



Universidade de Aveiro Departamento de Química  
2015

**Ana Raquel Almeida  
Fernandes**

**Estudo da imobilização da lacase em  
nanopartículas magnéticas e sua aplicação**



**Ana Raquel Almeida  
Fernandes**

**Estudo da imobilização da lacase em  
nanopartículas magnéticas e sua aplicação**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia, Ramo de Biotecnologia Industrial e Ambiental, realizada sob a orientação científica da Professora Doutora Ana Maria Rebelo Barreto Xavier, Professora Auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro e da Doutora Ana Luísa Daniel-da-Silva, Investigadora Auxiliar do CICECO, Departamento de Química da Universidade de Aveiro.

Estudo inserido no âmbito do projeto CICECO-Aveiro Institute of Materials (Ref. FCTUID/CTM/50011/2013), financiado por fundos nacionais através da FCT/MEC e quando apropriado co-financiado por fundos FEDER sob o acordo de parceria PT2020

Dedico este trabalho à minha mãe, por tudo aquilo que ela é, por todos os valores que me transmitiu, por todo o apoio incondicional e por tornar possível o meu sonho.

## **o júri**

Presidente

### **Doutora Mara Guadalupe Freire Martins**

Investigadora Coordenadora do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

### **Professora Doutora Ana Maria Rebelo Barreto Xavier**

Professora Auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

### **Doutora Raquel Oliveira Cristóvão**

Investigadora do Laboratório de Separação e Engenharia de Reação da Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto

## **agradecimentos**

Às minhas orientadoras, Professora Doutora Ana Xavier e Doutora Ana Luísa Silva, por todo o apoio e orientação na execução da dissertação.

À Doutora Ana Paula Tavares pela orientação e colaboração na execução do trabalho experimental.

À minha família por todo o apoio e compreensão nos momentos de maior desalento.

Ao meu namorado Tiago Henriques pelo companheirismo e paciência demonstrados ao longo da elaboração desta dissertação.

Aos meus amigos, Tiago, Cátia e Lucas, por me proporcionarem os melhores momentos do meu percurso académico.

À Doutora Susana Pereira por ter sempre uma hipótese e um conselho para os problemas que foram surgindo.

Aos meus restantes colegas do LEB – Laboratório de Engenharia Biotecnológica e do NanoLab – Laboratório de Nanotecnologia pela companhia e alegria durante todo este ano.

A todos aqueles que direta ou indiretamente estiveram envolvidos no meu projeto e que contribuíram para que este se concretizasse.

## palavras-chave

Lacase, imobilização, nanopartículas magnéticas, coordenação, biocatálise, mediador, índigo de carmim

## resumo

A lacase é uma enzima pertencente à família das *multicopper blue* oxidases, sendo responsável por catalisar a oxidação ou a redução de vários compostos. O potencial catalítico da lacase é amplamente conhecido, o que promove a investigação com vista à sua aplicação industrial. No entanto, para que a aplicação de uma enzima a larga escala seja viável, é necessário o estudo e a otimização de sistemas de imobilização. Embora existam atualmente diversos materiais que são usados como suportes de imobilização, o recente desenvolvimento da nanotecnologia possibilitou o aparecimento de novos materiais, nomeadamente as nanopartículas magnéticas (MNPs). A sua elevada área superficial, que permite uma elevada taxa de transferência de massa, combinada com a sua fácil remoção dos meios reacionais, torna as MNPs promissores suportes de imobilização. Desta forma, foi estudada a imobilização da lacase em MNPs com vista à remoção de corantes.

A primeira parte do trabalho envolveu a preparação das MNPs e a sua posterior caracterização, recorrendo a diversas técnicas analíticas. O sucesso da síntese das MNPs foi avaliado através de análise elementar e de FTIR. As imagens de TEM mostraram a forma esférica das MNPs com cerca de 50 nm de diâmetro e o seu revestimento com sílica. A área superficial específica foi analisada através de adsorção de azoto BET. Por fim, a análise de potencial zeta determinou a carga superficial negativa das MNPs e demonstrou a sua elevada estabilidade coloidal.

A segunda parte do trabalho envolveu a otimização das condições de imobilização da lacase nas MNPs, nomeadamente a concentração de iões cobre e o pH, e a consequente avaliação da estabilidade do sistema catalítico. Nas condições ótimas, isto é, 1 mole de iões cobre por cada mole de EDTA-TMS funcionalizado na superfície das MNPs e pH 3,5, a lacase imobilizada apresentou uma atividade recuperada de  $97,4 \pm 0,6\%$ . Na avaliação da estabilidade da lacase livre e imobilizada, foram estudadas as estabilidades térmica, operacional e de armazenamento. No caso da estabilidade térmica a  $40^\circ\text{C}$ , verificou-se um aumento da atividade recuperada com a imobilização. Em relação à estabilidade operacional, demonstrou-se que, após 10 ciclos reativos consecutivos, a lacase imobilizada apresentava ainda  $46,3 \pm 2,4\%$  de atividade. Quanto ao armazenamento, a lacase em ambas as formas apresentou reduzida estabilidade.

A última parte do trabalho envolveu a aplicação do sistema mediador de lacase (LMS) na remoção de corantes, nomeadamente o Vermelho do Congo (VC) e o Índigo de Carmim (IC), utilizando o metilseringato (MS) como mediador. Relativamente à degradação do IC, foi obtida uma remoção de  $43,8 \pm 1,1\%$  utilizando  $0,500\text{ mM}$  de MS. Por sua vez, a degradação do VC não foi possível de quantificar, uma vez que a ocorrência de reações secundárias entre o produto de oxidação do VC e o mediador mascararam a absorvância medida.

Em suma, os resultados obtidos permitem concluir que a aplicação industrial da lacase imobilizada nas MNPs preparadas apresenta um potencial inegável. Contudo, é ainda necessário que sejam ultrapassadas algumas das limitações detetadas no sistema de imobilização.

**keywords**

Laccase, immobilization, magnetic nanoparticles, coordination, biocatalysis, mediator, carmine indigo

**abstract**

Laccases are enzymes that belong to the multicopper blue oxidases family, responsible for catalyzing redox reactions of several compounds. The catalytic potential of laccases is widely known, which promotes the research in order to its industrial application. However, the study and optimization of enzymatic immobilization systems are required to make possible the large-scale application. Although there are many materials that are used as immobilization supports, the nanotechnology development provides the discovery of new materials, namely the magnetic nanoparticles (MNPs). The MNPs high surface area that allows a high rate of mass transfer combined with its easy removal from reactional bulks make them promising immobilization supports. Therefore, it was studied the laccase immobilization on the MNPs in order to dye removal.

The first part of the work involved the MNPs preparation and their characterization, through several analytical methods. The success of the MNPs synthesis was evaluated by elemental analysis and FTIR. The TEM images showed a spherical form of the MNPs with about 50 nm of diameter and an amorphous silica coating. The specific surface area was measured by nitrogen adsorption BET. Finally, the zeta potential analysis showed the negative charge of the MNPs and proved its high colloidal stability.

The second part of the work involved the optimization of the laccase immobilization conditions on the MNPs, namely the copper ions proportion and the pH as well as the evaluation of the catalytic system stability. Under the optimal conditions, i.e. 1 mole of copper ions for each mole of EDTA-TMS that was functionalized at the MNPs surface and a pH 3.5, the activity recovery of the immobilized laccase was  $97.4\pm 0.6\%$ . To evaluate the stability of free and immobilized laccase, the thermal, operational and storage stability were studied. In the case of the thermal stability at  $40^{\circ}\text{C}$ , there was an increase in the recovered activity with the immobilization process. Regarding to the operational stability, it was shown that after 10 sequential reactive cycles, the enzyme presents  $46.3\pm 2.4\%$  of activity. Lastly, the free and immobilized laccase still presented low storage stability.

The last part of the work involved the application of the laccase mediator system (LMS) in the dye removal, namely the Congo Red (VC) and the Indigo Carmine (IC), using methyl syringate (MS) as mediator. Relatively to the IC degradation, a removal of  $43.8\pm 1.1\%$  was obtained, using 0.500 mM of MS. The VC degradation was not possible to quantify since the occurrence of secondary reactions between the VC oxidation product and the mediator masked the measured absorbance.

The results of this work showed that the industrial application of immobilized laccase on the prepared MNPs has an undeniable potential. However, it is still necessary to overcome some of the system limitations.

# ÍNDICE

---

<b>Capítulo 1 -Introdução .....</b>	<b>1</b>
<b>Capítulo 2 -Revisão Bibliográfica .....</b>	<b>3</b>
2.1. Lacases .....	3
2.1.1. Caraterização estrutural e bioquímica .....	3
2.1.2. Mecanismos de catálise .....	5
2.1.2.1. Sistemas Mediadores de Lacase.....	6
2.1.3. Aplicações Biotecnológicas.....	7
2.2. Imobilização .....	10
2.2.1. Efeitos sobre as propriedades enzimáticas .....	11
2.2.2. Métodos .....	12
2.2.3. Tipos de Suportes .....	14
2.3. Nanopartículas.....	15
2.3.1. Nanopartículas Magnéticas.....	16
2.3.1.1. Síntese .....	17
2.3.1.2. Aplicações.....	20
2.4. Imobilização da lacase em nanopartículas magnéticas.....	22
<b>Capítulo 3 -Materiais e Métodos.....</b>	<b>26</b>
3.1. Preparação das nanopartículas magnéticas .....	26
3.1.1. Síntese de magnetite .....	26
3.1.2. Silanização.....	27
3.1.3. Modificação superficial com EDTA-TMS .....	28
3.1.4. Quelação dos iões cobre .....	29
3.2. Caraterização das nanopartículas magnéticas .....	29
3.2.1. Espectroscopia de Infravermelho .....	29
3.2.2. Microscopia Eletrónica de Transmissão.....	29
3.2.3. Análise Elementar.....	30
3.2.4. Adsorção de Azoto Brunauer-Emmett-Teller.....	30
3.2.5. Potencial Zeta .....	30
3.3. Imobilização da lacase .....	30
3.4. Determinação da atividade enzimática .....	31
3.4.1. Lacase Livre.....	31
3.4.2. Lacase Imobilizada .....	32

3.5. Propriedades cinéticas.....	32
3.6. Avaliação da estabilidade.....	33
3.6.1. Térmica.....	33
3.6.2. Operacional.....	34
3.6.3. Armazenamento.....	34
3.7. Remoção dos corantes.....	35
<b>Capítulo 4 -Resultados e Discussão .....</b>	<b>36</b>
4.1. Caraterização das nanopartículas magnéticas.....	36
4.2. Otimização das condições de imobilização .....	40
4.2.1. Concentração de iões cobre .....	40
4.2.2. pH .....	41
4.3. Propriedades cinéticas.....	43
4.4. Avaliação da estabilidade.....	47
4.4.1. Térmica.....	47
4.4.2. Operacional.....	50
4.4.3. De armazenamento .....	52
4.4.4. Impacto do pH na estabilidade .....	54
4.5. Remoção de corantes .....	55
4.5.1. Vermelho do congo.....	56
4.5.2. Índigo de carmim.....	57
4.5.2.1. Efeito da concentração de mediador .....	59
<b>Capítulo 5 -Conclusão.....</b>	<b>61</b>
<b>Capítulo 6 -Trabalho Futuro.....</b>	<b>63</b>
<b>Referências Bibliográficas .....</b>	<b>64</b>
<b>Anexos.....</b>	<b>73</b>

## ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

---

<b>2,4-DCP</b>	2,4-Diclorofenol
<b>ABTS</b>	Ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)
<b>APTES</b>	3-Aminopropiltrietoxisilano
<b>ATR</b>	<i>Attenuated Total Reflectance</i>
<b>CLEA</b>	<i>Cross-linked Enzyme Aggregates</i>
<b>CLEC</b>	<i>Cross-linked Enzyme Crystals</i>
<b>E<sub>c</sub></b>	Eficiência catalítica
<b>EDTA-TMS</b>	Ácido trimetoxisililpropiletlenodiamino triacético
<b>ELISA</b>	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
<b>EPR</b>	<i>Electron Paramagnetic Resonance</i>
<b>FM</b>	Ferromagnético
<b>FTIR</b>	<i>Fourier Transform Infrared Spectroscopy</i>
<b>HBT</b>	<i>N</i> -hidroxibenzotriazol
<b>HPI</b>	<i>N</i> -hidroxiftalamida
<b>HPLC</b>	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
<b>IC</b>	Índigo de carmim
<b><i>k</i></b>	Constante cinética de desativação
<b>K<sub>M</sub></b>	Constante de Michaelis-Menten
<b>LMS</b>	<i>Lacase Mediator System</i>
<b>MNP</b>	Nanopartícula magnética
<b>MS</b>	Metil seringato
<b>NHA</b>	<i>N</i> -hidroxiacetanilida
<b>NP</b>	Nanopartícula
<b>PCP</b>	Pentaclorofenol
<b>PCR</b>	<i>Polimerase Chain Reaction</i>
<b>PEG</b>	Polietilenoglicol
<b>pI</b>	Ponto isoelétrico
<b>POM</b>	Polioxometalato
<b>SPM</b>	Superparamagnético
<b><i>t</i><sub>1/2</sub></b>	Tempo de meia vida

<b>TEMPO</b>	2,2,6,6-tetrametil-1-piperidiniloxil
<b>TEOS</b>	Tetraetoxisilano
<b>VC</b>	Vermelho do congo
<b>VIO</b>	Ácido violúrico
<b>V<sub>max</sub></b>	Velocidade máxima da reação

## ÍNDICE DE TABELAS

---

Tabela 2.1 - Aplicações da lacase em diversas áreas. ....	7
Tabela 2.2 - Vantagens e desvantagens da utilização de biocatalisadores imobilizados (Adaptado de (46)).....	10
Tabela 2.3 - Vantagens e desvantagens dos métodos de síntese de MNPs (Adaptado de (59,63)). ....	18
Tabela 2.4 - Aplicações de MNPs. ....	20
Tabela 2.5 - Trabalhos desenvolvidos sobre imobilização de lacase em NPs de magnetite. ....	23
Tabela 3.1 - Reagentes utilizados na produção das MNPs (Adaptado de (80)). ....	26
Tabela 3.2 - Reagentes utilizados durante a imobilização da lacase e nos ensaios enzimáticos. ....	31
Tabela 4.1 - Resultados obtidos pela análise elementar. ....	37
Tabela 4.2 – Resultados da área superficial BET ( $A_{BET}$ ), da porosidade ( $V_p$ ) e do diâmetro do poro ( $D_p$ ) das MNPs.....	38
Tabela 4.3 - Resultados do potencial zeta. ....	39
Tabela 4.4 - Parâmetros cinéticos obtidos para a lacase livre e imobilizada.....	44
Tabela 4.5 - Parâmetros da cinética de inativação térmica da lacase livre e imobilizada a 40°C.....	48
Tabela 4.6 - Atividade da lacase livre ( $A_{Livre}$ ) e imobilizada ( $A_{Imobilizada}$ ) verificada na avaliação da estabilidade de armazenamento. ....	52
Tabela 4.7 - Resultados obtidos para a reação da lacase e o MS com o VC (s - desvio-padrão). ....	56
Tabela 4.8 - Resultados obtidos para o ensaio controlo com o VC (s - desvio-padrão).....	57

## ÍNDICE DE FIGURAS

---

Figura 2.1- Representação esquemática do centro ativo da lacase, com identificação dos quatro átomos de cobre (Cu1, Cu2, Cu3 e Cu4) organizados em três diferentes grupos (T <sub>1</sub> , T <sub>2</sub> e T <sub>3</sub> ) (Adaptado de (4)).	4
Figura 2.2 - Mecanismo da reação catalisada pela lacase (Adaptado de (4)).	5
Figura 2.3 - Representação esquemática da catálise num LMS (Adaptado de (4)).	6
Figura 2.4 - Principais métodos de imobilização de enzimas (Adaptado de (45–47)).	12
Figura 2.5 - Curva de magnetização de MNPs monodomínio com (a) comportamento FM e (b) comportamento SPM, em que <i>M</i> indica a magnetização e <i>H</i> o campo magnético aplicado (Adaptado de (64–66)).	16
Figura 3.1 - Montagem utilizada para a síntese de NPs de Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> .	27
Figura 3.2 - Montagem para a modificação superficial com EDTA-TMS.	28
Figura 4.1 - Esquema do processo de produção das MNPs.	36
Figura 4.2 - Espectro de FTIR das diferentes fases de produção das MNPs.	36
Figura 4.3 - Imagens obtidas por TEM das MNPs de Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> @SiO <sub>2</sub> _EDTA-TMS isoladas (a) e agregadas (b).	38
Figura 4.4 - Efeito do número de moles de cobre na imobilização da lacase nas MNPs a pH 3,0.	40
Figura 4.5 - Efeito do pH na imobilização da lacase nas MNPs.	42
Figura 4.6 - Gráficos de Michaelis-Menten obtidos para a lacase livre e imobilizada. A linha sólida representa o ajuste efetuado segundo o modelo de Michaelis-Menten.	43
Figura 4.7 – Perfil de estabilidade térmica a 40°C da lacase livre e imobilizada. A linha sólida representa o ajuste do modelo de decaimento exponencial.	47
Figura 4.8 - Perfil de estabilidade térmica da lacase livre a 40°C a pH 9,0.	49
Figura 4.9 - Perfil de estabilidade operacional da lacase imobilizada nas MNPs.	50
Figura 4.10 – Efeito da imobilização na remoção do IC.	58
Figura 4.11 - Efeito da concentração de MS na remoção do IC.	59

### Capítulo 1 - Introdução

A lacase é uma *multicopper blue* oxidase, responsável por catalisar reações de oxidação-redução de diversos compostos. As potencialidades catalíticas da lacase são sobejamente conhecidas, o que promove a investigação com vista à sua aplicação em áreas cada vez mais variadas. No entanto, para que a aplicação industrial desta enzima se torne uma realidade ainda mais comum, é necessário realizar o estudo e a otimização de sistemas de imobilização.

A imobilização de enzimas é um processo recorrente quando o objetivo passa pela aplicação industrial do biocatalisador. Este processo apresenta algumas vantagens, nomeadamente o aumento da estabilidade do biocatalisador relativamente a condições extremas, como pH e temperatura. Além disso, a possibilidade de recuperação e reutilização do biocatalisador é um fator preponderante na implementação de um tratamento enzimático num processo industrial. Desta forma, o estudo de sistemas recorrendo à imobilização de enzimas revela-se uma ferramenta importante no desenvolvimento de bioprocessos com aplicação industrial viável.

Uma das grandes questões do processo de imobilização é a escolha do suporte. Diversos materiais, tanto orgânicos como inorgânicos, foram e continuam a ser estudados no sentido de serem utilizados como suportes para imobilização enzimática.

Com o desenvolvimento da nanotecnologia, a descoberta de novos materiais demonstra ser uma boa oportunidade para expandir a gama de suportes de imobilização. A utilização de nanomateriais, designadamente as nanopartículas (NPs), oferece inúmeras vantagens atendendo às propriedades únicas que estas apresentam. Recentemente, as NPs magnéticas (MNPs) têm ganho especial importância nesta linha de investigação. Além das propriedades físicas e químicas intrínsecas aos materiais que apresentam dimensões nanométricas, as MNPs apresentam um carácter magnético, o que facilita a sua recuperação através da aplicação de um campo magnético externo. Todas estas características das MNPs, aliadas à vasta gama de aplicações que apresentam atualmente, tornam este nanomaterial numa boa opção para o estudo de novos sistemas de imobilização enzimática.

O trabalho a ser desenvolvido teve como fase inicial a produção de MNPs para a imobilização da lacase de *Myceliophthora termophila*. Posteriormente, as MNPs foram caracterizadas utilizando diversas metodologias que permitiram determinar parâmetros como o diâmetro, a carga superficial, a morfologia, a área superficial específica, a constituição

atômica e as propriedades magnéticas das mesmas. Na fase de imobilização da lacase, foram otimizadas as condições do processo, de modo a que fosse obtida a maior recuperação de atividade possível. Desta forma, foram determinados os parâmetros cinéticos da reação de oxidação de ABTS com a enzima imobilizada. Além disso, foram também avaliadas as estabilidades operacional, térmica e de armazenamento da lacase imobilizada. Por fim, foi estudada a degradação de corantes têxteis para avaliar a aplicabilidade do sistema enzimático desenvolvido no tratamento de efluentes provenientes da indústria têxtil.

## **Capítulo 2 - Revisão Bibliográfica**

### **2.1.Lacases**

Lacase (EC 1.10.3.2 benzenodiol:oxigénio oxidorreductase) é uma enzima que pertence à família das *multicopper blue* oxidases, cujas enzimas contêm átomos de cobre no seu centro ativo, responsáveis por reações de oxidação-redução (1–4). A primeira descrição desta enzima foi feita por Yoshida (1883), através da análise aos exsudados da árvore *Rhus vernicifera* (5). Além de plantas, a lacase foi também isolada em fungos (2), insetos (6), bactérias (7,8) e até veneno de vespa (9), o que revela a sua ubiquidade.

Em termos do seu papel fisiológico nas plantas, a lacase está intimamente relacionada com os mecanismos de formação de radicais para a polimerização da lenhina (2,10) e em reações envolvidas na reparação de danos após um ataque de organismos patogénicos (4). No que diz respeito às bactérias, esta enzima tem um papel importante na morfogénese, na biossíntese do pigmento castanho dos esporos e na homeostasia do cobre e do ferro (10,11). Embora seja menos frequente em insetos, acredita-se que a lacase está envolvida nos processos de endurecimento das cutículas da epiderme (10). No entanto, é na categoria dos fungos que esta se encontra caracterizada num maior número de espécies (2,10), especialmente nos fungos da podridão branca da madeira (1). Nestes organismos, a lacase catalisa reações de oxidação-redução, responsáveis pela degradação da lenhina que é promovida em situações de *stress* e de morfogénese (2,10).

#### **2.1.1. Caracterização estrutural e bioquímica**

Bioquimicamente, a lacase é classificada como uma glicoproteína extracelular, contendo um total de 520 a 550 aminoácidos. Esta enzima apresenta uma massa molecular variável, entre os 60 e os 80 kDa, podendo, no entanto, verificar-se algumas exceções (1,12). O seu teor glicosídico varia entre os 8 e os 50% (1,4), sendo constituído, essencialmente, por manose, *N*-acetilglucosamina e galactose (11). O ponto isoelétrico da lacase situa-se entre 3 e 9, enquanto que o potencial redox varia entre 0,4 e 0,8 V, sendo ambos os parâmetros dependentes do organismo que a produz (1,2,13).

A nível estrutural é caracterizada como uma molécula dimérica ou tetramérica (4), com um centro ativo que engloba quatro átomos de cobre organizados em três grupos diferentes: um cobre do tipo 1 (T<sub>1</sub>) e três cobres adicionais, um do tipo 2 (T<sub>2</sub>) e dois do tipo 3 (T<sub>3</sub>), que se encontram arrançados num *cluster* trinuclear (2,4), conforme se pode ver na Figura 2.1.

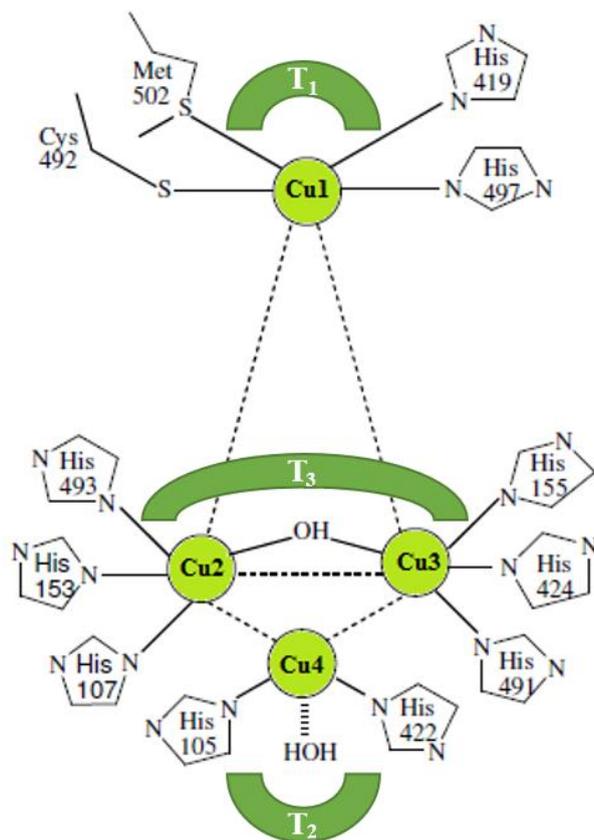


Figura 2.1- Representação esquemática do centro ativo da lacase, com identificação dos quatro átomos de cobre (Cu1, Cu2, Cu3 e Cu4) organizados em três diferentes grupos (T<sub>1</sub>, T<sub>2</sub> e T<sub>3</sub>) (Adaptado de (4)).

Os três tipos de átomos de cobre podem ser distinguidos através das suas propriedades espectroscópicas e paramagnéticas, EPR (do inglês *Electron Paramagnetic Resonance*), além de apresentarem funções distintas no mecanismo catalítico da lacase (10,13). O cobre T<sub>1</sub> apresenta um sinal de EPR detetável e uma forte absorvância a 614 nm, conferindo a cor azul característica à enzima, quando esta se encontra numa solução pura (10,13). Mecanicamente, este átomo de cobre é responsável pela oxidação do substrato, sendo o primeiro aceitador de eletrões do sistema catalítico (2,10). Numa reação catalisada pela lacase ocorrem quatro reações de oxidação no substrato, em que cada uma delas envolve apenas a remoção de um eletrão (10). Seguidamente, os eletrões são transportados por um tripéptido, composto por dois resíduos de histidina ligados a um resíduo de cisteína, pertencente ao seu centro ativo, até ao *cluster* trinuclear (10). Por fim, o cobre T<sub>2</sub> e os cobres T<sub>3</sub> estão envolvidos na redução do oxigénio molecular a água, desempenhando assim o papel de aceitadores finais na cadeia de eletrões (10). O cobre T<sub>2</sub> apresenta um espectro de EPR característico, embora não se verifique nenhuma absorvância específica (13). No caso dos cobres T<sub>3</sub>, ocorre uma forte absorvância a 330 nm, sendo indetetável o sinal de EPR (2,13).

### 2.1.2. Mecanismos de catálise

A lacase, atendendo à sua função como biocatalisador, catalisa a oxidação de substratos, habitualmente compostos fenólicos, sendo a reação acoplada a uma redução do oxigênio a água, como mostra a Figura 2.2 (12,14).



Figura 2.2 - Mecanismo da reação catalisada pela lacase (Adaptado de (4)).

Desta forma, acredita-se que a catálise efetuada pela lacase pode ser sumariada em três fases essenciais: numa primeira fase, ocorre a redução do cobre  $T_1$  pelo substrato; seguidamente, verifica-se uma transferência interna de elétrons entre o cobre  $T_1$  e os cobres  $T_2$  e  $T_3$ ; por fim, ocorre a redução do oxigênio a água no *cluster* trinuclear (13). A reação que envolve a redução do oxigênio molecular a água permite que ocorra a regeneração do biocatalisador, dado que a lacase apenas é capaz de catalisar a oxidação de um substrato quando se encontra oxidada. Assim, o mecanismo reacional não pode ocorrer apenas no sentido direto, levando a que a lacase funcione como uma bateria, que recebe e doa elétrons (4,12).

O potencial redox está intimamente relacionado com a atividade da lacase. A oxidação dos compostos fenólicos depende diretamente da diferença de potencial redox entre o substrato e o centro ativo, mais concretamente do cobre  $T_1$ , sendo dificultada em substratos com elevados potenciais redox (2,4). Além disso, a massa molecular do composto interfere também com a capacidade catalítica da enzima, pois compostos com elevadas massas moleculares têm maior dificuldade em aceder ao centro ativo da enzima (4,15). Para ultrapassar estas limitações, Bourbonnais e Paice (1990) mostraram que o ABTS (ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotriazolina-6-sulfónico)) tinha a capacidade de funcionar como “intermediário” na oxidação de compostos não fenólicos que existem na lenhina, que não eram diretamente oxidados pela lacase (16). Desta forma, surgiu o conceito de “mediador” e os sistemas mediadores de lacase (LMS) (4,12).

### 2.1.2.1. Sistemas Mediadores de Lacase

Os mediadores são descritos como moléculas de pequeno peso molecular passíveis de serem oxidados pela lacase, gerando radicais com elevado potencial redox, que promovem a oxidação de outros compostos (2,11,15). Alguns dos mediadores já identificados são o ABTS, o HBT (*N*-hidroxibenzotriazol), o VIO (ácido violúrico), a HPI (*N*-hidroxiptalamida), a NHA (*N*-hidroxiacetanilida) e o TEMPO (radical livre estável de 2,2,6,6-tetrametil-1-piperidiniloxil) (11,15). Assim, os LMS (Figura 2.3) são definidos como sistemas reacionais em que são utilizadas moléculas mediadoras, para permitir a ação da lacase sobre determinados compostos, normalmente não fenólicos (4,15).

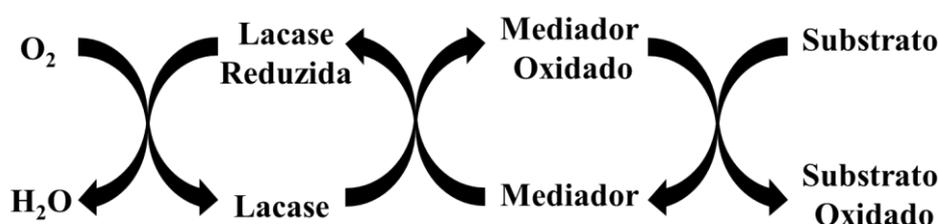


Figura 2.3 - Representação esquemática da catálise num LMS (Adaptado de (4)).

O sistema baseia-se, numa primeira fase, na oxidação do mediador pela lacase, envolvendo a perda de um único elétron. Consequentemente, verifica-se a formação de um radical livre instável que vai promover a transferência de elétrons para um substrato que, neste caso, pode ser não fenólico. Desta forma, ocorre uma oxidação indireta do composto pela lacase (4,13). Um dos exemplos da aplicação deste tipo de sistemas é a utilização de polioxometalatos (POMs) como mediadores na oxidação da lenhina (17–19).

Os POMs são aniões poliatômicos, constituídos por metais de transição, e podem ser utilizados como agentes branqueadores, através da oxidação da lenhina residual presente na pasta de papel (17,19). De forma a garantir a reutilização do catalisador, é necessário assegurar que o processo ocorre sob condições aeróbias, tendo em conta que os POMs reduzidos são reoxidados pelo oxigénio, o que permite a sua regeneração. No entanto, esta reação é extremamente lenta, o que reduz a aplicabilidade do processo (17,18). A utilização da lacase neste sistema permite que a oxidação dos POMs se torne um processo termodinamicamente favorável. Assim, neste LMS, os POMs oxidam a lenhina residual e a lacase assegura a reoxidação dos POMs reduzidos no mesmo passo do processo (17–19).

A grande vantagem de utilizar compostos mediadores reside no facto de aumentar em larga escala o portefólio de substratos da enzima, podendo assim potenciar novas aplicações

da mesma (4,11,15). Além disso, permite também aumentar o rendimento e a velocidade das reações de oxidação (11). No entanto, a utilização de mediadores apresenta duas grandes limitações, uma vez que estes compostos são normalmente caros e, por vezes, geram produtos que se tornam tóxicos para o ambiente e inibidores para a enzima (4,11). A descoberta de mediadores de ocorrência natural, como é o caso da anilina, do ácido 4-hydroxibenzóico, do álcool 4-hidroxibenzílico, do siringaldeído e da acetosiringona, veio trazer uma nova janela à investigação sobre este tipo de sistemas (2,15).

### 2.1.3. Aplicações Biotecnológicas

A lacase é uma enzima amplamente estudada no que diz respeito à sua utilização em processos biotecnológicos (13). Este facto deve-se, em grande parte, ao alargamento do leque de substratos da enzima com a utilização dos LMS (11). Na Tabela 2.1 são apresentadas algumas das aplicações mais estudadas (3,4,13).

Tabela 2.1 - Aplicações da lacase em diversas áreas.

Área	Aplicação	Referência
Indústria Têxtil	• Branqueamento	•(20)
	• <i>Biostoning</i>	•(21)
Indústria Papeleira	• Remoção de Lenhina	•(22)
	• Branqueamento	•(23)
Indústria Alimentar	• Empacotamento	•(24)
	• Estabilização de vinho	•(25)
Biorremediação	• Tratamento de efluentes	•(26,27)
	• Tratamento de solos	•(28)
Higiene e Saúde	• Síntese de medicamentos	•(29)
	• Produção de produtos	•(30)
Medicina e Nanobiotecnologia	• Células de Biocombustível	•(31)
	• Biossensores	•(32)
	• Imunoquímica	•(33)

A indústria têxtil é uma das áreas onde a lacase é amplamente utilizada (4,13). Tendo em conta o seu potencial de oxidação, é aplicada no melhoramento do branqueamento do algodão e também na conversão *in situ* de alguns precursores de corantes, de forma a promover um tingimento mais eficaz (20,34,35). Além disso, é também aplicada em *biostoning* (obtenção dos tecidos com aspeto “gasto”) e em detergentes para a lavagem da roupa (21,36). A escolha do método biológico em detrimento de processos químicos e/ou

físicos promove uma redução no tempo, na energia e na quantidade de água necessários para o processo, tornando-se assim uma melhor alternativa em termos ambientais (4,13).

No processo de fabrico do papel, é necessário que ocorra uma remoção da lenhina, para que a celulose existente na madeira seja processada. Dado o seu caráter lenhinolítico, a lacase é utilizada no processo de branqueamento, através da remoção de lenhina residual e de alguns compostos fenólicos, promovendo a obtenção de uma pasta mais branca e com melhores propriedades mecânicas (22,23). Tal como na indústria têxtil, também na indústria papelreira a utilização da lacase revela vantagens como a poupança de energia e de reagentes oxidantes, produzindo efluentes com menor grau de toxicidade (37).

A estabilização do vinho é uma das principais aplicações da lacase na indústria alimentar (25,38). Durante o processo de maturação, a enzima é utilizada para oxidar os polifenóis existentes no vinho, melhorando assim as suas propriedades organolépticas (25). Além disso, está também envolvida na oxidação de alguns compostos fenólicos existentes em sumos de fruta (39). Através da redução do oxigénio, a lacase é responsável por aumentar o tempo de armazenamento da cerveja e por melhorar o empacotamento de alguns alimentos, atendendo a que a presença de oxigénio pode deteriorar a qualidade dos alimentos embalados (24,40). Por fim, a lacase apresenta outras aplicações na área alimentar, nomeadamente na determinação de ácido ascórbico (41), no processo de cozimento (42) e na gelificação da pectina da beterraba (43).

O tratamento de efluentes, tanto industriais como domésticos, é uma obrigatoriedade ambiental. Dado o seu poder de oxidação, a lacase tem vindo a ser estudada e aplicada em processos de biorremediação (3,38). Além de serem substratos da lacase, os fenóis e os seus derivados, como os clorofenóis, dimetoxifenóis e nitrofenóis, são os compostos orgânicos mais tóxicos neste tipo de efluentes (38). Assim, a sua remoção é facilitada através do seu tratamento enzimático. Por outro lado, também outro tipo de compostos, como o carbazol oxidado, *N*-etilcarbazol, fluoreno, alcenos e dibenzotiofeno são oxidados pelos LMS (3). A lacase também provou ser eficaz na descoloração de efluentes com determinados corantes, como o *Azure B*, *Brilliant green*, *Congo Red*, *Violeta de cristal*, *Remazol Brilliant Blue R*, entre outros (26,27). Por fim, é também descrito que os LMS têm também aplicação no que diz respeito à degradação de herbicidas e pesticidas, revelando-se assim importantes na biorremediação de solos (28).

A nível farmacêutico, a lacase é utilizada na síntese de fármacos, como anestésicos, anti-inflamatórios, antibióticos e sedativos, entre outros (4,13). Além disso, a literatura reporta que a lacase apresenta elevada atividade inibitória da transcriptase reversa do vírus HIV-1 e é também utilizada no combate à aceruloplasminemia (perda de ceruloplasmina, uma *multicopper* oxidase que regula a homeostasia do ferro) (4,29). Mais recentemente e atendendo ao seu potencial de descoloração, a lacase foi testada na área da higiene, no fabrico de alguns produtos, como desodorizantes, pastas de dentes, elixires, detergentes, sabões e fraldas (30,44).

As células de biocombustíveis são fontes de energia extremamente atrativas, especialmente ao nível da escala portátil (4). Estas células apresentam um potencial de conversão de energia muito elevado, bem como uma baixa poluição, tendo em conta as fontes de energia existentes (31). Neste tipo de sistemas, a lacase pode ser imobilizada no cátodo, dado o seu elevado potencial de oxidação (31). Esta aplicação é muito importante na área médica, permitindo assim que determinados implantes no corpo humano que necessitam de uma fonte de energia constante possam ter sucesso (4). Outra vertente importante da utilização da lacase é na área de nanobiotecnologia, nomeadamente no fabrico de biossensores. Esta enzima já é amplamente utilizada em diversos tipos de biossensores, desde sensores de oxigénio, glucose, aminas aromáticas e compostos fenólicos, entre outros (32). Além dos biossensores, a lacase pode ser também combinada com outra biomolécula, de forma a ser utilizada como agente biológico de identificação em testes como *ELISA* (do inglês, *Enzyme-linked Immunosorbent Assay*) e *Western blotting*, e ainda em histoquímica, citoquímica e na deteção de ácidos nucleicos (33).

Embora atualmente existam diversas aplicações para a lacase, a sua utilização industrial tem vindo a ser condicionada pela fraca estabilidade que esta apresenta comparativamente aos catalisadores químicos, bem como pela dificuldade na sua recuperação dos meios reacionais com posterior reutilização ou utilização em reatores contínuos (4,13). De forma a ultrapassar estas limitações na sua aplicação, um dos caminhos a seguir passa pela imobilização da lacase, para uma posterior otimização de processos (45).

## 2.2.Imobilização

A immobilização de um biocatalisador consiste no seu confinamento a uma região restrita (46). A utilização de enzimas immobilizadas apresenta inúmeras vantagens e desvantagens, conforme se apresenta na Tabela 2.2.

Tabela 2.2 - Vantagens e desvantagens da utilização de biocatalisadores immobilizados (Adaptado de (46)).

Vantagens	Desvantagens
<ul style="list-style-type: none"><li>• Retenção do biocatalisador no reator</li><li>• Concentrações elevadas do biocatalisador</li><li>• Microambiente controlado do biocatalisador</li><li>• Fácil separação do meio reacional</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Perda de atividade catalítica</li><li>• Processo empírico</li></ul>

A retenção de uma enzima num biorreator permite operar o sistema em contínuo, o que se revela bastante vantajoso no que diz respeito à sua utilização em processos industriais (46,47). Além disso, possibilita a operação com elevados volumes e, conseqüentemente com elevadas taxas de diluição, já que elimina o risco de ocorrência de *wash-out* (46). Por outro lado, a immobilização enzimática permite operar com elevadas concentrações de biocatalisador, o que potencia a produtividade e a rapidez da bioconversão (46). Outra vantagem resulta do confinamento da enzima a um espaço limitado, promovendo a criação de microambientes, isto é, permite que na vizinhança da enzima se criem condições diferentes daquelas que se verificam no interior do reator. Desta forma, pode promover-se um efeito protetor do biocatalisador face a condições de operação extremas e também face a potenciais compostos inibidores (45,46). Por fim, o processo de immobilização permite a recuperação e reutilização do biocatalisador, tornando a sua concentração residual no produto final (46).

A perda de atividade catalítica é uma das grandes preocupações nos processos de immobilização. O decréscimo verificado na atividade catalítica pode ser causado pela possível desnaturação proteica da enzima durante o protocolo de immobilização, por alterações conformacionais que se verifiquem na estrutura secundária e por dificuldades na transferência de massa, no caso de métodos de oclusão (46,48). Por outro lado, a otimização das condições e metodologias de immobilização para os vários sistemas enzimáticos deve ser feita caso a caso, de forma empírica, tornando-se o controlo e a modelação bastante complexos (46).

### 2.2.1. Efeitos sobre as propriedades enzimáticas

O processo de imobilização promove alterações nas características das enzimas, nomeadamente na sua atividade, estabilidade e seletividade (45,47,49).

Em suportes sólidos porosos, a enzima beneficia dum efeito protetor face a potenciais inibidores e às condições extremas da reação. Esta proteção pode potenciar um aumento na atividade enzimática, face a situações em que a enzima livre se encontra sujeita ao mesmo tipo de condições (50). Tal facto pode ser provocado pela imobilização da enzima no interior da matriz, que atua como uma barreira, protegendo a enzima de condições extremas como pH e temperatura, e também de substâncias inibidoras e/ou desnaturantes que possam estar presentes no meio reacional (50). Contudo, este tipo de suportes cria também problemas de difusão do substrato, o que influencia diretamente a taxa de conversão do mesmo (46,51). Assim, o efeito de proteção que ocorre em processos de imobilização origina microambientes que alteram significativamente a atividade enzimática (46,50,51).

A estabilidade de uma enzima livre em solução é determinada pela sua estrutura intrínseca, enquanto que, após a imobilização, este parâmetro passa a depender de vários fatores, tais como, as propriedades da interação entre a enzima e o suporte, o número de ligações, o microambiente a que a enzima está sujeita, as características físicas e químicas da matriz e as condições de imobilização (50). As matrizes porosas permitem que as moléculas de enzima se dispersem totalmente, impedindo a interação com uma interface externa, o que promove a estabilização da enzima face às moléculas presentes no meio reacional (51). Por outro lado, a ligação entre a enzima e o suporte deve ser efetuada a vários níveis, para que ocorra uma consolidação da estrutura enzimática, fomentando assim a sua estabilidade (52). Durante o processo de imobilização devem ser tidos em conta determinados parâmetros, tais como, o tempo, o pH, a temperatura e os reagentes utilizados, pois vão interferir diretamente com o processo, levando-o, muitas vezes, ao fracasso (52). Desta forma, a imobilização de uma enzima pode permitir que esta se torne mais estável, tanto a nível operacional como de armazenamento. No entanto, esse efeito sobre a estabilidade não é universal. Assim, não é possível identificar o método mais indicado para a imobilização, sendo necessária a otimização experimental do sistema (52).

As enzimas são biomoléculas que apresentam seletividade, atuam naturalmente sobre determinados compostos, denominados como substratos. Em processos industriais, pretende-se que a seletividade da enzima seja elevada, de forma a maximizar o rendimento

da reação em termos do produto final pretendido. A imobilização de um biocatalisador pode causar alguma distorção do seu centro ativo, reduzindo a mobilidade dos grupos reativos. Assim, manipulando esta alteração, podem ser modificados os centros ativos da enzima, de forma a que se verifique um aumento da seletividade do biocatalisador face a determinado substrato (51,53). Além destes fatores, a seletividade pode também ser determinada pelas características do suporte, nomeadamente o diâmetro do poro e a difusão do substrato (52).

### 2.2.2. Métodos

Os métodos de imobilização podem ser divididos em dois tipos principais, sendo eles a imobilização por reticulação (*cross-linking*) com agentes bifuncionais (CLEC e CLEA) e a imobilização em suportes sólidos, que pode ocorrer através da ligação do biocatalisador ao suporte ou por oclusão do mesmo (oclusão, adsorção, ligação iónica e ligação covalente) (Figura 2.4) (50).

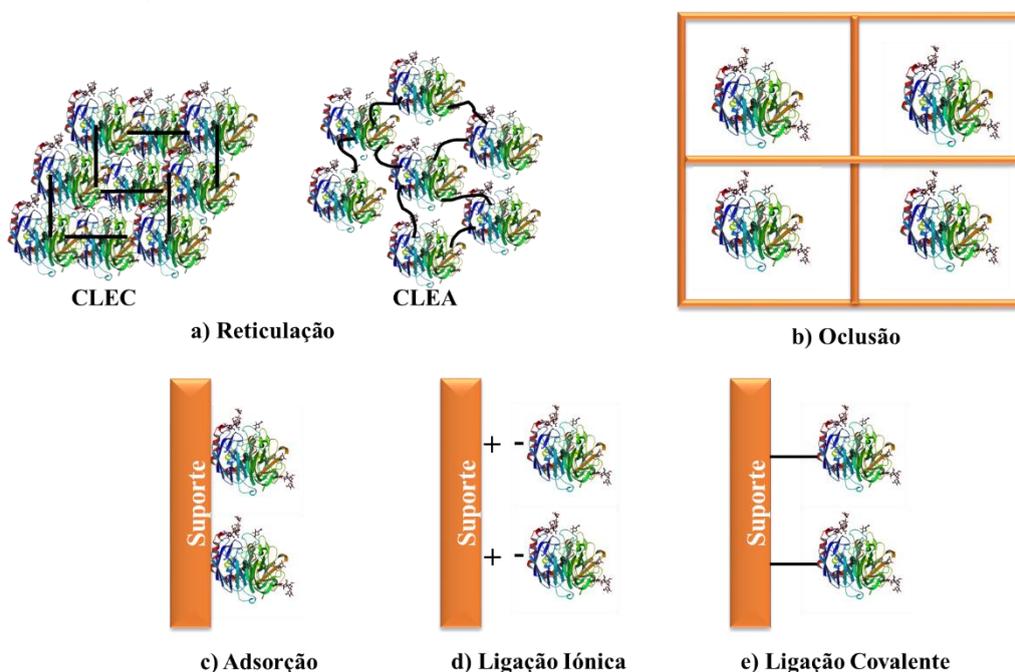


Figura 2.4 - Principais métodos de imobilização de enzimas (Adaptado de (45–47)).

A imobilização de enzimas através de reticulação não envolve a utilização de suportes sólidos, baseando-se em ligações covalente cruzadas através da adição de reagentes bi- ou multifuncionais, resultando assim na formação de agregados tridimensionais insolúveis em água (49). Neste tipo de imobilização podem destacar-se os CLECs (do inglês, *Cross-linked Enzyme Crystals*) e os CLEAs (do inglês, *Cross-linked Enzyme Aggregates*) (46). Os CLECs apresentam elevada atividade catalítica e estabilidade operacional, no entanto, é necessária

uma elevada pureza na enzima, de forma a que seja possível obter os cristais da mesma (45). Nos CLEAs, a purificação e imobilização da enzima são combinadas numa única operação, tornando-se mais simples de obter (49).

A imobilização de biocatalisadores em suportes sólidos pode ser conseguida através de uma ligação de natureza física, iónica ou covalente (45).

A adsorção é um fenómeno físico que pode ocorrer através de interações fracas, do tipo interações hidrofóbicas, de van der Waals, eletrostáticas e pontes de hidrogénio (49). Este método de imobilização apresenta um elevado potencial a nível industrial, atendendo à sua simplicidade e baixo custo. No entanto, parâmetros como o pH do meio reacional, bem como a sua força iónica e hidrofobicidade, afetam significativamente o seu desempenho, uma vez que estão diretamente relacionados com o sucesso da imobilização (45,46,54). Desta forma, este tipo de interações revela-se pouco eficiente em processos em que as condições adotadas são extremamente rigorosas, como pH extremo e elevadas forças iónicas (46,49,53). Uma das formas de ultrapassar esta desvantagem passa por adotar uma adsorção de iões metálicos (45,46). Este tipo de imobilização baseia-se na interação entre iões metálicos e os resíduos de cisteína e histidina que se encontram na superfície das enzimas, através de ligações de coordenação (55,56). Além de se conseguir uma forte adsorção entre a enzima e o suporte, este método é reversível, o que implica que o suporte pode ser reaproveitado mesmo após a dessorção da enzima (56).

As resinas de troca iónica podem ser utilizadas como suporte de imobilização, estabelecendo ligações iónicas com o biocatalisador (46). Embora as ligações entre a matriz e a enzima sejam mais fortes do que na adsorção, as limitações determinadas pelas condições do meio reacional são semelhantes, verificando-se a dessorção da enzima em situações de elevada força iónica ou variações de pH extremas (46).

Industrialmente, a imobilização de enzimas através de ligações covalentes pode ser o método mais interessante, já que este tipo de ligações se revela bastante forte e estável (55,56). O processo baseia-se em dois passos principais, sendo primeiro necessário ativar o suporte através da adição de grupos eletrofílicos, para que, posteriormente, ocorra a ligação da enzima à matriz (46,53). Os aminoácidos normalmente envolvidos neste tipo de ligações são as cisteínas (grupo tiol), as serinas e treoninas (grupo hidróxilo), as lisinas e argininas (grupo amina), o aspartato e o glutamato (grupo carboxílico) e a tirosina (grupo fenol) (49,53). A ligação entre a enzima e o suporte pode ser conseguida de forma direta ou através

da introdução de *spacers*, como o glutaraldeído, que oferecem uma maior mobilidade à enzima (46,49,53). Uma das grandes desvantagens deste método baseia-se no caráter irreversível da ligação estabelecida entre a enzima e o suporte (53). Desta forma, é necessário descartar o suporte aquando da perda de atividade catalítica da enzima, o que, neste tipo de imobilização, se verifica com grande frequência (45).

A oclusão baseia-se no aprisionamento de enzimas em matrizes poliméricas sólidas que apresentam poros de dimensões microscópicas (45,46). Além de apresentar uma elevada simplicidade, este método não interfere com a configuração estrutural da enzima, o que se revela de extrema importância quando se fala em processos catalíticos que se baseiam na afinidade da enzima com o seu substrato (49). Por outro lado, a matriz porosa funciona como proteção da biomolécula face às condições do meio que a rodeia, prevenindo assim possíveis problemas relacionados com alterações de pH e temperatura (49). No entanto, a oclusão apresenta graves problemas no que diz respeito à quantidade de enzima que pode ser incorporada na matriz e também em relação às limitações de transferência de massa, provocadas pelo difícil acesso do substrato ao biocatalisador (49,53).

### 2.2.3. Tipos de Suportes

A seleção de uma matriz de suporte para um processo de imobilização implica a avaliação de diversos parâmetros, tendo em conta a estrutura e a atividade da enzima em causa, o método que será escolhido para a imobilização e a aplicação do sistema (46). Assim, um suporte ideal caracteriza-se por ser um material inerte, resistente, estável, regenerável, com capacidade de aumentar a especificidade/atividade enzimática e de reduzir a inibição pelo produto, a adsorção não específica e a contaminação microbiana (47,57). Além disso, deve ser um material acessível em termos de custos, de forma a não condicionar a sua aplicação (54,58).

Os materiais utilizados para o fabrico dos suportes de imobilização podem ser divididos em dois grandes grupos, os orgânicos e os inorgânicos, de acordo com a sua natureza química (54).

Os polímeros naturais, como o alginato, o quitosano e a celulose, são alguns dos materiais orgânicos utilizados em processos de imobilização (54,57,58). Além dos naturais, existem também polímeros orgânicos sintéticos, como o caso do cloreto de polivinil, o poliuretano, a polianilina, a poliacrilamida, o *nylon* e o polietilenoglicol (PEG) (54). A grande vantagem da utilização destes polímeros reside no facto de poderem ser aplicados em

diferentes métodos de imobilização, tornando-se assim materiais muito versáteis (45,54). Além disso, a funcionalização deste tipo de suportes é relativamente fácil (57). No entanto, a sua fraca resistência química e mecânica prejudica o seu desempenho em condições operacionais agressivas, limitando também as suas possibilidades de regeneração (46).

Em relação aos materiais inorgânicos, destacam-se a sílica, o vidro e o carvão ativado (57). Estes suportes são quimicamente inertes e têm uma boa estabilidade mecânica e térmica, o que se revela bastante vantajoso (54). Porém, os grupos funcionais que se encontram na superfície deste tipo de materiais são quase exclusivamente grupos hidróxilo, o que limita o tipo de ligação estabelecida entre o suporte e a enzima. Para ultrapassar esta questão, utilizam-se técnicas de ativação destes suportes, sendo esta uma área ainda pouco explorada (46).

A nanotecnologia tem desempenhado um papel muito importante no desenvolvimento de novos suportes de imobilização, sendo considerada uma das áreas de investigação mais promissoras (46). Materiais como as nanofibras e as NPs têm sido amplamente estudados em diferentes métodos de imobilização, de forma a permitir obter sistemas enzimáticos mais eficazes (47).

### **2.3.Nanopartículas**

As NPs definem-se como partículas que apresentam pelo menos uma dimensão entre 1 e 100 nm, apresentando propriedades distintas consoante a sua composição (47,59). O tamanho das NPs confere-lhes propriedades físicas diferentes dos materiais com maiores dimensões, potenciando assim inúmeras vantagens no que diz respeito à sua utilização, nomeadamente, a estabilidade química, a uniformidade no tamanho e a possível utilização em processos de grande escala (60,61).

A imobilização de enzimas em NPs é uma estratégia que apresenta diversos pontos fortes, entre eles a reduzida resistência à transferência de massa, o que confere elevada sensibilidade ao método; a elevada carga enzimática efetiva, potenciando a utilização deste tipo de suportes na reprodução de cascatas enzimáticas; a elevada área superficial, tornando o contato com o meio reacional mais eficaz; a elevada resistência mecânica, que se revela muito importante em sistemas sujeitos a *stress* mecânico; e a minimização dos problemas de difusão (47). No entanto, algumas NPs, como as NPs de ouro e diamante, têm elevados custos de síntese, tornando assim inviável a sua utilização à escala industrial; os estudos efetuados no *scale-up* de processos que envolvem a imobilização em nanomateriais são

muito reduzidos, não sendo ainda possível a sua implementação; e verificam-se dificuldades na remoção das partículas do meio reacional (47,60).

Atualmente, as NPs magnéticas (MNPs) têm ganho uma maior relevância na escolha da estratégia de imobilização de enzimas, não só por serem facilmente removidas do meio reacional, através a aplicação de campos magnéticos externos, como também por apresentarem inúmeras potenciais aplicações (47).

### 2.3.1. Nanopartículas Magnéticas

As MNPs são compostas por elementos magnéticos, como por exemplo o ferro, cobalto e níquel, ou por compostos como os óxidos de ferro, como a magnetite ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) e a maguemite ( $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ) (59,62).

O facto de as NPs apresentarem propriedades características do seu tamanho ganha especial relevância nas MNPs, já que o domínio magnético das mesmas pode coincidir com a própria partícula, pois a diminuição do tamanho da partícula torna energeticamente desfavorável a formação de domínio magnéticos (62–64). Este tipo de partículas denominam-se por partículas monodomínio e originam dois tipos de comportamento magnético, o comportamento ferromagnético (FM) e o comportamento superparamagnético (SPM) (61,65).

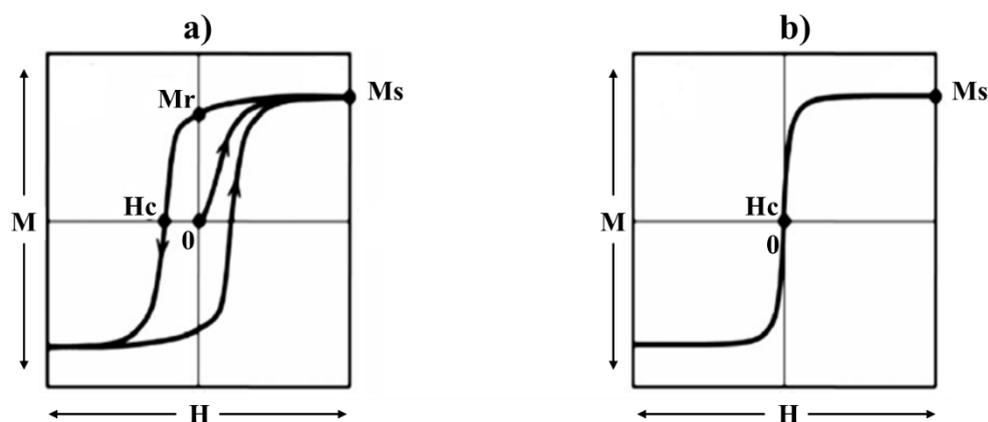


Figura 2.5 - Curva de magnetização de MNPs monodomínio com (a) comportamento FM e (b) comportamento SPM, em que  $M$  indica a magnetização e  $H$  o campo magnético aplicado (Adaptado de (64–66)).

O comportamento FM ocorre quando o material apresenta magnetização, mesmo na ausência de um campo magnético externo (65). Este tipo de comportamento magnético caracteriza-se por exercer um efeito de longo alcance, permitindo a interação entre os momentos magnéticos das MNPs e o alinhamento dos seus campos magnéticos na direção

do campo magnético externo (61). O valor de magnetização ao qual ocorre o alinhamento total dos momentos magnéticos é denominado por magnetização de saturação ( $M_s$ ) (61,65). Após atingir a saturação, o campo magnético externo é reduzido a zero e as MNPs apresentam uma magnetização residual mensurável, denominada por magnetização remanescente ( $M_r$ ) (61,65). A reversão do campo magnético no sentido oposto à  $M_r$  provoca o desalinhamento dos momentos magnéticos das MNPs. Desta forma, o valor do campo externo necessário para que a magnetização volte ao valor nulo é denominada por coercibilidade ( $H_c$ ) (61,65). Na curva de magnetização típica do comportamento FM, a magnetização encontra-se sempre desfasada do campo magnético externo aplicado, originando um ciclo de histerese (Figura 2.5 (a)) (61,65).

No caso do comportamento SPM, os momentos magnéticos das MNPs têm tendência a alinhar-se paralelamente ao campo magnético aplicado, verificando-se assim magnetização das mesmas (61,65). Em partículas com dimensões muito reduzidas, com tamanho inferior ao dos domínios magnéticos, a energia de ativação térmica é suficiente para que os momentos magnéticos se desalinhem. Esta desordem leva a que, na ausência de um campo magnético externo, a magnetização que se verifica seja nula, não existindo assim  $H_c$  (Figura 2.5 (b)) (66).

As MNPs mais utilizadas para aplicações biotecnológicas são de óxido de ferro, dentre as quais se destacam as MNPs de magnetite ( $Fe_3O_4$ ), dadas algumas das suas características como a baixa toxicidade e a elevada biocompatibilidade (61,66,67). A magnetite é composta por iões ferro em dois estados de oxidação diferentes ( $Fe^{2+}$  e  $Fe^{3+}$ ), organizados numa estrutura de espinela invertida (59,62). Consequentemente, a magnetite macrocristalina apresenta um comportamento ferrimagnético, isto é, na ausência de campo magnético externo, apresenta dipolos magnéticos mais fracos alinhados antiparalelamente aos dipolos magnéticos mais fortes adjacentes, o que gera um valor de magnetização residual (64). Para dimensões inferiores a cerca de 20-30 nm, as NPs de magnetite não apresentam magnetização residual após a remoção do campo magnético externo (à temperatura ambiente), adotando um comportamento SPM (61,67).

### 2.3.1.1. Síntese

Com o desenvolvimento da nanotecnologia, muitos métodos eficazes foram desenvolvidos para a síntese de NPs. Na Tabela 2.2 apresenta-se uma revisão dos métodos

mais utilizados especificamente na preparação de MNPs, avaliando as suas principais vantagens e desvantagens.

Tabela 2.3 - Vantagens e desvantagens dos métodos de síntese de MNPs (Adaptado de (59,63)).

	<b>Métodos</b>	<b>Vantagens</b>	<b>Desvantagens</b>
<b>Físicos</b>	<b>Deposição em fase gasosa</b>	Fácil execução Elevada homogeneidade na pureza e composição das NPs	Controlo difícil do tamanho das NPs
	<b>Litografia por feixe de eletrões</b>	Bom controlo do espaçamento entre NPs	Caro
<b>Químicos</b>	<b>Síntese sol-gel</b>	Controlo extremo do tamanho e estrutura interna das NPs	Ligação fraca Pouca resistência Elevada permeabilidade
	<b>Hidrólise oxidativa</b>	Tamanho e distribuição uniformes das NPs	Formação de coloides de ferrite
	<b>Co-precipitação</b>	Simples e eficiente	Baixa pureza
	<b>Decomposição térmica</b>	Tamanho das NPs uniforme	Utilização de tensoativos
	<b>Reações hidrotérmicas</b>	Fácil controlo do tamanho e da forma das NPs	Elevadas temperaturas e tempos de reação
	<b>Síntese de injeção de fluxo</b>	Elevada reprodutibilidade e homogeneidade	Necessidade de equipamento muito especializado
	<b>Eletroquímico</b>	Fácil controlo do tamanho das NPs	Pouco reprodutível
	<b>Reações de decomposição sonoquímica</b>	Distribuição estreita dos tamanhos das NPs	Mecanismo pouco conhecido
	<b>Fase aerosol/vapor</b>	Elevado rendimento	Elevadas temperaturas
	<b>Fluído supercrítico</b>	Eficiente controlo do tamanho Sem necessidade de solventes orgânicos	Pressão e temperatura críticas
<b>Microbianos</b>	<b>Síntese em nanoreatores</b>	Controlo preciso do tamanho e da composição das NPs	Condições complexas
	<b>Incubação microbiana</b>	Elevado rendimento Boa reprodutibilidade Bom <i>scale-up</i> Baixo custo	Moroso

Os métodos físicos de síntese de MNPs baseiam-se em técnicas que envolvem fases sólidas ou gasosas, com recurso a altas energias (59,62). A grande vantagem deste tipo de métodos é a sua fácil execução. No entanto, não permite um bom controlo do tamanho das MNPs, o que se revela bastante problemático, dado que este parâmetro condiciona as propriedades que as partículas apresentam (63). Os métodos químicos têm ganho uma maior prevalência no que diz respeito à síntese deste tipo de nanomateriais, tendo em conta que permitem um bom controlo do tamanho das MNPs, além de serem métodos que apresentam

elevados rendimentos (59,63). Por fim, os métodos microbianos, embora apresentem muitas vantagens no que diz respeito ao seu rendimento e reprodutibilidade, são métodos extremamente morosos, pois envolvem as cinéticas de crescimento de populações microbianas, exigindo passos de fermentação com condições muito bem definidas (59,63).

Na síntese de NPs de óxidos de ferro magnéticos são utilizadas, essencialmente, duas técnicas diferentes, a co-precipitação e a decomposição térmica (59). A co-precipitação é um método bastante simples e que permite elevados rendimentos, no entanto, as dimensões das nanopartículas obtidas são normalmente polidispersas, não se verificando um bom controlo do tamanho das mesmas (61). Esta técnica baseia-se na co-precipitação de uma mistura de sais de ferro (II) e ferro (III), em meio alcalino, utilizando bases como o hidróxido de sódio ou a amónia (59,63). Frequentemente, realiza-se a co-precipitação controlada na presença de miniemulsões (nanoreactores) de modo a obter um controlo mais rigoroso da distribuição do tamanho das NPs (61). Em alternativa, as NPs de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  podem ser preparadas a partir da hidrólise oxidativa de um sal de ferro (II) em meio aquoso alcalino (68). Este método de síntese exige um controlo rigoroso das condições da reação, especialmente do pH e da temperatura, uma vez que a variação deste valor pode implicar a formação de outros tipos de MNPs (68).

As MNPs podem também ser sintetizadas por decomposição térmica de precursores de ferro, em solventes tensoativos com ponto de ebulição elevado (59,61). A adição de surfatantes durante o processo promove a estabilidade coloidal, além de permitir a dispersão das NPs em solventes apolares. Ao contrário da co-precipitação, este método permite obter partículas monodispersas, com diâmetros entre os 3 e os 50 nm (61). A utilização de solventes tensoativos origina MNPs hidrofóbicas, resultantes da formação de películas na superfície das partículas, o que reduz as possibilidades de aplicação deste tipo de materiais em meios aquosos (61). Assim, é necessário efetuar a modificação da superfície das MNPs para aumentar a sua afinidade com a fase aquosa. Esta modificação pode ocorrer por duas vias distintas, através da adição de ligantes hidrofílicos ou pelo encapsulamento das MNPs com revestimentos heterofuncionais (59).

A adição de ligantes hidrofílicos envolve a substituição das moléculas de tensoativos por moléculas orgânicas ambidentadas (59,61). Estas moléculas apresentam dois grupos funcionais, em que um deles se liga na superfície da NP e o outro permite que a NP seja estável em soluções aquosas (61). Para garantir que a troca é realmente efetuada, são

utilizadas moléculas orgânicas com afinidade superior para a superfície da NP, podendo também utilizar-se apenas uma solução de ligante com uma concentração suficientemente elevada (61).

A estratégia de encapsulamento baseia-se na utilização de diversos tipos de moléculas e polímeros, como o PEG, o álcool polivinílico (PVA), o amido, a albumina, o quitosano, entre outros, para o revestimento das MNPs (61). O revestimento inorgânico mais utilizado é a sílica amorfa, pois apresenta algumas características como a baixa citotoxicidade, elevada estabilidade e facilidade de execução. Além disso, este tipo de revestimento das NPs permite prevenir a sua oxidação (59). O processo de silanização baseia-se numa primeira hidrólise das moléculas de silanos, como o tetraetoxisilano (TEOS) ou o 3-aminopropiltriethoxisilano (APTES). Seguidamente, ocorre uma reação de condensação entre os grupos Si-OH silanol e os grupos OH da superfície da MNP, originando-se uma ligação estável (59).

### 2.3.1.2. Aplicações

Com o desenvolvimento da nanotecnologia e atendendo às propriedades que apresentam, as MNPs têm vindo a ser aplicadas nas mais vastas áreas e com as mais diversas finalidades (Tabela 2.4).

Tabela 2.4 - Aplicações de MNPs.

Área	Aplicação	Referência
Industrial	• Dessulfurização de gás natural	(69)
Biomédica	• Aplicação de fármacos	(70)
	• Técnicas terapêuticas	(70)
	• Técnicas de diagnóstico	(71)
Ambiental	• Remediação	(72)
Alimentar	• Análise de contaminantes e microrganismos patogénicos	(62)

As MNPs de óxidos de ferro são utilizadas frequentemente na cerâmica e pintura como pigmentos sintéticos (59,61). Além disso, a nível industrial, são muito utilizadas como catalisadores em diversos processos, desde a preparação de amoníaco, a dessulfurização de gás natural, a síntese de hidrocarbonetos, a desidrogenação do etilbenzeno a estireno, a oxidação de álcoois e a síntese a larga escala de butadieno (67,69).

O caráter magnético deste tipo de NPs e a sua elevada capacidade de retenção de pequenas moléculas promovem a sua utilização na biomedicina, permitindo que a aplicação de fármacos seja mais eficaz (67). Além disso, as NPs de magnetite estão também a ser testadas em tratamentos como a hipertermia, dado que permitem a transferência de energia sob a forma de calor para tecidos tumorais, levando assim à destruição das células afetadas (59).

A utilização das MNPs em técnicas de diagnóstico através da imobilização de proteínas na sua superfície, como a ressonância magnética nuclear (RMN), apresenta bons resultados (71). Por outro lado, podem ser também utilizadas para avaliar estudos imunológicos, através de magnetorrelaxometria, uma técnica que mede o decaimento da magnetização de MNPs após a remoção do campo magnético externo (59). Nas diferentes técnicas de diagnóstico utilizadas atualmente, por vezes, é necessária a separação de biomoléculas, como DNA e proteínas. Esta biosseparação pode também ser conseguida através da marcação destas moléculas biológicas com MNPs, e posterior aplicação de um campo magnético externo. As grandes vantagens da utilização das MNPs face a outras técnicas de separação residem na boa dispersabilidade, a ligação rápida e efetiva às biomoléculas, a sedimentação reversível e controlável e a fácil e rápida separação do meio circundante, apresentando-se assim como excelentes sistemas para a aplicação de fármacos (67,70). Por fim, as MNPs são também utilizadas como suporte para catalisadores, tanto químicos como biológicos, em reações de hidroformilação, hidrogenação, polimerização, hidrólise, entre outras (67).

Na área ambiental, as MNPs são vistas como ferramentas extremamente versáteis no que diz respeito à remediação de diversos compostos, orgânicos e inorgânicos (67,72). Normalmente, a remoção de compostos orgânicos recorrendo a MNPs remete para a remoção de corantes que são facilmente detetados em efluentes de diferentes tipos de indústrias. Em relação à remediação de compostos inorgânicos, destacam-se as toxinas metálicas. Estes compostos são adsorvidos à superfície das MNPs e, posteriormente, removidos de águas residuais (67).

A segurança alimentar exige que cada vez mais sejam desenvolvidas novas técnicas que permitam a deteção de contaminantes, permitindo assim assegurar a qualidade dos alimentos. Embora atualmente existam técnicas que demonstrem bons resultados, existem algumas desvantagens que lhes estão associadas, nomeadamente a complexidade, a morosidade e a necessidade de material caro e muito específico (67). Assim, torna-se

importante desenvolver técnicas mais rápidas, mais simples, com maior sensibilidade e seletividade (62). As NPs de óxidos de ferro são utilizadas em técnicas de detecção para análises alimentares através de duas formas diferentes, como modificadores de elétrodos ou como pré-concentradores da amostra (62). Uma das características deste tipo de MNPs é a possibilidade de transferência de carga. Desta forma, estas nanopartículas são utilizadas em elétrodos de detecção para que se verifique um aumento na sensibilidade do método, através da acentuação da transferência de elétrons entre o analito e o elétrodo (62). Por outro lado, dada a possibilidade de imobilização de biomoléculas na sua superfície, as MNPs podem fácil e rapidamente detetar e capturar analitos em amostras complexas, atuando assim como agentes concentradores (62). Em técnicas como PCR (do inglês *Polimerase Chain Reaction*), ensaios imunológicos, cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa, HPLC (do inglês *High Performance Liquid Chromatography*), biossensores e métodos óticos, a integração das MNPs demonstrou ser bastante vantajosa, pois aumenta a rapidez e a sensibilidade dos processos (62).

A área da nanotecnologia tem tido a sua grande expansão nas últimas décadas. Desta forma, prevê-se que as MNPs ganhem cada vez mais importância ao nível das aplicações nas mais diversas áreas, tendo em conta todas as suas características únicas.

### **2.4. Imobilização da lacase em nanopartículas magnéticas**

As vantagens da imobilização enzimática aliadas às propriedades únicas apresentadas pelas MNPs, têm potenciado a investigação nesta área. No entanto, no que diz respeito à imobilização da lacase em NPs de magnetite, são ainda poucos os trabalhos desenvolvidos. Na Tabela 2.5 é apresentada uma síntese dos trabalhos publicados até à data sobre a imobilização da lacase em NPs de magnetite.

Huang et al. (2007) (73) estudaram a imobilização da lacase em NPs compósitas de magnetite e tetraminofalocianina de zinco, utilizando o glutaraldeído como *spacer*. A enzima imobilizada apresentou uma constante de Michaelis-Menten ( $K_M$ ) de 20,1  $\mu\text{M}$ , cerca de 60 % superior ao  $K_M$  apresentado pela enzima livre, 12,6  $\mu\text{M}$ . Além dos parâmetros cinéticos, também as estabilidades térmica, operacional e de armazenamento foram avaliadas. A enzima imobilizada demonstrou maior estabilidade térmica do que a enzima livre. Por outro lado, no que diz respeito ao estudo da estabilidade operacional, a enzima imobilizada reteve 80% da atividade inicial após 5 ciclos consecutivos, o que revela a elevada capacidade de reutilização do sistema. Por fim, em relação à estabilidade de

armazenamento após um mês a 4°C, a atividade da enzima livre diminuiu para 30%, enquanto que a atividade da lacase imobilizada se manteve nos 85%, verificando-se um claro melhoramento deste parâmetro.

Tabela 2.5 - Trabalhos desenvolvidos sobre imobilização de lacase em NPs de magnetite.

Revestimento	Funcionalização	Resultados	Referência
Sem revestimento	Glutaraldeído	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Maior valor de <math>K_M</math></li> <li>• Elevada estabilidade de armazenamento e operacional</li> </ul>	(73)
Quitosano	Glutaraldeído	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Maior valor de <math>K_M</math></li> <li>• Menor valor de <math>V_{max}</math></li> <li>• Elevada estabilidade de armazenamento e operacional</li> </ul>	(74)
Quitosano	Epicloridrina	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Maior valor de <math>K_M</math></li> <li>• Menor valor de <math>V_{max}</math></li> <li>• Elevada recuperação de atividade</li> <li>• Elevada estabilidade de armazenamento e operacional</li> <li>• Elevada remoção de Reactive Yellow 2 e Reactive Blue 4</li> </ul>	(75)
Quitosano	Carbodiimida Cloreto cianúrico	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Maior valor de <math>K_M</math> e <math>V_{max}</math></li> <li>• Elevada eficiência de imobilização</li> <li>• Elevada estabilidade de armazenamento</li> </ul>	(76)
PEG	APTES Concavalina	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Menor valor de <math>K_M</math></li> <li>• Maior valor de <math>V_{max}</math></li> <li>• Elevada recuperação de atividade</li> <li>• Efetiva remoção de antibióticos</li> </ul>	(77)
Ácido oléico	Ácido iminodiacético	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Maior valor de <math>K_M</math></li> <li>• Menor valor de <math>V_{max}</math></li> <li>• Elevada recuperação de atividade</li> <li>• Elevada estabilidade de armazenamento e operacional</li> </ul>	(55)
Sílica mesoporosa	Ácido iminodiacético	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Maior valor de <math>K_M</math></li> <li>• Elevada recuperação de atividade</li> <li>• Elevada estabilidade de armazenamento e operacional</li> </ul>	(78)
Sílica	Poliacrilamida	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Maior valor de <math>K_M</math></li> <li>• Aumento da estabilidade térmica</li> <li>• Elevada remoção de 2,4-DCP e PCP</li> </ul>	(56,79)

Também Fang et al. (2009) (74) estudaram a imobilização da lacase utilizando o glutaraldeído como *spacer*. As NPs utilizadas foram NPs de magnetite com um revestimento de quitosano. Neste sistema, a velocidade máxima da reação ( $V_{max}$ ) com a lacase livre foi pouco superior à  $V_{max}$  determinada para a enzima imobilizada, 5,29 mM.min<sup>-1</sup> e 4,25

mM.min<sup>-1</sup>, respetivamente. No entanto, o valor de  $K_M$  foi cerca de 4 vezes superior no caso da enzima imobilizada, 140,6  $\mu$ M em contraste com 31,1  $\mu$ M verificados pela lacase livre. A fim de avaliar a viabilidade do sistema, foram também estudadas as estabilidades operacional e de armazenamento da lacase imobilizada. Os resultados obtidos demonstraram que, após 10 ciclos consecutivos, a enzima imobilizada reteve acima de 85% da sua atividade inicial. Em relação ao armazenamento, após 4 semanas a 4°C, a atividade da lacase imobilizada manteve-se acima dos 85%, enquanto que a lacase livre apresentou apenas 30% de atividade.

No entanto, o glutaraldeído não é o único agente bifuncional utilizado na imobilização da lacase em NPs de magnetite. Bayramoglu et al. (2010) (75) utilizaram NPs de magnetite revestidas com quitosano utilizando a epícloridrina como *spacer*. Os resultados obtidos dos parâmetros cinéticos demonstraram ser concordantes com os resultados anteriormente referidos, verificando-se um aumento do  $K_M$  e uma diminuição do  $V_{max}$  na reação com a lacase imobilizada. Consequentemente, verificaram também a diminuição significativa da eficiência catalítica do sistema, isto é, a razão entre  $V_{max}$  e  $K_M$ . Além do estudo das estabilidades operacional e de armazenamento, foi testada a utilização do sistema de imobilização na degradação de corantes têxteis (Reactive Yellow 2 e Reactive Blue 4), durante 18 h. Os resultados obtidos demonstraram a remoção de 82% de Reactive Yellow 2 e 59% de Reactive Blue 4, contrastando com os 71% de remoção de Reactive Yellow 2 e 48% de Reactive Blue 4 apresentados pela enzima livre.

Com o mesmo tipo de NPs, Kalkan et al. (2012) (76) utilizaram a carbodiimida e o cloreto cianúrico como *spacers*, tendo obtido valores de  $V_{max}$  superiores para os sistemas da enzima imobilizada, contrariando assim a tendência dos resultados que outros autores apresentam.

Além do quitosano, outros compostos foram utilizados como revestimento das NPs de magnetite. Shi et al. (2014) (77) testaram a atividade da lacase imobilizada em NPs de magnetite revestidas com PEG na remoção de antibióticos. O estudo permitiu comprovar a eficiência do sistema catalítico na remoção dos compostos considerados, com uma oxidação de mais de 95% dos compostos em 30 minutos de reação. Estes resultados foram conseguidos através da imobilização orientada da enzima, isto é, foi promovida a interação entre a concanavalina A e a lacase, o que permitiu que a quantidade de enzima imobilizada na superfície das NPs fosse bastante superior ao método utilizado sem a adição desta proteína.

Desta forma, os valores de  $V_{\max}$  obtidos para o sistema imobilizado foram bastante superiores aos valores apresentados pela lacase na forma livre.

Nos últimos anos tem vindo a ser investigada a imobilização da lacase através da interação das histidinas da enzima com iões cobre que se encontram quelados na superfície de diferentes MNPs.

Wang et al. (2008) (55) imobilizaram a lacase através deste tipo de interação em NPs de magnetite revestidas com ácido oleico e utilizando ácido iminodiacético como agente quelante. Também Wang et al. (2010) (78) utilizaram o mesmo composto como quelante dos iões cobre em NPs de magnetite revestidas com sílica mesoporosa. Os resultados obtidos em ambos os estudos foram semelhantes, tendo-se verificado mais de 85% de retenção de atividade da lacase imobilizada após 10 ciclos catalíticos consecutivos e a retenção de mais de 90% da atividade após 1 mês de armazenamento a 4°C.

Mais recentemente, Wang et al. (2012, 2013) (56,79) estudaram a imobilização da lacase em NPs de magnetite revestidas com sílica, utilizando a poliacrilamida como agente quelante dos iões cobre. Os ensaios cinéticos da enzima imobilizada apresentaram um valor de  $K_M$  superior ao da lacase livre, 85,62 e 64,99  $\mu\text{mol/L}$ , respetivamente. No estudo da estabilidade térmica verificaram que, a 65°C, a enzima imobilizada apresentava 25% de atividade, enquanto que a lacase livre se encontrava praticamente inativa à mesma temperatura. Este grupo investigou ainda a utilização deste sistema de imobilização na degradação de dois compostos específicos, 2,4-diclorofenol (2,4-DCP) e pentaclorofenol (PCP). Por conseguinte, verificaram que, após 12 h de reação, se atingia uma eficiência de remoção do 2,4-DCP de 91,47%. No caso do PCP, após 0,5 h de reação, atingiram uma eficiência de remoção de 82,89%.

Tendo em conta os resultados verificados nos estudos desenvolvidos, a imobilização da lacase em NPs de magnetite afigura-se como uma mais-valia para a sua utilização industrial. Desta forma, torna-se imperativo a investigação contínua e cada vez mais aprofundada sobre este tipo de sistemas e as suas possíveis aplicações.

## Capítulo 3 - Materiais e Métodos

### 3.1.Preparação das nanopartículas magnéticas

As MNPs foram preparadas por hidrólise oxidativa em meio alcalino, de acordo com a metodologia descrita por Oliveira-Silva et al. (2015) (62). Para isso, foram utilizados os reagentes descritos na Tabela 3.1. Todas as soluções foram preparadas em água Milli-Q, obtida a partir do equipamento Synergy da Millipore com filtro de 0,22  $\mu\text{m}$ .

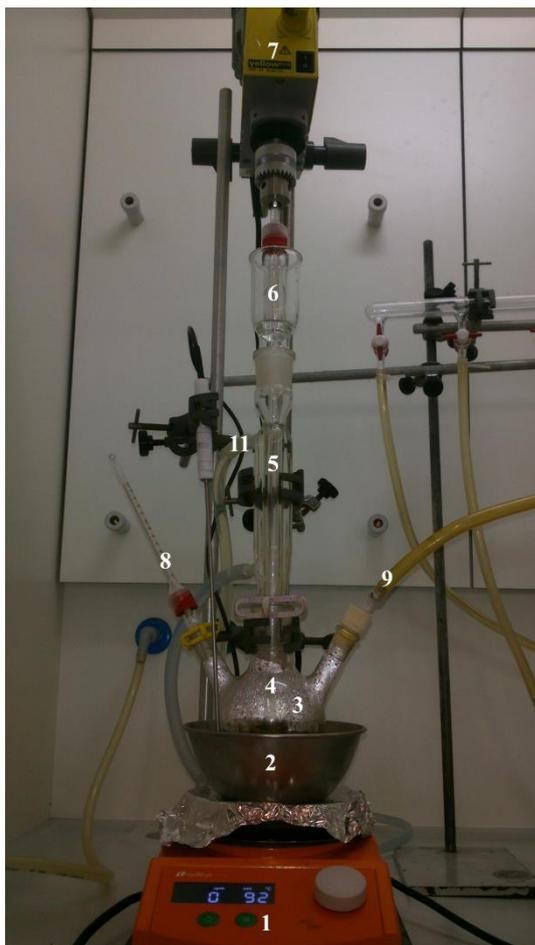
Tabela 3.1 - Reagentes utilizados na produção das MNPs (Adaptado de (80)).

Reagentes	Fornecedor
Hidróxido de Potássio (p.a.) (KOH)	LabChem
Nitrato de Potássio (97,2%) (KNO <sub>3</sub> )	LabChem
Sulfato de Ferro (II) Heptahidratado ( $\geq 99,0\%$ ) (FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O)	Sigma-Aldrich
Tetraetil ortosilicato ( $\geq 99,0\%$ ) (Si(OC <sub>2</sub> H <sub>5</sub> ) <sub>4</sub> - TEOS)	Sigma-Aldrich
Amônia (25%)	Analar Normapur
Ácido trimetoxisililpropileno diamino triacético (35%) (EDTA-TMS)	Gelest
Ácido acético glacial (99,7%)	Panreac
Etanol puro absoluto (p.a.) ( $\geq 99,9\%$ )	Carlo Erba
Acetona pura absoluta (p.a.)	Fluka
Sulfato de Cobre (II) Pentahidratado ( $\geq 99\%$ ) (CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O)	Merck

#### 3.1.1.Síntese de magnetite

Para a síntese de magnetite (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>) foi necessário proceder à desoxigenação de água Milli-Q. Desta forma, foi borbulhado azoto gasoso, com agitação mecânica vigorosa durante 2 horas num determinado volume de água Milli-Q. Seguidamente, foram adicionadas 1,899 g de KOH e 1,519 g de KNO<sub>3</sub>, a 25,0 mL de água Milli-Q desoxigenada, num balão de fundo redondo com três tubuladuras. A mistura resultante foi colocada num banho de parafina a 60°C, com injeção contínua de azoto e agitação mecânica sob refluxo a 500 rpm, de acordo com a Figura 3.1. Após esta fase, foram adicionados, lentamente, 25,0 mL de uma solução aquosa contendo 4,75 g de FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O. A reação decorreu durante 30 minutos, com uma agitação de 700 rpm. Depois disso, a mistura reacional foi transferida para um banho de parafina a 90°C, sem agitação mas mantendo a corrente de azoto ligada. Após 4 horas de reação, a suspensão resultante foi separada magneticamente em duas frações, o sobrenadante

e o precipitado, que corresponde à magnetite. O sobrenadante foi descartado e a magnetite foi lavada várias vezes com etanol p.a. e água Milli-Q desoxigenada. Por fim, antes da secagem por evaporação do solvente, foi efetuada uma lavagem final com acetona p.a.. O pó obtido após a secagem corresponde às NPs de magnetite, designadas por  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ .



### Legenda:

- 1 – Placa de aquecimento com controlo de temperatura
- 2 – Tina com parafina
- 3 – Balão redondo com três tubuladuras
- 4 – Vareta de vidro
- 5 – Condensador
- 6 – Borbulhador
- 7 – Agitador mecânico
- 8 – Termómetro
- 9 – Corrente de azoto
- 10 – Entrada de água
- 11 – Saída de água

Figura 3.1 - Montagem utilizada para a síntese de NPs de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ .

### 3.1.2. Silanização

O revestimento com sílica das NPs foi efetuado recorrendo à adição de 50 mg de NPs de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  a 40,0 mL de etanol p.a., num balão de erlenmeyer. A suspensão foi colocada no sonicador, durante 10 minutos, de forma a permitir a dispersão completa das NPs. Seguidamente, foram adicionados 3,00 mL de amónia 25% e 100,0  $\mu\text{L}$  de TEOS e a suspensão foi sonicada novamente, durante 2 horas. De forma a controlar os efeitos da libertação de calor que ocorre durante o funcionamento do sonicador, o balão foi envolvido numa determinada quantidade de gelo, em ambos os passos. Após esta fase, as NPs foram separadas magneticamente do sobrenadante, sendo posteriormente lavadas com água Milli-

Q e etanol p.a.. Por fim, foram sujeitas a secagem por evaporação do solvente, obtendo-se assim as NPs de magnetite revestidas com sílica, designadas por  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ .

### 3.1.3. Modificação superficial com EDTA-TMS

A modificação da superfície das NPs foi efetuada com o intuito de introduzir grupos quelantes no revestimento de sílica. Para isso, foram adicionadas 80 mg de  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$  a 4,214 mL de água Milli-Q, num balão de fundo redondo com duas tubuladuras. Seguidamente, foram adicionados 500,0  $\mu\text{L}$  de ácido acético glacial e 1,286 mL de EDTA-TMS, sendo a mistura sujeita a agitação mecânica sob refluxo, a 70°C, durante 24 horas, de acordo com a Figura 3.2. Após esta fase, as NPs foram separadas magneticamente para posterior lavagem com água Milli-Q e etanol p.a.. Por fim, as NPs foram sujeita a secagem por evaporação do solvente, obtendo-se assim as NPs de magnetite revestidas com sílica e modificadas superficialmente com EDTA-TMS, designadas por  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ \_EDTA-TMS.



#### Legenda:

- 1 – Placa de aquecimento com controlo de temperatura
- 2 – Tina com parafina
- 3 – Balão redondo com duas tubuladuras
- 4 – Vareta de vidro
- 5 – Condensador
- 6 – Agitador mecânico
- 7 – Entrada de água
- 8 – Saída de água

Figura 3.2 - Montagem para a modificação superficial com EDTA-TMS.

### **3.1.4. Quelação dos íons cobre**

A quelação dos íons cobre ( $\text{Cu}^{2+}$ ) nas NPs de  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-EDTA-TMS}$  foi efetuada de acordo com a metodologia adotada por Wang et al. (2013), salvo algumas alterações (56). Desta forma, foram pesadas 15 mg de NPs de  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-EDTA-TMS}$  e foram adicionados 5,00 mL de uma solução aquosa de  $\text{CuSO}_4.5\text{H}_2\text{O}$ . A otimização da concentração de  $\text{Cu}^{2+}$  foi efetuada atendendo ao teor de EDTA-TMS funcionalizado na superfície das NPs, indicado por Oliveira-Silva et al. (2015) (80) e a estequiometria da reação de quelação. Por conseguinte, foram avaliadas três estequiometrias diferentes (1:1, 1:5 e 1:10). Note-se que a nomenclatura adotada se refere à razão entre o número de moles de EDTA-TMS presentes na superfície das NPs e o número de moles de  $\text{Cu}^{2+}$  disponíveis para a quelação, respetivamente. A mistura reacional foi dispersa com o sonicador e, posteriormente incubada a 30°C durante 10 h, a 150 rpm. No final da reação, as NPs foram separadas magneticamente e lavadas com água Milli-Q. Por fim, procedeu-se à secagem das NPs por evaporação do solvente, obtendo-se assim as NPs de magnetite revestidas com sílica e modificadas superficialmente com EDTA-TMS quelado com  $\text{Cu}^{2+}$ , designadas por  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-EDTA-TMS-Cu}^{2+}$ .

## **3.2. Caracterização das nanopartículas magnéticas**

### **3.2.1. Espectroscopia de Infravermelho**

Os espectros de infravermelho foram obtidos através de espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR). Para isso foi utilizado o espectrómetro Bruker Optics Tensor 27 com uma célula horizontal de refletância total atenuada (ATR), efetuando um total de 256 varrimentos no intervalo de 350 a 4000  $\text{cm}^{-1}$ , com uma resolução de 4  $\text{cm}^{-1}$ .

### **3.2.2. Microscopia Eletrónica de Transmissão**

A morfologia e o tamanho das NPs foram estudados através da microscopia eletrónica de transmissão (TEM) utilizando o microscópio TEM Hitachi H-9000, operando a 300 kV e no microscópio TEM de alta resolução JEOL 2200FS, operando a 200 kV. As amostras para a análise foram preparadas por deposição de suspensão das NPs em etanol p.a. numa grelha de cobre revestidas com um filme amorfo de carbono. Posteriormente, as amostras foram sujeitas a evaporação do solvente.

### **3.2.3. Análise Elementar**

A análise elementar de carbono, azoto e hidrogénio foi obtida no aparelho Eager 300. Além da secagem por evaporação do solvente, as amostras não necessitaram de qualquer preparação prévia para a medição.

### **3.2.4. Adsorção de Azoto Brunauer-Emmett-Teller**

A área superficial específica das NPs nas várias fases de síntese foi obtida através da medição da adsorção de azoto Brunauer-Emmett-Teller (BET) realizada no aparelho Gemini V2.0 Micromeritics.

### **3.2.5. Potencial Zeta**

A carga superficial das NPs foi determinada através da medição do potencial zeta, utilizando o equipamento Zetasizer Nanoseries da Malvern Instruments. As amostras foram previamente diluídas em água Milli-Q (pH 6,1) e foram realizadas três leituras por cada amostra.

## **3.3. Imobilização da lacase**

A imobilização da lacase nas MNPs foi efetuada de acordo com a metodologia descrita por Wang et al. (2008), com as algumas alterações (55). A solução de lacase comercial Novozym® 51003 foi diluída em tampões com diferentes valores de pH (tampão acetato de sódio 0,10 M/ácido acético 0,10 M pH 3,0; tampão acetato de sódio 0,20 M/ácido acético 0,20 M pH 3,5; pH 4,0 e pH 4,2). A diluição efetuada corresponde a 0,17 µL da solução de lacase fornecida por cada mL de solução de lacase diluída. Posteriormente, foi incubado 1,00 mL de solução de lacase diluída com 4,00 mg de NPs de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@SiO<sub>2</sub>\_EDTA-TMS\_Cu<sup>2+</sup>. A mistura reacional foi sujeita a agitação orbital (30 rpm) durante 90 minutos, à temperatura ambiente. Por fim, a enzima imobilizada foi separada magneticamente do sobrenadante e lavada três vezes com o respetivo tampão, para aferir a sua atividade. Na Tabela 3.2 são apresentados os reagentes utilizados, tanto no processo de imobilização como nos restantes ensaios enzimáticos.

Tabela 3.2 - Reagentes utilizados durante a imobilização da lacase e nos ensaios enzimáticos.

Reagentes	Fornecedor
Acetato de sódio trihidratado ( $\leq 99,0\%$ ) ( $C_2H_3NaO_2 \cdot 3H_2O$ )	Sigma-Aldrich
Ácido acético glacial ( $\leq 99,7\%$ )	Panreac
Ácido 2,2'-azino bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico) ( $\leq 98,0\%$ ) (ABTS)	Sigma-Aldrich
Ácido cítrico monohidratado ( $\leq 99,5\%$ ) $C_6H_8O_7 \cdot H_2O$	Panreac
Fosfato de sódio (II) heptahidratado ( $\leq 98,0\%$ ) ( $Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$ )	Sigma-Aldrich

### 3.4. Determinação da atividade enzimática

#### 3.4.1. Lacase Livre

De forma a preparar o substrato, foram adicionados 0,500 mL de ABTS 1,6 mM a 1,40 mL de tampão citrato 0,050 M/fosfato 0,10 M (pH 4,5), obtendo-se assim uma concentração final de ABTS de 0,40 mM. Ambos os reagentes foram previamente colocados no banho de modo a que a reação enzimática ocorra a 40°C. Posteriormente, foram adicionados 0,100 mL de solução de lacase diluída ao substrato previamente preparado. A medição da absorvância foi efetuada a 420 nm ( $\epsilon=3,6 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) no espectrofotómetro UV-Visível (UV mini-1240, Shimadzu Co., Japão). A atividade catalítica foi determinada através do declive da fase linear inicial da curva cinética, tendo sido efetuadas 3 réplicas. Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para oxidar 1  $\mu\text{mol}$  de ABTS por minuto. A atividade da enzima livre ( $A_{\text{Livre}}$ ) foi expressa em  $\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$ , de acordo com a Equação 3.1:

$$A_{\text{Livre}} = \frac{\Delta \text{Abs}/\text{min} \times V_{\text{reacional}} \times 10^3}{\epsilon_{\text{ABTS}} \times V_{\text{enzima}}} \quad (\text{eq. 3.1})$$

, onde  $\Delta \text{Abs}/\text{min}$  é o valor do declive da fase linear inicial da curva cinética,  $V_{\text{reacional}}$  é o volume total da mistura reacional (mL),  $\epsilon_{\text{ABTS}}$  é o coeficiente de absorvidade molar do ABTS ( $\text{M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) e  $V_{\text{enzima}}$  é o volume de enzima adicionado (mL). A metodologia adotada neste trabalho para a determinação da atividade da enzima livre foi descrita por Frazão et al. (2014) (81).

### 3.4.2. Lacase Imobilizada

A atividade da lacase imobilizada foi determinada de acordo com a metodologia descrita por Frazão et al. (2014) (81), salvo algumas alterações. De forma a preparar o substrato, foram adicionados 1,70 mL de ABTS 1,6 mM a 4,80 mL de tampão acetato de sódio 0,20 M/ácido acético 0,20 M (pH 3,5), obtendo-se assim uma concentração final de ABTS de 0,40 mM. Posteriormente, foi adicionada lacase imobilizada nas MNPs. A reação decorreu durante 8 minutos, a uma temperatura de 40°C e com agitação orbital constante (80 rpm). Os valores de absorvância a 420 nm da mistura reacional foram lidos em amostras retiradas de 2 em 2 minutos. Para evitar a interferência das MNPs nos dados obtidos, foi efetuada uma decantação prévia com a aplicação de um campo magnético. Após a leitura da absorvância, o volume de amostra foi devolvido ao meio reacional. Para cada determinação de atividade foram realizadas 3 réplicas. A atividade da lacase imobilizada ( $A_{\text{Imobilizada}}$ ) foi expressa em  $\text{U}\cdot\text{g}^{-1}$ , de acordo com a Equação 3.2:

$$A_{\text{Imobilizada}} = \frac{\Delta\text{Abs}/\text{min} \times V_{\text{reacional}} \times 10^6}{\epsilon_{\text{ABTS}} \times m_{\text{partículas}}} \quad (\text{eq. 3.2})$$

, onde  $\Delta\text{Abs}/\text{min}$  é o valor do declive da fase linear inicial da curva cinética,  $V_{\text{reacional}}$  é o volume total da mistura reacional (L),  $\epsilon_{\text{ABTS}}$  é o coeficiente de absorvância molar do ABTS ( $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ ) e  $m_{\text{partículas}}$  é a massa de nanopartículas utilizada para imobilizar a lacase (g).

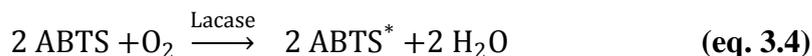
A fim de avaliar a imobilização, calculou-se a recuperação da atividade (R) que foi expressa em % de acordo com a Equação 3.3:

$$R = \frac{A_{\text{Imobilizada}}}{A_{\text{Livre}} \times f_{\text{conversão}}} \times 100 \quad (\text{eq. 3.3})$$

, onde  $A_{\text{Livre}}$  é a atividade da lacase livre imediatamente antes da imobilização ( $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$ ),  $A_{\text{Imobilizada}}$  é a atividade da lacase após a imobilização ( $\text{U}\cdot\text{g}^{-1}$ ) e  $f_{\text{conversão}}$  é 250,0  $\text{mL}\cdot\text{g}^{-1}$ , que corresponde à razão entre o volume de enzima utilizado na imobilização (1,00 mL) e a massa de suporte utilizado (4,00 mg).

### 3.5. Propriedades cinéticas

Os parâmetros cinéticos de Michaelis-Menten ( $K_M$  e  $V_{\text{max}}$ ) da lacase livre e da lacase imobilizada foram determinados através da medição da velocidade de reação de oxidação do ABTS (Equação 3.4).



Desta forma, para a enzima imobilizada foram utilizadas concentrações de ABTS entre 0,010 e 1,0 mM em tampão acetato de sódio 0,20 M/ácido acético 0,20 M (pH 3,5). A metodologia adotada encontra-se descrita na Secção 3.4.. No caso da lacase livre, foi efetuada uma nova diluição da solução de lacase comercial de forma a garantir que em ambos os testes, livre e imobilizada, existiam as mesmas unidades catalíticas. O estudo da cinética foi realizado com concentrações de ABTS entre 0,040 e 1,0 mM em tampão citrato 0,050 M/fosfato 0,10 M (pH 4,5), de acordo com a metodologia descrita na Secção 3.4.. Para cada concentração de ABTS foram realizadas 3 réplicas da reação, tanto com a lacase livre como com a imobilizada. A atividade enzimática (A) foi expressa em  $\mu\text{M}\cdot\text{min}^{-1}$  de acordo com a Equação 3.5:

$$A = \frac{\Delta\text{Abs}/\text{min} \times 10^6}{\epsilon_{\text{ABTS}}} \quad (\text{eq. 3.5})$$

, onde  $\Delta\text{Abs}/\text{min}$  é o valor do declive da fase linear inicial da curva cinética e  $\epsilon_{\text{ABTS}}$  é o coeficiente de absorvidade molar do ABTS ( $\text{M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ).

A equação da cinética de Michaelis-Menten (Equação 3.6) foi ajustada aos valores de atividade obtidos, utilizando o *software* GraphPad Prism 6 para a regressão não linear e posterior determinação do valor de  $K_M$  e  $V_{\text{max}}$ .

$$V = \frac{V_{\text{max}}S}{K_M + S} \quad (\text{eq. 3.6})$$

, onde  $V$  é a velocidade da reação ( $\mu\text{M}\cdot\text{min}^{-1}$ ),  $V_{\text{max}}$  é a velocidade máxima da reação ( $\mu\text{M}\cdot\text{min}^{-1}$ ),  $K_M$  é a constante de Michaelis-Menten (mM) e  $S$  é a concentração de substrato (mM).

### **3.6.Avaliação da estabilidade**

#### **3.6.1. Térmica**

Vários eppendorfs com a lacase imobilizada e 1,00 mL de tampão acetato de sódio 0,20 M/ácido acético 0,20 M (pH 3,5) foram incubados num banho a 40°C. Em relação à lacase livre, foram também incubados vários eppendorfs com 1,00 mL de solução de lacase diluída em tampão carbonato de sódio 0,10 M/ bicarbonato de sódio 0,10 M (pH 9,0) e em

tampão acetato de sódio 0,20 M/ácido acético 0,20 M (pH 3,5) num banho a 40 °C. A atividade foi determinada a vários tempos de incubação, sendo efetuadas 3 réplicas determinação. A estabilidade térmica foi avaliada através da atividade relativa ( $A_r$ ) expressa em %, de acordo com a Equação 3.7:

$$A_r = \frac{A_t}{A_0} \times 100 \quad (\text{eq. 3.7})$$

, onde  $A_t$  é a atividade a um determinado tempo de incubação ( $\text{U.g}^{-1}$  no caso da lacase imobilizada e  $\text{U.mL}^{-1}$  no caso da lacase livre),  $A_0$  é a atividade inicial, isto é, imediatamente antes de colocar no banho ( $\text{U.g}^{-1}$  no caso da lacase imobilizada e  $\text{U.mL}^{-1}$  no caso da lacase livre).

De forma a determinar o tempo de meia-vida da enzima ( $t_{1/2}$ ) e a constante cinética de inativação térmica ( $k$ ), foi efetuada uma regressão de decaimento exponencial da atividade relativa (%) em função do tempo de incubação (h), recorrendo ao *software* GraphPad Prism 6.

### 3.6.2. Operacional

De forma a avaliar a estabilidade operacional, foram realizados 10 ciclos consecutivos da reação de oxidação do ABTS, utilizando a mesma amostra de lacase imobilizada. No final de cada ciclo, a reação foi parada e o meio reacional foi separado magneticamente da enzima imobilizada. Para iniciar um novo ciclo, a lacase imobilizada foi lavada três vezes com tampão acetato de sódio 0,20 M/ácido acético 0,20 M (pH 3,5) e foi adicionado novo substrato. A estabilidade operacional foi avaliada pela atividade relativa ( $A_r$ ) expressa em %, de acordo com a Equação 3.8:

$$A_r = \frac{A_n}{A_1} \times 100 \quad (\text{eq. 3.8})$$

, onde  $A_n$  é a atividade da enzima imobilizada no ciclo  $n$  ( $\text{U.g}^{-1}$ ) e  $A_1$  é a atividade da enzima imobilizada no primeiro ciclo ( $\text{U.g}^{-1}$ ). A determinação efetuada envolveu a realização de 3 réplicas.

### 3.6.3. Armazenamento

Para avaliar a estabilidade no armazenamento da enzima livre e imobilizada foram testados três métodos diferentes. No primeiro método, a lacase imobilizada foi armazenada em 1,00 mL de tampão acetato de sódio 0,20 M/ácido acético 0,20 M (pH 3,5) a 4°C, durante

7 dias. A lacase livre foi armazenada nas mesmas condições que a lacase imobilizada. No segundo método, as lacases livre e imobilizada foram liofilizadas e armazenadas no exsiccador durante 14 dias. Por fim, no último método, a enzima foi congelada em ambas as formas e armazenada no congelador durante 7 dias. A estabilidade térmica foi avaliada através da atividade relativa ( $A_r$ ) expressa em %, de acordo com a Equação 3.9:

$$A_r = \frac{A_t}{A_0} \times 100 \quad (\text{eq. 3.9})$$

, onde  $A_t$  é a atividade a um determinado tempo de armazenamento ( $\text{U.g}^{-1}$  no caso da lacase imobilizada e  $\text{U.mL}^{-1}$  no caso da lacase livre),  $A_0$  é a atividade no dia em que se iniciou o armazenamento ( $\text{U.g}^{-1}$  no caso da lacase imobilizada e  $\text{U.mL}^{-1}$  no caso da lacase livre). Para cada um dos métodos foram efetuadas 3 réplicas.

### 3.7. Remoção dos corantes

A fim de realizar testes de remoção dos corantes, foi preparada uma solução *stock* de Índigo de Carmim (Acros Organics) e Vermelho do Congo (Merck) de 0,005 M em tampão acetato de sódio 0,20 M/ácido acético 0,20 M (pH 3,5), obtendo-se posteriormente uma concentração de  $5,0 \times 10^{-4}$  M de corante na mistura reacional. Com o objetivo de maximizar a remoção efetuada, foi investigado o efeito da concentração inicial de mediador na mistura reacional (0,100 e 0,500 mM). Para isso, foram preparadas soluções de metil seringato em tampão acetato de sódio 0,20 M/ácido acético 0,20 M. A diluição da lacase comercial efetuada para o teste com a lacase livre foi ajustada de forma a garantir a equidade entre as unidades catalíticas envolvidas na reação da lacase livre e imobilizada. Para o Índigo de Carmim foram realizados ensaios controlo (apenas com as MNPs) com as diferentes concentrações iniciais de mediador, enquanto que para o Vermelho do Congo foram realizados ensaios controlo (apenas com as MNPs) apenas com 0,100 mM de mediador. De forma a avaliar a remoção dos corantes, foi lida a absorvância da mistura reacional a 610 nm (para o Índigo de Carmim) e 500 nm (para o Vermelho do Congo) ao longo de 4 horas. A reação foi efetuada sob agitação (80 rpm) e à temperatura de 40°C. A remoção dos corantes ( $R_c$ ) expressa em % foi calculada através da Equação 3.10:

$$R_c = \frac{Abs_i - Abs_t}{Abs_i} \times 100 \quad (\text{eq. 3.10})$$

, onde  $Abs_i$  é a absorvância inicial da mistura reacional e  $Abs_t$  é a absorvância da mistura reacional ao tempo  $t$ .

## Capítulo 4 - Resultados e Discussão

### 4.1. Caracterização das nanopartículas magnéticas

A produção das MNPs inclui diversas fases, conforme se pode ver na Figura 4.1, sendo estas monitorizadas através da análise de espectros de FTIR e análise elementar.

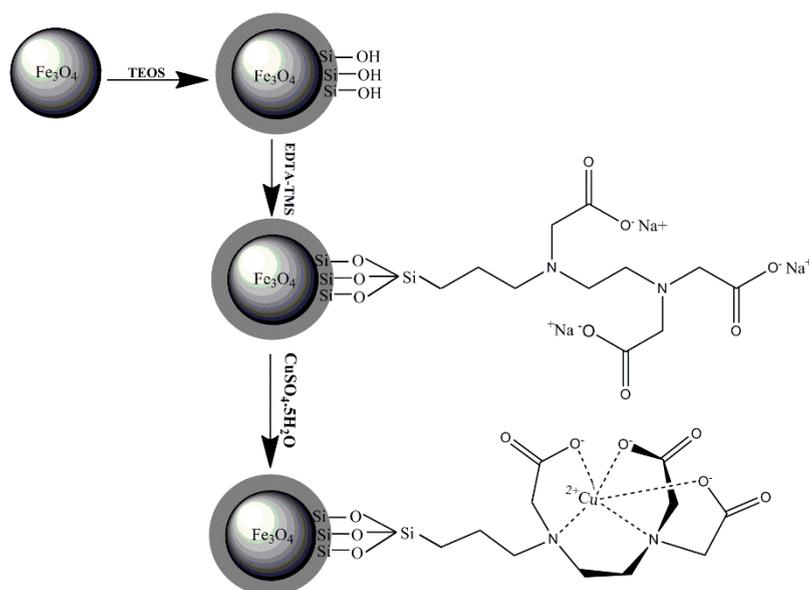


Figura 4.1 - Esquema do processo de produção das MNPs.

Na Figura 4.2 apresentam-se os espectros obtidos para as NPs de magnetite (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>), as MNPs revestidas com sílica (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@SiO<sub>2</sub>) e as MNPs após a funcionalização com EDTA-TMS (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@SiO<sub>2</sub>\_EDTA-TMS).

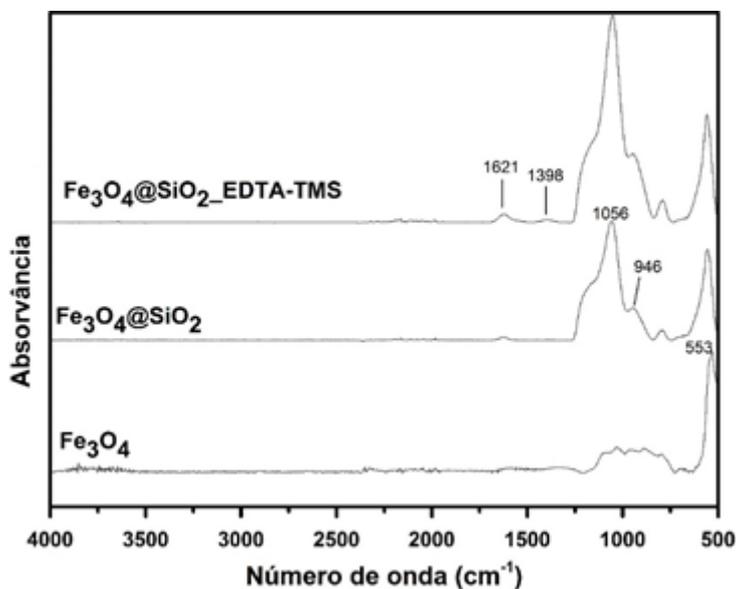


Figura 4.2 - Espectro de FTIR das diferentes fases de produção das MNPs.

O espectro das NPs de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  apresenta uma banda aos  $553\text{ cm}^{-1}$ , característica da vibração de alongação da ligação Fe-O na magnetite (80). Este facto era expectável, tendo em conta que se trata de um composto de óxido de ferro. O revestimento das MNPs com a sílica pode ser comprovado pela análise do espectro das MNPs de  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ . Neste espectro podem visualizar-se duas bandas adicionais, a  $946$  e a  $1056\text{ cm}^{-1}$ , características da vibração de alongação assimétrica das ligações Si-O-Fe e Si-O-Si, respetivamente (80). Após a funcionalização com EDTA-TMS, o espectro das MNPs de  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ \_EDTA-TMS apresenta duas novas bandas, a  $1398$  e  $1621\text{ cm}^{-1}$ , características da vibração de alongação das ligações C-O-H e C=O, respetivamente (80). Estas ligações são originadas pela presença dos grupos carboxílicos na estrutura do EDTA-TMS, o que demonstra que a funcionalização das MNPs com o agente quelante realmente ocorreu.

Além de FTIR, realizaram-se também outras técnicas a fim de caracterizar o material sintetizado. Na Tabela 4.1 apresentam-se os resultados obtidos na análise elementar das MNPs nos diferentes estágios de produção.

Tabela 4.1 - Resultados obtidos pela análise elementar.

Amostra	% C	% H	% N
$\text{Fe}_3\text{O}_4$	$0,175\pm 0,005$	$0,238\pm 0,024$	—
$\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$	$0,151\pm 0,038$	$0,509\pm 0,021$	$0,038\pm 0,007$
$\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ _EDTA-TMS	$0,909\pm 0,095$	$0,780\pm 0,077$	$0,145\pm 0,030$

A deteção de carbono nas NPs de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  poder-se-á dever a alguma contaminação da amostra com parafina, utilizada durante o processo de síntese das mesmas, enquanto que o teor de hidrogénio poder-se-á atribuir aos grupos OH existentes na superfície das NPs. Dada a difícil remoção da parafina, o teor de carbono manteve-se quase inalterado nas MNPs de  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ . A adição de TEOS para o revestimento das MNPs traduziu-se num aumento do teor de hidrogénio nas MNPs de  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$  relativamente às NPs de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ , originado pela presença dos grupos silanol (SiOH) na superfície das mesmas. Desta forma, tal como tinha sido adiantado com a análise de FTIR, o revestimento das MNPs com sílica foi bem-sucedido. A presença de azoto em quantidade residual nas MNPs de  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$  pode dever-se à utilização de amónia como catalisador da reação de silanização, não sendo esta completamente removida na lavagem das MNPs. Os resultados obtidos corroboram a efetiva funcionalização das MNPs com EDTA-TMS atendendo ao aumento significativo do teor de

carbono e de azoto nas MNPs de  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-EDTA-TMS}$ , comparativamente às MNPs obtidas nas fases anteriores de produção.

A morfologia das MNPs produzidas foi aferida através de TEM. Na Figura 4.3 apresentam-se as imagens obtidas das MNPs de  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-EDTA-TMS}$ .

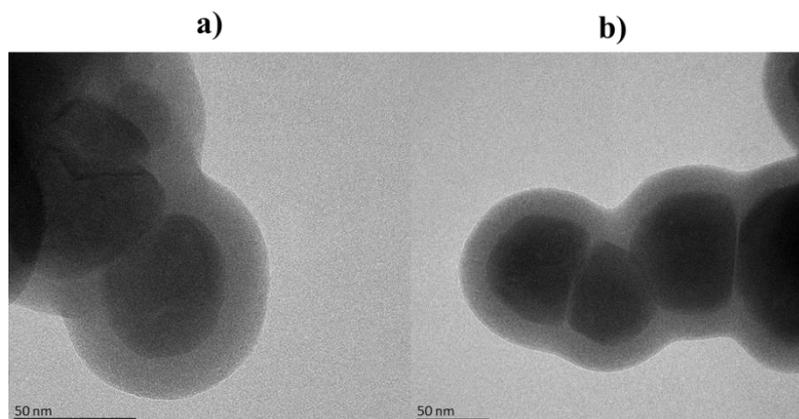


Figura 4.3 - Imagens obtidas por TEM das MNPs de  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-EDTA-TMS}$  isoladas (a) e agregadas (b).

Através da visualização das imagens obtidas, é possível aferir um diâmetro médio das MNPs de cerca de 50 nm. As MNPs apresentam uma forma esférica, podendo identificar-se o núcleo de magnetite (zona mais escura) e o revestimento com sílica (zona mais clara). Além disso, é possível verificar que o revestimento das MNPs com sílica ocorreu, tanto em partículas isoladas (Figura 4.3 a) como em agregados de partículas (Figura 4.3 b)).

A área superficial é um parâmetro bastante importante no que diz respeito às vantagens do uso das MNPs. Na Tabela 4.2 são apresentadas as áreas superficiais obtidas por adsorção de azoto BET, assim como a porosidade e o diâmetro dos poros nas diferentes fases da produção das MNPs.

Tabela 4.2 – Resultados da área superficial BET ( $A_{\text{BET}}$ ), da porosidade ( $V_p$ ) e do diâmetro do poro ( $D_p$ ) das MNPs

Amostra	$A_{\text{BET}}$ ( $\text{m}^2\cdot\text{g}^{-1}$ )	$V_p$ ( $\text{cm}^3\cdot\text{g}^{-1}$ )	$D_p$ (Å)
$\text{Fe}_3\text{O}_4$	31,8	—	—
$\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$	106,5	0,133	77,7
$\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-EDTA-TMS}$	68,9	0,057	59,1
$\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-EDTA-TMS-Cu}^{2+}$	30,2	0,026	54,8

Através da análise da Tabela 4.2 pode verificar-se um aumento significativo da área superficial BET após a silanização das NPs de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ . Dado que, com o processo de

silanização o diâmetro da NP aumenta devido à formação da capa de sílica, este aumento de área superficial pode ser atribuído à porosidade da capa de sílica, tendo em conta a porosidade e o diâmetro de poro obtidos (80). Com a funcionalização das NPs de  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$  com EDTA-TMS, verifica-se um decréscimo na área superficial, resultante da diminuição do diâmetro do poro e da porosidade. A adição dos iões de  $\text{Cu}^{2+}$  permitiu a formação de complexos que poderão ocupar parte do espaço livre nos poros das NPs de  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ \_EDTA-TMS, levando assim à diminuição do diâmetro do poro e da porosidade. Esta diminuição provocou, conseqüentemente, a redução da área superficial de BET. Os resultados obtidos demonstram que o aumento do diâmetro das NPs pode resultar na diminuição da área superficial de BET das mesmas. Porém, a diminuição verificada não compromete a utilização das MNPs como um bom suporte de imobilização, uma vez que ainda se verificou uma elevada área superficial, o que não coloca em causa uma das grandes vantagens do uso deste tipo de material, ou seja, a sua elevada área superficial.

O potencial zeta é definido como o potencial elétrico entre o solvente onde a MNP se encontra dispersa e a camada que se encontra em contacto com a superfície da MNP (82). Este parâmetro permite aferir a carga superficial das MNPs e a potencial estabilidade do sistema coloidal (82,83). No caso de MNPs com potenciais menores que -25 mV e maiores que +25 mV, apresentam elevada estabilidade coloidal e, conseqüentemente, uma reduzida tendência para que ocorra agregação das partículas (82,83). Através da análise da Tabela 4.2 pode verificar-se a alteração do potencial da amostra após a funcionalização com EDTA-TMS e a quelação com os iões de  $\text{Cu}^{2+}$ .

Tabela 4.3 - Resultados do potencial zeta.

Amostra	Potencial (mV)
$\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ _EDTA-TMS	-52,9±0,6
$\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ _EDTA-TMS_ $\text{Cu}^{2+}$	-44,5±0,7

Com base nos valores de potencial zeta obtidos pode concluir-se que as MNPs funcionalizadas com EDTA-TMS apresentam boa estabilidade coloidal quando dispersas em água Milli-Q (pH 6,1). Os valores negativos de potencial zeta estão consistentes com a presença de grupos carboxílicos na superfície das MNPs, provenientes do EDTA-TMS. Após a quelação de  $\text{Cu}^{2+}$  na superfície das MNPs, observou-se um aumento significativo na sua carga superficial, embora a mesma se mantenha sempre negativa dada a carga resultante do

complexo formado pelo EDTA-TMS e os íons de  $\text{Cu}^{2+}$ . Tal facto era expectável, uma vez que a adição de íons positivos torna a carga superficial menos negativa. Além disso, a presença deste tipo de elementos torna as MNPs mais instáveis, promovendo interações entre o material e o meio onde este se encontra disperso. A inclusão de íons na superfície das MNPs facilita a ligação com outras moléculas, como enzimas, fomentando assim a sua utilização como suporte de imobilização.

## 4.2.Otimização das condições de imobilização

A otimização das condições de imobilização da lacase nas MNPs foi efetuada a dois níveis, alterando a concentração de  $\text{Cu}^{2+}$  usada na produção das partículas e alterando o pH utilizado no processo de imobilização.

### 4.2.1. Concentração de íons cobre

A concentração de  $\text{Cu}^{2+}$  utilizada na quelação com o EDTA-TMS presente na superfície das MNPs é um parâmetro fulcral no processo de imobilização, dado que a lacase é uma enzima que contém átomos de cobre no seu centro ativo. Assim, revela-se de extrema importância aferir a concentração de  $\text{Cu}^{2+}$  que garante que todo o EDTA-TMS se encontra quelado, evitando assim a interação com o centro ativo da enzima e a consequente inativação da mesma. Desta forma, segundo a literatura, as MNPs produzidas apresentam  $1,12 \times 10^{-7}$  mol EDTA-TMS/mg partícula (80). Atendendo a que a reação de quelação entre o EDTA-TMS e o cobre ocorre com a estequiometria de 1:1, deduz-se que são necessárias  $1,12 \times 10^{-7}$  mol  $\text{Cu}^{2+}$ /mg partícula. Na Figura 4.4 apresentam-se os resultados obtidos para a atividade recuperada após a imobilização com a estequiometria de 1:1, 1:5 e 1:10.

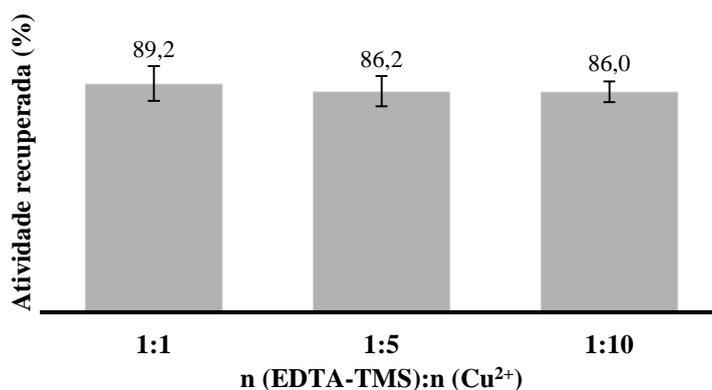


Figura 4.4 - Efeito do número de moles de cobre na imobilização da lacase nas MNPs a pH 3,0.

Através da análise dos resultados obtidos é possível verificar que as atividades recuperadas divergiram muito pouco. No entanto, a estequiometria de 1:1 apresentou o valor mais elevado ( $89,2\pm 6,8\%$ ), permitindo concluir que esta estequiometria garante que todo o EDTA-TMS se encontra quelado. Embora não seja significativo, o aumento do número de moles de  $\text{Cu}^{2+}$  na estequiometria de 1:5 e 1:10 provocou um decréscimo na atividade recuperada da lacase ( $86,2\pm 5,9\%$  e  $86,0\pm 4,1\%$  respetivamente). Este decréscimo não era expectável, uma vez que as estequiometrias estudadas garantem uma concentração de  $\text{Cu}^{2+}$  superior à necessária, o que impede que a lacase seja quelada pelo EDTA-TMS e fique inativa. Por outro lado, na literatura é descrito que o efeito potenciador de diversos iões na atividade da lacase, como o caso dos iões de  $\text{Cu}^{2+}$ , pode ser invertido caso as concentrações dos mesmos sejam demasiado elevadas (84,85). Embora não seja significativa a diminuição, este carácter inibidor dos iões de  $\text{Cu}^{2+}$  pode ter revelado alguma influência sobre a atividade da lacase, resultando assim na diminuição da atividade recuperada. Assim, a otimização da concentração de  $\text{Cu}^{2+}$  no processo de produção das MNPs permitiu concluir que a estequiometria de 1:1 é a mais indicada, pois apresenta uma atividade recuperada superior. Além disso, permite diminuir o custo de produção das MNPs com a utilização da concentração mínima de  $\text{Cu}^{2+}$ , parâmetro que se revela determinante quando se avalia a viabilidade da aplicação industrial deste sistema de imobilização.

### 4.2.2. pH

O método de imobilização estudado baseia-se numa interação reversível por coordenação, entre as MNPs preparadas e a lacase. Neste método, os iões de  $\text{Cu}^{2+}$  quelados na superfície das MNPs formam uma ligação com os grupos funcionais presentes na estrutura da enzima, podendo destacar-se os grupos imidazol característicos dos resíduos de histidina (86–88). Como se verificou na Secção 4.1, as MNPs preparadas apresentam uma carga superficial negativa e para que a imobilização da lacase ocorra com sucesso, é necessário que a enzima apresente carga global contrária, ou seja, uma carga global positiva (88). Desta forma, e atendendo ao que é descrito na literatura, a imobilização de lacase em MNPs por interação com iões de  $\text{Cu}^{2+}$  apenas ocorre para valores de pH até ao valor do ponto isoelétrico (pI) da mesma (55,56,78). A lacase utilizada neste estudo apresenta um pI de 4,2 e, além disso, valores de pH muito baixos podem provocar a desnaturação da enzima. Assim, foi determinado o intervalo de pH entre 3,0 e 4,2 para a otimização deste parâmetro. Na Figura

4.5 apresentam-se os resultados obtidos de atividade recuperada aos diferentes valores de pH de imobilização (3,0; 3,5; 4,0 e 4,2).

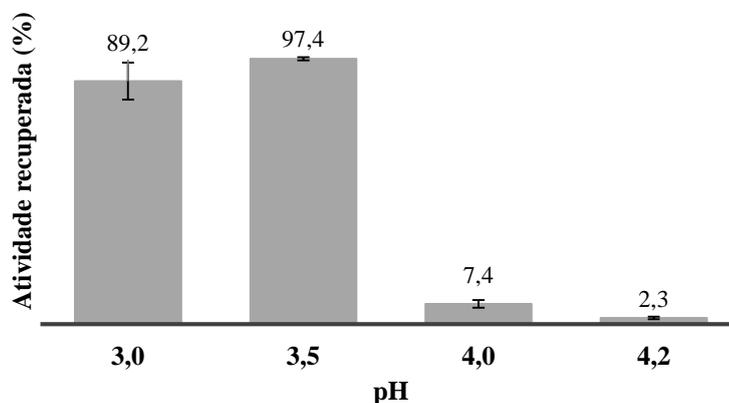


Figura 4.5 - Efeito do pH na imobilização da lacase nas MNPs.

Através da análise dos resultados é possível verificar que para valores de pH de 3,0 e 3,5, a atividade recuperada obtida é bastante elevada ( $89,2\pm 6,8\%$  e  $97,4\pm 0,6\%$ , respectivamente), pois a lacase apresenta uma carga global positiva, o que promove a interação com as MNPs, permitindo assim a sua imobilização (56,88). Com o aumento do pH para 4,0, a enzima reduz a sua carga positiva e as repulsões entre as moléculas sobrepõem-se às interações entre as mesmas e as MNPs (56,88), não se verificando assim imobilização significativa ( $7,4\pm 1,4\%$ ).

No pH 4,2 a atividade recuperada foi bastante reduzida ( $2,3\pm 0,5\%$ ), uma vez que a enzima apresenta carga global nula, o que reduz drasticamente as interações eletrostáticas com as MNPs, dificultando assim o sucesso da imobilização (56,88). O perfil adotado pela lacase na otimização do pH foi também verificado por outros autores, utilizando as NPs de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  como suporte de imobilização (55,74,75,78). Wang et al. (2010) obtiveram 92,5% de atividade recuperada máxima após a otimização da imobilização da lacase, assim como Fang et al. (2009) atingiram mais de 90% de atividade recuperada (74,78). Por sua vez, Bayramoglu et al. (2010) obtiveram 82,6% de atividade recuperada (75). Embora sejam valores ligeiramente inferiores aos obtidos neste estudo, revelam a enorme potencialidade deste tipo de imobilização. No entanto, Wang et al. (2008) atingiram apenas 68% de atividade recuperada após a otimização do processo de imobilização, uma vez que a enzima ao ser imobilizada pode criar um espaço intermolecular que dificulta a difusão do substrato, refletindo-se assim numa diminuição da atividade (55). Além das NPs de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ , outro tipo de materiais podem ser utilizados como suporte de imobilização, podendo destacar-se as

matrizes poliméricas. Frazão et al. (2014) imobilizaram a lacase em celulose bacteriana, tendo obtido uma atividade recuperada de 49,3% em condições ótimas (81). Também Zhang et al. (2009) utilizaram uma matriz polimérica, o quitosano, como suporte de imobilização da lacase, verificando 52,2% de atividade recuperada após a otimização do processo (89). Um outro exemplo é o estudo de Fatarella et al. (2014) que utilizou filmes de *nylon* para imobilizar a enzima, atingindo 59,4% de atividade recuperada (90). Poonkuzhali et al. (2012) estudaram vários biopolímeros para a imobilização da lacase e verificaram que o gel de agarose apresentava o melhor resultado, com 88% de atividade recuperada (91).

Desta forma, a otimização do pH de imobilização permitiu concluir que o pH mais indicado para a imobilização da lacase nas MNPs é 3,5, pois apresenta uma elevada atividade recuperada. Além disso, este tipo de suporte revelou-se uma mais valia para a aplicação industrial de lacase imobilizada, possibilitando obter atividades enzimáticas mais elevadas do que utilizando matrizes poliméricas.

Além do pH e da concentração dos iões de  $\text{Cu}^{2+}$ , outras condições poderiam ter sido otimizadas, como a quantidade de enzima utilizada e o tempo de contato entre as MNPs e a lacase durante a imobilização. No entanto, o trabalho desenvolvido foi seguimento de trabalhos já realizados, em que esses parâmetros já haviam sido definidos (92).

### 4.3. Propriedades cinéticas

A cinética da lacase livre e imobilizada foi avaliada através da reação de oxidação do ABTS com diferentes concentrações. Na Figura 4.6 apresentam-se os resultados experimentais e as curvas de ajuste não linear do modelo de Michaelis-Menten obtidas para a forma livre e imobilizada.

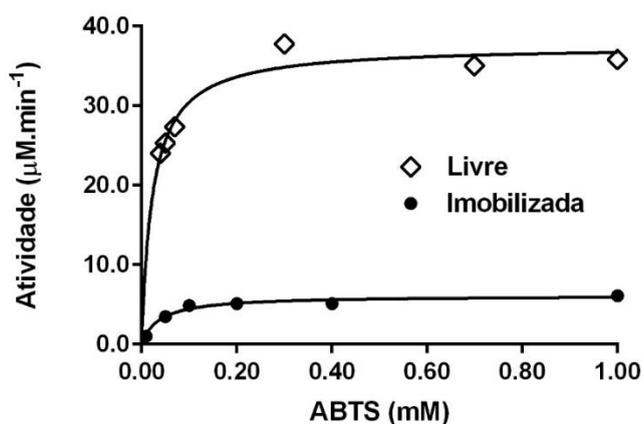


Figura 4.6 - Gráficos de Michaelis-Menten obtidos para a lacase livre e imobilizada. A linha sólida representa o ajuste efetuado segundo o modelo de Michaelis-Menten.

De acordo com o modelo cinético de Michaelis-Menten, a velocidade de uma reação enzimática varia hiperbolicamente com a concentração de substrato, até atingir a velocidade máxima (Equação 3.6). O ajuste do modelo de Michaelis-Menten aos dados experimentais obtidos permitiu obter as equações da cinética para a reação de oxidação do ABTS pela lacase livre (Equação 4.1) e imobilizada (Equação 4.2).

$$V_{\text{Livre}} = \frac{37,6S}{0,0234 + S} \quad (\text{eq. 4.1})$$

$$V_{\text{Imobilizada}} = \frac{6,12S}{0,0375+S} \quad (\text{eq. 4.2})$$

Pela análise das curvas obtidas e do valor de  $R^2$  apresentado na Tabela 4.4, é possível verificar que a lacase, em ambas as formas, se comporta de acordo com o modelo esperado.

Tabela 4.4 - Parâmetros cinéticos obtidos para a lacase livre e imobilizada.

Lacase	$K_M$ (mM)	$V_{\text{max}}$ ( $\mu\text{M}\cdot\text{min}^{-1}$ )	$E_c$ ( $\text{min}^{-1}$ )	$R^2$
<b>Livre</b>	0,0234±0,0041	37,6±1,2	1,61	0,934
<b>Imobilizada</b>	0,0375±0,0086	6,12±0,30	0,16	0,968

O  $K_M$  é um parâmetro cinético que se relaciona inversamente com a afinidade entre a enzima e o substrato. Desta forma, o aumento do  $K_M$  após a imobilização traduz-se numa diminuição da afinidade entre a lacase e o ABTS (46). Na determinação do  $K_M$  é possível verificar que a imobilização da lacase provocou um aumento deste parâmetro em cerca de 0,6 vezes (Tabela 4.4), o que era expectável tendo em conta os resultados obtidos por outros autores que utilizaram NPs de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  como suporte de imobilização da lacase (55,56,73–76,78,79). No entanto, o aumento do  $K_M$  verificado foi bastante inferior ao intervalo verificado para o mesmo tipo de NPs (entre 1,5 a 4,5 vezes) (55,56,73–76,78), o que pode demonstrar que este sistema de imobilização conferiu mais mobilidade à lacase imobilizada do que outros sistemas testados. Vários fatores podem afetar a afinidade da enzima ao substrato, entre os quais a possibilidade de impedimento estérico e a perda de flexibilidade estrutural da enzima, uma vez que o processo de imobilização promove a ligação múltipla da lacase ao suporte, permitindo assim que estruturalmente esta se torne mais rígida (55,56,73,74,76,78). Relativamente a outro tipo de suportes, Frazão et al. (2014) verificou um aumento do valor de  $K_M$  em cerca de 10 vezes utilizando a celulose bacteriana como matriz de suporte e Fatarella et al. (2014) com filmes de *nylon* obtiveram um aumento de

mais de 30 vezes, o que demonstra que o processo de imobilização em matrizes poliméricas pode afetar em maior escala a afinidade entre a enzima e o seu substrato (81,90). Além das alterações conformacionais, questões como as limitações de transferência de massa e interações entre o suporte e o substrato podem ser explicações para o aumento do valor de  $K_M$  neste tipo de suportes (81,90).

Outro parâmetro importante na cinética de reações enzimáticas é a  $V_{max}$ . Segundo o modelo de Michaelis-Menten, o aumento da concentração de substrato traduz-se num aumento da velocidade da reação (46). No entanto, quando a concentração de substrato corresponde à saturação de todas as moléculas de enzima, deixa de ser possível aumentar a velocidade, atingindo-se um valor de velocidade constante ( $V_{max}$ ) (46). A cinética da lacase imobilizada demonstrou a diminuição em cerca de 6 vezes na  $V_{max}$  da reação (Tabela 4.4). Outros autores reportaram o mesmo tipo de comportamento (diminuições da  $V_{max}$  entre 1 e 1,5 vezes) para suportes do mesmo tipo e associam esta diminuição a alterações conformacionais provocadas pelo processo de imobilização, e consequente dificuldade de acesso do substrato aos centros ativos da lacase (55,74,75). Além disso, as dificuldades na transferência de massa são apontadas como uma provável causa da diminuição da  $V_{max}$  (74,75). No entanto, quando se fala de imobilização em NPs, as limitações de transferência de massa e difusão do substrato não devem ter um papel significativo, uma vez que uma das grandes vantagens do uso deste tipo de suporte reside no facto de diminuir este tipo de restrições (47). Por outro lado, embora fosse expectável que, no caso das matrizes poliméricas a  $V_{max}$  fosse bastante afetada por problemas de transferência de massa e difusão de substrato, estudos com celulose bacteriana e filmes de *nylon* apontam para aumentos deste parâmetro cinético em cerca de 1,5 vezes (81,90). Comparando as variações nos valores de  $V_{max}$  para a lacase livre e imobilizada obtidas por outros autores, a variação verificada neste estudo foi bastante superior. Além dos motivos já apontados para a diminuição deste parâmetro, a influência do pH ao qual foi efetuada a medição da atividade deve ter sido determinante, dado que, no caso da lacase livre, a atividade foi medida ao pH ótimo para a reação (4,5) e, no caso da imobilizada, isso não se verificou (3,5). Teoricamente o comportamento da generalidade das enzimas face ao pH a que decorre a reação enzimática define a existência de um valor de pH ao qual a atividade é máxima, sendo esse valor denominado de pH ótimo (46). Para valores de pH acima e abaixo do pH ótimo, a atividade da enzima sofre um decréscimo significativo (46). Desta forma, o pH ótimo para a ação da

lacase utilizada é 4,5 (81). Tendo em conta que a atividade da lacase imobilizada foi determinada a pH 3,5, pode inferir-se que o pH utilizado provocou uma diminuição na taxa de conversão do substrato, e consequentemente, a redução na  $V_{\max}$  da reação.

Por último, é importante avaliar o par enzima-substrato do ponto de vista da sua eficiência catalítica. Assim, a eficiência catalítica ( $E_c$ ) expressa em  $\text{min}^{-1}$  pode ser definida através da Equação 4.3 (55,75,76,78):

$$E_c = \frac{V_{\max}}{K_M} \quad (\text{eq. 4.3})$$

Através da análise da Tabela 4.4 é possível verificar que a  $E_c$  da lacase livre é 10 vezes superior à  $E_c$  da lacase após a imobilização, atendendo à variação verificada no valor de  $V_{\max}$  discutida anteriormente. Segundo o que se encontra descrito na literatura para a imobilização em NPs de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ , era expectável que a eficiência do sistema de catálise fosse afetada após o processo de imobilização (75,76,78). No entanto, a diminuição da  $E_c$  obtida foi bastante elevada quando comparada com as variações verificadas por outros autores, que variam entre 1 e 2 vezes (55,75,76). Para as matrizes poliméricas, as diminuições verificadas na  $E_c$  da enzima imobilizada são bastante superiores às verificadas para as MNPs, atendendo à variação verificada nos valores de  $K_M$  (81,90). As comparações efetuadas permitem inferir que provavelmente o processo de imobilização adotado provoca um maior número de alterações ou alterações mais significativas na estrutura da lacase do que os restantes processos de imobilização em NPs de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ , resultando assim num maior decréscimo na eficiência. Além disso, a questão do pH a que a atividade foi determinada, uma vez mais, influencia negativamente os resultados obtidos, podendo acentuar a diminuição da eficiência. No entanto, a utilização de matrizes poliméricas na imobilização da lacase pode gerar diminuições mais abruptas na eficiência de catálise, sendo preferível adotar o suporte de imobilização em estudo.

Em suma, a imobilização da lacase demonstrou reduções bastante significativas na  $V_{\max}$  e na  $E_c$  do sistema. No entanto, é importante ter em conta que o valor de  $K_M$  apenas sofreu um ligeiro aumento, denotando-se que a afinidade da enzima ao seu substrato se manteve quase inalterada. Embora não seja possível atingir a mesma  $V_{\max}$  que a lacase livre apresenta, o sistema imobilizado não aumenta o risco da obtenção de produtos secundários, causada pela conversão de compostos que possam estar em solução juntamente com o substrato. Este facto é importante quando se avalia a introdução em contexto industrial de enzimas imobilizadas, pois, embora a reação seja muito mais lenta do que seria se a enzima

se encontrasse na sua forma livre, as eficiências de conversão de substrato no produto desejado serão bastante semelhantes. Além disso, aliando ainda todas as vantagens associadas à imobilização de biocatalisadores para aplicações industriais, pode concluir-se que a imobilização da lacase nas MNPs é um processo que apresenta algumas potencialidades industriais (46,57).

#### 4.4. Avaliação da estabilidade

A estabilidade do sistema catalítico após a imobilização foi avaliada a três níveis, a estabilidade térmica, a estabilidade operacional e a estabilidade de armazenamento. Os resultados obtidos foram comparados com os mesmos estudos na enzima livre, à exceção da estabilidade operacional.

##### 4.4.1. Térmica

A estabilidade térmica da lacase livre e imobilizada foi estudada a 40°C. Na Figura 4.7 são apresentados os resultados obtidos para a estabilidade térmica ao longo do tempo. A atividade enzimática relativa verificada para t=0,00h foi definido como 100%, sendo os restantes valores determinados a partir da relação imposta.

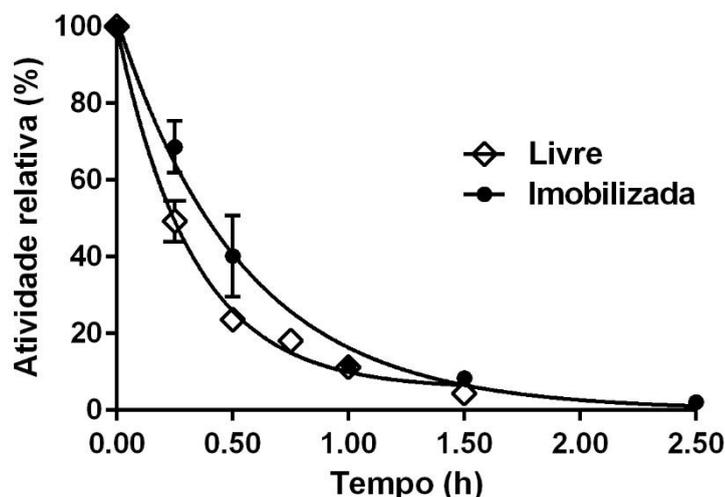


Figura 4.7 – Perfil de estabilidade térmica a 40°C da lacase livre e imobilizada. A linha sólida representa o ajuste do modelo de decaimento exponencial.

O ajuste do modelo de decaimento exponencial aos dados experimentais obtidos permitiu obter as equações que traduzem a atividade recuperada ao longo do tempo de incubação da lacase livre (Equação 4.4) e imobilizada (Equação 4.5).

$$A_{\text{Livre}} = 100 \times (e^{-3,31t}) \quad (\text{eq. 4.4})$$

$$A_{\text{Imobilizada}} = 100 \times (e^{-1,83t}) \quad (\text{eq. 4.5})$$

Atendendo ao ajuste e valor de  $R^2$  obtido (Tabela 4.5) pode concluir-se que a inativação térmica da lacase segue um modelo de decaimento exponencial. Além disso, é possível verificar graficamente (Figura 4.7) que a atividade relativa da lacase imobilizada foi sempre superior à da lacase livre, o que indica que a imobilização exerceu um efeito positivo sobre a estabilidade térmica da lacase.

Tabela 4.5 - Parâmetros da cinética de inativação térmica da lacase livre e imobilizada a 40°C.

Lacase	$t_{1/2}$ (h)	$k$ (h <sup>-1</sup> )	$R^2$
Livre	0,209	3,31	0,989
Imobilizada	0,379	1,83	0,993

A análise dos parâmetros cinéticos apresentados na Tabela 4.5 indica o melhoramento da estabilidade térmica com a imobilização. O  $t_{1/2}$  de uma enzima é definido como o tempo necessário para que a sua atividade seja reduzida a 50% (46). Após a imobilização, a lacase imobilizada apresentou um  $t_{1/2}$  cerca de 1,8 vezes superior ao  $t_{1/2}$  da lacase livre. Por outro lado, o valor de  $k$  relaciona-se com a taxa de inativação térmica, isto é, a taxa de inativação térmica aumenta com o aumento de  $k$  e, conseqüentemente, menor será o tempo necessário para que a enzima se torne inativa (46). A Tabela 4.5 mostra que a lacase imobilizada apresentou um valor de  $k$  1,8 vezes inferior ao valor obtido para a lacase livre, confirmando assim a melhoria verificada na estabilidade térmica da lacase após a imobilização. O mesmo tipo de alteração foi verificado por outros autores após a imobilização de lacase (56,73,75,81,93). Com a utilização de matrizes poliméricas como suporte, verificou-se o aumento significativo da estabilidade térmica da lacase (81,93). Frazão et al. (2014) verificaram que após a incubação da lacase imobilizada em celulose a 60°C durante 1,5 h, esta ainda apresentava mais de 70% da sua atividade inicial (81). Já Metin et al. (2013), ao imobilizar a lacase em quitosano, obtiveram uma atividade recuperada de 72% após 2 h de incubação a 55°C (93). No estudo que foi desenvolvido, a lacase imobilizada a 40°C, após 1,5 h de incubação, apresentava  $8,36 \pm 1,11\%$  de atividade (Anexo A1), o que se revela bastante inferior aos valores obtidos em matrizes. A imobilização da lacase em matrizes poliméricas permite que seja exercido um efeito protetor sobre a enzima, uma vez que a imobilização ocorre maioritariamente por aprisionamento, o que dificulta a ação de agentes desnaturantes, como a temperatura (81,93). No caso da imobilização em NPs, esse efeito

protetor não se verifica, estando a enzima mais sujeita à desnaturação. No entanto, a estabilidade térmica obtida neste estudo é inferior à verificada por outros autores com imobilização em NPs de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  (56,73,75). Wang et al. (2013) (56) verificaram que após 0,50 h de incubação a  $40^\circ\text{C}$  a atividade da lacase imobilizada foi cerca de 70%, contrapondo com  $40,2\pm 10,6\%$  de atividade obtida para o mesmo tempo de incubação do sistema de imobilização em estudo (Anexo A1). Além disso, Bayramoglu et al. (2010) (75) mostraram que, 1,5 h de incubação a  $65^\circ\text{C}$  reduziu a atividade da lacase imobilizada para 58%, o que demonstra uma fragilidade excessiva da lacase imobilizada em estudo, uma vez que após 1,5 h a uma temperatura inferior ( $40^\circ\text{C}$ ) a atividade foi de cerca de 10% de atividade (Anexo A1). Assim, é importante perceber que podem existir outros fatores que condicionam a resistência da lacase à temperatura, como o pH. O pH ótimo de conservação da lacase comercial utilizada é 9,0 (81). No entanto, como valores de pH superiores a 3,5 não permitem a imobilização da lacase nas MNPs, a estabilidade térmica de ambas as formas foi avaliada ao pH 3,5 para que fosse possível a comparação. A fim de avaliar a influência do pH na estabilidade térmica, foi repetido o protocolo para a lacase livre a pH 9,0. Na Figura 4.8 é apresentado o perfil de estabilidade térmica a  $40^\circ\text{C}$  obtido para a lacase livre a pH 9,0.

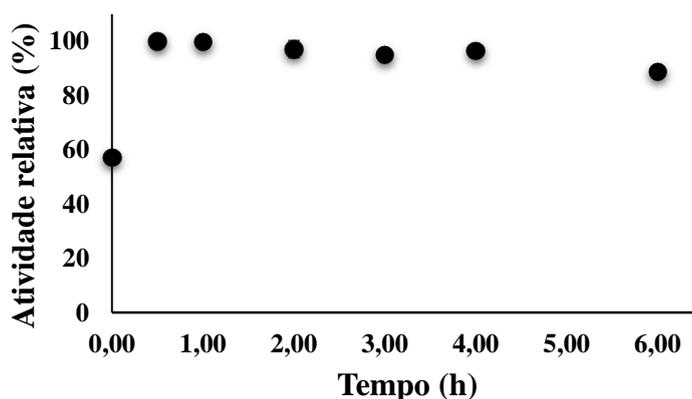


Figura 4.8 - Perfil de estabilidade térmica da lacase livre a  $40^\circ\text{C}$  a pH 9,0.

Pela análise dos resultados obtidos pode verificar-se que após 6,00h de incubação a  $40^\circ\text{C}$  a pH 9,0, a lacase livre apresentou  $88,7\pm 0,8\%$  (Anexo A1) de atividade, enquanto que a pH 3,5 a lacase livre não apresentava atividade significativa a partir das 1,50h. Estes resultados demonstram que o pH teve influência direta e determinante no comportamento da lacase na avaliação da sua estabilidade térmica. Desta forma, é possível concluir que o pH provocou uma redução drástica na estabilidade térmica da lacase livre. O efeito verificado

permite inferir que a mesma ação se repercutiu na enzima imobilizada, traduzindo-se numa rápida inativação da mesma. No entanto, é possível denotar que a imobilização aumentou a resistência estrutural da lacase à temperatura, resultando assim num aumento da sua estabilidade térmica. Industrialmente, as melhorias verificadas no desempenho de enzimas imobilizadas face a condições que podem provocar a sua desnaturação, como a temperatura, são muito importantes pois possibilitam que estas se tornem mais resistentes e estáveis a condições extremas (52). Assim, a aplicação industrial do sistema de imobilização estudado pode apresentar vantagens face à utilização da lacase livre do ponto de vista da resistência à temperatura.

#### 4.4.2. Operacional

A estabilidade operacional de um biocatalisador é definida como a estabilidade do mesmo durante a catálise (46). A avaliação da estabilidade operacional tem como principal objetivo perceber quanto tempo um reator que contenha enzimas imobilizadas pode operar sem que ocorra uma perda significativa de atividade, de forma a que a produtividade do processo não seja comprometida (46).

De forma a avaliar a estabilidade operacional da lacase imobilizada foram realizados dez ciclos consecutivos de oxidação do ABTS. Na Figura 4.9 são apresentados os resultados obtidos do perfil de estabilidade operacional da lacase.

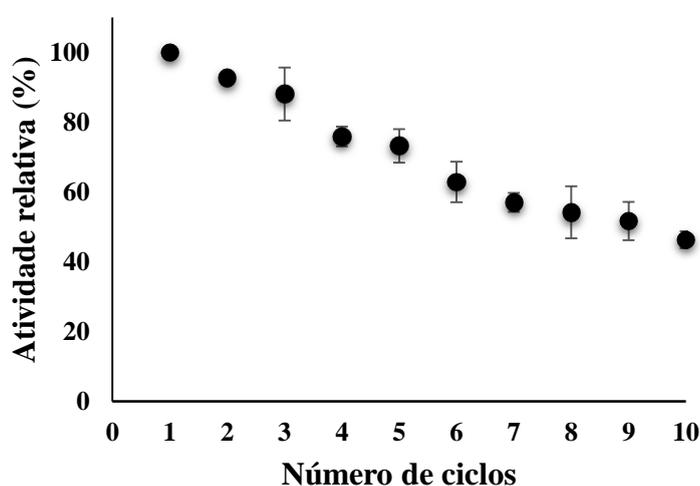


Figura 4.9 - Perfil de estabilidade operacional da lacase imobilizada nas MNPs.

Através da análise da Figura 4.9 é possível verificar que a atividade da lacase imobilizada sofreu um decréscimo significativo após a sua reutilização. Huang et al. (2007)

determinaram um valor de 80% de atividade da lacase após 5 ciclos consecutivos de oxidação do ABTS, o que se assemelha ao valor obtido no estudo desenvolvido ( $73,2 \pm 4,8\%$ ) (Anexo A2) para o mesmo número de ciclos. No entanto, a diminuição verificada para a realização de 10 ciclos catalíticos consecutivos é bastante acentuada ( $46,3 \pm 2,4\%$ ) quando comparada com os resultados de alguns autores que utilizaram o mesmo tipo de suporte ( $55,74-76,78$ ). Fang et al. (2009) e Kalkan et al. (2012) verificaram que, após 10 ciclos de oxidação do ABTS, a lacase apresentava mais de 85% de atividade ( $74,76$ ). Já Bayramoglu et al. (2010), utilizando a siringaldazina como substrato, verificaram que a lacase apresentava 87% de atividade (75). O mesmo nível de estabilidade operacional foi atingido por Wang et al. (2010) e Wang et al. (2008) com a reutilização da lacase na oxidação do catecol também com 10 ciclos catalíticos, tendo sido obtido 86,6 % e 87,8% de atividade respectivamente (55,78). Também Frazão et al. (2014), utilizando a celulose como suporte, verificaram que após 7 ciclos catalíticos de oxidação do ABTS, a lacase imobilizada ainda apresentava 86% da sua atividade inicial (81). No entanto, Fatarella et al. (2014) verificaram que a imobilização da lacase em filmes de *nylon* revelava apenas 21% de atividade após 7 ciclos reativos consecutivos (90).

Alguns autores apresentam justificações para o decréscimo que se verifica na atividade da lacase imobilizada ao longo dos vários ciclos de reação (75,76). A interação iônica entre a lacase e os íons metálicos de  $\text{Cu}^{2+}$  que se encontram quelados na superfície das MNPs é uma interação fraca e pode ser quebrada através de fatores externos, como variação de pH e agitação (46). Desta forma, é possível que durante a reação de oxidação do ABTS tenham ocorrido pequenas flutuações no valor de pH do meio que podem ter sido suficientes para provocar a quebra deste tipo de interações. Por outro lado, é possível que alguns íons de  $\text{Cu}^{2+}$  não tenham sido quelados com o EDTA-TMS, ficando apenas adsorvidos na superfície das MNPs. Esta fração de íons de  $\text{Cu}^{2+}$  adsorvidos pode ter originado locais de imobilização da lacase. Com a alteração de valores de pH e agitação, estes íons podem ter sofrido dessorção, tendo diminuído assim a quantidade de enzima que se encontra imobilizada, e conseqüentemente, resultando numa redução da atividade catalítica (75). Este tipo de limitações não se verificam em processos de imobilização através da formação de ligações covalentes, indicando assim que a imobilização da lacase através de interações com metais quelados apresenta uma estabilidade operacional inferior, dada a menor estabilidade ou força de ligação (76).

A estabilidade operacional de uma enzima está também relacionada com fatores que podem provocar a sua desnaturação, e consequente inativação (46). Como já foi discutido anteriormente, o pH é um parâmetro fulcral, não só para assegurar a imobilização efetiva da lacase, como também na estabilidade da sua estrutura. No caso da estabilidade térmica, foi verificado que o pH exerceu uma forte influência nos resultados obtidos, tendo promovido a inativação precoce da enzima. Desta forma, pode inferir-se que também na avaliação da estabilidade operacional o pH desempenhou um papel significativo, permitindo que a perda de atividade da lacase ao longo dos ciclos reacionais fosse acontecendo.

#### **4.4.3. De armazenamento**

A estabilidade de armazenamento da lacase livre e imobilizada foi avaliada através de três métodos diferentes nomeadamente, em solução, por congelação (após 7 dias de armazenamento) e por liofilização (após 14 dias). Na Tabela 4.6 são apresentados os resultados obtidos para todos os métodos.

Tabela 4.6 - Atividade da lacase livre ( $A_{\text{Livre}}$ ) e imobilizada ( $A_{\text{Imobilizada}}$ ) verificada na avaliação da estabilidade de armazenamento.

<b>Método</b>	<b><math>A_{\text{Livre}}</math> (%)</b>	<b><math>A_{\text{Imobilizada}}</math> (%)</b>
<b>Em solução</b>	4,2±0,1	3,5±0,5
<b>Congelação</b>	3,1±0,2	2,7±0,6
<b>Liofilização</b>	1,0±0,6	0,8±0,0

Através da análise dos resultados obtidos é possível verificar que a estabilidade de armazenamento da lacase, tanto livre como imobilizada, foi bastante reduzida, uma vez que após 7 dias em solução e congeladas, apresentaram menos de 5% de atividade e após 14 dias liofilizadas apresentavam apenas cerca de 1% de atividade. Embora se verifique uma diminuição na congelação relativamente ao armazenamento em solução, esta diminuição não é significativa, o que não permite inferir qual dos dois métodos apresenta melhores resultados. Além disso, a variação verificada no método de liofilização não pode ser comparada com os restantes, dado que foi determinada a tempos diferentes de armazenamento.

A comparação entre os resultados obtidos para a lacase livre e imobilizada indica que não houve qualquer tipo de variação induzida pelo processo de imobilização na estabilidade de armazenamento da enzima. No entanto, os estudos de estabilidade de armazenamento

efetuados por outros autores em lacase imobilizada em diferentes NPs de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  mostraram que a enzima imobilizada apresenta uma maior estabilidade, o que não se verifica neste estudo (55,73,74,78). Fang et al. (2009) verificaram que a lacase imobilizada apresentava 85% de atividade após 4 semanas a  $-4^\circ\text{C}$ , enquanto que a lacase livre apenas apresentava 30% de atividade (74). Também Wang et al. (2008) e Huang et al. (2007) verificaram que após 1 mês de armazenamento a  $4^\circ\text{C}$ , a lacase imobilizada apresentava respectivamente 100% e 85% de atividade, o que é bastante superior às atividades que obtiveram para a forma livre (60% e 30% respectivamente) (55,73). Bayramoglu et al. (2010) mostraram que após 5 semanas a  $4^\circ\text{C}$ , a lacase imobilizada apresentava cerca de 60% de atividade, ao contrário da lacase livre que praticamente se encontrava inativa nas mesmas condições de armazenamento (75). Por fim, Wang et al. (2010) obtiveram uma atividade de 92% após 7 semanas de armazenamento em solução (78).

Em relação à estabilidade verificada após a imobilização em outro tipo de suportes, como o quitosano, Bayramoglu et al. (2012) verificaram que após 8 semanas a  $4^\circ\text{C}$ , a lacase imobilizada ainda apresentava 37% de atividade, enquanto que a lacase livre perdeu toda a sua atividade após 5 semanas de armazenamento nas mesmas condições (94). Também Zhang et al. (2009) mostraram o aumento da estabilidade após a imobilização, uma vez que após 17 dias em solução à temperatura ambiente, a lacase imobilizada em quitosano apresentava praticamente a mesma atividade inicial, enquanto que a forma livre estava praticamente inativa (89). Com a imobilização da lacase em filmes de *nylon*, Fatarella et al. (2014) verificaram também que após 7 dias a  $4^\circ\text{C}$ , a enzima imobilizada não apresentava perda significativa de atividade e que a lacase livre apresentava cerca de 80% da sua atividade inicial (90).

As alterações conformacionais induzidas na estrutura da lacase durante o processo de imobilização são apontadas como possível justificção para o aumento da estabilidade por alguns autores (55,78,94). No entanto, Frazão et al. (2014) verificaram que a imobilização da lacase em celulose foi traduzida num decréscimo da sua estabilidade (81). Uma das justificções apontadas pelos autores para esta alteração inesperada na estabilidade da lacase relaciona-se com o pH ótimo para cada uma das formas, imobilizada e livre, uma vez que não são iguais e o armazenamento foi realizado nas condições ótimas de cada uma delas (81). Atendendo a que os valores de atividade obtidos, tanto para a lacase livre como para a lacase imobilizada nas MNPs, são bastante inferiores aos obtidos por outros autores, é

possível inferir que o pH utilizado para o armazenamento (3,5) tenha prejudicado a estabilidade das mesmas, assim como também já tinha afetado negativamente a estabilidade térmica e operacional.

Deste modo, é possível concluir que a enzima imobilizada não apresenta estabilidade no armazenamento, podendo este resultado dever-se maioritariamente ao efeito do pH na atividade da enzima, e não ao armazenamento em si. Assim, pode deduzir-se que a potencial aplicação industrial deste sistema catalítico iria acarretar custos acrescidos, uma vez que a enzima imobilizada teria de ser imobilizada sempre que fosse utilizada e isso iria levar a que houvesse um gasto de tempo, que se traduziria numa redução da produtividade do processo.

#### **4.4.4. Impacto do pH na estabilidade**

O pH exerce um efeito bastante significativo sobre a estabilidade das enzimas, tanto imobilizadas como livres, uma vez que é um potencial agente desnaturante, podendo provocar a sua inativação (46). Desta forma, é inevitável que este parâmetro afete a estabilidade dos sistemas catalíticos. Conforme já foi discutido anteriormente, as estabilidades térmica, operacional e de armazenamento da lacase foram bastante afetadas pelo pH ao qual foram efetuadas as determinações. No entanto, o valor do pH não podia ser alterado, uma vez que, como já foi referido anteriormente, um pH superior não permite a imobilização, e a alteração do pH para valores superiores após o processo de imobilização interfere diretamente com a estabilidade da ligação da enzima ao suporte, quebrando-a. Desta forma, torna-se imperativo ter alternativas que permitam a obtenção de um sistema catalítico mais estável. No caso do sistema catalítico criado, existem duas formas de contornar o efeito do pH, uma delas é alterando a funcionalização das MNPs preparadas e a outra é utilizar uma outra lacase que apresente um pI superior.

A funcionalização das MNPs com EDTA-TMS e posterior quelação com os iões de  $\text{Cu}^{2+}$  originam um complexo de carga global negativa. Este complexo é o responsável por estabelecer a ligação com a lacase, permitindo a sua imobilização. Atendendo ao caráter iónico da interação, é necessário que a lacase esteja na sua forma protonada para que esta aconteça, o que limita bastante os valores de pH possíveis para a imobilização. Todavia, a alteração do composto com o qual é efetuado a funcionalização das MNPs pode ser uma solução. A utilização de um composto que, quando quelado com os iões de  $\text{Cu}^{2+}$ , gera um complexo de carga positiva ou até mesmo nula, pode permitir que a imobilização da lacase ocorra a valores de pH superiores, reduzindo assim os efeitos negativos verificados na

estabilidade do sistema catalítico. Alguns autores utilizaram o ácido iminodiacético, a poliacrilamida, a poli(4-vinilpiridina), a amidoxima poliacrilonitrilo, entre outros para a funcionalização dos suportes para a imobilização da lacase por coordenação, permitindo a imobilização no pI da enzima e até mesmo a valores de pH superiores (55,56,79,86,87).

Outra das possíveis soluções passa pela utilização de uma lacase com pI superior. Como já foi referido anteriormente, o pI das lacases varia entre 3 e 9, dependendo do organismo que a produz (1,2,13). Desta forma, a escolha de uma lacase com pI superior, permite que a imobilização ocorra a um pH superior, utilizando as MNPs preparadas neste estudo.

Desta forma, a interferência do pH na estabilidade do sistema catalítico em estudo é atenuada, podendo assim equacionar-se a viabilidade de uma aplicação industrial do mesmo.

### 4.5. Remoção de corantes

A indústria têxtil é uma das maiores indústrias a nível mundial, consumindo largas quantidades de corantes sintéticos (95–97). Um dos grandes problemas associados a este tipo de indústrias reside na produção de águas residuais, e no seu posterior tratamento, uma vez que estes compostos são tóxicos e muitos deles carcinogénicos (95,96). O algodão é a fibra mais utilizada no fabrico de tecidos e são necessários corantes específicos para o seu tingimento, como os corantes do tipo *direct* e índigo (95). Alguns dos corantes do tipo *direct* mais usados são o Vermelho do congo (VC), o *Direct Yellow 50* e o *Direct Brown 116* (95). Os corantes do tipo *direct* são utilizados também no tingimento de lã e seda usando agentes químicos fixadores, sendo amplamente usados por serem mais baratos que os outros tipos de corantes (95). Já no grupo dos corantes índigo, podem destacar-se o Índigo de Carmim (IC), o Índigo branco e o Violeta *tyrian* (95). Estes corantes são bastante utilizados no fabrico das calças de ganga, sendo responsáveis por lhes conferir a cor azulada (95).

Atendendo às propriedades físico-químicas deste tipo de compostos e ao perigo que representam quando descartados sem um tratamento prévio, revela-se de extrema importância estudar formas eficientes de reduzir o seu impacto na Natureza (95). Atualmente, existem técnicas de tratamento destas águas residuais que passam por processos físicos e químicos (98). No entanto, estas técnicas são caras, pouco eficientes e não apresentam versatilidade de forma a puderem ser adaptadas ao efluente a tratar (98). Desta forma, o tratamento através de enzimas tem vindo a ser uma via cada vez mais estudada, tentando colmatar e ultrapassar as falhas dos processos já existentes.

Neste trabalho, estudou-se a remoção do VC e do IC através de um LMS, envolvendo a lacase imobilizada em MNPs e o metil seringato (MS) como mediador.

#### 4.5.1. Vermelho do congo

Na Tabela 4.7 são apresentados os resultados obtidos para a reação da lacase imobilizada com o VC mediada pelo MS.

Tabela 4.7 - Resultados obtidos para a reação da lacase e o MS com o VC (s - desvio-padrão).

t (h)	Abs média <sub>500 nm</sub>	s
0,00	0,339	0,011
0,25	0,372	0,006
0,50	0,393	0,006
0,75	0,402	0,001
1,00	0,409	0,001
1,50	0,418	0,006
3,67	0,431	0,004
4,67	0,437	0,003

Através da análise dos resultados não se verifica a descoloração do VC, uma vez que não ocorre a diminuição da absorvância, o que indicaria a remoção do corante da solução. Outros autores estudaram a remoção do VC utilizando a reação mediada com a lacase (99–101). Suwannawong et al. (2010) obtiveram mais de 75% de descoloração do VC em 3 h, utilizando a lacase parcialmente purificada de *Lentinus polychrous* e 0,100 mM ABTS como mediador (99). Chairin et al. (2013) verificaram mais de 80% de remoção do VC com a adição de 2,00 mM de HBT pela lacase de *Trametes polyzona* (100). Já Claus et al. (2002) estudaram a remoção do VC na lacase livre e imobilizada em esferas de alginato na presença de 2,00 mM de HBT (101). O estudo mostrou que após 16h de incubação, a lacase livre de *Polyporus pinisitus* removeu 46,9% do VC, enquanto que a imobilizada, nas mesmas condições removeu 64% (101).

Atendendo aos resultados descritos na bibliografia, pode concluir-se que o comportamento verificado do sistema catalítico em estudo não era expectável. A capacidade da lacase de degradar o VC é inegável, uma vez que já diversos estudos a comprovaram. Além disso, pela análise da Tabela 4.8 é possível verificar que no ensaio controlo ocorreu a remoção de  $12,7 \pm 2,2\%$  do VC após 4h de reação. Desta forma, é possível concluir que não existe reação entre o suporte de imobilização, o MS e o VC. Uma provável explicação para o aumento da absorvância verificado pode estar relacionado com reações secundárias entre

o produto de oxidação do VC e o mediador utilizado, o MS, resultando na formação de compostos que absorvem ao comprimento de onda utilizado para avaliar a concentração do VC. Esta hipótese é apoiada pois este tipo de comportamento apenas se verifica na presença da lacase. Na literatura não existem relatos de resultados concordantes com os que foram obtidos, no entanto, os mediadores utilizados pelos autores foram diferentes, o que, uma vez mais, aponta para que o MS desempenhe um papel fulcral na obtenção destes resultados.

Tabela 4.8 - Resultados obtidos para o ensaio controlo com o VC (s - desvio-padrão).

t (h)	Controlo	
	Remoção (%)	s
0,00	0,0	0,0
0,50	8,5	0,6
1,50	11,0	2,3
3,00	12,9	0,7
4,00	12,7	2,2

Em relação ao ensaio controlo, é importante referir que apenas a presença das MNPs promove a remoção de corantes, uma vez que estes compostos apresentam uma carga intrínseca que potencia a interação com as MNPs, podendo ser adsorvidos à sua superfície.

Em suma, embora os trabalhos já desenvolvidos de degradação do VC pela lacase apontem para a remoção efetiva do corante, o estudo desenvolvido não obteve os mesmos resultados. A causa provável dessa alteração pode relacionar-se com a ocorrência de reações secundárias que promovem a formação de compostos que vão mascarar a remoção efetuada.

#### **4.5.2. Índigo de carmim**

Na Figura 4.10 são apresentados os perfis de remoção do IC para a lacase livre e imobilizada, utilizando 0,100 mM de MS como mediador. Além disso, apresentam-se também os resultados obtidos para o ensaio controlo.

Através da análise da Figura 4.10 pode verificar-se que a lacase imobilizada apresentou uma remoção do IC superior à lacase livre,  $28,4 \pm 0,7\%$  e  $21,0 \pm 0,2\%$ , respetivamente (Anexo A3). O ensaio controlo revelou que as MNPs foram responsáveis por remover  $3,3 \pm 2,1\%$  (Anexo A3) do corante. Desta forma, a diferença real entre a remoção efetuada apenas pela lacase imobilizada e pela lacase livre é de cerca de 4%. No entanto, é importante considerar

que a remoção do IC efetuada apenas pelas MNPs deve também ser incluída, uma vez que o sistema catalítico envolve tanto a enzima como o suporte.

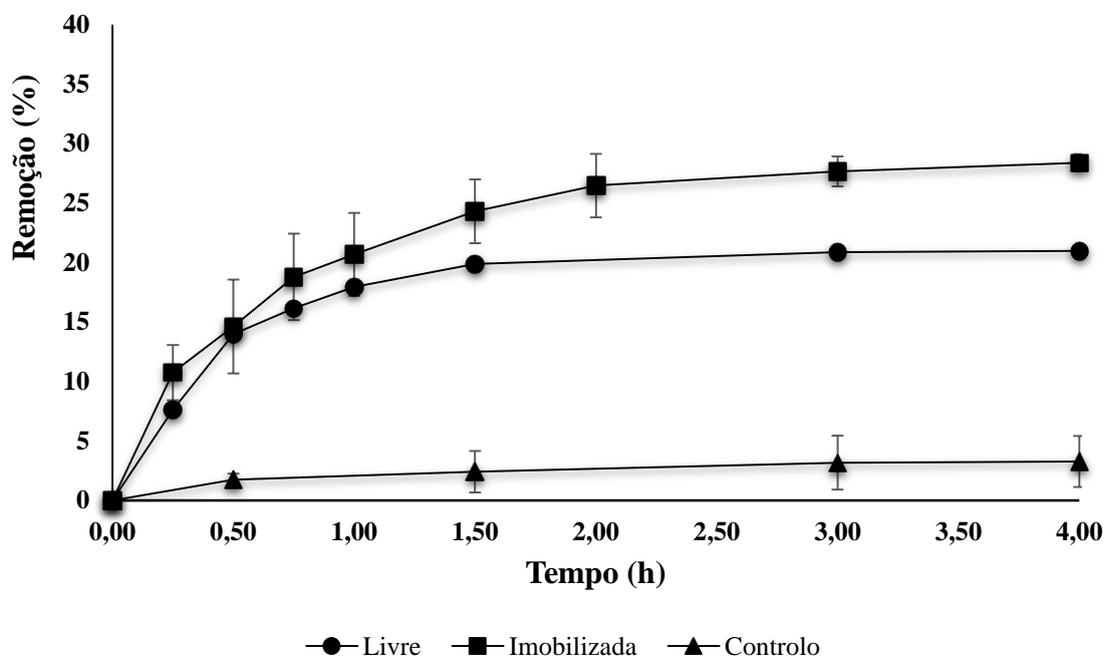


Figura 4.10 – Efeito da imobilização na remoção do IC.

Outros autores verificaram também que a lacase imobilizada tem a capacidade de degradar o IC (96–98,102–105). Rekuc et al. (2009, 2010) obtiveram mais de 90% de remoção do IC após 2h de reação da lacase imobilizada em suportes de sílica-gel e cerca de 80% com a imobilização em espumas celulares de silício mesoestruturadas (102,105). Com a imobilização da lacase de *Lentinus polychrous* em esferas de alginato e cobre, Phetsom et al. (2009) verificaram a completa degradação do IC após 150 minutos de reação (98). Um outro estudo efetuado por Rajendran et al. (2012) com lacase imobilizada em esferas de alginato atingiu mais de 70% de remoção do IC após 5 dias de reação (96). Também Lu et al. (2012) verificaram a efetiva remoção (65%) do IC pela lacase imobilizada presente nos esporos de *Bacillus amyloliquefaciens* (97). A lacase de *Trametes hirsuta* foi imobilizada numa esponja de aço inoxidável por Couto et al. (2004) e os autores verificaram que após 3 dias de reação o corante foi praticamente removido na totalidade (103). Por fim, Teerapatsakul et al. (2008) obtiveram 96% de remoção do IC após 12 dias de reação continua (104). Embora os resultados obtidos estejam bastante abaixo dos apresentados nos estudos efetuados, é importante ter em conta que diversos fatores afetam a descoloração do corante, entre eles, o organismo produtor da lacase, a atividade da enzima, o suporte de imobilização utilizado, o tempo de reação, o mediador e a sua concentração, para além da temperatura e

pH a que ocorre a reação. Tendo em conta a pesquisa efetuada, pode concluir-se o estudo desenvolvido foi o primeiro relato de descoloração do IC recorrendo à lacase imobilizada em MNPs, comprovando assim que a mesma é possível. Os resultados obtidos poderiam ser melhorados caso fosse possível alterar o valor de pH ao qual é efetuada a reação, uma vez que, como já foi evidenciado anteriormente, este parâmetro condiciona de forma severa a atividade da enzima, ou então alterando a concentração de mediador utilizado, atendendo a que não se sabe se a concentração de MS adotada (0,100 mM) corresponde à concentração de saturação da lacase, e conseqüentemente, à sua velocidade máxima de reação. Por este motivo, foi aprofundado o estudo sobre o efeito da concentração de MS de forma a maximizar a descoloração do IC sob as condições adotadas.

#### 4.5.2.1. Efeito da concentração de mediador

A fim de avaliar o efeito da concentração de MS na descoloração do IC, foi testada a reação com 0,100 e 0,500 mM de MS, tanto com a lacase livre como com a lacase imobilizada. Os resultados obtidos são apresentados na Figura 4.11.

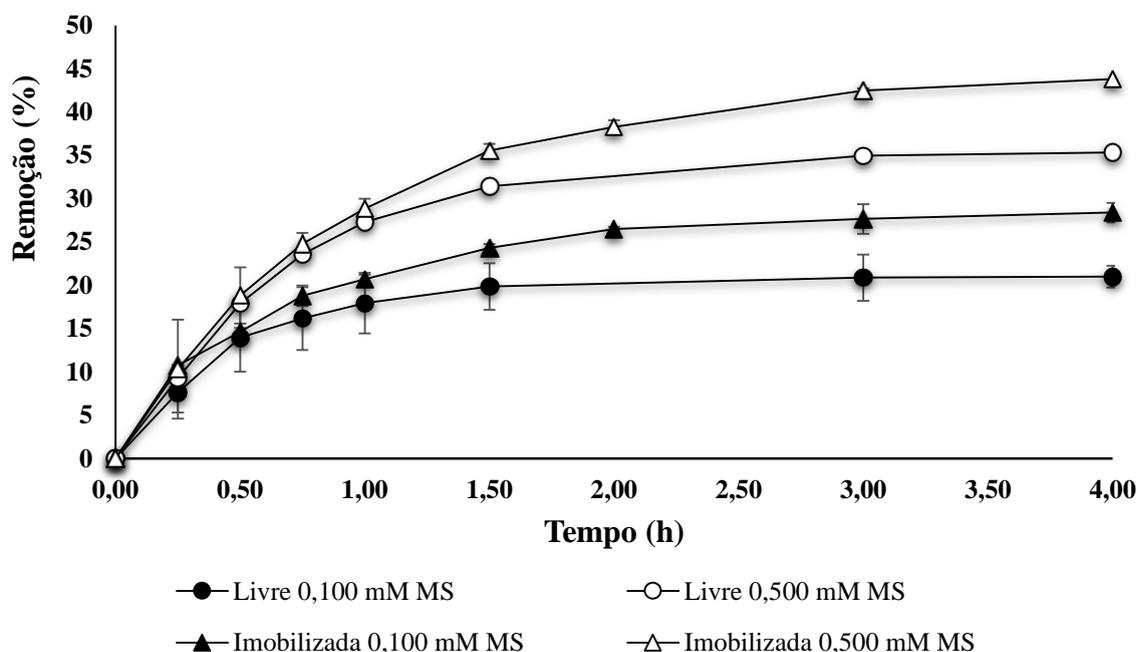


Figura 4.11 - Efeito da concentração de MS na remoção do IC.

Pela análise da Figura 4.11 é possível verificar que o aumento da concentração de MS promoveu o aumento da remoção do IC, tanto na lacase livre como na imobilizada. Em termos percentuais, a lacase livre chegou a  $35,3 \pm 0,3\%$  (Anexo A4) de remoção enquanto que a imobilizada atingiu  $43,8 \pm 1,1\%$  (Anexo A4) utilizando 0,500 mM de MS, contrastando com

os resultados obtidos para 0,100 mM de MS ( $21,0 \pm 0,2\%$  e  $28,4 \pm 0,7\%$ , respectivamente) (Anexo A3). O aumento verificado na remoção do IC era já esperado, atendendo à dinâmica do LMS. Uma reação enzimática é condicionada pela concentração de enzima e de substrato que se encontram no meio reacional. A enzima apenas atinge a sua atividade máxima quando se encontra em situação de saturação, o que se aplica igualmente aos sistemas catalíticos que envolvem mediadores. Neste caso, a atividade da enzima é condicionada pela concentração de mediador, uma vez que é este que intervém diretamente na conversão do substrato. Desta forma, uma baixa concentração de mediador traduz-se numa atividade da lacase mais reduzida. Ao aumentar a sua concentração, a atividade enzimática sofre também um aumento, até ao ponto em que a enzima se encontra saturada e o aumento da concentração de mediador deixa de fazer efeito. Os resultados obtidos permitem concluir que 0,100 mM de MS é uma concentração demasiado baixa, demonstrando-se condicionante na remoção do IC. O aumento de 5 vezes na concentração de MS foi traduzido em cerca de 60 a 65% de acréscimo na descoloração do corante. A concentração de MS necessária para a saturação da lacase imobilizada não foi estudada, logo não se pode apontar a eficiência máxima deste sistema de remoção. No entanto, apontando para uma aplicação industrial deste tipo de sistemas, o aumento da concentração de mediadores envolve gastos que se podem revelar proibitivos. Assim, se por um lado a otimização e maximização da eficiência de processos se revela bastante importante na área industrial, por outro o custo associado a essa otimização pode não ser justificável.

Em modo de conclusão, é possível antever que a instalação de sistemas de tratamento de efluentes, nomeadamente da indústria têxtil, que envolvam a lacase imobilizada em MNPs apresenta inúmeras potencialidades, tendo-se obtido no desenvolvimento deste estudo de remoção do IC uma eficiência bastante considerável.

## **Capítulo 5 - Conclusão**

O trabalho desenvolvido permitiu concluir que as MNPs foram preparadas com sucesso, atendendo aos resultados obtidos pelo FTIR e pela análise elementar. Em termos de caracterização, as imagens obtidas por TEM permitiram identificar claramente o revestimento de sílica efetuado nas MNPs, bem como a forma esférica e o diâmetro de cerca de 50 nm das mesmas. A análise de adsorção de azoto BET mostrou que as partículas preparadas apresentam uma área superficial de  $30,2 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$ , com  $0,026 \text{ cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$  de porosidade e  $54,8 \text{ \AA}$  de diâmetro de poro, comprovando assim uma das grandes vantagens deste tipo de material. Por fim, a carga superficial das MNPs determinada através do potencial zeta foi de  $-44,5 \pm 0,7 \text{ mV}$ , parâmetro fulcral para o sucesso da imobilização da lacase.

O processo de imobilização enzimático foi otimizado, através da concentração de íons de  $\text{Cu}^{2+}$  quelados na superfície das MNPs e do pH ao qual decorreu a imobilização. A melhor concentração de íons  $\text{Cu}^{2+}$  foi a respeitante à estequiometria 1:1, tendo-se verificado  $89,2 \pm 6,8\%$  de recuperação da atividade enzimática. No que diz respeito ao pH, a imobilização apenas ocorreu para valores de pH abaixo de 3,5, sendo que, para o pH de 3,5, foi obtida  $97,4 \pm 0,6\%$  de atividade recuperada, o que revela a eficiência do sistema de imobilização adotado.

De modo a caracterizar cineticamente a enzima livre e imobilizada foram determinados o  $K_M$  e a  $V_{\text{max}}$ . O valor de  $K_M$  da lacase imobilizada foi 0,6 vezes superior ao valor determinado para a lacase livre, o que se revela bastante inferior às diferenças descritas na bibliografia, apontando assim para um efeito quase inexistente no que toca à alteração entre a afinidade da lacase ao seu substrato com a imobilização. Em relação ao  $V_{\text{max}}$ , verificou-se a sua diminuição em cerca de 6 vezes na lacase imobilizada, o que era expectável dado que a imobilização origina alterações conformacionais que podem dificultar o acesso do substrato ao centro ativo da enzima.

Além da cinética, foi também avaliada a estabilidade da enzima a nível térmico, operacional e de armazenamento. Os resultados obtidos permitiram concluir que a estabilidade térmica da lacase imobilizada foi superior à da lacase livre, tendo sido determinados valores de  $t_{1/2}$  de 0,379 h e 0,209 h, respetivamente. Na estabilidade operacional, a enzima imobilizada apresentou mais de 45% de atividade após 10 ciclos reativos consecutivos, o que comprova que pode ser utilizada continuamente. Por último, verificou-se que o armazenamento da enzima, tanto livre como imobilizada, não foi possível,

atendendo a que ao fim de 7 dias de armazenamento a atividade da mesma era quase inexistente. Um dos parâmetros que condicionou amplamente os resultados obtidos na avaliação da estabilidade do sistema catalítico em estudo foi o pH, pois provocou a inativação precoce da enzima, o que condicionou o sucesso dos testes.

O desenvolvimento deste trabalho culminou com a aplicação do sistema de catalítico em estudo na remoção de dois corantes amplamente presentes nos efluentes da indústria têxtil, o VC e o IC. A remoção do VC não ocorreu, tendo-se verificado a formação de um produto, provavelmente resultante da reação entre o produto de oxidação do VC e o mediador, MS. Em relação ao IC, obteve-se  $43,8 \pm 1,1\%$  de remoção após 4 h de reação, utilizando 0,500 mM de MS.

Com a execução deste trabalho foi possível verificar que a aplicação industrial da lacase imobilizada em MNPs apresenta muitas potencialidades. No entanto, é necessário continuar o estudo, uma vez que há limitações que necessitam de ser ultrapassadas para que possa ser obtido o máximo rendimento na utilização deste sistema.

### Capítulo 6 - Trabalho Futuro

Com vista ao melhoramento do sistema de catálise desenvolvido, é importante contornar as limitações impostas pelo pH e também expandir a sua gama de aplicações.

O sucesso da imobilização da lacase nas MNPs preparadas é condicionado pelo pH ao qual decorre o processo. Para que a lacase possa estabelecer interações com o suporte é necessário que se encontre com carga global positiva, o que obriga a que a imobilização ocorra abaixo do seu pI. O pI da lacase é influenciado pelo organismo que a produz, o que permite que o pH de imobilização seja modificado. A escolha de uma lacase com elevado pI implica o aumento do pH de imobilização, e conseqüentemente, a redução do seu impacto na estabilidade da enzima. Desta forma, é possível obter um sistema enzimático que apresente melhores resultados do que aquele que foi desenvolvido neste trabalho.

Após ultrapassar a questão do pH, outro ponto que deve ser explorado passa pela aplicação do sistema na degradação de outros compostos. No trabalho desenvolvido verificou-se a efetiva remoção do IC, o que indica a capacidade da lacase remover este corante. No entanto, existem outros corantes que podem também ser testados e até mesmo a mistura de vários, de forma a que a composição do substrato se aproxime da composição de um efluente real. Além dos corantes, outros compostos, como os compostos fenólicos devem ser testados, uma vez que permitem que o sistema seja aplicado no tratamento de efluente de muitas indústrias e também eventualmente em processos de branqueamento com a remoção dos restos de lenhina da pasta de papel crua utilizada no fabrico de papel.

**Referências Bibliográficas**

1. Gochev VK, Krastanov AI. Fungal Laccases. *Bulg J Agric Sci.* 2007;13:75–83.
2. Baldrian P. Fungal laccases – occurrence and properties. *FEMS Microbiol Rev.* 2006 Mar 1;30(2):215–42.
3. Mayer AM, Staples RC. Laccase: new functions for an old enzyme. *Phytochemistry.* 2002 Jul;60(6):551–65.
4. Kunamneni A, Plou FJ, Ballesteros A, Alcalde M. Laccases and their applications: a patent review. *Recent Pat Biotechnol.* 2008;2:10–24.
5. Yoshida H. LXIII.-Chemistry of lacquer (Urushi). Part I. Communication from the Chemical Society of Tokio. *J Chem Soc Trans.* 1883;43(0):472–86.
6. Thomas BR, Yonekura M, Morgan TD, Czapla TH, Hopins TL, Kramer KJ. A trypsin solubilised laccase from pharate pupal integument of the tobacco hornworm, *Manduca sexta* insect. *Biochemistry.* 1989;19:611–22.
7. Enguita FJ, Marçal D, Martins LO, Grenha R, Henriques AO, Lindley PF, Carrondo MA. Substrate and dioxygen binding to the endospore coat laccase from *Bacillus subtilis*. *J Biol Chem.* 2004 May 28;279(22):23472–6.
8. Sharma P, Goel R, Capalash N. Bacterial laccases. *World J Microbiol Biotechnol.* 2007;23(6):823–32.
9. Parkinson N, Smith I, Weaver R, Edwards JP. A new form of arthropod phenoloxidase is abundant in venom of the parasitoid wasp *Pimpla hypochondriaca*. *Insect Biochem Mol Biol.* 2001 Jan;31(1):57–63.
10. Giardina P, Faraco V, Pezzella C, Piscitelli A, Vanhulle S, Sannia G. Laccases: a never-ending story. *Cell Mol Life Sci.* 2010;67(3):369–85.
11. Kunamneni A, Camarero S, García-Burgos C, Plou F, Ballesteros A, Alcalde M. Engineering and applications of fungal laccases for organic synthesis. *Microb Cell Fact.* 2008;7(1):1–17.
12. Thurston CF. The structure and function of fungal laccases. *Microbiology.* 1994;140:19–26.
13. Arora DS, Sharma RK. Ligninolytic fungal laccases and their biotechnological applications. *Appl Biochem Biotechnol.* 2010;160(6):1760–88.
14. Chaurasia PK, Bharati SL, Singh SK. Comparative studies on the blue and yellow laccases. *Res Plant Sci.* 2013 Nov 8;1(2):32–7.

---

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

15. Riva S. Laccases: blue enzymes for green chemistry. *Trends Biotechnol.* 2006 May;24(5):219–26.
16. Bourbonnais R, Paice MG, Reid ID, Lanthier P, Yaguchi M. Lignin oxidation by laccase isozymes from *Trametes versicolor* and role of the mediator 2,2'-azinobis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonate) in kraft lignin depolymerization. *Appl Environ Microbiol.* 1995 May 1;61(5):1876–80.
17. Tavares APM, Gamelas JAF, Gaspar AR, Evtuguin D V, Xavier AMRB. A novel approach for the oxidative catalysis employing polyoxometalate–laccase system: application to the oxygen bleaching of kraft pulp. *Catal Commun.* 2004 Sep;5(9):485–9.
18. Gamelas JAF, Pontes ASN, Evtuguin D V, Xavier AMRB, Esculcas AP. New polyoxometalate–laccase integrated system for kraft pulp delignification. *Biochem Eng J.* 2007 Feb;33(2):141–7.
19. Kim S, Silva C, Evtuguin D, Gamelas JF, Cavaco-Paulo A. Polyoxometalate/laccase-mediated oxidative polymerization of catechol for textile dyeing. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2011;89(4):981–7.
20. Tzanov T, Basto C, Gübitz GM, Cavaco-Paulo A. Laccases to Improve the Whiteness in a Conventional Bleaching of Cotton. *Macromol Mater Eng.* 2003 Oct 1;288(10):807–10.
21. Maryan AS, Montazer M. A cleaner production of denim garment using one step treatment with amylase/cellulase/laccase. *J Clean Prod.* 2013 Oct 15;57(0):320–6.
22. Mendonça R, Jara J, González V, Elissetche J, Freer J. Evaluation of the white-rot fungi *Ganoderma australe* and *Ceriporiopsis subvermispota* in biotechnological applications. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 2008;35(11):1323–30.
23. Valls C, Roncero MB. Using both xylanase and laccase enzymes for pulp bleaching. *Bioresour Technol.* 2009 Mar;100(6):2032–9.
24. Johansson K, Gillgren T, Winstrand S, Järnström L, Jönsson LJ. Comparison of lignin derivatives as substrates for laccase-catalyzed scavenging of oxygen in coatings and films. *J Biol Eng.* 2014 Jan 2;8:1.
25. Minussi RC, Rossi M, Bologna L, Rotilio D, Pastore GM, Durán N. Phenols removal in musts: strategy for wine stabilization by laccase. *J Mol Catal B Enzym.* 2007 Apr 30;45(3–4):102–7.
26. Sathiya moorthi P, Periyar selvam S, Sasikalaveni A, Murugesan K, Kalaichelvan PT. Decolorization of textile dyes and their effluents using white rot fungi. *African J Biotechnol.* 2007;6(4):424–9.

---

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

27. Li H-X, Zhang R-J, Tang L, Zhang J-H, Mao Z-G. In vivo and in vitro decolorization of synthetic dyes by laccase from solid state fermentation with *Trametes sp.* SYBC-L4. *Bioprocess Biosyst Eng.* 2014;37(12):2597–605.
28. Fan B, Zhao Y, Mo G, Ma W, Wu J. Co-remediation of DDT-contaminated soil using white rot fungi and laccase extract from white rot fungi. *J Soils Sediments.* 2013;13(7):1232–45.
29. Wu X, Huang C, Chen Q, Wang H, Zhang J. A novel laccase with inhibitory activity towards HIV-I reverse transcriptase and antiproliferative effects on tumor cells from the fermentation broth of mushroom *Pleurotus cornucopiae*. *Biomed Chromatogr.* 2014 Apr 1;28(4):548–53.
30. Kyoko A, Hiromichi S, Naoto U. Deodorant compositions. WO2003090797, 2003.
31. Khani Z, Jolivalt C, Cretin M, Tingry S, Innocent C. Alginate/carbon composite beads for laccase and glucose oxidase encapsulation: application in biofuel cell technology. *Biotechnol Lett.* 2006;28(22):1779–86.
32. Portaccio M, Di Martino S, Maiuri P, Durante D, De Luca P, Lepore M, Bencivenga U, Rossi S, De Maio A, Mita DG. Biosensors for phenolic compounds: the catechol as a substrate model. *J Mol Catal B Enzym.* 2006 Aug 4;41(3–4):97–102.
33. Loginov DS, Vavilova EA, Savinova OS, Abyanova AR, Chulkin AM, Vasina D V, Zherdev A V, Koroleva O V. Immunoassays of fungal laccases for screening of natural enzymes and control of recombinant enzyme production. *Biotechnol Appl Biochem.* 2014 Mar 1;61(2):230–6.
34. Gonçalves I, Martins M, Loureiro A, Gomes A, Cavaco-Paulo A, Silva C. Sonochemical and hydrodynamic cavitation reactors for laccase/hydrogen peroxide cotton bleaching. *Ultrason Sonochem.* 2014 Mar;21(2):774–81.
35. Aaslyng D, Roerbaek K, Soerensen NH. Laccases with improved dyeing properties. WO1997019999, 1997.
36. Barnabas M V, Busch A, Denoodt K, Herbots IMAJ. Detergent composition comprising a cellulase enzyme and a laccase enzyme. WO1997043381, 1999.
37. Scott GM, Lentz M, Akhtar M, Sykes M, Abubakr S. Environmental aspects of biosulfite pulping. *Proceedings of 1995 international environmental conference.* 1995. p. 1155–61.
38. Alcalde M. Laccases: biological functions, molecular structure and industrial applications. In: Polaina J, MacCabe AP, editors. *Industrial Enzymes.* Springer, 2007. p. 461–76.

---

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

39. Ribeiro DS, Henrique SMB, Oliveira LS, Macedo GA, Fleuri LF. Enzymes in juice processing: a review. *Int J Food Sci Technol*. 2010 Apr 1;45(4):635–41.
40. Mathiasen TE. Laccase and beer storage. WO1995021240, 1995.
41. Nugroho Prasetyo E, Kudanga T, Steiner W, Murkovic M, Nyanhongo G, Guebitz G. Antioxidant activity assay based on laccase-generated radicals. *Anal Bioanal Chem*. 2009;393(2):679–87.
42. Si JQ. Use of laccase in baking. 6296883, 2001.
43. Micard V, Thibault J-F. Oxidative gelation of sugar-beet pectins: use of laccases and hydration properties of the cross-linked pectins. *Carbohydr Polym*. 1999 Jul;39(3):265–73.
44. Aaslyng D, Tsuchiya R, Gaffar A, Smith SF. Contacting teeth with oral care product comprising an *Aspergillus niger* enzyme having glucose oxidase activity. 6379653, 2002.
45. Sheldon RA, van Pelt S. Enzyme immobilisation in biocatalysis: why, what and how. *Chem Soc Rev*. 2013;42(15):6223–35.
46. Cabral JMS, Aires-Barros MR, Gama M. Engenharia enzimática. Lidel, 2003.
47. Cipolatti EP, Silva MJA, Klein M, Feddern V, Feites MMC, Oliveira J V, Ninow JL, Oliveira D. Current status and trends in enzymatic nanoimmobilization. *J Mol Catal B Enzym*. 2014;99:56–67.
48. Guzik U, Hupert-Kocurek K, Wojcieszynska D. Immobilization as a strategy for improving enzyme properties-application to oxidoreductases. *Molecules*. 2014;19(7):8995–9018.
49. Fernández-Fernández M, Sanromán MÁ, Moldes D. Recent developments and applications of immobilized laccase. *Biotechnol Adv*. 2013 Dec;42(8):1808–25.
50. Rodrigues RC, Ortiz C, Berenguer-Murcia A, Torres R, Fernandez-Lafuente R. Modifying enzyme activity and selectivity by immobilization. *Chem Soc Rev*. 2013;42(15):6290–307.
51. Cao L. Introduction: immobilized enzymes: past, present and prospects. *Carrier-bound Immobilized Enzymes: Principles, Application and Design*. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim. 2005. p. 1–52.
52. Mateo C, Palomo JM, Fernandez-Lorente G, Guisan JM, Fernandez-Lafuente R. Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. *Enzyme Microb Technol*. 2007 May 2;40(6):1451–63.

---

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

53. Nisha S, Arun Karthick S, Gobi N. A review on methods, application and properties of immobilized enzyme. *Chem Sci Rev Lett*. 2012;1(3):148–55.
54. Datta S, Christena LR, Rajaram Y. Enzyme immobilization: an overview on techniques and support materials. *3 Biotech*. 2013;3(1):1–9.
55. Wang F, Guo C, Liu H-Z, Liu C-Z. Immobilization of *Pycnoporus sanguineus* laccase by metal affinity adsorption on magnetic chelator particles. *J Chem Technol Biotechnol*. 2008;83(1):97–104.
56. Wang Y, Chen X, Liu J, He F, Wang R. Immobilization of laccase by Cu<sup>2+</sup> chelate affinity interaction on surface-modified magnetic silica particles and its use for the removal of 2,4-dichlorophenol. *Environ Sci Pollut Res*. 2013;20(9):6222–31.
57. Mota M, Lima N. *Biotecnologia: fundamentos e aplicações*. Lidel, 2003.
58. Brena B, González-Pombo P, Batista-Viera F. Immobilization of enzymes: a literature survey. In: Guissan JM, editor. *Methods in Biotechnology: Immobilization of Enzymes and Cells*. Humana Press Inc., Totowa, NJ; 2013. p. 15–31.
59. Xu J, Sun J, Wang Y, Sheng J, Wang F, Sun M. Application of iron magnetic nanoparticles in protein immobilization. *Molecules*. 2014;19(8):11465–86.
60. Mohanraj VJ, Chen Y. Nanoparticles – A Review. *Trop J Pharm Res*. 2006;5(1):561–73.
61. Martins MA, Trindade T. Os nanomateriais e a descoberta de novos mundos na bancada do químico. *Quim Nova*. 2012;35:1434–46.
62. Cao M, Li Z, Wang J, Ge W, Yue T, Li R, Colvin VL, Yu WW. Food related applications of magnetic iron oxide nanoparticles: enzyme immobilization, protein purification, and food analysis. *Trends Food Sci Technol*. 2012;27(1):47–56.
63. Gubin SP, Koksharov YA, Khomutov GB, Yurkov GY. Magnetic nanoparticles: preparation, structure and properties. *Russ Chem Rev*. 2005;74(6):489–520.
64. Gubin SP. *Magnetic nanoparticles*. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim. 2009.
65. Frey NA, Peng S, Cheng K, Sun S. Magnetic nanoparticles: synthesis, functionalization, and applications in bioimaging and magnetic energy storage. *Chem Soc Rev*. 2009 Sep 23;38(9):2532–42.
66. Bucak S, Yavuztürk B, Sezer AD. Magnetic nanoparticles: synthesis, surface modifications and application in drug delivery. *Recent Advances in Novel Drug Carrier Systems*.

---

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

67. Akbarzadeh A, Samiei M, Davaran S. Magnetic nanoparticles: preparation, physical properties, and applications in biomedicine. *Nanoscale Res Lett.* 2012;7(1):1–13.
68. Schwertmann U, Cornell RM. Synthesis pathways. *Iron Oxides in the Laboratory.* 2000. p. 55–65.
69. Sekhavatjou MS, Moradi R, Hosseini Alhashemi, A. Taghinia Hejabi A. A new method for sulfur components removal from sour gas through application of zinc and iron oxides nanoparticles. *Int J Environ Res.* 2014;8.
70. Mody V, Cox A, Shah S, Singh A, Bevins W, Parihar H. Magnetic nanoparticle drug delivery systems for targeting tumor. *Appl Nanosci.* 2014;4(4):385–92.
71. Shao H, Yoon T-J, Liong M, Weissleder R, Lee H. Magnetic nanoparticles for biomedical NMR-based diagnostics. *Beilstein J Nanotechnol.* 2010;1:142–54.
72. Mueller NC, Nowack B. Nanoparticles for remediation: solving big problems with little particles. *Elements.* 2010 Dec 1;6(6):395–400.
73. Huang J, Liu C, Xiao H, Wang J, Jiang D, GU E. Zinc tetraaminophthalocyanine-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticle composite for laccase immobilization. *Int J Nanomedicine.* 2007 Dec;2(4):775–84.
74. Fang H, Huang J, Ding L, Li M, Chen Z. Preparation of magnetic chitosan nanoparticles and immobilization of laccase. *J Wuhan Univ Technol Sci Ed.* 2009;24(1):42–7.
75. Bayramoglu G, Yilmaz M, Yakup Arica M. Preparation and characterization of epoxy-functionalized magnetic chitosan beads: laccase immobilized for degradation of reactive dyes. *Bioprocess Biosyst Eng.* 2010;33(4):439–48.
76. Kalkan NA, Aksoy S, Aksoy EA, Hasirci N. Preparation of chitosan-coated magnetite nanoparticles and application for immobilization of laccase. *J Appl Polym Sci.* 2012 Jan 15;123(2):707–16.
77. Shi L, Ma F, Han Y, Zhang X, Yu H. Removal of sulfonamide antibiotics by oriented immobilized laccase on Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles with natural mediators. *J Hazard Mater.* 2014;279(0):203–11.
78. Wang F, Guo C, Yang L, Liu C-Z. Magnetic mesoporous silica nanoparticles: Fabrication and their laccase immobilization performance. *Bioresour Technol.* 2010;101(23):8931–5.
79. Wang Y, Zhang D, He FR, Chen XC. Immobilization of laccase by Cu<sup>2+</sup> chelate affinity interaction on surface modified magnetic silica particles and its use for the removal of pentachlorophenol. *Chinese Chem Lett.* 2012 Feb;23(2):197–200.

---

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

80. Oliveira-Silva R, Pinto da Costa J, Vitorino R, Daniel-da-Silva AL. Magnetic chelating nanoprobes for enrichment and selective recovery of metalloproteases from human saliva. *J Mater Chem B*. 2015;
81. Frazão CJR, Silva NHC, Freire CSR, Silvestre AJD, Xavier AMRB, Tavares APM. Bacterial cellulose as carrier for immobilization of laccase: Optimization and characterization. *Eng Life Sci*. 2014 Sep 1;14(5):500–8.
82. Singh S, Bharti A, Meena V. Structural, thermal, zeta potential and electrical properties of disaccharide reduced silver nanoparticles. *J Mater Sci Mater Electron*. 2014;25(9):3747–52.
83. NanoComposix. Zeta potential analysis of nanoparticles. 2012. 6 p.
84. Stajić M, Persky L, Hadar Y, Friesem D, Duletić-Laušević S, Wasser S, Nevo E. Effect of copper and manganese ions on activities of laccase and peroxidases in three *Pleurotus* species grown on agricultural wastes. *Appl Biochem Biotechnol*. 2006;128(1):87–96.
85. Acton QA. Enhancement of *Dichomitus squalens* tolerance to copper and copper-associated laccase activity by carbon and nitrogen sources. *Oxidoreductases—Advances in Research and Application*. ScholarlyEditions, 2013.
86. Bayramoğlu G, Yilmaz M, Arica MY. Reversible immobilization of laccase to poly(4-vinylpyridine) grafted and Cu(II) chelated magnetic beads: Biodegradation of reactive dyes. *Bioresour Technol*. 2010;101(17):6615–21.
87. Wang Q, Cui J, Li G, Zhang J, Huang F, Wei Q. Laccase immobilization by chelated metal ion coordination chemistry. *Polymers (Basel)*. 2014;6(9):2357–70.
88. Chen T, Yang W, Guo Y, Yuan R, Xu L, Yan Y. Enhancing catalytic performance of  $\beta$ -glucosidase via immobilization on metal ions chelated magnetic nanoparticles. *Enzyme Microb Technol*. 2014;63(0):50–7.
89. Zhang J, Xu Z, Chen H, Zong Y. Removal of 2,4-dichlorophenol by chitosan-immobilized laccase from *Coriolus versicolor*. *Biochem Eng J*. 2009;45(1):54–9.
90. Fatarella E, Spinelli D, Ruzzante M, Pogni R. Nylon 6 film and nanofiber carriers: Preparation and laccase immobilization performance. *J Mol Catal B Enzym*. 2014;102(0):41–7.
91. Poonkuzhali K, Palvannan T. Comparison of biopolymers for immobilization of laccase: Ecotoxicity assessment of azo dye. *Indian J Biotechnol*. 2013;12:395–401.
92. Júnior C. Imobilização da lacase em nanopartículas de magnetite [master's thesis]. [Aveiro]: Universidade de Aveiro; 2014. 85 p.

---

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

93. Metin A. Immobilization of laccase onto polyethyleneimine grafted chitosan films: Effect of system parameters. *Macromol Res.* 2013;21(10):1145–52.
94. Bayramoglu G, Gursel I, Yilmaz M, Arica MY. Immobilization of laccase on itaconic acid grafted and Cu(II) ion chelated chitosan membrane for bioremediation of hazardous materials. *J Chem Technol Biotechnol.* 2012 Apr 1;87(4):530–9.
95. Ghaly AE, Ananthashankar R, Alhattab M, Ramakrishnan V V. Production, characterization and treatment of textile effluents: a critical review. *J Chem Eng Process Technol.* 2014;5:182.
96. Rajendran R, Sundaram SK, Yasodha K, Umamaheswari K. Comparison of fungal laccase production on different solid substrates, immobilization and its decolorization potential on synthetic textile dyes. *IIOAB J.* 2012;3(5):1–6.
97. Lu L, Zhao M, Li G-F, Li J, Wang T-N, Li D-B, Xu T-F. Decolorization of synthetic dyes by immobilized spore from *Bacillus amyloliquefaciens*. *Catal Commun.* 2012 Sep 5;26(0):58–62.
98. Phetsom J, Khammuang S, Suwannawong P, Sarnthima R. Copper-alginate encapsulation of crude laccase from *Lentinus polychrous* Lev. and their effectiveness in synthetic dyes decolorizations. *J Biol Sci.* 2009;9(6):573–83.
99. Suwannawong P, Khammuang S, Sarnthima R. Decolorization of rhodamine B and congo red by partially purified laccase from *Lentinus polychrous* Lév. *J Biochem Technol.* 2010;3(2):182–6.
100. Chairin T, Nitheranon T, Watanabe A, Asada Y, Khanongnuch C, Lumyong S. Biodegradation of bisphenol A and decolorization of synthetic dyes by laccase from white-rot fungus, *Trametes polyzona*. *Appl Biochem Biotechnol.* 2013;169(2):539–45.
101. Claus H, Faber G, König H. Redox-mediated decolorization of synthetic dyes by fungal laccases. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2002;59(6):672–8.
102. Rekuć A, Bryjak J, Szymańska K, Jarzębski AB. Very stable silica-gel-bound laccase biocatalysts for the selective oxidation in continuous systems. *Bioresour Technol.* 2010 Apr;101(7):2076–83.
103. Rodríguez Couto S, Sanromán MA, Hofer D, Gübitz GM. Stainless steel sponge: a novel carrier for the immobilisation of the white-rot fungus *Trametes hirsuta* for decolourization of textile dyes. *Bioresour Technol.* 2004 Oct;95(1):67–72.
104. Teerapatsakul C, Bucke C, Parra R, Keshavarz T, Chitradon L. Dye decolorisation by laccase entrapped in copper alginate. *World J Microbiol Biotechnol.* 2008;24(8):1367–74.

---

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

105. Rekuć A, Bryjak J, Szymańska K, Jarzębski AB. Laccase immobilization on mesostructured cellular foams affords preparations with ultra high activity. *Process Biochem.* 2009 Feb;44(2):191–8.

## Anexos

**A1 – Estabilidade térmica da lacase livre e imobilizada a pH 3,5 e da lacase livre a pH 9,0**

t (h)	Lacase Livre (pH 3,5)		Lacase Imobilizada (pH 3,5)		t (h)	Lacase Livre (pH 9,0)	
	A <sub>r</sub> (%)	s	A <sub>r</sub> (%)	s		A <sub>r</sub> (%)	s
0,00	100	0,0	100	0,0	0,00	57,2	0,8
0,25	49,3	5,3	68,6	6,8	0,50	100	0,0
0,50	23,6	2,3	40,2	10,6	1,00	99,8	1,9
0,75	18,1	0,8	-	-	2,00	97,1	3,1
1,00	11,2	0,9	11,7	0,8	3,00	95,0	1,7
1,50	4,35	1,0	8,36	1,1	4,00	96,5	0,4
2,50	-	-	2,11	0,5	6,00	88,7	0,8

**Nota:** A<sub>r</sub> – atividade relativa

s – desvio padrão

**A2 – Estabilidade operacional da lacase imobilizada**

Lacase Imobilizada		
Ciclo	$A_r$ (%)	s
1	100	0,0
2	92,6	1,6
3	88,0	7,6
4	75,9	2,8
5	73,2	4,8
6	62,8	5,8
7	57,0	2,7
8	54,2	7,5
9	51,7	5,5
10	46,3	2,4

**Nota:**  $A_r$  – atividade relativa

s – desvio padrão

**A3 – Efeito da imobilização na remoção do IC**

t (h)	Livre		Imobilizada		Controlo	
	Remoção (%)	s	Remoção (%)	s	Remoção (%)	s
0,00	0,0	0,0	0	0,0	0,0	0,0
0,25	7,6	0,1	10,7	2,3	—	—
0,50	14,0	0,4	14,6	3,9	1,7	0,5
0,75	16,2	0,0	18,8	3,6	—	—
1,00	17,9	0,2	20,7	3,5	—	—
1,50	19,9	0,1	24,3	2,7	2,4	1,7
2,00	—	—	26,5	2,7	—	—
3,00	20,9	0,1	27,7	1,3	3,2	2,3
4,00	21,0	0,2	28,4	0,7	3,3	2,1

**Nota:** s – desvio padrão

#### A4 – Efeito da concentração de MS na remoção do IC

t (h)	0,100 mM de MS				0,500 mM de MS			
	Livre		Imobilizada		Livre		Imobilizada	
	Remoção (%)	s	Remoção (%)	s	Remoção (%)	s	Remoção (%)	s
0,00	0,0	0,0	0	0,0	0,0	0,0	0	0,0
0,25	7,6	0,1	10,7	2,3	9,3	5,7	10,3	0,0
0,50	14,0	0,4	14,6	3,9	17,9	3,2	18,8	0,5
0,75	16,2	0,0	18,8	3,6	23,6	1,3	24,8	1,2
1,00	17,9	0,2	20,7	3,5	27,3	1,2	28,8	0,5
1,50	19,9	0,1	24,3	2,7	31,4	0,8	35,6	0,4
2,00	—	—	26,5	2,7	—	—	38,3	0,3
3,00	20,9	0,1	27,7	1,3	35,0	0,8	42,5	1,7
4,00	21,0	0,2	28,4	0,7	35,3	0,3	43,8	1,1

Nota: s – desvio padrão