and wall polysaccharides. *Annual Review in Microbiology* 39: 243-270 (1985).
165. Swamy, J., Ramsay, A. The evaluation of white rot fungi in the decolouration of textile dyes. *Enzyme Microbiology and Technology* 24:130-137 (1999).
166. Tanaka, H., Itakura, S., Enoki, A. Hydroxyl radical generation by an extracellular low-molecular-weight substance and phenol oxidase activity during wood degradation by the white-rot basidiomycete *Trametes versicolor*. *Journal of Biotechnology* 75(1):57-70 (1999).
167. Takamatsu, T., Shioya, S, Okuda, K. A comparison of unstructured growth models of micro-organisms. *Journal of Fermentation Technology*. 59 (2): 131-136 (1981).
168. Teeri, T. Crystalline cellulose degradation: new insight into the function of cellobiohydrolases. *Trends in Biotechnology* 15: 160-167 (1997).
169. Tien, M., Kirk, T.K. Lignin Peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium*. *Methods in Enzymology* 161:238-247 (1988).
170. Thurston, C.F. The structure and function of fungal laccases. *Microbiology* 140:19-26 (1994).
171. Tolan, J.S., Thibault, L., Decreasing ECF bleaching costs with enzymes in a mill with oxygen delignification. *Pulp Paper Can.* 98 (12): 147-150 (1997).
172. Tourné, C.M., Tourné, G.F., Malik, S.A., Weakley, T.J.R. J. Triheteropolyanions containing copper(II), manganese (II), or manganese (III). *Inorganic Nuclear Chemistry* 32: 3875-3881 (1970).
173. Trupkin, S., Levin, L., Forchiassin, F., Viale, A. Optimization of a culture medium for ligninolytic enzyme production and synthetic dye decolorization using response surface methodology. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 30:682–690 (2003).
174. Urzúa, U., Kersten, P.J., Vicuña, R. manganese peroxidase-dependent oxidation of glyoxylic and oxalic acids synthesized by *Ceriporiopsis subvermispora* produces



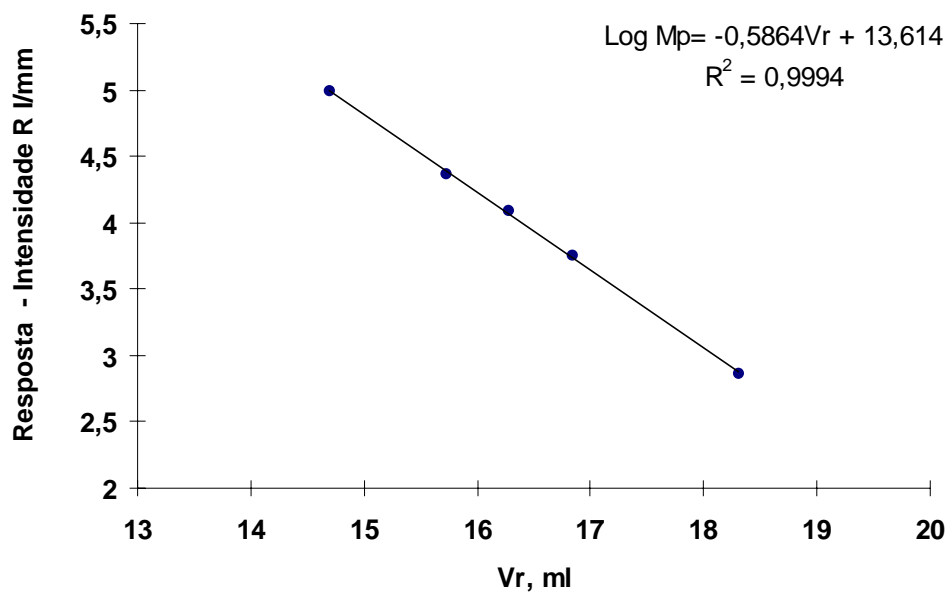
- extracellular hydrogen peroxide *Applied and Environmental Microbiology*, 64(1): 68–73 (1998).
175. Viikari, L., Lantto R. Biotechnology in the pulp and paper industry, Progress in Biotechnology, Elsevier Science B.V. vol. 21 p.v (2002)
  176. Voet, D., Voet, J. *Biochemistry*, John Wiley and Sons, New York, pp.254-257 (1990).
  177. Xu, F., Shin, W., Brown, S.H., Wahleithner, J.A., Sundaram, U.M., Solomon, E.I. A study of a series of recombinant fungal laccases and bilirubin oxidase that exhibit significant differences in redox potential, substrate specificity, and stability *Biochimica et Biophysica Acta* 1292: 303-311 (1996).
  178. Zamora, P., Pereira, C., Tiburtius, E., Moraes, S., Rosa, M., Minussi R., Durán, N. Decolorization of reactive dyes by immobilized laccase. *Applied Catalysis B: Environmental* 42(2):131-144 (2003).
  179. Zing, R., Fletcher, I.J., Freiermuth, B., Huber, K. Method for enhancing the activity of an enzyme, compounds showing enzyme activity enhancement, and detergents containing such compounds PCT. World patent application, WO 97/06224. February 1997.
  180. Zhang, X., Pope, M.T., Chance, M., Jameson, G. High-valent manganese in polyoxotungstates. 1. Manganese (IV) Keggin derivatives. *Polyhedron* 14: 1381-1392 (1995).
  181. Znidarsic, P., Pavko, A. Morphology of Filamentous Fungi. *Food Technology and Biotechnology*. 39 (3): 237–252 (2001).
  182. Yadav, J.S., Tripathi, J.P. Optimization of cultivation and nutrition conditions and substrate pretreatment for solid substrate fermentation of wheat straw by *Coriolus versicolor*. *Folia Microbiology* 36:249– 301 (1991).
  183. Yesilada, O., Asma, D., Cing, S. Decolorization of textile dyes by fungal pellets. *Process Biochemistry* 38: 933- 938 (2003).
  184. Yaropolov, A.I., Skorobogatko, O.V., Vartanov, S.S., Varfolomeyev, S.D. Laccase Properties, catalytic mechanism and applicability. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 49(3): 257-280 (1994).
  185. Waites, M.J., Morgan, N.L., Rockey, J.S. & Hi Gton A.G. *Industrial Microbiology, An Introduction*. pp. 68. Blackwell Publishing, Oxford; ISBN 0-632-05307-0 (2001).
  186. Weinstock, I. A.; Atalla, R. H.; Reiner, R. S.; Moen, M. A.; Hammel, K. E.; Houtman, C. J.; Hill, C. L.; Harrup, M. K. A new environmentally benign technology for transforming wood pulp into paper. Engineering polyoxometalates as catalysts for multiple processes. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical* 116: 59-84 (1997).
  187. Whistler, R.L., BeMiller, J.N. *Carbohydrate Chemistry for Food Scientists*. pp.96. Eagan Press. St. Paul ISBN 0-913250-92-9 (1997).
  188. Wong, Y., Yu, J. Laccase-catalyzed decolorization of synthetic dyes. *Water Research* 33(16): 3512-3520 (1999).

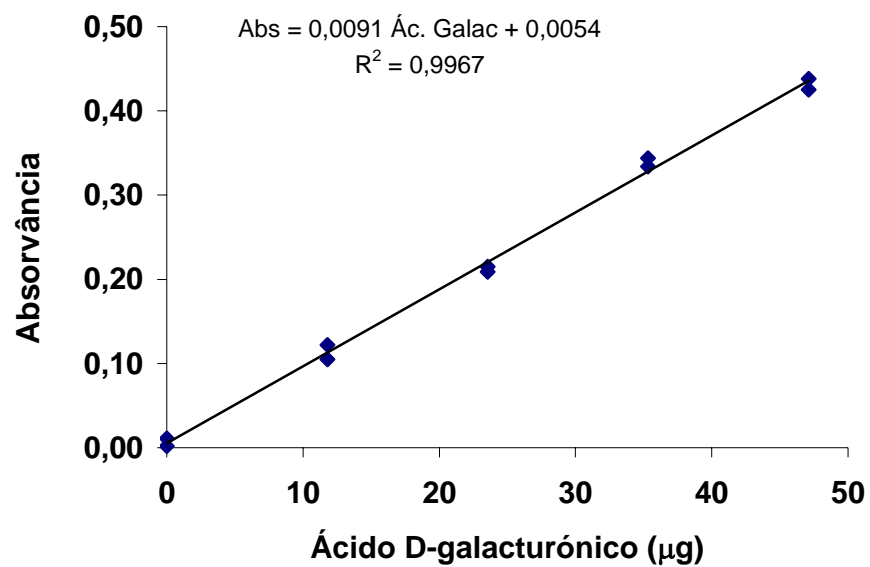
ANEXOS**A1. Curva de calibração para o método de DNS de determinação de açúcares reductores**

**A2. Curva de calibração para o método de Lowry de determinação de proteína total**

### A3. Curva de calibração do GPC para a determinação do peso molecular médio do EPS

Curva de calibração com pululana



**A4. Curva de calibração para a determinação dos ácidos hexourónicos**

## LISTA DE PUBLICAÇÕES

A.P.M. Tavares, M.A.Z. Coelho, J.A.P. Coutinho, A.M.R.B. Xavier. Optimization and modelling of laccase production by *Trametes versicolor* in bioreactor using statistical experimental design, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, in press (2006).

A.P.M. Tavares, M.S.M. Agapito, M.A.Z. Coelho, J. A. Lopes da Silva, A. Barros-Timmons, J.A.P. Coutinho, A.M.R.B. Xavier. Selection and optimization of culture medium for exopolysaccharide production by *Coriolus (Trametes) versicolor*, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 21 (8-9) 1499-1507 (2005).

A.P.M. Tavares, M.A.Z. Coelho, J.A.P. Coutinho, A.M.R.B. Xavier. Laccase improvement in submerged cultivation: induced production and kinetic modelling. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 80 (6) 669-676 (2005).

J.A.F. Gamelas, A.P.M. Tavares, D.V. Evtuguin, A.M.B. Xavier. Oxygen bleaching of kraft pulp with polyoxometalates and laccase applying multi-stage process: comparative study. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 33: 57-64 (2005).

P.F.F. Amaral, D.L.A. Fernandes, A.P.M. Tavares, A.M.R.B. Xavier, M.C. Cammarota, J.A.P. Coutinho, M.A.Z. Coelho. Dye decolorization performed by *Trametes versicolor* from textile wastewater. *Environmental Technology*, 25: 1313-1320 (2004).

A.P.M. Tavares, J.A.F. Gamelas, A. Gaspar, D.V. Evtuguin, A.M.R.B. Xavier. A novel approach for the oxidative catalysis employing polyoxometalate-laccase system: application to the oxygen bleaching of kraft pulp. *Catalysis Communications*, 5 485-489 (2004).