

---

## Aplicação de lacases em biorremediação: comparação entre enzimas livres e imobilizadas

Emanuéli Backes, Rosane Marina Peralta

<https://doi.org/10.4322/mp.978-65-84548-03-9.c10>

### Resumo

Lacases são enzimas capazes de oxidar uma ampla gama de substratos com a redução concomitante de O<sub>2</sub> em água. Esta característica a torna especialmente favorável para aplicação em diversos segmentos biotecnológicos, com ênfase na biorremediação. A prática de imobilização enzimática é aplicada para transpor limitações operacionais, tais como baixa estabilidade e impossibilidade de recuperação e reuso. Distintos métodos de imobilização de lacases vem sendo estudados nos processos de remoção, transformação e/ou degradação de poluentes ambientais. Este trabalho fornece informações sobre o desempenho operacional de lacases livres e imobilizadas, bem como as particularidades dos métodos de imobilização. Embora um panorama global seja fornecido aos leitores, a seleção do método mais adequado é sempre inata às características de cada processo.

**Palavras-chave:** Biorremediação, enzima livre, enzima imobilizada, lacase, imobilização.

### Abstract

Laccases are enzymes capable of oxidizing a wide range of substrates with the concomitant reduction of O<sub>2</sub> to water. This feature especially favors its application in several biotechnological segments, with emphasis on bioremediation. The enzymatic immobilization practice is applied to overcome operational limitations, such as low stability and the impossibility of recovery and reuse. Different methods of laccase immobilization have been studied in the processes of removal, transformation, and/or degradation of environmental pollutants. This work provides information about the operational performance of free and immobilized laccases, as well as the particularities of the immobilization methods. Although an overview is provided to readers, the selection of the most suitable method is always innate to the characteristics of each process.

**Keywords:** Bioremediation, free enzyme, immobilized enzyme, laccase, immobilization.

## 1. Introdução

Lacases (EC 1.10.3.2) são polifenol oxidases pertencentes à família das proteínas multi-cobre e capazes de catalisar a oxidação mono-eletrônica do substrato com redução concomitante de O<sub>2</sub> para H<sub>2</sub>O (BRUGNARI *et al.*, 2018; OLAJUYIGBE *et al.*, 2019). A especificidade das lacases para com substratos fenólicos e não fenólicos intensificou o uso dessas enzimas em diversos segmentos biotecnológicos. Embora sejam amplamente difundidas em plantas, insetos e bactérias, as mais frequentemente utilizadas são lacases provenientes de fungos da podridão-branca (LONAPPAN *et al.*, 2018).

Por razões de disponibilidade, baixo preço e ausência da necessidade de reagentes químicos ambientais, a degradação enzimática, em especial com o uso de lacases, desempenha papel significativo na remoção de poluentes ambientais (ZDARTA *et al.*, 2020). Para além, os apelos verde e sustentável tornam os processos mediados por enzimas uma alternativa viável e promissora, comparativamente aos métodos convencionais de remoção de contaminantes (ZHOU, ZHANG, CAI, 2021).

No entanto, a aplicação de lacases em processos industriais ainda é limitada, dada a baixa estabilidade, fácil inativação nas condições de operação e reutilização difícil (OLAJUYIGBE *et al.*, 2019). Consequentemente, métodos de imobilização vem se mostrando uma abordagem eficaz para suprir tais limitações e tornar favorável o custo-benefício da aplicação de lacases em larga escala. Adsorção ou ligação covalente em materiais de suporte, encapsulação e reticulação (ligações cruzadas) são algumas das abordagens empregadas na imobilização enzimática (ZHANG *et al.* 2020a; ZHOU, ZHANG, CAI, 2021). A escolha do método de imobilização adequado para enzima e substrato específicos, aliado a um estudo de otimização do processo de imobilização, por exemplo, tem se mostrado promissor no desenvolvimento de um cenário ideal para uma ação enzimática economicamente fiável (BILAL *et al.*, 2019b).

Neste estudo são revisados alguns dos principais métodos de imobilização de lacase recentemente aplicados em processos de biorremediação. Além disso, o desempenho operacional entre lacases livres e imobilizadas foi comparado. Pretende-se, com este capítulo, atualizar o leitor sobre as particularidades dos métodos de imobilização e estimular mais pesquisas de aplicação dessas enzimas na área ambiental.

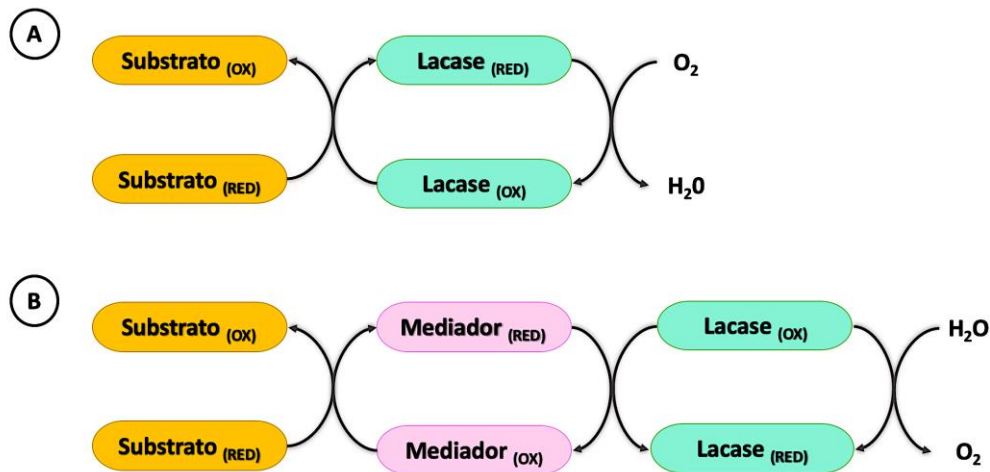
## 2. Lacases

### 2.1 Fontes, características estruturais e mecanismo oxidativo

Lacases são glicoproteínas, geralmente extracelulares, pertencentes a família de multi-cobre oxidases, assim como manganês oxidase, ascorbato oxidase, entre outras. Essas enzimas são capazes de conduzir a oxidação mono-eletrônica de uma gama de compostos, utilizando oxigênio molecular como acceptor final de elétrons, enquanto água é produzida como único subproduto do ciclo catalítico (Figura 1 A). A depender da fonte em que são obtidas, as lacases podem se apresentar na forma monomérica, dimérica ou tetramérica e com peso molecular variando entre 20 a 130 kDa (MOGHARABI, FARAMARZI, 2014; JANUSZ *et al.*, 2020).

Desde sua primeira identificação em 1883 em uma árvore japonesa, *Rhus vernicifera*, a atividade da lacase foi observada nos reinos Plantae, Animalia, Monera e Fungi. Na realidade, a lacase é uma enzima multifacetada e o processo fisiológico no qual está envolvida tem relação direta com sua origem. Enquanto as lacases de fontes vegetais exercem função de lignificação da parede celular das plantas, por exemplo, lacases de origem fúngica são responsáveis pelo ataque e degradação do polímero de lignina. Nos insetos, a lacase atua na esclerotização da cutícula vegetal e, quando proveniente de bactérias, estão relacionadas aos processos de síntese de pigmentos marrons nos esporos e proteção contra a luz UV (ZERVA *et al.*, 2019; JANUSZ *et al.*, 2020).

O sítio ativo das lacases contém quatro átomos de cobre: um tipo 1 (T1), um tipo 2 (T2) e dois tipo 3 (T3), que são classificados de acordo com suas características espectrais, e estão dispostos em dois sítios distintos de ligação ao substrato (ZERVA *et al.*, 2019). O íon de cobre T1, localizado na região mononuclear do centro catalítico, confere a cor azul típica da enzima e é responsável pela oxidação do substrato. Já o íon de cobre T2 forma um cluster trinuclear com os dois íons de cobre T3 (T2/T3), que é para onde os elétrons são transferidos para a redução do oxigênio à água (MOGHARABI, FARAMARZI, 2014; JANUSZ *et al.*, 2020).



**Figura 1.** Esquema do mecanismo oxidativo da lacase na ausência (A) e presença (B) de mediador. Fonte: Próprio autor.

A capacidade de oxidação da lacase é proporcional à diferença de potencial redox entre o átomo de cobre T1 e o substrato. Portanto, o maior potencial redox desse átomo se traduz em uma maior gama de substratos susceptíveis à oxidação e, conseqüentemente, opções de aplicações biotecnológicas (CASTROVILLI *et al.*, 2019). O potencial redox da lacase geralmente varia de 400 a 800 mV vs. Eletrodo Padrão de Hidrogênio (EPH), e é afetado por diversos fatores como, por exemplo, diferentes ligantes axiais e tipo do organismo do qual a enzima foi isolada (ZERVA *et al.*, 2019).

No entanto, muitas vezes as lacases não são capazes de oxidar diretamente o substrato devido ao seu grande tamanho, baixa difusão no sítio ativo ou alto potencial redox. Nestes casos, as reações enzimáticas podem ser realizadas na presença de um composto apropriado que irá mediar a transferência de elétrons do substrato para a enzima. Os mediadores estabelecem uma rota indireta para oxidação do substrato, isto é, eles são primeiro oxidados pela lacase para então atacar o substrato (Fig. 1 B) (MOGHARABI, FARAMARZI, 2014; ZERVA *et al.*, 2019).

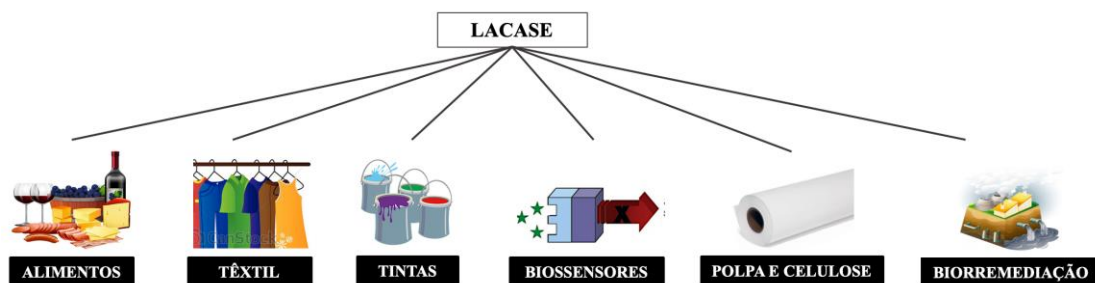
O ABTS (ácido 2,20-azino-bis (ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico) foi o primeiro composto sintético utilizado para mediar reações de oxidação de lacases. Porém, compostos como N-hidroxibenzotriazol e 2,2,6,6-tetrametilpiperidina-1-iloxi, por exemplo, também são reportados por eficiente capacidade mediadora. Para além, alguns compostos fenólicos apresentam-se

naturalmente como mediadores de lacases, como é o caso do ácido ferúlico, acetoseringona, acetovanilona e ácido para-cumárico (MOGHARABI, FARAMARZI, 2014).

## 2.2. Processos biotecnológicos com lacase

Enzimas, em geral, apresentam um gigante potencial catalítico que estimula estudos intensos sobre o aprimoramento de suas propriedades. A elevada seletividade pelo substrato, condições de reação amenas e atividade à temperatura ambiente, lhes permite atuar em condições experimentais e naturais (CASTROVILLI *et al.*, 2019).

No caso das lacases, suas aplicações biotecnológicas têm sido objetivo de pesquisa por mais de 30 anos e, devido ao espectro de atividade, abrangem um amplo escopo de possibilidades (Fig. 2). Indústrias de alimentos, rações, papel e celulose, cosméticos, fármacos, indústria têxtil e processos de biorremediação, por exemplo, são alguns dos segmentos nos quais as pesquisas com lacase tem sido intensificada nos últimos anos (ZERVA *et al.*, 2019).



**Figura 2.** Esquema das principais aplicações biotecnológicas da lacase.

Fonte: Próprio autor.

Uma parcela representativa dos estudos disponíveis na literatura busca elucidar a aplicação de enzimas em processos de biorremediação ambiental. Oxirredutases microbianas, em particular as lacases, são capazes de conduzir a transformação metabólica de uma variedade de poluentes ambientais recalcitrantes. Entretanto, o sucesso pleno das lacases em escala industrial ainda é limitado. Para além da falta de estabilidade operacional à longo prazo, a

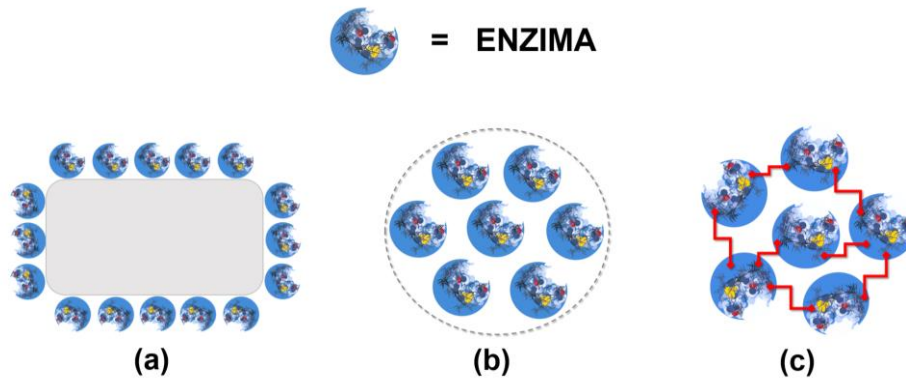
faixa estreita de pH e as dificuldades de recuperação e reutilização da enzima livre restringem, muitas vezes, sua utilização.

Dessa forma, a imobilização enzimática vem sendo empregada como alternativa eficaz para transpor tais empecilhos e produzir biocatalisadores industriais robustos (BRUGNARI *et al.*, 2018; ZHANG *et al.*, 2020a). Estudos recentes demonstraram a degradação eficiente de corantes sintéticos (BILAL *et al.*, 2019b), compostos fenólicos (MOHAMMADI *et al.*, 2018), fármacos (TAHERAN *et al.*, 2017), bifenilos policlorados (LI *et al.*, 2018), entre outros compostos, por intermédio de lacases imobilizadas.

### **3. Imobilização enzimática: abordagem para ampliar potencial biotecnológico**

A elevada sensibilidade das enzimas livres às condições ambientais complexas pode ser contornada por processos de imobilização. Quando imobilizadas, para além de se manterem ativas em sistemas reacionais mais agressivos, as enzimas podem ser reutilizadas, o que reduz os custos globais de produção. No entanto, observa-se que a maioria das estratégias de imobilização são acompanhadas por uma perda da atividade enzimática que, conseqüentemente, caracteriza um desperdício da enzima. Dessa forma, é grande a necessidade de se encontrar um método de imobilização eficaz, que não só contribua para a reutilização e estabilidade da enzima, mas também aumente a eficiência catalítica (RUEDA *et al.*, 2016).

Ao longo dos anos, várias estratégias de imobilização foram estudadas e propostas, no entanto, cada técnica tem suas vantagens e desvantagens inerentes, e nenhuma delas é capaz de superar, simultaneamente, todas as limitações das enzimas (SHELDON, 2019; ZHANG *et al.*, 2020a). Os métodos de imobilização podem ser classificados em três principais tipos (Fig. 3): (a) imobilização em um suporte pré-fabricado que, por sua vez, pode se dar através de adsorção física, iônica ou ligação covalente; (b) aprisionamento ou encapsulação em matriz polimérica e (c) reticulação ou ligação cruzada (SHELDON, 2019). Diversos estudos recentes propõem o processo de imobilização de lacase como uma alternativa promissora para melhorar os parâmetros operacionais da enzima, viabilizando amplo uso industrial (VERA *et al.*, 2020).



**Figura 3.** Esquema ilustrativo dos diferentes métodos de imobilização enzimática. (a) imobilização por adsorção (física ou iônica) ou ligação covalente; (b) imobilização por encapsulação ou aprisionamento; (c) imobilização por reticulação ou ligação cruzada. Fonte: Próprio autor.

A alta resistência frente a diversos fatores operacionais, tais como pH, temperatura e solvente orgânico, é característica notável de enzimas covalentemente imobilizadas à um suporte. Tais vantagens impulsionam constantes pesquisas na otimização e desenvolvimento de novos protocolos de imobilização através deste método (SHELDON, 2019). A expansão satisfatória na faixa de pH de atividade máxima, por exemplo, foi observada por Vera et al. (2020) na co-imobilização de lacases de *Agaricus bisporus* e *Trametes versicolor* por ligações covalentes em microesferas de poli (metacrilato de glicidila). Em valores de pHs de 2,0 e 3,0, onde ambas as enzimas na forma livre já não apresentaram atividade, a ação catalítica das lacases co-imobilizadas se manteve em valores ótimos. Contudo, a termo estabilidade enzimática foi afetada de forma menos intensa pelo processo de imobilização (VERA *et al.*, 2020).

A capacidade de reutilização é a principal vantagem das enzimas imobilizadas e é particularmente importante para aplicações práticas (ZDARTA *et al.*, 2019). Dessa forma, Vera *et al.* (2020) destacaram a retenção de, aproximadamente 80% da atividade inicial das lacases co-imobilizadas após 6 ciclos de oxidação consecutivos com ABTS como substrato. Bilal et al. (2019a) observaram resultado semelhante, porém mais efetivo, ao proceder com a imobilização de lacase de *Trametes versicolor* por ligação covalente à suporte

de quitosana utilizando glutaraldeído como agente de ativação. Neste último estudo, mais de 80% da atividade inicial da lacase foi mantida após 9 ciclos de uso e mais de 70% da atividade inicial foi mantida após dez ciclos, também ao fazer uso de ABTS como substrato (BILAL *et al.*, 2019a).

Brugnari *et al.* (2018) realizaram a imobilização de lacase de *Pleurotus ostreatus* por adsorção em suporte de agarose ionicamente ativado (gel de mono aminoetil-N-aminoetil agarose; MANAE-agarose). Os autores observaram uma carga enzimática de 12 U.g<sup>-1</sup> de suporte, aproximadamente o dobro do valor alcançado por Vera *et al.* (2020) na co-imobilização de lacases por ligação covalente (6,75 U.g<sup>-1</sup>). A carga enzimática consideravelmente inferior no segundo estudo está relacionada as propriedades do método de imobilização utilizado. Ao se ligar covalentemente aos grupos reativos do suporte, mudanças conformacionais na estrutura nativa da enzima podem ocorrer e, nestes casos, a redução da sua atividade catalítica é observada (SHELDON, 2019). Uma alternativa é, portanto, o uso de métodos de imobilização que contemplam um mecanismo de interação enzima-suporte mais brando, isto é, menos agressivo. As adsorções física e iônica da enzima ao suporte, por exemplo, são bastante investigadas dada a viabilidade econômica do processo e preservação da estrutura enzimática (LONAPPAN *et al.*, 2018).

A simplicidade associada aos métodos físicos de imobilização ao suporte não os abstém de gerar enzimas imobilizadas com ótimas propriedades operacionais (LONAPPAN *et al.*, 2018). Brugnari *et al.* (2018), por exemplo, também observaram que, embora o pH ótimo das lacases livre imobilizada tenha se mantida em 5,0, o processo de imobilização por adsorção iônica resultou em uma enzima significativamente mais estável em meios alcalinos. Os autores destacam que em pH 8,0, por exemplo, apenas 20% da atividade máxima da lacase livre foi mantida, enquanto quando imobilizada este valor passou à 60%. No mesmo artigo, Brugnari *et al.* (2018) demonstraram o aumento da estabilidade térmica da lacase imobilizada frente à enzima livre, que apresentou meia-vida de 2,3 e 7,0 vezes maior nas temperaturas de 40 e 55 °C, respectivamente. De acordo com Vera *et al.* (2020), a termo estabilidade enzimática é especialmente útil em sistemas que operam em temperaturas acima do ambiente, como é o caso das indústrias têxtil, de papel e celulose e de alimentos, por exemplo.



Como já referido, as propriedades catalíticas da lacase a tornam especialmente interessante na degradação de diversos compostos xenobióticos (OLAJUYIGBE *et al.*, 2019). Assim, Bilal *et al.* (2019a) fizeram uso desta capacidade e aplicaram as lacases livre e imobilizada covalentemente em quitosana na transformação de bisfenol A (BPA), um contaminante ambiental recalcitrante relacionado a diversos efeitos deletérios à saúde humana. A lacase imobilizada apresentou performance ligeiramente superior à da lacase livre ao atingir 50% de transformação BPA em, aproximadamente, 29 min., enquanto o mesmo grau de transformação foi encontrado após 34 min. de incubação com a enzima livre. Mais de 99% do BPA em solução foi transformado após 150 min. de reação por ambas as enzimas livre e imobilizada. Resultado similar, porém, com desempenho superior, foi encontrado por Brugnari *et al.* (2018). O nível de degradação de 50% do BPA foi observado em 20 e 27 minutos com lacase imobilizada em MANAE-agarose e lacase livre, respectivamente. Apenas 60 min. foram requeridos para transformação total do BPA em solução, ou seja, menos da metade do tempo demonstrado por Bilal *et al.* (2019a). Dessa forma, nota-se a relevância da carga enzimática e das particularidades de cada método de imobilização no desempenho do sistema enzimático.

Dois parâmetros cinéticos muito importantes para avaliar a eficiência catalítica de uma enzima são: a constante de Michaelis-Menten ( $K_M$ ), que reflete a afinidade da enzima pelo substrato, e a velocidade máxima da reação ( $V_{MAX}$ ). Após a imobilização da enzima é comum que o valor de  $K_M$  se eleve, enquanto o valor de  $V_{MAX}$  diminua. Este fenômeno indica a diminuição da afinidade da lacase para o substrato e da velocidade máxima de reação, e possui como causas prováveis a distorção da conformação do sítio ativo, baixa flexibilidade da proteína e limitação da difusão do substrato (ZHOU, ZHANG, CAI, 2021). Para fins comparativos, na Tabela 1 são apresentados os valores de  $K_M$  e  $V_{MAX}$  de diferentes reações catalisadas por lacases livres e imobilizadas. Nota-se, portanto, que estes parâmetros não são afetados, única e exclusivamente, pelo método de imobilização utilizado, mas também por particularidades operacionais, como o tipo de suporte e a fonte da enzima, por exemplo (OLAJUYIGBE *et al.*, 2019). Contrário ao esperado, Aricov *et al.* (2020) demonstraram valor de  $K_M$  menor para a lacase imobilizada através de ligações

covalentes em suporte de quitosana, do que para a enzima livre. O comportamento observado indicou que o substrato possuía uma afinidade maior para a lacase imobilizada, isto é, o processo de imobilização foi capaz de melhorar a orientação de alguns sítios ativos da lacase e modificar a flexibilidade da enzima. Entretanto, o  $V_{MAX}$  da lacase imobilizada foi significativamente inferior ao da livre, indicando uma resistência difusional do substrato no sítio ativo da enzima.

Zdarta *et al.* (2020) realizaram estudo comparativo com lacases de *Trametes versicolor* imobilizadas por ligação covalente e por encapsulação em material de poli(metacrilato de metila) incorporado de partículas magnéticas ( $Fe_3O_4$ ). Os métodos de imobilização por encapsulação (ou aprisionamento) são aqueles baseados na retenção da enzima em uma matriz polimérica sem que ligações sejam estabelecidas. Os autores constataram que os valores de  $K_M$  de ambos os sistemas imobilizados (Tabela 1) foram significativamente maiores do que o  $K_M$  da lacase livre, porém, um aumento mais expressivo foi obtido na enzima encapsulada. Resultados análogos foram demonstrados por Zdarta *et al.* (2019) ao comparar lacases imobilizadas por encapsulação e adsorção física em poli (ácido l-láctico)-co-poli( $\epsilon$ -caprolactona. Embora a imobilização por encapsulação seja reconhecida pelos insignificantes danos causados à estrutura nativa da enzima, obstáculos esféricos podem ser criados pelo material polimérico ao redor dos sítios ativos que, possivelmente, foram responsáveis pelo aumento de  $K_M$  (ZHOU, ZHANG, CAI, 2021).

Zdarta *et al.* (2020) também observaram maior estabilidade operacional da lacase encapsulada, que manteve mais de 90% da atividade inicial após 5 ciclos oxidativos completos, frente à 80% da lacase imobilizada por ligações covalentes. De forma similar, Zdarta *et al.* (2019) demonstraram que a degradação do fármaco naproxeno no quinto ciclo de reação foi de, aproximadamente, 20% e 60% para a lacase adsorvida e encapsulada, respectivamente. Esta vantagem operacional associada ao método de imobilização por encapsulação relaciona-se ao efeito da estrutura polimérica que envolve e protege as moléculas de enzimas contra mudanças conformacionais causadas pelo ambiente externo (ZDARTA *et al.*, 2019).

**Tabela 1.** Valores das constantes cinéticas  $K_M$  e  $V_{MAX}$  de lacases livre e imobilizadas por diferentes métodos.

Forma da lacase Método de imobilização	Material do transportador	Origem	$K_M$ (mM)	$V_{MAX}$ (mM.s <sup>-1</sup> )	Referência
Livre	-		0,059	0,043	
Encapsulação	Nanofibras eletrofiadas de PMMA / Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> .	<i>Trametes versicolor</i>	0,134	0,032	Zdarta <i>et al.</i> (2020)
Ligação covalente			0,192	0,027	
Livre	-	<i>Trametes versicolor</i>	2,0	0,001	Aricov <i>et al.</i> (2020)
Ligação covalente	Quitosana		0,226	0,0005	
Livre	-		0,108	-	Zhang <i>et al.</i> (2020a)
Encapsulação	Cobre-ácido trimésico	<i>Bacillus subtilis</i>	0,159	-	
Livre	-		0,032	0,25	
Encapsulação	Alginato de Cálcio Alginato de Cobre	<i>Cyberlindnera fabianii</i>	0,078	0,116	Olajuyigbe <i>et al.</i> (2019)
Livre	-	<i>Aspergillus oryzae</i>	0,4814	0,031	Zhang <i>et al.</i> (2020b)
Adsorção física	Geopolímero		0,8446	0,021	
Livre	-		0,051	0,039	
Adsorção física	Poli(ácido l-láctico)- co-poli(ε- caprolactona)	<i>Trametes versicolor</i>	0,143	0,033	Zdarta <i>et al.</i> (2019)
Encapsulação			0,215	0,024	
Livre	-	<i>Trametes pubescens</i>	0,0951	0,165	Lassouane <i>et al.</i> (2019)
Encapsulação CLEA-encapsulação	Alginato de Cálcio		0,272	0,014	
Livre	-		0,325	0,022	
Livre	-		0,091	-	
Adsorção iônica	Gel de mono aminoetil-N- aminoetil agarose	<i>Pleurotus ostreatus</i>	0,15	-	Brugnari <i>et al.</i> (2018)
Livre	-		0,024	0,00016	
Ligação covalente	Sílica funcionalizada com epóxi	<i>Myceliophthora thermophila</i>	0,025	0,000027	Mohammadi <i>et al.</i> (2018)

Métodos de imobilização que fazem uso de transportadores irão, de forma inevitável, “diluir” a atividade enzimática. Uma vez que parcela representativa do sistema imobilizado é constituído de um material não catalítico, a produtividade

e o rendimento reacional são reduzidos. Tal revés impulsionou, e continua a impulsionar, pesquisas no desenvolvimento e aprimoramento de métodos de imobilização livre de transportadores (SHELDON e VAN PELT, 2013; FATHALI et al., 2019). Neste cenário, a imobilização por ligação cruzada se apresenta como uma valiosa alternativa de imobilização, capaz de manter a atividade enzimática altamente concentrada no catalisador e excluir os custos com transportadores. Tais reticulados enzimáticos podem se apresentar nas formas dissolvida (CLE), de cristais (CLECs), ou ainda, de agregados (CLEAs) (SHELDON, VAN PELT, 2013; FATHALI et al., 2019).

Yang et al. (2016) produziram agregados reticulados de lacase utilizando glutaraldeído como agente reticulante. Os agregados demonstraram melhora significativa na tolerância à íons metálicos, NaCl e solventes orgânicos, quando comparados com a enzima livre. Apesar dos ganhos em performance que tornam CLEAs viáveis para operações em condições industriais, Sadeghzadeh et al. (2020) chamam atenção à necessidade de centrifugação e filtração para a sua reciclagem. Estas operações pós-catálise, de acordo com os autores, refletem em uma demanda energética e podem afetar a estrutura da enzima.

De forma combinar as vantagens de ambos os métodos de imobilização, Fathali et al. (2020) conduziram a elaboração de agregados lacase de *Trametes versicolor* encapsulados em sílica mesoporosa (E-CLEAs). Os E-CLEAs exibiram ótimas propriedades de estabilidade térmica e química, com tempo de meia vida mais de 12 vezes maior que a lacase livre, quando à temperatura ambiente e pH 4,5. A lacase imobilizada reteve 79% da atividade inicial após 20 ciclos oxidativos com ABTS e se mostrou eficiente na remoção do fenol em solução, embora o processo de imobilização tenha resultado em perda de atividade de ~2,8 vezes.

O processo de reticulação da lacase de *Trametes pubescens* anterior ao seu encapsulamento também foi estudado por Lassouane et al. (2019). A lacase encapsulada e reticulada apresentou 30% de aumento no rendimento, com redução do vazamento em 7 vezes, comparativamente a lacase encapsulada sem reticulação. Através da metodologia proposta (reticulação + encapsulamento), os autores constataram a remoção de mais de 99% do BPA em solução em 2 horas de reação. De acordo com os autores, este achado foi

superior a todos os resultados relatados até o momento para a remoção de BPA por lacases imobilizadas.

O sucesso de um método de imobilização está relacionado a fatores como o rendimento e eficiência da imobilização, e recuperação da atividade enzimática. A atividade observada no sistema imobilizado, em relação à atividade da enzima livre, é altamente dependente de vários fatores, como o ensaio utilizado para medição da atividade (tipo e concentração do substrato e pH e temperatura do meio reacional) e as características físicas do biocatalisador (tamanho de partícula, hidrofobicidade/hidrofilicidade e tamanho de poro). Enzimas imobilizadas com elevada afinidade pelo substrato e alta velocidade de reação não são, necessariamente, as mais estáveis do ponto de vista operacional. Portanto, estudos de otimização mostram-se especialmente úteis no projeto de biocatalisadores imobilizados, de forma que auxiliam na manipulação de todas as variáveis relevantes ao processo de imobilização a fim de atingir uma condição final de operação ideal (SHELDON, VAN PELT, 2013; ZHOU, ZHANG, CAI, 2021).

#### **4. Considerações finais**

Contaminantes ambientais abrangem uma gama de compostos com estrutura química distinta, corriqueiramente tóxicos e presente em diversos efluentes industriais. Métodos ecologicamente corretos de remoção destes poluentes envolvem, entre outros, processos enzimáticos. Portanto, o desenvolvimento de processos mediados por lacases é de interesse dada sua elevada capacidade de oxidar diferentes compostos fenólicos e não fenólicos. De forma geral, a imobilização se mostra uma alternativa eficiente para melhorar as propriedades físico-químicas das enzimas, aumentando seu desempenho para uso comercial, que é instável quando na forma livre. Numerosas são as possibilidades de métodos de imobilização disponíveis para degradação eficiente de vários poluentes e a seleção do método mais adequado é inerente às particularidades do processo.

## 5. Agradecimentos

A autora Emanuéli Backes agradece ao apoio financeiro do Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

## 6. Referências

ARICOV, Ludmila *et al.* Enhancement of laccase immobilization onto wet chitosan microspheres using an iterative protocol and its potential to remove micropollutants. **Journal of Environmental Management**, v. 276, p. 1-11, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2020.111326>.

BILAL, Muhammad *et al.* Immobilization of fungal laccase on glutaraldehyde cross-linked chitosan beads and its bio-catalytic potential to degrade bisphenol A. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 19, p. 1-6, 2019a, 101174. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2019.101174>.

BILAL, Muhammad *et al.* Hazardous contaminants in the environment and their laccase-assisted degradation - A review. **Journal of Environmental Management**, v. 234, p. 253-264, 2019b. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2019.01.001>.

BRUGNARI, Tatiane *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. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.04.051>.

CASTROVILLI, Mattea Carmen *et al.* Electrospray deposition as a smart technique for laccase immobilisation on carbon black-nanomodified screen-printed electrodes. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 163, p. 1-7, 2020, 112299. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2020.112299>.

FATHALI, Zahra *et al.* Catalytic phenol removal using entrapped cross-linked laccase aggregates. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 122, p. 359-366, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.10.147>.

JANUSZ, Grzegorz *et al.* Laccase Properties, Physiological Functions, and Evolution. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 966, p. 1-25, 2020. <https://doi.org/10.3390/ijms21030966>.

LASSOUANE, Fatiha *et al.* A promising laccase immobilization approach for Bisphenol A removal from aqueous solution. **Bioresource Technology**, v. 271, p. 360-367, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.09.129>.

LI, Na *et al.* Immobilizing laccase on modified cellulose/CF beads to degrade chlorinated biphenyl in wastewater. **Polymers**, v. 10, p. 1-12, 2018. <https://doi.org/10.3390/polym10070798>.

LONAPPAN, Linson *et al.* Adsorptive immobilization of agro-industrially produced crude laccase on various micro-biochars and degradation of diclofenac. **Science of the Total Environment**, v. 640, p. 1251-1258, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.06.005>.

MOGHARABI, Mehdi; FARAMARZI, Ali Faramarzi. Laccase and Laccase-Mediated Systems in the Synthesis of Organic Compounds. **Advanced Synthesis & Catalysis**, v. 356, p. 897-927, 2014. <https://doi.org/10.1002/adsc.201300960>.

MOHAMMADI, Mehdi *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. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.12.102>.

OLAJUYIGBE, Folasade M.; ADETUYI, Oluwafijimi Y.; FATOKUN, Cornelius O. Characterization of free and immobilized laccase from *Cyberlindnera fabianii* and application in degradation of bisphenol A. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 125, p. 856-864, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.12.106>.

RUEDA, Nazzoly *et al.* Chemical Modification in the Design of Immobilized Enzyme Biocatalysts: Drawbacks and Opportunities. **The Chemical Record**, v. 16, p. 1436-1455, 2016. <https://doi.org/10.1002/tcr.201600007>.

SADEGHZADEH, Sadegh *et al.* Removal of bisphenol A in aqueous solution using magnetic cross-linked laccase aggregates from *Trametes hirsute*. **Bioresource Technology**, v. 306, p. 1-7, 2020, 123169. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.123169>.

SHELDON, Roger A.; van PELT, Sander. Enzyme immobilisation in biocatalysis: why, what and how. **Chemical Society Reviews**, v. 42, p. 6223-6235, 2013. <https://doi.org/10.1039/C3CS60075K>.

SHELDON, Roger A. CLEAs, Combi-CLEAs and 'Smart' Magnetic CLEAs: **Biocatalysis in a Bio-Based Economy**. *Catalysts*, v. 9, n. 261, p. 1-31, 2019. <https://doi.org/10.3390/catal9030261>.

TAHERAN, M. *et al.* Covalent Immobilization of laccase onto nanofibrous membrane for degradation of pharmaceutical residues in water. **ACS Sustainable Chemistry & Engineering**, v. 5, p. 10430–10438, 2017. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.7b02465>.

VERA, Myleidi *et al.* Polymeric microspheres as support to co-immobilized *Agaricus bisporus* and *Trametes versicolor* laccases and their application in diazinon degradation. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 13, p. 4218-4227, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2019.07.003>.

YANG, Jie *et al.* Cross-linked enzyme aggregates of *Cerrena* laccase: Preparation, enhanced NaCl tolerance and decolorization of Remazol Brilliant

Blue Reactive. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v. 65, p. 1-7, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.jtice.2016.04.025>.

ZDARTA, Jakub *et al.* Robust biodegradation of naproxen and diclofenac by laccase immobilized using electrospun nanofibers with enhanced stability and reusability. **Materials Science & Engineering C**, v. 103, p. 1-10, 2019, 109789. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.109789>.

ZDARTA, Jakub *et al.* A promising laccase immobilization using electrospun materials for biocatalytic degradation of tetracycline: Effect of process conditions and catalytic pathways. **Catalysis Today**, v. 348, p. 127-136, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.cattod.2019.08.042>.

ZHANG, Hao *et al.* Recent applications of immobilized biomaterials in herbal analysis. **Journal of Chromatography A**, v. 1603, p. 216-230, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2019.06.059>.

ZHANG, Chengyu *et al.* An effective in-situ method for laccase immobilization: Excellent activity, effective antibiotic removal rate and low potential ecological risk for degradation products. **Bioresource Technology**, v. 308, p. 1-10, 2020a, 123271. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.123271>.

ZHANG, Jiubing *et al.* Enhanced removal of crystal violet in water using a facile-fabricated and environmental-friendly laccase immobilized composite membrane. **Process Biochemistry**, v. 98, p. 122-130, 2020b. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2020.07.021>.

ZHOU, Wenting; ZHANG, Wenxiang; CAI, Yanpeng. Laccase immobilization for water purification: A comprehensive review. **Chemical Engineering Journal**, v. 403, p. 1-15, 2021, 126272. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2020.126272>.

## Autores

Emanuelli Backes<sup>1</sup>, Rosane Marina Peralta<sup>1,2</sup>

1. Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, Universidade Estadual de Maringá. Email: [emanuelibackes@outlook.com](mailto:emanuelibackes@outlook.com); [pg54382@uem.br](mailto:pg54382@uem.br).
2. Programa de Pós-graduação em Biotecnologia Ambiental e Programa de Pós-graduação em Bioquímica, Universidade Estadual de Maringá. E-mail: [rmperalta@uem.br](mailto:rmperalta@uem.br).