



SÍNTESE DE MICROPARTÍCULAS DE FERRO MAGNÉTICAS PARA IMOBILIZAÇÃO DE LACASES E REMOÇÃO DE CORANTE TÊXTIL. SYNTHESIS OF MAGNETIC IRON MICROPARTICLES FOR LACCASE IMMOBILIZATION AND TEXTILE DYE REMOVAL.

Andressa Lullez¹, Giselle Maria Maciel².

RESUMO

Nas últimas décadas, o uso de lacases como biocatalisadores para substituir processos químicos convencionais nas indústrias têxtil, de papel e celulose e farmacêutica, tem se tornado cada vez mais atraente. Do ponto de vista biotecnológico, as lacases fúngicas, as HRPLs (lacases de alto potencial redox), são de grande interesse porque o seu potencial redox alto lhes permite oxidar uma gama mais ampla de substratos do que os seus homólogos com potencial redox baixo ou médio. Sobre a aplicação da lacase, o uso de enzimas solúveis (que abrange a maioria das lacases), são geralmente limitadas pela perda de atividade enzimática que pode estar envolvida por sua baixa estabilidade e/ou desempenho durante certas operações. A imobilização também permite a reutilização do biocatalisador e aumentar a estabilidade na operação, portanto, reduz o custo do uso de enzimas em processos biotecnológicos. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi analisar a imobilização da lacase em micropartículas magnéticas, onde foi possível observar um rendimento de imobilização de 99,9%. Posteriormente foi analisado a adsorção do corante preto reativo 5 pelas micropartículas magnéticas imobilizadas (Lac-Pmag-F), onde foi observada a maior eficiência de descoloração, resultando na taxa de remoção 97,77%.

PALAVRAS-CHAVE: biocatalisadores; lacase; potencial redox.

ABSTRACT

In recent decades, the use of laccases as biocatalysts to replace conventional chemical processes in the textile, pulp and paper and pharmaceutical industries has become increasingly attractive. From a biotechnological point of view, fungal laccases, HRPLs (high redox potential laccases), are of great interest because their high redox potential allows them to oxidize a wider range of substrates than their counterparts with low or medium redox potential. Regarding the application of laccases, the use of soluble enzymes (which includes most laccases) is generally limited by the loss of enzymatic activity that may be involved due to their low stability and/or performance during certain operations. Immobilization also allows the reuse of the biocatalyst and increases stability in operation, thus reducing the cost of using enzymes in biotechnological processes. Therefore, the aim of this work was to analyze the immobilization of laccase in magnetic microparticles, where it was possible to observe an immobilization yield of 99.9%. Subsequently, the adsorption of reactive black dye 5 by the immobilized magnetic microparticles (Lac-Pmag-F) was analyzed, where the highest decolorization efficiency was observed, resulting in a removal rate of 97.77%.

KEYWORDS: biocatalyzers; laccase; redox potential.

¹ Bolsista do PIBIC Fundação Araucária. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Curitiba, Paraná, Brasil E-mail: andressal@alunos.utfpr.edu.br.

² Docente do Departamento de Química e Biologia da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Curitiba, Paraná, Brasil, E-mail: gmmaciel@utfpr.edu.br. ID Lattes: 1525661213489573.



INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, o uso de lacases como biocatalisadores para substituir processos químicos convencionais nas indústrias têxtil, de papel e celulose e farmacêutica, tem se tornado cada vez mais atraente. Estas enzimas também têm aplicações potenciais em outros campos, como em biorremediação e nas indústrias de cosméticos, tintas e móveis. Dentre essas aplicações, a biodegradação de corantes sintéticos por lacases é de grande importância ambiental, considerando que os corantes ao serem descartados em águas superficiais causam elevado impacto aos organismos desse ecossistema. Diversas patentes relacionadas ao uso de lacases estão disponíveis, mas o próprio uso industrial ou ecologicamente sustentável de lacases ainda é uma questão de custo-benefício, especialmente quando se trata da viabilidade de produção em larga escala desta enzima e da necessidade ou não de enzimas purificadas para determinadas aplicações.

As lacases são glicoproteínas extracelulares pertencentes à família das multicobre oxidases, e que podem ser encontradas em fungos (principalmente fungos de podridão branca), plantas, bactérias, sendo ainda relatada em líquens e até em esponjas. Estas enzimas catalisam a oxidação de uma variedade de compostos orgânicos e inorgânicos juntamente com a redução de quatro elétrons do oxigênio molecular a água (Brugnari et al., 2021). Além disso, as reações das lacases podem ser realizadas com o auxílio de mediadores redox, como 2,2-azino-bis (ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico) (ABTS) ou 1-hidroxibenzotriazol (HBT) (Brugnari et al., 2021).

O mecanismo de ação da lacase envolve dois sítios únicos que se ligam ao substrato redutor e ao O₂ a quatro átomos de cobre catalítico: o cobre paramagnético tipo 1 (T1Cu), que é responsável pela cor azul característica da proteína em seu estado de repouso reduzido onde acontece a oxidação do substrato; T2Cu e dois T3Cu são agrupados 12 Å por T1Cu. Neste aglomerado trinuclear, o O₂ é reduzido a duas moléculas de água, que adquirem quatro elétrons consecutivos a partir de quatro reações independentes de monóxido no sítio T1Cu pela molécula de água. Via de transferência de elétrons His-Cys-His estritamente conservada (Motand Silaghi-Dumitrescu, 2012).

As lacases são geralmente classificadas como potencial redox baixo, médio ou alto, dependendo do seu potencial redox em T1Cu. As lacases fúngicas tem como potencial redox médio ou alto. Do ponto de vista biotecnológico, as lacases de alto potencial redox são de grande interesse porque podem oxidar uma gama mais ampla de substratos do que os seus homólogos com potencial redox baixo ou médio. No entanto, quando se trata da aplicação da lacase, o uso de enzimas livres em solução é geralmente limitado pela perda de atividade enzimática, que pode ser consequência de uma baixa estabilidade e/ou desempenho durante certas operações. Esses aspectos impactam o custo da maioria dos processos, especialmente em grande escala (Brugnari et al., 2021). Para superar essas limitações, utiliza-se técnicas de imobilização enzimática. A imobilização também permite a reutilização do biocatalisador e aumenta a estabilidade na operação, portanto, reduz o custo do uso de enzimas em processos biotecnológicos (Liu et al. 2018; Deska e Kończak 2019; Las-Souane et al. 2019).

MATERIAIS E MÉTODOS

O extrato enzimático bruto contendo lacases foi produzido pelo cultivo de um fungo da podridão branca, *Trametes villosa*, em meio semissólido. O fungo foi obtido do banco de cepas do laboratório de Biotecnologia da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, sede Ecoville, Curitiba. O meio de ágar batata dextrose (PDA) foi utilizado para o cultivo do fungo em placas de



Petri (90 mm) incubadas em estufa a 28°C durante 7 dias. Após o tempo de crescimento, as placas foram mantidas em geladeira a 4°C.

A produção dos extratos enzimáticos foi realizada em duplicata por cultura semissólida. O fungo *T. Villosa* foi repicado na forma de discos miceliais (4 discos de 11 mm cortados do micélio em PDA) para o meio de cultivo em frascos Erlenmeyer. O meio de cultivo contendo resíduos agroindustriais foi preparado segundo Matei et al. (2020). Os frascos foram incubados em estufa a 28 °C por 10 dias, e após esse período, os sólidos do meio foram separados por filtração em papel de filtro e o filtrado líquido (extrato bruto) armazenado por congelamento a -20 °C.

A determinação da atividade da lacase foi realizada a 420 nm em espectrofotômetro UV/VIS pelo monitoramento da oxidação do ácido 2-2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico) (ABTS) de acordo com Hou et al. (2004). Uma unidade (U) de lacase foi relacionada à oxidação de 1 micromol de ABTS por minuto. A atividade enzimática foi expressa em unidades por litro (U/L) de amostra.

Para o preparo das partículas magnéticas de óxido de ferro (P_{Mag}), 1 g de FeSO₄.7H₂O foi dissolvido em 100 mL de água destilada num béquer de vidro de 500 mL. Em seguida, uma solução de hidróxido de sódio (1 mol/L) foi adicionada lentamente com agitação até se atingir um pH em torno de 10-12. Durante este processo formou-se um precipitado de ferro. Após o ajuste do volume para 200 mL com água, o béquer contendo o precipitado foi colocado em um forno de micro-ondas doméstico (Panasonic, NN5658BH-Manaus, AM, Brasil) e aquecido na potência máxima (1100 W) por 10 min (MODKOVSKI, 2020, POSPISKOVA; prochazkova; safarik, 2013). A suspensão das partículas de óxido de ferro magnéticas foi cuidadosamente lavada com água destilada para neutralizar o pH com a ajuda da aplicação de um campo magnético (imã). As partículas foram secas numa estufa a uma temperatura 50° C raspadas e moídas com uma espátula.

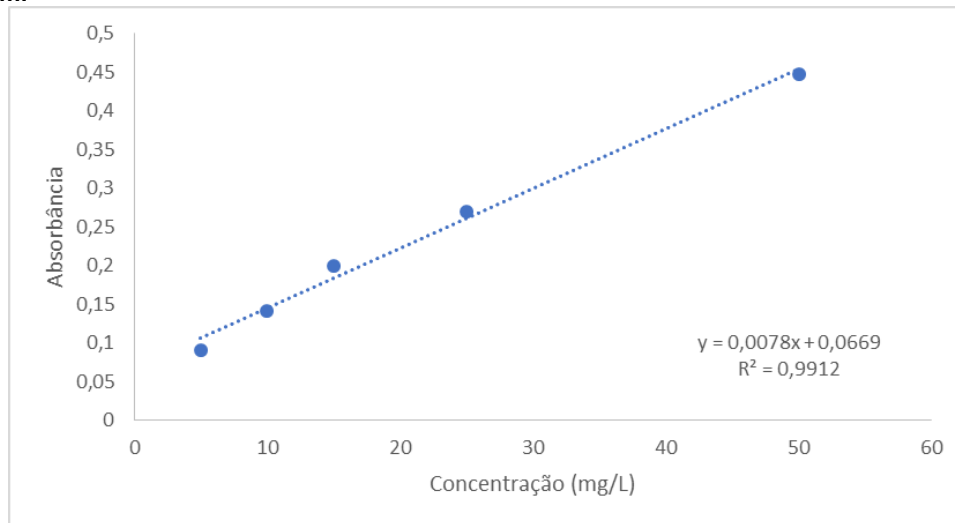
A imobilização da lacase na P_{Mag} foi realizada após um processo de funcionalização da superfície das partículas com APTES ((3-Aminopropil)triétoxissilano) segundo Wang et al. (2018), para adição de grupos funcionais que facilitam a ligação química entre as enzimas e o suporte. Após a silanização com APTES, as micropartículas magnéticas foram inseridas em uma solução de glutaraldeído (6%) e ficaram sob agitação por mais 3 horas a 28 °C e 130 rpm. Com a ajuda de um imã, foram feitas lavagens com água destilada para remover o excedente de glutaraldeído, obtendo-se as partículas magnéticas funcionalizadas (P_{Mag}-F).

Para a imobilização enzimática, as P_{Mag}-F (25 mg) foram adicionadas à uma solução (10 mL) contendo o extrato enzimático de lacase, em 1000 U mL⁻¹, diluída em Tampão Acetato de Sódio 50 mM pH 5, sob agitação a 130 rpm e 28 °C durante 24 horas. Com as enzimas já imobilizadas nas P_{Mag}-F (Lac-P_{Mag}) foram separadas magneticamente do sobrenadante e lavadas três vezes com o seu respectivo tampão, para assim determinar a sua atividade enzimática. A atividade enzimática do sobrenadante também foi determinada a fim de avaliar o montante de lacase não imobilizada (WANG et al., 2018).

O ensaio de remoção de corante sintético em solução aquosa foi realizado com a enzima livre, enzima imobilizada na P_{Mag}-F e a P_{Mag}-F sem enzima. A amostra de corante, Preto Reativo 5, foi cedida por uma indústria têxtil da região metropolitana de Curitiba, Paraná. As soluções de corantes para a curva analítica e ensaios de remoção foram produzidas a partir de diluições de uma solução estoque de 400 mg/L. A concentração dos corantes em solução aquosa foi avaliada em espectrofotômetro UV-Visível (UV-M51 BEL Engineering S.R.L, Monza, MB, Itália), a partir de curva analítica (Figura 1). O comprimento de onda (λ) utilizado foi de 599 nm, sendo o comprimento de onda máximo de absorção do corante.



Figura 1. Curva analítica do corante Preto Reativo 5 avaliado nas concentrações entre 5 e 50 mg/L em comprimento de onda (λ) de 599 nm.



Fonte: Autor (2023).

Os testes de remoção do corante pela enzima livre (1000 U/L de lacases), imobilizada (Lac-PMag-F) e amostras de PMag-F foram realizados em batelada, em frascos Erlenmeyer de 50 mL, contendo 15 mL da solução aquosa de corante (50 mg/L) e 25 mg de PMag, sob agitação de 130 rpm em incubadora shaker (Solab SL 222-Piracicaba, SP, Brasil) em uma temperatura fixa de 30 °C durante 4 horas.

Todos os ensaios foram realizados em duplicata e com controles de corante sem a presença das Pmag e enzima. Após 4 h de reação, as Pmag foram separadas das soluções com o auxílio de um campo magnético (ímã), e foram realizadas as análises de concentração de corante residual no sobrenadante.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O cultivo de *Trametes villosa* no meio semissólido, nas condições utilizadas, resultou em um extrato bruto com atividade de lacases de 2.501 ± 205 U/L. O extrato bruto foi diluído e ajustado para 1000 U/L nas etapas de imobilização. A atividade enzimática de lacase na Pmag após a imobilização foi de $60,67 \pm 3,73$ U/L, com um rendimento de imobilização de 99,9% e atividade recuperada de 6,07%. A baixa atividade recuperada de lacase pode estar relacionada à desnaturação protéica e/ou alteração do sítio ativo da enzima durante o processo de imobilização, o que reduz a atividade catalítica (Brugnari et al., 2021). No entanto, esse resultado pode ser melhorado em processos de otimização dos parâmetros de imobilização.

Os experimentos de remoção do corante Preto Reativo 5 em soluções aquosas foi realizado com lacases livres (1000 U/L), Lacases imobilizadas em Pmag-F (Lac-PMag-F com atividade média de 60,7 U/L em 25 mg de partículas) e somente as Pmag-F (25 mg) (Quadro 1). A maior eficiência de remoção do corante foi observada com as Lac-PMag-F, resultando em uma taxa de remoção de 97,77%. As enzimas livres (em atividade inicial de 1000 U/L, superior à da imobilizada em Pmag-F) atingiram 88,08% de biodegradação do corante. O uso de somente Pmag possibilitou a remoção de 63,14% do corante das soluções aquosas, possivelmente por um processo de adsorção.



Quadro 1 – Biodegradação/Adsorção do corante Preto Reativo 5 na concentração inicial de 50mg/L em solução aquosa.

Amostra	Concentração final (mg/L)	Taxa de remoção (%)	Concentração removida (mg/L)
Controle corante	58,08	-----	-----
Enzima livre	6,92	88,08	51,17
Lac-PMag-F	1,29	97,77	56,79
PMag-F	21,41	63,14	36,68

Fonte: Autor (2023).

As Lac-PMag-F atuaram em um processo simultâneo de adsorção (pela contribuição da PMag-F) e biodegradação (atuação da lacase) na remoção do corante Preto Reativo 5, o que aumentou sua eficácia em relação aos processos individuais.

Conclusão

Neste estudo, foi possível demonstrar a produção da enzima lacase pelo fungo *Trametes villosa*, a síntese e funcionalização de micropartículas magnéticas (PMag-F), a imobilização da lacase presente no extrato bruto em PMag-F (Lac-PMag-F), e a aplicação da enzima livre e imobilizada na remoção de um corante têxtil sintético (Preto Reativo 5). A remoção do corante (em solução inicial de aproximadamente 50 mg/L) por processo combinado de adsorção e biodegradação pelas Lac-PMag-F foi de 97,77%, o que é um resultado promissor para aplicações futuras das Lac-PMag-F no tratamento de efluentes têxteis. Destaca-se também a possibilidade do uso individual das PMag-F em processo de adsorção para a remoção de corantes em soluções aquosas. Estudos futuros deverão ser realizados para melhorar a atividade recuperada de lacase no processo de imobilização, assim como determinar possíveis metabólitos e sua toxicidade após a biodegradação enzimática.

Agradecimento

Não poderia começar esses agradecimentos de forma diferente, pois devo a minha família minha eterna gratidão. Agradeço a minha orientadora Profa. Dra. Giselle Maria Maciel que me guiou pelo caminho deste trabalho, sem o qual nada disso seria possível, a você meu agradecimento especial. Obrigada pela dedicação e tempo despendido em meu auxílio na realização da pesquisa, o mundo precisa de mais professores como você. A Universidade Tecnológica Federal do Paraná e ao Departamento de Química e Biologia que me cedeu a estrutura e que tornou isso tudo possível sou muito grata. Agradeço muito a Fundação Araucária que me proporcionou a oportunidade e pela contribuição para a minha formação.

Conflito de interesse

Não há conflito de interesse.



REFERÊNCIAS

- BRUGNARI Tatiane, BRAGA Dayane M., SANTOS Camila S. A., TORRES Bruno, MODKOVSKI Tatiani A., HAMINIUK Charles W., MACIEL Giselle M., **Laccases as green and versatile biocatalysts: from lab to enzyme market—an overview** (2021), *Bioresources and Bioprocessing*. 8:131
- ESSAWI Mohammad, TILCHIN Oleg, **A Constructive Confrontation Approach to Managing Organizational Culture**, *Journal of Business and Management Sciences*. 2013
- JANKOWSKA, GRZYWACZYK, PIASECKI, KIJÉSKA-GAWRONSKA, NGUYEN, ZDARTA, NGHIEM, PINELO, JOSIONOWSKI, **Electrospun biosystems made of nylon 6 and laccase and its application in dyes removal**, ELSEVIER, February 2021, 101332
- MATE, Diana M., ALCALDE, Miguel, **Laccase: a multi-purpose biocatalyst at the forefront of biotechnology**, *Applied Microbiology International*, 03 October 2016
- MOT Augustin C., SILAGHI-DUMITRESCU Radu, **Laccases: Complex architectures for one electron oxidations**, Researchgate, December 2012, *Biochemistry (Moscow)*
- MODKOVSKI, Tatiani Andressa. **Adsorção e biodegradação de corantes de efluente têxtil utilizando partículas magnéticas e lacase**. 2020. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental) - **Universidade Tecnológica Federal do Paraná**, Curitiba, 2020
- POSPISKOVA K, PROCHAZKOVA G, SAFARIK I, **One-step magnetic modification of yeast cells by microwave-synthesized iron oxide microparticles**, Pubmed, 2013 Jun
- ROSSER Elizabeth C., PIPER Christopher J.M., MATEI Diana E., ..., WEDDERBUM Lucy R., **Simon Eaton, Claudia Mauri Microbiota-Derived Metabolites Suppress Arthritis by Amplifying Aryl-Hydrocarbon Receptor Activation in Regulatory B Cells**, *Cell metabolism*, April 7, 202
- SU Jing, FU Jiajia, WANG Qiang, SILVA Carla, CAVACO-PAULO Artur, **Laccase: a green catalyst for the biosynthesis of poly-phenols**, Taylor e Francis online, 22 Nov 2016