

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL  
CAMPUS ERECHIM  
CURSO DE ENGENHARIA AMBIENTAL E SANITÁRIA**

**ANDRESSA JANAINA WARKEN**

**PRODUÇÃO, PURIFICAÇÃO E CONCENTRAÇÃO DE QUERATINASES VIA  
FERMENTAÇÃO SUBMERSA E APLICAÇÃO AMBIENTAL NA REDUÇÃO DA  
CONCENTRAÇÃO DE CROMO EM EFLUENTE SINTÉTICO**

**ERECHIM**

**2023**

**ANDRESSA JANAINA WARKEN**

**PRODUÇÃO, PURIFICAÇÃO E CONCENTRAÇÃO DE QUERATINASES VIA  
FERMENTAÇÃO SUBMERSA E APLICAÇÃO AMBIENTAL NA REDUÇÃO DA  
CONCENTRAÇÃO DE CROMO EM EFLUENTE SINTÉTICO**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Engenharia Ambiental e Sanitária da Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS), como requisito para obtenção do título de Engenheira Ambiental e Sanitarista.

Orientador: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Helen Treichel

**ERECHIM**

**2023**

**Bibliotecas da Universidade Federal da Fronteira Sul - UFFS**

Warcken, Andressa Janaina  
PRODUÇÃO E CONCENTRAÇÃO DE QUERATINASES VIA  
FERMENTAÇÃO SUBMERSA E APLICAÇÃO NA REDUÇÃO DA  
CONCENTRAÇÃO DE CROMO EM EFLUENTE SINTÉTICO / Andressa  
Janaina Warcken. -- 2023.  
34 f.

Orientadora: Doutora Helen Treichel

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) -  
Universidade Federal da Fronteira Sul, Curso de  
Bacharelado em Engenharia Ambiental e Sanitária,  
Erechim,RS, 2023.

1. enzima. 2. efluente. 3. concentração enzimática.  
I. Treichel, Helen, orient. II. Universidade Federal da  
Fronteira Sul. III. Título.

**ANDRESSA JANAINA WARKEN**

**PRODUÇÃO, PURIFICAÇÃO E CONCENTRAÇÃO DE QUERATINASES VIA  
FERMENTAÇÃO SUBMERSA E APLICAÇÃO AMBIENTAL NA REDUÇÃO DA  
CONCENTRAÇÃO DE CROMO EM EFLUENTE SINTÉTICO**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Engenharia Ambiental e Sanitária da Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS), como requisito para obtenção do título de Engenheira Ambiental e Sanitarista.

Este trabalho foi defendido e aprovado pela banca em 16/02/2023.

**BANCA EXAMINADORA**

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Helen Treichel – UFFS  
Orientadora

Prof. Dr. João Paulo Bender – UFFS  
Avaliador

Me.<sup>a</sup> Charline Bonatto – UFFS  
Avaliador

## RESUMO

A extensa produção de resíduos queratinosos no Brasil, devido à alta produtividade de aves e suínos, gera anualmente uma carga significativa de materiais de difícil degradação natural que requerem atenção no contexto ambiental. Neste sentido, a produção de queratinases, enzimas proteolíticas com especificidade para a degradação da queratina contida em estruturas como pelos, penas, bicos, cabelos e cascos, via processos fermentativos de baixo custo utilizando microrganismos com afinidade para a produção destas, se faz de suma importância no contexto ambiental e econômico, visando à diminuição da carga descartada e valorização de subprodutos do setor agroindustrial. Diante disso, este trabalho avaliou a produção de queratinases via biotecnológica em biorreator batelada e processos de concentração das enzimas produzidas através de Sistema Aquoso Bifásico (SAB), contendo polietilenoglicol e diferentes sais e solventes. O extrato foi caracterizado frente a diferentes pH e temperaturas demonstrando melhores resultados quando exposto a valores maiores para ambas as características analisadas. Além disso foi avaliado o potencial do substrato reduzir a concentração de cromo em efluente sintético de dicromato de potássio com concentração inicial de 20 mg/L de cromo, com leituras em espectrofotômetro segundo a metodologia descrita no Standad Methods, com a presença de 1% de substrato p/v, mantida em agitador orbital a 150rpm e 28°C. O extrato resultante do processo fermentativo apresentou resultados promissores de purificação para a precipitação sal/solvente, utilizando-se acetona e cloreto de sódio em 5 diferentes condições avaliadas, com fator de purificação variando entre 1,16 e 1,92. Com a utilização do sal sulfato de amônio, foi possível obter 1,37 de fator de purificação, e 1,58 quando o sistema foi elaborado numa proporção de 50% para a relação enzima/solvente e 0,5 mol/L de sal. Quanto às análises realizadas com o substrato restante após o final da fermentação este apresentou uma diminuição de 44,91% de sua massa inicial em decorrência de sua degradação durante o processo. Ainda utilizando-se o substrato seco ao fim da fermentação, ocorreu uma redução de 93,45% da concentração de cromo hexavalente após 9 horas em agitador orbital. Desta forma, o estudo demonstrou-se relevante para a produção de queratinases, com aplicabilidade ambiental posterior e possibilidade de concentração do extrato via processos de baixo custo.

Palavras-chave: Subprodutos. Enzimas. Concentração. Purificação. Metais pesados.

## ABSTRACT

The extensive production of keratinous waste in Brazil, due to the high productivity of poultry and pigs, annually generates a significant load of materials of difficult natural degradation that require attention in the environmental context. In this sense, the production of keratinases, proteolytic enzymes with specificity for the degradation of keratin contained in structures such as hairs, feathers, beaks, hair and hooves, via low-cost fermentation processes using microorganisms with affinity for their production, is of paramount importance in the environmental and economic context, aiming at reducing the load discarded and valorization of by-products from the agro-industrial sector. Therefore, this work evaluated the production of keratinases via biotechnology in batch bioreactor and concentration processes of the enzymes produced through a Biphasic Aqueous System (BAS), containing polyethylene glycol and different salts and solvents. The extract was characterized against different pH and temperatures showing better results when exposed to higher values for both analyzed characteristics. In addition, the potential of the substrate to reduce the concentration of chromium in synthetic effluent of potassium dichromate with initial concentration of 20 mg/L of chromium was evaluated with readings in spectrophotometer according to the methodology described in Standard Methods, with the presence of 1% w/v substrate, maintained on orbital shaker at 150 rpm and 28°C. The extract resulting from the fermentative process showed promising purification results for the salt/solvent precipitation, using acetone and sodium chloride in 5 different conditions evaluated, with purification factor ranging between 1.16 and 1.92. With the use of ammonium sulfate salt, it was possible to obtain 1.37 of purification factor, and 1.58 when the system was prepared in a proportion of 50% for the enzyme/solvent ratio and 0.5 mol/L of salt. As for the analyses performed with the remaining substrate after the end of the fermentation, it showed a decrease of 44.91% of its initial mass due to its degradation during the process. Still using the dried substrate at the end of fermentation, there was a 93.45% reduction in the concentration of hexavalent chromium after 9 hours in an orbital shaker. Thus, the study proved to be relevant for the production of keratinases, with subsequent environmental applicability and the possibility of concentrating the extract via low-cost processes.

Keywords: By-products. Enzymes. Concentration. Purification. Heavy metals.

## SUMÁRIO

|              |   |           |
|--------------|---|-----------|
| <b>1</b>     | <b>INTRODUÇÃO .....</b>   | <b>1</b>  |
| <b>2</b>     | <b>OBJETIVOS .....</b>  | <b>4</b>  |
| <b>2.1</b>   | <b>GERAL .....</b>  | <b>4</b>  |
| <b>2.2</b>   | <b>ESPECÍFICOS .....</b>  | <b>4</b>  |
| <b>3</b>     | <b>MATERIAL E MÉTODOS .....</b>   | <b>5</b>  |
| <b>3.1</b>   | <b>MATÉRIA-PRIMA .....</b>  | <b>5</b>  |
| <b>3.2</b>   | <b>MICROORGANISMO .....</b>   | <b>5</b>  |
| <b>3.3</b>   | <b>PRODUÇÃO DE QUERATINASES .....</b>   | <b>6</b>  |
| <b>3.3.1</b> | <b>Medida de atividade enzimática .....</b>   | <b>6</b>  |
| <b>3.3.2</b> | <b>Determinação do teor de proteína .....</b>   | <b>7</b>  |
| <b>3.4</b>   | <b>AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DO EXTRATO ENZIMÁTICO .....</b>                                  | <b>7</b>  |
| <b>3.5</b>   | <b>CARACTERIZAÇÃO DO EXTRATO ENZIMÁTICO EM DIFERENTES<br/>PH E TEMPERATURAS .....</b>         | <b>7</b>  |
| <b>3.6</b>   | <b>DEGRADAÇÃO DO SUBSTRATO QUERATINOSO .....</b>  | <b>7</b>  |
| <b>3.7</b>   | <b>CONCENTRAÇÃO ENZIMÁTICA .....</b>  | <b>8</b>  |
| <b>3.7.1</b> | <b>Sistema Aquoso Bifásico .....</b>  | <b>8</b>  |
| <b>3.7.2</b> | <b>Precipitação com solventes .....</b>   | <b>8</b>  |
| <b>3.7.3</b> | <b>Fator de Purificação .....</b>   | <b>9</b>  |
| <b>3.8</b>   | <b>AVALIAÇÃO DO SUBSTRATO FRENTE À REDUÇÃO DE<br/>CONCENTRAÇÃO DE CROMO HEXAVALENTE .....</b> | <b>9</b>  |
| <b>3.9</b>   | <b>TRATAMENTO ESTATÍSTICO .....</b>   | <b>10</b> |
| <b>4</b>     | <b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>   | <b>11</b> |
| <b>4.1</b>   | <b>ATIVIDADES ENZIMÁTICAS E ESPECÍFICAS .....</b>   | <b>11</b> |
| <b>4.2</b>   | <b>CARACTERIZAÇÃO DO EXTRATO ENZIMÁTICO .....</b>   | <b>12</b> |
| <b>4.3</b>   | <b>SISTEMA AQUOSO BIFÁSICO .....</b>  | <b>14</b> |
| <b>4.4</b>   | <b>PRECIPITAÇÃO SAL/SOLVENTE .....</b>  | <b>16</b> |
| <b>4.5</b>   | <b>CAPTURE DE ÍONS DE CROMO .....</b>   | <b>22</b> |
| <b>5</b>     | <b>CONCLUSÕES .....</b>   | <b>25</b> |
|              | <b>REFERÊNCIAS .....</b>  | <b>26</b> |

## 1 INTRODUÇÃO

O Brasil é atualmente o 4º maior produtor de carne suína do mundo e em 2020 produziu mais de 4,4 milhões de toneladas, segundo a Associação Brasileira de Proteína Animal (2021). Neste sentido a quantidade de resíduos gerados por esse setor é significativa, gerando uma preocupação com a sustentabilidade produtiva destes processos. O pelo suíno juntamente com penas, bicos, lã, unhas e cascos são fontes de queratina, proteína rígida e fibrosa amplamente encontrada em resíduos advindos de processamentos de mamíferos e aves (REDDY et al., 2021).

A queratina é uma proteína fibrosa obtida principalmente de biomassa animal e encontrada também no corpo humano, podendo ser dividida em  $\alpha$ -queratina (compostas por cordões em espiral) e  $\beta$ -queratina (estrutura em folha que pode ser subdividida em ácida ou alcalina conforme o tamanho de sua estrutura), o primeiro tipo de estrutura pode ser principalmente encontrado em tecidos, cabelos, unhas, chifres e cascos, e a segunda forma estrutural em unhas, garras e bicos (HOLKAR, 2018)

Estas estruturas tridimensionais são de difícil degradação, compostas de ligações dissulfeto, pontes de hidrogênio, compostos de enxofre e interações hidrofóbicas apresentando resistência e impermeabilidade (HOLKAR et al., 2018; MAZOTTO et al., 2011; RIFFEL et al., 2003; CĂLIN et al., 2017; GOPINATH et al., 2015).

A presença de inúmeras ligações dissulfeto unidas a cadeias peptídicas nestas estruturas as tornam insolúveis, impermeáveis e resistentes à atuação de enzimas proteases como pepsina e tripsina. Quanto a presença de aminoácidos sulfurados, podem ser classificadas também em mole ou dura, sendo a segunda com alto teor de cistina e contendo a forma de  $\alpha$ -queratina (GOPINATH et al., 2015; KORNITOWICZ-KOWALSKA, 2011).

Devido a difícil degradação de resíduos contendo queratina, estes se tornam um agravante à sustentabilidade ambiental tendo em vista sua geração em larga escala pelo setor agroindustrial, gerando a necessidade da gestão e utilização destes subprodutos, diminuindo a carga descartada e agregando valor ao resíduo que é gerado, favorecendo, portanto, os aspectos ambientais e socioeconômicos (WANG et al., 2016).

As queratinases (EC3.4.21/24/99.11) são uma categoria de metaloproteases que hidrolisam as queratinas devido a sua alta especificidade por esse tipo de substrato (BRANDELLI; DAROIT; RIFFEL, 2010; KOTHARI; RANI; GOYAL, 2016). Essas enzimas podem ser obtidas comercialmente via química ou via biotecnológica por meio de processos fermentativos de baixo custo e ambientalmente adequados, através de uma série de microrganismos para hidrolisar a queratina presente em ligações peptídicas (PARINAYAWANICH, 2021).

A produção de queratinases por meio de processos fermentativos utilizando como substrato resíduos queratinosos aliado à microrganismos que apresentam afinidade para a produção destas enzimas, apresentando estabilidade em pH alcalino e determinadas faixas de temperatura. Apesar do baixo custo, a produção desta enzima é relativamente baixa o que torna a sua forma comercial com alto valor agregado em decorrência de sua produção não ser via processos que utilizem subprodutos ou por meio biotecnológicos (HERZOG et al., 2015; KOTHARI; RANI; GOYAL, 2016).

Devido à baixa produção desta enzima, a ampliação de escala para este fim via biotecnológica utilizando resíduos queratinosos se demonstra viável com o intuito de agregar valor a estes resíduos e gerar um processo de baixo custo, podendo ser posteriormente aplicado em vários processos, como na produção de fertilizantes e biogás, a partir do hidrolisado de queratina (DIPANKAR; BHAN, 2019; HASSAN et al., 2020), aditivos de detergentes, no processamento de couro e nas indústrias farmacêuticas e têxteis (DIPANKAR; BHAN, 2019; HASSAN et al., 2020).

Técnicas de concentração enzimática se tornam relevantes após processos fermentativos para a sua produção visando melhorar os resultados obtidos para a atividade específica da enzima, por meio de métodos simples e de baixo custo. Neste sentido o Sistema Aquoso Bifásico (SAB) é uma técnica envolvendo um sal e um polímero ou dois polímeros, formando uma solução em duas fases líquidas imiscíveis que apresenta características importantes para o crescimento microbiano, que acontece em uma das fases do processo. Esta técnica se demonstra viável para a aplicação na purificação e concentração de enzimas em substituição a outras técnicas como cromatografia e ultrafiltração, de maneira a tornar o processo mais rápido e com menor custo (KEE et al., 2022; SANTOS et al., 2022).

A concentração enzimática por sal/solvente é uma técnica utilizada para precipitação de enzima quando combinada a um solvente orgânico e um agente iônico, os solventes

proporcionam a atração entre as moléculas de proteínas devido à baixa constante dielétrica em comparação com a água, permitindo a precipitação enzimática devido à substituição do volume de água pelo solvente, tornando a região hidrofóbica mais solúvel, podendo-se aumentar a força iônica da solução através da adição de sais (CORTEZ e PESSOA JR, 1999).

A indústria de produção e curtição de couro gera em seus processos efluentes contendo metais pesados como o cromo hexavalente. Materiais advindo de subprodutos como pelos suínos pré-tratados apresentam potencial ao serem utilizados na remoção deste metal em efluentes, sendo um tratamento de baixo custo que por meio da utilização de subprodutos que seriam inicialmente descartados pelas indústrias por incineração ou destinados a aterros, possibilita a solução de um problema ambiental devido à alta produção destes (de PARIS JUNIOR et al., 2019).

Portanto, a realização desse trabalho justifica-se pela utilização de resíduos queratinosos, como pelos suínos, para a produção de queratinases em larga escala via fermentação submersa, utilizando fungos, em biorreator, mostrando-se uma alternativa viável de produção desta enzima, de modo a agregar maior valor ao substrato obtido ao final do processo e suas aplicações posteriores em indústrias farmacêuticas, cosméticas, de produtos animais, tratamento de efluentes que contenham metais pesados, dentre outras.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 GERAL**

Avaliar a produção de queratinases via fermentação submersa em reator de batelada, utilizando microrganismos com potencial de produção dessa enzima, bem como caracterizar e avaliar a estabilidade enzimática, além de concentrar a enzima, visando posterior aplicação na área ambiental.

### **2.2 ESPECÍFICOS**

- ❖ Avaliar a produção da enzima queratinases em biorreator;
- ❖ Caracterizar o extrato enzimático em diferentes pHs e temperaturas;
- ❖ Avaliar a estabilidade enzimática ao longo do tempo;
- ❖ Concentrar e purificar o extrato enzimático resultante do processo fermentativo;
- ❖ Avaliar a remoção de cromo hexavalente de efluente sintético;

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 MATÉRIA-PRIMA

O resíduo de pelos de suínos foram coletados de uma agroindústria local e armazenados em embalagens de polietileno a  $-4^{\circ}\text{C}$ . O resíduo passou por uma redução de carga microbiana, conforme adaptação das metodologias de Calin e colaboradores (2017) e Preczeski e colaboradores (2020), o resíduo foi lavado em água corrente e posteriormente seco a  $60^{\circ}\text{C}$ .

#### 3.2 MICRORGANISMO

O microrganismo com potencial de produção de queratinases que foi utilizado neste estudo foi o *Aspergillus niger*, armazenado em estufa BOD a  $-4^{\circ}\text{C}$ , no laboratório de Microbiologia e Bioprocessos da Universidade Federal da Fronteira Sul – UFFS, Campus Erechim/RS

O microrganismo foi cultivado em placas de Petri, Figura 1, com meio de cultura Ágar Batata Dextrose por um período de 10 dias, em shaker à temperatura constante de  $28^{\circ}\text{C}$  e sem agitação mecânica.

Figura 1. Microrganismo *Aspergillus niger* após os 10 dias de crescimento



Fonte: A autora, 2023.

### **3.3 PRODUÇÃO DE QUERATINASES**

A produção de queratinases foi realizada em biorreator com agitação mecânica e volume total de 5 L (BIOTEC, Tecnal), conforme adaptação da metodologia de Preczeski e colaboradores (2020). Foram adicionados 3 L de tampão TRIS HCl 50 mM pH 8,5 e 10 g/L de pelos suínos como substrato queratinosos, como única fonte de carbono, nitrogênio e fosforo. Posteriormente foi realizada a esterilização do biorreator em autoclave a 120°C e 1,1 atm por 40 minutos (BONATTO et al., 2020).

Após a esterilização do biorreator foi adicionado o inóculo contendo  $10^6$  esporos do microrganismo com potencial de produção de queratinases, com volume final de 50 mL/L do volume total do processo.

A produção de queratinases foi avaliada a cada 24 horas por nove dias a fim de acompanhar a atividade queratinolítica, sendo cessada ao nono dia, pois testes preliminares demonstraram que a maior atividade enzimática após este período diminui.

#### **3.3.1 Medida de atividade enzimática**

A medida de atividade queratinolítica foi realizada conforme adaptação de Bressolier e colaboradores (1999). Uma amostra de 0,8 mL do extrato enzimático foi misturada com 3,2 mL de tampão TRIS HCl 50 mM pH 8,5 e 0,013 g de azoqueratina comercial (SIGMAALDRICH Keratin Azure K8500). A mistura foi para banho ultratermostático a 50 °C por 1 hora. Após esse tempo a reação foi cessada com 0,8 mL de ácido tricloroacético 10% e posteriormente feita a medida de absorbância a 595 nm. Uma unidade de atividade é definida como a quantidade de enzima que resulta em um aumento na absorbância de 0,01 U após um processo reacional de uma hora.

As amostras foram avaliadas em triplicata, com branco sem a presença do extrato enzimático.

### **3.3.2 Determinação do teor de proteína**

O teor de proteína do extrato enzimático foi determinado por meio do método de Bradford (1976), utilizando albumina de soro bovino como padrão (SIGMA A3294).

### **3.4 AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DO EXTRATO ENZIMÁTICO**

A estabilidade enzimática do extrato obtido foi avaliada a cada sete dias após a fermentação finalizar, sendo este extrato armazenado de -4°C a 10°C até a sua utilização. Para a avaliação da estabilidade foram realizadas medidas de atividade enzimática e específica do extrato semanalmente durante o período de um mês.

### **3.5 CARACTERIZAÇÃO DO EXTRATO ENZIMÁTICO EM DIFERENTES pH E TEMPERATURAS**

O extrato enzimático obtido a partir das fermentações em biorreator foi caracterizado quanto à diferentes pHs da faixa alcalina (ANBU et al., 2005; KOTHARI; RANI; GOYAL, 2016) e temperaturas entre 40°C e 70°C.

Foram avaliados os tampões Carbonato/Bicarbonato em pH 10 e 10,62, Tampão Tris HCl 50mM pH 8,5 e tampão fosfato de sódio 50mM pH 7,0, sob respectivas temperaturas de 70°C, 50°C, 78,28°C e 70°C. Os pontos experimentais foram determinados através de planejamento experimental com Delineamento Composto Central Rotacional 2<sup>2</sup>, com variação de pH e temperatura conforme descrito anteriormente.

### **3.6 DEGRADAÇÃO DO SUBSTRATO QUERATINOSO**

A degradação do substrato foi avaliada pela diferença entre o extrato seco inicial utilizado durante a fermentação em relação à massa seca de substrato ao final da fermentação.

Para a avaliação da diferença de massa, o substrato queratinoso foi seco em mufla a 105°C por um período de 24 horas e pesado em balança analítica.

### **3.7 CONCENTRAÇÃO ENZIMÁTICA**

#### **3.7.1 Sistema Aquoso Bifásico**

A concentração da enzima foi realizada via Sistema Aquoso Bifásico (SAB), utilizando um sistema sal/polímero a fim de promover uma separação de fases entre estes (topo e fundo), conforme a metodologia proposta por Albertsson (1986).

Para a preparação dos sistemas, os mesmos foram elaborados de forma que seja composta por uma solução A de 50% peso/volume de polietilenoglicol (PEG) com massa molar de 1500, e uma solução B composta por 40% de peso/volume de sal. Os testes foram realizados utilizando os sais cloreto de sódio e sulfato de amônio.

Os sistemas foram compostos com diferentes proporções entre as soluções A e B com o intuito de verificar qual a melhor situação para a enzima, após a mistura ser adicionada a tubos de ensaio com volume de 25 mL a homogeneização foi realizada em vórtex e posteriormente deixada em repouso por 20 minutos em banho de gelo até que ocorre a separação das fases. A atividade enzimática foi realizada para cada fase obtida.

#### **3.7.2 Precipitação com solventes**

A precipitação sal/solvente realizada nos testes preliminares foi executada em condições fixas contendo 0,8mol/L de sal, solvente orgânico a concentração de 80% e utilizando-se bomba peristáltica com vazão de 10mL/min foi realizada conforme metodologia de Preszeski et al, (2018).

As fases foram separadas em amostras, onde a fase precipitada será dissolvida em 5 mL de tampão Tris HCl pH 8,5. Nos testes preliminares foi realizado um procedimento de

“screening”, avaliando-se diferentes solventes (acetona, etanol, N-propílico, Iso-propílico, Iso-butílico e Tert-butílico) em condições com, e sem sal.

### 3.7.3 Fator de Purificação

O Fator de Purificação (FP) quanto a remoção de impurezas do extrato obtido através do processo fermentativo foi calculado segundo a Equação 1, com medidas do extrato bruto e concentrado pela atividade enzimática específica através do método de Bradford (1976).

$$FP = \frac{A_c}{A_b}$$

Em que:

FP = Fator de Purificação;

$A_c$  = Atividade específica do extrato concentrado;

$A_b$  = Atividade específica do extrato bruto.

## 3.8 AVALIAÇÃO DO SUBSTRATO FRENTE À REDUÇÃO DE CONCENTRAÇÃO DE CROMO HEXAVALENTE

O substrato queratinoso seco ao final da fermentação foi avaliado quanto a sua absorção de íons metálicos de efluente sintético com a utilização de uma concentração conhecida de diferentes metais por diferença entre as concentrações inicial e final da solução submetida ao extrato.

Para avaliar a capacidade de redução de concentração de Cromo Hexavalente foi utilizado o método colorimétrico contido no Standard Methods com a utilização de difenilcarbazida P.A. ( $C_{13}H_{14}N_4O$ ), em solução contendo 250mg de difenilcarbazida diluídas em 50ml de acetona P.A., com leitura em espectrofotômetro em 540nm e curva de calibração previamente estabelecida.

Para a realização do experimento foram adicionados 1% e 5% m/v de substrato de pelos suínos em erlenmeyers contendo 100mL de solução de dicromato de potássio, com concentração de  $20\text{mg L}^{-1}$  de cromo, permanecendo sob agitação em agitador orbital a

150rpm e 28°C, as amostras foram de 10mL cada as quais foram adicionados 2 mL da solução contendo difenilcarbazida.

A curva de calibração foi realizada através de uma solução mãe de dicromato de potássio com diferentes pontos de diluição para amostras entre 0,05mg e 1,5mg de cromo.

### **3.9 TRATAMENTO ESTATÍSTICO**

Foi realizado planejamento de experimentos para os testes realizados com a aplicação de Delineamento Composto Central (DCC) e Delineamento Composto Central Rotacional (DCR), a fim de determinar as condições ótimas e a faixa de atuação de cada parâmetro e combinação destes, com análise dos valores de “p valor” e comparação “f calculado” em relação ao “f tabelado”, além do grau de confiança para a validação do modelo obtido. O tratamento estatístico dos dados foi realizado utilizando o “software” Protimiza Experimental Design (<https://experimental-design.protimiza.com.br/>).

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 ATIVIDADES ENZIMÁTICAS E ESPECÍFICAS

A avaliação da produção do extrato foi feita até o nono dia, com medições diárias da atividade enzimática e atividade específica de queratinases, onde foi cessada, para utilização do extrato obtido quando este estivesse com a maior atividade obtida, tendo em vista que após este período ocorre a diminuição dos resultados de atividade obtidos em relação ao dia que ocorre a finalização da fermentação segundo os testes preliminares executados. A figura 2 demonstra o extrato enzimático sendo produzido em biorreator sob agitação e controle de temperatura. A Tabela 1 apresenta os resultados obtidos durante o processo fermentativo.

Figura 2. Processo fermentativo em biorreator.



Fonte: A autora, 2023.

Tabela 1. Atividade enzimática e específica resultante do processo fermentativo ao longo do período de nove dias

| Dia | Atividade enzimática U/mL | Atividade específica U/mg |
|-----|---------------------------|---------------------------|
| 1   | 26,50 ± 0,41              | 174,97 ± 4,78             |
| 2   | 38,67 ± 5,20              | 322,62 ± 1,03             |
| 3   | 30,17 ± 2,32              | 171,97 ± 2,32             |
| 4   | 47,50 ± 7,76              | 269,11 ± 1,08             |
| 5   | 34,17 ± 5,63              | 330,08 ± 2,25             |
| 6   | 44,00 ± 1,08              | 159,62 ± 7,64             |
| 7   | 43,33 ± 2,78              | 216,15 ± 7,88             |
| 8   | 85,67 ± 1,03              | 393,12 ± 1,55             |
| 9   | 88,67 ± 2,09              | 402,86 ± 2,46             |

Fonte: A autora, 2023.

Quanto à redução da massa do substrato utilizado, para a realização da fermentação foram adicionados 30,09g de pelos suínos e ao final da fermentação houve uma redução na massa de substrato no meio fermentativo resultando em uma diminuição de 44,91% de seu peso seco, resultando em 16,58g de substrato quando se findou o processo. Portanto ocorreu uma redução relevante na quantidade do substrato utilizado devido a sua degradação durante a fermentação, sendo as maiores atividades alcançadas no nono dia do processo.

Quanto a estabilidade do extrato enzimático após o final da fermentação este apresentou em tempos maiores que 9 dias atividades enzimáticas e específicas máximas 50 U/mL e 250 U/mg respectivamente, não ocorrendo variações significativas durante o período de um mês.

#### 4.2 CARACTERIZAÇÃO DO EXTRATO ENZIMÁTICO

A caracterização do extrato foi realizada em diferentes temperaturas e pH. Quanto ao comportamento do extrato obtido em pH entre 6,38 e 10,62 e temperatura entre 21 e 78°C, por meio dos tampões Tris HCl 50 mM pH 8,5, Carbonato/Bicarbonato de Sódio 50 mM pH 10 e 10,62 e Fosfato de Sódio 50 mM pH 6,38 e 7,0. Os resultados podem ser observado na

Tabela 2, a figura 3 demonstra a curva de contorno obtida através do Delineamento Composto Central Rotacional realizado.

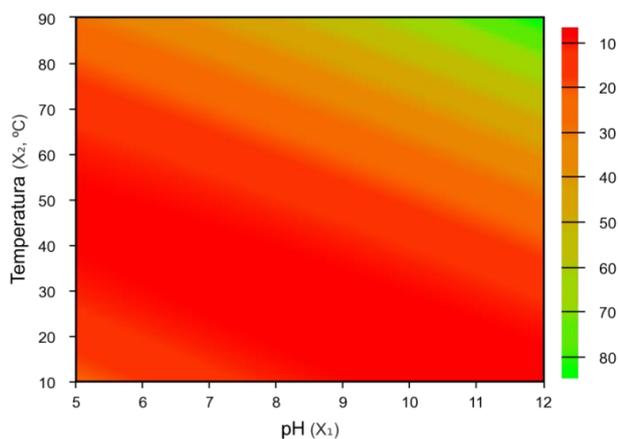
Tabela 2. Caracterização do extrato enzimático frente a diferentes pH e temperaturas para avaliar a faixa ótima de atuação da enzima resultante do processo fermentativo

| Ensaio | pH           | Temp. (C°)    | Atividade (U/mL) |
|--------|--------------|---------------|------------------|
| 1      | -1 (7)       | -1 (30)       | 5,13             |
| 2      | 1 (10)       | -1 (30)       | 7,17             |
| 3      | -1 (7)       | 1 (70)        | 26,99            |
| 4      | 1 (10)       | 1 (70)        | 59,57            |
| 5      | -1,41 (6,38) | 0 (50)        | 10,99            |
| 6      | 1,41 (10,62) | 0 (50)        | 21,56            |
| 7      | 0 (8,5)      | -1,41 (21,72) | 13,98            |
| 8      | 0 (8,5)      | 1,41 (78,28)  | 46,28            |
| 9      | 0 (8,5)      | 0 (50)        | 13,71            |
| 10     | 0 (8,5)      | 0 (50)        | 13,21            |
| 11     | 0 (8,5)      | 0 (50)        | 13,52            |

Fonte: A autora, 2023.

A atividade enzimática demonstra que o extrato obtido apresenta respostas melhores quanto submetido à combinação de maiores temperaturas e pHs através de análise estatística com 95% de confiança pelo “software” Protimiza Experimental Design. Com modelo valido para a curva obtida com  $R^2$  de 0,947, p valor  $< 0,05$  e  $F_{calc}$  3,5 vezes maior que  $F_{tab}$ .

Figura 3. Curva de contorno para a relação temperatura versus pH.



Fonte: A autora, 2023.

Os resultados obtidos para caracterização enzimática são similares aos obtidos por Zhang et al. (2019), onde os testes propostos pelos autores demonstraram uma maior atividade para a enzima queratinase em temperaturas de 50 a 70°C e em pHs neutros a alcalinos na faixa de 7,0 e 11,0, com faixa ótima obtida em pH 10,0 e temperatura de 60°C.

### 4.3 SISTEMA AQUOSO BIFÁSICO

Após a realização de testes preliminares para o SAB e posterior aplicação de Delineamento Composto Central (DCC) com variação na concentração de sal e PEG no sistema, apenas um ponto demonstrou FP maior que 1 para a fase topo utilizando cloreto de sódio. Em todos os sistemas a enzima concentrou-se na fase de topo devido a afinidade desta com a fase salina pode ser observada visualmente conforme a Figura 4.

Figura 4. SAB com extrato queratinoso.



Fonte: A autora, 2023.

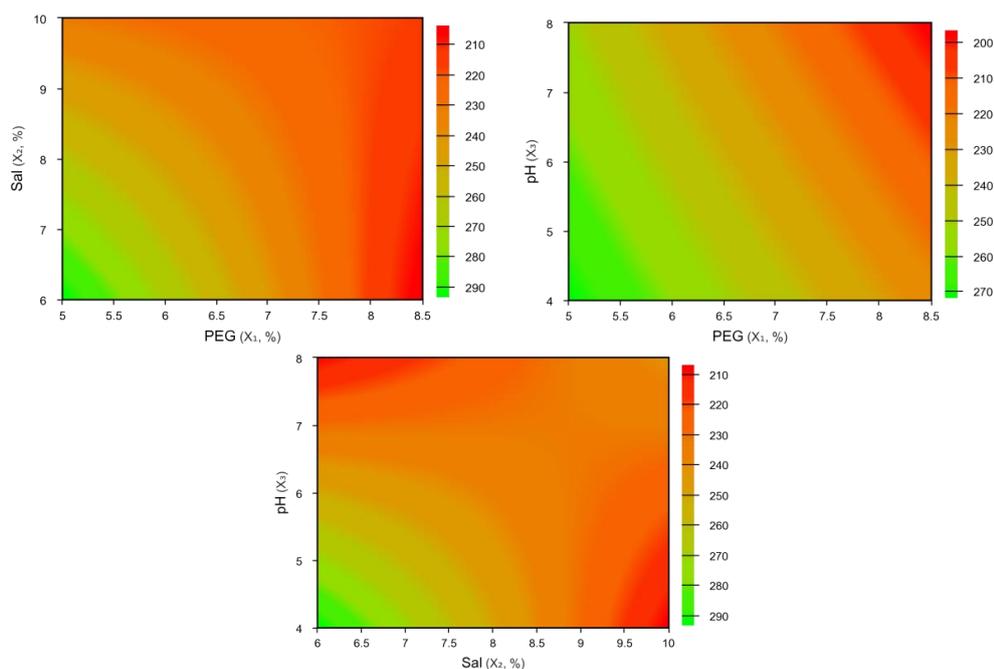
Tabela 3. Resultados DCC de SAB utilizando o sal cloreto de sódio e PEG 1500.

| Ensaio | PEG (% v/v) | Sal (% v/v) | pH     | Atividade Específica (U/mg) | Fator de Purificação |
|--------|-------------|-------------|--------|-----------------------------|----------------------|
| 1      | 15 (-1)     | 14 (-1)     | 4 (-1) | 331,45                      | 1,28                 |
| 2      | 25 (+1)     | 14 (-1)     | 4 (-1) | 247,22                      | 0,95                 |
| 3      | 15 (-1)     | 22 (+1)     | 4 (-1) | 214,80                      | 0,83                 |
| 4      | 25 (+1)     | 22 (+1)     | 4 (-1) | 209,31                      | 0,81                 |
| 5      | 15 (-1)     | 14 (-1)     | 8 (+1) | 250,22                      | 0,96                 |
| 6      | 25 (+1)     | 14 (-1)     | 8 (+1) | 172,98                      | 0,67                 |
| 7      | 15 (-1)     | 22 (+1)     | 8 (+1) | 254,51                      | 0,98                 |
| 8      | 25 (+1)     | 22 (+1)     | 8 (+1) | 228,16                      | 0,88                 |
| 9      | 20 (0)      | 18 (0)      | 6 (0)  | 232,39                      | 0,90                 |
| 10     | 20 (0)      | 18 (0)      | 6 (0)  | 233,99                      | 0,90                 |
| 11     | 20 (0)      | 18 (0)      | 6 (0)  | 236,13                      | 0,91                 |

Fonte: A autora, 2023.

O modelo foi valido para a curva obtida com  $R^2$  de 0,990, p valor < 0,05 e  $F_{calc}$  10,95 vezes maior que  $F_{tab}$ .

Figura 5. Curvas de contorno para as interações do SAB



Fonte: A autora, 2023.

Os experimentos relacionados para a realização de sistema aquoso bifásico utilizando-se extrato obtido apresentaram fator de purificação apenas com a utilização do sal Cloreto de Sódio, conforme pode ser observado na Tabela 3, foram realizados através da variação da quantidade de sal e PEG da solução, e conseqüentemente de enzima a fim de obter um volume final de 25 mL. A análise estatística dos dados demonstrou resultados melhores quando há menores concentrações de sal no meio, aliada ao menor volume de PEG e pH entre 4 e 6.

O sistema apresentou resultado acima de  $FP > 1$  em apenas um ponto, no ensaio 1, os resultados obtidos para o SAB demonstram-se interessantes devido ao baixo custo de aplicação da técnica de concentração associado a sua simplicidade de execução e tempo baixo de preparação até a sua concentração.

Estudos realizados por Kee et al. (2022), apresentaram resultados de recuperação enzimáticas até 94,80% utilizando os PEGs 1000 e 2000 e os sais sulfato de amônio e citrato de sódio, portanto, a concentração de PEG pode ser um dos fatores que influenciou no resultados obtidos, tendo em vista que os melhores resultados obtidos no estudo citado foram obtidos com a utilização de PEG 1000 combinado com sulfato de amônio em proporção 30/7,5% p/p. Portanto a concentração do polímero pode estar influenciando diretamente no sistema desenvolvido tendo em vista a afinidade apresentada entre este e a enzima.

#### **4.4 PRECIPITAÇÃO SAL/SOLVENTE**

Foram realizados testes preliminares conforme as Tabelas 4 e 5 que demonstraram que os solventes acetona e etanol apresentam resultados promissores para a concentração enzimática via precipitação.

Para os testes preliminares foram utilizadas as condições fixas de 10mL de Solvente, 0,5 mol/L de sal e vazão de 10ml/min na bomba peristáltica, a fase sobrenadante (S) foi separada em béquer e a fase precipitada (P) foi resuspensa com 5mL de Tampão Tris HCl pH 8,5.

A Tabela 6 demonstra os resultados obtidos para o planejamento de experimentos para o sal cloreto de sódio e a Tabela 7 para o sal sulfato de amônio na fase precipitada. A adição de sais aumenta as respostas obtidas, sendo o delineamento composto central realizado então variando a concentração de sal, solvente e vazão do mesmo.

Tabela 4. Condições preliminares para a precipitação

| <b>Ensaio</b> | <b>Condição</b>             |
|---------------|-----------------------------|
| <b>1</b>      | Apenas Acetona              |
| <b>2</b>      | Apenas Etanol               |
| <b>3</b>      | Acetona + Sulfato de Amônio |
| <b>4</b>      | Acetona + Cloreto de Sódio  |
| <b>5</b>      | Etanol + Sulfato de Amônio  |
| <b>6</b>      | Etanol + Cloreto de Sódio   |

Fonte: A autora, 2023.

Tabela 5. Testes preliminares realizados com os sais Cloreto de Sódio e Sulfato de Amônio e utilizando os solventes acetona e etanol, onde “P” indica a fase precipitada e “S” a fase sobrenadante.

| <b>Ensaio</b> | <b>Atividade Específica (U/mg)</b> | <b>Fator de Purificação</b> |
|---------------|------------------------------------|-----------------------------|
| 1 P           | 326,08 ± 2,75                      | 1,26                        |
| 2 P           | 186,26 ± 4,75                      | 0,72                        |
| 3 P           | 324,58 ± 0,75                      | 1,25                        |
| 4 P           | 408,73 ± 1,00                      | 1,58                        |
| 5 P           | 205,75 ± 2,00                      | 0,79                        |
| 6 P           | 161,65 ± 0,75                      | 0,62                        |
| 1 S           | 192,35 ± 3,25                      | 0,74                        |
| 2 S           | 78,72 ± 2,75                       | 0,30                        |
| 3 S           | 210,74 ± 1,25                      | 0,81                        |
| 4 S           | 208,19 ± 0,75                      | 0,80                        |
| 5 S           | 135,63 ± 2,25                      | 0,52                        |
| 6 S           | 89,91 ± 0,75                       | 0,35                        |

Fonte: A autora, 2023.

Após a realização dos testes preliminares observou-se que os fatores de purificação para estes sais e nestas condições eram maiores que 1 apenas para o solvente acetona e com ambos os sais na fase precipitada, desta forma, os ensaios foram continuados sob estas condições apenas.

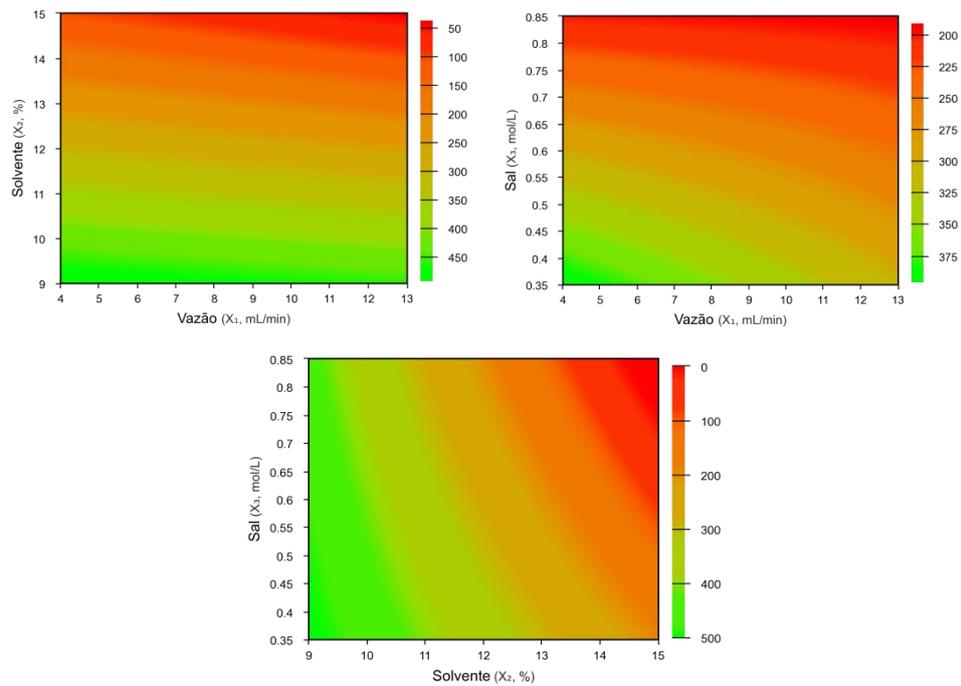
Tabela 6. DCC para o sal cloreto de sódio

| <b>Ensaio</b>                                  | <b>Sal<br/>(mol/L)</b> | <b>Solvente<br/>(%)</b> | <b>Vazão<br/>(mL/min)</b> | <b>Atividade<br/>Específica (U/mg)</b> | <b>Fator de<br/>Purificação</b> |
|--|------------------------|-------------------------|---------------------------|--|---------------------------------|
| <b>1</b>                                       | 0,36 (-1)              | 48,1 (-1)               | 4,6 (-1)                  | 497,40                                 | 1,92                            |
| <b>2</b>                                       | 0,36 (-1)              | 48,1 (-1)               | 12,4 (+1)                 | 482,26                                 | 1,86                            |
| <b>3</b>                                       | 0,36 (-1)              | 71,9 (+1)               | 4,6 (-1)                  | 301,56                                 | 1,16                            |
| <b>4</b>                                       | 0,36 (-1)              | 71,9 (+1)               | 12,4 (+1)                 | 161,72                                 | 0,62                            |
| <b>5</b>                                       | 0,84 (+1)              | 48,1 (-1)               | 4,6 (-1)                  | 427,78                                 | 1,65                            |
| <b>6</b>                                       | 0,84 (+1)              | 48,1 (-1)               | 12,4 (+1)                 | 379,59                                 | 1,46                            |
| <b>7</b>                                       | 0,84 (+1)              | 71,9 (+1)               | 4,6 (-1)                  | 5,74                                   | 0,02                            |
| <b>8</b>                                       | 0,84 (+1)              | 71,9 (+1)               | 12,4 (+1)                 | 35,48                                  | 0,14                            |
| <b>9</b>                                       | 0,60 (0)               | 60,0 (0)                | 8,5 (0)                   | 236,68                                 | 0,91                            |
| <b>10</b>                                      | 0,60 (0)               | 60,0 (0)                | 8,5 (0)                   | 241,14                                 | 0,93                            |
| <b>11</b>                                      | 0,60 (0)               | 60,0 (0)                | 8,5 (0)                   | 237,70                                 | 0,92                            |
| Atividade Específica Enzima Bruta: 259,39 U/mg |                        |                         |                           |  |                                 |

Fonte: A autora, 2023.

O modelo foi valido para a curva obtida com  $R^2$  de 0,963, p valor < 0,05 e  $F_{calc}$  2,8 vezes maior que  $F_{tab}$ .

Figura 6. Curvas de contorno obtidas por meio das atividades específicas resultantes da precipitação envolvendo o sal NaCl e o solvente acetona



Fonte: A autora, 2023.

A precipitação utilizando-se cloreto de sódio e acetona apresentou 5 pontos com fator de purificação maior que 1, com o maior resultado obtido através da condição com menores valores de vazão, concentração de sal e de solvente e, portanto, maior adição de enzima ao meio. O processo se demonstrou eficiente aumentando em quase 2 vezes a atividade específica da enzima avaliada.

A análise estatística dos dados, Figura 6, demonstrou que na interação entre vazão e solvente a variação da primeira não influencia quando há uma baixa concentração de solvente, porém em relação a interação com o sal, vazões e concentrações menores apresentam resultados mais significantes, por fim, a interação entre sal e solvente corrobora com as demais interações demonstrando que a baixa concentração de solvente em solução aumenta os resultados obtidos.

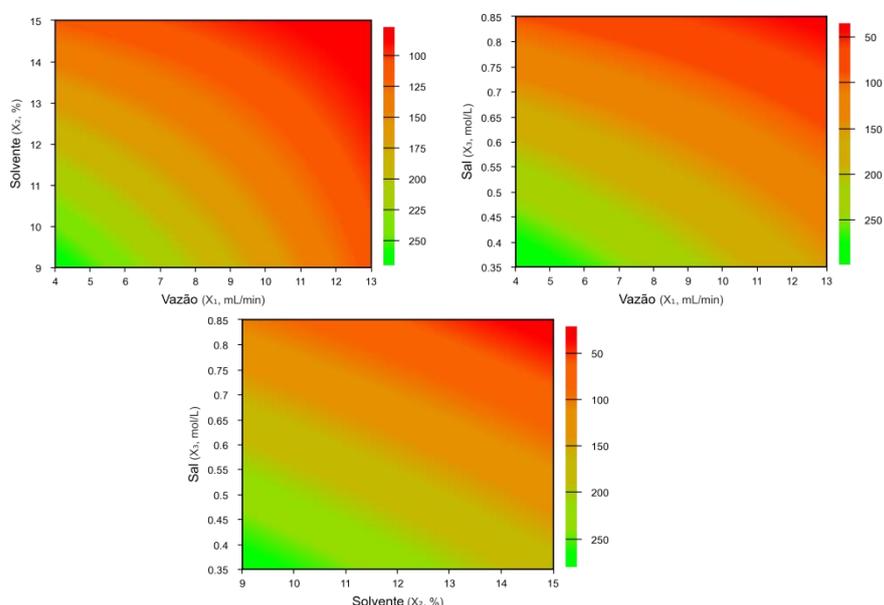
Tabela 7. DCC realizada para a precipitação utilizando o sal sulfato de amônio e acetona

| <b>Ensaio</b>                                  | <b>Sal<br/>(mol/L)</b> | <b>Solvente<br/>(%)</b> | <b>Vazão<br/>(mL/min)</b> | <b>Atividade<br/>Específica (U/mg)</b> | <b>Fator de<br/>Purificação</b> |
|--|------------------------|-------------------------|---------------------------|--|---------------------------------|
| <b>1</b>                                       | 0,36 (-1)              | 48,1 (-1)               | 4,6 (-1)                  | 355,73                                 | 1,37                            |
| <b>2</b>                                       | 0,36 (-1)              | 48,1 (-1)               | 12,4 (+1)                 | 198,71                                 | 0,77                            |
| <b>3</b>                                       | 0,36 (-1)              | 71,9 (+1)               | 4,6 (-1)                  | 237,24                                 | 0,91                            |
| <b>4</b>                                       | 0,36 (-1)              | 71,9 (+1)               | 12,4 (+1)                 | 146,86                                 | 0,57                            |
| <b>5</b>                                       | 0,84 (+1)              | 48,1 (-1)               | 4,6 (-1)                  | 155,89                                 | 0,60                            |
| <b>6</b>                                       | 0,84 (+1)              | 48,1 (-1)               | 12,4 (+1)                 | 61,11                                  | 0,24                            |
| <b>7</b>                                       | 0,84 (+1)              | 71,9 (+1)               | 4,6 (-1)                  | 43,98                                  | 0,17                            |
| <b>8</b>                                       | 0,84 (+1)              | 71,9 (+1)               | 12,4 (+1)                 | 43,46                                  | 0,17                            |
| <b>9</b>                                       | 0,60 (0)               | 60,0 (0)                | 8,5 (0)                   | 118,02                                 | 0,45                            |
| <b>10</b>                                      | 0,60 (0)               | 60,0 (0)                | 8,5 (0)                   | 113,97                                 | 0,44                            |
| <b>11</b>                                      | 0,60 (0)               | 60,0 (0)                | 8,5 (0)                   | 114,85                                 | 0,44                            |
| Atividade Especifica Enzima Bruta: 259,39 U/mg |                        |                         |                           |  |                                 |

Fonte: A autora, 2023.

O modelo foi valido para a curva obtida com  $R^2$  de 0,958, p valor < 0,05 e  $F_{calc}$  2,5 vezes maior que  $F_{tab}$ .

Figura 7. Curvas de contorno obtidas por meio das atividades específicas resultantes da precipitação envolvendo o sal sulfato de amônio e o solvente acetona



Fonte: A autora, 2023.

Quanto à utilização do sal sulfato de amônio, Tabela 7 e Figura 7, a utilização deste sal apresentou resultado melhores apenas em uma das condições, quando houve as menores concentrações de sal e solvente com maior presença de enzima, de forma semelhante ao outro sal utilizado nos experimentos e nas condições preliminares com quando houve a adição de 50% de solvente a condição avaliada.

A análise estatística dos dados apresentou os melhores de resultados em condições com menor vazão, menor volume de solvente e concentração de sal, com maior volume de enzima.

Os resultados obtidos principalmente em relação à utilização de acetona como solvente e o sal cloreto de sódio, se demonstram promissores e corroboram com os estudos realizados por Preczeski, onde o maior acréscimo obtido foram com a adição dos mesmos compostos para a precipitação da enzima queratinase obtendo rendimento de 49,58% e 42,64% utilizando o sal sulfato de amônio ambos em proporções de  $0,5 \text{ mol L}^{-1}$  de sal e 50% v/v de solvente com taxa fixada em  $10 \text{ ml min}^{-1}$ .

## 4.5 CAPTURA DE ÍONS DE CROMO

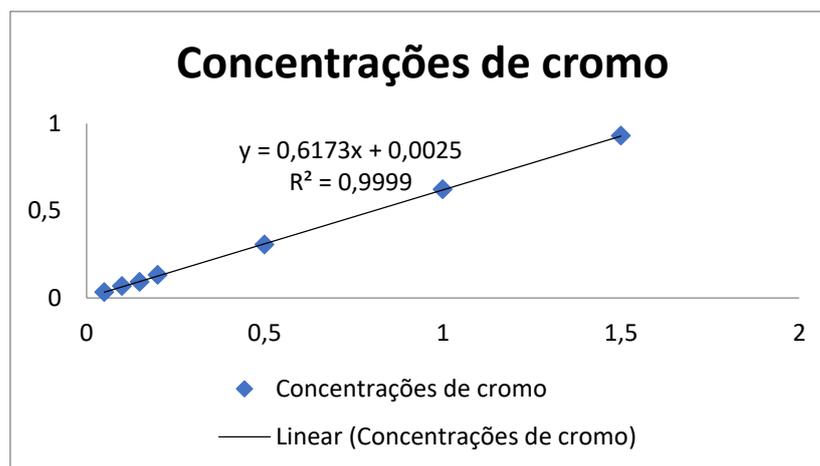
Para o cálculo da remoção de cromo em solução com o substrato de pelo suíno foi realizada uma curva em espectrofotômetro a 540 nm para concentrações de 0,05 mg a 1,50 mg de cromo, Figura 8, utilizando difenilcarbazida P.A. para reação após a adição de ácido sulfúrico 72% até atingir pH  $1 \pm 0,3$ , a curva e sua respectiva equação da reta podem ser observadas no Gráfico 1.

Figura 8. Pontos para a curva de calibração



Fonte: A autora, 2023.

Gráfico 1. Curva de concentração de cromo



Fonte: A autora, 2023.

Posteriormente em Erlenmeyers foram adicionados 100mL de solução dicromato de potássio contendo  $20 \text{ mg L}^{-1}$  de cromo, os testes preliminares foram realizados com 1% e 5% m/v de pelos suínos (Figura 9) e após estes os testes foram continuados com 1% de pelos, os resultados de remoção podem ser observados na Tabela 8 e Gráfico 2.

Figura 9. Solução de dicromato de potássio com diferentes quantidades de substrato



Fonte: A autora, 2023.

A análise da diminuição da concentração de cromo foi inicialmente conduzida com medidas a cada 24 horas e para as diferentes quantidades de substrato, após estes testes preliminares, os demais experimentos ocorreram com adição de 1% p/v de pelos suínos com medidas a cada 1 hora.

Tabela 8. Concentrações de cromo obtidas com a utilização de 1% m/v de pelos suínos em solução de dicromato de potássio, medidas a cada 1 hora

| <b>Tempo (horas)</b> | <b>Concentração de cromo (<math>\text{mg/L}^{-1}</math>)</b> |
|----------------------|--|
| 1                    | $9,88 \pm 0,14$  |
| 2                    | $6,88 \pm 0,08$  |
| 3                    | $5,24 \pm 0,00$  |
| 4                    | $3,90 \pm 0,13$  |
| 5                    | $2,83 \pm 0,19$  |
| 6                    | $2,30 \pm 0,11$  |
| 7                    | $1,62 \pm 0,01$  |
| 8                    | $1,40 \pm 0,02$  |
| 9                    | $1,31 \pm 0,13$  |

Fonte: A autora, 2023.

Após o período de 9 horas não foi mais verificada diminuição na concentração de cromo para a condição avaliada até o período de 48 horas onde foram cessadas as medidas. Os resultados obtidos se demonstraram relevantes com uma diminuição de 93,45% na concentração em 9 horas, havendo uma queda de mais de 50% desta em uma hora de reação.

O resultado se demonstra interessante por ser resultante de um processo de baixo custo que utiliza o resíduo fermentativo advindo de um subproduto agroindustrial, resultados de até 99,41% de remoção de Cromo hexavalente foram obtidos sob condições com concentração inicial de  $4,6\text{mg Cr}^6\text{ L}^{-1}$  e 8,7% m/v de biomaterial adicionado em uma período de 3 horas, utilizando pelos suínos pré-tratados com peróxido de hidrogênio nos estudos propostos por de Paris Júnior et al. (2019).

Estudos realizados por Singh e Mishra (2021), utilizando águas residuais para a utilização de cepas tolerantes a presença de cromo utilizou *Microbacterium paraoxydans*, apresentando uma remoção de 99,96% CR IV em 5 dias para uma concentração inicial de 50mg/L de cromo e de aproximadamente 53% em concentrações iniciais de 200mg/L.

Neste sentido a não utilização de pré-tratamentos que envolvam a utilização de outros compostos tornam o processo de menor custo, com um tempo baixo até a sua remoção máxima, além de proporcionar a utilização de resíduo de processo fermentativo utilizado anteriormente para a produção enzimática por meio de um resíduo ao qual é agregado valor e permite uma segunda utilização fechando um ciclo produtivo para o processo visando à aplicabilidade da economia circular.

## **5 CONCLUSÕES**

Os experimentos realizados durante este trabalho demonstraram potencial para a produção com valorização do processo via duas técnicas de concentração de queratinases por processos biotecnológicos de baixo em custo. Além de proporcionar uma redução de peso para os pelos suínos utilizados e tornando estes que seriam anteriormente descartados um subproduto com valor agregado com aplicação ambiental, que após a produção enzimática torna possível a diminuição na concentração de cromo em efluente sintético de maneira expressiva permitindo a utilização do extrato enzimático para a produção de concentração da enzima e do resíduo de seu substrato em processos de interesse ambiental.

## REFERÊNCIAS

- ALBERTSSON, P. A. Partition of cell particles and macromolecules. 3 ed.: *Wiley-Interscience*, 346 p., 1986.
- ANBU, P.; GOPINATH, S.C.B.; HILDA, A.; LAKSHMI PRIYA, T.; ANNADURAI, G. Purification of keratinase from poultry farm isolate- *Scopulariopsis brevicaulis* and statistical optimization of enzyme activity. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 36, p. 639–647, 2005.
- BONATTO, C.; VENTURIN, B.; MAYER, D.P.; BAZOTI, S.F.; OLIVEIRA, D. D.; ALVES JR, S.L.; TREICHEL, H. Experimental data and modelling of 2G ethanol production by *Wickerhamomyces* sp. UFFS-CE-3.1.2. *Renewable Energy*, v. 145, p. 2445–2450, 2020.
- BRADFORD, M. M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry*, v. 72, p. 248–254, 1976.
- BRANDELLI, A.; DAROIT, D. J.; RIFFEL, A. Biochemical features of microbial keratinases and their production and applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 85, p. 1735–1750, 2010.
- BRESSOLLIER, P., LETOURNEAU, F.; URDACI, M.; VERNEUIL, B. Purification and Characterization of a Keratinolytic Serine Proteinase from *Streptomyces albidoflavus*. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 65, p. 2570–2576, 1999.
- CĂLIN, M.; CONSTANTINESCU-ARUXANDEI, D.; ALEXANDRESCU, E.; RAUT, I.; DONI, M.B.; ARSENE, M.L.; OANCEA, F.; JECU, L.; LAZAR, V. Degradation of keratin substrates by keratinolytic fungi. *Electronic Journal of Biotechnology*, v. 28, p. 101–112, 2017.
- CORTEZ, E. V.; PESSOA JR., A. Xylanase and  $\beta$ -xylosidase separation by fractional precipitation. *Process Biochemistry*, v. 35, p. 277-283, 1999.
- DE PARIS JÚNIOR, O.; SCAPINI, T.; CAMARGO, A. F. et al. Removal of chromium from wastewater by swine hair residues applied as a putative biofilter. *Environmental Science and Pollution Research*, v. 26, p. 33014-33022, 2019.

DIPANKAR, P.; BHAN, C. Role of keratinase in bioremediation of feathers and hairs. *Smart Bioremediation Technologies*, p. 83-98, 2019.

GOPINATH, S. C. B.; ANBU, P.; LAKSHMIPRIYA, T.; TANG, T.H.; CHEN, Y.; HASHIM, U.; RUSLINDA, A.R.; ARSHAD, M. K. MD. Biotechnological Aspects and Perspective of Microbial Keratinase Production. *BioMed Research International*, v. 2015, p. 1-10, 2015.

HASSAN, M. A.; ABOL-FOTOUH, D.; OMER, A. M.; TAMER, T. M.; ABBAS, E. Comprehensive insights into microbial keratinases and their implication in various biotechnological and industrial sectors: A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2020.

HERZOG, B.; OVERY, D. P.; HALTLI, B.; KERR, R. G. Discovery of keratinases using bacteria isolated from marine environments. *Systematic and Applied Microbiology*, p. 1-9, 2015.

HOLKAR, Chandrakant R.; JAIN, Saransh S.; JADHAV, Ananda J.; PINJARI, Dipak V.. Valorization of keratin based waste. *Process Safety And Environmental Protection*, [S.L.], v. 115, p. 85-98, abr. 2018. Elsevier BV.

KEE, P. E.; YIM, H. S.; KONDO, A.; LAN, J. C. W.; NG, H. S. Extractive fermentation of *Kytococcus sedentarius* TWHKC01 using the aqueous biphasic system for direct recovery of keratinase. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, v 137, p. 104232, Aug. 2022. Elsevier BV.

KORNIŁOWICZ-KOWALSKA, Teresa; BOHACZ, Justyna. Biodegradation of keratin waste: theory and practical aspects. *Waste Management*, [S.L.], v. 31, n. 8, p. 1689-1701, ago. 2011. Elsevier BV.

KOTHARI, D.; RANI, A.; GOYAL, A. Keratinases. *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering: Production, Isolation and Purification of Industrial Products*, p. 447-469, 2016.

MAZOTTO, A. M.; MELO, A. C. N. D.; MACRAE, A.; ROSADO, A. S.; PEIXOTO, R.; CEDROLA, S. M. L.; COURI, S.; ZINGALI, R. B.; VILLA, A. L. V.; RABINOVITCH, L.; CHAVES, J. Q.; VERMELHO, A. B. Biodegradation of feather waste by extracellular

keratinases and gelatinases from *Bacillus* spp. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 27, p. 1355–1365, 2011.

PARINAYAWANICH, Saranya; SITTIPOLO, Duangjai; AJINGI, Ya'U Sabo; RODPAN, Sudarut; PATTANAPANYASAT, Kovit; JONGRUJA, Nujarin. Application of recombinant hyperthermostable keratinase for degradation of chicken feather waste. *Biocatalysis And Agricultural Biotechnology*, [S.L.], v. 36, p. 102146, set. 2021. Elsevier BV.

PRECZESKI, K. P.; DALASTRA, C.; CZAPELA, F. F.; KUBENECK, S.; SCAPINI, T.; CAMARGO, A. F.; ZANIVAN, J.; BONATTO, C.; STEFANSKI, F. S.; VENTURIN, B.; FONGARO, G.; TREICHEL, H. *Fusarium oxysporum* and *Aspergillus* sp. as Keratinase Producers Using Swine Hair From Agroindustrial Residues. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, v. 8, p. 1–8, 2020.

REDDY, Chilakamarry Chaitanya; KHILJI, Irshad Ahamad; GUPTA, Arun; BHUYAR, Prakash; MAHMOOD, Syed; AL-JAPAIRAI, Khater Ahmed Saeed; CHUA, Gek Kee. Valorization of keratin waste biomass and its potential applications. *Journal Of Water Process Engineering*, [S.L.], v. 40, p. 101707, abr. 2021. Elsevier BV.

RIFFEL, A.; LUCAS, F.; HEEB, P.; BRANDELLI, A. Characterization of a new keratinolytic bacterium that completely degrades native feather keratin. *Archives of Microbiology*, v. 179, p. 258–265, 2003.

SANTOS, A. G.; BUARQUE, F. S.; RIBEIRO, B. D.; COELHO, M. A. Z. Extractive fermentation for the production and partitioning of lipase and citric acid by *Yarrowia lipolytica*. *Process Biochemistry*, v. 122, p. 374-385, Nov. 2022.

SINGH, V.; MISHRA, V. Microbial removal of Cr (VI) by a new bacterial strain isolated from the site contaminated with coal mine effluents. *Jornal of Environmental Chemical Engineering*, v. 9, p. 106279, Oct. 2021. Elsevier BV.

WANG, B.; YANG, W.; MCKITTRICK, J.; MEYERS, M. A. Keratin : Structure , mechanical properties , occurrence in biological organisms , and efforts at bioinspiration. *Progress in Materials Science*, v. 76, p. 229–318, 2016.

ZHANG, B. et al. Isolation and characterization of a new *Bacillus* sp. 50-3 with highly alkaline keratinase activity from *Calotes versicolor* faeces. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 25, n. 4, p. 583–590, 2009.