

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA AMBIENTAL

HÉLEN CRISTINA OLIVEIRA DOS REIS

**IMOBILIZAÇÃO DA LACASE EM NANOCELULOSE BACTERIANA:
OTIMIZAÇÃO E AVALIAÇÃO NA BIOTRANSFORMAÇÃO DE COMPOSTOS
FENÓLICOS**

CURITIBA
2020

HÉLEN CRISTINA OLIVEIRA DOS REIS

**IMOBILIZAÇÃO DA LACASE EM NANOCELULOSE BACTERIANA:
OTIMIZAÇÃO E AVALIAÇÃO NA BIOTRANSFORMAÇÃO DE COMPOSTOS
FENÓLICOS**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental na Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Gustavo Henrique Couto
Coorientadora: Profa. Dra. Giselle Maria Maciel

**CURITIBA
2020**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

Reis, Hélen Cristina Oliveira dos

Imobilização da lacase em nanocelulose bacteriana: otimização e avaliação na biotransformação de compostos fenólicos [recurso eletrônico] / Hélen Cristina Oliveira dos Reis. -- 2020.

1 arquivo texto (107 f.): PDF; 10,6 MB.

Modo de acesso: World Wide Web.

Título extraído da tela de título (visualizado em 07 jul. 2020).

Texto em português com resumo em inglês.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental, Curitiba, 2020.

Bibliografia: f. 92-101.

1. Tecnologia ambiental - Dissertações. 2. Lacase - Biotecnologia. 3. Fenóis - Poluição. 4. Celulose - Biodegradação. 5. Biopolímeros. I. Couto, Gustavo Henrique, orient. II. Maciel, Giselle Maria, coorient. III. Universidade Tecnológica Federal do Paraná - Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental, inst. IV. Título.

CDD: Ed. 23 -- 363.7

Biblioteca Ecoville da UTFPR, Câmpus Curitiba
Bibliotecária: Lucia Ferreira Littiere - CRB 9/1271
Aluna de Biblioteconomia: Josiane Manguera

TERMO DE APROVAÇÃO DE DISSERTAÇÃO Nº 136

A Dissertação de Mestrado intitulada: **IMOBILIZAÇÃO DA LACASE EM NANOCELULOSE BACTERIANA: OTIMIZAÇÃO E AVALIAÇÃO NA BIOTRANSFORMAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS**, defendida em sessão pública pela Candidata **Hélen Cristina Oliveira dos Reis**, no dia 28 de fevereiro 2020, foi julgada para a obtenção do título de Mestre em Ciência E Tecnologia Ambiental, área de concentração: Tecnologias E Processos Ambientais, linha de pesquisa: Processos Químicos E Biotecnológicos De Tratamento E Valorização De Resíduos, e aprovada em sua forma final, pelo Programa de Pós-Graduação em Ciência E Tecnologia Ambiental.

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Gustavo Henrique Couto - Presidente - UTFPR

Prof^a. Dr^a. Tatiane Brugnari - UTFPR

Prof^a. Dr^a. Juliana Inaba - UEPG

A via original deste documento encontra-se arquivada na Secretaria do Programa, contendo a assinatura da Coordenação após a entrega da versão corrigida do trabalho.

**Dedico este trabalho aos meus
pais, Zelia e Dalvino por tudo.**

AGRADECIMENTOS

A Deus e ao universo por emanarem suas energias e forças para que eu pudesse trilhar o meu caminho com determinação e persistência.

Aos meus pais, Dalvino e Zelia, por sempre estarem ao meu lado e apoiarem todas as minhas decisões, pelos sacrifícios realizados para que eu pudesse ir atrás dos meus sonhos além de serem meu exemplo de honestidade, amizade, amor e cumplicidade.

Ao meu irmão Danilo por ser meu companheiro ao longo de todos estes anos e me ensinar a ter paciência, companheirismo e respeito.

A minha família que sempre esteve me apoiando e torcendo pelo meu sucesso.

Ao meu orientador, Gustavo Henrique Couto, pelos ensinamentos acadêmicos e pela confiança em minha pesquisa.

A minha coorientadora, Gisele Maria Maciel, pela assistência na minha pesquisa e também por todos os ensinamentos acadêmicos.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pesquisa e Ensino Superior (CAPES) pela concessão da minha bolsa para que eu pudesse realizar este trabalho.

A Universidade Tecnológica Federal do Paraná, ao Departamento de Química e Biologia e aos Laboratórios de Pesquisa Relacionada a Biomassa e Bioenergia (LAPREBB), ao laboratório de Microbiologia, ao Laboratório de Tratamento de Águas Residuárias (LATAR), ao Laboratório Multiusuário de Análises Químicas (LAMAQ), ao Laboratório Multiusuário de Equipamentos e Análises Ambientais (LAMEAA) e ao Centro Multiusuário de Caracterização de Materiais (CMCM) - UTFPR pela estrutura e oportunidade de poder desenvolver o presente trabalho.

A Jean-Luc por me mostrar o real significado de companheirismo, amizade e amor. Por ser meu suporte e transmitir uma paz e tranquilidade para que eu enfrente a vida com mais leveza.

Aos meus amigos de longa data, Alexandre, Arany, Kamila, Rhaony, Thamires e Caroline por estarem ao meu lado em toda minha trajetória acadêmica, serem meus confidentes e proporcionarem os melhores momentos e as melhores risadas.

Aos meus parceiros de mestrado, Fernando, Ketinny e Pedro por estarem comigo enquanto trilhei este trabalho dando o suporte necessário além de compartilharem momentos inesquecíveis comigo. Aos amigos feitos em Curitiba, Adriana, Camila, Eduarda, Mariana, Renata, Tatiani e Viviane, que levarei no coração com muito carinho.

“Everything that has existed, lingers in the eternity”.
Agatha Christie

RESUMO

REIS, H.C.O. **Imobilização da Lacase em Nanocelulose Bacteriana: Otimização e Avaliação na Biotransformação de Compostos Fenólicos**. 107 p. Dissertação. Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Curitiba, 2020.

O tratamento biológico pela utilização de enzimas no processo de biorremediação pode ser vantajoso por ser uma alternativa eficiente, econômica e ambientalmente correta. Dentre os compostos de interesse, pode-se citar os compostos fenólicos, pois, a problemática envolvendo estes compostos deve-se a sua baixa degradabilidade e elevada toxicidade no meio ambiente. Quanto as enzimas relacionadas a biorremediação, destaca-se a lacase que pode degradar compostos recalcitrantes necessitando basicamente de oxigênio para que o processo ocorra. Este trabalho teve como objetivo imobilizar uma lacase de *Myceliophthora thermophila* em nanocelulose bacteriana (NCB) para a biotransformação de compostos fenólicos visando maior estabilidade operacional e a possibilidade de reuso, favorecendo assim sua aplicação em condições operacionais na indústria. O suporte para imobilização, a NCB, é um biopolímero produzido por algumas espécies de bactérias e apresenta diversas vantagens, como biodegradabilidade, elevada área superficial, resistência mecânica e flexibilidade. Portanto, primeiramente produziu-se a nanocelulose em escala laboratorial, a qual foi purificada e liofilizada. Em seguida, um delineamento experimental do tipo Box-Behnken foi elaborado para que a lacase pudesse ser imobilizada pelo método de *cross-linking*. As variáveis selecionadas para a otimização do processo foram pH (3, 4 e 5), concentração de enzima (200, 350 e 500 U L⁻¹) e concentração de glutaraldeído (0,125%, 0,5% e 0,875%). A condição otimizada de imobilização foi de pH 5, concentração de enzima de 200 U L⁻¹ e concentração de glutaraldeído de 0,4%. A imobilização da lacase ocorreu em três etapas: (1) fase de adsorção em que se adicionou 10 mg ±1 de NCB em tubos contendo 10 mL de lacase durante 30 minutos por 150 rpm a 30°C, (2) adição de glutaraldeído para passar por uma fase estacionária a 4°C por um período de 12 horas e (3) os tubos contendo a solução lacase e NCB passaram para uma etapa com rotação a 150 rpm por duas horas a 30°C. Após o processo de imobilização, realizaram-se testes para determinar as condições ótimas da atividade enzimática da enzima livre (EL) e imobilizada utilizando como substrato o ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico) (ABTS), em que se observou as melhores condições para o pH 4 e temperatura de 60°C. Em seguida, foram realizados os testes para a determinação da estabilidade operacional, do armazenamento e reuso do sistema além das aplicações. Todos os testes foram realizados em triplicatas e utilizando as condições ótimas previamente definidas. Em relação ao armazenamento a enzima imobilizada (EI) manteve a sua atividade relativa entre 90 a 70% mesmo após quatro semanas, enquanto, a EL manteve somente 40% após o período de quatro semanas. Quanto ao reuso, a EI manteve a atividade relativa em cerca de 60% e 38% no quarto ciclo e no último ciclo (sétimo), respectivamente. Por fim, a EI apresentou resultados promissores como a possibilidade de ser um detector (biossensor) do catecol visto que após 90 minutos foi possível detecta-lo por UV-VIS quanto como um suporte com propriedades antioxidantes resultante da interação lacase e ácido ferúlico, podendo reter até 50 % da atividade antioxidante do ácido ferúlico (15 mM), além de ser possível o processo de biocoloração.

Palavras-chave: Lacase-*Myceliophthora thermophila*, *cross-linking*, Catecol.

ABSTRACT

REIS, H.C.O. **Immobilization of Laccase in Bacterial Nanocelulose: Optimization and Evaluation of the Biotransformation of Phenolic Compounds.** 107 p. Master Thesis. Postgraduate Program in Environmental Science and Technology. Federal University of Technology - Paraná. Curitiba, 2020.

Biological treatment through the application of enzymes may be an interesting alternative considering it is an efficient, economic and environmentally friendly alternative. Regarding the pollutants of interest in bioremediation, phenolic compounds can be mentioned, due the fact the problem involving these compounds is due to their low degradability and high toxicity in the environment. Among the enzymes that can be used in the bioremediation process, laccase can be presented as a possibility for the degradation of persistent compounds, because, it requires only oxygen for degradation to occur. Therefore, this work aimed to immobilize a *Myceliophthora thermophila* laccase in bacterial nanocelulose (BNC) for the biotransformation of phenolic compounds aiming at greater operational stability and the possibility of reuse, thus favoring its potential application under industrial operating conditions. The immobilization support, BNC, is a biopolymer produced by some species of bacteria that has several advantages such as biodegradability, high surface area, mechanical strength and flexibility, among others. Therefore, for this work, first it was produced the nanocelulose then the purification process was performed so the nanocelulose could pass to the lyophilization process. Then, a Box-Behnken experimental design was designed in order that the laccase could be immobilized by the *cross-linking* method. This design focused on the optimization of the immobilization process by evaluating the pH variation (3, 4 and 5), enzyme concentration. (200, 350 and 500 U L⁻¹) and concentration of glutaraldehyde (0.125%, 0.5% and 0.875%). The optimized immobilization condition was at pH 5, enzyme concentration of 200 U L⁻¹ and glutaraldehyde concentration of 0.4%. Immobilization occurred in three stages: (1) adsorption phase in which 10 mg ± 1 BNC was added to tubes containing 10 mL laccase for 30 minutes at 150 rpm at 30 ° C, (2) addition of glutaraldehyde to pass through a static phase at 4°C during overnight and (3) the tubes containing the laccase and BNC solution were rotated at 150 rpm for two hours at 30°C. Subsequently, the immobilization process was performed to determine the optimal conditions for enzyme activity of the free and immobilized laccase using 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) as substrate, where the best conditions were observed at pH 4 and 60°C. Then the tests were performed to determine the kinetic parameters, thermal stability, free and immobilized enzyme storage and reuse of the immobilized enzyme, all tests performed in triplicates and using the previously defined optimal conditions. Regarding storage test, the immobilized laccase maintained its relative activity between 90 and 70% after four weeks, while free enzyme maintained after four weeks 40% of its activity. As for the reuse, the immobilized enzyme maintained the relative activity in about 60% and 37% in the fourth cycle and in the last cycle (seventh), respectively. Lastly, the immobilized enzyme showed promising results for being used as detector (biosensor) for catechol considering the fact that even after 90 minutes, it was still possible to detect it by UV-VIS also as a support with antioxidant properties regarding the interaction laccase and ferulic acid, being possible to retain 50% of the antioxidant activity of acid ferulic (15 mM), besides the possibility of the biocoloration process.

Keywords: Laccase-*Myceliophthora thermophila*, cross-linking, Catechol.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Técnicas aplicadas no processo de biorremediação.	22
Figura 2 – Caminho plausível dos elétrons pelos sítios ativos da lacase de <i>Trametes versicolor</i>	24
Figura 3 – Estrutura cristalina de lacase <i>Myceliophthora thermophila</i>	25
Figura 4 – Processo de oxidação do 2-Cloro-4-(hidroximetil)fenol pela lacase.	26
Figura 5 – Representação da estrutura química de possíveis mediadores para o sistema lacase- mediador.	29
Figura 6 – Mecanismo cíclico da oxidação de um substrato por meio de um sistema lacase- mediador.	29
Figura 7 – Esquema dos dois tipos das reações catalisadas pela lacase: tipo A - sem a presença de um mediador (oxidação direta) e tipo B - com a presença de mediador (oxidação indireta).	30
Figura 8 – Técnicas de imobilização: (A) ligação covalente; (B) adsorção; (C) <i>cross-linking</i> ; (D) encapsulamento e (E) aprisionamento.	32
Figura 9 – Fatores a serem considerados na escolha do suporte em que a enzima será imobilizada.	34
Figura 10 – Microscopia eletrônica de varredura da nanocelulose bacteriana produzida por <i>Gluconacetobacter xylinus</i> (aumento de 50.000 vezes).	38
Figura 11 – Diversas aplicações para a lacase.	40
Figura 12 – Aplicações biotecnológicas gerais da lacase.	41
Figura 13 – Fluxograma das principais etapas do projeto.	43
Figura 14 – Representação esquemática do procedimento empregado para o cultivo de NCBs em placas de cultivo celular de 6 poços.	45
Figura 15 – Representação esquemática do procedimento empregado para avaliar o efeito do sistema lacase-mediador com a finalidade de preparar a NCB com propriedades antioxidantes do ácido ferúlico (processo <i>grafting</i>).	55
Figura 16 – Nanocelulose bacteriana produzida por <i>Gluconacetobacter</i> sp.	58
Figura 17 – Celulose bacteriana liofilizada com o corte padrão.	59
Figura 18 – Nanocelulose bacteriana liofilizada (A) e seca em estufa a 60°C (B).	60
Figura 19 – Nanocelulose bacteriana após o corte padronizado em 6 mm de diâmetro.	60
Figura 20 – Microscopia eletrônica de varredura da nanocelulose bacteriana após secagem pelo processo de liofilização (A) e em estufa (B) (aumento de 5.000 vezes).	61

Figura 21 – Avaliação da influência do tempo no processo de imobilização por adsorção e análise do tempo de reação do ABTS para a atividade enzimática.	62
Figura 22 – Gráfico de Pareto dos efeitos padronizados tendo como resposta a recuperação da atividade enzimática (%).	65
Figura 23 – Superfície de resposta e gráfico de contorno quanto a recuperação da atividade enzimática em função das variáveis independentes.	66
Figura 24 – Microscopia eletrônica de varredura da nanocelulose bacteriana antes (A) e após (B) do processo de imobilização com lacase (aumento de 20.000 vezes).	68
Figura 25 – Difração Raios-X da NCB	70
Figura 26 – Espectroscopia ATR-FTIR da NCB e da EI em nanocelulose bacteriana.	71
Figura 27 – Efeito de diferentes pHs na atividade enzimática tanto da lacase livre quanto imobilizada. – pH ótimo.	72
Figura 28 – Efeito de diferentes temperaturas na atividade enzimática da lacase livre e imobilizada em NCB.	73
Figura 29 – Efeito do cobre e do zinco na atividade enzimática da lacase livre e imobilizada em NCB.	74
Figura 30 – Gráfico de Lineweaver-Burk com o gráfico do inverso da velocidade pelo inverso do substrato de ABTS para o cálculo dos parâmetros cinéticos.	76
Figura 31 – Termoestabilidade da enzima lacase em diferentes temperaturas.	77
Figura 32 – Estabilidade a estocagem da enzima lacase após imobilização.	79
Figura 33 – Reuso da enzima imobilizada durante 7 ciclos seguidos utilizando o ABTS como substrato.	80
Figura 34 – Biotransformação do catecol por lacase livre e imobilizada.	81
Figura 35 – Amostras da NCB como detector da presença do catecol após o processo de biotransformação do mesmo pela lacase imobilizada.	82
Figura 36 – Avaliação da atividade antioxidante pela metodologia DPPH.	83
Figura 37 – Avaliação da atividade antioxidante pela metodologia FRAP.	84
Figura 38 – Amostras da NCB após o processo de polimerização do ácido ferúlico por lacase imobilizada (a esquerda) e amostras da solução de ácido ferúlico após o mesmo processo (a direita) após 12 horas.	85
Figura 39 – Determinação do conteúdo total de fenóis nas amostras analisadas.	86
Figura 40 – Determinação total do conteúdo total de fenóis para as amostras analisadas.	87
Figura 41 – Análise de variância (ANOVA) para otimização do processo de imobilização frente a recuperação da atividade enzimática.	102

Figura 42 – Gráfico de contorno quanto a recuperação da atividade enzimática em função da concentração da enzima e do pH, enquanto a concentração de glutaraldeído foi mantido constante no nível central.....	103
Figura 43 – Superfície de resposta e gráfico de contorno quanto a recuperação da atividade enzimática em função da concentração de glutaraldeído e do pH, enquanto a concentração da enzima foi mantida constante no nível central.	103
Figura 44 – Superfície de resposta e gráfico de contorno quanto a recuperação da atividade enzimática em função da concentração de glutaraldeído e da concentração da enzima, enquanto o pH foi mantido constante no nível central.....	104
Figura 45 – Valores otimizados das variáveis independentes para o processo de imobilização.	104
Figura 46 – Curva padrão para análise de DPPH realizada no laboratório de BIOTEC.	105
Figura 47 – Curva padrão para análise de FRAP realizada no laboratório de BIOTEC.	106
Figura 48 – Curva padrão para análise de Fenóis Totais realizada no laboratório de BIOTEC.	107

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Fatores e níveis das variáveis independentes estabelecidos para delineamento experimental.....	47
Tabela 2 – Matriz do tipo Box-Behnken para o delineamento experimental.....	47
Tabela 3 – Matrix do delineamento experimental do tipo Box-Behnken em relação aos 15 experimentos realizados com as variáveis independentes com a resposta sendo a recuperação da atividade enzimática, além de apresentar os valores para a taxa de imobilização.	64
Tabela 4 – Valores dos parâmetros K_M e $V_{máx}$ referente a cinética da enzima livre e imobilizada.	76

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Enzimas oxirredutases envolvidas no processo de biorremediação e suas funções.	23
Quadro 2 – Grupos fenólicos e suas estruturas de carbonos	27
Quadro 3 – Compostos fenólicos citados como poluentes prioritários e sua estrutura química.	28
Quadro 4 – Exemplos de estudos utilizando lacase imobilizada para remoção de diversos contaminantes, os métodos de imobilização e tipos de suportes.....	35
Quadro 5 – Exemplos de estudos utilizando a nanocelulose bacteriana como suporte para a lacase.....	39

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ABTS	Ácido 2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazole-6-sulfonato
ATR-FTIR	<i>Fourier-transform infrared spectroscopy</i> (Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier)
BET	<i>Brunauer, Emmett, Teller</i>
CF's	Compostos Fenólicos
CV	Celulose Vegetal
DRX	Difração Raios-X
EDS	Espectroscopia de Energia Dispersiva
EI	Enzima Imobilizada
EL	Enzima Lacase
IUPAC	União Internacional de Química Pura e Aplicada
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
NCB	Nanocelulose bacteriana
UFC	Unidade Formadora de Colônia
USEPA	United States Environmental Protection Agency

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
2	OBJETIVOS	20
2.1	GERAL	20
2.2	ESPECÍFICOS	20
3	REFERENCIAL TEÓRICO	21
3.1	BIOTECNOLOGIA: PROCESSOS DE BIORREMEDIAÇÃO	21
3.1.1	UTILIZAÇÃO DE ENZIMAS EM PROCESSOS DE REMEDIAÇÃO	21
3.2	LACASES	23
3.2.1	ESTRUTURA E FUNÇÕES BIOQUÍMICAS DAS LACASES	24
3.2.2	SISTEMA LACASE-MEDIADOR	28
3.3	IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS	31
3.3.1	MÉTODOS DE IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS	31
3.3.2	TIPOS DE SUPORTE	33
3.3.3	IMOBILIZAÇÃO DA LACASE	35
3.4	NANOCELULOSE BACTERIANA COMO SUPORTE PARA ENZIMAS	36
3.5	APLICAÇÕES DA LACASE IMOBILIZADA	40
4	METODOLOGIA	43
4.1	MATERIAIS	44
4.2	PRODUÇÃO E TRATAMENTO DA NANOCELULOSE BACTERIANA	44
4.3	TESTES PRELIMINARES	46
4.4	IMOBILIZAÇÃO DA LACASE NA NANOCELULOSE BACTERIANA	46
4.4.1	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E ANÁLISE ESTATÍSTICA	47
4.5	CARACTERIZAÇÃO DA NANOCELULOSE BACTERIANA: ANTES E APÓS IMOBILIZAÇÃO	48
4.5.1	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV) E ESPECTROSCOPIA DE ENERGIA DISPERSIVA (EDS).....	48
4.5.2	DIFRAÇÃO DE RAIOS-X (DRX).....	48
4.5.3	ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR) COM MODO DE REFLEXÃO TOTAL ATENUADA (ATR):	49
4.6	ANÁLISE DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA	49
4.7	CONDIÇÕES ÓTIMAS PARA A ATIVIDADE ENZIMÁTICA QUANTO AO pH E TEMPERATURA	51
4.8	INFLUÊNCIA DE METAIS NA ATIVIDADE DA LACASE LIVRE E IMOBILIZADA	51
4.9	DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS CINÉTICOS DA LACASE LIVRE E IMOBILIZADA	52
4.10	ESTABILIDADE TÉRMICA	53
4.11	ESTABILIDADE DE ARMAZENAMENTO DA ENZIMA LIVRE E IMOBILIZADA	53
4.12	REUSO DA LACASE IMOBILIZADA	53
4.13	APLICAÇÕES DA LACASE IMOBILIZADA EM NANOCELULOSE BACTERIANA:	54
4.13.1	BIOTRANSFORMAÇÃO DO CATECOL: ATUAÇÃO COMO BIOSSENSOR	54
4.13.2	PREPARO DA NCB COM PROPRIEDADES ANTIOXIDANTES: EFEITO DA LACASE IMOBILIZADA NA PRESENÇA DE ÁCIDO FERÚLICO	54
4.13.3	DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO DPPH	55

4.13.4	DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO FRAP	56
4.13.5	DETERMINAÇÃO DO CONTEÚDO DE FENÓIS TOTAIS	57
4.14	ANÁLISE DA SIGNIFICÂNCIA ESTATÍSTICA DOS DADOS	57
5	RESULTADOS E DISCUSSÕES	58
5.1	PRODUÇÃO E TRATAMENTO DA NANOCELULOSE BACTERIANA	58
5.2	TESTES PRELIMINARES	59
5.2.1	DETERMINAÇÃO DO MÉTODO DE SECAGEM PARA A NANOCELULOSE BACTERIANA	59
5.2.2	DETERMINAÇÃO DO TEMPO PARA A REAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA PELO ABTS DA ENZIMA LIVRE E IMOBILIZADA	62
5.3	OTIMIZAÇÃO DA IMOBILIZAÇÃO DA LACASE EM NCB VIA DELINEAMENTO EXPERIMENTAL DO TIPO BOX-BEHNKEN	63
5.4	CARACTERIZAÇÃO DA NANOCELULOSE BACTERIANA: LIVRE E IMOBILIZADA	68
5.4.1	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV) E ESPECTROSCOPIA DE ENERGIA DISPERSIVA (EDS)	68
5.4.2	DIFRAÇÃO DE RAIOS-X	69
5.4.3	ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR) COM MODO DE REFLEXÃO TOTAL ATENUADA (ATR): ..	70
5.5	AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO pH E DA TEMPERATURA NA ATIVIDADE ENZIMÁTICA	72
5.5.1	pH ÓTIMO	72
5.5.2	TEMPERATURA ÓTIMA	73
5.6	INFLUÊNCIA DE METAIS NA LACASE LIVRE E IMOBILIZADA	74
5.7	PARÂMETROS CINÉTICOS	75
5.8	ESTABILIDADE TÉRMICA	77
5.9	ESTABILIDADE AO ARMAZENAMENTO DA ENZIMA LIVRE E IMOBILIZADA	78
5.10	ESTUDO DO REUSO DA LACASE IMOBILIZADA	79
5.11	APLICAÇÕES DA LACASE IMOBILIZADA EM NANOCELULOSE BACTERIANA NA BIOTRANSFORMAÇÃO DE FENÓLICOS	81
5.11.1	BIOTRANSFORMAÇÃO DO CATECOL: ATUAÇÃO COMO BIOSSENSOR ...	81
5.11.2	PREPARO DA NCB COM PROPRIEDADES ANTIOXIDANTES: EFEITO DA LACASE IMOBILIZADA NA PRESENÇA DE ÁCIDO FERÚLICO	82
6	CONCLUSÃO	89
7	RECOMENDAÇÕES	91
	REFERÊNCIAS	92
	ANEXO A –Delineamento Experimental e otimização do processo de imobilização	102
	ANEXO B – Curva Padrão Trolox – DPPH	105
	ANEXO C – Curva Padrão Trolox – FRAP	106
	ANEXO D – Curva Padrão Ácido Gálico – Fenóis Totais.....	107

1 INTRODUÇÃO

Na área biotecnológica, a utilização de enzimas abrange diversas aplicações, como, na área de biorremediação para tratamento de certos poluentes ou efluentes, como mediadora no processo de oxidação de certos produtos e de desenvolvimento de dispositivos, como, biossensores (DESHMUKH, KHARDENAVIS, PUROHIT, 2016). Ressalta-se que a utilização de processos enzimáticos na biorremediação é vantajosa por ser uma alternativa eficiente, econômica e ambientalmente correta (SHARMA, DANGI, SHUKLA, 2018).

Dentre os poluentes de interesse, pode-se citar os compostos fenólicos (CF's), os quais são encontrados tanto de forma natural, presentes em frutas e vegetais, quanto sinteticamente provenientes de diversos tipos de indústrias, tal como as alimentícias, as farmacêuticas, as têxteis e as petroquímicas. A problemática envolvendo estes compostos é referente ao impacto causado ao meio ambiente quando os mesmos se encontram principalmente em sua forma sintética devido à alta toxicidade e a baixa biodegradabilidade. Portanto, podendo chegar aos corpos hídricos devido ao descarte irregular ou pela ausência de tratamento adequado e eficiente (ANNACHHATRE, GHEEWALA, 1996; RODRÍGUEZ-DELGADO et al., 2015).

Alguns compostos fenólicos estão presentes na lista de poluentes prioritários da United States Environmental Protection Agency (USEPA, 2014) para o monitoramento de corpos hídricos. Um exemplo desta lista, pode-se destacar o catecol, o qual foi classificado pela USEPA como um poluente tóxico devido a sua persistência no meio ambiente e toxicidade inerente aos anéis aromáticos e outros grupos funcionais (por exemplo, o cloro) que possam estar presente na sua estrutura química (PALANISAMY et al., 2017).

Os ácidos fenólicos também vêm ganhando destaque na área da pesquisa devido às suas propriedades bioativas, como a atividade antioxidante. Dentre estes ácidos, pode-se citar o ácido ferúlico, o qual é um ácido abundante no mundo vegetal além de ser um dos ingredientes de remédios utilizados na cultura Chinesa para prevenção e tratamento de doenças (ADELAKUN et al., 2012).

Dentre as enzimas que podem ser utilizadas ao optar pela biotransformação desses compostos, destacam-se as lacases pela sua capacidade de catalisar a oxidação de diversos produtos orgânicos e inorgânicos, como os fenóis e as aminas aromáticas por meio da redução de oxigênio para água além de não precisarem da adição de cofatores (HUBLIK, SCHINNER, 2000; SHARMA, DANGI, SHUKLA, 2018; MATE, ALCADE, 2016; PACHECO, SOARES, 2014).

Entretanto, utilizar a lacase pode ser inviável economicamente devido ao seu tempo de meia vida curto além de poder sofrer com as alterações operacionais drásticas, como mudanças no pH e na temperatura (RODRIGUÉZ-DELGADO et al., 2015).

Deste modo, a imobilização de uma enzima em um determinado suporte insolúvel torna possível a sua reutilização por diversos ciclos além de possibilitar maior estabilidade operacional da mesma frente a condições adversas (CHEN, ZOU, HONG, 2015). O potencial desta enzima após o processo de imobilização pode ser demonstrado pelo estudo de Pang, Li e Zhang (2015), em que se observou 98,9% e 99,9% de remoção de bisfenol A e catecol, respectivamente, por lacase imobilizada em nanomateriais de carbono. Em trabalho de Pacheco e Soares (2014), averiguou-se que a imobilização da enzima foi necessária para ter uma melhora na remoção de fenóis presentes em efluentes de indústrias papeleiras.

Os materiais utilizados para a imobilização de enzimas são os mais diversos, como nanopartículas, resíduos agroindustriais e materiais compostos de sílica, entre outros. Entretanto, ressalta-se que para os materiais sintéticos, como os materiais compostos de sílica, podem conter substâncias que podem trazer algum impacto ambiental (CHEN, ZOU, HONG, 2015). Assim, a utilização de nanocelulose bacteriana (NCB) é uma alternativa a estes materiais por ser de origem natural sendo sintetizada por algumas espécies de bactéria, dentre as quais as pertencentes do gênero *Gluconacetobacter*. Ademais, apresenta como vantagens uma elevada área superficial, oferece boa resistência mecânica e pode ser moldável de acordo com o interesse (BIELECKI et al., 2002). Salienta-se também a importância da utilização deste suporte para ampliar sua aplicação na área biotecnológica (GALLEGOS et al., 2016).

As aplicações da lacase imobilizada podem ser as mais diversas, como biossensores, oxidação/polimerização de compostos fenólicos e biocoloração, entre outros (BRUGNARI et al., 2018; GOMES, REBELO, 2003; SENTHIVELAN, KANAGARAJ, PANDA, 2016; SONG et al., 2018).

Logo, percebe-se a relevância de estudos utilizando sistemas enzimáticos focando no aprimoramento da atividade e estabilidade destes por meio da imobilização além da sua posterior aplicação. Desta forma, o presente projeto visa estudar a imobilização da enzima lacase em NCB visando aplicações biotecnológicas na área da biotransformação de compostos fenólicos, como o catecol e o ácido ferúlico.

2 OBJETIVOS

2.1 GERAL

Imobilizar a lacase comercial de *Myceliophthora thermophila* em nanocelulose bacteriana e utilizá-la na biotransformação de compostos fenólicos.

2.2 ESPECÍFICOS

- Produzir e purificar membranas de nanocelulose bacteriana utilizando a cepa *Gluconacetobacter* sp. por cultivo estático;
- Otimizar o processo de imobilização da lacase de *Myceliophthora thermophila* pelo método *cross-linking*;
- Analisar físico-quimicamente a nanocelulose bacteriana antes e depois da imobilização da lacase por MEV, EDS, FTIR e DRX;
- Verificar a influência do pH, da temperatura e dos metais sobre a atividade da lacase imobilizada e livre utilizando 2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico (ABTS);
- Determinar os parâmetros cinéticos da atividade da lacase livre e imobilizada;
- Avaliar a estabilidade da enzima livre e imobilizada em relação à temperatura, pH e o reuso no caso da lacase imobilizada;
- Aplicar a enzima imobilizada na biotransformação de compostos fenólicos, como o catecol com a possibilidade de detectá-lo (biossensor) e o ácido ferúlico, o qual serviria como mediador para lacase, podendo resultar em um suporte (NCB) com atividades antioxidantes provenientes do ácido ferúlico além da possibilidade do processo de biocoloração.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 BIOTECNOLOGIA: PROCESSOS DE BIORREMEDIAÇÃO

A biotecnologia é uma área aplicada que vem sendo utilizada como tecnologia avançada por diversos países em diversas ações de desenvolvimento sustentável. É um ramo que está inserido em diversos setores, como o ambiental, farmacêutico, industrial e agrícola além de inovar em certos ramos da engenharia, como a de diagnóstico e engenharia genética (AGHMIUNI et al., 2019).

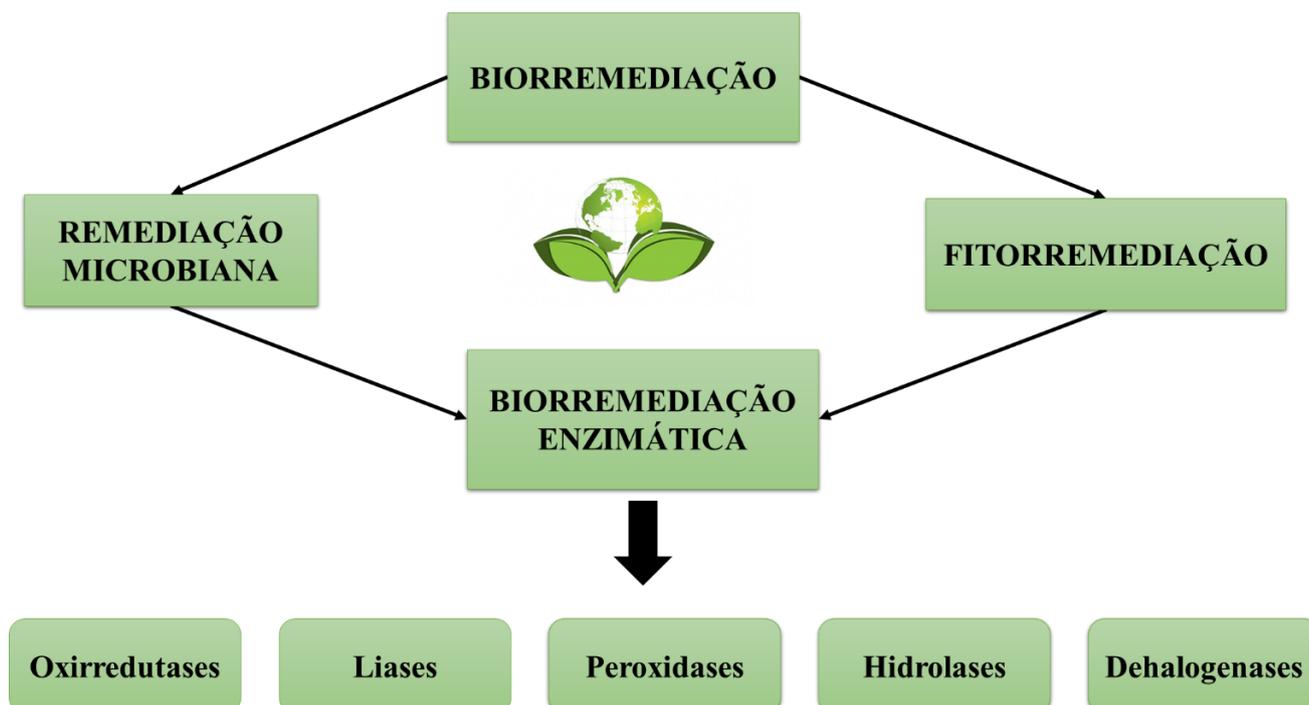
Na área da biotecnologia, a biorremediação é uma alternativa aos métodos convencionais, pois, proporciona a degradação ou transformação destes compostos poluentes em formas menos tóxicas ao utilizar microrganismos e suas enzimas (SHARMA, DANGI, SHUKLA, 2018).

Desta forma, este tipo de tratamento biológico é considerado ambientalmente correto além de poder ser mais econômico por converter de forma eficiente compostos recalcitrantes e tóxicos em compostos não tóxicos ao aplicar processos na remediação de solos e água contaminados (DESHMUKH, KHARDENAVIS, PUROHIT, 2016).

3.1.1 UTILIZAÇÃO DE ENZIMAS EM PROCESSOS DE REMEDIAÇÃO

A biorremediação pode consistir na utilização de microrganismos ou plantas, nesse caso denominado fitorremediação, para a remediação de ambientes contaminados (SHARMA, DANGI, SHUKLA, 2018). Há também a biorremediação enzimática que consiste na utilização de enzimas para realizar a degradação ou transformação de diversos poluentes conforme apresentado na Figura 1.

Figura 1 – Técnicas aplicadas no processo de biorremediação.



Fonte: Adaptado de SHARMA, DANGI, SHUKLA (2018).

Tanto na remediação microbiana como na fitorremediação há utilização de enzimas. A utilização de enzimas isoladas é uma ferramenta promissora pelo fato de novas enzimas estarem sendo descobertas, as quais podem ser utilizadas em diversos processos de biorremediação, além de que, associações com outros métodos e modificações podem ser feitas para aprimorar a biorremediação enzimática (KUMAR et al., 2016).

Na prática, a utilização de microrganismos na biorremediação é dificultada por ser um processo lento. Portanto, a utilização das enzimas livres vem se sobressaindo e pode contornar esta situação (GHOSH, DASTIDAR, SREEKRISHNAN, 2017; THATOI et al., 2014). Ao analisar a Figura 1, de forma geral as enzimas utilizadas podem ser divididas em oxirredutases, hidrolases, liases e peroxidases (SHARMA, DANGI, SHUKLA, 2018).

A utilização das mesmas é viável pelo fato de as enzimas serem macromoléculas biológicas capazes de catalisarem diversas reações envolvidas no processo de degradação de poluentes (KALOGERAKIS, FAVA, CORVINI, 2017). Este processo pode ser descrito como biocatálise e vem sendo imensamente utilizado nos diversos setores em que a biotecnologia atua (SIRISHA, JAIN, JAIN, 2016).

Dentre os grupos das enzimas apresentados na Figura 1, as oxirredutases são uma das mais amplamente utilizadas para a degradação de diversos poluentes naturais e sintéticos.

Normalmente, o processo de remediação consiste no acoplamento oxidativo no qual ocorre a oxidação do poluente pela transferência de elétrons (redutores para oxidantes) resultando na liberação de íons cloretos, CO₂ e metanol (SHARMA, DANGI, SHUKLA, 2018). Exemplos de enzimas deste grupo são as oxigenases, lacases e peroxidases como apresentado no Quadro 1.

Quadro 1 – Enzimas oxirredutases envolvidas no processo de biorremediação e suas funções.

Classificação da enzima	Exemplos	Funções	Referência
Oxirredutases	Oxigenases	Catalisam a oxidação de compostos aromáticos ao utilizar uma ou duas moléculas de oxigênio ocorrendo a transformação e a mineralização destes compostos.	Chakraborty et al., 2014.
	Lacases	Quebra os anéis de compostos aromáticos e reduz uma molécula de oxigênio em água além de produzir radicais livres.	Shraddha et al., 2011
	Peroxidases	Catalisam as reações de redução e geram radicais reativos livres após a oxidação de compostos orgânicos.	Bansal, Kanwar, 2013

Fonte: Adaptado de SHARMA, DANGI, SHUKLA (2018).

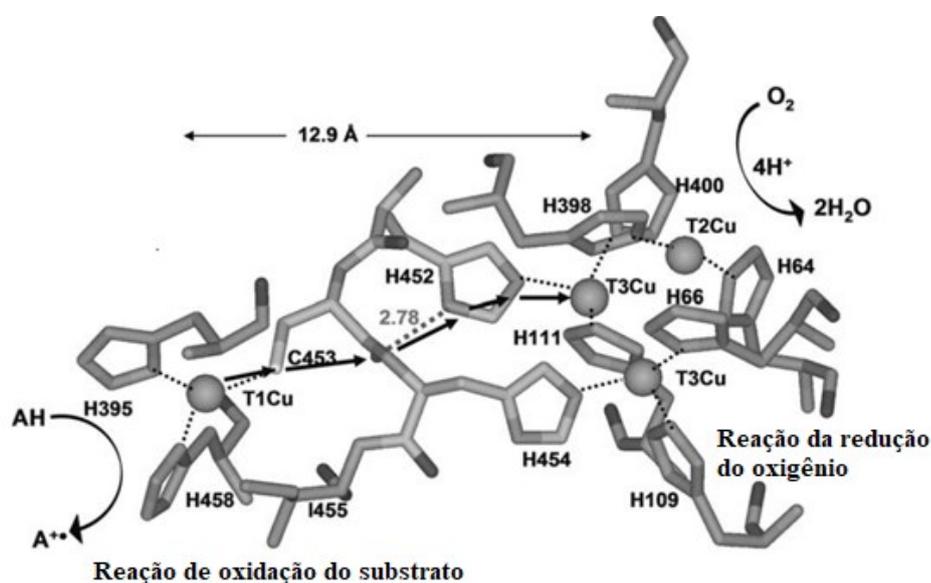
3.2 LACASES

Dentre as oxirredutases, destacam-se as lacases, grupo de enzimas primeiramente descritas cerca de 100 anos atrás, destacando-se pelo potencial biotecnológico aliado à baixa especificidade quanto ao substrato e a flexibilidade em relação ao tipo e adição cofatores para catalisar as reações de degradação (PERALTA, 2017; UNUOFIN, OKOH, NWODO, 2019). Por exemplo, certas peroxidases precisam de peróxido de hidrogênio para poder realizar a remoção de fenol, além disso, em altas concentrações, pode resultar na inativação da enzima ou ainda gerar subprodutos mais tóxicos que o substrato inicial (MOHAMMADI et al., 2018). Nas últimas décadas, o interesse pela utilização de lacases em processos biotecnológicos em que antes se utilizavam métodos químicos convencionais vem se destacando, principalmente ao considerar as indústrias têxteis, de celulose e papel e as farmacêuticas (MATE, ALCALDE, 2016).

3.2.1 ESTRUTURA E FUNÇÕES BIOQUÍMICAS DAS LACASES

A lacase (EC 1.10.3.2) faz parte da família de multicobre oxidases (contendo quatro íons de cobre em dois sítios ativos) que catalisam a oxidação de compostos fenólicos e aromáticos na presença de oxigênio, reduzindo-os a água (MOT, DUMITRESCU, 2012; SAMPAIO et al., 2016). A Figura 2 retrata a estrutura da lacase com a distribuição dos seus sítios ativos além do possível caminho percorrido pelos elétrons por esses sítios.

Figura 2 – Caminho plausível dos elétrons pelos sítios ativos da lacase de *Trametes versicolor*.



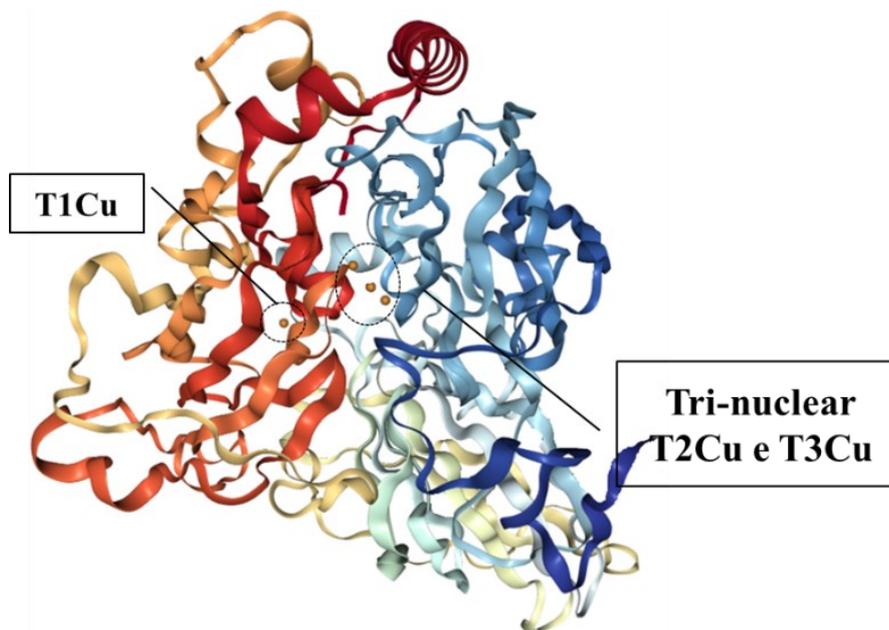
Fonte: Adaptado de MOT, DUMITRESCU (2012).

A Figura 2 retrata como seria a disposição dos íons de cobre nos sítios ativos para a lacase de *Trametes versicolor*, além do caminho de transferência dos elétrons em relação a estes íons. De forma mais detalhada, o mecanismo de ação da lacase envolve dois sítios individuais que ligam o substrato redutor e o oxigênio com quatro átomos de cobre. É importante salientar que a distribuição destes íons irá depender das características estruturais da enzima. Os quatro íons são: o cobre tipo 1 (T1Cu) local em que ocorre a oxidação do substrato; o tipo 2 (T2Cu) e o tipo 3 (T3Cu), o qual consiste em dois átomos (MATE, ALCALDE, 2016; MOT, DUMITRESCU, 2012). O tipo 1 e 2 possuem um átomo de cobre cada enquanto o tipo 3 possui dois átomos de cobre (OUZOUNIS, SANDER, 1991). A eficiência da reação da lacase está em relação ao potencial redox do cobre tipo 1 visto que é o aceitador primário de elétron e é importante ressaltar que o potencial redox pode diferenciar substancialmente de uma lacase (KUNAMNENI, 2007).

Em contrapartida, o tipo 2 e 3 formam um aglomerado trinuclear (T2 e T3) em que ocorre a redução do oxigênio molecular em água ao aceitar elétrons, os quais foram transferidos do T1 para o aglomerado trinuclear (FALADE et al., 2018).

A Figura 3 apresenta a estrutura cristalina em 3D da lacase de *Myceliophthora thermophila* resultante da técnica de difração Raios-X.

Figura 3 – Estrutura cristalina de lacase *Myceliophthora thermophila*

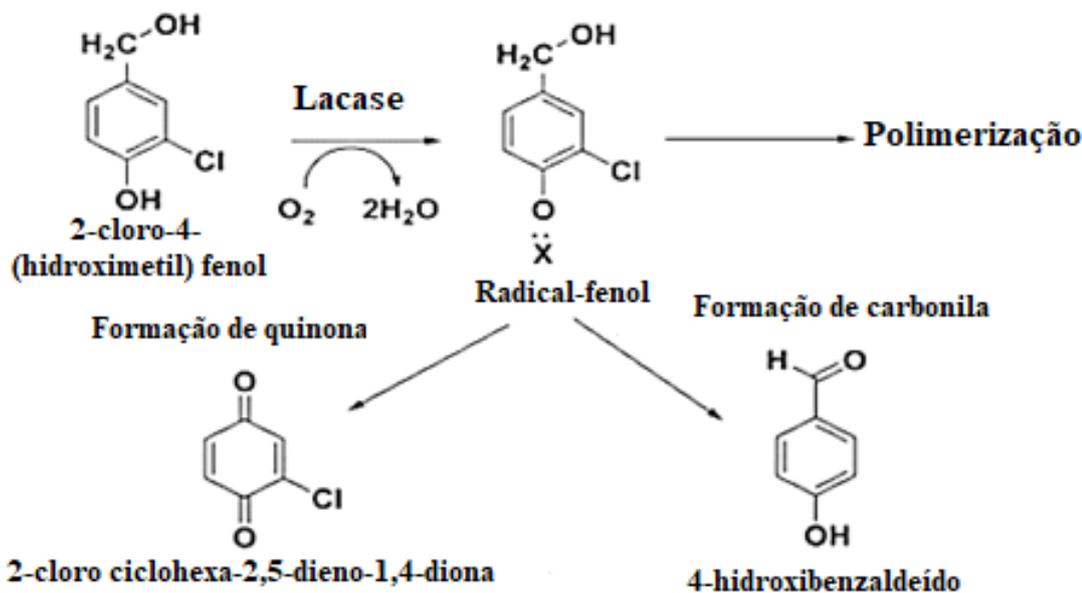


Fonte: PROTEIN DATA BANK (2019).

Assim, analisando a Figura 3 é possível observar a disposição dos átomos de cobre nos sítios T2 e T3 que estão próximos um do outro e formam um centro trinuclear, o qual está envolvido no mecanismo de catálise da lacase (YANG, et al., 2017).

A Figura 4 esquematiza um exemplo do possível mecanismo que ocorre da oxidação de um composto fenólico (2-Cloro-4-(hidroximetil) fenol) pela enzima lacase (SENTHIVELAN, KANAGARAJ, PANDA, 2016).

Figura 4 – Processo de oxidação do 2-Cloro-4-(hidroximetil)fenol pela lacase.



Fonte: Adaptado de SENTHIVELAN, KANAGARAJ, PANDA (2016).

Conforme apresentado na Figura 4, é possível analisar a ação da lacase no processo de oxidação do composto fenólico em que a lacase utiliza oxigênio no processo e libera água. Após este processo, tem-se a formação de outros compostos, além da possibilidade de polimerização do radical fenol (SENTHIVELAN, KANAGRAJ, PANDA, 2016).

3.2.1.1 COMPOSTOS FENÓLICOS

Os compostos fenólicos são definidos quimicamente como compostos orgânicos no qual um grupo hidroxila está ligado diretamente a um anel aromático. Dependendo da estrutura química podem ser divididos em diferentes subgrupos, como fenóis simples, ácidos fenólicos, flavonóides e lignina (GAN et al., 2019). Estes compostos possuem um caráter antioxidante que está relacionado à sua estrutura química, as hidroxilas e anéis aromáticos que podem estar na forma simples ou de polímeros.

Os compostos fenólicos são moléculas que fazem parte da constituição das plantas resultantes do metabolismo secundário destas. Apresentam relevância nesses organismos por estarem envolvidos no crescimento e reprodução além de serem formados em certas condições de estresse. Possuem grande relevância médica por estarem relacionados a prevenção de certas doenças cardiovasculares e até mesmo do câncer devido às suas propriedades antioxidantes (ANGELO, JORGE, 2007; GOMES, REBELO, 2003).

Os grupos fenólicos de maior relevância e suas estruturas orgânicas são apresentados no Quadro 2.

Quadro 2 – Grupos fenólicos e suas estruturas de carbonos

Grupos	Estrutura de carbonos
Fenóis simples e benzoquinonas	C_6
Ácidos fenólicos	$C_6 - C_1$
Flavonóides	$C_6 - C_3 - C_6$
Ligninas	$(C_6 - C_3)_n$
Taninos condensados	$(C_6 - C_3 - C_6)_n$

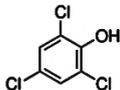
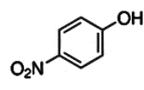
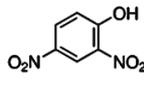
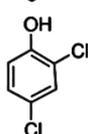
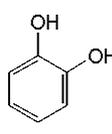
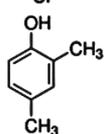
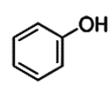
Fonte: Adaptado de Bravo (1998).

Quanto aos fenólicos, estes são principalmente subprodutos de processos industriais. O fenol, por exemplo, produzido comercialmente por processos de peroxidação de cumeno, cloração de benzeno, oxidação de tolueno e sulfonação do benzeno para a utilização em remédios, na agricultura com aplicação de pesticidas e fertilizantes, na indústria têxtil e na produção de plásticos, entre outros (BABICH, DAVIS, 1981; ZHOU, ZHANG, SUN, 2017).

A problemática ambiental envolve os compostos fenólicos sintéticos devido ao seu potencial poluidor, proveniente principalmente de descarte irregular de efluentes industriais como de indústria têxtil, farmacêutica, de tintas e refinarias de petróleo, além das próprias indústrias que produzem fenóis. Essa problemática é devida a certas propriedades, tais como toxicidade, recalcitrância e persistência destes compostos no meio ambiente, afetando a vida aquática e dos seres humanos (ANNACHHATRE, GHEEWALA, 1996).

Alguns compostos fenólicos estão presentes na lista de poluentes prioritários da USEPA (2014), os quais são regulados para evitar a contaminação de corpos hídricos focando em programas de *Clean Water*, e estão apresentados no Quadro 3. Estes compostos são comumente utilizados como pesticidas, herbicidas ou como desinfetante.

Quadro 3 – Compostos fenólicos citados como poluentes prioritários e sua estrutura química.

Poluente	Estrutura química	Poluente	Estrutura química
2,4,6-triclorofenol		4-nitrofenol	
2-clorofenol		2,4-dinitrofenol	
2,4-diclorofenol		Catecol	
2,4-dimetilfenol		Fenol	

Fonte: Adaptado USEPA (2014).

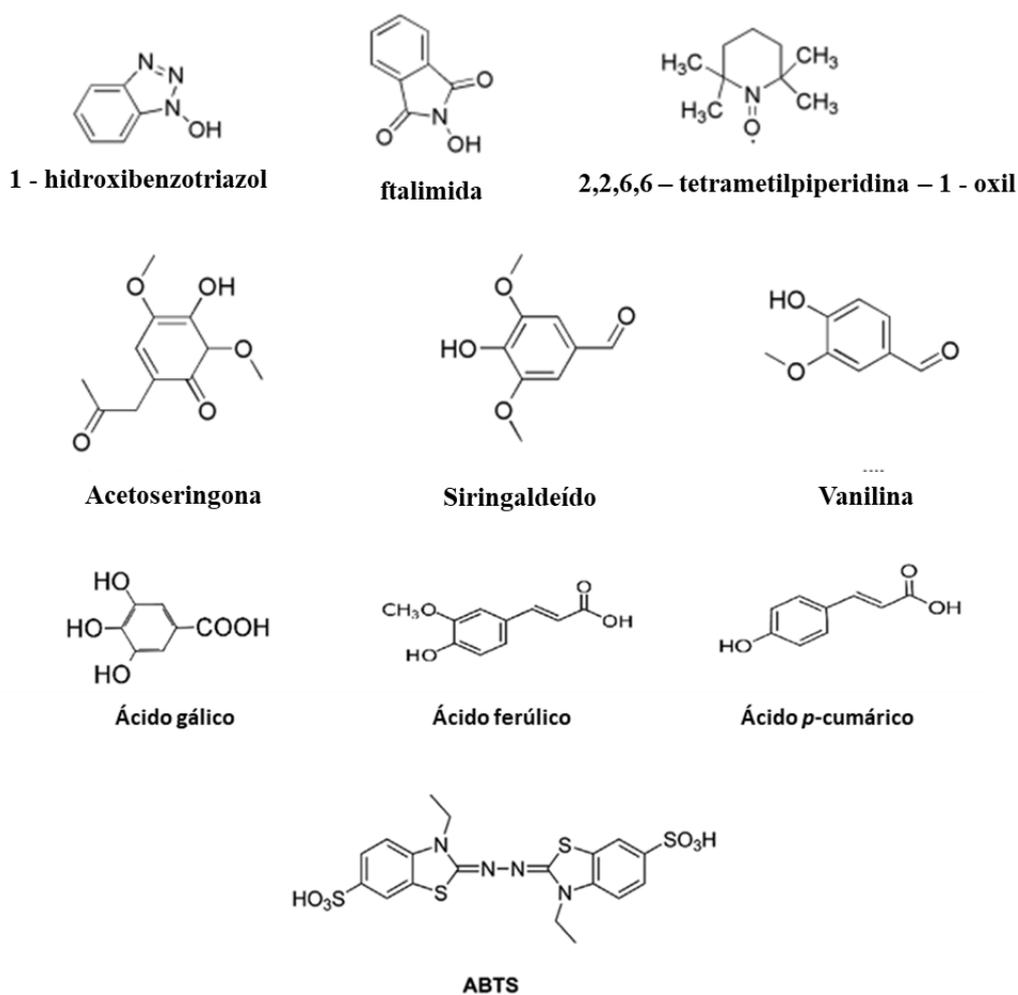
Dentre os compostos acima (Quadro 3), destaca-se o catecol, o qual foi classificado pela USEPA como um poluente prioritário devido a sua toxicidade e por persistir no meio ambiente. É comumente utilizado como antisséptico, em fotografia, na indústria de corantes e de tintas e em antioxidantes, entre outros (PALANISAMY et al., 2017; USEPA, 2014).

Pela facilidade da lacase em oxidar compostos aromáticos, ela é uma alternativa para biotransformação ou degradação do catecol ou até mesmo ser um biossensor para o mesmo, pois, a interação entre lacase e catecol causa uma mudança de coloração do meio (LIU et al., 2012; MOHAMMADI et al., 2018).

3.2.2 SISTEMA LACASE-MEDIADOR

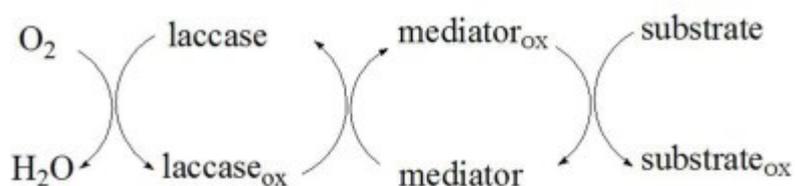
De forma a melhorar o desempenho da lacase com certos substratos ou até mesmo possibilitar sua ação com outras moléculas, pode-se formar sistemas da lacase com mediadores. Estes são moléculas químicas naturais ou sintéticas com um potencial redox superior ao da lacase, os quais são oxidados de forma contínua pela lacase causando a redução de um substrato específico (CHRISTOPHER, YAO, JI, 2014). A Figura 5 apresenta alguns mediadores sintéticos e naturais que podem ser utilizados neste sistema.

Figura 5 – Representação da estrutura química de possíveis mediadores para o sistema lacase-mediador.



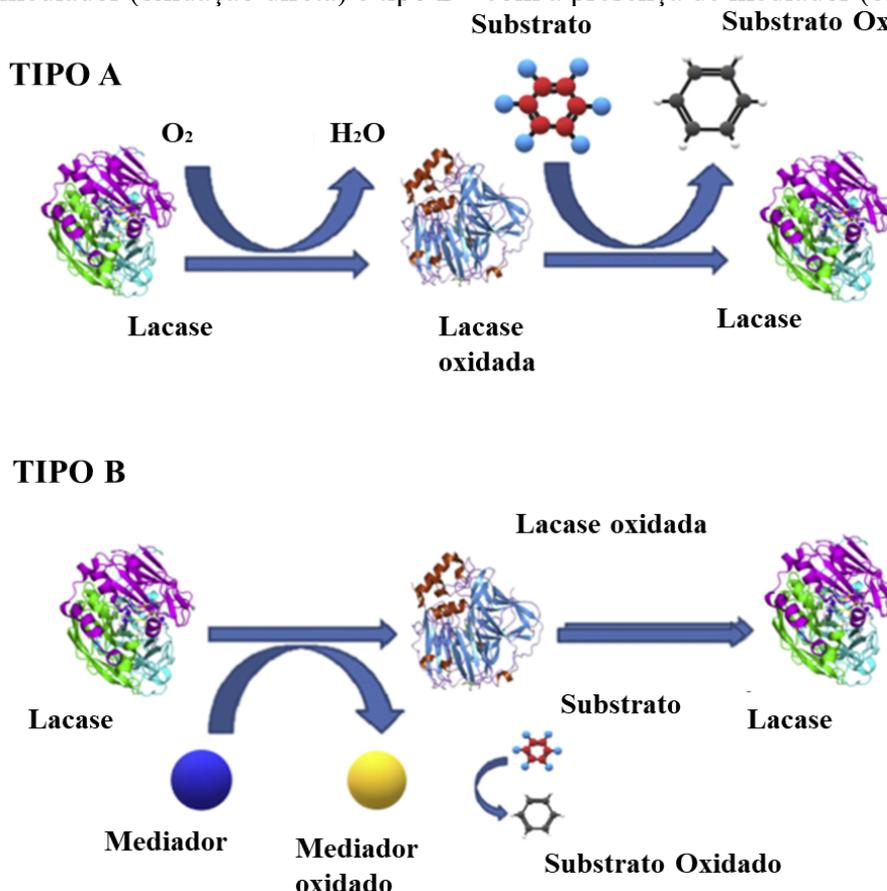
Fonte: Adaptado de CHRISTOPHER, YAO, JI, (2014); PERALTA et al., (2017).

Figura 6 – Mecanismo cíclico da oxidação de um substrato por meio de um sistema lacase-mediador.



Fonte: CHRISTOPHER, YAO, JI, (2014).

Figura 7 – Esquema dos dois tipos das reações catalisadas pela lacase: tipo A - sem a presença de um mediador (oxidação direta) e tipo B - com a presença de mediador (oxidação indireta).



Fonte: Adaptado de DESKA, KOCNIAK (2017).

A Figura 5 apresenta alguns dos mediadores que podem ser utilizados com a lacase, ressalta-se que é importante na escolha do mediador relevar a toxicidade do mesmo, o custo, a eficiência além de que o mesmo deve manter o ciclo redox contínuo (Figura 6) e não deve ocorrer a inativação da enzima (CHRISTOPHER, YAO, JI, 2014; MOROZOVA et al., 2007).

A Figura 7 retrata de forma geral como ocorre as reações com a lacase sem e com a presença de um mediador, no qual forma-se um sistema lacase-mediador que poderá aumentar a aplicabilidade e eficiência da lacase (PERALTA et al., 2017). O tipo A é a oxidação direta de substratos fenólicos enquanto o tipo B por meio do mediador tem-se a oxidação indireta tanto de compostos fenólicos quanto não fenólicos (DESKA, KOŃCZAK, 2019). Desta forma, dependendo da aplicação da lacase, a utilização de um mediador pode facilitar o processo de oxidação e/ou polimerização de diversos substratos visto que o mediador terá um potencial redox superior à da lacase e, então, conseguirá aumentar o poder de oxidação dessa enzima conferindo-lhe a possibilidade de oxidar outros substratos que antes a lacase não conseguiria. Assim, o mediador age como um carreador de elétrons entre a enzima e o substrato (CHRISTOPHER, YAO, JI, 2014; PERALTA et al., 2017).

Dentre estes mediadores, ressalta-se o ácido ferúlico, o qual pode ser aplicado em conjunto com a lacase para a biocoloração de suportes, como a NCB, tecidos e algodão além da biotransformação do mesmo em outros compostos que possam vir a ser usados visto a capacidade oxidativa do ácido ferúlico (SLAGMAN, ZUILHOF, FRANSSEN, 2018; SONG et al., 2018).

3.3 IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS

De forma geral, indústrias que almejam um desenvolvimento sustentável, eficiente e ecológico, podem considerar utilização de enzimas como biocatalisadores. Entretanto, o uso em larga escala de enzimas de forma livre torna-se limitada devido ao custo, a não possibilidade de reutilização além de ser difícil de manter a estabilidade estrutural das enzimas sob condições reacionais adversas. Portanto, é importante avaliar a imobilização das mesmas visando aumentar a sua estabilidade, meia-vida e resistência contra condições ambientais adversas (pH extremo, altas temperaturas, presença de solventes, entre outras), que frequentemente ocorrem em situações reais (SIRISHA, JAIN, JAIN, 2016; YANG et al., 2017).

A imobilização enzimática pode ser definida como o confinamento das moléculas da enzima a uma matriz/suporte sólido diferente daquele em que o substrato ou os produtos estão presentes. Desta forma, para ter o melhor aproveitamento da enzima, pode-se imobilizá-la em um suporte que possibilite o aumento do seu tempo de vida útil, ciclos de uso e maior estabilidade operacional, ou seja, permitirá que a enzima aceite uma faixa maior de variações de pH e temperatura mantendo o máximo possível de sua atividade enzimática.

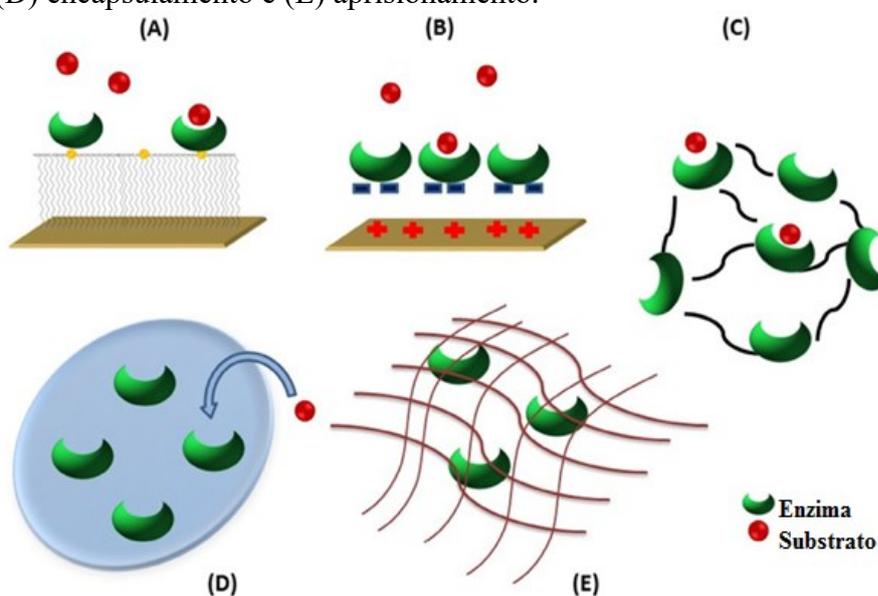
O suporte preferencialmente pode ser inerte, estável e resistente, sendo importante também considerar tamanho, expansibilidade, distribuição e tamanho dos poros (PACHECO, SOARES, 2014; RODRÍGUEZ-DELGADO et al., 2015).

3.3.1 MÉTODOS DE IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS

É importante destacar que para se ter uma melhora na atividade enzimática é necessário combinar a técnica de imobilização com o tipo de suporte focando na estabilidade operacional e de armazenamento visto que existem diferentes métodos de imobilização (BON et al., 2008; RODRÍGUEZ-DELGADO et al., 2015). A Figura 8 apresenta os métodos mais comuns de imobilização.

De acordo com BON et al. (2008), existem basicamente dois tipos de imobilização, no interior do suporte ou na sua superfície. Naquela, pressupõe-se a formação de uma estrutura porosa em que a mobilidade da enzima é mantida por não ter reações químicas ou físicas entre o suporte e a enzima e quanto a imobilização na superfície consiste na fixação da enzima por interações como a adsorção, ligações covalentes e ligação iônica, entre outros. Conforme a Figura 8, a ligação covalente (8A) é um exemplo de imobilização na superfície do suporte e o encapsulamento no interior do suporte (8D).

Figura 8 – Técnicas de imobilização: (A) ligação covalente; (B) adsorção; (C) *cross-linking*; (D) encapsulamento e (E) aprisionamento.



Fonte: Adaptado de RODRÍGUEZ-DELGADO et al. (2015).

O método de ligação covalente (Fig. 8A) consiste na relação química dos grupos funcionais do componente biológico a ser utilizado (enzima) que não serão utilizados na atividade catalítica com o suporte. A adsorção (Fig. 8B) consiste em um método simples e de baixo custo e consiste na atração da enzima ao suporte por ligações de Van der Waals e pontes de hidrogênio. A técnica de *cross-linking* (Fig. 8C) consiste na geração de ligações intermoleculares entre as moléculas da enzima por um ativador dessa reação, como, por exemplo, o glutaraldeído. Já a técnica de encapsulamento (Fig. 8D), a enzima ficará retida no interior de uma matriz insolúvel como, por exemplo, em polímeros. Já o aprisionamento (Fig. 8E) consiste em misturar a enzima em uma solução monômero formando um gel tendo o aprisionamento da enzima nos interstícios do gel (BON et al., 2008; BRADY, JORDAAN, 2009; BRYJAK et al., 2007; IBARRA-ESCUZIA et al., 2010; RODRÍGUEZ-DELGADO et al., 2015).

A técnica a ser considerada irá depender do elemento biológico a ser estudado, do tipo de enzima, das propriedades físico-químicas do analito, por exemplo, compostos fenólicos e as condições operacionais em que podem afetar a enzima. Entretanto, independente da técnica certas desvantagens devem ser levantadas sobre a imobilização, como a possível alteração da conformação da enzima em relação ao seu estado livre, a heterogeneidade da relação enzima-suporte em que se pode ter quantidades distintas de proteína imobilizada nas diferentes partes do suporte e ter a perda da atividade enzimática após a imobilização sendo que esta perda estará relacionado ao tipo de método utilizado para imobilização (ARROYO, 1998; FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ, SANROMÁN, MOLDES, 2013).

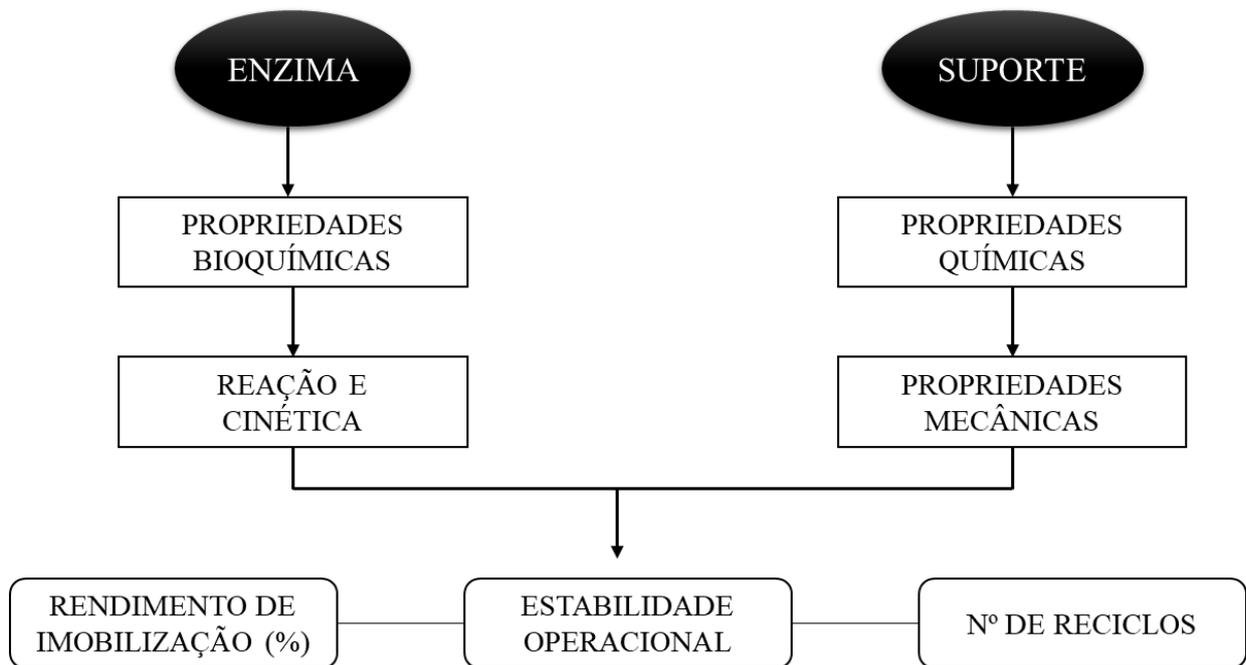
3.3.2 TIPOS DE SUPORTE

O tipo de suporte poderá ser classificado como orgânico ou inorgânico dependendo da composição química deste, podendo ser dividido em naturais ou sintéticos. Dentre os suportes, tem-se um maior interesse naqueles que apresentam uma maior área superficial, como os materiais porosos (MOHAMAD et al., 2015).

Um fator importante no processo de imobilização é o suporte a ser utilizado, e diversos são os tipos de suportes que podem ser empregados na atualidade. Por exemplo, na literatura os suportes utilizados encontrados foram caulinita, microesferas de quitosana magnetizada, esferas de sílica funcionalizada e carbono modificado, entre outros (DODOR, HWANG, EKUNWE, 2004; JIANG et al., 2005; MISRA et al., 2014). Portanto, a imobilização da lacase é necessária para que possa ter sua aplicação contínua em um processo de tratamento em escala real visando seu uso sustentável.

A Figura 9 apresenta os fatores que devem ser levados em consideração para a escolha de um suporte para imobilização.

Figura 9 – Fatores a serem considerados na escolha do suporte em que a enzima será imobilizada.



Fonte: Adaptado de CARVALHO, LIMA, SOARES (2015).

De forma geral, na seleção do suporte, deve-se considerar as características físicas, químicas e morfológicas, como a superfície de contato, porosidade, fixação da enzima no mesmo e insolubilidade. De forma específica, deve-se observar a composição química, grupos funcionais, composição da superfície do suporte, tamanho da partícula, área superficial e porosidade do suporte (BON et al., 2008; CARVALHO, LIMA, SOARES, 2015).

3.3.3 IMOBILIZAÇÃO DA LACASE

O Quadro 4 apresenta diversos estudos que utilizam a lacase imobilizada para a degradação de diferentes tipos de poluentes considerando diversos tipos de suporte.

Quadro 4 – Exemplos de estudos utilizando lacase imobilizada para remoção de diversos contaminantes, os métodos de imobilização e tipos de suportes.

Fonte	Contaminantes	Suporte	Método de imobilização	Resultado para a enzima imobilizada	Referência
<i>Trametes versicolor</i>	Fenol e p-clorofenol	Carbono modificado	Adsorção	Remoção de 78 e 84% para fenol e clorofenol, considerando a adsorção no suporte.	Liu et al., 2012
<i>Trametes versicolor</i>	Corante	Polietersulfona (PES)	Covalente	Alcance de 88% de degradação do corante após um período de 15 dias.	Misra et al., 2014
<i>Pleurotus florida</i>	Efluente têxtil	Nanofibra de celulose	<i>Cross-linking</i>	Remoção de até 85% do efluente após 5 ciclos.	Sathishkumar et al., 2014
<i>Aspergillus sp</i>	Fenol	Esferas de quitosana	Adsorção	Remoção de 65% do fenol além de diminuir em 60% da cor do efluente de indústrias papeleiras	Pacheco e Soares, 2014
<i>Myceliophthora thermophila</i>	Fenol, catecol e p-clorofenol	Partículas de sílica modificada	Ligação covalente	Eficiência de remoção do catecol em 95% após 2 horas.	Mohammadi et al., 2018
<i>Pleurotus ostreatus</i>	Bisfenol A	MANAE	Adsorção iônica	Após vinte minutos, 50% de remoção do bisfenol-A. Além de manter a atividade em 90% após 15 ciclos.	Brugnari et al., 2018

Fonte: Autoria Própria (2019).

Os estudos apresentados no Quadro 4 demonstram a importância da imobilização para uma remoção sustentável de poluentes. No trabalho de Liu et al. (2012), a imobilização da lacase permitiu uma melhor tolerância a diferentes pHs e temperaturas. Por exemplo, frente ao pH 7 e 8, a lacase imobilizada manteve cerca de 50% de sua atividade original, ao passo que a atividade da forma livre se manteve em aproximadamente 10% para ambos os pHs. Quanto ao reuso, a lacase imobilizada reteve 70% da atividade inicial após 5 ciclos e 50% após 10 ciclos utilizando o ABTS como substrato.

No trabalho de Misra et al. (2014), avaliou-se além da degradação de corante, a estabilidade de armazenamento da lacase imobilizada a 4 °C durante um período de 20 dias enquanto a forma livre sofreu uma redução da sua atividade inicial em 88% após esse período.

No estudo de Sathishkumar et al. (2014), a lacase suportada em nanofibras de celulose reteve 67% da sua atividade inicial após 10 ciclos utilizando o ABTS como substrato. Quanto a operacionalidade frente a remoção de efluente têxtil, a enzima reteve 50% de atividade inicial após 8 ciclos e chegando a descolorir o efluente têxtil em 85% após cinco ciclos.

Em trabalho de Pacheco e Soares (2014), para o pH 5,5, a lacase imobilizada em quitosana reteve em 100% a atividade relativa enquanto a livre apresentou uma atividade relativa de aproximadamente 10%. Já no pH a forma livre apresentou atividade relativa de 100% enquanto a imobilizada se manteve em 80%.

Comportamento semelhante é apresentado no estudo de Dodor, Hwang e Ekunwe (2004) em que a lacase no suporte manteve sua atividade relativa entre 70-100% de temperatura entre 20 e 80°C ao passo que a livre apresenta a atividade entre 10-70% para a mesma faixa.

Outro ponto a levar em conta referente aos suportes é a possível necessidade de realizar algum tratamento ou modificação para sua utilização como apresentando por Liu et al. (2012) e Mohammadi et al. (2018). Isso pode implicar em custos e necessidade de novas metodologias para tratar estes suportes.

3.4 NANOCELULOSE BACTERIANA COMO SUPORTE PARA ENZIMAS

Ao considerar os diversos tipos de suporte, a NCB se apresenta como um suporte vantajoso devido as suas características estruturais, físicas e químicas (FRAZÃO et al., 2014; YAO et al., 2011).

A NCB é um exopolissacarídeo produzido por diferentes gêneros de bactérias e, como resultado, tem-se uma matriz polimérica que irá desempenhar diferentes funções na natureza, por exemplo, ser utilizada como barreira física para proteger a bactéria de intempéries físicas (PINEDA; MESA; RIASCOS, 2012; WILLIAMS; CANNON, 1989).

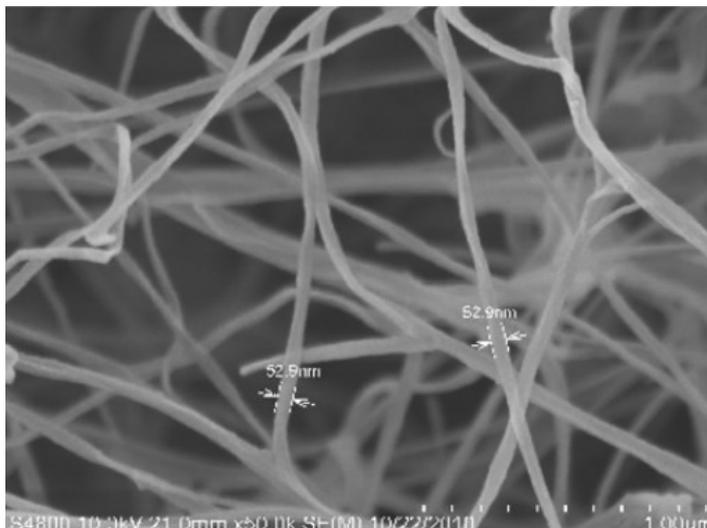
Em comparação a celulose vegetal (CV), a NCB atua principalmente como um revestimento protetor, enquanto a CV desempenha um papel estrutural. Apesar de estudos mostrarem a semelhança química entre a NCB e a CV são encontradas diferenças quanto as propriedades e estruturas macromoleculares (BIELECKI et al., 2002). Vale ressaltar que certas vantagens da NCB, como a sua alta pureza, biocompatibilidade, boa resistência quanto a degradação microbiana e maior capacidade de reter água do que a CV, são bem quistas para certas aplicações, como na biomedicina e no uso em cosméticos. (KLEMM et al., 2001).

Dentre os gêneros de bactérias que sintetizam a NCB, pode-se citar os gêneros *Acetobacter*, *Rhizobium*, *Agrobacterium* e *Sarcina*. O tipo de organismo irá influenciar diretamente a estrutura da celulose bacteriana mesmo que o mecanismo e a forma de biossíntese sejam semelhantes na maioria dos gêneros. Por exemplo, para o gênero *Acetobacter* apresenta uma película extracelular e os gêneros *Achromobacter*, *Aerobacter* e *Alcaligenes* apresentam fibrilas (JONAS, FARAH, 1998).

De forma geral, a NCB apresenta elevada área superficial, alta porosidade, resistência mecânica e boa compatibilidade com os componentes biológicos para que sejam imobilizados na mesma (BIELECKI et al., 2002; CHEN, ZOU, HONG, 2015).

A Figura 10 mostra a estrutura da NCB, na qual é possível visualizar as fibras de celulose ultrafinas com diâmetros menores que 100 nm, justificando a grande área superficial deste suporte.

Figura 10 – Microscopia eletrônica de varredura da nanocelulose bacteriana produzida por *Gluconacetobacter xylinus* (aumento de 50.000 vezes).



Fonte: CHEN, ZOU, HONG (2015).

A elevada área superficial da NCB faz com que a enzima possua maior contato superficial no suporte podendo ser imobilizada de forma mais eficiente com um melhor aproveitamento de sua atividade.

A estrutura da NCB formada por uma rede de nanofibras permite o contato da enzima com o analito em questão para que ocorra as reações enzimáticas (processo de catálise) apresentando também resistência mecânica a diferentes faixas de condições operacionais para a utilização como suporte a longo prazo, além da possibilidade de operar em vários ciclos de reuso (CHEN, ZOU, HONG, 2015; SAMPAIO et al., 2015).

Desta maneira, a utilização da NCB como suporte para enzimas, como a lacase, é uma alternativa para alcançar maior estabilidade operacional e permitir o seu reuso. O Quadro 5 apresenta alguns exemplos de estudos que utilizaram a NCB como suporte para a imobilização da lacase.

Quadro 5 – Exemplos de estudos utilizando a nanocelulose bacteriana como suporte para a lacase.

Fonte - NCB	Fonte - Lacase	Método de imobilização	Referência
<i>Gluconacetobacter sacchari</i>	<i>Myceliophthora thermophila</i>	Adsorção	Frazão et al., 2014
Quatro espécies de bactérias	<i>Coriolus versicolor</i>	Adsorção	Yuan et al., 2018
<i>Gluconacetobacter xylinus</i>	<i>Trametes versicolor</i>	Adsorção & cross-linking	Chen, Zou, Hong, 2015
<i>Gluconacetobacter xylinus</i>	<i>Myceliophthora thermophila</i>	Adsorção	Sampaio et al., 2016

Fonte: Autoria Própria (2019).

Percebe-se que a maioria dos estudos envolve o método de adsorção para imobilização, abrindo uma lacuna para que trabalhos utilizando outros métodos sejam estudados, como o *cross-linking*. Além de que a probabilidade de ocorrer o processo de dessorção, o qual é um processo reverso à adsorção, em que terá a eliminação da substância adsorvida na superfície do suporte, sendo maior no processo de adsorção do que no *cross-linking* (HAVLÍK, 2008).

Frazão et al. (2014) avaliou a influência da concentração da lacase, o tempo de contato e o pH para o processo de imobilização, visando a otimização do processo frente a recuperação da atividade da lacase após imobilização por meio de um planejamento estatístico 3³ e método de superfície em resposta.

As condições ótimas ficaram definidas em 0,15 $\mu\text{L L}^{-1}$, pH 5,4 e tempo de contato de com a enzima de 4,8 horas. A recuperação da atividade enzimática após a imobilização sob estas condições ótimas ficou em cerca de 50%. Com a imobilização da lacase, houve um aumento da estabilidade térmica frente as temperaturas de 60 e 70°C, além de apresentar boa operacionalidade frente ao reuso da EI após sete ciclos consecutivos, mantendo uma atividade relativa de 86%.

Yuan et al. (2018) avaliou a relação da imobilização da lacase em NCB produzida por quatro espécies diferentes. Independente da espécie que produziu a NCB, a lacase imobilizada apresentou uma maior estabilidade operacional frente ao reuso, sendo utilizada em dez ciclos, variando entre 75 a 90% entre as espécies.

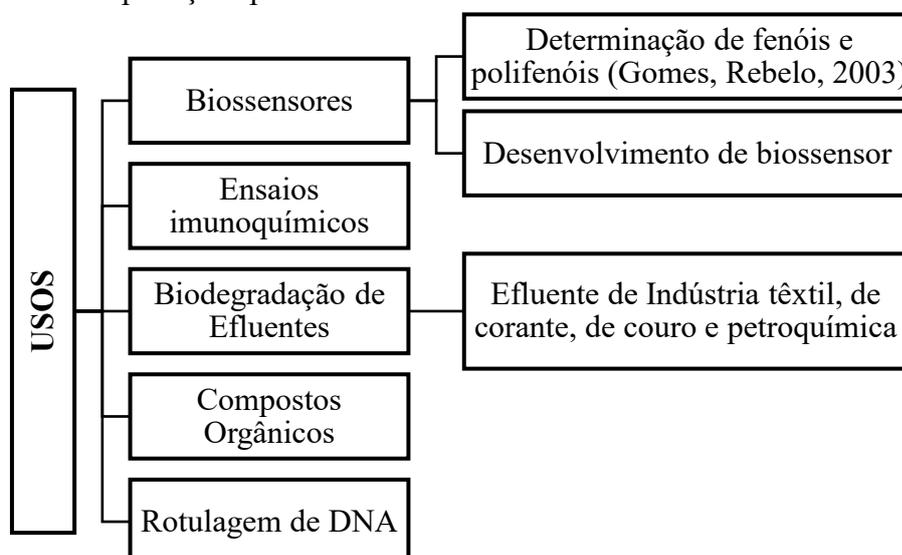
Os trabalhos apresentados anteriormente utilizaram do método de adsorção em NCB para o processo de imobilização. O método utilizando *cross-linking* é apresentado por Chen, Zou, Hong (2015) em que se observa que a lacase imobilizada por este processo apresenta uma maior tolerância a diferentes perfis de pH quando comparado a forma livre e a imobilizada por adsorção. Também percebe este comportamento para o reuso da lacase imobilizada por *cross-linking*, a qual manteve uma atividade relativa de aproximadamente 70% após seis ciclos, ao passo que a lacase imobilizada por adsorção teve uma queda da atividade relativa para cerca de 20% após os seis ciclos.

De forma geral, estes trabalhos apresentam a possível aplicação da lacase imobilizada para o tratamento de compostos, sejam compostos fenólicos ou até em biorreatores que tratem efluentes contendo águas residuárias.

3.5 APLICAÇÕES DA LACASE IMOBILIZADA

Por catalisar diversos substratos tanto orgânicos quanto inorgânicos e por apenas utilizar oxigênio como receptor final de elétrons em sua reação, a lacase pode ser utilizada amplamente em várias indústrias, como têxtil, alimentícia, biocombustível, síntese orgânica, biorremediação, papel e celulose, farmacêutica e cosmética conforme apresentado na Figura 11 (BRUGNARI et al., 2018; DESKA, KOŃCZANK, 2019; KARIGAR, RAO, 2011; LASSOUANE et al., 2019; LIU et al., 2012; MOHAMMADI et al., 2018; PACHECO, SOARES, 2014; SONG et al., 2018).

Figura 11 – Diversas aplicações para a lacase.

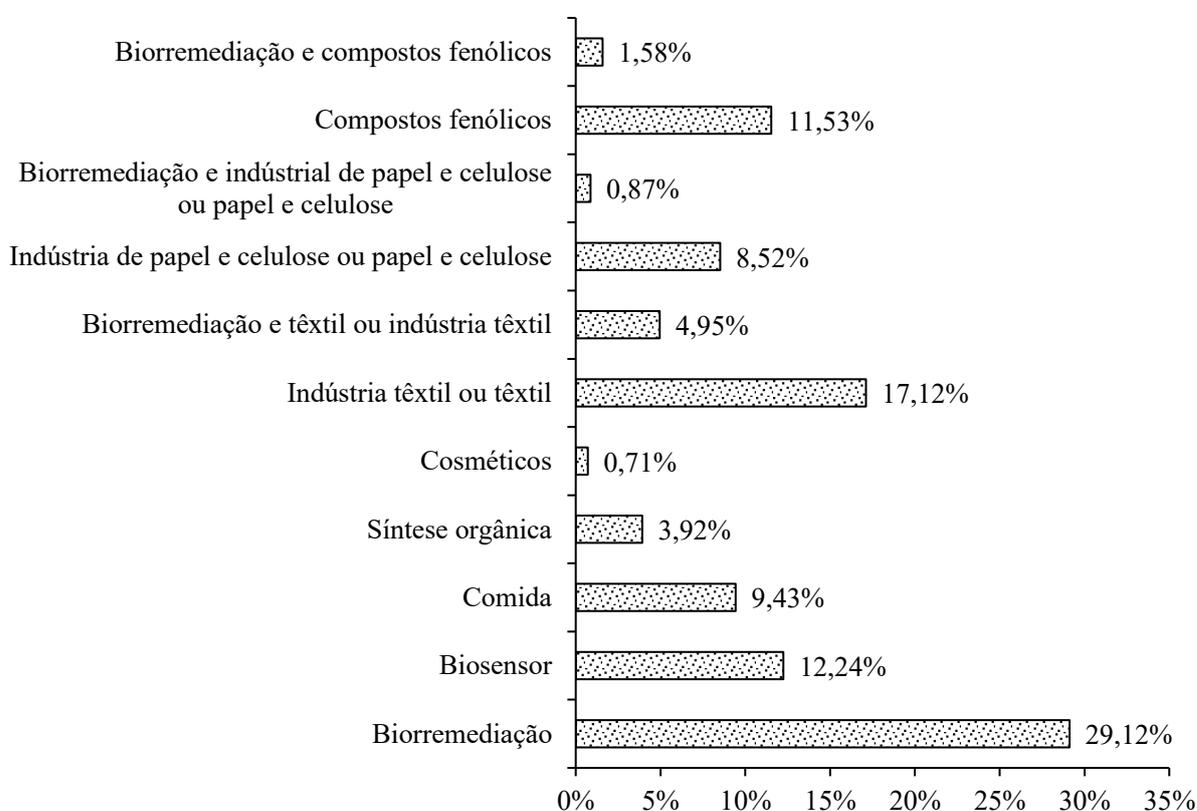


Fonte: Adaptado de SENTHIVELAN, KANAGARAJ, PANDA (2016).

Na área ambiental, uso da lacase pode ser exemplificado pelo estudo de Kumar, Sivanesan e Cabana (2014) que aplicaram lacase magnetizada por processo de *cross-linking* para degradar corantes recalcitrantes, sendo uma ferramenta de biorremediação. Outro trabalho utilizou a lacase imobilizada na biodegradação de efluentes de indústrias papelarias (PACHECO, SOARES, 2014).

A Figura 12 apresenta as aplicações biotecnológicas, na indústria e no desenvolvimento de biossensores, mostrando o potencial da mesma na área da pesquisa após análise no dado de bancos da Scopus.

Figura 12 – Aplicações biotecnológicas gerais da lacase.



Fonte: Dados extraídos da base de dados do Scopus (www.scopus.com/results/handle.uri) procura de artigos com as seguintes palavras-chaves: “lacase e biorremediação”, “lacase e biossensor”, “lacase e comida”, “lacase e síntese orgânicas”, “lacase e cosméticos”, “lacase e indústria têxtil ou têxtil”, “lacase, biorremediação e indústria têxtil ou têxtil”, “lacase e indústria de papel e celulose ou papel e celulose”, “lacase, biorremediação e indústria de papel e celulose ou papel e celulose”, “lacase e compostos fenólicos” e “lacase, biorremediação e compostos fenólicos” (2019).

Tais estudos mostram o potencial da lacase em suas diversas aplicações na indústria e em processos biotecnológicos, sendo neste caso a biorremediação como a maior aplicação da lacase, seguida da aplicação na indústria têxtil e em biossensores. Outras aplicações envolvem os compostos fenólicos, indústria de papel e celulose, além da utilização em alimentos e bebidas e cosméticos.

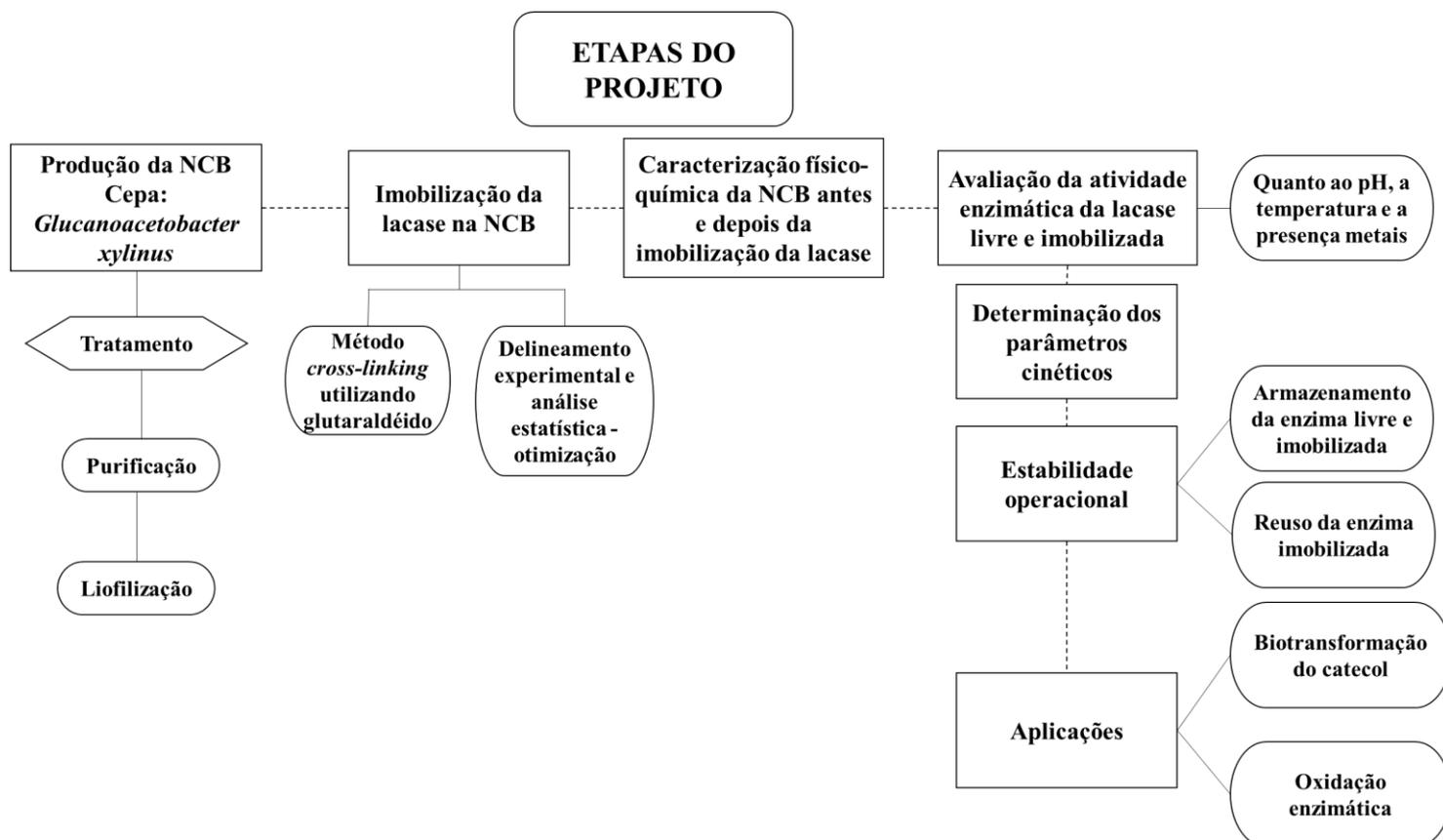
É importante destacar que para o tratamento destes efluentes, existem diversas formas de tratamento como processos físico-químicos, coagulação-floculação, métodos biológicos e oxidativos (LIU et al., 2011). Entretanto, estes tratamentos não são totalmente eficazes, alguns necessitam de associações de técnicas para ser eficiente, o que se torna, na maioria das vezes, inviável por gerar alto custo que pode acarretar sua inviabilidade, principalmente em larga escala (DESHMUKH, KHARDENAVIS, PUROHIT, 2016). Portanto, a biorremediação enzimática é uma alternativa sustentável e eficiente a estes tratamentos.

De forma geral, percebe-se as diversas aplicações desta enzima, entretanto, além da sua grande aplicabilidade é importante levar em consideração o suporte em que a mesma será imobilizada de forma a ter um sistema inovador, sustentável e ambientalmente correto.

4 METODOLOGIA

O presente trabalho contou com sete etapas principais: 1^a) produção, purificação e liofilização da NCB, 2^a) otimização do processo de imobilização da lacase na NCB, 3^a) caracterização da estrutura da NCB antes e depois da imobilização da enzima, 4^a) avaliação da atividade enzimática frente a diferentes pHs, temperaturas e metais, 5^a) determinação dos parâmetros cinéticos da atividade da lacase, 6^a) verificação do potencial de armazenamento e reuso da EI e 7^a) aplicações da NCB com lacase imobilizada, conforme o fluxograma mostrado na Figura 13.

Figura 13 – Fluxograma das principais etapas do projeto.



Fonte: Autoria Própria (2020).

Desta forma, a NCB foi produzida pela cepa *Glucanoacetobacter* sp. por cultivo estático. Após a sua produção, as NCBs passaram por processo de purificação para então serem liofilizadas no laboratório de Laboratório de Multiusuários de Equipamentos e Análises Ambientais (LAMEAA) para posterior uso no processo de imobilização.

O processo de caracterização determinou a estrutura físico-química e morfológica da NCB antes e após a imobilização por meio do MEV, EDS, difração Raios-X e ATR-FTIR.

O MEV, o EDS e a difração Raios-x foram realizados pelo Centro Multiusuário de Caracterização de Materiais (CMCM) - UTFPR. Para o ATR-FTIR, as amostras foram analisadas no Laboratório da empresa Vegoor – Tecnologia Aplicada (Colombo – PR).

Quanto ao estudo da atividade enzimática, foi utilizado como substrato o ABTS para analisar o desempenho tanto da enzima (EL) quanto da enzima imobilizada (EI) além de verificar as condições ótimas frente a diferentes pHs e temperaturas. Também foram avaliados os efeitos de diferentes parâmetros como pH, temperatura e metais na EL e EI, além do potencial de armazenamento da lacase livre e imobilização e de reuso das enzimas imobilizadas. Ressalta-se que um delineamento experimental do tipo Box-Behnken e análise estática foram realizados com o intuito de otimizar o processo de imobilização.

Por fim, aplicou-se a lacase imobilizada em NCB na biotransformação do catecol e como mediadora no processo oxidativo do ácido ferúlico.

4.1 MATERIAIS

O ABTS e glutaraldeído 25% (v/v) foram adquiridos da empresa Sigma-Aldrich®. Outros reagentes de grau analítico foram os obtidos no Laboratório de Microbiologia, no Laboratório de Pesquisa Relacionada a Biomassa e Bioenergia (LAPREBB) e no de Multiusuário de Análises Químicas (LAMAQ) na Universidade Tecnológica Federal do Paraná campus Ecoville. A enzima lacase (E.C. 1.10.3.2) de *Myceliophthora thermophila* foi obtida comercialmente (Novozymes Ltda) e a cepa de *Gluconacetobacter* sp. foi obtida do laboratório LAPREBB.

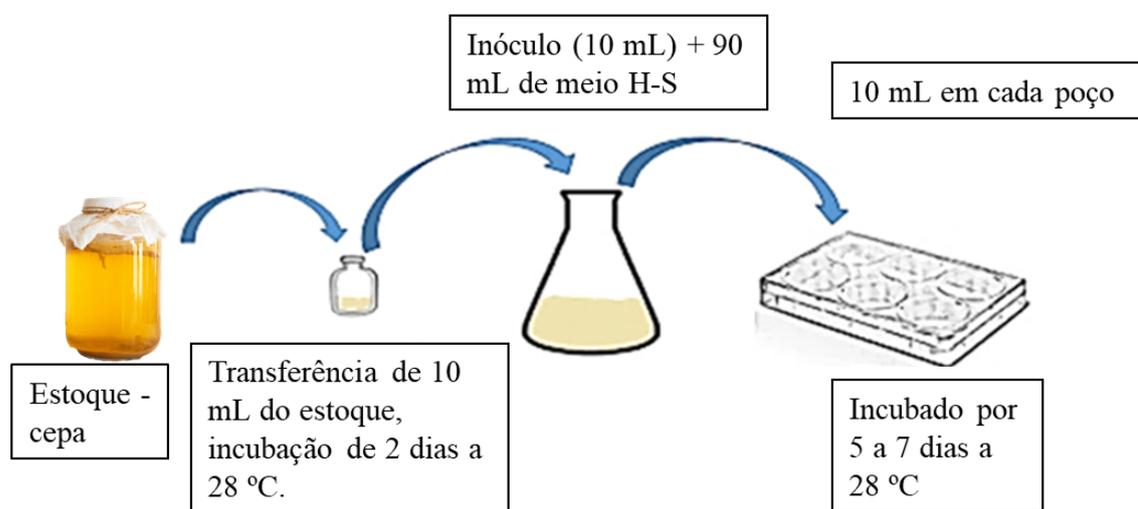
4.2 PRODUÇÃO E TRATAMENTO DA NANOCELULOSE BACTERIANA

Para a produção da NCB, a bactéria *Gluconacetobacter* sp. foi cultivada em meio de cultura Hestrin-Schramm (H-S) modificado (substituição de glicose por glicerol) cuja constituição em g L⁻¹ foi: 20,0 de glicerol, 5,0 de extrato de levedura, 5,0 de peptona, 2,7 de fosfato de sódio bibásico e 1,15 de ácido cítrico com o pH ajustado para 4,0 utilizando solução de ácido acético glacial (SAMPAIO et al., 2016; HESTRIN, SCHRAMM, 1954).

Em seguida, o meio foi autoclavado à 121°C a 1 atm por 15 minutos e estocado a temperatura ambiente para posterior uso. Para a produção da nanocelulose, preparou-se um estoque da cepa bacteriana a qual foi mantida sob cultivo em meio H-S estático contínuo em estufa a 28 °C.

Por seguinte, preparou-se o inóculo a partir do cultivo estoque em 10 mL de meio H-S seguido por incubação durante dois dias a 28°C. Depois, adicionou-se todo este inóculo a 90 mL de meio H-S que foram dispensados em poços de placas de cultivo celular de fundo chato de 6 poços. O processo de incubação foi um período entre cinco a sete dias a temperatura de 28°C conforme apresentada pela Figura 14 (YAO et al., 2011; WU, LIA, 2008).

Figura 14 – Representação esquemática do procedimento empregado para o cultivo de NCBs em placas de cultivo celular de 6 poços.



Fonte: Autoria Própria (2020).

Após período de cinco a sete dias, membranas de aproximadamente 3 mm de espessura foram purificadas. Para isso, as NCBs foram imersas em solução de hidróxido de sódio (NaOH) 100 mM por 1 hora a uma temperatura de 90°C para remover qualquer resquício de células bacterianas e do meio de cultura. Por fim, as membranas foram imersas novamente em água deionizada até chegar a pH neutro e, se não utilizadas imediatamente, foram estocadas até seu uso em frascos com água deionizada sob refrigeração de 4°C (CHEN, ZOU, HONG, 2015; DROZD et al., 2018; SAMPAIO et al., 2016; YAO et al., 2011).

4.3 TESTES PRELIMINARES

Experimentos foram realizados com a finalidade de avaliar dois métodos de secagem da NCB, por liofilização e por secagem em estufa a 60 °C, e de avaliar a influência do tempo de reação ao ABTS com a lacase imobilizada e o tempo de contato no processo de adsorção (primeira etapa do processo de imobilização deste trabalho). Vale ressaltar que foram avaliadas as características morfológicas da nanocelulose bacteriana após os métodos de secagem por microscopia eletrônica de varredura (MEV).

Para esses testes, o método de imobilização foi apenas por adsorção e a análise da atividade enzimática foi realizada conforme descrito no item 4.6.

4.4 IMOBILIZAÇÃO DA LACASE NA NANOCELULOSE BACTERIANA

As membranas de NCB purificadas foram congeladas a -80°C em ultrafreezer e posteriormente liofilizadas (liofilizador marca Liotop, a -48 °C e 0,1 mbar, por 24 h). Para a imobilização por *cross-linking*, primeiramente realizou-se uma fase de adsorção seguida pela reticulação com a adição de glutaraldeído. Para tanto, as membranas liofilizadas foram cortadas com cortador de papel que proporcionou o formato de pequenas esferas (6 mm de diâmetro), pesadas (10 ± 1 mg) e imersas em 10 mL de tampão de acetato de sódio 50 mM contendo lacase seguido por incubação a 30°C sob agitação de 150 rpm por 30 minutos.

Depois desse período, adicionou-se glutaraldeído e a mistura foi incubada a 4°C, de forma estática, durante 12 horas. Para a última etapa da imobilização, a solução foi incubada a 30°C durante 2 horas sob agitação de 150 rpm. Por fim, o material foi lavado com a solução tampão de acetato de sódio 50 mM e o excesso de umidade removido com auxílio de papel, estando pronto para ser utilizado imediatamente (CHEN, ZOU, HONG, 2015; SATHISHKUMAR et al., 2014). Ressalta-se que a quantidade de glutaraldeído adicionado, a quantidade de enzima e o pH da solução tampão são detalhadas no delineamento experimental 4.4.1.

4.4.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E ANÁLISE ESTATÍSTICA

Aplicou-se o método de superfície de resposta e um delineamento experimental tipo Box-Behnken baseado em 15 experimentos com triplicata no ponto central avaliando os níveis máximos (+1), ponto central (0) e mínimos (-1) de três variáveis independentes (fatores) conforme Tabela 1.

Tabela 1 – Fatores e níveis das variáveis independentes estabelecidos para delineamento experimental.

Fatores	-1	0	+1
pH	4	5	6
Concentração da enzima (U. L ⁻¹)	200	350	500
Concentração de glutaraldeído (%)	0,125%	0,500%	0,875%

Fonte: Autoria Própria (2019).

Os testes ocorreram como mostrado na Tabela 2, a resposta ou variável dependente deste delineamento experimental foi referente a recuperação da atividade enzimática da lacase após imobilização (%). A determinação da atividade enzimática e da recuperação da atividade enzimática foi realizada conforme detalhado no item 4.

Tabela 2 – Matriz do tipo Box-Behnken para o delineamento experimental.

Experimentos	pH	Concentração da enzima (U L⁻¹)	Concentração de Glutaraldeído (%)
1	4	200	0,500%
2	4	350	0,125%
3	4	350	0,875%
4	4	500	0,500%
5	6	200	0,500%
6	6	350	0,125%
7	6	350	0,875%
8	6	500	0,500%
9	5	200	0,125%
10	5	500	0,125%
11	5	200	0,875%
12	5	500	0,875%
13	5	350	0,500%
14	5	350	0,500%
15	5	350	0,500%

Fonte: Autoria Própria (2019).

Com os dados experimentais, obteve-se um modelo baseado no método dos mínimos quadrados ordinários e para se obter os valores ótimos. Os gráficos de superfície de resposta foram elaborados em função da máxima resposta para a recuperação da atividade enzimática. Estes resultados foram obtidos por meio do software MINITAB[®] versão 19 (avaliação gratuita) e pelo STATISTICA[®] versão 8 (avaliação gratuita).

4.5 CARACTERIZAÇÃO DA NANOCELULOSE BACTERIANA: ANTES E APÓS IMOBILIZAÇÃO

4.5.1 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV) E ESPECTROSCOPIA DE ENERGIA DISPERSIVA (EDS)

Para avaliar as características morfológicas da nanocelulose bacteriana antes e após imobilização, utilizou-se o microscópio eletrônico de varredura (Zeiss modelo EVO MA 15) operando a 10 kV, 8,5 mM e com detector SE1.

Ressalta-se que as amostras foram preparadas no equipamento Quanta Quorum Q150R ES para recobrimento com ouro por ser um material não condutor. As imagens obtidas foram analisadas pelo software Image-J (software livre) sendo possível estimar o diâmetro médio após análise de 100 fibras escolhidas de forma aleatória e em combinação com a macro jPOR estimou-se a porosidade total da superfície da NCB (antes e depois da imobilização) (DROZD et al., 2018; GROVE, JERRAM, 2011; YUAN et al., 2018). Uma análise elementar foi realizada através da espectroscopia de energia dispersiva de forma a avaliar elementos químicos que estivessem presentes na área selecionada durante a análise do MEV.

4.5.2 DIFRAÇÃO DE RAIOS-X (DRX)

As características estruturais da nanocelulose bacteriana antes da imobilização foram investigadas por DRX (Shimadzu, modelo XRD-7000) a 40 kV e 40 mA. O escaneamento angular ocorreu em modo contínuo de varredura de 5° a 120° (2 θ) por 2° por minuto. Baseou-se no método empírico do Segal et al. (1959) celulose nativa para calcular o índice cristalino (CRI^{XRD}) conforme Equação 1:

$$CRI^{XRD} = \frac{(I_{002} - I_{am})}{I_{002}} \times 100\% \quad (1)$$

Em que I_{002} é a intensidade máxima da difração analisada e I_{am} é a intensidade de difração a $2\theta = 18^\circ$.

4.5.3 ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR) COM MODO DE REFLEXÃO TOTAL ATENUADA (ATR):

Os grupos funcionais presentes na NCB antes e depois do processo de imobilização foram avaliados por ATR-FTIR (AGILENT CARY 630). A faixa espectral avaliada foi entre 4000 cm^{-1} a 650 cm^{-1} e cada amostra foi escaneada 16 vezes a uma resolução de 4 cm^{-1} .

4.6 ANÁLISE DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA

Para analisar a atividade enzimática tanto da EL quanto da EI foi utilizado o método que se baseia na oxidação do ABTS a ABTS^+ que apresenta absorção à 420 nm ($\epsilon = 36 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), sendo as leituras obtidas por meio de espectrofotômetro UV-visível (BEL M-51).

Para os ensaios, preparou-se uma mistura contendo $400 \mu\text{L}$ de ABTS 10 mM , $3,4 \text{ mL}$ de tampão acetato de sódio (50 mM , $\text{pH } 5$) e $200 \mu\text{L}$ de EL ou 10 mg de EI (CHEN et al., 2015; SAMPAIO et al., 2016). Esta mistura foi colocada em tubos e permaneceram em banho maria à 40°C por 5 minutos e então realizou-se a leitura da absorbância no espectrofotômetro. Para a EI, manteve a amostra sob agitação.

Vale ressaltar que para a análise da atividade enzimática, uma unidade de atividade da enzima foi definida como a quantidade de enzima necessária para oxidar $1 \mu\text{mol}$ de ABTS por minuto e sua unidade expressa a atividade de 1 mL ou 1 mg de enzima (CHEN, ZOU, HONG, 2015; SAMPAIO et al., 2016; SATHISHKUMAR et al., 2014).

Assim, a atividade enzimática foi expressa em U mL^{-1} e U mg^{-1} tanto para EL quanto para EI.

Para o cálculo do valor da atividade enzimática da enzima imobilizada e livre foram utilizadas as Equações 2 e 3 respectivamente:

$$U/g = \frac{ABS \times f_{dil} \times V_{r.1} \times 10^6}{t \times m_{cb} \times \epsilon} \quad (2)$$

$$U/L = \frac{ABS \times f_{dil} \times V_{r.2} \times 10^6}{t \times V_e \times \epsilon} \quad (3)$$

Em que:

ABS: absorvância lida a 420 nm;

f_{dil} : fator de diluição caso a enzima tenha sido diluída;

$V_{r.1}$ (L): volume total da reação que foi colocada na cubeta em L que foi 3,8 mL referente a 3,4 mL do tampão de acetato de sódio 50 mM e 400 μ L do ABTS 10 mM para a reação envolvendo a EI;

$V_{r.2}$ (L): volume total da reação que foi colocada na cubeta em L que foi 4 mL referente a 3,4 mL do tampão de acetato de sódio 50 mM, 400 μ L do ABTS 10 mM e 200 μ L da EL para a reação envolvendo a EL;

m_{cb} (g): massa da nanocelulose bacteriana que foi adicionada ao experimento antes de ser imobilizada (10 mg);

V_e (L): volume de EL que foi adicionada ao experimento (200 μ L);

t (min): tempo da reação que foi de 5 minutos;

ϵ é o coeficiente relacionado ao ABTS que é 36.000 $M^{-1} cm^{-1}$ a 420 nm.

Analisou-se também a taxa da adsorção da lacase pela Equação 4 e recuperação da atividade enzimática após imobilização pela Equação 5 (CHEN, ZOU, HONG, 2015; FRAZÃO et al., 2014):

$$Taxa de imobilização (\%) = \frac{A_L - A_S}{A_L} \times 100 \quad (4)$$

$$Recuperação da atividade enzimática após imobilização (\%) = \frac{A_I}{A_T} \times 100 \quad (5)$$

Em que:

A_L ($U L^{-1}$): atividade da EL antes do processo de imobilização;

A_S ($U L^{-1}$): atividade da enzima no sobrenadante após o processo de imobilização;

A_I ($U g^{-1}$): atividade da EI;

A_T ($U g^{-1}$): atividade teórica.

A atividade teórica refere-se à atividade da lacase livre presente no sobrenadante antes do processo de imobilização (A_L), sendo convertido em $U g^{-1}$ (FRAZÃO et al., 2014). A constante de conversão utilizada foi de 0,01 $L g^{-1}$ ao considerar a razão entre o volume da solução de imobilização (0,01 L) por 1 grama do suporte utilizado no processo de imobilização.

4.7 CONDIÇÕES ÓTIMAS PARA A ATIVIDADE ENZIMÁTICA QUANTO AO pH E TEMPERATURA

Para avaliar a relação dos parâmetros operacionais com a atividade enzimática, tanto para a enzima livre quanto para a imobilizada, testou-se a influência do pH e temperatura. Desta forma, avaliou-se quais seriam os valores ótimos de pH (3-7) e temperatura (20-70 °C) para a atividade enzimática, tanto para a enzima livre quanto para a enzima imobilizada.

Para os testes de pH foram utilizados os tampões: citrato-fosfato para o pH 3, acetato de sódio para os pHs 4, 5 e 6 e fosfato de sódio para o pH 7 a temperatura de 40°C. Os testes foram realizados em tubos Eppendorf contendo 5 mL de meio reacional. Para a temperatura, o pH utilizado foi o da melhor condição do teste anterior e ocorreu da mesma forma (SAMPAIO, et al. 2016; SATHISHKUMAR et al., 2014). Após determinar a condição ótima, os testes para determinação do parâmetro cinético, estabilidade, armazenamento e reuso foram realizados sob as condições ótimas. Salienta-se que todos os testes foram realizados em triplicatas e, para a análise da atividade enzimática, seguiu procedimento apresentado em 4.6.

4.8 INFLUÊNCIA DE METAIS NA ATIVIDADE DA LACASE LIVRE E IMOBILIZADA

Para a analisar a influência de metais na atividade enzimática, tanto da EL e EI, dois metais a foram avaliados, o sulfato de cobre (Cu^{+2}) e nitrato de zinco (Zn^{+2}) em duas concentrações, 10 e 100 mM. A escolha destes metais se deu ao considerar a relação da lacase com o cobre, pois, a lacase faz parte da família de multicobre oxidases e o zinco pela sua aplicação na indústria, podendo ser um potencial inibidor da lacase.

A análise da atividade enzimática seguiu o mesmo procedimento apresentado no item 4.6 e então calculou-se a atividade enzimática relativa, a qual consiste na razão entre a atividade enzimática final (após período de incubação) e atividade enzimática inicial (antes do período de incubação) (PACHECO, SOARES, 2014). Ressalta-se que considerou as condições ótimas para o pH e temperatura para a análise da atividade enzimática.

4.9 DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS CINÉTICOS DA LACASE LIVRE E IMOBILIZADA

Para analisar a atividade da lacase pela oxidação do ABTS, tanto da enzima livre quanto da imobilizada, foram analisados os parâmetros cinéticos, a velocidade máxima da reação ($V_{m\acute{a}x}$) e a constante de Michaelis-Menten K_M , em ensaios com amostras contendo diferentes concentrações de ABTS (4 mM, 2 mM, 1mM, 0,5 mM e 0,1 mM) nas condições ótimas de temperatura e pH. Quanto à atividade enzimática, realizou-se o procedimento citado em 4.6 e todos os testes foram realizados em triplicatas.

A equação de Michaelis-Menten é apresentada pela Equação 6 e pode ser transformada algebricamente na Equação 7, a qual é denominada de equação de Lineweaver-Burk, que é uma linearização da equação de Michaelis-Menten e é possível determinar os parâmetros cinéticos ao fazer o plot da curva com os dados experimentais (NELSON, COX, 2019).

$$V_o = \frac{V_{m\acute{a}x} [S]}{K_m + [S]} \quad (6)$$

$$\frac{1}{V_o} = \frac{K_m}{V_{m\acute{a}x} [S]} + \frac{1}{V_{m\acute{a}x}} \quad (7)$$

Em que:

V_o : velocidade inicial;

$[S]$: concentração do substrato;

$V_{m\acute{a}x}$: velocidade máxima de reação;

K_M : constante de Michaelis-Menten.

Portanto, por meio do gráfico de Lineweaver-Burk foram estimados os parâmetros cinéticos e os valores de $V_{m\acute{a}x}$ e K_M pela intercepção no eixo y e x do gráfico sendo y o inverso da velocidade inicial da produção do produto enzimático ($1/V_o$) e x o inverso da concentração do substrato ($1/[S]$) (ARICA, ALTINTAS, BAYRAMOGLU, 2009; MOHAMMADI et al, 2018).

4.10 ESTABILIDADE TÉRMICA

Para a estabilidade térmica, os testes foram feitos com incubações nas temperaturas de 60°C e 70°C também durante uma hora com retiradas a cada 15 minutos, considerando o pH ótimo determinado conforme item 4.7.

A análise da atividade enzimática seguiu o mesmo procedimento apresentando no item 4.6 e então calculou-se a atividade enzimática relativa, a qual consiste na razão entre a atividade enzimática final (após período de incubação) e atividade enzimática inicial (antes do período de incubação) (MOHAMMADI et al., 2018; PACHECO, SOARES, 2014). Ressalta-se que considerou as condições ótimas para o pH e temperatura para a análise da atividade enzimática.

4.11 ESTABILIDADE DE ARMAZENAMENTO DA ENZIMA LIVRE E IMOBILIZADA

Para o teste referente à estabilidade de armazenamento, tanto a enzima imobilizada quanto a livre foram armazenadas a 4°C, de forma estática, em tampão de acetato de sódio (50 mM) durante um período de 4 semanas, verificando a atividade relativa a qual foi definida como a razão entre a atividade enzimática de um determinado dia de armazenamento pela atividade enzimática inicial ($t=0$). Todos os testes foram realizados em triplicata (ARICA, ALTINTAS, BAYRAMOGLU, 2009; FRAZÃO et al., 2014; JIANG et al., 2005).

4.12 REUSO DA LACASE IMOBILIZADA

Para verificar o reuso da lacase realizaram-se setes ciclos seguidos com a EI utilizando ABTS como substrato considerando a temperatura e o pH ótimos determinados pelo teste citado em 4.7.

Após cada ciclo, a EI utilizada foi lavada com a solução tampão de acetato de sódio (50 mM – pH 5) até que a solução estivesse incolor visando a remoção de qualquer resíduo do substrato do ciclo anterior e então foi utilizada em um novo meio reacional contendo ABTS e tampão. As amostras foram analisadas pela atividade relativa sendo a razão entre a atividade enzimática de um determinado ciclo pela atividade do primeiro ciclo, o qual foi determinado como 100%. Todos os testes foram realizados em triplicata (CHEN, ZOU, HONG, 2015; DROZD et al. 2018).

4.13 APLICAÇÕES DA LACASE IMOBILIZADA EM NANOCELULOSE BACTERIANA:

4.13.1 BIOTRANSFORMAÇÃO DO CATECOL: ATUAÇÃO COMO BIOSENSOR

Para avaliar a habilidade da lacase em biotransformar o catecol para um composto no qual é possível detectar visualmente (biossensor óptico), além de avaliar a estabilidade da enzima ao longo do tempo na presença deste composto, preparou-se uma solução contendo 10 mL de catecol (10 mM – pH 7) com a adição da lacase imobilizada otimizada (200 U g⁻¹) a 30 °C a 100 rpm durante uma hora e meia com retiradas de alíquotas para análise nos tempos 15, 30, 45, 60 e 90 minutos.

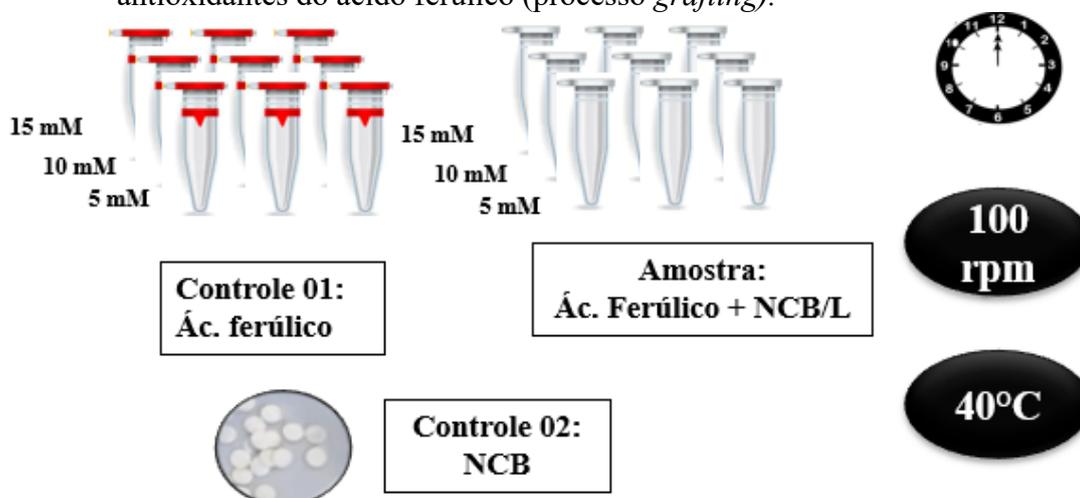
Assim, de forma a relacionar a biotransformação do catecol com a capacidade da lacase em oxidar compostos fenólicos, baseou-se na análise da atividade enzimática conforme apresentado para o ABTS (item 4.6) em que a leitura da absorbância foi feita a 450 nm ($\epsilon = 2.211 \text{ M cm}^{-1}$) no espectrofotômetro (SAMPAIO et al., 2016). Ressalta-se que a análise foi feita tanto para a lacase livre quanto imobilizada e o cálculo da atividade foi realizada conforme as Equações 2 e 3. A atividade relativa foi determinada como a relação entre a atividade enzimática no tempo zero (atividade máxima) com as atividades obtidas nos tempos descritos acima.

4.13.2 PREPARO DA NCB COM PROPRIEDADES ANTIOXIDANTES: EFEITO DA LACASE IMOBILIZADA NA PRESENÇA DE ÁCIDO FERÚLICO

Preparou-se um sistema lacase imobilizada-mediador com o ácido ferúlico de forma a avaliar a possibilidade do processo de *grafting*, ou seja, compartilhar as propriedades antioxidantes do ácido ferúlico (mediador) pelo sistema lacase-mediador para a NCB, possuindo um suporte com estas propriedades.

Primeiramente, preparou-se uma solução mãe de ácido ferúlico em metanol (100 mM) e então diluiu-se com tampão de acetato de sódio (50 mM, pH 5) em diferentes concentrações (5, 10 e 15 mM, concentrações finais) (ADELAKUN et al., 2012).

Figura 15 – Representação esquemática do procedimento empregado para avaliar o efeito do sistema lacase-mediador com a finalidade de preparar a NCB com propriedades antioxidantes do ácido ferúlico (processo *grafting*).



Fonte: Autoria Própria (2019).

A reação começou com a adição da lacase imobilizada e, após o período de 12 horas incubada a 40°C a 100 rpm, retirou-se as alíquotas para as análises. É importante destacar que o processo foi realizado na presença de luz o que poderá afetar a atividade antioxidante. Dois controles foram usados, um referente apenas a amostra do ácido ferúlico e outro apenas com a nanocelulose bacteriana. Ao total foram 6 amostras analisadas, amostra referente ao controle 01, o sobrenadante da extração da NCB (controle 02), ao controle 02 de forma direta, sobrenadante da amostra, a própria NCB/L (nanocelulose bacteriana com lacase imobilizada) de forma direta e o sobrenadante da extração da NCB/L. Todos os testes foram realizados em triplicata. Cada amostra foi então analisada frente aos métodos DPPH, FRAP e de fenóis totais.

4.13.3 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO DPPH

O método DPPH é uma técnica espectrofotométrica em que se determina indiretamente a atividade antioxidante. Este método é baseado na redução da absorbância a 517 nm do radical livre 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) por determinados tipos de compostos, como os compostos fenólicos (BORGES et al., 2011).

Assim, adaptando-se o método proposto por Brand-Williams, Cuvelier e Berset (1995), os testes foram realizados pela mistura de 3,9 mL da solução de DPPH (125 µmol/L) e 0,1 (mL) da amostra com a leitura feita a 517 nm por meio de espectrofotômetro UV-visível (BEL M-51) após as soluções ficarem em repouso no escuro por 30 minutos. No caso do branco (controle), adicionou-se água destilada ao invés da amostra a ser analisada.

Para as análises do sobrenadante da lacase imobilizada e da imersão direta da nanocelulose bacteriana, seguiram-se a metodologia apresentada por Byun, Kim, Whiteside. (2010), Domenek et al. (2013) e Yang et al. (2016) com adaptações. A lacase imobilizada foi imersa em 3 mL de metanol por 24 horas a temperatura ambiente (25 °C), analisando então o sobrenadante conforme descrito anteriormente. Também foi realizada a extração com solução salina de forma a evitar o uso de um solvente como o metanol. Para a análise da nanocelulose bacteriana de forma direta, 10 mg foram imersas na solução de DPPH e a análise ocorreu da mesma forma descrita anteriormente.

A atividade antioxidante foi expressa como a habilidade do sequestro do radical DPPH (%) ou porcentagem de redução (%) conforme a Equação 8:

$$\begin{aligned} & \% \text{ de redução} \\ & = \frac{A_{\text{controle}} - A_{\text{amostra}}}{A_{\text{controle}}} \times 100 \end{aligned} \quad (8)$$

Em que A_{controle} é a absorbância do branco e A_{amostra} é a absorbância da solução de DPPH com a amostra analisada. Todas as amostras foram realizadas em triplicata. Os resultados foram então comparados com curva padrão (Anexo B).

4.13.4 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO FRAP

Um outro método para determinar a atividade antioxidante é o método FRAP que consiste na redução do íon ferro. Para esta análise, baseou-se na metodologia apresentada por Benzie e Strain (1996).

Para este experimento, 50 µL da amostra analisada (as que foram descritas em 4.13.2) foi misturada com 1,5 mL do reagente FRAP. As amostras ficaram em repouso no escuro durante 30 minutos e a leitura foi realizada a 593 nm por meio de espectrofotômetro UV-visível (BEL M-51). Ressalta-se que as extrações e a análise da nanocelulose bacteriana de forma direta ocorreram da mesma forma como descrito no item 4.12.2.1. Todas as amostras foram realizadas em triplicatas e os resultados foram expressos em µmol de Trolox por L de amostra ou por g de amostra, sendo comparados com curva padrão (Anexo C).

4.13.5 DETERMINAÇÃO DO CONTEÚDO DE FENÓIS TOTAIS

Os compostos fenólicos totais foram determinados pelo método de Folin-Ciocalteu, adotando como base a metodologia apresentada por Singleton e Rossi (1965) com adaptações. Ressalta-se que as extrações e a análise da nanocelulose bacteriana de forma direta ocorreram da mesma forma como indicado no item 4.12.2.2.

As amostras (as que foram descritas em 4.13.2) ficaram em repouso no escuro durante uma hora e a leitura foi realizada a 765 nm por meio de espectrofotômetro UV-visível (BEL M-51).

Todas as amostras foram analisadas em triplicatas e os resultados foram expressos em mg de equivalentes de ácido gálico (EAG) por L de amostra ou por g de amostra, sendo comparados com curva padrão (Anexo D).

4.14 ANÁLISE DA SIGNIFICÂNCIA ESTATÍSTICA DOS DADOS

De forma a avaliar a significância dos dados, quando necessário, realizou-se o teste T pelo software MINITAB[®] versão 19 (avaliação gratuita).

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 PRODUÇÃO E TRATAMENTO DA NANOCELULOSE BACTERIANA

As membranas de NCB foram produzidas por *Gluconacetobacter* sp. em placas para cultivo de células como apresentado na Figura 16.

Figura 16 – Nanocelulose bacteriana produzida por *Gluconacetobacter* sp.



Fonte: Autoria Própria (2019).

As membranas levaram cerca de 6 dias para alcançarem a espessura de aproximadamente 1 cm e diâmetro de 3,50 cm. As membranas produzidas tiveram uma massa média de $4,0 \pm 1$ g em seu estado hidratado (*in natura* pós-lavagem). A substituição da glicose pelo glicerol bruto no meio de cultura Hestrin-Schramm (H-S) foi vantajoso pela diminuição do custo de produção da membrana (custo 1 Ton US\$ 480,00 para a glicose contra US\$ 200,00 para o glicerol bruto) e pela menor possibilidade de contaminação pois um número menor microrganismos metabolizam esse substrato comparando com a glicose.

Quanto ao tratamento posterior a produção, a metodologia utilizada mostrou-se eficiente por remover o meio de cultivo residual impregnado na membrana (de coloração amarelada) e juntamente com as células viáveis e não-viáveis, passando então para o processo de liofilização, o qual mostrou ser o método de secagem mais eficiente conforme apresentado no item 5.2.1.

Após o processo de liofilização, as membranas foram cortadas, possuindo um diâmetro de 6 mm e estocadas até o uso conforme apresentado na Figura 17. Ressalta-se que este formato foi determinado visando uma melhor padronização do tamanho no preparo do material e nos ensaios posteriores.

Figura 17 – Celulose bacteriana liofilizada com o corte padrão.



Fonte: Autoria Própria (2019).

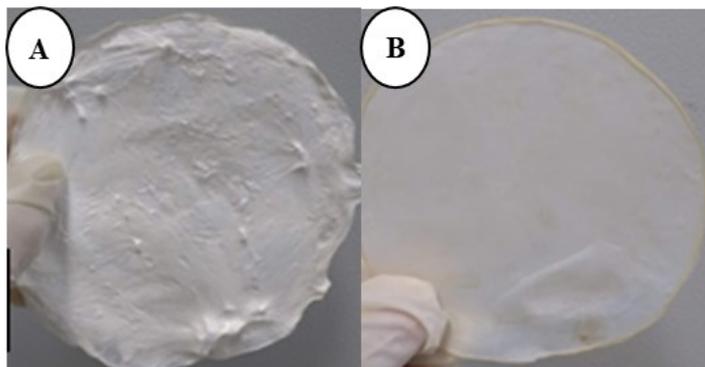
5.2 TESTES PRELIMINARES

Testes preliminares foram realizados a fim de determinar: a) o melhor procedimento de secagem da NCB (liofilização ou em estufa a uma temperatura de 60°C e b) a influência do tempo de reação ao ABTS com a lacase imobilizada e o tempo de contato no processo de adsorção (primeira etapa do processo de imobilização deste trabalho). Ressalta-se que todos esses testes preliminares foram realizados para a lacase imobilizada pelo processo de adsorção para que pudesse então prosseguir para o próximo de imobilização pelo método de *cross-linking*.

5.2.1 DETERMINAÇÃO DO MÉTODO DE SECAGEM PARA A NANOCELULOSE BACTERIANA

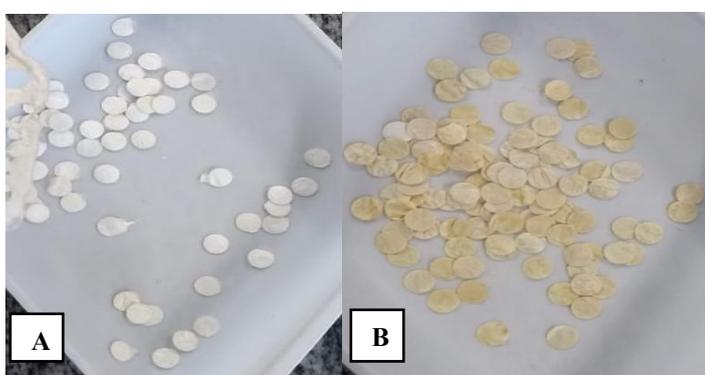
As Figuras 18 e 19 apresentam a nanocelulose bacteriana após o processo de secagem, sendo por liofilização e em estufa a 60°C.

Figura 18 – Nanocelulose bacteriana liofilizada (A) e seca em estufa a 60°C (B).



Fonte: Autoria Própria (2019).

Figura 19 – Nanocelulose bacteriana após o corte padronizado em 6 mm de diâmetro.



Fonte: Autoria Própria (2019).

Nanocelulose bacteriana liofilizada (A) e seca em estufa a 60°C (B).

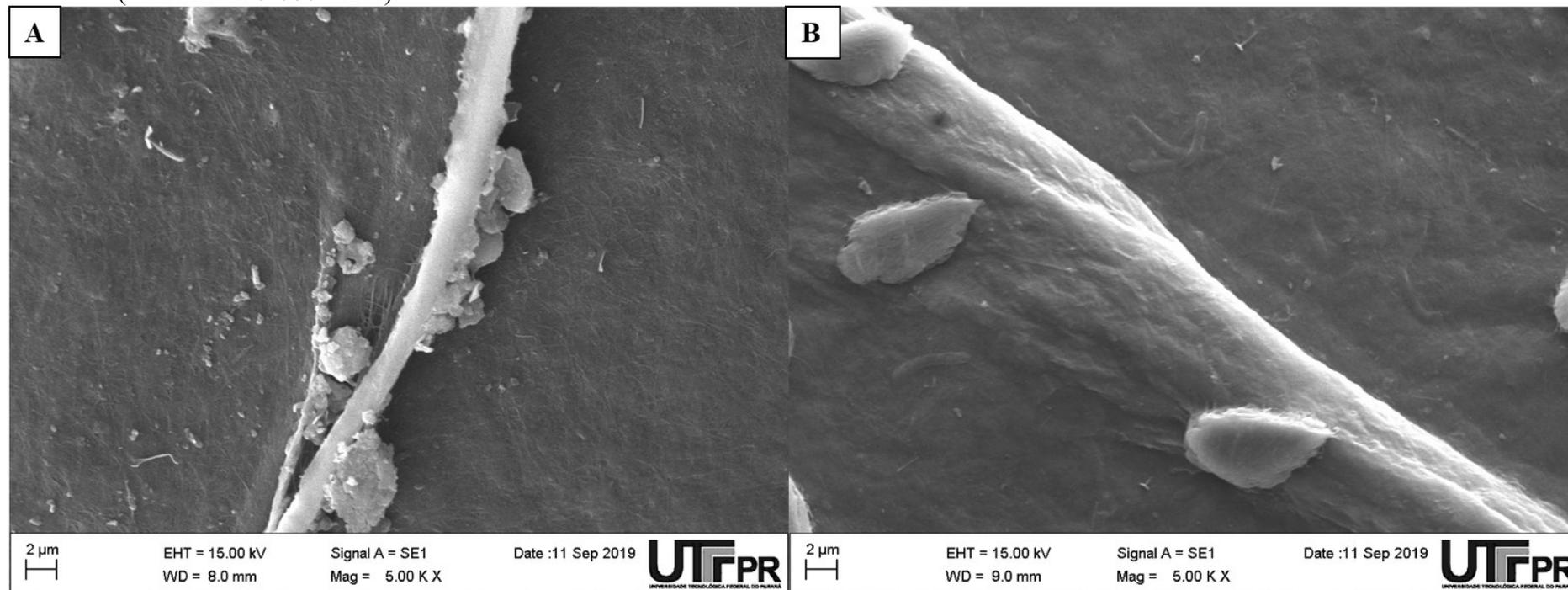
É possível notar diferenças visuais entre as NCBs no quesito espessura (Figura 18) e coloração (Figura 19).

A NCB seca pelo processo de liofilização reteve uma atividade enzimática em relação a lacase livre de $31,39\% \pm 1,48$ frente a $5,05\% \pm 0,09$ da NCB seca em estufa. Portanto, optou-se por utilizar o método de liofilização para secagem visando a maior recuperação da atividade enzimática no suporte analisado. Além de que um tratamento estatístico mostrou diferença significativa ($p < 0,05$) entre os dados.

De forma a entender melhor esta diferença, realizou-se a análise por MEV destes materiais. Entretanto, é importante enfatizar que a NCB seca em estufa não permitiu o preparo para a efetiva análise da estrutura interna da membrana, pois é necessário que a NCB tivesse uma certa espessura para o recorte de uma fina camada superficial expondo a parte interna para análise. Desta forma, fez-se a caracterização superficial de ambas as membranas.

A Figura 20 é referente a caracterização da superfície da NCB liofilizada e seca em estufa.

Figura 20 – Microscopia eletrônica de varredura da nanocelulose bacteriana após secagem pelo processo de liofilização (A) e em estufa (B) (aumento de 5.000 vezes).



Fonte: Centro Multiusuário de Caracterização de Materiais da UTFPR (2019).

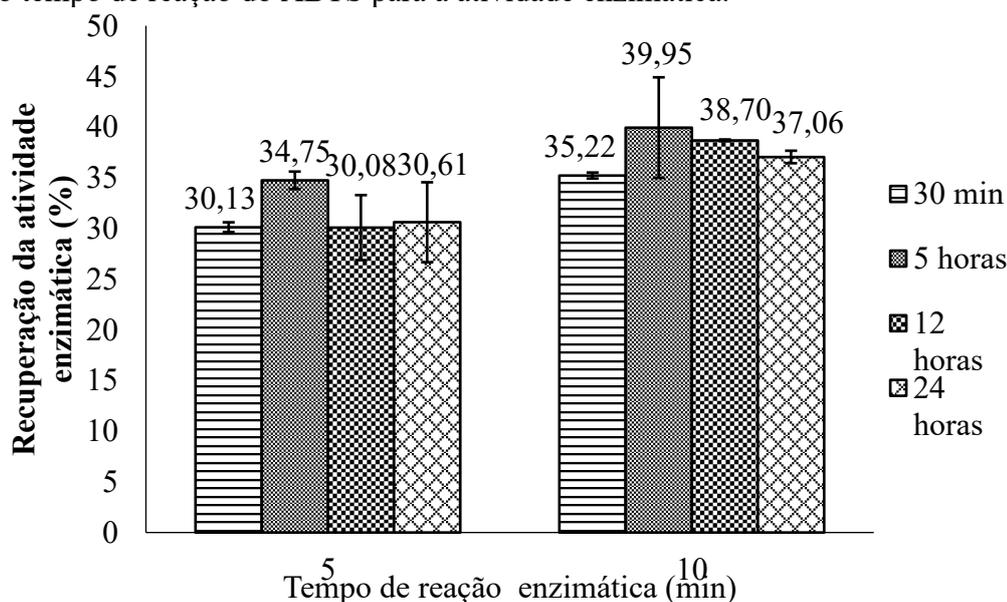
Ao analisar a Figura 20, pode-se inferir que mesmo superficialmente a membrana liofilizada (20A) apresenta fibras que não são visíveis na NCB seca em estufa (20B), o que pode inferir na menor imobilização da lacase. O processo de secagem em estufa pode acarretar no processo de hornificação, que consiste na aglomeração das fibras da celulose devido à atração dessas fibras promovida pelas ligações de hidrogênio em decorrência dos grupos hidroxilas presentes na superfície da celulose.

Esta aglomeração pode ser considerada um processo irreversível ou parcialmente reversível (DINIZ, HIL, CASTRO, 2004; PENG, GARDNER, HAN, 2012; ZIMMERMANN et al., 2016). Quanto ao processo de liofilização, ele já é considerado uma técnica apropriada para a remoção da água sem comprometer a estrutura da nanocelulose bacteriana (ZIMMERMANN et al., 2016). Assim, estas mudanças estruturais podem ser as responsáveis pela diferença da recuperação enzimática após o processo imobilização da lacase na NCB.

5.2.2 DETERMINAÇÃO DO TEMPO PARA A REAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA PELO ABTS DA ENZIMA LIVRE E IMOBILIZADA

A Figura 21 apresenta a influência do tempo de reação de 5 e 10 minutos entre o ABTS e a EI pelo método de adsorção conforme descrito em 5.2, além de verificar a ação do tempo de reação considerando o processo de adsorção para o processo de imobilização.

Figura 21 – Avaliação da influência do tempo no processo de imobilização por adsorção e análise do tempo de reação do ABTS para a atividade enzimática.



Fonte: Autoria Própria (2019).

EI EI: 200 U/L (pH 5). Condições de ensaio para leitura da atividade enzimática: ABTS 10 mM, 40°C, pH 5.

Quanto aos tempos de imersão da NCB na solução de lacase para avaliar qual tempo seria ideal para a etapa de adsorção que ocorre na primeira etapa de imobilização deste estudo, optou-se por um período de 30 minutos. Visto que mesmo com diferença significativa ($p < 0,05$) entre 30 minutos e 5 horas, escolheu-se adotar um menor tempo de imobilização, pois haverá outras etapas objetivando a melhoria do processo de imobilização.

Além de que estudos na literatura também realizaram um tempo de imersão de 30 minutos (CHEN, ZOU, HON, 2015). Para os outros tempos, não se observou diferença significativa ($p < 0,05$) entre os resultados conforme teste estatístico.

Com relação ao tempo de reação e considerando apenas o tempo de 5 minutos, apenas para 30 minutos e 12 horas houve diferenças significativas. Entretanto, mesmo havendo esta diferença, optou-se por cinco minutos para manter o tempo de reação da EL. Além de que se adotou uma adaptação no método de leitura da atividade enzimática em que a amostra com a EI fica sob agitação de forma que toda a membrana fique em contato com a solução.

5.3 OTIMIZAÇÃO DA IMOBILIZAÇÃO DA LACASE EM NCB VIA DELINEAMENTO EXPERIMENTAL DO TIPO BOX-BEHNKEN

Um delineamento experimental do tipo Box-Behnken foi realizado e os dados obtidos foram analisados pelo programa MINITAB[®] referente a ANOVA (gráficos de contorno são apresentados no Anexo A). Os resultados obtidos para a matriz considerando as variáveis independentes e dependente são apresentadas na Tabela 3.

O valor de p (o valor de significância) foi abaixo de 0,05, e, portanto, o modelo apresentou significância. Quanto ao coeficiente de determinação (R^2), este ficou em aproximadamente 0,98. Enquanto ao R^2 ajustado foi acima de 0,9, e, portanto, suportou a validade do modelo.

Tabela 3 – Matrix do delineamento experimental do tipo Box-Behnken em relação aos 15 experimentos realizados com as variáveis independentes com a resposta sendo a recuperação da atividade enzimática, além de apresentar os valores para a taxa de imobilização.

Experimentos	pH	Concentração da enzima (U L ⁻¹)	Concentração de Glutaraldeído (%)	Recuperação da atividade enzimática (%)	Taxa de imobilização (%)
1	4	200	0,500%	35,07%	87,45%
2	4	350	0,125%	28,08%	54,27%
3	4	350	0,875%	18,16%	67,39%
4	4	500	0,500%	21,38%	49,69%
5	6	200	0,500%	48,05%	31,36%
6	6	350	0,125%	27,33%	17,62%
7	6	350	0,875%	13,70%	36,60%
8	6	500	0,500%	19,93%	34,32%
9	5	200	0,125%	52,14%	19,61%
10	5	500	0,125%	32,61%	9,46%
11	5	200	0,875%	38,14%	64,31%
12	5	500	0,875%	25,01%	65,07%
13	5	350	0,500%	56,25%	42,10%
14	5	350	0,500%	52,55%	40,48%
15	5	350	0,500%	54,31%	42,75%

$R^2 = 0,9401$, R^2 (aj) = 0,9123 e $p = 0,001$

Fonte: Autoria Própria (2019).

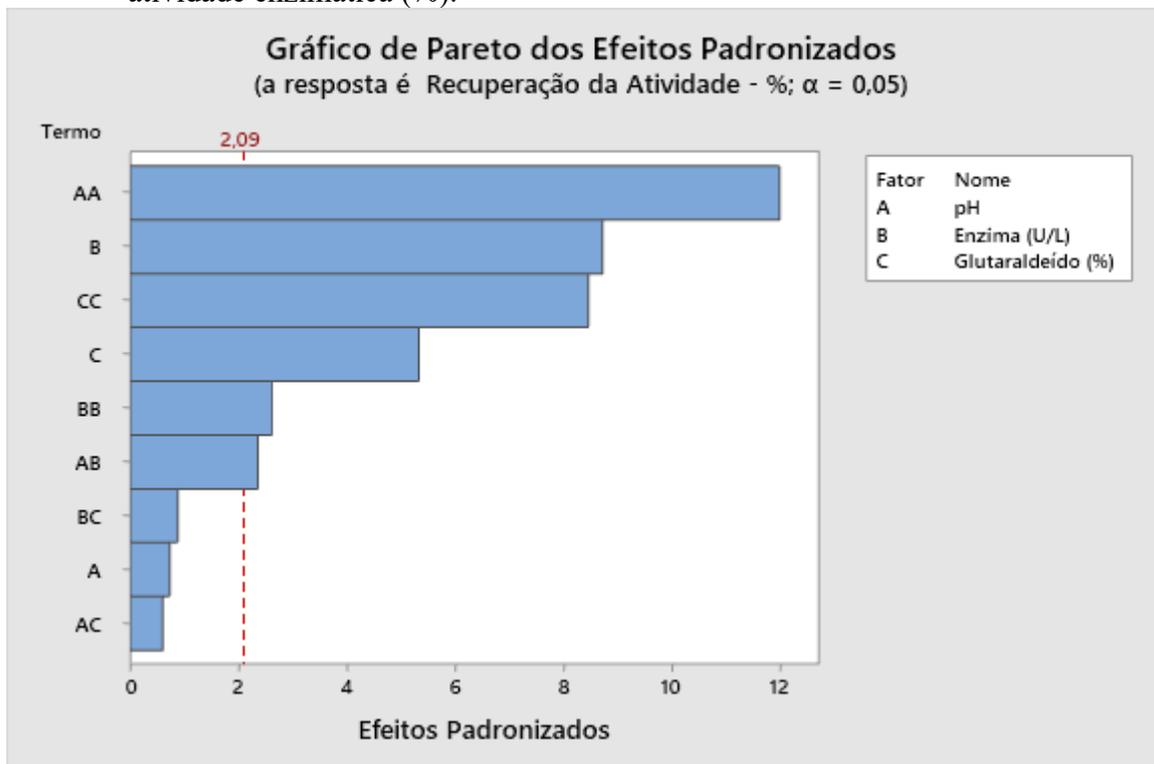
Desta forma, a resposta para a otimização da imobilização apresentou como melhores condições o pH 5, a concentração da enzima em 200 U L⁻¹ e a concentração de glutaraldeído em 0,40% (Anexo A).

Frente aos valores da recuperação da atividade enzimática apresentados pela Tabela 3, em trabalho de Chen, Zou, Hong (2015), ao avaliar a recuperação da atividade enzimática para um processo contendo uma solução de 10 mL de lacase (1000 U L, pH 5) e 2,6 mg de NCB como suporte durante diferentes tempos para a imobilização por adsorção, obteve uma recuperação da atividade enzimática da lacase de 0,4% para meia hora de incubação resultando na atividade da lacase imobilizada em 1,9 U g⁻¹, 0,7% para uma hora de incubação (3 U g⁻¹) e alcançando um máximo de 1,2% após 8 horas (5,1 U g⁻¹). Enquanto em estudo de Frazão et al. (2014), ao imobilizar pelo método de adsorção 0,5 mL lacase em 6 mg de celulose bacteriana, após um delineamento experimental, obteve um valor otimizado da recuperação da atividade enzimática de 49,30%. Com este trabalho, foi possível alcançar aproximadamente 50% de recuperação da atividade enzimática e com a otimização foi possível alcançar 60,84%. Portanto, percebe-se que o processo de imobilização por *cross-linking* aumentou a recuperação da atividade da lacase.

Quanto a taxa de imobilização da enzima na NCB, para o trabalho de Chen, Zou, Hong (2015) observou-se os valores de 27,6%, 28,4% e 34,7% para meia hora, uma hora e 8 horas respectivamente. Conforme a Tabela 3, nota-se que é possível obter valores acima de 50% dependendo da combinação das variáveis independentes. Como a otimização focou na recuperação da atividade enzimática, não foi possível determinar qual seria o melhor valor para a taxa de imobilização.

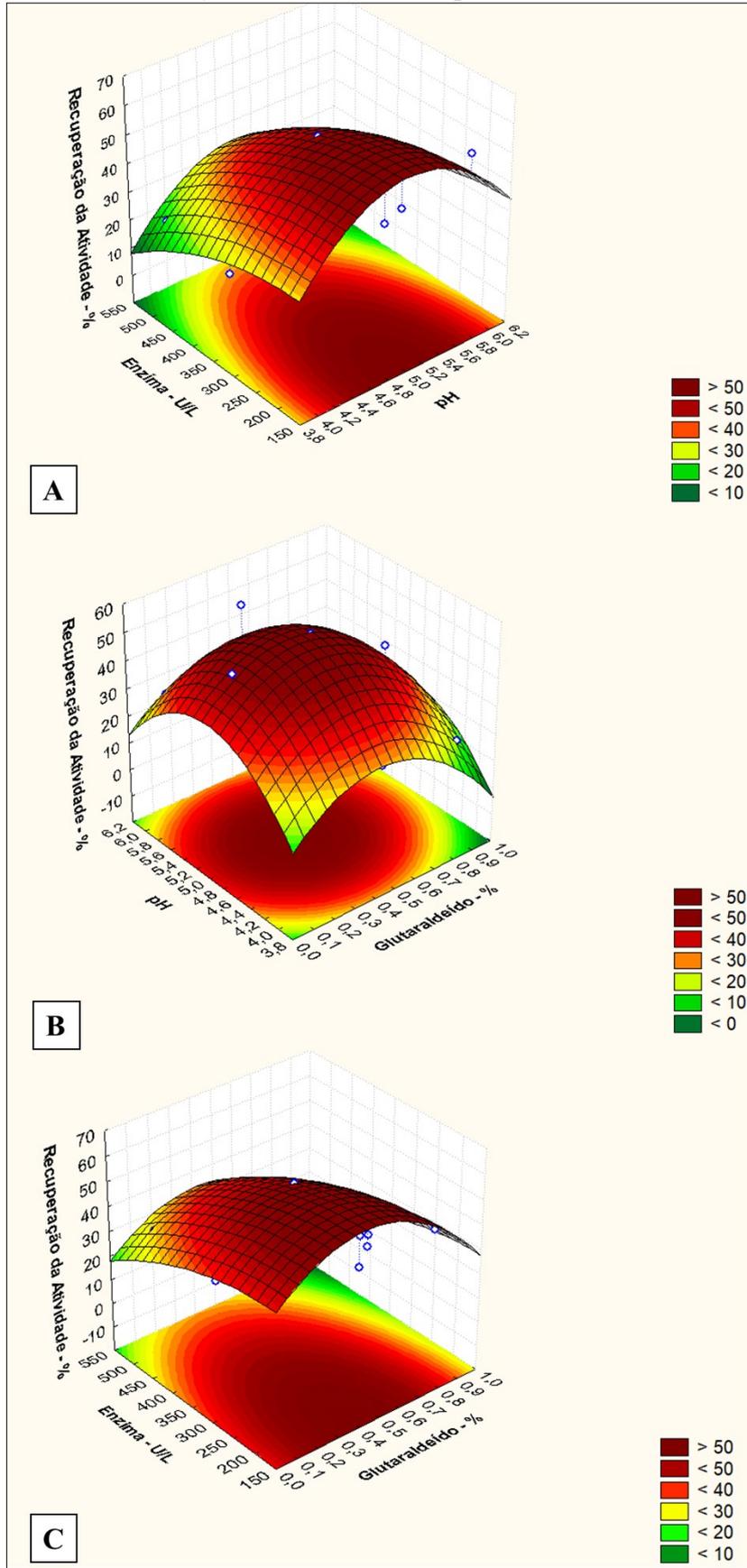
Conforme a Figura 22, o pH (valor quadrático) foi o que mais impactou este processo seguido da concentração da enzima (valor linear). Os gráficos do método superfície de resposta e de contorno são apresentados na Figura 22 (A, B e C).

Figura 22 – Gráfico de Pareto dos efeitos padronizados tendo como resposta a recuperação da atividade enzimática (%).



Fonte: MINITAB® (2019).

Figura 23 – Superfície de resposta e gráfico de contorno quanto a recuperação da atividade enzimática em função das variáveis independentes.



(A) Recuperação da atividade enzimática em função da concentração da enzima e do pH, enquanto a concentração de glutaraldeído foi mantida constante no nível central. (B) Recuperação da atividade enzimática em função do pH e da concentração de glutaraldeído, enquanto a concentração da enzima foi mantida constante no nível central. (C) Recuperação da atividade enzimática em função da concentração de glutaraldeído e da concentração da enzima, enquanto o pH foi mantido constante no nível central.

Fonte: STATISTICA[®] (2019).

Ao analisar a Figura 23A nota-se que a atividade enzimática é sensível às mudanças na concentração da enzima, principalmente com o aumento desta concentração. O pH manteve-se estável, com exceção dos extremos em que se tem uma queda da atividade enzimática. Em relação as duas variáveis, com a diminuição da concentração da enzima e um valor intermediário do pH, obteve-se atividade enzimática mais elevada. Para a concentração da enzima, observa-se a redução da atividade enzimática com o aumento da mesma e isso pode ser devido à saturação dos sítios ativos da enzima. Em relação ao pH, o processo de desnaturação pode vir a ocorrer nos pHs extremos ocorrendo a mudança da conformidade da enzima antes da imobilização (LASSOUANE et al. 2019; TAVARES et al. 2015).

Em relação a Figura 23B, novamente o pH demonstra o mesmo perfil em relação aos valores extremos e a concentração de glutaraldeído segue o mesmo perfil, mostrando que para estas variáveis escolhidas, os valores intermediários influenciam de forma positiva na recuperação da atividade da enzima. Quanto a concentração de glutaraldeído, quando muito baixa, o processo de *cross-linking* pode não ocorrer e se for muito alta pode resultar no fechamento da malha interna e/ou dos poros internos dificultando a imobilização (BROUN, 1976).

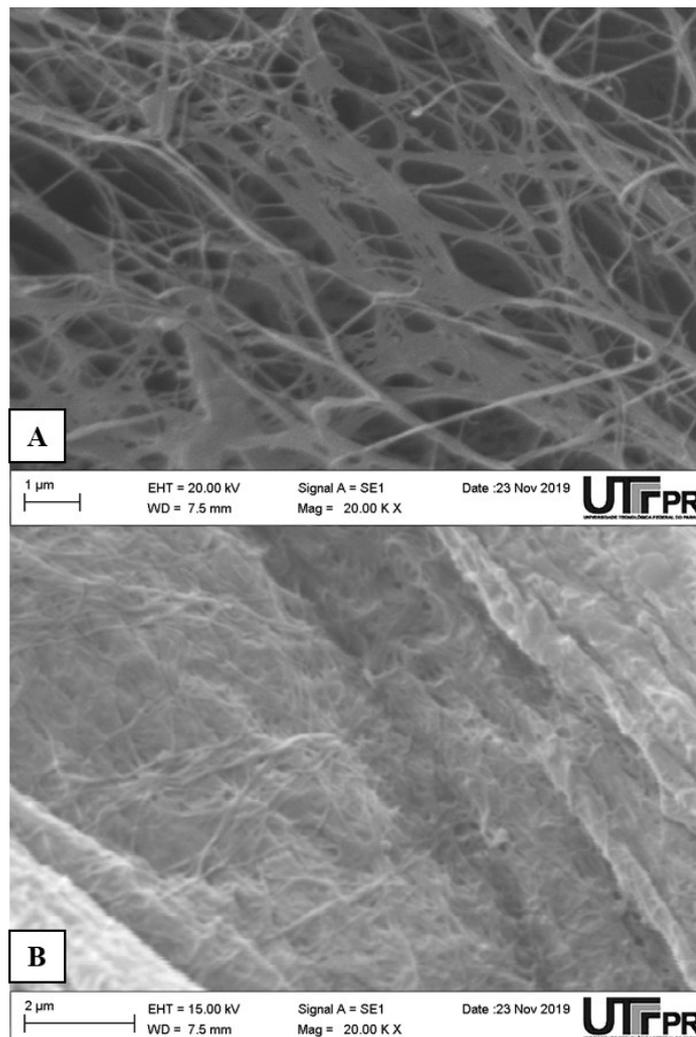
Para a Figura 23C, a concentração da enzima apresenta o mesmo perfil que na Figura 23A, ou seja, quanto menor o seu valor maior a recuperação. Para a concentração de glutaraldeído, os valores intermediários apresentaram a maior atividade. Este comportamento, no que tange a concentração da enzima, pode indicar a limitação da transferência de massa no suporte devido aos obstáculos de difusão interna, visto que o substrato não consegue alcançar o sítio ativo da enzima (FRAZÃO et al. 2014).

5.4 CARACTERIZAÇÃO DA NANOCELULOSE BACTERIANA: LIVRE E IMOBILIZADA

5.4.1 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV) E ESPECTROSCOPIA DE ENERGIA DISPERSIVA (EDS)

A análise por MEV foi realizada para a obtenção de imagens de alta resolução de superfície da NCB pura (Figura 24A) e a NCB com a lacase immobilizada (Figura 24B). Ressalta-se que para estas análises a lacase foi immobilizada pelo método *cross-linking* utilizando os valores otimizados (pH 5, concentração de enzima de 200 U L⁻¹ e concentração de glutaraldeído de 0,40%)

Figura 24 – Microscopia eletrônica de varredura da nanocelulose bacteriana antes (A) e após (B) do processo de imobilização com lacase (aumento de 20.000 vezes).



Fonte: Centro Multiusuário de Caracterização de Materiais da UTFPR (2019).

Ao analisar a Figura 24A, a membrana é composta de uma estrutura tridimensional contendo fibras ultrafinas de celulose com um diâmetro aproximado de 125 nm (Image-J), com diversos espaços livres que proporcionam uma elevada área superficial. Em trabalho de Chen, Zou, Hong (2015), a NCB produzida por *Gluconacetobacter xylinus* apresentou um diâmetro aproximado de 100 nm. Um outro dado obtido pelo programa Image-J foi uma estimativa da área compreendida por poros que ficou em $29,18\% \pm 5,56$. No estudo de Drozd et al. (2018) aplicando o mesmo software, obteve $26\% \pm 1,6$ e $16,1 \pm 0,7$ para NCB produzida por *Komagataeibacter xylinus* com tratamento e sem tratamento por campo magnético rotativo, respectivamente.

Esta área superficial e a porosidade aprisionam a enzima no estado reticulado através dos microcanais além de proporcionarem uma maior área de contato entre as fibras de celulose com as moléculas da enzima (CHEN, ZOU, HONG, 2015).

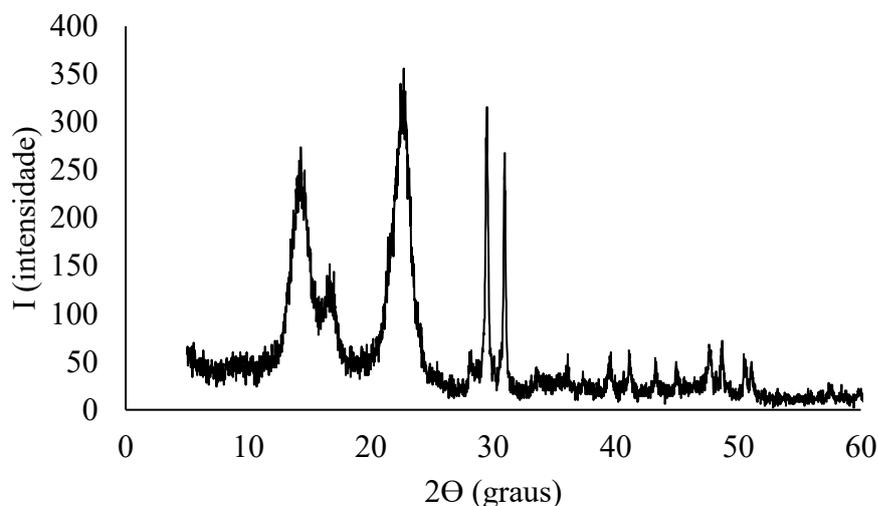
Na Figura 24B, é possível observar um preenchimento dos interstícios da membrana, o que indica que a lacase foi devidamente imobilizada na NCB de forma homogênea. Pode-se inferir também que por ter penetrado nas camadas internas da membrana, a lacase fica menos acessível ao substrato, resultando numa menor atividade enzimática em relação a EL (FRAZÃO et al., 2014).

Quanto a análise elementar referente ao EDS, para a membrana encontrou-se a presença de carbono, oxigênio, sódio, magnésio, alumínio e cálcio em uma proporção de 46,77%, 47,08%, 1,19%, 0,95%, 0,42% e 3,59%, respectivamente. Quanto a EI, os elementos encontrados foram carbono, oxigênio, sódio, alumínio, cloro e cálcio nas seguintes proporções 57,87%, 44,83%, 1,22%, 0,34%, 0,55% e 0,19%, respectivamente. Percebe-se que para ambas as enzimas, a maior presença é de carbono e oxigênio, e a ausência de magnésio para a enzima imobilizada e cloro para a enzima livre.

5.4.2 DIFRAÇÃO DE RAIOS-X

A Figura 25 mostra o comportamento da DRX para a nanocelulose bacteriana em que é possível averiguar algumas características estruturais.

Figura 25 – Difração Raios-X da NCB



Fonte: Centro Multiusuário de Caracterização de Materiais da UTFPR (2019).

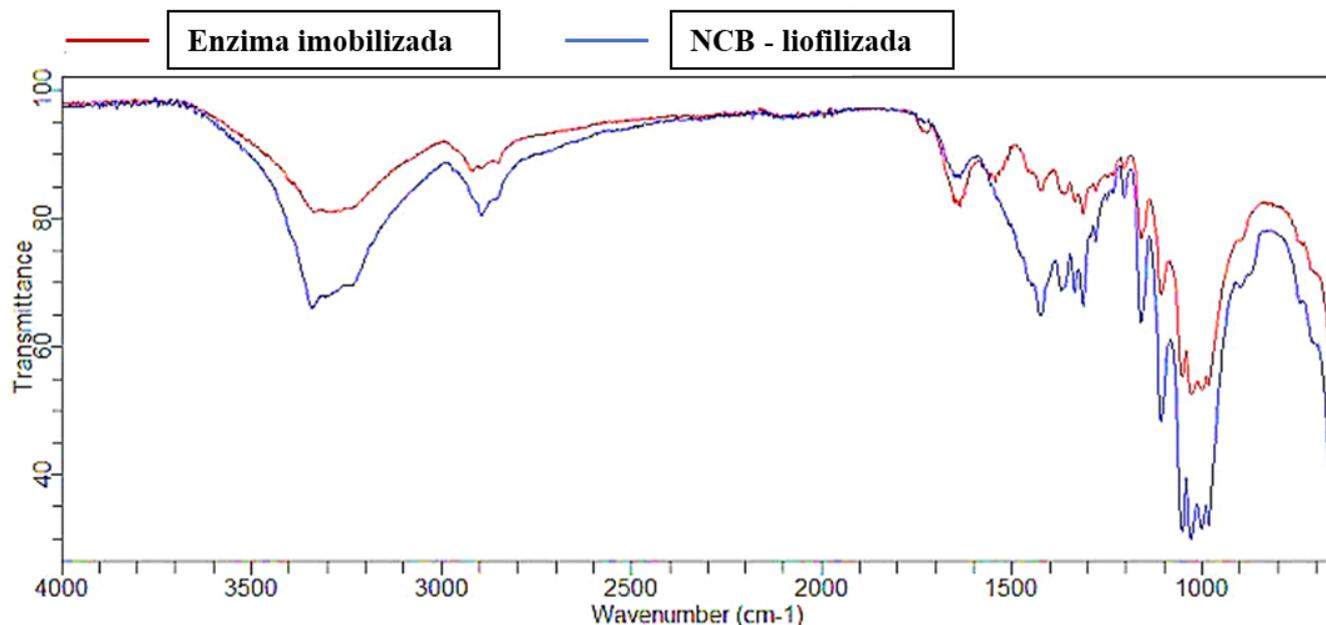
Configurações do experimento: Escaneamento angular em modo contínuo de varredura de 5° a 120° (2 θ) por 2° por minuto, 40 kV e 40 mA.

Ao analisar a Figura 25, observa-se cinco picos em 14,30°, 16,64°, 22,68°, 29,48° e 30,94°. Em trabalho de Chen, Zao, Heng (2015), os picos para a NCB ocorreram em 15°, 16,5° e 22,8°. Estes picos podem ser atribuídos a um típico perfil de celulose tipo I (celulose natural) na forma cristalina (ATALLA, VANDERHART, 1984). Quanto a cristalinidade da celulose, obteve-se um valor de 84,3%, em que valor semelhante ao encontrado no estudo de Chen, Zao, Heng (2015), o qual alcançou um valor de 86,9%. Ressalta-se que a intenção desta técnica é poder avaliar a forma do material entre amorfa ou cristalina. A cristalinidade está relacionada com o ordenamento de moléculas ou grupo de moléculas da estrutura analisada (NASCIMENTO et al., 2014).

5.4.3 ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR) COM MODO DE REFLEXÃO TOTAL ATENUADA (ATR):

A espectroscopia no ATR-FTIR da NCB (pura) e lacase immobilizada em NCB é apresentada na Figura 26. A importância desta técnica é poder analisar os grupos funcionais presentes nos materiais analisados e em posse dessa informação é possível entender certos mecanismos, como o de adsorção (NASCIMENTO et al., 2014).

Figura 26 – Espectroscopia ATR-FTIR da NCB e da EI em nanocelulose bacteriana.



Fonte: Laboratório da empresa Vegoor – Tecnologia Aplicada (2019).

Conforme observado na Figura 26, foi possível identificar uma banda forte entre 3400 e 3200 cm^{-1} , a qual correspondem à região de estiramento axial e indicam a presença do grupo -OH de álcool ou fenol, -NH (amida primária) e C-H (LOPES, FASCIO, 2004). Ressalta-se que a absorção na faixa de 3240 cm^{-1} pode inferir que a celulose I cristalina seja dominante na amostra de NCB analisada, em consonância com os dados apresentados pelo DRX (SAMPAIO et al., 2016).

Outras bandas fortes foram detectadas entre 2900 e 2800 cm^{-1} e podem ser relacionadas a vibrações assimétricas de estiramento da ligação -CH do grupo de aldeídos. Quanto aos picos entre 1400 e 1200 cm^{-1} , estes estão relacionados com as vibrações deformacionais de -CH₃ e -OH, respectivamente. As bandas fortes entre 1100 e 1000 estão atribuídas as vibrações de C-O em celulose, hemicelulose e lignina ou C-O-C em celulose e hemicelulose. Esses picos não são tão visíveis para a EI, demonstrando a interferência da enzima após o processo de imobilização. Para a EI, observa-se o que há um pico maior do que para a NCB na banda a 1600 cm^{-1} e há um pequeno pico na banda a 1700 cm^{-1} que pode estar relacionado com a ligação C=O, relacionado a bandas grupos de aldeídos e de cetona. (FRAZÃO et. al, 2014; LOPES, FASCIO, 2004; SAMPAIO et al., 2016; SASKA et al., 2012).

De forma geral, pode-se correlacionar os grupos de aldeídos presentes na NCB (pico apresentado na região entre 2900 e 2800 cm^{-1}) como sítios ativos para o grupo as amins

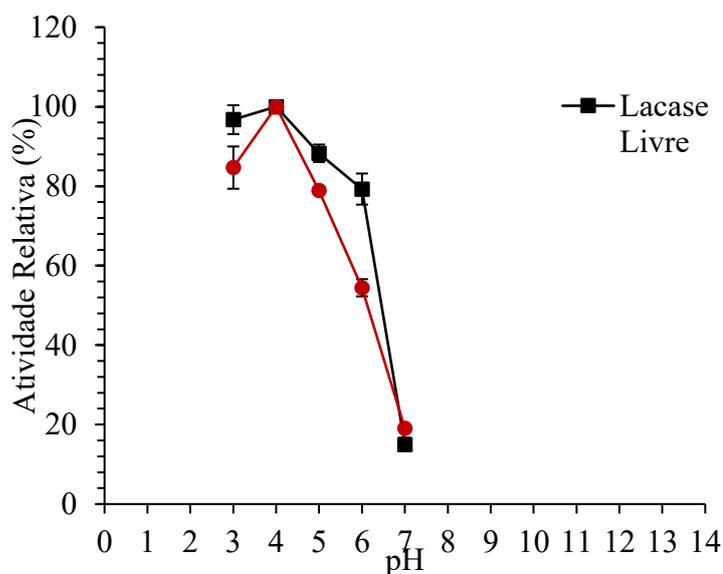
primárias da lacase (pico entre a região entre 1640 a 156 cm^{-1}), podendo ser um indicador da ligação covalente causada pelo processo de *cross-linking* (SATHISHKUMAR et al. 2014).

5.5 AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO pH E DA TEMPERATURA NA ATIVIDADE ENZIMÁTICA

5.5.1 pH ÓTIMO

A Figura 27 apresenta o efeito do pH na lacase livre e imobilizada utilizando como substrato o ABTS para a leitura da atividade enzimática. Analisou-se uma faixa entre 3 a 7 do pH.

Figura 27 – Efeito de diferentes pHs na atividade enzimática tanto da lacase livre quanto imobilizada. – pH ótimo.



Fonte: Autoria Própria (2019).

EL: 200 U L^{-1} (pH 5) e EI: 200 U L^{-1} imobilizada em 0,40% de glutaraldeído (pH 5). Condições de reação: ABTS 10 mM - 5 minutos para a reação.

Para a EI, houve um decaimento de 46% e de 81% do pH 4 para o pH 6 e pH 7 respectivamente conforme observado na Figura 26. Desta forma, pode-se inferir a influência do pH na condição ótima da atividade enzimática para a lacase imobilizada.

Para a EI, todos os valores apresentaram diferença estatística ($p < 0,05$). Quanto as diferenças entre os pHs da enzima livre e imobilizada, com exceção do pH 7, todos os outros valores apresentaram diferença.

Para a EL, após o pH 4 tem-se um decaimento da atividade enzimática, ficando a atividade relativa em 79% para o pH 6 e em 15% para o pH 7. É importante salientar que o pH

3 e pH 4 não apresentaram diferença estatística ($p < 0,05$), entretanto, de forma a manter o pH para a enzima livre e imobilizada, optou-se nos ensaios seguintes pelo pH 4.

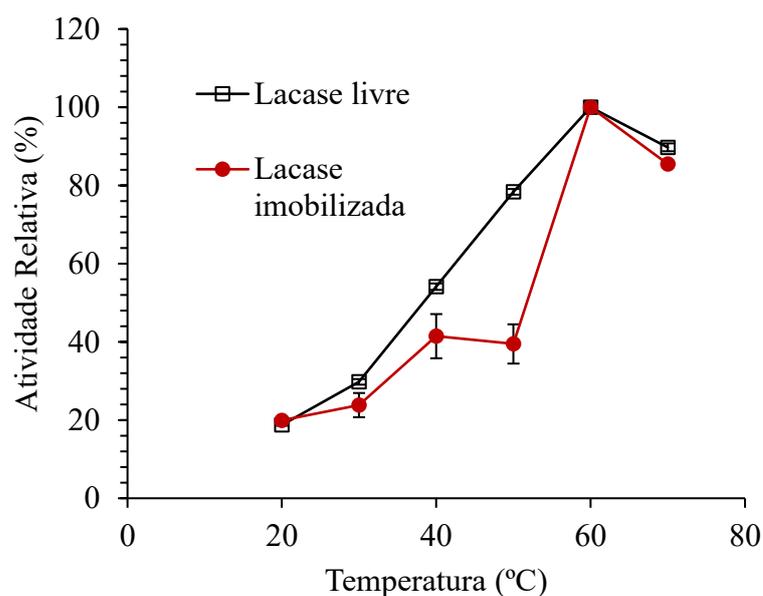
Em trabalho de Chen, Zou, Hong (2015), em que se avaliou as condições ótimas na faixa de pH 3 a 6, observou-se que para a EL a melhor condição foi pH 3 e para a lacase imobilizada só por adsorção foi pH 3,5, e para lacase imobilizada por adsorção/*cross-linking* foi pH 4,5. Mesmo comportamento é apresentado por Drozd et al. (2018), em que para a lacase livre a melhor condição foi pH 3 e para a lacase imobilizada foi pH 4.

O comportamento da lacase quanto ao pH tende a ser de acordo com o substrato a ser utilizado. Por exemplo, ao utilizar substratos não fenólicos como o ABTS, a atividade da lacase de *Trametes versicolor* aumentou com a redução do pH até 3 conforme apresentado por Chen, Zou, Hong (2015). No trabalho de Sampaio et al. (2016), avaliou-se a influência de um composto fenólico, o catecol, além do ABTS e observou-se uma mudança na condição ótima em que para o catecol foi em pH 7 e para o ABTS foi em pH 3.

5.5.2 TEMPERATURA ÓTIMA

A Figura 28 mostra a influência da temperatura na lacase livre e imobilizada utilizando o ABTS como substrato.

Figura 28 – Efeito de diferentes temperaturas na atividade enzimática da lacase livre e imobilizada em NCB.



Fonte: Autoria Própria (2019).

EL: 200 U L⁻¹ (pH 5) e EI: 200 U L⁻¹ imobilizada em 0,40% de glutaraldeído (pH 5). Condições de reação: ABTS 10 mM - 5 minutos para a reação.

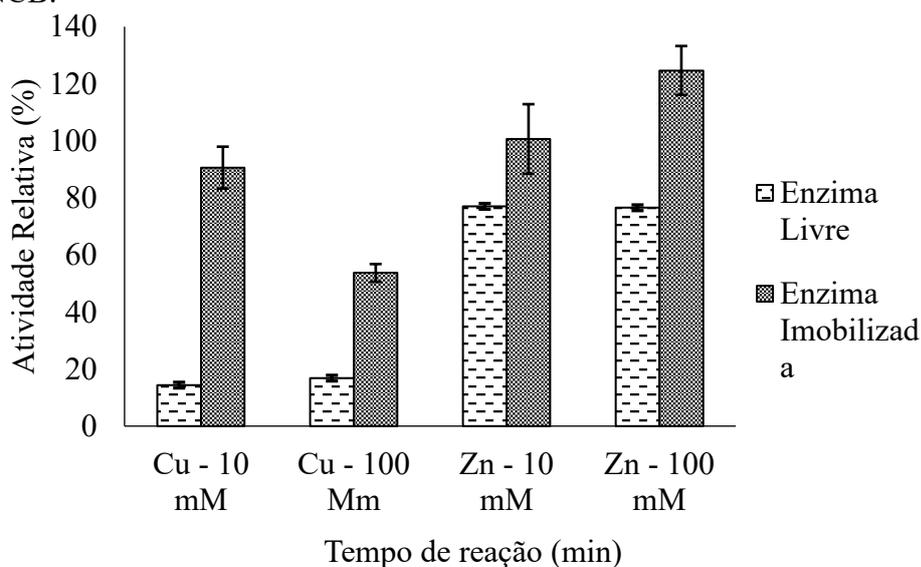
Como pode ser mostrado na Figura 28, a temperatura ótima foi de 60°C para ambas lacases (diferença estatística - $p < 0,05$). A 70°C, a atividade relativa manteve aproximadamente acima de 80% da atividade relativa. As mudanças no perfil da atividade da EI podem ser explicadas pelo fato de que, após o processo de *cross-linking*, a formação da ligação por grupos aminos da lacase imobilizada e grupos hidroxilas da nanocelulose poderá reduzir a flexibilidade conformacional e podendo resultar em uma maior energia de ativação para a molécula da enzima para reorganizar a conformação adequada para a ligação com o substrato (ARICA, ALTINTAS, BAYRAMOGLU, 2009; CHEN, ZOU, HONG, 2015).

Chen, Zou, Hong (2015), reportou que para a lacase livre a maior atividade relativa foi para 50°C e tanto a lacase imobilizada por *cross-linking* e adsorção apresentaram a maior atividade para 60°C. Em estudo de Drozd et al. (2018), a lacase imobilizada em celulose bacteriana também apresentou a maior atividade para 60°C.

5.6 INFLUÊNCIA DE METAIS NA LACASE LIVRE E IMOBILIZADA

A Figura 29 retrata o comportamento da lacase, tanto livre quanto imobilizada, frente a dois tipos metais nas concentrações de 10 e 100 mM. Estas concentrações foram escolhidas para verificar o comportamento da lacase em concentrações distintas.

Figura 29 – Efeito do cobre e do zinco na atividade enzimática da lacase livre e imobilizada em NCB.



Fonte: Autoria Própria (2019).

EL: 200 U L⁻¹ (pH 5) e EI: 200 U L⁻¹ imobilizada em 0,40% de glutaraldeído (pH 5). Condições de reação: ABTS 10 mM - 5 minutos para a reação.

Ao avaliar a influência do cobre, observa-se um impacto negativo na atividade da EL com redução de aproximadamente 80% para ambas as concentrações. Para a EI, o efeito negativo do cobre não foi marcante para 10 mM, visto que a atividade ficou em 90,60%. Para a concentração de 100 mM, a redução foi de aproximadamente 50%. Em trabalho de Hernández-Monjaraz et al. (2018), tais autores avaliaram a influência de cobre (25 μ M) na atividade enzimática da lacase tanto na fração intra e extracelular. Observou-se uma redução da atividade enzimática em aproximadamente 80% em relação ao controle para a fração extracelular, isso pode ocorrer pelo fato de cobre vir a realizar a ligação de resíduos de aminoácido aromáticos nas moléculas de enzima além de causar danos nas proteínas devido ao estresse oxidativo (BALDRIAN et al., 2003; STOHS, BAGCHI et al. 1995).

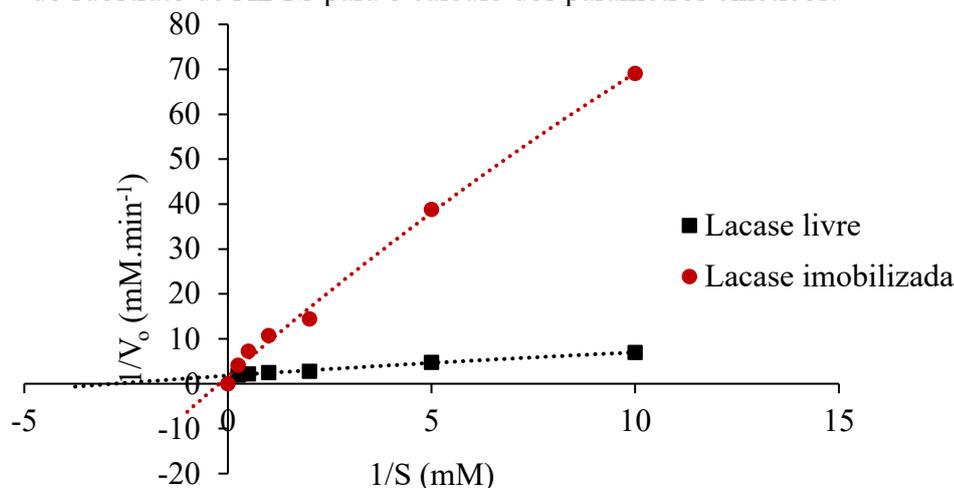
Quanto ao Zinco, a EL sofreu uma redução de sua atividade em aproximadamente 30% para ambas as concentrações. Enquanto para a EI, os valores ficaram superiores ao máximo sendo que para a concentração de 100 mM, a atividade chegou em 126%. No trabalho de Zhou et al. (2017), um comportamento similar foi observado para a lacase imobilizada em DEAE (Dietilaminoetil) celulose. Uma explicação para isso poderia ser pelo fato da lacase ser induzida por certas condições de estresse (BALDRIAN et al., 2005).

Os metais são elementos traços essenciais para o metabolismo dos fungos, como o cádmio, zinco e manganês para o fungo *Phanerochaete chrysosporium* (podridão branca), entretanto, a concentrações altas podem vir a serem tóxicos conforme foi visto com o cobre em que mesmo em concentrações baixas apresentou ação inibidora para o trabalho de Hernández-Monjaraz et al. (2018).

5.7 PARÂMETROS CINÉTICOS

A Figura 30 é referente ao gráfico do gráfico de Lineweaver-Burk para se obter as constantes de Michaelis-Menten (K_m) e a velocidade máxima.

Figura 30 – Gráfico de Lineweaver-Burk com o gráfico do inverso da velocidade pelo inverso do substrato de ABTS para o cálculo dos parâmetros cinéticos.



Fonte: Autoria Própria (2019).

EL: 200 U L⁻¹ (pH 5) e EI: 200 U L⁻¹ imobilizada em 0,40% de glutaraldeído (pH 5). Condições de reação: ABTS 10 mM - 5 minutos para a reação.

A constante de Michaelis-Menten mostra a afinidade da enzima com um determinado substrato. Assim, quanto menor o valor desta constante, maior é a afinidade da enzima com o substrato (ABTS).

Conforme apresentado na Tabela 4, a EL apresentou um menor valor do que para a EI, o que indica que a forma livre possui uma maior afinidade pelo ABTS em relação à lacase imobilizada. Em trabalho de Yuan et al. (2014), o mesmo comportamento foi relatado para as quatro espécies de NCBs estudadas na imobilização de lacase.

Tabela 4 – Valores dos parâmetros K_M e $V_{m\acute{a}x}$ referente a cinética da enzima livre e imobilizada.

Enzima	K_M (mM)	$V_{m\acute{a}x}$ (mM.min ⁻¹)	$K_M/V_{m\acute{a}x}$
Livre	0,27	0,54	0,50
Imobilizada	2,93	0,44	6,66

Fonte: Autoria Própria (2019).

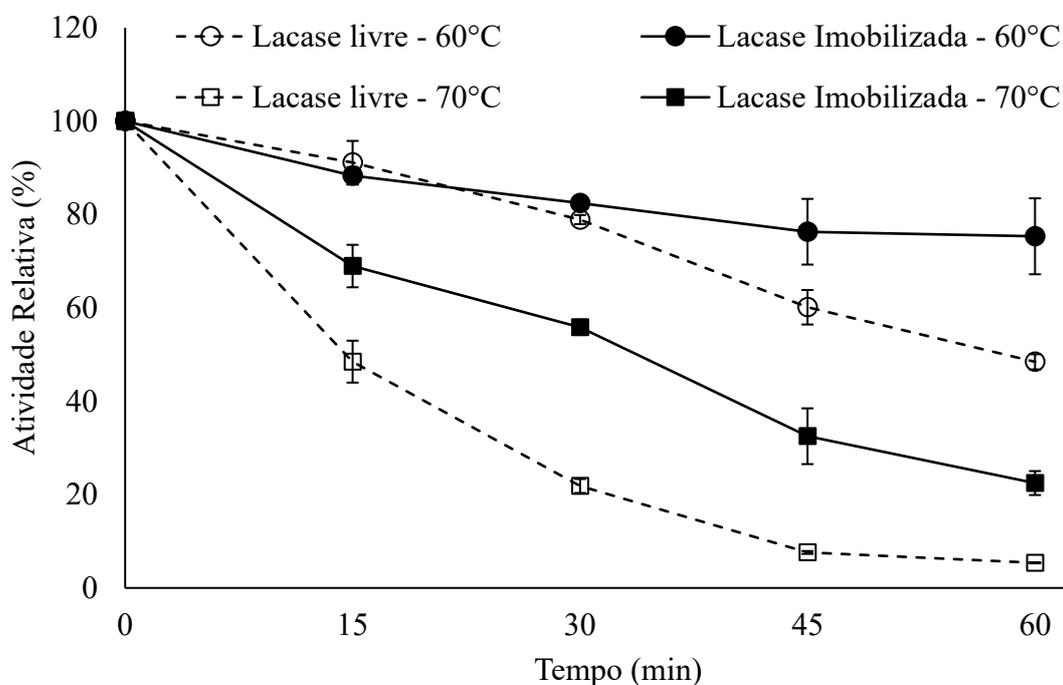
Quanto a $V_{m\acute{a}x}$, a EI apresentou uma velocidade de 0,44 mM.min⁻¹, enquanto, a EL apresentou uma velocidade de 0,54 mM.min⁻¹. A redução da velocidade também ocorreu em outros trabalhos, como, o de Yuan et al. (2014) em que se teve a redução da velocidade para a lacase imobilizada para as quatro espécies estudadas frente a EL. Esta redução da afinidade da enzima pelo substrato pode ser devido às limitações de difusão, redução da flexibilidade da enzima e diminuição do acesso do substrato ao sítio ativo da enzima além das mudanças que possivelmente ocorreram na estrutura tridimensional da lacase após a imobilização (TAVARES et al., 2015). Isso pode ser visualizado pela perda de eficiência catalítica apresentada pela relação entre K_M e $V_{m\acute{a}x}$ em que se tem um aumento de aproximadamente 13 vezes.

Por fim, o aumento do K_M e a redução da $V_{m\acute{a}x}$ após o processo de imobilização pode ser devido aos impedimentos de chegar ao sítio ativo da enzima causada pelo suporte por causa de problemas de acessibilidade ou limitação de difusão do substrato causado pelo suporte.

5.8 ESTABILIDADE TÉRMICA

A Figura 31 se refere ao comportamento da estabilidade térmica da enzima livre e imobilizada incubadas na temperatura de 60 °C e 70 °C durante uma hora com amostragens cada 15 minutos.

Figura 31 – Termoestabilidade da enzima lacase em diferentes temperaturas.



Fonte: Autoria Própria (2019).

EL: 200 U L⁻¹ (pH 5) e EI: 200 U L⁻¹ imobilizada em 0,40% de glutaraldeído (pH 5). Condições de reação: ABTS 10 mM, pH 4, 5 minutos para a reação. Lacase livre, 60°C R² = 0,9918 (○); Lacase Imobilizada, 60°C R² = 0,9918 (□); Lacase livre, 70°C R² = 0,9918 (●); Lacase Imobilizada, 70°C R² = 0,9918 (■).

Verificou-se que a EI possui uma maior estabilidade nas duas temperaturas analisadas. Para 60°C, após uma hora, a lacase imobilizada manteve a atividade relativa em aproximadamente 70% da atividade enzimática inicial enquanto a EL permanece com 48,45%. Quanto a 70°C, a lacase livre manteve a atividade em 5,38% e a imobilizada em 22,47% após uma hora.

De forma geral, nas temperaturas analisadas, a EI reteve mais da atividade original quando comparada com a lacase livre, inferindo então que a lacase imobilizada foi mais estável sob altas temperaturas. Ressalta-se que as diferenças a 60 minutos foram significativamente diferentes entre a enzima livre e imobilizada para ambas as temperaturas. Assim, este aumento da estabilidade térmica para a EI é um indicativo interessante para a utilização da forma imobilizada em processos que exigem condições reacionais com temperaturas mais elevadas.

Em trabalhos na literatura, o mesmo comportamento foi observado em um estudo de Yuan et al. (2018). Neste, após uma hora a 70°C, a lacase livre (*Coriolus versicolor*) reteve aproximadamente 50% da atividade relativa inicial enquanto as lacases imobilizadas (em NCB de quatro espécies diferentes) mantiveram a atividade relativa em cerca de 70%.

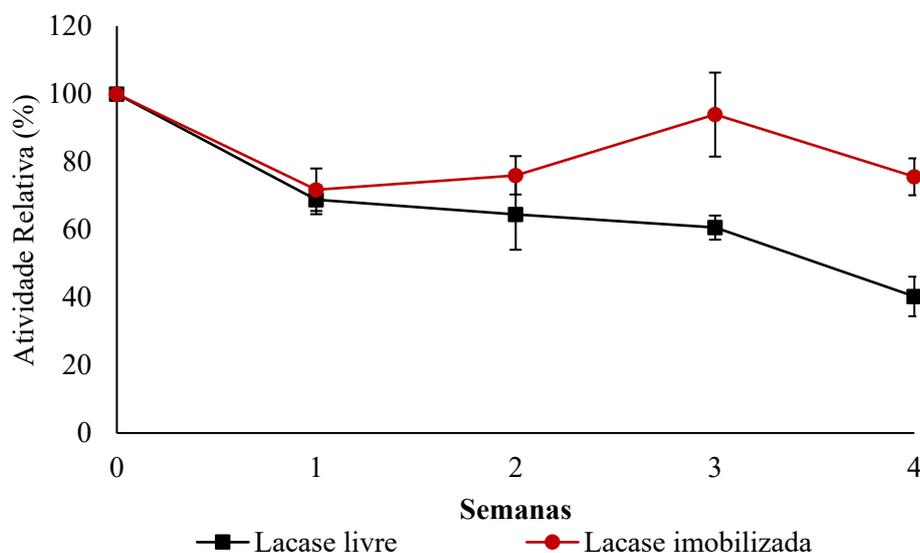
No trabalho de Frazão et al. (2014), a EI reteve uma atividade relativa de 42% enquanto a livre manteve 21% após período de 5,3 horas para 60°C. Para a temperatura de 70°C, tanto a EI e a livre foram inativadas após 2 horas e 1,2 horas respectivamente.

A perda da atividade enzimática ao longo tempo sob temperaturas elevadas pode estar relacionada com a inativação da mesma por um aumento da vibração dos átomos da proteína em altas temperaturas em que poderá romper as ligações químicas resultando em mudanças drásticas na estrutura tridimensional da enzima além da perda da capacidade catalítica (TAVARES et al., 2015). Outra razão para que a lacase imobilizada manteve maior atividade é que após a imobilização ocorre uma restrição da mobilidade das moléculas da enzima resultando em uma maior estabilidade para a lacase e dificultando o processo de inativação (FRAZÃO, 2018).

5.9 ESTABILIDADE AO ARMAZENAMENTO DA ENZIMA LIVRE E IMOBILIZADA

A Figura 32 retrata o comportamento da enzima livre e imobilizada quanto ao armazenamento das mesmas durante um período de quatro semanas com análises que foram realizadas a cada semana.

Figura 32 – Estabilidade a estocagem da enzima lacase após imobilização.



Fonte: Autoria Própria (2019).

EL: 200 U L⁻¹ (pH 5) e EI: 200 U L⁻¹ imobilizada em 0,40% de glutaraldeído (pH 5). Condições de reação: ABTS 10 mM, pH 4, 5 minutos para a reação.

Constatou-se que a EI permaneceu com a atividade relativa entre 90 e 70% em comparação com a EL, a qual teve seu decaimento após a segunda semana chegando a uma atividade relativa final em 40%.

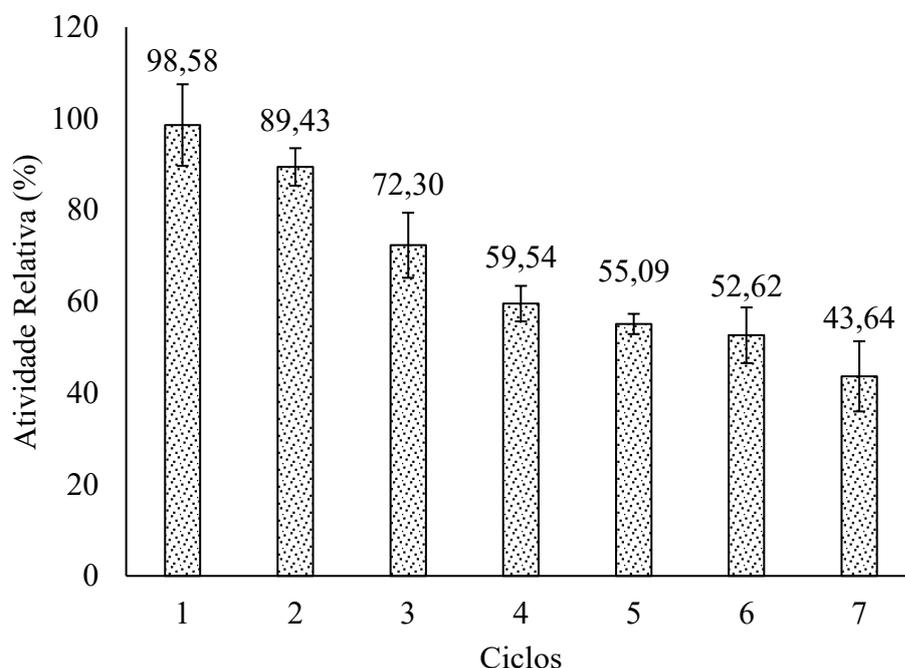
Em trabalho de Arica et al. (2009), a lacase livre não apresentou atividade após seis semanas, ao passo que a lacase imobilizada em esferas de poli (GMA/EGDMA) manteve 52% da atividade enzimática inicial durante o mesmo período. No trabalho de Frazão et al. (2014), a lacase imobilizada em NCB manteve a atividade em 78% e 54% após 7 e 42 dias de armazenamento respectivamente. Em ambos estudos, a enzima foi mantida a 4°C.

Ao considerar os resultados deste trabalho e os apresentados pela literatura, a EI apresenta estabilidade satisfatória quando estocada em baixas temperaturas.

5.10 ESTUDO DO REUSO DA LACASE IMOBILIZADA

Para avaliar o reuso da EI, sete ciclos seguidos foram realizados utilizando o ABTS como substrato e a Figura 33 ilustra estes ciclos.

Figura 33 – Reuso da enzima imobilizada durante 7 ciclos seguidos utilizando o ABTS como substrato.



Fonte: Autoria Própria (2019).

EL: 200 U L⁻¹ (pH 5) e EI: 200 U L⁻¹ imobilizada em 0,40% de glutaraldeído (pH 5). Condições de reação: ABTS 10 mM, pH 4, 5 minutos para a reação. R² = 0,9816.

Em relação ao reuso da EI, observa-se a redução da atividade a cada ciclo conforme apresentado pela Figura 33. Sathishkumar et al. (2014) mostraram em seu trabalho que a lacase imobilizada em nanofibra de celulose manteve a atividade relativa em 67% após 10 ciclos utilizando o ABTS como substrato.

Fração et al. (2014) apresentaram em seu estudo que a lacase imobilizada em celulose bacteriana reteve 97% e 86% da sua atividade inicial após 5 e 7 ciclos respectivamente. Ao comparar estes resultados, percebe-se a eficiência da lacase imobilizada ao ser reutilizada e isto é um resultado promissor para aplicações práticas (FRAZÃO et al., 2014). Além de que o quinto, sexto e o sétimo ciclo não apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$) demonstrando o potencial da EI para mais ciclos subsequentes.

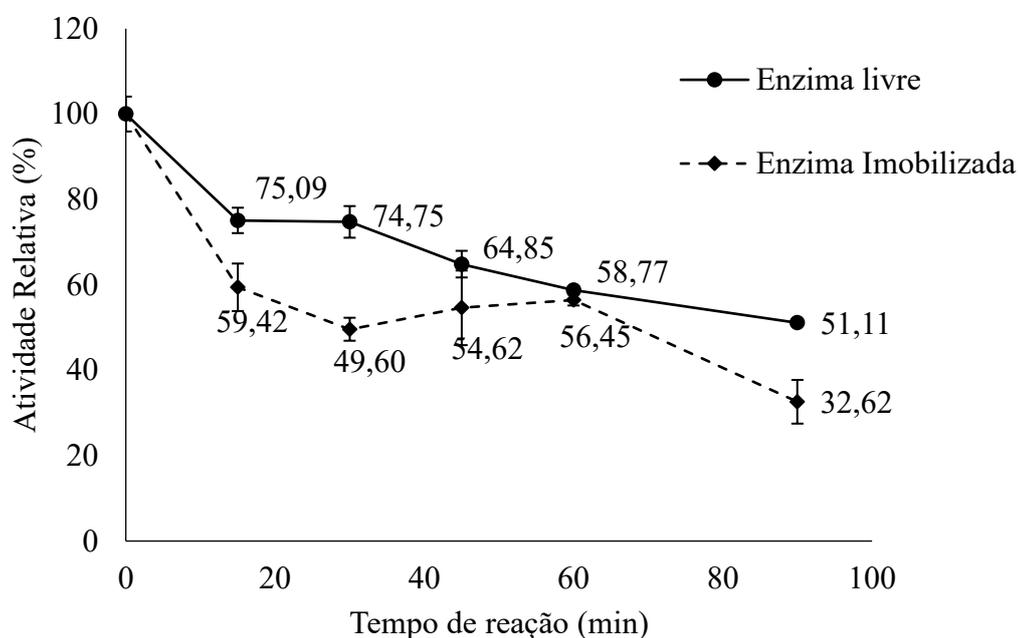
Quanto a perda da atividade a cada ciclo, isto pode ser devido a inativação progressiva da enzima pelo o seu uso contínuo e possível lixiviação enzimática (SATHISHKUMAR et al., 2014). Além disso, o grau de porosidade da membrana pode ser um fator significativo que pode afetar a capacidade deste material em se ligar com as moléculas da enzima e, assim, comprometer em algum nível o processo de reuso (DROZD et al., 2018).

5.11 APLICAÇÕES DA LACASE IMOBILIZADA EM NANOCELULOSE BACTERIANA NA BIOTRANSFORMAÇÃO DE FENÓLICOS

5.11.1 BIOTRANSFORMAÇÃO DO CATECOL: ATUAÇÃO COMO BIOSSENSOR

De forma a avaliar a habilidade da lacase immobilizada na biotransformação do catecol como forma de se tornar um detector deste composto, um ensaio durante o período de 90 minutos foi realizado conforme apresentado na Figura 34.

Figura 34 – Biotransformação do catecol por lacase livre e immobilizada.



Fonte: Autoria Própria (2019).

EL: 200 U L⁻¹ (pH 5) e EI: 200 U L⁻¹ immobilizada em 0,40% de glutaraldeído (pH 5). Condições de reação: Catecol 10 mM, pH 7.

Foi possível analisar que a atividade relativa da EL apresentou um declínio menor na presença do catecol após os 90 minutos em relação a EI. Com estes dados é possível determinar que ainda há a presença do catecol que reagiu com a enzima durante todo o processo, o que pode resultar em um futuro biossensor para este composto. Uma outra análise é que a EI apresentou uma atividade relativa menor pela menor acessibilidade do substrato a enzima. Mohammadi et al. (2018) avaliaram a eficiência de remoção do catecol por um outro método que após duas horas alcançou uma eficiência de 100% na remoção.

Figura 35 – Amostras da NCB como detector da presença do catecol após o processo de biotransformação do mesmo pela lacase imobilizada.



Fonte: Autoria Própria (2019).

Estes resultados demonstraram o potencial da lacase imobilizada ao ser aplicada como biossensor para o catecol, seja pela sua remoção ou biotransformação. Para um resultado mais detalhado, é necessária uma análise cromatográfica avaliando se houve remoção ou biotransformação do catecol.

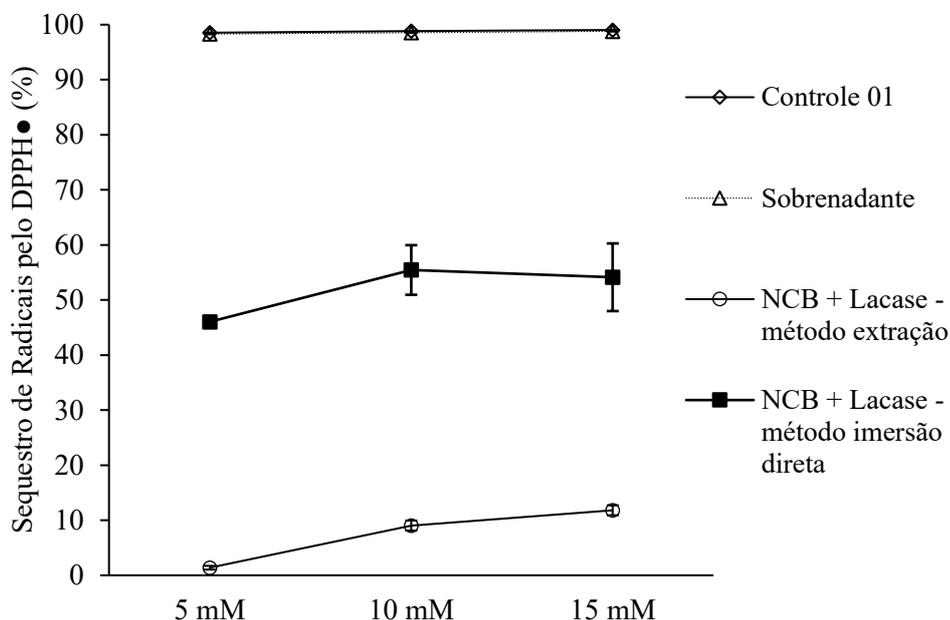
É importante ressaltar que os biossensores servem como um equipamento do meio analítico com a função de detectar e/ou quantificar diversos compostos biológicos e químicos. Estes podem ser elétricos, químicos, óticos ou mecânicos. A utilização dos biossensores enzimáticos é interessante devido à alta especificidade, sensibilidade, resposta rápida, baixo custo, tamanho compacto, fácil operação e serem um aparato de monitoramento (SIRISHA, JAIN, JAIN, 2016).

5.11.2 PREPARO DA NCB COM PROPRIEDADES ANTIOXIDANTES: EFEITO DA LACASE IMOBILIZADA NA PRESENÇA DE ÁCIDO FERÚLICO

Avaliaram-se certos resultados provenientes do processo lacase-mediadora com o ácido ferúlico, como, atribuição da atividade antioxidante do ácido ferúlico a NCB pela lacase além da possibilidade do processo de biocoloração. Desta forma, as Figuras 35 e 36 apresentam os testes por DPPH e FRAP de forma a avaliar a influência da lacase na atividade antioxidante do ácido ferúlico. Enquanto a Figura 37 é referente aos fenóis totais.

5.11.2.1 DPPH

Figura 36 – Avaliação da atividade antioxidante pela metodologia DPPH.



Fonte: Autorial Própria (2019).

Primeiramente, quanto ao controle 02, os valores ficaram abaixo do detectável pela curva padrão. Quanto ao método de extração, apenas é apresentado pelo metanol visto que pela extração com solução salina também apresentarem resultados abaixo do detectável. Ressalta-se que o mesmo comportamento foi observado pelo método FRAP.

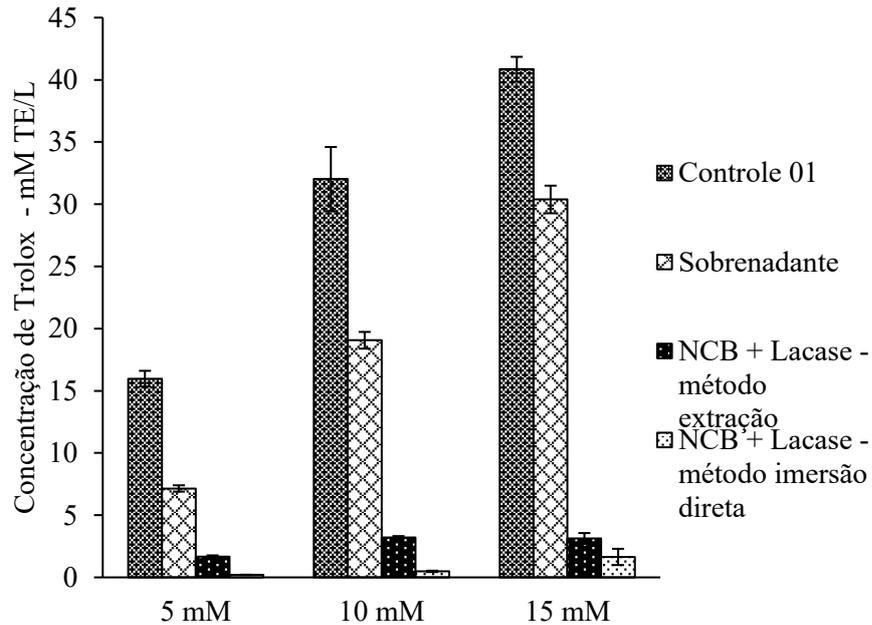
O ácido ferúlico e o sobrenadante exibiram atividade antioxidante em torno de 98% para todas as concentrações analisadas, ao passo que para a lacase imobilizada, a mesma reteve uma atividade antioxidante em torno de 50% (método por imersão direta) e, em contraste, pelo método de extração, a atividade ficou em torno de 1%, 9% e 11% para as concentrações 5, 10 e 15 mM, respectivamente. Percebe-se então a influência do método a ser utilizado para detectar a atividade antioxidante pelo método de DPPH.

Quanto a redução da atividade antioxidante, em estudo de Adalakun et al. (2012), sugeriu que a redução pode ser pela oxidação do ácido ferúlico a β - β dímero e há perda dos grupos carboxílicos e das ligações insaturadas C-C no processo de dimerização. Além de que a atividade antioxidante de compostos fenólicos é dependente de diversas características estruturais, como a energia dissociativa da ligação O-H. Entretanto, mesmo com esta redução, estes resultados indicam o potencial da lacase imobilizada em NCB na ligação de ácido ferúlico e modificação do polímero em um produto com potencial antioxidante.

5.11.2.2 FRAP

O método FRAP possibilita uma avaliação direta da atividade antioxidante ao se basear na rápida redução do ferro Fe III-TPTZ por antioxidantes presentes nas amostras formando o Fe II-TPTZ, um produto de coloração azulada (BENZIE, STRAIN, 1996).

Figura 37 – Avaliação da atividade antioxidante pela metodologia FRAP.



Fonte: Autoria Própria (2019).

A Figura 37 apresenta os dados da atividade antioxidante em relação ao teste FRAP e é possível perceber comportamento semelhante para as diferentes concentrações de ácido ferúlico. Os valores dos controles ficaram em aproximadamente 15, 32 e 41 mM TE L⁻¹ para as concentrações 5, 10 e 15 mM, respectivamente. Para o sobrenadante, os valores foram cerca de 7, 19 e 30 mM TE L⁻¹.

Quanto para ao conjunto NCB e lacase, para o método de extração, a maior atividade antioxidante foi para a concentração de 10 mM em 3,21 mM TE L⁻¹. Para o outro método, a maior atividade ficou em 1,64 mM TE L⁻¹ para a concentração de 15 mM.

A princípio observa-se que há uma significativa diferença ($p < 0,05$) entre os métodos para a análise da atividade antioxidante da EI. Também se nota um comportamento ascendente da atividade antioxidante frente as diferentes concentrações, havendo diferença para a concentração 5 mM para as outras concentrações e sem diferença entre a 10 mM e 15 mM, o que pode ser devido a possível inativação da enzima ou limitações entre a mesma com o ácido ferúlico.

Outro ponto importante é que não se atinge a concentração do controle 01 ao somar as concentrações do sobrenadante com a lacase imobilizada, isso pode ser devido a alterações da solução pela enzima ou pela temperatura.

Quanto a relação entre o controle 01 com a EI, é possível reter cerca de 10% da atividade antioxidante inicial do ácido ferúlico para as concentrações 5 mM e 10 mM e cerca de 8% para 15 mM. Trabalho de Alijawish et al. (2014) também apresentou uma redução da atividade antioxidante após a biocatálise de oxidação pela lacase para o ácido ferúlico e o ferulato de etila em relação a atividade inicial. A redução da atividade pode ser devido ao fato de que o processo de polimerização reduz a ação antioxidante por diminuir o número de grupos como $-COOH$, $-OH$ e OCH_3 , os quais são responsáveis pela atividade antioxidante, além da saturação das ligações de grupos como $C=C$ (ADELAKUN et al., 2012; ALIJAWISH et al., 2014).

A Figura 38 apresenta um possível processo de biocoloração das NCB após o processo de biotransformação do ácido ferúlico.

Figura 38 – Amostras da NCB após o processo de polimerização do ácido ferúlico por lacase imobilizada (a esquerda) e amostras da solução de ácido ferúlico após o mesmo processo (a direita) após 12 horas.



Fonte: Autoria Própria (2019).

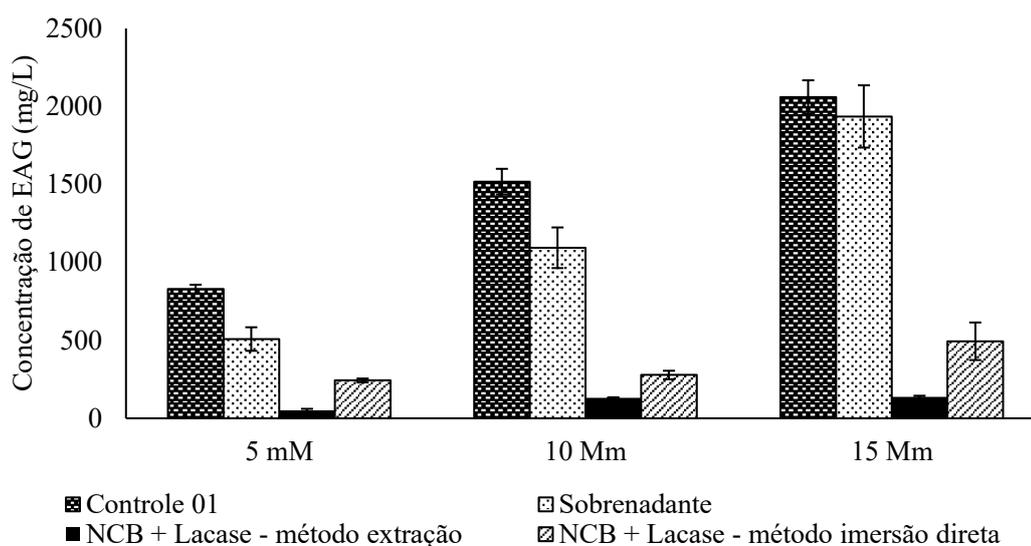
Ao analisar a Figura 38 é possível observar que após o processo de polimerização, as amostras de NCB aderiram uma tonalidade amarelada. Isto pode ser associado aos oligômeros pequenos formados após a oxidação enzimática do ácido ferúlico. Assim, como o catecol, o ácido ferúlico faz parte dos compostos flavonoides e após a polimerização é esperado a alteração de cor (SONG et al. 2018). Deste modo, é possível obter um processo de biocoloração pela oxidação do ácido ferúlico pela lacase imobilizada.

Resultado semelhante foi apresentado no trabalho de Song et al. (2018), em que foi avaliado a polimerização do catecol, do ácido ferúlico, da catequina e da hidroquinona utilizando a lacase de *Myceliophthora thermophila*. Ocorreu a polimerização de todos os compostos conferindo cor ao NCB. Para o catecol, a cor foi marrom escura e para o ácido ferúlico, cor amarela. Ressalta-se que seria interessante a confirmação da polimerização por análise MALDI-TOF conforme o estudo apresentado anteriormente.

5.11.2.3 ANÁLISE DE FENÓIS TOTAIS:

A Figura 39 apresenta a análise realizada para avaliar os fenóis totais presentes nas amostras envolvidas no experimento da biotransformação do ácido ferúlico.

Figura 39 – Determinação do conteúdo total de fenóis nas amostras analisadas.



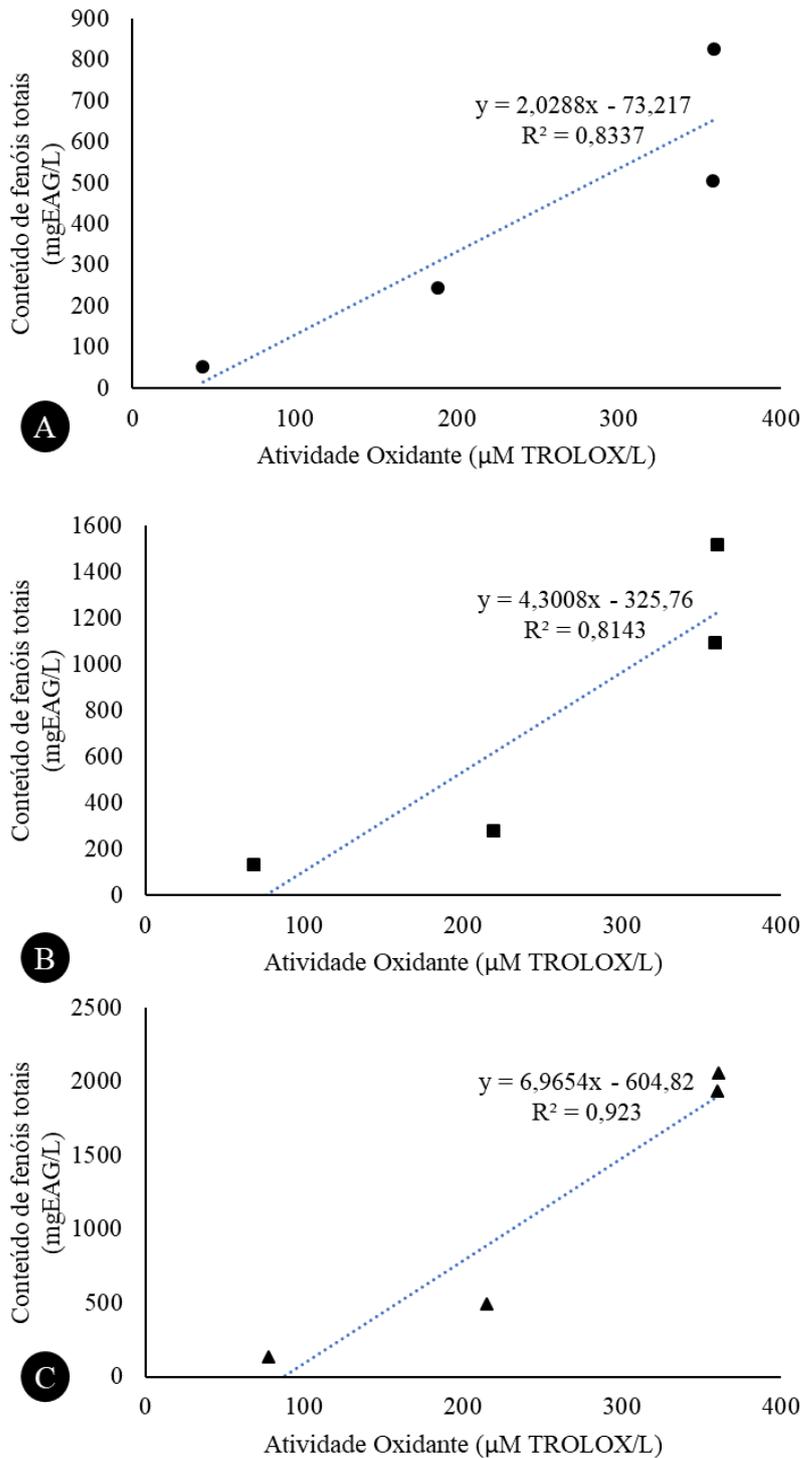
Fonte: Autoria Própria (2019).

Os resultados obtidos (Figura 39) demonstram que, entre os métodos utilizados na extração dos fenóis totais, a imersão direta foi a que apresentou maior eficiência de extração. Além de que para a concentração 5 mM, a NCB+lacase pelo método de imersão direta reteve cerca de 30% da quantidade total do controle 01.

Os compostos fenólicos estão correlacionados com a atividade antioxidante quando são capazes de impedir ou prevenir o processo de oxidação mediada por radicais livres e que o produto formado após a reação seja estável (RICE-EVANS, MILLER, PAPANGA, 1996).

A Figura 40 demonstra a relação entre a atividade antioxidante determinada pelo método DPPH para a NCB+lacase (método imersão direta) pelos fenóis totais para as concentrações 5, 10 e 15 mM.

Figura 40 – Determinação total do conteúdo total de fenóis para as amostras analisadas.



Fonte: Autoria Própria (2019).

A: para concentração de ácido ferúlico de 5 mM, B: para concentração de ácido ferúlico de 10 mM e C: para concentração de ácido ferúlico de 15 mM.

A Figura 40 exemplifica a relação entre a atividade antioxidante e a presença de compostos fenólicos para as amostras sendo que para a concentração 15 mM foi a que apresentou o maior R^2 .

Por fim, estes resultados podem ser um indicativo da possibilidade da NCB apresentar atividade antioxidante decorrente de mediação entre lacase e ácido ferúlico, podendo apresentar até 50% da atividade antioxidante apresentada pelo controle de ácido ferúlico (15 mM) ao considerar a análise por DPPH, além de ser possível o processo de biocoloração.

6 CONCLUSÃO

A NCB se mostrou como um suporte adequado para a imobilização da lacase comercial de *Myceliophthora thermophila* pelo processo de *cross-linking*. As análises por MEV demonstraram o potencial da NCB como suporte para a lacase devido à alta porosidade além de comprovar a imobilização da lacase na forma reticulada nas fibras da celulose. Quanto a DRX, foi possível identificar o índice cristalino da NCB que ficou em torno de 86% além de enquadrar a NCB em celulose tipo I (celulose natural).

De forma a otimizar o processo de imobilização, um delineamento experimental do tipo Box-Behnken foi realizado com o intuito de avaliar a relação da recuperação da atividade enzimática após a imobilização (variável dependente) por variáveis independentes (pH, concentração da enzima e concentração de glutaraldeído). As melhores condições ficaram em pH 5, concentração da enzima em 200 U L^{-1} e concentração de glutaraldeído em 0,40%. Após o processo de imobilização, a atividade enzimática observada foi menor que a atividade enzimática apresentada pela a EL, o que foi decorrente do processo de imobilização em que pode apresentar mudanças na conformidade tridimensional da enzima, além de o substrato poder encontrar dificuldades para acessar ao sítio ativo da enzima devido a dificuldades de difusão.

Para as condições ótimas de pH e temperatura, tanto para a EL quanto para a EI obtiveram-se os melhores resultados no pH 4 e na temperatura de 60°C.

Ao avaliar a influência do cobre foi verificado que ele afeta negativamente a atividade enzimática, entretanto, a EI manteve a atividade relativa em 90,60% para 10 mM e 53,70% para 100 mM, ao passo que a EL permaneceu entre 14 a 16%. O zinco não apresentou efeito negativo como o cobre. Para a EL a atividade enzimática permaneceu em 77,05% e 76,54% para 10 mM e 100 mM, respectivamente. Para a EI, a atividade apresentou valores maiores que a atividade enzimática sem a presença do metal, sendo 100,65% e 124,65% para 10 mM e 100 mM, respectivamente.

Quanto a estabilidade térmica das duas formas foi observada que após a imobilização, a lacase apresenta maior resistência as alterações de temperatura ao longo do tempo. Para a temperatura de 60°C, após uma hora, a EI manteve a atividade relativa em 70% ao passo que a livre apresentava 45,45%. Após uma hora a 70°C, a lacase livre apresentava 5,38% de atividade relativa enquanto a EI manteve a atividade em 22,47%.

Frente a estabilidade operacional, a EI reteve 55,09% da sua atividade inicial após 5 ciclos e 43,64% após sete ciclos. Quanto ao armazenamento, a EI manteve sua atividade relativa entre 90% a 70% para o período de quatro semanas, enquanto a EL reteve apenas 40% da sua atividade inicial após as quatro semanas.

Para as aplicações, a EI apresentou resultados promissores como um possível suporte de detector do catecol pelo processo de biotransformação do catecol pela lacase, considerando um tempo de análise de até 90 minutos. Quanto aos resultados provenientes do processo de mediação entre lacase e ácido ferúlico, é possível ter um suporte (NCB) com propriedades antioxidantes ou até mesmo realizar o processo de biocoloração.

Por fim, este trabalho propôs um sistema que emprega uma enzima com diversas áreas de estudo, como, na área ambiental, cosmética e industrial, visando a otimização de um método de imobilização que não é tão comumente utilizado e usando um suporte orgânico visando a aplicação deste produto no campo industrial e para a redução de custos.

7 RECOMENDAÇÕES

De forma a aplicar a nanocelulose bacteriana com lacase para bio-tratamento de certos efluentes, seria interessante avaliar a influência de outros metais e até mesmo um mix dos mesmos, além de analisar concentrações específicas utilizadas nas indústrias de forma a realizar um projeto com efluente real.

Para a aplicação visando averiguar a biotransformação ou a remoção do catecol, recomenda-se futuramente análises por cromatografia para poder analisar em quais compostos o catecol está se transformando e analisar a complexidade destes novos compostos.

Quanto a aplicabilidade ao processo de *grafting* da lacase com outros compostos, é necessário analisar outros tipos de soluções, como o ácido gálico, além de avaliar a atividade microbiana. Outra aplicação interessante seria em relação à biocoloração em que seria necessário avaliar outros compostos, como a catequina, além de realizar o processo de lavagem para averiguar o potencial do processo de tingimento. Ressalta-se que a mediação com o ácido ferúlico pode permitir que a lacase atue com outros substratos.

REFERÊNCIAS

- ADELAKUN, O.E. et al. Laccase-catalyzed dimerization of ferulic acid amplifies antioxidant activity. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.74, p. 29-35, 2012.
- AGHMIUNI, S. K. et al. Assessment of factors affecting innovation policy in biotechnology. **Journal of Innovation & Knowledge**, v. 5, p. 180-190, 2019.
- ALIJAWISH, A. et al. Laccase-catalysed oxidation of ferulic acid and ethyl ferulate in aqueous medium: A green procedure for the synthesis of new compounds. **Food Chemistry**, v. 145, p. 1046-1054, 2014.
- ANGELO, P. M.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos – Uma breve revisão. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, v. 66, n. 1, p. 1-9, 2007.
- ANNACHHATRE, A. P.; GHEEWALA, S. H. Biodegradation of chlorinated phenolic compounds. **Biotechnology Advances**, v. 14, n. 1, p. 35-56, 1996.
- ARICA, M. Y.; ALTINTAS, B.; BAYRAMOĞLU, G. Immobilization of laccase onto spacer-arm attached non-porous poly (GMA/EGDMA) beads: Application for textile dye degradation. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 2, p. 665-669, 2009.
- ARROYO, M. Inmovilización de enzimas. Fundamentos, métodos y aplicaciones. **Ars Pharmaceutica**, v.39, n. 2, p. 23-29, 1998.
- ATALLA, R.H.; VANDERHART, D.V. Native Cellulose: A Composite of Two Distinct Crystalline Forms. **Science**, v.233, n. 4633, p; 283-285, 1984.
- BABICH, H; DAVIS, L. Phenol: A review of environmental and health risks. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v.1, p. 90-109, 1981.
- BALDRIAN, P. Interactions of heavy metals with white-rot fungi. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 32, p. 78-91, 2003.
- BANSAL, N.; KANWAR, S. Peroxidase(s) in Environment Protection. **The Scientific World Journal**, v. 2013, p. 1-9, 2013.

BENZIE, I. F. F.; STRAIN, J.J. The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of Antioxidant Power: The FRAP Assay. **Analytical Biochemistry**, v.239, p. 70-76, 1996.

BIELECKI, S; et al. **Bacterial Cellulose**. In: STEINBUCHER A. Polysaccharides I: Polysaccharides from Prokaryotes. Alemanha: Wiley-VCH, 2002. p. 37-46.

BON, E.P.S.; CORVO, M. L; FERRARA, M. A. **Enzimas em biotecnologia: Produção, aplicações e mercado**. Rio de Janeiro: Interciência, 2008. p. 123-151.

BORGES, L.L. et al. Uma Abordagem sobre Métodos Analíticos para determinação da atividade antioxidante em produtos naturais. **Enciclopédia Biosfera**, v. 7, n. 12, p. 1-20, 2011.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M.E.; BERSET, C. Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. **Lebensm-Wiss-Technology**, v.28, n.1, p. 25-30, 1994.

BRADY, D.; JORDAAN, J. Advances in enzyme immobilization. **Biotechnology Letters**, v. 31, n. 11, p. 1639-1650, 2009.

BRAVO, L. Polyphenols: Chemistry, Dietary Sources, Metabolism, and Nutritional Significance. **Nutrition Reviews**, v. 56, n. 11, p. 317-333, 1998.

BROUN, G.B. Chemically aggregated enzymes. **Methods Enzymol**, p.263-280, 1976.

BRUGNARI, et al. A highly reusable MANAE-agarose-immobilized *Pleurotus ostreatus* laccase for degradation of bisphenol A. **Science of the Total Environment**, v.634, p. 1346-1351, 2018.

BRYJAK, J. et al. Laccase immobilization on copolymer of butyl acrylate and ethylene glycol dimethacrylate. **Biochemical Engineering Journal**, v. 35, n. 3, p. 325-332, 2007.

BYUN, Y.; KIM, Y.T.; WHITESIDE, S. Characterization of an antioxidant polylactic acid (PLA) film prepared with α -tocopherol, BHT and polyethylene glycol using film cast extruder. **Journal of food engineering**, v. 100, p. 239-244, 2010.

CARDOSO, J. C.; BESSEGATO, G. G.; BOLDRIN ZANONI, M. V. Efficiency comparison of ozonation, photolysis, photocatalysis and photoelectrocatalysis methods in real textile wastewater decolorization. **Water Research**, v. 98, p. 39-46, 2016.

CARVALHO, N.B; LIMA, A.S.; SOARES, C.M.F. Uso de sílicas modificadas para imobilização de lipases. **Química Nova**, v. 38, n. 3, p. 399-409, 2015.

CHAKRABORTY et al. Ring-Hydroxylating Oxygenase database: a database of bacterial aromatic ring-hydroxylating oxygenases in the management of bioremediation and biocatalysis of aromatic compounds. **Environmental Microbiology Reports**, v. 6, n. 5, p. 519-523, 2014.

CHEN, L.; ZOU, M.; HONG, F. F. Evaluation of fungal laccase immobilized on natural nanostructured bacterial cellulose. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, n. NOV, p. 1-10, 2015.

CHRISTOPHER, L.P; YAO, B.; JI, Y. Lignin biodegradation with laccase-mediator systems. **Frontiers in Energy Research**, v.2, n.12, p. 1-15, 2014.

CRISTÓVÃO, R. O. et al. Immobilization of commercial laccase onto green coconut fiber by adsorption and its application for reactive textile dyes degradation. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 72, p. 6-12, 2011.

DESHMUKH, R.; KHARDENAVIS, A. A.; PUROHIT, H. J. Diverse Metabolic Capacities of Fungi for Bioremediation. **Indian Journal of Microbiology**, v. 56, n. 3, p. 247-264, 2016.

DESKA, M.; KOŃCZAK, B. Immobilized fungal laccase as “green catalyst” for the decolourization process – State of the art. **Process Biochemistry**, v. 84, p. 112-123, 2019.

DINIZ, J.; GIL, M.; CASTRO, A. Hornification its origin and interpretation in wood pulps. **Wood Sci Technol**, v.37, p. 489-494, 2004.

DODOR, D. E.; HWANG, H.-M.; EKUNWE, S. I. N. Oxidation of anthracene and benzo[a]pyrene by laccases from *Trametes versicolor*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 35, p. 210-217, 2004.

DOMENEK, S. et al. Potential of Lignins as Antioxidant Additive in Active Biodegradable Packaging Materials. **J Polym. Environm.**, v.21, p. 692-701, 2013.

DROZD, R. et al. The application of magnetically modified bacterial cellulose for immobilization of laccase. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 108, p. 462-470, 2018.

ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, UNITED STATES (USEPA). **Priority Pollutants List**. 2014. Disponível em: <<<https://www.epa.gov/sites/production/files/2015-09/documents/priority-pollutant-list-epa.pdf>>>. Acessado em: 18/04/2018

FALADE, A. O. et al. Ligninolytic enzymes: versatile biocatalysts for the elimination of endocrine disrupting chemicals in wastewater. **MicrobiologyOpen**, v.7, n.6, p. 1-17, 2018.

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

FRAZÃO, C. J. R. et al. Bacterial cellulose as carrier for immobilization of laccase: Optimization and characterization. **Engineering in Life Sciences**, v. 14, n. 5, p. 500-508, 2014.

GALLEGOS, A. M. A. et al. Bacterial Cellulose: A Sustainable Source to Develop Value-Added Products – A Review. **BioResources**. v. 11, n .2, p. 5641-5655, 2016.

GAN, R. Y. et al. **Bioactive compounds and beneficial functions of sprouted grains**. In: FENG, H et al. (eds). *Sprouted Grains: Nutritional Value, Production, and Applications*. Elsevier Inc., 2019, p. 200 -208.

GHOSH, A.; DASTIDAR, M. G.; SREEKRISHNAN, T.R. Bioremediation of chromium complex dyes and treatment of sludge generated during the process. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 119, p. 448-460, 2017.

GOMES, S. A. S. S.; REBELO, M. J. F. A New Laccase Biosensor for Polyphenols Determination. **Sensors**, v. 3, p. 166-175, 2003.

GROVE, C.; JERRAM, D.A. Jpor: An ImageJ macro to quantify total optical porosity from blue-stained thin sections. **Computers & Geosciences**, v.37, n. 11, p. 1850-1859, 2011.

HAVLÍK, T. **Hydrometallurgy: Principles and application**. Inglaterra: Woodhead Publishing in Materials, 2008. p. 202-204.

HERNÁNDEZ-MONJARAZ et al. Influence of iron and copper on the activity of laccases in *Fusarium oxysporum* f. sp. *Lycopersici*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.49, n.1, p. 269-275, 2018.

HESTRIN, S.; SCHRAMM, M. Synthesis of cellulose by *Acetobacter xylinum*. 2. Preparation of freeze-dried cells capable of polymerizing glucose to cellulose. **Biochemical Journal**, v. 58, n. 2, p. 345-352, 1954.

HUBLIK, G.; SCHINNER, F. Characterization and immobilization of the laccase from *Pleurotus ostreatus* and its use for the continuous elimination of phenolic pollutants. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 27, p. 330-336, 2000.

IBARRA-ESCUZIA, P. et al. Amperometric biosensor based on a high-resolution photopolymer deposited onto a screen-printed electrode for phenolic compounds monitoring in tea infusions. **Talanta**, v. 81, n. 4-5, p. 1636-1642, 2010.

JONAS, R.; FARAH, L. F. Production and application of microbial cellulose. **Polymer Degradation and Stability**, v. 59, n. 1-3, p. 101-106, 1998.

JIANG, D. S. et al. Immobilization of *Pycnoporus sanguineus* laccase on magnetic chitosan microspheres. **Biochemical Engineering Journal**, v. 25, n. 1, p. 15-23, 2005.

KALOGERAKIS, N.; FAVA, F.; CORVINI, P. F. X. Bioremediation advances. **New Biotechnology**, v. 38, p. 41-42, 2017.

KARIGAR, C. S.; RAO, S. S. Role of microbial enzymes in the bioremediation of pollutants: A review. **Enzyme Research**, v. 2011, n. 1, 2011.

KLEMM, D. et al. Bacterial synthesized cellulose – artificial blood vessels for microsurgery. **Progress in Polymer Science**, v. 26, n. 9, p. 1561-1603, 2001.

KUMAR, V. et al. Recent Developments in Systems Biology and Metabolic Engineering of Plant–Microbe Interactions. **Frontiers in Plant Science**, v. 7, n. September, p. 1-12, 2016.

KUMAR, V.V.; SIVANESAN, S.; CABANA, H. Science of the Total Environment Magnetic *cross-linked* laccase aggregates — Bioremediation tool for decolorization of distinct classes of recalcitrant dyes. **Science of the Total Environment**, v. 487, p. 830-839, 2014.

KUNAMNENI, A. et al. Fungal laccase- a versatile enzyme for biotechnological applications. In: Méndez-Vilas A (ed) Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology. **Formatex**, p. 233-245, 2007.

LASSOUANE, F.; AIT-AMAR, H.; AMRANI, S.; RODRIGUEZ-COUTO, S. A promising laccase immobilization approach for Bisphenol A removal from aqueous solutions. **Bioresource Technology**, v.271, p. 360-367, 2019.

LIANG, C. Z. et al. Treatment of highly concentrated wastewater containing multiple synthetic dyes by a combined process of coagulation/flocculation and nanofiltration. **Journal of Membrane Science**, v. 469, p. 306-315, 2014.

LIU, Y. et al. Immobilization of laccase on magnetic bimodal mesoporous carbon and the application in the removal of phenolic compounds. **Bioresource Technology**, v. 115, p. 21-26, 2012.

LOPES, W.A; FASCIO, M. Esquema para interpretação de espectros de substâncias orgânicas na região do infravermelho. **Quim. Nova**, v. 27, n.4, p. 670-673, 2004.

LÓPEZ, C. et al. Economic comparison of enzymatic reactors and advanced oxidation processes applied to the degradation of phenol as a model compound processes applied to the degradation of phenol as a model compound. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 29, n. 6, p. 344-353, 2011.

MATE, D. M.; ALCALDE, M. Minireview Laccase: a multi-purpose biocatalyst at the forefront of biotechnology. **Microbial Biotechnology**, v. 10, p. 1457-1467, 2016.

MISRA, N. et al. Laccase immobilization on radiation synthesized epoxy functionalized polyethersulfone beads and their application for degradation of acid dye. **Polymer**, v. 55, n. 23, p. 6017-6024, 2014.

MOHAMAD, N. R. et al. An overview of technologies for immobilization of enzymes and surface analysis techniques for immobilized enzymes. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, v. 29, n. 2, p. 205-220, 2015.

MOHAMMADI, M. et al. Immobilization of laccase on epoxy-functionalized silica and its application in biodegradation of phenolic compounds. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 109, p. 443-447, 2018.

MOROZOVA, O.V. et al. "Blue" Laccases. **Biochemistry**, v.78, n.10, p.1136-1150, 2007.

MOT, A. C.; DUMITRESCU, R. S. Laccases: Complex Architectures for One Electron Oxidations. **Biochemistry**, v. 77, n. 12, p. 1395-1407, 2012.

NASCIMENTO, R.F. et al. **Adsorção: aspectos teóricos e aplicações ambientais**. Fortaleza: Imprensa Universitária, 2014, p. 202 - 2015.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. 7ª ed. Porta Alegre: Artmed, 2019, p. 187-213.

OUZOUNIS, C.; SANDER, C. A structure-derived sequence pattern for the detection of type I copper binding domains in distantly related proteins. **FEBS Letters**, v. 279, n. 1, p. 73-78, 1991.

PACHECO, S. M. V.; SOARES, C. H. L. Imobilização e caracterização de lacase e seu uso na biodegradação de efluentes de indústrias papeleiras. **Química Nova**, v. 37, n. 2, p. 209-214, 2014.

PAŹDZIOR, K. et al. Influence of ozonation and biodegradation on toxicity of industrial textile wastewater. **Journal of Environmental Management**, v. 195, p. 166-173, 2016.

PALANISAMY, S. et al. A novel Laccase biosensor based on laccase immobilized graphene-cellulose microfiber composite modified screen-printed carbon electrode for sensitive determination of catechol. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1-12, 2017.

PANG, R.; LI, M.; ZHANG, C. Degradation of phenolic compounds by laccase immobilized on carbon nanomaterials: Diffusional limitation investigation. **Talanta**, v. 131, p. 38-45, 2015.

PENG, Y.; GARDNER, D; HAN, Y. Drying cellulose nanofibrils: in search of a suitable method. **Cellulose**, v. 2012, n. 19, p. 91-102, 2012.

PERALTA, R. M. et al. **Enzymes from Basidiomycetes: Peculiar and Efficient Tools for Biotechnology**. In: BRAHMACHARI, G.; DEMAINE, A. L.; ADRIO, J.L. *Biotechnology of Microbial Enzymes: Production, Biocatalysis and Industrial Applications*. Elsevier Inc. - Academic Press, 2017. p. 119-149, 2017.

PINEDA, L. D. C.; MESA, L. A. C.; RIASCOS, C. A. M. Técnicas de fermentación y aplicaciones de la celulosa bacteriana: una revisión. **Ingeniería y Ciencia**, v. 8, n.16, p. 307-335, 2012.

RICE-EVANS, C.; MILLER, N. J.; PAPANGA, G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolics acids. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 20, p. 933-956, 1996.

RODRÍGUEZ-DELGADO, M. M. et al. Laccase-based biosensors for detection of phenolic compounds. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 74, p. 21-45, 2015.

SAMPAIO, L. M. P. et al. Laccase immobilization on bacterial nanocellulose membranes: Antimicrobial, kinetic and stability properties. **Carbohydrate Polymers**, v. 145, p. 1-12, 2016.

SASKA, S. et al. Bacterial cellulose-collagen nanocomposite for bone tissue engineering. **Journal of Materials Chemistry**, v. 22, n. 41, p. 22102-22112, 2012.

SATHISHKUMAR, P. et al. Laccase immobilization on cellulose nanofiber: The catalytic efficiency and recyclic application for simulated dye effluent treatment. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 100, p. 111-120, 2014.

SEGAL et al. An Empirical Method for Estimating the Degree of Crystallinity of Native Cellulose Using the X-Ray Diffractometer. **Textile Research Journal**, p. 786-794, 1959.

SENTHIVELAN, T.; KANAGARAJ, J.; PANDA, R. C. Recent trends in fungal laccase for various industrial applications: An eco-friendly approach - A review. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 21, n. 1, p. 19-38, 2016.

SINGLETON, V.L.; ROSSI, J.A. Colorimetry of Total Phenolics With Phosphomolibdic-Phosphotungstic Acid Reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**, v.16, n.3, p. 144 - 158, 1965.

SIRISHA, V.L.; JAIN, A.; JAIN, A. Chapter Nine - Enzyme Immobilization: an Overview on Methods, Support Material, and Applications of Immobilized Enzymes. **Advances in Food and Nutrition Research**, v. 79, p. 179-211, 2016.

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

SHRADDHA, R et al. Laccase: Microbial Sources, Production, Purification and Potential Biotechnological Applications. **Enzyme Research**, v. 2011, p. 1-11, 2011.

SLAGMAN, S.; ZUILHOF, H.; FRANSSEN, MC.R. Laccase-mediated grafting on biopolymers and Synthetic Polymers: a critical review. **ChemBioChem**, v.19, p. 288-311, 2018.

SONG et al. Bio-coloration of bacterial cellulose assisted by immobilized laccase. **AMB Express**, v.8, n. 19, p. 1-11, 2018.

STOHS, S.J; BAGCHI, D. Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. **Free Radical Biology & Medicine**, v.18, n.2, p. 321-336, 1995.

TAVARES, A. P. M. et al. Journal of Colloid and Interface Science Laccase immobilization over multi-walled carbon nanotubes: Kinetic, thermodynamic and stability studies. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 454, p. 52-60, 2015.

THATOI, H. et al. Bacterial chromate reductase, a potential enzyme for bioremediation of hexavalent chromium: A review. **Journal of Environmental Management**, v. 146, p. 383-399, 2014.

UNUOFIN, J.; OKOH, A.; NOWODO, U. Aptitude of oxidative enzymes for treatment of wastewater pollutants: A laccase perspective. **Molecules**, v. 24, n. 2064, p. 1 – 36, 2019.

WILLIAMS, W. S.; CANNON, R.T E. Alternative environmental roles for cellulose produced by *Acetobacter xylinum*. **Applied and environmental microbiology**, v. 55, n. 10, p. 2448-2452, 1989.

WILSON, A. L; FASCIO, M. Esquema para interpretação de espectros de substâncias orgânicas na região do infravermelho. **Quim. Nova**, v. 27, n. 4, p. 670-673, 2004.

WU, S. C.; LIA, Y. K. Application of bacterial cellulose pellets in enzyme immobilization. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 54, n. 3-4, p. 103-108, 2008.

YANG, J. et al. Laccases: Production, Expression Regulation and Applications in Pharmaceutical Biodegradation. **Frontiers in Microbiology**, v.8, n. 832, p. 1-20, 2017.

YAO, W. et al. Bacterial cellulose membrane - A new support carrier for yeast immobilization for ethanol fermentation. **Process Biochemistry**, v. 46, n. 10, p. 2054-2058, 2011.

YUAN, H. et al. Evaluation of nanocellulose carriers produced by four different bacterial strains for laccase immobilization. **Carbohydrate Polymers**, v. 196, n. May, p. 457-464, 2018.

ZIMMERMANN et al. Drying Techniques applied to cellulose nanofibers. **Journal of reinforced plastics & composites**. v.35, p. 1-16, 2016.

ZHOU et al. Preparation and Characterization of Immobilized Spores with Laccase Activity from *Bacillus pumilus* W3 on DEAE-Cellulose and their Application in Dye Decolorization. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 34, n.1, p. 41-52, 2017.

ANEXO A –Delineamento Experimental e otimização do processo de imobilização

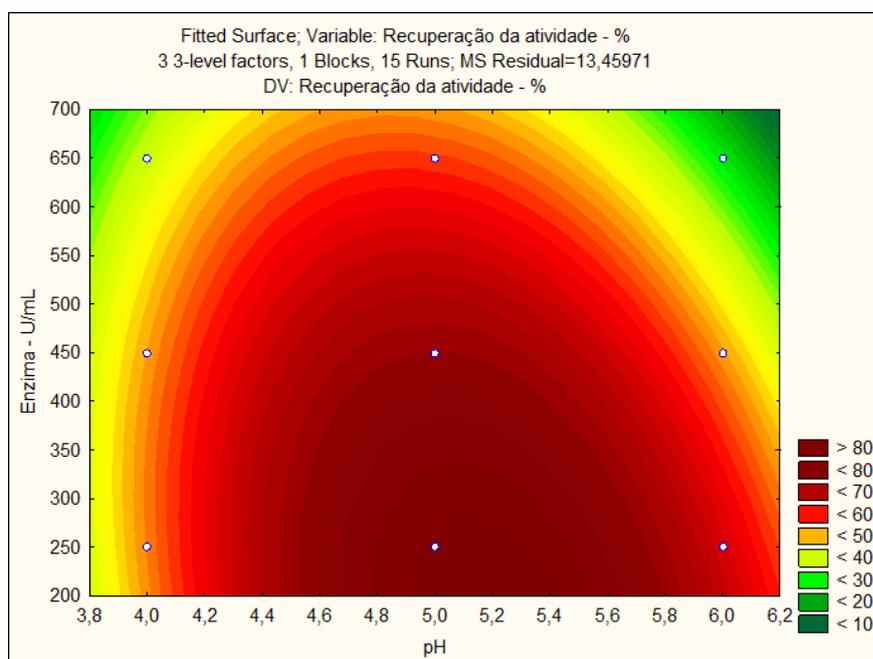
Figura 41 – Análise de variância (ANOVA) para otimização do processo de imobilização frente a recuperação da atividade enzimática.

Análise de Variância

Fonte	GL	SQ (Aj.)	QM (Aj.)	Valor F	Valor-P
Modelo	9	5877,26	653,03	34,89	0,000
Linear	3	1966,71	655,57	35,03	0,000
pH	1	9,96	9,96	0,53	0,474
Enzyme	1	1424,18	1424,18	76,09	0,000
Glutaraldehyde	1	532,57	532,57	28,45	0,000
Quadrado	3	3785,11	1261,70	67,41	0,000
pH*pH	1	2689,49	2689,49	143,69	0,000
Enzyme*Enzyme	1	128,86	128,86	6,88	0,016
Glutaraldehyde*Glutaraldehyde	1	1339,81	1339,81	71,58	0,000
Interação com 2 Fatores	3	125,43	41,81	2,23	0,116
pH*Enzyme	1	104,04	104,04	5,56	0,029
pH*Glutaraldehyde	1	6,85	6,85	0,37	0,552
Enzyme*Glutaraldehyde	1	14,55	14,55	0,78	0,388
Erro	20	374,34	18,72		
Falta de ajuste	3	87,03	29,01	1,72	0,201
Erro puro	17	287,32	16,90	*	*
Total	29	6251,60			

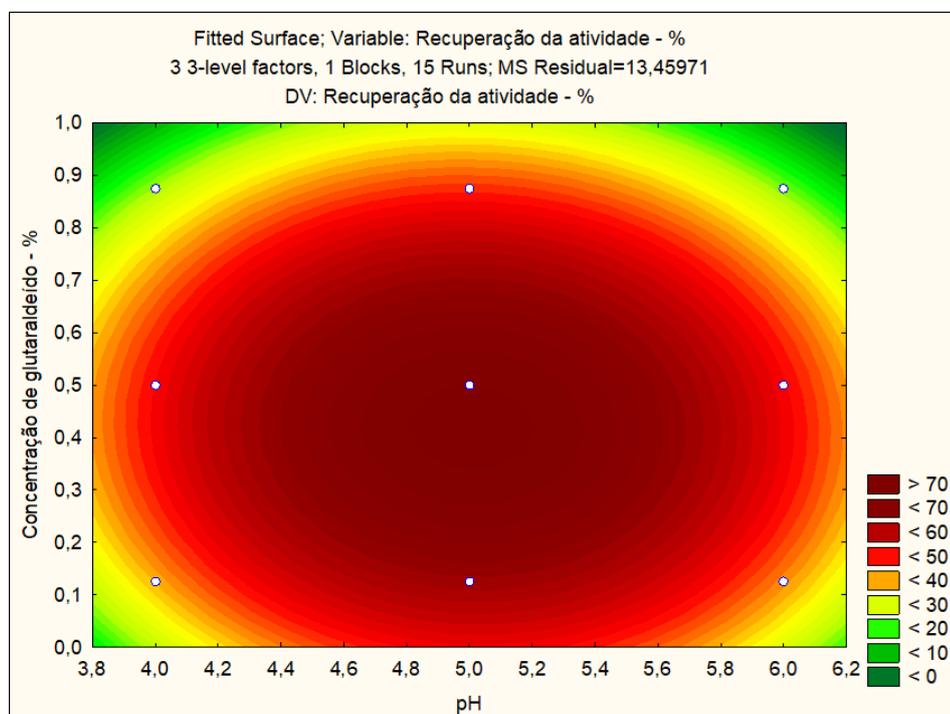
Fonte: MINITAB®

Figura 42 – Gráfico de contorno quanto a recuperação da atividade enzimática em função da concentração da enzima e do pH, enquanto a concentração de glutaraldeído foi mantido constante no nível central.



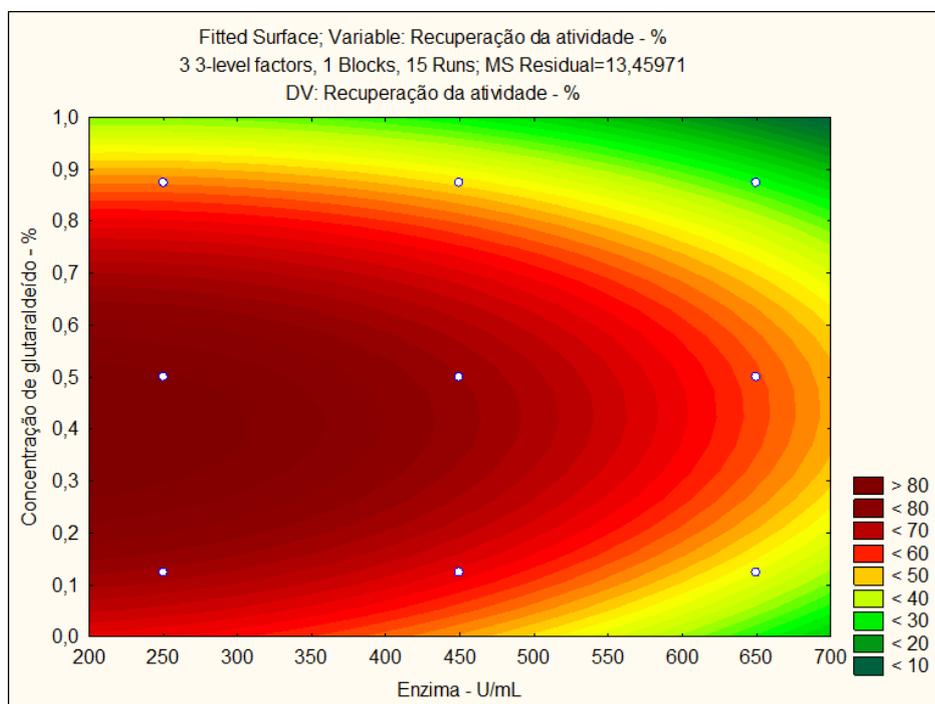
Fonte: STATISTICA®

Figura 43 – Superfície de resposta e gráfico de contorno quanto a recuperação da atividade enzimática em função da concentração de glutaraldeído e do pH, enquanto a concentração da enzima foi mantida constante no nível central.



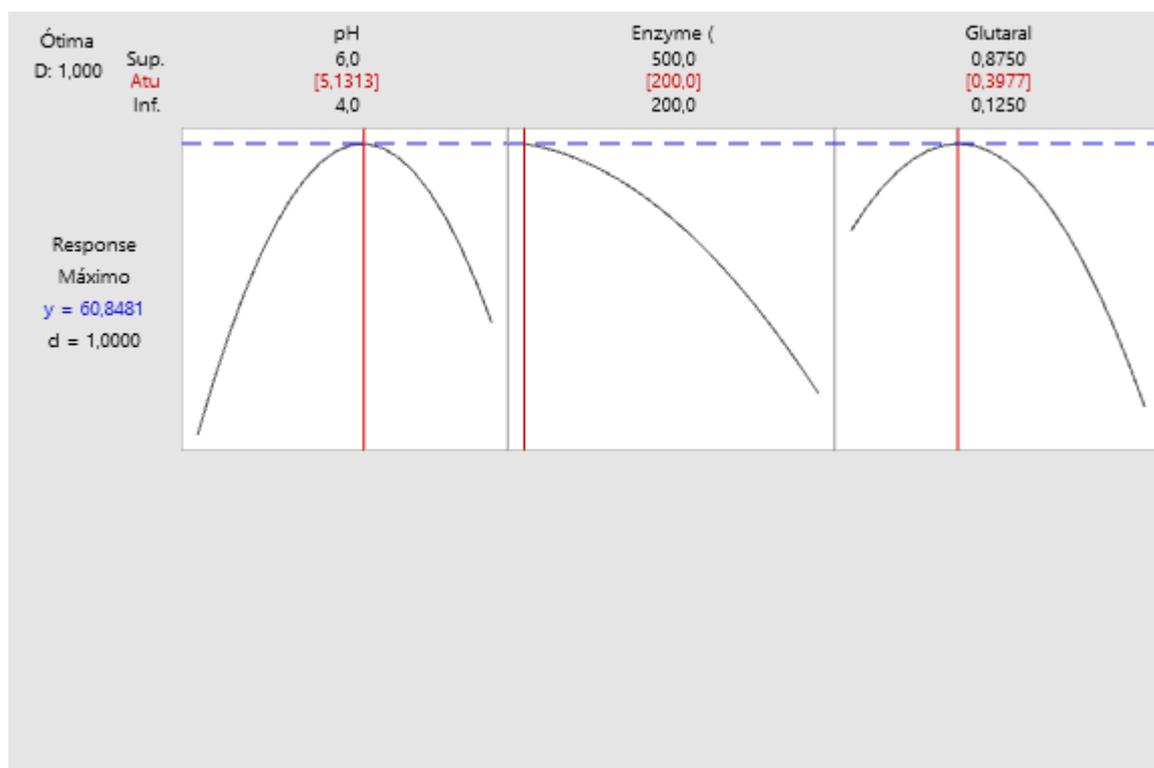
Fonte: STATISTICA®

Figura 44 – Superfície de resposta e gráfico de contorno quanto a recuperação da atividade enzimática em função da concentração de glutaraldeído e da concentração da enzima, enquanto o pH foi mantido constante no nível central.



Fonte: STATISTICA®

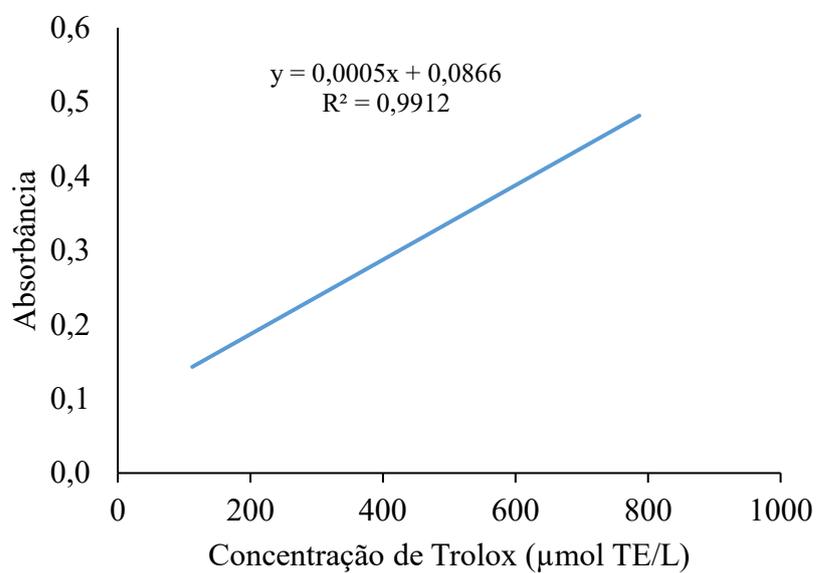
Figura 45 – Valores otimizados das variáveis independentes para o processo de imobilização.



Fonte: MINITAB®

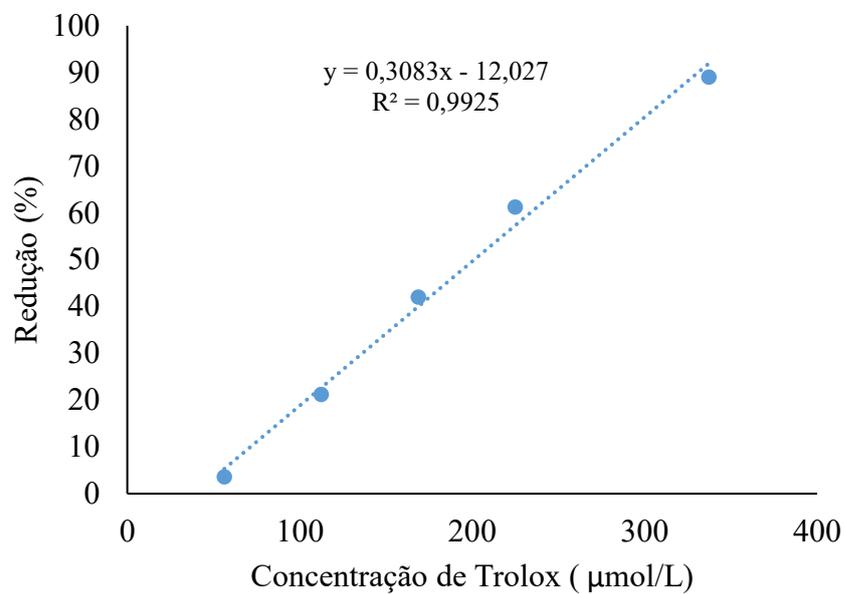
ANEXO B – Curva Padrão Trolox – DPPH

Figura 46 – Curva padrão para análise de DPPH realizada no laboratório de BIOTEC.



ANEXO C – Curva Padrão Trolox – FRAP

Figura 47 – Curva padrão para análise de FRAP realizada no laboratório de BIOTEC.



ANEXO D – Curva Padrão Ácido Gálico – Fenóis Totais

Figura 48 – Curva padrão para análise de Fenóis Totais realizada no laboratório de BIOTEC.

