

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
ESCOLA DE ENGENHARIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE MINAS,
METALÚRGICA E DE MATERIAIS**

TAÍS ROSSATO SILVEIRA

**IMOBILIZAÇÃO DE LACASE EM PARTÍCULAS MAGNÉTICAS RECOBERTAS
COM QUITOSANA PARA APLICAÇÃO NA DEGRADAÇÃO DE CORANTES
TÊXTEIS**

Porto Alegre

2019

TAÍS ROSSATO SILVEIRA
ENGENHEIRA DE BIOPROCESSOS E BIOTECNOLOGIA

**IMOBILIZAÇÃO DE LACASE EM PARTÍCULAS MAGNÉTICAS RECOBERTAS
COM QUITOSANA PARA APLICAÇÃO NA DEGRADAÇÃO DE CORANTES
TÊXTEIS**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Minas, Metalúrgica e de Materiais da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Engenharia.

Área de Concentração: Ciência e Tecnologia dos Materiais

Orientador: Prof. Dr. Álvaro Meneguzzi
Coorientadora: Profa. Dra. Manuela Poletto Klein

Porto Alegre

2019

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

Reitor: Rui Carlos Opperman

Vice-Reitora: Jane Fraga Tutikian

ESCOLA DE ENGENHARIA

Diretor: Luiz Carlos Pinto da Silva Filho

Vice-Diretora: Carla Schwengber ten Caten

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE MINAS, METALÚRGICA
E DE MATERIAIS

Coordenador: Carlos Pérez Bergmann

Coordenador Substituto: Afonso Reguly

TAÍS ROSSATO SILVEIRA

IMOBILIZAÇÃO DE LACASE EM PARTÍCULAS MAGNÉTICAS RECOBERTAS COM
QUITOSANA PARA APLICAÇÃO NA DEGRADAÇÃO DE CORANTES TÊXTEIS

Esta Dissertação foi analisada e julgada adequada para a obtenção do título de Mestre em Engenharia na área de concentração em Ciência e Tecnologia dos Materiais e aprovada em sua forma final pelo Orientador e pela Banca Examinadora do Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Minas, Metalúrgica e de Materiais – PPGE3M – da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Orientador: Prof. Dr. Álvaro Meneguzzi

Coorientadora: Profa. Dra. Manuela Poletto Klein

Banca examinadora:

Profa. Dra. Claucia Fernanda Volken de Souza – UNIVATES

Profa. Dra. Eliana Weber de Menezes – UFRGS

Profa. Dra. Roberta da Silva Bussamara Rodrigues – UFRGS

Porto Alegre, 12 de Março de 2019.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha coorientadora Prof^a. Dr^a. Manuela Poletto Klein por toda a dedicação, incentivo, paciência e ajuda nos experimentos e na análise dos resultados durante estes dois anos.

Ao meu orientador Prof. Dr. Álvaro Meneguzzi pela confiança e oportunidade de realizar este trabalho.

Ao Prof. Dr. Rafael Costa Rodrigues por me acolher em seu laboratório e contribuir com as minhas dúvidas.

Aos colegas do LACOR e do ICTA, especialmente ao Lucas Dal Magro pelos ensinamentos no início e ao longo desta jornada.

Agradeço à minha família, especialmente aos meus pais, Altemir e Iomara, que sempre me apoiaram, incentivaram e acreditaram em mim.

Às minhas amigas de São Leopoldo, pelo companheirismo e momentos de diversão.

Ao CNPq pelo apoio financeiro.

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul por disponibilizar recursos e estrutura para o desenvolvimento desse estudo.

Agradeço a todos que, de alguma forma, colaboraram para a realização deste trabalho. Obrigada por acreditar em mim e contribuir com o meu crescimento profissional e pessoal.

RESUMO

A capacidade de oxidação de uma grande variedade de substratos e a autonomia relativa das lacases frente a outras enzimas têm atraído grande interesse no desenvolvimento de tecnologias para aplicações na área industrial e ambiental como um catalisador verde. A baixa estabilidade e o elevado custo de produção são os principais fatores que limitam o uso de enzimas em processos de tratamento de efluentes. Desta forma, o principal objetivo deste trabalho foi sintetizar um suporte magnético, recobrir com quitosana e imobilizar a enzima lacase, a fim de aplicar o biocatalisador imobilizado na degradação de corantes sintéticos presentes em efluentes têxteis. Foram utilizadas duas lacases para este estudo, uma de *Marasmiellus palmivorus* (bruta e purificada) e outra de *Trametes versicolor* (comercial). As proteínas do extrato bruto enzimático produzido pelo fungo *M. palmivorus* foram concentradas e a lacase foi imobilizada em partículas de magnetita sintetizadas pelo método de co-precipitação e recobertas com quitosana por gelificação ionotrópica. O suporte foi funcionalizado com glutaraldeído e caracterizado por VSM, método de BET, MEV e FTIR. A maior atividade da lacase bruta imobilizada de *M. palmivorus* foi obtida com 25 mg proteína.g suporte seco⁻¹ e 90 mM de glutaraldeído e foi de 139,84 U.g suporte seco⁻¹, com eficiência de 48,74 % e rendimento acima de 99%; enquanto que para a lacase purificada imobilizada de *M. palmivorus* obteve-se 268,40 U.g suporte seco⁻¹ com 15 mg proteína.g suporte seco⁻¹ e o rendimento e eficiência foram de 98,02% e 27,15%, respectivamente. Para a lacase comercial imobilizada, a maior atividade foi alcançada com 571 mg proteína.g suporte seco⁻¹ e foi de 74,92 U.g suporte seco⁻¹, com eficiência de 45,30% e rendimento de 97,58%. O pH ótimo da lacase bruta solúvel e imobilizada foi em 5,5 e a temperatura ótima variou entre 40–50 °C para a forma solúvel e entre 25–35 °C para a forma imobilizada. Já para a enzima comercial, o pH ótimo foi em 4 e a temperatura ótima variou de 30–40 °C para a enzima solúvel, e foi de 25 °C para a enzima imobilizada. A imobilização aumentou a estabilidade térmica de ambas as enzimas, entretanto as formas solúvel e imobilizada da lacase bruta perderam atividade quando armazenadas em tampão a 4°C. Por fim, a reação de descoloração do alaranjado de metila com o uso de 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazole-6-ácido sulfônico) (ABTS) como mediador, possibilitou 30 ciclos de reuso com percentual de descoloração acima de 60%.

Palavras-chave: Lacase. Imobilização. *Marasmiellus palmivorus*. Partículas magnéticas. Corantes sintéticos.

ABSTRACT

The oxidation capacity of a broad range of substrates and the relative autonomy of the laccases against other enzymes, have attracted great interest in the development of technologies for industrial and environmental applications as a green catalyst. The low stability and the high cost of production are the main factors that limit the use of enzymes in wastewater treatment processes. In this way, the main objective of this work was to synthesize a magnetic support, to coat with chitosan and to immobilize the lacase enzyme in order to apply the immobilized biocatalyst in the degradation of synthetic dyes present in textile effluents. For this study two laccases were used, one of them, from *Marasmiellus palmivorus* (crude and purified) and another one from *Trametes versicolor* (commercial). The proteins of the crude enzymatic extract produced by *M. palmivorus* fungus were concentrated and the laccase was immobilized on magnetite particles synthesized by the co-precipitation method and coated with chitosan by ionotropic gelation. The support was functionalized with glutaraldehyde and characterized by VSM, BET method, SEM and FTIR. The highest activity of the immobilized crude laccase of *M. palmivorus* was obtained with 25 mg protein.g dry support⁻¹ and 90 mM glutaraldehyde and was 139.84 U.g dry support⁻¹, with 48.74% of efficiency and yield above 99%; while for the immobilized purified laccase of *M. palmivorus*, 268.40 U.g dry support⁻¹ was obtained with 15 mg protein.g dry support⁻¹ and the yield and efficiency were 98.02% and 27.15%, respectively. For the immobilized commercial laccase the highest activity was achieved with 571 mg protein.g dry support⁻¹ and was 74.92 U.g dry support⁻¹, with efficiency of 45.30% and yield of 97.58%. The optimum pH of the soluble and immobilized crude laccase was 5.5 and the optimum temperature varied between 40-50 °C for the soluble form and between 25-35 °C for the immobilized form. As for the commercial enzyme, the optimum pH was 4 and the optimum temperature ranged from 30-40 °C for the soluble enzyme and 25 °C for the immobilized enzyme. Immobilization increased the thermal stability of both enzymes, however the soluble and immobilized forms of the crude laccase lost activity when stored in buffer at 4 °C. Finally, the decolorization reaction of methyl orange with the use of 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazole-6-sulfonic acid) (ABTS) as a mediator allowed 30 cycles of reuse with a percentage of decolorization above 60%.

Keywords: Laccase. Immobilization. *Marasmiellus palmivorus*. Magnetic particles. Synthetic dyes.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Sítio ativo de uma lacase.....	14
Figura 2 – Reação catalisada por lacases.....	15
Figura 3 – Oxidação do ABTS pela lacase.....	17
Figura 4 – Estrutura química do alaranjado de metila.....	21
Figura 5 – Ativação e imobilização de enzimas em suportes aminados	25
Figura 6 – Partículas magnéticas recobertas com quitosana	30
Figura 7 – Efeito da carga de lacase bruta aplicada ao suporte na atividade do biocatalisador imobilizado e na atividade recuperada	40
Figura 8 – Efeito da carga de lacase purificada aplicada ao suporte na atividade do biocatalisador imobilizado e na atividade recuperada.....	41
Figura 9 – Efeito da carga de lacase comercial aplicada ao suporte na atividade do biocatalisador imobilizado e na atividade recuperada.....	42
Figura 10 – Efeito da concentração de glutaraldeído na atividade da lacase bruta imobilizada e da lacase comercial imobilizada.....	44
Figura 11 – Efeito do tempo de imobilização na AR da lacase bruta imobilizada e da lacase comercial imobilizada.....	46
Figura 12 – pH ótimo das lacases (bruta e comercial) solúveis e imobilizadas.....	48
Figura 13 – Temperatura ótima das lacases (bruta e comercial) solúveis e imobilizadas.....	50
Figura 14 – Estabilidade de armazenamento das enzimas solúveis e imobilizadas	51
Figura 15 – Estabilidade térmica das lacases (bruta e purificada de <i>M. palmivorus</i> e comercial de <i>T. versicolor</i>) solúveis e imobilizadas.	52
Figura 16 – Bateladas repetidas de reuso para descoloração de uma solução de alaranjado de metila (50 mg/L), utilizando ABTS como mediador, pelas lacases bruta e comercial imobilizadas nas partículas magnéticas recobertas com quitosana, a temperatura ambiente...54	
Figura 17 – Curvas de histerese das partículas magnéticas e das partículas magnéticas recobertas com quitosana.....	55
Figura 18 – Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura das partículas magnéticas (PM) e das partículas magnéticas recobertas com quitosana e com a enzima imobilizada (PMQE)	57
Figura 19 – Distribuição granulométrica das partículas magnéticas.....	58
Figura 20 – Distribuição granulométrica das partículas magnéticas recobertas com quitosana	58

Figura 21 – Espectros de infravermelho das partículas magnéticas (PM), das partículas magnéticas com quitosana (PMQ), das partículas magnéticas com quitosana ativadas com glutaraldeído e das partículas magnéticas recobertas com quitosana e com a enzima imobilizada (PMQE) 60

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Algumas aplicações de diferentes lacases	20
Tabela 2 – Resumo da purificação da lacase bruta de <i>M. palmivorus</i>	37
Tabela 3 – Influência da variação da carga da lacase bruta de <i>M. palmivorus</i> sobre a atividade da enzima imobilizada, eficiência (EI), rendimento (RI) e atividade recuperada (AR) após imobilização.....	39
Tabela 4 – Influência da variação da carga da lacase comercial de <i>T. versicolor</i> sobre a atividade da enzima imobilizada, eficiência (EI), rendimento (RI) e atividade recuperada (AR) após imobilização.	39
Tabela 5 – Influência da variação da carga da lacase purificada de <i>M. palmivorus</i> sobre a atividade da enzima imobilizada, eficiência (EI), rendimento (EI) e atividade recuperada (AR) após imobilização.	40
Tabela 6 – Influência da variação da concentração de glutaraldeído sobre a atividade relativa da lacase bruta de <i>M. palmivorus</i> após imobilização e sobre os parâmetros de imobilização EI, RI e AR.....	44
Tabela 7 – Influência da variação da concentração de glutaraldeído sobre a atividade relativa lacase comercial de <i>T. versicolor</i> após imobilização e sobre os parâmetros de imobilização EI, RI e AR.....	45
Tabela 8 – Influência do tempo de imobilização da lacase bruta de <i>M. palmivorus</i> sobre a atividade da enzima imobilizada e sobre os parâmetros de imobilização EI, RI e AR.	46
Tabela 9 – Influência do o tempo de imobilização da lacase comercial de <i>T. versicolor</i> sobre a atividade da enzima imobilizada e sobre os parâmetros de imobilização EI, RI e AR.	47
Tabela 10 – Valor de k, tempo de meia-vida e fator de estabilização para as lacases solúveis e imobilizadas.....	52

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

HBT	1-hidroxibenzotriazol
TMPO	2,2',6,6'-tetrametilpiperidina-1-oxil
ABTS	2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazole-6-ácido sulfônico)
DMP	2,6-dimetóxfenol
VA	Ácido violúrico
CLEAs	Agregados de enzimas entrecruzados
BSA	Albumina do soro bovino
APTES	Aminopropiltriétoxisilano
AR	Atividade recuperada
PCBs	Bifenilas policloradas
KBr	Brometo de potássio
BET	Brunauer, Emmett e Teller
Hc	Coercividade
EI	Eficiência da imobilização
FTIR	Infravermelho com transformada de Fourier
VSM	Magnetometria de amostra vibrante
MOFs	<i>Metal-organic frameworks</i>
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
HAA	N-hidroxiacetanilida
HPI	N-hidroxiftalimida
ONU	Organização das Nações Unidas
PM	Partículas magnéticas
PMQ	Partículas magnéticas recobertas com quitosana
PMQE	Partículas magnéticas recobertas com quitosana e com a enzima imobilizada
PVA	Poli (vinil álcool)
Mr	Remanência
RI	Rendimento da imobilização
t _{1/2}	Tempo de meia-vida

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 OBJETIVOS	13
2.1 OBJETIVO GERAL.....	13
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	13
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
3.1 LACASE.....	14
3.2 APLICAÇÕES DAS LACASES	17
3.2.1 Biorremediação	19
3.3 IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS	22
3.3.1 Métodos de Imobilização de Enzimas	23
3.3.2 Tipos de Suportes para Imobilização de Enzimas	27
3.3.3 Avaliação da Imobilização	30
3.4 CONSIDERAÇÕES SOBRE O ESTADO DA ARTE	31
4 METODOLOGIA.....	32
4.1 MATERIAIS	32
4.2 PREPARAÇÃO DA LACASE BRUTA.....	32
4.3 PURIFICAÇÃO DA LACASE BRUTA.....	32
4.4 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA E CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNAS	33
4.5 SÍNTESE DAS PARTÍCULAS MAGNÉTICAS RECOBERTAS COM QUITOSANA	33
4.6 IMOBILIZAÇÃO DA LACASE	34
4.7 pH E TEMPERATURA ÓTIMOS	34
4.8 ESTABILIDADE DE ARMAZENAMENTO	35
4.9 ESTABILIDADE TÉRMICA	35

4.10 ESTABILIDADE OPERACIONAL E DESCOLORAÇÃO DE CORANTES TÊXTEIS	35
4.11 CARACTERIZAÇÃO DO SUPORTE	36
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
5.1 PURIFICAÇÃO DA LACASE	37
5.2 INFLUÊNCIA DA CARGA DE ENZIMA NA IMOBILIZAÇÃO	38
5.3 INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO DE GLUTARALDEÍDO NA IMOBILIZAÇÃO	42
5.4 INFLUÊNCIA DO TEMPO DE IMOBILIZAÇÃO	45
5.5 pH E TEMPERATURA ÓTIMOS	47
5.6 ESTABILIDADE DE ARMAZENAMENTO E ESTABILIDADE TÉRMICA	50
5.7 ESTABILIDADE OPERACIONAL	53
5.8 CARACTERIZAÇÃO DO SUPORTE	55
6 CONCLUSÕES.....	61
SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	61
REFERÊNCIAS	62

1 INTRODUÇÃO

Atualmente, há uma grande crise na obtenção de água de qualidade e, de acordo com a Organização das Nações Unidas (ONU), a população mundial continua em crescimento e deverá ultrapassar os nove bilhões de habitantes até 2050. Com esta perspectiva, o problema da água deve se agravar nos próximos anos. Os principais fatores associados à má qualidade da água são o manejo inadequado das águas residuais, a precariedade da infraestrutura das estações de tratamento de efluentes e as estratégias limitadas no descarte de poluentes (BARRIOS-ESTRADA et al., 2018; UNITED NATIONS, 2017).

Apesar de ser indispensável para o crescimento econômico de uma região, a indústria é um dos setores que provoca os maiores danos ambientais. Sabe-se que, anualmente, são produzidos mais de 700 mil toneladas de corantes, e que durante o processamento têxtil, principalmente nas etapas de lavagens, são perdidos cerca de 10% a 15% dos corantes (BILAL et al., 2017). Em função da baixa eficiência de remoção desses poluentes (além de outros como fármacos, agrotóxicos e aditivos químicos industriais) pelo sistema convencional de tratamento de efluentes, alguns métodos alternativos estão sendo estudados e as tecnologias de bioconversão enzimática têm atraído interesse nessa área (YANG et al., 2013).

Os fungos lignolíticos são capazes de degradar a lignina e compostos xenobióticos com estrutura semelhante à lignina devido à produção de enzimas extracelulares como as lacases (YANG et al., 2013). Algumas espécies de fungos, como *Pleurotus ostreatus*, *Pichia* sp., *Penicillium* sp. e *Candida tropicalis*, já foram relatados como sendo capazes de descolorir corantes do tipo azo por degradação e adsorção (SEN et al., 2016). Além disso, o uso de moléculas mediadoras durante a oxidação enzimática pela lacase pode proporcionar maiores taxas de degradação. Tais moléculas são compostos de baixo peso molecular, facilmente oxidados pela lacase, e que produzem radicais intermediários (MOROZOVA et al., 2007).

Devido à sua baixa especificidade, as lacases são utilizadas para diferentes fins biotecnológicos, como branqueamento e acabamento do *jeans*, deslignificação da polpa de papel, realce da cor em chás, como oxidante em panificação, em biossensores, na indústria de cosméticos, para síntese orgânica e biorremediação (OSMA; TOCA-HERRERA; RODRÍGUEZ-COUTO, 2010). No entanto, enzimas robustas, com boa estabilidade operacional e, principalmente, insolúveis são desejáveis para aplicações industriais. Essas características podem ser obtidas pela técnica de imobilização de enzimas, que também permite o uso contínuo dos biocatalisadores em biorreatores (HOMAEI et al., 2013).

A escolha do suporte para a imobilização de uma enzima está diretamente associada ao processo no qual será utilizada. Devem-se considerar diversos fatores como o meio em que a enzima será utilizada (aquoso ou com solventes), a velocidade de agitação, a configuração do reator e o tipo de substrato/produto envolvido (CIPOLATTI et al., 2017). A imobilização de enzimas em suportes micro e nanométricos possui algumas vantagens frente ao uso de macro suportes, entretanto há uma maior dificuldade de recuperação desses biocatalisadores. Essa limitação pode ser superada pelo uso de suportes magnéticos, uma vez que são facilmente recuperados do meio reacional pelo magnetismo e são suscetíveis a modificações na superfície (KALKAN et al., 2011). A quitosana é considerada um excelente biopolímero para a imobilização de enzimas, e o seu uso como revestimento de partículas magnéticas aumenta a proteção do suporte contra oxidação, reduz a tendência de agregação causada pelo magnetismo, aumenta a vida útil e funcionaliza a superfície das partículas magnéticas pela presença de grupos amino e hidroxilas (LEE; REDDY; LEE, 2013).

O custo da enzima ainda é um fator limitante para ampla aplicação em processos industriais de larga escala, principalmente para o tratamento de efluentes. Além da imobilização enzimática, uma alternativa para tornar o processo viável economicamente é o uso de extratos enzimáticos brutos (JI et al., 2017), já que são os processos de *downstream* que contribuem para o aumento do custo das enzimas, podendo chegar até 80% do custo total da enzima (AZEVEDO et al., 2009; BANKI; GERNGROSS; WOOD, 2005; HEARN; ACOSTA, 2001; SUN et al., 2018).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Imobilizar a enzima lacase em partículas magnéticas recobertas com quitosana e aplicar o biocatalisador obtido na reação de degradação de corantes têxteis.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Sintetizar as partículas magnéticas recobertas com quitosana para utilização como suporte na imobilização da enzima;
- b) Caracterizar o suporte obtido;
- c) Imobilizar a lacase bruta e a lacase purificada de *M. palmivorus*, bem como a lacase comercial de *T. versicolor*;
- d) Estudar os parâmetros que influenciam no processo de imobilização (carga de enzima, concentração de agente entrecruzante e tempo de imobilização);
- e) Caracterizar os biocatalisadores imobilizados em relação ao pH e temperatura ótimos, estabilidade térmica e estabilidade ao armazenamento refrigerado;
- f) Verificar a estabilidade operacional dos biocatalisadores obtidos em reações de descoloração de corantes têxteis.

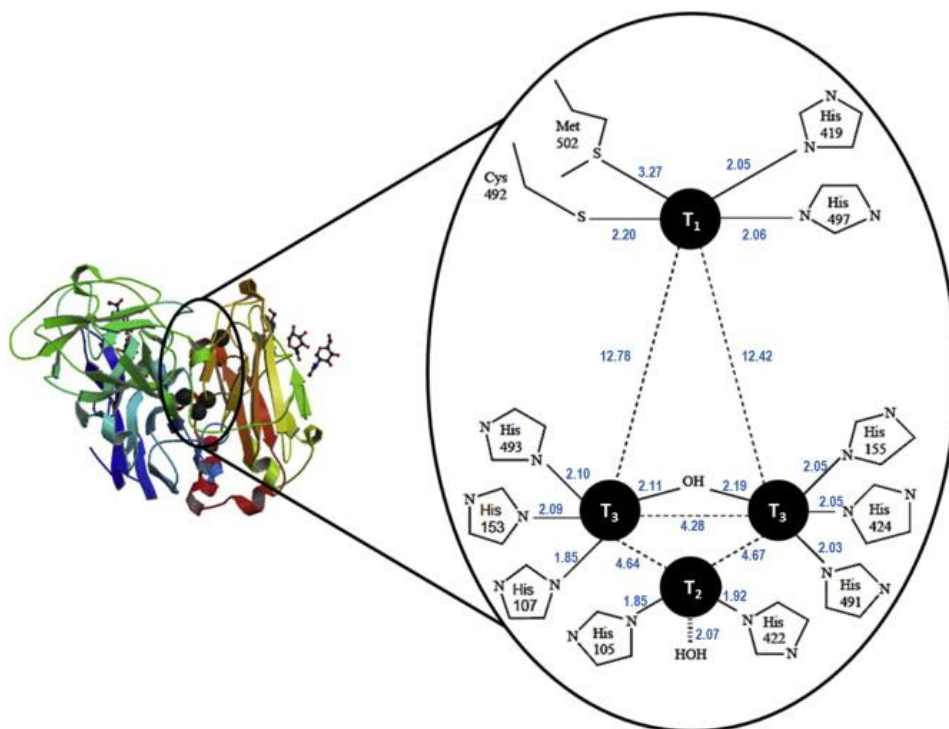
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 LACASE

As lacases [benzenodiol: oxigênio oxidoredutases, EC 1.10.3.2] são enzimas extracelulares que utilizam o oxigênio molecular para oxidar diversos compostos, preferencialmente aromáticos. Pertencem a um grupo de enzimas denominadas azul-multicobre oxidases e são caracterizadas pela presença de metais. As lacases contêm quatro átomos de cobre por monômero que estão distribuídos em três sítios redox, denominados T1, T2 e T3 binuclear (RODRÍGUEZ-COUTO, 2018; SALIS; MONDUZZI; SOLINAS, 2007).

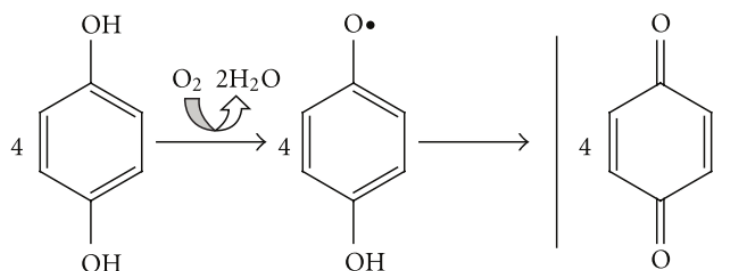
A ilustração da Figura 1 representa a estrutura tridimensional de uma lacase de *Coriolus zonatus* e o sítio ativo da enzima, com as distâncias (em Å) entre os átomos de cobre e os ligantes. O cobre do sítio T1 é reduzido com a simultânea oxidação do substrato, enquanto que nos sítios T2 e T3 o oxigênio é reduzido à água. Desta forma, os elétrons do substrato são transferidos pelo cobre do sítio T1 até o centro trinuclear T2/T3. Após a transferência de quatro elétrons, o oxigênio molecular é reduzido a duas moléculas de água, conforme mostrado na figura 2 (OSMA; TOCA-HERRERA; RODRÍGUEZ-COUTO, 2010).

Figura 1 – Sítio ativo de uma lacase



Fonte: Rivera-Hoyos et al. (2013)

Figura 2 – Reação catalisada por lacases



Fonte: Osma; Toca-Herrera e Rodríguez-Couto (2010)

As lacases podem ser encontradas em plantas, insetos, bactérias e, principalmente, em fungos lignolíticos, também denominados de *white-rot fungi*. Além das lacases, os *white-rot fungi* secretam lignina peroxidases e peroxidases dependentes de manganês, cujo papel na natureza é auxiliar na degradação da lignina para liberar celulose e hemicelulose. A baixa especificidade das lacases permite que atuem na degradação de compostos xenobióticos com estrutura semelhante à lignina (polímero fenólico e heterogêneo constituído por unidades de fenilpropano). Isto é, são capazes de degradar compostos contendo grupos aromáticos, como por exemplo: o 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazole-6-ácido sulfônico) (ABTS), o guaiacol, a siringaldazina e o 2,6-dimetóxfenol (DMP). Em geral, as lacases são proteínas com massa molecular que varia entre 40-130 kDa com ponto isoelétrico próximo a 4,0. Geralmente são glicosiladas, entre 10-25 %, e podem ocorrer na forma de isoenzimas ou em monômeros que se oligomerizam e formam complexos multiméricos (RODRÍGUEZ-COUTO, 2018).

Alguns reagentes e ânions pequenos podem inibir as lacases. Haletos (com exceção do iodeto), azida, cianeto e hidróxidos podem se ligar ao cobre dos sítios T2 e T3 e interromper a transferência interna de elétrons, provocando a inibição da enzima. Outras substâncias como alguns íons metálicos, ácidos graxos, reagentes de sulfidril, hidroxiglicina, ácido kójico, EDTA, l-cisteína, ditiotreitól, glutatona, tioureia e detergentes catiônicos de amônio quaternário podem afetar a atividade da lacase por provocarem uma ação quelante dos átomos de cobre, por modificações nos resíduos de aminoácidos ou por alterações conformacionais (DWIVEDI et al., 2011).

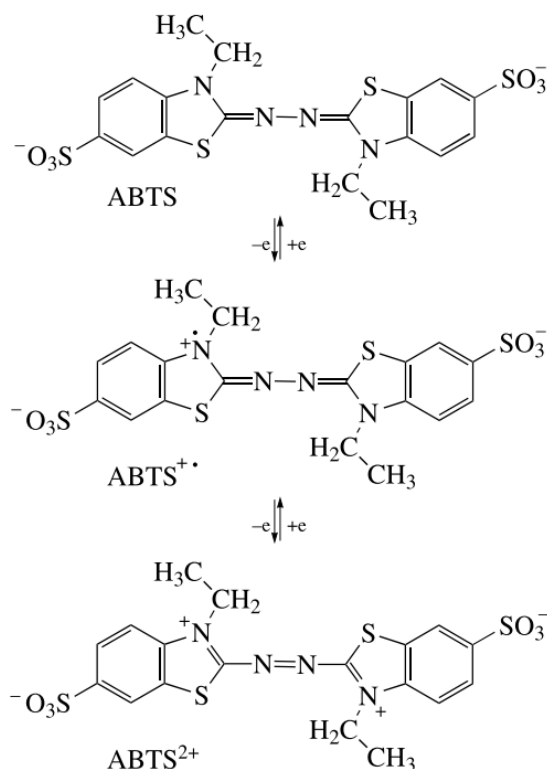
Duas lacases, de fontes diferentes, foram utilizadas neste estudo. Uma delas, produzida pelo fungo *Trametes versicolor*, comercializada pela Sigma-Aldrich, é uma preparação em pó de coloração castanho claro, com atividade enzimática $\geq 0,5 \text{ U.mg}^{-1}$. Seu pH ótimo é em torno de 4 e sua temperatura ótima em 40 °C (AYDEMIR; GÜLER, 2015). Possui massa molecular de 57 kDa e contém 4 átomos de cobre no sítio ativo (SAOUDI; GHAOUAR, 2019).

Por outro lado, a lacase de *Marasmiellus palmivorus* é pouco reportada na literatura. Esta espécie de fungo é um *white-rot fungi* e apenas alguns trabalhos relataram a produção de lacase, sendo que todos destacam os elevados níveis de produção da enzima. O fungo utilizado neste estudo, cepa VE-111, foi isolado do Parque Estadual de Itapeva (Torres/RS) pelo grupo de pesquisa do Laboratório de Enzimas e Biomassas do Instituto de Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul. Os estudos realizados pelo grupo demonstraram que a lacase tem maior atividade sob condições de reação quando o pH permanece entre 4,0 e 5,5 e temperaturas entre 25–45 °C (CANTELE et al., 2017). Também foi observado, com o auxílio de um zimograma, que o fungo produz duas isoformas da lacase (SCHNEIDER et al., 2018).

Em muitas aplicações biotecnológicas, a lacase sozinha não é suficiente para promover a oxidação de moléculas complexas. Nestes casos, se faz necessário o uso de mediadores que atuam como transportadores de elétrons e promovem o aumento das taxas de conversão do substrato. Mediadores são moléculas de baixo peso molecular, facilmente oxidadas no sítio T1 da enzima e produzem radicais catiônicos reativos instáveis, capazes de oxidar substâncias mais complexas. Os mediadores permitem a oxidação de compostos de alto peso molecular que não são acessíveis ao sítio ativo da enzima e de moléculas cuja estrutura não é passível de oxidação pela lacase, como por exemplo, compostos que não são fenólicos (CAÑAS; CAMARERO, 2010).

O primeiro sistema mediador de lacase foi obtido utilizando o substrato ABTS como transportador de elétrons e, desta forma, a gama de compostos que podem ser convertidos pela ação da lacase aumentou significativamente. Na Figura 3 estão representadas as reações de oxidação do ABTS que ocorre em dois estágios. No primeiro, a formação do radical $ABTS^{\bullet+}$ ocorre de forma rápida, enquanto que a segunda reação é mais lenta, já que forma o cátion bivalente $ABTS^{2+}$. O mediador oxidado é reduzido à sua forma inicial pelo composto a ser oxidado, e está outra vez disponível para um novo ciclo. Além do ABTS, outros mediadores da lacase foram estudados, como o 1-hidroxibenzotriazol (HBT), N-hidroxiftalimida (HPI), ácido violúrico (VA), N-hidroxiacetanilida (HAA) e o 2,2',6,6'-tetrametilpiperidina-1-oxil (TMPO) (MOROZOVA et al., 2007).

Figura 3 – Oxidação do ABTS pela lacase



Fonte: Morozova et al. (2007)

Zeng, Qin e Xia (2017) investigaram a degradação do herbicida isoproturon na oxidação de um sistema mediador utilizando uma lacase de *T. versicolor*. Foi avaliado o uso de diversos mediadores (ABTS, HBT, VA, vanilina, siringaldeído e acetoseringona) na reação de degradação e o estudo demonstrou que os sistemas mediadores da lacase podem efetivamente aumentar as taxas de degradação do herbicida. Utilizando somente a lacase, menos de 10% de degradação foi alcançado, após 24h de reação, com diferentes concentrações de enzima, enquanto que com a adição de 1 mM de HBT, o isoproturon foi completamente degradado. As reações com ABTS e VA também apresentaram resultados semelhantes, entretanto os mediadores naturais (vanilina, siringaldeído e acetoseringona) não foram efetivos, à exceção da acetoseringona, que promoveu cerca de 50% de degradação em uma concentração de 2 mM.

3.2 APLICAÇÕES DAS LACASES

A baixa especificidade, a grande variedade de compostos que podem oxidar e a liberação de água como único subproduto, utilizando apenas o oxigênio molecular, sem necessidade da

adição de cofatores para catalisar reações de oxidação são os principais motivos que contribuem para o estudo e vasta aplicação das lacases. Lacases de origem bacteriana geralmente possuem baixos níveis de expressão e eficiência catalítica, fatores que limitam o uso em aplicações industriais. Além disso, lacases de plantas são pouco estudadas devido à dificuldade de extração e purificação dessas enzimas. No entanto, a lacase de *Rhus vernicifera* tem sido amplamente estudada, já que foi a primeira lacase e uma das primeiras enzimas descritas na literatura, em 1883. Em geral, as lacases fúngicas são aplicadas em diversas áreas, pois apresentam alguns aspectos que contribuem para isso, como a possibilidade de cultivo em meios modificados com indutores, o uso de substratos de baixo custo, como resíduos da agricultura e da fermentação em estado sólido, além da descoberta frequente de novas cepas de fungos produtores de lacase e da facilidade de recuperação dessas enzimas (VISWANATH et al., 2014).

Nas biorrefinarias, as lacases têm grande potencial para auxiliar na conversão da biomassa lignocelulósica, já que desempenham um importante papel na degradação da lignina, por despolimerização oxidativa durante o pré-tratamento da biomassa. Já na indústria de alimentos e bebidas, as lacases podem ser utilizadas para eliminação de compostos fenólicos indesejáveis. Em bebidas, as lacases auxiliam no aumento da estabilidade e do tempo de estocagem de sucos de frutas, vinhos e cervejas, devido à remoção de compostos fenólicos polimerizáveis. Em panificação, atuam como melhoradores de textura, volume, frescura e sabor do pão, devido ao reforço nas estruturas do glúten (NUNES; KUNAMNENI, 2018).

O uso de lacases em biossensores é bastante conveniente, uma vez que catalisam reações de transferência de elétrons. Compostos fenólicos, oxigênio, azida, catecolaminas, flavonoides, drogas e fármacos são algumas das substâncias que podem ser detectadas pelo uso de biossensores contendo lacases imobilizadas. Lacases também têm apresentado potencial catalítico na síntese de compostos bioativos – substâncias com benefícios nutricionais que são encontradas principalmente como metabólitos secundários em plantas, bactérias e fungos – e na síntese química de antioxidantes, alcaloides e antibióticos. Alguns exemplos desses compostos são: a oxidação da rutina para a síntese de polímeros de rutina, cuja capacidade antioxidante, anti-inflamatória e antienvelhecimento é maior em comparação com o monômero de rutina; a produção de compostos bioativos pela oxidação de fenilpropanoides originando pinosinol e desidrodiisoeugenol; e a síntese de derivados do ácido ferúlico, como o dímero β -5, cujas propriedades são melhoradas. No geral, a síntese ocorre pela oxidação de alguns grupos funcionais (fenóis, aminofenóis, poliaminas, anilina, aminas aromáticas e benzenotióis) que conduzem à formação de radicais orgânicos como produtos primários, que, por sua vez, sofrem reações de acoplamento com outras espécies (substratos ou não da lacase), produzindo dímeros,

oligômeros, polímeros ou produtos de acoplamento cruzado (KUDANGA; NEMADZIVA; LE ROES-HILL, 2017; NUNES; KUNAMNENI, 2018).

Na indústria de papel e celulose, a aplicação de preparados enzimáticos à base de lacases pode ser uma alternativa ao uso de agentes químicos em, pelo menos, duas etapas do processamento, sob condições moderadas de pH, temperatura e pressão, o que leva a um menor gasto energético. O processo de biopolpação – pré-tratamento biológico da biomassa lignocelulósica para promover a deslignificação – é realizado pela produção *in situ* de uma mistura de exoenzimas em um processo de fermentação em estado sólido. Lacases e peroxidases são as principais enzimas que atuam na despolimerização da lignina, no entanto, o fungo selecionado para este processo deve apresentar alta atividade lignolítica e baixa atividade celulolítica, a fim de preservar a fração celulósica. Desta forma, a qualidade das fibras do papel é melhorada, pois o processo é menos agressivo, o gasto energético é menor e a recuperação de celulose é maior. Outra etapa do processamento que pode ser substituída pela oxidação enzimática é o branqueamento da polpa. Usualmente, o dióxido de cloro é utilizado como agente branqueador, o qual oxida a lignina residual que confere a cor marrom à polpa, porém, o cloro adicionado à biomassa orgânica pode gerar organoclorados nocivos à saúde. As lacases podem ser utilizadas neste processo, entretanto, a aplicação direta de um preparado enzimático nesta etapa, em escala industrial, ainda apresenta um custo muito elevado (GUIMARÃES et al., 2017).

3.2.1 Biorremediação

Um grande número de substâncias tóxicas, carcinogênicas e recalcitrantes são lançadas diariamente nas águas residuais, tais como bifenilas policloradas (PCBs), hidrocarbonetos, corantes, pesticidas, herbicidas, metais tóxicos, compostos nitrogenados, halogenados, disruptores endócrinos, fármacos, entre outros. Dentre os métodos de tratamento de efluentes, o conceito de biorremediação refere-se aos processos biológicos que visam transformar, degradar ou remover poluentes de ambientes contaminados. Embora efetivos, o uso de plantas e microrganismos são processos lentos de biorremediação. No entanto, a adição direta de enzimas concentradas é uma forma de aumentar as taxas de degradação, pois não depende do tempo de adaptação e crescimento do microrganismo (SHARMA; DANGI; SHUKLA, 2018).

Na área da biorremediação, existem estudos envolvendo o uso de lacases de diferentes microrganismos na degradação de diferentes substâncias, alguns deles estão resumidos na Tabela 1. Apesar de apresentarem elevada eficiência na degradação de poluentes, a adição de

enzimas purificadas é economicamente inviável devido ao elevado custo de produção e purificação dessas enzimas. Tendo isso em vista, alternativas para o uso desta enzima incluem sua imobilização, para possibilitar o reuso, o uso de resíduos como substrato para a produção da enzima e a utilização da enzima bruta ao invés da enzima purificada (FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ; SANROMÁN; MOLDES, 2013).

Tabela 1 – Algumas aplicações de diferentes lacases

Fonte da lacase	Aplicação	Mediador	Eficiência de remoção	Referência
<i>Trichoderma harzianum</i>	Descoloração de corantes	HBT	100% de verde de malaquita, 90% de azul de metileno e 60% de vermelho do congo	(BAGEWADI; MULLA; NINNEKAR, 2016)
<i>Echinodontium taxodii</i>	Degradação de antibióticos	Compostos naturais derivados da lignina	100% de antibióticos sulfonamidas	(SHI et al., 2014)
<i>Pleurotus ostreatus</i>	Remoção de bisfenol A e carbamazepina	Ausência de mediador	90% de bisfenol A e 10% de carbamazepina	(JI et al., 2017)
<i>Cerrena unicolor</i>	Degradação de tetraciclina	Ausência de mediador	80%	(YANG et al., 2016)
<i>Trametes versicolor</i>	Degradação de diclofenaco	Ausência de mediador	100%	(LONAPPAN et al., 2018)
<i>Marasmius sp.</i>	Descoloração de corantes	Ausência de mediador	72% – 76%	(VANTAMURI; KALIWAL, 2016)
<i>Trametes versicolor</i>	Degradação de fenóis	ABTS	96%	(ALVER; METIN, 2017)

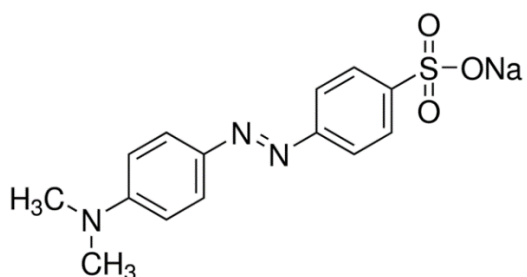
Fonte: elaborado pela autora.

De acordo com a Organização Mundial da Saúde, cerca de 17% a 20% da poluição industrial dos recursos hídricos provém do tratamento e do tingimento de têxteis. A indústria têxtil é uma das principais poluidoras, pois gera enormes volumes de efluentes com uma elevada quantidade de químicos e presença de cor. Os corantes, em mínimas quantidades, podem afetar a transparência dos corpos d'água, que interfere na absorção e reflexão da luz solar na superfície da água, prejudicando a fotossíntese das algas e plantas aquáticas. Além

disso, a maioria dos corantes utilizados são projetados para serem resistentes a exposição à luz, água e substâncias químicas (SENTHIVELAN; KANAGARAJ; PANDA, 2016).

Os corantes industriais podem ser classificados como azo corantes, antraquinonas, heterocíclicos, trifenilmetano e ftalocianinos, sendo que mais de 70% dos corantes utilizados pela indústria têxtil são do tipo azo. Estima-se que de 10% a 15% dos corantes empregados no processamento não se liguem às fibras têxteis e, portanto, são descartados nos efluentes. Muitos deles são recalcitrantes no ambiente e podem causar sérios problemas no ecossistema aquático e na saúde dos organismos vivos, já que apresentam potencial tóxico e/ou mutagênico. A estrutura química dos azos corantes é caracterizada pela presença do grupo cromóforo azo ($-N=N-$) que promove estabilidade, alta intensidade de cor e brilho e o processo de síntese é simples (reações de acoplamento azo entre sais de diazônio e nucleófilos). Um exemplo de corante pertencente a este grupo é o alaranjado de metila, cuja estrutura química está representada na Figura 4 (SENTHIVELAN; KANAGARAJ; PANDA, 2016; SINGH; SINGH; SINGH, 2015).

Figura 4 – Estrutura química do alaranjado de metila



Os processos convencionais para o tratamento de efluentes com cor são, em geral, baseados em métodos físico-químicos como adsorção, coagulação e floculação. A adsorção apresenta boa eficiência de descoloração, no entanto, o alto custo e a dificuldade de regeneração dos adsorventes são limitações desta técnica. Já a coagulação/floculação é uma metodologia pouco eficiente e consome muitos agentes químicos, além disso, ambos os processos produzem grandes quantidades de lodo, o qual requer um descarte seguro após o tratamento. As técnicas de filtração por membranas também produzem resíduos secundários que necessitam de tratamento adicional. As tecnologias de oxidação que compreendem a oxidação química (métodos que utilizam agentes oxidantes como o ozônio, o peróxido de hidrogênio, entre outros) e os processos oxidativos avançados (técnicas que visam a produção de radicais hidroxila) apresentam grande potencial para aplicação na degradação de corantes, pois são

bastante eficientes, entretanto, em muitos casos, exigem elevada demanda de energia e a adição de reagentes químicos. Tendo em vista este cenário, métodos de tratamento que apresentam melhor relação custo-benefício e a produção de menores quantidades de lodo estão sendo estudados (HOLKAR et al., 2016; SINGH; SINGH; SINGH, 2015).

Os processos biológicos englobam o uso de organismos (fungos, bactérias e algas) e/ou suas enzimas para a biorremediação e degradação de poluentes. São caracterizados por serem ecológicos, apresentarem baixa produção de lodo e baixo consumo de água. A eficiência desses sistemas é influenciada por vários fatores, como: a carga orgânica, a concentração de oxigênio dissolvido, a temperatura, o pH, a adaptabilidade dos organismos e a atividade das enzimas no meio reacional (HOLKAR et al., 2016). O tratamento enzimático é uma das tecnologias verdes promissoras para a degradação de poluentes ambientais. Dentro deste contexto, as lacases têm sido estudadas devido às características que conferem, como a baixa especificidade e consequente ampla gama de substratos e a capacidade de utilizar apenas o oxigênio como co-substrato (RODRÍGUEZ-DELGADO; ORNELAS-SOTO, 2017). Um exemplo do uso das lacases na biorremediação é o trabalho realizado por Zhuo e colaboradores (2017), no qual uma lacase de *Pleurotus ostreatus* foi avaliada quanto ao potencial de descoloração de diversos corantes sintéticos. O extrato bruto do fungo contendo a lacase foi capaz de degradar 81,3% do alaranjado de metila (100 mg/L), 87,6% do violeta cristal (100 mg/L), 85,1% do verde malaquita (100 mg/L), 98,0% do azul de bromofenol (100 mg/L), 64,6% do azul reativo 4 (800 mg/L) e 89,1% do azul brilhante de remazol R (800 mg/L) durante 24h de reação e sem a adição de mediadores, evidenciando o potencial das lacases para uso nas novas tecnologias ambientais.

3.3 IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS

As diversas reações bioquímicas que constituem o metabolismo celular são catalisadas por enzimas específicas. Quando isoladas do seu ambiente natural, as enzimas são altamente sensíveis a condições de desnaturação, como extremos de pH e temperatura e a presença de inibidores. Além disso, são moléculas de alta complexidade estrutural e de elevado custo de produção, o qual está associado principalmente às etapas de extração e purificação dessas proteínas. A maioria das enzimas atua dissolvida em meio aquoso, sob um sistema de catálise homogênea, o que dificulta a separação do meio reacional e a reutilização da enzima (HOMAEI et al., 2013; ILLANES, 2008).

Um dos métodos propostos mais bem-sucedidos para superar essas limitações é a técnica de imobilização de enzimas (HOMAEI et al., 2013; LIU; CHEN; SHI, 2018; MA et al.,

2014; SHELDON, 2007). A primeira observação científica de uma enzima imobilizada foi a adsorção de uma invertase em carvão e hidróxido de alumínio, realizada em 1916, por Nelson e Griffin. A partir deste evento, poucos trabalhos foram desenvolvidos até as décadas de 60 e 70, quando houve um aumento significativo no número de publicações. O primeiro uso industrial de enzimas imobilizadas foi reportado por Chibata e colaboradores (1976), que realizaram a imobilização de aminoacilase de *Aspergillus oryzae* para a produção de L-aminoácidos. Foi nesta época que foram desenvolvidas as bases das atuais tecnologias de imobilização; no mesmo período, o glutaraldeído começou a ser utilizado na imobilização de enzimas. Hoje, o desafio é desenvolver técnicas de imobilização que forneçam capacidade catalítica semelhante à de uma enzima solúvel, com maior estabilidade e ênfase para o desenvolvimento sustentável (GUISAN, 2006; SNEHA; BEULAH; MURTHY, 2019).

Uma das principais vantagens do uso de enzimas imobilizadas é a possibilidade de recuperação e reutilização do biocatalisador. A imobilização também permite a utilização em operações contínuas e a separação da enzima ao final do processo, diminuindo ou eliminando a contaminação do produto por proteínas. Além disso, a imobilização tende a aumentar a estabilidade da enzima, seja no armazenamento ou operacional, protege contra desnaturação, tornando o biocatalisador mais resistente a mudanças do meio e, portanto, mais robusto. A melhoria no desempenho enzimático e a reutilização do biocatalisador durante múltiplos ciclos reflete na produtividade – kg de produto por kg de enzima – que determina os custos da enzima em relação ao produto (SHELDON; VAN PELT, 2013).

Embora a imobilização de enzimas apresente uma série de vantagens, alguns aspectos negativos também são observados, tais como: a perda de atividade enzimática após a imobilização, alterações desfavoráveis nas propriedades cinéticas, o custo dos suportes e do processo de imobilização, limitações na transferência de massa e a possibilidade da ocorrência de *fouling*, ou seja, o acúmulo de material indesejado na superfície do suporte (DICOSIMO et al., 2013).

A fim de superar essas limitações, as pesquisas têm sido desenvolvidas com base no estudo dos principais elementos que compõem uma enzima imobilizada, que são: a enzima, o suporte e o modo de fixação da enzima ao suporte (GUISAN, 2006).

3.3.1 Métodos de Imobilização de Enzimas

Existe um elevado número de publicações e patentes descrevendo diferentes métodos de imobilização de enzimas e alguns desses produtos foram comercializados com sucesso. Uma

das aplicações industriais estabelecidas em larga escala para enzimas imobilizadas mais bem-sucedida foi a imobilização de glicose isomerase para a produção de xarope de milho com alto teor de frutose. O produto da Novozymes, o Sweetzymes[®], possui células de microrganismos produtores de glicose isomerase imobilizadas em um suporte inorgânico entrecruzadas com glutaraldeído. Outras enzimas também são utilizadas industrialmente em suas formas imobilizadas, como a nitrila hidratase, lactase, penicilina G acilase, aspartase, termolisina, etc (DICOSIMO et al., 2013).

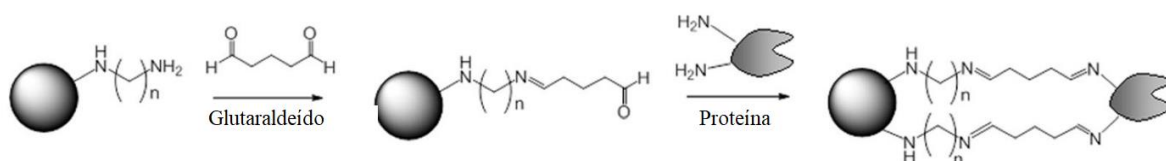
De acordo com Sheldon e Van Pelt (2013), os métodos de imobilização de enzimas podem ser classificados em três categorias: ligação a um suporte, aprisionamento e entrecruzamento.

A ligação da enzima a um suporte pode ocorrer por ligações covalentes, iônicas ou de natureza física, tais como interações hidrofóbicas, van der Waals e ligações de hidrogênio. Em geral, a adsorção física da enzima ao suporte é muito fraca e, por isso, é possível que ocorra a dessorção da enzima, principalmente sob condições de alta força iônica (SHELDON; VAN PELT, 2013). Entretanto, é uma técnica de imobilização simples, na qual a enzima, sob condições adequadas, interage com o suporte. É fundamental a presença de grupos funcionais na superfície do suporte que tenham afinidade com a estrutura da enzima. Esse método é reversível e também pode ser utilizado para purificação de proteínas. A fim de estabilizar a enzima contra a lixiviação, o biocatalisador imobilizado pode sofrer a deposição de uma camada de sílica, que protege a enzima sem provocar efeitos difusionais negativos. Um exemplo é o Novozym[®] 435, um produto que possui lipase imobilizada por interações hidrofóbicas em uma resina acrílica, revestido por um polímero de silício e que possui alta atividade enzimática retida (SNEHA; BEULAH; MURTHY, 2019).

As ligações iônicas e covalentes geralmente são mais fortes e conferem maior estabilidade à enzima. Por ser um processo de imobilização irreversível, a ligação covalente previne a perda de enzima durante a reação, contudo, o suporte (muitas vezes de alto custo) é descartado com a enzima após a inativação enzimática (SHELDON; VAN PELT, 2013). Para que ocorra a formação da ligação covalente, o suporte deve ter um grupo funcional reativo, ou deve ser ativado, a fim de reagir com os nucleófilos da enzima. Uma limitação desta técnica é que para recuperar boa parte da atividade enzimática do biocatalisador, os aminoácidos que mantêm a atividade não podem estar envolvidos na ligação covalente ao suporte. As reações mais utilizadas envolvem as seguintes cadeias laterais dos resíduos de aminoácidos: lisina (grupo amino), cisteína (grupo tiol) e ácidos aspártico e glutâmico (grupo carboxílico) (GUISAN, 2006; NETTO; TOMA; ANDRADE, 2013).

Um método bastante comum é a utilização dos grupos amino dos resíduos de lisina, naturalmente presentes na estrutura da enzima, que reagem com suportes que contêm ésteres, aldeídos e epóxidos. Em suportes aminados, um agente de entrecruzamento, como o glutaraldeído, é muito utilizado; como mostrado na figura 5, os grupos amino do suporte são ativados com uma molécula bifuncional, após, ocorre um ataque nucleofílico do grupo amino ao aldeído e a formação de ligações imina (bases de Schiff). Suportes com ésteres de N-hidroxisuccinimida podem reagir com aminas para formar ligações amidas, no entanto, em meio aquoso, a ligação da enzima compete com a hidrólise do éster, prejudicando o RI. Já os grupos aldeídos formam uma ligação amina secundária quando são reduzidos pela ação de agentes químicos, como o cianoborohidreto de sódio. Os epóxidos reagem com aminas, hidroxilas e tióis, fornecendo enzimas imobilizadas com alta estabilidade, pois podem ser fixadas por ligações multipontuais; entretanto, o processo de imobilização é lento e são necessários suportes com elevado grau de grupos epóxi para um bom rendimento (HOMAEI et al., 2013; NETTO; TOMA; ANDRADE, 2013).

Figura 5 – Ativação e imobilização de enzimas em suportes aminados



Fonte: Cantone et al. (2013)

Resíduos de cisteínas possuem o grupo tiol e também são empregados na imobilização de enzimas. A nucleoficidade dos grupos tióis permite a reação com carbonilas insaturadas, como as maleimidadas, em pH fisiológico, e formam ligações do tipo tioéter estáveis. Em geral, as proteínas têm poucos resíduos de cisteínas expostos à superfície, porém, com ferramentas da engenharia de proteínas, pode-se inserir resíduos de cisteínas na superfície da proteína, possibilitando uma imobilização dirigida da enzima (HOMAEI et al., 2013).

Outro método de imobilização de enzimas é o aprisionamento por inclusão da enzima em uma matriz, usualmente um polímero orgânico ou inorgânico, como a poliácridamida e a sílica sol-gel, ou uma membrana, como uma microcápsula ou uma fibra oca. A fim de evitar a perda de enzima, pode-se promover ligações adicionais. A diferença entre os métodos em que ocorrem ligações é que, na inclusão, a enzima é aprisionada ao suporte durante o processo de fabricação do mesmo, enquanto que na ligação ao suporte, a enzima é ligada a um suporte pré-fabricado, independentemente da localização da enzima, podendo estar na superfície externa ou

interna (poros) do material (SHELDON; VAN PELT, 2013). De acordo com Liu e colaboradores (2018), a principal restrição desta técnica é a elevada barreira de difusão, que impede o acesso de substratos macromoleculares à enzima.

Além da inclusão em redes poliméricas e da microencapsulação, outra técnica de aprisionamento de enzimas é em estruturas metal-orgânicas (MOFs – *metal-organic frameworks*). Esses materiais são porosos e cristalinos, compostos por núcleos inorgânicos e ligantes orgânicos, que se agrupam em redes multidimensionais por ligações de coordenação. Apresentam elevada área superficial, resistência química, mecânica e térmica, além de uma variedade de topografias, tamanhos e estrutura de poros, que dependem da escolha dos materiais para a síntese dos MOFs. Oferecem também locais para a ligação de enzimas por ligações coordenadas, covalentes, de hidrogênio e interações de van der Waals (DROUT; ROBISON; FARHA, 2018).

A técnica de entrecruzamento é notável devido à ausência de um suporte, o qual representa uma grande porção não catalítica do biocatalisador. A dificuldade de acesso do substrato à enzima, nos métodos de imobilização com suportes, está associada principalmente à formação de multicamadas na superfície do material e à profundidade dos poros do material onde pode estar localizada a enzima. O interesse pelos agregados de enzimas entrecruzados (CLEAs) é devido às vantagens que oferecem, como alta atividade enzimática, estabilização das enzimas e baixo custo de produção – pela inexistência de um suporte (SHELDON; VAN PELT, 2013). O método de preparação dos CLEAs é simples e econômico; a enzima é precipitada e um agente de entrecruzamento é adicionado, geralmente o glutaraldeído. O objetivo deste processo é a formação de biocatalisadores insolúveis com elevada atividade catalítica. A formação dos CLEAs ainda pode combinar ambas as etapas de purificação e imobilização em uma única operação. Apesar de diversas vantagens, este método requer a adição de agentes de entrecruzamento e a estrutura da enzima fica mais susceptível à desnaturação (VOBERKOVA et al., 2018). Além disso, apresentam baixa resistência mecânica e são de difícil recuperação (CANTONE et al., 2013).

Muitos métodos de imobilização para a lacase têm sido propostos. Como exemplo de aprisionamento da enzima em uma matriz polimérica, pode-se citar a imobilização de lacase de *Corioloropsis gallica* em esferas de alginato de cálcio. Neste estudo, a enzima imobilizada apresentou maior estabilidade ao pH e a temperatura do que a sua forma solúvel, além de 70% de atividade retida após 4 ciclos de descoloração (DAÂSSI et al., 2014). Outra forma de imobilização da lacase bastante utilizada é por ligação covalente. Misra e colaboradores (2014), imobilizaram uma lacase de *Trametes versicolor* em esferas de polietersulfona funcionalizadas

com grupos epóxi. A lacase foi imobilizada via ligação covalente pela reação dos grupos amina da enzima com os grupos epóxi do suporte e resultou em 88% de degradação do corante, em um período de 15 dias. CLEAs de lacases de *Fomes fomentarius* e *Trametes versicolor* foram preparados utilizando sulfato de amônio como agente precipitante e glutaraldeído como agente entrecruzante. Os CLEAs apresentaram maior estabilidade (térmica, pH e estocagem) do que a enzima solúvel e possibilitaram a reutilização em 6 bateladas de oxidação do ABTS, mantendo 50% da atividade inicial (VRŠANSKÁ et al., 2017).

3.3.2 Tipos de Suportes para Imobilização de Enzimas

As propriedades das enzimas imobilizadas dependem tanto da enzima, quanto do suporte selecionado para imobilização (SHELDON, 2007). Existe uma variedade de matrizes disponíveis para a imobilização de enzimas e as propriedades do biocatalisador podem ser afetadas principalmente pela natureza física do suporte (tamanho de poro, grau de porosidade, forma e tamanho do suporte) e pela natureza química do suporte (tipo de ligação ao suporte) (CAO, 2005). De acordo com Zdarta e colaboradores (2018), os suportes para imobilização de enzimas podem ser classificados em: materiais orgânicos (sintéticos ou naturais), inorgânicos e compósitos.

Os materiais orgânicos caracterizam-se pela presença de numerosos grupos reativos, alta afinidade por peptídeos e biocompatibilidade (ZDARTA et al., 2018). Os polímeros sintéticos mais utilizados para a imobilização de enzimas são as resinas acrílicas, tais como a Amberlite XAD-7 (imobilização por adsorção) e a Eupergit C (imobilização via ligação covalente), ambas as resinas macroporosas. A Eupergit C é formada pela copolimerização de N,N-metileno-bi-(metacrilamida), metacrilato glicidil, éter alilglicidílico e metacrilamida e tem sido utilizada com êxito em processos industriais, pois possui características desejáveis, como tamanho médio de 170 µm, diâmetro de poro de 25 nm, altamente hidrofílica e elevada estabilidade química e mecânica (SHELDON; VAN PELT, 2013). Outros suportes poliméricos sintéticos utilizados para imobilização de enzimas são os materiais a base de poli (vinil álcool) (PVA). São ricos em grupos hidroxila, hidrofílicos, podem ser facilmente modificados e possibilitam diversas configurações (em fibras, esferas ou microsferas) (ZDARTA et al., 2018).

Os polímeros orgânicos naturais, ou biopolímeros, têm sido amplamente utilizados como suportes para imobilização de enzimas. Alguns deles são: celulose, amido, agarose, carragenanos, colágeno, ágar, alginato e quitosana. Mesmo em baixas concentrações, são

capazes de formar géis inertes, insolúveis em água, com boa resistência e estrutura facilmente ativada. Além disso, o uso de agentes bifuncionais promove a formação de ligações cruzadas que fortalecem a estrutura e aumentam a resistência mecânica e térmica (HOMAEI et al., 2013).

A quitosana é um copolímero linear composto por D-glicosamina e N-acetil-D-glicosamina com ligações β -(1 \rightarrow 4), obtido pela desacetilação da quitina. Depois da celulose, a quitina é o polissacarídeo mais abundante na natureza e é extraída do exoesqueleto de invertebrados, principalmente de crustáceos como camarões e caranguejos, cujo exoesqueleto é um resíduo da indústria pesqueira. Devido à presença de unidades de repetição, a estrutura da quitosana pode ser considerada cristalina. A quitosana não é solúvel em água e nem em solventes orgânicos, no entanto, em meio ácido, os grupamentos amina são protonados, dessa forma ocorre uma repulsão entre os grupos NH_3^+ , desestruturando as interações intercadeia, e promovendo a solubilização do polissacarídeo (BARBOSA et al., 2017). O pKa da quitosana depende principalmente do grau de desacetilação e pode variar entre 6,3 e 7 (GUIBAL, 2005; KRAJEWSKA, 2004; SHUKLA et al., 2013; SORLIER et al., 2001), ou seja, em pHs abaixo do pKa, a quitosana é um polycation, sendo que abaixo de pH 4, está completamente protonada.

O uso da quitosana tem sido descrito em diversas áreas da ciência devido às suas características. A presença de um grupamento amino ($-\text{NH}_2$) e duas hidroxilas ($-\text{OH}$) em cada resíduo da estrutura da quitosana, confere ótimas propriedades químicas e biológicas. Além da biocompatibilidade e da notável afinidade com proteínas, a quitosana também é biodegradável, hidrofílica, não-tóxica, apresenta atividade antimicrobiana e capacidade de adsorção de metais pesados (SHUKLA et al., 2013).

Os suporte inorgânicos, tais como sílica, titânia, alumina, zircônia, óxido de zinco, magnetita, zeólitas, caulinita, hidroxiapatita, carbonos ativados, nanotubos de carbono, vidro poroso e metais nobres, em geral, são caracterizados por apresentarem excepcional estabilidade térmica e ao pH, resistência mecânica, elevada área superficial específica e possibilidade de funcionalização da superfície (ZDARTA et al., 2018). Os suportes à base de sílica apresentam características desejáveis para a imobilização de enzimas, como superfície facilmente modificada por métodos químicos – geralmente com aminosilanos, como o 3-aminopropiltriétoxissilano (APTES) e glutaraldeído – e processos de fabricação que possibilitam diversas morfologias e estruturas de poros. Além disso, apresentam elevada resistência mecânica e são quimicamente inertes (HOMAEI et al., 2013).

Nas últimas duas décadas, os materiais compósitos (híbridos) têm atraído a atenção de pesquisadores para a imobilização de enzimas, em virtude das propriedades que conferem. São caracterizados pela união de dois ou mais materiais, podendo ser a combinação de orgânicos

com orgânicos (quitosana-alginato), orgânicos com inorgânicos (quitosana-magnetita) e inorgânicos com inorgânicos (sílica-magnetita). A proposta dos materiais compósitos é unir as propriedades desejáveis de ambos os materiais, maximizando os benefícios (ZDARTA et al., 2018).

A imobilização de enzimas em micro e nanopartículas tem se mostrado interessante, uma vez que é possível imobilizar uma carga maior de enzima por unidade de massa do suporte. Além da alta relação superfície/volume, essas estruturas reduzem as limitações difusionais (ANSARI; HUSAIN, 2012). Comparando a estrutura das micro e nanopartículas com os suportes porosos tradicionais, observa-se uma diferença na localização das enzimas. Enquanto que nas micro e nanopartículas as enzimas se ligam à superfície, nos materiais porosos, grande parte dos biocatalisadores são encontrados na superfície interna do suporte (LIESE; HILTERHAUS, 2013). Contudo, a diminuição do tamanho do suporte aumenta a dificuldade de separação do biocatalisador imobilizado (nanopartículas de sílica, sílica mesoporosa, MOFs, entre outros) por centrifugação (LIU; CHEN; SHI, 2018).

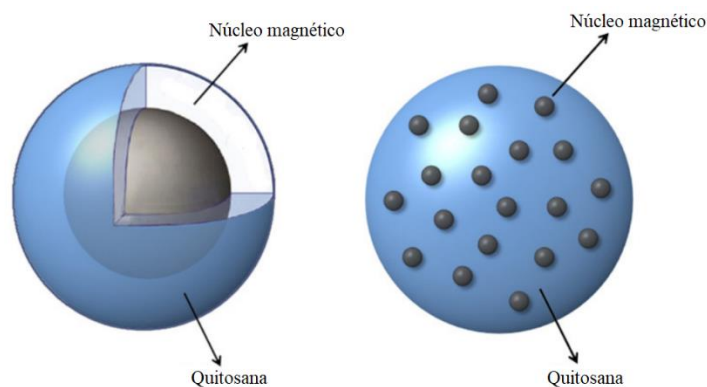
A separação magnética é um processo muito versátil devido a sua simplicidade e rapidez, o qual ocorre pela aplicação de um campo magnético externo à amostra. Esta técnica tem sido utilizada na biotecnologia para purificação de células, vírus, proteínas e ácidos nucleicos de extratos brutos. Alternativamente, as enzimas podem ser imobilizadas em partículas magnéticas, que tem como principal objetivo facilitar a separação e recuperação do biocatalisador para posterior reuso (BORLIDO et al., 2013).

Partículas de óxidos de ferro como a magnetita (Fe_3O_4) e a maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) são núcleos magnéticos muito utilizados, uma vez que apresentam relativa estabilidade química, baixa ou nenhuma toxicidade, são fáceis de sintetizar e passíveis de funcionalização. Além disso, as partículas magnéticas exibem baixa porosidade e boa estabilidade mecânica. Outras ligas à base de ferro, cobalto e estruturas do tipo espinélio também podem ser utilizadas como núcleos magnéticos (BILAL et al., 2018). Um fenômeno que tende a ocorrer com as partículas magnéticas é a aglomeração em função do magnetismo e da elevada energia superficial. Além disso, podem ser facilmente oxidadas em contato com o oxigênio do ar, o que resulta em perda do magnetismo (LEE; REDDY; LEE, 2013; LIU; CHEN; SHI, 2018).

Uma estratégia utilizada para proteger o material contra a oxidação, reduzir a agregação e aumentar o tempo de estocagem é recobrir os núcleos magnéticos com materiais orgânicos ou inorgânicos, formando compósitos. A utilização de um polímero como a quitosana, promove proteção e estabilidade às partículas magnéticas, além de funcionalizar a superfície, ser de baixo custo e de fácil preparação (LEE; REDDY; LEE, 2013). A interação entre a quitosana e as

partículas magnéticas pode ocorrer de duas formas: em estruturas com um único núcleo magnético ou com múltiplos núcleos magnéticos, como mostrado na figura 6.

Figura 6 – Partículas magnéticas recobertas com quitosana



Fonte: Lee; Reddy e Lee (2013)

3.3.3 Avaliação da Imobilização

A fim de avaliar o sucesso da imobilização, alguns parâmetros devem ser medidos e calculados, como o RI, a eficiência da imobilização (EI) e a atividade recuperada (AR). O RI é descrito como o percentual de atividade enzimática da solução de imobilização que foi imobilizado, conforme a Equação (1), em que a atividade teoricamente imobilizada é calculada pela diferença entre as atividades aplicada e recuperada no sobrenadante e nas lavagens. A EI corresponde à porcentagem de atividade enzimática que é observada na enzima imobilizada em relação ao que foi oferecido, conforme a Equação (2). Portanto, uma imobilização que apresenta 100% de RI e 0% de EI significa que todas as enzimas da solução de imobilização inicial foram imobilizadas, no entanto, o suporte com a enzima imobilizada não apresenta atividade, pois a enzima foi desnaturada ou está inacessível. A AR pode ser calculada multiplicando-se o RI pela EI ou com a atividade mensurada no suporte e a atividade inicial, segundo a Equação (3). Este parâmetro fornece uma ideia geral do processo de imobilização (SHELDON; VAN PELT, 2013).

$$RI(\%) = \frac{\textit{Atividade Teoricamente Imobilizada}}{\textit{Atividade Aplicada}} \times 100 \quad (1)$$

$$EI(\%) = \frac{\textit{Atividade Medida no Suporte}}{\textit{Atividade Teoricamente Imobilizada}} \times 100 \quad (2)$$

$$AR(\%) = \frac{\textit{Atividade Medida no Suporte}}{\textit{Atividade Aplicada}} \times 100 \quad (3)$$

3.4 CONSIDERAÇÕES SOBRE O ESTADO DA ARTE

Após a revisão da literatura disponível sobre o tema desta dissertação, pode-se observar que existe um grande número de trabalhos que relatam a imobilização de lacases de diferentes organismos produtores, bem como o uso dessas lacases na degradação de poluentes, seja com o uso de mediadores ou não. Muitas classes de contaminantes têm sido estudadas, principalmente fármacos e corantes, assim como diferentes métodos de imobilização e tipos de suportes.

Apesar disso, tendo em vista a importância de preservar o meio ambiente e a saúde humana, algumas lacunas ainda precisam ser preenchidas para tornar a tecnologia enzimática mais atrativa para o tratamento de efluentes. Uma das principais limitações é o elevado custo dos processos enzimáticos, o qual, neste trabalho, dedicou-se a minimizá-lo com a utilização de um extrato enzimático bruto como fonte de obtenção da lacase e um suporte para imobilização de baixo custo, fácil recuperação e fácil preparação. Além disso, não há relatos de imobilização da lacase utilizada neste estudo.

4 METODOLOGIA

4.1 MATERIAIS

A quitosana derivada de casca de camarão ($\geq 75\%$ desacetilada), o ABTS, a albumina do soro bovino (BSA), a lacase de *Trametes versicolor* ($\geq 0,5$ U/mg) e os corante azul brilhante de remazol R e azul preto de naftol foram adquiridos da Sigma-Aldrich (SP, Brasil). O alaranjado de metila, o azul de bromofenol, o violeta cristal e o vermelho neutro foram obtidos da Neon. O vermelho do Congo, o verde naftol B, o sulfato ferroso ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) e o cloreto férrico ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) foram adquiridos da Dinâmica® e o sulfato de amônio, da Êxodo. As resinas cromatográficas DEAE Sepharose Fast Flow e Sephacryl S200 HR e as colunas PD-10 foram adquiridas da GE Healthcare. Os tubos de ultrafiltração Vivaspin 20 com membrana de polietersulfona de 5000 MWCO foram obtidos da Sartorius Stedim Biotech. O reagente de Bradford Quick Start™ para ensaio de proteína foi comprado da Bio-Rad. Todos os outros reagentes químicos e solventes utilizados neste trabalho foram de grau analítico.

4.2 PREPARAÇÃO DA LACASE BRUTA

O extrato bruto proveniente do cultivo do fungo *Marasmiellus palmivorus* VE111 foi fornecido pelo Laboratório de Enzimas e Biomassas do Instituto de Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul. O fungo foi cultivado sob fermentação submersa de acordo com Schneider e colaboradores (2018) e, após 5 dias de cultivo, o sobrenadante foi filtrado com o auxílio de um papel filtro qualitativo para remoção dos micélios. As proteínas do extrato bruto foram concentradas por precipitação com sulfato de amônio (70%), recuperadas por centrifugação ($3000 \times g$, 10 min, 4 °C) e ressuspensas em tampão acetato de sódio 50 mM (pH 5,0). A dessalinização da amostra foi realizada em colunas de dessalinização PD-10 contendo a resina Sephadex G-25. Após a inserção da amostra na coluna, as proteínas foram eluídas por gravidade com o mesmo tampão em que estavam ressuspensas. A amostra coletada foi designada lacase bruta.

4.3 PURIFICAÇÃO DA LACASE BRUTA

A lacase bruta foi purificada por cromatografia de troca iônica e gel filtração. A cromatografia de troca iônica foi realizada em uma coluna de vidro, com 4 mL da resina DEAE

Sepharose Fast Flow – matriz esférica de troca aniônica carregada positivamente em pH abaixo de 9 – e equilibrada com tampão acetato de sódio 10 mM (pH 5,5). A amostra foi eluída com 80 mL de um gradiente de sal (0,1 – 1 M de cloreto de sódio) a um fluxo de 0,65 mL/min. As frações coletadas foram analisadas quanto à concentração de proteínas e atividade enzimática da lacase. As alíquotas purificadas foram concentradas em tubos de ultrafiltração até que o volume da amostra fosse 2% do volume da coluna utilizada para a cromatografia de gel filtração. A resina Sephacryl S200 HR foi empacotada por gravidade e a amostra foi eluída da coluna com tampão acetato de sódio 50 mM (pH 5) a um fluxo linear de 10 cm/h. As frações coletadas foram novamente analisadas quanto à concentração de proteínas e atividade enzimática da lacase.

4.4 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA E CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNAS

A atividade da lacase foi avaliada medindo-se o aumento da absorbância a 420 nm, durante 3 min, devido à oxidação enzimática de 0,5 mM de ABTS em tampão acetato de sódio 50 mM (pH 5,0). Uma unidade de atividade de lacase (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para oxidar 1 μmol de ABTS por minuto a 25 °C. O coeficiente de extinção molar do ABTS é $\epsilon_{420nm} = 36000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (BOURBONNAIS; PAICE, 1990). A concentração de proteínas foi determinada pelo método de Bradford utilizando BSA para construção da curva padrão (BRADFORD, 1976). Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

4.5 SÍNTESE DAS PARTÍCULAS MAGNÉTICAS RECOBERTAS COM QUITOSANA

As partículas magnéticas foram sintetizadas pelo método de co-precipitação. Para isso, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,1 M e $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0,2 M foram dissolvidos em água deionizada e degaseificada. Quando a solução atingiu 70°C, hidróxido de sódio 2 M foi adicionado lentamente à mistura até atingir pH 10 e um precipitado escuro foi observado. A reação foi mantida sob agitação vigorosa e sob atmosfera inerte de nitrogênio, durante 10 min. As partículas magnéticas assim obtidas foram recuperadas por magnetismo, utilizando um ímã permanente, e lavadas com água deionizada até pH neutro. As partículas foram secas em estufa a 40°C e revestidas com quitosana pela técnica de gelificação ionotrópica, como já descrito anteriormente (KLEIN et al., 2012). Resumidamente: 250 mg de quitosana e 250 mg de

partículas magnéticas (1:1) foram misturados em 57 mL de ácido acético (2% v / v) contendo Tween 80 (1% v / v). No ultrassom, foram adicionados 3 mL de sulfato de sódio 1,4 M gota a gota e a suspensão foi mantida sob agitação magnética (1500 rpm) durante 2 h. As partículas magnéticas revestidas com quitosana obtidas foram recuperadas por magnetismo e lavadas 3 vezes com tampão fosfato de sódio 0,1 M (pH 7,0). Por fim, a ativação do suporte foi realizada incubando as partículas magnéticas em 1 mL de glutaraldeído (10 mM a 170 mM) em tampão fosfato de sódio 0,1 M (pH 7) durante 1 h, sob agitação lenta. O suporte ativado foi lavado (3 x) com tampão acetato de sódio 50 mM (pH 5,0) para remover o excesso de glutaraldeído e equilibrar o suporte com o tampão de imobilização.

4.6 IMOBILIZAÇÃO DA LACASE

O suporte ativado foi incubado com as soluções (1 mL) de lacase bruta e purificada de *M. palmivorus*, bem como com a solução de lacase de *Trametes versicolor*. As soluções de enzima foram preparadas em tampão acetato de sódio 50 mM (pH 5). Após 17 h de incubação a 4°C, sob agitação lenta, o excesso de enzima que não se ligou ao suporte foi removido com 3 lavagens com o mesmo tampão. Para cada uma das lacases, diferentes cargas de enzima foram oferecidas ao suporte, a fim de determinar o melhor RI, EI, AR e atividade do biocatalisador imobilizado. Todos os parâmetros foram avaliados para definir a melhor carga para cada enzima. O tempo de imobilização foi determinado retirando-se alíquotas em diferentes tempos durante a imobilização.

4.7 pH E TEMPERATURA ÓTIMOS

O pH ótimo das lacases livres e imobilizadas foi determinado mensurando a atividade enzimática, a 25 °C, em diferentes tampões: pH 2,3-3,0 (glicina-HCl 0,05 M), pH 4,0-5,5 (acetato de sódio 0,1 M), pH 6,0-7,0 (fosfato de sódio 0,1 M) e pH 8,0 (tris-HCl 0,1 M). A temperatura ótima foi determinada em tampão acetato de sódio 50 mM, no pH ótimo para cada enzima, medindo-se a atividade enzimática em diferentes temperaturas de 25 °C a 70 °C.

4.8 ESTABILIDADE DE ARMAZENAMENTO

A estabilidade de armazenamento das lacases livres e imobilizadas foi realizada mantendo-se as enzimas a 4°C em tampão acetato de sódio 50 mM (pH 5,0). A atividade residual foi mensurada a cada 7 dias durante 42 dias.

4.9 ESTABILIDADE TÉRMICA A 50 °C

A estabilidade térmica das lacases livres e imobilizadas foi determinada pela medida da atividade enzimática residual após a incubação das soluções, em tubos fechados, em um banho-maria termostático a 50 °C. A inativação térmica foi interrompida em um banho de gelo. O tempo de meia-vida ($t_{1/2}$) foi avaliado quantitativamente pela cinética de primeira ordem, Equação (4). Este modelo sugere que a reação ocorre em uma única etapa, a uma taxa constante de inativação (k), em que A representa a atividade residual da enzima em um determinado tempo t (min), A_0 é a atividade enzimática inicial e t é o tempo de tratamento.

$$\frac{A}{A_0} = e^{-kt} \quad (4)$$

O $t_{1/2}$ foi calculado com os valores de k , de acordo com a Equação (5).

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k} \quad (5)$$

4.10 ESTABILIDADE OPERACIONAL E DESCOLORAÇÃO DE CORANTES TÊXTEIS

A fim de investigar a capacidade de reutilização, incubou-se 1 U do biocatalisador imobilizado em 1 mL de uma solução de alaranjado de metila 50 mg/L em tampão acetato de sódio 0,2 M, no pH ótimo para cada biocatalisador, e em presença de 0,45 mM de ABTS. A reação de descoloração foi realizada sob lenta agitação, durante 1 h e mensurada espectrofotometricamente pela diminuição da absorbância no comprimento de onda máximo (462 nm). Após cada ciclo de descoloração, o biocatalisador foi separado por magnetismo, lavado três vezes com o mesmo tampão e, em seguida, adicionou-se um novo meio de reação. A descoloração do primeiro ciclo foi considerada como 100%.

Além disso, foram analisados outros corantes em relação ao potencial de descoloração das lacases. Para isso, soluções com 50 mg/L dos corantes alaranjado de metila, azul brilhante de remazol R, azul preto de naftol, azul de bromofenol, violeta cristal, verde naftol B, vermelho neutro e vermelho do Congo foram preparadas e incubadas, sob agitação lenta, com 1 U do biocatalisador imobilizado sem a adição de mediadores.

4.11 CARACTERIZAÇÃO DO SUPORTE

As propriedades magnéticas das partículas magnéticas e das partículas magnéticas recobertas com quitosana foram determinadas por magnetometria de amostra vibrante (VSM) utilizando um equipamento modelo EZ9, MicroSense. As curvas de magnetização foram obtidas com a medição do momento magnético em um campo magnético aplicado de -20 kOe a +20 kOe e à temperatura ambiente. A área superficial específica das partículas magnéticas, das partículas magnéticas recobertas com quitosana e das partículas magnéticas recobertas com quitosana e com a enzima imobilizada (PMQE), foi medida pelo método de BET utilizando um Quantachrome, modelo Nova 1000e. A morfologia da superfície foi observada por microscopia eletrônica de varredura (MEV) em um equipamento JEOL (Modelo JSM 6060; Japão). Para esta análise, as partículas foram revestidas por uma fina camada de ouro e visualizadas com tensão de aceleração de 15 kV. O tamanho das partículas magnéticas e das partículas magnéticas recobertas com quitosana foi determinado por análise granulométrica por difração de laser. O equipamento utilizado foi um analisador CILAS 1180, que detecta partículas na faixa entre 0,04 – 2500 μm ; as partículas foram dispersas em água e submetidas ao ultrassom durante 60s. Foi utilizado o método Fraunhofer para cálculo do tamanho das partículas. O infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) foi realizado com o espectrofotômetro Perkin Elmer (modelo Spectrum 1000) e as amostras foram misturadas com KBr e pastilhadas. Todos os experimentos foram realizados com as amostras liofilizadas.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 PURIFICAÇÃO DA LACASE

A purificação da lacase bruta foi realizada a fim de melhor avaliar a carga enzimática aplicada ao suporte e a estabilidade da enzima após a purificação. Partindo do extrato bruto de *M. palmivorus* (0,22 mg/mL de proteína e 2,68 U/mL de atividade de lacase), conforme as etapas da purificação foram avançando, a atividade específica da amostra aumentou, como era o esperado, já que a quantidade de proteína total diminuiu. De acordo com a Tabela 2, observa-se um considerável aumento no fator de purificação após a cromatografia de troca iônica, evidenciando a purificação da amostra, pois grande parte da lacase foi separada do restante das proteínas. Apesar disso, o rendimento do processo diminuiu em função da perda de atividade da lacase entre as etapas, principalmente na última cromatografia. Tendo em vista esses resultados, optou-se por não realizar a cromatografia de gel filtração para os próximos experimentos, pois não houve um aumento no fator de purificação e o rendimento diminuiu praticamente pela metade.

Tabela 2 – Resumo da purificação da lacase bruta de *M. palmivorus*

Etapas	Proteína total (mg)	Atividade total (U)	Atividade específica (U/mg)	Rendimento (%)	Fator de purificação
Extrato bruto	185,75	2227,00	11,99	100	1
Precipitação com (NH ₄) ₂ SO ₄ (70%)	153,95	1878,57	12,20	84,35	1,02
Dessalinização PD-10	127,74	1941,83	15,20	87,20	1,27
DEAE-Sepharose	13,66	1410,23	103,23	63,32	8,61
Sephacryl S200	6,18	657,12	106,30	29,51	8,87

O fator de purificação da lacase e o rendimento do processo após a troca iônica, 8,61 e 63,32%, estão de acordo com outros trabalhos de purificação da lacase. Pawlik e colaboradores (2016), purificaram uma lacase de *Sinorhizobium meliloti* usando o extrato bruto e conseguiram um fator de purificação de 6,7 e rendimento de 48,7% após concentração por ultrafiltração e cromatografia, utilizando a resina DEAE-Sepharose. Bagewadi e colaboradores (2016), também utilizaram a mesma resina de troca iônica para purificação da lacase de *Trichoderma*

harzianum e, após as etapas iniciais de precipitação com sulfato de amônio e ultrafiltração, atingiram fator de purificação de 7 e rendimento de 12%. Entretanto, o fator de purificação aumentou para 25 quando foi realizada a etapa de gel filtração com a resina Sephadex G-100; o rendimento, por sua vez, decresceu para 7%. More e colaboradores (2011), similarmente, alcançaram valores superiores na purificação da lacase de *Pleurotus sp.* com a precipitação com sulfato de amônio, cromatografia de troca iônica com DEAE celulose e a gel filtração com Sephadex G-100. Ao final da purificação, o rendimento foi de 22,4% e o fator de purificação de 72,2. Uma alternativa para melhorar os resultados da cromatografia de gel filtração seria utilizar outra resina, como a Sephadex G-100 ou alterar os parâmetros da cromatografia (Ó'FÁGÁIN et al., 2011).

5.2 INFLUÊNCIA DA CARGA DE ENZIMA NA IMOBILIZAÇÃO

Os efeitos da carga de enzima aplicada ao suporte no RI, EI, AR e atividade da enzima imobilizada estão apresentados nas Tabelas 3, 4 e 5. O rendimento da imobilização da lacase bruta, independentemente da quantidade de enzima aplicada (5-35 mg de proteína.(g de suporte seco)⁻¹), manteve-se acima de 99%, enquanto que para a lacase comercial, foi observado um decréscimo no rendimento, conforme aumentou-se a carga de enzima (143-1143 mg de proteína.(g de suporte seco)⁻¹), principalmente devido à saturação dos sítios de ligação do suporte. O RI da lacase purificada de *M. palmivorus* apresentou o mesmo comportamento da imobilização da lacase comercial, porém a saturação foi observada com uma carga menor de enzima, já que são lacases de diferentes fontes e, portanto, com características distintas. Comparando o RI de ambas as lacases de *M. palmivorus* (bruta e purificada), percebeu-se que a lacase purificada satura os sítios de ligação do suporte com 15 mg de proteína.(g de suporte seco)⁻¹, enquanto que a lacase bruta mantém o RI ainda em 99%, entretanto, com uma tendência gradual de saturação dos sítios de ligação. Este comportamento pode ser atribuído ao grau de purificação das enzimas, que é maior na solução de imobilização da lacase purificada (Tabela 5) do que na solução de imobilização da lacase bruta (Tabela 3). Sendo assim, com uma mesma carga de proteína, a lacase bruta não satura os sítios de ligação do suporte, provavelmente devido às características distintas (tamanho e estrutura) de suas proteínas contaminantes.

A AR máxima da lacase bruta imobilizada, quando foram aplicados 5 mg de proteína.(g de suporte seco)⁻¹, foi de 73,22% (Tabela 3), diminuindo com o aumento da carga de proteína, como mostrado na figura 7. Embora esse comportamento seja mais pronunciado em suportes porosos, há estudos que relatam o mesmo para os não-porosos (FORTES et al., 2017), e está

associado com o restrito acesso do substrato aos sítios ativos das enzimas (LIN et al., 2017), que pode ser causado por limitações difusionais devido à falta de espaço intermolecular, impedimento estérico pela presença do suporte e imobilização de enzimas em multicamadas (FORTES et al., 2017; LIESE; HILTERHAUS, 2013; PEREIRA et al., 2001). Em contraste, a atividade da enzima imobilizada aumenta com o aumento da carga enzimática, até a estabilização. Assim, a máxima atividade da enzima imobilizada alcançada após a imobilização da lacase bruta foi de $139,84 \text{ U. (g de suporte seco)}^{-1}$ (Figura 7, Tabela 3), que corresponde a 48,55% de atividade recuperada, quando foram aplicados $25 \text{ mg de proteína. (g de suporte seco)}^{-1}$.

Tabela 3 – Influência da variação da carga da lacase bruta de *M. palmivorus* sobre a atividade da enzima imobilizada, eficiência (EI), rendimento (RI) e atividade recuperada (AR) após imobilização.

Carga de enzima (mg proteína.g suporte seco ⁻¹)	Atividade oferecida ao suporte (U.g suporte seco ⁻¹)	Atividade da enzima imobilizada (U.g suporte seco ⁻¹)	EI (%)	RI (%)	AR (%)
5	55,51	40,00 ± 3,44	73,28 ± 6,22	99,92 ± 0,03	73,22 ± 6,19
15	175,41	104,48 ± 1,50	59,58 ± 0,83	99,85 ± 0,04	59,49 ± 0,85
25	286,71	139,84 ± 1,27	48,74 ± 0,40	99,61 ± 0,10	48,55 ± 0,44
35	374,96	126,88 ± 10,92	33,83 ± 2,93	99,07 ± 0,06	33,51 ± 2,88

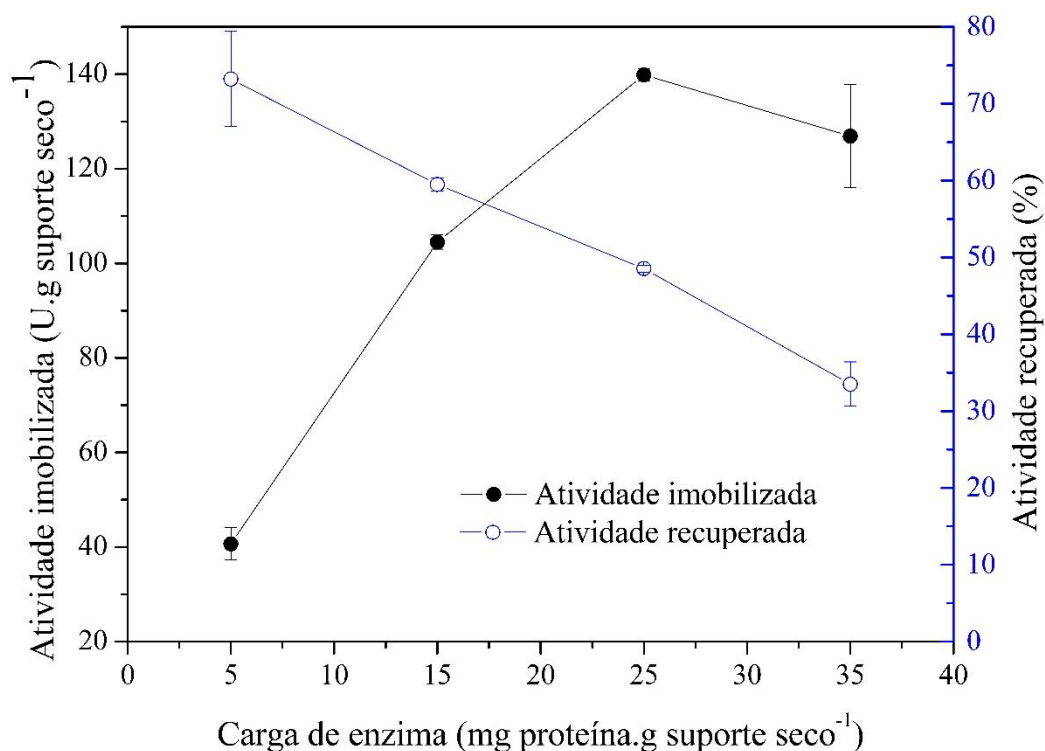
Tabela 4 – Influência da variação da carga da lacase comercial de *T. versicolor* sobre a atividade da enzima imobilizada, eficiência (EI), rendimento (RI) e atividade recuperada (AR) após imobilização.

Carga de enzima (mg proteína.g suporte seco ⁻¹)	Atividade oferecida ao suporte (U.g suporte seco ⁻¹)	Atividade da enzima imobilizada (U.g suporte seco ⁻¹)	EI (%)	RI (%)	AR (%)
143	45,14	15,04 ± 0,10	33,30 ± 0,18	99,50 ± 0,15	33,13 ± 0,22
286	87,80	35,89 ± 3,62	40,91 ± 4,08	98,47 ± 0,10	40,28 ± 4,06
571	165,88	74,92 ± 6,38	45,30 ± 3,67	97,58 ± 0,41	44,21 ± 3,77
1143	331,06	72,43 ± 11,82	21,89 ± 3,56	94,98 ± 0,07	20,79 ± 3,39

Tabela 5 – Influência da variação da carga da lacase purificada de *M. palmivorus* sobre a atividade da enzima imobilizada, eficiência (EI), rendimento (EI) e atividade recuperada (AR) após imobilização.

Carga de enzima (mg proteína.g suporte seco ⁻¹)	Atividade oferecida ao suporte (U.g suporte seco ⁻¹)	Atividade da enzima imobilizada (U.g suporte seco ⁻¹)	EI (%)	RI (%)	AR (%)
5	248,84	145,52 ± 2,18	58,48 ± 0,88	100 ± 0,00	58,48 ± 0,88
10	533,97	182,45 ± 20,08	34,17 ± 3,76	99,75 ± 0,01	34,09 ± 3,75
15	1008,49	268,40 ± 8,73	27,15 ± 0,76	98,02 ± 0,45	26,61 ± 0,87
25	1381,37	281,17 ± 16,59	31,12 ± 0,79	65,38 ± 2,20	20,35 ± 1,20
30	2007,72	297,99 ± 4,58	25,11 ± 1,65	59,20 ± 2,97	14,84 ± 0,23

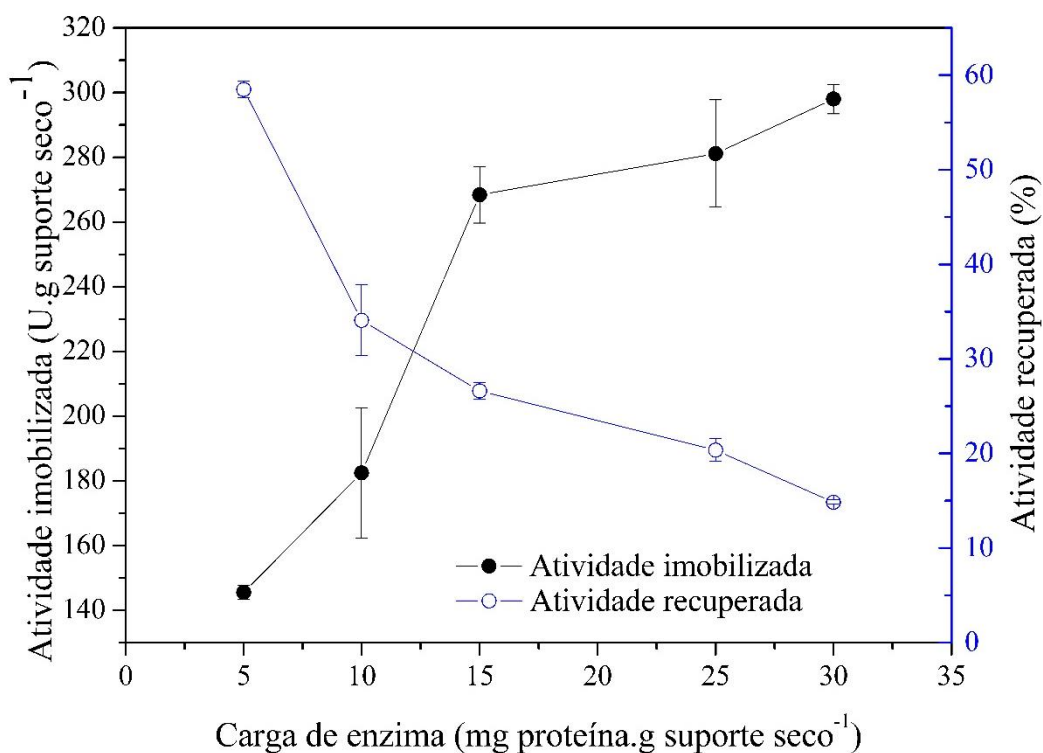
Figura 7 – Efeito da carga de lacase bruta aplicada ao suporte na atividade do biocatalisador imobilizado e na atividade recuperada



Comparando com a imobilização da lacase purificada de *M. palmivorus* (mesma carga de 25 mg de proteína.(g de suporte seco)⁻¹), a atividade da enzima imobilizada máxima praticamente dobrou, chegando a 281,17 U.(g de suporte seco)⁻¹ (Figura 8, Tabela 5), porém a AR e a EI diminuíram para 20,35% e 31,12%, respectivamente. Isto ocorre devido a maior atividade de lacase (mais purificada) na solução de imobilização que, por sua vez, não foi recuperada em função da restrição dos sítios ativos das enzimas imobilizadas pela proximidade

das moléculas. Este comportamento fica menos evidente na imobilização da lacase bruta, pois há outras moléculas proteicas ocupando os sítios de ligação e, possivelmente a lacase está melhor distribuída no suporte. Tendo isso em vista, optou-se por utilizar uma carga menor de enzima, de 15 mg de proteína.(g de suporte seco)⁻¹, na qual o RI é alto (98,02%) (Figura 8, Tabela 5) e a atividade da lacase purificada imobilizada é semelhante (268,40 U.(g de suporte seco)⁻¹) (Figura 8, Tabela 5). O mesmo comportamento foi relatado por Dal Magro e colaboradores (2018), no qual quanto maior a carga de enzima aplicada ao suporte, maior foi a atividade do biocatalisador imobilizado, e menor a AR.

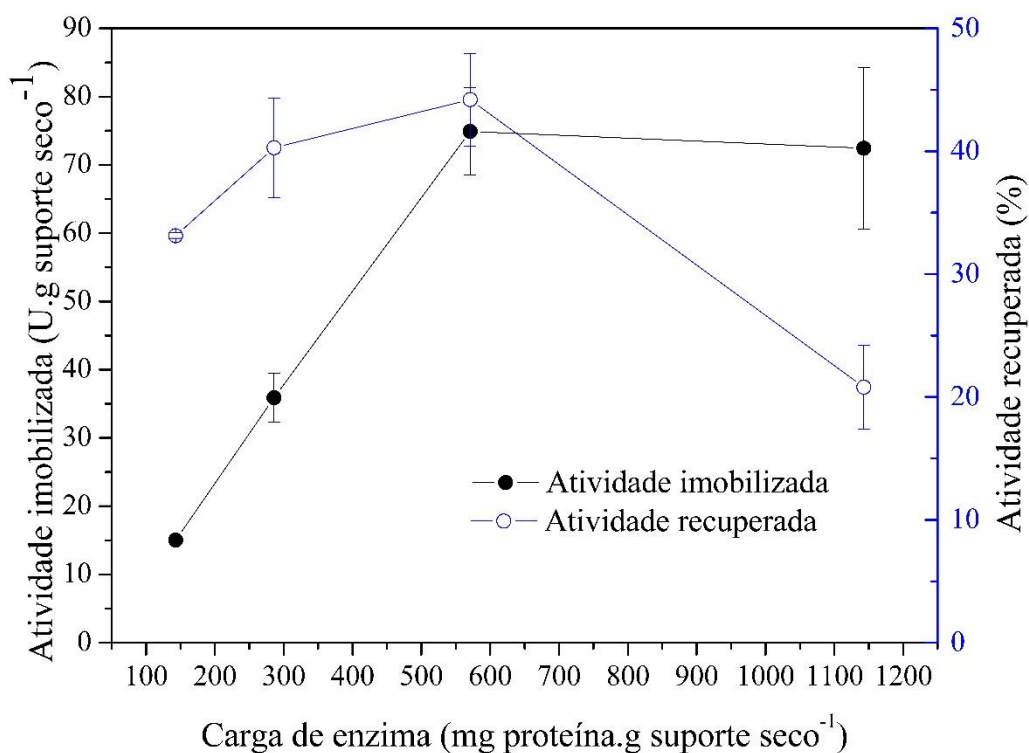
Figura 8 – Efeito da carga de lacase purificada aplicada ao suporte na atividade do biocatalisador imobilizado e na atividade recuperada



A atividade da lacase comercial imobilizada também aumentou com o acréscimo de enzima ao suporte, até estabilizar, no entanto, a carga máxima da enzima foi muito maior (571 mg de proteína.(g de suporte seco)⁻¹) e tornou o biocatalisador menos ativo (74,92 U.(g de suporte seco)⁻¹) (Figura 9, Tabela 4) do que a lacase imobilizada de *M. palmivorus* (bruta e purificada), com 44,21% de AR. Com esses resultados, é possível sugerir que a maior carga enzimática que pode ser fornecida ao suporte usando a enzima comercial ocorre principalmente devido ao maior grau de purificação, comparado à lacase bruta de *M. palmivorus* e às diferenças

entre as enzimas, já que são de microrganismos distintos. A presença de outras proteínas na solução de imobilização da lacase bruta, que foram recuperadas do extrato bruto juntamente com a lacase na precipitação com sulfato de amônio (SCOPE, 1993), podem preencher os sítios de ligação do suporte, reduzindo assim a área da superfície disponível para a imobilização da lacase. Além disso, a atividade específica da lacase bruta imobilizada de *M. palmivorus* ($5,59 \text{ U} \cdot (\text{mg de proteína})^{-1}$) é cerca de 43 vezes maior em relação a lacase comercial imobilizada de *T. versicolor* ($0,13 \text{ U} \cdot (\text{mg de proteína})^{-1}$), que também foi observada para as enzimas em suas formas solúveis (atividade específica da solução de imobilização da lacase bruta foi de $11,3 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$ e da solução de imobilização da lacase comercial foi de $0,3 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$).

Figura 9 – Efeito da carga de lacase comercial aplicada ao suporte na atividade do biocatalisador imobilizado e na atividade recuperada



5.3 INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO DE GLUTARALDEÍDO NA IMOBILIZAÇÃO

O glutaraldeído é considerado um agente de reticulação bastante versátil, pois possui duas carbonilas que podem reagir com os grupos amino da quitosana e da enzima, resultando na formação de bases de Schiff. Concentrações muito baixas de glutaraldeído podem prejudicar o RI, pois a quantidade de sítios ativados é pequena, por outro lado, é necessário determinar

uma concentração adequada, a fim de evitar o excesso de sítios ativados que podem induzir a desnaturação da enzima por mudanças conformacionais, influenciando na EI (ZHANG et al., 2009; ZHENG et al., 2016).

Nas Tabelas 6 e 7, estão apresentados os dados de RI e EI, bem como a AR e atividade relativa das enzimas imobilizadas (lacase bruta e comercial) em função da variação da concentração de glutaraldeído. Como mostrado no gráfico da figura 10, a melhor concentração de agente entrecruzante para a imobilização da lacase bruta foi de 90 mM, enquanto que para a imobilização da lacase comercial, a atividade relativa aumentou com o acréscimo de glutaraldeído. Este comportamento pode ser atribuído à maior carga enzimática aplicada para a imobilização da lacase comercial em comparação com a lacase bruta. Esta última, presente em menor quantidade no suporte, pode sofrer múltiplas ligações devido ao excesso de sítios ativados pelo glutaraldeído, levando à sua desnaturação e conseqüente diminuição de atividade enzimática, como discutido acima. Para ambas as enzimas, a concentração de glutaraldeído escolhida para os próximos experimentos foi de 90 mM (0,85% v/v). No caso da lacase comercial, os valores de atividade relativa da enzima imobilizada, EI, RI e AR (Tabela 7) praticamente estabilizaram quando foram utilizadas concentrações acima de 90 mM, sendo assim, não é justificável aumentar a concentração de glutaraldeído. Esses resultados estão de acordo com o estudo de Zheng e colaboradores (2016), que também avaliaram a melhor concentração de glutaraldeído, para a imobilização da lacase de *Trametes pubescens* em esferas de quitosana. Conforme a concentração de glutaraldeído foi aumentada, a atividade da enzima imobilizada aumentou, até um ponto máximo (0,8% v/v) e então começou a decair em função do excesso de sítios ativados pelo glutaraldeído.

Figura 10 – Efeito da concentração de glutaraldeído na atividade da lacase bruta imobilizada e da lacase comercial imobilizada

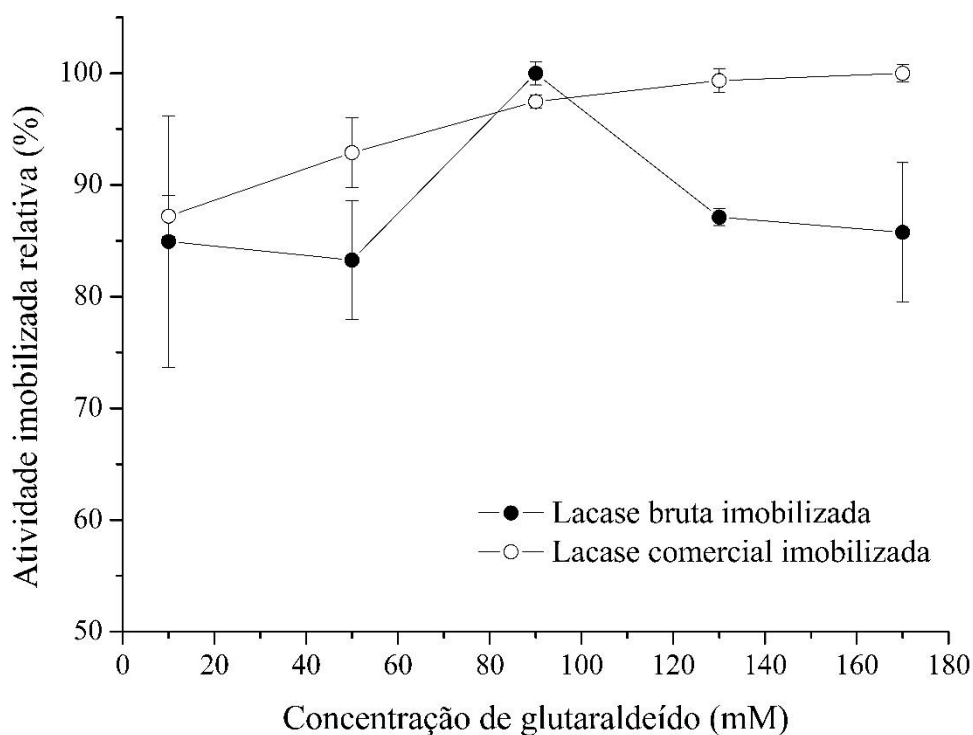


Tabela 6 – Influência da variação da concentração de glutaraldeído sobre a atividade relativa da lacase bruta de *M. palmivorus* após imobilização e sobre os parâmetros de imobilização EI, RI e AR.

Concentração de glutaraldeído (mM)	Atividade relativa da enzima imobilizada (%)	EI (%)	RI (%)	AR (%)
10	84,93 ± 11,27	44,19 ± 3,03	98,44 ± 0,19	43,50 ± 2,91
50	83,27 ± 5,34	42,90 ± 1,39	99,41 ± 0,01	42,65 ± 1,38
90	100 ± 1,05	51,60 ± 0,28	99,22 ± 0,00	51,21 ± 0,27
130	87,11 ± 0,75	44,95 ± 0,20	99,24 ± 0,00	44,61 ± 0,20
170	85,76 ± 6,23	44,18 ± 1,65	99,42 ± 0,08	43,92 ± 1,61

Tabela 7 – Influência da variação da concentração de glutaraldeído sobre a atividade relativa lacase comercial de *T. versicolor* após imobilização e sobre os parâmetros de imobilização EI, RI e AR.

Concentração de glutaraldeído (mM)	Atividade relativa da enzima imobilizada (%)	EI (%)	RI (%)	AR (%)
10	87,20 ± 1,84	38,39 ± 1,00	95,34 ± 0,28	36,60 ± 0,85
50	92,89 ± 3,15	40,58 ± 1,52	96,08 ± 0,02	38,99 ± 1,45
90	97,46 ± 0,57	42,30 ± 0,25	96,71 ± 0,06	40,90 ± 0,27
130	99,35 ± 1,09	42,96 ± 0,61	97,06 ± 0,21	41,70 ± 0,50
170	100 ± 0,77	43,24 ± 0,33	97,07 ± 0,08	41,97 ± 0,35

5.4 INFLUÊNCIA DO TEMPO DE IMOBILIZAÇÃO

O tempo de contato entre a enzima e o suporte é importante de ser avaliado, uma vez que curtos períodos de tempo podem não ser suficiente para que ocorra a ligação entre a enzima e os sítios ativos do suporte. Porém, tempos mais longos também podem ser negativos pois a enzima pode perder sua atividade durante o processo de imobilização. Como mostrado na figura 11, a AR para ambas as lacases não apresentou grandes variações ao longo do tempo, bem como para a atividade do biocatalisador imobilizado (Tabelas 8 e 9). Após 30 min de contato entre a solução de imobilização e o suporte, o RI da lacase bruta e comercial foi cerca de 99% e 96%, respectivamente. Além disso, os resultados foram muito semelhantes para todo o intervalo de tempo avaliado (5 – 360 min), demonstrando que as enzimas se imobilizaram rapidamente e não sofreram grandes alterações com o tempo.

Figura 11 – Efeito do tempo de imobilização na AR da lacase bruta imobilizada e da lacase comercial imobilizada.

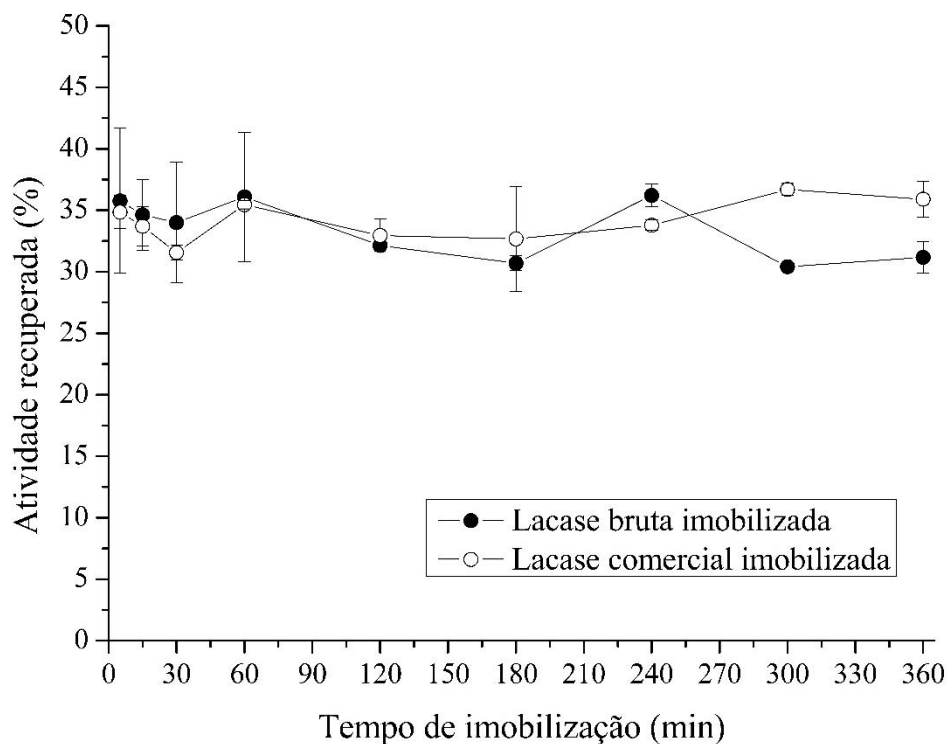


Tabela 8 – Influência do tempo de imobilização da lacase bruta de *M. palmivorus* sobre a atividade da enzima imobilizada e sobre os parâmetros de imobilização EI, RI e AR.

Tempo de imobilização (min)	Atividade da enzima imobilizada (U.g suporte seco ⁻¹)	EI (%)	RI (%)	AR (%)
5	152,52 ± 25,14	36,38 ± 6,07	98,32 ± 0,20	35,76 ± 5,89
15	147,69 ± 12,22	35,08 ± 2,90	98,72 ± 0,01	34,63 ± 2,87
30	145,04 ± 20,95	34,35 ± 4,99	99,01 ± 0,08	34,01 ± 4,91
60	153,90 ± 22,50	36,46 ± 5,37	98,99 ± 0,12	36,08 ± 5,27
120	137,07 ± 1,10	32,43 ± 0,25	99,08 ± 0,04	32,14 ± 0,26
180	130,93 ± 2,59	30,93 ± 0,62	99,27 ± 0,01	30,70 ± 0,61
240	154,46 ± 3,94	36,51 ± 0,88	99,19 ± 0,13	36,22 ± 0,92
300	129,70 ± 1,05	30,61 ± 0,26	99,35 ± 0,03	30,41 ± 0,25
360	132,95 ± 5,34	31,40 ± 1,21	99,26 ± 0,15	31,17 ± 1,25

Tabela 9 – Influência do o tempo de imobilização da lacase comercial de *T. versicolor* sobre a atividade da enzima imobilizada e sobre os parâmetros de imobilização EI, RI e AR.

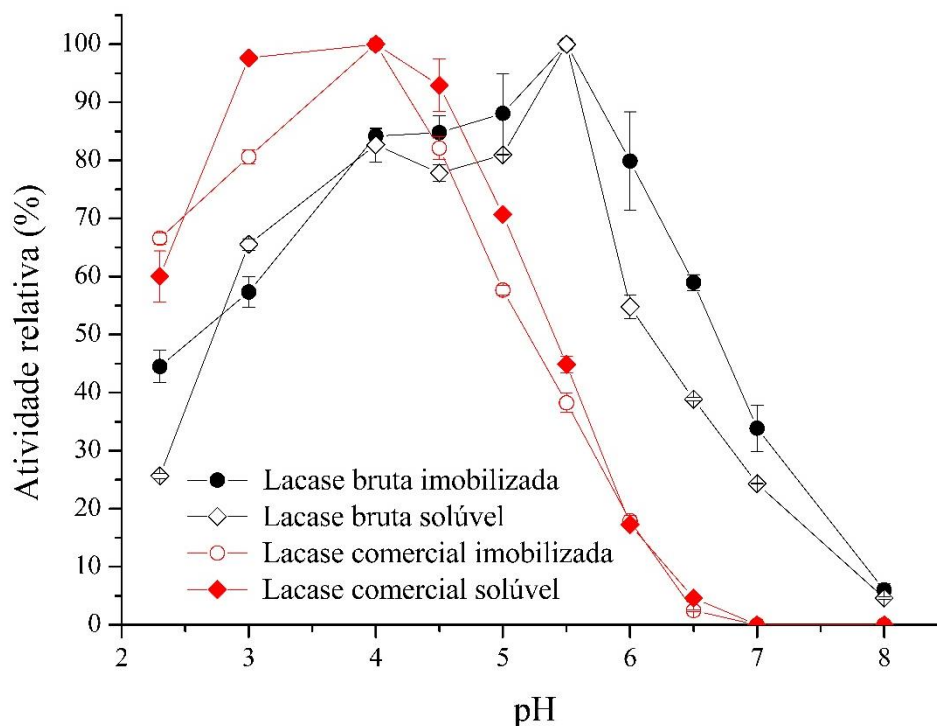
Tempo de imobilização (min)	Atividade da enzima imobilizada (U.g suporte seco ⁻¹)	EI (%)	RI (%)	AR (%)
5	70,11 ± 2,76	37,24 ± 1,65	93,60 ± 0,46	34,85 ± 1,37
15	67,78 ± 3,23	35,42 ± 1,71	95,13 ± 0,06	33,69 ± 1,61
30	63,49 ± 1,17	32,91 ± 0,52	95,91 ± 0,26	31,56 ± 0,58
60	71,30 ± 0,67	36,66 ± 0,27	96,69 ± 0,21	35,45 ± 0,33
120	66,30 ± 2,67	34,01 ± 1,32	96,91 ± 0,14	32,96 ± 1,33
180	65,71 ± 8,58	33,44 ± 4,39	97,69 ± 0,06	32,67 ± 4,26
240	67,97 ± 0,85	34,59 ± 0,47	97,68 ± 0,10	33,79 ± 0,42
300	73,81 ± 1,03	37,48 ± 0,57	97,91 ± 0,11	36,69 ± 0,51
360	72,21 ± 2,99	36,71 ± 1,51	97,77 ± 0,03	35,90 ± 1,48

5.5 pH E TEMPERATURA ÓTIMOS

A imobilização pode alterar as características enzimáticas, tais como as condições ótimas de pH e temperatura. O efeito do pH na atividade das lacases (bruta e comercial) solúveis e imobilizadas foi avaliado na faixa de pH entre 2,3–8 e está apresentado no gráfico da Figura 12. Após a imobilização, o pH ótimo da lacase bruta e comercial foi de 5,5 e 4, respectivamente, e não houve diferença entre os pHs ótimos das formas imobilizadas e solúveis. Este comportamento também foi relatado em outros estudos (JIANG et al., 2005; WANG et al., 2008). Acima do pH ótimo (5,5), a lacase bruta imobilizada apresentou um decréscimo de atividade mais gradual em relação à sua forma solúvel; em pH 6,5 a enzima imobilizada reteve $58,96 \pm 1,37$ de atividade, enquanto que a enzima solúvel reteve $38,85\% \pm 0,31$ de atividade. Essa maior resistência ao pH, após imobilização, pode estar associada ao efeito protetor do suporte, que cria um microambiente ao redor do sítio ativo da enzima. Sangeetha e Abraham (2008) perceberam o deslocamento do pH ótimo da subtilisina de *Bacillus subtilis*, de 7 para 9, após a imobilização em CLEAs. O desvio do pH para o lado alcalino pode ser atribuído às interações da enzima com o glutaraldeído, que liga os grupamentos amino, fazendo com que a enzima adquira carga negativa e, assim, o pH ótimo muda para o lado superior (SANGEETHA; ABRAHAM, 2008).

Entretanto, o mesmo comportamento não foi observado para a lacase comercial. Comparando-se o pH ótimo da lacase bruta com o da lacase comercial, percebeu-se que a enzima do *M. palmivorus* é mais favorável para atuar em pHs mais próximos da neutralidade. Essa diferença observada nos pHs ótimos pode ser atribuída à estrutura dos sítios ativos de cada uma das enzimas. O pH ótimo das lacases depende de dois fatores: da diferença do potencial redox entre o substrato e o cobre do sítio T1 e da ligação de ânions hidróxido aos sítios T2/T3 (FOKINA et al., 2015). Um estudo realizado por Xu (1997), demonstrou que essa diferença do potencial redox entre o substrato e o cobre poderia resultar em um aumento nas taxas de oxidação do substrato em pH mais alcalino, porém os ânions hidróxido causam a inibição da lacase, pelo bloqueio dos sítios T2/T3, causando um efeito oposto. Tendo isso em vista, pode-se inferir que a lacase de *T. versicolor* é mais susceptível a pHs neutros e alcalinos devido à maior exposição dos seus sítios de cobre T2/T3 e, portanto, são inibidos mais facilmente do que os sítios da lacase de *M. palmivorus*.

Figura 12 – pH ótimo das lacases (bruta e comercial) solúveis e imobilizadas.

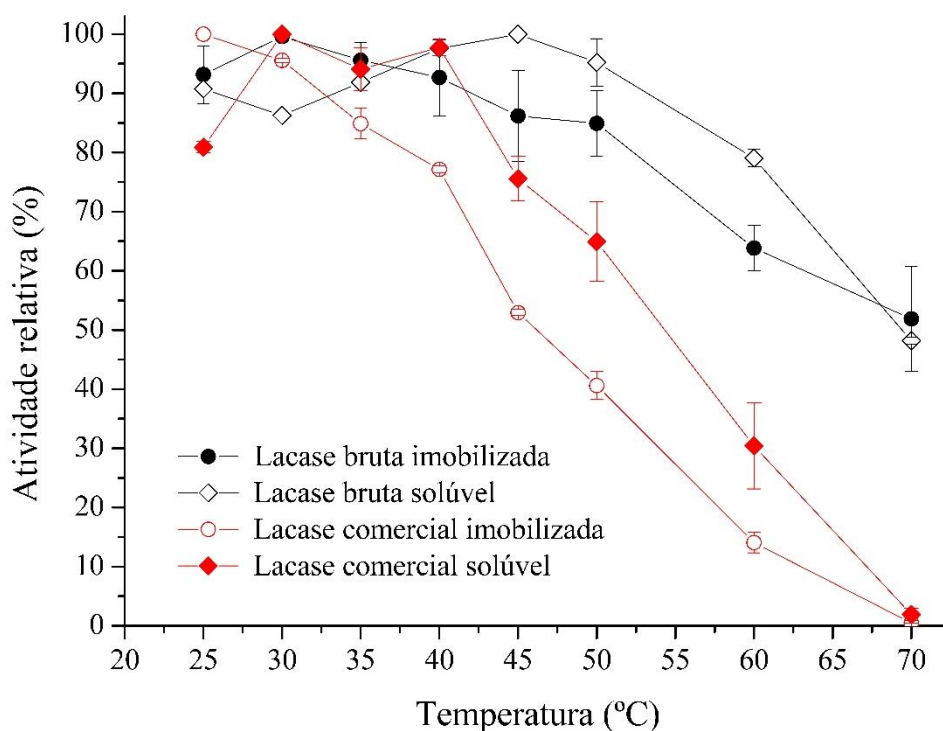


O efeito da temperatura nas atividades de ambas as lacases imobilizadas e solúveis, na faixa entre 25–70 °C, estão apresentadas na Figura 13. Para a lacase bruta, a temperatura ótima foi encontrada em torno de 40–50 °C para sua forma solúvel e em torno de 25–35 °C para a forma imobilizada. Em relação à lacase comercial, a temperatura ótima foi em torno de 30–40

°C para a enzima solúvel, e de 25 °C para a enzima imobilizada. Como pode ser observado, as temperaturas ótimas foram maiores para as formas solúveis do que para as enzimas imobilizadas. Em geral, as interações enzima-enzima e suporte-enzima aumentam com o aumento da temperatura (ZHENG et al., 2016), o que pode influenciar na temperatura ótima da enzima. Neste caso, o agente entrecruzante utilizado (glutaraldeído) é uma molécula muito reativa que pode, com o aumento da temperatura, interagir fortemente com as moléculas de enzima, levando à desnaturação. Kalkan e colaboradores (2011) imobilizaram uma lacase de *T. versicolor* em nanopartículas magnéticas recobertas com quitosana e avaliaram a temperatura ótima da enzima solúvel e imobilizada. A temperatura ótima foi de 40 °C para as formas solúvel e imobilizadas (enzima adsorvida em quitosana e enzima ligada ao suporte ativado com cloreto cianúrico) e de 30 °C para a enzima imobilizada no suporte ativado com carbodiimida. Essa alteração na temperatura ótima pode ser devido ao método de imobilização e interação entre a enzima e o suporte. Sendo assim, nem sempre a imobilização favorece a enzima em relação ao aumento da temperatura ótima ou de sua resistência em temperaturas mais elevadas.

Em relação às diferenças entre as duas lacases, ainda pode-se perceber que a lacase bruta de *M. palmivorus* apresentou uma temperatura ótima superior em comparação com a lacase comercial de *T. versicolor* e maior resistência a temperaturas mais elevadas. A 70 °C, a lacase bruta (solúvel e imobilizada) ainda apresentou cerca de 50% de sua atividade inicial, enquanto que a lacase comercial (solúvel e imobilizada) foi completamente inativada.

Figura 13 – Temperatura ótima das lacases (bruta e comercial) solúveis e imobilizadas.



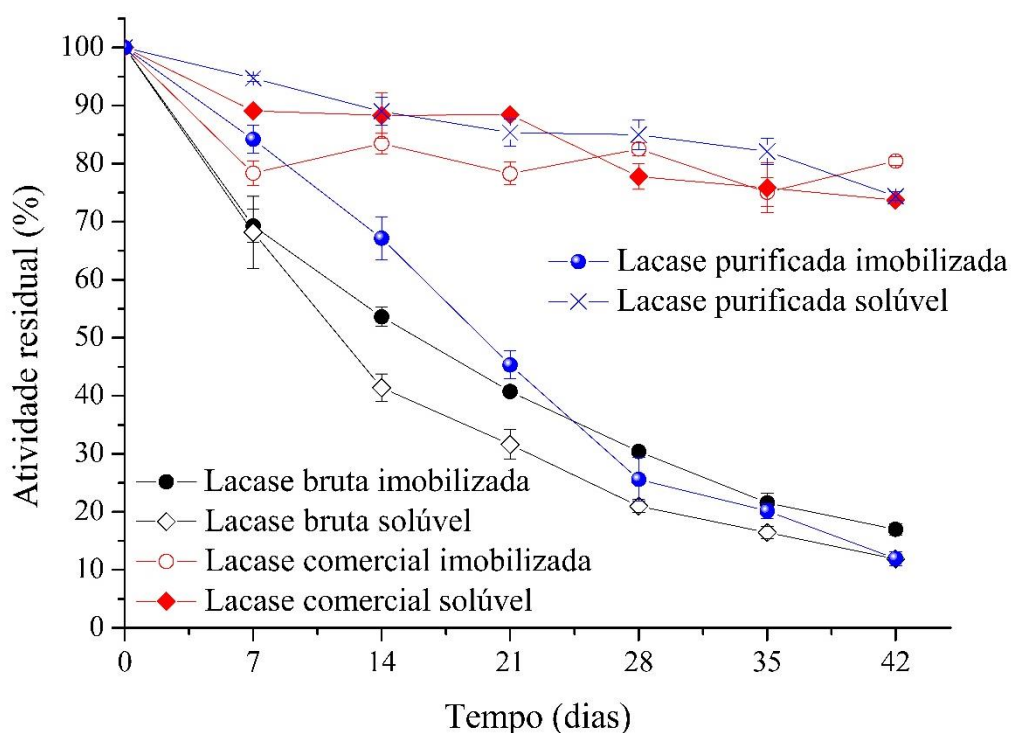
5.6 ESTABILIDADE DE ARMAZENAMENTO E ESTABILIDADE TÉRMICA

A estabilidade de armazenamento a 4 °C foi avaliada durante 42 dias, pela medida da atividade enzimática residual dos biocatalisadores, a cada 7 dias. No gráfico da Figura 14, pode-se observar que a lacase comercial em ambas as formas (solúvel e imobilizada) reteve mais de 70% de sua atividade inicial e que a imobilização não influenciou na estabilidade da enzima. No entanto, para a lacase bruta, as atividades residuais das enzimas solúvel e imobilizada diminuíram gradualmente ao longo do tempo. Este comportamento pode ser explicado pela influência de outras enzimas produzidas pelos fungos lignolíticos, que podem estar presentes no extrato bruto da lacase, como celulasas, hemicelulasas, proteases, ureases e fosfatases (VOBERKOVÁ et al., 2017). Dentre estas, as proteases catalisam reações de hidrólise de proteínas, ocasionando em perdas da enzima de interesse (ILLANES, 2008). A fim de confirmar a presença de proteases na lacase bruta, foi realizado um ensaio com azocaseína (CHARNEY; TOMARELLI, 1947), demonstrando a presença de 9,2 U/mL de protease.

Devido à ausência de proteases, a enzima purificada solúvel de *M. palmivorus* apresentou maior estabilidade de armazenamento (muito semelhante à lacase comercial) do que a enzima bruta de *M. palmivorus*, com era de se esperar. Entretanto, ao contrário do esperado,

a forma imobilizada da enzima purificada de *M. palmivorus* apresentou menor estabilidade de armazenamento do que sua forma solúvel (aproximadamente 20% e 80% de atividade residual após 35 dias de armazenamento, respectivamente), possivelmente devido ao efeito negativo provocado pelo suporte sobre a atividade enzimática. Segundo alguns estudos, as partículas de magnetita podem promover a perda de atividade de lacase, em função da complexação do ferro exposto na superfície da partícula com a enzima e/ou pela ocorrência de reações entre as cisteínas e os sítios de ferrihidrita, que podem estar presentes na superfície do suporte (NETTO et al., 2011; NETTO; TOMA; ANDRADE, 2013). Um estudo realizado por Cornell e Schneider (1989) demonstrou que as cisteínas reagem com a ferrihidrita, no sentido de convertê-la em goetita, sob condições fisiológicas. Essa possível inibição enzimática causada pelo suporte não havia sido percebida anteriormente, pois a perda de atividade pela ação das proteases era mais pronunciada.

Figura 14 – Estabilidade de armazenamento das enzimas solúveis e imobilizadas



No gráfico da Figura 15 estão apresentadas as atividades residuais das lacases solúveis e imobilizadas após incubação das enzimas a 50 °C durante 150 min. O valor de k e o tempo de meia-vida foram determinados para cada biocatalisador conforme as Equações (4) e (5), bem como o fator de estabilização (relação entre o tempo de meia-vida da enzima imobilizada e da enzima solúvel), conforme os dados apresentados na Tabela 10.

Figura 15 – Estabilidade térmica das lacases (bruta e purificada de *M. palmivorus* e comercial de *T. versicolor*) solúveis e imobilizadas.

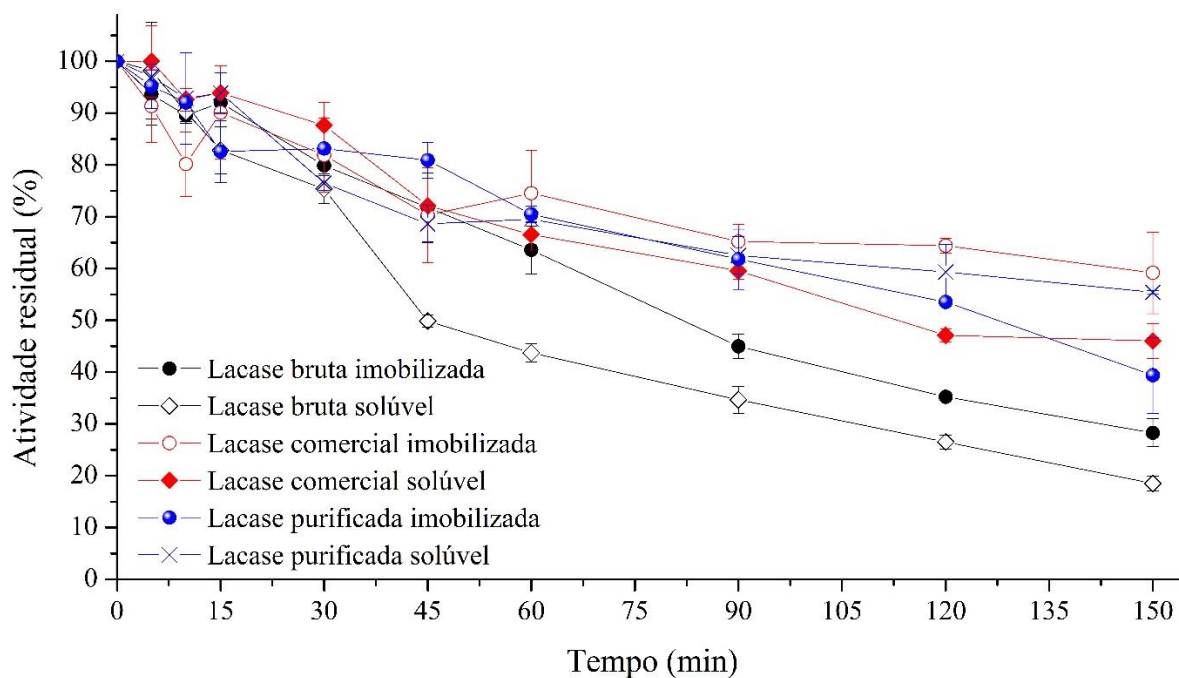


Tabela 10 – Valor de k , tempo de meia-vida e fator de estabilização para as lacases solúveis e imobilizadas.

Enzima	Valor de k (min^{-1})		$t_{1/2}$ (min)		Fator de estabilização
	Solúvel	Imobilizada	Solúvel	Imobilizada	
Lacase bruta de <i>M. palmivorus</i>	0,0114	0,0086	60,80	80,60	1,33
Lacase purificada de <i>M. palmivorus</i>	0,0040	0,0055	173,29	126,03	0,73
Lacase comercial de <i>T. versicolor</i>	0,0057	0,0031	121,60	223,60	1,84

De acordo com o gráfico da Figura 15, a lacase bruta e a lacase comercial imobilizadas foram mais estáveis, apresentando maior atividade residual em comparação com as suas formas solúveis. Além disso, comparando-se os valores de k e o tempo de meia-vida da lacase bruta solúvel e imobilizada, também é possível perceber e que a enzima imobilizada foi mais estável do que a sua forma solúvel, proporcionando um fator de estabilização de 1,33 (Tabela 10). Entretanto, foi observado um comportamento oposto para a lacase purificada de *M. palmivorus*, uma vez que a enzima purificada solúvel apresentou maior estabilidade térmica ($t_{1/2} = 173,29$ min) em relação à forma imobilizada ($t_{1/2} = 126,03$ min). É provável que isto ocorra pelo mesmo efeito provocado pelo suporte na estabilidade de armazenamento, em função de interações entre o suporte e a enzima que são prejudiciais à atividade enzimática, como já discutido

anteriormente. Vale ressaltar que, apesar de a enzima bruta também sofrer este efeito negativo do suporte, a lacase bruta imobilizada ainda apresentou maior estabilidade térmica em relação a lacase bruta solúvel, uma vez que as proteases da solução de lacase bruta solúvel tornaram-se menos ativas após o processo de imobilização.

Já a lacase comercial imobilizada apresentou maior fator de estabilização (1,84) e atividade residual de $59,16\% \pm 7,86$ após 150 min de incubação a 50°C , contra $46,00\% \pm 3,37$ de atividade relativa da lacase comercial solúvel (Figura 15). Este comportamento pode ser explicado uma vez que as estruturas 3D das moléculas de enzima são protegidas, após a imobilização, contra a desnaturação térmica devido à restrição da mobilidade conformacional. A enzima ligada a um suporte requer maior energia para quebrar essa conformação, aumentando, assim, a estabilidade térmica da lacase comercial imobilizada (SOJITRA; NADAR; RATHOD, 2017; WANG et al., 2008). Segundo Cao (2005), a estabilidade térmica é governada pelo número e pela natureza das ligações formadas entre a enzima e o suporte, pelo grau de confinamento da enzima no suporte, pelo microambiente criado ao redor da enzima e pelas condições da imobilização. Tendo em vista que o suporte não é poroso, esta seria uma causa para que o fator de estabilização não fosse tão elevado.

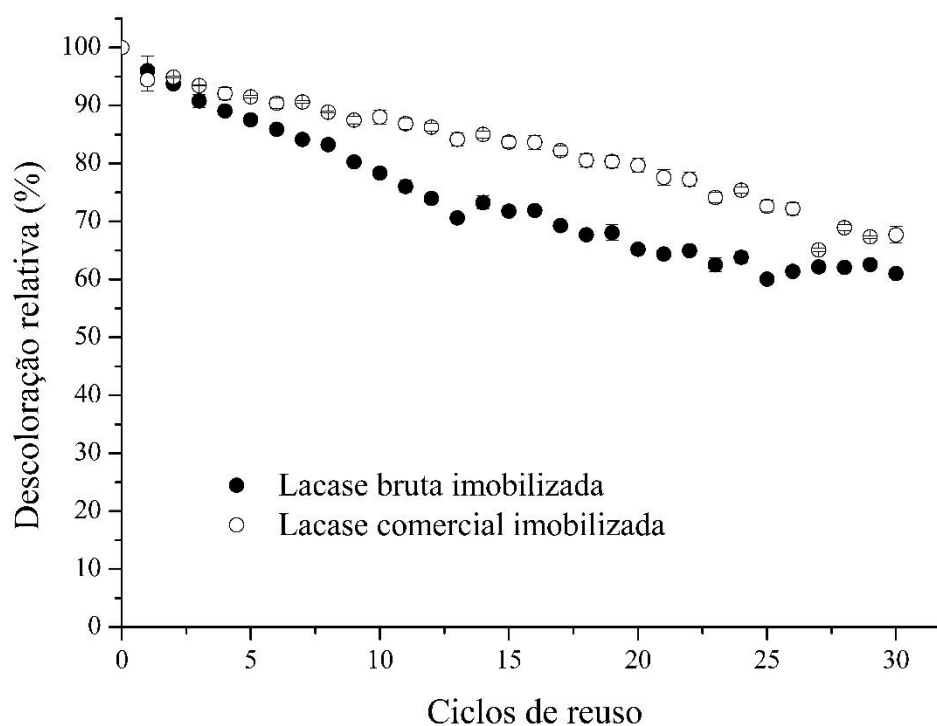
5.7 ESTABILIDADE OPERACIONAL

A capacidade de reutilização dos biocatalisadores imobilizados foi avaliada pela reação de descoloração do alaranjado de metila, utilizando o ABTS como mediador para acelerar o processo. A fim de evitar a adsorção cumulativa do alaranjado de metila na quitosana, foram realizadas três lavagens entre cada ciclo de reutilização, em que o primeiro ciclo foi considerado como 100% de descoloração. A estabilidade operacional das lacases imobilizadas está apresentada no gráfico da Figura 16. Bateladas repetidas de descoloração, à temperatura ambiente, permitiram 30 ciclos de reuso, apresentando uma porcentagem de descoloração sempre acima de 60%. A lacase bruta imobilizada apresentou menor estabilidade quando comparada à comercial bruta imobilizada, provavelmente devido à presença de proteases. Em geral, a diminuição da descoloração relativa para ambos os biocatalisadores pode ser explicada pela dessorção da enzima do suporte (FORTES et al., 2017) e perda de partículas entre os ciclos de reutilização.

Kadam e colaboradores (2018) observaram que a lacase de *T. versicolor*, imobilizada em nanotubos com magnetita e quitosana, apresentou 33% da capacidade de descoloração do *Direct Red 80* mediado por ABTS, após 11 ciclos de reutilização. Huang e colaboradores (2018)

imobilizaram ambos, a lacase e o mediador (ABTS), em um suporte à base de alginato para descoloração do verde malaquita e, após 8 ciclos de reuso, a descoloração se manteve em 79%. Comparando nosso resultado com esses estudos, pode-se concluir que as lacases imobilizadas apresentaram boa estabilidade operacional.

Figura 16 – Bateladas repetidas de reuso para descoloração de uma solução de alaranjado de metila (50 mg/L), utilizando ABTS como mediador, pelas lacases bruta e comercial imobilizadas nas partículas magnéticas recobertas com quitosana, a temperatura ambiente.



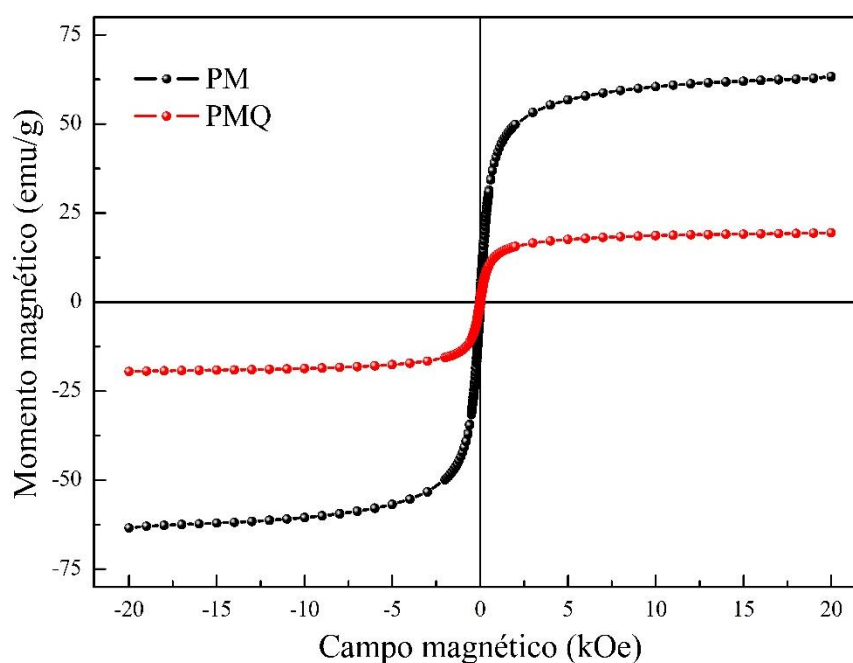
Além da avaliação do reuso, os biocatalisadores imobilizados foram testados quanto ao potencial de descoloração de alguns corantes com diferentes estruturas químicas (alaranjado de metila, azul brilhante de remazol R, azul preto de naftol, azul de bromofenol, violeta cristal, verde naftol B, vermelho neutro e vermelho do Congo) sem a adição do ABTS como mediador. No entanto, após poucos minutos de contato entre o biocatalisador imobilizado e a solução de corante, percebeu-se a adsorção dos corantes sobre o suporte. À exceção do alaranjado de metila, do vermelho neutro e do violeta cristal, todos os outros corantes apresentaram adsorção total ao suporte. Vale ressaltar que a adsorção ocorreu apenas na partícula magnética recoberta com quitosana e ativada com glutaraldeído (independentemente de ter a enzima imobilizada ou não). O suporte sem a ativação com glutaraldeído não apresentou capacidade de adsorção dos corantes, evidenciando que são os grupos funcionais do glutaraldeído que interagem com as

moléculas dos corantes. O corante que apresentou menor capacidade de adsorção ao suporte foi o alaranjado de metila e, por isso, o teste de reuso foi realizado com este corante.

5.8 CARACTERIZAÇÃO DO SUPORTE

As curvas de magnetização das partículas magnéticas (PM) e das partículas magnéticas recobertas com quitosana (PMQ) determinadas pela VSM estão apresentadas no gráfico da Figura 17. Pode-se observar que as PM apresentaram maior magnetização de saturação do que as PMQ, de 64,5 emu/g e 19,2 emu/g, respectivamente. Este comportamento sugere que a superfície das PM foi recoberta por uma camada não magnética com sucesso, causando um aumento de massa nas PM que contribuiu com a redução da magnetização de saturação. Outras pesquisas também relataram este comportamento (CUI et al., 2010; SAHIN; OZMEN, 2016; WANG et al., 2011). Além disso, os valores de coercividade e remanência foram baixos, de $H_c = 26$ Oe e $M_r = 2,2$ emu/g para as PM e de $H_c = 23$ Oe e $M_r = 0,8$ emu/g para as PMQ, respectivamente, evidenciando um comportamento que tende à dispersão das PM e das PMQ quando na ausência de um campo magnético externo.

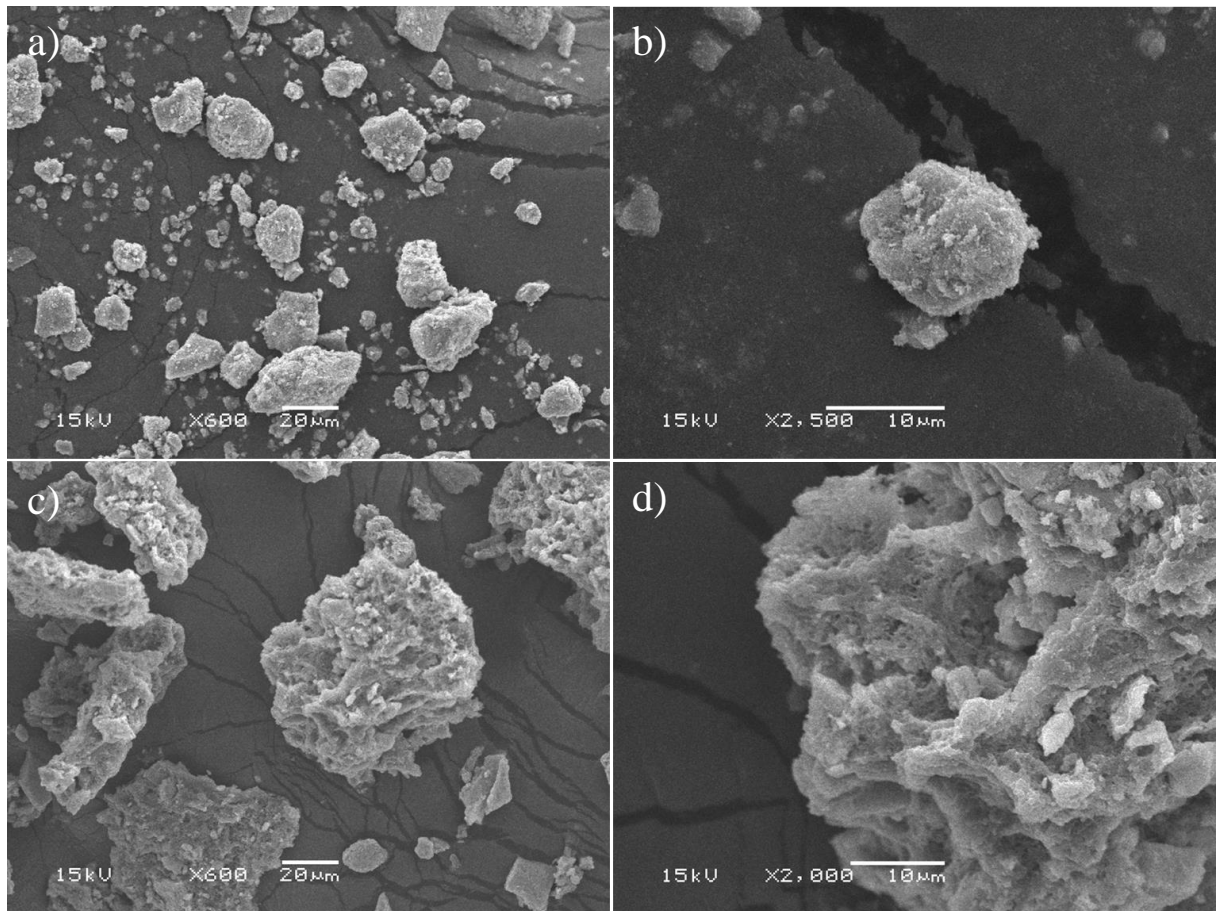
Figura 17 – Curvas de histerese das partículas magnéticas e das partículas magnéticas recobertas com quitosana



A área superficial específica das PM, das PMQ e das partículas magnéticas recobertas com quitosana e com a enzima imobilizada (PMQE) mensurada pelo método de BET foi de $15,7 \text{ m}^2.\text{g}^{-1}$, $32,6 \text{ m}^2.\text{g}^{-1}$ e $25,8 \text{ m}^2.\text{g}^{-1}$, respectivamente. Esses resultados demonstraram que o revestimento com quitosana aumentou a área superficial das PM, possivelmente devido à sua porosidade, tornando o suporte mais favorável para a imobilização de enzimas, como reportado por outros pesquisadores (PATIL et al., 2018; ZHOU et al., 2014). Após a imobilização da enzima, a área superficial diminuiu, evidenciando que as enzimas ocuparam parte da superfície do suporte e, portanto, foram imobilizadas.

Através da visualização das partículas por MEV, conforme ilustrado na Figura 18, pode-se perceber que as magnificações utilizadas foram muito baixas. Para melhor visualização das partículas, magnificações acima de 30000 x deveriam ser utilizadas. As partículas apresentaram tamanho em escala micrométrica, como também foi demonstrado pela análise de distribuição granulométrica das partículas. Para as PM foi observado um tamanho médio de $78,19 \mu\text{m}$, sendo que 90% das partículas estão abaixo de $242,14 \mu\text{m}$, 50% estão abaixo de $30,13 \mu\text{m}$ e 10% abaixo de $1,95 \mu\text{m}$, conforme o histograma da Figura 19. Entretanto, para as PMQ o tamanho médio encontrado foi menor ($15,22 \mu\text{m}$), com 90% das partículas abaixo de $34,76 \mu\text{m}$, 50% abaixo de $12,30 \mu\text{m}$ e 10% abaixo de $0,22 \mu\text{m}$, conforme o histograma da Figura 20. Tendo em vista que o recobrimento das partículas magnéticas pela quitosana deve aumentar o tamanho da partícula, pode-se inferir que possivelmente na medida do tamanho das PM ocorreu a aglomeração dessas partículas em função do magnetismo e, por isso, apresentaram um tamanho maior do que as PMQ. Também vale ressaltar que o método Fraunhofer considera as partículas esféricas, e pela MEV observou-se que as partículas são amorfas, portanto esta análise forneceu apenas um resultado aproximado do tamanho das partículas.

Figura 18 – Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura das partículas magnéticas (PM) e das partículas magnéticas recobertas com quitosana e com a enzima imobilizada (PMQE)



Legenda: a) PM com magnificação de 600 x, b) PM com magnificação de 2500 x, c) PMQE com magnificação de 600 x e d) PMQE com magnificação de 2000 x.

Figura 19 – Distribuição granulométrica das partículas magnéticas

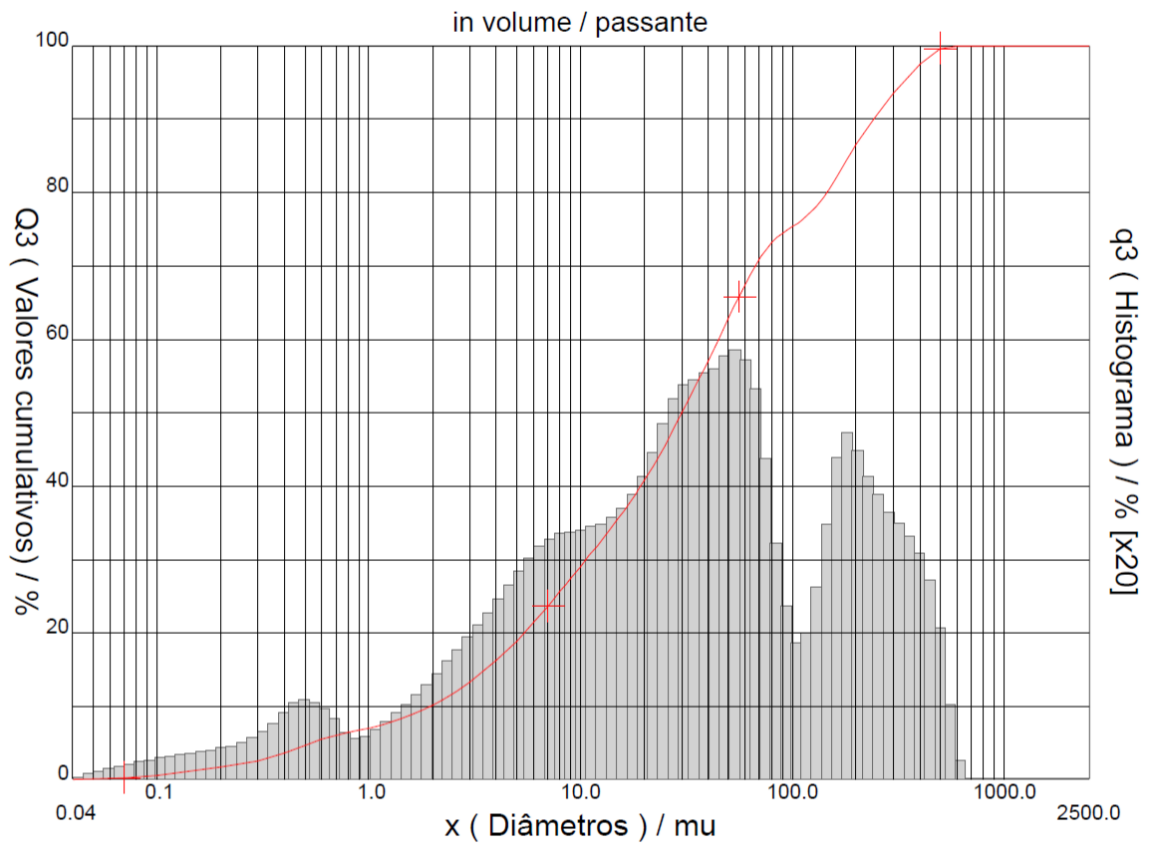
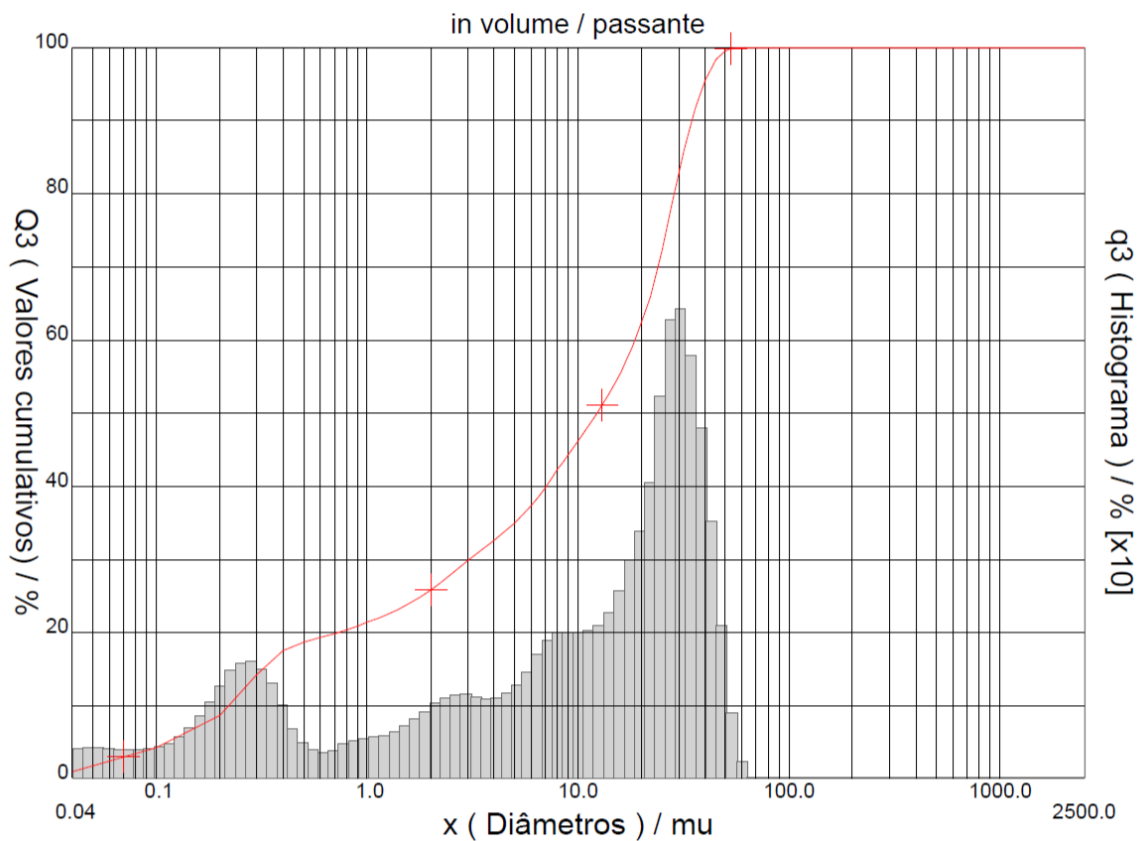


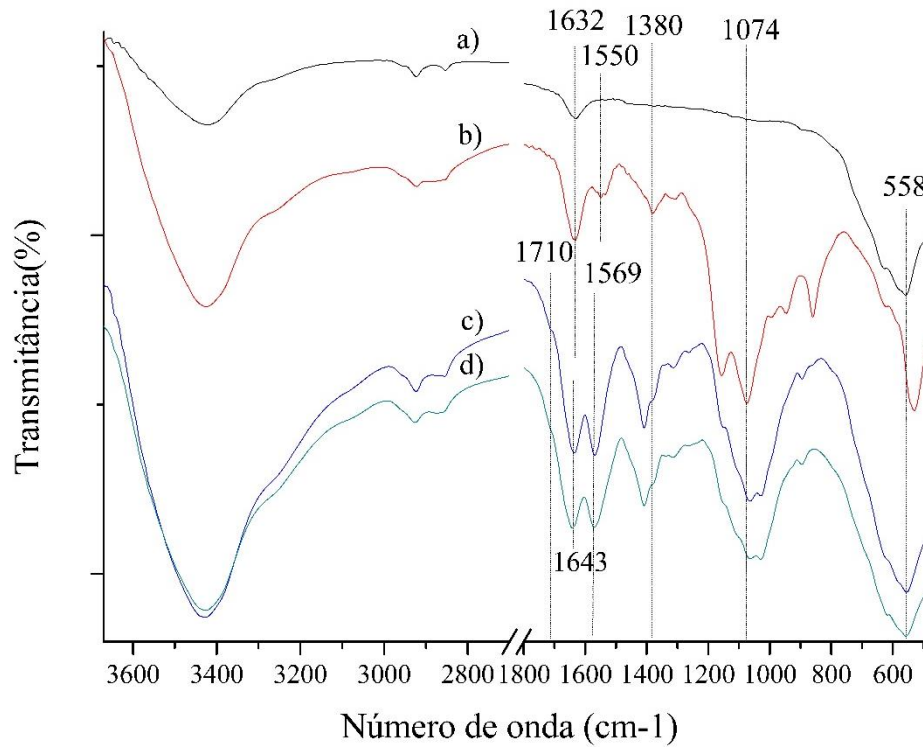
Figura 20 – Distribuição granulométrica das partículas magnéticas recobertas com quitosana



Os espectros de FTIR das PM, PMQ, PMQ ativadas com glutaraldeído e das PMQE estão apresentados na Figura 21. A larga banda que ocorre em torno de 3100 cm^{-1} pode ser atribuída às deformações da ligação O–H, associada principalmente a água, e, nos espectros b), c) e d), está sobreposta ao estiramento da ligação N–H do grupo amino da quitosana (KALKAN et al., 2011; MORHARDT et al., 2014). As bandas de 2800 cm^{-1} a 3000 cm^{-1} estão presentes devido ao estiramento das ligações C–H (SOLOMONS; FRYHLE, 2011). Em 1632 cm^{-1} a banda está associada à deformação angular das ligações O–H da água (LARSEN; WOUTERSEN, 2004). O pico em 1550 cm^{-1} no espectro b) (PMQ) é referente às vibrações de flexão da ligação N–H disponíveis na quitosana antes de ser ativada (SUN et al., 2017). Após a ativação, nos espectros da PMQ ativada com glutaraldeído (espectro c) e da PMQE (espectro d), o pico em 1632 cm^{-1} foi deslocado para 1643 cm^{-1} , pois nessa região também ocorre o estiramento da ligação imina C=N (SUN et al., 2017), confirmando a ligação do glutaraldeído à quitosana. Observou-se a formação de um pico em 1569 cm^{-1} nestes dois últimos espectros, que pode ser atribuído ao íon carboxilato (COO^-) (MORHARDT et al., 2014) presente na amostra, devido às lavagens com tampão acetato de sódio após a ativação com glutaraldeído e após a imobilização da enzima. Não houve diferença entre estes espectros, que seria em função da imobilização da enzima, pois a ligação do grupo amino da enzima à carbonila do glutaraldeído está representada no mesmo local da ligação do glutaraldeído com a quitosana.

Em 1710 cm^{-1} percebeu-se um fraco degrau no espectro da PMQ ativada com glutaraldeído (espectro c), que se torna mais fraco ainda quando a enzima é imobilizada (espectro d). Este pico está relacionado ao estiramento da carbonila do glutaraldeído que não reagiu (COLLINS; LASSALLE; FERREIRA, 2011). O pico a 1380 cm^{-1} dos espectros cuja amostra possui quitosana, é atribuído ao estiramento da ligação do álcool primário da quitosana (LIU et al., 2012), que foi deslocado para a esquerda no espectros c) e d) pela presença do íon carboxilato, no qual o pico é na região de 1413 cm^{-1} (MORHARDT et al., 2014). Na região de 1074 cm^{-1} ocorrem as vibrações de estiramento da ligação C–O–C da quitosana (GREGORIO-JAUREGUI et al., 2012; KALKAN et al., 2011). Por fim, as vibrações em 558 cm^{-1} são características da ligação Fe–O do núcleo magnético (SUN et al., 2017).

Figura 21 – Espectros de infravermelho das partículas magnéticas (PM), das partículas magnéticas com quitosana (PMQ), das partículas magnéticas com quitosana ativadas com glutaraldeído e das partículas magnéticas recobertas com quitosana e com a enzima imobilizada (PMQE)



Legenda: a) PM, b) PMQ, c) PMQ ativada com glutaraldeído e d) PMQE

6 CONCLUSÕES

Neste trabalho, a lacase de *M. palmivorus* e uma lacase comercial de *T. versicolor* foram imobilizadas em partículas magnéticas recobertas com quitosana. Comparando as duas lacases, observou-se que a lacase de *M. palmivorus* apresentou maior atividade específica (43x) em relação à enzima comercial. Além disso, a lacase bruta foi mais resistente a condições alcalinas e a temperaturas mais elevadas em comparação com a lacase comercial. A imobilização melhorou a estabilidade térmica da lacase bruta e da lacase comercial, porém a enzima comercial mostrou-se mais estável, enquanto que a atividade da lacase purificada foi prejudicada pelo efeito negativo do suporte.

A lacase bruta, em ambas as formas, não foi estável ao armazenamento, no entanto, a purificação da enzima proporcionou estabilidade semelhante à lacase comercial. A reação de descoloração do alaranjado de metila foi auxiliada com o uso de um mediador (ABTS), uma vez que o potencial redox da lacase de *M. palmivorus* não foi alto o suficiente para oxidar o corante.

Este trabalho teve a importância de demonstrar a utilização de um suporte de fácil preparação e recuperação do meio reacional, confirmado pela magnetometria de amostra vibrante, e de baixo custo, podendo ser reutilizado até 30 vezes mantendo um mínimo de 60% de descoloração relativa e sem apresentar desgaste mecânico visível. A análise da área superficial específica do suporte demonstrou que a quitosana praticamente dobrou a área da partícula magnética para a imobilização da enzima, e os espectros de FTIR apresentaram características compatíveis com os dados relatados na literatura.

SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Testar outros compostos passíveis de oxidação pela lacase de *M. palmivorus*, sem a necessidade da adição de mediadores;
- Obter maior quantidade da enzima purificada para realizar análise de estabilidade térmica, pH e temperatura ótimos;
- Utilizar outros suportes para a imobilização da lacase de *M. palmivorus* que não contenha Fe e forneça maior proteção para a enzima;
- Avaliar a estabilidade de armazenamento com as enzimas liofilizadas.

REFERÊNCIAS

- ALVER, E.; METIN, A. Ü. Chitosan based metal-chelated copolymer nanoparticles: Laccase immobilization and phenol degradation studies. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 125, p. 235–242, 2017.
- ANSARI, S. A.; HUSAIN, Q. Potential applications of enzymes immobilized on/in nano materials: A review. **Biotechnology Advances**, v. 30, n. 3, p. 512–523, 2012.
- AYDEMIR, T.; GÜLER, S. Characterization and immobilization of *Trametes versicolor* laccase on magnetic chitosan–clay composite beads for phenol removal Characterization and immobilization of *Trametes versicolor* laccase on magnetic chitosan – clay composite beads for phenol remov. **Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology**, v. 1401, 2015.
- AZEVEDO, A. M. et al. Chromatography-free recovery of biopharmaceuticals through aqueous two-phase processing. **Trends in Biotechnology**, v. 27, n. 4, p. 240–247, 2009.
- BAGEWADI, Z. K.; MULLA, S. I.; NINNEKAR, H. Z. Purification and immobilization of laccase from *Trichoderma harzianum* strain HZN10 and its application in dye decolorization. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, p. 139–150, 2016.
- BANKI, M. R.; GERNGROSS, T. U.; WOOD, D. W. Novel and economical purification of recombinant proteins: Intein-mediated protein purification using in vivo polyhydroxybutyrate (PHB) matrix association. **Protein Science**, v. 14, n. 6, p. 1387–1395, 2005.
- BARBOSA, M. et al. Chitosan. In: ELSEVIER (Ed.). . **Comprehensive Biomaterials II**. [s.l: s.n.]. v. 2p. 221–237.
- BARRIOS-ESTRADA, C. et al. Emergent contaminants: Endocrine disruptors and their laccase-assisted degradation – A review. **Science of the Total Environment**, v. 612, p. 1516–1531, 2018.
- BILAL, M. et al. Immobilized ligninolytic enzymes: An innovative and environmental responsive technology to tackle dye-based industrial pollutants – A review. **Science of the Total Environment**, v. 576, p. 646–659, 2017.
- BILAL, M. et al. Magnetic nanoparticles as versatile carriers for enzymes immobilization : A review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 120, p. 2530–2544, 2018.
- BORLIDO, L. et al. Magnetic separations in biotechnology. **Biotechnology Advances**, v. 31, p. 1374–1385, 2013.
- BOURBONNAIS, R.; PAICE, M. G. Oxidation An expanded of non-phenolic substrates role for lactase in lignin biodegradation. **Febs**, v. 267, n. 1, p. 99–102, 1990.
- BRADFORD, M. M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. v. 254, p. 248–254, 1976.
- CAÑAS, A. I.; CAMARERO, S. Laccases and their natural mediators: Biotechnological tools for sustainable eco-friendly processes. **Biotechnology Advances**, v. 28, n. 6, p. 694–705, 2010.

CANTELE, C. et al. Production, characterization and dye decolorization ability of a high level laccase from *Marasmiellus palmivorus*. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 12, n. August, p. 15–22, 2017.

CANTONE, S. et al. Efficient immobilisation of industrial biocatalysts: criteria and constraints for the selection of organic polymeric carriers and immobilisation methods. **Chemical Society Reviews**, v. 42, n. 15, p. 6262, 2013.

CAO, L. Covalent Enzyme Immobilization. In: WILEY-VHC (Ed.). . **Carrier-bound Immobilized Enzymes: Principles, Application and Design**. 1. ed. [s.l.] The Netherlands, 2005. p. 531.

CHARNEY, J.; TOMARELLI, R. M. A colorimetric method for the determination of the proteolytic activity of duodenal juice. **J. Biol. Chem.**, p. 501–505, 1947.

CHENTHAMARAKSHAN, A. et al. Optimization of laccase production from *Marasmiellus palmivorus* LA1 by Taguchi method of Design of experiments. **BMC Biotechnology**, p. 1–10, 2017.

CHIBATA, I. et al. Production of L-Amino Acids by Aminoacylase Adsorbed on DEAE-Sephadex. **Methods in Enzymology**, v. 44, p. 746–759, 1976.

CIPOLATTI, E. P. et al. Support engineering: relation between development of new supports for immobilization of lipases and their applications. **Biotechnology Research and Innovation**, p. 1–9, 2017.

COLLINS, Sebastián Enrique; LASSALLE, Verónica; FERREIRA, María Luján. FTIR-ATR characterization of free *Rhizomucor meihei* lipase (RML), Lipozyme RM IM and chitosan-immobilized RML. **Journal Of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, [s.l.], v. 72, n. 3-4, p.220-228, nov. 2011.

CORNELL, R. M.; SCHNEIDER, W. Formation of goethite from ferrihydrite at physiological pH under the influence of cysteine. **Polyhedron**, v. 8, n. 2, p. 149–155, 1989.

CUI, Y. et al. Facile synthesis of amino-silane modified superparamagnetic Fe₃O₄ nanoparticles and application for lipase immobilization. **Journal of Biotechnology**, v. 150, n. 1, p. 171–174, 2010.

DASSI, D. et al. Biodegradation of textile dyes by immobilized laccase from *Corioloropsis gallica* into Ca-alginate beads. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 90, p. 71–78, 2014.

DAL MAGRO, L. et al. Magnetic biocatalysts of pectinase and cellulase: Synthesis and characterization of two preparations for application in grape juice clarification. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 115, p. 35–44, 2018.

DICOSIMO, R. et al. Industrial use of immobilized enzymes. **Chemical Society Reviews**, 2013.

DROUT, R. J.; ROBISON, L.; FARHA, O. K. Catalytic applications of enzymes encapsulated

in metal – organic frameworks. **Coordination Chemistry Reviews journal**, v. 381, p. 151–160, 2018.

DWIVEDI, U. N. et al. Structure-function relationship among bacterial, fungal and plant laccases. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 68, n. 2, p. 117–128, 2011.

FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ, M.; SANROMÁN, M. Á.; MOLDES, D. Recent developments and applications of immobilized laccase. **Biotechnology Advances**, v. 31, n. 8, p. 1808–1825, 2013.

FOKINA, O. et al. Improving the performance of a biofuel cell cathode with laccase-containing culture supernatant from *Pycnoporus sanguineus*. **BIORESOURCE TECHNOLOGY**, v. 175, p. 445–453, 2015.

FORTES, C. C. S. et al. Optimization of enzyme immobilization on functionalized magnetic nanoparticles for laccase biocatalytic reactions. v. 117, n. August 2016, p. 1–8, 2017.

GREGORIO-JAUREGUI, K. M. et al. One-step method for preparation of magnetic nanoparticles coated with chitosan. **Journal of Nanomaterials**, v. 2012, 2012.

GUIBAL, E. Heterogeneous catalysis on chitosan-based materials: a review. **Progress in Polymer Science**, v. 30, p. 71–109, 2005.

GUIMARÃES, L. R. C. et al. Laccases. In: ELSEVIER (Ed.). *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering: Production, Isolation and Purification of Industrial Products*. [s.l: s.n.]. p. 199–216.

GUISAN, J. M. **Immobilization of Enzymes and cells**. [s.l: s.n.].

HEARN, M. T. W.; ACOSTA, D. Applications of novel affinity cassette methods: Use of peptide fusion handles for the purification of recombinant proteins. **Journal of Molecular Recognition**, v. 14, n. 6, p. 323–369, 2001.

HOLKAR, C. R. et al. A critical review on textile wastewater treatments: Possible approaches. **Journal of Environmental Management**, v. 182, p. 351–366, 2016.

HOMAEI, A. A. et al. Enzyme immobilization: An update. **Journal of Chemical Biology**, v. 6, n. 4, p. 185–205, 2013.

HUANG, J. et al. Immobilization of a Laccase/2,2'-azino-bis- (3-ethylbenzothiazoline)-6-sulfonic Acid System to Layered Double Hydroxide/Alginate Biohybrid Beads for Biodegradation of Malachite Green Dye. **BioMed Research International**, v. 2018, 2018.

ILLANES, A. **Enzyme Biocatalysis: Principles and Applications**. Valparaíso: Springer Science + Business Media B.V., 2008.

Ji, C. et al. Direct immobilization of laccase on titania nanoparticles from crude enzyme extracts of *P. ostreatus* culture for micro-pollutant degradation. **Separation and Purification Technology**, v. 178, p. 215–223, 2017.

JIANG, D. S. et al. Immobilization of *Pycnoporus sanguineus* laccase on magnetic chitosan

microspheres. **Biochemical Engineering Journal**, v. 25, n. 1, p. 15–23, 2005.

KADAM, A. A. et al. Chitosan-functionalized supermagnetic halloysite nanotubes for covalent laccase immobilization. **Carbohydrate Polymers**, v. 194, n. February, p. 208–216, 2018.

KALKAN, N. A. et al. Preparation of chitosan-coated magnetite nanoparticles and application for immobilization of laccase. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 123, n. 2, p. 707–716, 15 jan. 2011.

KARIMI, Z.; KARIMI, L.; SHOKROLLAHI, H. Nano-magnetic particles used in biomedicine: Core and coating materials. **Materials Science and Engineering C**, v. 33, n. 5, p. 2465–2475, 2013.

KLEIN, M. P. et al. Effect of the Support Size on the Properties of β -Galactosidase Immobilized on Chitosan: Advantages and Disadvantages of Macro and Nanoparticles. **Biomacromolecules**, p. 2456–2464, 2012.

KRAJEWSKA, B. Application of chitin- and chitosan-based materials for enzyme immobilizations: A review. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 35, n. 2–3, p. 126–139, 2004.

KUDANGA, T.; NEMADZIVA, B.; LE ROES-HILL, M. Laccase catalysis for the synthesis of bioactive compounds. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 101, n. 1, p. 13–33, 2017.

LARSEN, O. F. A.; WOUTERSEN, S. Vibrational relaxation of the H₂O bending mode in liquid water. **JOURNAL OF CHEMICAL PHYSICS**, v. 121, n. 2004, p. 12143–12145, 2004.

LEE, S.; REDDY, D. H. K.; LEE, S. Application of magnetic chitosan composites for the removal of toxic metal and dyes from aqueous solutions. v. 202, p. 68–93, 2013.

LIESE, A.; HILTERHAUS, L. Evaluation of immobilized enzymes for industrial applications. **Chemical Society Reviews**, v. 42, n. 15, p. 6236, 2013.

LIU, D.; CHEN, J.; SHI, Y. Advances on methods and easy separated support materials for enzymes immobilization. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 102, p. 332–342, 2018.

LIU, Zunying et al. Effects of chitosan molecular weight and degree of deacetylation on the properties of gelatine-based films. **Food Hydrocolloids**, [s.l.], v. 26, n. 1, p.311-317, jan. 2012.

LONAPPAN, L. et al. Adsorptive immobilization of agro-industrially produced crude laccase on various micro-biochars and degradation of diclofenac. **Science of the Total Environment**, v. 640–641, p. 1251–1258, 2018.

MA, L. et al. Recent advances in immobilized enzymes on nanocarriers. **Chinese Journal of Catalysis**, v. 35, n. 2, p. 108–119, 2014.

MISRA, N. et al. Laccase immobilization on radiation synthesized epoxy functionalized polyethersulfone beads and their application for degradation of acid dye. v. 55, p. 6017–6024, 2014.

MORE, S. S. et al. Isolation, Purification, and Characterization of Fungal Laccase from *Pleurotus* sp. **Enzyme Research**, v. 2011, p. 1–7, 2011.

MORHARDT, C. et al. Direct quantification of immobilized enzymes by means of FTIR ATR spectroscopy – A process analytics tool for biotransformations applying non-porous magnetic enzyme carriers. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 107, p. 55–63, 2014.

MOROZOVA, O. V. et al. Laccase-mediator systems and their applications: A review. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 43, n. 5, p. 523–535, 2007.

NETTO, C. G. C. M. et al. Catalytic properties of thioredoxin immobilized on superparamagnetic nanoparticles. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 105, n. 5, p. 738–744, 2011.

NETTO, C. G. C. M.; TOMA, H. E.; ANDRADE, L. H. Superparamagnetic nanoparticles as versatile carriers and supporting materials for enzymes. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 85–86, p. 71–92, 2013.

NUNES, C. S.; KUNAMNENI, A. Laccases-properties and applications. In: **Enzymes in Human and Animal Nutrition: Principles and Perspectives**. [s.l.] Elsevier Inc., 2018. p. 133–161.

Ó'FÁGÁIN, C. et al. Gel-Filtration Chromatography. In: DERMOT WALLS AND SINÉAD T. LOUGHRAN (Ed.). **Protein Chromatography: Methods and Protocols**. [s.l.] Springer Science + Business Media B.V., 2011. v. 681p. 8805–8810.

OSMA, J. F.; TOCA-HERRERA, J. L.; RODRÍGUEZ-COUTO, S. Uses of Laccases in the Food Industry. **Enzyme Research**, v. 2010, n. Table 1, p. 1–8, 2010.

PANDIYAN, K. et al. Comparative efficiency of different pretreatment methods on enzymatic digestibility of *Parthenium* sp. **World J Microbiol Biotechnol**, p. 55–64, 2014.

PATIL, P. B. et al. pH triggered curcumin release and antioxidant activity of curcumin loaded γ -Fe₂O₃ magnetic nanoparticles. **Materials Letters**, v. 223, p. 178–181, 2018.

PAWLIK, A. et al. Purification and characterization of laccase from *Sinorhizobium meliloti* and analysis of the lacc gene. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 92, p. 138–147, 2016.

RODRÍGUEZ-COUTO, S. Solid-State Fermentation for Laccases Production and Their Applications. In: ELSEVIER (Ed.). **Current Developments in Biotechnology and Bioengineering**. Bilbao: [s.n.]. p. 211–234.

RODRÍGUEZ-DELGADO, M.; ORNELAS-SOTO, N. Laccases: A Blue Enzyme for Greener Alternative Technologies in the Detection and Treatment of Emerging Pollutants. In: **Green Technologies and Environmental Sustainability**. [s.l.] Springer, 2017. p. 45–66.

SAHIN, S.; OZMEN, I. Determination of optimum conditions for glucose-6-phosphate dehydrogenase immobilization on chitosan-coated magnetic nanoparticles and its

characterization. **“Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic”**, v. 133, p. S25–S33, 2016.

SALIS, A.; MONDUZZI, M.; SOLINAS, V. **Industrial Enzymes**. [s.l: s.n.].

SANGEETHA, K.; ABRAHAM, T. E. Preparation and characterization of cross-linked enzyme aggregates (CLEA) of Subtilisin for controlled release applications. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 43, p. 314–319, 2008.

SAOUDI, O.; GHAOUAR, N. Biocatalytic characterization of free and immobilized laccase from *Trametes versicolor* in its activation zone. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 128, p. 681–691, 2019.

SCHNEIDER, W. D. H. et al. High level production of laccases and peroxidases from the newly isolated white-rot basidiomycete *Marasmiellus palmivorus* VE111 in a stirred-tank bioreactor in response to different carbon and nitrogen sources. **Process Biochemistry**, v. 69, p. 1–11, 2018.

SCOPES, R. K. **Protein Purification: Principles and Practice**. 3. ed. [s.l.] Springer, 1993.

SEN, S. K. et al. Fungal decolouration and degradation of azo dyes: A review. **Fungal Biology Reviews**, v. 30, n. 3, p. 112–133, 2016.

SENTHIVELAN, T.; KANAGARAJ, J.; PANDA, R. C. **Recent trends in fungal laccase for various industrial applications: An eco-friendly approach - A review** *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 2016.

SHARMA, B.; DANGI, A. K.; SHUKLA, P. Contemporary enzyme based technologies for bioremediation: A review. **Journal of Environmental Management**, v. 210, p. 10–22, 2018.

SHELDON, R. A. *Enzyme Immobilization : The Quest for Optimum Performance*. 2007.

SHELDON, R. A.; VAN PELT, S. Enzyme immobilisation in biocatalysis: why, what and how. **Chem. Soc. Rev.**, v. 42, n. 15, p. 6223–6235, 2013.

SHI, L. et al. Removal of sulfonamide antibiotics by oriented immobilized laccase on Fe₃O₄ nanoparticles with natural mediators. **Journal of Hazardous Materials**, v. 279, p. 203–211, 2014.

SHUKLA, S. K. et al. Chitosan-based nanomaterials : A state-of-the-art review. v. 59, p. 46–58, 2013.

SINGH, R. L.; SINGH, P. K.; SINGH, R. P. Enzymatic decolorization and degradation of azo dyes e A review. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 104, p. 21–31, 2015.

SNEHA, H. P.; BEULAH, K. C.; MURTHY, P. S. Enzyme Immobilization Methods and Applications in the Food Industry. In: ELSEVIER (Ed.). . **Enzymes in Food Biotechnology**. [s.l: s.n.]. p. 645–658.

SOJITRA, U. V.; NADAR, S. S.; RATHOD, V. K. Immobilization of pectinase onto chitosan magnetic nanoparticles by macromolecular cross-linker. **Carbohydrate Polymers**, v. 157, p.

677–685, 2017.

SOLOMONS, G.; FRYHLE, C. B. **Organic chemistry**. 10. ed. [s.l.] John Wiley & Sons, Inc, 2011.

SORLIER, P. et al. Relation between the Degree of Acetylation and the Electrostatic Properties of Chitin and Chitosan. **Biomacromolecules**, p. 765–772, 2001.

SUN, B. et al. Cost-effective downstream processing of recombinantly produced pexiganan peptide and its antimicrobial activity. **AMB Express**, v. 8, n. 1, 2018.

SUN, J. et al. Stability and activity of immobilized trypsin on carboxymethyl chitosan-functionalized magnetic nanoparticles cross-linked with carbodiimide and glutaraldehyde. **Journal of Chromatography B**, v. 1054, p. 57–63, 2017.

UNITED NATIONS. World Population Prospects: The 2017 Revision. **Department of Economic and Social Affairs**, v. 91, p. 399–404, 2017.

VANTAMURI, A. B.; KALIWAL, B. B. Purification and characterization of laccase from *Marasmius* species BBKAV79 and effective decolorization of selected textile dyes. **3 Biotech**, v. 6, n. 2, 2016.

VISWANATH, B. et al. Fungal laccases and their applications in bioremediation. **Enzyme Research**, v. 2014, 2014.

VOBERKOVA, S. et al. Immobilization of ligninolytic enzymes from white-rot fungi in cross-linked aggregates. **Chemosphere**, v. 202, p. 694–707, 2018.

VOBERKOVÁ, S. et al. Effect of inoculation with white-rot fungi and fungal consortium on the composting efficiency of municipal solid waste. **Waste Management**, v. 61, p. 157–164, 2017.

VRŠANSKÁ, M. et al. Preparation and Optimisation of Cross-Linked Enzyme Aggregates Using Native Isolate White Rot Fungi *Trametes versicolor* and *Fomes fomentarius* for the Decolourisation of Synthetic Dyes. **Environmental Research and Public Health**, p. 1–15, 2017.

WANG, F. et al. Immobilization of *Pycnoporus sanguineus* laccase by metal affinity adsorption on magnetic chelator particles. v. 104, n. August 2007, p. 97–104, 2008.

WANG, H. et al. A facile synthesis of monodisperse CoFe₂O₄/SiO₂ nanoparticles. **Applied Surface Science**, v. 257, n. 16, p. 7107–7112, 2011.

XU, F. Effects of Redox Potential and Hydroxide Inhibition on the pH Activity Profile of Fungal Laccases. **THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY**, v. 272, n. 2, p. 924–928, 1997.

YANG, J. et al. Degradation of tetracycline by immobilized laccase and the proposed transformation pathway. **Journal of Hazardous Materials**, v. 322, p. 525–531, 2016.

YANG, S. et al. Understanding the factors controlling the removal of trace organic contaminants by white-rot fungi and their lignin modifying enzymes: A critical review. **Bioresource Technology**, v. 141, p. 97–108, 2013.

ZDARTA, J. et al. Developments in support materials for immobilization of oxidoreductases: A comprehensive review. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 258, p. 1–20, 2018.

ZENG, S.; QIN, X.; XIA, L. Degradation of the herbicide isoproturon by laccase-mediator systems. **Biochemical Engineering Journal**, v. 119, p. 92–100, 2017.

ZHANG, J. et al. Removal of 2,4-dichlorophenol by chitosan-immobilized laccase from *Coriolus versicolor*. **Biochemical Engineering Journal**, v. 45, n. 1, p. 54–59, 2009.

ZHENG, F. et al. Immobilization of laccase onto chitosan beads to enhance its capability to degrade synthetic dyes. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 110, n. 4, p. 69–78, 2016.

ZHOU, L. et al. Development of carbon nanotubes/CoFe₂O₄magnetic hybrid material for removal of tetrabromobisphenol A and Pb(II). **Journal of Hazardous Materials**, v. 265, p. 104–114, 2014.

ZHUO, R. et al. Induction of laccase by metal ions and aromatic compounds in *Pleurotus ostreatus* HAUCC 162 and decolorization of different synthetic dyes by the extracellular laccase. **Biochemical Engineering Journal**, v. 117, p. 62–72, 2017.