

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE LORENA

HÉVILA BROGNARO DOS SANTOS

**Estudo da recuperação das enzimas produzidas por *Ceriporiopsis
subvermispora* em cavacos de eucalipto extraídos com água ou etanol**

São Paulo
2008

HÉVILA BROGNARO DOS SANTOS

**Estudo da recuperação das enzimas produzidas por *Ceriporiopsis
subvermispora* em cavacos de eucalipto extraídos com água ou etanol**

Dissertação apresentada à Escola de Engenharia de
Lorena da Universidade de São Paulo para obtenção
do título de mestre em Biotecnologia Industrial.

Área de concentração: Microbiologia Aplicada
Orientadora: Dra. Adriane M. F. Milagres

Lorena - SP
2008

AUTORIZO A DIVULGAÇÃO E A REPRODUÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Catalogação na Publicação
Biblioteca Universitária
Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo

Santos, Hévila Brognaro dos

Estudo da recuperação das enzimas produzidas por *Ceriporiopsis subvermispota* em cavacos de eucalipto extraídos com água ou etanol / Hévila Brognaro dos Santos ; orientadora Adriane M. F. Milagres. – Lorena, 2008
1116 f. : fig.

Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial. Área de Concentração: Microbiologia Aplicada) – Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo

1. Enzimas 2. *Ceriporiopsis subvermispota* 3. Manganês Peroxidase 4. β -glicosidase 5. Carvão ativado 6. Biodegradação. I. Título.

577.15 - CDU

AGRADECIMENTOS

A Profa. Dra Adriane M. F. Milagres pela orientação, apoio e compreensão durante todo o processo científico.

Aos meus amigos Joseana Rocha do Monte, Mayra Sarti, Michel Brienzo e Valdeir Arantes que me apoiaram e auxiliaram ao longo da pós-graduação.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior pela concessão da bolsa de mestrado e pelo apoio financeiro.

A minha família pelo incentivo durante todos os momentos.

RESUMO

BROGNARO, H. **Estudo da recuperação das enzimas produzidas por *Ceriporiopsis subvermispota* em cavacos de eucalipto extraídos com água ou etanol**. 2008. 116f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Industrial) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, São Paulo, 2008.

O extrato enzimático obtido do cultivo de *Ceriporiopsis subvermispota* em cavacos de eucalipto, foi tratado com carvão ativado, para a remoção de compostos aromáticos e recuperação das enzimas. Em uma primeira etapa os cavacos foram preparados usando etanol, água ou a combinação destes dois solventes, visando a remoção de parte dos extrativos da madeira. Os cavacos com baixo teor de extrativos e também cavacos originais, como recebido da fábrica, foram usados para o cultivo de *C. subvermispota*, dentro de Erlenmeyers, por um período de 40 dias a 27 °C. Os cavacos obtidos em cada um destes cultivos foram extraídos com tampão acetato de sódio 50 mM (pH 4,8), adicionado de 0,01% de tween 60. As atividades de xilanase, β -xilosidase, mananase e endoglucanase produzidas foram muito baixas, enquanto que a manganês peroxidase e β -glicosidase foram marcantes independentemente do uso de cavacos originais ou com baixo teor de extrativos. Os extratos enzimáticos apresentaram elevadas absorbâncias a 280 nm para todos os cultivos, indicando que os produtos da biodegradação da lignina foram mais importantes que os extrativos da madeira para a cor escura dos extratos enzimáticos. Foi avaliado o efeito das variáveis: carvão ativado (A), tempo de contato (B) e pH (C) no processo de adsorção de compostos que absorvem a 280 nm de forma a obter as condições que proporcionassem a máxima recuperação de manganês peroxidase e β -glicosidase. Os resultados mostraram que a concentração de carvão foi o fator que exerceu maior influência na redução da absorbância a 280 nm e na atividade de β -glicosidase, assim como o pH foi o fator que mais influenciou a atividade de MnP. Nas condições otimizadas de tratamento dos extratos enzimáticos com carvão ativado foi possível obter atividade de manganês peroxidase superior a 80%, de β -glicosidase superior a 62% e redução de absorbância a 280 nm acima de 70%. Foram também realizados ensaios usando um volume de 300 ml de extrato enzimático e os resultados de recuperação das enzimas foi similar aos realizados com menor volume. Após a concentração das proteínas, o perfil eletroforético foi obtido em gel desnaturante de poliacrilamida (SDS-PAGE) revelando bandas protéicas com massas de $53,5 \pm 1,8$ kDa para a manganês peroxidase. No extrato etanol/água tratado nas condições determinadas para a β -glicosidase a eletroforese em gel de poliacrilamida apresentou uma banda de 102,5 kDa, além das bandas similares apresentadas nos outros extratos. Essas bandas similares presentes nos dois extratos (controle e etanol/água) possuem massa molar média de $55,7 \pm 0,98$ kDa. Estes resultados possibilitaram a identificação do perfil de algumas proteínas extracelulares expressas por *C. subvermispota* quando cultivado em *Eucalyptus grandis* relacionadas à degradação da parede celular da madeira.

Palavras-chave: *Ceriporiopsis subvermispota*. Manganês peroxidase. β -glicosidase. Carvão ativado. Biodegradação. Extrativos. Enzimas.

ABSTRACT

BROGNARO, H. **Studies of enzymes recovery from eucalyptus chips extracted by ethanol or water biodegraded by *Ceriporiopsis subvermispora*** 2008. 116f. Dissertation (Master of Science in Industrial Biotechnology) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, São Paulo, 2008.

The enzymatic extracts from biodegraded eucalyptus by *Ceriporiopsis subvermispora* were treated with activated charcoal, to remove aromatic compounds and to recover the enzymes. Initially, the wood chips were prepared using ethanol, distilled water or both solvents, with the purpose to remove the extractives. The wood chips, with low extractives and those originally received from pulp and paper industry, were used for biodegradation experiments in Erlenmeyer flasks for 40 days at 27 °C. The wood chips were extracted with acetate buffer 50 mM (pH 5,5) and tween 60 (0,01%). The activities of xylanase, β -xylosidase, mannanase and endoglucanase were very low, however manganese peroxidase and β -glucosidase activities were expressive, even if original wood chips or solvent extracted chips were used. The enzymatic extracts showed high absorbances at 280 nm for all the extracts, suggesting that the biodegradation products of lignin are more important than wood extractives for the brown dark color. The effects of the variables: concentration of charcoal activated (A), pH (B), contact time (C) on the adsorption of compounds that absorb at 280 nm, were evaluated to establish the necessary conditions to attain a highly efficient recovery of manganese peroxidase and β -glucosidase. For this, the experimental design methodology was used, and the optimization of the treatment was based in multivariate statistical concepts. The results revealed that the concentration of charcoal activated leads significant effects on the absorbance reduction and β -glucosidase recovery, as well as the pH leads significant effects on the recovery of manganese peroxidase. Treating the enzymatic extracts with charcoal activated under optimal conditions, provided more than 80% recovery of manganese peroxidase and 62% of β -glucosidase with more than 70% of reduction on the absorbance at 280 nm. Assays were conducted in a 300 ml volume, under the same conditions and the results obtained showed similar results than those obtained for small volumes. Nevertheless, the results of the present study showed that the treatment with activated charcoal followed by loading in anionic resin resulted in an improvement of enzyme recovery with low aromatic compounds. After the protein concentration the electrophoretic profile was obtained by denaturing polyacrylamide gel (SDS-PAGE) revealing bands with molar weight of $53,5 \pm 1,8$ kDa for the extracts treated under conditions optimized for manganese peroxidase. The results also indicated that the extract ethanol/water treated under conditions determined β -glucosidase to SDS-PAGE presented a band with molar weight of 102.5 kDa, and the bands presented in other similar statements. These bands present similar in the two extracts (control and ethanol/water) have molar weight 55.7 ± 0.98 kDa. These results enabled the identification of the profile of extracellular proteins expressed by *C. subvermispora* when grown in *Eucalyptus grandis* related to biomass conversion.

Keywords: *Ceriporiopsis subvermispora*. Manganese peroxidase. β -glucosidase. Activated charcoal. Biodegradation. Extractives. Enzymes.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	10
1.1 Componentes da madeira.....	11
1.2 Enzimas envolvidas na degradação dos polissacarídeos da parede celular vegetal.....	14
1.2.1 Enzima oxidativa.....	15
1.2.2 Enzimas hidrolíticas.....	17
1.3 Biodegradação da madeira por <i>Ceriporiopsis subvermispora</i>	19
1.4 Remoção de compostos fenólicos.....	22
1.5 Concentração de proteínas.....	24
2. OBJETIVO.....	25
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	26
3.1 Fungo e preparação do inóculo.....	26
3.2 Madeira.....	26
3.2.1 Preparação da madeira.....	27
3.3 Condições de cultivo.....	27
3.4 Extração e quantificação das enzimas produzidas.....	27
3.5 Determinação das atividades enzimáticas.....	28
3.6 Determinação do pH.....	30
3.7 Remoção dos extrativos e derivados da lignina presentes nos extratos enzimáticos.....	31
3.8 Otimização da etapa de remoção de cor dos extratos enzimáticos.....	31
3.9 Concentração das enzimas presentes nos extratos.....	34
3.10 Diálise.....	34
3.11 Determinação de compostos fenólicos totais.....	34
3.12 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).....	35
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	36
4.1 Biodegradação de cavacos de eucalipto por <i>Ceriporiopsis subvermispora</i>	36
4.2 Análise dos extrativos e derivados da lignina presentes nos extratos de eucalipto.....	40

4.3 Emprego do carvão ativado nos extratos enzimáticos como auxiliar na remoção de extrativos e derivados de lignina	42
4.3.1 Tratamento dos extratos.....	43
4.3.2 Avaliação dos resultados obtidos a partir do extrato produzido pelo cultivo do fungo em madeira controle.....	43
4.3.2.1 Análise dos efeitos da concentração de carvão, tempo de adsorção e pH no tratamento do extrato da madeira controle.....	44
4.3.2.1.1 Análise da resposta recuperação de atividade de β -glicosidase para o extrato controle.....	46
4.3.2.1.2 Análise da resposta recuperação de atividade de manganês peroxidase para o extrato controle.....	49
4.3.2.1.3 Análise da resposta redução de absorbância a 280 nm para o extrato controle.....	51
4.3.3 Avaliação dos resultados obtidos a partir do extrato produzido pelo cultivo do fungo em madeira extraída com etanol.....	54
4.3.3.1 Análise dos efeitos da concentração de carvão, tempo de adsorção e pH no tratamento do extrato da madeira extraída com etanol.....	55
4.3.3.1.1 Análise da resposta recuperação de atividade de β -glicosidase para o extrato produzido pelo cultivo do fungo em madeira extraída com etanol.....	56
4.3.3.1.2 Análise da resposta recuperação de atividade de manganês peroxidase para o extrato produzido pelo cultivo do fungo em madeira extraída com etanol.....	59
4.3.3.1.3 Análise da resposta redução de absorbância a 280 nm para o extrato produzido pelo cultivo do fungo em madeira extraída com etanol.....	62
4.3.4 Avaliação dos resultados obtidos a partir d extrato produzido pelo cultivo do fungo em madeira extraída com água.....	65
4.3.4.1 Análise dos efeitos da concentração de carvão, tempo de adsorção e pH no tratamento do extrato produzido pelo cultivo do fungo em madeira extraída com etanol.....	66
4.3.4.1.1 Análise da resposta recuperação de atividade de β -glicosidase para o extrato produzido pelo cultivo do fungo em madeira extraída com água.....	68
4.3.4.1.2 Análise da resposta recuperação de atividade de manganês peroxidase para o extrato produzido pelo cultivo do fungo em madeira extraída com água.....	70
4.3.4.1.3 Análise da resposta redução de absorbância a 280 nm para o extrato produzido pelo cultivo do fungo em madeira extraída com etanol.....	73

4.3.5 Avaliação dos resultados obtidos a partir do extrato produzido pelo cultivo do fungo em madeira extraída com etanol e água.....	76
4.3.5.1 Análise dos efeitos da concentração de carvão, tempo de adsorção e pH no tratamento do extrato produzido pelo cultivo do fungo em madeira extraída com etanol e água.....	77
4.3.5.1.1 Análise da resposta recuperação de atividade de β -glicosidase para o extrato produzido pelo cultivo do fungo em madeira extraída com etanol e água.....	79
4.3.5.1.2 Análise da resposta recuperação de atividade de manganês peroxidase para o extrato produzido pelo cultivo do fungo em madeira extraída com etanol e água.....	81
4.3.5.1.3 Análise da resposta redução de absorbância a 280 nm para o extrato produzido pelo cultivo do fungo em madeira extraída com etanol e água.....	84
4.4 Otimização e validação dos modelos matemáticos.....	87
4.4.1 Otimização para as respostas % de atividade de β -glicosidade e redução de absorbância a 280 nm.....	87
4.4.2 Otimização para as respostas % de atividade de manganês peroxidase e redução de absorbância a 280 nm.....	91
4.4.3 Validação experimental.....	95
4.5 Determinação dos compostos fenólicos totais por espectrofotometria.....	98
4.6 Concentração dos extratos enzimáticos.....	100
4.7 Eletroforese.....	101
5. CONCLUSÕES.....	104
REFERÊNCIAS	105
ANEXOS.....	115

1. INTRODUÇÃO

Poucos estudos na literatura descrevem a produção de enzimas durante o crescimento dos fungos sobre madeira. Desta forma, muitas questões relacionadas à produção das enzimas durante o processo de degradação, participação de outros agentes não enzimáticos no processo, relação e importância que cada enzima tem na degradação de um determinado componente da matriz lignocelulósica, principalmente nos estágios iniciais da degradação, permanecem ainda sem resposta.

Procurando contribuir ao conhecimento da enzimologia da degradação da madeira, neste trabalho foi proposto caracterizar o padrão enzimático de *C. subvermispora* obtido da degradação de cavacos de eucalipto. Várias tentativas têm sido feitas nos últimos anos em relação às celulasas, hemicelulasas (MILAGRES et al., 2005; HEIDORNE et al., 2006; MAGALHÃES et al., 2006), lacases e manganês-peroxidases (LOBOS et al., 1994; VICUÑA et al., 1996; CARVALHO et al., 2007), porém o que se observa é que as análises das enzimas em géis ainda é extremamente dificultada pela presença de extrativos e derivados da lignina nas culturas, que além de interferir na determinação do teor de proteínas por métodos tradicionais (SOUZA CRUZ et al., 2004), também interfere na determinação de atividades enzimáticas, uma vez que estes podem atuar como inibidores das enzimas presentes (LOBOS et al., 1994). Desta forma, foram avaliadas metodologias para remover os extrativos da madeira a fim de utilizá-las para o cultivo de *C. subvermispora* e obtenção das enzimas. A remoção de extrativos e de lignina solúvel é uma parte importante de trabalhos que visam purificar e caracterizar enzimas de interesse. Alguns aspectos da colonização dos cavacos de *E. grandis* são inicialmente descritos. Posteriormente, procedeu-se ao estabelecimento das melhores condições para limpeza dos extratos e recuperação das enzimas com base em algumas informações da literatura. Nos extratos recuperados foram estudadas, através de ensaios espectrofotométricos, algumas das enzimas mais importantes relacionadas à decomposição de celulose, xilana e lignina. Os padrões proteicos e enzimáticos produzidos do cultivo de *C. subvermisproa* nas diferentes madeiras foram analisados através de eletroforese em condições desnaturantes.

1.1 COMPONENTES DA MADEIRA

O teor, a proporção e a estrutura química dos diferentes componentes da madeira podem variar de acordo com a espécie da madeira. Em geral as madeiras podem ser classificadas em duras (“hardwood”) ou moles (“softwood”). As madeiras duras são provenientes de angiospermas como, por exemplo, o eucalipto, ipê e peroba e as madeiras moles de gimnospermas, grupo das coníferas como o pinho, cedro, cipreste (FENGEL ; WEGENER, 1989; HIGUCHI, 1985). Os principais componentes da madeira são celulose, hemicelulose e lignina. Além destes, em muitas espécies, outros componentes químicos, coletivamente chamados de extrativos estão presentes.

A célula vegetal deposita a sua parede celular em várias camadas. A primeira camada formada é a lamela média, constituída principalmente por lignina, é depositada durante a divisão celular. Sobre a lamela média depositam-se as primeiras camadas de celulose, formando as microfibrilas de celulose e constituindo a parede celular primária, que é continuamente depositada durante o crescimento em área da célula. A madeira desenvolve em seguida internamente uma parede celular secundária composta principalmente de celulose e lignina (FENGEL ; WEGENER, 1989). De acordo com as orientações das microfibrilas de celulose, a parede secundária pode ser dividida em três camadas, denominadas S₁, S₂, e S₃. As camadas da parede celular são constituídas de microfibrilas de celulose e da matriz. A composição da matriz é heterogênea variando em diferentes partes da parede, em diferentes tipos celulares e em diferentes espécies.

A celulose é o componente mais abundante na madeira (cerca de 50%), constituída por uma β -D-glucana linear (parte amorfa e parte cristalina) cuja estrutura supramolecular depende da estabilização decorrente de ligações de hidrogênio intra- e intermoleculares (FENGEL ; WEGENER, 1989). Estritamente a celulose é composta por unidades monoméricas de celobiose que se repetem sempre apresentando o oxigênio que liga os anéis glicosídicos na posição equatorial, conforme mostrado na Figura 1.

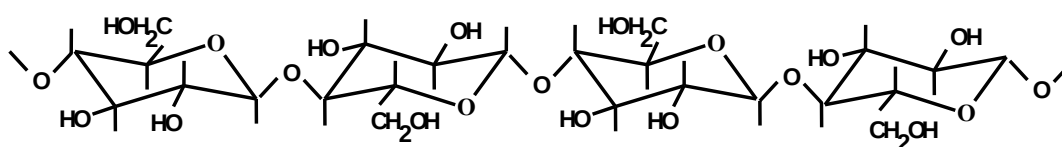


Figura 1. Estrutura de um fragmento de celulose

As polioses (ou hemicelulose) são compostas pelos açúcares glicose, manose e galactose (hexoses) e xilose e arabinose (pentoses), podendo ainda apresentar quantidades variáveis de ácidos urônicos e desoxi-hexoses em alguns tipos de madeira. Estes açúcares apresentam-se na forma de heteropolissacarídeos ramificados que atuam como uma interface entre a celulose e a lignina. As hemiceluloses de gramíneas e de resíduos de cereais são geralmente caracterizadas pela presença de arabinoxilanas e xiloglucanas, enquanto que 4-O-metil-glucuronoxilanas predominam em folhosas e glucomananas em coníferas. O teor de polioses em diferentes tipos de madeira é bastante variável, mas pode-se admitir um valor médio de cerca de 20%. Vários autores têm comprovado a existência de ligações covalentes entre essa classe de polissacarídeos e a lignina, cuja preponderância na fitobiomassa perde apenas para a celulose.

A lignina é definida como uma matriz amorfa não polissacarídica cuja biossíntese resulta da condensação de várias formas ressonantes de radicais livres, gerados a partir da oxidação de derivados do álcool p-hidroxi-cinâmico com vários graus de metoxilação (FENGEL ; WEGENER, 1989; DANIEL, 1993).

Os diferentes tipos de acoplamento entre os precursores dão origem a vários tipos de ligações entre as unidades fenilpropano. As mais abundantes são: β -O-4 e α -O-4 (50-65%), β -5 (6-15%), β -1 (9-15%), 5-5 (2-9%) e β - β (2-5%). A terminologia empregada na química da lignina é baseada numa estrutura básica de fenilpropano. Nessa terminologia considera-se como carbono 1 do anel aromático aquele que está ligado à cadeia propânica. Os carbonos dessa cadeia lateral são denominados respectivamente como α , β e γ , partindo do carbono ligado ao anel aromático. Uma estrutura modelo para a lignina é mostrada na Figura 2.

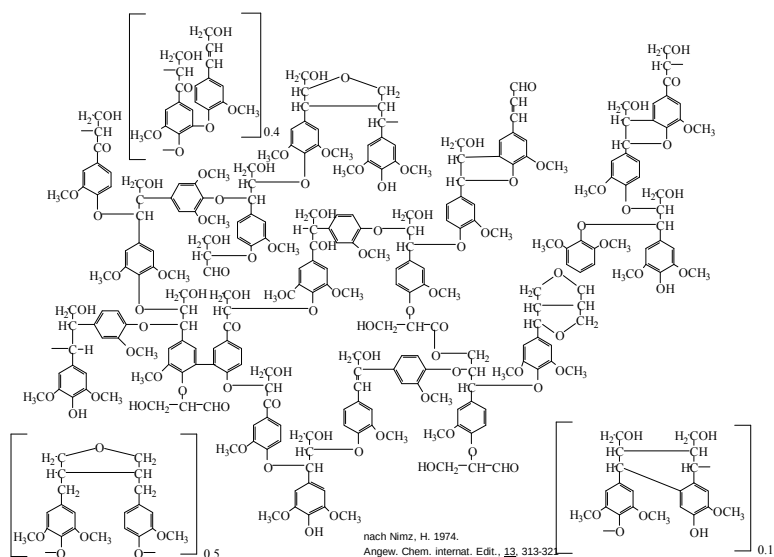


Figura 2. Modelo de uma estrutura de lignina proposta por H. Nimz (FENGEL ; WEGENER, 1989)

Assim como as hemiceluloses, o tipo e distribuição da lignina dependem da espécie vegetal e do tecido em questão e suas características químicas dependem largamente da metodologia usada para a extração, representando 20 a 30% do total da madeira. Via de regra, a lignina do tipo guaiacila (unidades monometoxiladas) predomina em gimnospermas, enquanto que a do tipo siringila (unidades dimetoxiladas) encontra-se em angiospermas. Por outro lado, a lignina de gramíneas e certas angiospermas ainda contém quantidades expressivas de ácido cinâmico e outros ácidos aromáticos dele derivados (FENGEL ; WEGENER, 1989).

Finalmente, os componentes de menor massa molar não residem na parede celular da planta e dividem-se basicamente em duas classes. A primeira classe engloba materiais conhecidos como extrativos por serem extraíveis em água, solventes orgânicos neutros, ou volatilizados a vapor. A segunda classe são solventes não comumente extraíveis com os agentes mencionados, como por exemplo, compostos inorgânicos cinzas, proteínas e substâncias pécicas.

O teor de extrativos em folhosas corresponde a 3 a 10%, estando este valor de 5 a 8% em coníferas. Esses constituintes são responsáveis por determinadas características da planta como a cor, o cheiro, a resistência natural ao apodrecimento, o sabor e suas propriedades abrasivas. É comum a denominação de resinas para determinada classe de extrativos. Extrativos de várias espécies de eucalipto são constituídos por ácidos carboxílicos polifenólicos e seus ésteres, flavonóides e seus polímeros, estilbenes, e outros componentes. Além dessas substâncias, outros compostos orgânicos podem também estar presentes nos

extrativos, como gorduras, ceras, ácidos graxos, álcoois, esteróides e hidrocarbonetos de alta massa molar (FENGEL ; WEGENER, 1989; HIGUCHI, 1985). Essas substâncias estão frequentemente presentes em quantidades apreciáveis, particularmente em espécies de regiões tropicais e semi-tropicais. Os ácidos carboxílicos polifenólicos quando em estado puro possuem baixa solubilidade em água bem como em solventes orgânicos. Entretanto quando naturalmente associados com outros extrativos podem ser removidos com solventes. Quando esses ácidos são aquecidos em condições alcalinas ocorrem reações de oxidação produzindo substâncias com cor marrom escura que aderem fortemente à polpa. Os ácidos também podem produzir complexos com íons metálicos que aderem as superfícies causando mal funcionamento dos equipamentos (HILLIS, 1971).

Com o aumento do uso de novas espécies de madeiras, as indústrias têm encontrado problemas devido às propriedades dos extrativos. Algumas das dificuldades encontradas pela indústria papelreira foram a redução do rendimento da polpa celulósica, o aumento do seu consumo e a queda na recuperação das polpas químicas. Alguns extrativos podem inibir reações de polpação e outros corroem equipamentos (HILLIS, 1971).

É interessante ressaltar que todos os constituintes da madeira estão intimamente associados e/ou ligados quimicamente, construindo todo o complexo celular (FENGEL ; WEGENER, 1989; HIGUCHI, 1985).

1.2 ENZIMAS ENVOLVIDAS NA DEGRADAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS DA PAREDE CELULAR VEGETAL

Os fungos são os principais degradadores de madeira na natureza e empregam diferentes mecanismos para romper a barreira de lignina. Enzimas extracelulares de ação hidrolítica e oxidativa e compostos de baixa massa molar, produzidos por diferentes fungos decompositores, causam diferentes formas de degradação da madeira. A degradação ocorre necessariamente de forma extracelular, uma vez que os componentes dos materiais lignocelulósicos devem ser inicialmente despolimerizados até compostos menores que são susceptíveis ao transporte pela parede celular e ao metabolismo intracelular dos fungos envolvidos.

A ordem nas quais variadas quantidades de lignina, celulose e hemicelulose são degradadas é diferente entre as espécies dos fungos de decomposição branca e pode variar

com o substrato que está sendo atacado e com o tempo de cultivo (ERIKSSON et al., 1990). Assim, um fungo pode causar uma degradação seletiva no início do cultivo, e com o passar do tempo tornar-se não seletivo (BLANCHETTE, 1980; HAKALA et al., 2004).

Os mecanismos distintos de degradação envolvidos em cada caso têm sido objeto de muitos estudos e um aspecto a ser considerado é o modo de ação das Mn-peroxidases, hemicelulases e celulasas por estes fungos.

1.2.1 ENZIMA OXIDATIVA

Manganês-peroxidase (MnP)

As MnPs são heme-proteínas que oxidam Mn^{2+} a Mn^{3+} , que oxida por sua vez substratos fenólicos. A Figura 3 mostra o ciclo catalítico desta enzima a qual é ativada através da oxidação por H_2O_2 , levando a formação do composto 1 (C_1) que é um oxo-complexo deficiente em 2 elétrons. A redução do C_1 até a enzima nativa pode dar-se por um doador de 2 elétrons como o iodeto ou, como ocorre durante a degradação de lignina, através de duas etapas de abstração de 1 elétron de cada vez. As MnPs dependem de Mn^{2+} para a redução do composto 2 (C_2) a C_0 (Figura 3). O composto 1 pode ser reduzido ao composto 2 as custas da oxidação direta de uma estrutura fenólica ou de um átomo de Mn^{2+} .

O Mn^{3+} formado é bastante reativo e pode atuar como um mediador da MnP, pois normalmente é estabilizado por quelantes produzidos pelo próprio fungo, como o ácido oxálico. O complexo Mn^{3+} -oxalato, por sua vez, pode ser reduzido às custas da oxidação de outra estrutura fenólica.

Em culturas líquidas de composição definida o basidiomiceto *C. subvermispora* secreta mais de sete isoenzimas da MnP com valores de pI entre 4,1 e 4,6 e dados da focalização isoeletrica (IEF) dos extratos enzimáticos não apresentaram mudanças durante todo o desenvolvimento do fungo. Entretanto, quando o fungo cresce em cavacos de madeira, o padrão das isoenzimas é drasticamente afetado depois de duas semanas, provavelmente devido a escassez de nutrientes. Neste caso, mais quatro isoenzimas da MnP com uma faixa de pI entre 3,2 e 3,53 foram observadas (LOBOS et al., 2001).

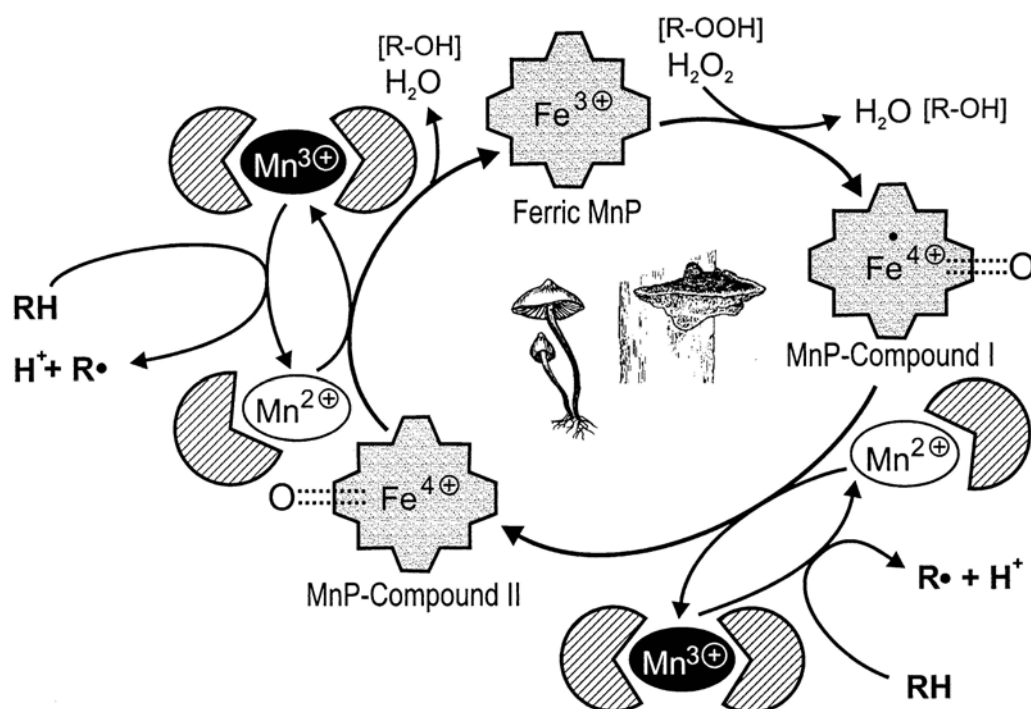


Figura 3. Ciclo catalítico de MnPs (HOFRICHTER, 2002).

A massa molar de MnPs de culturas líquidas (52,5 kDa) foi mais baixa do que de MnPs de culturas sólidas obtidas em 25 dias de cultivo (62,5 kDa). A massa molar de MnPs extraídas de cavacos de madeira mudou gradualmente durante o período de crescimento. Com 4 dias de cultivo as MnPs apresentaram massas molares de 52,5 kDa e 57,5 kDa, depois de 10 dias, a média molar aumentou de 60,2 kDa para um valor final de 62,5 kDa no 25º dia. As isoenzimas extraídas de cavacos de madeira com pIs de 3,20; 3,30 e 3,40 apresentaram uma maior banda correspondente a massa molar de 62,5 kDa, visto que bandas de 62,5 e 56 kDa apresentaram valor de pI de 3,53 (LOBOS et al., 2001).

1.2.2 ENZIMAS HIDROLÍTICAS

Hemicelulases

As enzimas que hidrolisam a hemicelulose podem ser divididas em enzimas que degradam a cadeia principal e enzimas que degradam as cadeias laterais (ERIKSSON et al., 1990; KUHAD et al., 1997). Assim a hidrólise das hemiceluloses ocorre de maneira aleatória, produzindo oligossacarídeos lineares e ramificados contendo cadeias laterais de arabinofuranose, ácido glucurônico ou ácido 4-O-metil-glucurônico. Devido à complexa estrutura das hemiceluloses, diferentes tipos de enzimas são requeridos para sua modificação e degradação enzimática. Um sistema enzimático incluindo xilanases, mananases, β -xilosidase, α -glucuronidase e α -arabinofuranosidase torna-se necessário para a hidrólise completa desses heteroxilo-oligossacarídeos (BIELY, 1985).

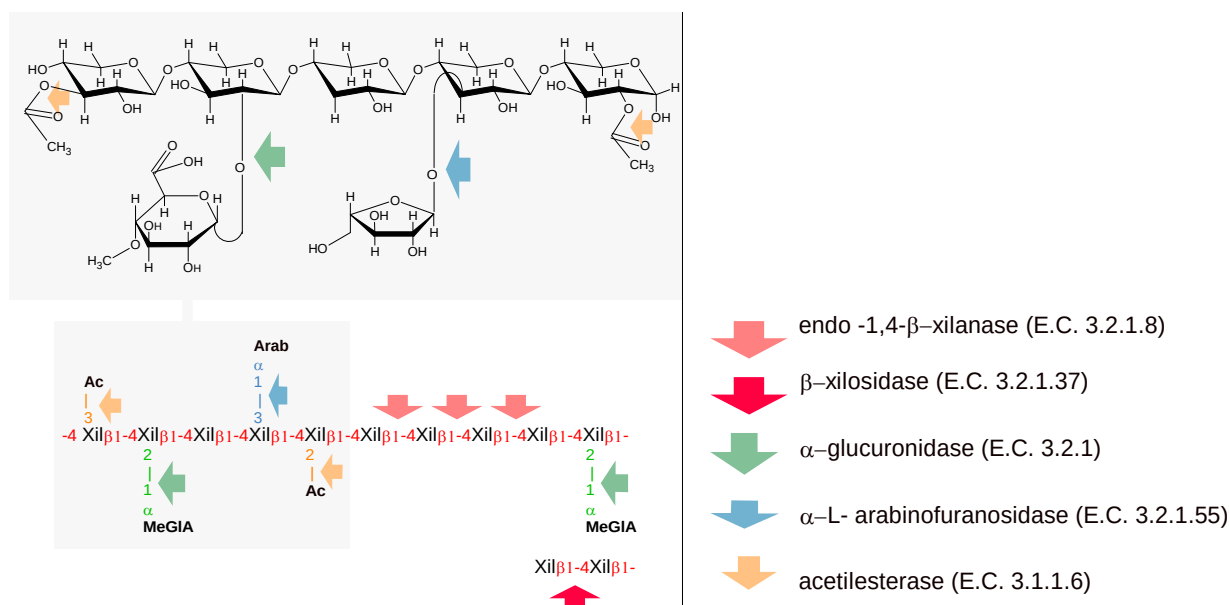


Figura 4. Representação teórica da estrutura da xilana vegetal e pontos onde as enzimas atuam. Ac, grupo acetil; Arab, L-arabinofuranose; MeGIA, ácido 4-O-metil-glicurônico; Xil, D-xilose

Entre estas, as duas principais enzimas degradadoras da hemicelulose são a endo-1-4- β -D-xilanase e a endo-1-4- β -D-mananase (BIELY, 1993). Formas múltiplas de cada classe de enzimas podem ocorrer e essas podem cooperar na hidrólise do substrato (WONG et al., 1988; BIELY et al., 1997) (Figura 4).

Celulases

Devido à constituição física da molécula de celulose e ao fato de que na natureza a celulose ocorre sempre associada à lignina e hemicelulose, a solubilização completa da celulose requer ações coordenadas de várias enzimas (KUBICEK, 1992).

A degradação da celulose ocorre pela ação de três classes principais de enzimas hidrolíticas: a endo-1,4- β -glucanases (EC 3.2.1.4), a exo-1,4- β -glucanases ou celobiohidrolases (EC 3.2.1.91) e a 1,4- β -glicosidase (EC 3.2.1.21) (SINSABAUGH ; PIPTAK, 1997; BHAT, 1997) (Figura 5).

As endoglucanases clivam a cadeia de celulose aleatoriamente em regiões amorfas, criando então novas extremidades de cadeia. Exoglucanases (celobiohidrolases) agem em sequência em tais extremidades, ou seja, são capazes de se ligar aos domínios cristalinos e liberar celobiose ou glicose das extremidades. A hidrólise completa da celulose ocorreria então pela ação das β -glicosidases, as quais hidrolisam celobiose e outras celodextrinas solúveis em glicose (MUÑOZ et al., 2001).

Além das enzimas hidrolíticas acredita-se que, enzimas oxidativas, também contribuem para a degradação da celulose. A celobiose desidrogenase (CDH) (EC 1.1.9.18) oxida as extremidades de celobiose ou celodextrinas maiores na presença de aceptores de elétrons, porém a função biológica da enzima ainda não foi totalmente esclarecida (HENRIKSSON et al., 2000a ; SIGOILLOT et al., 2002).

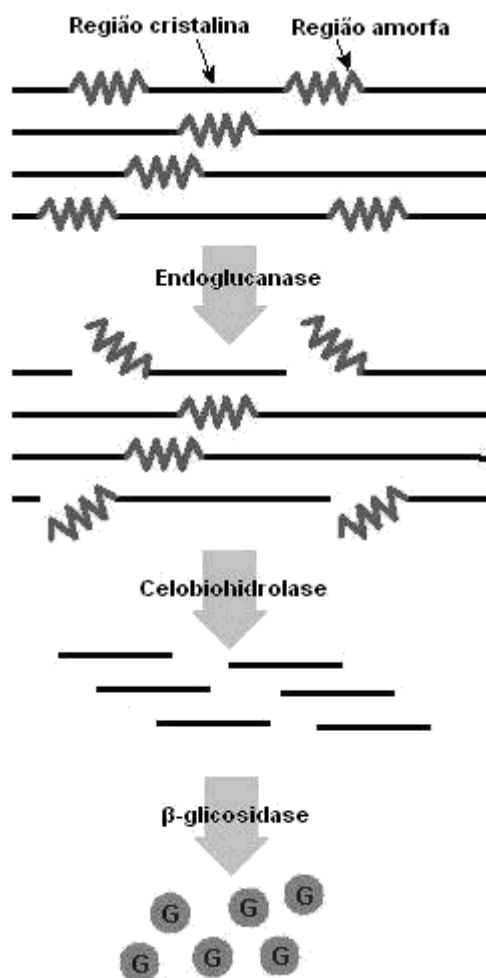


Figura 5. Mecanismo da decomposição da celulose pela ação do complexo celulolítico.

1.3 BIODEGRADAÇÃO DA MADEIRA POR *Ceriporiopsis subvermispora*

Os fungos causadores de decomposição branca são os principais degradadores de madeira na natureza e empregam diferentes mecanismos para romper a barreira de lignina. *Ceriporiopsis subvermispora* é um fungo de decomposição branca com habilidade em degradar a lignina de madeiras moles e duras seletivamente (BLANCHETTE et al., 1992; MESSNER ; SREBOTNIK, 1994; AKHTAR et al., 1998;). Sua extrema agressividade para a colonização da madeira lhe permite estabelecer-se em sistemas não estéreis (SCOTT et al.,

1998) e causar o efeito de “amolecimento” da matriz lignocelulósica com grande eficiência. Essas características indicam que, até o momento, essa é a espécie de fungo mais indicada para o processo de biopolpação de cavacos para utilização na fabricação de papel (FERRAZ et al., 1998; 2000). As enzimas extracelulares produzidas por este fungo em meio líquido compreendem as lacases e as manganês peroxidases, o complexo xilanolítico completo e parte do complexo celulolítico (SETHURAMAN et al., 1998; FERRAZ et al., 2003).

Muitos trabalhos têm mostrado que o crescimento fúngico em substrato sólido é diferente quando comparado ao meio líquido, e conseqüentemente, os padrões de produção de isoenzimas são diferentes (VICUÑA et al., 1996; MACHUCA ; FERRAZ, 2001). Durante os estágios iniciais de colonização da madeira por *C. subvermispora*, pequenas quantidades de lignina e celulose são removidas, mas ocorrem alterações substanciais na estrutura dos componentes da parede celular (BLANCHETTE et al., 1997; GUERRA et al., 2003). A biodegradação é ocasionada pela presença das enzimas hidrolíticas (celulases e hemicelulases) e das oxidativas (lacases e manganês peroxidases) (SETHURAMAN et al., 1998; FERRAZ et al., 2003). Estas enzimas são ativas ao longo das envolturas da hifa em contato com a parede celular da madeira (ENOKI et al., 1999; WATANABE et al., 2002). *C. subvermispora* também produz compostos de baixa massa molar para atacar os componentes da madeira, abrindo espaço para que as enzimas possam penetrar durante a biodegradação. Estudos recentes têm focado nos radicais hidroxil ($\text{OH}^\bullet$) e outros radicais oxigênio reativos como radicais peroxil ($\text{ROO}^\bullet$) ou hidroperoxil ($\text{OOH}^\bullet$) (HAMMEL et al., 2002).

Estudos do sistema ligninolítico de *C. subvermispora* revelaram que este fungo não produz lignina peroxidase em culturas líquidas e sólidas, sugerindo que diferentes estratégias devem ser usadas para a degradação da lignina (SALAS et al., 1995; ENOKI et al., 1999; LOBOS et al., 2001; HOFRICHTER, 2002; HAKALA et al., 2004, HEIDORNE et al., 2005). Curiosamente, embora genes semelhantes aos que codificam para LiPs em outros fungos tenham sido identificados em *C. subvermispora* (RAJAKUMAR et al., 1996), a presença de atividade desta enzima ainda não foi detectada em cultivos deste fungo. Desta forma, geralmente assume-se que as principais enzimas relacionadas à degradação de lignina por *C. subvermispora* são MnPs e lacases (FERRAZ et al., 2003). Em ensaios usando cavacos de eucalipto não foi observada atividade de lacases nos extratos obtidos, o que permite postular que as MnPs são as principais enzimas envolvidas na degradação de lignina por *C. subvermispora* (LOBOS, 2001; VICENTIM, 2007).

A produção de um sistema celulolítico incompleto tem sido considerada um dos motivos para a inexpressiva degradação de celulose, pois as exocelulases são produzidas em

pequenas quantidades, embora endocelulases e β -glicosidases são produzidas em quantidades comparáveis às reportadas por outros basidiomicetos de decomposição branca (SETHURAMAN et al., 1998; SOUZA-CRUZ et al., 2004). *C. subvermispora* produz duas β -glicosidases com massas molares de 110 kDa e 53 kDa que apresentam o máximo de atividade em pH 4.0 (MILAGRES et al., 2005). A atividade de endoglucanase foi maior em pH 3.5, sendo que acima de pH 6.0 a atividade desapareceu completamente (HEIDORNE et al., 2006).

As hemicelulases produzidas por *C. subvermispora* incluem a xilanase, mananase e β -xilosidase cuja produção ocorre em meios sintéticos ou complexos. Como em vários basidiomicetos, a expressão dessas enzimas é dependente do substrato (SETHURAMAN et al., 1998), e quando estudada em meios sintéticos, nem sempre reflete os acontecimentos do sistema *in situ* ou *in vivo*. Quando cultivado em cavaco de eucalipto com extrato de malte como substrato, a máxima atividade de xilanase foi obtida após 15 dias de degradação (FERRAZ et al., 2003). Em cavacos de *Pinus taeda* e *Eucalyptus grandis* sem co-substrato, *C. subvermispora* produziu xilanase e mananase (HEIDORNE et al., 2006), mas em níveis bem inferiores ao produzido na presença de co-substrato. Verificou-se que as xilanases apresentam pH ótimo de 5.0, a partir deste valor a atividade enzimática sofre redução. A atividade de β -xilosidase foi maior em pH 4,5 e da mesma forma que observado para a xilanase a atividade reduziu em valores de pH mais em pH acima de 7.0.

A β -glicosidase, mananase e a endoglucanase foram inativadas a 80°C, enquanto que β -xilosidase e xilanase permaneceram com parte da atividade a esta temperatura (HEIDORNE et al., 2006).

Durante o processo de purificação das enzimas hemicelulolíticas e celulolíticas, produzidas pelo *C. subvermispora* em cavacos de *Pinus taeda*, foi possível separar e purificar três xilanases (21, 29 e 79 kDa), duas mananases (65 e 156 kDa) e uma β -glicosidase (110 kDa) presentes no extrato enzimático. Tanto a xilanase de 29 kDa quanto a xilanase de 21 kDa apresentaram pontos isoelétricos superiores ao pH 5,0 (MILAGRES et al., 2005).

1.4 REMOÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS

Um dos maiores problemas encontrados para a caracterização de proteínas e enzimas de fungos cultivados em materiais lignocelulósicos é a presença de compostos liberados durante a degradação da estrutura da lignina. Sabe-se que as proteínas podem ligar-se a compostos fenólicos em meio aquoso através de diferentes mecanismos como ligações iônicas, pontes de hidrogênio e interações hidrofóbicas. O produto resultante da degradação de ligninas é mais hidrofóbico e susceptível a agregação e precipitação da proteína. Algumas características estruturais das proteínas como regiões ricas em prolina predispõem a formação do complexo. Compostos fenólicos podem também formar ligações covalentes irreversíveis com proteínas como uma conseqüente oxidação a quinonas (ALFENAS et al., 1998; CHARMONT et al., 2005).

Tanto os compostos fenólicos não oxidados quanto as quinonas reagem com as proteínas e inativam as enzimas ou alteram a mobilidade das moléculas de proteínas o que resulta em artefatos no gel de eletroforese (ALFENAS et al., 1998). Portanto é necessária a remoção dessas substâncias para que o procedimento de separação e identificação das proteínas apresente um resultado sem interferências, devendo ser incluído aos procedimentos de purificação de proteínas métodos capazes de eliminarem compostos que prejudicam a técnica de eletroforese.

Vários métodos podem ser empregados para a remoção de compostos fenólicos, tais como adsorção, troca iônica, osmose reversa, oxidação química, precipitação, destilação, extração por solventes, complexação e biorremediação (MUKHERJEE et al., 2007). A adsorção de compostos orgânicos em carvão ativado (CA) é uma das tecnologias mais importantes utilizada para remoção de compostos fenólicos e tem sido usado na remoção de fenóis de águas residuais e de substâncias coloridas em sucos, na purificação de ácidos ferúlicos e salicílico (SOTO et al., 2008). Tem sido também usada na remoção de derivados de lignina de licores provenientes da auto-hidrólise de materiais lignocelulósicos (MUSSATO ; ROBERTO, 2004).

O poder adsorvente do carvão ativado é proveniente da alta área superficial e da presença de uma variedade de grupos funcionais em sua superfície, sendo o oxigênio o principal átomo que aparece na rede de carbono, presente principalmente nos grupos funcionais carbonila, carboxila, hidroxila e enóis. Estes grupos superficiais influenciam a

reatividade e as propriedades de adsorção do material (GUILARDUCI, 2006; SATO et al., 2007).

Tem-se estabelecido que a principal forma de interação entre fenol e o carvão ativado é através da ligação entre os elétrons do sistema π , ou seja, os elétrons π do anel aromático do fenol ligam-se ao sistema π das camadas gráficas do carvão. Essa interação ocorre paralelamente ao plano basal do carvão ativado (GUILARDUCI, 2006).

Outra forma de interação estabelecida para a adsorção de fenol em carvão ativado é a formação de um complexo doador-receptor. Neste tipo de interação os grupos superficiais, em especial a carbonila, interagem com o grupo OH do fenol. A ligação ocorre com o fenol perpendicular ao plano basal das camadas gráficas. Esse tipo de ligação tem sido apontado como a principal causa da irreversibilidade do processo de adsorção do fenol em carvão ativado (GUILARDUCI, 2006). Entretanto há relatos de adsorção reversível e seletiva de ácido ferúlico, salicílico e compostos fenólicos com atividade antioxidante de vinhos (SOTO et al., 2008). Consequentemente, a adsorção e dessorção dos compostos fenólicos está relacionada ao caráter hidrofílico da superfície dos poros e cresce com a presença de grupos ácidos superficiais, o que favoreceria a formação de arranjos com a água, impedindo a difusão do fenol para dentro dos microporos. A partir de estudos calorimétricos com amostras de carvão ativado em pHs ácido e neutro, ficou demonstrado que a adsorção pela formação do complexo doador-receptor ocorre principalmente na superfície dos meso e microporos, bloqueando a entrada do fenol para os microporos (DABROWSKI et al., 2005). Apesar da grande quantidade de estudos sobre os fatores que influenciam o processo de adsorção de fenol, seu mecanismo ainda não é completamente entendido. A maioria dos trabalhos tem explorado o mecanismo de adsorção em meios neutro e ácido, que não são os pHs encontrados em muitos efluentes de indústrias têxteis e algumas minerações (DABROWSKI et al., 2005). No entanto, estudos realizados para os pHs 2, 6, 10 e 12, indicam que a adsorção de fenol no carvão ativado é favorecida pelo aumento do pH até 10, enquanto que para pH 12 ocorre uma queda significativa de adsorção. (GUILARDUCI, 2006). Com o aumento do pH, os grupos básicos e ácidos da superfície do carvão ativado vão se tornando ionizados e ficam disponíveis para formar complexos do tipo doador-receptor com o carvão. Inicialmente, os grupos lactonas se hidrolisam (pH $\sim$ 7,0) e, em seguida, os grupos fenólicos se ionizam (pH $\sim$ 10). Para valores muito altos de pH o excesso de carga negativa na superfície acarreta na repulsão com o íon fenolato. Além disso, nesta faixa de pH a interação do íon fenolato com o solvente é maior que com a superfície. Como consequência, tem-se a diminuição da adsorção de fenol pelo carvão ativado em pH 12. Entretanto, alguns estudos mostraram que as

isotermas de adsorção não mudam para valores de pH abaixo de 6,0, em função da baixa dissociação dos fenóis ($pK_a = 9,89$) (DABROWSKI et al., 2005).

1.5 CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNAS

As enzimas obtidas por processos fermentativos geralmente encontram-se bastante diluídas no meio de cultivo, sendo portanto, a sua recuperação um fator crítico em biotecnologia, principalmente pelos altos custos operacionais. (CORTEZ, 1998). A definição prévia do conjunto de proteínas a ser analisado é fundamental no traçado da estratégia de preparo da amostra. Quando o objetivo é avaliar todo o padrão protéico, a concentração das amostras é recomendada.

Purificações parciais dos extratos enzimáticos em resinas de troca iônica removem eficientemente não só grande parte da cor dos extratos, mas também compostos fenólicos, ácidos orgânicos e inorgânicos, compostos furânicos e metais, contaminantes que podem interferir na obtenção dos resultados da purificação. As resinas de troca iônica são compostos macromoleculares constituídos por um esqueleto tridimensional na qual se fixam os grupos ativos. Estas permitem trocar os íons não desejáveis da solução problema por aqueles que se encontram saturando os grupos funcionais da resina (VIÑALS, 1999).

A adsorção em colunas de troca iônica é um procedimento bastante utilizado para a concentração de enzimas de interesse, especialmente no caso onde o teor de proteínas é muito baixo. As colunas de adsorção possuem, em suas matrizes, grupamentos químicos responsáveis pela interação com a proteína. Incluem-se nesse caso as matrizes que possuem grupamentos ionizados (carregados positivamente ou negativamente). Para enzimas que possuem pH e ponto isoelétricos na região ácida ($pH < 5,0$) a adsorção pode ser realizada em resinas aniônicas fortes, contanto que o pH do extrato seja superior ao PI. Estudos realizados com as MnPs de *C. subvermispota* mostraram que a atividade desapareceu dos extratos após adsorção em uma resina aniônica fraca (DEAE Sepharose) não somente em pH 4.8 e 5.8, mas também em pH 3.8 (CARVALHO et al., 2007). *C. subvermispota* produz hemicelulases, celulasas, lacases e MnPs que apresentam valores de pH ótimo e pontos isoelétricos (Pis) entre 3,0 e 5,0 (LOBOS et al, 2001; HEIDORNE et al., 2006).

2. OBJETIVO

Produzir enzimas de *Ceriporiopsis subvermispota* mediante o seu cultivo em cavacos de eucalipto e otimizar as condições de clarificação dos extratos enzimáticos visando a recuperação das enzimas e eliminação de substâncias contaminantes .

Para alcançar o objetivo do trabalho foram conduzidas as etapas descritas a seguir:

- ✓ Obtenção do extrato enzimático de *C. subvermispota* cultivado por 40 dias em um sistema de fermentação sólida usando cavacos de eucalipto como recebido da fábrica e cavacos extraídos com água, etanol e com a combinação água – etanol;
- ✓ Análise da atividade das enzimas extracelulares relacionadas á degradação da celulose, hemicelulose e lignina produzidas durante o processo de biodegradação;
- ✓ Utilização da metodologia de superfície de resposta, que consiste em um conjunto de técnicas matemáticas e estatísticas, para determinar os efeitos das variáveis concentração de carvão, tempo de adsorção e pH na recuperação de manganês peroxidase e β -glicosidase e otimização de diferentes processos através do estabelecimento de condições operacionais ótimas para o sistema;

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 FUNGO E PREPARAÇÃO DO INÓCULO

O fungo utilizado neste estudo foi o basidiomiceto de decomposição branca *Ceriporiopsis subvermispora*, cepa SS-3, gentilmente cedido pelo Prof. M. Akhtar da empresa Biopulping International, Madison-WI, USA. A cepa foi periodicamente repicada e mantida em placas de Petri com meio contendo 2% de extrato de malte e 2% de ágar. Os cultivos foram realizados a 27 °C. A partir destas placas foi obtido o inóculo para o tratamento da madeira. Para a produção de inóculo, o fungo foi repicado em Erlenmeyer de 2 L contendo 200 mL de meio líquido composto por 2,4% de extrato de batata/dextrose (DIFCO) e 0,7% de extrato de levedura (OXOID). O meio líquido foi autoclavado a 121°C/15 min e após resfriamento inoculado com 20 discos de 8 mm de diâmetro provenientes de placas de Petri recém cultivadas. Após 12 dias de incubação estática a 27°C, o micélio crescido em meio líquido foi filtrado, lavado e macerado com água destilada esterilizada, usando um liquidificador de alumínio para a maceração. Da suspensão obtida, uma alíquota de 20 mL foi retirada e filtrada sobre papel de filtro previamente seco e pesado. O micélio retido no papel de filtro foi seco até massa constante para a determinação da quantidade de micélio (base seca) contido na suspensão recém preparada. Com base nessa determinação foi definido o volume de suspensão necessário para adicionar 3000 mg de micélio por kg de madeira.

3.2 MADEIRA

A madeira utilizada nesse trabalho foi *Eucalyptus grandis* cedida na forma de cavacos pela empresa Melhoramentos Ltda, Caieiras-SP. Os cavacos (2,5 x 1,0 x 0,2 cm) foram obtidos a partir de toras de árvores com cerca de 8 anos.

3.2.1 PREPARAÇÃO DA MADEIRA

A madeira para o cultivo do fungo foi utilizada como recebida da fábrica e também foram feitos tratamento para retirada de cromóforos como descrito abaixo:

a) Extração da madeira em etanol: Os cavacos foram extraídos com etanol 95% em um extrator Soxlet por 24 horas, a uma proporção de 700 mL de etanol para cada 100g de cavaco.

b) Extração da madeira com água: Os cavacos foram lavados com água desionizada 3 vezes e em seguida foram cobertos com 5 volumes de água para serem autoclavados a 121 °C durante 30 min (ABBAS et al., 2005).

c) Extração da madeira com etanol e água: Cavacos extraídos com etanol foram submetidos a extração em água, numa combinação dos métodos acima descritos.

3.3 CONDIÇÕES DE CULTIVO

Setenta e cinco gramas de cavacos de madeira foram mantidos em água por um período de 16 horas em frascos Erlenmeyers de 2 L. O excesso de água foi então drenado e os cavacos esterilizados a 121° C por 15 minutos. Os experimentos foram mantidos em sala termostatzada a $27 \pm 2^\circ \text{C}$ até o final de 40 dias.

3.4 EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DAS ENZIMAS PRODUZIDAS

A obtenção dos extratos enzimáticos foi conduzida com tampão acetato de sódio 50 mM, pH 4,8 adicionado de 0,01% de Tween 60 (solução de extração). Após 40 dias de cultivo foram adicionados 180 mL de solução de extração a qual foi distribuída sobre os cavacos colonizados. A extração foi conduzida sob agitação (120 rpm) durante 4 h a $10 \pm 1^\circ \text{C}$ e os extratos enzimáticos foram recuperados por centrifugação. Uma segunda extração com tempo de 16 h foi conduzida nas mesmas condições anteriores. Os extratos da primeira e segunda extração foram reunidos e determinadas as atividades enzimáticas relacionadas à degradação da lignina, celulose e hemicelulose que foram expressas como unidades internacionais (UI) por grama de madeira inicial.

A atividade enzimática obtida em cada ensaio foi calculada levando em consideração a diluição causada pelo ajuste do pH e comparada com a atividade do extrato sem tratamento. A resposta foi dada em porcentagem de atividade enzimática.

3.5 DETERMINAÇÃO DAS ATIVIDADES ENZIMÁTICAS

As atividades enzimáticas, expressas em UI/Kg de madeira foram determinadas conforme segue:

Manganês peroxidase

A atividade de manganês peroxidases foi determinada acompanhando-se a oxidação de vermelho de fenol ($\epsilon_{610} = 22.000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) (LUNDELL et al., 1990). A mistura reacional foi constituída por: 1.75 mL de tampão succinato de sódio 50 mM (pH 4,5), 1.5 mL de lactato de sódio 50 mM, 0.5 mL de vermelho de fenol 0.1 %, 0.5 mL de sulfato de manganês 1 mM, 0.25 mL de albumina bovina 1.8 %, 0.25 mL de peróxido de hidrogênio 2 mM e 0.25 mL de extrato enzimático. Após o início da reação, frações de 1 mL foram retiradas do tubo contendo a mistura reacional a cada 30 segundos e transferidas para cubetas contendo 65 μL de hidróxido de sódio 6.5 M previamente à leitura de absorbância à 610 nm (HITACHI – U-2001 Spectrophotometer). Uma unidade de atividade enzimática foi considerada como a quantidade de enzima capaz de catalisar a formação de 1 μmol de vermelho de fenol oxidado por minuto.

β -D-Xilanase

A atividade de xilanases foi determinada acompanhando-se a quantidade de açúcares redutores liberados durante a hidrólise de xilana de birchwood (BAIEY et al., 1992). A mistura reacional foi constituída por: 0.9 mL de xilana de birchwood 1 % (preparada em tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5.0) e 0.1 mL do extrato enzimático. Após incubação por 10, 20 e 30 min a 50 °C, adicionou-se 1.5 mL de DNS a cada um dos tubos, que foram então fervidos por 5 min. A concentração de açúcares redutores foi determinada a 540 nm, utilizando-se curva de calibração elaborada com xilose. Uma unidade de atividade enzimática

foi considerada como a quantidade de enzima capaz de catalisar a formação de 1 μ mol de açúcares redutores por minuto, expressos em xilose.

β -D-Xilosidase

A atividade de β -xilosidases foi determinada acompanhando-se a quantidade de p-nitrofenol liberado durante a hidrólise de p-nitrofenil- β -D-xilopiranosídeo (pNPX) (TAN et al., 1987). A mistura reacional foi constituída por: 0.4 mL de pNPX (preparado em tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5.0) e 0.1 mL de extrato enzimático. Após incubação por 10, 20 e 30 min a 50 °C, adicionou-se 1 mL de NaHCO₃ 10 % a cada um dos tubos. A concentração de p-nitrofenol foi determinada a 410 nm. Uma unidade de atividade enzimática foi considerada como a quantidade de enzima capaz de catalisar a formação de 1 μ mol de p-nitrofenol por minuto.

Mananase

A atividade de mananases foi determinada acompanhando-se a quantidade de açúcares redutores liberados durante a hidrólise de manana de locust bean (RATTO ; POUTANEN, 1988). A mistura reacional foi constituída por: 0.9 mL de manana de locust bean 0.5 % (preparada em tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5.0) e 0.1 mL do extrato enzimático. Após incubação por 10, 20 e 30 min a 50 °C, adicionou-se 1.5 mL de DNS a cada um dos tubos, que foram então fervidos por 5 min. A concentração de açúcares redutores foi determinada a 540 nm, utilizando-se curva de calibração elaborada com manose. Uma unidade de atividade enzimática foi considerada como a quantidade de enzima capaz de catalisar a formação de 1 μ mol de açúcares redutores por minuto, expressos em manose.

Endoglucanase

A atividade de endoglucanases (carboximetil celulase) foi determinada acompanhando-se a quantidade de açúcares redutores liberados durante a hidrólise de CMC (TANAKA et al., 1981). A mistura reacional foi constituída por: 0.9 mL de CMC 0.44 % (preparada em tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5.0) e 0.1 mL do extrato enzimático. Após incubação por 15, 30 e 60 min a 50 °C, adicionou-se 1.5 mL de DNS a cada um dos tubos, que foram então fervidos por 5 min. A concentração de açúcares redutores foi determinada a

540 nm, utilizando-se curva de calibração elaborada com glicose. Uma unidade de atividade enzimática foi considerada como a quantidade de enzima capaz de catalisar a formação de 1 μ mol de açúcares redutores por minuto, expressos em glicose.

Celobiohidrolases

A atividade de celobiohidrolases (exoglucanase) foi determinada acompanhando-se a quantidade de açúcares redutores liberados durante a hidrólise de Avicel (WOOD ; BHAT, 1988). A mistura reacional foi constituída por: 0.45 mL de Avicel 0.5 % (preparada em tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5.0) e 0.05 mL do extrato enzimático. Após incubação por 30, 60 e 120 min a 50 °C, adicionou-se 0.75 mL de DNS a cada um dos tubos. Após centrifugação a 12.000 *g* por 15 min, os sobrenadantes foram então fervidos por 5 min, e a concentração de açúcares redutores foi determinada a 540 nm, utilizando-se curva de calibração elaborada com glicose. Uma unidade de atividade enzimática foi considerada como a quantidade de enzima capaz de catalisar a formação de 1 μ mol de açúcares redutores por minuto, expressos em glicose.

β -glicosidases

A atividade de β -glicosidases foi determinada acompanhando-se a quantidade de p-nitrofenol liberado durante a hidrólise de p-nitrofenil – β - D-glicopiranosídeo (pNPG) (TAN et al., 1987). A mistura reacional foi constituída por: 0.4 mL de pNPG (preparado em tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5.0) e 0.1 mL de extrato enzimático. Após incubação por 10, 20 e 30 min a 50 °C, adicionou-se 1 mL de NaHCO₃ 10 % a cada um dos tubos. A concentração de p-nitrofenol foi determinada a 410 nm. Uma unidade de atividade enzimática foi considerada como a quantidade de enzima capaz de catalisar a formação de 1 μ mol de p-nitrofenol por minuto.

3.6 DETERMINAÇÃO DO pH

Quinze gramas de cavacos biodegradados foram extraídos com 26 mL de água de extração com o pH previamente ajustado em 7,0. A extração foi feita por imersão sob agitação de 120 rpm por 24 hrs, seguida de filtração e determinação do pH.

3.7 REMOÇÃO DOS EXTRATIVOS E DERIVADOS DA LIGNINA PRESENTES NOS EXTRATOS ENZIMÁTICOS.

Para a remoção dos extrativos e derivados de lignina dos extratos enzimáticos, os experimentos foram realizados em tubos Eppendorff de 2 mL, empregando-se 1.5 mL de extrato e concentrações variadas de carvão ativo.

A quantidade de carvão ativado necessária foi pesada diretamente em tubos de centrífuga de 2 ml tipo Eppendorfs. O pH do extrato foi medido e ajustado conforme o planejamento experimental usando ácido acético ou acetato de sódio ambos na concentração de 2 M. O volume adicionado para correção do pH foi anotado para posterior cálculo das respostas. Em seguida 1,5 mL do extrato, no devido pH, foi adicionado ao carvão, incubado a 10°C e agitado manualmente a cada 5 min. Ao final do tempo do ensaio o Eppendorf foi centrifugado por 5 min a 12000 rpm (BECKMAN – Microfuge™ 12) e 1 mL do sobrenadante foi retirado com pipeta para a caracterização das enzimas e leitura da absorbância a 280 nm.

O mesmo tratamento com carvão foi realizado aos extratos enzimáticos em Erlenmeyers de 500 mL com cerca de 350 mL de amostra, nas condições otimizadas de concentração de carvão ativo e pH. Após o tratamento realizou-se a caracterização das enzimas e leitura de absorbância, sendo em seguida o extrato levado a coluna de troca iônica.

3.8 OTIMIZAÇÃO DA ETAPA DE REMOÇÃO DE COR DOS EXTRATOS ENZIMÁTICOS

A atividade enzimática obtida em cada ensaio foi calculada levando em consideração a diluição causada pelo ajuste do pH e comparada com a atividade do extrato sem tratamento. A resposta foi dada em porcentagem de atividade enzimática.

A metodologia de superfície de resposta (MSR) foi utilizada para otimizar os parâmetros envolvidos na redução da absorbância a 280 nm e nas atividades enzimáticas dos extratos das madeiras biodegradadas. Os efeitos das variáveis concentração de carvão, tempo de adsorção e pH (variáveis independentes) sobre as atividades enzimáticas e absorção a 280 nm (variáveis dependentes) foram avaliados através da realização de 17 ensaios, de acordo

com um planejamento de compósito central com face centrada com três fatores e três níveis com três ensaios nos níveis centrais das variáveis independentes (Tabela 1).

Para o cálculo estatístico, as variáveis experimentais X_i foram codificadas como x_i de acordo com a seguinte equação:

$$x_i = \frac{X_i - X_0}{\delta X}$$

Onde x_i é o valor codificado da variável X_i , X_0 é o valor de X_i no ponto central, e δX é a diferença do passo.

A Tabela 1 apresenta os fatores e seus valores reais e codificados para o planejamento de compósito central com face centrada. Esta metodologia permite a modelagem de uma equação de primeira ou segunda ordem que descreve o processo. As respostas foram analisadas por regressão múltipla através do método dos mínimos quadrados para ajustar a seguinte equação:

$$Y = A_0 + \sum A_i X_i + \sum A_{ii} X_i^2 + \sum A_{ij} X_i X_j$$

Onde Y é a variável resposta predita; A_0 , A_i , A_{ii} , A_{ij} são os coeficientes de regressão do modelo, e X_i , X_j ($i = 1, 3$; $j = 1, 3$, $i \neq j$) representam as variáveis independentes na forma dos valores codificados (Li et al., 2007).

Os programas *Statística v.6.0* (Statsoft, USA) e *Design-Expert 6.0.6* foram empregados para a análise de regressão dos dados, para a estimativa dos coeficientes de regressão das equações, para gerar superfície de resposta e para otimizar as condições. A significância estatística dos modelos, da falta de ajuste dos mesmos e dos coeficientes de regressão foram determinados pela aplicação dos testes de Fisher (teste F) onde, se o valor de F calculado for superior ao de F tabelado ($F_{1-\alpha}$) para um nível de significância α então o termo em causa contribui significativamente para a resposta. Os níveis de significância e probabilidade assim como a notação utilizada para denotar cada nível, encontram-se na Tabela 2.

Tabela 1 - Variáveis independentes reais e codificadas para o planejamento de compósito central.

Ensaio	Variáveis independentes reais			Variáveis independentes codificadas		
	Carvão (%)	Tempo (min)	pH	Carvão (X ₁)	Tempo (X ₂)	pH (X ₃)
1	1	10	3	-1	-1	-1
2	1	10	5	-1	-1	1
3	1	50	3	-1	1	-1
4	1	50	5	-1	1	1
5	9	10	3	1	-1	-1
6	9	10	5	1	-1	1
7	9	50	3	1	1	-1
8	9	50	5	1	1	1
9	1	30	4	-1	0	0
10	9	30	4	1	0	0
11	5	10	4	0	-1	0
12	5	50	4	0	1	0
13	5	30	3	0	0	-1
14	5	30	5	0	0	1
15	5	30	4	0	0	0
16	5	30	4	0	0	0
17	5	30	4	0	0	0

Tabela 2 - Nível de probabilidade e notação para cada nível de significância, no planejamento efetuado.

Nível de Significância	p	Notação
90%	p < 0,10	*
95%	p < 0,05	**
99%	p < 0,01	***

A variância explicada pelo modelo foi dada pelo coeficiente de determinação, R² e os valores ótimos foram obtidos pela sobreposição das superfícies de resposta e análise numérica.

3.9 CONCENTRAÇÃO DAS ENZIMAS PRESENTES NOS EXTRATOS

Os extratos das madeiras biodegradadas foram concentrados em uma coluna trocadora de ânions. Cada extrato foi aplicado na coluna após o tratamento com carvão ativo, sendo posteriormente carregado em coluna (10.2 x 0.98 cm) empacotada com resina DEAE Sepharose CL 6B. Previamente ao carregamento dos extratos, a coluna foi equilibrada com tampão acetato de sódio 50 mM (pH 4.8), sendo as operações de carregamento, lavagem e eluição operadas a 0.50 – 0.75 mL/min. Para lavagem da coluna, empregou-se o tampão de equilíbrio. Para eluição, foi utilizada solução de NaCl 0,2 M. Foi feita a leitura de absorbância a 280 nm e atividade enzimática dos extratos antes e depois da eluição.

3.10 DIÁLISE

Dez mililitros das enzimas concentradas na coluna de troca iônica foram colocadas em um saco de diálise de 25 X 16 mm (INLAB) e dialisadas em 4 L de água deionizada. A agitação foi mantida constante a baixa velocidade sob refrigeração (4°C) e a água foi trocada a cada 4 horas.

3.11 DETERMINAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS

Em um tubo de ensaio foram adicionados 0,2 mL do reagente de Folin e 3 mL dos extratos, obtidos das madeiras biodegradadas após o pré-tratamento com carvão ativo nas condições otimizadas. A mistura reacional foi agitada em vórtice e após 5 minutos foi adicionado 0,8 mL de carbonato de sódio (150g/L), o sistema foi deixado em repouso, no escuro, a temperatura ambiente por 30 minutos. Ao final foi realizada leitura no espectrofotômetro a 760 nm. O aparelho foi calibrado substituindo a amostra por água desionizada. A concentração dos compostos fenólicos totais foi feita usando vanilina como padrão (CORTEZ, 2005)

3.12 ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA (SDS-PAGE)

Os extratos foram analisados quanto à distribuição dos padrões protéicos através de eletroforese em gel de poliacrilamida 12,5% (PAGE) sob condições desnaturantes na presença de SDS (sulfato de duodecil e sódio) de acordo com a técnica de Weber e Osborne, (1969). Os géis de poliacrilamida foram preparados na concentração de 12,5% com tampão Tris/HCl, solução de acrilamida/Bis acrilamida, solução de TEMED, água destilada e solução de SDS 10% (ALFENAS, 1991). A cuba para eletroforese foi preenchida com tampão Tris/glicina pH 8,9 com 1% de SDS. As amostras para a corrida foram preparadas tomando-se em um Ependorf, 30 μ L de cada amostra e 10 μ L do tampão fosfato de sódio 10 mM, pH 7,0, contendo 1,0% de 2-mercaptoetanol, azul de bromofenol 0,05% em água e 1 gota de glicerol. As amostras foram fervidas e injetadas no gel de eletroforese. As bandas de proteínas foram reveladas em soluções de sais de prata (ALFENAS et al., 1991) ou de coomassie blue e o tamanho das proteínas estimado por comparação com um padrão protéico. O aparelho utilizado foi um Hoefer/Mini VE Vertical Electrophoresis System (GE), com placas de vidro (10 X 10 cm) onde os géis foram montados.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 BIODEGRADAÇÃO DE CAVACOS DE EUCALIPTO POR *Ceriporiopsis subvermispora*

A madeira utilizada neste trabalho foi *Eucalyptus grandis* de 8 anos, cuja composição química corresponde a aproximadamente 50% de celulose, 15% de polioses, 26 % de lignina e 2,5 % de extrativos (FENGEL ; WEGENER, 1989). Alguns métodos foram usados para remover os extrativos da madeira a fim de se obter extratos mais claros e que pudessem ser utilizados em etapas posteriores de purificação e visualização em géis de eletroforese. Os cavacos de eucalipto original, extraídos com água, extraídos com etanol e com a combinação etanol/água foram autoclavados e inoculados com *C. subvermispora* durante 40 dias.

Após o tempo de biodegradação dos cavacos de *E.grandis* foi possível constatar alteração na sua coloração, especialmente na madeira tratada com etanol e água, mas que não refletiu na capacidade de colonização dos cavacos. Na Figura 6 tem-se uma foto ilustrativa do aspecto dos cavacos colonizados. Uma análise visual não indicou diferenças na velocidade de colonização dos cavacos originais e extraídos com solventes, apresentando um crescimento muito intenso ao final de 40 dias de incubação, com formação de uma grande massa de micélio na superfície dos cavacos, razão pela qual não se apresentou foto apenas do cultivo nos cavacos extraídos com etanol e água.



Figura 6. Aspecto visual do cultivo de *Ceriporiopsis subvermispora* em cavacos de eucalipto após 40 dias de cultivo.

Após 40 dias mais de 10% da lignina e polioses já deve ter sido degradada e se iniciado a despolimerização da celulose. Estas análises não foram realizadas, porém foram estimadas baseando-se em dados de biodegradação de cavacos de eucalipto por *C. subvermispota* cuja perda dos componentes da madeira aumenta em função do tempo de degradação (FERRAZ et al., 2003). Os extrativos da madeira são os primeiros a serem utilizados por *C. subvermispota*, o que poderia ser uma possível explicação para as modificações na sua coloração.

A medida do pH das madeiras ao final dos cultivos resultou em um pH igual a 2,8. Este fungo produz ácidos orgânicos, predominantemente ácido oxálico, durante o cultivo em madeira (AGUIAR et al., 2004). Masarim (2005), já havia reportado que o pH dos cavacos de eucalipto cultivados com uma alta concentração de inóculo (3000 mg/kg), ou seja, nas mesmas condições deste trabalho, decresce em função do tempo de cultivo, atingindo o pH 3,0 em 28 dias.

Os extratos obtidos a partir dos cavacos biodegradados foram avaliados quanto à atividade enzimática (Figuras 7 e 8). As enzimas extracelulares produzidas durante a degradação de madeira podem estar ligadas à membrana celular do microrganismo, adsorvidas na superfície da madeira ou formando agregados dentro do lúmen das células da madeira, devido à natureza hidrofóbica das proteínas. Por este motivo, é essencial a utilização de soluções de forças iônicas apropriadas e agentes solubilizantes de membrana, tais como Tween 60, para melhorar o rendimento da recuperação enzimática. O número de extrações necessárias para máxima recuperação enzimática parece ser um assunto mais difícil de estabelecer, uma vez que depende da enzima. Porém, optou-se por realizar duas extrações consecutivas, visto que em geral é possível recuperar mais de 80% da atividade, para a maioria das enzimas estudadas (FERRAZ et al., 2003).

As atividades de β -glicosidase foram superiores às demais nos extratos obtidos na primeira extração, à exceção da madeira extraída com água e etanol. Na segunda extração, detectou-se uma maior atividade de xilanase para a maioria dos extratos (Figura 7).

A atividade de xilanase no extrato do cavaco controle foi de apenas 36,35 UI/kg e com uma grande variação entre diferentes cultivos. Este valor foi muito inferior ao normalmente produzido por *C. subvermipora* (SOUZA-CRUZ et al., 2005, HEIDORNE et al., 2006). Tal resultado pode ser atribuído ao longo tempo de cultivo, visto que utilizando a mesma madeira e a mesma carga de inóculo, Masarim, (2005) descreveu a produção de 1900 UI/Kg de xilanases em 28 dias de incubação. Uma das explicações para esta baixa atividade

seria a presença de proteases nos extratos, considerando que o longo período de cultivo. A baixa atividade enzimática pode também ser atribuída ao baixo pH da madeira, conforme verificado por Massarim (2005). Esse dado pode ser associado aos estudos de estabilidade ao pH das enzimas de *C. subvermispora* (HEIDORNE et al, 2006).

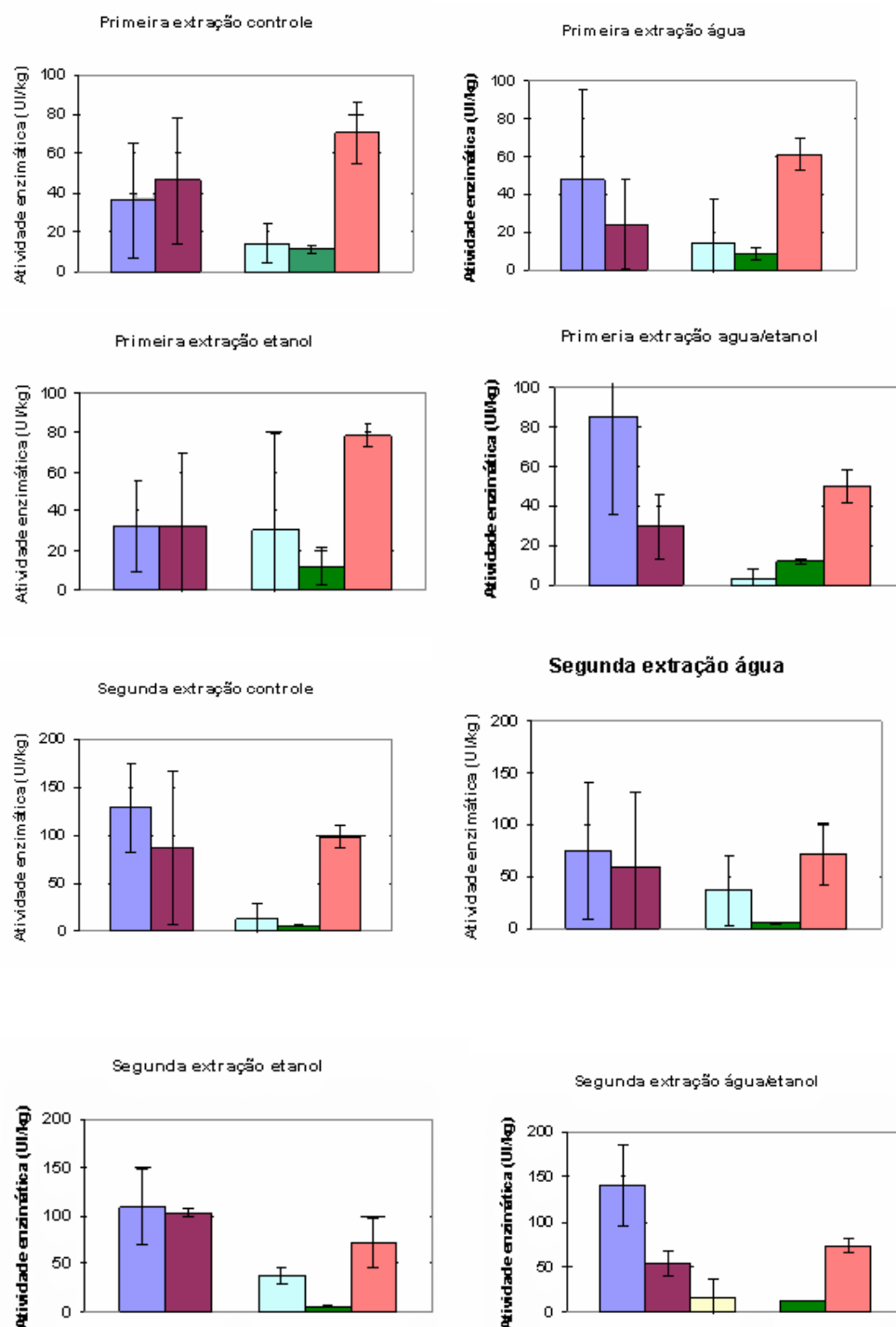


Figura 7. Enzimas recuperadas de cavacos de eucalipto biodegradados por *C. subvermispora*. As enzimas foram obtidas de cavacos controle e extraídos com água, etanol e pela sequência de extração com etanol e água. ■ xilanase, ■ mananase, ■ exoglucanase, ■ endoglucanase, ■ β -xilosidase, ■ β -glicosidase

Os autores mostraram que em pH 3,5 a xilanase possui baixa estabilidade, reduzindo sua atividade em 70% após um período de 6 horas neste pH. Nestas mesmas condições β -glicosidase, β -xilosidase, e endoglucanase, também tiveram suas atividades reduzidas.

A xilanase e a mananase, mesmo sendo produzidas em baixas atividades, foram mais expressivas na segunda extração e tal fato pode ser atribuído à adsorção das enzimas ao cavaco, o que dificulta a extração.

C. subvermispora produziu baixas atividades de endoglucanases e não produziu exoglucanases.. Estudos realizados por Souza-Cruz, (2005) indicaram que as atividades de endoglucanases permaneceram praticamente no mesmo nível desde o 7° até o 28° dia de cultivo para as cepas de *C. subvermispora* CS1 e *P. tremellosa*, no entanto, o *C.subvermispora* SS3 apresentou aos 28 dias de cultivo em *E. grandis* um decréscimo acentuado nos níveis de endoglucanase quando comparado ao 7° dia. No cultivo de 40 dias foram observados baixíssimos níveis de endoglucanase, entre 2,8 e 48,21 UI/kg para a primeira extração e entre 0 e 33,61 UI/kg na segunda extração, concordando com os resultados obtidos por Souza-Cruz (2005). No cultivo em madeira extraída com água e etanol, uma pequena atividade de exoglucanase foi detectada na segunda extração.

A β -xilosidade na primeira extração apresentou no controle e nas madeiras pré-tratadas atividades praticamente constantes em torno de 10 UI/kg e com pequenos desvios. Na segunda extração os valores foram ainda menos expressivos.

Com relação as MnPs, observa-se que suas atividades apresentaram o mesmo perfil em ambas extrações (Figura 8). As atividades de MnP foram semelhantes nos extratos de cultivo de *C. subvermispora* cultivado em cavacos não tratados e tratados com água, entretanto obteve-se maiores valores de atividade na segunda extração (1700 UI/kg de madeira) do que na primeira extração (1000 UI/kg de madeira).

Nos cavacos tratados com etanol e água/etanol as atividades foram semelhantes nas duas extrações e superiores às obtidas com os cavacos controle e tratados com água. Na primeira extração obteve-se 2300 e 2000 UI/kg de MnP, enquanto na segunda extração as atividades foram 2200 e 2000 UI/kg, respectivamente.

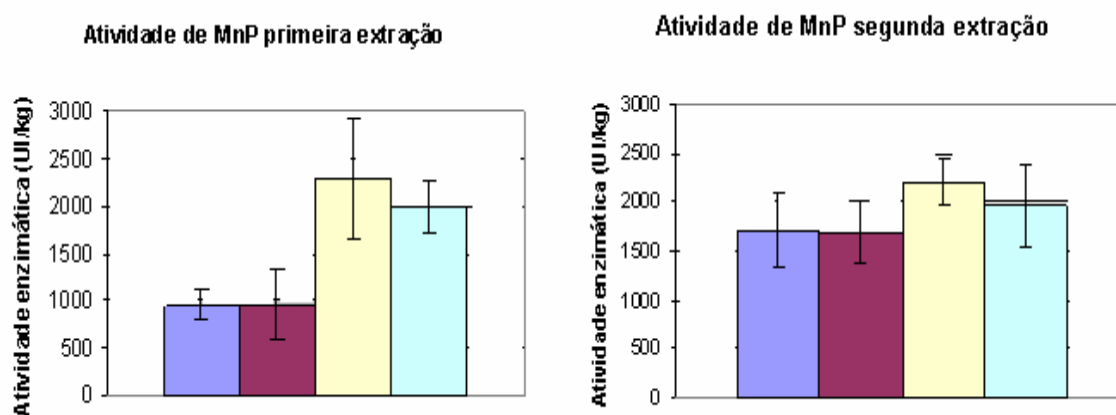


Figura 8. Análise de manganês-peroxidase recuperadas de cavacos de eucalipto, original e extraídos, biodegradados por *C. subvermispora*. ■ cavaco de eucalipto não tratado ■ cavaco de eucalipto pré-tratado em água ■ cavaco de eucalipto pré-tratado com etanol ■ cavaco de eucalipto pré-tratado com água/etanol

Diferentemente da redução de atividade observada para as enzimas hidrolíticas, a MnP permaneceu com alta atividade após 40 dias de cultivo. Esta observação é apoiada nos resultados de Masarim (2005) em cultivos com madeira autoclavada e inoculada com 3000 mg de micélio/kg de madeira onde observou-se elevadas atividades de MnP, atingindo em 28 dias 1300 UI/kg de madeira.

Cultivos realizados em *P. taeda* com carga de inóculo de 100 mg de micélio/kg de madeira apresentaram atividades de MnP de 170 U/Kg em cultivos em madeira não extraída e 183 U/Kg em madeiras extraída com etanol (AGUIAR, 2004). Este resultado indicou que a atividade de MnP é dependente da carga de inóculo e também do pré-tratamento da madeira. O uso da eucalipto extraído com etanol (Figura 8) favoreceu a produção de MnP por *C. subvermispora*, corroborando os resultados de Aguiar (2004).

4.2 ANÁLISE DOS EXTRATIVOS E DERIVADOS DA LIGNINA PRESENTES NOS EXTRATOS DE EUCALIPTO

Os diferentes extratos enzimáticos foram caracterizados com relação à absorvância em 280 nm, tomando-se estes dados como indicativos da concentração de compostos aromáticos oriundos da lignina e dos extrativos da madeira. Após 40 dias de incubação, foram realizadas duas extrações dos cavacos de *E. grandis* biodegradados por *C. subvermispora* com a solução contendo tampão acetato pH 4,8 e 0,01% de tween 60. Simultaneamente cavacos sem inocular foram extraídos e analisados. Os cavacos que foram

previamente extraídos com água ou etanol apresentaram menor absorbância a 280 nm após a extração com tampão e o surfactante (tween 60) (Figura 9a e Figura 9b). Os cavacos tratados com a combinação etanol/água produziram extratos com baixa absorção a 280 nm, cerca de 20% em relação ao controle.

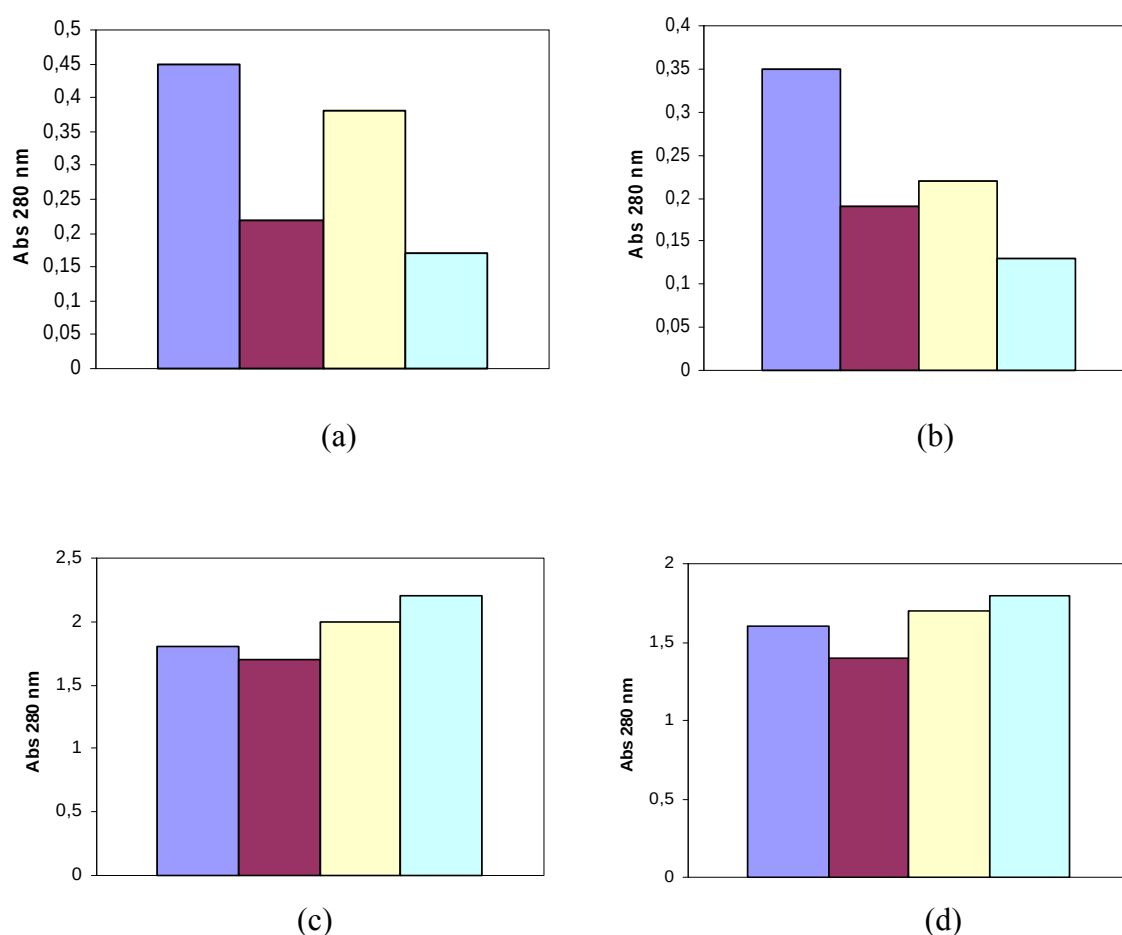


Figura 9. Absorbância, a 280 (diluição 1:25) dos extratos obtidos de cavacos de eucalipto após extração em tampão acetato de sódio pH 4,8. (a) e (b) primeira e segunda extração dos cavacos não inoculados, (c) e (d) primeira e segunda extração dos cavacos biodegradados, respectivamente.

■ cavaco de eucalipto não tratado ■ cavaco de eucalipto pré-tratado em água ■ cavaco de eucalipto pré-tratado com etanol ■ cavaco de eucalipto pré-tratado com água/etanol

As absorbâncias dos extratos dos cavacos biodegradados por *C. subvermispora* foram muito altas e semelhantes entre si (Figura 9c e Figura 9d). Esse resultado é um indicativo de que a maior parte da cor presente nos extratos de fungos cultivados em madeira é produto da biodegradação da parede celular e não de substâncias facilmente extraíveis da madeira ou de proteínas produzidas pelo fungo. Tais extratos são difíceis de serem utilizados para análises de proteínas e mesmo de algumas atividades enzimáticas devido à interferência dos compostos aromáticos em muitas análises.

4.3 UTILIZAÇÃO DE CARVÃO ATIVADO NOS EXTRATOS ENZIMÁTICOS COMO AUXILIAR NA REMOÇÃO DE EXTRATIVOS E DERIVADOS DE LIGNINA.

Um número diferente de métodos já foram estudados para a remoção das substâncias provenientes da madeira e que conferem uma cor marrom ao extrato enzimático. A extração de proteínas com ácido tricloro acético (TCA), fenol e mesmo a remoção prévia dos extrativos da madeira em água foram técnicas empregadas com o objetivo de se obter preparações protéicas mais limpas e com menos contaminantes. A extração de cavacos de carvalho em água mostrou-se bastante eficiente para remoção de compostos aromáticos (ABBAS et al., 2005), o que também foi verificado para cavacos de eucalipto neste trabalho, através da redução da absorbância dos extratos no comprimento de onda de 280 nm. A extração dos cavacos de eucalipto em etanol produziu extratos mais claros que o controle, porém mais escuros que a combinação de extração em etanol e água. Este último tratamento foi o mais eficiente para a redução de cor dos cavacos de eucalipto (Figura 9a e Figura 9b). Entretanto, ficou claro que mesmo sendo inoculados cavacos de madeira submetidos a diferentes tratamentos, após o cultivo do fungo o efeito de remoção de absorbância não foi relevante. Como os extratos ainda permaneceram muito escuros foram estudadas condições para a remoção desses compostos aromáticos ainda presentes nos extratos enzimáticos empregando o carvão ativado como agente adsorvente.

4.3.1 TRATAMENTO DOS EXTRATOS

Os efeitos da concentração de carvão ativado, tempo de adsorção e pH foram avaliados no tratamento dos extratos enzimáticos obtidos pela degradação dos cavacos de *E. gradis* controle e pré-tratados, utilizando a metodologia de superfície de resposta (Tabela 1).

A recuperação das enzimas e a redução de absorbância a 280 nm foram calculadas comparando as atividades e as absorbâncias presentes nos extratos originais, com aquelas dos extratos após o tratamento com carvão ativado.

Os resultados obtidos para cada extrato foram avaliados em relação à recuperação da β -glicosidase (β -gli), que apesar de apresentar baixos valores de atividade enzimática esteve presente em todos os extratos estudados e de manganês peroxidase (MnP). Os resultados também foram analisados em relação à redução de absorbância a 280 nm (Red. Abs-280) para verificar a adsorção de compostos aromáticos pelo carvão ativado.

4.3.2 AVALIAÇÃO DOS RESULTADOS OBTIDOS A PARTIR DO EXTRATO PRODUZIDO PELO CULTIVO DO FUNGO EM MADEIRA CONTROLE

Os extratos enzimáticos foram tratados com carvão ativado de acordo com o planejamento proposto (Tabela 1) e os resultados do planejamento foram avaliados, para as três respostas obtidas, na forma de análise de variância (ANOVA), a qual é utilizada para verificar a significância e a adequação do modelo.

Na tabela 3 estão apresentadas as respostas das porcentagens de recuperação de atividade de β -glicosidase (β -gli) e manganês peroxidase (MnP), e a porcentagem de redução de absorbância a 280nm. O ensaio realizado no nível baixo para porcentagem de carvão (A) e pH (C) e o nível alto para o tempo de adsorção (B) (ensaio 3) gerou a maior resposta para a atividade de β -glicosidase (103,2%), no entanto este ponto apresentou uma baixa porcentagem de remoção de compostos que absorvem a 280 nm (62,99%), em razão da baixa concentração de carvão ativado utilizada.

No ensaio 7, foi obtida uma alta porcentagem de redução da absorbância, no entanto, nestas condições foi observada baixa atividade de β -glicosidase (14,63%).

A máxima recuperação de MnP (98,81%) foi observada empregando-se o nível médio para as variáveis carvão e pH e o nível mínimo para o tempo de adsorção (ensaio 11). Neste ensaio também foi observada alta redução de absorbância a 280 nm (88,97%).

Tabela 3 - Matriz para as atividades de β -gli e MnP e para a redução de abs-280, apresentando os níveis reais e codificados de um planejamento de compósito central com face centrada com três replicatas no ponto central.

Ensaio (N°)	Variáveis independentes reais			Variáveis independentes codificadas			Respostas		
	Carvão (%)	Tempo (min)	pH	A	B	C	% β -gli	% MnP	% Red abs-280
1	1	10	3,0	-1	-1	-1	90,89	66,12	51,69
2	1	10	5,0	-1	-1	1	73,47	72,05	38,27
3	1	50	3,0	-1	1	-1	103,2	22,54	62,99
4	1	50	5,0	-1	1	1	54,12	69,54	46,33
5	9	10	3,0	1	-1	-1	43,35	26,95	95,57
6	9	10	5,0	1	-1	1	20,44	60,91	90,01
7	9	50	3,0	1	1	-1	14,63	0	96,68
8	9	50	5,0	1	1	1	12,74	45,86	94,52
9	1	30	4,0	-1	0	0	79,82	92,86	46,26
10	9	30	4,0	1	0	0	39,11	66,33	94,66
11	5	10	4,0	0	-1	0	60,72	98,81	88,97

4.3.2.1 ANÁLISE DOS EFEITOS DA CONCENTRAÇÃO DE CARVÃO, TEMPO DE ADSORÇÃO E pH NO TRATAMENTO DO EXTRATO DA MADEIRA CONTROLE.

A estimativa dos efeitos foram representados na forma de gráficos de pareto e encontram-se na Figura 10. As variáveis, que mais influenciaram a atividade de β -glicosidase foram o pH quadrático (-7,09), carvão (-20,45) e pH (-5,39) ambos lineares. O carvão foi a variável que apresentou maior influência na redução da atividade de β -glicosidase ao nível de 95% de probabilidade seguido do pH quadrático (C^2) e linear (C). Todos os fatores influenciaram de forma negativa, portanto quanto menos carvão for adicionado ao tratamento em um menor pH, maior será a resposta para a β -glicosidase

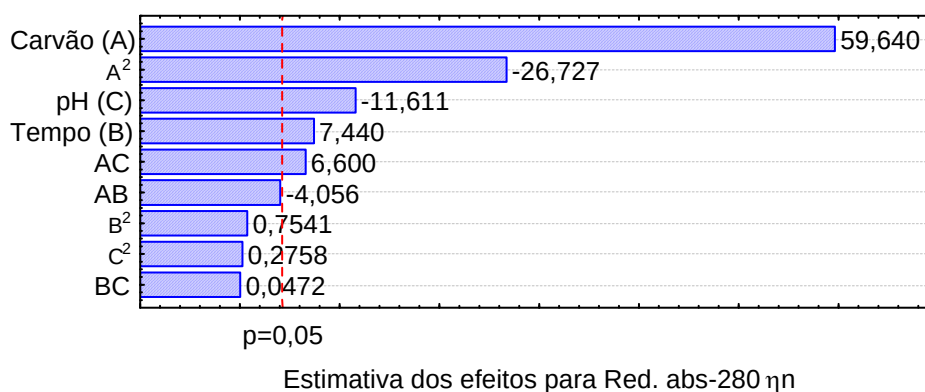
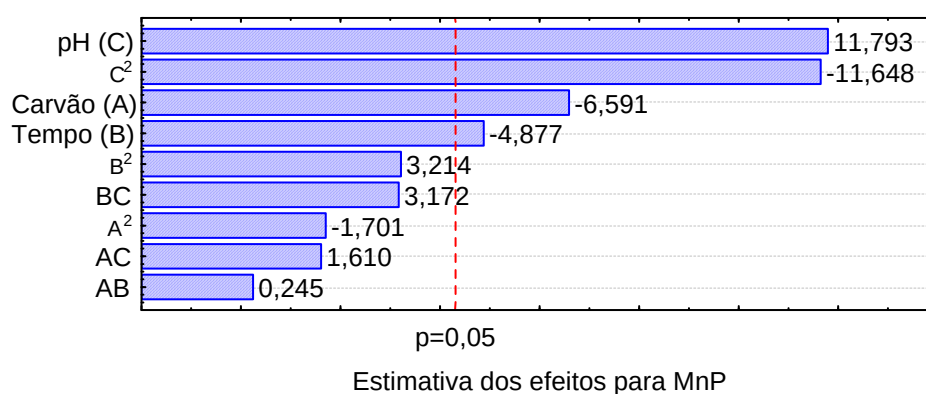
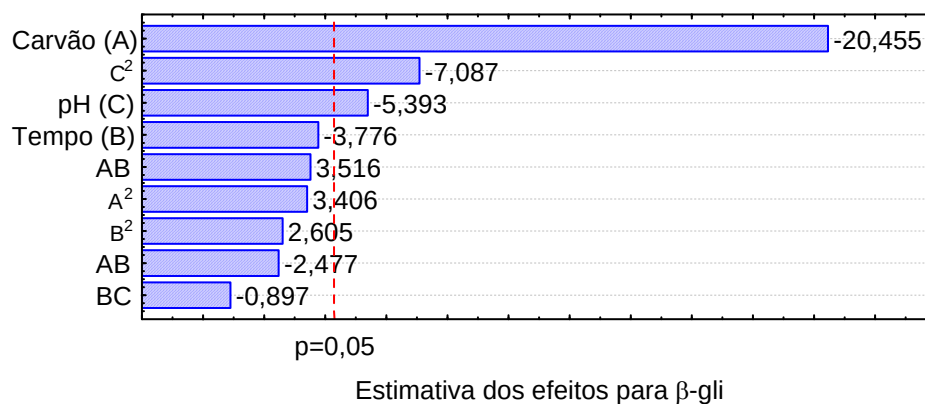


Figura 10. Gráficos de pareto para as respostas % β -glicosidase, MnP e redução de absorvância a 280 nm para o extrato controle.

A resposta MnP apresentou como efeitos mais influentes o pH linear (+11,79) e quadrático (-11,64) seguido do carvão linear (-6,59) e tempo linear (- 4,87). O efeito principal do pH (C) apresentou sinal positivo, ao nível de 95% de confiança, sugerindo que a utilização do nível superior desta variável no tratamento do extrato, favorece a atividade de manganês peroxidase, no entanto a interação do pH (C^2) apresentou sinal negativo que implica em dizer que a recuperação de MnP aumenta com o aumento do pH até um máximo e um aumento do pH levará a diminuição da resposta.

Os fatores carvão e temperatura apresentaram efeitos principais negativos, mostrando que a redução dos seus níveis levou a uma maior atividade de manganês peroxidase.

A redução dos valores de absorbância foi influenciada pelos fatores carvão linear (+59,63), carvão quadrático (-26,72), pH linear (-11,61) e tempo linear (+7,44). Da mesma forma que para a resposta de MnP, o aumento da concentração de carvão favorece a remoção até uma certa região do planejamento, após esse ponto a adição de carvão não implicará no mesmo aumento anteriormente observado. O fator pH (C) apresentou efeito principal negativo e o fator tempo (B) efeito positivo, portanto quanto menor o pH e maior o tempo de adsorção maior será a redução da $A_{280\text{ nm}}$.

4.3.2.1.1 ANÁLISE DA RESPOSTA RECUPERAÇÃO DE ATIVIDADE DE β -GLICOSIDASE PARA O EXTRATO CONTROLE.

A análise de variância obtida para a resposta % β -gli (Tabela 4) mostra que o carvão foi o fator mais significativo a um nível de 99% de confiança, seguido do fator carvão quadrático (C^2) que apresentou significância ao nível de 90 % de confiança. O coeficiente de determinação (R^2) para o modelo é de 0,876. Avaliando a variância do modelo quadrático com erro puro (Tabela 4), verifica-se que não houve falta de ajuste significativo ao nível de 95% de confiança ($p=0,0648$), ou seja, a diferença entre os valores obtidos experimentalmente e os valores previstos pela equação do modelo, pode ser explicada somente pelo erro experimental.

Tabela 4 - Análise de variância com erro puro para a resposta % de atividade de β -glicosidase.

Modelo/Efeitos	GL	SQ	MQ	F_{CALC}	p
Modelo	9	9374,75	1041,64	5,48	0,0177
Carvão (A)	1	7356,57	7356,57	38,73	0,0004***
Tempo(B)	1	250,70	250,70	1,32	0,2883
pH(C)	1	511,37	511,37	2,69	0,1448
A²	1	203,93	203,93	1,07	0,3346
B²	1	119,36	119,36	0,63	0,4540
C²	1	883,14	883,14	4,65	0,0680*
AB	1	107,90	107,90	0,57	0,4756
AC	1	217,36	217,36	1,14	0,3202
BC	1	14,15	14,15	0,075	0,7928
Residual	7	1329,54	189,93		
Falta de ajuste	5	1294,38	258,88	14,72	0,0648
Erro puro	2	35,17	17,58		
Total	16	10704,26			

(F_{1%} = 12,25 F_{5%} = 5,59 F_{10%} = 3,59 F_{5% (Falta de Ajuste)} = 19,30)

R² = 0,876; SQ: soma dos quadrados; GL: graus de liberdade; MS: média dos quadrados

Para tornar o modelo mais simples os fatores quadráticos que não apresentaram significância a 90% de confiança foram retirados do modelo, as interações que também não apresentaram significância foram mantidas.

Realizando uma nova análise de variância (Tabela 5), foi observada uma diminuição no coeficiente de determinação (R² = 0,831). O efeito carvão quadrático deixou de influenciar o modelo a 90% de confiança e os demais efeitos não apresentaram grandes mudanças nas suas significâncias, no entanto foi observado um aumento na significância estatística do modelo (p=0,0068). De acordo com os resultados gerados pelo programa DESIGN EXPERT a exclusão das interações provoca um decréscimo no coeficiente de determinação (R²) da análise, diminuindo a confiabilidade das respostas obtidas para o modelo ajustado.

A validade do modelo foi verificada pela análise de regressão múltipla (Tabela 5). Através do teste F, ou seja, comparando o valor de F do modelo (6,30) com o F tabelado para 99% de confiança (5,61), observou-se que o modelo matemático é significativo (p=0,0068) e consegue explicar 83,1% da variação total em torno da média (sendo os outros 2,9% de variação explicados pelos resíduos)

Tabela 5 - Análise de variância com erro puro para % de atividade de β -glicosidase, eliminando fatores não significativos.

Modelo/Efeitos	GL	SQ	MQ	F_{CALC}	p
Modelo	7	8889,49	1269,93	6,30	0,0068
Carvão (A)	1	7356,57	7356,57	36,48	0,0002***
Tempo(B)	1	250,70	250,70	1,24	0,2937
pH(C)	1	511,37	511,37	2,54	0,1457
C²	1	431,44	431,44	2,14	0,1776
AB	1	107,90	107,90	0,54	0,4831
AC	1	217,36	217,36	1,08	0,3262
BC	1	14,15	14,15	0,070	0,7970
Residual	9	1814,77	201,64		
Falta de ajuste	7	1779,60	254,23	14,46	0,0662
Erro puro	2	35,17	17,58		
Total	16	10704,26			

(F_{1%} = 10,56 F_{5%} = 5,12 F_{10%} = 3,46 F_{1%(Modelo)} = 5,61)

R² = 0,831; SQ: soma dos quadrados; GL: graus de liberdade; MS: média dos quadrados

Desta forma o modelo quadrático pode ser considerado como o que melhor se ajusta ao modelo para explicar as variações do fator porcentagem de atividade de β -glicosidase, na região estudada, podendo ser representado pela equação:

$$\% \beta\text{-gl i} = 58,04 - 27,12.A - 5,01.B - 7,15.C - 10,24.C^2 - 3,67.A.B + 5,21.A.C - 1,33.B.C$$

A Figura 11 representa o modelo tridimensional da superfície de resposta e seu contorno construída em função da equação proposta pelo modelo para a atividade de β -glicosidase. A variável tempo foi fixada em seu valor mínimo por ser a menos significativa para o modelo. Verifica-se a dependência da resposta em função das variáveis concentração de carvão e pH, sendo que o máximo valor previsto para a atividade de β -glicosidase encontra-se na região de pH entre os níveis médio e mínimo e próximo ao nível mínimo de carvão.

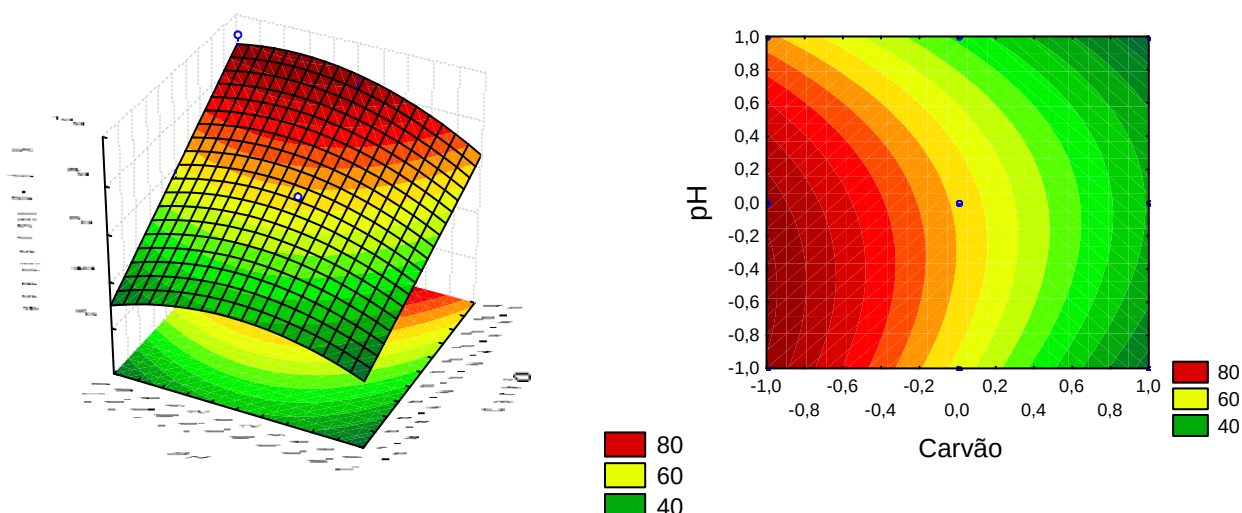


Figura 11. Superfície de resposta e seu contorno para o modelo quadrático, representando o efeito da concentração de carvão e do pH na % de atividade β -glicosidase.

4.3.2.1.2 ANÁLISE DA RESPOSTA RECUPERAÇÃO DE ATIVIDADE DE MANGANÊS PEROXIDASE PARA O EXTRATO CONTROLE

A análise de variância obtida para a resposta % MnP (Tabela 6) mostra que o pH e sua interação quadrática foram os fatores mais significativos a um nível de 99% de confiança. O coeficiente de determinação (R^2) para o modelo é de 0,90.

Tabela 6 - Análise de variância com erro puro para a resposta % de atividade de manganês peroxidase.

<i>Modelo/Efeitos</i>	<i>GL</i>	<i>SQ</i>	<i>MQ</i>	<i>F_{CALC.}</i>	<i>p</i>
Modelo	9	14340,46	1593,38	6,96	0,0090
Carvão (A)	1	1514,38	1514,38	6,61	0,0369**
Tempo(B)	1	829,19	829,19	3,62	0,0988*
pH(C)	1	4847,92	4847,92	21,17	0,0025***
A²	1	100,91	100,91	0,44	0,5280
B²	1	360,07	360,07	1,57	0,2501
C²	1	4730,06	4730,06	20,66	0,0027***
AB	1	2,09	2,09	9,133E-3	0,9265
AC	1	90,38	90,38	0,39	0,5498
BC	1	350,73	350,73	1,53	0,2557
Residual	7	1602,73	228,96		
Falta de ajuste	5	1533,01	306,60	8,80	0,1052
Erro puro	2	69,72	34,86		
Total	16	15943,18			

($F_{1\%} = 12,25$ $F_{5\%} = 5,59$ $F_{10\%} = 3,59$ $F_{5\%}(\text{Falta de Ajuste}) = 19,30$)

$R^2 = 0,90$; SQ: soma dos quadrados; GL: graus de liberdade; MS: média dos quadrados.

Alguns dos efeitos que não apresentaram significância ao nível de 90% foram mantidos no modelo. Após eliminação dos fatores menos significativos, e realização de uma nova análise de variância (Tabela 7), observou-se que os efeitos apresentaram pequenas mudanças nas suas significâncias (visto pela diminuição do valor de p) assim como o modelo ($p=0,0003$)

Tabela 7 - Análise de variância com erro puro para % de atividade de manganês peroxidase, eliminando fatores não significativos.

Modelo/Efeitos	GL	SQ	MQ	F_{CALC}	p
Modelo	6	14147,07	2357,84	13,13	0,0003
Carvão (A)	1	1514,38	1514,38	8,43	0,0157***
Tempo(B)	1	829,19	829,19	4,62	0,0572**
pH(C)	1	4847,92	4847,92	26,99	0,0004***
B²	1	273,82	273,82	1,52	0,2452
C²	1	5890,40	5890,40	32,80	0,0002***
BC	1	350,73	350,73	1,95	0,1925
Residual	10	1796,12	179,61		
Falta de ajuste	8	1726,40	215,80	6,19	0,1465
Erro puro	2	69,72	34,86		
Total	16	15943,18			

(F1% = 10,04 F5% = 4,96 F10% = 3,29 F_{1%(Modelo)} = 5,39)

R² = 0,90; SQ: soma dos quadrados; GL: graus de liberdade; MS: média dos quadrados

A validade do modelo foi verificada pela análise de regressão múltipla (Tabela 7). Através do teste F, comparando o valor de F do modelo (13,13) com o F tabelado para 99% de confiança (5,39), observou-se que o modelo matemático é significativo ($p=0,0003$) e consegue explicar 90% da variação total em torno da média (sendo os outros 10% de variação explicados pelos resíduos).

Com base nos dados obtidos, o modelo quadrático proposto para descrever o comportamento da resposta de % de atividade de manganês peroxidase, na região estudada, foi expresso por:

$$\% \text{ MnP} = 81,63 - 12,31.A - 9,11.B + 22,02.C + 9,51.B^2 - 44,10.C^2 + 6,62.B.C$$

Através da equação proposta pelo modelo, foi construída a representação tridimensional da superfície de resposta para a %MnP. em função da concentração de carvão e pH que foram os efeitos mais significativos. O tempo foi fixado no nível baixo (10 minutos)

por ser o efeito que apresentou menor valor significativo de acordo com a análise de variância.

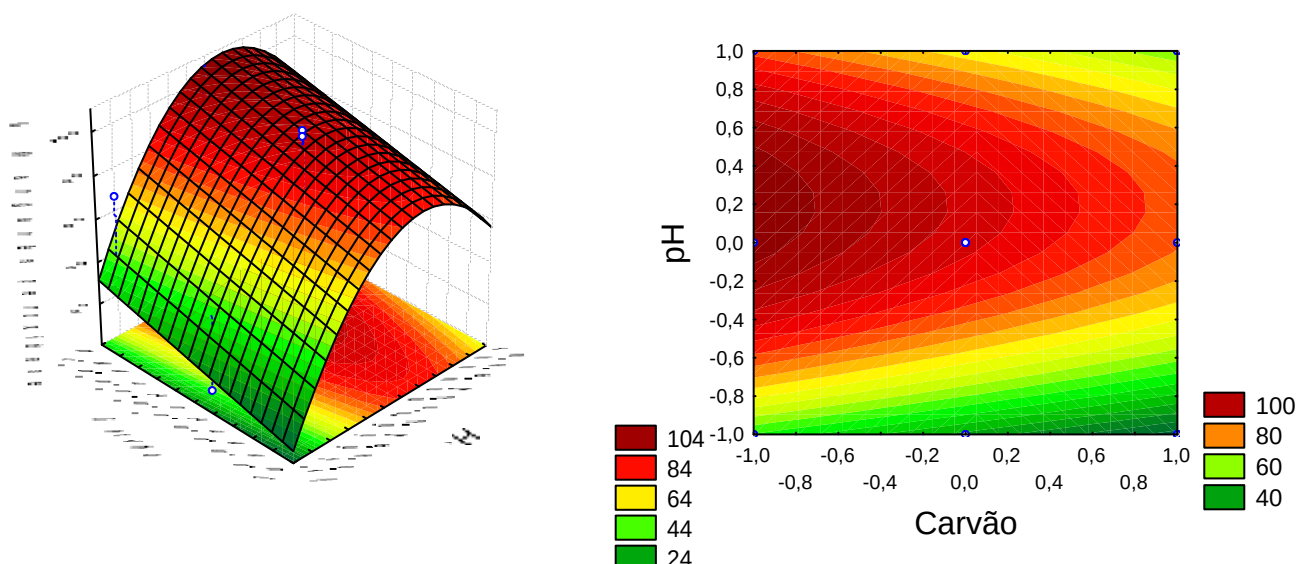


Figura 12. Superfície de resposta e seu contorno para o modelo quadrático, representando o efeito da concentração de carvão e do pH na % de atividade de manganês peroxidase.

A Figura 12 mostra a dependência da resposta em função das variáveis concentração de carvão e pH, sendo que o máximo valor previsto para a redução de absorbância a 280 nm encontra-se na região próxima ao nível médio de pH e ao ao nível mínimo de carvão, diminuindo com o aumento da concentração de carvão ativado.

4.3.2.1.3 ANÁLISE DA RESPOSTA REDUÇÃO DE ABSORBÂNCIA A 280 nm PARA O EXTRATO CONTROLE

A análise de variância obtida para a resposta redução de absorbância a 280 nm (Tabela 8), mostra que o fator tempo quadrático (B^2), pH quadrático (C^2) e a interação entre tempo e pH não apresentaram significância ao nível de 90% de confiança e a interação carvão e tempo (AB) apresentou apenas em 90%. Os demais fatores foram significativos ao nível de 99% de confiança sendo que o efeito principal do carvão foi o mais significativo ($p < 0,0001$) com um coeficiente de determinação (R^2) para o modelo de 0,996.

Tabela 8 - Análise de variância com erro puro para a resposta % redução de absorvância a 280 nm.

Modelo/Efeitos	GL	SQ	MQ	F_{CALC}	P
Modelo	9	6976.57	775.17	196.46	< 0.0001
Carvão (A)	1	5103.08	5103.08	1293.35	< 0.0001***
Tempo(B)	1	79.41	79.41	20.13	0.0028***
pH(C)	1	193.42	193.42	49.02	0.0002***
A²	1	1024.87	1024.87	259.75	< 0.0001***
B²	1	0.82	0.82	0.21	0.6631
C²	1	0.11	0.11	0.028	0.8726
AB	1	23.60	23.60	5.98	0.0444**
AC	1	62.50	62.50	15.84	0.0053***
BC	1	3.200E-3	3.200E-3	8.110E-4	0.9781
Residual	7	27.62	3.95		
Falta de ajuste	5	24.75	4.95	3.45	0.2398
Erro puro	2	2.87	1.43		
Total	16	7004.19			

(F_{1%} = 12,25 F_{5%} = 5,59 F_{10%} = 3,59 F_{5% (Falta de Ajuste)} = 19,30)

R² = 0,996; SQ: soma dos quadrados; GL: graus de liberdade; MS: média dos quadrados.

Os efeitos que não apresentaram significância estatística ao nível de 90% de confiança foram retirados do modelo para torná-lo mais simples e uma nova análise de variância foi realizada (tabela 9), a significância dos efeitos mantidos aumentaram significativamente, como pode ser visto pela diminuição dos valores de p e o coeficiente de determinação permaneceu inalterado.

Tabela 9 - Análise de variância com erro puro para % redução de absorvância a 280 nm, eliminado fatores não significativos

Modelo/Efeitos	GL	SQ	MQ	F_{CALC}	P
Modelo	6	6975,29	1162,55	402,30	< 0,0001
Carvão (A)	1	5103,08	5103,08	1765,94	< 0,0001***
Tempo(B)	1	79,41	79,41	27,48	0,0004***
pH(C)	1	193,42	193,42	66,93	< 0,0001***
A²	1	1513, 28	1513, 28	523,67	< 0,0001***
AB	1	23,60	23,60	8,17	0,0170**
AC	1	62,50	62,50	21,63	0,0009***
Residual	10	28,90	2,89		
Falta de ajuste	8	26,03	3,25	2,27	0.3418
Erro puro	2	2,87	1,43		
Total	16	7004,19			

(F_{1%} = 10,04 F_{5%} = 4,96 F_{10%} = 3,29 F_{1%(Modelo)} = 5,39)

R² = 0,996; SQ: soma dos quadrados; GL: graus de liberdade; MS: média dos quadrados

A validade do modelo foi verificada pela análise de regressão múltipla (Tabela 9). Através do teste F, comparando o valor de F do modelo (402,30) com o F tabelado para 99% de confiança (5,39), observou-se que o modelo matemático é altamente significativo ($p < 0,0001$) e consegue explicar 99,6% da variação total em torno da média (sendo os outros 0,4% de variação explicados pelos resíduos)

Com base nos dados obtidos, o modelo quadrático proposto para descrever o comportamento da resposta de % Redução da Abs, na região estudada, foi expresso por:

$$\% \text{Red. abs-280} = 90,87 + 22,59.A + 2,82.B - 4,40.C - 19,17.A^2 - 1,72.A.B + 2,80.A.C$$

Através da equação proposta pelo modelo, foi construída a representação tridimensional da superfície de resposta para a %Red abs-280. em função da concentração de carvão e pH que foram os efeitos mais significativos. O tempo foi fixado no nível baixo (10 minutos) por ser o efeito que apresentou menor valor significativo de acordo com a análise de variância.

A Figura 13 mostra a dependência da resposta, em função das variáveis pH e concentração de carvão. O máximo valor previsto para esta resposta (acima de 90%) pode ser obtido com a utilização do nível alto de carvão, sendo o pH pouco influente nessa região.

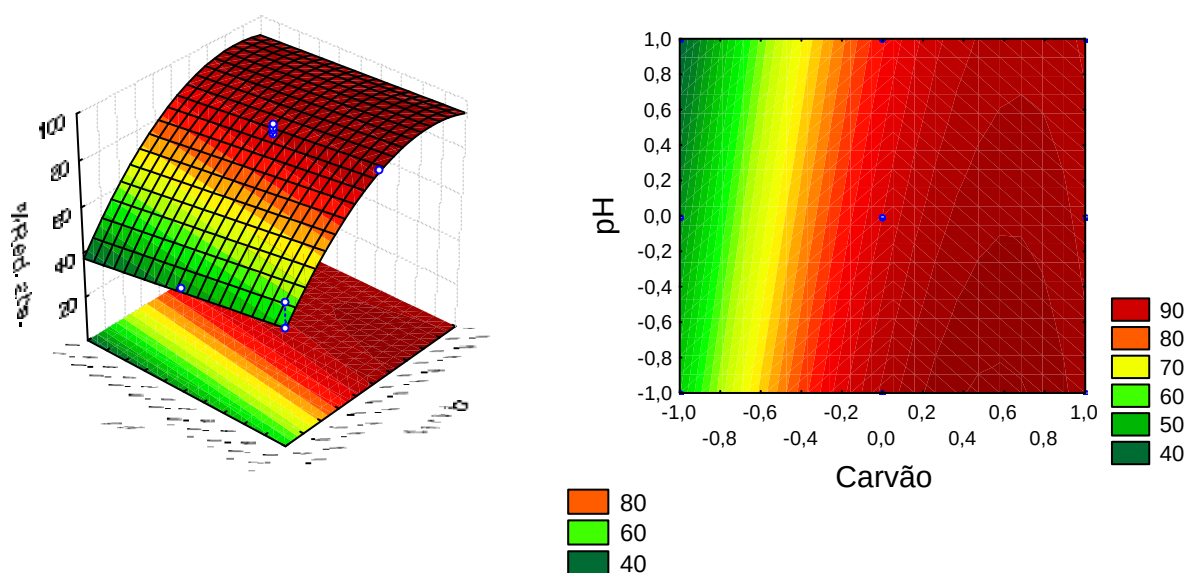


Figura 13. Superfície de resposta e seu contorno para o modelo quadrático, representando o efeito da concentração de carvão e do pH na % redução de absorvância a 280nm.

4.3.3 AVALIAÇÃO DOS RESULTADOS OBTIDOS A PARTIR DO EXTRATO PRODUZIDO PELO CULTIVO DO FUNGO EM MADEIRA EXTRAÍDA COM ETANOL.

Após o tratamento dos cavacos com etanol em soxlet e 40 dias de cultivo o extrato enzimático obtido foi tratado com carvão ativado de acordo com o planejamento proposto e os resultados do planejamento foram avaliados na forma de análise de variância (ANOVA), a qual é utilizada para verificar a significância e a adequação do modelo.

Analizando a tabela com as respostas obtidas para porcentagens de recuperação de atividade de β -glicosidase (β -gli) e manganês peroxidase (MnP), e a porcentagem de redução de absorbância a 280 nm (Tabela 10) pode ser observado que empregando o nível baixo para todas as variáveis independentes (ensaio 1) foi possível obter a maior resposta para a atividade de β -glicosidase (120,91%), no entanto este ponto apresentou uma baixa porcentagem de remoção de compostos que absorvem a 280 nm (40,78%), devido a baixa concentração de carvão ativado utilizada.

Tabela 10 - Matriz para as atividades de β -gli e MnP e para a redução de abs-280, apresentando os níveis reais e codificados de um planejamento de compósito central com face centrada com três replicatas no ponto central.

Ensaio (N°)	Variáveis independentes reais			Variáveis independentes codificadas			Respostas		
	Carvão (%)	Tempo (min)	pH	A	B	C	% β -gli	% MnP	% Red abs-280
1	1	10	3,0	-1	-1	-1	120,91	26,54	40,78
2	1	10	5,0	-1	-1	1	71,55	83,77	28,20
3	1	50	3,0	-1	1	-1	119,99	24,15	53,75
4	1	50	5,0	-1	1	1	64,65	94,23	39,92
5	9	10	3,0	1	-1	-1	42,90	0	95,33
6	9	10	5,0	1	-1	1	40,23	61,88	86,98
7	9	50	3,0	1	1	-1	20,40	0	96,32
8	9	50	5,0	1	1	1	17,35	52,64	93,37
9	1	30	4,0	-1	0	0	90,66	90,85	36,60
10	9	30	4,0	1	0	0	47,96	64,01	92,89
11	5	10	4,0	0	-1	0	70,67	75,70	79,24
12	5	50	4,0	0	1	0	63,20	67,58	86,30
13	5	30	3,0	0	0	-1	67,74	18,02	90,63
14	5	30	5,0	0	0	1	43,16	65,70	79,33
15	5	30	4,0	0	0	0	48,63	75,88	83,78
16	5	30	4,0	0	0	0	63,38	70,96	84,40
17	5	30	4,0	0	0	0	65,84	77,62	83,53

No ensaio 7 foi obtida a maior porcentagem de redução da absorbância (96,32%), no entanto, nestas condições, não foi observada atividade de MnP e baixa atividade de β -glicosidase (20,40%).

A máxima recuperação de atividade de MnP (94,23%) foi observada empregando-se o nível alto para as variáveis tempo e pH e o nível mínimo para o carvão (ensaio 4). Neste ensaio também foi obtido baixo valor de redução de absorbância (39,92%).

4.3.3.1 ANÁLISE DOS EFEITOS DA CONCENTRAÇÃO DE CARVÃO, TEMPO DE ADSORÇÃO E pH NO TRATAMENTO DO EXTRATO PRODUZIDO PELO CULTIVO DO FUNGO EM MADEIRA EXTRAÍDA COM ETANOL.

A estimativa dos efeitos foram representados na forma de gráficos de pareto e encontram-se na Figura 14.

Analizando o gráfico de Pareto para a resposta % β -glicosidase, verifica-se que as variáveis concentração de carvão (-10,16) e pH (-4,58) apresentaram efeito significativo ao nível de 95% de confiança. Os fatores concentração de carvão e pH apresentaram efeitos principais negativos. O carvão linear (A) foi o mais influente seguido do pH também linear (C). Todos os fatores influenciaram de forma negativa, portanto quanto menos carvão for adicionado ao tratamento em um menor pH maior a recuperação de β -glicosidase

A resposta MnP apresentou como efeitos mais influentes o pH linear (+26,50) e quadrático (-15,31) seguido do carvão linear (-12,90). Da mesma forma que na análise da resposta de manganês peroxidase para o extrato controle, o efeito principal do pH (C) apresentou sinal positivo, ao nível de 95% de confiança, sugerindo que a utilização do nível superior desta variável no tratamento, favorece a atividade de manganês peroxidase, no entanto a interação do pH (C²) apresentou sinal negativo que implica em dizer que quanto menor o pH maior será a recuperação de MnP. Portanto o aumento do pH favorecerá o aumento de atividade até certa região, onde a partir de então o seu aumento desfavorecerá o aumento da resposta.

O fator carvão apresentou efeito principal (A) negativo, mostrando que a redução do seu nível implica em maior atividade de manganês peroxidase.

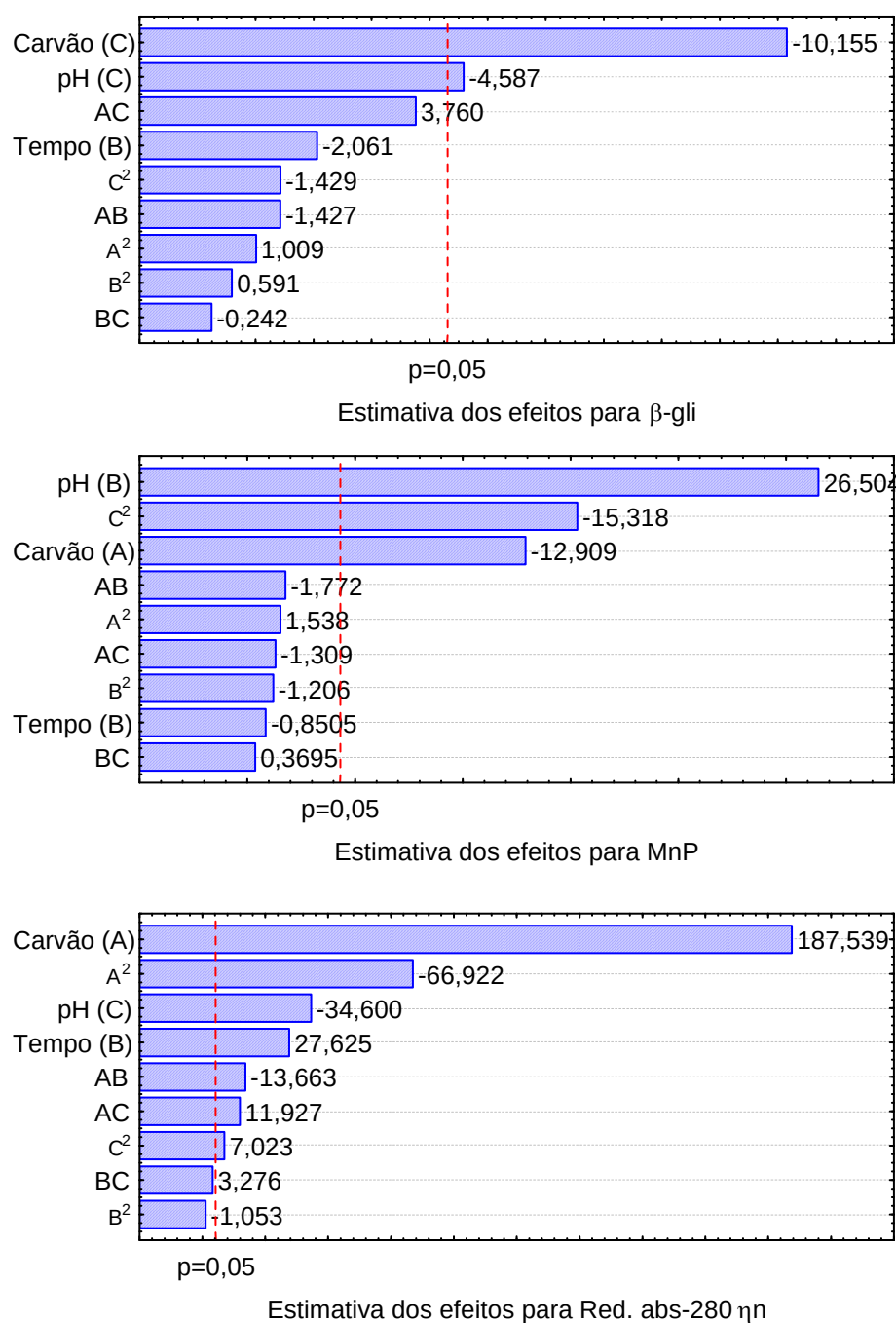


Figura 14. Gráficos de pareto para as respostas % β -glicosidase, MnP e Redução de absorvância a 280 nm para o extrato etanol

A redução da A_{280} nm foi influenciada pelos fatores carvão linear (+187,54), carvão quadrático (-66,92), pH linear (-34,6), tempo linear (+27,63), as interações do carvão com o tempo (-13,66), carvão com pH (+11,93) e pH quadrático (+7,02). O efeito principal do carvão (A) apresentou um alto valor positivo, no entanto a interação entre o carvão (A²), que

possui um menor valor, apresentou sinal negativo. Da mesma forma que para a resposta MnP, o aumento da concentração de carvão favorece a redução da A_{280} nm até uma certa região do planejamento. O fator pH (C) apresentou efeito principal negativo e o fator tempo efeito positivo, portanto quanto menor o pH e maior o tempo de adsorção maior será o aumento da remoção de cor. Nota-se ainda que a interação entre o carvão e o tempo e carvão e pH apresentaram efeitos significativos ao nível de 95% de confiança.

4.3.3.1.1 ANÁLISE DA RESPOSTA RECUPERAÇÃO DE ATIVIDADE DE β -GLICOSIDASE PARA O EXTRATO PRODUZIDO PELO CULTIVO DO FUNGO EM MADEIRA EXTRAÍDA COM ETANOL.

A análise de variância obtida para a resposta % β -gli (Tabela 11) mostra que o carvão, o pH e a interação entre eles são os fatores mais significativos a um nível de 99% de confiança, seguido do tempo que apresenta significância a um nível de 95% de confiança. O coeficiente de determinação (R^2) para o modelo é de 0,97.

Tabela 11 - Análise de variância com erro puro para a resposta % de atividade de β -glicosidase.

Modelo/Efeitos	GL	SQ	MQ	F_{CALC}	p
Modelo	9	12754,33	1417,15	23,80	0,0002
Carvão (A)	1	8935,08	8935,32	150,04	<0,0001***
Tempo(B)	1	368,08	368,08	6,18	0,0418**
pH(C)	1	1822,50	1822,50	30,60	0,0009***
A^2	1	88,14	88,14	1,48	0,2632
B^2	1	30,26	30,26	0,51	0,4990
C^2	1	176,84	176,84	2,97	0,1285
AB	1	176,34	176,34	2,96	0,1290
AC	1	1224,63	1224,63	20,56	0,0027***
BC	1	5,06	5,06	0,085	0,7792
Residual	7	416,88	59,55		
Falta de ajuste	5	243,61	48,72	0,56	0,7390
Erro puro	2	173,27	86,63		
Total	16	13171,20			

($F_{1\%} = 12,25$ $F_{5\%} = 5,59$ $F_{10\%} = 3,59$ $F_{5\%}(\text{Falta de Ajuste}) = 19,30$)

$R^2 = 0,97$; SQ: soma dos quadrados; GL: graus de liberdade; MS: média dos quadrados

Os efeitos A^2 , B^2 , C^2 e BC que não apresentaram efeito significativo a 90% de confiança foram removidos do modelo, no entanto a interação AB que também não apresentou significância a 90% de confiança foi mantida no modelo. Realizando uma nova

análise de variância (Tabela 12), o coeficiente de determinação apresentou o valor de 0,95. Os efeitos apresentaram pequenas melhoras nas suas significâncias (demostrada pela diminuição do valor de p) e foi observado um grande aumento na significância estatística do modelo ($p < 0,0001$).

Tabela 12 - Análise de variância com erro puro para % de atividade de β -glicosidase, eliminando fatores não significativos.

Modelo/Efeitos	GL	SQ	MQ	F_{CALC}	p
Modelo	5	12526,88	2505,38	42,77	<0,0001
Carvão (A)	1	8935,32	8935,32	152,54	<0,0001***
Tempo(B)	1	368,08	368,08	6,28	0,0292**
pH(C)	1	1822,50	1822,50	31,11	0,0002***
AB	1	176,34	176,34	3,01	0,1106
AC	1	1224,63	1224,63	20,91	0,0008***
Residual	11	644,33	58,58		
Falta de ajuste	9	471,06	52,34	0,60	0,7557
Erro puro	2	173,27	86,63		
Total	16	13171,20			

($F_{1\%} = 9,65$ $F_{5\%} = 4,84$ $F_{10\%} = 3,23$ $F_{1\%(\text{Modelo})} = 5,32$)

$R^2 = 0,95$; SQ: soma dos quadrados; GL: graus de liberdade; MS: média dos quadrados

A validade do modelo foi verificada pela análise de regressão múltipla (Tabela 12). Através do teste F, ou seja, comparando o valor de F do modelo (42,77) com o F tabelado para 99% de confiança (5,32), observou-se que o modelo matemático é altamente significativo ($p < 0,0001$) e consegue explicar 95% da variação total em torno da média (sendo os outros 5% de variação explicados pelos resíduos).

Desta forma, ao retirar todos os fatores quadráticos, nota-se que o modelo linear foi suficiente para explicar as variações do fator porcentagem de atividade de β -glicosidase, na região estudada, podendo ser representado pela equação abaixo.

$$\% \beta\text{-gli} = 62,31 - 29,89.A - 6,07.B - 13,50.C - 4,70.A.B + 12,37.A.C$$

A Figura 13 representa o modelo tridimensional da superfície de resposta e seu contorno construída em função da equação proposta pelo modelo para a % de atividade de β -glicosidase. A variável tempo foi fixada em seu valor mínimo por ser a menos significativa para o modelo.

A Figura 15 mostra claramente a dependência da resposta em função das variáveis concentração de carvão e pH, sendo que quanto menor o valor de pH e de concentração de carvão, maior é a resposta obtida para a % de atividade de β -glicosidase. Nota-se também que na região de onde a concentração de carvão é máxima não existe muita variação da resposta obtida.

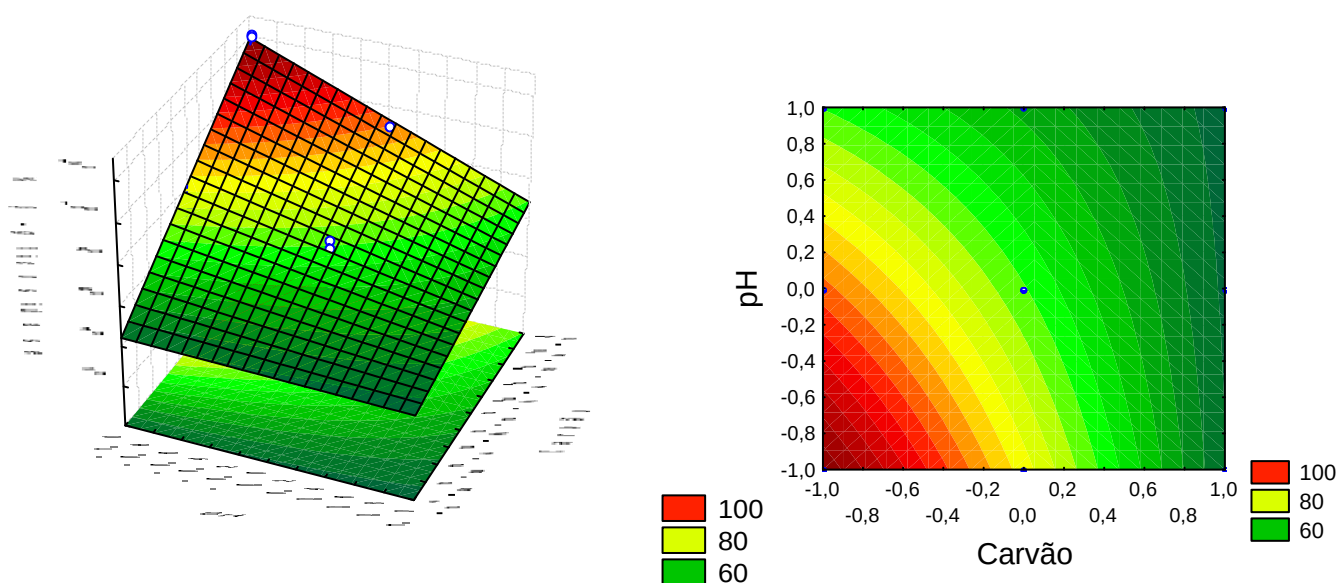


Figura 15. Superfície de resposta e seu contorno para o modelo linear, representando o efeito da concentração de carvão e do pH na % de atividade de β -glicosidase.

4.3.3.1.2 ANÁLISE DA RESPOSTA RECUPERAÇÃO DE ATIVIDADE DE MANGANÊS PEROXIDASE PARA O EXTRATO PRODUZIDO PELO CULTIVO DO FUNGO EM MADEIRA EXTRAÍDA COM ETANOL.

A análise de variância obtida para a resposta % de manganês peroxidase (Tabela 13) mostra que o carvão, o pH e a interação carvão quadrático (C^2) são os fatores mais significantes a um nível de 99% de probabilidade ($p < 0,0001$), com um coeficiente de determinação (R^2) para o modelo de 0,98.

Tabela 13 - Análise de variância com erro puro para a resposta % de atividade de manganês peroxidase.

Modelo/Efeitos	GL	SQ	MQ	F_{CALC}	p
Modelo	9	14679.69	1631.08	64.61	< 0.0001
Carvão (A)	1	1988.38	1988.38	78.77	< 0.0001***
Tempo(B)	1	8.63	8.63	0.34	0.5771
pH(C)	1	8381.60	8381.60	332.02	< 0.0001***
A²	1	28.22	28.22	1.12	0.3255
B²	1	17.35	17.35	0.69	0.4345
C²	1	2799.49	2799.49	110.90	< 0.0001***
AB	1	37.45	37.45	1.48	0.2627
AC	1	20.45	20.45	0.81	0.3980
BC	1	1.63	1.63	0.065	0.8068
Residual	7	176.71	25.24		
Falta de ajuste	5	152.85	30.57	2.56	0.3042
Erro puro	2	23.86	11.93		
Total	16	14856.40			

(F_{1%} = 12,25 F_{5%} = 5,59 F_{10%} = 3,59 F_{5%} (Falta de Ajuste) = 19,30)

R² = 0,98; SQ: soma dos quadrados; Gl: graus de liberdade; MS: média dos quadrados

A maioria dos efeitos que não apresentaram significância ao nível de 90% foram mantidos no modelo. Contudo a interação entre tempo e pH (BC), que era o efeito que apresentava menor significância, foi removido para deixar o modelo mais simples.

Após eliminação da interação, e realização de uma nova análise de variância (Tabela 14), observou-se que os efeitos não apresentaram grandes mudanças nas suas significâncias e o modelo permaneceu altamente significativo (p<0,0001).

A validade do modelo foi verificada pela análise de regressão múltipla (Tabela 14). Através do teste F, comparando o valor de F do modelo (82,30) com o F tabelado para 99% de confiança (6,03), observou-se que o modelo matemático é altamente significativo (p<0,0001) e consegue explicar 99,8% da variação total em torno da média (sendo os outros 0,2% de variação explicados pelos resíduos)

Tabela 14 - Análise de variância com erro puro para % de atividade de manganês peroxidase, eliminando fatores não significativos.

Modelo/Efeitos	GL	SQ	MQ	F_{CALC}	P
Modelo	8	14678,07	1834,76	82,30	< 0,0001
Carvão (A)	1	1988,38	1988,38	89,20	< 0,0001***
Tempo(B)	1	8,63	8,63	0,39	0,5511
pH(C)	1	8381,60	8381,60	375,99	< 0,0001***
A²	1	28,22	28,22	1,27	0,2932
B²	1	17,35	17,35	0,78	0,4034
C²	1	2799,49	2799,49	125,58	< 0,0001***
AB	1	37,45	37,45	1,68	0,2310
AC	1	20,45	20,45	0,92	0,3662
Residual	8	178,34	22,29		
Falta de ajuste	6	154,48	25,75	2,16	0,3501
Erro puro	2	23,86	11,93		
Total	16	14856,40			

(F_{1%} = 11,26 F_{5%} = 5,32 F_{10%} = 3,46 F_{1%(Modelo)} = 6,03)

R² = 0,998; SQ: soma dos quadrados; GL: graus de liberdade; MS: média dos quadrados

Com base nos dados obtidos, o modelo quadrático proposto para descrever o comportamento da resposta de % de atividade de manganês peroxidase, na região estudada, foi expresso por:

$$\% \text{ MnP} = 74,46 - 14,10.A - 0,93.B + 28,95.C + 3,25.A^2 - 2,54.B^2 - 32,32.C^2 - 2,16.A.B - 1,60.A.C$$

Através da equação proposta pelo modelo, foi construída a representação tridimensional da superfície de resposta para a %MnP em função da concentração de carvão e pH que foram os efeitos mais significativos. O tempo foi fixado no nível baixo (10 minutos) por ser o efeito que não apresentou valor significativo de acordo com a análise de variância.

A Figura 16 mostra claramente a dependência da manganês peroxidase em função das variáveis carvão e pH, sendo que o máximo valor previsto para a atividade de MnP encontra-se na região de pH entre os níveis alto e médio e próximo ao nível mínimo de carvão.

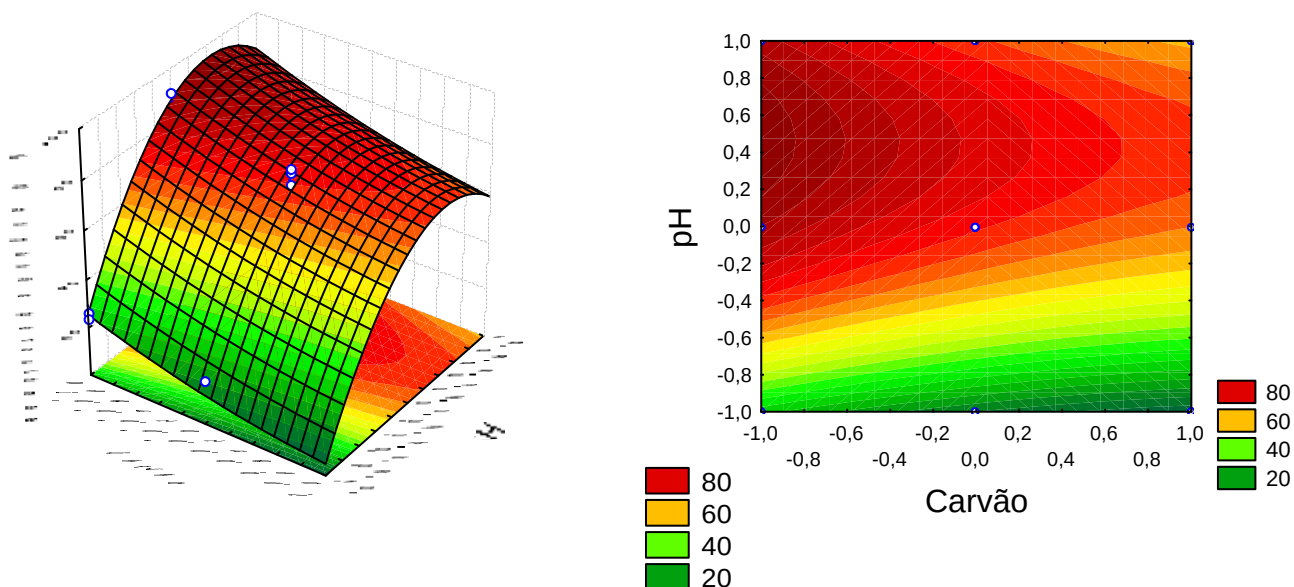


Figura 16. Superfície de resposta e seu contorno para o modelo quadrático, representando o efeito da concentração de carvão e do pH na % de atividade de manganês peroxidase.

4.3.3.1.3 ANÁLISE DA RESPOSTA REDUÇÃO DE ABSORBÂNCIA A 280nm PARA O EXTRATO PRODUZIDO PELO CULTIVO DO FUNGO EM MADEIRA EXTRAÍDA COM ETANOL.

A análise de variância obtida para a resposta % red A_{280nm} (Tabela 15), mostra que o fator tempo quadrático, a interação entre tempo e pH e o fator pH quadrático não apresentaram significância ao nível de 95% de confiança. Os demais fatores foram significativos ao nível de 99% de confiança sendo que os efeitos principais do carvão, pH e tempo e o fator carvão quadrático apresentaram $p < 0,0001$ com um coeficiente de determinação (R^2) para o modelo de 0,998.

Tabela 15 - Análise de variância com erro puro para a resposta % redução de absorbância a 280 nm.

Modelo/Efeitos	GL	SQ	MQ	F_{CALC}	p
Modelo	9	8785,38	976,15	440,86	< 0,0001
Carvão (A)	1	7056,46	7056,46	3186,90	< 0,0001***
Tempo(B)	1	153,12	153,12	69,15	< 0,0001***
pH(C)	1	240,20	240,20	108,48	< 0,0001***
A²	1	898,55	898,55	405,81	< 0,0001***
B²	1	0,22	0,22	0,10	0,7604
C²	1	9,89	9,89	4,47	0,0724*
AB	1	37,45	37,45	16,92	0,0045***
AC	1	28,54	28,54	12,89	0,0089***
BC	1	2,15	2,15	0,97	0,3570
Residual	7	15,50	2,21		
Falta de ajuste	5	15,10	3,02	15,05	0,0635
Erro puro	2	0,40	0,20		
Total	16	8800,88			

(F_{1%} = 12,25 F_{5%} = 5,59 F_{10%} = 3,59 F_{5%} (Falta de Ajuste) = 19,30)

R² = 0,998; SQ: soma dos quadrados; GL: graus de liberdade; MS: média dos quadrados

Os efeitos que não apresentaram significância estatística ao nível de 90% de confiança foram retirados do modelo para torná-lo mais simples e uma nova análise de variância foi realizada (Tabela 16), A significância dos efeitos mantidos permaneceram inalterados assim como coeficiente de determinação do modelo.

Tabela 16 - Análise de variância com erro puro para % redução de abs a 280 nm, eliminando fatores não significativos.

Modelo/Efeitos	GL	SQ	MQ	F_{CALC}	p
Modelo	7	8783,00	1254,71	631,75	<0,0001
Carvão (A)	1	7056,46	7056,46	3552,93	<0,0001***
Tempo(B)	1	153,12	153,12	77,09	<0,0001***
pH(C)	1	240,20	240,20	120,94	<0,0001***
A²	1	1026,59	1026,59	516,89	<0,0001***
C²	1	10,07	10,07	5,07	0,0508*
AB	1	37,45	37,45	18,86	0,0019***
AC	1	28,54	28,54	14,37	0,0043***
Residual	9	17,87	1,99		
Falta de ajuste	7	17,47	2,50	12,44	0,0764
Erro puro	2	0,40	0,20		
Total	16	8800,88			

(F_{1%} = 10,56 F_{5%} = 5,12 F_{10%} = 3,46 F_{1%}(Modelo) = 5,61)

R² = 0,95; SQ: soma dos quadrados; GL: graus de liberdade; MS: média dos quadrados

A validade do modelo foi verificada pela análise de regressão múltipla (Tabela 16). Através do teste F, comparando o valor de F do modelo (631,35) com o F tabelado para 99% de confiança (5,61), observou-se que o modelo matemático é altamente significativo ($p < 0,0001$) e consegue explicar 99,8% da variação total em torno da média (sendo os outros 0,2% de variação explicados pelos resíduos)

Com base nos dados obtidos, o modelo quadrático proposto para descrever o comportamento da resposta de % Redução da Abs 280 nm, na região estudada, foi expresso por:

$$\% \text{Red. Abs} = 83,37 + 26,56.A + 3,91.B - 4,90.C - 18,41.A^2 + 1,82.C^2 - 2,16.A.B + 1,89.A.C$$

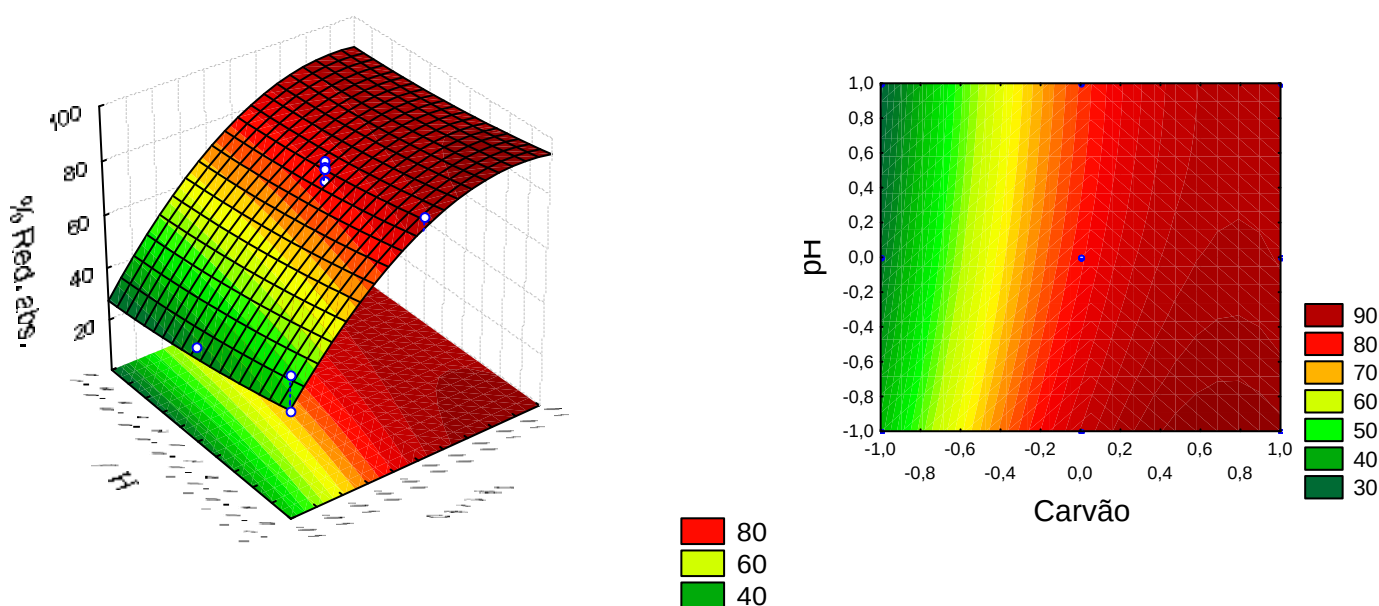


Figura 17. Superfície de resposta e seu contorno combinando os efeitos da concentração de carvão e pH na % redução da Absorbância para o extrato etanol.

A Figura 17 representa o modelo tridimensional da superfície de resposta e seu contorno construída em função da equação proposta pelo modelo para a % Redução da absorbância a 280 nm com o tempo em seu nível mínimo (10 min). Fica demonstrada a dependência da resposta em função das variáveis concentração de carvão e pH, sendo que os

máximos valores previstos para a remoção é encontrado na região de alta concentração de carvão.

4.3.4 AVALIAÇÃO DOS RESULTADOS OBTIDOS A PARTIR DO EXTRATO PRODUZIDO PELO CULTIVO DO FUNGO EM MADEIRA EXTRAÍDA COM ÁGUA.

Após o tratamento dos cavacos com água por 3 vezes e 40 dias de cultivo, o extrato enzimático obtido foi tratado com carvão ativado de acordo com o planejamento proposto (Tabela 17) e os resultados do planejamento foram avaliados na forma de análise de variância (ANOVA), a qual é utilizada para verificar a significância e a adequação do modelo.

Tabela 17 - Matriz para as atividades de β -gli e MnP e para a redução de abs-280, apresentando os níveis reais e codificados de um planejamento de compósito central com face centrada com três replicatas no ponto central.

Ensaio (N°)	Variáveis independentes reais			Variáveis independentes codificadas			Respostas		
	Carvão (%)	Tempo (min)	pH	A	B	C	% β -gli	% MnP	% Red abs-280
1	1	10	3,0	-1	-1	-1	80,84	0	41,62
2	1	10	5,0	-1	-1	1	59,58	61,35	29,91
3	1	50	3,0	-1	1	-1	70,77	9,94	51,87
4	1	50	5,0	-1	1	1	70,99	78,49	38,41
5	9	10	3,0	1	-1	-1	20,83	0	94,54
6	9	10	5,0	1	-1	1	38,01	35,64	88,58
7	9	50	3,0	1	1	-1	9,63	0	95,7
8	9	50	5,0	1	1	1	33,88	48,03	93,1
9	1	30	4,0	-1	0	0	85,69	96,73	39,86
10	9	30	4,0	1	0	0	63,68	36,52	93,32
11	5	10	4,0	0	-1	0	73,6	38,33	78,93
12	5	50	4,0	0	1	0	74,21	52,13	86,89
13	5	30	3,0	0	0	-1	40,09	0	91,56
14	5	30	5,0	0	0	1	60,3	71,93	80,75
15	5	30	4,0	0	0	0	69,77	81,36	82,27
16	5	30	4,0	0	0	0	75,95	93,53	84,45
17	5	30	4,0	0	0	0	73,25	67,91	84,71

Analisando a tabela com as respostas obtidas para porcentagens de recuperação de atividade de β -glicosidase (β -gli) e manganês peroxidase (MnP), e a porcentagem de redução de absorbância a 280 nm (Tabela 17) pode ser observado que empregando o nível médio para tempo de adsorção (B) e pH (C) e o nível baixo para o carvão (A) (ensaio 9), foram obtidas as maiores respostas para a atividade de β -gli e de MnP, 85,69% e 96,73% respectivamente, no entanto este ponto apresentou uma baixa porcentagem de remoção de compostos que absorvem a 280 nm (39,86%), devido a baixa concentração de carvão ativado utilizada.

No ensaio 7 foi obtida uma alta porcentagem de redução da absorbância, no entanto, nestas condições, não foi observada atividade de MnP e baixa atividade de β -gli (9,63%).

4.3.4.1 ANÁLISE DOS EFEITOS DA CONCENTRAÇÃO DE CARVÃO, TEMPO DE ADSORÇÃO E PH NO TRATAMENTO DO EXTRATO PRODUZIDO PELO CULTIVO DO FUNGO EM MADEIRA EXTRAÍDA COM ETANOL.

A estimativa dos efeitos foram representados na forma de gráficos de pareto e encontram-se na Figura 18.

Para o extrato enzimático proveniente da degradação de cavacos tratados com água a resposta % β -glicosidase apresentou como efeitos principais, ao nível de 5% de probabilidade, o carvão (-20,60) e o pH quadrático (-13,03). O carvão linear (A) foi o mais influente seguido do pH quadrático. Todos os fatores influenciaram de forma negativa, portanto quanto menos carvão for adicionado ao tratamento em um menor pH maior será a resposta para a β -glicosidase. Nota-se ainda que a interação entre essas variáveis apresentou efeito positivo e estatisticamente significativo ao nível de 95% de confiança, o que confirma o efeito obtido para cada variável analisada separadamente. O efeito positivo desta interação mostra que com a utilização dos níveis inferiores de carvão e pH podem ser encontradas as maiores porcentagens de atividade de β -glicosidase.

A resposta MnP apresentou como único efeito influente o pH linear (+14,82). O efeito principal do pH (C) apresentou sinal positivo, ao nível de 95% de confiança, sugerindo que a utilização do nível superior desta variável no tratamento favorece a atividade de manganês peroxidase. Os demais efeitos não apresentaram significância ao nível de 95% de confiança.

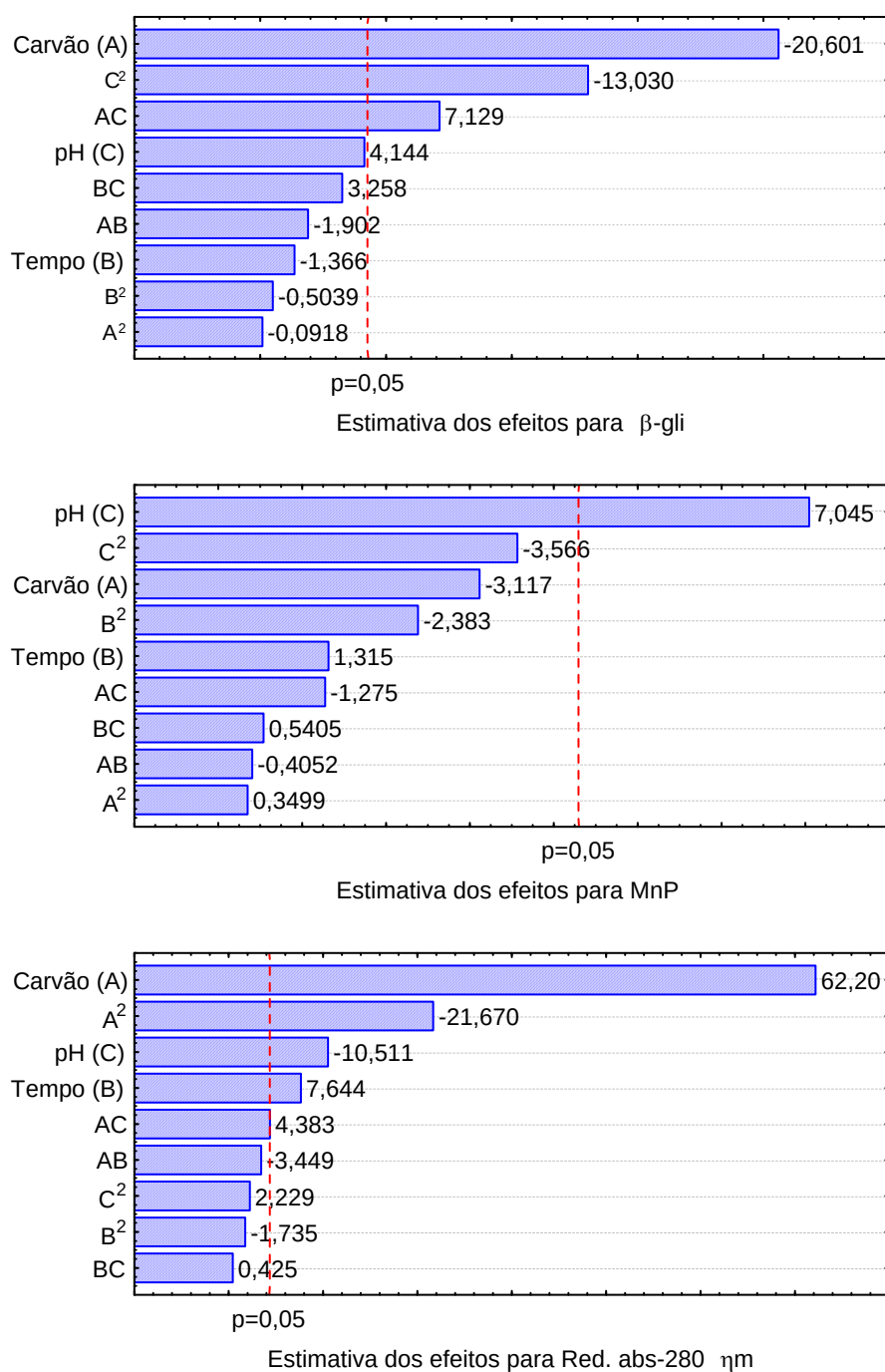


Figura 18. Gráficos de pareto para as respostas % β -gli, %MnP e Redução da absorvância a 280 nm para o extrato água.

A redução da absorvância foi influenciada pelos fatores carvão linear (+62,60), carvão quadrático (-21,66), pH linear (-10,51) e tempo linear (+7,64). O efeito principal do carvão (A) apresentou como nos outros extratos, alta influência no tratamento devido ao seu alto valor de efeito. O sinal positivo do efeito carvão linear (A) implica em dizer que quanto maior

a concentração de carvão maior será a remoção, no entanto a interação entre o carvão (C^2), que possui um menor valor, apresentou sinal negativo. Da mesma forma que para a resposta de MnP, o aumento da concentração de carvão favorece a remoção até uma certa região do planejamento, após esse ponto a adição de carvão deixa de favorecer a redução da absorbância do extrato. Os fatores pH e tempo apresentaram efeitos principais da mesma ordem e sinal observados no extrato controle para a resposta redução de absorbância, portanto quanto menor o pH e maior o tempo de adsorção maior o efeito de redução da absorbância a 280 nm.

4.3.4.1.1 ANÁLISE DA RESPOSTA RECUPERAÇÃO DE ATIVIDADE DE β -GLICOSIDASE PARA O EXTRATO PRODUZIDO PELO CULTIVO DO FUNGO EM MADEIRA EXTRAÍDA COM ÁGUA.

A análise de variância obtida para a resposta % β -gli (Tabela 18) mostra que o carvão é o fator mais significativo a um nível de 99% de probabilidade ($p < 0,0001$), seguido do fator pH quadrático e da interação entre carvão e pH, com um coeficiente de determinação (R^2) para o modelo de 0,95.

Tabela 18 - Análise de variância com erro puro para a resposta % de atividade de β -glicosidase

Modelo/Efeitos	GL	SQ	MQ	F_{CALC}	P
Modelo	9	7508,22	834,25	16,15	0,0007
Carvão (A)	1	4074,16	4074,16	78,88	<0,0001***
Tempo(B)	1	17,92	17,92	0,35	0,5744
pH(C)	1	164,93	164,93	3,19	0,1171
A²	1	0,079	0,079	1,522E-3	0,9700
B²	1	2,44	2,44	0,047	0,8341
C²	1	1629,67	1629,67	31,55	0,0008***
AB	1	34,72	34,72	0,67	0,4393
AC	1	487,85	487,85	9,44	0,0180**
BC	1	101,92	101,92	1,97	0,2029
Residual	7	361,57	51,65		
Falta de ajuste	5	342,39	68,48	7,14	0,1274
Erro puro	2	19,18	9,59		
Total	16	7869,79			

($F_{1\%} = 12,25$ $F_{5\%} = 5,59$ $F_{10\%} = 3,59$ $F_{5\%} \text{ (Falta de Ajuste)} = 19,30$)

$R^2 = 0,95$; SQ: soma dos quadrados; Gl: graus de liberdade; MS: média dos quadrados.

A maioria dos efeitos que não apresentaram significância ao nível de 90% foram mantidos no modelo. Contudo os fatores que apresentaram menor significância (A^2 e B^2) foram eliminados e foi realizada uma nova análise de variância (Tabela 19). Observou-se que a interação carvão e pH passou a influenciar o modelo a nível de 99% de confiança e o coeficiente de determinação apresentou o mesmo valor. Os outros efeitos não apresentaram grandes melhoras nas suas significâncias, no entanto foi observado um grande aumento na significância estatística do modelo ($p < 0,0001$).

Tabela 19 - Análise de variância com erro puro para % de atividade de β -glicosidase, eliminando fatores não significativos.

Modelo/Efeitos	GL	SQ	MQ	F_{CALC}	p
Modelo	7	7505,04	1072,15	26,45	<0,0001
Carvão (A)	1	4074,16	4074,16	100,53	<0,0001***
Tempo(B)	1	17,92	17,92	0,44	0,5227
pH(C)	1	164,93	164,93	4,07	0,0744
C^2	1	2623,54	2623,54	64,73	<0,0001***
AB	1	34,72	34,72	0,86	0,3788
AC	1	487,85	487,85	12,04	0,0071***
BC	1	101,92	101,92	2,51	0,1473
Residual	9	364,57	40,53		
Falta de ajuste	5	345,57	49,37	5,15	0,1722
Erro puro	2	19,18	9,59		
Total	16	7869,79			

($F_{1\%} = 10,56$ $F_{5\%} = 5,12$ $F_{10\%} = 3,46$ $F_{1\%(\text{Modelo})} = 5,61$)

$R^2 = 0,95$; SQ: soma dos quadrados; GL: graus de liberdade; MS: média dos quadrados

A validade do modelo foi verificada pela análise de regressão múltipla (Tabela 19). Através do teste F, ou seja, comparando o valor de F do modelo (26,45) com o F tabelado para 99% de confiança (5,61), observou-se que o modelo matemático é altamente significativo ($p < 0,0001$) e consegue explicar 95% da variação total em torno da média (sendo os outros 5% de variação explicados pelos resíduos).

Desta forma o modelo de compósito central com face centrada pode ser considerado como o que melhor se ajusta ao modelo para explicar as variações do fator porcentagem de atividade de β -glicosidase, na região estudada, podendo ser representado pela equação:

$$\% \beta\text{-gli} = 73,73 - 20,18.A - 1,34.B + 4,06.C - 25,24.C^2 - 2,08.A.B + 7,81.A.C + 3,57.B.C$$

A Figura 19 representa o modelo tridimensional da superfície de resposta e seu contorno construída em função da equação proposta pelo modelo para a % de atividade de β -glicosidase. A variável tempo foi fixada em seu valor mínimo por ser a menos significativa para o modelo.

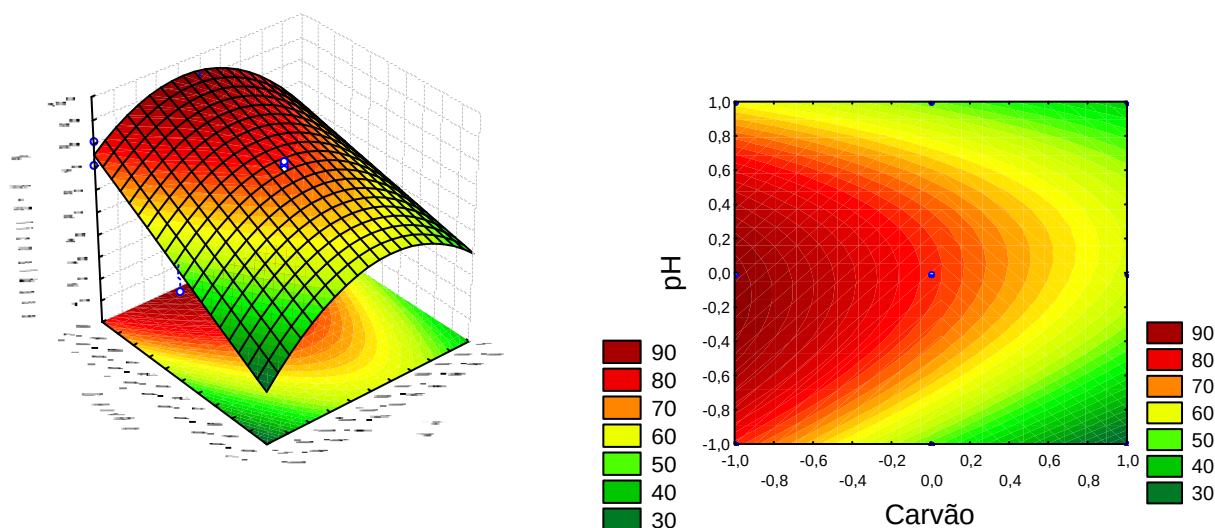


Figura 19. Superfície de resposta e seu contorno para o modelo linear, representando o efeito da concentração de carvão e do pH na % de atividade de β -glicosidase.

Observa-se uma dependência da atividade de β -glicosidase em função das variáveis concentração de carvão e pH, sendo que o máximo valor previsto para a atividade encontra-se na região mediana de pH e mínima de carvão e diminui com o aumento da concentração de carvão ativado.

4.3.4.1.2 ANÁLISE DA RESPOSTA RECUPERAÇÃO DE ATIVIDADE DE MANGANÊS PEROXIDASE PARA O EXTRATO PRODUZIDO PELO CULTIVO DO FUNGO EM MADEIRA EXTRAÍDA COM ÁGUA.

A análise de variância obtida para a resposta % de manganês peroxidase (Tabela 20) mostra o pH como o fator mais significativo a um nível de 99% de probabilidade ($p < 0,01$), seguido pelo fator principal do carvão e sua interação quadrática que apresentaram

significância ao nível de 95% de confiança com um coeficiente de determinação (R^2) para o modelo de 0,89.

Tabela 20 - Análise de variância com erro puro para a resposta % de atividade de manganês peroxidase.

Modelo/Efeitos	GL	SQ	MQ	F_{CALC}	P
Modelo	9	16712,24	1856,92	6,95	0,0091
Carvão (A)	1	1595,67	1595,67	5,97	0,0445**
Tempo(B)	1	283,77	283,77	1,06	0,3370
pH(C)	1	8151,02	8151,02	30,51	0,0009***
A²	1	20,10	20,10	0,075	0,7918
B²	1	932,47	932,47	3,49	0,1040
C²	1	2088,65	2088,65	7,82	0,0267**
AB	1	26,97	26,97	0,10	0,7600
AC	1	267,15	267,15	1,00	0,3507
BC	1	47,97	47,97	0,18	0,6845
Residual	7	1870,40	267,20		
Falta de ajuste	5	1541,93	308,39	1,88	0,3829
Erro puro	2	328,47	164,23		
Total	16	18582,64			

($F_{1\%} = 12,25$ $F_{5\%} = 5,59$ $F_{10\%} = 3,59$ $F_{5\%}(\text{Falta de Ajuste}) = 19,30$)

$R^2 = 0,89$; SQ: soma dos quadrados; GL: graus de liberdade; MS: média dos quadrados.

Tabela 21 - Análise de variância com erro puro para % de atividade de manganês peroxidase, eliminando fatores não significativos.

Modelo/Efeitos	GL	SQ	MQ	F_{CALC}	p
Modelo	6	16617,19	2769,53	14,09	0,0002
Carvão (A)	1	1595,67	1595,67	8,12	0,0173**
Tempo(B)	1	283,77	283,77	1,44	0,2572
pH(C)	1	8151,02	8151,02	41,47	<0,0001***
B²	1	951,54	951,54	4,84	0,0524*
C²	1	2206,26	2206,26	11,23	0,0074***
AC	1	267,15	267,15	1,36	0,2707
Residual	10	1965,45	196,54		
Falta de ajuste	8	1636,98	204,62	1,25	0,5188
Erro puro	2	328,47	164,23		
Total	16	18585,64			

($F_{1\%} = 10,04$ $F_{5\%} = 4,96$ $F_{10\%} = 3,29$ $F_{1\%}(\text{Modelo}) = 5,39$)

$R^2 = 0,89$; SQ: soma dos quadrados; GL: graus de liberdade; MS: média dos quadrados

Os efeitos que apresentaram menor significância, ou seja, maior valor de p, foram retirados do modelo para torná-lo mais simples, entretanto alguns fatores que não apresentaram significância a 90% de confiança (B^2 , AC) foram mantidos no modelo.

Após eliminação dos fatores, e realização de uma nova análise de variância (Tabela 21), observou-se que o fator tempo quadrático (B^2) passou a influenciar o modelo ao nível de 90% de confiança, os demais fatores apresentaram melhoras em suas significâncias assim como o modelo.

A validade do modelo foi verificada pela análise de regressão múltipla (Tabela 21). Através do teste F, comparando o valor de F do modelo (14,09) com o F tabelado para 99% de confiança (5,39), observou-se que o modelo matemático é significativo ($p=0,0002$) e consegue explicar 89% da variação total em torno da média (sendo os outros 11% de variação explicados pelos resíduos)

Com base nos dados obtidos, o modelo quadrático proposto para descrever o comportamento da resposta de % de atividade de manganês peroxidase, na região estudada, foi expresso por:

$$\%MnP = 71,71 - 12,63.A + 5,33.B + 28,55.C - 17,73.B^2 - 26,99.C^2 - 5,78.A.C$$

A partir da equação proposta é possível construir um modelo tridimensional da superfície de resposta assim como seu contorno para a resposta % de atividade de manganês peroxidase. Neste caso a variável tempo, que foi a menos significativa para o modelo, não pode ser fixada em seu valor mínimo pois nessa condição o modelo prevê valores negativos para a resposta, logo o tempo foi fixado em seu valor médio (30 min) para a construção da superfície de resposta e seu respectivo contorno.

A Figura 20 mostra a dependência da resposta em função das variáveis concentração de carvão e pH, sendo que o máximo valor previsto para a atividade de MnP encontra-se na região de pH mais elevado e mínima de carvão diminuindo com o aumento da concentração de carvão ativado.

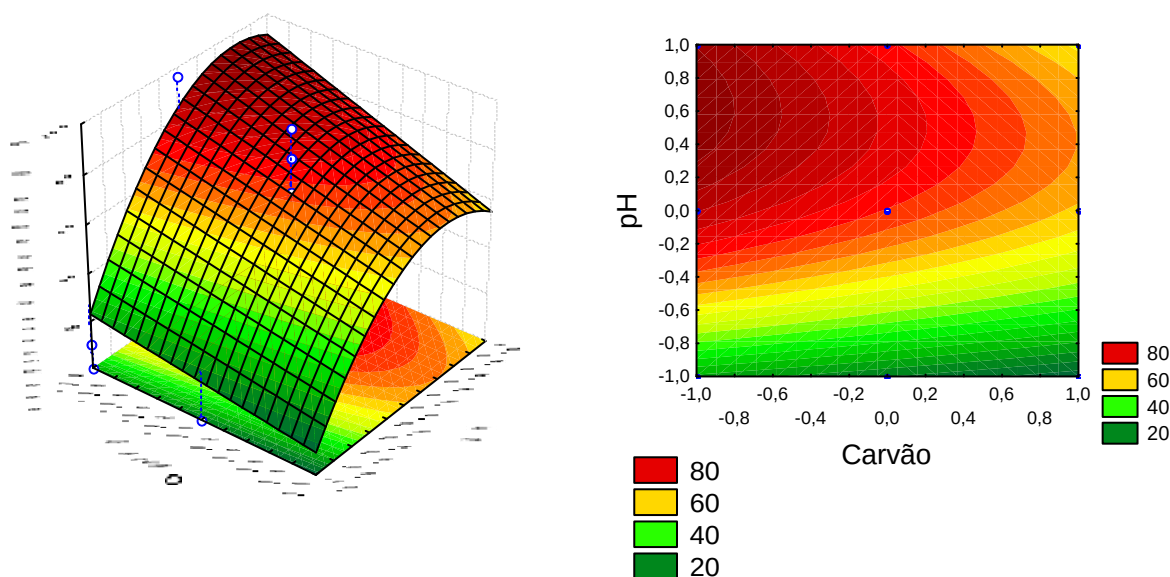


Figura 20. Superfície de resposta e seu contorno para o modelo linear, representando o efeito da concentração de carvão e do pH na % de atividade de manganês peroxidase.

4.3.4.1.3 ANÁLISE DA RESPOSTA REDUÇÃO DE ABSORBÂNCIA A 280 nm PARA O EXTRATO PRODUZIDO PELO CULTIVO DO FUNGO EM MADEIRA EXTRAÍDA COM ETANOL.

A análise de variância obtida para a resposta redução de absorbância a 280nm (Tabela 22), mostra que o fator tempo quadrático e a interação entre tempo e pH não apresentaram significância ao nível de 90% de confiança e o fator pH quadrático apresentou apenas em 90%. Os demais fatores foram significativos ao nível de 99% de confiança sendo que os efeitos principais do carvão, pH e tempo e o fator carvão quadrático apresentaram $p < 0,0001$ com um coeficiente de determinação (R^2) para o modelo de 0,998.

Apenas a interação entre carvão e tempo, que apresentou menor significância, foi retirada do modelo. Uma nova análise de variância foi realizada (Tabela 23) mostrando que o efeito tempo quadrático passou a influenciar o modelo ao nível de 90% de confiança e o coeficiente de determinação não sofreu alteração.

A validade do modelo foi verificada pela análise de regressão múltipla. Através do teste F, comparando o valor de F do modelo (728,67) com o F tabelado para 99% de

confiança (6,03), observou-se que o modelo matemático é altamente significativo ($p < 0,0001$) e consegue explicar 99,8% da variação total em torno da média (sendo os outros 0,2% de variação explicados pelos resíduos)

Tabela 22. Análise de variância com erro puro para a resposta % redução de absorbância a 280 nm.

Modelo/Efeitos	GL	SQ	MQ	F _{CALC}	p
Modelo	9	8582,93	953,66	582,52	<0,0001
Carvão (A)	1	6943,96	6943,96	4243,35	<0,0001***
Tempo(B)	1	104,90	104,90	64,07	<0,0001***
pH(C)	1	198,34	198,34	121,15	<0,0001***
A²	1	843,27	843,27	515,09	<0,0001***
B²	1	5,41	5,41	3,31	0,1118
C²	1	8,95	8,95	5,47	0,0520*
AB	1	21,38	21,38	13,06	0,0086***
AC	1	34,46	34,46	21,05	0,0025***
BC	1	0,32	0,32	0,19	0,6725
Residual	7	11,46	1,64		
Falta de ajuste	5	7,86	1,57	0,87	0,6104
Erro puro	2	3,60	1,80		
Total	16	8594,39			

(F_{1%} = 12,25 F_{5%} = 5,59 F_{10%} = 3,59 F_{5%} (Falta de Ajuste) = 19,30)

R² = 0,998; SQ: soma dos quadrados; GL: graus de liberdade; MS: média dos quadrados

Tabela 23 - Análise de variância com erro puro para % redução de absorbância a 280 nm, eliminado fatores não significativos.

Modelo/Efeitos	GL	SQ	MQ	F _{CALC}	p
Modelo	8	8582,61	1072,83	728,67	<0,0001
Carvão (A)	1	6943,96	6943,96	4718,40	<0,0001***
Tempo(B)	1	104,90	104,90	71,25	<0,0001***
pH(C)	1	198,34	198,34	134,71	<0,0001***
A²	1	843,27	843,27	572,75	<0,0001***
B²	1	5,41	5,41	3,68	0,0914*
C²	1	8,95	8,95	6,08	0,0390**
AB	1	21,38	21,38	14,52	0,0052***
AC	1	34,46	34,46	23,41	0,0013***
Residual	8	11,78	1,47		
Falta de ajuste	6	8,18	1,36	0,76	0,6652
Erro puro	2	3,60	1,80		
Total	16	8594,39			

(F_{1%} = 11,26 F_{5%} = 5,32 F_{10%} = 3,46 F_{1%(Modelo)} = 6,03)

R² = 0,998; SQ: soma dos quadrados; GL: graus de liberdade; MS: média dos quadrados

Com base nos dados obtidos, o modelo quadrático proposto para descrever o comportamento da resposta de % Redução da abs-280, na região estudada, foi expresso por:

$$\% \text{ Red. abs} = 84,11 + 26,36.A + 3,24.B - 4,45.C - 17,74.A^2 - 1,42.B^2 + 1,83.C^2 - 1,63.A.B + 2,08.A.C$$

Através da equação proposta pelo modelo, foi construída a representação tridimensional da superfície de resposta para a % de redução de absorbância e seu contorno (Figura 21) em função da concentração de carvão e pH que foram os efeitos mais significativos. O tempo foi fixado no nível baixo (10 minutos) por ser o efeito menos significativo de acordo com a análise de variância.

A Figura 21 mostra a dependência da resposta em função das variáveis concentração de carvão e pH, sendo que os máximos valores previstos para a remoção é encontrado na região de alta concentração de carvão.

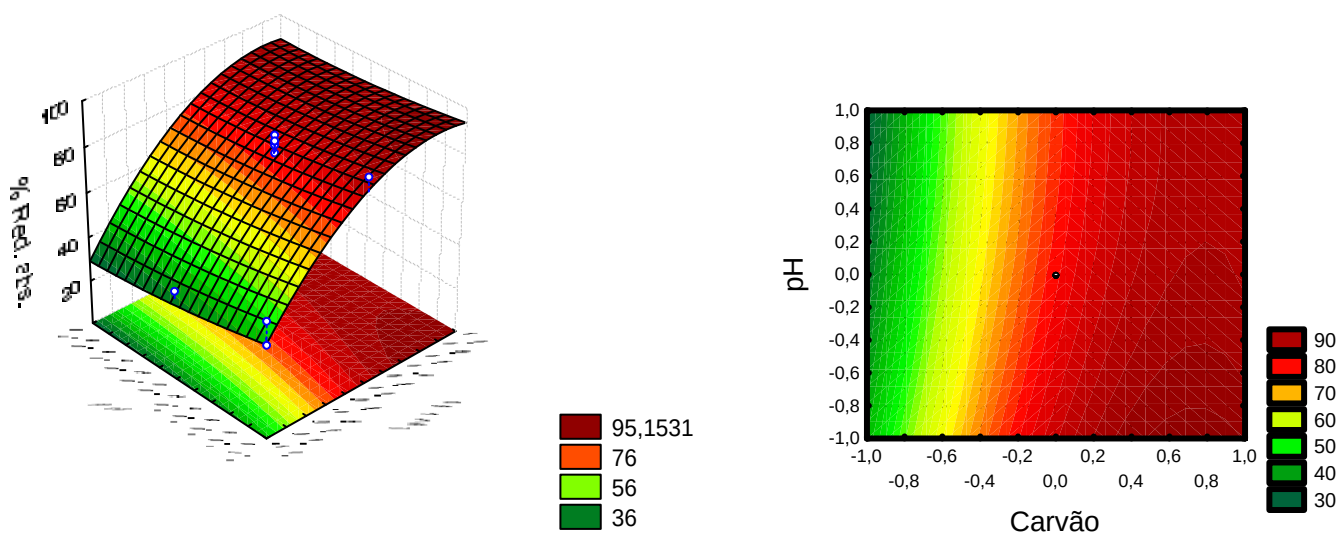


Figura 21. Superfície de resposta e seu contorno combinando os efeitos da concentração de carvão e pH na % Redução da Absorbância para o extrato água.

4.3.5 AVALIAÇÃO DOS RESULTADOS OBTIDOS A PARTIR DO EXTRATO PRODUZIDO PELO CULTIVO DO FUNGO EM MADEIRA EXTRAÍDA COM ETANOL E ÁGUA.

Analisando a tabela com as respostas obtidas para porcentagens de recuperação de atividade de β -glicosidase (β -gli) e manganês peroxidase (MnP), e a porcentagem de redução de absorbância a 280 nm (Tabela 24) pode ser observado que empregando o nível baixo (-1) para as variáveis carvão e pH e o nível alto (1) para o tempo (ensaio 3) foi possível obter a maior resposta para a atividade de β -glicosidase (100,251%), no entanto este ponto apresentou uma baixa porcentagem de remoção de compostos que absorvem a 280 nm (17,89%), em razão da baixa concentração de carvão ativado utilizada.

Tabela 24 - Matriz para as atividades de β -gli e MnP e para a redução de abs-280, apresentando os níveis reais e codificados de um planejamento de compósito central com face centrada com três replicatas no ponto central.

Ensaio (N°)	Variáveis independentes reais			Variáveis independentes codificadas			Respostas		
	Carvão (%)	Tempo (min)	pH	A	B	C	% β -gli	% MnP	% Red abs-280
1	1	10	3,0	-1	-1	-1	96,18	15,3	40,67
2	1	10	5,0	-1	-1	1	85,24	87,09	32,02
3	1	50	3,0	-1	1	-1	100,25	17,89	53,68
4	1	50	5,0	-1	1	1	73,64	91,14	32,17
5	9	10	3,0	1	-1	-1	2,95	0	96,14
6	9	10	5,0	1	-1	1	17,85	59,23	91,37
7	9	50	3,0	1	1	-1	0,41	0	97,7
8	9	50	5,0	1	1	1	5,8	61,12	93,34
9	1	30	4,0	-1	0	0	75,48	81,57	37,55
10	9	30	4,0	1	0	0	39,08	60,92	95,94
11	5	10	4,0	0	-1	0	61,68	88,34	83,9
12	5	50	4,0	0	1	0	64,87	83,94	90,82
13	5	30	3,0	0	0	-1	10,28	0	94,27
14	5	30	5,0	0	0	1	38,56	88,88	83,04
15	5	30	4,0	0	0	0	73,63	75,8	88,56
16	5	30	4,0	0	0	0	84,72	71,77	81,04
17	5	30	4,0	0	0	0	72,75	81,72	85,7

No ensaio 4 foi obtida a maior porcentagem de redução da absorbância (91,14%) e uma considerável atividade de β -glicosidase (73,64), no entanto, nestas condições a atividade de MnP foi muito baixa (32,17%)

A máxima recuperação de atividade de MnP (94,23%) foi observada empregando-se o nível alto para as variáveis tempo e pH e o nível mínimo para o carvão(ensaio 4). Neste ensaio também foi obtido baixo valor de redução de absorbância (32,17%).

4.3.5.1 ANÁLISE DOS EFEITOS DA CONCENTRAÇÃO DE CARVÃO, TEMPO DE ADSORÇÃO E pH NO TRATAMENTO DO EXTRATO PRODUZIDO PELO CULTIVO DO FUNGO EM MADEIRA EXTRAÍDA COM ETANOL.

A estimativa dos efeitos foram representados na forma de gráficos de pareto e encontram-se na figura 22. Para a β -glicosidase os efeitos principais, ao nível de 95% de confiança, que mais influenciaram o tratamento foram o carvão quadrático (-17,29) e o pH quadrático (-7,41). Ambos fatores influenciaram de forma negativa, portanto quanto menos carvão for adicionado ao tratamento em um menor pH maior será a resposta para a β -glicosidase.

A resposta MnP foi mais influenciada pelo pH linear (+22,38) e quadrático (-11,43) seguido do carvão linear (-7,06). O efeito principal do pH (C) apresentou sinal positivo, ao nível de 95% de confiança, sugerindo que a utilização do nível superior desta variável no tratamento do extrato, favorece a atividade de manganês peroxidase, no entanto a interação do pH (C^2) apresentou sinal positivo que implica em dizer que quanto menor o pH maior será a recuperação de MnP. Portanto o aumento do pH favorecerá o aumento de atividade até certa região, onde a partir desfavorecerá o aumento da resposta. O fator carvão apresentou efeito principal negativo, mostrando que a redução do seu nível implicou em maior atividade de manganês peroxidase.

A redução da absorbância foi influenciada pelos fatores carvão linear (+23,19), carvão quadrático (-8,84) e pH linear (-4,21). O efeito principal do carvão (A) apresentou sinal positivo, no entanto a interação entre o carvão (C^2), apresentou sinal negativo. Desta forma, o aumento da concentração de carvão favorece a redução da absorbância até uma certa região do planejamento. O fator pH apresentou efeito principal negativo, portanto quanto menor o pH maior será a redução da $A_{280\text{ nm}}$.

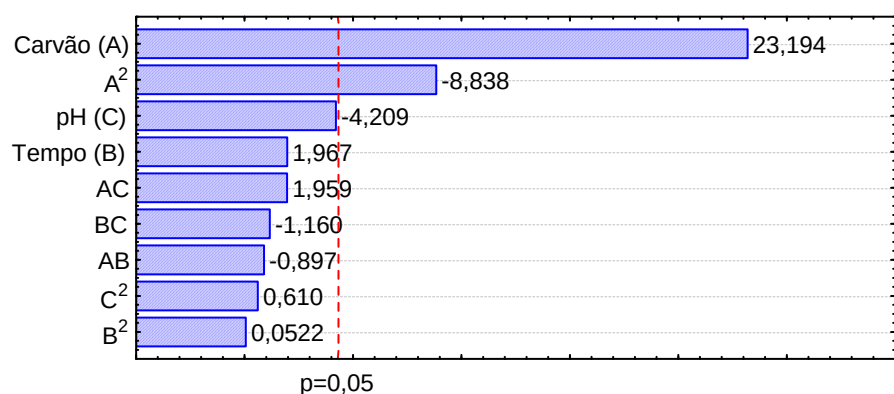
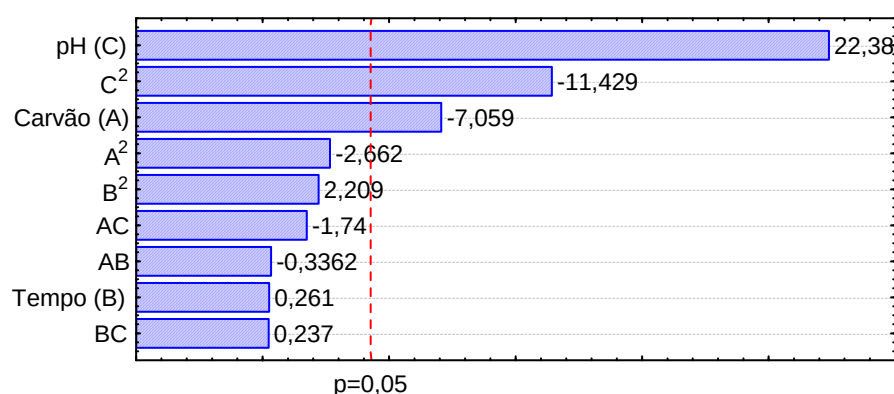
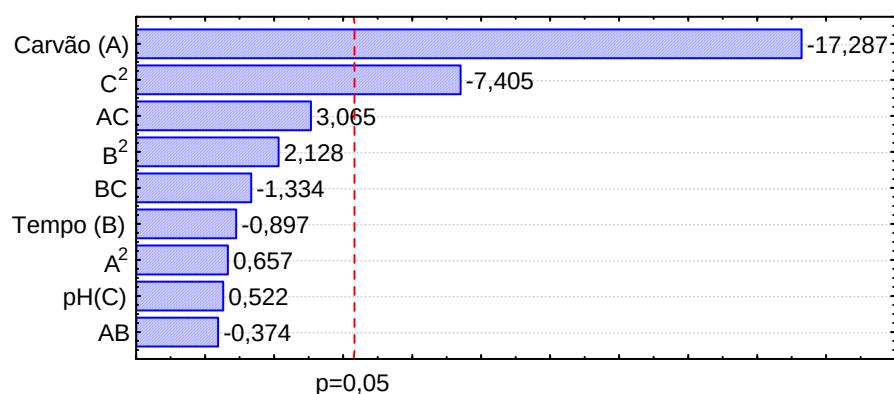


Figura 20. Gráficos de pareto para as respostas % β -gli, MnP e Redução da absorbância a 280 nm para o extrato etanol e água.

4.3.5.1.1 ANÁLISE DA RESPOSTA RECUPERAÇÃO DE ATIVIDADE DE β -GLICOSIDASE PARA O EXTRATO PRODUZIDO PELO CULTIVO DO FUNGO EM MADEIRA EXTRAÍDA COM ETANOL E ÁGUA.

A análise de variância obtida para a resposta % β -glicosidase (Tabela 25) mostra que o carvão é o fator mais significativo a um nível de 99% de confiança, seguido do pH quadrático que apresenta significância a um nível de 95% de confiança. O coeficiente de determinação (R^2) para o modelo é de 0,87.

Tabela 25 - Análise de variância com erro puro para a resposta % de atividade de β -glicosidase

Modelo/Efeitos	GL	SQ	MQ	F_{CALC}	p
Modelo	9	16589,60	1843,29	5,21	0,0203
Carvão (A)	1	13300,61	13300,61	37,58	0,0005***
Tempo(B)	1	35,83	35,83	0,10	0,7595
pH(C)	1	12,14	12,14	0,034	0,8583
A^2	1	19,23	19,23	0,054	0,8224
B^2	1	201,58	201,58	0,57	0,4750
C^2	1	2440,53	2440,53	6,90	0,0341**
AB	1	6,23	6,23	0,018	0,8982
AC	1	418,18	418,18	1,18	0,3130
BC	1	79,25	79,25	0,22	0,6505
Residual	7	2477,33	353,90		
Falta de ajuste	5	2388,31	477,66	10,73	0,0874
Erro puro	2	89,01	44,51		
Total	16	19066,93			

($F_{1\%} = 12,25$ $F_{5\%} = 5,59$ $F_{10\%} = 3,59$ $F_{5\%}(\text{Falta de Ajuste}) = 19,30$)

$R^2 = 0,87$; SQ: soma dos quadrados; GL: graus de liberdade; MS: média dos quadrados

A maioria dos efeitos que não apresentaram significância ao nível de 90% foram mantidos no modelo. Contudo eliminando os fatores A^2 , AB e BC e realizando uma nova análise de variância (Tabela 26), observou-se que o fator pH quadrático (C^2) passou a influenciar o modelo ao nível de 99% de confiança e o coeficiente de determinação apresentou o mesmo valor. Os outros efeitos não apresentaram grandes melhoras, no entanto foi observado um grande aumento na significância estatística do modelo ($p=0,0008$).

A validade do modelo foi verificada pela análise de regressão múltipla (Tabela 26). Através do teste F, ou seja, comparando o valor de F do modelo (10,64) com o F tabelado

para 99% de confiança (5,39), observou-se que o modelo matemático é significativo ($p=0,0008$) e consegue explicar 87% da variação total em torno da média (sendo os outros 13% de variação explicados pelos resíduos).

Tabela 26 - Análise de variância com erro puro para % de atividade de β -glicosidase, eliminando fatores não significativos.

Modelo/Efeitos	GL	SQ	MQ	F_{CALC}	p
Modelo	6	16484,89	2747,48	10,64	0,0008
Carvão (A)	1	13300,61	13300,61	51,51	<0,0001***
Tempo(B)	1	35,83	35,83	0,14	0,7173
PH(C)	1	12,14	12,14	0,047	0,8327
B^2	1	278,16	278,16	1,08	0,3237
C^2	1	2594,91	2594,91	10,05	0,0100***
AC	1	418,18	418,18	1,62	0,2319
Residual	10	2582,04	258,20		
Falta de ajuste	8	2493,02	311,63	7,00	0,1309
Erro puro	2	89,01	44,51		
Total	16	19066,93			

($F_{1\%} = 10,04$ $F_{5\%} = 4,96$ $F_{10\%} = 3,29$ $F_{1\%(\text{Modelo})} = 5,39$)

$R^2 = 0,87$; SQ: soma dos quadrados; GL: graus de liberdade; MS: média dos quadrados

Desta forma o modelo de compósito central com face centrada pode ser considerado como o que melhor se ajusta ao modelo, para explicar as variações do fator porcentagem de atividade de β -glicosidase, na região estudada, podendo ser representado pela equação:

$$\% \beta\text{-gli} = 64,72 - 36,47.A - 1,89.B + 1,10.C + 9,58.B^2 - 29,27.C^2 + 7,23.A.C$$

A Figura 23 representa o modelo tridimensional da superfície de resposta e seu contorno construída em função da equação proposta pelo modelo para a % de atividade de β -glicosidase e mostra a dependência da resposta em função das variáveis concentração de carvão e pH, sendo que o máximo valor previsto para a atividade de β -glicosidase encontra-se na região mediana de pH e mínima de carvão

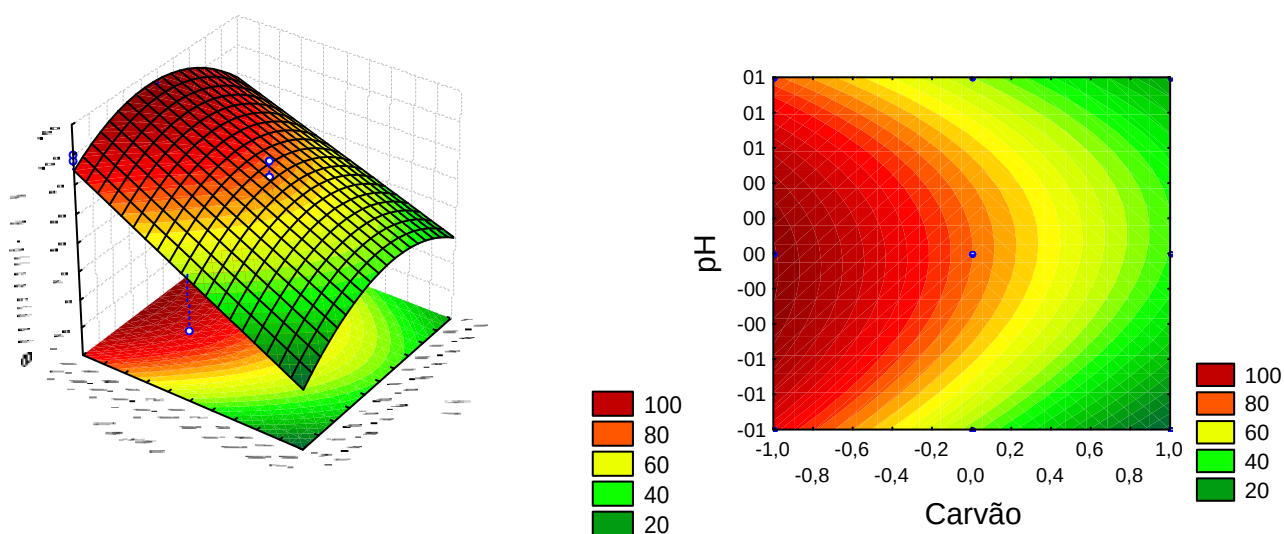


Figura 23: Superfície de resposta e seu contorno para o modelo linear, representando o efeito da concentração de carvão e do pH na % de atividade de β -glicosidase.

4.3.5.1.2 ANÁLISE DA RESPOSTA RECUPERAÇÃO DE ATIVIDADE DE MANGANÊS PEROXIDASE PARA O EXTRATO PRODUZIDO PELO CULTIVO DO FUNGO EM MADEIRA EXTRAÍDA COM ETANOL E ÁGUA.

Através da análise de variância obtida para a resposta % MnP, observa-se que os fatores pH, carvão e pH ao quadrado são os mais significativos ao nível de 99% de confiança, seguidos pelo fator carvão quadrático (A^2) que apresenta significância a 90% de confiança, apresentando um coeficiente de determinação (R^2) para o modelo de 0,985.

As interações AB e BC que não apresentaram efeito significativo a 10% de confiança foram removidos do modelo, no entanto os efeitos B^2 e AC que também não apresentaram significância a 10% de confiança foram mantidos no modelo.

Realizando uma nova análise de variância (Tabela 28), observou-se que o fator A^2 passou a influenciar o modelo a nível de 95% de confiança, o fator B^2 a nível de 90% de confiança e o coeficiente de determinação apresentou o mesmo valor. O modelo permaneceu altamente significativo ($p < 0,0001$).

Tabela 27 - Análise de variância com erro puro para resposta % de atividade de manganês peroxidase.

Modelo/Fatores	GL	SQ	MQ	F_{CALC}	p
Modelo	9	19342.26	2149.14	51.69	< 0.0001
Carvão (A)	1	1248.14	1248.14	30.02	0.0009***
Tempo(B)	1	1.71	1.71	0.041	0.8453
pH(C)	1	12550.72	12550.72	301.86	< 0.0001***
A²	1	177.54	177.54	4.27	0.0776*
B²	1	122.24	122.24	2.94	0.1301
C²	1	3271.82	3271.82	78.69	< 0.0001***
AB	1	2.82	2.82	0.068	0.8020
AC	1	76.20	76.20	1.83	0.2179
BC	1	1.40	1.40	0.034	0.8595
Residual	7	291.05	41.58		
Falta de ajuste	5	240.95	48.19	1.92	0.3764
Erro puro	2	50.10	25.05		
Total	16	19633.31			

(F_{1%} = 12,25 F_{5%} = 5,59 F_{10%} = 3,59 F_{5%} (Falta de Ajuste) = 19,30)

R² = 0,985; SQ: soma dos quadrados; GL: graus de liberdade; MS: média dos quadrados

Tabela 18 - Análise de variância com erro puro para % de atividade de manganês peroxidase, eliminando fatores não significativos.

Modelo/Fatores	GL	SQ	MQ	F_{CALC}	P
Modelo	7	2762,58	2762,58	84,20	< 0,0001
Carvão (A)	1	1248.14	1248.14	38,04	0.0002***
Tempo(B)	1	1.71	1.71	0,052	0.8247
pH(C)	1	12550.72	12550.72	382,55	< 0.0001***
A²	1	177.54	177.54	5,41	0.0450**
B²	1	122.24	122.24	3,73	0.0856*
C²	1	3271.82	3271.82	99,73	< 0.0001***
AC	1	76.20	76.20	2,32	0.1618
Residual	9	295,27	32,81		
Falta de ajuste	7	245,18	35,03	1,40	0.4783
Erro puro	2	50.10	25.05		
Total	16	19633.31			

(F_{1%} = 10,56 F_{5%} = 5,12 F_{10%} = 3,46 F_{1%(Modelo)} = 5,61)

R² = 0,985; SQ: soma dos quadrados; GL: graus de liberdade; MS: média dos quadrados

A análise de regressão múltipla que testa a validade do modelo através do teste F, também apresentada na Tabela 28, mostrou que foi possível validar o modelo, pois o F calculado (84,20) é maior do que o F tabelado (5,61), além de ser altamente significativo (p<0,0001).

Desta forma o modelo de compósito central com face centrada pode ser considerado como o ajuste que melhor se adequa ao modelo, para explicar as variações do fator porcentagem de atividade de manganês peroxidase, na região estudada, podendo ser representado pela equação abaixo,

$$\% \text{ MnP} = 78,12 - 11,17.A + 0,41.B + 35,43.C - 8,14.A^2 + 6,75.B^2 - 34,95.C^2 - 3,09.A.C$$

A Figura 24 apresenta a superfície de resposta tridimensional obtida através da equação e seu contorno para a % MnP na região estudada. A superfície de resposta e seu contorno foram plotados em função da concentração de carvão e pH que foram os efeitos mais significativos. O tempo foi fixado no nível baixo (10 minutos) por ser o efeito que não apresentou valor significativo de acordo com a análise de variância.

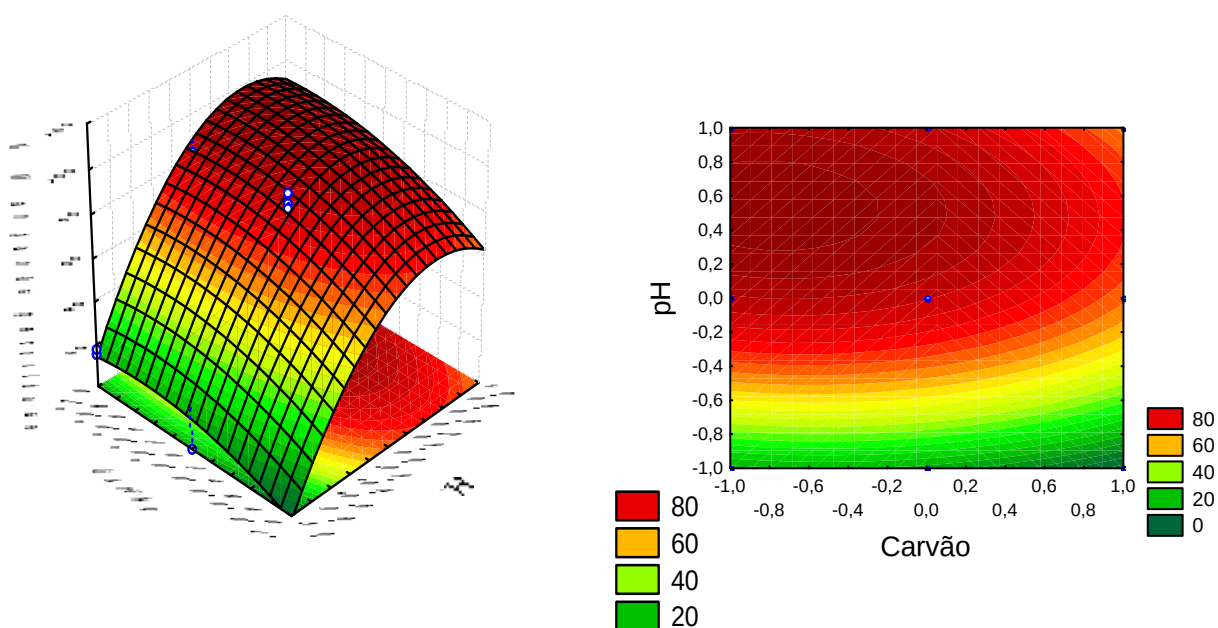


Figura 24. Superfície de resposta e seu contorno combinando os efeitos da concentração de carvão e pH na % recuperação de Manganês peroxidase para o extrato etanol / água.

A Figura 24 mostra a dependência da resposta em função das variáveis concentração de carvão e pH, sendo que o máximo valor previsto para a atividade de MnP encontra-se na região de pH entre os níveis médio e máximo diminuindo com o aumento da concentração de carvão ativado.

4.3.5.1.3 ANÁLISE DA RESPOSTA REDUÇÃO DE ABSORBÂNCIA A 280 nm PARA O EXTRATO PRODUZIDO PELO CULTIVO DO FUNGO EM MADEIRA EXTRAÍDA COM ETANOL E ÁGUA.

A análise de variância obtida para a resposta % redução de A_{280} nm (Tabela 29), mostra que os fatores mais significativos foram o carvão, e seu efeito quadrático que apresentaram $p < 0,0001$, seguido do efeito principal do pH que também apresentou significância a 95% de confiança e os fatores tempo e interação entre tempo e pH em 90%. Os demais fatores não apresentaram significância a 90% de confiança e o coeficiente de determinação (R^2) para o modelo foi de 0,993.

Tabela 29 - Análise de variância com erro puro para a resposta % redução de absorvância a 280 nm.

Modelo/Efeitos	GL	SQ	MQ	F _{CALC}	P
Modelo	9	9752,91	1083,66	109,70	< 0,0001
Carvão (A)	1	7750,61	7750,61	784,63	< 0,0001***
Tempo(B)	1	55,75	55,75	5,64	0,0492**
pH(C)	1	255,31	255,31	25,85	0,0014***
A²	1	1125,33	1125,33	113,92	< 0,0001***
B²	1	0,040	0,040	4,00E-3	0,9513
C²	1	5,38	5,38	0,54	0,4846
AB	1	11,60	11,60	1,17	0,3145
AC	1	55,24	55,24	5,59	0,0500**
BC	1	19,38	19,38	1,96	0,2041
Residual	7	69,15	9,88		
Falta de ajuste	5	40,30	8,06	0,56	0,7407
Erro puro	2	28,85	14,42		
Total	16	9822,05			

($F_{1\%} = 12,25$ $F_{5\%} = 5,59$ $F_{10\%} = 3,59$ $F_{5\%}(\text{Falta de Ajuste}) = 19,30$)

$R^2 = 0,993$; SQ: soma dos quadrados; GL: graus de liberdade; MS: média dos quadrados

Os efeitos que não apresentaram significância estatística ao nível de 90% de confiança foram retirados do modelo para torná-lo mais simples e uma nova análise de variância foi realizada (Tabela 30), o coeficiente de determinação teve um pequeno decréscimo porém o modelo permaneceu altamente significativo ($p < 0,0001$)

Tabela 30 - Análise de variância com erro puro para % redução de absorbância a 280 nm, eliminando fatores não significativos

Modelo/Efeitos	GL	SQ	MQ	F_{CALC}	P
Modelo	5	9715,46	1943,09	200,51	< 0,0001
Carvão (A)	1	7750,61	7750,61	799,80	< 0,0001***
Tempo(B)	1	55,75	55,75	5,75	0,0353**
pH(C)	1	255,31	255,31	26,35	0,0003***
A²	1	1598,55	1598,55	164,96	< 0,0001***
AC	1	55,24	55,24	5,70	0,0360**
Residual	11	106,60	9,69		
Falta de ajuste	9	77,75	8,64	0,60	0,7583
Erro puro	2	28,85	14,42		
Total	16	9822,05			

(F_{1%} = 9,65 F_{5%} = 4,84 F_{10%} = 3,23 F_{1%(Modelo)} = 5,32)

R² = 0,989; SQ: soma dos quadrados; GL: graus de liberdade; MS: média dos quadrados

A validade do modelo foi verificada pela análise de regressão múltipla (Tabela 30). Através do teste F, ou seja, comparando o valor de F do modelo (200,51) com o F tabelado para 99% de confiança (5,32), observou-se que o modelo matemático é altamente significativo (p<0,0001) e consegue explicar 98,9% da variação total em torno da média (sendo os outros 1,1% de variação explicados pelos resíduos)

Desta forma, o modelo polinomial de segundo grau pode ser considerado como o melhor ajuste para explicar as variações da % redução da absorbância a 280 nm para o extrato obtido a partir de cavacos que tiveram seus extrativos removidos com etanol e água.

Com base nos dados obtidos, o modelo quadrático proposto para descrever o comportamento da resposta de % redução da absorbância, na região estudada, foi expresso por:

$$\% \text{Red. abs} = 86,76 + 27,84.A + 2,36.B - 5,05.C - 19,70.A^2 + 2,63.A.C$$

A Figura 25 representa o modelo tridimensional da superfície de resposta e seu contorno construída em função da equação proposta pelo modelo para a % de redução de absorbância. Por ser a menos significativa para o modelo, a variável tempo foi fixada em seu valor mínimo (10 min) para a construção da superfície de resposta e seu respectivo contorno.

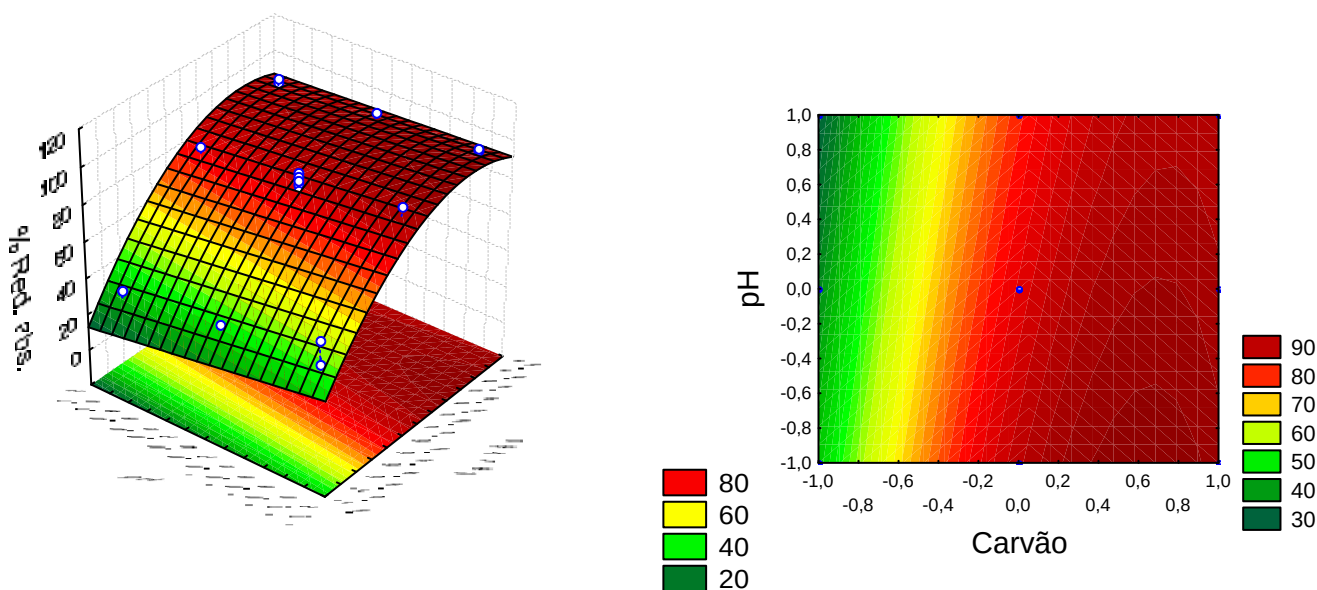


Figura 25. Superfície de resposta e seu contorno combinando os efeitos da concentração de carvão e pH na % redução da absorvância para o extrato etanol/água.

A Figura 25 mostra a dependência da resposta em função das variáveis concentração de carvão e pH, sendo que os máximos valores previstos para a remoção é encontrado na região de alta concentração de carvão onde a variação do pH não exerce muita influência.

De uma forma geral, verificou-se que a variável pH tendendo ao nível baixo e favorece a redução da absorvância a 280 nm.

O efeito das variáveis carvão e tempo variou em função da resposta analisada. Em relação às atividades enzimáticas verificou-se que se ambos os fatores tendem ao nível mais baixo, maiores serão as respostas para as atividades. Para a resposta redução de absorvância o aumento da concentração de carvão e do tempo de adsorção promove maior clarificação do extrato.

No geral verificou-se que não houve falta de ajuste significativo ao nível de 95% de confiança para os modelos analisados, ou seja, a diferença entre os valores obtidos experimentalmente e os valores previstos pelas equações dos modelos, pode ser explicada somente pelo erro experimental.

4.4 OTIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DOS MODELOS MATEMÁTICOS

A otimização dos modelos matemáticos foi realizada a partir da sobreposição das linhas de contorno a fim de definir uma região otimizada com alta atividade enzimática e alta redução de absorbância a 280 nm. Dentro dessa região foi selecionada uma condição na qual foi possível prever as respostas (% de β -gli, % de MnP e % red. Abs-280) de acordo com as equações matemáticas, dentro de um intervalo de confiança de 95%. Foi realizado um ensaio na condição selecionada para verificação da validade dos modelos ajustados.

4.4.1 OTIMIZAÇÃO PARA AS RESPOSTAS % DE ATIVIDADE DE β -GLICOSIDASE E REDUÇÃO DE ABSORBÂNCIA A 280 nm.

A sobreposição das linhas de contorno foi obtida fixando a variável tempo em seu valor mínimo por ter sido a menos significativa para os modelos e buscando atingir a máxima atividade de β -glicosidase e redução de absorbância. Nas figuras a seguir estão representadas as sobreposições das respostas % de atividade de β -glicosidase (β -gli) e % de redução de absorbância a 280 nm (Red. Abs 280) que permitem prever uma região otimizada dentro de faixas de resposta para cada extrato enzimático.

A sobreposição das respostas nas condições otimizadas para o extrato produzido pelo cultivo do fungo em madeira controle permitiu prever uma atividade de β -glicosidase (β -gli) entre 67 e 78% para uma redução de absorbância a 280 nm (Red. Abs 280) entre 70 e 85%. (Figura 26). Para os extratos obtidos do cultivo do fungo em madeira tratada com etanol, a sobreposição das respostas nas condições otimizadas permitiu prever uma atividade de β -glicosidase (β -gli) entre 80 e 95% para uma redução de absorbância a 280 nm (Red. Abs 280) entre 70 e 85%. (Figura 27).

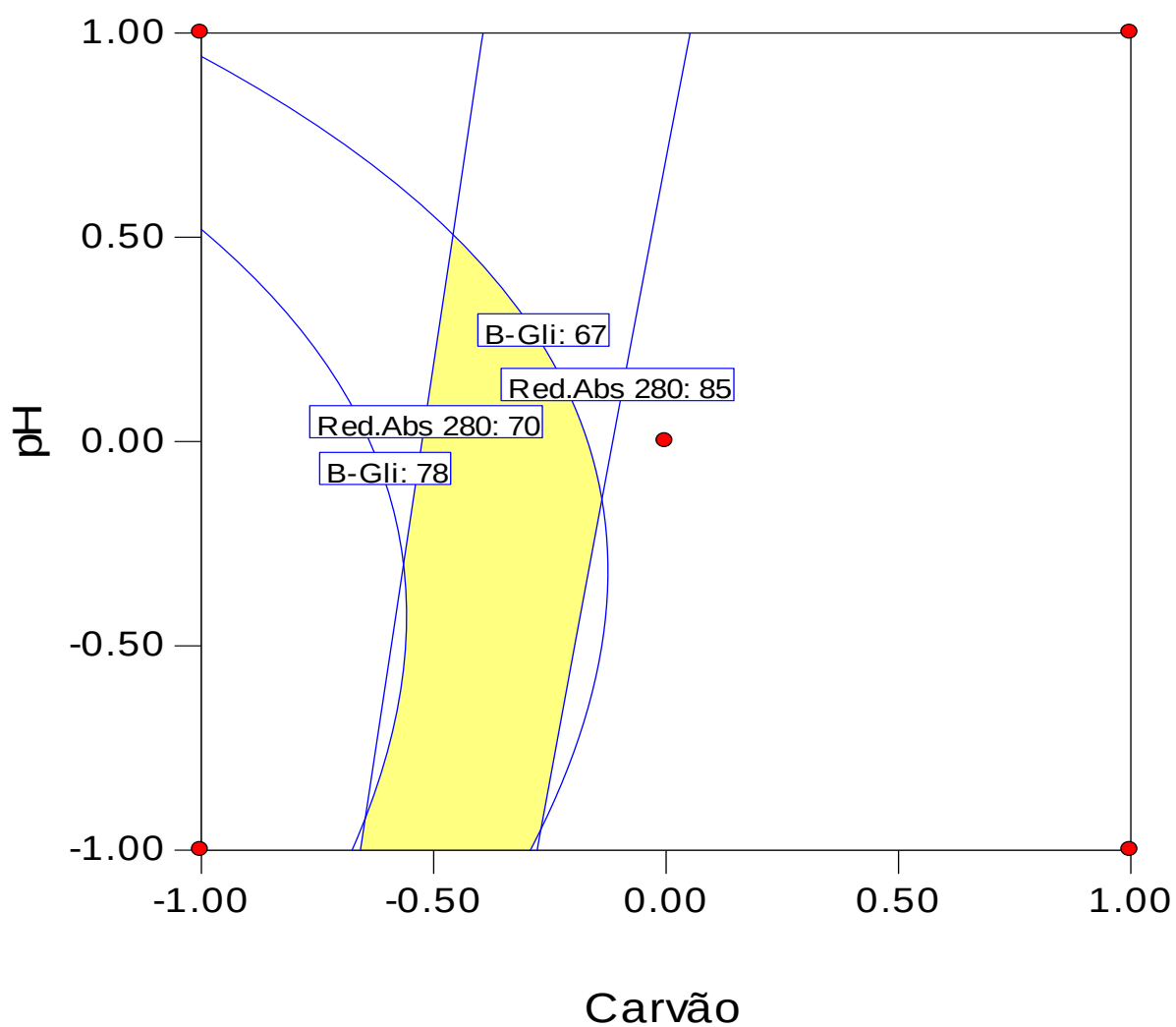


Figura 26. Sobreposição das repostas de atividade de β -glicosidase e redução de absorbância nas condições otimizadas para o extrato obtido da madeira controle.

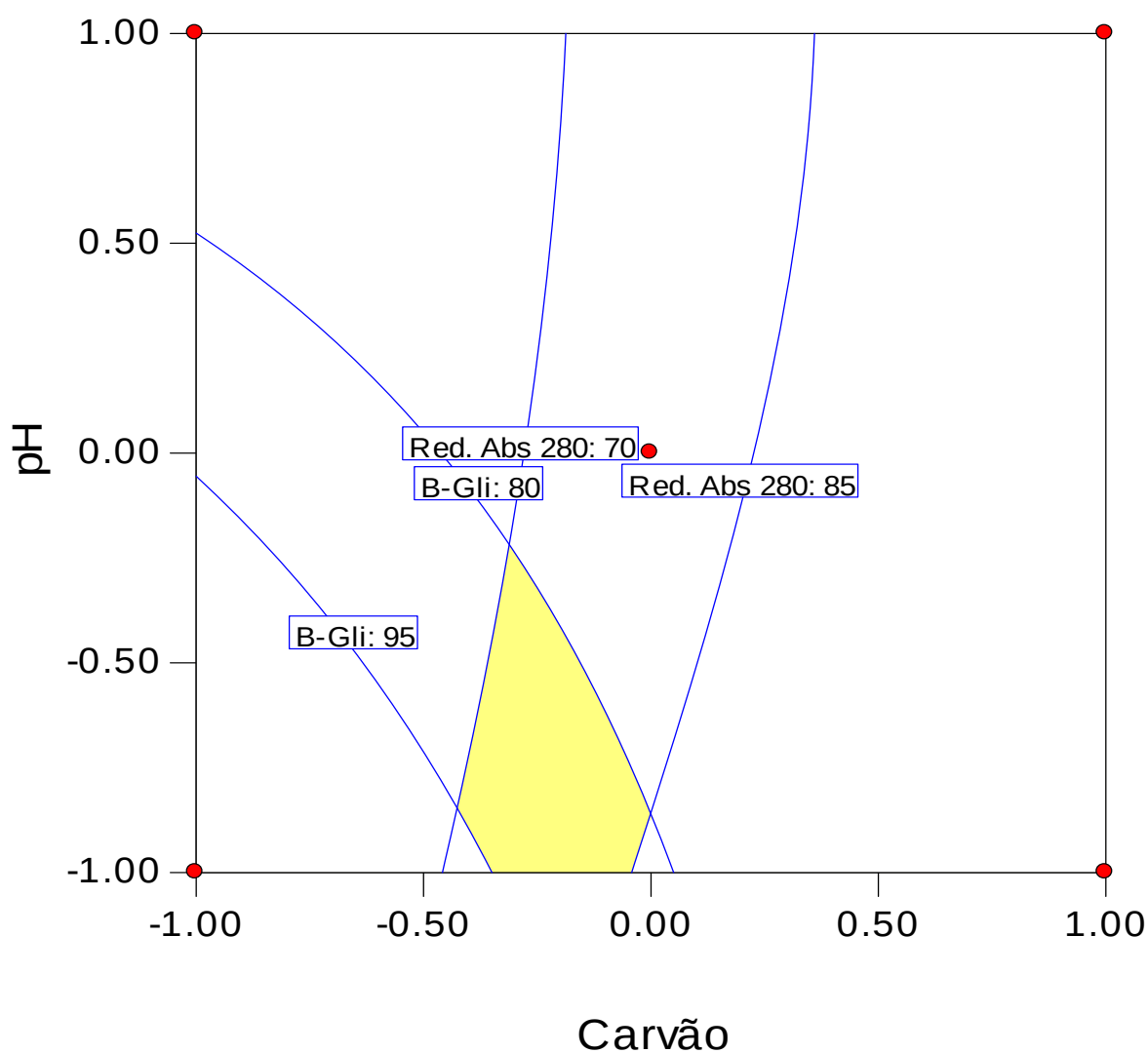


Figura 27. Sobreposição das repostas de atividade de β -glicosidase e redução de absorvância nas condições otimizadas para o extrato de madeira pré-tratada com etanol.

Para os extratos obtidos da madeira extraída com água, previu-se uma atividade de β -glicosidase (β -gli) entre 70 e 80% para uma redução de absorvância a 280 nm (Red. Abs 280) entre 70 e 85%. (Figura 28). Finalmente, a sobreposição das respostas nas condições otimizadas para o extrato cuja madeira foi extraída com etanol e água, permitiu prever uma atividade de β -glicosidase (β -gli) entre 70 e 90% para uma redução de absorvância a 280 nm (Red. Abs 280) entre 70 e 88%. (Figura 29)

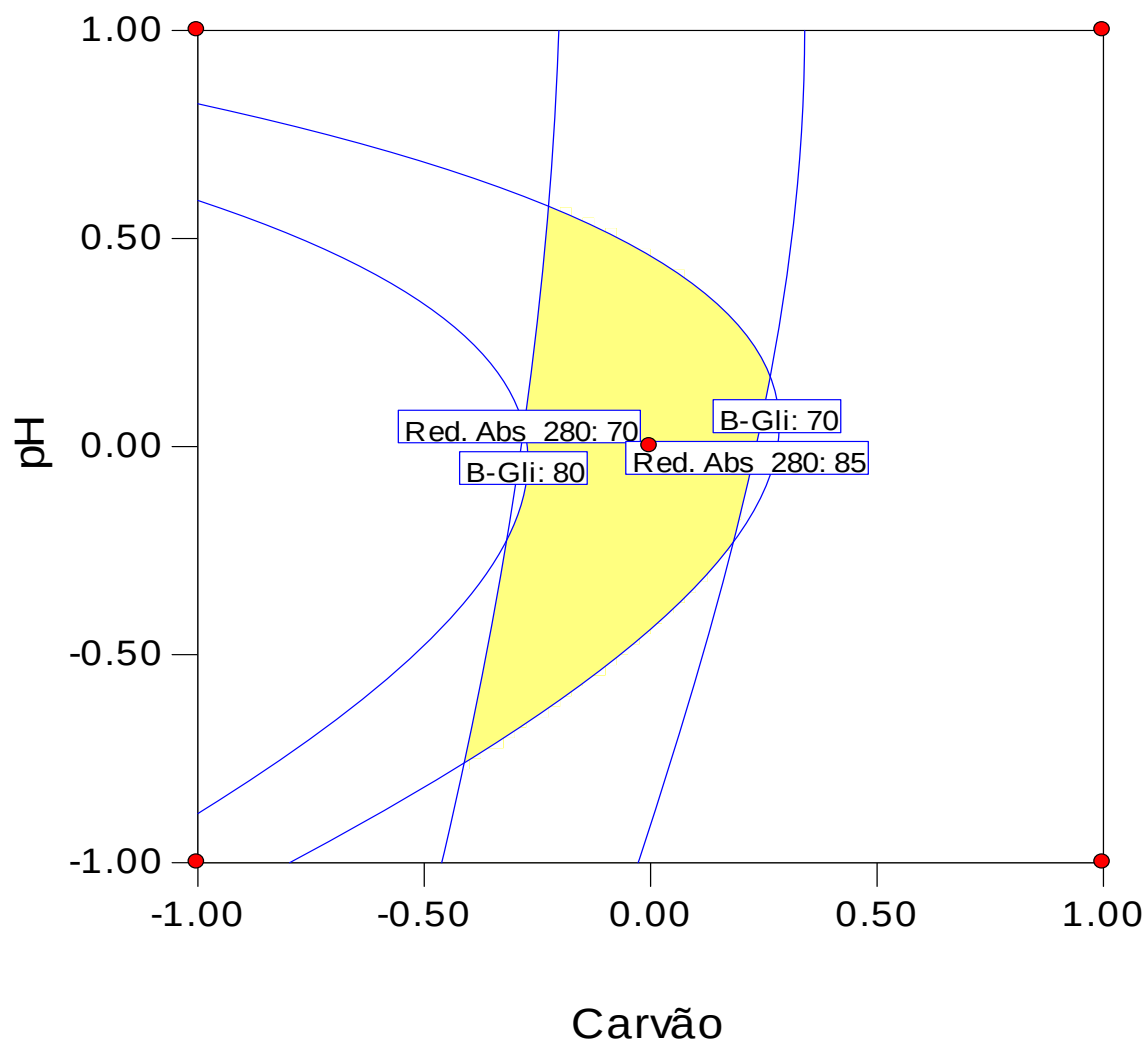


Figura 28. Sobreposição das repostas de atividade de β -glicosidase e redução de absorbância nas condições otimizadas para o extrato de madeira pré-tratada com água.

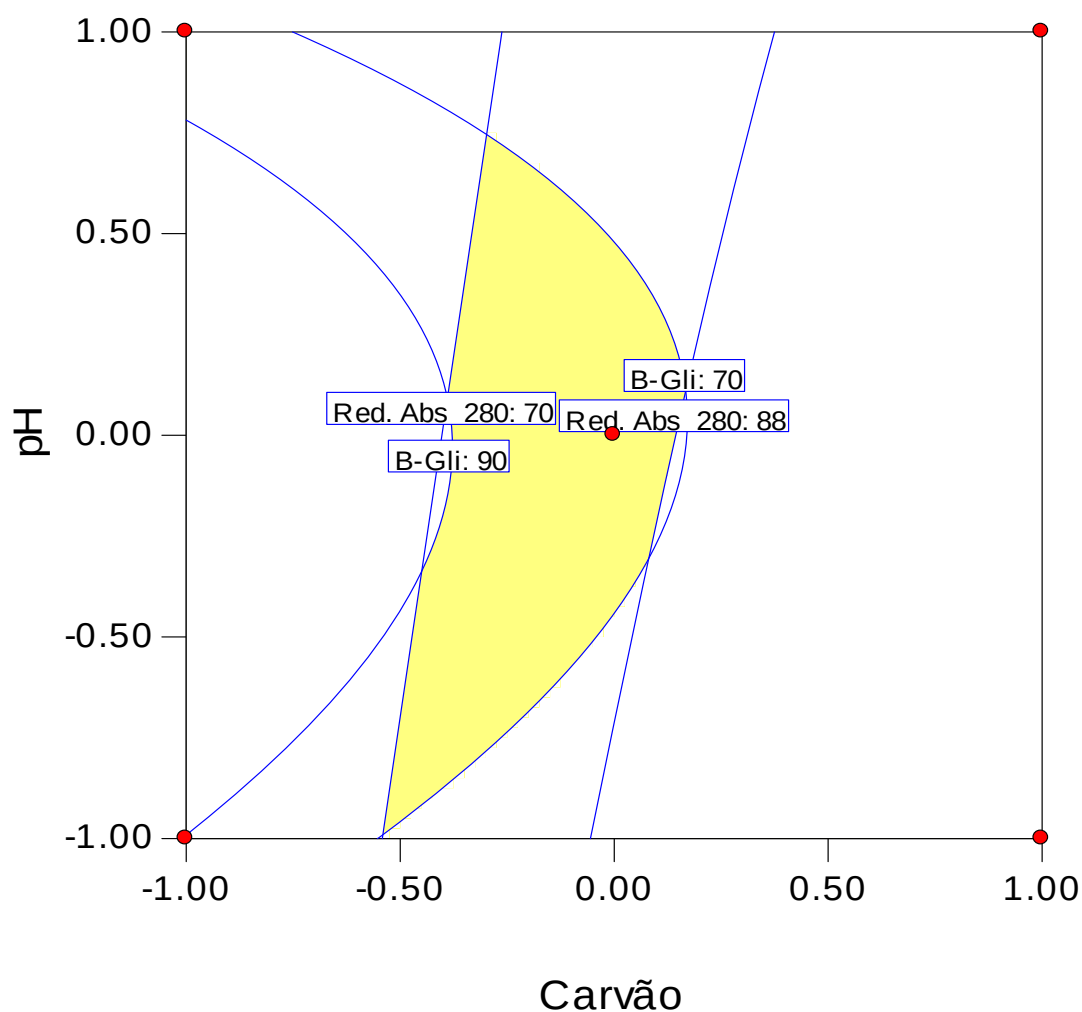


Figura 29. Sobreposição das repostas de atividade de β -glicosidase e redução de absorbância nas condições otimizadas para o extrato de madeira tratada com etanol e água.

4.4.2 OTIMIZAÇÃO PARA AS RESPOSTAS % DE ATIVIDADE DE MANGANÊS PEROXIDASE E REDUÇÃO DE ABSORBÂNCIA A 280 nm.

Para a otimização da resposta % de atividade de manganês peroxidase juntamente com a redução de abs-280, a sobreposição das linhas de contorno também foram obtidas fixando a variável tempo em seu valor mínimo, com exceção da otimização para o extrato obtido pelo cultivo do fungo em madeira tratada com água. Nas figuras a seguir estão representadas as

sobreposições das respostas % de atividade de manganês peroxidase (MnP) e % de redução de absorvância a 280 nm (Red. Abs 280) que permitem prever uma região otimizada dentro de faixas de resposta para cada extrato enzimático.

A sobreposição das respostas nas condições otimizadas para o extrato cuja madeira não sofreu tratamento, permitiu prever uma atividade de MnP entre 90 e 100% para uma redução de abs-280 entre 90 e 96%. (Figura 30)

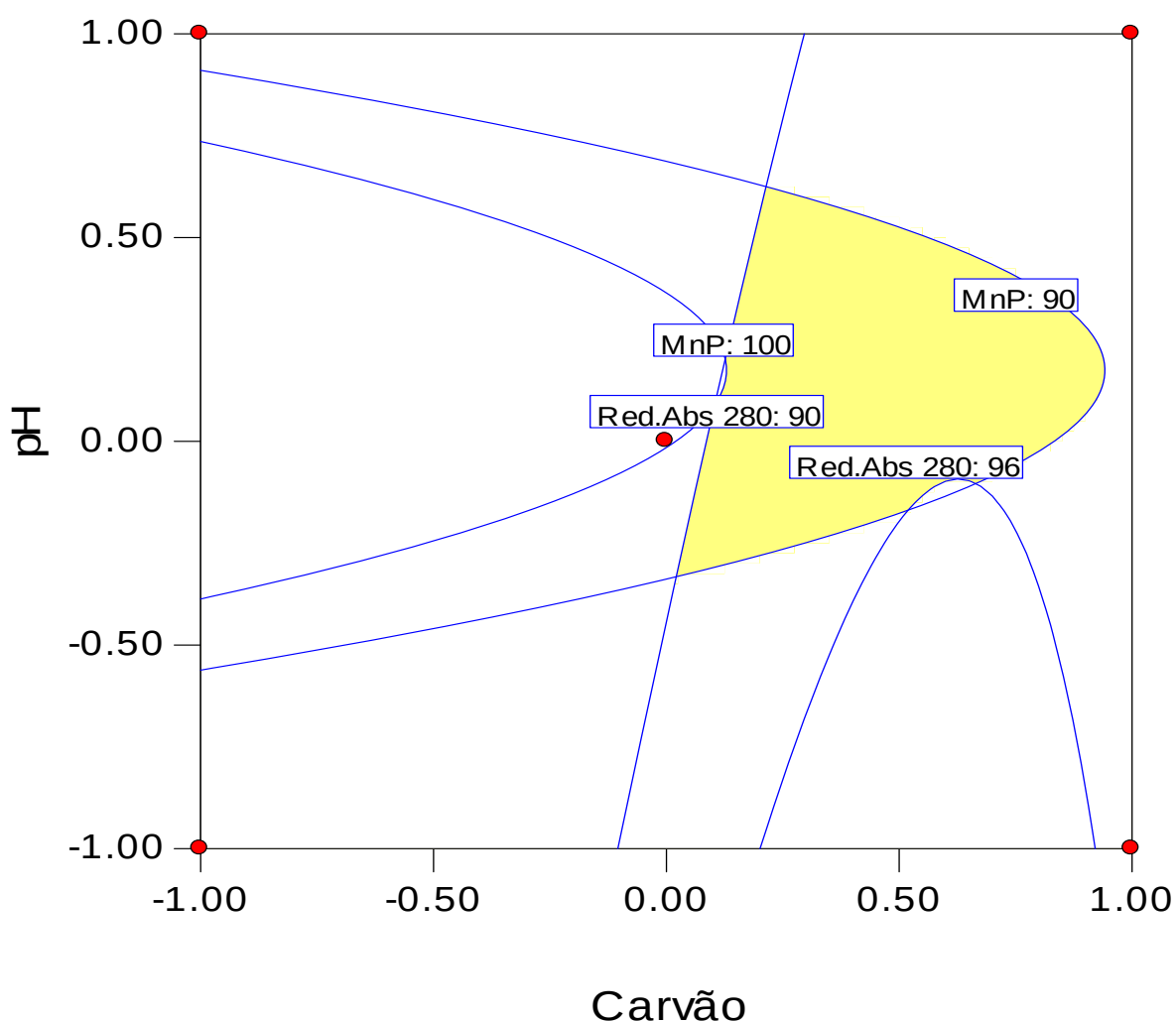


Figura 30. Sobreposição das repostas de atividade de MnP e redução de abs-280 nas condições otimizadas para o extrato de madeira controle (controle).

A sobreposição das respostas nas condições otimizadas para o extrato cuja madeira foi tratada com etanol, permitiu prever uma atividade de MnP entre 75 e 81% para uma redução de abs-280 entre 72 e 85%. (Figura 31).

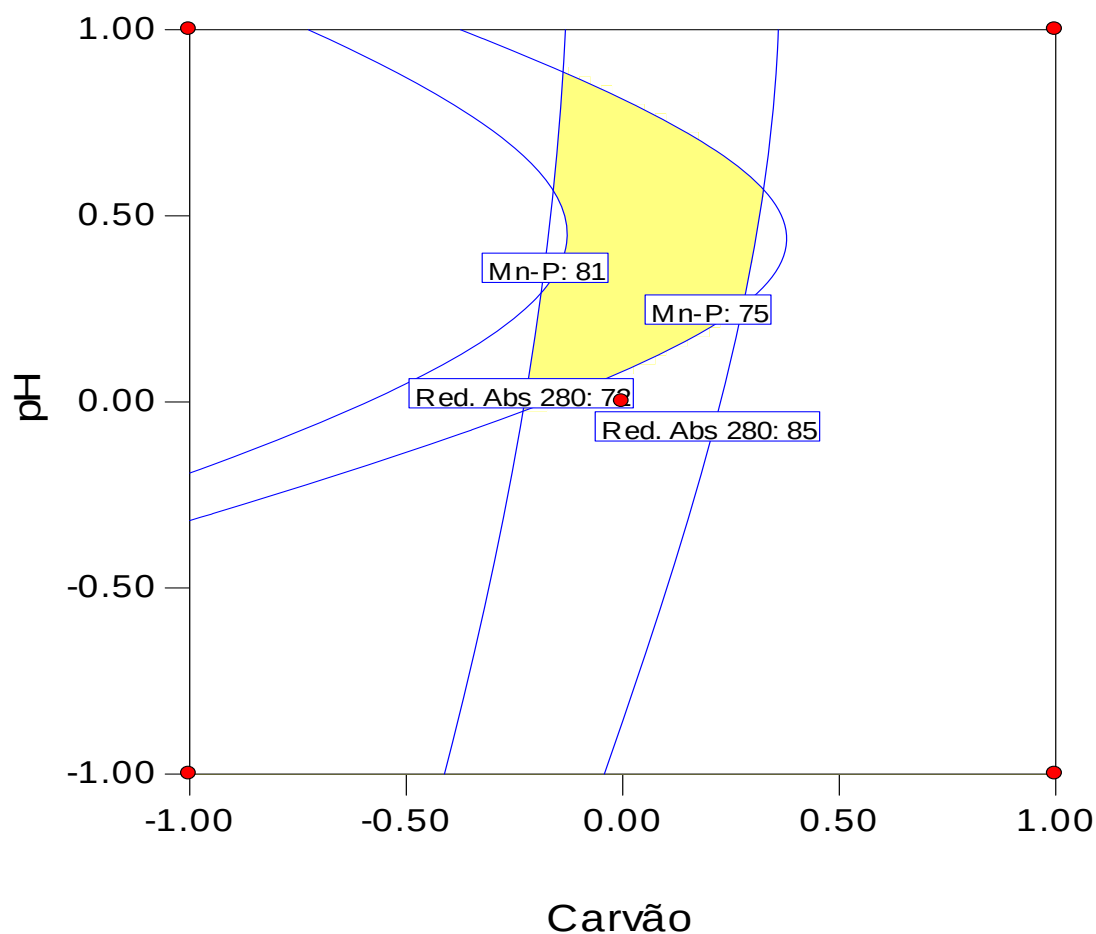


Figura 31. Sobreposição das repostas de atividade de manganês peroxidase e redução de absorvância nas condições otimizadas para o extrato de madeira tratada com etanol.

A sobreposição das respostas nas condições otimizadas para o extrato cuja madeira foi tratada com água, permitiu prever uma atividade de MnP entre 71 e 83% para uma redução de abs-280 entre 75 e 92%. (Figura 32) e as respostas nas condições otimizadas para o extrato cuja madeira foi tratada com etanol e água, permitiu prever uma atividade de MnP entre 80 e 93% para uma redução de abs-280 entre 80 e 93%. (Figura 33). Considerando as otimizações realizadas foi possível obter recuperação de atividade enzimática superior a 70%, com exceção da atividade de β -glicosidase no extrato obtido pelo cultivo do fungo em cavacos original, juntamente com uma redução da absorvância a 280 nm de pelo menos 70%.

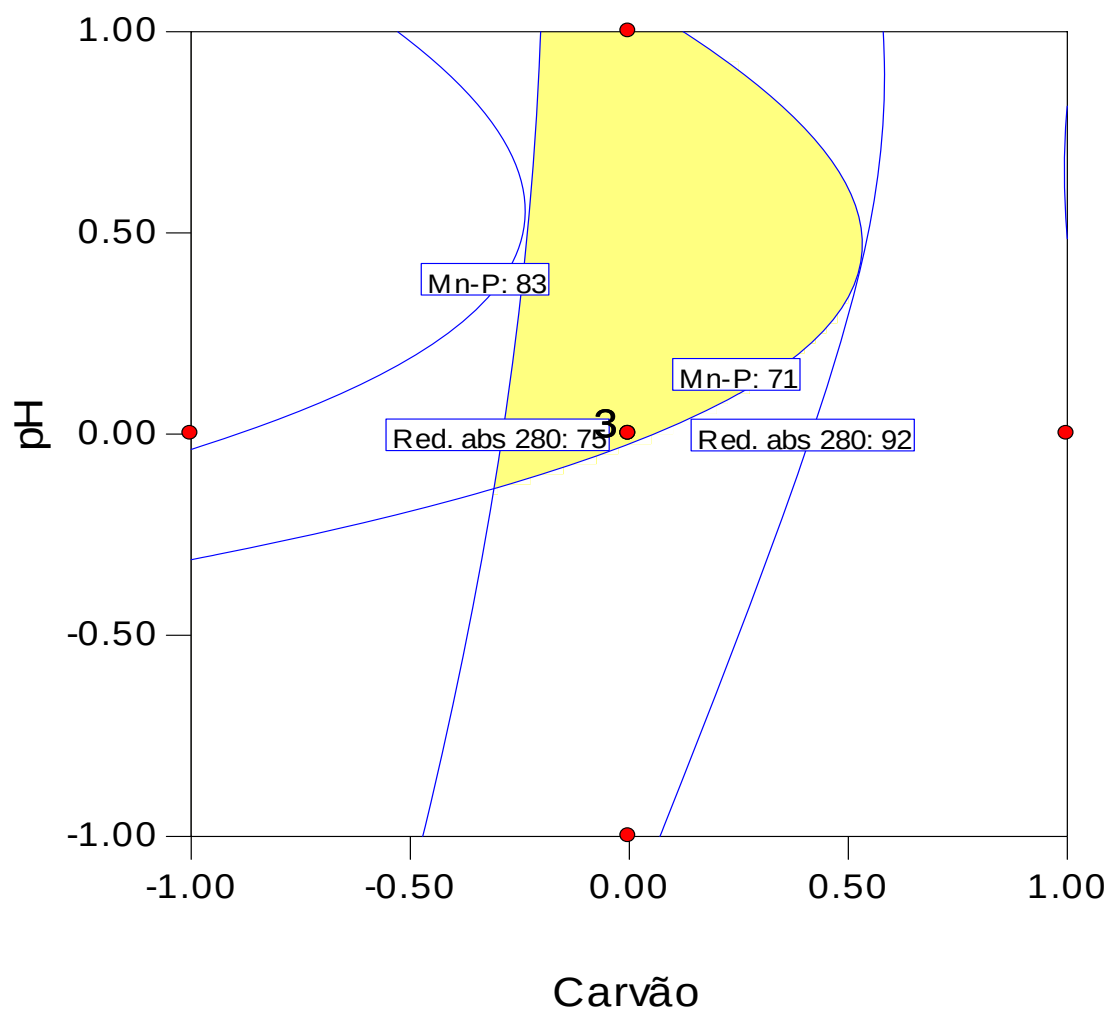


Figura 32. Sobreposição das repostas de atividade de manganês peroxidase e redução de absorbância nas condições otimizadas para o extrato de cuja madeira tratada com água.

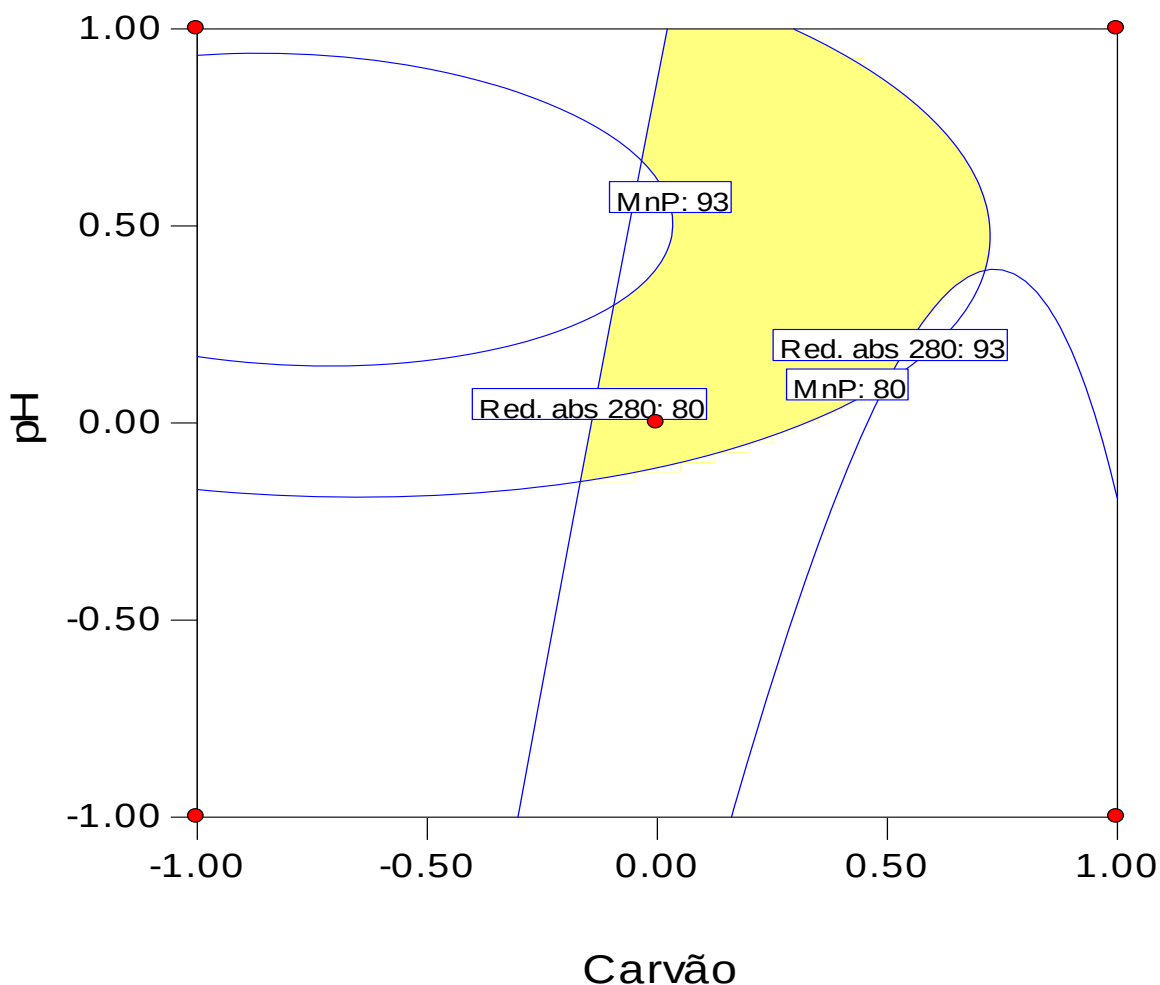


Figura 33. Sobreposição das repostas de atividade de manganês peroxidase e redução de absorvância nas condições otimizadas para o extrato de madeira tratada com etanol e água.

4.4.3 VALIDAÇÃO EXPERIMENTAL

A validação foi realizada através de um ensaio em uma condição selecionada dentro de cada região otimizada. Os resultados obtidos foram comparados com os preditos pelas equações matemáticas dentro de uma faixa de 95% de confiança prevista pelos modelos. Os resultados preditos e observados, assim como as condições selecionadas estão apresentados na tabela 31. Pode-se notar que a grande maioria das respostas observadas encontra-se dentro da faixa predita para 95% de confiança. Tal faixa apresenta intervalo menor quanto maior a significância e o coeficiente de determinação (R^2) do modelo.

A resposta observada para a atividade de manganês peroxidase do extrato IV, assim como a observada para redução de abs-280 nm do extrato III, ambas na validação realizada para MnP e redução da abs-280, apresentaram resultados superiores ao da faixa predita. Tal fato pode ser explicado apenas por variações nas condições experimentais uma vez que todos os modelos foram estatisticamente significativos e não apresentaram falta de ajuste ao nível de 95% de confiança.

Pode-se observar também que o pH ideal para atividade de manganês peroxidase foi selecionado em torno de 4,4 e 4,5, enquanto que para atividade de β -glicosidase o pH selecionado foi entre 3,8 e 4,0 para os extratos I, III e IV e pH 3,0 para o extrato II.

Em relação à concentração de carvão foi observado que é possível a recuperação de manganês peroxidase nos extratos I e IV utilizando maiores concentrações de carvão do que para a recuperação de β -glicosidase, logo a remoção de compostos aromáticos mantendo alta atividade enzimática é mais eficiente nestes extratos. Mesmo utilizando menores concentrações de carvão para o extrato III, obteve-se uma alta redução da Abs-280nm mantendo alta a recuperação de MnP. Resultados semelhantes foram descritos por Carvalho et al., (2007) quando compararam a remoção de impurezas de extratos de madeira. Extratos que apresentaram um teor muito grande de impurezas, permitiram maior seletividade na remoção destas impurezas durante a adsorção em carvão ativo.

Tabela31: Validação dos modelos matemáticos

Tipo de tratamento sofrido pela madeira														
		Nenhum (I)			Etanol (II)			Água (III)			Etanol e água (IV)			
Validação: β -glie e Red. Abs-280 nm	Condições		C (%)	t(min)	pH	C (%)	t(min)	pH	C (%)	t(min)	pH	C (%)	t(min)	pH
	Respostas		3,4	10	3,8	4,2	10	3,0	4,4	10	4,0	3,4	10	3,9
	β -gli (%)	Observada	62,60			82,30			79,19			74,77		
		Predita	73,60			89,40			77,79			90,67		
		Faixa predita	56,7-90,5			80,59-98,19			70,62-84,96			67,38-113,96		
	Red. abs(%)	Observada	76,39			82,23			76,37			73,02		
Predita		76,36			80,07			74,85			70,72			
Faixa predita		74,5-78,2			77,81-82,34			72,85-76,85			67,51-73,94			
Validação: MnP e Red. Abs-280 nm	Condições		C (%)	t(min)	pH	C (%)	t(min)	pH	C (%)	t(min)	pH	C (%)	t(min)	pH
	Respostas		7,8	10	4,4	4,6	10	4,5	4,2	30	4,5	7,8	10	4,5
	MnP (%)	Observada	98,30			80,32			82,21			92,47		
		Predita	90,74			80,54			82,34			80,55		
		Faixa predita	71,38-110,10			73,13-87,95			69,33-95,35			72,41-88,69		
	Red. abs(%)	Observada	93,02			75,30			86,91			89,87		
Predita		94,70			74,31			76,15			92,62			
Faixa predita		92,63-96,76			72,66-75,96			74,92-77,38			89,20-96,06			

C: concentração de carvão ativado, t: tempo de adsorção

4.5 DETERMINAÇÃO DOS COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS POR ESPECTROFOTOMETRIA

Na condição otimizada para a redução da absorbância a 280 nm e recuperação das atividades enzimáticas, anteriormente descritas para cada extrato obtido das madeiras biodegradadas, foi avaliada a remoção de fenóis usando o método de Folin. (Figura 34).

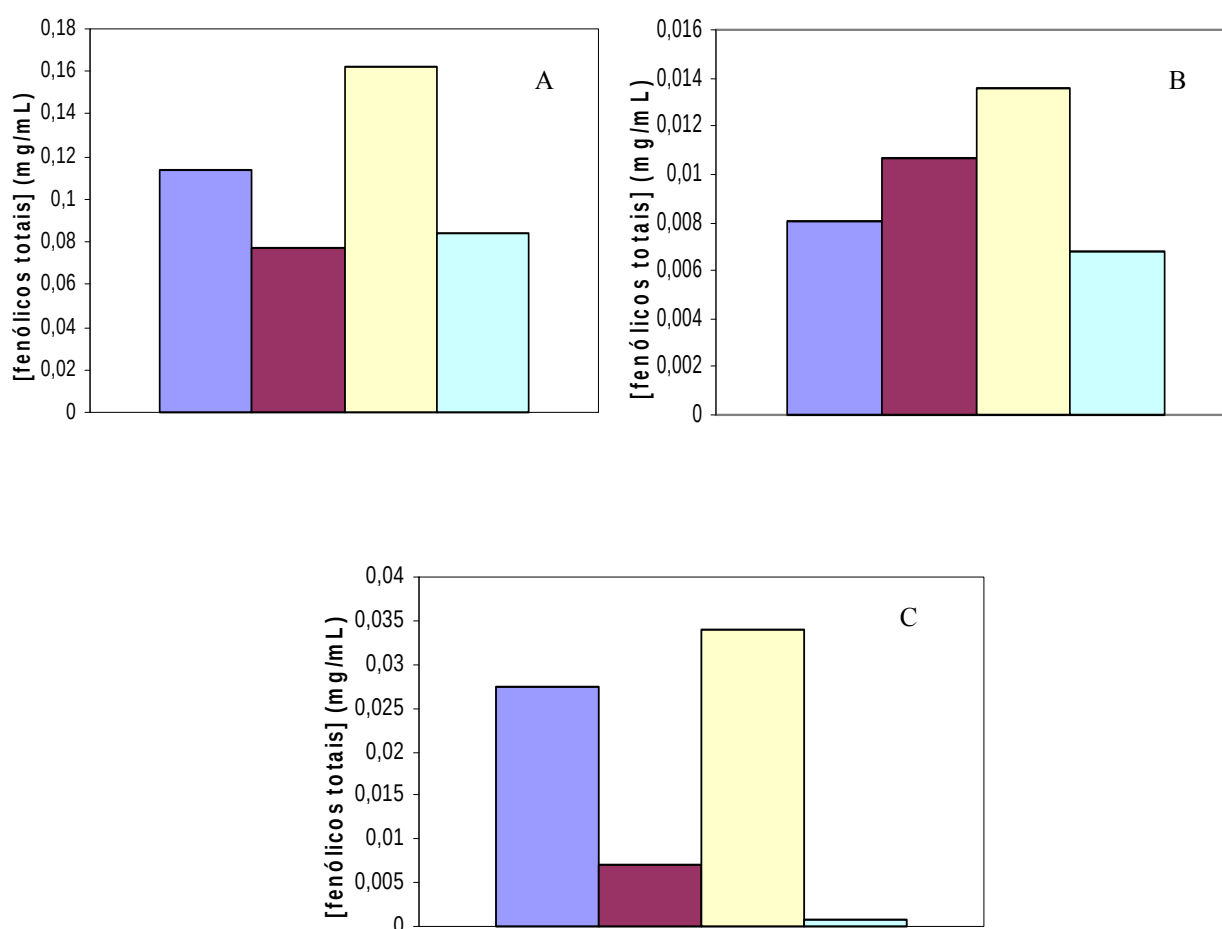


Figura 34. Quantificação dos compostos fenólicos. (A) extratos sem tratamento com carvão (B) extratos tratados nas condições para MnP e (C) extratos tratados nas condições para β -glicosidase.

■ cavaco de eucalipto não tratado ■ cavaco de eucalipto pré-tratado em água ■ cavaco de eucalipto pré-tratado com etanol ■ cavaco de eucalipto pré-tratado com água/etanol

As condições ótimas empregadas no tratamento dos extratos com carvão, para recuperação de MnP, foram mais efetivas para remoção de fenólicos dos extratos controle e etanol/água (Figura 34B). Já no tratamento utilizando as condições para recuperação da β -glicosidase, a maior remoção de compostos fenólicos foi obtida para os extratos água e etanol/água (Figura 34C). A concentração de compostos fenólicos nos extratos otimizados para a extração de MnP foi menor que nos otimizados para a β -glicosidase. Este resultado está relacionado principalmente à concentração de carvão ativado usado para remoção de compostos fenólicos de cada extrato. O pH também foi diferente para cada enzima; o pH usado no tratamento com carvão ativado para a MnP (4,5) foi mais alto que para a β -glicosidase (3,8). Uma das explicações para o poder de adsorção de compostos fenólicos ao carvão ativado baseia-se na ionização do fenol, que ocorre na região alcalina da escala de pH. Porém, a diferença de ionização dos fenóis nesta região do pH (3,8 a 4,5) é insignificante para causar diferenças na adsorção, conforme relatado nos estudos das isotermas de adsorção de fenóis em que os valores não mudaram para pH abaixo de 6,0, em função da baixa dissociação dos fenóis ($pK_a = 9,89$) (DABROWSKI et al., 2005).

Tabela 32 - Comparação entre a porcentagem de remoção de fenólicos e remoção de absorbância a 280 nm.

Extrato	MnP		β -glicosidase.	
	% Remoção de fenólicos totais	% Remoção Abs 280 nm	% Remoção de fenólicos totais	% Remoção Abs 280 nm
Controle	92,9	92,6	75,9	80
Etanol	91,9	74,9	99,2	91,1
Água	86,2	81,9	90,8	82,5
Etanol/água	91,9	92,0	79,0	86,6

As respostas da remoção de fenólicos e redução da absorbância a 280 nm foram calculadas e apresentadas na Tabela 32. Para a enzima MnP foram obtidos valores próximos para ambas as respostas, com exceção do extrato cultivado com a madeira pré-extraída com etanol., no entanto o mesmo não ocorreu quando a análise foi feita para a β -glicosidase.

4.6 CONCENTRAÇÃO DOS EXTRATOS ENZIMÁTICOS

Um volume de 300 ml de cada extrato enzimático foi submetido ao tratamento com carvão ativado nas condições previamente otimizadas. Os extratos clarificados foram aplicados em coluna de troca iônica com a resina DEAE - sepharose CL-6B, visando concentrar as proteínas.

A tabela 33 apresenta as atividades enzimáticas de MnP e a redução de absorbância a 280 nm para cada extrato. Após o tratamento com carvão todos os extratos sofreram redução em suas atividades, o extrato etanol/água teve sua atividade reduzida em até aproximadamente a metade, os outros apresentaram menores reduções em suas atividades.

Após o tratamento com carvão a absorbância a 280 nm reduziu mais de 75% em todos os extratos. Após a passagem dos extratos pela resina de troca iônica observou-se uma menor redução da absorbância, provavelmente porque os extratos já estavam mais limpos, conforme já relatado por Carvalho et al., (2007). Em relação à recuperação da atividade de manganês peroxidase observa-se que foi superior a 100%, provavelmente pela remoção de alguns inibidores da enzima. A cromatografia de troca iônica aumentou as atividades de manganês peroxidase nos extratos de 10 a 56 vezes.

Tabela 33 - Atividades de MnP e porcentagens de redução da absorbância a 280 nm.

Extrato	Tratado com carvão ativado			Concentração em coluna iônica	
	Atividade inicial (UI/mL)	Atividade (UI/mL)	% Redução Abs 280 nm	Atividade (UI/mL)	% Redução Abs 280 nm
Controle	0,52	0,44	89,5	24,77	64,4
Etanol	0,68	0,49	74,9	17,04	25,8
Água	1,49	1,21	81,9	12,82	29,5
Etanol/água	0,67	0,36	92,0	14,50	62,4

As mesmas análises foram feitas para a enzima β -glicosidase e verificou-se após o tratamento com carvão ativado que as atividades sofreram decréscimo, sendo que a máxima redução foi para o extrato controle (mais de 6 vezes) (Tabela 34). A absorbância reduziu mais de 80% em todos os extratos tratados, no entanto quando eles foram concentrados a remoção dos aromáticos foi menos expressiva, com exceção do extrato controle onde a leitura de absorbância a 280 nm foi maior do que o extrato sem tratamento (100%).

Apesar dos extratos apresentarem baixa atividade de β -glicosidase o procedimento de cromatografia aumentou as atividades entre 11 e 57 vezes, no entanto com atividades menores do que para a enzima MnP.

Tabela 34 - Atividades de β -glicosidase e porcentagens de redução de absorbância a 280 nm.

Extrato	Tratado com carvão ativado			Concentração em coluna iônica	
	Atividade inicial (UI/L)	Atividade (UI/L)	% Redução Abs 280 nm	Atividade (UI/L)	% Redução Abs 280 nm
Controle	41	6	87,8	70	>100%
Etanol	52	15	91,1	163	54,0
Água	36	19	82,5	205	59,3
Etanol/água	55	35	86,6	2000	35,5

4.7 ELETROFORESE

Depois de realizada a concentração das proteínas nos extratos tratados com carvão foram feitas diálises em todos os extratos durante 12 horas para remoção do NaCl proveniente da desorção na coluna de troca iônica. Em seguida as amostras dialisadas foram levadas ao liofilizador por um período de 8 horas.

As amostras liofilizadas foram ressuspendidas em 50 μ L de água deionizada e preparadas de acordo com a técnica para as corridas eletroforéticas.

A clarificação com carvão ativado e a concentração em coluna permitiram avaliar o perfil das proteínas presentes nos extratos. Nas figuras 35 e 36, pode ser observado bandas com massas molares aproximadas que foram detectadas em ambos os extratos tratados com carvão para as enzimas MnP e β -glicosidase. A eletroforese dos extratos tratados nas condições para a MnP detectaram bandas maiores com massa molar média de $53,5 \pm 1,8$ kDa. Nenhuma banda apresentou resolução na separação das proteínas indicando a presença de isoenzimas da MnP. Uma explicação para a presença dessas isoenzimas é que elas possuem diferentes afinidades por substratos particulares, devido a importantes diferenças nos aminoácidos localizados ao redor do grupo heme (LOBOS, 2001).

Os resultados também indicam que no extrato etanol/água tratado nas condições determinadas para a β -glicosidase a eletroforese em gel de poliacrilamida apresentou uma banda com massa molar de 102,5 kDa, além das bandas similares apresentadas nos outros extratos. Essas bandas similares presentes nos dois extratos (controle e etanol/água) possuem massa molar $55,7 \pm 0,98$ kDa.

A concentração da proteína de massa molar de 102,5 kDa no extrato etanol/água foi baixa, causando dificuldade em sua detecção pela eletroforese por isso esta não foi demonstrada no seu sentido exato. Magalhães et al. (2005), purificou uma β -glicosidase de *C. subvermispora* com massa molar de 110 kDa que apresentou semelhança às massas molares de β -glicosidases de outros basidiomicetos, como uma β -glicosidase de 116 kDa de *P. chrysosporium* (IGARASHI et al., 2003) e uma de 107 kDa de *S. rolfii* (SHEWALE ; SADANA, 1981). Várias β -glicosidases excretadas por *Schizophyllum commune* e *Neurospora crassa* foram descritas, apresentando massas molares de 96 e 102 kDa e 178, 106 e 43 kDa , respectivamente (YAZDI et al., 2003)

O mesmo perfil protéico em relação a Mnp foi observado em culturas filtradas obtidas pelo *C. subvermispora* crescido em meios líquidos composto de glicose-asparagina suplementado com 2 mM de álcool veratrílico (BLANCHETE, 1992).

Carvalho et al., (2007), também observaram comportamento similar no perfil protéico da MnP provenientes da biodegradação de cavacos de *E. grandis* pelo *C. subvermispora*, obtendo bandas com massas molares de $46,8 \pm 0,6$ kDa e $51,6 \pm 1,0$ kDa.

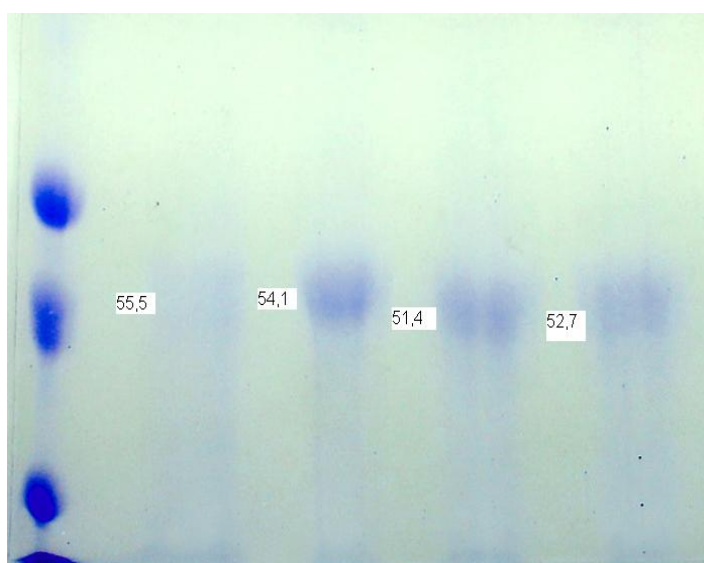


Figura 34. Eletroforese em gel de poliacrilamida corada com coomassie blue para os extratos tratados nas condições para MnP (controle, etanol, água e etanol/água, da esquerda p a direita)

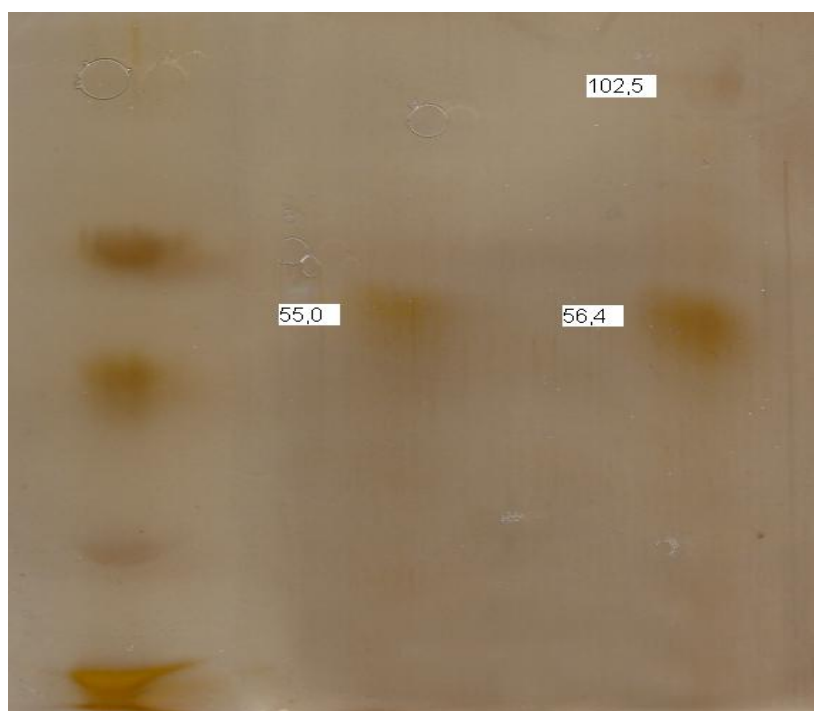


Figura 35. Eletroforese em gel de poliacrilamida corada com nitrato de prata para os extratos controle e etanol/água tratados nas condições para a β -glicosidase. Para determinação das massas molares foram empregados padrões de 66, 45, 29 e 20,1 KDa.

5. CONCLUSÕES

- O crescimento de *C. subvermispora* foi homogêneo até os 40 dias de incubação, e mesmo o cultivo sendo realizado em cavacos com menor teor de extrativos, os extratos não apresentaram redução na presença de pigmentos, podendo concluir que a pigmentação é proveniente da própria biodegradação da madeira.
- A biodegradação dos cavacos de eucalipto por um longo período (40 dias) e com alta carga de inóculo (3000 mg/kg) não favoreceu a produção de altas atividades de xilanases, mananases e β -xilosidases.
- O tratamento com carvão ativado foi eficiente na remoção dos compostos aromáticos, no entanto apesar do processo de tratamento ter sido otimizado ele prejudicou o teor de β -glicosidases que já havia se apresentado baixo.
- As altas atividades de MnP indicam que essa enzima possa ser mais tolerante que as hidrolíticas à acidez da madeira no final do cultivo.
- Foi possível detectar uma β -glicosidase de massa molar de 102,5 kDa e MnPs de $55,7 \pm 0,98$ nos extratos tratados nas condições para β -glicosidase e $53,5 \pm 1,8$ KDa para os extratos tratados nas condições para a MnP.

REFERÊNCIAS

ABBAS, A.; KOC, H.; LIU, F.; TIEN, M. Fungal degradation of wood: initial proteomic analysis of extracellular proteins of *Phanerochaete chrysosporium* grow on oak substrate. Current Genetics, v. 47, p. 49-56, 2005.

AGUIAR, A.; SOUZA-CRUZ, P. B.; FERRAZ, A. Oxalic acid, Fe^{+3} – reduction activity and oxidative enzymes detected in culture recovered *Pinus taeda* wood chips biotreated by *Ceriporiopsis subvermispota*. Enzyme and Microbial Technology, v. 38, p. 873-878, 2004.

AGUIAR, A. Importância dos mediadores de baixa massa molar na biodegradação de madeira por *Ceriporiopsis subvermispota*. Exame de qualificação de Doutorado, 2004. Departamento de Biotecnologia, Faculdade de Engenharia Química de Lorena.

AKHTAR, M.; BLANCHETTE, R. A.; MYERS, G.; KIRK, K. An overview of biochemical pulping research. In: YOUNG R.; AKHTAR M. (Ed.). Environmentally Friendly Technologies for the Pulp and Paper Industry. New York: John Wiley, 1998. p. 309-383.

AKINO, T.; NAKAMURA, N. Characterization of three β -mannanases of an alkalophylic *Bacillus* sp. Agricultural Biological Chemistry. v. 52, p. 773-779, 1988.

ALFENAS, A. C. Eletroforese de enzimas e proteínas afins: fundamentos e aplicações em plantas e microrganismos. Viçosa: ed. Universidade Federal de Viçosa, 1998.

ALFENAS, A. C; PETUS, I.; BRUNE, W.; PASSADOS, G. C. Eletroforese de Proteínas e Isoenzimas de Fungos e Essências Florestais. Viçosa: SIF, 1991, 242p.

AGUIAR, A.; SOUZA-CRUZ, P. B.; FERRAZ, A. Oxalic acid, Fe^{+3} – reduction activity and oxidative enzymes detected in culture extracts recovered from *Pinus taeda* wood chips biotreated by *Ceriporiopsis subvermispota*. Enzyme and Microbial Technology, v. 38, p. 873-879, 2004.

BAILEY, M. J.; BIELY, P.; POUTANEN, K. Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity. Journal of Biotechnology, v. 23, p. 257-270, 1992.

BHAT, M. K.; BHAT, S. Cellulose Degrading enzymes and Their Potential Industrial Applications. Biotechnology Advances, v. 15, n. 3/4, p. 583-620, 1997.

BIELY, P. Microbial xylanolytic systems. Trends in Biotechnology, v. 3, n. 11, p. 286-290, 1985.

BIELY, P.; VRSANSKÁ, M.; TENKANEN, M.; KLUEPFEL, D. Endo- β -1, 4-xylanase families: differences in catalytic proprieties. Journal of Biotechnology, v. 57, p. 151-166, 1997.

BLANCHETTE, R. A. Wood decomposition by *Phellinus (Fomes) pini*: a scanning electron microscopy study. Canada Journal Botanic, v. 58, p. 1496-1503, 1980.

BLANCHETTE, R. A.; KRUEGER, E. W.; HAIGHT, J. E.; AKHTAR, M.; AKIN, D. E. Cell wall alterations in loblolly pine wood decayed by the white-rot fungus, *Ceriporiopsis subvermispora*. Journal of Biotechnology, v. 53, p. 203-213, 1997.

BLANCHETTE, R. A.; BURNES, T. A.; ERDMANS, M. M.; AKHTAR, M. Evaluating isolates of *Pharnerochaete chrysosporium* and *Ceriporiopsis subvermispora* for use in biological pulping process. Holzforschung, v. 46, p. 109-115, 1992.

BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry, v.72, p. 278-254, 1976.

CARVALHO W.; FERRAZ A.; MILAGRES A.M.F. Clean-up and concentration of manganese peroxidases recovered during the biodegradation of *Eucalyptus grandis* by *Ceriporiopsis subvermispora*, Enzyme and Microbial Technology, Doi:10.1016/j.enzmictec.2007.10.010 (2007).

CHARMONT, S.; JAMET, E.; PONT-LEZICA, R.; CANUT, H. Proteomic analysis of secreted proteins from *Arabidopsis thaliana* seedlings: improved recovered following removal of phenolic compounds . Phytochemistry, v. 66, p. 453-461, 2005.

CORTEZ, D. V. Influência dos produtos de degradação da lignina na bioconversão de xilose em xilitol por *Candida guilliermondii*. 2005. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Industrial) - Faculdade de Engenharia Química de Lorena, 112 p.

COUGHLAN, M. P.; HAZLEWOOD, G. P. β -1-4-D-xylan degrading enzyme systems, biochemistry, Molecular biology and applications. Biotechnology Applied Biochemistry, v. 17, p. 259-289, 1993.

DANIEL, G. Microview of Wood under Degradation by Bacteria and Fungi. In: GOODELL, B.; NICHOLAS D. D.; SCHULTZ, T. P. (Eds.). Wood Deterioration and Preservation, Washington: The American Chemical Society, 2003. p. 34-72. (ACS Symposium Series, 845)

DABROWSKI, A.; PODKOSCIELNY, P.; HUBICKI, Z.; BARCZAK, M. Adsorption of phenolic compounds by activated carbon-a critical review. Chemosphere, v.58, p.1049-1070, 2005.

ENOKI, M.; WATANABE, T.; NAKAGAME, S.; KOLLER, K.; MESSNER, K.; HONDA, Y.; KUWAHARA, M. Extracellular lipid peroxidation of selective white-rot fungus, *Ceriporiopsis subvermispora*. FEMS Microbiology Letters, v. 180, p. 205-211, 1999.

ERIKSSON, K. E.; BLANCHETTE, R. A.; ANDER, P. Microbial and enzymatic degradation of wood and wood components. Berlin: Springer – Verlag, 1990, 560 p.

FENGEL, D.; WEGENER, G. Wood: Chemistry, Ultrastructure, Reactions. Berlin: Walter de Gruyter, 1989. 613 p.

FERRAZ, A.; CHRISTOV, L.; AKHTAR, M. Fungal pretreatment for organosolv pulping and dissolving pulp production. In: YOUNG R. AND AKHTAR M. (Eds.), Environmentally Friendly Technologies for the Pulp and Paper Industry. New York: John Wiley, 1998. p. 421-447.

FERRAZ, A.; CÓRDOVA, A. M.; MACHUCA, A. Wood biodegradation and enzyme production by *Ceriporiopsis subvermispora* during solid-state fermentation of *Eucalyptus grandis*. Enzyme and Microbial Technology, v. 32, p. 59-65, 2003.

FERRAZ, A.; MENDONÇA, R.; SILVA, F. T. Organosolv delignification of White and Brown rotted *Eucalyptus grandis* hardwood. Journal of Chemical Technology and Biotechnology, v. 75, p. 18-24, 2000.

FERREIRA, H. M.; FILHO, E. X. Purification and characterization of a β -mannanase from *Trichoderma harzianum* strain T4. Carbohydrate Polymers, v. 57, p. 23-29, 2004.

FRANGOS, T.; BULLEN, D.; BERGQUIST, P.; DANIEL, R. Hemicellulolytic and cellulolytic functions of the domains of a β -mannanase cloned from *Caldicellosiruptor saccharolyticus*. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, v. 31, p. 853-859, 1999.

GÜBITZ, G. M.; HAYN, M.; SOMMERAUER, M.; STEINER, W. Mannan-degrading enzymes from *Sclerotium rolfsii*: Characterization and synergism of two endo β -mannanase and a β -mannosidase. Bioresource Technology, v. 58, p. 127-135, 1996.

GUERRA, A.; MENDONÇA, R.; FERRAZ, A. Molecular weight distribution of wood components extracted from *Pinus taeda* biotreated by *Ceriporiopsis subvermispora*. Enzyme and Microbial Technology, v. 33, p. 12-18, 2003.

GUILARDUCI, V.V. S, et al Adsorção de fenol sobre carvão ativado em meio alcalino. Revista Química Nova, v. 29, n. 6 , p. 1226-1232, 2006.

HAKALA, T. K.; MAIJALA, P.; KONN, J.; HATAKKA, A. Evaluation of novel wood-rotting polypores and corticioid fungi for decay and biopulping of Norway spruce (*Picea abies*) wood. Enzyme and Microbial Technology, v. 34, p. 255-263, 2004.

HAMMEL, K. E.; KAPICH, A. N.; KENNETH, A.; JENSEN, Jr.; ZACHARY, C. R. Reactive oxygen species as agents of wood decay by fungi. Enzyme and Microbial Technology, v. 30, p. 445-453, 2002.

HEIDORNE, F. O.; MAGALHÃES, P. O.; MILAGRES, A. M. F. Characterization of hemicellulases and cellulases produced by *Ceriporiopsis subvermispora* under biopulping conditions. Enzyme and Microbial Technology, v. 38, p. 436-442, 2005

HENRIKSSON, G.; JOHANSSON, G.; PETTERSSON G. A critical review of cellobiose dehydrogenases. Journal of Biotechnology, v. 78, p. 93-113, 2000.

HERNANDES-MACEDO, M. L.; FERRAZ, A.; RODRIGUEZ, J.; OTTOBONI, L. M. M.; DE MELLO, M. P., Iron-regulated proteins in *Phanerochaete chrysosporium* and *Lentinula edodes*: Differential analysis by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis and two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis profiles. Electrophoresis, v. 23, p. 655-661, 2002.

HERNANDEZ-MACEDO, M. L. Produção de sideróforos e identificação de proteínas reguladas por ferro em fungos que degradam madeira. 2001. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, 93p.

HIGUCHI, T. Biosynthesis and Biodegradation of Wood Components. Orlando: Academic Press, 1985.

HILLIS, W. E. Formation and properties of some wood extractives. Phytochemistry, v. 11, p. 1207-1218, 1972.

HOFRICHTER, M. Review: Lignin conversion by manganese peroxidase (MnP). Enzyme and Microbial Technology, v. 30, p. 454-466, 2002.

IGARASHI, K. TANI, T.; RIE, K. ; Masahiro, S. Family 3 β -glucosidase from Cellulose-Degrading Culture of the White-rot Fungus *Phanerochaete chrysosporium* in a glucan 1,3- β -glucosidase. Journal of Bioscience and Bioengineering, v. 12, p. 960-964, 1990.

JIANG, L.; LIN H.E.; FOUNTOULAKIS, M. Comparison of protein precipitation methods for sample preparation prior to proteomic analysis, Journal of Chromatography A, v.1023, p. 317-320, 2004.

KUBICEK, C. P. The Cellulase Proteins of *Trichoderma reesei*: Structure, Multiplicity, Mode of Action and Regulation of Formation. In: FIECHTER A. (Ed), Advances in Biochemical Engineering Biotechnology. Berlin: Springer-Verlag, 1992. v. 45, p. 2-27.

KUHAD, R. C.; SINGH, A.; ERIKSSON, K. E. L. Microorganisms and enzymes involved in the degradation of plant fiber cell walls. In: ERIKSSON, K. E. L. (Ed.) Advances in Biochemical Engineering Biotechnology. Berlin: Springer-Verlag, 1997. v. 57, p. 45-126.

LEUNG, Y.; PANG, C.P. Trends in Proteomics. Trends Biotechnology, v.19, p.480-482, 2001

LI, K.; AZADI, P.; COLLINS, R.;TOLAN, J.; KIM,J.S.; ERIKSSON, K.E.L. Relationships between activities of xylanases and xylan structure. Enzyme and Microbial Technology, v. 27, p. 89-94, 2000.

LI, Y.; CUI, F.; LIU, Z.; XU, Y, ZHAO, H., Improvement of xylanase production by *Penicillium oxalicum* ZH-30 using response surface methodology. Enzyme and Microbial Technology, v. 40, p.1381-1388, 2007.

LOBOS, S.; TELLO, M.; POLANCO, R.; LARRONDO, L. F.; MANUBENS, A.; SALAS, L.; VICUÑA, R. Enzymology and molecular genetics of the ligninolytic system of the basidiomycete *Ceriporiopsis subvermispora*. Current Science, v. 81, p. 992-997, 2001.

MACHUCA, A.; FERRAZ, A. Hydrolytic and oxidative enzymes produced by white-rot fungi during *Eucalyptus grandis* decay in solid medium. Enzyme and Microbial Technology, v. 29, p. 386-391, 2001.

MASARIN, F. Habilidade degradativa de *Ceriporiopsis subvermispora* em cultivos sobre Madeira de *Eucalyptus grandis* nao autoclavado. Exame de qualificação de mestrado, 2005. Departamento de Biotecnologia, Faculdade de Engenharia Química de Lorena.

MESSNER, K.; SREBOTNIK, E. Biopulping: an overview of developments in an environmentally safe paper-making technology FEMS Microbiology Review, v. 13, p. 351-364, 1994.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Analytical Chemistry, v. 31, p. 426-428, 1959.

MUKHERJEE, S.; KUMAR, S.; MISRA, A. K.; FAN, M. Removal of phenols from water environment by activated carbon, bagasse ash and wood charcoal. Chemical Engineering Journal, v. 129, p. 133-142, 2007

MUSSATTO, S.I. Influência do tratamento do hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz para produção de xilitol por *Cândida guilliermondii*. 2002. Dissertação (Mestrado). Departamento de Biotecnologia, Faculdade de Engenharia Química de Lorena.

MUSSATO, I. S.; ROBERTO, I.C. Optimal experimental condition for hemicellulosic hydrolysate treatment with activated charcoal for xylitol production. Biotechnology Progress, v. 20, p. 134-139, 2004.

MUÑOZ, I. G.; UBHAYASEKERA, W.; HENRIKSSON, H.; SZABO, I.; PETTERSSON, G.; JOHANSSON, G.; MOWBRAY, S. L.; STAHLBERG, J. Family 7 Cellobiohydrolases from *Phanerochaete chrysosporium*: Crystal Structure of the Catalytic Module of Cel7D (CBH 58) at 1.32 Å Resolution and Homology Models of the Isozymes. Journal of Molecular Biology, v. 314, p. 1097-1111, 2001.

PARAJO, J.C.; DOMINGUEZ H.; DOMINGUEZ, J. M.; Biotechnological production of xylitol: Operation in culture media made from lignocellulose hydrolysates. Bioresource Technology, v. 66, p. 179-185, 1998

RATTO, M. ; POUTANEN, K. Production of mannan-degrading enzymes. Biotechnology Letters, v. 10, p. 661-664, 1988.

SALAS, C.; LOBOS, S.; LARRAÍN, J.; SALAS, L.; CULLEN, D.; VICUÑA, R. Properties of laccase isoenzymes produced by the basidiomycete *Ceriporiopsis subvermispota*. Biotechnology Applied Biochemistry, v. 21, p. 323-333, 1995.

SARASWAT, V.; BISARIA, V. S. Purification and substrate specificities of xylanase isoenzymes from *Melanocarpus albomyces* IIS 68. Bioscience and Biotechnology Biochemistry, v. 64, n. 6, p. 1173-1180, 2000.

SATO, S.; YOSHIHARA, K.; MORIYAMA, K.; MACHIDA, M.; TATSUMOTO, H. Influence of activated carbon surface acidity on adsorption of heavy metal ions and aromatics from aqueous solution Applied Surface Science v. 253, p. 8554-8559, 2007

SETHURAMAN, A.; AKIN, D. E.; ERIKSSON, K. E. Plant-cell-wall-degrading enzymes produced by the white-rot fungus *Ceriporiopsis subvermispota*. Biotechnology Applied Biochemistry, v. 27, p. 37-47, 1998.

SHEWALE, J. G.; SADANA, J. Purification, Characterization, and Properties of β -glucosidase Enzymes from *Sclerotium rolfsii*. Arquives of Biochemistry and Biophysics. v. 207, p. 185-196, 1981.

SIGOILLOT, C.; LOMASCOLO, A. ; RECORD, E. ; ROBERT, J.L.; ASTHER, M. ; SIGOILLOT, J.C. Lignocellulolytic and hemicellulolytic system of *Pycnoporus cinnabarinus*: isolation and characterization of a cellobiose dehydrogenase and a new xylanase. Enzyme and Microbial Technology, v. 31, p. 876-883, 2002.

SINSABAUGH, R. L.; LIPTAK, M. A. Enzymatic Conversion of Plant Biomass. In: ESSER, K; LEMKE, P. A. The Mycota: A Comprehensive Treatise on Fungi as Experimental Systems for Basic and Applied Research. Berlin: Springer-Verlag, 1997. p. 347-357. (Environmental and Microbial Relationships, IV).

SOTO, M. L.; MOURE, A.; DOMÍNGUEZ, H.; PARAJÓ, J.C. Charcoal adsorption of phenolic compounds present in distilled grape pomace Journal of Food Engineering, v.84, 156-163, 2008.

SOUZA-CRUZ, P. B. S. et al. Extraction and determination of enzymes produced by *Ceriporiopsis subvermispota* during biopulping of *Pinus taeda* wood chips. Enzyme Microbial Technology, v. 34, p. 228-234, 2004.

TAN, L.; MAYERS, P.; SADDLER, J. Purification and characterization of a thermostable xylanase from a thermophilic fungus *Thermoascus aurantiacus*. Canadian Journal of Microbiology, v. 33, p. 689-692, 1987.

TANAKA, M.; TANIGUCHI, M. A.; MATSUMO, R.; KAMIKUBO, T. Purification and Properties of Cellulases from *Eupenicillium javanicum*. Journal Fermentation Technology, v. 59, n.3, p. 177-183, 1981.

VICUÑA, R.; LARRAÍN, J.; LOBOS, S.; SALAS, C.; SALAS, L. Culture conditions of *Ceriporiopsis subvermispota* determine the pattern of MnP isoenzymes. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON BIOTECHNOLOGY IN THE PULP AND PAPER INDUSTRY, 6, 1995, Viena. Proceedings. Viena, 1996. p. 345–350.

VIÑALS, M.V. Aplicação de resinas de troca iônica no tratamento de hidrolisado hemicelulósico para processos fermentativos. 1999 Dissertação (Mestrado) - Departamento de Biotecnologia, Faculdade de Engenharia Química de Lorena.

VICENTIM, M.P. Secreção diferenciada de enzimas lignocelulolíticas durante a biodegradação de madeira por *C. subvermispota* e resposta da madeira biotratada frente a processos posteriores de polpação. 2007 Tese (Doutorado) Departamento de Biotecnologia, Escola de Engenharia de Lorena - USP.

WATANABE, T.; TERANISHI, H.; HONDA, Y.; KUWAHARA, M. A selective lignin-degrading fungus, *Ceriporiopsis subvermispota*, produces alkylitaconates that inhibit the production of a cellulolytic active oxygen species, hydroxyl radical in the presence of iron and H₂O₂. Biochemical and Biophysical Research Communication, v. 297, p. 918-923, 2002.

WESTERMEYER, RB; NAVEN, T. Proteomics in practice: A laboratory manual of proteome analysis Weinheim:Wiley-VCH, 2002. 315p.

WONG, K. K. Y.; SADDLER, J. N. *Trichoderma* xylanases, their properties and application. Critical Reviews in Biotechnology, v. 12, n.5/6, p. 413-435, 1992.

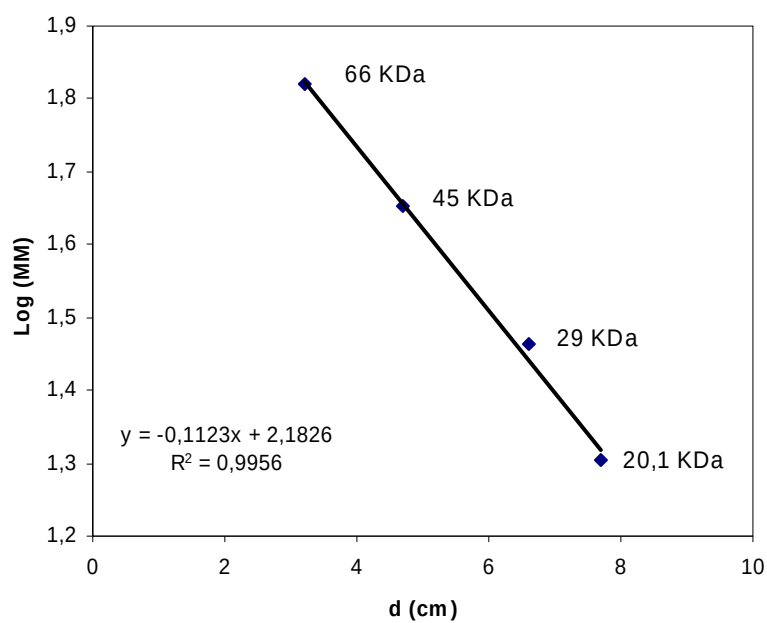
WONG, K. K. Y.; TAN, L. U. L.; SADDLER, J. N. Multiplicity of β -1, 4-xylanase in microorganisms: functions and applications. Microbiology Review, v. 52, p. 305-317, 1988.

XU, B; HÄGGLUND, P.; STALBRAND, H.; JANSON, J. C. Endo- β -1,4-Mannanase from blue mussel, *Mytilus edulis*: purification, characterization, and mode of action. Journal of Biotechnology, v. 92, p. 267-277, 2002.

ZELLNER, M.; WINKLER, W.; HAYDEN, H.; DIESTINGER, M.; ELIASSEN, M.; GESSLBAUER, B.; MILLER, I.; CHANG, M.; KUNGL, A.; ROTH, E.; OEHLER, R. Quantitative validation of different protein precipitation methods in proteome analysis of blood platelets. Electrophoresis, v. 26, p. 1-10, 2005.

APÊNDICE

Curva padrão do log da massa molar *versus* a distância em centímetros percorrida pelas proteínas padrões aplicadas no gel de poliacrilamida. Corrida para os extratos tratados nas condições para a enzima Manganês peroxidase.



Curva padrão do log da massa molar *versus* a distância em centímetros percorrida pelas proteínas padrões aplicadas no gel de poliacrilamida. Corrida para os extratos tratados nas condições para a enzima β -glicosidase.

