



Universidade de Aveiro Departamento de Química
Ano 2014

Cristiano Correia **Imobilização de lacase em nanopartículas de**
Silva Fortes Júnior **magnetite**



**Universidade de
Aveiro
2014**

Departamento de Química

**Cristiano Correia
Silva Fortes Júnior**

Imobilização de lacase em nanopartículas de magnetite

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Engenharia Química, realizada sob a orientação científica da Doutora Ana Maria Rebelo Barreto Xavier, Professora Auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro e da Doutora Ana Paula Mora Tavares, Investigadora Auxiliar do LSRE- Laboratório de Processos de Separação e Reação Faculdade de Engenharia, Universidade do Porto

Dedico este trabalho à memória da minha avó materna

O júri
Presidente

Doutora Maria Inês Purcell de Portugal Branco

Professora Auxiliar do departamento de Química da Universidade de Aveiro

Doutora Ana Maria Rebelo Barreto Xavier

Professora Auxiliar do departamento de Química da Universidade de Aveiro

Doutora Raquel Oliveira Cristóvão

Investigadora de Pós-Doc do LSRE- Laboratório de Separação e Engenharia da Reação/Faculdade de Engenharia, Universidade do Porto

Agradecimentos

Aos meus orientadores, Doutora Ana Maria Rebelo Barreto Xavier e Doutora Ana Paula Mora Tavares, pela disponibilidade, paciência e pelos conhecimentos que me transmitiram.

À Doutora Ana Luísa Daniel da Silva, pela colaboração e fornecimento das nanopartículas e pela disponibilidade e conhecimentos transmitidos.

À minha família pelo apoio, compreensão e positivismo demonstrado ao longo do meu percurso académico mesmo estando longe.

À minha namorada Marli dos Reis e a todos os meus amigos e colegas da Universidade de Aveiro, pelo apoio, respeito e força, em especial, Marcos Cruz, Jacinto da Veiga, Nair Lopes, Helga Correia, Manuel Teixeira, Arany Rocha, Ricardo Sanches, Carlos dos Reis, Evandro da Veiga, entre outros não mencionados mas igualmente importantes.

A todos aqueles que de forma direta ou indireta, contribuíram para que este trabalho fosse possível.

Palavras-chave

biocatalisador, nanopartículas de magnetite, imobilização, lacase, otimização

Resumo

As excelentes propriedades catalíticas têm aumentado o uso de enzimas na biocatálise industrial. Contudo, como normalmente são solúveis, apresentam desvantagens como a dificuldade de recuperação da enzima da solução reacional e a sua reutilização. De modo a reutilizar uma enzima solúvel, a sua imobilização tem sido utilizada, nos mais diversos tipos de suportes e usando metodologias variadas. Neste sentido, estudou-se a imobilização da lacase em nanopartículas magnéticas de magnetite, revestidas com sílica ($\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2$) e ativadas com glutaraldeído. Na primeira fase deste trabalho, com o objetivo de maximizar a recuperação de atividade enzimática, estudou-se a otimização das condições da imobilização, através do uso da metodologia de superfície de resposta, tendo como variáveis independentes o pH (4.5, 6.5 e 8.5), a concentração da enzima (0.03, 0.1 e 0.17 $\mu\text{L/mL}$) e o tempo de contato (1.0, 2.0 e 3.0h). As condições ótimas de imobilização encontradas foram a concentração de enzima 0.03 $\mu\text{L/mL}$, pH 5 e tempo de contato de 3h. Numa segunda fase, investigou-se a estabilidade térmica da lacase livre e imobilizada, estabilidade operacional ou capacidade de reutilização e o efeito do armazenamento na enzima imobilizada. Verificou-se que a estabilidade térmica da lacase imobilizada, em relação à lacase livre, foi ligeiramente melhorada. A retenção de 75,8 % da atividade inicial após 6 ciclos de reação mostraram claramente que a estabilidade operacional e a capacidade de reutilização do biocatalisador foi melhorada em relação à enzima livre. Na terceira fase determinou-se a cinética da reação de oxidação do ABTS, catalisada pela lacase imobilizada e comparou-se com a cinética da enzima livre. Os resultados foram modelados usando o modelo de Michaelis-Menten, e constatou-se que um aumento substancial do valor da constante de Michaelis-Menten, em relação à enzima livre, certamente provém de uma menor afinidade da enzima imobilizada para o substrato e ou por limitações de transferência de massa. Conclui-se que as propriedades melhoradas da lacase imobilizada em nanopartículas, assim como as vantagens de reutilização, aproveitando as propriedades magnéticas das nanopartículas, mostram que a lacase imobilizada nestes suportes apresenta potencial para aplicações industriais.

Keywords

biocatalyst, magnetite nanoparticles, immobilization, laccase, optimization

Abstract

Due to their excellent catalytic properties, there is an increase of the use of enzymes in industrial biocatalysis. However because normally they are in the soluble state, there are disadvantages such as the difficulty of recovering the enzyme from the solution where occurs the reaction and its posterior reutilization. In order to reuse the soluble enzyme in an industrial reactor, the enzyme can be immobilized in various supports using different immobilization methodologies. The main objective of this work was to study the immobilization of laccase on magnetic nanoparticles of magnetite coated with silica ($\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2$) and activated with glutaraldehyde. In the first stage of this work the optimization of the conditions for the immobilization of laccase was studied, through the use of a response surface methodology, taking as independent variables pH (4.5, 6.5 and 8.5), the concentration of the enzyme (0.03, 0.10 and 0.17 $\mu\text{L}/\text{mL}$) and contact time (1.0, 2.0 and 3.0h) with the purpose of maximizing the recovery of enzyme activity. The optimal experimental conditions for the immobilization were enzyme concentration 0.03 $\mu\text{L}/\text{mL}$, pH 5 and contact time of 3h. In a second stage, investigation of the thermal stability of laccase, operational stability and reusability and the effect of storage on the immobilized enzyme was carried out. It was found that the thermal stability of the immobilized laccase comparing to the free laccase was slightly improved. The retention of 75.8% of initial activity after 6 cycles of operation clearly showed the good operational stability and reusability. Later the kinetics of oxidation of ABTS, catalyzed by immobilized laccase was determined and compared with the kinetics of the free enzyme. The results of the oxidation of ABTS by laccase immobilized were modeled using the Michaelis-Menten model, and it was found that a substantial increase in the value of the Michaelis-Menten constant by comparing to the free enzyme, certainly comes from a lower affinity of the immobilized enzyme for the substrate or by limitation in mass transfer. As conclusion, there was an improvement in the properties of immobilized laccase on magnetic nanoparticles as well as the benefits of reuse, taking advantage of the magnetic properties of the nanoparticles and showing that laccase immobilized in these carriers has enormous potential for industrial application.

Índice geral

1.	Introdução	1
1.1.	Enzimas: função, estrutura e classificação.....	1
1.2.	Imobilização de enzimas.....	3
1.3.	Nanopartículas magnéticas	9
1.4.	A lacase.....	15
1.4.1.	Propriedades gerais	15
1.4.2.	Aplicações da lacase	18
1.4.3.	Imobilização da lacase	19
1.4.4.	Aplicações da lacase imobilizada	22
2.	Materiais e Métodos	29
2.1.	Materiais	29
2.2.	Imobilização da lacase	30
2.3.	Medição da atividade	31
2.4.	Planeamento experimental e análise estatística	33
2.5.	Estabilidade térmica: Cinética da inativação térmica da lacase livre e imobilizada.....	34
2.6.	Estudo da cinética enzimática.....	36
2.7.	Estabilidade operacional	36
2.8.	Estabilidade de armazenamento.....	37
2.9.	Caracterização: estudo de morfologia do suporte e da enzima imobilizada	37
3.	Resultados e discussão	38
3.1.	Otimização das condições de imobilização da lacase.....	38
3.2.	Estabilidade térmica: Cinética da inativação térmica da lacase livre e imobilizada.....	47
3.3.	Propriedades cinéticas.....	49
3.4.	Estabilidade operacional	51
3.5.	Estabilidade de armazenamento.....	52
3.6.	Caracterização: estudo da morfologia do suporte e da enzima imobilizada	54
4.	Conclusão	55

Bibliografia	57
--------------------	----

Índice de figuras

Figura 1: Estrutura de uma secção de uma proteína ³	1
Figura 2: Modelo chave-fechadura e modelo do ajuste induzido; onde E-enzima, S-substrato e P-produtos ⁶	3
Figura 3: Métodos de imobilização de enzimas ¹⁵	6
Figura 4: Imobilização covalente de uma enzima utilizando o glutaraldeído como um espaçador ¹⁹	8
Figura 5: Métodos de proteção e estabilização de NPms com posterior de enzimas disponíveis na literatura ⁷	13
Figura 6: Representação esquemática da nanopartícula de magnetite revestida com sílica ³⁷	14
Figura 7: ciclo catalítico da lacase (Adaptado de Sołoducho et al. (2013)) ³⁹	15
Figura 8: Estrutura 3D da lacase. Os três sítios (T1, T2 e T3) estão representados a cores diferentes. Os átomos de cobre são as esferas azuis e a porção de hidrato de carbono e pontes dissulfeto são os modelos em bola-e-bastão ⁴⁰	16
Figura 9: Metodologia de imobilização da lacase: (a) NPM em contato com solução enzimática; (b) lavagem das NPms usando a decantação magnética. ...	30
Figura 10: Superfície de resposta e gráfico de contorno da recuperação de atividade em função da concentração de enzima (X1) e pH (X2) e tempo de contato constante (X3).....	42
Figura 11: Gráfico de cubo da recuperação de atividade em função de concentração de enzima; pH e tempo de contato.....	46
Figura 12: Perfis de estabilidade térmica da lacase imobilizada (□) e livre (■) a 60 °C.	47
Figura 13: Velocidades iniciais de reação da lacase livre (a) e imobilizada (b) com diferentes concentrações de ABTS. A linha contínua sólida representa o modelo de Michaelis-Menten ajustado aos dados experimentais.....	49
Figura 14: Estabilidade operacional da lacase imobilizada.....	52
Figura 15: Estabilidade de armazenamento da lacase livre (□) e imobilizada (■) a 4°C.....	53
Figura 16: Espectros FTIR-ATR de: (a) lacase livre; (b) NPM magnética antes da imobilização; (c) NPM magnética após imobilização da lacase.....	55

Índice de tabelas

Tabela 1: Potenciais aplicações da lacase na indústria.....	19
Tabela 2: Aplicações da lacase imobilizada no tratamento de efluentes.....	24
Tabela 3: Aplicações da lacase imobilizada no tratamento de efluentes da indústria têxtil	25
Tabela 4: Níveis codificados e reais das variáveis independentes na aplicação do planeamento Box-Behnken na imobilização da lacase em partículas magnéticas.	33
Tabela 5: Planeamento Box-Behnken com os resultados experimentais.	38
Tabela 6: Análise de variancia (ANOVA) ^a para o modelo polinomial quadrático para a otimização da recuperação de atividade da lacase imobilizada.	39
Tabela 7: Valores-F e valores-P do modelo para a otimização da recuperação de atividade da lacase imobilizada.	40
Tabela 8: Parâmetros da cinética de inativação térmica da lacase livre e imobilizada a 60°C.....	48
Tabela 9: Parâmetros cinéticos (K_M , V_{max}) da lacase livre e imobilizada.	49

Lista de abreviaturas e símbolos

ABTS	(2,2' – azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico) sal de diamónio
ANOVA	Análise de variância
APTES	3- aminopropil-trietoxisilano
APTS	3-aminopropiltrio-toxisilano
ATR	Reflectância total atenuada
BaP	Benzo (a) pireno
CIL	lacase imobilizada em carbono
FTIR	Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier
MG	corante vermelho de metilo
NPG	Nanopartículas porosas de ouro
NPm	Nanopartícula magnética
p(HEMA)	filmes de poli-hidroxietilmetacrilato
RBBR	corante azul brilhante de remazol
RB5	corante preto reativo 5
R ²	Coefficiente de correlação
TEOS	Tetraetilortosilicato
T1	sítio tipo 1
T2	sítio tipo 2
T3	sítio tipo 3
α	razão entre atividades específicas
K_M	constante de Michaelis-Menten (mM)
k_{cat}	constante catalítica
k	constante de inativação térmica (h ⁻¹)
t	tempo de incubação (h)
$t_{1/2}$	tempo de meia vida (h)
V_{max}	velocidade máxima de reação (mM/min)

1. Introdução

1.1. Enzimas: função, estrutura e classificação

Enzimas são biomoléculas que evoluíram de forma a realizarem eficientemente as reações biocatalíticas necessárias para preservar a funcionalidade e a integridade dos sistemas biológicos. Desta forma são definidas como biocatalisadores que foram otimizados pela evolução, de modo a promoverem as funções fisiológicas existentes em todas as formas de vida ¹.

Com exceção de um pequeno grupo de moléculas de ARN, que apresentam propriedades catalíticas, todas as enzimas são proteínas. As proteínas (Figura 1) são moléculas compostas por um número de aminoácidos, que pode ir de 100 a muitas centenas, ligados entre si por ligações peptídicas covalentes, sendo que os aminoácidos apresentam na sua fórmula química um grupo carboxílico (-COOH), um grupo amino (-NH₂) e um grupo chamado genericamente radical R, responsável pela diferenciação entre os 20 aminoácidos existentes ².

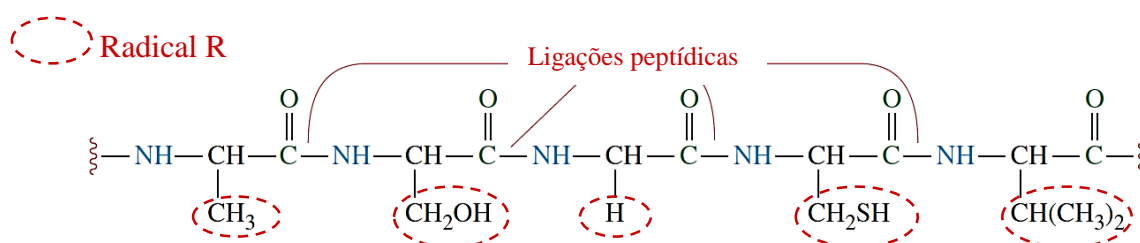


Figura 1: Estrutura de uma secção de uma proteína ³.

Os catalisadores reduzem a amplitude da barreira energética (estado de transição) a ser ultrapassada pelos reagentes ao serem convertidos quimicamente nos produtos. Esta redução promove um aumento da velocidade da reação química sem afetar o equilíbrio. Termodinamicamente, a amplitude da barreira de energia pode ser convenientemente expressa em termos da variação de energia livre (ou energia de Gibbs) ².

Os reagentes que participam nas reações catalisadas pelas enzimas, designam-se por substratos e o caráter específico da enzima, faz com que geralmente esta atue somente sobre um determinado tipo de substratos, convertendo-o num determinado tipo de

produtos ¹. Esta especificidade, bem como o facto de serem lábeis por efeito da temperatura, pH ou na presença de alguns compostos (agentes desnaturantes), advém da sua natureza proteica já referida. Além da elevada especificidade, ao contrário dos catalisadores químicos, as enzimas têm em muitos casos uma atividade catalítica regulável, sendo que a maioria das reações enzimáticas ocorre em condições suaves de temperatura, abaixo de 100°C, à pressão atmosférica, com valores de pH entre 4 e 8, e sem necessidade de uso de químicos ou solventes agressivos, o que não se verifica normalmente nas reações catalisadas quimicamente ⁴.

Estruturalmente, a maioria das enzimas é muito maior do que o substrato onde atuam, e apenas uma pequena porção da enzima está diretamente envolvida na catálise ². O substrato liga-se à enzima no sítio ativo e faz com que ocorram alterações na distribuição eletrónica das ligações químicas necessárias à formação do produto final. Algumas enzimas contêm, além dos sítios ativos, centros reguladores (centros alostéricos), aos quais se ligam pequenas moléculas (ativadores ou inibidores) que influenciam a atividade enzimática ⁵.

As principais características do sítio ativo podem ser resumidas nos seguintes pontos:

- O sítio ativo ocupa uma parte relativamente pequena do volume total de uma enzima;
- Os substratos ligam-se através de atrações fracas múltiplas (eletrostáticas, de *Van der Waals*, hidrofóbicas ou ligações de hidrogénio);
- O sítio ativo corresponde geralmente a uma fenda ou cavidade existente na estrutura da molécula proteica;
- A especificidade da ligação do substrato depende do arranjo dos átomos no centro ativo, tendo tal arranjo sido descrita de 2 diferentes formas (Figura 2).

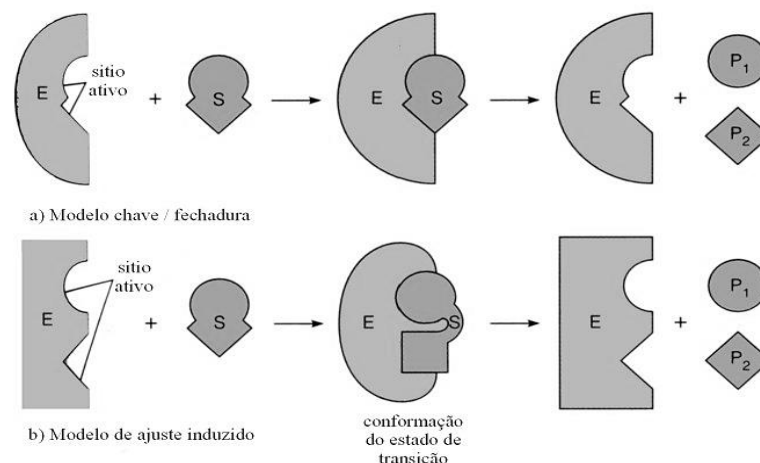


Figura 2: Modelo chave-fechadura e modelo do ajuste induzido; onde E-enzima, S-substrato e P-produtos ⁶.

O modelo chave-fechadura proposto por Emil Fischer em 1894 é uma visão rígida da associação enzima-substrato, que explica a elevada especificidade das enzimas pelo facto de tanto as enzimas como os substratos apresentarem formas geométricas complementares, o que faz com que se encaixem de maneira precisa uns nos outros. Koshland, em 1958, propôs um modelo mais flexível no qual o substrato pode induzir alterações conformacionais discretas e reversíveis na molécula de enzima. Estas alterações, por sua vez, orientam os grupos catalíticos de forma favorável para dar continuidade à reação que se segue ⁷.

1.2. Imobilização de enzimas

Em enzimologia, o termo imobilização de enzimas refere-se ao confinamento físico da enzima sem a perda das propriedades catalíticas. No entanto, ao imobilizar uma enzima, algumas mudanças estruturais podem alterar as suas propriedades e capacidade catalítica ⁷.

A imobilização de uma enzima tem como principais vantagens facilitar a utilização continuada e a reutilização, o manuseio, a prevenção da contaminação do produto final com o biocatalisador e a fácil separação do biocatalisador dos produtos finais. De um modo geral, as enzimas imobilizadas também possuem uma maior estabilidade térmica, química e de armazenamento ⁸. Todos estes benefícios fazem com que a imobilização de enzimas seja altamente aplicada em vários ramos da biotecnologia

e da indústria química, farmacêutica, alimentar entre outras ⁹. A nível industrial, o uso da enzima imobilizada é geralmente considerada vantajosa, pois favorece os processos contínuos e pode simplificar muito a construção de um reator e o controlo da reação, uma vez que a simples remoção da enzima é muitas vezes um modo eficaz de parar a reação ¹⁰.

Numa análise comercial da imobilização de enzimas, DiCosimo et al. (2013) indicam que o mercado mundial de enzimas industriais movimentou 3.3 bilhões \$US em 2010 e estava previsto um crescimento de aproximadamente de 4.5 a 5.5 bilhões \$US até 2015, com uma taxa de crescimento de 7-9% por ano. Porém, embora existam muitos estudos sobre métodos de imobilização de enzimas, são relativamente poucos os processos que foram um sucesso comercial, sendo que apenas aproximadamente 20% das vendas de enzimas incluem enzimas imobilizadas. Justifica-se falta de investimento dos produtores de enzima na área da imobilização, como compreensível do ponto de vista do produtor, pois o facto de a enzima imobilizada poder ser reutilizada várias vezes não beneficia diretamente o produtor da enzima. Assim, muitas indústrias químicas têm apostado no desenvolvimento de metodologias de imobilização internamente nos departamentos de inovação e desenvolvimento ¹¹.

1.2.1. Suporte de imobilização

O desempenho catalítico da enzima imobilizada pode ser afetado pelo suporte através das seguintes formas: (i) difusão de substrato e produto, (ii) alterações conformacionais da enzima e (iii) interação entre o suporte e o meio reativo ⁸. Para cada tipo de enzima e aplicação haverá um suporte mais apropriado para a sua imobilização. No entanto, é difícil prever quais os suportes que apresentam as melhores características para a imobilização de uma enzima específica. Características do suporte, tais como, uma grande área superficial e uma grande densidade de grupos reativos, com impedimento estérico mínimos, são fundamentais para melhorar a interação suporte-biomolécula ⁷. Uma grande área superficial pode ser conseguida usando partículas de tamanho pequeno, contudo esta escolha pode dificultar processo de separação no final da reação. De qualquer maneira o material escolhido como suporte tem que ser mecânica e quimicamente estável ¹².

Alguns dos materiais utilizados como suportes de imobilização incluem os polímeros naturais como o alginato, a quitosana, a quitina, a celulose, o colagénio, o amido, a gelatina e a pectina e materiais inorgânicos como zeólitos, cerâmica, celite, sílica, vidro e carvão ¹³. Contando com as vantagens de estabilidade mecânica, elevada capacidade de adsorção e disponibilidade de grupos funcionais reativos, os suportes inorgânicos são cada vez mais comuns na aplicação em imobilização de enzimas ⁸.

1.2.2. Métodos de imobilização de enzimas

Existem vários métodos utilizados para a imobilização de enzimas e sabe-se que a escolha de um método de imobilização pode influenciar fortemente as propriedades do biocatalisador. Os parâmetros, tais como, a atividade catalítica em geral, a eficiência do catalisador, a desativação, a cinética de regeneração e o custo devem ser otimizados de modo a conseguir a melhor estratégia de imobilização. Ainda deve levar-se em conta a toxicidade dos reagentes utilizados na imobilização, o tratamento dos resíduos e a aplicação final do biocatalisador ¹⁴.

A classificação dos procedimentos de imobilização mais correntemente usada pela sua simplicidade consiste em dividir os métodos em reversíveis e irreversíveis. Imobilizações irreversíveis evitam que a enzima seja libertada do suporte enquanto a reação ocorre, contudo, com a inativação da enzima o suporte deve ser descartado juntamente com a enzima. Por outro lado, as imobilizações reversíveis permitem a recuperação dos suportes, após inativação da enzima ⁷.

As técnicas de imobilização mais usadas (Figura 3) e de maior relevância podem ser consideradas cinco ¹²: (i) Adsorção não-covalente; (ii) Imobilização através de interações iónicas; (iii) Ligação covalente; (iv) Ligação cruzada (*Cross-linking*); (v) Aprisionamento.

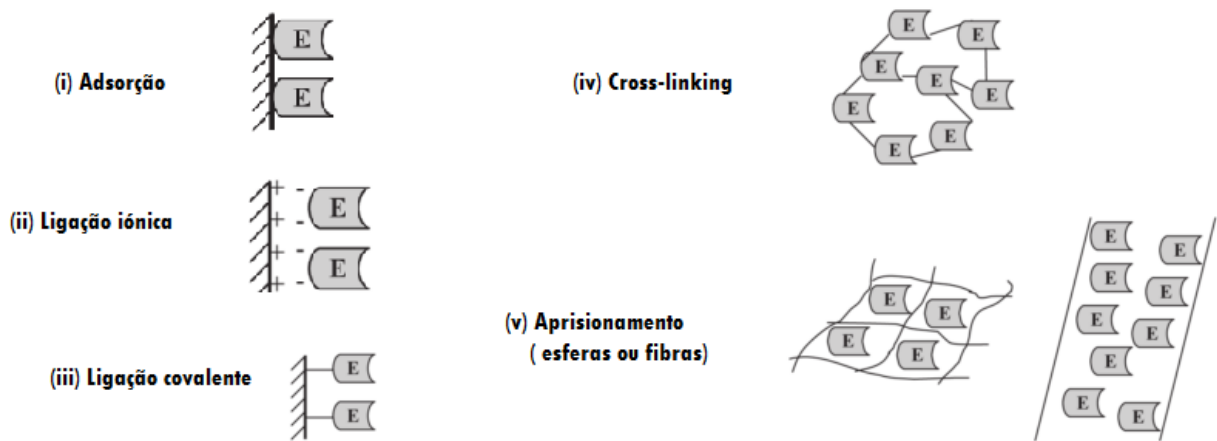


Figura 3: Métodos de imobilização de enzimas ¹⁵.

i) Adsorção

A adsorção é um método reversível comumente usado. Neste método de imobilização, grupos superficiais do suporte interagem com grupos da superfície da enzima através de interações eletrostáticas ou dipolares (forças de van der Waals) ou ainda pontes de hidrogénio. O tipo predominante de interação depende da natureza química e propriedades superficiais do suporte e da enzima em questão. No método de adsorção a enzima está fisicamente adsorvida sobre um suporte. Esta técnica é relativamente simples, uma vez que basicamente envolve colocar o suporte em contato com uma solução enzimática durante um determinado tempo incubação. Devido ao tipo de forças envolvidas no processo de adsorção, este método é bastante dependente de variáveis tais como pH, força iónica do meio, a natureza do solvente e a relação entre concentração de enzima e quantidade de suporte ^{9,13}.

ii) Interações iónicas

Outro método reversível é a imobilização por ligações iónicas, onde geralmente o suporte possui grupos funcionais ionizáveis característicos, os quais irão interagir especificamente com grupos da enzima. No processo, é possível que algum tipo de adsorção ocorra simultaneamente. Entretanto, a força da interação iónica é maior do que a de adsorção e portanto prevalece. Polissacarídeos e polímeros sintéticos contendo

centros permutadores de iões costumam ser usados como suportes na imobilização iónica. A imobilização iónica é fortemente dependente do valor de pH e concentrações de sal durante a imobilização, esta extrema dependência é uma das limitações deste método ¹²
¹⁶.

iii) Ligação covalente

A imobilização de enzimas via ligações covalentes é um método irreversível que está entre os mais utilizados. A principal vantagem deste método advém do facto de a enzima estar firmemente ligada ao suporte devido a alta estabilidade das ligações formadas entre o suporte e a enzima. Esta forte ligação previne o escape de material enzimático para a solução durante a reação. Muitas vezes a enzima também aumenta a estabilidade térmica e operacional. Os inconvenientes desta técnica incluem condições de imobilização mais drásticas, o maior número de etapas de reação e consequentemente, mais tempo para sua realização. Alguns autores mencionaram mudanças estruturais na enzima causados por exposição aos químicos usados na imobilização ¹⁵. Há uma variedade de reações que podem ser utilizadas para imobilização, via ligação covalente, dependendo dos grupos funcionais disponíveis na superfície do suporte ¹⁶. Geralmente, os grupos amino da enzima são empregues na imobilização covalente, contudo outros grupos funcionais sobre a superfície da enzima também podem ser utilizados, incluindo os resíduos de açúcares ¹². Entretanto, deve-se ter especial atenção para que os resíduos de aminoácidos essenciais não estejam envolvidos na ligação covalente ao suporte, o que resultaria numa diminuição da capacidade catalítica da enzima ^{16,15}.

A imobilização covalente de enzimas, na maior parte das vezes, começa com uma modificação da superfície, com grupos funcionais orgânicos, como por exemplo a silanização, utilizando o reagente silano organofuncional.

Neste método, também pode utilizar-se um agente de ativação conhecido como espaçador, ou agente bifuncional, de modo a manter as propriedades estruturais e funcionais das enzimas durante a imobilização. Tal agente costuma ser o glutaraldeído, tradicionalmente utilizado como agente de reticulação bifuncional ¹³. O glutaraldeído ou 1,5 pentanedial é um composto orgânico de fórmula química $C_5H_8O_2$ que é solúvel em solventes aquosos e não é tóxico ⁵. O glutaraldeído geralmente sofre reações de aldeídos ¹⁷ sendo que numa solução aquosa, com pH, força iónica e temperatura recomendada, o

glutaraldeído reage rapidamente com grupos amino gerando ligações covalentes intra ou intermoleculares ¹⁸. Na **Figura 4** pode-se ver o exemplo de uma imobilização por ligações covalente usando o glutaraldeído como espaçador, onde um suporte de sílica modificada com grupos aminopropil reage com glutaraldeído e o terminal-N da enzima de modo a ocorrer a imobilização ¹⁹.

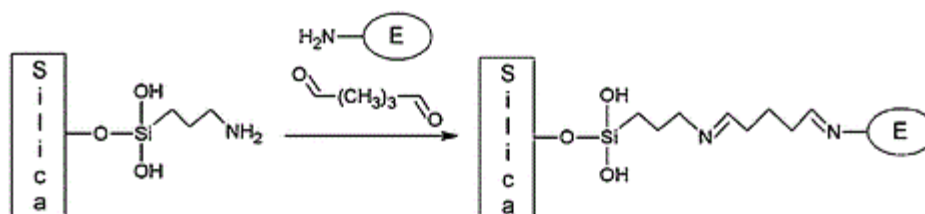


Figura 4: Imobilização covalente de uma enzima utilizando o glutaraldeído como um espaçador ¹⁹.

iv) Aprisionamento

O aprisionamento é um método que consiste na oclusão de uma enzima dentro de uma matriz polimérica que retém a enzima mas permite a difusão de substratos e produtos ¹⁶. No aprisionamento em gel, os materiais utilizados costumam ser o ágar ²⁰, poliacrilamida ²¹, gelatina ²² e alginato ²³ e no aprisionamento em fibra, o acetato de celulose tem sido o material de referência ²⁴. A utilização prática destes métodos é limitada pelas limitações de transferência de massa através das membranas ou géis. A imobilização por aprisionamento físico possui a vantagem de ter uma grande aplicabilidade e não compromete a estrutura e função da enzima nativa pois protege a estrutura da enzima contra qualquer interferência ¹⁴. Possui também a desvantagem de devido ao facto de a estrutura da matriz polimérica ser geralmente flexível, pode facilmente acontecer o inchamento da matriz, devido ao efeito da pressão osmótica interna, como resultado, algum material enzimático aprisionado pode escapar da matriz comprometendo até certo ponto o rendimento de imobilização ²⁵.

v) **Ligação cruzada**

A imobilização de enzimas através do método ligação cruzada ou *cross-linking* significa a promover uma ligação covalente entre moléculas enzimáticas e reagentes bifuncionais de baixa massa molar, formando agregados unidos através de ligações intermoleculares ¹⁶. O método de ligação cruzada não costuma envolver a associação da enzima a um suporte sólido, sendo que a enzima atua como seu próprio suporte. Geralmente o produto da ligação de várias enzimas através do uso dos agentes bifuncionais se torna insolúvel e precipita. O sucesso da imobilização depende das condições experimentais e varia de acordo com a enzima e o agente bifuncional escolhido. Dentre os diversos agentes bifuncionais existentes destaca-se o glutaraldeído já referido, que continua a ter vasto uso por causa de sua rápida reação com os grupos amino superficiais na molécula da enzima. Também se utiliza a carbodiimida para reações com grupos carboxílicos ¹².

1.3. Nanopartículas magnéticas

Nas últimas décadas o prefixo “nano” tem feito parte do vocabulário científico. Nanomaterial, Nanopartículas, Nanoreator, Nanoquímica entre outros termos têm estado presentes nos mais diversos estudos e aplicações. Nanopartículas são partículas que apresentam um tamanho entre 1 a 100 nanômetros. Estas partículas têm despertado interesse por possuírem propriedades diferenciadas quando comparadas com as propriedades do mesmo material em dimensões maiores ²⁶. As nanopartículas magnéticas (NPM) são uma classe de nanopartículas que tem tido atenção especial por possuírem propriedades magnéticas com muito potencial em diversas aplicações. As NPM têm sido objeto de estudo numa vasta gama de disciplinas, incluindo fluidos magnéticos ²⁷, catálise ²⁸, biotecnologia/biomedicina ²⁶, ressonância magnética, armazenamento de dados e remediação ambiental ²⁹. Na maioria das aplicações, as NPM apresentam melhor desempenho a tamanhos de 10-20 nm, dependendo do material de origem ⁷²⁹. Sendo que geralmente as NPM são derivadas de elementos com propriedades magnéticas tais como o ferro, níquel e cobalto ²⁶.

Ao minimizar muito o tamanho de um material magnético, o material adota um comportamento superparamagnético. Os materiais superparamagnéticos têm como

principal característica o facto de, na ausência de campo magnético, não apresentarem magnetização. Entretanto, quando se lhes é aplicado um campo magnético, os *spins* alinham-se imediatamente resultando numa resposta rápida aos campos magnéticos com um magnetismo remanescente (magnetismo residual) e força coersiva (o campo necessário para reduzir a magnetização a 0) desprezável ²⁹. De modo a entender estes fenómenos magnéticos das NPM, deve-se considerar os efeitos de redução da quantidade de átomos que compõem o material magnético (efeito de tamanho finito) assim como a contribuição de efeitos de superfície ^{26,30}. Uma desvantagem associada às NPM consiste na instabilidade intrínseca que tendem a desenvolver após longos períodos de tempo. Partículas tão pequenas tendem a formar aglomerados de forma a reduzir a energia associada ao elevado valor da razão área superficial/volume. Assim para determinadas aplicações é crucial desenvolver estratégias de modo a estabilizar as partículas ²⁹.

1.3.1. Nanopartículas magnéticas e a biocatálise

Como já foi referido o uso de enzimas na biocatálise apresenta várias vantagens mas também apresenta desvantagens como a dificuldade de recuperação da enzima na solução reacional e reutilização da mesma. Metodologias de imobilização em suportes têm sido empregues de modo a minimizar este problema em reações catalisadas por enzimas e neste contexto, as NPM apresentam-se como uma excelente alternativa. A utilização destas partículas pode ser vantajosa pois pode-se obter um sistema quási-homogéneo, que combina as vantagens de alta dispersão, reatividade elevada e separação fácil ²⁹. Por ser um material não-poroso, a imobilização em NPM pode ser também vantajosa pois limita os problemas de difusão que estão associados aos suportes porosos, mas por outro lado a carga de enzima por unidade de massa de suporte é usualmente baixa ³¹.

Do ponto de vista processual, a imobilização de enzimas permite a separação por centrifugação ou filtração, porém para uma boa separação as partículas têm de ser relativamente grandes. Neste contexto, a imobilização de enzimas em NPM surge como uma excelente alternativa, pois permite a separação da enzima da mistura reacional por aplicação de decantação magnética, não exigindo um compromisso entre o tamanho da partícula e as limitações dos processos de separação por centrifugação ou filtração ³². Sheldon et al. (2013) referiram que partículas muito pequenas (tamanho micro ou nano)

podem ser usadas com sucesso no dimensionamento de (bio) reatores de leito fluidizado, onde a alimentação passa ao longo do reator com velocidade suficiente para fluidizar as partículas. Contudo tem que haver um compromisso entre as características das partículas (densidade, tamanho) e o caudal de passagem de modo a não serem projetadas ou expelidas para fora do reator³². Neste sentido, Yu et al. (2005) promoveram a fluidização assistida de um leito de aglomerados de nanopartículas (*Degussa Aerosil®* de 12 nm) misturadas com partículas magnéticas de ferrite de bário, aplicando um campo magnético externo. De modo a criar o campo magnético usaram uma fonte de corrente alternada oscilatória, com intensidade e frequência reguláveis. Investigaram os aspetos da fluidização como a velocidade mínima de fluidização, a queda de pressão e expansão do leito. Os principais resultados mostraram que a velocidade mínima de fluidização foi significativamente reduzida com a aplicação de um campo magnético a baixa frequência.

Uma outra vantagem da imobilização em NPm insere-se no facto de que podemos considerar a imobilização em NPm (assim como em outros suportes) uma tecnologia “verde” no sentido ecológico e económico, pois prolonga, através de sucessivos ciclos de recuperação, a vida útil de um catalisador⁷.

Entretanto, a imobilização em NPm pode apresentar algumas desvantagens pelo facto de a enzima estar exposta à superfície do suporte, como por exemplo a inativação por autoproteólise, interação com bolhas de gás ou gotas de solvente insolúvel. Estes inconvenientes podem ser minimizados se a enzima for revestida com um polímero hidrofílico, que irá evitar a interação direta entre a enzima imobilizada e qualquer outra molécula³¹.

1.3.2. Proteção e estabilização de nanopartículas magnéticas

A estabilização e proteção das NPm frequentemente estão interligadas. Dependendo da aplicação desejada, geralmente utilizam-se estratégias de proteção/ativação das nanopartículas, onde se incluem o enxerto ou o revestimento com espécies orgânicas, incluindo surfatantes e polímeros, ou o revestimento com uma camada de material inorgânico, tal como sílica ou carbono (Figura 5). Apesar de haver avanços significativos na síntese de NPm, manter a estabilidade das partículas por um longo período de tempo, sem aglomeração ou precipitação, ainda constitui um problema a ultrapassar. A estabilização é um requisito fundamental para qualquer aplicação que

envolva NPm, especialmente quando se trabalha com metais puros como o Ferro (Fe), Cobalto (Co) e Níquel (Ni) e as suas ligas metálicas, pois são muito sensíveis ao ar. Um revestimento não serve apenas como proteção da nanopartícula contra degradação, mas também pode servir para a funcionalização usando compostos específicos ³³²⁹.

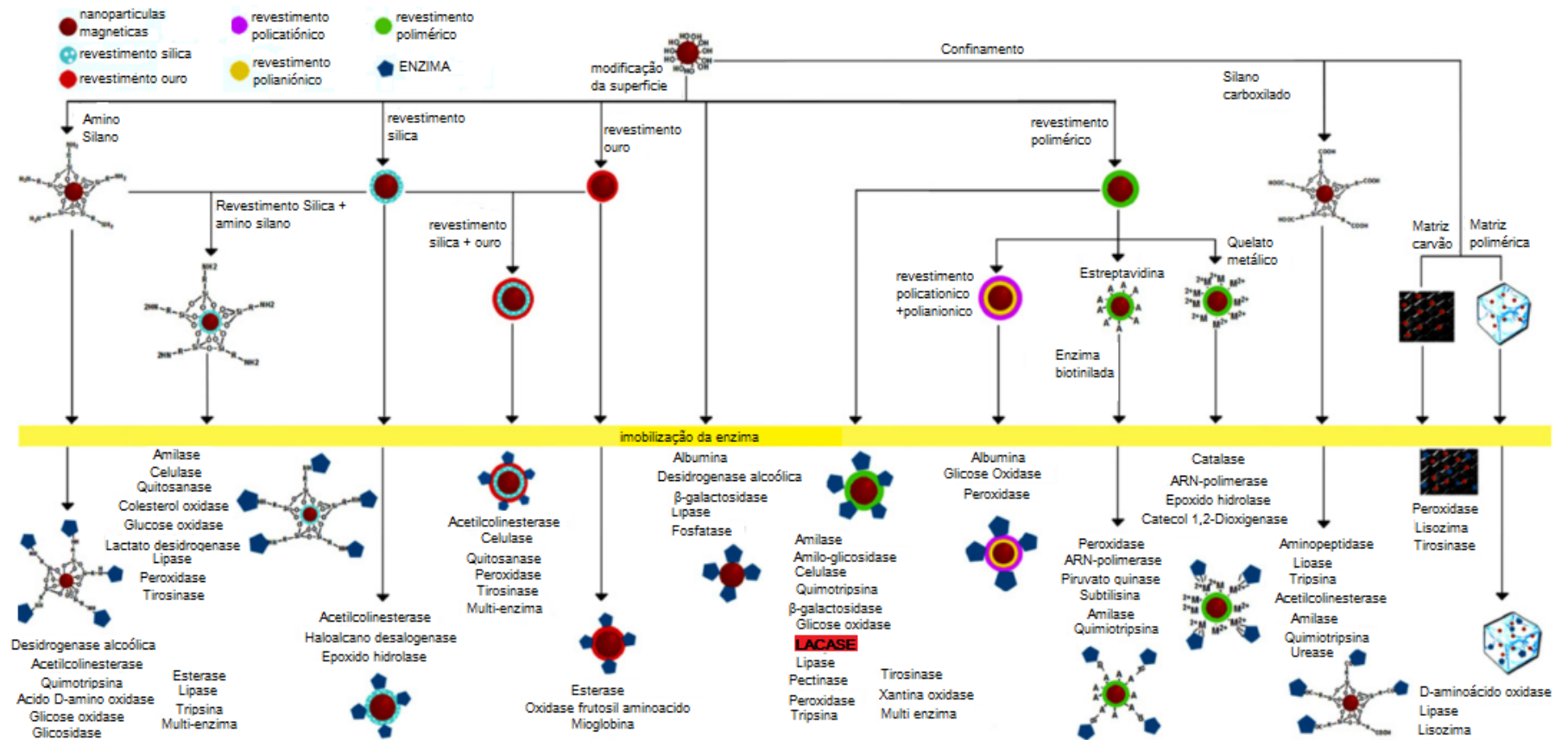


Figura 5: Métodos de proteção e estabilização de NPMs com posterior imobilização de enzimas disponíveis na literatura ⁷.

Em alguns casos, pode haver uma correlação clara entre o revestimento de superfície e as propriedades magnéticas. Por exemplo, o revestimento com sílica pode ser usado para ajustar as propriedades magnéticas de nanopartículas, uma vez que a extensão de acoplamento dipolar está relacionada com a distância entre partículas, e esta depende da espessura do revestimento de sílica ²⁹.

Geralmente, a superfície das NPms revestidas com sílica é hidrofílica e o próprio revestimento de sílica é quimicamente inerte e promove a dispersão das nanopartículas. Porém a principal vantagem das NPms revestidas com sílica (Figura 6) advém do facto de possuírem na superfície muitos grupos funcionais, nomeadamente grupos silanol ou Si–OH. Estes grupos são diretamente empregues na funcionalização da superfície.

A funcionalização com grupos amino, na superfície das nanopartículas revestidas de sílica, pode ser conseguida através da mistura de TEOS com agentes silano, tais como APTS ³⁴. Huang et al. (2010) imobilizou covalentemente glucose oxidase em NPms, onde as partículas foram silanizadas com APTS e ativadas com glutaraldeído ³⁵. A modificação da superfície por silanização é um método muito comum na funcionalização de partículas ³⁶. Esta funcionalização aumenta assim o leque de possibilidades de aplicação das nanopartículas nas mais diversas áreas ²⁹.

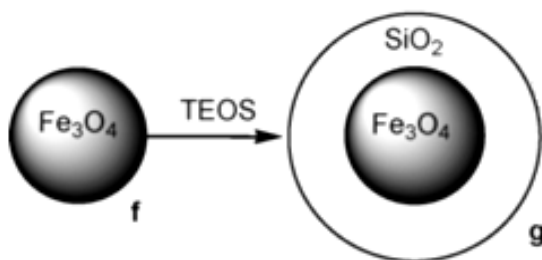


Figura 6: Representação esquemática da nanopartícula de magnetite revestida com sílica ³⁷.

1.4. A lacase

1.4.1. Propriedades gerais

A lacase (EC 1.10.3.2) é uma enzima que contém cobre com um peso molecular que varia entre 50-130 kDa e pertence ao grupo das oxidases sendo encontrada principalmente em fungos e plantas superiores. As reações de oxidação catalisadas pela lacase utilizam o oxigênio molecular como oxidante onde o oxigênio molecular é reduzido a H_2O ao mesmo tempo que o substrato é oxidado pela lacase (Figura 7) ³⁸. O primeiro registo de um estudo da lacase foi apresentado por Yoshida em 1883, posteriormente em 1985 a lacase foi caracterizada como uma oxidase contendo um metal, por Bertrand, o que faz com que a lacase seja uma das enzimas mais antigas já descritas ⁴.

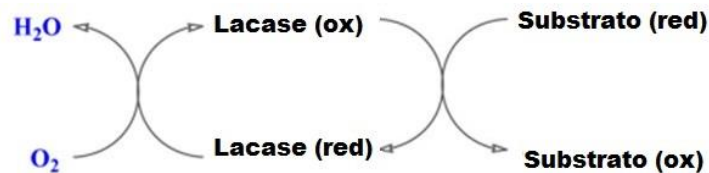


Figura 7: ciclo catalítico da lacase (Adaptado de Soloducho et al. (2013))³⁹.

Normalmente, o sítio ativo da lacase contém 4 átomos de cobre, os quais são distribuídos por três sítios. Estes sítios foram classificados em três tipos: **Tipo 1** ou sítio azul (**T1**); **Tipo 2** ou normal (**T2**) e o **Tipo 3** (**T3**) ou sítio de cobre binuclear, sendo este último sítio constituído por dois átomos de cobre antiferromagneticamente acoplados através de uma ponte hidroxilo ³⁸.

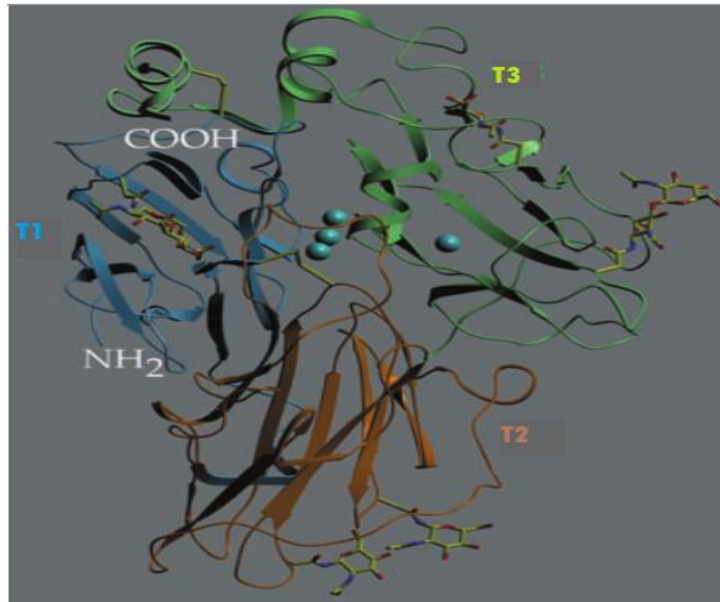
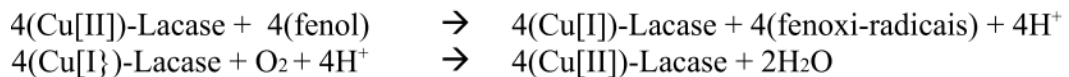


Figura 8: Estrutura 3D da lacase. Os três sítios (T1, T2 e T3) estão representados a cores diferentes. Os átomos de cobre são as esferas azuis e a porção de hidrato de carbono e pontes dissulfeto são os modelos em bola-e-bastão ⁴⁰.

A reação de oxidação da lacase com um substrato fenólico, geralmente ocorre com remoção de um elétron e formação de um radical fenoxil, conforme a equação química abaixo.



Pode-se referir de forma resumida que o ciclo catalítico da lacase envolve transferências coordenadas de elétrons entre os átomos de cobre. A estequiometria do ciclo envolve 4 Cu^{+2} (ligados a uma única proteína ou a cadeias proteicas acopladas), 4 substratos fenólicos, 4 H^+ e uma molécula de O_2 . A lacase nativa é constituída pelos seus 4 átomos de cobre com estado de oxidação +2. À medida que a enzima vai promovendo a oxidação de seus substratos, os átomos de cobre vão-se reduzindo e transferem os seus elétrons, para que o sítio **T1** esteja sempre disponível para promover a oxidação de um substrato, até a completa redução de todos os sítios ^{40,41}.

Foi demonstrado que todos os quatro íons de cobre da lacase são oxidados. Solomon et al. (1996) fizeram uma revisão do ciclo catalítico da lacase onde foi proposto que a velocidade de oxidação de substrato é dependente de seu potencial de redução. Isto implica que a transferência de elétrons a partir do substrato para o sítio **T1** (o recetor

primário de elétrons no substrato) é o passo determinante da velocidade de *turnover*. Solomon et al. (1996) sugeriram nesta revisão dois mecanismos possíveis: (A) depois de o substrato reduzir o sítio **T1** na “lacase nativa”, este transfere o seu elétron para o **T2** e em seguida volta a ficar reduzido; **T1** e **T2** transferem dois elétrons para o **T3**, o **T1** fica reduzido novamente; **T1** transfere o seu elétron para o **T2** e fica reduzido mais uma vez e por fim resultando na forma totalmente reduzida da enzima. (B) O arranjo trinuclear é sequencialmente reduzido em três etapas de transferência de um elétron do sítio **T1** ⁴².

A gama de substratos que as lacases podem oxidar é bastante extensa. Basicamente qualquer substrato fenólico com características similares a um p-difenol será oxidado pela lacase ⁴³. As lacases são caracterizadas por uma baixa especificidade de substrato e pela sua grande capacidade catalítica. Difenóis simples, tais como, a hidroquinona e catecóis são bons substratos para a maioria das lacases, mas guaiacol e 2,6-dimetoxifenol em geral são os melhores substratos. A lacase também é capaz de catalisar a oxidação de polifenóis, aminas aromáticas, diaminas ⁴⁴, tiofenóis e uma série de outros compostos ¹⁴.

Valores de constante de Michaelis-Menten (K_m) e constante catalítica (k_{cat}) de diferentes lacases podem variar muito para o mesmo substrato. A maior parte das lacases combinam a grande afinidade com o ABTS e siringaldazina com uma elevada constante catalítica. Baixos valores de K_m são específicos para a hidroquinona e os ácidos sinápico e siríngico, enquanto que valores de K_m relativamente elevados encontram-se para fenóis p-substituídos como o ácido vanílico e aldeído vanílico ³⁸.

Geralmente a curva da atividade da lacase em função do pH tem forma de sino, sendo que o pH ótimo das lacases é altamente dependente do substrato. Por exemplo quando se usa o ABTS como substrato o pH ótimo para a reação com a lacase é mais ácido situando-se na gama de valores entre 3.0 e 5.0 ⁴⁵.

A temperatura ótima da lacase pode variar muito com a sua origem. Lacase isolada de *Marasmius quercophilus* conseguiu ser estável durante 1 h a 60 °C ⁴⁵. Palmeiri et al. (1993) demonstrou que a lacase proveniente de *P. ostreatus* é ativa quase na totalidade à temperatura entre 40°C-60°C, com atividade máxima a 50°C. A atividade manteve-se inalterada após incubação prolongada por mais de 4 h à temperatura de 40 °C ⁴⁶.

Nyanhongo et al. (2002) mostrou que lacase produzida por *T. modesta* é totalmente ativa a pH 4 e à temperatura de 50 °C. A estabilidade máxima da lacase foi conseguida a pH 4.5 e à temperatura de 40 °C, sendo que o tempo de meia vida da enzima

decrece para valores de 120 minutos a temperaturas mais altas (60 °C) e 125 minutos a pH mais baixo (3) ⁴⁷.

A atividade das lacases é inibida por vários compostos orgânicos e inorgânicos ⁴⁸. Pequenos aniões inorgânicos, tais como, fluoreto, cloreto, azida e aniões de hidróxido podem ligar-se ao sítio **T2/T3** das lacases o que impede a transferência de eletrões a partir do sítio **T1** da enzima para o sítio **T2/T3** inibindo a atividade enzimática ⁴⁹. Alguns compostos orgânicos como o ditiotreitól, ácido tioglicólico, cisteína e azida de sódio também são considerados inibidores de lacases ³⁸. Johannes et al. (2000) testou vários inibidores em reações de oxidação com ABTS e 2,6-dimetoxifenol usando lacase proveniente de *T. versicolor*. Só o ião azida foi considerado como real inibidor enzimático da lacase usando ABTS como substrato ⁵⁰.

1.4.2. Aplicações da lacase

As enzimas fúngicas, em particular as lacases, são de grande interesse em processos biotecnológicos e químicos (Tabela 1). Por exemplo, na indústria do papel a tecnologia de branqueamento de pasta usando enzimas como a lacase, tem atraído especial atenção pela sua componente ambiental, como substituto aos oxidantes à base de cloro, que ainda são usados hoje em dia ⁴⁵. Uma das vantagens do uso da lacase em comparação com as peroxidases é o facto de que não necessitam de incluir peróxido de hidrogénio no seu ciclo catalítico, o que oferece maior estabilidade e capacidade de imobilização ⁴⁴.

Tabela 1: Potenciais aplicações da lacase na indústria

Potenciais aplicações	Referências
Deslinhificação da pasta da madeira na indústria de papel	Tavares et al. (2004) ⁵¹ Marques et al. (2010) ⁵² Gamelas et al. (2007) ⁵³
Biorremediação: -Tratamento de efluentes -Descoloração e desintoxicação de corantes têxteis. -Biorremediação de compostos xenobióticos.	Duran et al. (2000) ⁵⁴ Raghukumar et al. (2000) ⁵⁵ Abadulla et al. (2000) ⁵⁶ Cristóvão et al. (2012) ⁵⁷ Benzina O. (2013) ⁵⁸ Singhal et al. (2013) ⁵⁹ Kuddus et al. (2013) ⁶⁰
Produção de etanol	Larsson et al. (2001) ⁶¹ Alvira et al. (2013) ⁶²
Clarificação e estabilização do vinho	Servili et al. (2000) ⁶³

1.4.3. Imobilização da lacase

Dos primeiros registros da imobilização da lacase, consta o estudo de Shuttleworth e Bollag (1986) onde destacaram a lacase proveniente do fungo *Rhizoctonia praticola* como sendo capaz de reagir com 15 compostos fenólicos diferentes. A enzima foi imobilizada em celite através de interações covalentes apresentando 89% de rendimento de imobilização, contudo não foram observadas diferenças significativas entre as atividades relativas da enzima imobilizada em relação à enzima livre ⁶⁴. Posteriormente, a lacase de *T. versicolor* foi imobilizada por Leonowicz (1988) em pequenas esferas de

vidro poroso, que foram ativadas com 3-aminopropiltriétoxissilano e glutaraldeído. O suporte imobilizou 100% da enzima, onde 90% da atividade inicial foi conservada. Após imobilização, a enzima permaneceu ativa numa grande gama de valores de temperatura e de pH. A estabilidade térmica e a reutilização foram otimizadas em relação à lacase livre ⁶⁵. No estudo feito por Davis et al. (1992), a lacase foi imobilizada covalentemente em carvão ativado e foi utilizada no tratamento de efluentes. Trataram-se dois efluentes fenólicos neste estudo: (i) efluente de uma unidade de branqueamento de pasta de celulose; e (ii) efluente de uma unidade de limpeza de algodão através de fase com tratamento cáustico (efluente OH). A enzima foi imobilizada empregando-se quatro estratégias de imobilização. O maior valor de atividade foi obtido usando di-imidas para ativação dos grupos carboxilo no carbono. A atividade máxima registada foi alcançada com 11.5 mg_{lacase}/g_{carbono}. A quantidade máxima de proteína ligada foi de 42.85 mg/g_{carbono}. A lacase imobilizada em carbono (CIL) mostrou ser estável a valores de pH entre 4.0 e 9.0. CIL foi armazenada a 4°C e perdeu 38% da atividade nos primeiros 4 dias e 22% em 126 dias. A lacase imobilizada mostrou maior estabilidade a valores de pH mais baixos. Usando CIL conseguiu-se a remoção de cor dos dois efluentes usados ⁶⁶.

De modo a melhorar a estabilidade e aumentar as suas aplicações industriais, mais recentemente, a lacase tem sido imobilizada com sucesso em outros tipos de suporte como a quitosana ⁶⁷, sílica modificada ⁶⁸, material compósito celulose-poliamina ⁶⁹, alginato ⁷⁰, membranas de *nylon* ⁷¹, hidróxidos de alumínio ⁷² entre outros. Contudo a escolha de determinados suportes na imobilização pode ter desvantagens. Assim foram observados fenómenos de dessorção da enzima do suporte usando alginato e membranas de *nylon* como suporte de imobilização ⁷³.

O estudo de novos materiais tem proporcionado uma grande evolução nas características de suportes para a imobilização da lacase. Neste contexto, Qiu et al. (2009) estudaram a imobilização da lacase usando como suporte nanopartículas porosas de ouro (NPG). Utilizaram-se três estratégias de imobilização, nomeadamente adsorção física, atrações electrostáticas e interações covalentes. Fez-se um estudo comparativo detalhado entre as três estratégias a nível de atividade específica e escape de enzima. O estudo indicou que a adsorção física é a melhor estratégia de imobilização em NPG. Também foi estudada a relação entre o tamanho da partícula e a imobilização e concluiu-se que com a diminuição do tamanho da partícula, mais lacase pode aceder aos poros internos e ser imobilizada. Os estudos cinéticos mostraram que o NPG não só favoreceu a transferência

de massa do substrato e oxidação do produto, como também promoveu a exposição dos sítios ativos da lacase imobilizada, aumentando a sua eficiência catalítica ⁷⁴.

A imobilização da lacase em NPM também é relativamente recente. Jiang et al. (2005) prepararam microsferas de quitosana magnética usando glutaraldeído como agente bifuncional para a imobilização de lacase proveniente de *Pycnopus sanguineus*. Foram investigadas as condições de imobilização e fez-se a caracterização da enzima imobilizada. A lacase imobilizada exibiu a atividade máxima a pH 3.0 e a temperatura ótima foi 10 °C e 55 °C. Os parâmetros cinéticos, K_m e V_{max} , determinados foram 171.1 μM e 5.9 mmol/min, respetivamente. As estabilidades de armazenamento, térmica e operacional da enzima foram bastante melhoradas após a imobilização na superfície das partículas da quitosana magnética ⁷⁵.

Um dos suportes magnéticos mais utilizado é a magnetite (Fe_3O_4). Isto devido ao facto de a magnetite possuir uma maior magnetização de saturação e suscetibilidade, o que significa que a magnetite satura-se a campos magnéticos mais baixos. Porém, partículas de magnetite com tamanhos menores do que 8 nm são bastante difíceis de estabilizar podendo ser oxidadas, originando misturas de óxidos com menor cristalinidade e resposta à magnetização ⁷. Assim tem sido utilizado um revestimento com SiO_2 , de modo a evitar a exposição parcial da magnetite e deste modo evitar a agregação das partículas³⁷. Assim, Zheng et al. (2012) imobilizaram lacase em partículas de Fe_3O_4 revestida com sílica e funcionalizada com APTES conseguindo uma recuperação de atividade máxima de 83.9 %. Registraram uma melhoria significativa na estabilidade térmica e operacional da enzima imobilizada e demonstraram aplicabilidade oxidando dois compostos fenólicos, o 2,4-diclorofenol e 4-clorofenol com taxas de remoção de 80.9% e 64.2%, respetivamente ⁷⁶.

Nanopartículas de sílica magnética mesoporosa foram sintetizadas por Wang et al. (2010) usando TEOS como fonte de sílica de modo a formarem um quelato com Cu^{2+} . Este quelato demonstrou grande capacidade de adsorção, com um valor de 98.1 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ e uma recuperação de atividade da lacase de 92.5%. A constante de K_m e k_{cat} da reação usando-se lacase imobilizada foram 3.28 mM e 155.4 min^{-1} , respetivamente. A estabilidade de armazenamento e a resistência à temperatura da lacase imobilizada em MMSNPs- Cu^{2+} aumentaram significativamente, e a lacase reteve 86.6% da atividade inicial após 10 reações sucessivas, usando separação magnética ⁷⁷.

Kalkan et al. (2012) imobilizaram lacase de *T. versicolor* em nanopartículas de magnetite revestidas e funcionalizadas com quitosana ($\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-CS}$) por ligação covalente.

Os grupos hidroxilo da quitosana foram ativados com carbodi-imida. Foram estudados os parâmetros cinéticos, o pH e a temperatura ótimos, na lacase livre e imobilizada, assim como a variação de atividade da enzima após ciclos de reutilização. Os resultados demonstraram que a lacase imobilizada retém 71% da atividade inicial após 30 ciclos de reação ⁷⁸.

Recentemente Wang et al. (2013) estudaram a imobilização da lacase por coordenação através da formação de um quelato Cu^{2+} em partículas de sílica magnética empregando poliacrilamida como ligante quelante metálico. Foram avaliados com sucesso as propriedades enzimáticas da lacase imobilizada e a capacidade catalítica para a degradação de 2,4-diclorofenol. Os resultados mostraram que a lacase imobilizada apresenta atividade enzimática máxima, em condições de imobilização de pH de 4.0 a 5 °C por 1h. A concentração ótima de lacase foi 20 mg/g_{suporte}. A estabilidade térmica e a resistência da lacase a meios ácidos aumentou. Atividades mais elevadas da lacase imobilizada foram obtidas em intervalos de pH de 2.0 e 3.5 e temperaturas de 25 a 40 °C ⁷⁹.

A perda de atividade tem sido um dos problemas a resolver na imobilização da lacase. Esta perda está associada a muitos fatores envolvendo a enzima, a matriz ou o suporte onde se encontra imobilizada, os reagentes usados na reação e as condições do processo, pelo que o desenvolvimento de novas técnicas que melhorem a imobilização da lacase é uma área de grande interesse a ser mais explorada.

1.4.4. Aplicações da lacase imobilizada

1.4.4.1. Aplicações ambientais

É do consenso geral que as substâncias xenobióticas estão a tornar-se cada vez mais um problema no tratamento de água e efluentes. A razão de serem tão problemáticas reside no facto de muitas vezes serem compostos novos que muitas vezes são resistentes à degradação por métodos convencionais químicos ou biológicos. A biorremediação com lacase pode ser considerada uma alternativa, visto que esta enzima é capaz de oxidar uma grande variedade de compostos xenobióticos. Visto que a imobilização da lacase permite o seu uso, à escala industrial, pela grande estabilidade operacional e durabilidade da enzima, alguns estudos tem sido feitos no sentido de otimizar este processo (Tabela 2).

Uma das indústrias alvo com problemas de biorremediação tem sido a indústria têxtil que é responsável por grande parte do mercado de corantes. Os efluentes desta indústria são controlados pelas normas governamentais devido às implicações ambientais associadas. Assim o desenvolvimento de processos baseados em lacases, é de especial interesse, devido ao seu potencial de degradação de diferentes tipos de corantes. Contudo, ainda existem desvantagens do uso de lacase em processos industriais, onde se inclui o não reaproveitamento da enzima. Neste sentido, a imobilização de lacase poderá ser usada no tratamento de corantes, uma vez que o reuso da enzima reduz os custos do processo⁸⁰. Têm sido feitos extensivos estudos de modo a alargar o leque de aplicações da lacase imobilizada nesta área (Tabela 3).

Além da aplicação da lacase imobilizada no tratamento de efluentes da indústria têxtil, a lacase imobilizada também pode ter outras aplicações na área têxtil. Assim, Ibrahim et al. (2007) imobilizou lacase de Denilite II S (Novozymes) em tecidos de algodão. A adsorção da lacase foi conseguida através de ligações éster e quelato de cobre. O tecido modificado apresentou propriedades antimicrobianas contra bactérias e fungos que se mantiveram após vários ciclos de lavagem⁸¹.

Tabela 2: Aplicações da lacase imobilizada no tratamento de efluentes

Lacase	Suporte/ métodos	Poluente	Resultados	Referencia
<i>T. versicolor</i>	Kaolinite; suporte silanizado por 3-aminopropiltrióxido de silano e ativado com glutaraldeído	PAH ¹⁾ :Antraceno; Benzo(a)pireno (BaP);	Estabilidade térmica, pH e de armazenamento da lacase foi melhorada; eficiência da enzima imobilizada igual à eficiência da enzima livre; eficiência de oxidação de PAH de 80%	Dodor et al. 2004 ⁸²
<i>T. versicolor</i>	Nanopartículas de sílica mesoporosa e kaolinite; imobilização covalente: suporte silanizado por 3-aminopropiltrióxido de silano e ativado com glutaraldeído; adsorção física	BaP	Após ciclos de reação de 48h a lacase imobilizada covalentemente em kaolinite apresentou maior eficiência de oxidação, com um resíduo de 23% de BaP; estabilidade térmica e pH da lacase imobilizada melhoraram	Hu et al. 2007 ⁸³
<i>T. versicolor</i>	Imobilização por adsorção em filmes de poli-hidroxietilmetacrilato p(HEMA); ativação dos grupos hidroxilos do p(HEMA) por brominação	Fenol; p-clorofenol; anilina	Atividade recuperada da lacase imobilizada de 71% no filme; Degradação de 72% de fenol, 81% de p-clorofenol e 58% de anilina num ciclo de 10h	Bayramoğlu et al. 2009 ⁸⁴
<i>T. versicolor</i>	Sílica mesoporosa (SB-15) com grupo aminopropil e aminobutil; imobilização por adsorção física e ligação covalente. Sílica funcionalizada com grupos aldeído e ativada com glutaraldeído	Naftaleno	Adsorção física parcialmente reversível; parcial escape de enzima do suporte; enzima ligada covalentemente com eficiência catalítica na degradação de naftaleno, com valores de 35%wt para aminopropil e 39%wt para aminobutil de em ciclo de 5h	Fernando et al. 2010 ⁸⁵
<i>T. versicolor</i>	Imobilização por coordenação em partículas de sílica magnéticas com quelato Cu ²⁺ empregando poliácridamida como ligante quelante metálico	2,4-diclorofenol	Após ciclo de 12h, eficiência de remoção de 91.47%; eficiência de remoção acima de 70% após seis ciclos consecutivos. Estabilidade da lacase imobilizada melhorada	Wang et al. 2013 ⁷⁹

¹⁾ Hidrocarbonetos aromáticos policíclicos

Tabela 3: Aplicações da lacase imobilizada no tratamento de efluentes da indústria têxtil

Fonte da lacase	Suporte/ métodos	Corante	Principais Resultados	Referência
<i>T. hirsuta</i>	Partículas de alumina silanizadas com APTES e ativadas com glutaraldeído; ligação covalente; enzima revestida com PAH ¹ e PSS ²	Verde de metilo ; azul brilhante de remazol (RBBR)	Imobilizou-se 68% de lacase; lacase revestida apresentou maior atividade; o corante MG teve uma taxa de descoloração maior do que o RBBR	Rodríguez et al. 2007 ⁸⁶
Lacase comercial (DeniliteII)	Pérolas de alginato/gelatina com Polietilenoglicol (PEG); ativadas com glutaraldeído; imobilização covalente	Vermelho de Remazol	Corante com concentração 50 mg/L, foi descolorada a 50% após 10 ciclos de reação; estabilidade térmica e de pH da lacase imobilizada foram melhoradas	Wang et al. 2008 ⁸⁷
<i>Pleurotus ostreatus</i>	Resina acrílica, com grupos epóxi: EUPERGIT C 250L [®] ; os grupos epóxi reagiram com os grupos amino, tióis e carboxilos da lacase.	RBBR	Rendimento de imobilização baixo de 7%; Estabilidade da lacase imobilizada melhorada	Russo et al. 2010 ⁸⁸
Lacase comercial (DeniliteII)	Fibra da casca de coco verde; imobilização por adsorção	Preto reativo 5 (RB5); preto remazol B; azul reativo 114; azul brilhante Levafix; amarelo reativo 15; vermelho reativo 180	Descoloração de quase todos os corantes nos primeiros 2 ciclos de reação; adsorção de corantes no suporte limita algumas conclusões	Cristóvão et al. 2011 ⁸⁹
<i>Corioloopsis gallica</i> ; <i>Bjerkandera adusta</i> ; <i>T. versicolor</i> <i>T. trogii</i>	Aprisionamento em esferas de alginato/cálcio	Cinzento de Lanaset G	Descoloração de 88.7%, 89.3%, 82.1% e 81.3% usando <i>C. gallica</i> ; <i>B. adusta</i> ; <i>T. versicolor</i> e <i>T. trogii</i> , respetivamente após 3 ciclos de descloração valore de descoloração decresceram para 75%, 70%, 60% e 68%	Daâssi et al. 2013 ⁹⁰
<i>Corioloopsis gallica</i>	Aprisionamento em esferas de alginato/cálcio	RBBR; RB5; castanho Bismark; Lanaset	Estabilidade térmica e de armazenamento melhorada com a imobilização; descoloração eficiente da maioria dos corantes por parte de lacase imobilizada	Daâssi et al. 2014 ⁹¹

¹⁾ Hidrocloro de Polialilamina

²⁾ poli (4-estireno sulfonato de sódio)

1.4.4.2. Células de combustível

As células de combustível biológico costumam ser sistemas eletrônicos baseados em processos enzimáticos usando enzimas para catalisar a oxidação de biomassa de modo a gerar energia. Como resultado, são excelentes alternativas ao combustível convencional. Geralmente costuma-se usar o oxigênio molecular como recetor de elétrons nos compartimentos catódicos das células, por causa da sua disponibilidade e por ser um bom oxidante. Visto que a lacase pode reduzir o oxigênio a água, saltando o passo da formação do intermediário peróxido de hidrogênio, a aplicação dessa enzima no ramo da produção de eletricidade é bastante promissora. A imobilização de lacase na superfície de um eletrodo é essencial para a eficiência e estabilidade de um sistema catalítico usado como célula de combustível. Esta imobilização tem de cumprir alguns requisitos onde incluem a retenção da enzima no eletrodo, a estabilidade enzimática e uma rápida transferência de elétrons. Têm sido estudados vários métodos e suportes para a imobilização de lacase de modo a ser usada como célula de combustível. Nogala et al. (2006) projetaram um eletrodo voltamétrico cerâmico de carbono, com lacase de *C. unicolor* e ABTS depositados na superfície. A enzima e o mediador foram encapsulados em duas matrizes diferentes de silicato: filme de tetrametoxisilano hidrofílico e metiltrimetoxisilano. Este novo eletrodo apresentou atividade eletrocatalítica e imobilização estável de enzima e mediador⁹². Khani et al. (2006) desenvolveram esferas de alginato/carbono de modo a obter uma matriz biocompatível para a encapsulação de lacase de *T. versicolor* e glucose oxidase para aplicação como célula de biocombustível. 2/3 de ambas as enzimas foram encapsulados, com a lacase com um rendimento de imobilização de 80%. Os parâmetros foram similares aos da enzima livre, demonstrando que não havia limitações difusionais nas esferas⁷⁰. Lacase de *T. hirsuta* foi covalentemente imobilizada por Vaz-Dominguez et al. (2008) em eletrodos de grafite de baixa densidade, modificados com camadas de 2-aminofenol e aminofenil. Foram efetuadas ligações éster entre os grupos carboxilatos da enzima e os grupos amina na superfície do eletrodo. A transferência direta de elétrons foi eficiente, produzindo um biocátodo estável e resistente ao cloro⁹³. O desenvolvimento dos nanomateriais abriu fronteiras também nesta área, assim, Tan et al. (2009) estudaram a imobilização covalente da lacase de *T. versicolor* num eletrodo de nanotubos de carbono revestidos com quitosana modificada com glutaraldeído. A célula de combustível estudada exibiu uma

densidade de potência de $9.6 \mu\text{W}\cdot\text{cm}^{-2}$, diferença de potencial de 0.19 V e uma intensidade de $114 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ ⁹⁴. Nanotubos de carbono foram também testados na imobilização por Pang et al. (2010). A funcionalização foi feita com 1-aminopireno e imobilizadas com lacase de *T. versicolor* usando glutaraldeído. A lacase imobilizada nestes nanotubos demonstrou maior atividade eletrocatalítica e estabilidade do que a lacase imobilizada em nanotubos de carbono puro (pristina)⁹⁵. Recentemente, e pela primeira vez Ardhaoui et al. (2013) testou a funcionalização de elétrodos de grafite usando um *jet* de plasma à pressão atmosférica, de modo a serem aplicados como células de combustível. A lacase de *T. versicolor* foi imobilizada por dois métodos: adsorção física e ligação covalente. A maior atividade foi verificada com a lacase imobilizada covalentemente com uma densidade de corrente de $108 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ ⁹⁶.

1.4.4.3. Biosensores

Os biosensores têm vindo a ganhar importância na química analítica pela capacidade de detetar analitos de forma barata, rápida, precisa e seletiva. Os biosensores eletroquímicos são normalmente baseados na troca de eletrões que ocorre numa reação de catálise enzimática. O analito alvo faz parte da reação que geralmente ocorre na superfície ativa do elétrodo, e os iões produzidos criam um potencial, que é subtraído ao potencial criado pelo elétrodo de referência, de modo a conseguir-se um sinal mensurável. De modo a evitar fuga de enzima, a enzima imobilizada tem de estar firmemente ligada ao elétrodo. Biosensores baseados em lacases possuem um interesse especial quando usados na deteção de compostos fenólicos na indústria alimentar, no tratamento de efluentes e aplicações na biomedicina.

Quan et al. (2004a) imobilizaram lacase comercial (DeniLite) na superfície dum elétrodo silanizado de platina que detetou ABTS, p-fenilenodiamina e p-aminofenol com sensibilidades de 75, 330 e 385 nA/ μM em intervalos de 0.6–15, 0.14–29 e 0.12–22 μM , respetivamente. As principais vantagens concluídas deste estudo foram a resposta rápida e estável do elétrodo, resultante da afinidade entre a lacase e os substratos usados⁹⁷.

Alguns biosensores têm sido projetados como sistemas bi-enzimáticos, onde a lacase é imobilizada em modo cooperativo com outras enzimas. Quan et al. (2004b) imobilizaram covalentemente lacase e tirosinase num elétrodo de platina, resultando num aumento de sensibilidade de 70% na deteção de fenilenodiamina⁹⁸.

Kirgöz et al. (2005) desenvolveram um novo biosensor, imobilizando covalentemente, lacase na superfície dum filme fino de mercúrio, sobre um eléctrodo de carbono vítreo e usaram como agente bifuncional o glutaraldeído. Foram detetados catecol e fenol na gama de concentrações de micromolar μM ⁹⁹. Portaccio et al. (2006) imobilizaram lacase de *T. versicolor* por adsorção e ligação covalente a um eléctrodo de grafite. A grafite foi tratada com ácido nítrico e os agentes bifuncionais usados foram hexametilenodiamina e glutaraldeído. Os eléctrodos com lacase imobilizada por ligações covalentes apresentaram maior sensibilidade. A gama de pH, no qual a resposta foi máxima, foi de 4.25–5.5, o que permite a aplicação direta deste biosensor no tratamento de efluentes industriais e agrícolas¹⁰⁰.

Tem sido usado material magnético em vários estudos, que combinados com outros eléctrodos, à base de carbono, projetam diferentes biosensores. Zhang et al. (2007) imobilizaram lacase covalentemente usando nanopartículas de ferrite com revestimento de sílica ($\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2$) e glutaraldeído. Por sua vez, essas bio-nanopartículas foram imobilizadas na superfície de um eléctrodo de carbono vítreo de modo a detetar hidroquinona. A gama de concentrações detetadas foi de 1×10^{-7} a 1.375×10^{-4} M com um limite de deteção de 1.5×10^{-8} M. Este biosensor apresentou boa estabilidade e seletividade¹⁰¹. NPM revestidas com sílica ($\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2$) num eléctrodo de carbono também foram usadas por Tang et al. (2008) como biosensor de catecol. Em outro estudo, lacase foi imobilizada covalentemente em nanopartículas funcionalizadas com Aminopropiltriétoxissilano (APTES) e ativadas com glutaraldeído. A gama de concentração detetada foi de 7.5×10^{-7} to 2.75×10^{-4} M, com um limite de deteção de 7.5×10^{-7} M¹⁰². Recentemente, Fu et al. (2014) fizeram um estudo comparativo de biosensores com lacase imobilizada em nanofibras de carbono (CNFs) e com nanofibras compostas de cobre/carbono (Cu/CNFs). Essas fibras seriam posteriormente imobilizadas em carbono vítreo. Os resultados amperimétricos indicaram que o eléctrodo com lacase imobilizada em Cu/CNFs possui resultados analíticos mais precisos para a deteção de catecol, com sensibilidade de $33.1 \mu\text{A}/\text{mM}$. A gama de concentração detetada é maior, com um valor de 9.95×10^{-6} a 9.76×10^{-3} M e limite de deteção de $1.18 \mu\text{M}$. O eléctrodo apresentou boa reprodutibilidade, seletividade e estabilidade, revelando com potencial para aplicação na área de biosensores¹⁰³.

2. Materiais e Métodos

2.1. Materiais

Reagentes

Glutaraldeído da Sigma-Aldrich 50% (v/v); ABTS (2,2' – azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico) sal de diamónio (98%) da Sigma-Aldrich.

Enzima: Lacase comercial (Novozym® 51003; 1000 LAMU.g⁻¹) gentilmente fornecida pela Novozymes (Denmark).

Tampões: 0.05 M citrato/0.1 M fosfato (pH 4.5); 0.05 M fosfato monossódico/0.1 M fosfato dissódico (pH 6.5); 0.1 M carbonato (pH 8.5).

Suporte de imobilização

Neste trabalho foram usadas como suporte, nanopartículas de magnetite, com tamanho médio 10-12 nm. As partículas foram amavelmente preparadas e cedidas pela Doutora Ana Luísa Silva CICECO, UA. A preparação das nanopartículas incluiu 3 fases, sendo que numa primeira fase o núcleo magnético do óxido de ferro (magnetite – Fe₃O₄) foi sintetizado por co-precipitação dos iões Fe²⁺ e Fe³⁺ em meio alcalino, utilizando como sais de partida FeCl₂.4H₂O e FeCl₃.6H₂O. Em seguida revestiu-se as partículas com uma capa de sílica amorfa (SiO₂) seguindo uma versão modificada do método descrito por Bumb et al. (2008) ¹⁰⁴, onde se efetuou a reação de hidrólise do TEOS em condições alcalinas usando trietilamina como catalisador. Numa última fase, a superfície das nanopartículas de magnetite revestidas com sílica (Fe₃O₄-SiO₂) foi funcionalizada com grupos amina usando 3-aminopropil-trietoxissilano ¹⁰⁵.

De modo a ativar o suporte preparou-se a solução de glutaraldeído 5% (v/v) diluindo uma solução de 50% (v/v) em tampão fosfato 50 mM (pH 7.0). Pesou-se 50.0 mg de nanopartículas que foram adicionadas em 2.500 mL de solução de glutaraldeído a 5% (v/v) em constante agitação (*rotational shaker Stuart*® SB3 Rotator, Bibby Sterilin Ltd., UK), por um período de 2h. Após decantação magnética usando um íman de

neodímio, fez-se 3 lavagens das partículas com tampão fosfato 50 mM (pH 7.0). A secagem das partículas foi efetuada em estufa a 40°C durante 12h.

2.2. Imobilização da lacase

Amostras de nanopartículas de magnetite com massa média de 4.000 mg foram postas em contato com 1.000 mL de solução enzimática, à temperatura ambiente com a solução tampão adequada e sob agitação constante a 40 rpm (*rotational shaker Stuart*[®] SB3 Rotator, Bibby Sterilin Ltd., UK). A imobilização foi efetuada utilizando diferentes concentrações de enzima (0.03, 0.10 e 0.17 $\mu\text{L}/\text{mL}$), valores de pH (pH 4.5: tampão 0.05 M citrato/0.1 M fosfato; pH 6.5: tampão 0.05 M fosfato monossódico/0.1 M fosfato dissódico e pH 8.5: tampão 0.1 M carbonato) e tempos de contato (1.0, 2.0 e 3.0 h) de modo a otimizar o processo de imobilização conforme apresentado no planeamento experimental da Tabela 4. Subsequentemente, e após decantação magnética usando um íman de neodímio (Figura 9), as nanopartículas com a enzima imobilizada foram lavadas 3 vezes com a respetiva solução tampão.

A imobilização da lacase de modo efetuar os estudos da estabilidade térmica, cinética enzimática e estabilidade operacional da enzima imobilizada foi feita com concentração de enzima de 0.17 $\mu\text{L}/\text{mL}$, pH de 8.5 e tempo de contato de 3h.

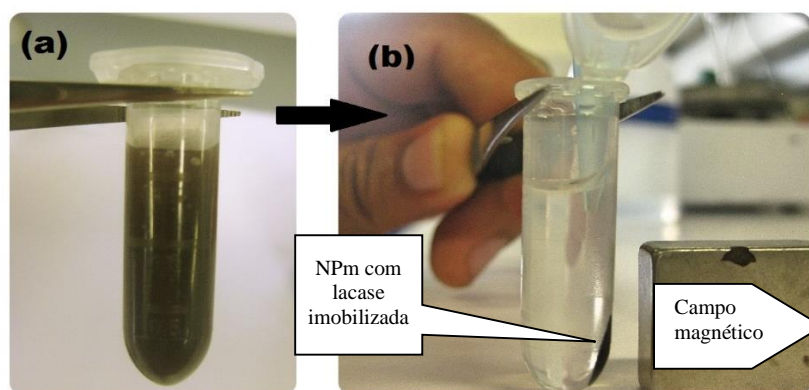


Figura 9: Metodologia de imobilização da lacase: (a) NPM em contato com solução enzimática; (b) lavagem das NPms usando a decantação magnética.

2.3. Medição da atividade

A atividade da lacase livre foi determinada de acordo com o método colorimétrico descrito por Ander e Mesner¹⁰⁶. A atividade enzimática foi medida no espectrofotômetro UV-visível (UV mini-1240, Shimadzu Co., Japão) usando como substrato o ABTS 0.4 mM em tampão citrato 0.050 M/fosfato 0.10 M (pH 4.5). A reação foi iniciada adicionando 0.100 mL de enzima a 0.500 mL de solução de ABTS em 1.400 mL de tampão citrato (pH 4.5) previamente termostatizado a 40 °C, perfazendo um total de 2.000 mL dentro da célula. A medição de absorvência em função do tempo foi feita a um comprimento de onda de 420 nm ($\epsilon = 3.6 \times 10^4 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$) e a atividade catalítica foi determinada calculando o declive da parte inicial linear do gráfico da absorvência em função do tempo.

Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para oxidar 1 μmol de ABTS por minuto, e a atividade de lacase livre foi expressa em U.L^{-1} . De modo a converter Abs/s em U.L^{-1} efetuou-se o cálculo usando a equação Eq.(1):

$$\frac{U}{L} = \frac{\Delta\text{Abs}/\text{min} \times 60 \times f_{dil} \times 10^6}{\epsilon} \quad (1)$$

Onde,

$\Delta\text{Abs}/\text{min}$: valor medido pelo espectrofotômetro;

60: fator de conversão de segundo para minuto;

f_{dil} : fator de diluição;

10^6 : fator de conversão de mol para μmol .

De modo a determinar a atividade da enzima imobilizada, amostras de enzima imobilizada em nanopartículas, que foram previamente pesadas com massa média de 4.000 mg, foram adicionadas a uma solução com 7.00 mL de solução tampão citrato 0.05 M/fosfato 0.1 (pH 4.5) a 40 °C e 2.5 mL de ABTS 1.6 mM, sob agitação constante. Foram retiradas amostras da mistura reacional para medição de absorvência no espectrofotômetro UV-visível (UV mini-1240, Shimadzu Co., Japão) a 420 nm ($\epsilon = 3.6 \times 10^4 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$) por um período de 6-7 min, com intervalos de 1 minuto entre cada medição. De modo a fazer a leitura espectrofotométrica sem interferência das NPms em suspensão, realizou-se uma decantação magnética das partículas, através do contato entre

a cuvete e o íman de neodímio. Calculou-se o declive correspondente à velocidade inicial e apresentou-se a atividade da lacase imobilizada em U.g⁻¹ (unidade de atividade enzimática por grama de suporte) usando a Eq. (2):

$$\frac{U}{g} = \frac{\Delta Abs/min \times V_{reação} \times f_{dil} \times 10^6}{\varepsilon \times m_{suporte}} \quad (2)$$

Onde,

$\Delta Abs/min$: valor medido pelo espectrofotómetro;

$m_{suporte}$: massa de suporte com a enzima imobilizada (g);

f_{dil} : fator de diluição;

10^6 : fator de conversão de mol para μmol ;

$V_{reação}$: volume de reação (mL).

Usou-se a recuperação da atividade da enzima imobilizada como medida de imobilização. A recuperação de atividade (R) foi definida como a atividade aparente da lacase imobilizada, a dividir pela atividade teórica máxima possível, ou seja, a atividade teórica conseguida se toda a lacase estivesse ligada ao suporte. A atividade teórica foi calculada pela diferença entre a atividade inicial e a atividade no sobrenadante após a imobilização¹⁰⁷. A atividade teórica da lacase imobilizada foi posteriormente convertida em U.g⁻¹ usando um fator de conversão de 250 mL.mg⁻¹, levando em conta a razão entre o volume de imobilização (1.000 mL) e o peso médio do suporte (4.000 mg).

A recuperação de atividade foi calculada pela Eq. (3)⁷³.

$$R(\%) = \left(\frac{A_i}{A_f} \right) \times 100 \quad (3)$$

Onde R é a atividade recuperada da enzima imobilizada (%), A_i é a atividade da enzima imobilizada (U.g⁻¹) e A_f é a atividade teórica da enzima imobilizada (U.g⁻¹).

2.4. Planejamento experimental e análise estatística

O processo de imobilização da lacase em partículas magnéticas funcionalizadas foi otimizado através do planejamento experimental Box-Behnken. O planejamento *Box-Behnken* (PBB) e a superfície de resposta (RSM) exigem três níveis codificados: -1, 0 e 1 que são traduzidos em valores reais ¹⁰⁸, conforme demonstrado na Tabela 4. As variáveis independentes definidas, de modo a otimizar o processo de imobilização, foram a concentração da enzima (X_1), o pH (X_2) e o tempo de contacto (X_3). Estas variáveis foram escolhidas pela relevância que apresentam no processo de imobilização. A recuperação de atividade da enzima imobilizada é a variável de resposta (Y) dos ensaios experimentais. Previamente foram efetuadas algumas experiências preliminares de modo a definirem-se intervalos de valores a explorar das variáveis independentes.

Tabela 4: Níveis codificados e reais das variáveis independentes na aplicação do planejamento Box-Behnken na imobilização da lacase em partículas magnéticas.

Variável independente	Símbolo	Nível codificado		
		-1	0	+1
Concentração da enzima ($\mu\text{L.L}^{-1}$)	X_1	0.03	0.1	1.7
pH	X_2	4.5	6.5	7.5
Tempo de contato (h)	X_3	1.0	2.0	3.0

Uma vez realizados os ensaios experimentais, usaram-se os recursos computacionais do programa *Design-Expert 7.01* (Stat-Ease, Inc, Minneapolis, MN, USA) para ajustar os dados experimentais a um modelo polinomial de regressão quadrática e relacionar as variáveis independentes e as dependentes, Eq.(4).

$$Y = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + b_3X_3 + b_{12}X_1X_2 + b_{13}X_1X_3 + b_{23}X_2X_3 + b_{11}X_1^2 + b_{22}X_2^2 + b_{33}X_3^2 \quad (4)$$

Onde Y é a resposta (variável dependente), X_1 , X_2 e X_3 são as variáveis independentes em estudo, b_0 é o termo independente, b_1 , b_2 , b_3 são os coeficientes dos termos lineares e b_{11} , b_{22} e b_{33} são os coeficientes dos termos de efeito quadrático entre as variáveis. A partir dos dados experimentais, realizou-se uma análise da variância (ANOVA) e determinaram-se os coeficientes de regressão usando o programa *design-expert 7.01* (Stat-Ease, Inc, Minneapolis, MN, USA). Em seguida e de modo a descrever os efeitos individuais e cumulativos das variáveis independentes, na resposta, a equação polinomial ajustada foi representada graficamente como superfície de resposta. Depois de definir as condições de cálculo, de modo a maximizar a recuperação de atividade da enzima imobilizada, o programa *Design-Expert 7.01* usou um método de otimização desenvolvido por Derringer e Suich, e descrito por Myers e Montgomery¹⁰⁹ de modo a selecionar os valores considerados ótimos.

2.5. Estabilidade térmica: Cinética da inativação térmica da lacase livre e imobilizada

Efetuuou-se o estudo da estabilidade térmica da lacase na forma livre e na forma imobilizada a 60 °C. Assim, estudou-se a cinética de inativação térmica da lacase livre incubando durante aproximadamente 6 horas uma solução de lacase com concentração de enzima de 0.17 $\mu\text{L}/\text{mL}$ em tampão carbonato 0.1 M (pH 8.5), num banho termostaticado a 60 °C. Foram retiradas amostras ao longo do tempo de forma a medir a atividade da lacase pelo método colorimétrico já descrito.

A estabilidade térmica da lacase imobilizada foi testada incubando Eppendorfs com enzima imobilizada, em banho termostaticado a 60°C. Para medir a atividade da lacase ao longo do tempo, retirou-se um Eppendorf de cada vez e mediu-se a atividade de acordo com o procedimento acima descrito. A atividade relativa (%) foi definida como a razão entre a atividade da enzima num determinado tempo e a atividade inicial ($t = 0 \text{ h}$).

A análise dos dados experimentais foi feita por um ajuste não linear dos pontos, usando o programa CurveExpert v.1.3. O cálculo dos parâmetros da inativação térmica foi efetuado de acordo com o modelo matemático introduzido por Henley e Sandana (1984) e aplicado por Arroyo et al. (1999)¹¹⁰. O modelo descrito por Arroyo consiste num modelo de duplo decaimento exponencial de primeira ordem:



$$A = \left[100 + \frac{\alpha_1 k_1}{k_2 - k_1} - \frac{\alpha_2 k_2}{k_2 - k_1} \right] e^{-k_1 t} + \left[\frac{\alpha_2 k_1}{k_2 - k_1} - \frac{\alpha_1 k_1}{k_2 - k_1} \right] e^{-k_2 t} + \alpha_2 \quad (6)$$

Este modelo envolve os estados enzimáticos (E, E₁, e E₂), sendo k_1 e k_2 as constantes de inativação de primeira ordem (Eq. (5)). Na Eq. (6), A representa a atividade residual da enzima, α_1 e α_2 são as razões entre as atividades específicas das formas intermediárias e iniciais da enzima (E₁/E) e (E₂/E), respetivamente, sendo que o parâmetro α_1 também é uma medida que define o nível de atividade enzimática constante que é observada no fim do ensaio da inativação ¹¹¹, k_1 e k_2 são as constantes de inativação de primeira ordem e t o tempo. Na análise dos dados obtidos, considerou-se que a enzima pode sofrer somente uma transição conformacional devido à temperatura usada neste estudo. Assim, neste trabalho utilizou-se o modelo que corresponde a uma inativação que respeita um único decaimento exponencial (Eq. (8)) ou seja $\alpha_2 = 0$ e $k_2 = 0$. Isto resulta na equação simplificada proposta por Ladero et al. (2006) ¹¹².



$$A = [100 - \alpha] \cdot e^{-kt} + \alpha \quad (8)$$

Onde A é outra vez a atividade residual da enzima, α ($\alpha = \alpha_1$ na Eq. (6)) é a razão entre as atividades específicas E₁/E, k a constante de inativação e t o tempo. Conhecendo o valor dos parâmetros cinéticos, determinou-se o tempo de meia vida ($t_{1/2}$) considerando $A = 50\%$.

2.6. Estudo da cinética enzimática

Estudou-se a cinética da reação enzimática com a lacase livre e imobilizada através do método das velocidades iniciais usando o ABTS como substrato. A reação da enzima livre foi testada num intervalo de concentrações entre 0.01 e 0.3 mM. A velocidade inicial da reação foi seguida por colorimetria e calculada durante o primeiro minuto.

O estudo da cinética da reação com a lacase imobilizada fez-se a 40°C, num copo em agitação constante, onde se misturou 2.50 mL de ABTS em 7.000 mL de tampão citrato 0.050 M/fosfato 0.10 M (pH 4.5) com enzima imobilizada em 4.000 mg de nanopartículas. Retiraram-se amostras de 1 mL ao longo do tempo e mediu-se a absorvência da solução reacional. As concentrações de ABTS testadas variaram de 0.01 a 0.95 mM. Os dados experimentais foram ajustados à equação de Michaelis-Menten¹¹³ (Eq. (9)) e os valores dos parâmetros cinéticos da enzima livre e imobilizada foram obtidos através da regressão não linear das velocidades iniciais de reação em função da concentração do substrato, usando o programa CurveExpert 1.3.

$$V = \frac{V_{max}[S]}{K_M + [S]} \quad (9)$$

Onde V é a velocidade da reação (mM/min), V_{max} é a velocidade máxima da reação (mM/min), K_M é a constante de Michaelis-Menten (mM), e [S] é a concentração de ABTS (mM).

2.7. Estabilidade operacional

Estudou-se a estabilidade operacional ou reutilização da lacase imobilizada, promovendo a reação a 40°C e em agitação constante, de 4.000 mg de nanopartículas com enzima imobilizada, com 2.50 mL de solução de ABTS (1.6 mM) em 7.000 mL de tampão citrato 0.050 M/fosfato 0.10 M (pH 4.5). Durante cerca de 10 minutos, em intervalos de 1 minuto retiraram-se amostras da mistura reacional, para medir a absorvência. Logo de seguida estas eram rapidamente reintroduzidas no meio reacional. Isto foi considerado

um ciclo de reação. No fim de cada ciclo usou-se um íman de neodímio modo a efetuar uma decantação magnética das partículas com lacase imobilizada, e proceder-se à interrupção da reação. Depois de recolher a mistura oxidada, efetuou-se a lavagem das partículas em tampão citrato 0.050 M/fosfato 0.10 M (pH 4.5) por três vezes, sendo que a solução da lavagem também foi recolhida usando decantação magnética de modo a evitar perdas de massa de lacase imobilizada. Após a lavagem, recomeçou-se um novo ciclo de reação com a introdução de nova solução de ABTS, em tampão citrato/fosfato no copo com lacase imobilizada. Foram efetuados 6 ciclos de reação.

2.8. Estabilidade de armazenamento

De modo a investigar a estabilidade de armazenamento da lacase livre e imobilizada nas condições experimentais já mencionadas, armazenou-se a lacase livre e imobilizada em tampão carbonato 0.1 M (pH 8.5), a 4°C durante aproximadamente 5 semanas (34 dias). A estabilidade de armazenamento foi avaliada pela atividade relativa medida semanalmente. A atividade relativa (%) foi definida como a razão entre a atividade da enzima num determinado dia de armazenamento e a atividade inicial da enzima ($t = 0$).

2.9. Caracterização: estudo de morfologia do suporte e da enzima imobilizada

Investigou-se a presença de grupos funcionais na enzima e no suporte antes e após imobilização, através da espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR). Os espectros foram gerados usando um espectrofotómetro FTIR Bruker Tensor 27. Os espectros FTIR foram obtidos após 128 varrimentos entre 4000 e 400 cm^{-1} com resolução espectral de 4 cm^{-1} , utilizando um acessório de refletância total atenuada (ATR). A imobilização da lacase foi efetuada em tampão carbonato (pH 8.5), com uma concentração de enzima 0.17 $\mu\text{L}/\text{mL}$ e com um tempo de contato de 3h.

3. Resultados e discussão

3.1. Otimização das condições de imobilização da lacase

O planeamento *Box-Behnken* permitiu a realização de um total de 17 ensaios experimentais, incluindo as cinco réplicas do ponto central. As respostas obtidas estão apresentadas na Tabela 5.

Tabela 5: Planeamento Box-Behnken com os resultados experimentais obtidos.

Ensaio	Variáveis independentes			Atividade recuperada (%)
	X ₁	X ₂	X ₃	
1	-1	0	-1	14.3
2	-1	0	1	36.3
3	1	0	-1	3.8
4	0	-1	1	10.2
5	0	0	0	7.2
6	0	1	-1	3.0
7	0	0	0	7.0
8	-1	-1	0	28.7
9	0	1	1	10.5
10	1	1	0	4.6
11	1	-1	0	4.5
12	-1	1	0	27.0
13	0	0	0	6.9
14	0	0	0	7.0
15	0	0	0	7.2
16	0	-1	-1	2.5
17	1	0	1	3.2

Os resultados experimentais obtidos (Tabela 5) foram sujeitos a uma análise de variância (ANOVA) de modo a determinar os parâmetros significativos. A Tabela ANOVA permite classificar os dados estatísticos e testar se as médias se diferenciam significativamente ¹¹⁴. Definindo o valor-F como a razão, entre o somatório dos

quadrados da regressão modelo e o somatório do quadrado dos resíduos, o modelo apresentou um valor-F de 191.39. Este valor é maior do que valor-F tabulado de 2.42 o que indica que o modelo proposto possui significância estatística num intervalo de confiança de 95%, e existe 0.01% de probabilidade, que um valor tão elevado de valor-F se deva somente ao ruído (Tabela 6). O valor de p é definido como a probabilidade do valor-F observado seja verdadeiro sob hipótese nula ¹⁰⁸. Caso esta probabilidade seja pequena ($p < 0.05$) é uma indicação de que o modelo é estatisticamente significativo e sendo que o valor de p do modelo apresentado foi de < 0.0001 (< 0.05), este modelo é válido.

O teste “falta de ajuste do valor F” compara o erro residual com o erro associado aos pontos replicados. Geralmente quer-se que o modelo apresente um valor insignificante de “falta de ajuste do valor F”. O valor-F de 181.11 sendo maior que o valor tabulado $F_{0.05}$ para a falta de ajuste de 19.3 indica que a falta de ajuste possui significância. O valor-P menor que 0.0001 reforça a significância estatística do valor “falta de ajuste do valor F”. O modelo mais apropriado tinha de ter um valor- p maior que 0.10, o que revela alguma fraqueza no ajuste dos pontos, que pode ser explicado por discrepância de valores nos pontos replicados centrais.

Tabela 6: Análise de variancia (ANOVA)^a para o modelo polinomial quadrático para a otimização da recuperação de atividade da lacase imobilizada.

	g.l	SQ	SM	Valor-F	Significância (valor-p) ^b
Modelo	9	1692.25	180.33	191.39	<0.0001
Falta de ajuste-F	3	6.55	2.18	181.11	<0.0001
Erro puro	4	0.048	0.012		

g.l = graus de liberdade; SQ = somatório dos quadrados; SM = somatório das médias.

^a $R^2 = 0.996$; $R^2(\text{ajustado}) = 0.990$.

^b $p < 0.05$ indica significância estatística.

A tabela ANOVA além de indicar a previsibilidade do método serve também para fazer uma análise individual dos coeficientes e concluir se as contribuições individuais são ou não significantes (Tabela 7).

Tabela 7: Valores-F e valores-P do modelo para a otimização da recuperação de atividade da lacase imobilizada.

Variáveis independentes	Erro padrão	Valor-F	Significância (valor-P) ^a
Constantes			
Linear			
X_1	0.34	1078.22	<0.0001
X_2	0.34	0.083	0.7819
X_3	0.34	176.94	<0.0001
Quadráticos			
X_1^2	0.47	323.26	<0.0001
X_2^2	0.47	1.80	0.2214
X_3^2	0.47	6.09	0.0430
Interativos			
$X_1 \cdot X_2$	0.49	0.94	0.3651
$X_1 \cdot X_3$	0.49	135.89	<0.0001
$X_2 \cdot X_3$	0.49	0.012	0.9169

^a $P < 0.05$ indica significância estatística.

Através da análise individual do valor- P dos coeficientes, observou-se que os coeficientes significativos neste modelo foram X_1 , X_3 , X_1^2 , X_3^2 e $X_1 \cdot X_3$. Conjugando os coeficientes significativos derivou-se a expressão quadrática que relaciona a resposta com as variáveis independentes x_1, x_2, x_3 em termos de fatores codificados Eq. (10) e X_1, X_2, X_3 em termos de fatores reais Eq. (11).

$$Y = 7.08 - 11.27 x_1 - 0.099 x_2 + 4.57 x_3 + 0.47 x_1 x_2 - 5.66 x_1 x_3 - 0.053 x_2 x_3 + 8.51 x_1^2 + 0.63 x_2^2 - 1.17 x_3^2 \quad (10)$$

$$Y = 19.44 - 368.30 X_1 - 2.39 X_2 + 17.48 X_3 + 3.35 X_1 X_2 - 80.82 X_1 X_3 + 0.026 X_2 X_3 + 1735.71 X_1^2 + 0.15 X_2^2 - 1.16 X_3^2 \quad (11)$$

Onde Y é a recuperação de atividade, X_1 é a concentração da enzima, X_2 o pH e X_3 é o tempo de contacto.

A contribuição relativa de cada variável independente na resposta foi avaliada pelo seu coeficiente correspondente no modelo de regressão, sendo que a concentração da enzima e o pH tiveram efeitos lineares negativos ($b_1 = -368.30$ e $b_2 = -2.39$), enquanto que o tempo de contato apresentou um efeito positivo. De entre as variáveis a concentração de enzima X_1 , teve maior impacto na resposta, pois apresenta o coeficiente com maior magnitude ($b_1 = -368.30$). O tempo de contato foi a única variável que apresentou um efeito quadrático negativo ($b_3^2 = -1.16$).

O programa de otimização *Design-Expert* 7.01 disponibiliza uma medida que é a razão entre o sinal e o ruído que quantifica o alcance da resposta prevista, em relação ao erro associado, e é usado como indicação da validade do modelo, para navegar numa superfície de resposta. Esta medida é apelidada de valor de precisão adequada. O valor desejado para a precisão adequada costuma ser maior que 4, de modo a que o modelo tenha um sinal adequado. O valor fornecido pelo modelo foi de 45.63 o que significa que este modelo tem validade para gerar uma superfície de resposta.

A análise das superfícies de resposta é de elevado interesse pois podem ser usadas para prever a gama de valores ótimos para diferentes valores de variáveis independentes. As principais interações entre as variáveis experimentais podem ainda ser identificadas analisando a natureza circular dos contornos¹¹⁵. Geralmente as superfícies de resposta são representações gráficas 3D que incluem um gráfico de contorno do modelo de regressão (Figura 10.a;b;c). Estas superfícies são ainda muito úteis na análise e descrição dos efeitos de duas variáveis independentes diferentes na resposta, mantendo uma terceira variável constante.

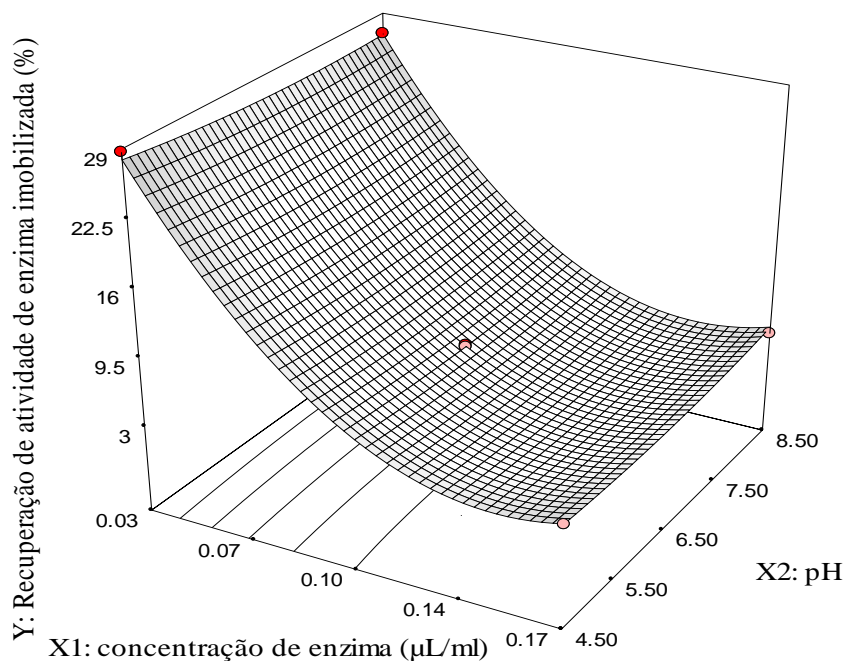


Figura 10.a: Superfície de resposta e gráfico de contorno da recuperação de atividade em função da concentração de enzima (X1) e pH (X2); tempo de contato constante (2h) (X3).

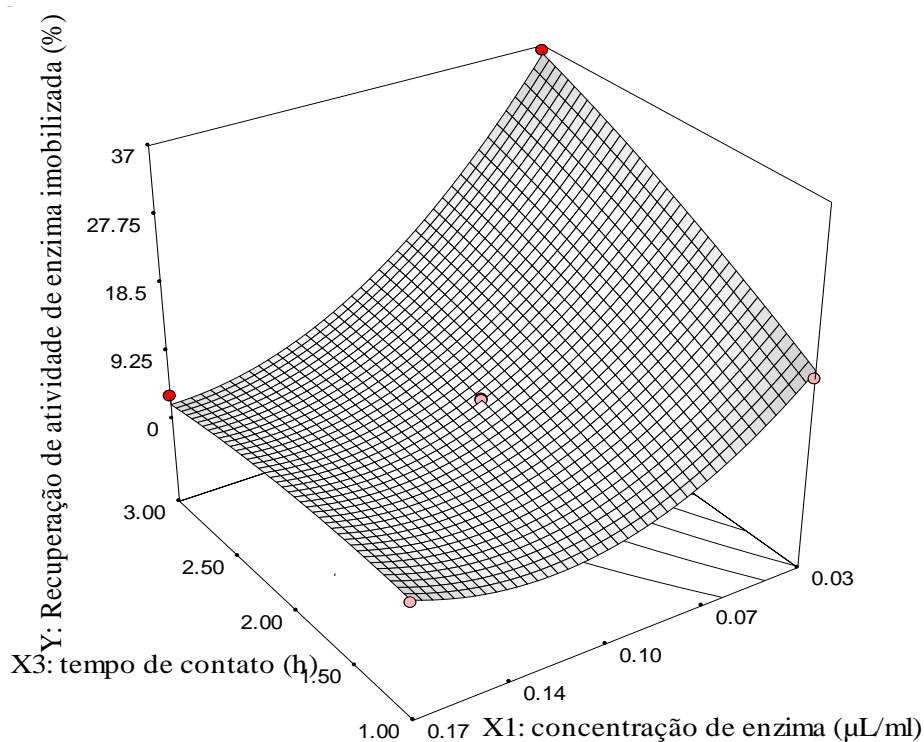


Figura 10.b: Superfície de resposta e gráfico de contorno da recuperação de atividade em função da concentração de enzima (X1) e tempo de contato (X3); pH constante (6.5) (X2).

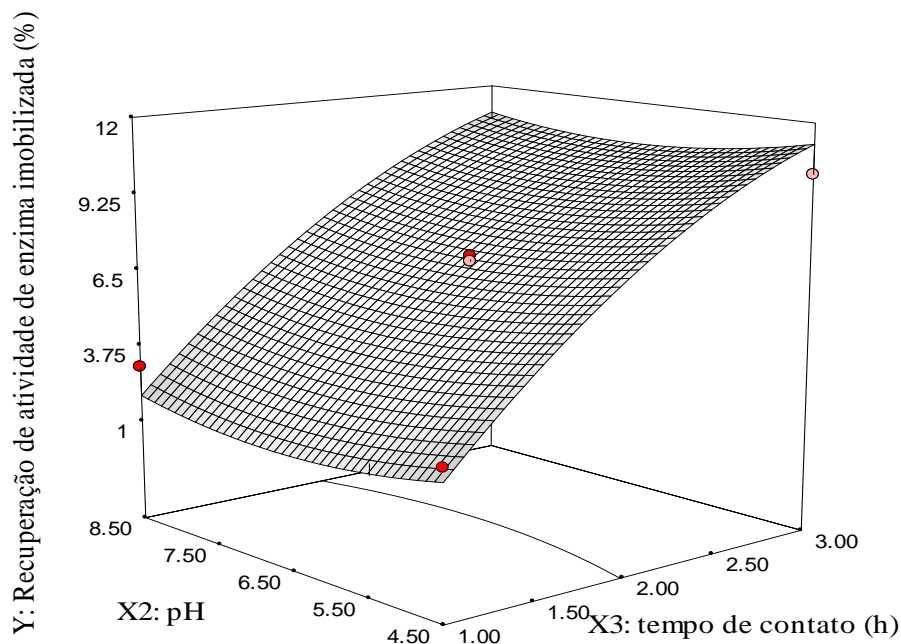


Figura 10.c: Superfície de resposta e gráfico de contorno da recuperação de atividade em função do tempo de contato (X3) e pH (X2); concentração de enzima constante (0.1 $\mu\text{L/mL}$) (X1).

Analisando as Figura 10.a e Figura 10.b observa-se que a recuperação de atividade da enzima imobilizada é altamente sensível a variações da concentração de enzima. Os valores mais altos de recuperação foram atingidos para as concentrações mais baixas de enzima. Este facto pode ser uma indicação da saturação do suporte devido a excesso de enzima presente na solução. Wang et al. (2009) fizeram referência a esta situação no seu estudo de lacase imobilizada em nanopartículas de sílica mesoporosa, onde a partir de determinada concentração de enzima a recuperação de enzima decresceu significativamente⁷⁷. Este fenómeno tinha sido também reportado noutros estudos de imobilização de lacase⁷³. Justificou-se tal comportamento como um impedimento por limitações de transferência de massa, provocadas por falta de espaço intermolecular na lacase imobilizada. Este impedimento é causado por um excesso de enzima nos suportes de imobilização que causa alguma restrição na difusão do substrato e do produto. Embora este comportamento seja mais frequente em suporte porosos, alguns estudos de enzimas imobilizadas em nanopartículas também exibiram uma queda de atividade com o aumento da concentração de enzima¹¹⁶. Jiang et al. (2009) imobilizou Lipase em NPM e justificou a queda de atividade por efeitos estéricos resultantes da concentração de enzima³⁷. O impedimento estérico ocorre quando existe uma excessiva concentração de enzima, o que

leva a interações entre as proteínas e inibe a flexibilidade da conformação proteica da enzima. Contudo não se esperava um comportamento tão pronunciado, pois outros trabalhos da literatura mostram que o uso de um agente espaçador, como o glutaraldeído, reduz o impedimento estérico.

Da análise da Figura 10.a e Figura 10.c pode-se observar que o pH teve pouca influência na resposta, com um ligeiro aumento de recuperação de atividade para valores de pH mais baixos. Assim, numa primeira análise pode-se inferir que a enzima imobilizada, neste estudo, demonstrou relativa tolerância a variações do pH de imobilização.

Um outro aspeto a considerar na variação do pH de imobilização, consiste em analisar como as interações eletrostáticas entre a enzima e as NPM condicionam, ou favorecem, a imobilização da lacase. Sabe-se que qualquer tipo de interações eletrostáticas das NPM com as enzimas é fortemente dependente da carga (e do valor absoluto) existente entre eles, por sua vez a carga é altamente influenciada pelo valor de pH do meio onde decorre a reação de imobilização. Reportou-se que em meio aquoso a superfície das nanopartículas de magnetite encontra-se coberta por grupos FeOH. Estes grupos podem dissociar-se em H^+ ou OH^- , carregando a partícula positivamente ou negativamente ¹¹⁷. Alguns autores tem reportado o ponto isoelétrico da magnetite com um valor aproximado de pH entre 6-7 ¹¹⁸. Contudo, sabendo que o revestimento com sílica também é capaz de modificar o potencial zeta da superfície da nanopartícula de magnetite, R. Ferreira (2009) realizou um estudo de caracterização da magnetite, onde reportou um valor de ponto isoelétrico da magnetite revestida com sílica de 2.8 ¹¹⁷. Sendo o ponto isoelétrico da lacase utilizada nesse estudo de aproximadamente 4.0 ¹¹⁹, poderia deduzir-se que no intervalo de valores de pH utilizados neste trabalho, tanto as NPms como a lacase se encontram carregadas negativamente, repelindo-se e não potenciando nenhum tipo de interação eletrostática, ou seja qualquer tipo de ligação seria por interações covalentes. Contudo esta análise não é totalmente conclusiva, pois sabe-se que valores baixos de pH afetam os grupos aminas, presentes na superfície das nanopartículas, ficando estes protonados e passando a carga superficial das nanopartículas a ser positiva. Em meios básicos este efeito não se observa e a carga costuma ser negativa ²⁹. A protonação dos grupos aminas pode assim ser a causa do ligeiro aumento de recuperação de atividade, verificado quando se imobilizou a lacase, a valores de pH mais ácidos.

Já foram realizados alguns estudos que relacionam o valor de pH com a imobilização em NPM, contudo, a maioria destes estudos debruça-se sobre as interações

eletrostáticas, que podem ou não, potencializar a imobilização por adsorção e por ligação iônica. No estudo de Shamim et al. (2006), as moléculas de albumina e NPM ganharam carga negativa a pH 8.1, o que resultou em forças repulsivas que condicionaram a imobilização por adsorção ¹²⁰. Porém Zheng et al. (2012) destaca que, a lacase imobilizada covalentemente, tende a reduzir a ocorrência de mudanças conformacionais em relação à lacase livre, o que resulta numa resistência a variações de pH ⁷⁶.

O tempo de contato teve influência significativa na resposta (Figura 10.c) indicando que a recuperação de atividade cresceu com o aumento do tempo de contato. Constata-se também que a curva tende a aumentar de forma contínua, o que sugere um aumento do tempo de contato de modo a encontrar um ponto ótimo para a imobilização da lacase.

Este comportamento repete-se na Figura 10.a, pois analisando a variação da concentração de enzima, pode-se constatar que, para valores mais elevados de concentração de enzima há uma estabilização da atividade recuperada, contudo não existe um ponto de inflexão claro. Por esta razão não se tem qualquer informação sobre a esfericidade dos gráficos de contorno, nas três situações analisadas, e não se podem retirar relações sobre as interações entre as variáveis independentes, no ponto máximo da recuperação de atividade.

Uma outra forma de apresentar os resultados otimizados é através do gráfico de cubos (Figura 11).

Y: Recuperação de atividade de enzima imobilizada (%)

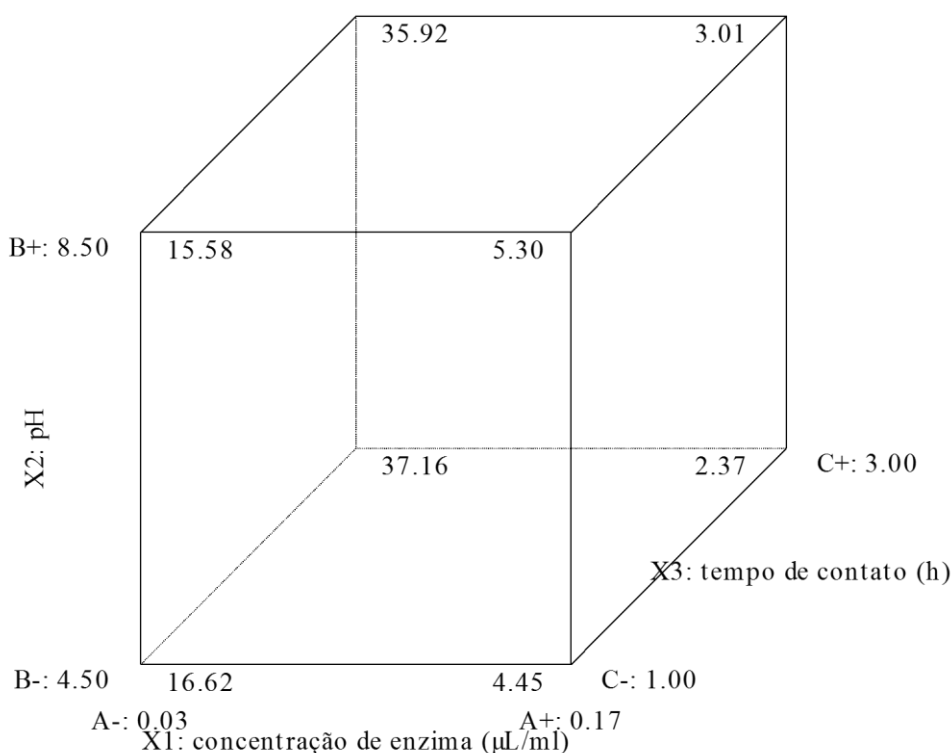


Figura 11: Gráfico de cubo da recuperação de atividade em função de concentração de enzima; pH e tempo de contato.

Os gráficos de cubo são ferramentas que servem para visualizar os limites (máximos e mínimos) da resposta para várias combinações de variáveis independentes. Cada vértice do cubo representa o valor da resposta média para cada combinação. Da análise do gráfico de cubos pode-se prever que o valor mais baixo de recuperação de atividade (2.37%) acontece com a concentração de enzima 0.17 $\mu\text{L}/\text{mL}$, pH 4.5 e tempo de contato 3h. A condição da recuperação de atividade mais elevada (37.16%) prevista será obtida com concentração de enzima 0.03 $\mu\text{L}/\text{mL}$, pH 4.5 e tempo de contato 3h, ou seja confirma-se a grande influência da variável concentração de enzima na recuperação de atividade.

De modo a confirmar estes valores, usou-se os recursos computacionais do programa *Design-Expert 7.01* de modo a permitir a previsão de um ponto onde a recuperação de atividade de enzima imobilizada fosse máxima. Encontrou-se 25 soluções da equação, sendo que o ponto ótimo, possui os valores de concentração de enzima 0.03 $\mu\text{L}/\text{mL}$, pH 5 e tempo de contato de 3.0 h.

3.2. Estabilidade térmica: Cinética da inativação térmica da lacase livre e imobilizada

Illanes et al. (2008) referiu que a inativação da enzima por exposição à temperatura da reação é um dos fatores mais importantes na perda de capacidade catalítica de um reator enzimático. Sendo inevitável, é necessário estabelecer um compromisso entre a temperatura da reação e a estabilidade térmica da enzima, para que não se comprometa a operação ⁵. Segundo Hu et al. (2007), a flexibilidade conformacional da enzima pode ser afetada pela imobilização, uma vez que a imobilização pode causar um aumento na rigidez da enzima, o que costuma refletir-se num aumento de resistência à desnaturação pelo aumento de temperatura ⁸³. Neste sentido foram efetuados testes de estabilidade térmica na lacase livre e na lacase imobilizada em nanopartículas à temperatura de 60°C (Figura 12).

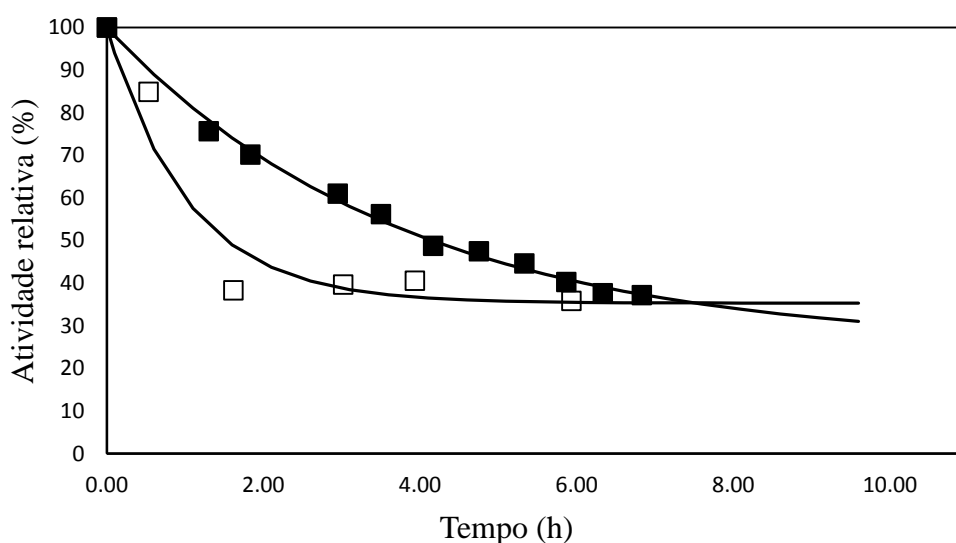


Figura 12: Perfis de estabilidade térmica da lacase imobilizada (□) e livre (■) a 60 °C.

Os resultados da Figura 12 mostram que a estabilidade térmica da lacase é sensível ao tempo de incubação, mostrando um decréscimo gradual de atividade relativa ao longo do tempo tal como esperado. Os dados experimentais foram ajustados ao modelo descrito pela Eq. (8), com uma boa correlação para ambas as curvas ($R=0.996$ e 0.992 para enzima livre e imobilizada, respetivamente) e permitindo calcular os parâmetros cinéticos, k e α (Tabela 8). Constatou-se que após 7.6 h de incubação a 60°C a enzima imobilizada estabiliza a atividade retida em 35.3 % enquanto que a atividade da enzima livre continua

a decair para valores mais baixos do que 30%. A lacase imobilizada estabilizou a atividade a partir das 4h de incubação podendo inferir-se que a velocidade de inativação da lacase imobilizada é maior do que na enzima livre, o que se pode constatar pelos valores das constantes de inativação térmica (k) (Tabela 8). Observou-se igualmente um nível de atividade constante maior, para tempos de incubação mais elevados (parâmetro α) na enzima imobilizada. Assim pressupõe-se que a lacase imobilizada em nanopartículas exibe uma ligeira melhoria na estabilidade térmica residual quando comparada com a enzima livre. Outro estudo comparativo entre a enzima livre e imobilizada pode basear-se na análise do tempo de meia vida ($t_{1/2}$). O tempo de meia vida representa o tempo necessário para que a enzima perca metade da sua atividade inicial ⁶⁸. A 60° C o tempo de meia vida da enzima imobilizada foi de 1.5 h enquanto o tempo de meia vida da enzima livre foi de 4.1 h. Na literatura escasseiam estudos que relacionem o efeito da temperatura na atividade da lacase imobilizada em NPm. Contudo Kouassi et al. (2005) relataram no seu estudo de imobilização de oxidase do colesterol em NPm, que a estabilidade térmica da enzima foi substancialmente melhorada à temperatura de 60°C quando a enzima foi imobilizada, sugerindo uma melhor resistência da enzima à temperatura ¹²¹. Mais recentemente Zheng et al. (2012) estudaram a inativação térmica da lacase imobilizada em NPm e reportou que a lacase livre apresenta maior atividade específica até aproximadamente 45 °C. A partir desta temperatura a estabilidade térmica da lacase imobilizada foi sempre melhor, inclusive a 60 °C, onde a atividade específica da lacase imobilizada foi aproximadamente 50% superior à da lacase livre ⁷⁶.

Tabela 8: Parâmetros da cinética de inativação térmica da lacase livre e imobilizada a 60°C.

Enzima	Parâmetros térmicos			
	k (h ⁻¹)	α	$t_{1/2}$ (h)	R ²
60 °C				
Livre	0.265	25.1	4.14	0.996
Imobilizada	0.971	35.2	1.52	0.992

3.3. Propriedades cinéticas

Estudou-se a cinética de oxidação da lacase livre e imobilizada, usando como substrato o ABTS a diferentes concentrações. Usando o modelo cinético proposto por Michaelis-Menten ¹¹³ calcularam-se os parâmetros cinéticos K_M e V_{max} da enzima livre e imobilizada, após o ajuste dos dados experimentais. Pode-se considerar que tanto a cinética da enzima livre como a da imobilizada foram bem descritas pelo modelo cinético de Michaelis-Menten ¹¹³ pois pela análise da regressão não linear, usando o aplicativo CurveExpert 1.3, conseguiram-se valores aceitáveis de R^2 para a lacase livre e imobilizada (Tabela 9). A Figura 13 mostra as velocidades iniciais de reação de oxidação do ABTS, com a enzima livre e imobilizada, para diferentes concentrações de ABTS. Pode-se ver que a forma da função é hiperbólica retangular, respeitando a equação de Michaelis-Menten ¹²².

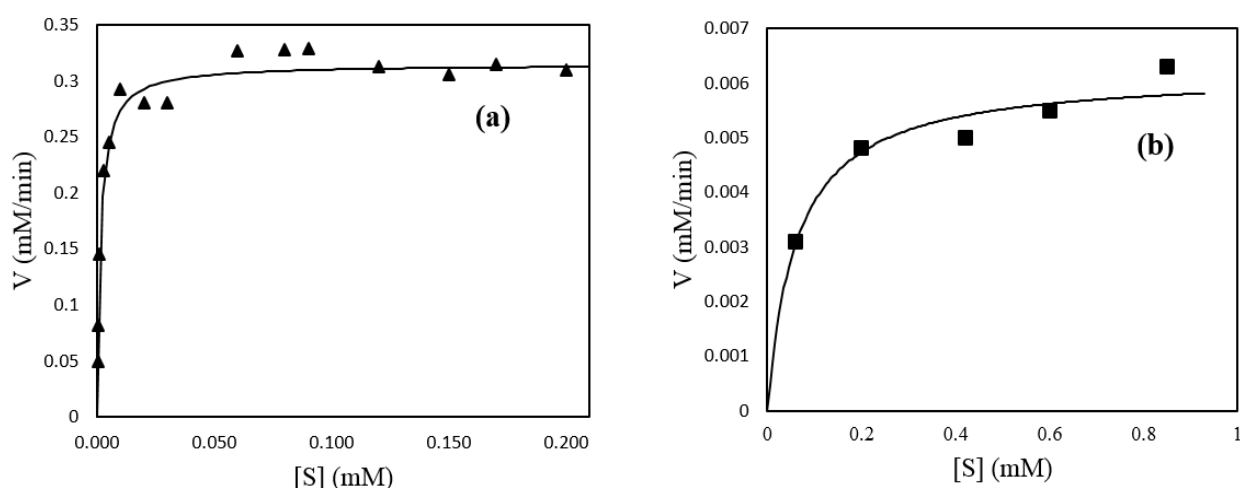


Figura 13: Velocidades iniciais de reação da lacase livre (a) e imobilizada (b) com diferentes concentrações de ABTS. A linha contínua sólida representa o modelo de Michaelis-Menten ajustado aos dados experimentais.

Tabela 9: Parâmetros cinéticos (K_M , V_{max}) da lacase livre e imobilizada.

Enzima	K_M (mM)	V_{max} ($\mu\text{M min}^{-1}$)	R^2
Livre	0.0015	0.3148	0.967
Imobilizada	0.062	0.0062	0.958

A constante de Michaelis-Menten (K_M) é um dos parâmetros mais importantes usados na previsão da capacidade da enzima se ligar ao substrato, sendo definida como uma medida da afinidade da enzima para com o substrato: um valor elevado de K_M , costuma ser uma indicação de baixa afinidade da enzima pelo substrato. Sendo que valor de K_M aumentou de forma significativa após a imobilização da enzima, tal facto pode ser uma indicação clara de que a imobilização causou uma diminuição da afinidade, para com o ABTS. Alguns estudos têm reportado resultados relativamente semelhantes quanto à afinidade entre a enzima e o substrato após o processo de imobilização. Wang et al. (2007) imobilizou com sucesso lacase de *Pycnoporus sanguineus* por afinidade metálica em partículas magnéticas quelantes, o valor de K_M calculado para a lacase imobilizada foi 2.1 vezes maior do que o da lacase livre. A relativa baixa afinidade da lacase imobilizada com o substrato foi justificada com mudanças estruturais na enzima provocadas pelo procedimento de imobilização, que talvez tenha impossibilitado o total acesso do substrato ao sítio ativo da enzima imobilizada⁷³. Além de mudanças estruturais na enzima^{73,123} e efeitos estéricos causados por grandes grupos de moléculas, no centro ativo da enzima¹²⁴, alguns autores têm justificado este comportamento como causado por limitações difusionais inerentes ao suporte usado. Zheng et al. (2012) imobilizaram lacase em NPM e reportaram um valor de K_M mais elevado na enzima imobilizada, fundamentando este valor com mudanças estruturais da enzima e limitações à transferência de massa⁷⁶. Wang et al. (2010) também referiram que baixa afinidade da lacase imobilizada em nanopartículas de sílica magnética mesoporosa, pode ser explicada por mudanças estruturais na enzima limitando a acessibilidade do substrato ao sítio ativo e limitações no processo de adsorção da lacase dentro dos canais mesoporosos do suporte⁷⁷.

Alguns autores reportaram um aumento do valor de V_{max} com a imobilização em nanopartículas de magnetite^{123,125}, contudo, neste estudo o valor de V_{max} é relativamente baixo quando comparado com a enzima livre.

3.4. Estabilidade operacional

Para efeitos práticos, é importante que a lacase imobilizada preserve a elevada atividade catalítica, mas também que a preserve durante um número máximo de ciclos de reação. Assim investigou-se a estabilidade operacional da lacase imobilizada em 6 ciclos oxidativos, usando como substrato o ABTS. Os resultados são apresentados na Figura 14. A lacase imobilizada apresentou um ligeiro decréscimo na atividade residual ao longo dos ciclos de reação e reteve aproximadamente 75.8% da atividade inicial após 6 ciclos de reação consecutivos, sendo que o 4º ciclo apresentou uma atividade residual de 82.0%.

O decréscimo de atividade ao longo dos ciclos pode sugerir um escape da enzima do suporte ao longo do processo, ou uma inativação gradual da lacase imobilizada conforme sugerido por Wang et al. (2013) ¹¹⁶. A estabilidade operacional e reutilização da lacase imobilizada já foi alvo de diversos estudos presentes na literatura. Huang et al. (2006), prepararam nanopartículas de material compósito onde imobilizou lacase com um rendimento de 20%, a estabilidade operacional da enzima imobilizada foi melhorada, com retenção de 80% da atividade inicial, após 5 ciclos ¹²⁶. Bayramoğlu et al. (2009) imobilizaram lacase covalentemente em filmes de poli (hidroxietilmetacrilato), sendo que estes filmes com enzima imobilizada foram usados na degradação de fenol. Em 6 ciclos de oxidação a atividade da lacase decresceu em torno de 14% após o terceiro ciclo. Tal decréscimo de atividade foi explicado por um possível escape de enzima do suporte, ou mudanças conformacionais na estrutura terciária da enzima durante o período de armazenamento ⁸⁴. Recentemente Wang et al. (2013) imobilizaram covalentemente lacase em nanopartículas funcionalizadas de Fe₃O₄/SiO₂ tendo como objetivo principal a descoloração de dois corantes fenólicos. A estabilidade operacional foi testada em 10 ciclos de reação, sendo que no 10º ciclo a percentagem de corante removido decresceu para 88% e 79% ¹¹⁶. Comparando estes resultados de estabilidade operacional da literatura com os resultados obtidos neste estudo pode-se inferir que os resultados de estabilidade operacional e de reutilização da lacase imobilizada em NPM's são bons, o que realça também um dos aspetos mais importante, a enzima imobilizada pode ser facilmente recuperada do meio reativo através da aplicação de um campo magnético externo. Estas indicações demonstram claramente o potencial de aplicação da lacase imobilizada e como Mateo et al. (2007) destacam, é crucial desenvolver o interesse na reutilização de enzimas, devido à contribuição para a redução de custos e à inerente viabilidade económica de processos industriais ¹⁰.

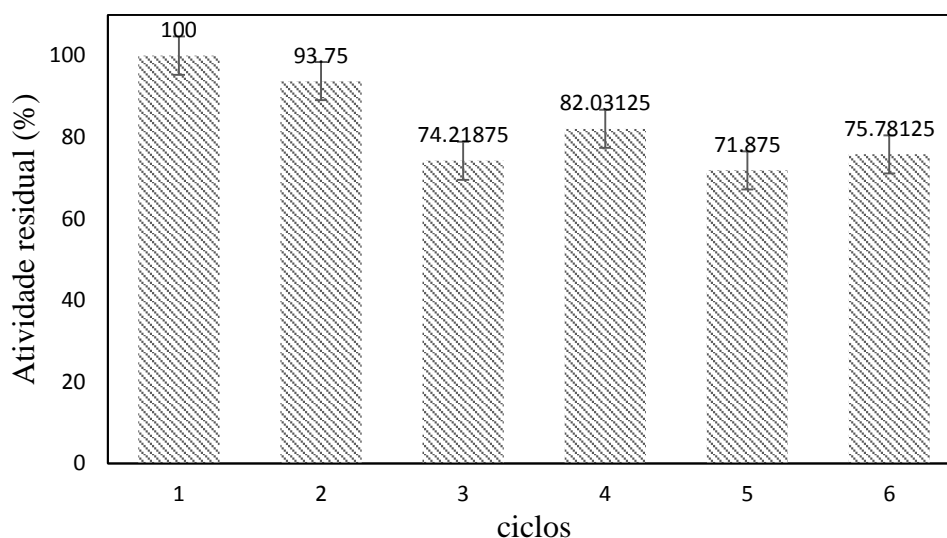


Figura 14: Estabilidade operacional da lacase imobilizada.

3.5. Estabilidade de armazenamento

Avaliou-se a estabilidade da lacase livre e imobilizada ambas armazenadas a 4 °C durante 35 dias (Figura 15). Registrou-se que a enzima livre reteve 87 % da atividade inicial após 34 dias de armazenamento enquanto que a enzima imobilizada apenas reteve 30.2 % de atividade após 30 dias de armazenamento. Verificou-se igualmente uma abrupta queda de atividade da enzima imobilizada na primeira semana de armazenamento, mantendo-se a atividade relativa aproximadamente constante nas semanas que se seguiram. Estes resultados, ao contrário do esperado, demonstram que a lacase livre apresentou uma melhor estabilidade de armazenamento, em relação à sua forma imobilizada. Esta queda de atividade ao longo dos dias de armazenamento pode ser sido causada pela metodologia de imobilização, uma vez que os reagentes usados ou o próprio método poderá ter causado mudanças conformacionais na enzima, o que veio a afetar negativamente a estabilidade da enzima após imobilização ¹²⁷. O contato com reagentes foi destacado por Mateescu et al. (1990) no seu estudo de imobilização da lacase em suporte agarose p-benzoquinona ativada. A enzima imobilizada teve uma estabilidade de armazenamento altamente melhorada, retendo 95% da atividade por 14 meses a 4°C. Justificou-se tal rendimento de armazenamento com modificações causadas na estrutura

da enzima provocadas pela imobilização. A enzima imobilizada era muito menos suscetível à inibição por íons azida e cloreto ¹²⁸.

Em muitos estudos refere-se o aumento da estabilidade de armazenamento da enzima imobilizada covalentemente como o resultado da rigidificação da estrutura da enzima. A rigidificação ocorre quando existe a interação múltipla entre a enzima e os grupos do suporte. No sentido oposto, a diminuição da estabilidade de armazenamento é muitas vezes justificada com o escape de enzima que é característico da imobilização por adsorção ¹²⁹. Assim a perda de estabilidade de armazenamento neste trabalho pode ser também uma indicação da existência de interações por adsorção entre enzima e suporte.

Illanes (2008), refere a que enzima, sendo uma proteína, pode perder atividade naturalmente devido à proteólise, agregação ou condições não ótimas de tampão. E sendo que a capacidade de armazenamento da enzima pode também condicionar as condições de transporte da mesma, é crucial investigar novos e melhores métodos de estabilização da enzima ⁵.

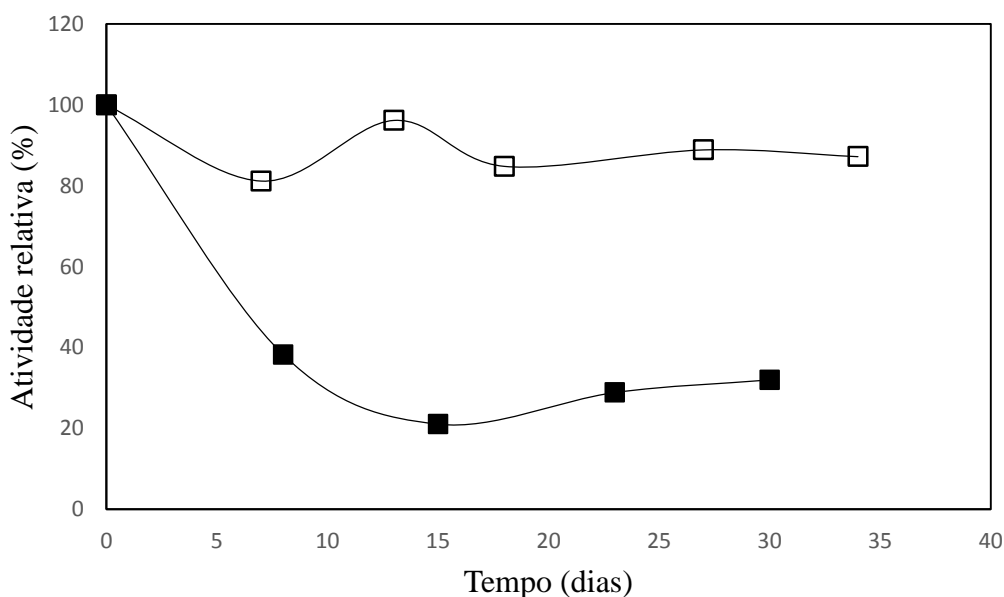


Figura 15: Estabilidade de armazenamento da lacase livre (□) e imobilizada (■) a 4°C.

3.6. Caracterização: estudo da morfologia do suporte e da enzima imobilizada

Usou-se a espectroscopia FTIR de modo a fazer a caracterização da lacase livre e do suporte com e sem enzima imobilizada. A Figura 16 mostra o espectro FTIR da lacase na forma livre (a), da NPM de magnetite funcionalizada com grupos amina na superfície (b) e da NPM após o processo de imobilização com lacase. Da análise da Figura 16.a, pode-se constatar que o espectro FTIR da lacase apresenta bandas características das proteínas em 3300 (OH e NH), 2800 (CH), 1630 (CONH) e 1100 cm^{-1} (COC) ¹³⁰. A Figura 16.b mostra o espectro FTIR do suporte sem enzima imobilizada, onde se pode reconhecer bandas de forte intensidade em 541 cm^{-1} . Esta banda corresponde à vibração de alongação da ligação Fe-O, do núcleo de magnetite. A banda a 796 cm^{-1} é característico da ligação Si-O-Fe, o que significa que SiO_2 se encontra quimicamente ligado a Fe_3O_4 , o pico a 1037 cm^{-1} corresponde à vibração da ligação Si-O ⁷⁶ e a banda 1616 cm^{-1} mostra as vibrações de deformação da ligação Si-OH. A banda a 1523 cm^{-1} pode ser associada à vibração de alongação da ligação N-H, o que pode confirmar a presença de grupos NH_2 livres ⁷⁶. A análise do espectro FTIR do suporte com a enzima imobilizada (Figura 16.c) revelou, as bandas características da magnetite com revestimento de sílica sendo que também se notou a ausência de picos característicos dos grupos aldeídos a 1720 cm^{-1} , o que pode sugerir que o glutaraldeído reagiu com os grupos funcionais ($-\text{NH}_2$) presentes na lacase e no suporte ¹²³. Observou-se igualmente picos a 1434 e a 2912 cm^{-1} , que são picos característicos de sais de carbonato de cálcio ¹³¹. Este facto pode indicar que houve uma interferência devido ao tampão utilizado no processo de imobilização. Ao contrário do inicialmente esperado, não foi possível observar bandas de vibração atribuídas exclusivamente aos grupos da enzima, na Figura 16.c devido à sobreposição das bandas da enzima com as bandas do material usado como suporte.

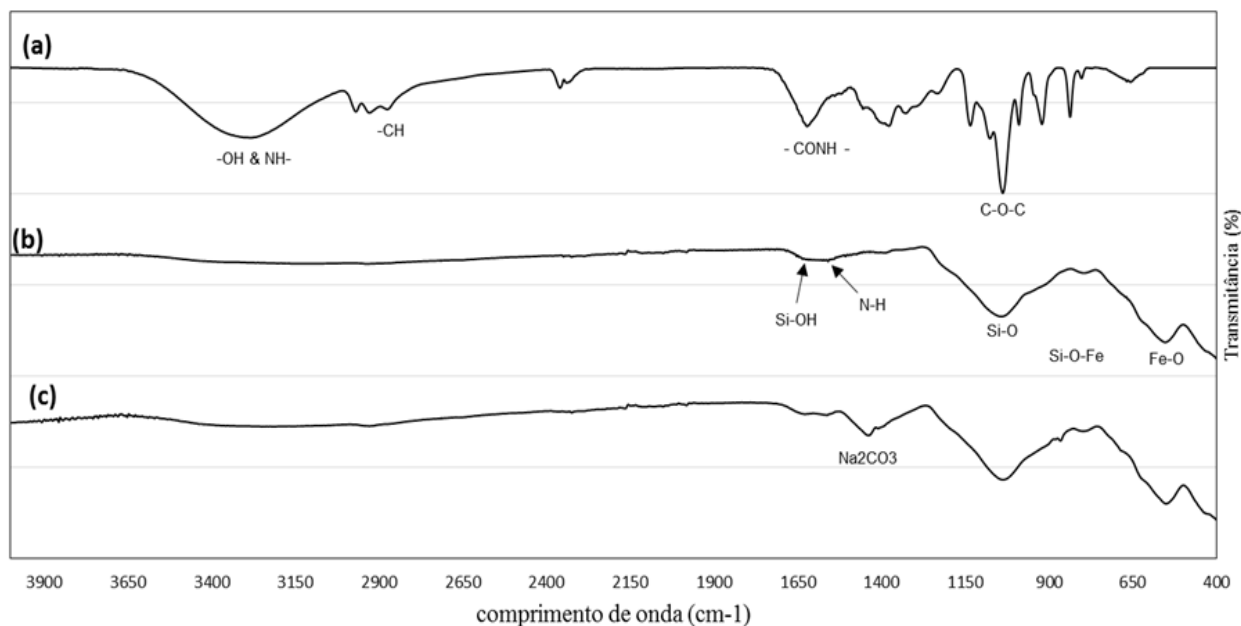


Figura 16: Espectros FTIR-ATR de: (a) lacase livre; (b) NPm magnética antes da imobilização; (c) NPm magnética após imobilização da lacase.

4. Conclusões

A principal conclusão deste trabalho pode resumir-se na imobilização da lacase em nanopartículas magnéticas de lacase com sucesso. O modelo gerado pelo planeamento experimental foi estatisticamente viável e permitiu a construção de superfícies de resposta de modo a encontrar o ponto ótimo de atividade de enzima recuperada e estabelecer relações entre as variáveis independentes. Além da identificação do ponto ótimo, a análise do modelo determinou que a variável mais significativa na imobilização da laccase é a concentração da enzima.

Da análise dos parâmetros da inativação térmica, constatou-se uma ligeira melhoria da estabilidade térmica da enzima imobilizada. Os resultados da cinética de Michaelis-Menten mostraram que a enzima livre apresentou uma maior afinidade pelo substrato aquando comparado com a enzima imobilizada, embora o efeito de limitação de transferência de massa deva ser considerado. A estabilidade operacional e de reutilização

foram melhoradas contudo a estabilidade de armazenamento não foi satisfatória nas condições escolhidas.

Da análise do espectro FTIR-ATR do suporte com a enzima imobilizada, registou-se a baixa presença de grupos aminas superficiais no suporte, o que se reflete numa baixa quantidade de enzima imobilizada e consequente sobreposição das bandas da enzima com o suporte.

Bibliografia

- (1) Cabral, M. S. J.; Aires-Barros, R. M.; Gama, M. *Engenharia Enzimática*; 1º ed.; LIDEL-Edições Técnicas Ltda: Lisboa, 2003; p. 252.
- (2) Nelson, D. L.; Lehninger, A. L.; Cox, M. M. *Lehninger principles of biochemistry*; 3º ed.; W. H. Freeman: New York, US., 2000; p. 1100.
- (3) Wade, L. G. J. Amino acids, peptides, and proteins. In *Organic Chemistry*; Young, G. T., Ed.; Amino Acids, Peptides And Proteins; Royal Society of Chemistry: Cambridge, 2009; Vol. 2, p. 1320.
- (4) Call, H. P.; Mucke, I. History , overview and applications of mediated lignolytic systems , especially laccase-mediator-systems (Lignozym ® -process). *Journal of Biotechnology* **1997**, *53*, 163–202.
- (5) Andrés Illanes. *Enzyme Biocatalysis, Principles and Applications*; Springer: Valparaíso, 2008; p. 401.
- (6) Professor Gallo, A. Enzimas 2 <http://docentes.esalq.usp.br/luagallo/Enzimas2.htm> (accessed Feb 23, 2314).
- (7) Netto, C. G. C. M.; Toma, H. E.; Andrade, L. H. Superparamagnetic nanoparticles as versatile carriers and supporting materials for enzymes. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **2013**, *85-86*, 71–92.
- (8) Dong, H.; Li, Y.; Sheng, G.; Hu, L. The study on effective immobilization of lipase on functionalized bentonites and their properties. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **2013**, *95*, 9–15.
- (9) Spahn, C.; Minter, S. Enzyme immobilization in biotechnology. *Recent patents on Engineering* **2008**, *2*, 195–200.
- (10) Mateo, C.; Palomo, J. M.; Fernandez-Lorente, G.; Guisan, J. M.; Fernandez-Lafuente, R. Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. *Enzyme and Microbial Technology* **2007**, *40*, 1451–1463.
- (11) DiCosimo, R.; McAuliffe, J.; Ayrookaran, J.; Bohlmann, G. Industrial use of immobilized enzymes. *Chemical Society reviews* **2013**, *42*, 6437–6474.
- (12) Hanefeld, U.; Gardossi, L.; Magner, E. Understanding enzyme immobilisation. *Chemical Society reviews* **2009**, *38*, 453–468.

- (13) Datta, S.; Christena, L. R.; Rajaram, Y. R. S. Enzyme immobilization: an overview on techniques and support materials. *3 Biotech* **2012**, *3*, 1–9.
- (14) Durán, N.; Rosa, M. A.; D'Annibale, A.; Gianfreda, L. Applications of laccases and tyrosinases (phenoloxidases) immobilized on different supports: a review. *Enzyme and Microbial Technology* **2002**, *31*, 907–931.
- (15) Brena, B. M.; Batista-viera, F.; González-Pombo, P. Immobilization of Enzymes and cells. In *Methods in molecular biology*; J. M. Guisan, Ed.; Humana Press Inc: N.J, 2006; Vol. 1051, pp. 15–31.
- (16) Fernandes, K. F.; Lima, C. S.; Lopes, F. M. Técnicas de Imobilização de Enzimas. *Revista Processos Químicos*, 2010, 53–58.
- (17) Chadwick, S. S. Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry. *Reference Services Review*, 1988, *16*, 31–34.
- (18) Chen, C.-C.; Gu, Y. Enhancing the sensitivity and stability of HRP/PANI/Pt electrode by implanted bovine serum albumin. *Biosensors and Bioelectronics* **2008**, *23*, 765–770.
- (19) Hartmann, M.; Jung, D. Biocatalysis with enzymes immobilized on mesoporous hosts: the status quo and future trends. *Journal of Materials Chemistry* **2010**, *20*, 844.
- (20) Li, T.; Li, S.; Wang, N.; Tain, L. Immobilization and stabilization of pectinase by multipoint attachment onto an activated agar-gel support. *Food Chemistry* **2008**, *109*, 703–708.
- (21) Lee S-Y. · Min B-H. · Hwang S-H. · Koo Y-M. · Lee. Enantioselective production of levofloxacin by immobilized porcine liver esterase. *Biotechnology Letters* **2001**.
- (22) Shah, R. M.; D'mello, A. P. Stabilization of phenylalanine ammonia lyase against organic solvent mediated deactivation. *International journal of pharmaceutics* **2007**, *331*, 107–115.
- (23) Freitas, F. F.; Marquez, L. D. S.; Ribeiro, G. P.; Brandão, G. C.; Cardoso, V. L.; Ribeiro, E. J. Optimization of the immobilization process of β -galactosidase by combined entrapment-cross-linking and the kinetics of lactose hydrolysis. *Brazilian Journal of Chemical Engineering* **2012**, *29*, 15–24.
- (24) Kurokawa, Y.; Suzuki, K.; Tamai, Y. Adsorption and enzyme (beta-galactosidase and alpha-chymotrypsin): immobilization properties of gel fiber prepared by the gel formation of cellulose acetate and titanium iso-propoxide. *Biotechnology and bioengineering* **1998**, *59*, 651–656.
- (25) Rodrigues, R. C.; Berenguer-Murcia, Á.; Fernandez-Lafuente, R. Coupling Chemical Modification and Immobilization to Improve the Catalytic Performance of Enzymes. *Advanced Synthesis & Catalysis* **2011**, *353*, 2216–2238.

- (26) Tartaj, P.; Morales, M. a D. P.; Veintemillas-Verdaguer, S.; González-Carretero, T.; Serna, C. J. The preparation of magnetic nanoparticles for applications in biomedicine. *Journal of Physics D: Applied Physics* **2003**, *36*, 182–197.
- (27) Taketomi, S.; Ukita, M.; Mizukami, M.; Miyajima, H.; Chikazumi, S. Magneto-optical Effects of Magnetic Fluid. *Journal of the Physical Society of Japan* **1987**, *56*, 3362–3374.
- (28) Kalkan, N. A.; Aksoy, S.; Aksoy, E. A.; Hasirci, N. Preparation of chitosan-coated magnetite nanoparticles and application for immobilization of laccase. *Journal of Applied Polymer Science* **2012**, *123*, 707–716.
- (29) Lu, A.-H.; Salabas, E. L.; Schüth, F. Magnetic nanoparticles: synthesis, protection, functionalization, and application. *Angewandte Chemie (International ed. in English)* **2007**, *46*, 1222–1244.
- (30) Jung, E.; Joo, E. Size dependence of the magnetic properties Zinc-Ferrite Nanoparticles. **2008**, *53*, 2090–2094.
- (31) Fernandez-Lafuente, R. Lipase from *Thermomyces lanuginosus*: Uses and prospects as an industrial biocatalyst. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **2010**, *62*, 197–212.
- (32) Sheldon, R. A.; van Pelt, S. Enzyme immobilisation in biocatalysis: why, what and how. *Chemical Society reviews* **2013**, *42*, 6223–6235.
- (33) Prozorov, T.; Kataby, G.; Prozorov, R.; Gedanken, A. Effect of surfactant concentration on the size of coated ferromagnetic nanoparticles. *Thin Solid Films* **1999**, *340*, 189–193.
- (34) Lee, J.; Lee, Y.; Youn, J. K.; Na, H. Bin; Yu, T.; Kim, H.; Lee, S.-M.; Koo, Y.-M.; Kwak, J. H.; Park, H. G.; et al. Simple synthesis of functionalized superparamagnetic magnetite/silica core/shell nanoparticles and their application as magnetically separable high-performance biocatalysts. *Small (Weinheim an der Bergstrasse, Germany)* **2008**, *4*, 143–152.
- (35) Huang, J.; Zhao, R.; Wang, H.; Zhao, W.; Ding, L. Immobilization of glucose oxidase on Fe₃O₄/SiO₂ magnetic nanoparticles. *Biotechnology letters* **2010**, *32*, 817–821.
- (36) Šulek, F.; Drofenik, M.; Habulin, M.; Knez, Ž. Surface functionalization of silica-coated magnetic nanoparticles for covalent attachment of cholesterol oxidase. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* **2010**, *322*, 179–185.
- (37) Jiang, Y.; Guo, C.; Xia, H.; Mahmood, I.; Liu, C.; Liu, H. Magnetic nanoparticles supported ionic liquids for lipase immobilization: Enzyme activity in catalyzing esterification. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **2009**, *58*, 103–109.
- (38) Morozova, O. V.; Shumakovich, G. P.; Gorbacheva, M. A.; Shleev, S. V.; Yaropolov, A. I. “Blue” laccases. *Biochemistry. Biokhimiia* **2007**, *72*, 1136–1150.

- (39) Sołoducho, J.; Cabaj, J. Phenolic Compounds Hybrid Detectors. *Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology* **2013**, *04*, 17–27.
- (40) Villela, S. M. Imobilização de Lacase e seu uso na biotransformação de efluentes de indústrias papeleiras., Universidade Federal de Santa Catarina, 2006, p. 113.
- (41) Lee, S.-K.; George, S. D.; Antholine, W. E.; Hedman, B.; Hodgson, K. O.; Solomon, E. I. Nature of the intermediate formed in the reduction of O(2) to H(2)O at the trinuclear copper cluster active site in native laccase. *Journal of the American Chemical Society* **2002**, *124*, 6180–6193.
- (42) Solomon, E. I.; Sundaram, U. M.; Machonkin, T. E. Multicopper Oxidases and Oxygenases. *Chemical reviews* **1996**, *96*, 2563–2606.
- (43) Mayer, A. M.; Staples, R. C. Laccase: new functions for an old enzyme. *Phytochemistry* **2002**, *60*, 551–565.
- (44) Octavio, L. C.; Irma, P. P. M. C.; Ricardo, B. R. J.; V.O. Francisco. Laccases. In *Advances in Agricultural and Food Biotechnology*; Guevara-Gonzalez, R. G.; Torres-Pacheco, I., Eds.; InstitutoTecnologico de Celaya: Kerala, India, 2006; pp. 323–340.
- (45) Kunamneni, A.; Ballesteros, A.; Plou, F. J.; Alcalde, M. Fungal laccase—a versatile enzyme for biotechnological applications. In *Applied Microbiology*; Mendez-Vilas, Ed.; Formatex: Badajoz, 2007; pp. 233–245.
- (46) Palmeiri, G.; Giardina, P.; Marzullo, L. Stability and activity of a phenol oxidase from the ligninolytic fungus *Pleurotus ostreatus*. *Applied microbiology and biotechnology* **1993**, *39*.
- (47) Nyanhongo, G. S.; Gomes, J.; Gübitz, G.; Zvauya, R.; Read, J. S.; Steiner, W. Production of laccase by a newly isolated strain of *Trametes modesta*. *Bioresource Technology* **2002**, *84*, 259–263.
- (48) Yaropolov, A. I.; Skorobogat’Ko, O. V.; Vartanov, S. S.; Varfolomeyev, S. D. Laccase. Properties, catalytic mechanism and applicability. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **1994**, *49*, 257–280.
- (49) Gianfreda, L.; Xu, F.; Bollag, J.-M. Laccases: A Useful Group of Oxidoreductive Enzymes. *Bioremediation Journal* **1999**, *3*, 1–26.
- (50) Johannes, C.; Majcherczyk, A. Natural mediators in the oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons by laccase mediator systems. *Applied and environmental microbiology* **2000**, *66*, 524–528.
- (51) Tavares, A. P. .; Gamelas, J. A. .; Gaspar, A. R.; Evtuguin, D. V; Xavier, A. M. R. . A novel approach for the oxidative catalysis employing polyoxometalate–laccase system: application to the oxygen bleaching of kraft pulp. *Catalysis Communications* **2004**, *5*, 485–489.

- (52) Marques, G.; Gamelas, J. A. F.; Ruiz-Dueñas, F. J.; del Rio, J. C.; Evtuguin, D. V.; Martínez, A. T.; Gutiérrez, A. Delignification of eucalypt kraft pulp with manganese-substituted polyoxometalate assisted by fungal versatile peroxidase. *Bioresource technology* **2010**, *101*, 5935–5940.
- (53) Gamelas, J. a. F.; Pontes, A. S. N.; Evtuguin, D. V.; Xavier, A. M. R. B.; Esculcas, A. P. New polyoxometalate–laccase integrated system for kraft pulp delignification. *Biochemical Engineering Journal* **2007**, *33*, 141–147.
- (54) Duran, N.; Esposito, E. Potential applications of oxidative enzymes and phenoloxidase-like compounds in wastewater and soil treatment: a review. *Applied catalysis B: Environmental* **2000**, *28*, 83–99.
- (55) Raghukumar, C. Fungi from marine habitats: an application in bioremediation. *Mycological Research* **2000**, *104*, 1222–1226.
- (56) Abadulla, E.; Tzanov, T.; Costa, S. Decolorization and detoxification of textile dyes with a laccase from *Trametes hirsuta*. *Applied and environmental microbiology* **2000**, *66*, 3357–3362.
- (57) Cristóvão, R. O.; Silvério, S. C.; Tavares, A. P. M.; Brígida, A. I. S.; Loureiro, J. M.; Boaventura, R. a R.; Macedo, E. a; Coelho, M. A. Z. Green coconut fiber: a novel carrier for the immobilization of commercial laccase by covalent attachment for textile dyes decolourization. *World journal of microbiology & biotechnology* **2012**, *28*, 2827–2838.
- (58) Benzina, O.; Daâssi, D. Decolorization and detoxification of two textile industry effluents by the laccase/1-hydroxybenzotriazole system. *Environmental science and pollution research international* **2013**, *20*, 5177–5187.
- (59) Singhal, A. Optimization of growth media for enhanced production of laccase by *Cryptococcus albidus* and its application for bioremediation of chemicals. *Journal of Environmental Engineering and Science*. **2013**, *36*, 1253–1264.
- (60) Kuddus, M.; Joseph, B.; Ramteke, P. W. Production of laccase from newly isolated *Pseudomonas putida* and its application in bioremediation of synthetic dyes and industrial effluents. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* **2013**, *2*, 333–338.
- (61) Larsson, S.; Cassland, P.; Jönsson, L. a *Saccharomyces cerevisiae* strain with enhanced resistance to phenolic fermentation inhibitors in lignocellulose hydrolysates by heterologous expression of laccase. *Applied and environmental microbiology* **2001**, *67*, 1163–1170.
- (62) Alvira, P.; Moreno, A.; Ibarra, D. Improving the fermentation performance of *saccharomyces cerevisiae* by laccase during ethanol production from steam-exploded wheat straw at high- substrate. *Biotechnology Progress* **2013**, *29*, 74–82.

- (63) Servili, M.; Stefano, G. De; Piacquadio, P.; Sciancalepore, V. A Novel Method for Removing Phenols from Grape Must. *American Journal of Enology and Viticulture* **2000**, *51*, 357–361.
- (64) Shuttleworth, K. L.; Bollag, J.-M. Soluble and immobilized laccase as catalysts for the transformation of substituted phenols. *Enzyme and Microbial Technology* **1986**, *8*, 171–177.
- (65) Leonowicz, A.; Sarkar, J.; Bollag, J. Improvement in stability of an immobilized fungal laccase. *Applied microbiology and biotechnology* **1988**, *29*, 129–135.
- (66) Davis, S.; Burns, R. Covalent immobilization of laccase on activated carbon for phenolic effluent treatment. *Applied microbiology and biotechnology* **1992**, *37*, 474–479.
- (67) Delanoy, G.; Li, Q.; Yu, J. Activity and stability of laccase in conjugation with chitosan. *International journal of biological macromolecules* **2005**, *35*, 89–95.
- (68) Tavares, A. P. M.; Rodríguez, O.; Fernández-Fernández, M.; Domínguez, A.; Moldes, D.; Sanromán, M. A.; Macedo, E. A. Immobilization of laccase on modified silica: stabilization, thermal inactivation and kinetic behaviour in 1-ethyl-3-methylimidazolium ethylsulfate ionic liquid. *Bioresource technology* **2013**, *131*, 405–412.
- (69) Turner, M. B.; Spear, S. K.; Holbrey, J. D.; Daly, D. T.; Rogers, R. D. Ionic liquid-reconstituted cellulose composites as solid support matrices for biocatalyst immobilization. *Biomacromolecules* **2005**, *6*, 2497–2502.
- (70) Khani, Z.; Jolival, C.; Cretin, M.; Tingry, S.; Innocent, C. Alginate/carbon composite beads for laccase and glucose oxidase encapsulation: application in biofuel cell technology. *Biotechnology letters* **2006**, *28*, 1779–1786.
- (71) Attanasio, A.; Diano, N.; Grano, V.; Sicuranza, S.; Rossi, S.; Bencivenga, U.; Fraconte, L.; Di Martino, S.; Canciglia, P.; Mita, D. G. Nonisothermal bioreactors in the treatment of vegetation waters from olive oil: laccase versus syringic acid as bioremediation model. *Biotechnology progress* **2005**, *21*, 806–815.
- (72) Ahn, M.-Y.; Zimmerman, A. R.; Martínez, C. E.; Archibald, D. D.; Bollag, J.-M.; Dec, J. Characteristics of *Trametes villosa* laccase adsorbed on aluminum hydroxide. *Enzyme and Microbial Technology* **2007**, *41*, 141–148.
- (73) Wang, F.; Guo, C.; Liu, H. Z.; Liu, C. Z. Reversible immobilization of glucoamylase by metal affinity adsorption on magnetic chelator particles. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **2007**, *48*, 1–7.
- (74) Qiu, H.; Xu, C.; Huang, X.; Ding, Y.; Qu, Y.; Gao, P. Immobilization of Laccase on Nanoporous Gold: Comparative Studies on the Immobilization Strategies and the Particle Size Effects. *The Journal of Physical Chemistry C* **2009**, *113*, 2521–2525.

- (75) Jiang, D.; Long, S.; Huang, J. Immobilization of *Pycnoporus sanguineus* laccase on magnetic chitosan microspheres. *Biochemical Engineering Journal* **2005**, *25*, 15–23.
- (76) Zheng, X.; Wang, Q.; Jiang, Y.; Gao, J. Biomimetic Synthesis of Magnetic Composite Particles for Laccase Immobilization. *Industrial & Engineering Chemistry Research* **2012**, *51*, 10140–10146.
- (77) Wang, F.; Guo, C.; Yang, L.; Liu, C. Magnetic mesoporous silica nanoparticles: Fabrication and their laccase immobilization performance. *Bioresource technology* **2010**, *101*, 8931–8935.
- (78) Kalkan, N. A.; Aksoy, S.; Aksoy, E. A.; Hasirci, N. Preparation of chitosan-coated magnetite nanoparticles and application for immobilization of laccase. *Journal of Applied Polymer Science* **2012**, *123*, 707–716.
- (79) Wang, Y.; Chen, X.; Liu, J.; He, F.; Wang, R. Immobilization of laccase by Cu(2+) chelate affinity interaction on surface-modified magnetic silica particles and its use for the removal of 2,4-dichlorophenol. *Environmental science and pollution research international* **2013**, *20*, 6222–6231.
- (80) Fernández-Fernández, M.; Sanromán, M. Á.; Moldes, D. Recent developments and applications of immobilized laccase. *Biotechnology advances* **2013**, *31*, 1808–1825.
- (81) Ibrahim, N. A.; Gouda, M.; El-Shafei, A. N.; Abdel-Fatah, O. M. Antimicrobial activity of cotton fabrics containing immobilized enzymes. *Journal of Applied Polymer Science* **2007**, *104*, 1754–1761.
- (82) Dodor, D. E.; Hwang, H.-M.; Ekunwe, S. I. . Oxidation of anthracene and benzo[a]pyrene by immobilized laccase from *Trametes versicolor*. *Enzyme and Microbial Technology* **2004**, *35*, 210–217.
- (83) Hu, X.; Zhao, X.; Hwang, H.-M. Comparative study of immobilized *Trametes versicolor* laccase on nanoparticles and kaolinite. *Chemosphere* **2007**, *66*, 1618–1626.
- (84) Bayramoğlu, G.; Yakup Arıca, M. Immobilization of laccase onto poly(glycidylmethacrylate) brush grafted poly(hydroxyethylmethacrylate) films: Enzymatic oxidation of phenolic compounds. *Materials Science and Engineering: C* **2009**, *29*, 1990–1997.
- (85) Fernando Bautista, L.; Morales, G.; Sanz, R. Immobilization strategies for laccase from *Trametes versicolor* on mesostructured silica materials and the application to the degradation of naphthalene. *Bioresource technology* **2010**, *101*, 8541–8548.
- (86) Rodríguez Couto, S.; Osma, J. F.; Saravia, V.; Gübitz, G. M.; Toca Herrera, J. L. Coating of immobilised laccase for stability enhancement: A novel approach. *Applied Catalysis A: General* **2007**, *329*, 156–160.

- (87) Wang, P.; Fan, X.; Cui, L.; Wang, Q.; Zhou, A. Decolorization of reactive dyes by laccase immobilized in alginate/gelatin blend with PEG. *Journal of Environmental Sciences* **2008**, *20*, 1519–1522.
- (88) Russo, M. E.; Giardina, P.; Marzocchella, A.; Salatino, P.; Sanna, G. Assessment of anthraquinone-dye conversion by free and immobilized crude laccase mixtures. *Enzyme and Microbial Technology* **2008**, *42*, 521–530.
- (89) Cristóvão, R. O.; Tavares, A. P. M.; Brígida, A. I.; Loureiro, J. M.; Boaventura, R. A. R.; Macedo, E. A.; Coelho, M. A. Z. Immobilization of commercial laccase onto green coconut fiber by adsorption and its application for reactive textile dyes degradation. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **2011**, *72*, 6–12.
- (90) Daâssi, D.; Mechichi, T.; Nasri, M.; Rodríguez-Couto, S. Decolorization of the metal textile dye Lanaset Grey G by immobilized white-rot fungi. *Journal of environmental management* **2013**, *129*, 324–332.
- (91) Daâssi, D.; Rodríguez-Couto, S.; Nasri, M.; Mechichi, T. Biodegradation of textile dyes by immobilized laccase from *Corioloropsis gallica* into Ca-alginate beads. *International Biodeterioration & Biodegradation* **2014**, *90*, 71–78.
- (92) Nogala, W.; Rozniecka, E.; Zawisza, I.; Rogalski, J.; Opallo, M. Immobilization of ABTS – laccase system in silicate based electrode for bioelectrocatalytic reduction of dioxygen. *Electrochemistry Communications* **2006**, *8*, 1850–1854.
- (93) Vaz-Dominguez, C.; Campuzano, S.; Rudigera, O.; Pita, M.; Gorbacheva, M.; Shleev, S.; Fernandez, V. M.; De Lacey, A. Laccase electrode for direct electrocatalytic reduction of O₂ to H₂O with high-operational stability and resistance to chloride inhibition. *Biosensors and Bioelectronics* **2008**, *24*, 531–537.
- (94) Tan, Y.; Deng, W.; Ge, B.; Xie, Q.; Huang, J.; Yao, S. Biofuel cell and phenolic biosensor based on acid-resistant laccase-glutaraldehyde functionalized chitosan-multiwalled carbon nanotubes nanocomposite film. *Biosensors & bioelectronics* **2009**, *24*, 2225–2231.
- (95) Pang, H. L.; Liu, J.; Hu, D.; Zhang, X. H.; Chen, J. H. Immobilization of laccase onto 1-aminopyrene functionalized carbon nanotubes and their electrocatalytic activity for oxygen reduction. *Electrochimica Acta* **2010**, *55*, 6611–6616.
- (96) Ardhaoui, M.; Zheng, M.; Pulpytel, J.; Dowling, D.; Jolival, C.; Khonsari, F. A. Plasma functionalized carbon electrode for laccase-catalyzed oxygen reduction by direct electron transfer. *Bioelectrochemistry (Amsterdam, Netherlands)* **2013**, *91*, 52–61.
- (97) Quan, D.; Kim, Y.; Shin, W. Characterization of an amperometric laccase electrode covalently immobilized on platinum surface. *Journal of Electroanalytical Chemistry* **2004**, *561*, 181–189.

- (98) Quan, D.; Kim, Y.; Shin, W. Sensing characteristics of tyrosinase immobilized and tyrosinase, laccase co-immobilized platinum electrodes. *Bulletin-KOREAN CHEMICAL society* **2004**, *25*, 1195–1201.
- (99) Anık Kırgöz, Ü.; Tural, H.; Timur, S.; Pazarlıoğlu, N.; Telefoncu, A.; Pilloton, R. Laccase Biosensors Based on Mercury Thin Film Electrode. *Artificial Cells, Blood Substitutes and Biotechnology* **2005**, *33*, 447–456.
- (100) Portaccio, M.; Di Martino, S.; Maiuri, P.; Durante, D.; De Luca, P.; Lepore, M.; Bencivenga, U.; Rossi, S.; De Maio, a.; Mita, D. G. Biosensors for phenolic compounds: The catechol as a substrate model. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **2006**, *41*, 97–102.
- (101) Zhang, Y.; Zeng, G.-M.; Tang, L.; Huang, D.-L.; Jiang, X.-Y.; Chen, Y.-N. A hydroquinone biosensor using modified core-shell magnetic nanoparticles supported on carbon paste electrode. *Biosensors & bioelectronics* **2007**, *22*, 2121–2126.
- (102) Tang, L.; Zeng, G.; Liu, J.; Xu, X.; Zhang, Y.; Shen, G.; Li, Y.; Liu, C. Catechol determination in compost bioremediation using a laccase sensor and artificial neural networks. *Analytical and bioanalytical chemistry* **2008**, *391*, 679–685.
- (103) Fu, J.; Qiao, H.; Li, D.; Luo, L.; Chen, K.; Wei, Q. Laccase Biosensor Based on Electrospun Copper/Carbon Composite Nanofibers for Catechol Detection. *Sensors* **2014**, *14*, 3543–3556.
- (104) Bumb, A.; Brechbiel, M. W.; Choyke, P. L.; Fugger, L.; Eggeman, A.; Prabhakaran, D.; Hutchinson, J.; Dobson, P. J. Synthesis and characterization of ultra-small superparamagnetic iron oxide nanoparticles thinly coated with silica. *Nanotechnology* **2008**, *19*, 335601.
- (105) Ferreira, J. A.; Daniel-Da-Silva, A. L.; Alves, R. M. P.; Duarte, D.; Vieira, I.; Santos, L. L.; Vitorino, R.; Amado, F. Synthesis and optimization of lectin functionalized nanoprobe for the selective recovery of glycoproteins from human body fluids. *Analytical Chemistry* **2011**, *83*, 7035–7043.
- (106) Ander, P.; Messner, K. Oxidation of 1-hydroxybenzotriazole by laccase and lignin peroxidase. *Biotechnology Techniques* **1998**, *12*, 191–195.
- (107) Cabana, H.; Alexandre, C.; Agathos, S. N.; Jones, J. P. Immobilization of laccase from the white rot fungus *Coriolopsis polyzona* and use of the immobilized biocatalyst for the continuous elimination of endocrine disrupting chemicals. *Bioresource technology* **2009**, *100*, 3447–3458.
- (108) Bezerra, M. A.; Santelli, R. E.; Oliveira, E. P.; Villar, L. S.; Escalera, L. A. Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. *Talanta* **2008**, *76*, 965–977.

- (109) Montgomery, D.; Myers, R. Response surface methodology: process and product optimization using designed experiments. In *Design and Analysis of Experiments.*; John Wiley & Sons, Inc., 2009.
- (110) Arroyo, M.; Sánchez-Montero, J. M.; Sinisterra, J. V. Thermal stabilization of immobilized lipase B from *Candida antarctica* on different supports: Effect of water activity on enzymatic activity in organic media. *Enzyme and Microbial Technology* **1999**, *24*, 3–12.
- (111) Saraiva, J.; Tavares, A. P. M.; Xavier, A. M. R. B. Effect of the inducers veratryl alcohol, Xylidine, and ligninosulphonates on activity and thermal stability and inactivation kinetics of laccase from *Trametes versicolor*. *Applied biochemistry and biotechnology* **2012**, *167*, 685–693.
- (112) Ladero, M.; Ruiz, G.; Pessela, B. C. C.; Vian, a.; Santos, a.; Garcia-Ochoa, F. Thermal and pH inactivation of an immobilized thermostable β -galactosidase from *Thermus* sp. strain T2: Comparison to the free enzyme. *Biochemical Engineering Journal* **2006**, *31*, 14–24.
- (113) Michaelis, L.; Menten, M. L.; Johnson, K. A.; Goody, R. S. The original Michaelis constant: translation of the 1913 Michaelis-Menten paper. *Biochemistry* **2011**, *50*, 8264–8269.
- (114) Francis, F.; Sabu, A. Use of response surface methodology for optimizing process parameters for the production of α -amylase by *Aspergillus oryzae*. *Biochemical Engineering Journal* **2003**, *15*, 107–115.
- (115) Esfahanian, M.; Nikzad, M.; Najafpour, G.; Ghoreyshi, A. Modeling and optimization of ethanol fermentation using *Saccharomyces cerevisiae*: Response surface methodology and artificial neural network. *Chemical Industry and Chemical Engineering Quarterly* **2013**, *19*, 241–252.
- (116) Wang, H.; Zhang, W.; Zhao, J.; Xu, L. Rapid Decolorization of Phenolic Azo Dyes by Immobilized Laccase with Fe₃O₄/SiO₂ Nanoparticles as Support. *Industrial & Engineering Chemistry Research* **2013**, *12*, 4401–4407.
- (117) Ferreira, R. V. Síntese e Caracterização de Nanopartículas Magnéticas Funcionalizadas com Núcleo Magnético de Magnetita, Universidade Federal de Minas Gerais, 2009, p. 93.
- (118) Arias, J. L.; Gallardo, V.; Gómez-Lopera, S. a; Plaza, R. C.; Delgado, a V. Synthesis and characterization of poly(ethyl-2-cyanoacrylate) nanoparticles with a magnetic core. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society* **2001**, *77*, 309–321.
- (119) Kulys, J.; Vidziunaite, R. Modulation of laccases activity by soluble polymers. *Biologija* **2002**, *500*, 0–3.

- (120) Shamim, N.; Hong, L.; Hidajat, K.; Uddin, M. S. Thermosensitive-polymer-coated magnetic nanoparticles: adsorption and desorption of bovine serum albumin. *Journal of colloid and interface science* **2006**, *304*, 1–8.
- (121) Kouassi, G. K.; Irudayaraj, J.; McCarty, G. Examination of Cholesterol oxidase attachment to magnetic nanoparticles. *Journal of nanobiotechnology* **2005**, *3*, 1.
- (122) Pinto, G. F.; Menezes, R. R. *Cinética enzimática*; 1° ed.; Editora E-papers: Rio de Janeiro, 2009; p. 320.
- (123) Swarnalatha, V.; Aluri Esther, R.; Dhamodharan, R. Immobilization of α -amylase on gum acacia stabilized magnetite nanoparticles, an easily recoverable and reusable support. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **2013**, *96*, 6–13.
- (124) Huang, J.; Liu, C.; Xiao, H.; Wang, J.; Jiang, D.; Gu, E. Zinc tetraaminophthalocyanine-Fe₃O₄ nanoparticle composite for laccase immobilization. *International journal of nanomedicine* **2007**, *2*, 775–784.
- (125) Ai, Z.; Jiang, Z.; Li, L.; Deng, W.; Kusakabe, I.; Li, H. Immobilization of *Streptomyces olivaceoviridis* E-86 xylanase on Eudragit S-100 for xylo-oligosaccharide production. *Process Biochemistry* **2005**, *40*, 2707–2714.
- (126) Huang, J.; Xiao, H.; Li, B.; Wang, J.; Jiang, D. Immobilization of *Pycnoporus sanguineus* laccase on copper tetra-aminophthalocyanine-Fe(3)O(4) nanoparticle composite. *Biotechnology and applied biochemistry* **2006**, *44*, 93–100.
- (127) Cao, L.; Schmid, R. D. Factors Which Dictate Enzyme Performance. In *Carrier-bound Immobilized Enzymes: Principles, Application and Design*; John Wiley & Sons: Weinheim, FRG, 2006; pp. 85–90.
- (128) Mateescu, M.; Agostinelli, E.; Weltrowska, G.; Weltrowski, M.; Mondovi, B. Specific immobilization of laccase on p-benzoquinone-activated supports. *Biology of Metals* **1990**, *3*, 98–102.
- (129) Nwagu, T.; Aoyagi, H.; Okolo, B. Adsorption and Stabilization of a Raw Starch Digesting Amylase on Micro Bead Silica Gel 300 A. *British Biotechnology Journal* **2012**, *2*, 85–101.
- (130) Stuart, B. *Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications*; 2° ed.; John Wiley & Sons, Inc.: Chichester, UK, 2004; p. 244.
- (131) Coblenz Society Inc.; NIST Chemistry WebBook. Evaluated Infrared Reference Spectra <http://webbook.nist.gov/cgi/cbook.cgi?ID=C497198&Type=IR-SPEC&Index=1#IR-SPEC> (accessed Jun 20, 2014).

