



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA HIDRÁULICA E AMBIENTAL
PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA CIVIL-SANEAMENTO AMBIENTAL

ANA KÁTIA DE SOUSA BRAZ

**IMOBILIZAÇÃO DE LACASE EM NANOCOMPÓSITOS MAGNÉTICOS COM
POTENCIAL APLICAÇÃO PARA REMOÇÃO DE CORANTES EM EFLUENTE
TÊXTIL**

FORTALEZA

2023

ANA KÁTIA DE SOUSA BRAZ

**IMOBILIZAÇÃO DE LACASE EM NANOCOMPÓSITOS MAGNÉTICOS COM
POTENCIAL APLICAÇÃO PARA REMOÇÃO DE CORANTES EM EFLUENTE
TÊXTIL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Civil da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Engenharia Civil. Área de concentração: Saneamento Ambiental.

Orientador: Prof. Dr. Ronaldo Ferreira Nascimento.

Coorientador: Prof. Dr. José Cleiton Sousa dos Santos.

FORTALEZA

2023

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Sistema de Bibliotecas

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

B839i Braz, Ana Kátia de Sousa.
Imobilização de lacase em nanocompósitos magnéticos com potencial aplicação para remoção de corantes em efluente têxtil / Ana Kátia de Sousa Braz. – 2023.
146 f. : il. color.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Tecnologia, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Civil: Recursos Hídricos, Fortaleza, 2023.

Orientação: Prof. Dr. Ronaldo Ferreira Nascimento.

Coorientação: Prof. Dr. José Cleiton Sousa dos Santos.

1. Nanocompósitos. 2. Lacase. 3. Imobilização. 4. Poluentes recalcitrantes. 5. Corante têxtil. I. Título.

CDD 627

ANA KÁTIA DE SOUSA BRAZ

**IMOBILIZAÇÃO DE LACASE EM NANOCOMPÓSITOS MAGNÉTICOS COM
POTENCIAL APLICAÇÃO PARA REMOÇÃO DE CORANTES EM EFLUENTE
TÊXTIL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Civil da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Engenharia Civil. Área de concentração: Saneamento Ambiental.

Aprovada em: 29/08/2023.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Ronaldo Ferreira do Nascimento (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Fernando Jose Araújo da Silva
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof^ª. Dr^ª. Denise Cavalcante Hissa
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof^ª. Dr^ª. Carla Bastos Vidal
Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR)

Prof. Dr. José Cleiton Sousa dos Santos (Coorientador)
Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira (UNILAB)

Prof. Dr. Othon Souto Campos
Universidade Federal do Espírito Santo (UFES)

À Jesus Cristo!
Aos meus pais!
Aos meus irmãos!
Dedico.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Senhor Jesus, pela oportunidade que me foi concedida para realizar esse curso, a despeito dos difíceis obstáculos que tive de superar, com força, fé e determinação.

Agradeço a Antônia, minha mãe, pelo seu amor, dedicação e sacrifício ao decorrer dos meus estudos. Ao meu pai, Paulo Braz, pelo apoio incondicional e também aos meus irmãos Charles, Paulinho e Dalton pelos choros, risadas, conselhos, críticas, enfim, por tudo, vocês são meus amores.

Aos meus parentes e amigos que de alguma forma contribuíram para meu êxito acadêmico e profissional, compreendendo minha ausência e me dando apoio e incentivo. Em especial às amigas Katiúcia e sua mãe Fransquinha, Renata e Célia, amigas em todos os momentos.

Agradeço ao meu orientador prof. Dr. Ronaldo Ferreira do Nascimento que sempre procurou conduzir meu trabalho com paciência e dedicação, e por toda a infraestrutura que me propiciou. E ao meu coorientador prof. Dr. José Cleiton de Sousa Santos, que nunca permitiu que as dificuldades do processo de criação atingissem ou modificassem o nosso entusiasmo, propósito e objetivos durante toda esta jornada.

Aos professores do curso de Mestrado em Engenharia Civil, do Departamento De Engenharia Hidráulica e Ambiental (DEHA), da Universidade Federal do Ceará, pelos conhecimentos compartilhados e também por generosas acolhidas durante todo o curso. Em especial, ao professor Fernando José Araújo da Silva e ao professor Raimundo Oliveira de Souza (*in memoriam*) pelas conversas e conselho de corredores.

Aos Laboratórios da UFC: GQMAT, GRINTEQUI, LABIC, raios X, LABOSAN pelo auxílio nas análises físico-químicas da tese e pelo material cedido para as essas análises.

A todos os colegas do LANAGUA, LAT e LABPOA pelo apoio, pela amizade e aprendizado mútuo. Em especial aos colegas da Pós-graduação da Química e Engenharia Química: Juliana Serpa, Victor Moreira, Roberta Busson, Rafael Melo, Simão Neto, Rodolpho Monteiro e Tiago Rocha. Como também, ao João Vítor Torres Sousa, nos auxílios dos experimentos.

A todos que de alguma contribuíram a conclusão desse trabalho.

Aos órgãos de fomento: Conselho Nacional de Desenvolvimento e Pesquisa (CNPQ), Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)

e Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP), pelo financiamento às pesquisas efetuadas durante o doutorado.

À Universidade Federal do Ceará pela oportunidade de fazer o doutorado.

À Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira, bem como aos gestores da instituição, corpo docente e técnico, pelo apoio e a oportunidade de cursar a pós-graduação, tão primordial para meu desenvolvimento profissional.

“Dêem graças ao Senhor porque ele é bom; o seu amor dura
para sempre.”

Bíblia Sagrada - Salmos 107:1.

RESUMO

O uso de enzimas na biodegradação de contaminantes ambientais, vem despertando grande interesse com o aumento de poluentes orgânicos recalcitrantes na água. Dentre os poluentes presentes na água estão os corantes sintéticos, um dos poluentes mais comuns e frequentemente encontrados no efluente da indústria têxtil. Sua destinação final é de extrema importância do ponto de vista ambiental, pois mesmo em baixíssimas concentrações os corantes podem ser altamente tóxicos para sistemas aquáticos. As enzimas lacases têm alcançado destaque por degradar esses tipos de poluentes. A lacase catalisa a oxidação de polifenóis, compostos aromáticos; além disso, possuem muitas aplicações, o que torna esta enzima atrativa para aplicações ambientais. No entanto, as lacases livres apresentam desvantagens como alto custo de produção, perda de estabilidade, não sendo possível a recuperação e a reutilização destas para tornar o processo economicamente viável. Tais problemas podem ser superados quando técnicas apropriadas de imobilização são empregadas. Desta forma, estudou-se a imobilização da lacase em nanocompósitos magnéticos revestidos com quitosana. Na primeira abordagem deste trabalho, teve como objetivo estudar as propriedades bioquímicas e físico-químicas da lacase do fungo *Aspergillus* sp., a fim de fornecer informações iniciais importantes para estudos básicos e para a aplicação da lacase. Na segunda abordagem desse trabalho, com o objetivo de maximizar a recuperação de atividade enzimática, estudou-se as melhores condições da imobilização da enzima. Dessa forma, as lacases imobilizadas em nanocompósitos magnéticos revestidos com quitosana, foram preparadas seguindo diferentes combinações de carga enzimática, pH, força iônica e tempo; e, posteriormente caracterizadas pelas técnicas de DRX, FTIR, TGA, FRX, MEV e VSM. Finalmente, a enzima e, os biocatalisadores produzidos nas melhores condições do planejamento experimental, foram usados na degradação de corantes C.I. *Reactive Blue 19* e C.I. *Reactive Blue 250*, respectivamente. Os biocatalisadores promoveram uma maior remoção dos contaminantes, com $96,24 \pm 0,56$ % do C.I. *Reactive Blue 250*; em comparação com a enzima livre, que removeu $72,76 \pm 1,12$ % do C.I. *Reactive Blue 19*, nas condições testadas.

Palavras-chave: Nanocompósitos; Lacase; Imobilização; Poluentes recalcitrantes; Corante têxtil.

ABSTRACT

The use of enzymes in biodegradation of environmental contaminants has aroused great interest, with the increase in recalcitrant organic pollutants in water. Among the pollutants present in water are synthetic dyes, one of the most common pollutants and frequently found in the effluent of the textile industry. Their final destination is extremely important from an environmental point of view, because even at very low concentrations, dyes can be highly toxic to aquatic systems. Laccase enzymes have achieved prominence for degrading these types of pollutants. Laccase catalyzes the oxidation of polyphenols, aromatic compounds; moreover, they have many applications, which makes this enzyme attractive for environmental applications. However, free laccases have disadvantages such as high production cost, loss of stability, and it is not possible to recover and reuse them to make the process economically viable. Such problems can be overcome when proper immobilization techniques are employed. Thus, the immobilization of laccase in magnetic nanocomposites coated with chitosan was studied. In the first approach of this work, the objective was to study the biochemical and physical-chemical properties of laccase from the fungus *Aspergillus* sp., in order to provide important initial information for basic studies and for the application of laccase. In the second approach of this work, with the objective of maximizing the recovery of enzymatic activity, the best conditions for enzyme immobilization were studied. Thus, laccases immobilized on magnetic nanocomposites coated with chitosan were prepared following different combinations of enzymatic charge, pH, ionic strength and time; and later characterized by the techniques of DRX, FTIR, TGA, FRX, MEV and VSM. Finally, the enzyme and the biocatalysts produced under the best conditions of the experimental design were used in the degradation of C.I. *Reactive Blue* 19 and C.I. *Reactive Blue* 250 dyes, respectively. Biocatalysts promoted greater removal of contaminants, with 96.24 ± 0.56 of C.I. *Reactive Blue* 250; compared to the free enzyme, which removed $72.76 \pm 1.12\%$ of C.I. *Reactive Blue* 19 under the conditions tested.

Keywords: Nanocomposites; Laccase; Immobilization; Recalcitrant pollutants; Textile dye.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Diferentes categorias de corantes e suas possíveis aplicações industriais.	25
Figura 2 – (a) Estrutura geral de um corante orgânico; (b) fórmula estrutural do Blue Trypan.	26
Figura 3 – Exemplos de interações de fixação da molécula do corante em fibras têxteis.	30
Figura 4 – Diagrama da fórmula geral dos corantes reativos.	37
Figura 5 – Reação entre o corante reativo e as fibras têxteis.	37
Figura 6 – Impactos ecotoxicológicos de efluentes têxteis contendo corantes no meio ambiente e nos microrganismos vivos.	39
Figura 7 – Impactos negativos dos corantes têxteis na saúde humana desde a dermatite até o sistema nervoso central.	41
Figura 8 – Métodos atuais para remoção de corantes.	43
Figura 9 – Estrutura química do C.I. <i>Reactive Blue</i> 250.	48
Figura 10 – Estrutura química do C.I. <i>Reactive Blue</i> 19.	50
Figura 11 – Representação da enzima Lacase e seu sítio catalítico. (a) Estrutura cristalina da Lacase a partir do Protein Data Bank; (b) sítio catalítico da Lacase Tipo-1 (T1); (c) sítios catalíticos da Lacase Tipo-2 (T2) e Tipo-3 (T3); e (d) representação esquemática do sistema de oxidação do ciclo catalítico.	52
Figura 12 – Via de degradação proposta de corantes azo por lacase. Tais atividades foram propostas para o ascomiceto <i>Pyricularia oryzae</i>	53
Figura 13 – Métodos usados para imobilização de Lacase e a escolha da matriz adequada para sua imobilização.	56
Figura 14 – Diagrama esquemático de alguns métodos de imobilização de Lacase.	57
Figura 15 – Os materiais nanocompósitos para imobilização de Lacase e suas aplicações na remoção da poluição da água.	60
Figura 16 – Representação e classificação dos diferentes tipos de materiais magnéticos.	62
Figura 17 – Representação esquemática das interações de spin de $\text{FeO} \cdot \text{Fe}_2\text{O}_3$	63
Figura 18 – Curvas de magnetização (a) predominantemente reversível e (b) onde há processos irreversíveis caracterizando a formação de uma histerese.	64
Figura 19 – A magnetização (M) versus força do campo magnético aplicado (H), onde M_s é a magnetização de saturação, M_r é a magnetização remanescente e H_C é a coercividade.	65
Figura 20 – Extração de quitina de recursos naturais e sua conversão em quitosana.	67

Figura 21 – Representação esquemática da preparação de nanocompósitos de Fe ₃ O ₄ -CHI por ultrassom e seu arranjo estrutural final.....	69
Figura 22 – Ilustração esquemática do estudo do efeito da temperatura na atividade da Lacase.	82
Figura 23 – Ilustração esquemática do ensaio de degradação de corante RB19.....	83
Figura 24 – Titulador potenciométrico automático utilizado nos experimentos.....	85
Figura 25 – Estudo do efeito da temperatura (30°C a 70°C) na enzima livre.....	87
Figura 26 – Curva de titulação potenciométrica da molécula RB19 em função do volume de HCl padronizado adicionado à célula (curva preta) e curva de derivada primeira da curva de titulação (curva vermelha).....	88
Figura 27 – (a) Distribuição teórica das microespécies do RB19 de acordo com a variação de pH sendo a linha azul correspondente a molécula não ionizada e a vermelha sua microespécie ionizada. (b) Zoom da microespécie preponderante, indicada na linha azul.....	91
Figura 28 – Varredura espectral do RB19 em função do pH.	92
Figura 29 – Estudo do efeito do pH na descoloração do corante.	93
Figura 30 – Tempo de descoloração do corante RB19 por Lacase livre com concentração do corante de 12,5 mg L ⁻¹	94
Figura 31 – Pose 3 do docking cego entre Lacase e RB19.	98
Figura 32 – Pose 5 do docking cego entre Lacase e RB19.	99
Figura 33 – Pose 6 do docking cego entre Lacase e RB19.	99
Figura 34 – Ilustração esquemática da imobilização de Lacase no suporte funcional MNP@CHI-GLU.	109
Figura 35 – Ilustração esquemática do estudo do efeito do pH na Lacase solúvel e imobilizada.	112
Figura 36 – Ilustração esquemática do estudo de estabilidade de armazenamento da Lacase imobilizada.	113
Figura 37 – Esquema 3D de um VSM.....	116
Figura 38 – Razões S/N para carga de proteína, força iônica (FI), pH e tempo para otimização da imobilização MNP@CHI-GLU-LAC.....	109
Figura 39 – Superfície de contorno para a imobilização de MNP@CHI-GLU-LAC, demonstrando carga de proteína (mg g ⁻¹) versus pH, levando em consideração a atividade do biocatalisador como resposta.....	110
Figura 40 – Efeito da quantidade de LAC nos nanocompósitos magnéticos revestidos e ativados.....	111

Figura 41 – O efeito da temperatura (condições de reação: tampão acetato 95 mM a pH 4) na Lacase livre e imobilizada. Cada ponto representa a média de três experimentos \pm SD.	113
Figura 42 – O efeito do pH (condições de reação: tampão acetato 95 mM a 25°C) na Lacase livre e imobilizada. Cada ponto representa a média de três experimentos \pm SD.	114
Figura 43 – DRX das amostras sintetizadas.	115
Figura 44 – FTIR das amostras sintetizadas.	116
Figura 45 – Curva de (a) TG e (b) DTG das amostras sintetizadas.	117
Figura 46 – Imagens MEV e composição dos espectros FRX de (a) CHI, (b) MNP@CHI, (c) MNP@CHI-GLU e (d) MNP@CHI-GLU-LAC.	120
Figura 47 – Fotografias das amostras de MNP@CHI-GLU-LAC: (a) na ausência de um ímã, (b) após a aproximação de um ímã por 30s na horizontal e (c) após a aproximação de um ímã por 30s na vertical.	121
Figura 48 – Análise VSM para o suporte e a Lacase imobilizada no suporte.	122
Figura 49 – Potencial de reutilização da Lacase imobilizada em ciclos de oxidação do guaiacol.	123
Figura 50 – Estabilidade da Lacase imobilizada no suporte modificado em armazenamento durante 30 dias, sob 4°C.	125
Figura 51 – Tempo de descoloração do corante RB250 por Lacase imobilizada, concentração do corante 20,5 mg L ⁻¹	127

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – A relação entre a cor e o comprimento de onda da luz absorvida em corantes orgânicos.....	28
Tabela 2 – Interações básicas que podem ocorrer na fixação da molécula do corante em fibras têxteis.....	29
Tabela 3 – Classificação de corantes com base no uso têxtil, constituição química e solubilidade.....	32
Tabela 4 – Energias de aproximações do sítio catalítico da enzima.....	97
Tabela 5 – Fatores independentes e seus respectivos níveis para a imobilização da LAC em MNP@CHI-GLU.	109
Tabela 6 – Descritivo de matriz ortogonal L9 junto com os valores de atividade MNP@CHI-GLU-LAC e as razões S/N.	108
Tabela 7 – Tabela de resposta das razões sinal-ruído.....	109

SUMÁRIO

Capítulo 1	<i>Introdução e Objetivos</i>	17
1.1	Introdução	17
1.2	Objetivo geral	20
1.1.1	<i>Objetivos específicos</i>	20
1.3	Referências	21
Capítulo 2	<i>Revisão Bibliográfica</i>	24
2.1	Materiais corantes	24
2.1.1	<i>Uso de corantes na indústria têxtil</i>	31
2.1.2	<i>Corantes reativos</i>	36
2.2	Poluição com corantes têxteis	38
2.3	Tecnologias de tratamento de efluentes contendo corantes têxteis	42
2.4	Biodegradação de corantes usando enzimas	45
2.4.1	<i>Corantes em estudo</i>	46
2.4.2	<i>Lacase</i>	50
2.5	Imobilização da Lacase	54
2.5.1	<i>Nanocompósitos magnéticos (NCM)</i>	59
2.5.1.1	<i>MNPs e suas propriedades magnéticas</i>	61
2.5.1.1.1	<i>Visão geral da estrutura das ferromagnetistas</i>	63
2.5.1.1.2	<i>Histerese Magnética</i>	63
2.5.1.2	<i>Nanopartículas de magnetita revestidas com quitosana</i>	66
2.6	Referências	69
Capítulo 3	<i>Compreendendo a biodegradação de corante antraquinona pela Lacase de <i>Aspergillus sp.</i>: teórico e experimental</i>	78
3.1	Resumo	78
3.2	Introdução	79
3.3	Materiais e Métodos	80
3.3.1	<i>Determinação da atividade enzimática</i>	80
3.3.2	<i>Propriedades da enzima Lacase</i>	81
3.3.2.1	<i>Ponto isoelétrico da enzima</i>	81
3.3.2.2	<i>Efeito da temperatura na atividade da Lacase</i>	81
3.3.3	<i>Propriedades do corante Reactive Blue 19</i>	82

3.3.3.1 Teste de estabilidade do corante em função do pH.....	82
3.3.3.2 Efeitos do pH na descoloração do corante	83
3.3.3.3 Ensaio de degradação de corante	83
3.3.4 Equilíbrio ácido-base do corante	84
3.3.4.1 Titulação potenciométrica.....	84
3.3.4.2 Microespécies – estudo teórico	85
3.3.5 Estudo in silico.....	85
3.3.5.1 Preparo da proteína e obtenção do ligante.....	86
3.3.5.2 Docking molecular	86
3.4 Resultados e Discussões.....	86
3.4.1 Propriedades da enzima Lacase	86
3.4.1.1 Ponto isoelétrico da enzima	86
3.4.1.2 Efeito da temperatura sobre a atividade da Lacase.....	87
3.4.2 Equilíbrio ácido-base do corante	88
3.4.3 Propriedades do corante Reactive Blue 19	92
3.4.3.1 Teste de estabilidade do corante em função do pH.....	92
3.4.3.2 Efeito do pH na descoloração do corante	93
3.4.3.3 Uso de Lacase livre para descoloração de corante	94
3.4.4 Estudo in silico.....	96
3.4.4.1 Interação entre o corante e a Lacase	96
3.5 Conclusão	100
3.6 Referências	100
Capítulo 4 Biocatalisador híbrido para imobilização da Lacase de <i>Aspergillus sp.</i> com potencial aplicação na biodegradação de corante têxtil	104
4.1 Resumo	104
4.2 Introdução	105
4.3 Materiais e Métodos	107
4.3.1 Preparação dos nanocompósitos magnéticos de magnetita e funcionalização numa etapa rápida.....	108
4.3.2 Ativação dos nanocompósitos magnéticos revestidos com quitosana	108
4.3.3 Estudo de imobilização da Lacase de <i>Aspergillus sp.</i> em suporte MNP@CHI-GLU	108
4.3.4 Determinação da atividade enzimática e concentração de proteínas	110
4.3.5 Parâmetros de imobilização	111
4.3.6 Efeito da concentração da enzima sobre a imobilização da Lacase	111

4.3.7 Efeito do pH na Lacase solúvel e imobilizada.....	111
4.3.8 Efeito da temperatura na atividade da enzima solúvel e imobilizada.....	112
4.3.9 Ensaio de degradação de corante	112
4.3.10 Estabilidade de armazenamento da Lacase imobilizada.....	113
4.3.11 Reutilização de Lacase imobilizada	114
4.4 Instrumentação	114
4.4.1 Difração de raios X (DRX)	114
4.4.2 Espectroscopia de absorção na região do infravermelho (FTIR)	114
4.4.3 Análise termogravimétrica (TG)	115
4.4.4 Microscopia eletrônica de varredura (MEV) e espectroscopia de fluorescência de raios X (FRX).....	115
4.4.5 Magnetômetro de amostra vibrante (VSM)	115
4.5 Resultados e Discussões.....	116
4.5.1 Imobilização de Lacase em nanocompósitos	116
4.5.2 Efeito da concentração da enzima sobre a imobilização da Lacase	111
4.5.3 Efeito do pH e da temperatura sobre a atividade da Lacase livre e imobilizada	112
4.5.4 Caracterização dos nanocompósitos e biocatalisadores.....	114
4.5.4.1 Análise de DRX.....	114
4.5.4.2 Análise de FTIR.....	115
4.5.4.3 Análise de TG	116
4.5.4.4 Análise de MEV e FRX.....	118
4.5.4.5 Análise de VSM.....	120
4.5.4.6 Estabilidade de armazenamento e reutilização de Lacase imobilizada.....	123
4.5.4.7 Uso de Lacase imobilizada para descoloração de corante.....	126
4.6 Conclusão	128
4.7 Referências	129
Capítulo 5 Considerações Finais	134
5.1 Considerações Finais	134

Capítulo 1

Introdução e Objetivos

1.1 Introdução

Com o crescimento acelerado da população e da industrialização houve um rápido aumento da contaminação dos corpos de água em todo o mundo (JAWAD *et al.*, 2023; ISLAM *et al.*, 2023). A disponibilidade de água segura e limpa é um grande problema global, onde diferentes tipos de poluentes degradam a qualidade da água ao longo do tempo e levam a vários problemas de saúde (KOLAK *et al.*, 2023). A urbanização e a melhoria dos padrões de vida das pessoas aumentaram significativamente a demanda por tecidos (CHRISTIAN *et al.*, 2023), sendo que uma das principais fontes de poluição hídrica mundial são as águas residuais têxteis devido ao grande consumo de água e descarte de materiais corantes no efluente (GOSSEN *et al.*, 2023; ISLAM *et al.*, 2023; KOLAK *et al.*, 2023).

A indústria têxtil desempenha um papel significativo no desenvolvimento econômico de qualquer país (WTO, 2022). No Brasil, indústria têxtil e da confecção impacta cerca de 8 milhões de pessoas, direta e indiretamente, por meio de trabalho formal e geração de renda, tendo atingido um volume de produção têxtil de 2,16 milhões de toneladas em 2021 (ABIT, 2023). A indústria têxtil pode ser dividida em dois grupos: indústrias de tecidos secos geradores de resíduos sólidos e indústrias de tecidos úmidos geradores de resíduos líquidos (CHRISTIAN *et al.*, 2023).

De acordo com o banco mundial, 20% das águas residuais geradas globalmente são provenientes do processamento úmido de têxteis (THE WORLD BANK, 2019), onde diversos produtos químicos são usados nesse processo (GOSSEN *et al.*, 2023). As águas residuais das fábricas de tingimento são um contribuinte significativo para as águas residuais têxteis (MU; XU; YANG, 2023). Segundo dados do Programa das Nações Unidas para o Meio Ambiente (Pnuma), são necessários 3.781 litros de água para fazer uma calça jeans, desde a produção do algodão até a entrega do produto final na loja (THE WORLD BANK, 2019). A água é utilizada

principalmente para aplicar os corantes nas fibras e na lavagem dos produtos acabados, gerando efluentes altamente concentrados em produtos químicos e corantes (GOSSEN *et al.*, 2023). No tingimento têxtil convencional, uma tonelada de tecido pode resultar na poluição de até 200 toneladas de água (LARA; CABRAL; CUNHA, 2022).

A contaminação ambiental provocada pela descarga de águas residuais das indústrias têxteis é uma preocupação crescente em escala global (SUDARSHAN *et al.*, 2023). Atualmente a poluição da água é um dos problemas mais graves do mundo. As indústrias têxteis acabam desempenhando um papel importante na poluição da água quando não tratam adequadamente seus efluentes (ESKIKAYA *et al.*, 2023). A indústria de tingimento têxtil é um dos principais contribuintes para a contaminação ambiental entre os setores consumidores de corantes, pois como durante esse processo, cerca de 10 a 15% do corante geralmente não permanece fixado, essa fração é liberada diretamente no efluente industrial. Assim, 2 a 20% dos corantes usados são descartados diretamente como efluentes aquosos em corpos d'água e, uma vez que o valor tintorial do corante é alto, mesmo pequenas concentrações de corante ($< 1 \text{ mg L}^{-1}$) acabam produzindo coloração visível dos corpos d'água, tornando a água imprópria para consumo humano (SUDARSHAN *et al.*, 2023).

A descarga de águas residuais não tratadas ou insuficientemente tratadas em corpos d'água pode desencadear altos níveis de poluição, impactando severamente o meio ambiente e a saúde humana (GOSSEN *et al.*, 2023). A descarga de efluentes da indústria têxtil no reservatório aquático afeta sua demanda bioquímica de oxigênio (DBO), demanda química de oxigênio (DQO), sólidos totais dissolvidos (STD), sólidos suspensos totais (SST) e pH (ISLAM *et al.*, 2023). As águas residuais geradas pela indústria têxtil consistem em uma mistura de diversos poluentes, sendo que dependendo do tipo de equipamento utilizado, processo, tecido produzido, produtos químicos utilizados, estação do ano, tendência da moda, etc., as características dos efluentes têxteis acabam diferindo de indústria para indústria (CHRISTIAN *et al.*, 2023).

Os corantes são responsáveis pelos principais problemas ambientais no mundo devido à sua ampla produção e uso extensivo em diferentes campos (NACHIYAR *et al.*, 2023). O uso de corantes aumenta de acordo com a demanda no setor industrial em expansão, o que pode resultar em grandes volumes de efluentes contendo corantes (KHAN *et al.*, 2023a). Os corantes usados na indústria têxtil não se ligam adequadamente ao tecido e acabam sendo descartados como efluentes em corpos d'água (CHRISTIAN *et al.*, 2023). Os corantes são compostos persistente e refratários, que contribuem para questões estéticas, impedem a penetração de luz e a transferência de oxigênio em meio aquoso (KHAN *et al.*, 2023b). O

tratamento desse efluente é de extrema importância antes de seu lançamento nos corpos hídricos, pois pode contaminar os *habitats* aquáticos e causar danos à vida aquática (CHRISTIAN *et al.*, 2023).

Os corantes sintéticos normalmente têm estruturas complexas com maior grau de estabilidade e menor biodegradabilidade, podendo ter vários impactos negativos sobre os organismos vivos, como a destruição do ambiente aquático (pela redução da atividade fotossintética) e problemas de saúde (por exemplo, carcinogenicidade e toxicidade) (JAWAD *et al.*, 2023). Os contaminantes tóxicos e nocivos devem ser removidos das águas residuais têxteis para reduzir a extensão da poluição ambiental causada quando as águas residuais têxteis são lançadas nos rios ou reutilizadas (WANG; JIANG; GAO, 2022).

Os corantes industriais são poluentes recalcitrantes, exigindo o desenvolvimento de soluções sustentáveis para sua degradação (ZHANG *et al.*, 2023). Por exemplo, o corante sintético C.I. *Reactive Blue* 19 é um poluente perigoso com alta solubilidade em água que resiste à degradação, é classificado como um corante aniônico que é comumente usado como material de partida para a síntese de corantes poliméricos, sendo categorizado como um organopoluente recalcitrante e representa um risco tanto para as pessoas quanto para outros organismos vivos (REGHIOUA *et al.*, 2021; JAWAD *et al.*, 2022; JAWAD *et al.*, 2023). O corante C.I. *Reactive Blue* 250 é solúvel em água e difícil de ser degradado (NIPPES *et al.*, 2022), e pertence a uma das classes mais utilizada em processos de tingimento industrial, sendo geralmente persistente em efluentes industriais finais (FERNANDES *et al.*, 2019).

Os efluentes gerados pela indústria têxtil necessitam passar por um tratamento eficaz antes de serem dispostos no meio ambiente (WANG; JIANG; GAO, 2022), porém, as águas residuais têxteis são uma das mais difíceis de tratar (WANG; JIANG; GAO, 2022; GOSSSEN *et al.*, 2023). Como vários produtos químicos e matérias-primas podem ser usados na indústria têxtil, a seleção de técnicas específicas é um desafio (CHRISTIAN *et al.*, 2023). Apesar do desenvolvimento de novas tecnologias de tingimento mais limpas, os problemas relacionados às descargas de corantes não foram completamente resolvidos (MU; XU; YANG, 2023). Embora o campo de tratamento de águas residuais têxteis tenha feito um enorme progresso, os métodos de tratamento desenvolvidos devem ser melhorados para torná-los economicamente viáveis e amigáveis (WANG; JIANG; GAO, 2022). A remoção dos corantes pode ser realizada usando uma variedade de metodologias, incluindo coagulação/floculação, troca iônica, fotodegradação, adsorção e biodegradação (JAWAD *et al.*, 2022).

Diferentes técnicas de remoção de corantes têm sido desenvolvidas, entre as quais a biodegradação pela enzima lacase tem se destacado (COELHO *et al.*, 2023; NASEEM *et al.*,

2023; PHAM *et al.*, 2023; RODRIGUES *et al.*, 2023). A lacase é um catalisador verde que possui alta atividade catalítica, gera subprodutos menos tóxicos e tem sido amplamente pesquisada na área de remediação de corantes (NASEEM *et al.*, 2023). No entanto, a atividade catalítica significativa da lacase só pode ser alcançada após uma etapa de imobilização eficaz, que ajuda a fortalecer e estabilizar a estrutura proteica da lacase, melhorando assim suas propriedades funcionais (NASEEM *et al.*, 2023, HUANG *et al.*, 2023) e para manter a atividade enzimática em condições extremas (MAFTOON; TARA VATI; TOHIDI, 2023).

Para aplicações industriais, é desejável que uma enzima seja robusta, estável e principalmente insolúvel, onde tais características são obtidas pela imobilização de enzimas em suportes sólidos (SILVEIRA *et al.*, 2020). A fim de facilitar a aplicação da lacase, diferentes estratégias de imobilização, como agregados enzimáticos reticulados (CLEAs), nanoflores e suportes magnéticos, têm sido exploradas para aumentar sua estabilidade e reciclabilidade (HAN *et al.*, 2022).

A redução da perda da lacase (RODRIGUES *et al.*, 2023), estabilidade e reutilização podem ser significativamente melhoradas através da imobilização (HUANG *et al.*, 2023; RODRIGUES *et al.*, 2023). As técnicas de imobilização enzimática também podem aumentar a eficiência de degradação de poluentes em sistemas mediados por lacase e melhorar sua estabilidade térmica (ZHANG *et al.*, 2023). No entanto, no processo de imobilização, muitos fatores podem levar à diminuição da atividade enzimática. Portanto, a seleção de um suporte adequado pode garantir a atividade e a utilização econômica dos catalisadores imobilizados (REN *et al.*, 2023).

1.2 Objetivo geral

Avaliar a biodegradação de corantes têxteis utilizando as enzimas lacases imobilizadas em nanocompósitos magnéticos (NCMs) de magnetita e quitosana.

1.1.1 Objetivos específicos

- Estimar as propriedades bioquímicas e físico-químicas da lacase, após imobilização em NCM sintetizadas a partir de magnetita e quitosana;
- Avaliar a mudança estrutural e cristalina das NCMs, antes e após a imobilização da lacase, por meio das técnicas de difração de raios X (DRX), fluorescência de raios X

(FRX), microscopia eletrônica de varredura (MEV), magnetômetro de amostra vibrante (VSM), termogravimetria (TG) e espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR);

- Avaliar o processo de biodegradação dos corantes têxteis C.I. *Reactive Blue* 19 e C.I. *Reactive Blue* 250 utilizando as enzimas livres e imobilizadas através de Espectrofotometria no ultravioleta-visível (UV-Vis);
- Determinar a influência das variáveis: concentração de enzima, pH, temperatura e concentração de corantes, nas reações de biodegradação dos corantes têxteis;
- Estudar estratégias de reuso dos biocatalisadores produzidos.

1.3 Referências

ABIT. Associação Brasileira da Indústria Têxtil e de Confecção. **Perfil do Setor**. São Paulo: ABIT, 2023. Disponível em: <https://www.abit.org.br/cont/perfil-do-setor>. Acesso em: 29 jun. 2023.

CHRISTIAN, D. *et al.* Recent techniques of textile industrial wastewater treatment: A review. **Materials Today: Proceedings**, [s. l.], v. 77, p. 277-285, 2023.

COELHO, G. D. *et al.* *In silico* and *in vitro* assays suggests Congo red dye degradation by a *Lentinus sp.* laccase enzyme. **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics**, [s. l.], p. 1-12, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/07391102.2023.2216282>. Acesso em: 05. jul. 2023.

ESKIKAYA, O. *et al.* Preparation of hydrochar bio-based catalyst for fenton process in dye-containing wastewater treatment. **Environmental Research**, [s. l.], v. 216, p. 114357, 2023.

FERNANDES, R. J. C. *et al.* Magnetic nanoparticles of zinc/calcium ferrite decorated with silver for photodegradation of dyes. **Materials**, [s. l.], v. 12, n. 21, p. 3582, 2019.

GOSSEN, M. *et al.* EfectroH₂O: Development and evaluation of a novel treatment technology for high-brine industrial wastewater. **Science of The Total Environment**, [s. l.], v. 883, p. 163479, 2023.

HAN, Z. *et al.* Metal-organic frameworks (MOFs): A novel platform for laccase immobilization and application. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, [s. l.], v. 10, n. 6, p. 108795, 2022.

HUANG, Y. *et al.* Laccase immobilization on hierarchical micro/nano porous chitin/graphene oxide beads prepared via Pickering emulsion template for dye decolorization. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, [s. l.], v. 661, p. 130858, 2023.

ISLAM, T. *et al.* Impact of textile dyes on health and ecosystem: A review of structure, causes, and potential solutions. **Environmental Science and Pollution Research**, [s. l.], v.

30, n. 4, p. 9207-9242, 2023.

JAWAD, A. H. *et al.* Hybrid multifunctional biocomposite of chitosan grafted benzaldehyde/montmorillonite/algae for effective removal of brilliant green and reactive blue 19 dyes: Optimization and adsorption mechanism. **Journal of Cleaner Production**, [s. l.], v. 393, p. 136334, 2023.

JAWAD, A. H. *et al.* Process optimization and adsorptive mechanism for reactive blue 19 dye by magnetic crosslinked chitosan/MgO/Fe₃O₄ biocomposite. **Journal of Polymers and the Environment**, [s. l.], v. 30, n. 7, p. 2759-2773, 2022.

KHAN, M. D. *et al.* Current perspectives, recent advancements, and efficiencies of various dye-containing wastewater treatment technologies. **Journal of Water Process Engineering**, [s. l.], v. 53, p. 103579, 2023a.

KHAN, H. *et al.* Novel modeling and optimization framework for Navy Blue adsorption onto eco-friendly magnetic geopolymer composite. **Environmental Research**, [s. l.], v. 216, p. 114346, 2023b.

KOLAK, S. *et al.* Tailor-made novel electrospun polycaprolactone/polyethyleneimine fiber membranes for laccase immobilization: An all-in-one material to biodegrade textile dyes and phenolic compounds. **Chemosphere**, [s. l.], v. 313, p. 137478, 2023.

LARA, L.; CABRAL, I.; CUNHA, J. Ecological approaches to textile dyeing: a review. **Sustainability**, [s. l.], v. 14, n. 14, p. 8353, 2022.

MAFTOON, H.; TARAVATI, A.; TOHIDI, F. Immobilization of laccase on carboxyl-functionalized chitosan-coated magnetic nanoparticles with improved stability and reusability. **Monatshefte für Chemie-Chemical Monthly**, [s. l.], v. 154, n. 2, p. 279-291, 2023.

MU, B.; XU, L.; YANG, Y. Rational fabrication of completely amorphous chitosan-formyl-sucrose sorbents with excellent durability and regenerability for high-throughput dye removal. **Chemical Engineering Journal**, [s. l.], v. 461, p. 142134, 2023.

NACHIYAR, C. V. *et al.* Developments in treatment technologies of dye-containing effluent: A review. **Case Studies in Chemical and Environmental Engineering**, [s. l.], v. 7, p. 100339, 2023.

NASEEM, S. *et al.* Immobilized laccase: an effective biocatalyst for industrial dye degradation from wastewater. **Environmental Science and Pollution Research**, [s. l.], p. 1-20, 2023.

NIPPES, R. P. *et al.* Removal of reactive blue 250 dye from aqueous medium using Cu/Fe catalyst supported on Nb₂O₅ through oxidation with H₂O₂. **Reaction Kinetics, Mechanisms and Catalysis**, [s. l.], v. 135, n. 5, p. 2697-2717, 2022.

PHAM, V. H. T. *et al.* Investigating Bio-Inspired Degradation of Toxic Dyes Using Potential Multi-Enzyme Producing Extremophiles. **Microorganisms**, [s. l.], v. 11, n. 5, p. 1273, 2023.

REGHIOUA, A. *et al.* Synthesis of Schiff's base magnetic crosslinked chitosan-

glyoxal/ZnO/Fe₃O₄ nanoparticles for enhanced adsorption of organic dye: modeling and mechanism study. **Sustainable Chemistry and Pharmacy**, [s. l.], v. 20, p. 100379, 2021.

REN, S. *et al.* Recent Progress and Future Prospects of Laccase Immobilization on MOF Supports for Industrial Applications. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, [s. l.], p. 1-16, 2023.

RODRIGUES, A. F. S *et al.* A scientometric analysis of research progress and trends in the design of laccase biocatalysts for the decolorization of synthetic dyes. **Process Biochemistry**, [s. l.], v. 126, p. 272-291, 2023.

SILVEIRA, T. R. *et al.* An efficient decolorization of methyl orange dye by laccase from *Marasmiellus palmivorus* immobilized on chitosan-coated magnetic particles. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, [s. l.], v. 30, p. 101859, 2020.

SUDARSHAN, S. *et al.* Impact of textile dyes on human health and bioremediation of textile industry effluent using microorganisms: current status and future prospects. **Journal of Applied Microbiology**, [s. l.], v. 134, n. 2, p. lxac064, 2023.

THE WORLD BANK. **How Much Do Our Wardrobes Cost to the Environment?** [S. l.], 2019. Disponível em: <https://www.worldbank.org/en/news/feature/2019/09/23/costo-modamedio-ambiente>. Acesso em: 28 jun. 2023.

WANG, X.; JIANG, J.; GAO, W. Reviewing textile wastewater produced by industries: Characteristics, environmental impacts, and treatment strategies. **Water Science and Technology**, [s. l.], v. 85, n. 7, p. 2076-2096, 2022.

WTO. World Trade Organization. **World Trade Statistical Review**. 1. ed. Geneva: WTO, 2022. Disponível em: https://www.wto.org/english/res_e/booksp_e/wtsr_2022_e.pdf. Acesso em: 29 jun 2023.

ZHANG, Y. *et al.* Computer-aided discovery of a novel thermophilic laccase for low-density polyethylene degradation. **Journal of Hazardous Materials**, [s. l.], v. 458, p. 131986, 2023.

Capítulo 2

Revisão Bibliográfica

2.1 Materiais corantes

A cor é um dos elementos da natureza que torna a vida humana mais estética e fascinante no mundo (GÜRSES *et al.*, 2016). O uso da cor marcou a história do progresso, evolução, desenvolvimento cognitivo e tecnológico da humanidade. No registro pré-histórico, a frequência de uso de diferentes cores aumentou ao longo do tempo; embora isso, tenha ocorrido de forma diferente em diversas épocas e regiões. Chegando, à obtenção de diferentes cores extraídas de fontes naturais como: carvão, ocre, plantas e insetos; sendo, portanto, uma atividade constante nas diferentes civilizações (ARDILA-LEAL *et al.*, 2021).

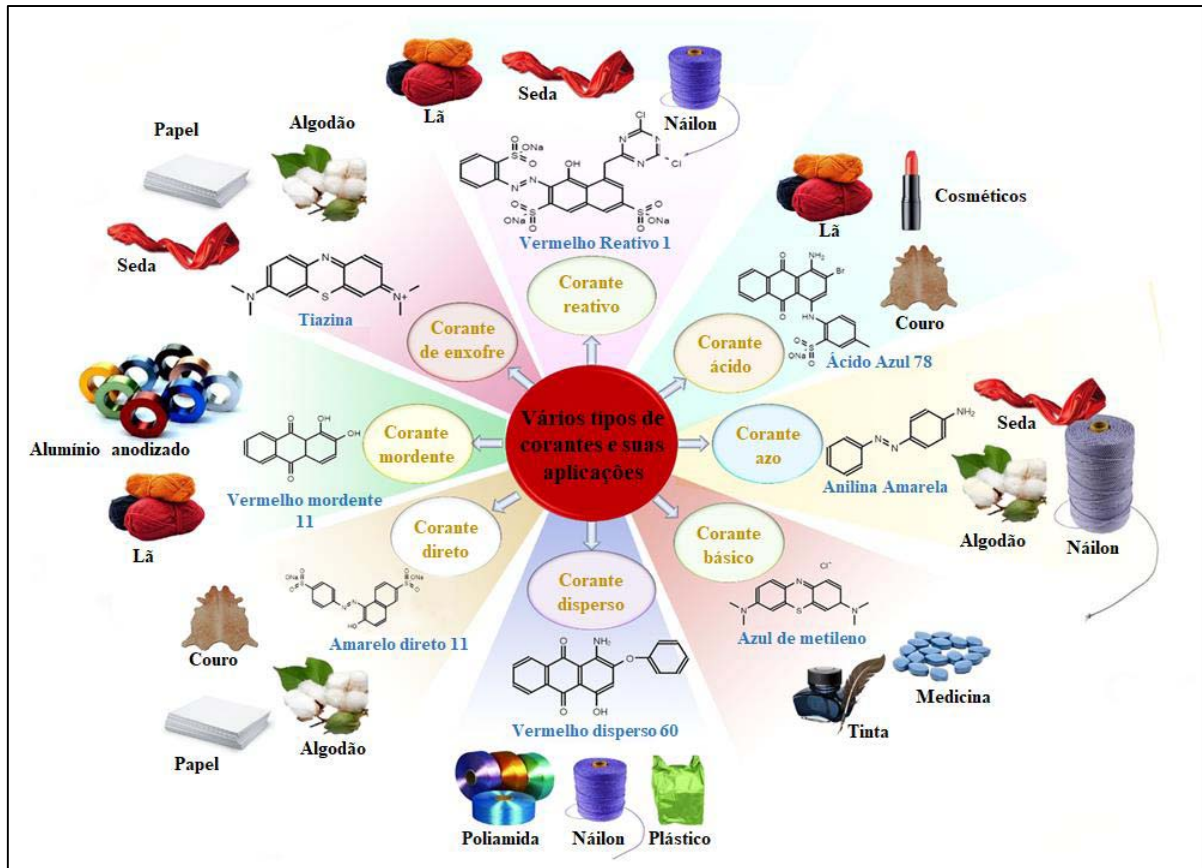
Materiais corantes são substâncias que dão cor a diversos tipos de materiais e são classificados em pigmentos e corantes. A principal diferença entre eles é a solubilidade, no qual os pigmentos são insolúveis e os corantes, são solúveis.

Os pigmentos referem-se principalmente a sais e óxidos inorgânicos, como óxidos de ferro e cromo, que geralmente são dispersos em forma de cristal ou pó em um meio de aplicação. As propriedades de cor da dispersão dependem do tamanho da partícula e da forma do pigmento. Os pigmentos tendem a ser altamente duráveis, estáveis ao calor, resistentes a solventes, resistentes à luz e de rápida migração. Por outro lado, eles também tendem a ser difíceis de processar e têm brilho e força de cor ruins.

Os corantes são convencionalmente entendidos como moléculas orgânicas dissolvidas, como cromóforos moleculares, no meio de aplicação (GÜRSES *et al.*, 2016). Assim, os corantes são substâncias coloridas que são solúveis ou se dissolvem durante o processo de aplicação e conferem cor por absorção seletiva de luz (GÜRSES *et al.*, 2016). Um corante colore ao se ligar ao substrato ao qual está sendo aplicado (PANDA *et al.*, 2021), modificando a estrutura cristalina, pelo menos momentaneamente (ISLAM *et al.*, 2023). Os corantes podem aderir a superfícies favoráveis através de ligações covalentes ou pela formação de complexos com sais ou metais, bem como adsorção física e retenção mecânica (ISLAM *et*

al., 2023). Os corantes são frequentemente divididos em várias categorias de acordo com sua origem, estrutura e aplicação, como apresenta a Figura 1 (AL-TOHAMY *et al.*, 2022).

Figura 1 – Diferentes categorias de corantes e suas possíveis aplicações industriais.

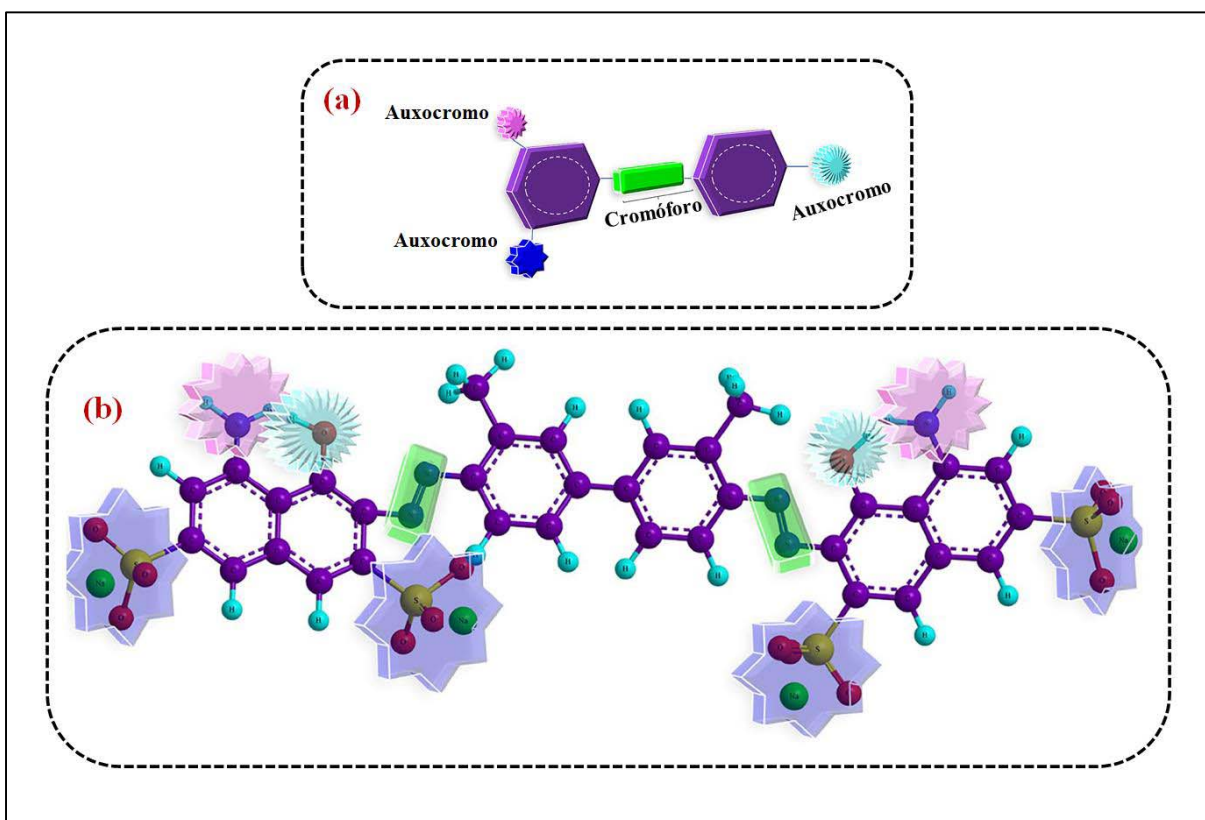


Fonte: Adaptada de Al-Tohamy *et al.* (2022).

Os corantes são geralmente classificados em dois grupos, corantes orgânicos e corantes inorgânicos. No qual, o grupo de corante orgânico subdivide-se em duas categorias: corantes orgânicos naturais e corantes orgânicos sintéticos. (MUKHERJEE; GOSWAMI; DHAK, 2023). Quase todos os corantes são compostos orgânicos aromáticos que podem ser considerados derivados do benzeno. Benzeno, naftaleno e outros hidrocarbonetos aromáticos absorvem luz no ultravioleta, mas não na faixa espectral visível, por isso são incolores (YANEVA, *et al.*, 2022). No caso dos corantes, eles são substâncias orgânicas insaturadas complexas que absorvem a luz e dão cor à região do visível (BENKHAYA; M'RABET; EL HARFI, 2020). Para absorver a luz visível, os núcleos aromáticos devem formar moléculas maiores conhecidas como cromogênios (YANEVA, *et al.*, 2022). O cromogênio é a estrutura aromática contendo anéis de benzeno, naftaleno ou antraceno (MAHAPATRA, 2016).

Os corantes são um grupo de compostos orgânicos insaturados complexos que possuem cromóforos e auxocromos como seus componentes básicos (IARC, 2010; NASEEM *et al.*, 2023). A estrutura geral de um corante é apresentada na Figura 2 (YANEVA, *et al.*, 2022). O cromóforo é um grupo químico responsável pelo aparecimento de cor nos compostos (o cromógeno) onde está localizado (GÜRSES *et al.*, 2016; NASEEM *et al.*, 2023). O cromóforo ou grupo cromóforo é responsável pelo cromogênio (GÜRSES *et al.*, 2016), que está presente em todos os corantes reativos, ácidos, diretos, básicos, sulfurados e dispersos (MUKHERJEE; GOSWAMI; DHAK, 2023), mas para ser um corante, um composto orgânico deve ser capaz de transmitir sua cor a outra substância (YANEVA, *et al.*, 2022).

Figura 2 – (a) Estrutura geral de um corante orgânico; (b) fórmula estrutural do *Blue Trypan*.



Fonte: Adaptada de Yaneva *et al.* (2022).

Uma vez que o cromogênio não é capaz de determinar uma cor particular e tonalidade, essa propriedade é obtida pela adição à molécula orgânica de um ou mais grupos substituintes de auxocromos, que são modificadores de cor do cromogênio (GÜRSES *et al.*, 2016; BENKHAYA; M'RABET; EL HARFI, 2020; YANEVA, *et al.*, 2022). Os cromóforos são comumente retiradores de elétrons, já os auxocromos geralmente são grupos liberadores de elétrons. Alguns dos radicais que podem ser encontrados em um grupo cromóforo, e que

formam a base para a classificação química dos corantes quando acoplados ao cromogênio são: azo ($-N=N-$), carbonil ($=C=O$), tiocarbonila ($-C=S$), azometino ($-N=CH-$), nitro ($-NO_2$), nitroso ($-N=O$), isonitroso ($=NOH$), isonitrila ($-C=N-$), nitrila ($-C\equiv N-$), etilênico ($-CH=CH-$) e grupos etílico ($-C\equiv C-$). Os auxocromos ionizantes incluem principalmente grupos ácidos, como sulfônico ($=SO_3H$), hidroxila (OH), ácido carboxílico (COOH), e grupos básicos como amina primária (NH_2), amônia (NH_3), amina secundária ($NHCH_3$) e amina terciária ($N(CH_3)_2$) (GÜRSES *et al.*, 2016; MAHAPATRA, 2016; BENKHAYA; M'RABET; EL HARFI, 2020; AHMOUDA; BOUDIAF; BENHAOUA, 2022).

Podem existir dois tipos de auxocromos, os coligadores, que são responsáveis pelas interações corante-substrato e que são iônicos (por exemplo, ácidos: $-SO_3-$, $-COOH$, etc., ou básicos: $-N^+$, $-NH_2$) ou não iônicos, e os não coligadores que modificam a cor (GÜRSES *et al.*, 2016). O auxocromo é um grupo funcional contendo pares de elétrons não compartilhados, que ao ser ligado a um cromóforo, causa mudanças no comprimento de onda e na intensidade de absorção. A relação direta dos grupos funcionais com o sistema π do cromóforo pode causar um aumento do comprimento de onda e, por sua vez, intensificação da absorção (YANEVA, *et al.*, 2022).

Portanto as moléculas de corante contêm cromóforos, que são a parte da molécula de corante orgânico que é responsável por sua cor (YANEVA, *et al.*, 2022; NASEEM *et al.*, 2023) ou grupo de átomos em uma molécula em que a transição eletrônica é responsável por uma determinada banda espectral (YANEVA, *et al.*, 2022), e os auxocromos, que são responsáveis por intensificar a cor do corante (KHAN *et al.*, 2023a; NASEEM *et al.*, 2023).

O comprimento de onda da luz absorvida pelos cromóforos e auxocromos determina as cores variadas que os corantes produzem (KHAN *et al.*, 2023a). A Tabela 1 mostra as relações entre o comprimento de onda do visível e a cor absorvida/observada (IARC, 2010; GÜRSES *et al.*, 2016). Ao contrário da maioria dos compostos orgânicos, os corantes possuem cor porque 1) absorvem a luz no espectro visível (400–700 nm); 2) possuem pelo menos um cromóforo (grupo de coloração); 3) possuem um sistema conjugado, ou seja, uma estrutura com ligações duplas e simples alternadas; e 4) exibem ressonância de elétrons, que é uma força estabilizadora em compostos orgânicos. Assim, a cor se perde caso falte qualquer uma dessas características na estrutura molecular. Embora os auxocromos (auxiliares de cor) não sejam responsáveis pela cor, sua presença pode alterar a cor de um corante e são usados com mais frequência para influenciar a solubilidade do corante (IARC, 2010; GÜRSES *et al.*, 2016).

Tabela 1 – A relação entre a cor e o comprimento de onda da luz absorvida em corantes orgânicos.

Comprimento de onda observado (nm)	Cor Absorvida	Cor observada
400 – 435	Violeta	Amarelo esverdeado
435 – 480	Azul	Amarelo
480 – 490	Verde azulado	Laranja
490 – 500	Azul esverdeado	Vermelho
500 – 560	Verde	Roxo
560 – 580	Amarelo esverdeado	Violeta
580 – 595	Amarelo	Azul
595 – 605	Laranja	Verde azulado
605 – 700	Vermelho	Azul esverdeado

Fonte: Adaptada de Iarc (2010) e Gürses *et al.* (2016).

Outros fatores também contribuem para a formação da cor, como a presença de um sistema conjugado estendido, gerando uma cor mais escura. Além disso, a cor é afetada pela existência de ressonância entre as moléculas, com deslocalização de carga elétrica entre os átomos conjugados. Conseqüentemente, sempre há mais de uma maneira de desenhar a estrutura de um corante (GÜRSES *et al.*, 2016). Apesar dos corantes naturais terem sido usados desde os tempos antigos para múltiplos propósitos, principalmente no campo do tingimento têxtil, a crescente demanda e custos excessivos de extração de corantes naturais impulsionaram o desenvolvimento de corantes sintéticos, que atualmente dominam o mercado têxtil (SLAMA *et al.*, 2021).

A fixação da molécula do corante em fibras têxteis, realizada em solução aquosa, pode ter basicamente quatro tipos de interações: ligações iônicas, de hidrogênio, de van der Waals e covalentes. As principais características dessas interações são apresentadas na Tabela 2. A Figura 3 denota exemplos dessas interações (GUARATINI; ZANONI, 2000). Os corantes orgânicos sintéticos podem ser distinguidos com base nas propriedades químicas e físicas, como estrutura cromógena e nos átomos ou grupo de átomos/elétrons conectados ao cromóforo (MUKHERJEE; GOSWAMI; DHAK, 2023). Com base em sua natureza iônica, os corantes podem ser aniônicos, catiônicos e não iônicos (PANDA *et al.*, 2021; NACHIYAR *et al.*, 2023).

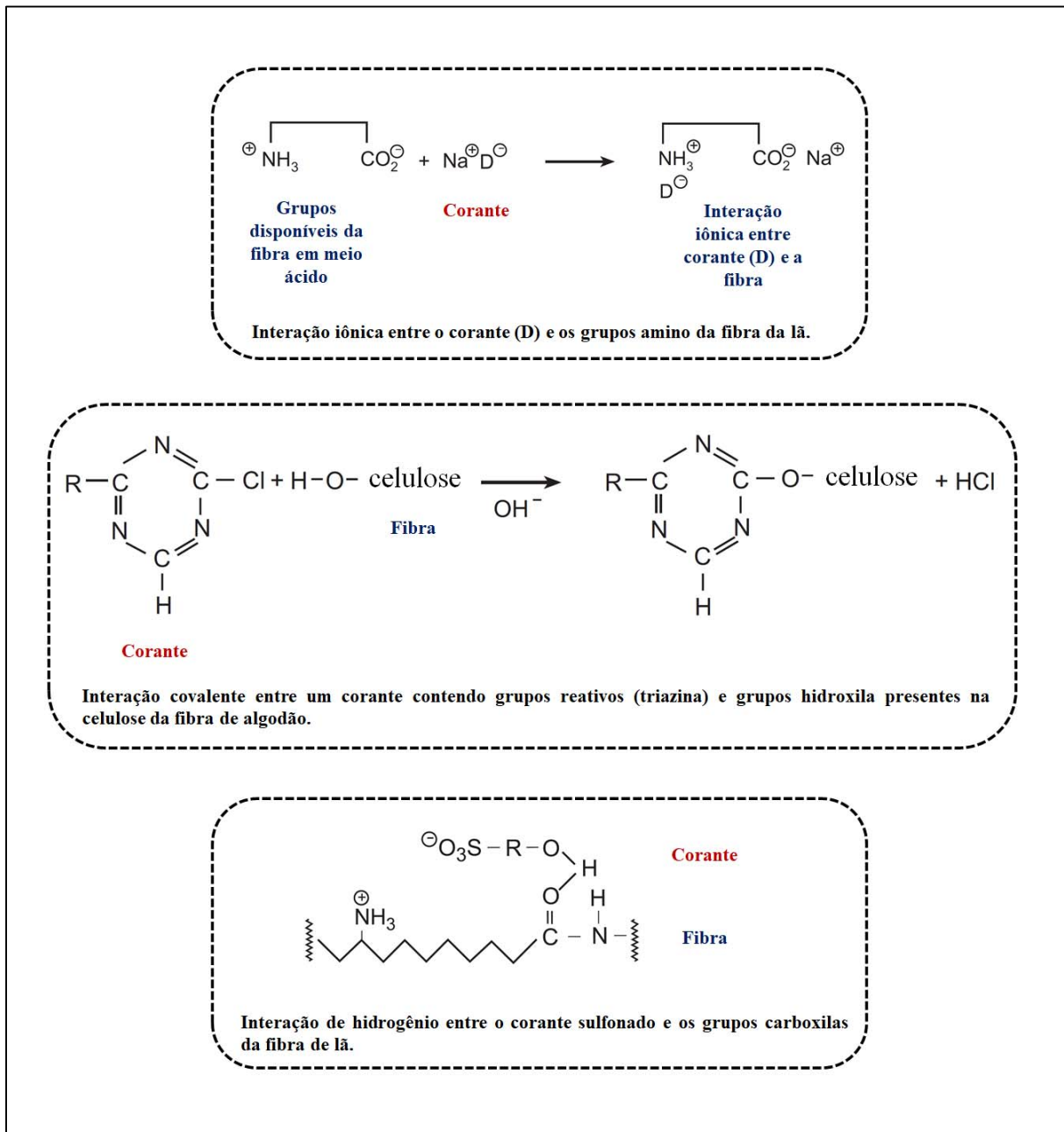
Em geral, os corantes iônicos representam um risco maior devido à sua reatividade e natureza cancerígena (PANDA *et al.*, 2021).

Tabela 2 – Interações básicas que podem ocorrer na fixação da molécula do corante em fibras têxteis.

Interação	Característica	Exemplos
Iônicas	São tingimentos baseados em interações mútuas entre o centro positivo dos grupos amino e carboxilatos presentes na fibra e a carga iônica da molécula do corante ou vice-versa.	tintura da lã, seda e poliamida
Covalentes	São provenientes da formação de uma ligação covalente entre a molécula do corante contendo grupo reativo (grupo eletrofilico) e resíduos nucleofílicos da fibra.	tinturas de fibra de algodão
Hidrogênio	São tinturas provenientes da ligação entre átomos de hidrogênio covalentemente ligados no corante e pares de elétrons livres de átomos doadores em centros presentes na fibra.	tintura de lã, seda e fibras sintéticas como acetato de celulose
van der Waals	São tingimentos baseados na interação proveniente da aproximação máxima entre orbitais p do corante e da molécula da fibra, de tal modo que as moléculas do corante são "ancoradas" firmemente sobre a fibra por um processo de afinidade, sem formar uma ligação propriamente dita. Esta atração é especialmente efetiva quando a molécula do corante é linear/longa e/ou achatada e pode assim se aproximar o máximo possível da molécula da fibra.	tintura de lã e poliéster com corantes com alta afinidade por celulose

Fonte: Adaptada de Guaratini e Zanoni (2000).

Figura 3 – Exemplos de interações de fixação da molécula do corante em fibras têxteis.



Fonte: Adaptada de Guaratini e Zanoni (2000).

Os corantes sintéticos são muito procurados devido ao rápido desenvolvimento da indústria têxtil (SUDARSHAN *et al.*, 2023). O primeiro corante sintético, a mauveína, foi sintetizada em 1856 por William Henry Perkin, que procurava uma maneira de sintetizar a quinina, uma droga usada para curar a malária (BENKHAYA; M'RABET; EL HARFI, 2020; LARA; CABRAL; CUNHA, 2022; ISLAM *et al.*, 2023; LONGONI *et al.*, 2023; SUDARSHAN *et al.*, 2023). Os primeiros corantes sintéticos eram fabricados industrialmente

a partir de moléculas orgânicas e logo substituíram os obtidos de fontes naturais (LONGONI *et al.*, 2023).

Com o avanço de uma sociedade moderna e baseada na informação, os produtos químicos sintéticos por trás da cor foram identificados, sendo que os pesquisadores já conseguem identificar os grupos funcionais em moléculas que absorvem luz na faixa de 400 a 800 nm, resultando no aparecimento da cor (KHAN *et al.*, 2023a). Mais de 10.000 variedades de corantes sintéticos estão disponíveis comercialmente, com uma produção anual de quase 800.000 toneladas (ISLAM *et al.*, 2023). Anualmente 8×10^5 toneladas de corantes são globalmente fabricadas e cerca de 200.000 toneladas deles são corantes têxteis (SLAMA *et al.*, 2021; SOLAYMAN *et al.*, 2023).

2.1.1 Uso de corantes na indústria têxtil

A indústria têxtil e de vestuário é talvez a área mais antiga, maior e estabelecida do mundo (CHAND; CHAND; RAULA, 2023), sendo que a indústria de tingimento têxtil existe há mais de 4.000 anos (BENKHAYA; M'RABET; EL HARFI, 2020; YANEVA, *et al.*, 2022; ISLAM *et al.*, 2023). A industrialização e o desenvolvimento financeiro assumem uma parte significativa no avanço de qualquer país. Nesta linha, é difícil imaginar um mundo sem têxteis, que é uma peça chave da vida quotidiana e uma área significativa na economia mundial. A indústria têxtil global foi estimada em cerca de US\$ 920 bilhões em 2018 e deve atingir aproximadamente US\$ 1.230 bilhões até 2024, representando uma taxa de crescimento anual composta constante de quase 5% durante o período de previsão (CHAND; CHAND; RAULA, 2023).

Até meados do século XIX, eram utilizados apenas corantes de origem natural (YANEVA, *et al.*, 2022). A utilização de corantes naturais representa apenas 1% do total de substratos têxteis tingidos. O uso de corantes naturais foi substancialmente reduzido, principalmente devido ao número limitado de cores, baixo rendimento, não reprodutibilidade e propriedades de solidez média. A solidez do tingimento é uma medida de sua resistência ao desbotamento, ou mudança de cor, após exposição a um determinado agente ou tratamento (LARA; CABRAL; CUNHA, 2022). O uso de corantes sintéticos aumentou exponencialmente devido à ampla gama de cores, boas propriedades de solidez, facilidade de aplicação e tonalidades reprodutíveis (LARA; CABRAL; CUNHA, 2022). A classificação do corante é mostrada na Tabela 3 com base nos usos têxteis, constituições químicas e solubilidade (ISLAM *et al.*, 2023).

Tabela 3 – Classificação de corantes com base no uso têxtil, constituição química e solubilidade.

Classificação	Com base no uso têxtil	Com base na constituição química	Com base na solubilidade		
			Solúvel		Insolúvel
			Aniônico	Catiônico	
Tipos	azóicos ácidos básicos diretos dispersos mordentes reativos de enxofre à cuba	azo de antraquinona heterocíclicos indigóides nitro de ftalocianina de polimetina de estilbeno de enxofre de trifenilmetano	ácidos diretos mordentes reativos	básicos	azo dispersos mordentes de enxofre à cuba

Fonte: Adaptada de Islam *et al.* (2023).

Existem vários tipos de corantes orgânicos usados para colorir os diversos produtos têxteis. Tais corantes possuem diferentes estruturas químicas, com propriedades químicas e físicas distintas (BENKHAYA; M'RABET; EL HARFI, 2020). As estruturas dos corantes usados na indústria têxtil são alteradas continuamente para atender aos requisitos de tonalidade de cor e obter firmeza de cor (WANG; JIANG; GAO, 2022).

O rápido desenvolvimento da indústria têxtil leva a uma grande demanda por corantes sintéticos, sendo responsável pelo uso global de mais de 50% dos corantes sintéticos (WANG *et al.*, 2022; SUDARSHAN *et al.*, 2023). Os corantes têxteis são usados para colorir e polir materiais têxteis, como fibras, fios e tecidos. Os corantes melhoram a aparência dos materiais têxteis. Na indústria de acabamento têxtil, uma grande quantidade de água e uma variedade de corantes e pigmentos são necessários para o tingimento/acabamento de materiais têxteis (ISLAM *et al.*, 2023). Particularmente na indústria têxtil, existem várias classes de corantes, e eles são selecionados para coloração têxtil com base na química do corante, na fibra a ser tingida e nas interações corante-fibra (KHAN *et al.*, 2023a).

Os corantes diretos, ácidos, básicos, dispersos e reativos estão entre os diferentes tipos de corantes sintéticos com base em sua estrutura (KHAN *et al.*, 2023a). Essas diferenças estruturais nos corantes também podem ser categorizadas com base em sua natureza iônica, o corante catiônico é classificado como um corante básico, enquanto o corante não iônico é caracterizado como um corante disperso (NACHIYAR *et al.*, 2023). Os corantes sintéticos ácidos, básicos, dispersos, sulfetados (de enxofre), diretos e reativos, são amplamente utilizados pelas indústrias têxteis. As fibras naturais e sintéticas utilizadas na indústria têxtil incluem lã, algodão, seda, poliéster, poliamida e acrílico. Além disso, as indústrias têxteis utilizam um grande número de produtos químicos altamente tóxicos em várias etapas do processo, como agentes de engomagem, amaciamento, desengomagem, abrillhantamento e acabamento (AL-TOHAMY *et al.*, 2022).

O termo corante ácido corresponde a um grande grupo de corantes aniônicos portadores de um a três grupos sulfônicos. Eles têm vital importância no método de aplicação do corante tanto em fibras de poliamida sintética quanto em fibras protéicas (lã, seda) (GUARATINI; ZANONI, 2000). A natureza ácida explica sua afinidade pelas funções básicas das fibras, como as poliamidas. Seu uso constitui cerca de 30 a 40% do consumo total de corantes, e são aplicados extensivamente em náilon, algodão e lã. Eles são geralmente aplicados em pH ácido (BENKHAYA; M'RABET; EL HARFI, 2020), podendo ser caracterizados por substâncias com estrutura química baseada em compostos antraquinona, azo, azina, xanteno,

nitro, nitroso ketonimina e triarilmetano que fornecem uma ampla faixa de coloração e grau de fixação (GUARATINI; ZANONI, 2000).

Os corantes básicos são catiônicos, sendo particularmente adequados para tingir fibras aniônicas, como fibras acrílicas, e menos preferidos para tingir lã ou náilon. Geralmente, a fibra acrílica, enquanto lã e náilon têm cargas anfóteras em pH neutro. Em pH alcalino, a lã passa a gerar mais cargas aniônicas, mas tais condições danificam as fibras de lã e náilon e fazem com que percam sua resistência. Eles são particularmente adequados para tingir fibras aniônicas, como fibras acrílicas (KHAN *et al.*, 2023a) como poliéster (NACHIYAR *et al.*, 2023), e menos preferidos para tingir lã ou náilon (KHAN *et al.*, 2023a). Geralmente, a fibra acrílica tem uma carga aniônica, proporcionando uma melhor afinidade para o corante básico carregado catiônico (NACHIYAR *et al.*, 2023). Por outro lado, os corantes básicos são conhecidos por sua baixa resistência à luz e baixa aderência a substratos de fibra (KHAN *et al.*, 2023a).

Os corantes dispersos não possuem um grupo ionizante, e por isso, são menos solúveis em água. Eles são extensivamente usados para colorir tecidos sintéticos em ambientes ácidos com alta temperatura, sendo usado principalmente para tingir fios de poliéster, embora o náil e o acrílico também possam ser tingidos (NACHIYAR *et al.*, 2023). Os corantes dispersos são frequentemente insolúveis ou pouco solúveis em água, de caráter não iônico e aplicados a fibras hidrofóbicas a partir de uma dispersão aquosa (GUARATINI; ZANONI, 2000; BENKHAYA; M'RABET; EL HARFI, 2020). Eles são predominantemente usados em poliéster, mas encontraram aplicação em náilon, acetato de celulose e fibras acrílicas, embora algumas das propriedades de resistência à umidade dos corantes nesses substratos sejam ruins (BENKHAYA; M'RABET; EL HARFI, 2020). Ele pode ser usado principalmente para tinturas de fibras sintéticas, como náilon, poliéster, poliácridonitrila e acetato de celulose (GUARATINI; ZANONI, 2000). Os corantes azo dispersos são a maior categoria entre os corantes dispersos, representando mais de 50% do total de corantes dispersos (BENKHAYA; M'RABET; EL HARFI, 2020).

Os corantes sulfetados são altamente insolúveis em água (GUARATINI; ZANONI, 2000; GÜRSES *et al.*, 2016). Eles são um tipo de corante à cuba (BENKHAYA; M'RABET; EL HARFI, 2020). São utilizados principalmente na tintura de fibras celulósicas, apresentando boa fixação (GUARATINI; ZANONI, 2000; GÜRSES *et al.*, 2016; BENKHAYA; M'RABET; EL HARFI, 2020). Esses corantes são divididos em quatro grupos: corantes de enxofre, corantes de leuco enxofre, corantes de enxofre solubilizados e corantes de enxofre condensado (BENKHAYA; M'RABET; EL HARFI, 2020). O corante de enxofre propriamente dito é então

formado dentro dos poros da fibra por oxidação atmosférica ou química. Os corantes de enxofre constituem uma importante classe de corantes para produzir tons terciários econômicos, especialmente preto, em fibras celulósicas (GÜRSES *et al.*, 2016).

Os corantes diretos podem ser aplicados diretamente nos tecidos sem a necessidade de qualquer auxiliar têxtil e formar uma ligação de hidrogênio com os têxteis (KHAN *et al.*, 2023a; NACHIYAR *et al.*, 2023). Os corantes diretos podem ter cromóforos azo, estilbeno, oxazina e ftalocianina (BENKHAYA; M'RABET; EL HARFI, 2020; KHATTAB; ABDELRAHMAN; REHAN, 2020), com alguns corantes azo-complexos de cobre e tiazol (BENKHAYA; M'RABET; EL HARFI, 2020). Eles também podem possuir substituintes de ácido sulfônico, que ao serem ionizados em ambiente aquoso aumentam a solubilidade do corante. As moléculas de corante direto existem no banho de corante como ânions (KHATTAB; ABDELRAHMAN; REHAN, 2020). A razão pela qual esses corantes ganharam popularidade em comparação com os corantes naturais é que os mordentes e outros aglutinantes se tornaram obsoletos com o advento do tingimento de algodão (KHAN *et al.*, 2023a). Os corantes diretos podem tingir tecidos como viscose (GUARATINI; ZANONI, 2000), algodão, raiom, linho, seda, lã, náilon (KHAN *et al.*, 2023a; NACHIYAR *et al.*, 2023). O tingimento das fibras de celulose ocorre através de interações de Van der Waals (GUARATINI; ZANONI, 2000).

Os corantes azo representam mais de dois terços (70%) de todos os corantes sintéticos. Devido às suas qualidades atraentes industrialmente, como facilidade de síntese, baixo custo, excelente solidez à lavagem e à luz e disponibilidade em uma ampla gama de cores, os corantes azo são preferidos em relação a outros corantes (KHAN *et al.*, 2023a). Os corantes azo aniônicos constituem a maior proporção dos corantes diretos. Eles possuem uma classificação baseada na estrutura química que constituem um cromóforo azo, como monoazo, diazo, triazo, tetraazo e poliazo (BENKHAYA; M'RABET; EL HARFI, 2020).

Muitos corantes não possuem forte afinidade química com as fibras têxteis. Portanto, as fibras têxteis devem ser tratadas antes do estágio de tingimento. Uma solução de um mordente, geralmente um sal metálico, é usada primeiro para impregnar as fibras, para permitir que o íon metálico forme os complexos com grupos funcionais apropriados na estrutura do têxtil. Os íons de alumínio, ferro, estanho, cromo ou cobre, assim como os taninos, são exemplos de mordentes (GÜRSES *et al.*, 2016). Para a produção de alguns corantes é necessário o uso de metais pesados, como mercúrio, cromo, cádmio, chumbo ou arsênio (LARA; CABRAL; CUNHA, 2022).

2.1.2 Corantes reativos

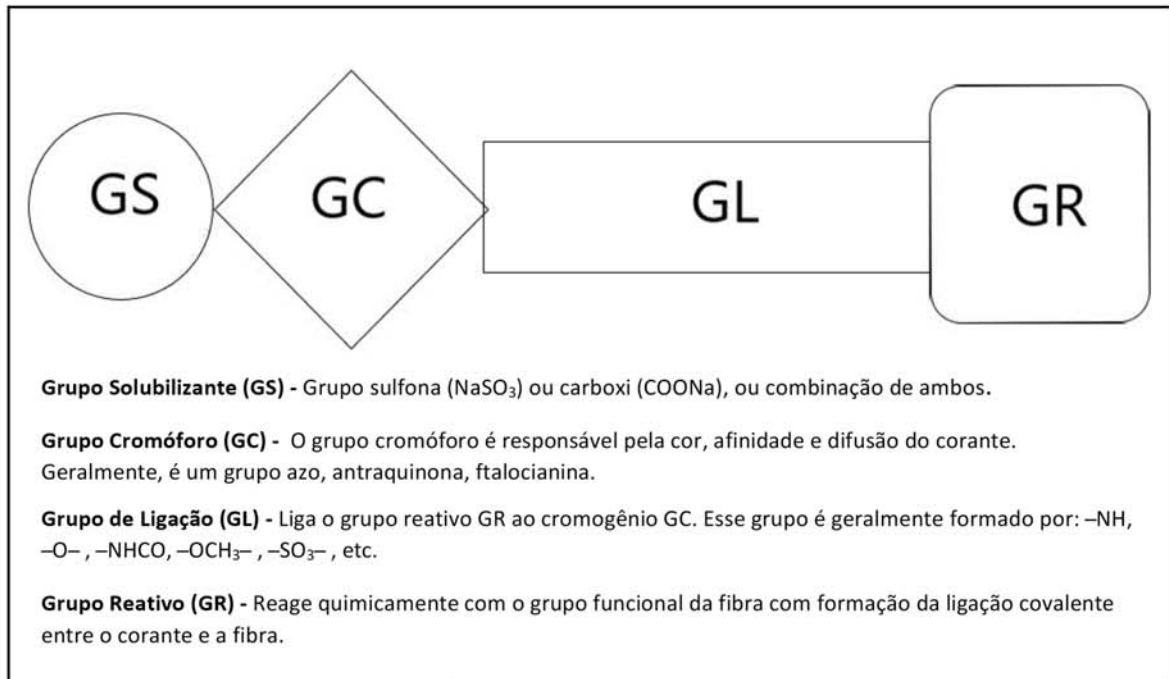
Os corantes reativos surgiram em meados da década de 1950 (GÜRSES *et al.*, 2016; ŚMIGIEL-KAMIŃSKA *et al.*, 2020), e tornaram-se muito populares devido à sua alta resistência à umidade, brilho e gama de tonalidades (BENKHAYA; M'RABET; EL HARFI, 2020; BANERJEE; SHARMA; DAS, 2022). Eles são a classe de corantes mais jovem e importante para materiais celulósicos (MAHAPATRA, 2016). Os corantes reativos são geralmente aplicados em lã, algodão (GÜRSES *et al.*, 2016; ŚMIGIEL-KAMIŃSKA *et al.*, 2020), seda e fibras celulósicas regeneradas (ŚMIGIEL-KAMIŃSKA *et al.*, 2020), mas são mais comumente usados para tingir algodão e outros tecidos celulósicos (KHAN *et al.*, 2023a; NACHIYAR *et al.*, 2023).

Além disso, os corantes desta categoria têm maior atração pelas fibras, maior estabilidade, condições de processamento mais adequadas (BANERJEE; SHARMA; DAS, 2022), fácil aplicabilidade, reprodutibilidade (MAHAPATRA, 2016) e possuem resistência à fricção moderada (KHAN *et al.*, 2023a). No entanto, um bom pré-tratamento do material é um pré-requisito (MAHAPATRA, 2016).

Os corantes reativos são amplamente utilizados devido à capacidade de seus grupos reativos se ligarem às fibras, sua estabilidade e suas condições de processamento, etc. Eles são a segunda maior classe de corantes (BENKHAYA; M'RABET; EL HARFI, 2020; BANERJEE; SHARMA; DAS, 2022). Eles são corantes que possuem um grupo eletrofílico reativo que forma ligação covalente com grupos amino das poliamidas; com grupos amino, hidroxila e tióis das fibras proteicas, e também com grupos hidroxila das fibras celulósicas (GÜRSES *et al.*, 2016).

Corantes reativos podem ser amplamente definidos como cromóforos contendo grupos pendentes que são capazes de formar ligações covalentes com sítios nucleofílicos em substratos fibrosos (ŚMIGIEL-KAMIŃSKA *et al.*, 2020). A Figura 4 mostra um diagrama da estrutura geral dos corantes reativos. Os corantes reativos possuem três partes: uma parte responsável pela cor, uma parte solubilizante e uma parte reativa (ŚMIGIEL-KAMIŃSKA *et al.*, 2020). O grupo reativo é normalmente ligado ao cromóforo por meio de um grupo de ligação. De acordo com sua técnica de aplicação, os corantes reativos podem ser classificados como corantes controláveis por álcali, controláveis por sal e controláveis por temperatura. Existem numerosos tipos de corantes reativos, porém os principais contêm a função azo e antraquinona como grupos cromóforos e os grupos clorotriazinila e sulfatoetilsulfonila como grupos reativos (GÜRSES *et al.*, 2016).

Figura 4 – Diagrama da fórmula geral dos corantes reativos.



Fonte: Adaptada de Mahapatra (2016) e Śmigiel-Kamińska *et al.* (2020).

No processo de tingimento do algodão são necessárias condições alcalinas e o uso de eletrólitos (KHAN *et al.*, 2023a). O processo de aplicação de corantes reativos em fibras de algodão consiste em duas etapas. Na primeira etapa é feita a sorção dos corantes nas fibras de celulose do banho de tingimento, com a adição de eletrólitos para superar a barreira eletrostática do corante-fibra. A segunda etapa do processo de tingimento é a reação com a fibra de celulose (ŚMIGIEL-KAMIŃSKA *et al.*, 2020). A melhor força de ligação desses corantes vem do fato de que deles poderem formar ligações covalentes com grupos amina (Figura 5) e sulfidril ($-\text{SH}$) de fibras têxteis proteicas (BENKHAYA; M'RABET; EL HARFI, 2020; BANERJEE; SHARMA; DAS, 2022).

Figura 5 – Reação entre o corante reativo e as fibras têxteis.



Fonte: Adaptada de Benkhaya, M'rabet e El Harfi (2020).

2.2 Poluição com corantes têxteis

A descoberta dos corantes sintéticos mudou a produção e as formas de uso dos corantes, gerando desenvolvimento industrial, mas aumentando os níveis de poluição ambiental; dado que, a maioria deles foram identificados como altamente tóxicos (ARDILA-LEAL *et al.*, 2021).

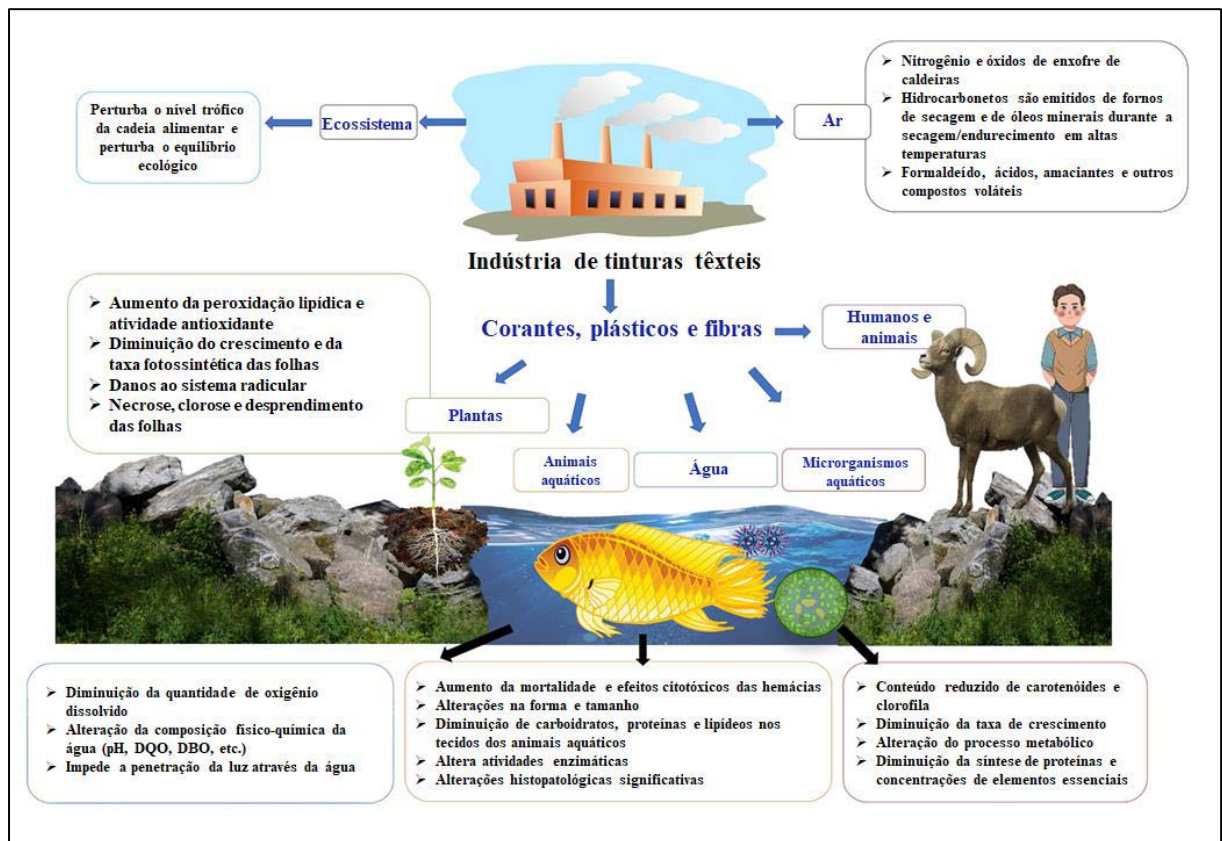
A contaminação ambiental provocada pela descarga de águas residuais das indústrias têxteis é uma preocupação crescente em escala global, visto que elas produzem uma grande quantidade de efluentes contendo uma infinidade de produtos químicos, principalmente corantes (SARAVANAN *et al.*, 2023; SUDARSHAN *et al.*, 2023). Em que, a indústria têxtil representa 55% dos efluentes de corantes mundialmente lançados no meio ambiente, como efluentes (ISLAM *et al.*, 2023).

Os corantes sintéticos utilizados na indústria têxtil poluem uma grande quantidade de água, pois não se ligam firmemente ao tecido e são descartados como efluentes no ambiente aquático (AL-TOHAMY *et al.*, 2022). Cerca de 5 a 50% do tipo de corante fica ancorado nos tecidos e o restante se torna água residual (~ 200 bilhões de litros) que contamina os corpos d'água continuamente (MUKHERJEE; GOSWAMI; DHAK, 2023). Aproximadamente 50 a 2.600 L de água são utilizados para tingir 1 kg de tecido (CASTILLO-SUÁREZ *et al.*, 2023). A indústria têxtil perde grandes quantidades de corantes para águas residuais a cada ano devido, à ineficácia no processo de tingimento, e ao conhecimento inadequado sobre a química do corante, durante os processos de tingimento e acabamento (ISLAM *et al.*, 2023). Vale ressaltar que o tingimento de tecido é um dos setores que mais polui a água, sendo que o tingimento têxtil é o segundo maior poluidor da água no mundo (TEO *et al.*, 2022).

Os corantes sintéticos são estruturas químicas aromáticas complexas (SUDARSHAN *et al.*, 2023) pouco biodegradáveis (SRINIVASAN *et al.*, 2019; ARDILA-LEAL *et al.*, 2021), prejudiciais ao meio ambiente, causam mutações, têm efeitos cancerígenos (ARDILA-LEAL *et al.*, 2021; SUDARSHAN *et al.*, 2023), alterações metabólicas e bioacumulam (ARDILA-LEAL *et al.*, 2021); sendo que, 60-70% dos corantes são tóxicos, recalcitrantes e cancerígenos (KHAN *et al.*, 2023a). Portanto, as águas residuais com corantes devem ser tratadas, antes do lançamento em um corpo de água, para minimizar seus impactos negativos. Embora, tenha havido avanços significativos na gestão e tratamento desse tipo de efluente, por meio de métodos: físicos, químicos e biológicos; a falta de informações sobre métodos eficazes de remoção de corantes, torna difícil decidir sobre uma única técnica simples que remova completamente o corante das águas residuais (SOLAYMAN *et al.*, 2023). A

descarga de tais efluentes acaba resultando na poluição, que gera efeitos negativos perceptíveis no corpo humano e no meio ambiente (AL-TOHAMY *et al.*, 2022; ISLAM *et al.*, 2023; SARAVANAN *et al.*, 2023). A Figura 6 ilustra como a indústria têxtil contribui significativamente para a deterioração da qualidade da água, contaminando os seres humanos e a natureza; interagindo negativamente com os *habitats* naturais, ao depositar contaminantes nos *habitats* terrestres e nos ecossistemas aquáticos (AL-TOHAMY *et al.*, 2022). Os corantes contribuem para a toxicidade da água e representam um perigo crescente para o meio ambiente, seres humanos e animais (AHMOUDA; BOUDIAF; BENHAOUA, 2022; SUDARSHAN *et al.*, 2023).

Figura 6 – Impactos ecotoxicológicos de efluentes têxteis contendo corantes no meio ambiente e nos microrganismos vivos.



Fonte: Adaptada de Al-Tohamy *et al.* (2022).

A liberação de águas residuais não tratadas contendo corantes prejudica aos ecossistemas aquáticos, devido à sua alta solubilidade em água dos corantes; podendo, então, ser absorvidos por vários organismos. Além disso, podem afetar a taxa de produção de nossa agricultura, visto que as terras agrícolas acabam sofrendo alteração na fertilidade do solo e na taxa de cultivo (PHAM *et al.*, 2023; SARAVANAN *et al.*, 2023). Efluentes com corantes

perturbam o equilíbrio químico do solo e afetam a microflora do solo, prejudicando a germinação e o teor de clorofila nas plantas (MAHAWAR; AKHTAR, 2019; KHAN *et al.*, 2023a).

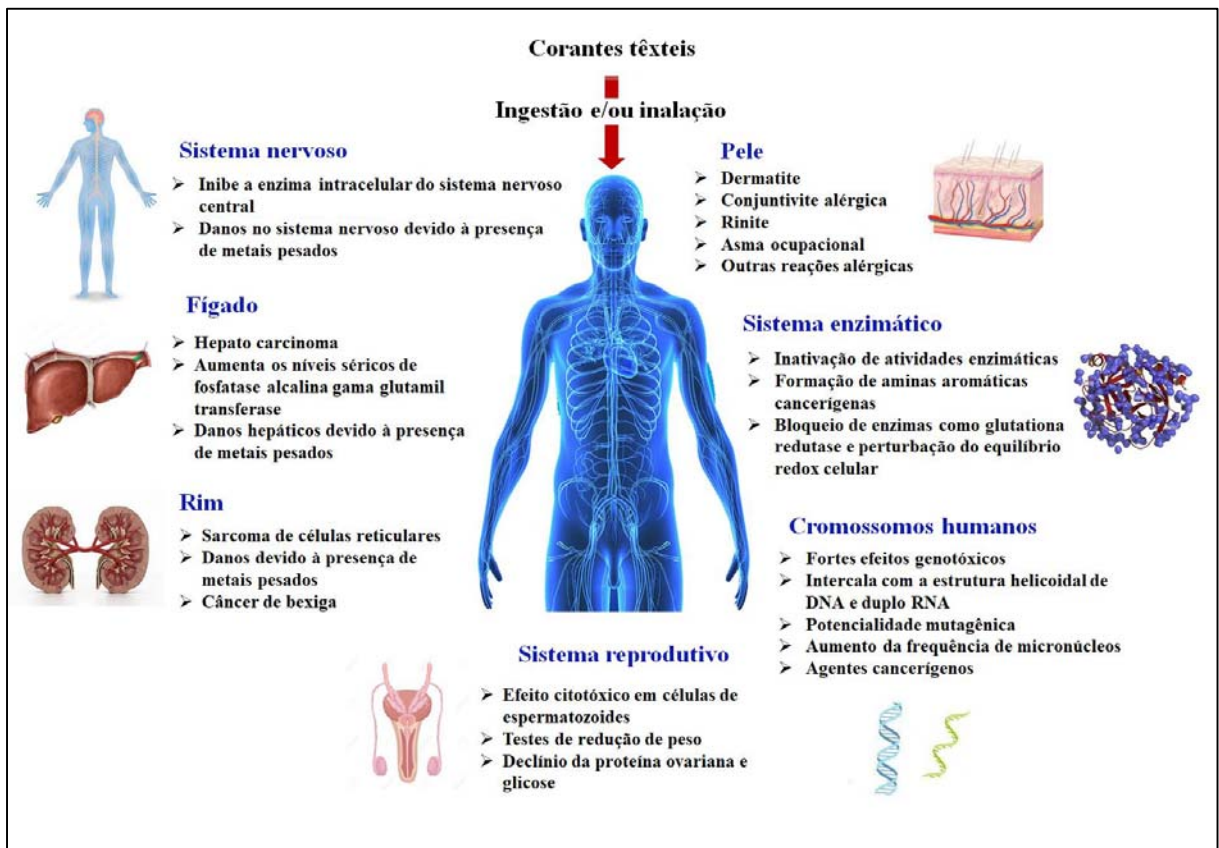
Os corantes liberados em *habitats* aquáticos representam um efeito adverso na flora aquática, sendo o problema natural mais evidente com a presença do corante a modificação da absorção e reflexão da luz solar na água. Os corantes blindam a passagem da luz para zona fótica (eufótica) do ambiente aquático, resultando na redução da fotossíntese da vegetação aquática, sendo que quantidades excessivas de corantes diminuem os níveis de oxigênio e inibem a atividade biológica da fauna aquática (KHAN *et al.*, 2023a); gerando, por conseguinte, um esgotamento do oxigênio (SARAVANAN *et al.*, 2023).

Os corantes têxteis comprometem significativamente a qualidade estética dos corpos d'água, prejudicam a fotossíntese, inibem o crescimento vegetal, entram na cadeia alimentar, proporcionam recalcitrância e bioacumulação; podendo, em consequência, promover toxicidade, mutagenicidade e carcinogenicidade (LELLIS *et al.*, 2019). A existência de agentes de coloração têxtil na água, como os corantes, resulta na alteração da cor da água, o que causa a modificação do pH, maiores concentrações de carbono orgânico total (COT), partículas dissolvidas (AL-TOHAMY *et al.*, 2022; KHAN *et al.*, 2023a; PHAM *et al.*, 2023; SARAVANAN *et al.*, 2023), demanda biológica de oxigênio (DBO) e demanda química de oxigênio (DQO) (LELLIS *et al.*, 2019; KHAN *et al.*, 2023a; PHAM *et al.*, 2023; SARAVANAN *et al.*, 2023; SUDARSHAN *et al.*, 2023). As partículas dissolvidas inibem a passagem da água pelas brânquias do peixe, restringindo a troca gasosa e possivelmente resultando em uma taxa de crescimento lenta ou até morte (AL-TOHAMY *et al.*, 2022; KHAN *et al.*, 2023a; SARAVANAN *et al.*, 2023). Assim, o caráter xenobiótico e recalcitrante dos corantes acabam impactando a estrutura e o funcionamento dos ecossistemas (LELLIS *et al.*, 2019).

O consumo de alimento dos peixes diminui devido à exposição prolongada aos efluentes com corantes, resultando em teores mais baixos de gordura, proteína e carboidratos (AL-TOHAMY *et al.*, 2022; KHAN *et al.*, 2023a). Além disso, os peixes também são propensos a várias doenças devido aos efeitos nocivos da hipóxia em suas respostas fisiológicas, particularmente no sistema imunológico. Como resultado, peixes contaminados têm um impacto significativo na saúde humana (ZHENG *et al.*, 2021; AL-TOHAMY *et al.*, 2022; KHAN *et al.*, 2023a). Assim, os corantes podem atingir os órgãos humanos causando uma série de patologias por meio da cadeia alimentar (LELLIS *et al.*, 2019).

A Figura 7 mostra alguns dos impactos negativos dos corantes têxteis na saúde humana. Os corantes têxteis, que são altamente tóxicos e potencialmente cancerígenos, têm sido associados a uma variedade de doenças em homens e animais (AL-TOHAMY *et al.*, 2022), como dermatites e distúrbios do sistema nervoso central (AYED *et al.*, 2021; AL-TOHAMY *et al.*, 2022; KHAN *et al.*, 2023a). A descarga de corantes reativos na água, mesmo em baixas concentrações, pode causar vários riscos à saúde humana, como queimaduras oculares, ânsia de vômito, hiperespaquia, taquicardia e metemoglobinemia (SI *et al.*, 2022).

Figura 7 – Impactos negativos dos corantes têxteis na saúde humana desde a dermatite até o sistema nervoso central.



Fonte: Adaptada de Al-Tohamy *et al.* (2022).

Os corantes inativam a atividade enzimática substituindo os cofatores enzimáticos (AL-TOHAMY *et al.*, 2022; GUPTA *et al.*, 2022). Estudos mostraram que os corantes sintéticos são muito tóxicos e exercem efeitos nocivos ao induzir a mutação de um determinado gene, e podem causar várias doenças, incluindo problemas pulmonares, irritação da pele, queimose e cegueira permanente (GUPTA *et al.*, 2022). O uso generalizado de corantes em várias indústrias resultou na causa potencial de câncer de pulmão, mama, colorretal e bexiga

em humanos (AL-TOHAMY *et al.*, 2022; KHAN *et al.*, 2023a). Vários corantes, particularmente corantes azo, têm potencial mutagênico (AL-TOHAMY *et al.*, 2022).

A genotoxicidade dos corantes têxteis é o maior perigo potencial a longo prazo para a saúde humana. Embora a maioria dos corantes possua recalcitrância ambiental, alguns podem ser parcialmente degradados ou transformados na presença de sedimentos anóxicos, como ocorre na redução dos compostos do tipo azo, causadores de perigosas aminas aromáticas. Outra possibilidade envolve a combinação de corantes com compostos sintéticos intermediários ou seus produtos de degradação, gerando outras substâncias mutagênicas e cancerígenas (LELLIS *et al.*, 2019).

Os corantes azo solúveis em água são mais perigosos quando metabolizados por enzimas hepáticas. Os corantes do tipo azo, básico e nitro podem ser carcinogênicos. Em concentrações mais altas (até 100 ppm) de ácido, corantes azo em corpos d'água são tóxicos para bactérias, algas, crustáceos e peixes. Eles também são responsáveis por induzir genotoxicidade com alta frequência (GUPTA *et al.*, 2022).

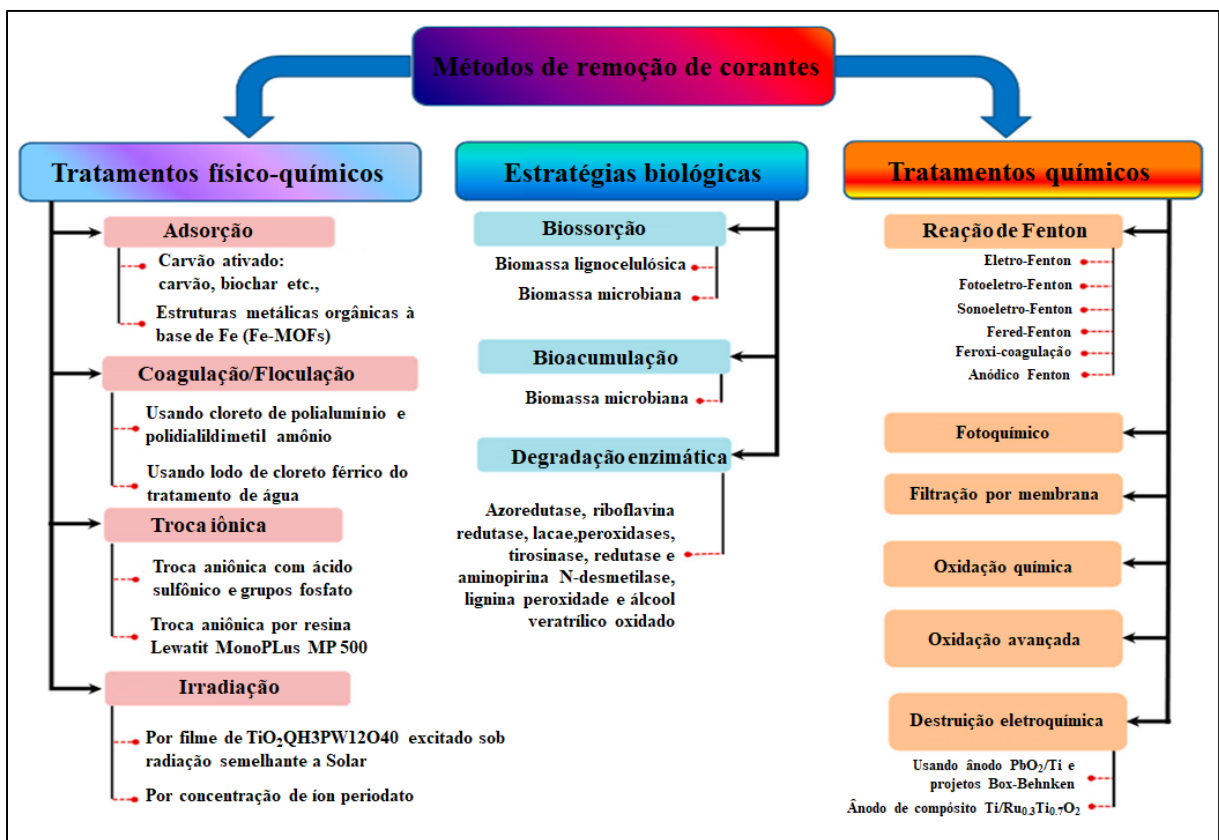
A tendência recalcitrante dos corantes em ambientes aeróbios, resultante de compostos difíceis de quebrar (como estruturas aromáticas), promove uma baixa remoção durante os tratamentos primários e secundários (estações de tratamento convencionais), resultando em sua fácil passagem para o ecossistema aquoso. Conseqüentemente, a bioacumulação desses compostos pode ocorrer em sedimentos e solos, podendo ocorrer o transporte para o sistema de abastecimento de água potável (VIKRANT *et al.*, 2018; LELLIS *et al.*, 2019).

2.3 Tecnologias de tratamento de efluentes contendo corantes têxteis

Uma vez liberados em sistemas aquáticos, os corantes são difíceis de degradar, pois geralmente são resistentes à luz, a agentes oxidantes e muitos produtos químicos (AHMOUDA; BOUDIAF; BENHAOUA, 2022). Um dos grandes problemas ambientais relacionados às inúmeras aplicações industriais de corantes é a sua remoção de efluentes (AHMOUDA; BOUDIAF; BENHAOUA, 2022; KHAN *et al.*, 2023a). A remoção de moléculas de corantes de fontes de água tornou-se um grave problema ambiental e um desafio nos últimos anos (KHAN *et al.*, 2023a). A escolha do método de tratamento adequado depende do processo de produção e dos produtos químicos utilizados na fábrica têxtil. A escolha também é influenciada pela composição das águas residuais, regime de descarga, localização, custos comerciais, custos operacionais, disponibilidade de terreno, seleção e disponibilidade de reutilização/reciclagem

de efluentes tratados, processo e experiência (WANG; JIANG; GAO, 2022). Assim, cada fibra têxtil tratada gera efluentes com propriedades únicas. Para fábricas têxteis que processam a mesma fibra, as propriedades do efluente são geralmente comparáveis, embora os volumes reais possam variar. A mesma fibra pode ser processada por várias fábricas de maneiras diferentes devido a diferenças na tecnologia de produção (NACHIYAR *et al.*, 2023). Alguns dos métodos usados atualmente para a remoção de corante de águas residuais estão resumidos na Figura 8 (PHAM *et al.*, 2022).

Figura 8 – Métodos atuais para remoção de corantes.



Fonte: Adaptada de Pham *et al.* (2023).

Existem muitos métodos para extrair corantes de uma solução aquosa, como isolamento por membrana, oxidação química, coagulação/floculação, tratamento eletroquímico, aeróbio e anaeróbio microbiano, mas cada um desses métodos possui certas desvantagens (PANDA *et al.*, 2021). Infelizmente, a maioria dos corantes, conhecidos por serem tóxicos, escapa dos processos convencionais de tratamento de águas residuais (ESKIKAYA *et al.*, 2023). Os corantes são resistentes à degradação por estratégias de tratamento tradicionais (KHAN *et al.*, 2023a), principalmente por que, eles contêm grupos

funcionais, como grupos carboxílicos, amina e azo, que não podem ser facilmente tratados com métodos convencionais (BENKHAYA; M'RABET; EL HARFI, 2020).

A filtração por membrana, irradiação, troca iônica e adsorção, são amplamente utilizados (NACHIYAR *et al.*, 2023). Apesar da alta eficiência de descoloração, a maioria das abordagens de remoção de corantes não é preferida devido a seus altos requisitos técnicos (ESKIKAYA *et al.*, 2023); alto custo (ESKIKAYA *et al.*, 2023; NACHIYAR *et al.*, 2023) e consequências indesejadas (NACHIYAR *et al.*, 2023). A principal desvantagem dos processos de membrana é que eles têm uma vida útil curta antes do início da incrustação da membrana, fazendo com que o custo da substituição periódica seja considerado em qualquer estudo de viabilidade econômica (NACHIYAR *et al.*, 2023). As abordagens químicas convencionais, como a degradação eletroquímica e a reação de Fenton, estão frequentemente relacionadas ao alto consumo de energia e à produção de resíduos perigosos (GAO *et al.*, 2022).

A adsorção é frequentemente utilizada devido à sua simplicidade e baixo custo. No entanto, o método de adsorção apresenta algumas desvantagens: entre elas, do adsorvente atingir a saturação em pouco tempo, perder sua capacidade de adsorver o poluente após um tempo, e com a necessidade de dessorção (ESKIKAYA *et al.*, 2023). A saturação diminui a eficiência e requer custos associados ao descarte frequente (GAO *et al.*, 2022).

Os procedimentos de oxidação química incluem agentes oxidantes (ozônio), fotoquímicos, de coagulação/floculação e o uso de reagentes químicos. Esses procedimentos químicos às vezes são caros e geram o acúmulo de lodo concentrado, causando um problema de descarte. Existe também o perigo de contaminação secundária devido ao uso excessivo de produtos químicos (NACHIYAR *et al.*, 2023). O tratamento biológico é um processo barato que cria menos lodo. Utiliza menos reagentes químicos, economiza energia, sendo economicamente viável em países subdesenvolvidos (ISLAM *et al.*, 2023). Quando comparada às abordagens físicas e químicas, a biológica é mais econômica, ecologicamente segura e universalmente aceita (NACHIYAR *et al.*, 2023).

Os corantes sintéticos são projetados para serem resistentes aos processos típicos à digestão aeróbia (NACHIYAR *et al.*, 2023) e de oxidação/redução, tornando-os difíceis de serem removidos dos efluentes da indústria têxtil (ESKIKAYA *et al.*, 2023). Nenhum método de tratamento é tão eficaz no tratamento de águas residuais de corantes devido à alta complexidade do efluente, por isso numerosas estratégias são utilizadas para atingir remoção necessária (NACHIYAR *et al.*, 2023). Uma combinação de métodos de tratamento também pode ser usada para tratar águas residuais têxteis de maneira eficaz como, por exemplo, o uso de processo Fenton combinado à adsorção (ESKIKAYA *et al.*, 2023).

A regulamentação para prevenir e/ou punir as fontes geradoras de contaminação da água por corantes ainda é escassa na maioria dos países. A legislação internacional, como a Organização Mundial da Saúde (OMS) e a Comissão Europeia do Meio Ambiente (ECE), não mencionam o limite de concentração de corantes na água potável (GOMES *et al.*, 2023). A Resolução brasileira Nº 430, de 13 de maio de 2011, do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA), que dispõe sobre a classificação dos corpos d'água e diretrizes ambientais, não estabelece parâmetros de tratamento para corantes em efluentes industriais (BRASIL, 2011). Na Resolução Nº 02 de 02 de fevereiro de 2017, do Conselho Estadual de Meio Ambiente (COEMA) do estado do Ceará é estabelecido que os efluentes não sanitários, somente poderão ser lançados diretamente no corpo hídrico (desde que obedeçam, resguardadas outras exigências cabíveis, condições e padrões específicos) se estiverem ausentes da presença de corantes e pigmentos virtualmente (cor aparente) (CEARÁ, 2017).

Um processo de remoção de corante ideal deve ser capaz de tratar altas concentrações de corantes da água em um curto período (tempo de retenção hidráulica) sem produzir poluentes secundários (subprodutos perigosos) (KHAN *et al.*, 2023a). Os métodos de tratamento biológico, que utilizam processos enzimáticos realizados por “biocatalisadores”, superam muitas das desvantagens das estratégias físico-químicas, desempenhando um papel significativo na remoção da contaminação por corantes para a sustentabilidade ambiental (PHAM *et al.*, 2022). Desenvolver uma solução sustentável para remover corantes de efluentes têxteis seria extremamente benéfico para o meio ambiente (KHAN *et al.*, 2023a), sendo que várias enzimas, como lacases, hidrolases, azoredutases e lignina peroxidases são eficazes na remoção dos corantes (PHAM *et al.*, 2022).

2.4 Biodegradação de corantes usando enzimas

Algo crucial é o uso de soluções sustentáveis e ecológicas para a remediação de corantes e seus derivados presentes em efluentes industriais (NASEEM *et al.*, 2023). Os corantes podem causar sérios problemas ambientais, pois são difíceis de serem removidos da água ao utilizar adsorventes convencionais devido aos seus grandes tamanhos moleculares e estruturas volumosas (ABDOUL *et al.*, 2023).

Embora muitos métodos físicos e químicos possam descolorir águas residuais contaminadas por corantes, processos alternativos baseados em princípios biotecnológicos têm atraído um interesse crescente (RODRIGUES *et al.*, 2023). Muitos métodos de remoção foram propostos, entre os quais, a degradação biológica é considerada mais barata, mais ecológica e

associada a subprodutos menos tóxicos (GAO *et al.*, 2022). A biodegradação no tratamento de efluentes industriais tem se tornado atrativa devido às suas moderadas condições de trabalho, alta eficiência e menor impacto ambiental adverso. No caso da biodegradação com enzimas, ela tem sido ressaltada como uma abordagem muito útil no tratamento de efluentes têxteis industriais (YUAN *et al.*, 2020; ISLAM *et al.*, 2023).

As enzimas são excelentes biocatalisadores que são amplamente utilizados em diferentes setores industriais. Elas oferecem várias vantagens sobre os catalisadores químicos convencionais, como alta eficiência, alta seletividade e operação em condições brandas e seguras. Devido à sua natureza verde, a biocatálise baseada em enzimas pode desempenhar um papel importante no alcance dos “Objetivos de Desenvolvimento Sustentável das Nações Unidas” (HAN *et al.*, 2022). O alto custo das enzimas em sua forma pura, faz com que elas raramente sejam a primeira escolha para o tratamento de águas residuais. Por outro lado, as enzimas industriais são enzimas confiáveis, de baixo custo, eficazes e eficientes (ISLAM *et al.*, 2023).

A biodegradação de corantes pelo uso de métodos biológicos (biocatalisadores), parece ser uma abordagem extremamente promissora. Os biocatalisadores são ecológicos, possuem alta eficiência e excelente quimio, estéreo e regioselectividade, tornando-os um ótimo substituto para o catalisador químico tradicional (NASEEM *et al.*, 2023).

Os corantes sintéticos que são classificados como aniônicos, catiônicos e não iônicos são projetados para serem resistentes aos processos típicos de oxidação e redução, tornando-os difíceis de serem removidos dos efluentes da indústria têxtil (ESKIKAYA *et al.*, 2023). Várias enzimas, como lacases, hidrolases, azoredutases e lignina peroxidases, são eficazes na clivagem dos anéis aromáticos e amins das moléculas de corantes (PHAM *et al.*, 2022). As enzimas podem operar em uma ampla faixa de pH, temperatura e salinidade para alta e baixa concentração de contaminantes e podem catalisar reações de conversão direcionadas sem a necessidade de solventes químicos, altas temperaturas e pressões. Vários biocatalisadores, como azoredutases, fenol oxidases e peroxidase, têm sido aplicados na degradação de corantes naturais e sintéticos de recursos hídricos (DARONCH *et al.*, 2020; NASEEM *et al.*, 2023).

2.4.1 Corantes em estudo

Nenhum método de biodegradação é absoluto no tratamento de todos os corantes têxteis, o que leva à degradação ser dependente da estrutura do corante (ALAM *et al.*, 2023).

Os corantes reativos são corantes aniônicos solúveis em água (MAHAPATRA, 2016; NACHIYAR *et al.*, 2023), perigoso para o ambiente aquático e perigosos a longo prazo (NACHIYAR *et al.*, 2023). Eles são propositadamente projetados para ter baixa substantividade, a fim de facilitar a remoção do corante hidrolisado por simples lavagem e enxágue (MAHAPATRA, 2016).

Uma grande fração de corantes reativos é hidrolisada durante os processos de tingimento (> 30% da concentração inicial de corante), sendo descartada junto com os efluentes (SENGUTTUVAN *et al.*, 2022). Entre os corantes sintéticos encontrados em efluentes emitidos, os corantes azo ocupam a maior porcentagem (~60%), seguidos pelos corantes antraquinona (~15%) (GAO *et al.*, 2022; ROUTOULA; PATWARDHAN, 2020). Aproximadamente 95% dos corantes reativos são corantes azo cobrindo toda a gama de cores (MAHAPATRA, 2016). Eles representam quase 30% de todo o mercado de corantes têxteis e mais de 50% dos corantes empregados na indústria algodoeira (ABDOUL *et al.*, 2023).

Entre os diferentes corantes sintéticos, o corante azo (grupo cromóforo) é a maior classe e, é bastante utilizado em diferentes indústrias, sendo amplamente utilizados na indústria têxtil (GUPTA *et al.*, 2022). Em torno de 15 a 50% dos corantes têxteis do tipo azo não se ligam ao tecido, durante o processo de tingimento (LELLIS *et al.*, 2019). Os corantes azo são sintetizados a partir de um composto aromático e atuam como um bom agente oxidante (GUPTA *et al.*, 2022) devido a presença de grupos de remoção de elétrons que causam redução de elétrons (ALAM *et al.*, 2023), apresentando estrutura molecular complexa com anéis aromáticos que os tornam mais estáveis e não degradáveis (SENGUTTUVAN *et al.*, 2022).

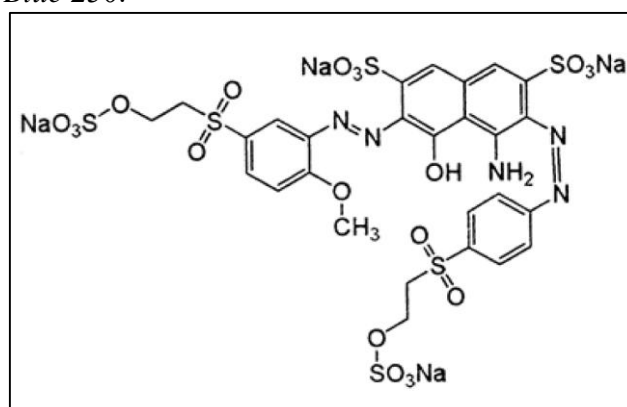
Com o aumento do uso de corantes azóicos, surgiram vários problemas de saúde e ambientais causados por alguns desses corantes azóicos e seus metabólitos (NGO; TISCHLER, 2022). Quando liberados na água, os corantes azo danificam consideravelmente os organismos vivos devido às suas propriedades genotóxicas, mutagênicas e citotóxicas (ALAM *et al.*, 2023). Em concentrações mais altas (até 100 ppm) de ácido, corantes azo em corpos d'água são tóxicos para bactérias, algas, crustáceos e peixes, podendo induzir genotoxicidade com alta frequência. A exposição a corantes azóicos leva a anomalias celulares, câncer de bexiga, sarcomas esplênicos, carcinomas hepatocelulares ou aberrações cromossômicas (GUPTA *et al.*, 2022).

Os corantes azo reativos contêm dois tipos de grupos funcionais, um grupo reativo que liga a molécula de corante à fibra e um cromóforo com ligação dupla azo ($-N=N-$) que é responsável pela sua cor, possuem massa molar típica entre 1300 e 1600 g mol⁻¹ e uma estrutura 3D complexa (ABDOUL *et al.*, 2023). A degradação do corante azo pode ocorrer devido à reação entre uma enzima e a ligação azo (SRINIVASAN *et al.*, 2019).

A Figura 9 mostra a estrutura do C.I. *Reactive Blue 250* (CAS: 93951-21-4), também conhecido como *Reactive Blue RGB*, *Akreact Blue RGB*, *Mohizol Navy Blue RGB*, *Reactive Navy RGB*, *Reactofix Supra Navy Blue HRGBL*, *Reactron Navy Blue RGB* e *Rite Reactive NavyRGB* (WORLD DYE VARIETY, 2023). O C.I. *Reactive Blue 250* possui um peso molecular de $1021,9 \text{ g mol}^{-1}$ (PUBCHEM, 2023; WORLD DYE VARIETY, 2023), com solubilidade de 392 g L^{-1} a 20°C (LOOKCHEM, 2023), um comprimento de onda de absorção máxima ($\lambda_{\text{máx}}$) de 604 nm (MAIA *et al.*, 2014). Possuindo em sua estrutura dois cromóforos de ligações (díazo) conectados com estruturas aromáticas (DETJOB; BOONNORAT; PHATTARAPATTAMAWONG, 2023).

O C.I. *Reactive Blue 250* é mutagênico com efeito cancerígeno e não é biodegradável (MEIYAZHAGAN *et al.*, 2020). Esse corante diazótico não é facilmente biodegradável, e o uso de processos de tratamento biológico requer condições específicas, como tempos de retenção suficientes, espécies microbianas específicas e diversas; assim como, nutrientes adequados, o que acaba resultando em limitações (DETJOB; BOONNORAT; PHATTARAPATTAMAWONG, 2023).

Figura 9 – Estrutura química do C.I. *Reactive Blue 250*.



Fonte: World Dye Variety (2023).

Os corantes de antraquinona (grupo cromóforo) são a segunda classe mais importante depois dos corantes azo (GÜRSSES *et al.*, 2016; SEM; RAUT; RAUT, *et al.*, 2023). Eles são um dos mais antigos tipos de corantes, tendo sido encontrados nos invólucros de múmias que datam de mais de 4.000 anos (GÜRSSES *et al.*, 2016). Tal como os corantes azo são difíceis de serem degradados (SEN; RAUT; RAUT, *et al.*, 2023).

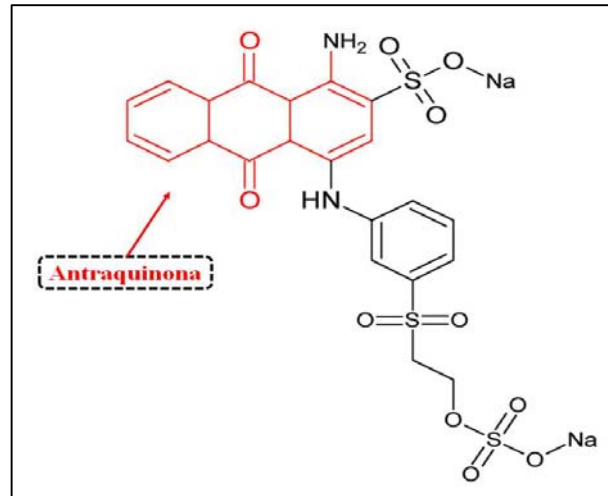
Os corantes de antraquinona são estáveis e resistentes no sistema aquático (TOLKOU; MITROPOULOS; KYZAS, 2023), sendo considerados poluentes tipicamente

refratários por causa de seus anéis de benzeno e estruturas complexas, e exibem efeitos teratogênicos e carcinogênicos (LI *et al.*, 2022). De acordo com a avaliação da Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer (IARC), em 1981, os corantes de antraquinonas foram considerados cancerígenos (GUPTA *et al.*, 2022). O grupo ácido sulfônico do corante antraquinona é responsável por sua solubilidade em água. Sendo que o C.I. *Reactive Blue 19*, além de ser um dos corantes mais utilizados na indústria têxtil, é tipicamente aplicado como um material inicial na produção de corantes poliméricos.

O C.I. *Reactive Blue 19* é um corante reativo de antraquinona comercialmente representativo (APPAVU; THIRIPURANTHAGAN; SURESHKUMAR, 2020). A Figura 10 mostra a estrutura do C.I. *Reactive Blue 19* (CAS: 2580-78-1) também conhecido como *Reactive Blue 19*, *Remazol Brilliant Blue R*, *Remalan Brilliant Blue R*, *Remazol Blue RGB* ou *Remazol Blue RR*, etc (PUBCHEM, 2023; WORLD DYE VARIETY, 2023), um corante antraquinona que é difícil de ser degradado (DATTA *et al.*, 2021). O C.I. *Reactive Blue 19* é um corante derivado do antraceno (importante grupo de poluentes perigosos) (KHAN *et al.*, 2023c), que pertence ao grupo de poluentes orgânicos não biodegradáveis, recalcitrantes e tóxicos (TOLKOU; MITROPOULOS; KYZAS, 2023). Ele possui um peso molecular de 626,5 g mol⁻¹ (PUBCHEM, 2023), um comprimento de onda de máxima absorção ($\lambda_{\text{máx}}$) de 592 nm (ILERI; DOGU, 2020), cuja solubilidade é de 10 a 50 g L⁻¹ a 20°C (PUBCHEM, 2023).

A solubilidade em água é considerada alta (APPAVU; THIRIPURANTHAGAN; SURESHKUMAR, 2020; PEHLIVAN *et al.*, 2020) e seu grau de fixação é baixo, o que torna o esse corante potencialmente carcinogênico e tóxico (PEHLIVAN *et al.*, 2020). Além disso, C.I. *Reactive Blue 19* produz resíduos tóxicos orgânicos venenosos e dificilmente degradáveis (MELATI *et al.*, 2023). A química específica do grupo antraquinona é baseada no antraceno e consiste em três anéis benzênicos fundidos (estrutura básica do antraceno) com dois grupos carbonila no anel central (ROUTOULA; PATWARDHAN, 2020).

Figura 10 – Estrutura química do C.I. *Reactive Blue 19*.



Fonte: Adaptado de Routoula e Patwardhan (2020).

Na estrutura de um corante antraquinona, os grupos cromóforos compreendem dois grupos carbonila em ambos os lados de um anel de benzeno (SEN; RAUT; RAUT, et al., 2023), onde o grupo carbonila atua como um aceptor de elétrons, necessitando assim de um doador de elétrons para reagir e quebrar sua estrutura, e combinado com efeitos de ressonância entre a estrutura do antraceno leva a uma maior dificuldade de degradação em comparação com os corantes azo (ROUTOULA; PATWARDHAN, 2020). Assim, os corantes à base de antraquinona são mais resistentes à biodegradação devido às suas estruturas aromáticas fundidas em comparação com os à base de azo (FANCHIANG; TSENG, 2009; APPAVU; THIRIPURANTHAGAN; SURESHKUMAR, 2020).

Os corantes podem permanecer no ambiente por um longo período de tempo, devido à alta estabilidade térmica e fotoestabilidade. Por exemplo, a meia-vida do C.I. *Reactive Blue 19* hidrolisado é de cerca de 46 anos em pH 7 a 25°C (GÜRSES *et al.*, 2016). A degradação dos corantes de antraquinona representa um problema ambiental que tem sido ignorado devido ao seu menor volume de uso em comparação com os corantes azóicos, sendo que as enzimas isoladas se destacam em termos de taxa de degradação (ROUTOULA; PATWARDHAN, 2020).

2.4.2 *Lacase*

A lacase foi descoberta na seiva da árvore de laca japonesa *Rhus vernicifluum* em 1985, sendo identificada como uma oxidase contendo metal (ISLAM *et al.*, 2023). Elas são os

membros mais prevalentes da família de proteínas multi-oxidase de cobre (PHAN *et al.*, 2023). A lacase (benzenodiol: oxigênio oxidoreductase, EC 1.10.3.2) (DARONCH *et al.*, 2020; YUAN *et al.*, 2020) é uma das polifenoloxidasas mais abundantes (CHEN; OH; YAP, 2022), amplamente distribuídas em plantas, fungos e bactérias (HAN *et al.*, 2022).

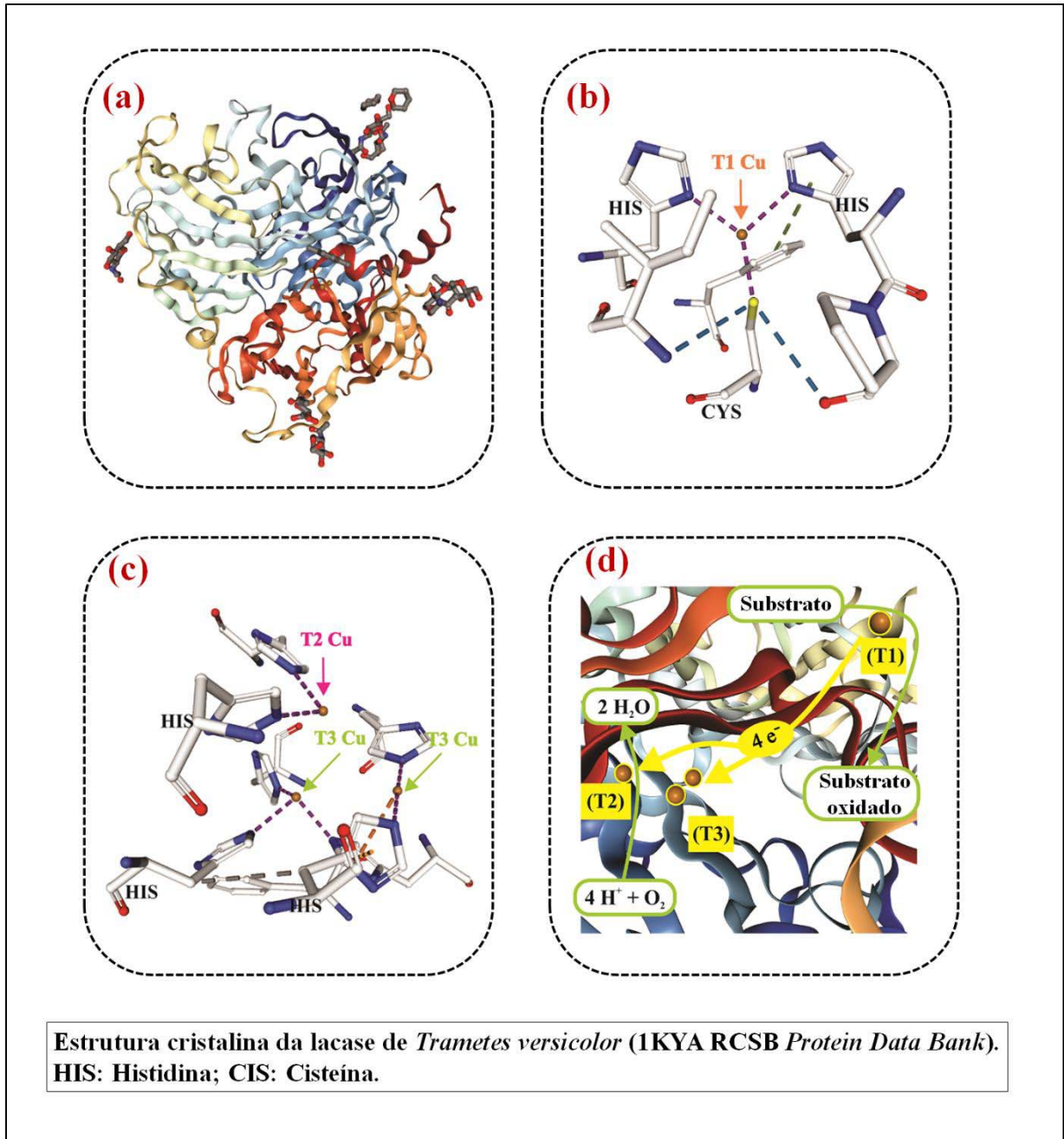
A lacase de *Trametes versicolor* foi expressa em *Trametes ressei*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus niger*. Como apresentada na Figura 11, a lacase apresenta íons de cobre em seu centro catalítico que podem oxidar uma ampla gama de compostos orgânicos juntamente com a redução de quatro elétrons do oxigênio com a formação de água (HAN *et al.*, 2022; COELHO *et al.*, 2023). Os sítios T2 e T3 formam um aglomerado trinuclear onde ocorre a ligação e a redução do oxigênio molecular (CHEN; OH; YAP, 2022).

As lacases são importantes biocatalisadores para várias aplicações industriais. Essas enzimas carecem de cofatores, mas usam oxigênio molecular como acceptor de elétrons para realizar suas reações de oxidação (PHAN *et al.*, 2023), liberando água como um único subproduto (CHEN; OH; YAP, 2022), e tornando-as mais versáteis e capazes de usar vários substratos adicionando mediadores redox às reações (PHAN *et al.*, 2023). O uso de mediadores redox permite a oxidação de produtos químicos que possuem impedimento estérico ou potenciais redox incompatíveis (HAN *et al.*, 2022).

A oxidação de compostos fenólicos pode ser catalisada pela lacase (YUAN *et al.*, 2020), sendo que o escopo de degradação pode ser expandido ainda mais, para também catalisar compostos não fenólicos, pelo uso de mediadores redox (YUAN *et al.*, 2020; HAN *et al.*, 2022). A lacase tem uma maior capacidade de degradar numerosas aminas aromáticas (NACHIYAR *et al.*, 2023) e degrada eficientemente um grande número de compostos recalcitrantes na presença de oxigênio atmosférico (CHEN; OH; YAP, 2022). Além de sua capacidade em catalisar a oxidação de compostos fenólicos, não fenólicos substituídos, aminas aromáticas (PANDEY *et al.*, 2023), ácidos fenólicos e metoxifenólicos; essas enzimas também podem realizar descarboxilação e desmetilação (EKEOMA *et al.*, 2023).

A lacase, como catalisador verde, possui alta atividade catalítica, gera subprodutos menos tóxicos (NASEEM *et al.*, 2023) e sua baixa especificidade de substrato (HAN *et al.*, 2022), aumentaram a demanda por lacase em aplicações biotecnológicas, como a biorremediação (HAN *et al.*, 2022; ALAM *et al.*, 2023), e por isso tem sido amplamente pesquisada na área de remediação de corantes (NASEEM *et al.*, 2023).

Figura 11 – Representação da enzima Lacase e seu sítio catalítico. (a) Estrutura cristalina da Lacase a partir do *Protein Data Bank*; (b) sítio catalítico da Lacase Tipo-1 (T1); (c) sítios catalíticos da Lacase Tipo-2 (T2) e Tipo-3 (T3); e (d) representação esquemática do sistema de oxidação do ciclo catalítico.

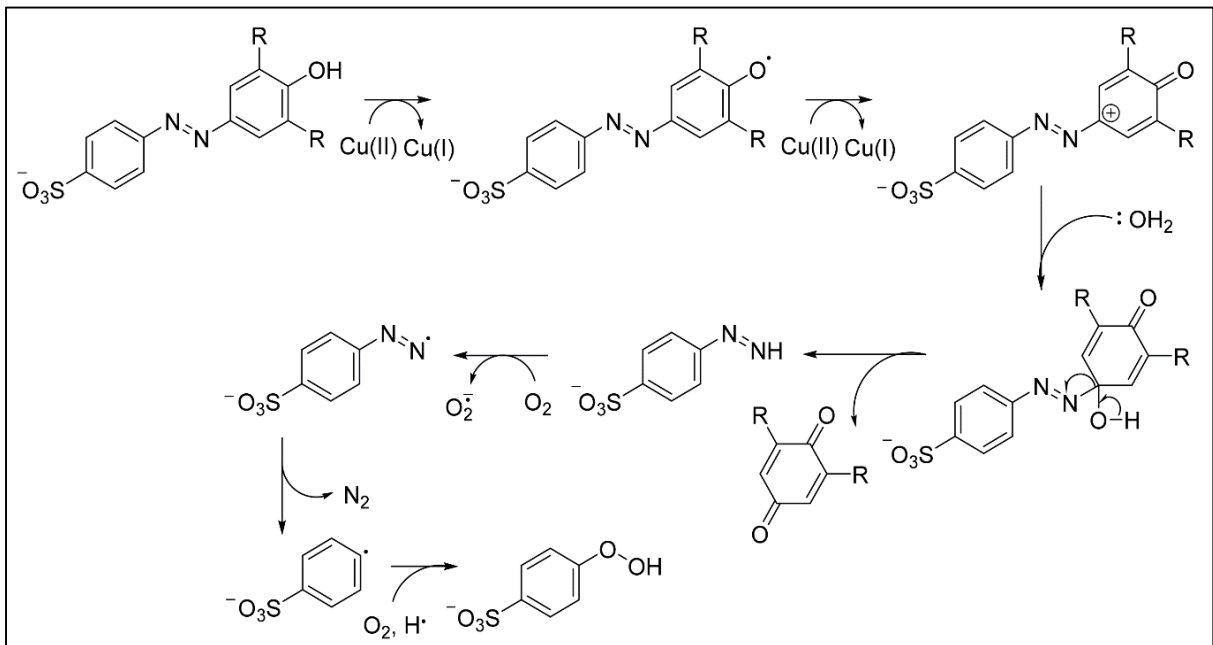


Fonte: Adaptada de Daronch *et al.* (2020).

A capacidade das lacases para degradar corantes azo tem sido intensamente investigada, pois elas demonstraram que podem degradar corantes azo e descolori-los enzimaticamente (ISLAM *et al.*, 2023). A Figura 12 apresenta um exemplo de via de degradação proposta de corantes azo por lacase. Os cobres presentes na estrutura da lacase podem oxidar uma ampla gama de substâncias aromáticas e inorgânicas, onde os quatro íons

Cu^{2+} em seu sítio ativo desempenham um papel importante na oxidação de seu substrato, retirando quatro elétrons do composto, enquanto os quatro íons Cu^{2+} são reduzidos a Cu^+ . A lacase reduzida transfere os elétrons para o dioxigênio e, assim, produz água à medida que retorna ao seu estado de repouso. Enquanto isso, o substrato oxidado se decompõe automaticamente em produtos simples, pois se tornou um cátion radical ativo. Embora alguns substratos oxidados possam reverter ao estado original, o 2,2'-azino-bis (ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico) (ABTS) pode ser usado como um mediador redox para a descoloração e degradação do corante (NGO; TISCHLER, 2022).

Figura 12 – Via de degradação proposta de corantes azo por lacase. Tais atividades foram propostas para o ascomiceto *Pyricularia oryzae*.



Fonte: Ngo e Tischler (2022).

As lacases têm a capacidade de atuar sobre os corantes, criando precipitantes que podem ser facilmente removidos; ou, transformando-os quimicamente em compostos facilmente tratados (ROUTOULA; PATWARDHAN, 2020).

A lacase funciona de maneira ideal em uma faixa de temperatura de 25 a 40°C e pH 7, sendo que variações de pH podem afetar a afinidade e a especificidade dos substratos das lacases, e sua ação catalítica é inibida pela presença de reagentes como azida, haletos (excluindo iodeto), hidróxido e cianeto. O fato de diferentes lacases exibirem diferentes tolerâncias à inibição de haletos indica uma acessibilidade distinta de haletos (EKEOMA *et al.*, 2023). Existem vários estudos que se concentram em várias degradações de corantes usando a lacase,

incluindo *Malachite Green*, *Methylene Blue*, *Bromophenol Blue* e *C.I. Reactive Blue 19*, etc (DATTA *et al.*, 2021).

Embora as lacases demonstrem grande potencial para descolorir uma ampla gama de corantes industriais, a degradação do corante ainda é um grande desafio devido a diversos fatores como altas concentrações de sal, presença de vários metais contaminantes e a natureza complexa dos resíduos (PHAM *et al.*, 2022). Uma vez que a aplicação de enzimas livres em águas residuais leva ao esgotamento rápido da atividade, o que aumenta a frequência de reabastecimento e os custos operacionais), uma solução plausível é imobilizar as enzimas em materiais e superfícies específicas (GAO *et al.*, 2022).

2.5 Imobilização da Lacase

A imobilização pode ser definida como a fixação de biocatalisadores (por exemplo, enzimas, microrganismos e organelas) a sólidos insolúveis (RODRIGUES *et al.*, 2023). O suporte perfeito não deve mostrar nenhum efeito negativo na configuração enzimática, mas deve promover um ambiente favorável na interação por meio da junção adequada com as enzimas (REN *et al.*, 2023).

Apesar das funções promissoras, as aplicações de enzimas livres ainda possuem barreiras a serem otimizadas (ANITA *et al.*, 2020). As aplicações práticas de enzimas são geralmente dificultadas por sua natureza frágil, baixa reutilização e altos custos (HAN *et al.*, 2022). Pois, as enzimas tendem a ser frágeis em condições de alta pressão, como poderia ser encontrado nos processos industriais, como alta temperatura, reações de mistura e forças mecânicas. Em decorrência disso, a estabilidade e a atividade da lacase livre diminuem drasticamente, e esses fatores limitam a aplicação da enzima devido aos processos dispendiosos envolvidos (ANITA *et al.*, 2020). A imobilização de enzimas tem sido considerada uma solução poderosa para esses problemas (HAN *et al.*, 2022).

Existem alguns fatores que afetam o sucesso do sistema enzimático imobilizado, como a natureza do veículo ou material de suporte, as propriedades da enzima e o processo de imobilização (ANITA *et al.*, 2020). Assim, para imobilizar uma enzima, três coisas devem ser levadas em consideração (DARONCH *et al.*, 2020):

1. A seleção do material de suporte, com química de superfície adequada, que define a química de ligação para a fixação da enzima;
2. A avaliação das condições experimentais durante o processo, para otimizar o desempenho operacional;

3. A caracterização do comportamento catalítico do biocatalisador resultante em condições operacionais.

Para materiais do suporte, propriedades como morfologia, área de superfície específica, volume de poro e diâmetro de poro são fatores críticos. Enquanto isso, os valores de rendimento da imobilização devem ser considerados para o sucesso do processo de imobilização. Os benefícios da enzima imobilizada incluem o aumento da estabilidade da enzima em condições extremas, a facilidade de manuseio da enzima e a reutilização para ciclos de reação (ANITA *et al.*, 2020). Uma vantagem predominante das enzimas imobilizadas é a sua reutilização, o que reduz consideravelmente o custo operacional em aplicações práticas (HAN *et al.*, 2022). A imobilização de enzimas frequentemente limita sua liberdade de sofrer mudanças conformacionais drásticas e, portanto, resulta em uma estabilidade mais excelente em relação à desnaturação (RODRIGUES *et al.*, 2023).

A estabilidade da lacase livre se deteriora lentamente com o aumento do tempo de incubação sob condições operacionais extremas, sendo que a atividade da lacase livre diminui e não pode ser reutilizada para degradar os contaminantes. Portanto, para resolver esses problemas, uma estratégia eficiente é a imobilização da lacase em um suporte para melhorar as propriedades da lacase (pH, estabilidade térmica, reutilização e armazenamento) (CHEN; OH; YAP, 2022). Os suportes enzimáticos adequados devem estar disponíveis, preferencialmente serem baratos, não tóxicos e aumentar significativamente a eficiência biocatalítica (AMERI *et al.*, 2023).

Pesquisas científicas sobre a imobilização de lacase têm sido relatadas na literatura desde 1986 (DARONCH *et al.*, 2020). Existem muitos métodos e suportes usados para imobilização de enzimas, que podem focar em um suporte específico, método de imobilização ou enzima. Dentre muitas formas disponíveis de imobilização, as mais amplamente preferidas são adsorção, aprisionamento/encapsulamento e formação de ligação covalente. O teor típico de enzima no produto final é geralmente inferior a 10% em peso (ROUTOULA; PATWARDHAN, 2020).

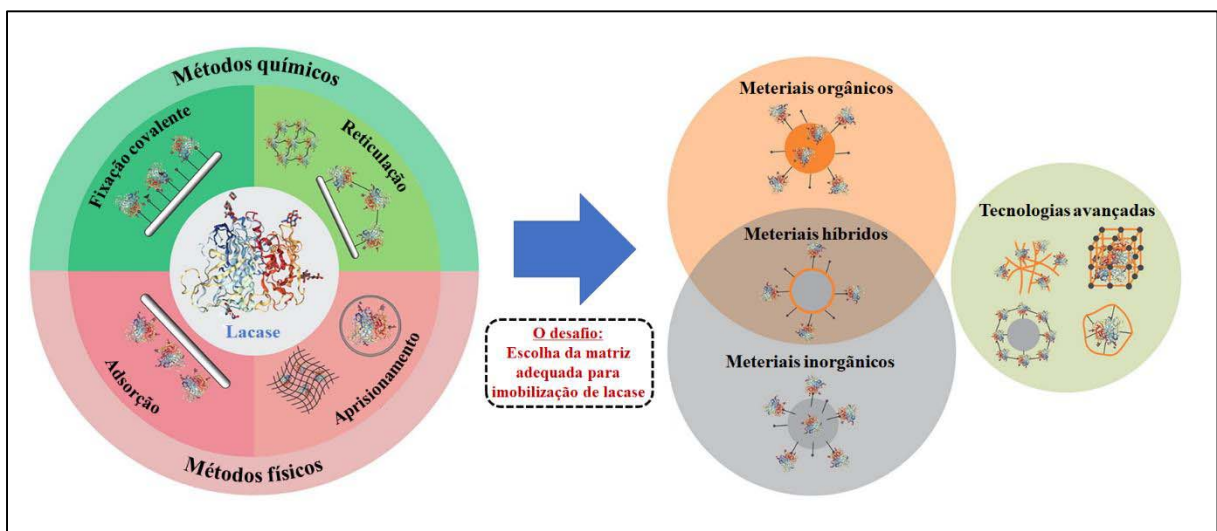
Em comparação com a lacase livre, as enzimas imobilizadas aumentam significativamente a eficiência catalítica, têm bom armazenamento (AMERI *et al.*, 2023), estabilidade operacional, permitem a recuperação (fácil separação de água e águas residuais), reutilização da enzima (AMERI *et al.*, 2023; ZHANG *et al.*, 2023). Além disso, a imobilização da enzima é uma estratégia eficaz para aumentar a estabilidade à temperatura, pH e força mecânica externa, aumentando a eficiência enzimática e o valor da aplicação. A lacase imobilizada no adsorvente é capaz de alcançar a regeneração eficiente da capacidade de

adsorção, assim a lacase pode degradar eficientemente o micropoluinte na fase líquida ou adsorvida no adsorvente a tempo, liberando o local de adsorção do adsorvente e restaurando sua capacidade de adsorção para micropoluentes e, finalmente, obter uma maior capacidade de adsorção. Assim, esse processo pode ser considerado como “adsorção enzimática”. (ZHOU; ZHANG; CAI, 2022).

Embora as lacases imobilizadas sejam operacionalmente mais estáveis do que as lacases livres, a eficiência catalítica da lacase imobilizada é ameaçada pela limitação de transferência de massa, acesso reduzido para o substrato e perda de atividade enzimática devido à lixiviação da enzima (DONG *et al.*, 2023). Uma carga enzimática mais alta pode resultar na aglomeração de lacase no suporte, impedindo que os substratos acessem o centro ativo da lacase e, assim, diminuindo a atividade enzimática (DENG *et al.*, 2022; DONG *et al.*, 2023).

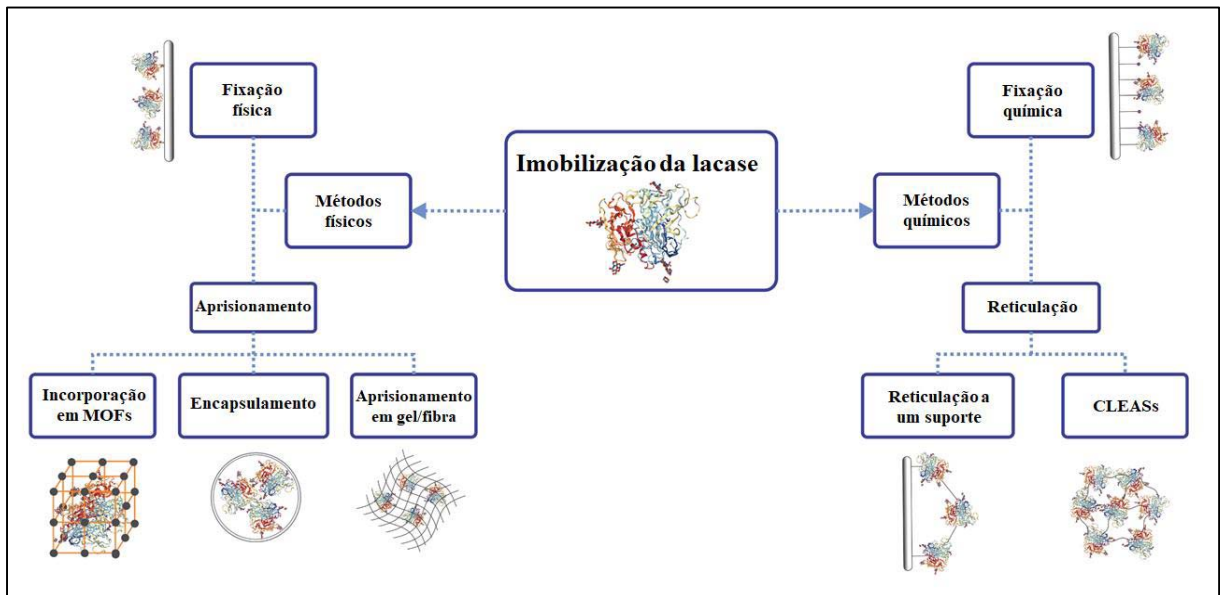
As lacases imobilizadas têm sido amplamente utilizadas para remediação, como a degradação de fenóis e corantes resistentes (DATTA *et al.*, 2021). Diferentes métodos de imobilização e suportes têm sido utilizados para a biodegradação de corantes industriais perigosos por lacase imobilizada (NASEEM *et al.*, 2023). Os métodos de imobilização de enzimas podem ser classificados como físicos e químicos. Na Figura 13 pode ser vista uma visão geral da imobilização de lacase com os tipos de métodos usados e o desafio na escolha da matriz adequada para sua imobilização; enquanto que na Figura 14 é apresentado um diagrama esquemático de alguns métodos de imobilização de lacase (DARONCH *et al.*, 2020).

Figura 13 – Métodos usados para imobilização de Lacase e a escolha da matriz adequada para sua imobilização.



Fonte: Adaptada de Daronch *et al.* (2020).

Figura 14 – Diagrama esquemático de alguns métodos de imobilização de Lacase.



Fonte: Adaptada de Daronch *et al.* (2020).

Os métodos de imobilização química incluem a ligação da enzima à matriz por ligações covalentes. A criação de fortes ligações químicas entre o biocatalisador e a matriz reduz significativamente a perda da enzima e aumenta sua reutilização. A ligação da enzima com o suporte funcionalizado pode ser por ligação covalente ou ligação cruzada (reticulação), que melhora a estabilidade operacional da enzima. Além disso, as enzimas podem ser reticuladas entre si, criando um agregado enzimático reticulado (CLEA) ou criando um cristal enzimático reticulado (CLEC). Dependendo do grupo funcional presente na superfície do suporte, a fixação enzimática se dará de forma diferenciada. Se na superfície do suporte estiverem presentes os grupos $-OH$, $C=O$ e $-NH_2$, apenas métodos de aprisionamento podem ser aplicados, mas em uma superfície com $-OH$, $COOH$, $C=O$, $-SH$, $-NH_2$, pode ocorrer adsorção da enzima e formação de ligação covalente (DARONCH *et al.*, 2020).

A concentração do glutaraldeído (GLU), agente de reticulação, também influencia a atividade relativa e a eficiência de imobilização das lacases, uma vez que concentrações mais altas de GLU impedem a estabilidade catalítica da lacase devido a alterações conformacionais da proteína enzimática (DENG *et al.*, 2022; DONG *et al.*, 2022). O tempo de armazenamento, pH, a temperatura do armazenamento e o número de ciclos de reutilização são os fatores que determinam a estabilidade operacional da lacase imobilizada. Embora haja uma diminuição da atividade relativa com o aumento da duração do armazenamento em diferentes pH e temperaturas, as lacases imobilizadas são, em geral, robustas em manter atividades catalíticas superiores às lacases livres (DONG *et al.*, 2022).

Embora a imobilização enzimática ajude a superar as limitações da aplicação, as técnicas de imobilização ainda apresentam limitações (AL-SAREJI *et al.*, 2023). O suporte é a peça chave para a imobilização da lacase. Os materiais veiculares adequados são propícios para aumentar a capacidade catalítica da enzima e a estabilidade da lacase imobilizada. Em comparação com lacases livres, a lacase imobilizada não só reduz a perda de atividade enzimática, mas também melhora a estabilidade térmica, estabilidade de armazenamento e estabilidade operacional. Existe uma grande variedade de materiais de suporte, que podem ser divididos em suportes tradicionais e novos materiais. Em comparação com os materiais tradicionais, os novos materiais têm estruturas ou propriedades especiais, por exemplo, magnetismo e condutividade, de modo que as lacases imobilizadas preparadas têm vantagens únicas (ZHOU; ZHANG; CAI, 2021).

Não existe uma combinação definida de técnica, suporte e enzima, pois a imobilização depende muito da reação/processo alvo, das condições dadas e das possíveis interações. O que se pretende é criar um biocatalisador estável e ativo que possa ser aplicado a nível industrial a um custo total aceitável (ROUTOULA; PATWARDHAN, 2020). A temperatura e pH ótimos das lacases variam de 20 a 60°C e 3 a 9, respectivamente, dependendo da fonte da enzima e do substrato (DARONCH *et al.*, 2020). As lacases podem ser instáveis à temperatura ambiente, e sua conformação frequentemente muda em um ambiente fortemente ácido ou alcalino, tornando-as menos eficazes. Portanto, a imobilização de lacases em suportes pode efetivamente melhorar a estabilidade e reutilização e agregar valor industrial. Como muitos fatores podem levar à diminuição da atividade enzimática, a seleção de um suporte adequado pode garantir a atividade e a utilização econômica dos catalisadores imobilizados (REN *et al.*, 2023).

Há um interesse crescente em imobilizar a lacase em adsorventes para alcançar alta remoção de poluentes através de adsorção e biodegradação simultâneas (AL-SAREJI *et al.*, 2023). A imobilização de enzimas é considerada uma das abordagens mais eficazes para aumentar a separação mais fácil do reator. Além disso, para as próprias enzimas, a imobilização pode prevenir a aglomeração enzimática e a dissociação de subunidades, e a estrutura da enzima também se torna rígida, o que fornece um microambiente adequado para todo o processo catalítico. Assim, desenvolver novos tipos de materiais e seus métodos de imobilização relacionados é altamente desejável (REN *et al.*, 2023).

Como o custo de produção da lacase é elevado, daí a importância da imobilização em suportes sólidos (IQHRAMMULLAH *et al.*, 2023). Todavia, deve ser ressaltado que a introdução de suporte tende a aumentar os custos de produção, tornando essencial o

desenvolvimento de substratos excelentes e de baixo custo para combinação com enzimas (REN *et al.*, 2023). Enzimas imobilizadas podem ser econômicas se o custo de imobilização (custo total de cada etapa do processo) for menor do que o custo de separação de enzimas solúveis do produto (e de purificação adicional do produto, se necessário); além do custo de usar enzima livre em cada “rodada catalítica” (ROUTOULA; PATWARDHAN, 2020). A imobilização de enzimas já provou fortalecer a reutilização do adsorvente e a taxa de remoção de poluentes enquanto diminui o custo operacional (ZHOU; ZHANG; CAI, 2021).

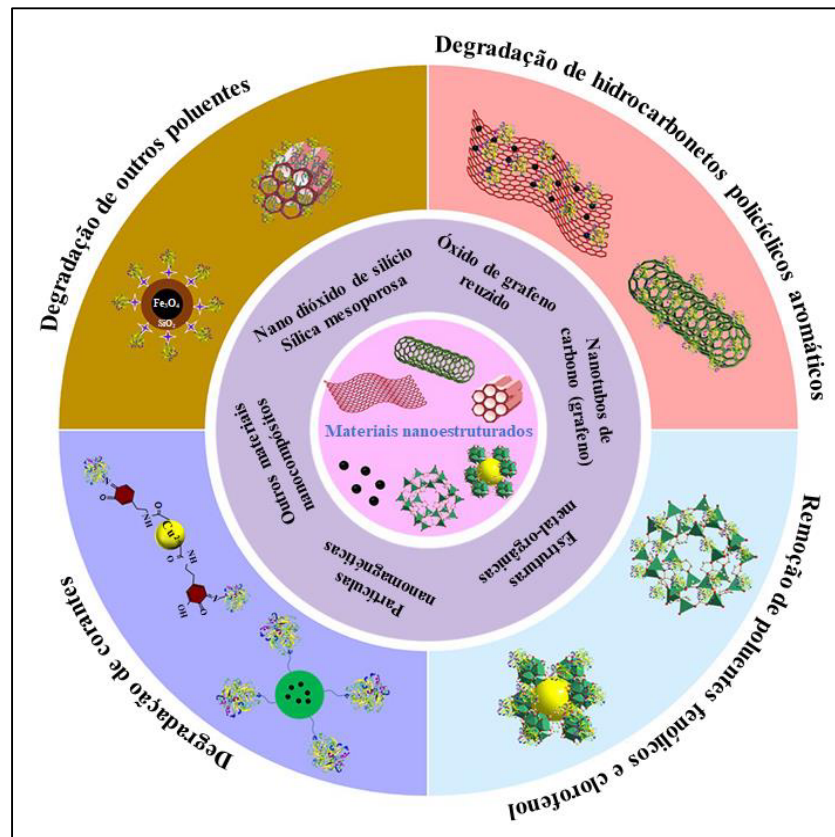
2.5.1 Nanocompósitos magnéticos (NCM)

Nos últimos anos, os nanomateriais, como as nanopartículas, nanotubos, nanofibras, nanoporos, nanofolhas e nanocompósitos têm apresentado vantagens incomparáveis na imobilização de enzimas, o que pode garantir a construção de um microambiente adequado entre os suportes e as enzimas para uma biocatálise ótima (SOUZA *et al.*, 2017; REN *et al.*, 2023).

Em comparação com os materiais de imobilização tradicionais, os nanomateriais exibem suas grandes vantagens em termos de grandes áreas de superfície, boa porosidade, baixa resistência à transferência de massa e locais de ligação abundantes que são benéficos para a imobilização da lacase (ZHANG *et al.*, 2023). Algumas nanopartículas, como estruturas metal-orgânicas (MOFs) e nanotubos de carbono são amplamente relatadas para imobilização de enzimas devido às suas propriedades únicas, como proporções de superfície para volume (GAO *et al.*, 2022). O termo “nanopartículas” é utilizado para definir partículas com uma faixa de tamanho de 1 a 100 nm em pelo menos uma de suas três dimensões (FREIRE *et al.*, 2016b).

A Figura 15 mostra algumas aplicações da lacase imobilizada em nanocompósitos na degradação de resíduos poluentes. Os materiais nanocompósitos adequados são condutivos para aumentar a capacidade catalítica da enzima, carregamento de lacase, eficiência de recuperação de atividade e estabilidade. Em comparação com a lacase livre, a lacase imobilizada reduz a perda de atividade da enzima e também melhora sua estabilidade (ZHANG *et al.*, 2023).

Figura 15 – Os materiais nanocompósitos para imobilização de Lacase e suas aplicações na remoção da poluição da água.



Fonte: Adaptada de Zhang *et al.* (2023).

As técnicas de imobilização permitem a reutilização ou aplicação de enzimas em processos contínuos, além de diminuir a taxa de desativação das mesmas em diferentes condições de processo. Para uma imobilização enzimática bem sucedida, a escolha do suporte é uma etapa crucial e, os nanomateriais, especialmente as nanopartículas magnéticas (MNPs) (OLIVEIRA *et al.*, 2020), têm atraído muita atenção devido à sua alta capacidade de adsorção, regeneração (PEHLIVAN *et al.*, 2020), grande área de superfície específica, superfície facilmente modificável por métodos químicos, boa estabilidade em uma ampla faixa de valores de temperatura e pH (OLIVEIRA *et al.*, 2020), e fácil separação da mistura de reação por um campo magnético (OLIVEIRA *et al.*, 2020; PEHLIVAN *et al.*, 2020). O método de separação magnética possui características como alta eficiência, baixo custo e ecologicamente correto em comparação com os métodos tradicionais de centrifugação e filtração (PEHLIVAN *et al.*, 2020).

2.5.1.1 MNPs e suas propriedades magnéticas

O magnetismo é conhecido pelo homem há milhares de anos, existem relatos sobre o surgimento das primeiras teorias sobre magnetismo na Idade Antiga. Os gregos, nesse período, observaram que determinados fragmentos de rochas da região da Magnésia, na Ásia menor, atraíam pedaços de determinados metais. A rocha encontrada era, no entanto, um tipo de minério de ferro chamado magnetita (Fe_3O_4), daí a denominação de magnetismo a essa propriedade.

Entretanto, o estudo de magnetismo e, dos seus princípios e mecanismos, é relativamente recente. O magnetismo moderno teve início no século XIX com os estudos de Hans Oersted. Em 1819, esse pesquisador observou o desvio de uma agulha imantada causado pela proximidade de um fio com corrente elétrica. Além dele, vários pesquisadores contribuíram para desvendar o fenômeno do magnetismo ao longo do tempo, como André-Marie Ampère, Dominique François Arago, Carl Friederich Gauss, Michael Faraday, Pierre Curie, J. J. Thompson, Niels Bohr, Goudsmit e Uhlenbeck (SILVA, 2011).

Por outro lado, que a magnetita é um ímã natural, pode-se obter ímãs artificiais através do processo de imantação, a saber: a) por atrito, quando uma barra de ferro é atritada por um ímã sempre no mesmo sentido; b) por contato, quando uma barra de ferro é colocada em contato com um ímã; c) por indução, quando uma barra de ferro se imanta pela proximidade de um ímã sem que haja contato, apenas pela influência; d) por corrente elétrica, quando um fio condutor de eletricidade é enrolado a uma barra de ferro e percorrido por uma corrente contínua (SILVA, 2014).

Os fenômenos magnéticos podem ser expressos por duas grandezas: o vetor indução magnética B e o vetor intensidade de campo magnético H . B depende tanto da corrente de condução quanto da magnetização do meio (corrente de Ampère), enquanto H está relacionado com a corrente que cria o campo (corrente de condução). Portanto, B é a resposta a um campo externo (H) aplicado em um material magnético (RODRIGUÉZ, 1998; RIBEIRO, 2000). Então, B e H se relacionam conforme Equação (2.1):

$$B = \mu \cdot H \quad (2.1)$$




Onde:

μ é a permeabilidade magnética.

Os materiais são classificados pela sua resposta a um campo magnético aplicado externamente. Cinco tipos básicos de magnetismo podem ser descritos: diamagnetismo, paramagnetismo, ferromagnetismo, antiferromagnetismo e ferrimagnetismo, conforme vistos na Figura 16, como diamagnéticos, paramagnéticos, antiferromagnéticos, ferromagnéticos e ferrimagnéticos, e o prefixo refere-se à natureza das interações de ligação entre os dipolos dentro do material.

O magnetismo de um material é uma consequência direta do momento angular orbital e do momento de spin dos elétrons. Em cada átomo, os momentos magnéticos de orbital e de spin do conjunto de todos os elétrons se acoplam, resultando no cancelamento total ou a soma desses momentos. Assim, o magnetismo observado nos átomos é uma consequência da existência ou não do cancelamento desses momentos, sendo que o não cancelamento desses, leva ao momento magnético atômico resultante (SILVA, 2013).

Figura 16 – Representação e classificação dos diferentes tipos de materiais magnéticos.

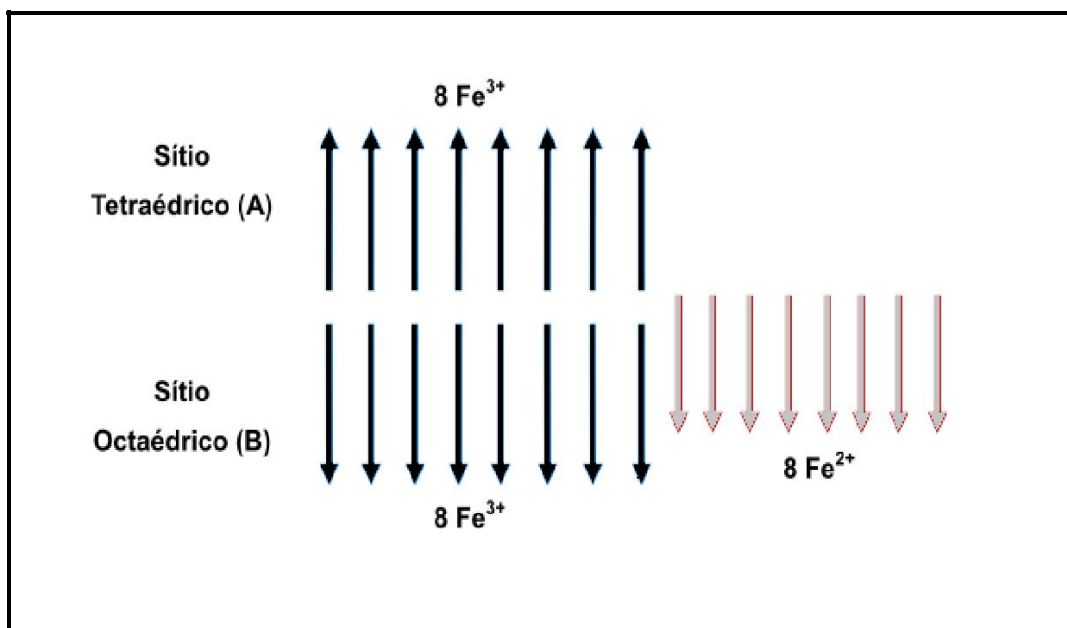
Formação espontânea de domínios magnéticos	Ferromagnetismo		Momentos de átomos individuais alinhados
	Antiferromagnetismo		Momentos alinhados alternadamente
	Ferrimagnetismo		Momentos desiguais alinhados alternadamente
Sem domínios	Paramagnetismo	Sem ordem magnética de longo alcance; alinhamento com campo externo	
	Diamagnetismo	Sem ordem magnética de longo alcance; alinhamento oposto ao campo externo	

Fonte: Adaptado de Mathew e Juang (2007).

2.5.1.1.1 Visão geral da estrutura das ferromagnetistas

A magnetita pertence a uma classe de materiais com estrutura cúbica de espinélio, cuja fórmula geral é escrita como AB_2O_4 , em que A e B denotam os sítios tetraédricos e octaédricos ocupados por cátions de carga $2+$ e $3+$, respectivamente. No caso da magnetita, considera-se sua estrutura como sendo de espinélio inverso, uma vez que a posição dos cátions é invertida: os íons Fe^{2+} ocupam metade dos sítios B, enquanto que o Fe^{3+} ocupam todos os sítios A e metade dos sítios B (FIGURA 17). O magnetismo observado no Fe_3O_4 está diretamente relacionado à distribuição catiônica em sua estrutura, os íons Fe^{3+} que ocupam ambos os sítios A e B apresenta alinhamento antiparalelo, havendo, portanto, um cancelamento total dos seus respectivos momentos magnéticos. Dessa forma, a magnetização líquida do material é resultante apenas da contribuição dos íons Fe^{2+} , podendo a magnetita ser considerada, então, ferromagnética e com alta magnetização de saturação (FREIRE *et al.*, 2016b; SOUZA, 2011).

Figura 17 – Representação esquemática das interações de spin de $FeO.Fe_2O_3$.



Fonte: Adaptado de Silva (2011).

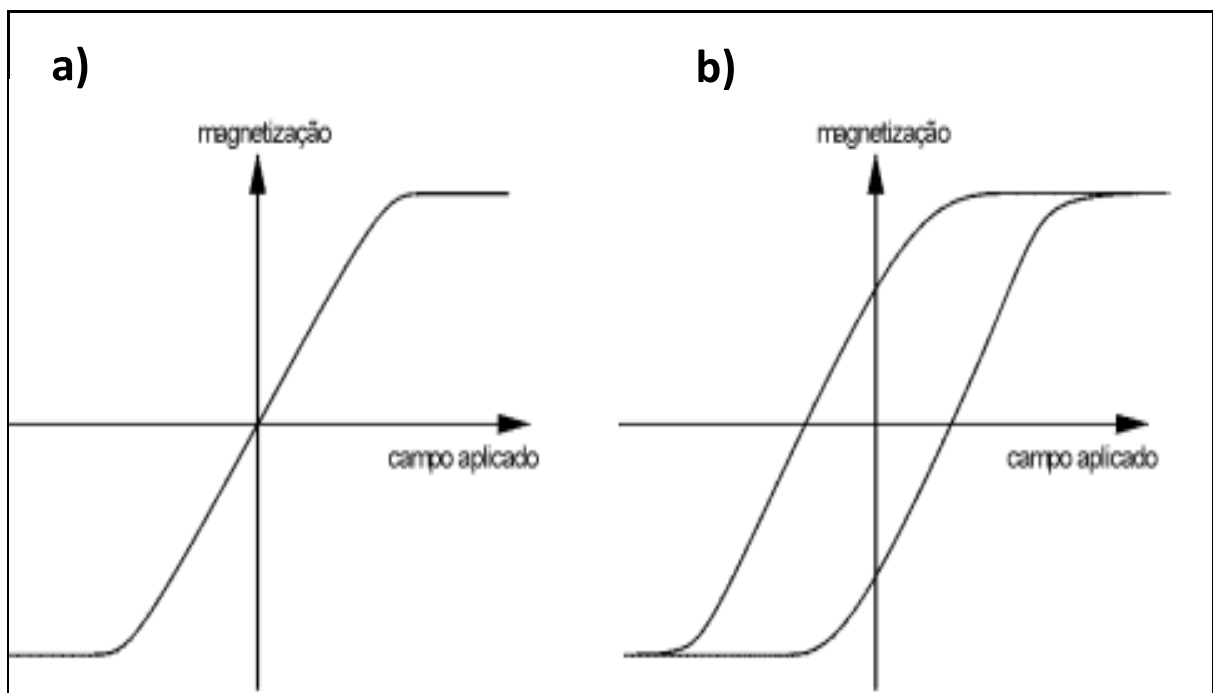
2.5.1.1.2 Histerese Magnética

Para verificar a capacidade de magnetização e desmagnetização de um material, se analisa a sua histerese. Em termos gerais, a histerese magnética mostra a tendência de um

material em manter suas propriedades magnéticas, na ausência de um estímulo externo que as gerou.

Então, uma maneira de estudar os processos de magnetização em um material ferromagnético é submetê-lo a um campo externo variável, e acompanhar o comportamento da magnetização total do material à medida que o campo aplicado se modifica. Pode-se, então, traçar uma curva de magnetização em função do campo. E esta curva será uma somatória de todos os processos reversíveis e irreversíveis de magnetização que vão ocorrendo à medida que o campo varia. Na Figura 18 (a) temos um exemplo de como seria uma curva onde dominam processos reversíveis. Na Figura 18 (b) temos um exemplo do que ocorre quando há processos irreversíveis numa curva (SINNECKER, 2000).

Figura 18 – Curvas de magnetização (a) predominantemente reversível e (b) onde há processos irreversíveis caracterizando a formação de uma histerese.

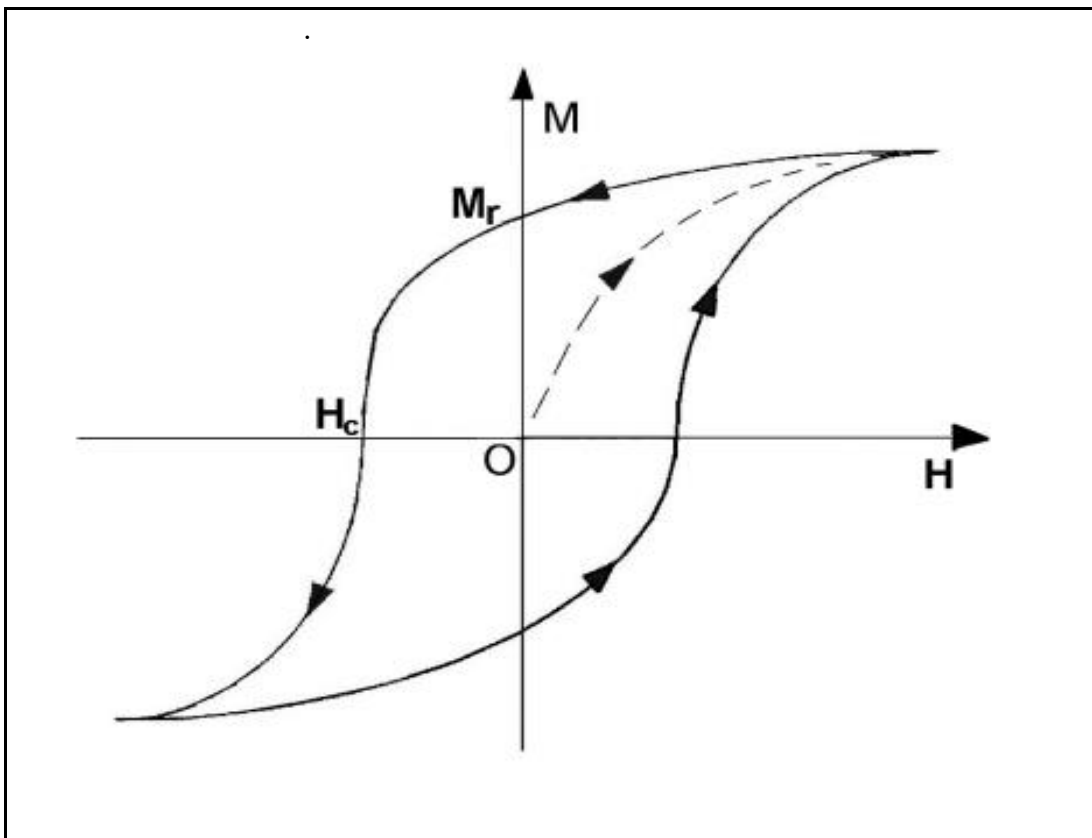


Fonte: Zhao e Wen, 2020; Sinnecker (2000).

Aplicando-se um campo no material inicialmente desmagnetizado (FIGURA 19), esse seguirá a curva pontilhada até atingir um patamar constante chamado de magnetização de saturação (M_s). Em que, M_s é a magnetização máxima que pode ser induzida por um campo magnético externo dentro de um material. Através da diminuição do campo a partir desse valor, M decresce mais lentamente seguindo o sentido dado pela seta até um valor residual da

magnetização para um campo nulo chamado de magnetização remanescente (M_r), em que o material permanece magnetizado sem aplicação de campo. Invertendo, agora, o sentido do campo; esse segue no mesmo sentido da curva para valores de M menores que M_r até que a magnetização se anule para um determinado valor de campo, chamado de campo coercivo (H_c). Ainda com a continuação da variação do módulo do campo se obtém novamente uma região de saturação; e, repetindo o ciclo no sentido inverso, ocorre uma curva fechada que é chamado ciclo de histerese (RIBEIRO, 2000; COELHO, 2011; HOSSAIN; HOSSAIN; SIKDER, 2022).

Figura 19 – A magnetização (M) versus força do campo magnético aplicado (H), onde M_s é a magnetização de saturação, M_r é a magnetização remanescente e H_c é a coercividade.



Fonte: Adaptado de Hossain, Hossain e Sikder (2022).

Embora as MNPs compostas por óxido de ferro (Fe_3O_4) magnético puro tenham excelente eficiência de separação, há desafios em usá-las (HAMEDI; REZAEI; ZENDEHBOUDI, 2022).

Pois, essas são altamente sensíveis a condições ácidas e oxidativas, e tendem a se agregar em meio líquido devido às fortes atrações magnéticas dipolo-dipolo entre as partículas

(OLIVEIRA *et al.*, 2020); em vista disso, resulta em sua precipitação e alta atividade química; consequentemente, causa oxidação pelo ar e perda de magnetismo nas nanopartículas (HAMEDÍ; REZAEI; ZENDEHBOUDI, 2022). Exigindo, portanto, uma modificação ou funcionalização (OLIVEIRA *et al.*, 2020).

Assim sendo, a estabilização das MNPs se faz necessária, através do desenvolvimento de uma camada de revestimento usando diferentes compostos orgânicos/inorgânicos (HAMEDÍ; REZAEI; ZENDEHBOUDI, 2022).

2.5.1.2 Nanopartículas de magnetita revestidas com quitosana

Materiais nanocompósitos têm sido desenvolvidos e aplicados na imobilização eficiente de lacase devido ao seu desempenho físico, químico e biológico superior. As propriedades superiores do nanocompósito podem efetivamente melhorar a quantidade de carregamento, a eficiência catalítica e a estabilidade da lacase. Além disso, pode reter as propriedades originais tanto quanto possível, ao mesmo tempo em que cria novas propriedades, que desempenham um papel positivo na imobilização da lacase (ZHANG *et al.*, 2023).

Atualmente, os pesquisadores têm dado atenção especial à fabricação de materiais adsorventes magnéticos devido à sua fácil separação da solução tratada pelo campo magnético externo (REGHIOUA *et al.*, 2021). As MNPs são frequentemente usadas como materiais de imobilização porque não interferem nas propriedades naturais de biomacromoléculas, como proteínas e enzimas e, portanto, biomacromoléculas conseguem manter suas atividades biológicas (ULU *et al.*, 2020).

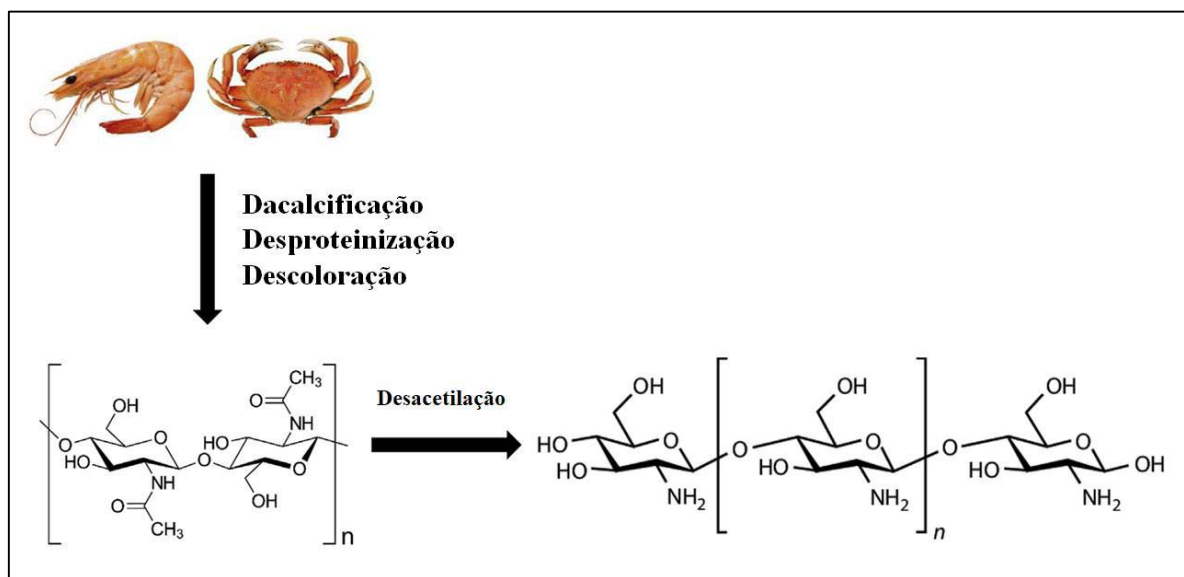
O Fe_3O_4 é uma das partículas magnéticas comumente usadas como núcleo magnético em adsorventes devido às suas propriedades notáveis, como alta área superficial, biocompatibilidade, capacidade de resposta magnética, estabilidade química (REGHIOUA *et al.*, 2021). As MNPs de Fe_3O_4 têm um tamanho de poro ajustável, estrutura porosa ordenada e grande área de superfície específica que melhoram o desempenho de biocatalisadores para degradação de poluentes orgânicos (DENG *et al.*, 2022; DONG *et al.*, 2023). Para evitar a formação de agregados e a fácil oxidação na presença do ar, o núcleo magnético das nanopartículas de Fe_3O_4 pode ser coberta por uma fina camada de moléculas orgânicas, polímeros e também por materiais inorgânicos, como sílica e óxidos metálicos (DARONCH *et al.*, 2020).

Dentre os polímeros utilizados para estabilizar as MNPs, a quitosana (CHI) se destaca pela sua baixa toxicidade e boa biocompatibilidade, bem como pela presença de grupos

amino que possibilitam a imobilização da enzima por reticulação com reagentes bifuncionais como o GLU (OLIVEIRA *et al.*, 2020). A CHI é um biopolímero que exibe características como facilidade de modificação, alta capacidade de adsorção, atividade antimicrobiana, disponibilidade, biodegradabilidade e não toxicidade (QAMAR *et al.*, 2020; JAWAD *et al.*, 2022; REGHIOUA *et al.*, 2021). A CHI é um polissacarídeo natural, bioativo e catiônico, formado por subunidades de glucosamina e N-acetilglucosamina ligadas por ligações β (1–4). Ela é insolúvel em água e outros solventes orgânicos, mas pode ser dissolvida em certos ácidos orgânicos (isto é, ácido acético e ácido fórmico) (QAMAR *et al.*, 2020).

A quitina é um dos polímeros naturais mais abundantes na terra e importante recurso de biomassa que é produzida em animais. Ela é utilizada como matéria-prima para a produção de CHI por desacetilação, onde as principais etapas envolvidas nessa conversão são desmineralização, desproteinização e descoloração. Todas essas etapas são realizadas por meios químicos ou biológicos (fermentação e/ou tratamento enzimático). A Figura 20 apresenta a obtenção da CHI a partir da quitina proveniente de recursos naturais (QAMAR *et al.*, 2020).

Figura 20 – Extração de quitina de recursos naturais e sua conversão em quitosana.



Fonte: Adaptada de Qamar *et al.* (2020).

A CHI é extensivamente aplicada na remoção de corantes orgânicos e íons metálicos devido à presença de sítios ativos (grupos amino e hidroxila) em seu esqueleto. A presença de grupos funcionais amino protonados ($-\text{NH}_3^+$) na CHI são responsáveis por adsorver uma molécula orgânica aniônica, especialmente em ambientes ácidos por atração eletrostática. Muitos estudos relataram a aplicação da CHI e derivados de CHI para a remoção de corantes

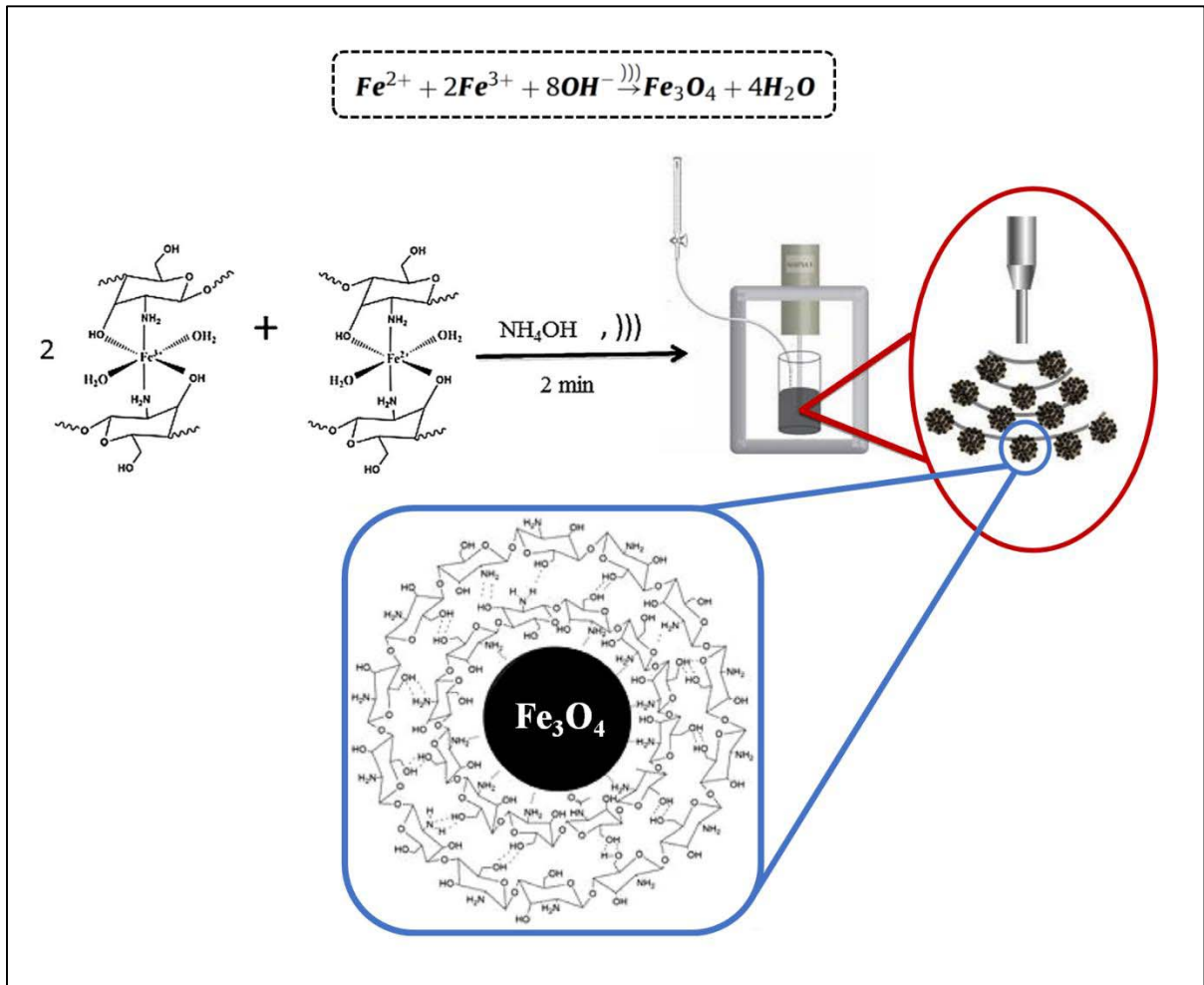
de efluentes (REGHIOUA *et al.*, 2021). No entanto, o uso da CHI pura é restrito por sua dissociação em ambiente ácido, baixa estabilidade química, pequena área superficial (JAWAD *et al.*, 2022), formação de colóides na água, degradação por ações químicas e fraca resistência mecânica (REGHIOUA *et al.*, 2021).

O desenvolvimento de propriedades da CHI por composição com nanopartículas de óxido metálico atraiu atenção especial devido às suas excelentes propriedades, como estabilidade química, proteção ao meio ambiente, alta área superficial, característica estrutural e propriedade adsorptiva desejável (REGHIOUA *et al.*, 2021). Portanto, a combinação de componentes inorgânicos ou orgânicos com a CHI é uma forma eficaz e comum de gerar novos materiais com características novas ou aprimoradas (JAWAD *et al.*, 2022).

Os nanocompósitos de magnetita à base de CHI podem ser sintetizados usando um método versátil assistido por ultrassom *in situ* envolvendo uma etapa rápida, onde a coprecipitação química e a funcionalização ocorrem ao mesmo tempo. O esquema do procedimento e a estrutura idealizada obtida são mostrados na Figura 21. Uma vez que a síntese está sendo realizada sob irradiação de ultrassom, as próprias ondas de sonicação (energia mecânica vibratória gerada no conversor do equipamento) promovem uma dispersão homogênea com uma área superficial ultraelevada entre a CHI e os íons de ferro. Na primeira etapa, os íons ferro (Fe^{2+} e Fe^{3+}) são capturados pelos grupos amino da CHI para formar o complexo Fe-CHI. Como resultado desse efeito de quelação, os grupos amino quelados podem dificultar a difusão dos íons de ferro, controlando o crescimento dos cristais de magnetita. Na segunda etapa, enquanto a base é adicionada, o processo de cavitação melhora a homogeneidade do sistema, evitando a formação de aglomerados durante o crescimento do cristal (FREIRE *et al.*, 2016a).

A combinação de precursores orgânicos e inorgânicos gera materiais híbridos mais biocompatíveis com os peptídeos contidos nas enzimas (EKEOMA *et al.*, 2023). A imobilização da enzima lacase pode ser feita em nanopartículas de magnetita revestidas com CHI (Fe_3O_4 -CHI) de modo que a enzima imobilizada possa ser utilizada repetidamente (KALKAN *et al.*, 2012; ZHANG *et al.*, 2020). Ao imobilizar a lacase em um compósito híbrido de Fe_3O_4 com CHI tiolada (Fe_3O_4 - TCS), Ulu *et al.* (2020) obteve uma alta estabilidade em uma ampla faixa de temperatura e pH, sendo que a lacase imobilizada exibiu boa capacidade de reutilização (20 vezes), apresentando atividade de descoloração de corantes têxteis orgânicos a longo prazo (corante azo *Reactive Blue* 171 e corante índigo *Acid Blue* 74).

Figura 21 – Representação esquemática da preparação de nanocompósitos de Fe₃O₄-CHI por ultrassom e seu arranjo estrutural final.



Fonte: Adaptada de Freire *et al.* (2016a).

2.6 Referências

ABDOUL, H. J. *et al.* Efficient adsorption of bulky reactive dyes from water using sustainably-derived mesoporous carbons. **Environmental Research**, [s. l.], v. 221, p. 115254, 2023.

AHMOUDA, K.; BOUDIAF, M.; BENHAOUA, B. A novel study on the preferential attachment of chromophore and auxochrome groups in azo dye adsorption on different greenly synthesized magnetite nanoparticles: investigation of the influence of the mediating plant extract's acidity. **Nanoscale Advances**, [s. l.], v. 4, n. 15, p. 3250-3271, 2022.

ALAM, R. *et al.* Understanding the biodegradation pathways of azo dyes by immobilized white-rot fungus, *Trametes hirsuta* D7, using UPLC-PDA-FTICR MS supported by *in silico* simulations and toxicity assessment. **Chemosphere**, [s. l.], v. 313, p. 137505, 2023.

AL-SAREJI, O. J. *et al.* Ketoprofen and aspirin removal by laccase immobilized on date stones. **Chemosphere**, [s. l.], v. 311, p. 137133, 2023.

AL-TOHAMY, R. *et al.* A critical review on the treatment of dye-containing wastewater: Ecotoxicological and health concerns of textile dyes and possible remediation approaches for environmental safety. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, [s. l.], v. 231, p. 113160, 2022.

AMERI, A. *et al.* Removal of dyes by *Trametes versicolor* laccase immobilized on NaY-zeolite. **Chemical Engineering Research and Design**, [s. l.], v. 197, p. 240-253, 2023.

ANITA, S. H. *et al.* Immobilization of laccase from *Trametes hirsuta* EDN 082 in light expanded clay aggregate for decolorization of Remazol Brilliant Blue R dye. **Bioresource Technology Reports**, [s. l.], v. 12, p. 100602, 2020.

APPAVU, B.; THIRIPURANTHAGAN, S.; SURESHKUMAR, T. Novel band gap engineered Bi₅Nb₃O₁₅/N-rGO composite catalyst for photo degradation of reactive dyes. **Materials Science and Engineering: B**, [s. l.], v. 252, p. 114472, 2020.

ARDILA-LEAL, L. D. *et al.* A brief history of colour, the environmental impact of synthetic dyes and removal by using laccases. **Molecules**, [s. l.], v. 26, n. 13, p. 3813, 2021.

AYED, L. *et al.* Decolorization and phytotoxicity reduction of reactive blue 40 dye in real textile wastewater by active consortium: anaerobic/aerobic algal-bacterial-probiotic bioreactor. **Journal of Microbiological Methods**, [s. l.], v. 181, p. 106129, 2021.

BANERJEE, D.; SHARMA, A. K.; DAS, N. S. **Nano Materials Induced Removal of Textile Dyes from Waste Water**. 1. ed. [S. l.]: Bentham Science Publishers, 2022.

BENKHAYA, S.; M'RABET, S.; EL HARFI, A. A review on classifications, recent synthesis and applications of textile dyes. **Inorganic Chemistry Communications**, [s. l.], v. 115, p. 107891, 2020.

BRASIL. MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE – CONAMA. **Resolução nº 430, de 13 de maio de 2011**. Dispõe sobre as condições e padrões de lançamento de efluentes, complementa e altera a Resolução nº 357, de 17 de março de 2005, do Conselho Nacional do Meio Ambiente – CONAMA. Brasília, DF: Presidente do Conselho, 2011. Disponível em: <https://www.ibama.gov.br/sophia/cnia/legislacao/CONAMA/RE0430-130511.PDF>. Acesso em: 20 jan. 2023.

CASTILLO-SUÁREZ, L. A. *et al.* A critical review of textile industry wastewater: green technologies for the removal of indigo dyes. **International Journal of Environmental Science and Technology**, [s. l.], v. 20, p. 1-38, 2023.

CEARÁ. CONSELHO ESTADUAL DE MEIO AMBIENTE – COEMA. **Resolução Nº 02, de 02 de fevereiro de 2017**. Dispõe sobre padrões e condições para lançamento de efluentes líquidos gerados por fontes poluidoras, revoga as Portarias SEMACE nº 154, de 22 de julho de 2002 e nº 111, de 05 de abril de 2011, e altera a Portaria SEMACE nº 151, de 25 de novembro de 2002. Fortaleza, CE: Presidente do Coema, 2017. Disponível em: <https://www.semace.ce.gov.br/wp-content/uploads/sites/46/2019/09/COEMA-02-2017.pdf>. Acesso em: 20 jan. 2023.

CHAND, S.; CHAND, S.; RAULA, B. Textile and apparel industries waste and its sustainable management approaches. **Journal of Material Cycles and Waste Management**, [s. l.], p. 1-12, 2023.

CHEN, Z.; OH, W-D.; YAP, P-S. Recent advances in the utilization of immobilized laccase for the degradation of phenolic compounds in aqueous solutions: A review. **Chemosphere**, [s. l.], v. 307, n. 3, p. 135824, 2022.

COELHO, G. D. *et al.* *In silico* and *in vitro* assays suggests Congo red dye degradation by a *Lentinus sp.* laccase enzyme. **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics**, [s. l.], p. 1-12, 2023.

COELHO, T. C. **Desenvolvimento de fluidos e filmes magnéticos a partir de óxidos de ferro para aplicações biomédicas**. 2011. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2011. Disponível em: <https://repositorio.ufsc.br/handle/123456789/96076>. Acesso em: 19 out. 2023.

DARONCH, N. A. *et al.* Elucidating the choice for a precise matrix for laccase immobilization: A review. **Chemical Engineering Journal**, [s. l.], v. 397, p. 125506, 2020.

DATTA, S. *et al.* Immobilization of laccases and applications for the detection and remediation of pollutants: a review. **Environmental Chemistry Letters**, [s. l.], v. 19, n. 1, p. 521-538, 2021.

DENG, J. *et al.* Catalyzed degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by recoverable magnetic chitosan immobilized laccase from *Trametes versicolor*. **Chemosphere**, [s. l.], v. 301, p. 134753, 2022.

DETJOB, A.; BOONNORAT, J.; PHATTARAPATTAMAWONG, S. Synergistic decolorization and detoxication of reactive dye Navy Blue 250 (NB250) and dye wastewater by the UV/Chlorine process. **Environmental Engineering Research**, [s. l.], v. 28, n. 4, 2023.

DONG, Cheng-Di *et al.* Laccase: A potential biocatalyst for pollutant degradation. **Environmental Pollution**, [s. l.], v. 319, p. 120999, 2023.

EKEOMA, B. C. *et al.* Recent advances in the biocatalytic mitigation of emerging pollutants: a comprehensive review. **Journal of biotechnology**, [s. l.], v. 369, p. 14-34, 2023. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2023.05.003>

ESKIKAYA, O. *et al.* Preparation of hydrochar bio-based catalyst for fenton process in dye-containing wastewater treatment. **Environmental Research**, [s. l.], v. 216, p. 114357, 2023.

FANCHIANG, Jen Mao.; TSENG, Dyi-Hwa. Degradation of anthraquinone dye CI Reactive Blue 19 in aqueous solution by ozonation. **Chemosphere**, [s. l.], v. 77, n. 2, p. 214-221, 2009.

FREIRE, T. M. *et al.* Fast ultrasound assisted synthesis of chitosan-based magnetite nanocomposites as a modified electrode sensor. **Carbohydrate polymers**, [s. l.], v. 151, p. 760-769, 2016a.

FREIRE, T. M. **Síntese e caracterização de nanoquitosanas magnéticas por Sonoquímica**

e sua aplicação na remoção de azo compostos. 2016. Dissertação (Mestrado em Química) – Centro de Ciências, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2016b.

GAO, Y. *et al.* Decolorization and detoxification of synthetic dye compounds by laccase immobilized in vault nanoparticles. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 351, p. 127040, 2022.

GOMES, A. S. *et al.* Cationic dialdehyde cellulose microfibers for efficient removal of eriochrome black T from aqueous solution. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 380, p. 129096, 2023.

GUARATINI, C. C. I.; ZANONI, M. V. B. Corantes têxteis. **Quím. nova**, [s. l.], v. 23, p. 71-78, 2000.

GUPTA, R. *et al.* Potential and future prospects of biochar-based materials and their applications in removal of organic contaminants from industrial wastewater. **Journal of Material Cycles and Waste Management**, [s. l.], v. 24, n. 3, p. 852-876, 2022.

GÜRSES, A. *et al.* **Dyes and Pigments**. 1. ed. [S. l.]: Springer, 2016. p. 13-29.

HAMEDI, H.; REZAEI, N.; ZENDEHBOUDI, S. A comprehensive review on demulsification using functionalized magnetic nanoparticles. **Journal of Cleaner Production**, [s. l.], p. 134868, 2022.

HAN, Z. *et al.* Metal-organic frameworks (MOFs): A novel platform for laccase immobilization and application. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, [s. l.], v. 10, n. 6, p. 108795, 2022.

HOSSAIN, M. D.; HOSSAIN, M. A.; SIKDER, S. S. Hysteresis loop properties of rare earth doped spinel ferrites: A review. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, [s. l.], v. 564, p. 170095, 2022.

IARC. INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. **Some aromatic amines, organic dyes, and related exposures**. France: IARC Press, International Agency for Research on Cancer, 2010.

ILERI, B.; DOGU, I. Sono-degradation of Reactive Blue 19 in aqueous solution and synthetic textile industry wastewater by nanoscale zero-valent aluminum. **Journal of Environmental Management**, [s. l.], v. 303, p. 114200, 2022.

IQHRAMMULLAH, M. *et al.* Laccase Immobilization Using Polymeric Supports for Wastewater Treatment: A Critical Review. **Macromolecular Chemistry and Physics**, [s. l.], v. 224, p. 2200461, 2023.

ISLAM, T. *et al.* Impact of textile dyes on health and ecosystem: A review of structure, causes, and potential solutions. **Environmental Science and Pollution Research**, [s. l.], v. 30, n. 4, p. 9207-9242, 2023.

JAWAD, A. H. *et al.* Process optimization and adsorptive mechanism for reactive blue 19 dye by magnetic crosslinked chitosan/MgO/Fe₃O₄ biocomposite. **Journal of Polymers and the Environment**, [s. l.], v. 30, n. 7, p. 2759-2773, 2022.

KALKAN, N. A. *et al.* Preparation of chitosan-coated magnetite nanoparticles and application for immobilization of laccase. **Journal of Applied Polymer Science**, [s. l.], v. 123, n. 2, p. 707-716, 2012.

KHAN, M. D. *et al.* Current perspectives, recent advancements, and efficiencies of various dye-containing wastewater treatment technologies. **Journal of Water Process Engineering**, [s. l.], v. 53, p. 103579, 2023a.

KHAN, H. *et al.* Novel modeling and optimization framework for Navy Blue adsorption onto eco-friendly magnetic geopolymer composite. **Environmental Research**, [s. l.], v. 216, p. 114346, 2023b.

KHAN, S. A. *et al.* Efficacy of fungi in the decolorization and detoxification of remazol brilliant blue dye in aquatic environments. **Microorganisms**, [s. l.], v. 11, n. 3, p. 703, 2023c.

KHATTAB, T. A.; ABDELRAHMAN, M. S.; REHAN, M. Textile dyeing industry: environmental impacts and remediation. **Environmental Science and Pollution Research**, [s. l.], v. 27, p. 3803-3818, 2020.

LARA, L.; CABRAL, I.; CUNHA, J. Ecological approaches to textile dyeing: a review. **Sustainability**, [s. l.], v. 14, n. 14, p. 8353, 2022.

LELLIS, B. *et al.* Effects of textile dyes on health and the environment and bioremediation potential of living organisms. **Biotechnology Research and Innovation**, [s. l.], v. 3, p. 275-290, 2019.

LI, Y. *et al.* Research on the treatment mechanism of anthraquinone dye wastewater by algal-bacterial symbiotic system. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 347, p. 126691, 2022.

LONGONI, M. *et al.* Early synthetic textile dyes of the late 19th century from the “Primo Levi” Chemistry Museum (Rome): A multi-technique analytical investigation. **Journal of Cultural Heritage**, [s. l.], v. 59, p. 131-139, 2023.

LOOKCHEM. **Look for chemicals all over the world**, [Hangzhou], 2023. Disponível em: <https://www.lookchem.com/Reactive-Blue-250/>. Acesso em: 29 jun. 2023.

MAHAPATRA, N. N. **Textile dyes**. 1. ed. New York: WPI Publishing, 2016.

MAHAWAR, P.; AKHTAR, A. Impact of dye effluent on seed germination, seedling growth and chlorophyll content of soybean (*Glycine max L.*). **International Journal of Science and Research**, [s. l.], v. 8, p. 1-5, 2019.

MAIA, C. G. *et al.* Optimization of the photocatalytic degradation of commercial azo dyes in aqueous TiO₂ suspensions. **Reaction Kinetics, Mechanisms and Catalysis**, [s. l.], v. 113, p. 305-320, 2014.

MATHEW, D. S.; JUANG, RUEY-SHIN. An overview of the structure and magnetism of spinel ferrite nanoparticles and their synthesis in microemulsions. **Chemical Engineering Journal**, [s. l.], v. 129, n. 1, p. 51-65, 2007.

- MEIYAZHAGAN, S. *et al.* Process and kinetics of dye degradation using microplasma and its feasibility in textile effluent detoxification. **Journal of Water Process Engineering**, [s. l.], v. 37, p. 101519, 2020.
- MELATI, I. *et al.* Biodecolorization of anthraquinone and azo dyes by dark septate endophytic fungi. **Bioresource Technology Reports**, [s. l.], v. 22, p. 101427, 2023.
- MUKHERJEE, A.; GOSWAMI, N.; DHAK, D. Photocatalytic remediation of industrial dye waste streams using biochar and metal-biochar hybrids: a critical review. **Chemistry Africa**, [s. l.], v. 6, n. 2, p. 609-628, 2023.
- NACHIYAR, C. V. *et al.* Developments in treatment technologies of dye-containing effluent: A review. **Case Studies in Chemical and Environmental Engineering**, [s. l.], v. 7, p. 100339, 2023.
- NASEEM, S. *et al.* Immobilized laccase: an effective biocatalyst for industrial dye degradation from wastewater. **Environmental Science and Pollution Research**, [s. l.], p. 1-20, 2023.
- NGO, A. C. R.; TISCHLER, D. Microbial degradation of azo dyes: approaches and prospects for a hazard-free conversion by microorganisms. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, [s. l.], v. 19, n. 8, p. 4740, 2022.
- OLIVEIRA, R. L. *et al.* Fructo-oligosaccharides production by an *Aspergillus aculeatus* commercial enzyme preparation with fructosyltransferase activity covalently immobilized on Fe₃O₄-chitosan-magnetic nanoparticles. **International journal of biological macromolecules**, [s. l.], v. 150, p. 922-929, 2020.
- PANDA, S. K. *et al.* Magnetite nanoparticles as sorbents for dye removal: a review. **Environmental Chemistry Letters**, [s. l.], v. 19, p. 2487-2525, 2021.
- PANDEY, D. *et al.* Dye removal from simulated and real textile effluent using laccase immobilized on pine needle biochar. **Journal of Water Process Engineering**, [s. l.], v. 53, p. 103710, 2023.
- PEHLIVAN, M. *et al.* An optimization study on adsorption of Reactive Blue 19 dye from aqueous solutions by extremely effective and reusable novel magnetic nanoadsorbent. **Desalination Water Treatment**, [s. l.], v. 191, p. 438-451, 2020.
- PHAM, V. H. T. *et al.* Investigating Bio-Inspired Degradation of Toxic Dyes Using Potential Multi-Enzyme Producing Extremophiles. **Microorganisms**, [s. l.], v. 11, n. 5, p. 1273, 2023.
- PUBCHEM. **Explore Chemistry - Quickly find chemical information from authoritative sources**. [Maryland], 2023. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>. Acesso em: 25 jun. 2023.
- QAMAR, S. A. *et al.* Chitosan-based hybrid materials as adsorbents for textile dyes—A review. **Case Studies in Chemical and Environmental Engineering**, [s. l.], v. 2, p. 100021, 2020.

REGHIOUA, A. *et al.* Synthesis of Schiff's base magnetic crosslinked chitosan-glyoxal/ZnO/Fe₃O₄ nanoparticles for enhanced adsorption of organic dye: modeling and mechanism study. **Sustainable Chemistry and Pharmacy**, [s. l.], v. 20, p. 100379, 2021.

REN, S. *et al.* Recent Progress and Future Prospects of Laccase Immobilization on MOF Supports for Industrial Applications. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, [s. l.], p. 1-16, 2023.

RIBEIRO, G. A. P. As propriedades magnéticas da matéria: um primeiro contato. **Rev. Bras. Ens. Fis.**, [s. l.], v. 22, n. 3, p. 299-305, 2000. Disponível em: http://www.sbfisica.org.br/rbef/pdf/v22_299.pdf. Acesso em: 05 out. 2023.

RODRIGUES, A. F. S. *et al.* A scientometric analysis of research progress and trends in the design of laccase biocatalysts for the decolorization of synthetic dyes. **Process Biochemistry**, [s. l.], v. 126, p. 272-291, 2023.

RODRIGUÉZ, G. J. B. O porque de estudarmos os materiais magnéticos. **Rev. Bras. Ens. Fis.**, [s. l.], v. 20, n. 4, p. 315-320, 1998. Disponível em: http://www.ifba.edu.br/PROFESSORES/lissandro/arquivos/importancia_magnetismo.pdf. Acesso em: 14 out. 2023.

ROUTOULA, E.; PATWARDHAN, S. V. Degradation of anthraquinone dyes from effluents: a review focusing on enzymatic dye degradation with industrial potential. **Environmental science & technology**, [s. l.], v. 54, n. 2, p. 647-664, 2020.

SARAVANAN, A. *et al.* A comprehensive review on immobilized microbes-biochar and their environmental remediation: Mechanism, challenges and future perspectives. **Environmental Research**, [s. l.], p. 116723, 2023.

SEN, S. K.; RAUT, S.; RAUT, S. Mycoremediation of anthraquinone dyes from textile industries: a mini-review. **BioTechnologia**, [s. l.], v. 104, n. 1, p. 85, 2023.

SENGUTTUVAN, S. *et al.* Polypyrrole/zeolite composite—A nanoadsorbent for reactive dyes removal from synthetic solution. **Chemosphere**, [s. l.], v. 287, p. 132164, 2022.

SI, J. *et al.* Flower-shaped Ni/Co MOF with the highest adsorption capacity for reactive dyes. **Langmuir**, [s. l.], v. 38, n. 19, p. 6004-6012, 2022.

SILVA, F. C. **Síntese, caracterização e estudo de propriedades magnéticas de ferritas mistas Co_{1-x}Mg_xFe₂O₄ (0 ≤ x ≤ 0,6)**. 2011. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2011. Disponível em: <https://repositorio.bc.ufg.br/tedeserver/api/core/bitstreams/83b4b847-d93f-4a48-b6f4-59b670165988/content>. Acesso em: 10 out. 2023.

SILVA, F. E. DA. **Resgatando a importância do experimento de Hans Christian Oersted**. 2014. 30 p. Monografia (Licenciatura em Física semipresencial) – Pró-Reitoria de Graduação, Universidade Federal de Ceará, Barbalha, 2014. Disponível em: <https://repositorio.ufc.br/handle/riufc/31922>. Acesso em: 13 out. 2023.

SILVA, M. F. DA. **Engenharia de superfície de nanopartículas magnéticas para biomedicina**: recobrimentos com macromoléculas visando estabilização e compatibilidade em meio fisiológico. 2013. Dissertação (Mestrado em Físico-Química) – Instituto de Química de São Paulo, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2013. Disponível em: <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/75/75134/tde-23042013-105323/>. Acesso em: 10 out. 2023.

SINNECKER, J. P. Materiais magnéticos doces e materiais ferromagnéticos amorfos. **Rev. Bras. Ens. Fis.**, [s. l.], v. 22, n. 3, p. 396-405, 2000. Disponível em: https://sbfisica.org.br/rbef/pdf/v22_396.pdf. Acesso em: 21 out. 2023.

SLAMA, H. B. *et al.* Diversity of synthetic dyes from textile industries, discharge impacts and treatment methods. **Applied Sciences**, [s. l.], v. 11, n. 14, p. 6255, 2021.

ŚMIGIEL-KAMIŃSKA, D. *et al.* The identification of cotton fibers dyed with reactive dyes for forensic purposes. **Molecules**, [s. l.], v. 25, n. 22, p. 5435, 2020.

SOLAYMAN, H. M. *et al.* Performance evaluation of dye wastewater treatment technologies: A review. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, [s. l.], p. 109610, 2023.

SOUZA, L. T. A. *et al.* Imobilização enzimática: princípios fundamentais e tipos de suporte. In: RESENDE, R. R. (org). **Biotecnologia Aplicada à Agro&Indústria**. São Paulo: Blucher, 2017. v. 4, cap. 15, p. 529 -568. Disponível em: <https://openaccess.blucher.com.br/article-details/imobilizacao-enzimatica-principios-fundamentais-e-tipos-de-suporte-20266>. Acesso em: 01 set. 2023

SOUZA, K. C. D. **Síntese e caracterização de nanopartículas e nanocompósitos magnéticos para aplicações biomédicas**. 2011. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2011.

SRINIVASAN, S. *et al.* Application of docking and active site analysis for enzyme linked biodegradation of textile dyes. **Environmental Pollution**, [s. l.], v. 248, p. 599-608, 2019.

SUDARSHAN, S. *et al.* Impact of textile dyes on human health and bioremediation of textile industry effluent using microorganisms: current status and future prospects. **Journal of Applied Microbiology**, [s. l.], v. 134, n. 2, p. lxac064, 2023.

TEO, S. H. *et al.* Sustainable toxic dyes removal with advanced materials for clean water production: A comprehensive review. **Journal of Cleaner Production**, [s. l.], v. 332, p. 130039, 2022.

TOLKOU, A. K.; MITROPOULOS, A. C.; KYZAS, G. Z. Removal of anthraquinone dye from wastewaters by hybrid modified activated carbons. **Environmental Science and Pollution Research**, [s. l.], p. 1-14, 2023.

ULU, A. *et al.* Laccase-conjugated thiolated chitosan-Fe₃O₄ hybrid composite for biocatalytic degradation of organic dyes. **International journal of biological macromolecules**, [s. l.], v. 150, p. 871-884, 2020.

VIKRANT, K. *et al.* Recent advancements in bioremediation of dye: current status and

challenges. **Bioresource technology**, [s. l.], v. 253, p. 355-367, 2018.

WANG, R. *et al.* Efficient removal of azo dyes by *Enterococcus faecalis* R1107 and its application in simulated textile effluent treatment. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, [s. l.], v. 238, p. 113577, 2022.

WANG, X.; JIANG, J.; GAO, W. Reviewing textile wastewater produced by industries: Characteristics, environmental impacts, and treatment strategies. **Water Science and Technology**, [s. l.], v. 85, n. 7, p. 2076-2096, 2022.

WORLD DYE VARIETY. **Reactive Blue 250**. [S. l.], 2023. Disponível em: <https://www.worlddyevariety.com/reactive-dyes/reactive-blue-250.html>. Acesso em: 29 jun. 2023.

YANEVA, Z. *et al.* Organic dyes in contemporary medicinal chemistry and biomedicine. I. From the chromophore to the bioimaging/bioassay agent. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, [s. l.], v. 36, n. 1, p. 1-14, 2022.

YUAN, H. *et al.* Enhanced decolourization efficiency of textile dye Reactive Blue 19 in a horizontal rotating reactor using strips of BNC-immobilized laccase: Optimization of conditions and comparison of decolourization efficiency. **Biochemical Engineering Journal**, [s. l.], v. 156, p. 107501, 2020.

ZHANG, K. *et al.* Laccase immobilized on chitosan-coated Fe₃O₄ nanoparticles as reusable biocatalyst for degradation of chlorophenol. **Journal of Molecular Structure**, [s. l.], v. 1220, p. 128769, 2020.

ZHANG, W. *et al.* Laccase immobilized on nanocomposites for wastewater pollutants degradation: current status and future prospects. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, [s. l.], p. 1-19, 2023.

ZHENG, X. *et al.* Effects of hypoxic stress and recovery on oxidative stress, apoptosis, and intestinal microorganisms in *Pelteobagrus vachelli*. **Aquaculture**, [s. l.], v. 543, p. 736945, 2021.

ZHAO, Y.; WEN, G. Synthesis and magnetic properties of ε-Fe₂O₃ by ball milling and post annealing. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, [s. l.], v. 512, p. 167039, 2020.

ZHOU, W.; ZHANG, W.; CAI, Y. Enzyme-enhanced adsorption of laccase immobilized graphene oxide for micro-pollutant removal. **Separation and Purification Technology**, [s. l.], v. 294, p. 121178, 2022.

ZHOU, W.; ZHANG, W.; CAI, Y. Laccase immobilization for water purification: A comprehensive review. **Chemical Engineering Journal**, [s. l.], v. 403, p. 126272, 2021.

Capítulo 3

*Compreendendo a biodegradação de corante antraquinona pela Lacase de *Aspergillus sp.*: teórico e experimental*

3.1 Resumo

Os resíduos das atividades industriais causam sérios prejuízos ao meio ambiente, especialmente aos corpos hídricos. Dentre esses resíduos podemos citar os efluentes descartados pelas indústrias têxteis, que se caracterizam por apresentar alta carga de compostos orgânicos. Os corantes são os principais resíduos desses efluentes, sendo esses compostos recalcitrantes, de difícil degradação, e altamente tóxicos para o meio ambiente. A biodegradação de corantes por lacase fúngica tem grande potencial.

Nessa perspectiva, o objetivo deste trabalho estudar as propriedades bioquímicas e físico-químicas (atividade, estabilidade, pH e temperatura ótimos) da lacase comercial do fungo *Aspergillus sp.*, pois fornecem muitas informações iniciais importantes para estudos básicos e para a aplicação de lacase na biotecnologia.

Também fez parte do escopo desta pesquisa, investigar a influência do tempo de reação, pH, temperatura, e carga enzimática na descoloração do corante *Reactive Blue 19* (RB19), catalisada pela lacase. No estudo teórico, um editor molecular, foi utilizado para analisar o estado de protonação do corante e, suas microespécies formadas; porque, ao se explorar bases de dados é possível extrair várias informações que auxiliam na compreensão do comportamento das moléculas. Já, para prever as possíveis interações entre as moléculas estudadas; utilizou-se, a ferramenta de docking molecular, que se destaca como sendo uma técnica para prever possíveis interações entre ligante e proteína; empregando-se, então, da energia envolvida nesse processo para prever a melhor orientação de ajuste entre as mesmas.

Com isso, os resultados experimentais encontrados, indicaram que a enzima estudada teve excelente capacidade de descolorir o corante antraquinona (RB19) sem qualquer mediador redox. A porcentagem ótima de descoloração ($72,76\% \pm 1,12$) foi alcançada a 25°C ,

pH 4,0 e 12,5 mg L⁻¹ de RB19, em 18 horas. Os resultados indicam que, em condições ideais, a lacase de *Aspergillus* sp., têm um forte potencial para remover RB19 de efluente têxtil.

3.2 Introdução

Os corantes usados para impressão de papel, fotografia colorida, tingimento têxtil e como aditivo em produtos petrolíferos têm origem sintética e estrutura molecular aromática complexa. A decomposição de corantes resulta na produção de diversas substâncias tóxicas que são liberadas no meio ambiente através de efluentes residuais, causando problemas gênicos ou carcinogênicos (PATILA *et al.*, 2022). Assim, a degradação do corante ou modificação dos subprodutos produzidos é de importância crítica. Até agora, o tratamento de corantes é realizado por uma variedade de métodos, incluindo oxidação química, adsorção, co-precipitação ou fotodegradação (RASHEED *et al.*, 2019).

Apesar das tecnologias existentes que são geralmente caras e comercialmente ou ambientalmente pouco atraentes, os processos enzimáticos aparecem como alternativas potenciais porque são econômicos, ecologicamente corretos, os produtos da degradação enzimática são menos tóxicos que os corantes sintéticos puros e podem ser aplicados a uma ampla gama de corantes contendo efluentes industriais (CHATHA; ASGHER; IQBAL, 2017; RASHEED *et al.*, 2019). Além disso, o tratamento enzimático pode ocorrer em uma ampla faixa de pH e temperatura e contra altas concentrações de poluentes (CHIONG *et al.*, 2016). WRF (fungos de podridão branca) tem a capacidade de degradar contaminantes em virtude de suas enzimas ligninolíticas extracelulares, incluindo lignina peroxidases (LiPs), manganês peroxidases (MnPs) e lacases (Lacs) (ASGHER; KAMAL; IQBAL, 2012).

Lacases (EC 1.10.3.2) são oxidases multi-cobre, que catalisam a oxidação de um elétron de uma ampla gama de substâncias orgânicas e inorgânicas, através da redução do oxigênio molecular a água (ARREGUI *et al.*, 2019; BASSANINI *et al.*, 2021). As lacases exibem ampla especificidade de substrato, portanto, são amplamente aplicadas na modificação de fibras de madeira, síntese química ou medicinal, desintoxicação de poluentes e branqueamento biológico nas indústrias de celulose e papel (BASSANINI *et al.*, 2021; DANA *et al.*, 2017).

O presente estudo foi definido estudar as propriedades bioquímicas e físico-químicas (atividade, estabilidade, pH e temperatura ótimos) da lacase comercial do fungo *Aspergillus* sp. (LAC), pois fornecem muitas informações iniciais importantes para estudos básicos e para a aplicação de lacase na biotecnologia. Também fez parte da perspectiva desta

pesquisa, investigar a influência do tempo de reação, pH, temperatura, carga enzimática na remoção do corante RB19 usado como modelo, corante que pertence à classe das antraquinonas.

3.3 Materiais e Métodos

Os experimentos foram realizados com lacase de *Aspergillus* sp. comercializada pela Novozymes (Dinamarca). Ácido acético glacial (CH₃COOH, 99,7%) foram adquiridos da VETEC. Guaiacol (2-metoxifenol, Éter monometílico catecol, Éter monometílico de pirocatecol) foram provenientes da Sigma-Aldrich. O corante utilizado no presente estudo, RB19, foi cedido pela empresa DyStar. Todos os outros reagentes foram de grau analítico.

Para a elaboração do delineamento experimental pelo método Taguchi foi utilizado o *software* Statistica® 10 (Statsoft, TULSA, OK, USA) e, para a criação dos gráficos, o OriginPro®2019 (OriginLab, Northampton, MA, USA). Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

3.3.1 Determinação da atividade enzimática

A atividade da enzima foi medida utilizando guaiacol como substrato padrão. Esse método é baseado na oxidação do guaiacol gerando sua respectiva quinona (absorção a 420 nm $\epsilon = 12.100 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). As determinações foram conduzidas em um espectrofotômetro UV-Vis (Shimatzu UV-1800). A atividade da lacase foi calculada de acordo com a Equação (3.1). (ALAM *et al.*, 2023; YUAN *et al.*, 2021).

$$\text{Atividade da lacase} = \frac{(Abs_f - Abs_0) * v_{sol} * 10^3}{\epsilon * v * t * d} \text{ U mL}^{-1} \quad (3.1)$$

Onde:

Abs_f = absorbância final;

Abs_0 = absorbância inicial;

v_{sol} = volume total da solução (mL);

v = volume da enzima (mL);

ϵ = coeficiente de extinção molar;

t = tempo de reação (min);

10^3 = fator de correção ($\mu\text{mol mol}^{-1}$);
 d = comprimento da célula (cm).

Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para oxidar $1 \mu\text{mol L}^{-1}$ de substrato por minuto. A concentração de proteína foi então determinada usando o método de Bradford conforme descrito, e a albumina de soro bovino foi usada como referência (BRADFORD, 1976).

3.3.2 Propriedades da enzima Lacase

3.3.2.1 Ponto isoelétrico da enzima

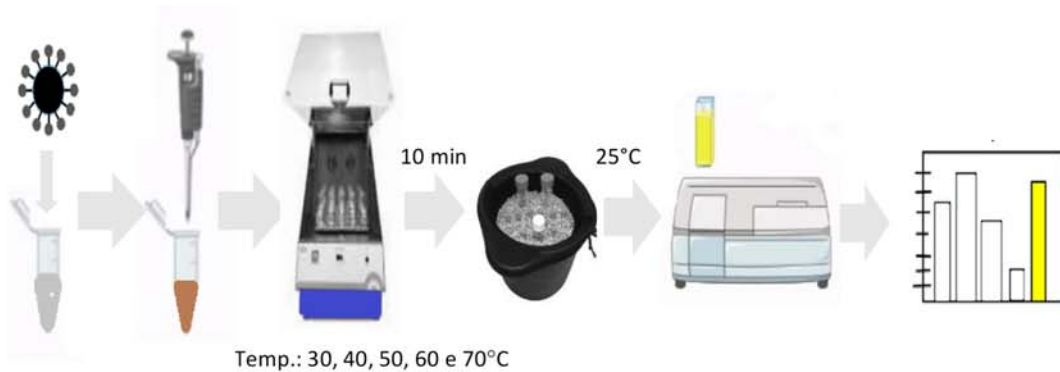
O ponto isoelétrico é a situação na qual o aminoácido apresenta a mesma quantidade de cargas positivas e negativas, de modo que a soma das cargas é nula. O ponto isoelétrico (pI) de uma proteína pode ser consultado teoricamente, para a sequência de aminoácidos que você inserir, através do *Protein isoelectric point calculator* (ISOELECTRIC, 2023; SILLERO; RIBEIRO, 1989).

3.3.2.2 Efeito da temperatura na atividade da Lacase

Avaliou-se a atividade oxidativa da lacase sob diferentes temperaturas, conforme metodologia de Melo *et al.* (2017) com modificações. Para isso, a enzima foi incubada em tampão acetato de sódio (95 mM; pH 4) a 30, 40, 50, 60 e 70°C durante 10 min (FIGURA 22).

Após o processo de aquecimento, as amostras foram resfriadas em banho de gelo e imediatamente aquecidas à temperatura ambiente (25°C) em banho-maria antes da análise. A atividade foi medida usando guaiacol, e a atividade residual foi expressa como uma porcentagem da atividade inicial.

Figura 22 – Ilustração esquemática do estudo do efeito da temperatura na atividade da Lacase.



Fonte: Elaborada pela autora.

3.3.3 Propriedades do corante *Reactive Blue 19*

3.3.3.1 Teste de estabilidade do corante em função do pH

Inicialmente, uma solução aquosa de RB19 com concentração $0,1 \text{ mMol L}^{-1}$ foi preparada. Em seguida, foram determinados os comprimentos de onda de máxima absorbância ($\lambda_{\text{máx}}$) utilizando um equipamento de espectrofotometria no ultravioleta-visível (UV/Vis - SHIMADZU). Para tal foi realizada uma varredura na faixa de comprimento de onda de 190 a 800 nm.

Determinado o $\lambda_{\text{máx}}$, em seguida foi realizado um teste para verificar a influência do pH na determinação do comprimento de onda característico, uma vez que a diversidade de cores nos corantes se deve não só à presença de grupos auxocromos; como também, a variação de sistemas conjugados com a alteração da faixa de pH (MARTINS; SUCUPIRA; SUAREZ, 2015).

Esse teste de estabilidade em diferentes pHs, procedeu-se da seguinte forma: a solução aquosa de partida com concentração $0,1 \text{ mMol L}^{-1}$ foi usada. Retirou-se 11 alíquotas desta referida solução. Cada uma das 11 soluções, sofreram correção de pH visando atingir os valores de 1 a 12 espaçados por 1 unidade de pH. Para isso, se utilizou de NaOH 1 mol L^{-1} e HCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. A absorbância de cada solução foi medida em um espectrofotômetro UV-Vis (SHIMADZU UV 1800), varrendo a faixa de comprimento de onda que equivale 800-190 nm.

3.3.3.2 Efeitos do pH na descoloração do corante

O efeito do pH, na descoloração do corante modelo escolhido nesse trabalho (RB19), foi investigado por lacase de *Aspergillus* sp., em tampão acetato e fosfato (pH 3–7).

3.3.3.3 Ensaio de degradação de corante

Experimentalmente, 5 mL de solução corante, 12,5 g mL⁻¹, foram misturados com 0,2 mL de tampão acetato 0,250 mol L⁻¹, pH 5 e incubados com 1,5 U mL⁻¹ de enzima. Um segundo grupo de frascos foi incubado com os mesmos componentes, porém, sem a enzima, para a obtenção de valores do controle negativo. Os frascos foram mantidos sob agitação 150 rpm e temperatura de 25°C (FIGURA 23).

Figura 23 – Ilustração esquemática do ensaio de degradação de corante RB19



Fonte: Elaborada pela autora.

A diminuição na intensidade da cor da solução de corante após o tratamento com lacase foi determinada em um espectrofotômetro UV-Vis, UV-1800 (Shimadzu, Japão), a 590 nm. A porcentagem de descoloração do corante foi calculada usando a Equação (3.2).

$$\% \text{ Descoloração} = \frac{A_i - A_f}{A_f} * 100 \quad (3.2)$$

Onde:

A_i = absorbância inicial;

A_f = absorbância final.

3.3.4 Equilíbrio ácido-base do corante

3.3.4.1 Titulação potenciométrica

Na titulação potenciométrica determina-se concentração do analito, através do volume gasto da solução padronizada (titulante) necessária para atingir uma medida de potencial que representa o ponto de equivalência da reação. No ponto de equivalência, o titulado é totalmente consumido e a diferença de potencial medido a partir desse ponto corresponderá ao acúmulo do titulante na solução, resultando em súbita mudança no potencial, indicando o término da reação.

A titulação potenciométrica requer equipamento especial (potenciômetro, eletrodos indicadores e de referência), e fornecem dados que são mais confiáveis que aqueles gerados por titulações que empregam indicadores químicos; além disso, elas são particularmente úteis com soluções coloridas ou turvas. Isso sem contar que apresentam uma série de vantagens como: maior sensibilidade; se requer a variação de potencial, e não sua medida absoluta; consomem menos tempo que as titulações envolvendo indicadores; pode ser aplicada em meio não aquoso; e, ainda pode ser adaptada a instrumentos automáticos (SKOOG, 2006).

O objetivo nesse estudo desta técnica, é verificar o comportamento ácido-base da molécula do corante. Para isso, as titulações potenciométricas foram realizadas em um titulador automático Metrohm 809; utilizando sistema de bureta automatizado Metrohm 800 Dosino e agitador magnético 801 Stirrer. As titulações foram realizadas na temperatura $T = 293,15\text{K}$, utilizando um eletrodo combinado de pH (Ag/AgCl). A tensão do eletrodo em mV foi registrada diretamente com o *software* Metrohm Tiamo 1.3, cujo sinal em mV foi utilizado diretamente na análise dos dados da titulação (FIGURA 24).

A solução de HCl 1 mol L^{-1} utilizada na titulação foi padronizada com uma massa conhecida de carbonato de sódio anidro PA. O volume utilizado da solução de RB19 na concentração 10 mmol L^{-1} , foi 20 mL.

Figura 24 – Titulador potenciométrico automático utilizado nos experimentos



Fonte: Elaborado pelo autora.

3.3.4.2 Microespécies – estudo teórico

Os estados de protonação do corante estudado, a microdistribuição teórica das estruturas moleculares a $T = 293,15\text{K}$, e em uma faixa de pH entre 0 e 14, foram avaliados pelo calculator plugin disponível em MarvinSketch© versão 20.14, 2020, ChemAxon (<https://www.chemaxon.com>) utilizando licença acadêmica.

3.3.5 Estudo in silico

Foram realizados estudos de ancoragem molecular para auxiliar nas abordagens utilizadas para as explicações dos resultados observados entre o corante e a lacase. Assim, os dados do ligante (corante) foi examinado estruturalmente pela modelagem molecular por um

estudo de acoplamento ao receptor (lacase) usando o *software* AutoDock Vina com o objetivo de prever sua afinidade, orientação e superfícies circundantes.

3.3.5.1 Preparo da proteína e obtenção do ligante

A estrutura cristalina da enzima LAC ID 5LM8 foi obtida do *Protein Data Bank* (BERMAN *et al.*, 2000; FERRARONI *et al.*, 2017). A ferramenta computacional AutoDockTools 1.5.6 (SANNER, 1999) foi usada para remover moléculas de água, glicanos, íons e outros ligantes desnecessários. Além do reparo dos átomos perdidos, a adição de cargas polares e hidrogênios (MORRIS *et al.*, 2009). O ligante RB19 foi obtido pelo repositório ChemSpider (<https://www.chemspider.com/>), com o código 16472.

3.3.5.2 Docking molecular

A fixação molecular do Ligante RB19 ao receptor LAC foi realizada utilizando-se AutoDock Vina 1.1.2 (EBERHARDT *et al.*, 2021), a partir da consideração de enzimas rígidas e ligantes flexíveis (LORBER; SHOICHET, 1998; MORRIS *et al.*, 2009; TROTT; OLSON, 2009). A metodologia escolhida para o ensaio foi de docking cego. Sendo assim, o *software* AutoDockTools 1.5.6 (SANNER, 1999) foi utilizado para estabelecer as coordenadas da grade, a qual utilizou a proteína inteira. Os resultados foram então avaliados em valores de RMSD (raiz quadrada do desvio quadrático médio) e energia de interação. As imagens das interações obtidas foram visualizadas no *software* Pymol 2.5.4 (SCHRÖDINGER, 2015).

3.4 Resultados e Discussões

3.4.1 Propriedades da enzima Lacase

3.4.1.1 Ponto isoelétrico da enzima

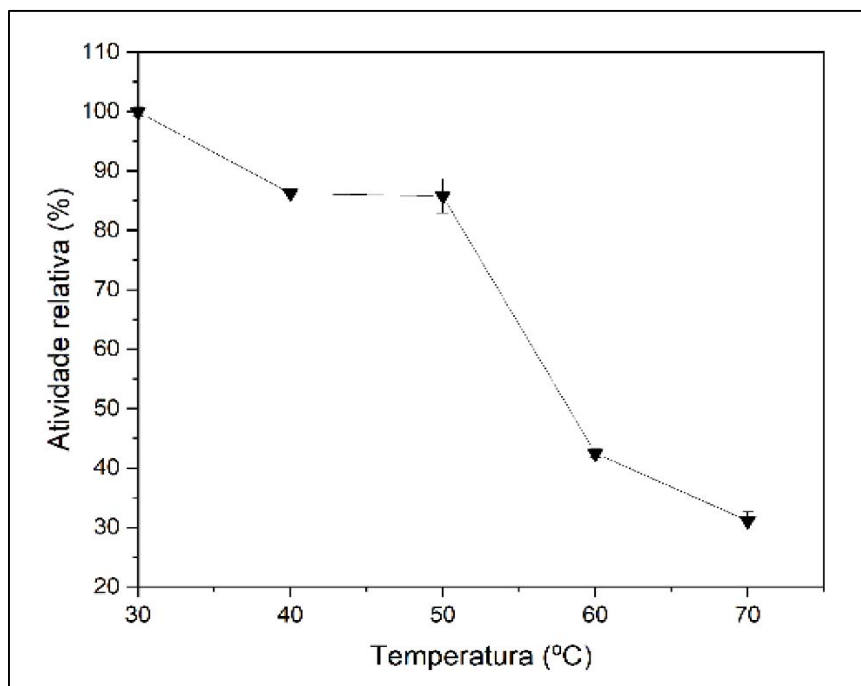
Para o presente estudo, a consulta para o ponto isoelétrico da lacase foi efetuada teoricamente através da sequência de aminoácidos da proteína, em Isoelectric (2023). Segundo Baldrian (2006) um monômero típico de uma lacase é geralmente uma molécula de 60 a 80 kDa com o ponto isoelétrico ácido de aproximadamente 4,0; no caso, para a lacase de *Aspergillus*

sp., o valor do pI encontrado foi de 4,5; valor esse que está coerente com o apresentado na literatura. Outra importante característica estrutural é o teor de carboidratos (10 – 25%), que contribui para sua estabilidade conformacional e proteção contra degradação de proteases (HILDÉN; HAKALA; LUNDELL, 2009).

3.4.1.2 Efeito da temperatura sobre a atividade da Lacase

O efeito da temperatura na atividade relativa da lacase livre foi estudado em uma faixa de temperatura 30 – 70°C. Na faixa de temperatura estudada é possível perceber na Figura 25, que a enzima livre apresentou sua maior atividade a 30°C, caracterizando; então, como sua temperatura ótima. Atacan e Özacar (2015) relataram que as enzimas são geralmente mais estáveis em temperaturas mais baixas. Posteriormente, se verifica com o aumento da temperatura que sua atividade se estabiliza entre 40 e 50°C; já, em temperaturas mais elevadas sua atividade relativa se reduz. Estudo e resultados semelhantes foram obtidos por Palonen *et al.* (2003) e Xu *et al.* (1996) indicaram que, em geral, as lacases são estáveis a 30 – 50°C e perdem rapidamente a atividade em temperaturas acima de 60°C, quando sua desnaturação térmica tende a ocorrer (AGRAWAL *et al.*, 2019; PALONEN *et al.*, 2003; XU *et al.*, 1996).

Figura 25 – Estudo do efeito da temperatura (30°C a 70°C) na enzima livre.

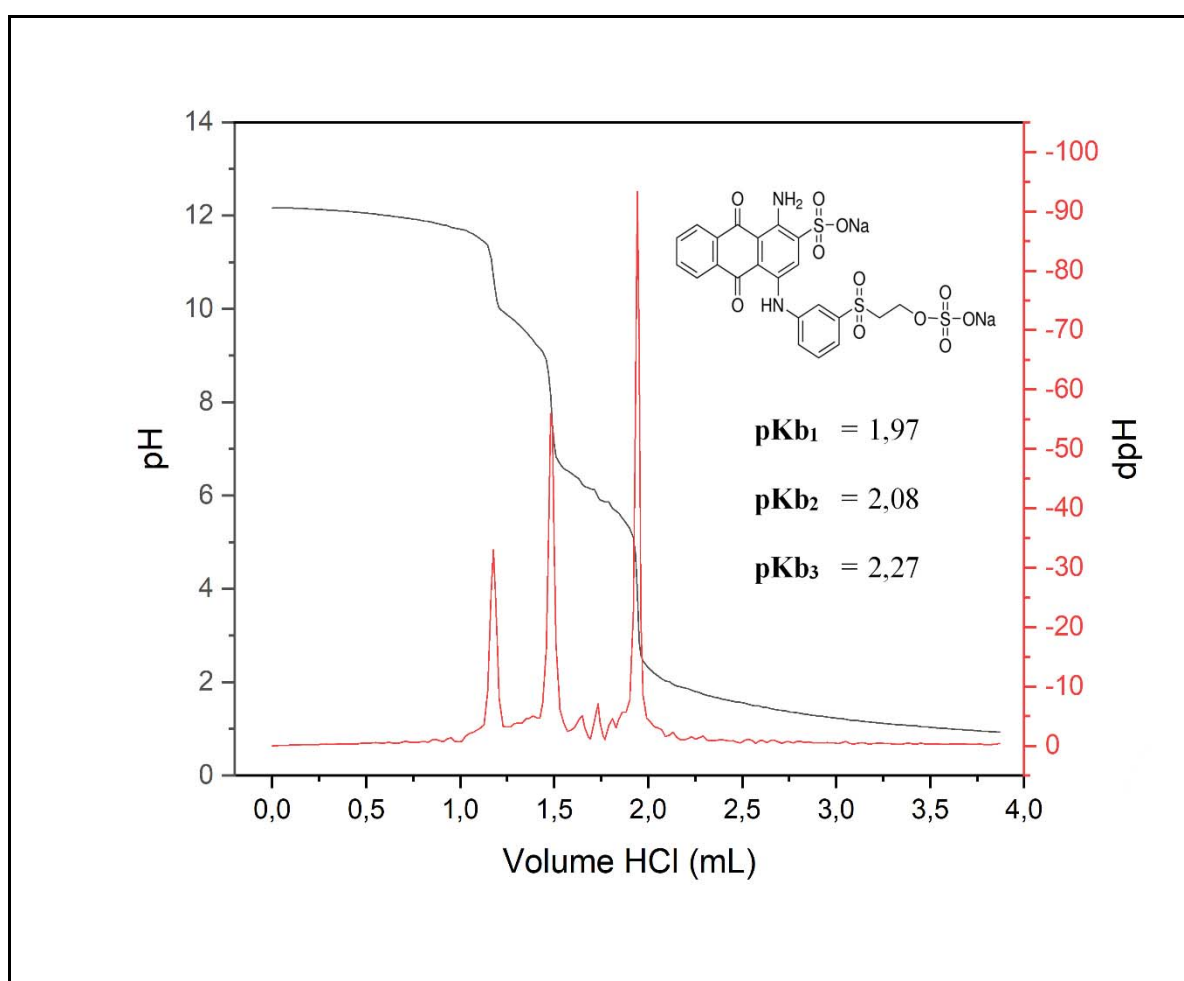


Fonte: Elaborado pela autora.

3.4.2 Equilíbrio ácido-base do corante

Com o objetivo de estudar o comportamento ácido-base da molécula do corante RB19, foram realizadas titulações potenciométricas cujos resultados são apresentados na Figura 26; além da curva de primeira derivada da curva de titulação que mostra os valores de pKa dessa molécula (SKOOG, 2006).

Figura 26 – Curva de titulação potenciométrica da molécula RB19 em função do volume de HCl padronizado adicionado à célula (curva preta) e curva de derivada primeira da curva de titulação (curva vermelha).



Fonte: Elaborado pela autora.

Na Figura 26, observa-se que a curva de titulação (cor preta) apresenta um comportamento ácido-base do tipo anfótero, uma vez que existem grupos que agem como ácidos fracos, como o grupo sulfônico; e, bases fracas, como anilina (amina ligada a anel aromático), amino conjugados possuem essa característica.

O primeiro ponto de viragem, em torno de 1,2 mL ($pK_{b1} = 1,97$) pode ser atribuído ao grupo sulfônico mais distante da molécula de RB19, pois não interage com átomo algum e o seu hidrogênio ionizável sai muito facilmente. Já o segundo hidrogênio ionizável em torno de 1,5 mL ($pK_{b2} = 2,08$) possui valor de pK_b muito próximo de um grupo sulfônico, que está ligado diretamente ao anel dianilínico.

Nesse contexto, apesar dos valores de pK_b serem próximos, o grupo sulfônico em discussão interage via ligação de hidrogênio pelo grupo $-NH_2$ do anel anilínico. Contudo, pela curva de titulação é possível observar uma queda de pH intensa ao redor de 2,0 mL ($pK_{b3} = 2,27$), o que pode indicar que um dos hidrogênios localizados nos grupos amino da molécula de RB19 foi desprotonado.

Considerando a estrutura molecular do RB19, é mais provável que a desprotonação do hidrogênio da amina ocorra em $-NH_2$, e não em $-NH-$, uma vez que esse hidrogênio em específico está com carga parcial positiva e pode fazer uma ligação de hidrogênio com o átomo de oxigênio ligado na hidroquinona. Contudo, o grupo $-NH_2$ possui dois hidrogênios disponíveis, e apenas um deles potencialmente forma uma ligação de hidrogênio e, teoricamente, deixa o outro livre. Porém, existe um átomo de oxigênio também vizinho no grupo sulfonato, mas este possui um comprimento de ligação $S=O$ maior do que o da hidroquinona, $C=O$, o que inviabiliza uma interação efetiva; pois, interações eletrostáticas são dependentes da carga e do inverso ao quadrado da distância dos átomos. A atração exercida por um átomo sobre o par de elétrons na sua camada de valência depende da carga nuclear efetiva e da distância entre os núcleos e da camada de valência (RUSSELL, 1994).

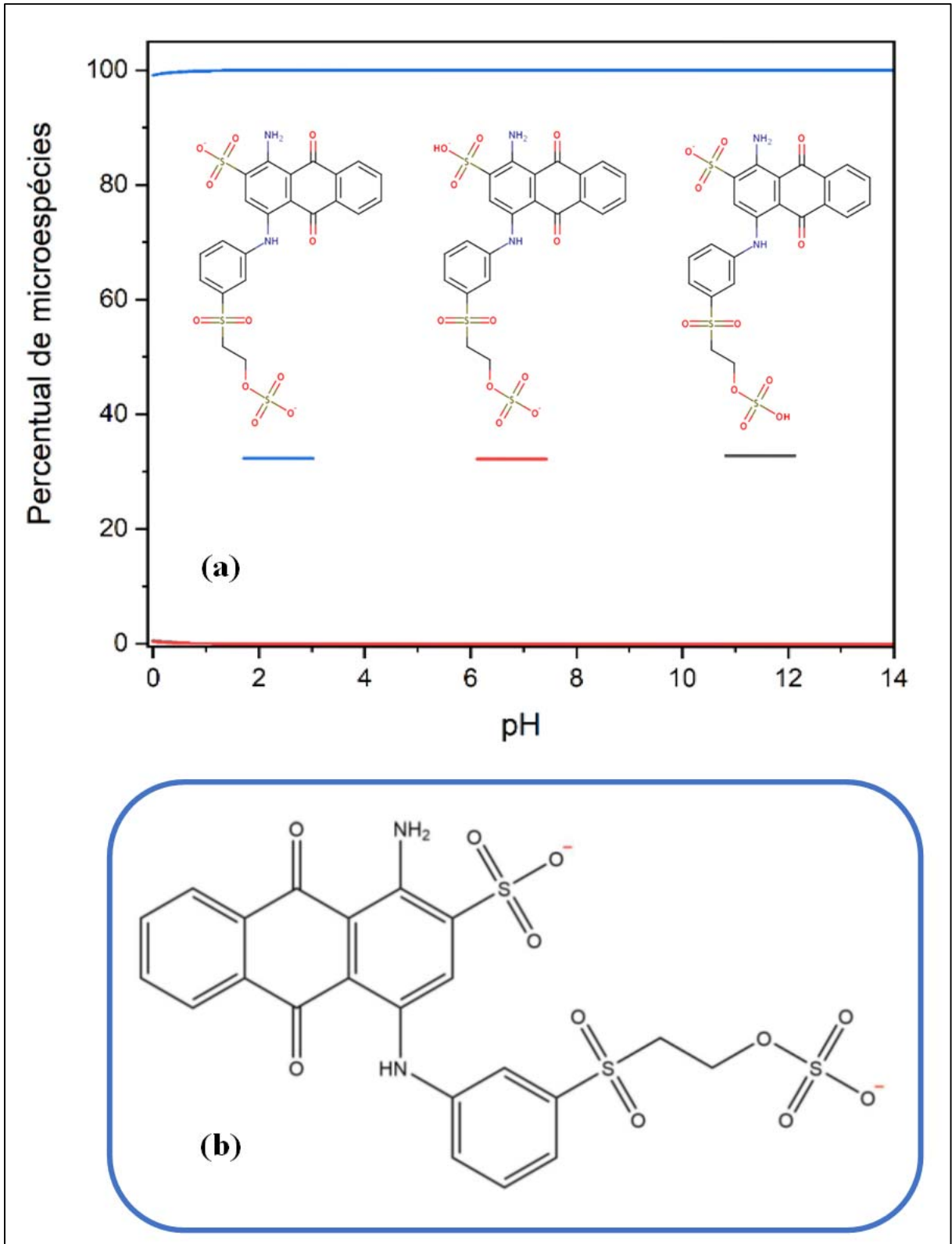
Além dessas informações mencionadas, pode-se extrair da curva de titulação potenciométrica, é que a adição de um ácido forte ao titulado, permite observar a curva de distribuição de espécies a partir de valores de pH; exigindo apenas, a determinação do ponto de equivalência desse ácido.

Tais constantes de dissociação foram encontradas, a partir da titulação potenciométrica efetuada. Essas indicam o grau de dissociação do corante em função do pH, conforme pode ser observado na Figura 27 com o gráfico de distribuição de micro-espécies em função do pH.

Em relação a distribuição das microespécies, o RB19 apresenta duas possibilidades. A primeira e mais provável é dada pela linha azul na Figura 27 (a). Observa-se que essa microespécie é praticamente estável com a variação do pH; mas, em pH extremamente ácidos, em quem é favorecido sua ionização, conseqüentemente proporciona a formação de uma

segunda microespécie. Ainda assim, vale destacar que essa espécie ionizada representa uma pequena porção, isto é, a forma não ionizada ainda é preponderante.

Figura 27 – (a) Distribuição teórica das microespécies do RB19 de acordo com a variação de pH sendo a linha azul correspondente a molécula não ionizada e a vermelha sua microespécie ionizada. (b) Zoom da microespécie preponderante, indicada na linha azul.



Fonte: Elaborado pela autora.

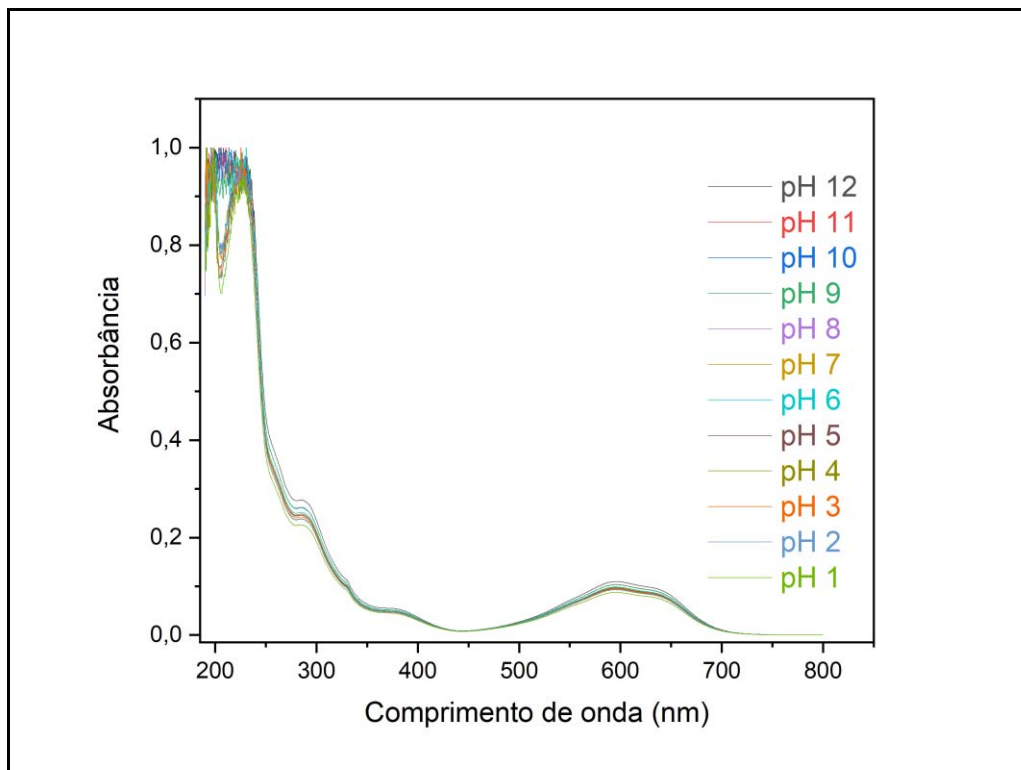
3.4.3 Propriedades do corante *Reactive Blue 19*

3.4.3.1 Teste de estabilidade do corante em função do pH

A escolha de uma faixa de pH nos experimentos precisa levar em conta essa disposição das espécies de cada corante em função do pH; visto que, à medida que o tratamento se processa pode ocorrer incremento no valor do pH devido as reações que podem ocorrer. Na Figura 28, pode se visualizar a varredura espectral (800-190 nm) realizada com 11 alíquotas, variando-se o pH 1 a pH 12. Logo, pode se observar que o corante RB19 possui bandas que pouco foram alteradas em função da variação do pH, dada a proximidade das absorbâncias relacionadas, isso se deve a dominância de uma só espécie apresentado no diagrama da Figura 27.

Em relação as propriedades em solução do corante, a caracterização do espectro UV-Vis possibilitou a verificação dos $\lambda_{\text{máx}}$, e a modificação desta propriedade em função do pH. O comprimento de onda máximo observado para o visível foi visualizado em 590 nm.

Figura 28 – Varredura espectral do RB19 em função do pH.



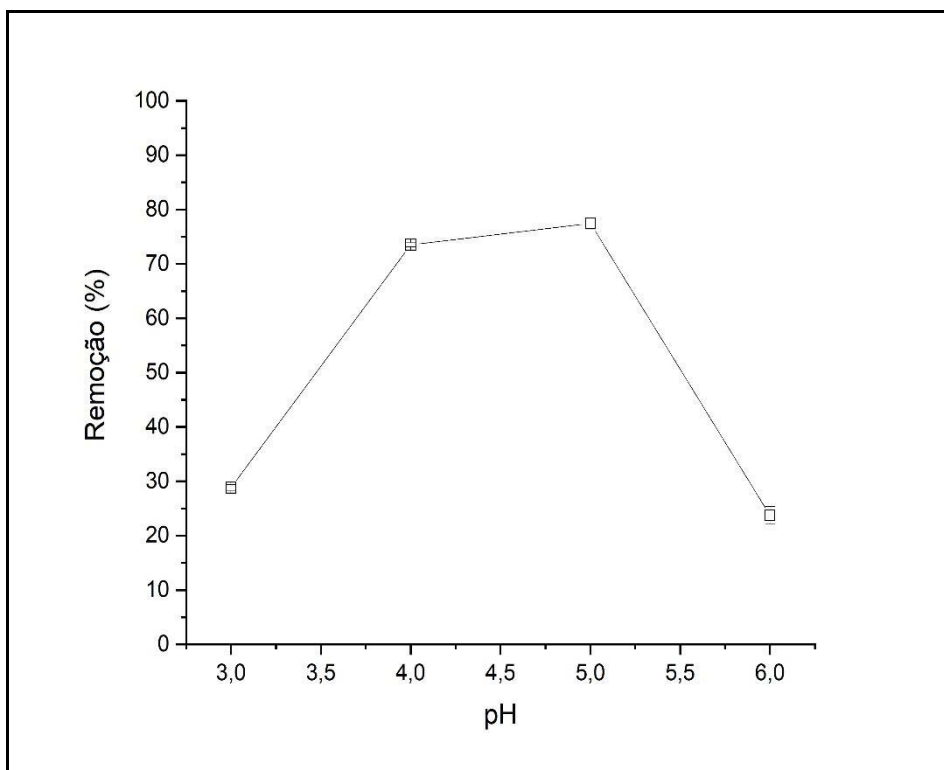
Fonte: Elaborado pela autora.

3.4.3.2 Efeito do pH na descoloração do corante

O RB19 foi selecionado como corantes modelo para investigar o efeito do pH em sua descoloração, seu pH ótimo de descoloração encontrado foi de pH 5 (FIGURA 29). Entretanto, outro fator a ser considerado é que em pH 4 e 5, a quantidade de descoloração aumentou, o que pode ser causado pela maior atividade enzimática nesses valores de pH. Chen *et al.* (2020) relataram que a maioria das lacases extraídas de fontes fúngicas exibem sua atividade máxima em condições ácidas. Ao contrário do pH neutro, onde não se observou nenhuma descoloração.

Outros valores de pH observados, foram pH 3 e 6. Esses, entretanto, foram os valores de pH que apresentaram as menores quantidade de remoção em relação a todos os valores de pH estudados. Para o presente estudo, o tampão acetato de sódio pH 4 foi escolhido como pH ideal por causa da alta atividade enzimática e do ótimo resultado apresentado na degradação do corante.

Figura 29 – Estudo do efeito do pH na descoloração do corante.



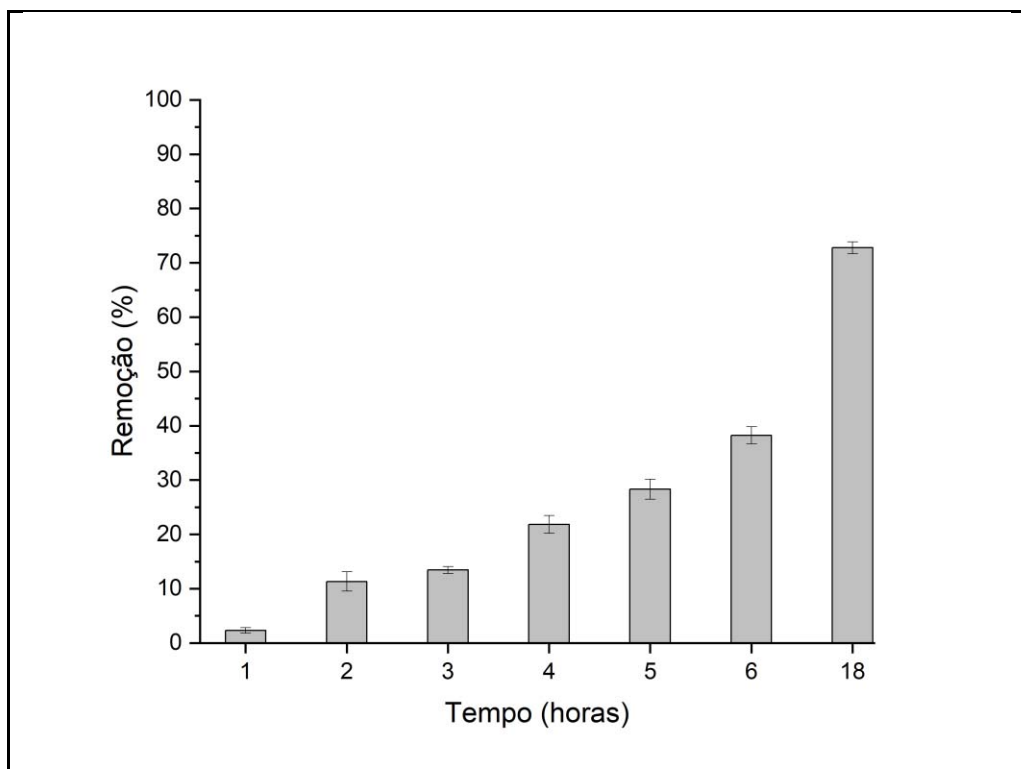
Fonte: Elaborado pela autora.

3.4.3.3 Uso de Lacase livre para descoloração de corante

Um dos métodos eficientes para a descoloração do tratamento de efluentes industriais são os métodos de descoloração baseados em enzimas (SALAMI *et al.*, 2018). Nesse estudo, o potencial de descoloração da lacase proveniente de fungo *Aspergillus* sp., foi demonstrado para o corante modelo escolhido, RB19. Esse composto fenólico, com base na sua estrutura química, pertencem a classe das antraquinonas.

O potencial da lacase oriundo de *Aspergillus* sp. para a biodegradação do corante de antraquinona foi avaliado por meio de medição de absorbância de UV-Vis. As soluções de corantes foram submetidas à degradação usando a lacase oriundo de *Aspergillus* sp., em várias durações de tempo e as soluções resultantes foram submetidas à medição de absorbância. A descoloração nas condições ótimas (pH 4, 50 mM tampão acetato e carga enzimática de 1,5 U mL⁻¹), foi seguida pela medição da diminuição da absorbância no $\lambda_{\text{máx}}$. Os resultados obtidos para a descoloração do corante pela lacase livre são apresentados na Figura 30.

Figura 30 – Tempo de descoloração do corante RB19 por Lacase livre com concentração do corante de 12,5 mg L⁻¹.



Fonte: Elaborado pela autora.

Como pode ser visto na Figura 30, a taxa de descoloração do RB19 foi de aproximadamente 38,22%, quando observados após 6h de operação, chegando a 72,76% após 18 horas. O efeito do tempo de reação na porcentagem de descoloração de RB19 por lacase de *Aspergillus* sp. foi determinado em 18 horas. Os resultados revelaram que a descoloração do RB19 foi associada a um aumento no tempo de reação, que atingiu um valor máximo de 72,76% em 18 horas. Durante o estágio inicial da reação (20-300min), a porcentagem de descoloração aumentou significativamente e tendeu a ser mais estável em momentos posteriores. A mudança de descoloração é muito pequena entre os pontos de tempo 300min e 360min. Aos 360min, quase 38,22% do RB19 foi descolorido, respondendo por aproximadamente metade da porcentagem total de descoloração. Daqui em diante, a descoloração apresentou uma cinética lenta; e, a remoção efetuou-se no tempo máximo de 18 horas, no valor de 72,76%. Porém, era de se esperar uma cinética rápida; contudo, isso não ocorreu.

Provavelmente, a cinética rápida não ocorreu, por um efeito inibitório do RB19, na concentração testada desse corante industrial (ZOUARI-MECHICHI *et al.*, 2006). Pois, os corantes contêm em sua estrutura compostos aromáticos, que podem ser liberados após ataques microbianos ou químicos, durante a degradação do corante. Mechichi, Mhiri e Sayadi (2006) relataram que vários compostos aromáticos, como catecol, cafeato, protocatecuato, e 3,4-dihidroxifenilacetato, apresentaram inibição na descoloração do corante, em concentração de 1 mM. Todos esses compostos citados, possuem dois grupos hidroxila em posição orto entre si. Isso sugere que os orto-difenóis são inibidores da descoloração; então, conclui-se que há mais especificidade da lacase para esses substratos do que em relação ao corante em estudo, RB19.

Esse resultado corrobora o trabalho de outros autores que realizaram o tratamento de corante, como Asgher, Kamal e Iqbal (2012) que obtiveram remoção aproximadamente de 60% do corante *Drimarine Brilliant Red K4BL*, após 5 horas de tratamento. Forootanfar *et al.* (2012) obteve, com uso de mediadores redox (HBT), uma remoção de cerca 80,5%, após 30min de incubação, para o corante RB19 com lacase *T. versicolor*. Já, no caso da lacase de *A. oryzae*, na ausência de mediador redox, o percentual de descoloração foi de 28,3% após 30min. Quin *et al.* (2019) teve como resultado ao tratamento utilizando a lacase *Ganoderma lucidum*, a porcentagem ótima de descoloração (60,3%) foi alcançada a 35°C, pH 4 e 200 ppm RB19 em 150min. Em contrapartida, Soares *et al.* (2001) demonstraram que uma lacase fúngica pura, obtida a partir de uma formulação comercial utilizada na indústria têxtil, não descolorava o RBBR. A descoloração só foi observada quando um mediador redox de pequeno peso molecular (ácido violúrico ou HBT) foi adicionado juntamente com a lacase.

3.4.4 Estudo *in silico*

3.4.4.1 Interação entre o corante e a Lacase

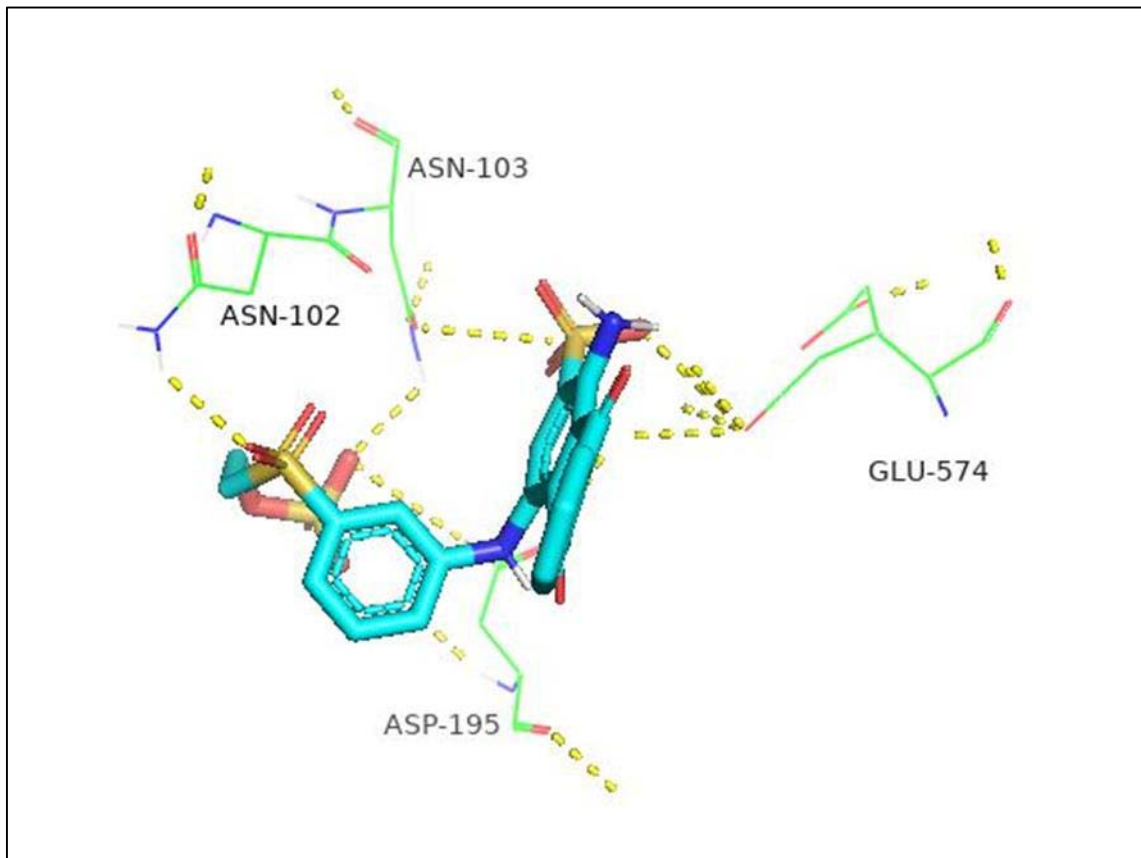
Foram realizados estudos de ancoragem molecular, onde o *software* AutoDock Vina gerou 20 poses do ligante para com a lacase (TABELA 4), das quais se destacam 3 por terem valores satisfatórios de RMSD abaixo de 2Å. Na terceira pose (FIGURA 31), o ligante apresentou energias favoráveis e melhores aproximações do sítio catalítico; e, por isso, essa pose foi definida como a mais adequada, conforme Tabela 4. As ligações de hidrogênio e as forças Van der Waals, foram favoráveis com as afinidades previstas por estudos de acoplamento molecular, de acordo com a literatura (CHATURVEDI et al., 2015). Através de investigações de acoplamento molecular, descobriu-se que os resíduos ASN-102, ASN-103, ASP-195, GLU-574 interagiram com distâncias variando abaixo 2Å, em uma orientação apropriada com o corante por meio de ligações de hidrogênio. A afinidade vinculante para o ligante ancorado com a proteína, foi estimado em $-8,6 \text{ kcal mol}^{-1}$. A menor energia de ligação sugere que a combinação do corante com a lacase foi mais estável e adequada para a imobilização. Isso indica que a interação se distancia pouco das referências de dados cristalográficos e, portanto, evidencia que o docking molecular pode ser uma estratégia viável para predição do sítio ativo da lacase. Além disso, há uma predominância dos seguintes resíduos, os quais aparecem ao menos em uma das poses: ASN-103, HIS-564, GLU-574; conforme, se pode visualizar nas Figura 31, Figura 32 e Figura 33.

Tabela 4 – Energias de aproximações do sítio catalítico da enzima.

Modo	Afinidade (kcal mol⁻¹)	Distância do melhor modo (rmsd lb)
1	-8,9	0,000
2	-8,6	25,314
3	-8,6	1,230
4	-8,5	25,734
5	-8,4	1,738
6	-8,3	1,919
7	-8,3	25,573
8	-8,1	25,243
9	-8,1	26,372
10	-8,0	2,992
11	-7,8	25,234
12	-7,8	25,428
13	-7,8	24,993
14	-7,7	24,974
15	-7,7	25,333
16	-7,6	3,432
17	-7,6	3,547
18	-7,5	25,866
19	-7,3	26,170
20	-7,3	3,226

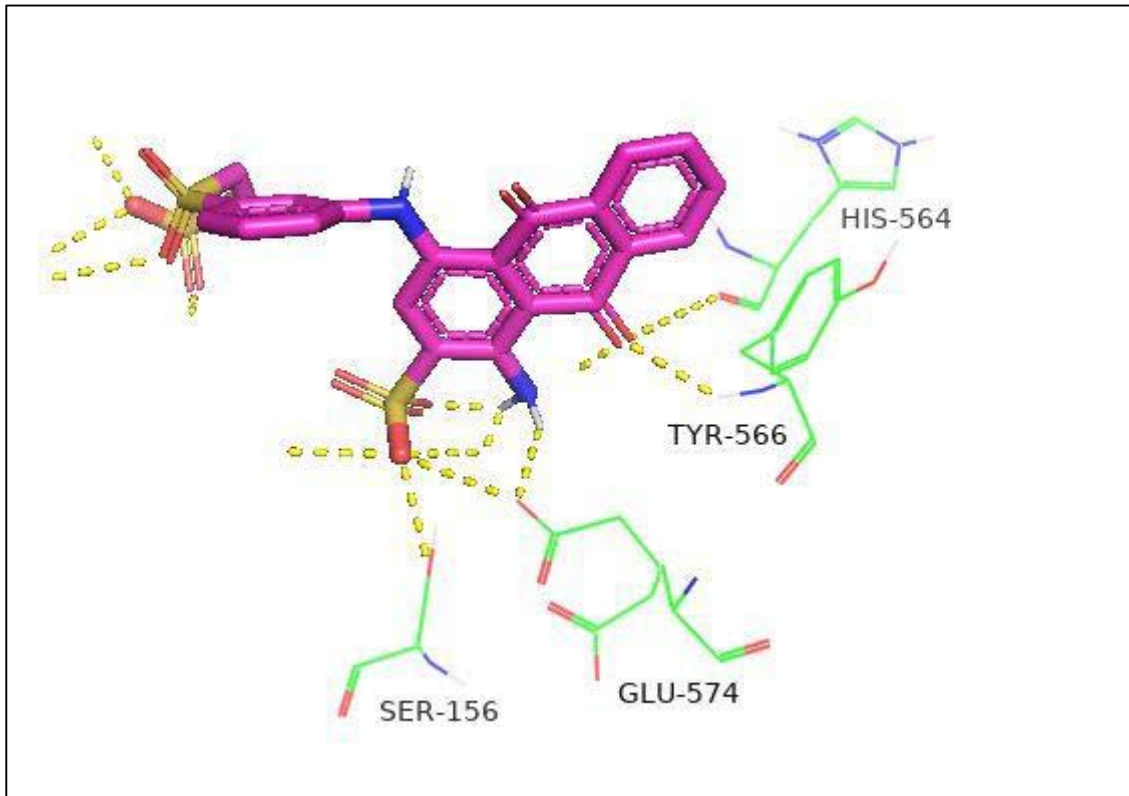
Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 31 – Pose 3 do docking cego entre Lacase e RB19.



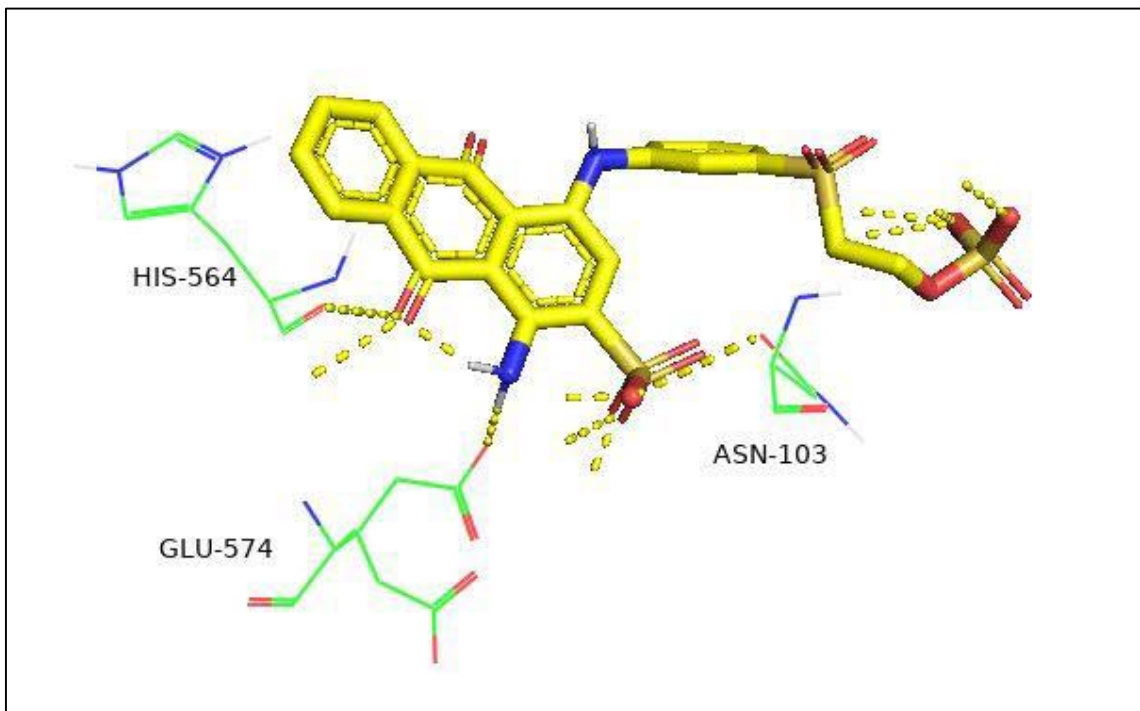
Fonte: Elaborado pela autora.

Figura 32 – Pose 5 do docking cego entre Lacase e RB19.



Fonte: Elaborado pela autora.

Figura 33 – Pose 6 do docking cego entre Lacase e RB19.



Fonte: Elaborado pela autora.

Com base em Ferraroni *et al.*, 2017, os íons de cobre são mediadores da atividade catalítica e agem como mediadores redox. Sendo assim, a HIS-253 é um aminoácido vital para a catálise do RB19, estando presente na transferência de prótons com compostos fenólicos. O docking molecular realizado nesse trabalho aponta para uma interação na qual resíduos próximos aos íons de cobre e à HIS-253 citada estão presentes.

3.5 Conclusão

Nesse estudo, a eficiência de biodegradação do corante antraquinona RB19 foi estudada usando lacase comercial de *Aspergillus* sp. Estudo sobre as propriedades bioquímicas e físico-químicas da enzima fornecem informações para a aplicação de lacase em corantes.

A enzima teve excelente capacidade de descolorir o corante RB19 sem qualquer mediador redox. Os dados de absorção de UV-Vis demonstraram que mais de $72,76 \pm 1,12\%$ das moléculas de corante foram degradadas em 18h. A porcentagem de descoloração foi alcançada nas seguintes condições reacionais a 25°C, pH 4 do tampão acetato 50 mM, carga enzimática 1,5 U mL⁻¹, concentração de 12,5 mg L⁻¹ de RB19.

Portanto, esse estudo mostrou claramente que a lacase comercial de *Aspergillus* sp. pode ser um método de tratamento de águas residuais ecologicamente correto.

3.6 Referências

- AGRAWAL, K. *et al.* Process optimization, purification and characterization of alkaline stable white laccase from *Myrothecium verrucaria* ITCC-8447 and its application in delignification of agroresidues. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 125, p. 1042-1055, 2019.
- ALAM, R. *et al.* Understanding the biodegradation pathways of azo dyes by immobilized white-rot fungus, *Trametes hirsuta* D7, using UPLC-PDA-FTICR MS supported by in silico simulations and toxicity assessment. **Chemosphere**, [s. l.], v. 313, p. 137505, 2023.
- ARREGUI, L. *et al.* Laccases: structure, function, and potential application in water bioremediation. **Microbial Cell Factories**, [s. l.], v. 18, n. 1, p. 1-33, 2019.
- ASGHER, M.; KAMAL, S.; IQBAL, H. M. N. Improvement of catalytic efficiency, thermostability and dye decolorization capability of *Pleurotus ostreatus* IBL-02 laccase by hydrophobic sol gel entrapment. **Chemistry Central Journal**, [s. l.], v. 6, p. 1-10, 2012.
- ATACAN, K.; ÖZACAR, M. Characterization and immobilization of trypsin on tannic acid modified Fe₃O₄ nanoparticles. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, [s. l.], v. 128, p. 227-236, 2015.

BALDRIAN, P. Fungal laccases—occurrence and properties. **FEMS Microbiology Reviews**, [s. l.], v. 30, n. 2, p. 215-242, 2006.

BASSANINI, I. *et al.* Biocatalysis with laccases: An updated overview. **Catalysts**, [s. l.], v. 11, n. 1, p. 26, 2021.

BERMAN, H. M. *et al.* The protein data bank. **Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography**, [s. l.], v. 58, n. 6, p. 899-907, 2002.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, [s. l.], v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.

CHATHA, S. A. S.; ASGHER, M.; IQBAL, H. M. N. Enzyme-based solutions for textile processing and dye contaminant biodegradation—a review. **Environmental Science and Pollution Research**, [s. l.], v. 24, p. 14005-14018, 2017.

CHATURVEDI, S. K. *et al.* Unraveling comparative anti-amyloidogenic behavior of pyrazinamide and D-Cycloserine: A mechanistic biophysical insight. **Plos One**, [s. l.], v. 10, n. 8, e0136528, 2015. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0136528>. Acesso em: 15 jul. 2023.

CHEN, X. *et al.* Immobilized laccase on magnetic nanoparticles for enhanced lignin model compounds degradation. **Chinese Journal of Chemical Engineering**, [s. l.], v. 28, n. 8, p.

CHIONG, T. *et al.* Enzymatic treatment of methyl orange dye in synthetic wastewater by plant-based peroxidase enzymes. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, [s. l.], v. 4, n. 2, p. 2500-2509, 2016.

DANA, M. *et al.* Biotechnological and industrial applications of laccase: A review. **Journal of Applied Biotechnology Reports**, [s. l.], v. 4, n. 4, p. 675-679, 2017.

EBERHARDT, J. *et al.* AutoDock Vina 1.2. 0: New docking methods, expanded force field, and python bindings. **Journal of Chemical Information and Modeling**, [s. l.], v. 61, n. 8, p. 3891-3898, 2021.

FERRARONI, M. *et al.* Structure and function of *Aspergillus niger* laccase McoG. **Biocatalysis**, [s. l.], v. 3, n. 1, p. 1-21, 2017.

FOROOTANFAR, H. *et al.* Synthetic dye decolorization by three sources of fungal laccase. **Research Journal of Chemistry and Environment**, [s. l.], v. 17, n. 5, p. 76-81, 2013.

HILDÉN, K.; HAKALA, T. K.; LUNDELL, T. Thermotolerant and thermostable laccases. **Biotechnology Letters**, [s. l.], v. 31, p. 1117-1128, 2009.

ISOELECTRIC. **Protein isoelectric point calculator**. [S. l.], 2023. Disponível em: <http://isoelectric.org/index.html>. Acesso em: 15 jan. 2023.

LORBER, D. M.; SHOICHET, B. K. Flexible ligand docking using conformational ensembles. **Protein Science**, [s. l.], v. 7, n. 4, p. 938-950, 1998.

MARTINS, G. B. C.; SUCUPIRA, R. R.; SUAREZ, P. A. Z. A. Química e as Cores. **Rev. Virtual Quim.**, [s. l.], v. 7, n. 4, p. 1508-1534, 2015. Disponível em: <https://s3.sa-east-1.amazonaws.com/static.sites.s bq.org.br/rvq.s bq.org.br/pdf/v7n4a27.pdf>. Acesso em: 15 agost. 2023.

MECHICHI, Tahar; MHIRI, Nejla; SAYADI, Sami. Remazol Brilliant Blue R decolorization by the laccase from *Trametes trogii*. **Chemosphere**, [s. l.], v. 64, n. 6, p. 998–1005, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2005.11.027>. Acesso em: 30 set. 2023.

MELO, A. D. Q *et al.* Synthesis of benzyl acetate catalyzed by lipase immobilized in nontoxic chitosan-polyphosphate beads. **Molecules**, [s. l.], v. 22, n. 12, p. 2165, 2017.

MORRIS, G. M. *et al.* AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. **Journal of Computational Chemistry**, [s. l.], v. 30, n. 16, p. 2785-2791, 2009.

PALONEN, H. *et al.* Purification, characterization and sequence analysis of a laccase from the ascomycete *Mauginiella* sp. **Enzyme and Microbial Technology**, [s. l.], v. 33, n. 6, p. 854-862, 2003.

PATILA, M. *et al.* Immobilization of laccase on hybrid super-structured nanomaterials for the decolorization of phenolic dyes. **Processes**, [s. l.], v. 10, n. 2, p. 233, 2022.

QIN, P. *et al.* Optimization of laccase from *Ganoderma lucidum* decolorizing Remazol Brilliant Blue R and Glac1 as main laccase-contributing gene. **Molecules**, [s. l.], v. 24, n. 21, p. 3914, 2019.

RASHEED, T. *et al.* Environmentally-related contaminants of high concern: potential sources and analytical modalities for detection, quantification, and treatment. **Environment International**, [s. l.], v. 122, p. 52-66, 2019.

RUSSELL, J. B. **Química Geral**. 2.ª ed. São Paulo: Pearson Education do Brasil, 1994.

SALAMI, F. *et al.* Covalent immobilization of laccase by one pot three component reaction and its application in the decolorization of textile dyes. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 120, p. 144-151, 2018.

SANNER, M. F. *et al.* Python: a programming language for software integration and development. **J Mol Graph Model**, [s. l.], v. 17, n. 1, p. 57-61, 1999.

SCHRÖDINGER, L. L. C. **The PyMOL molecular graphics system**. Version 1.8. [S. l.], 2015.

SILLERO, A.; RIBEIRO, J. M. Isoelectric points of proteins: theoretical determination. **Analytical Biochemistry**, [s. l.], v. 179, n. 2, p. 319-325, 1989.

SKOOG, D. A *et al.* **Fundamentos de Química Analítica**. 8. Ed. [S. l.]: Editora Thomson, 2006.

SOARES, G. M. B.; COSTA-FERREIRA, M.; PESSOA DE AMORIM, M. T. Decolorization of an anthraquinone-type dye using a laccase formulation. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 79, n. 2, p. 171–177, 2001.

TROTT, O.; OLSON, A. J. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. **Journal of Computational Chemistry**, [s. l.], v. 31, n. 2, p. 455-461, 2010.

XU, F. *et al.* A study of a series of recombinant fungal laccases and bilirubin oxidase that exhibit significant differences in redox potential, substrate specificity, and stability. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology**, [s. l.], v. 1292, n. 2, p. 303-311, 1996.

YUAN, Y. *et al.* Recyclable laccase by coprecipitation with aciduric Cu-based MOFs for bisphenol A degradation in an aqueous environment. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, [s. l.], v. 204, p. 111792, 2021.

ZOUARI-MECHICHI, Héra et al. Laccase purification and characterization from *Trametes trogii* isolated in Tunisia: decolorization of textile dyes by the purified enzyme. **Enzyme and Microbial Technology**, [s. l.], v. 39, n. 1, p. 141–148, 2006.

Capítulo 4

*Biocatalisador híbrido para imobilização da Lacase de *Aspergillus sp.* com potencial aplicação na biodegradação de corante têxtil*

4.1 Resumo

Os corantes usados para impressão de papel, fotografia colorida, tingimento têxtil e como aditivo em produtos petrolíferos têm origem sintética e estrutura molecular aromática complexa. Quando esses corantes sintéticos são descartados em efluentes industriais, eles causam poluição ambiental, pois são recalcitrantes e tóxicos; resistentes à degradação biológica, não sendo facilmente degradados em estações de tratamento de águas residuais. O tratamento enzimático tem sido proposto por muitos pesquisadores como uma alternativa potencial aos métodos convencionais que visam a utilização de enzimas lignolíticas extracelulares obtidas de fungos degradadores de madeira. Dentre a vasta diversidade de enzimas lignolíticas existentes, encontram-se as lacases.

As lacases (EC 1.10.3.2) são uma classe de enzimas oxidativas que estão atraindo crescente interesse por suas aplicações industriais potenciais. No entanto, o uso de enzimas solúveis na indústria é limitado devido a problemas relacionados à sua estabilidade, seu custo e dificuldade de reaproveitamento. Assim, a imobilização enzimática apresenta-se como uma alternativa promissora que garantirá um melhor desempenho da enzima.

Assim, o presente trabalho visa a utilização da nanocompósito magnético de quitosana na estabilização de enzimas para biodegradação de corante. A partir da utilização do planejamento experimental, foi possível verificar que na imobilização da lacase, os fatores determinantes foram o pH e a concentração do tampão, nos experimentos. A maior atividade do derivado obtido foi de $14,40 \pm 0,1 \text{ U g}^{-1}$. Além disso, as melhores condições do processo destacaram os parâmetros: 5 mg g^{-1} de carga de proteína, tempo de 6h, força iônica de 95 mM

e pH 4, o que resultou em um rendimento de 65,63%. A aplicação do biocatalisador foi realizada para confirmar a eficácia do processo de imobilização, onde após sua utilização resultou em $96,24 \pm 0,56\%$ de remoção do corante C.I. *Reactive Blue 250*.

4.2 Introdução

A indústria têxtil apresenta em diversos países um expressivo valor econômico e social, mas está entre as principais indústrias geradoras de efluentes com alto potencial poluidor. Do ponto de vista ambiental, a etapa do processo operacional de tingimento dos tecidos é o mais preocupante, devido à variedade e complexidade dos produtos químicos empregados no processo, sendo os corantes sintéticos as substâncias que têm atraído maior atenção de pesquisadores.

Dos corantes sintéticos um dos mais utilizado correspondem aos azos corantes, que são compostos que contém uma ou mais ligações do tipo azo. Entretanto, as tecnologias convencionais de tratamento dessas águas ainda possuem muitas limitações, como por exemplo, alto custo de operação, alto consumo energético, redução de eficiência devido à estabilidade química dessas moléculas e/ou à complexidade do seu processo de degradação (ROSU *et al.*, 2017; ZHANG; ZHU; ZHANG, 2017). Considerando isso, outros métodos, principalmente relacionados ao tratamento desses efluentes, vêm sendo estudados, dentre eles merecem destaque os processos enzimáticos que visam a utilização de enzimas lignolíticas extracelulares obtidas de fungos degradadores de madeira. Dentre a vasta diversidade de enzimas lignolíticas existentes, encontram-se as lacases (PACHECO; SOARES, 2014).

As lacases (EC 1.10.3.2) pertencem à família das oxidases multicobre azuis (MCO), que catalisam a oxidação de um elétron de uma ampla gama de substâncias orgânicas e inorgânicas, através da redução do oxigênio molecular a água. Embora a presença de enzimas do tipo lacase tenha sido relatada em bactérias e insetos, as lacases podem ser divididas principalmente em dois grupos: lacases de plantas superiores e aquelas de fungos. De fato, a presença de lacase foi descrita em quase todos os fungos examinados. Eles são amplamente distribuídos em ascomicetos, deuteromicetos e basidiomicetos (PISCITELLI; PEZZELLA; LETTERA, 2013). As lacases exibem ampla especificidade de substrato, portanto, já vêm sendo estudadas para várias aplicações biotecnológicas, tais como a biotransformação de xenobióticos e efluentes industriais, a descoloração de corantes, a biorremediação de solos contaminados, na produção de bioetanol, na clarificação de vinhos e chás, e na produção de biossensores (DURÁN; ESPOSITO, 2000).

A utilização de enzimas em suas formas livres evidencia alguns problemas relacionados à baixa estabilidade operacional, difícil recuperação e reutilização desses biocatalisadores (DATTA; CHRISTENA; RAJARAM, 2013). No entanto, esses problemas podem ser superados quando técnicas apropriadas de imobilização são empregadas (SANTOS *et al.*, 2017); outrossim, uma vez imobilizadas, as enzimas apresentam maior resistência ao pH, temperatura e as variações de armazenamento (SALAMI *et al.*, 2018).

O uso de MNPs como suportes sólidos para imobilização enzimática tem atraído considerável atenção nas últimas décadas; ademais, apresentam baixa porosidade e alta estabilidade mecânica e térmica que são importantes propriedades desses suportes magnéticos nanoestruturados (CIPOLATTI *et al.*, 2016; SADEGHI; MOGHIMIFAR; JAVADIAN, 2023; XIMENES *et al.*, 2021). As nanoestruturas magnéticas de Fe₃O₄ tendem a se agregar e a se oxidar. Isso produz a perda de paramagnetismo e dispersibilidade (XU; LING; ZHANG, 2013). Para contornar tais problemas, a superfície desse tipo de suporte sólido tem sido funcionalizada com polímeros orgânicos, sílica ou MOFs para sua utilização na imobilização (RASHEED *et al.*, 2019; SADEGHI; MOGHIMIFAR; JAVADIAN, 2023).

Dentre esses materiais citados, a CHI se destaca por sua boa biocompatibilidade e baixa toxicidade. A CHI é um copolímero obtido da desacetilação da quitina, sendo uma base fraca é solúvel em meios ácidos diluídos (pH < 6) (JIMÉNEZ-GÓMEZ; CECILIA, 2020). A CHI tem sido utilizada em aplicações industriais, ambientais, alimentícias, farmacêuticas, médicas, entre outros (MAFTOON; TARAVALI; TOHIDI, 2023; MELO *et al.*, 2017; PIEKARSKA *et al.*, 2023).

Para a imobilização de enzimas, a CHI tem sido utilizada por oferecer um conjunto único de características: biocompatibilidade, biodegradabilidade para produtos inofensivos, não toxicidade, propriedades de formação de gel e hidrofiliabilidade, dentre outros (SOUSA *et al.*, 2022; MO; QIU, 2020). Como revestimento para MNPs de Fe₃O₄ a CHI controla a distribuição de tamanho nanométrico, permite a estabilidade coloidal dessas nanoestruturas (FREIRE *et al.*, 2016a; NICOLÁS *et al.*, 2013), adiciona novos grupos à superfície dos nanocompósitos, introduzindo grupos amino e hidroxila (JIMÉNEZ-GÓMEZ; CECILIA, 2020).

As enzimas podem ser ligadas ao suporte por ligações físicas ou químicas. A grande versatilidade do GLU o faz ser geralmente usado como agente ativador para imobilizar enzimas covalentemente em um suporte. O GLU reage com grupos amino da enzima e o suporte; assim, um suporte heterofuncional é gerado, tendo ambas as capacidades de interação física e química (MONTEIRO *et al.*, 2019; ZAAK *et al.*, 2017).

Nesse contexto, a combinação de enzimas com MNPs pode permitir uma fácil separação do biocatalisador enzimático através da exposição a um campo magnético externo, permitindo, assim, uma posterior reutilização do biocatalisador (SOUZA *et al.*, 2017). No caso das MNPs de Fe₃O₄ empregadas, elas são partículas de dispersão sólida que exibem propriedades paramagnéticas em tamanhos típicos de 10 a 20 nm (NETTO; TOMA; ANDRADE, 2013; RODRIGUES *et al.*, 2023).

O principal objetivo deste estudo é avaliar a imobilização da lacase de *Aspergillus* sp. em MNPs revestidos com CHI ativados com GLU, aqui denominadas MNP@CHI-GLU-LAC. A fim de desenvolver um processo sustentável e tecnologicamente eficiente, a metodologia de Taguchi (TAGUCHI, 1995) foi utilizada para investigar o efeito de parâmetros operacionais (quantidade oferecida de enzima, força iônica, pH e tempo de reação) na síntese enzimática. Por fim, foi verificada a aplicação do biocatalisador na remoção do corante têxtil da classe dos azos, o C.I. *Reactive Blue 250* (RB250) e verificada a viabilidade de recuperação do biocatalisador.

4.3 Materiais e Métodos

Os experimentos foram realizados com lacase de *Aspergillus* sp. comercializada pela Novozymes (Dinamarca). O cloreto férrico hexahidratado (FeCl₃·6H₂O, 97%) e ácido acético glacial (CH₃COOH, 99,7%) foram adquiridos da VETEC. O sulfato ferroso heptahidratado (FeSO₄·7H₂O, 99%) e o hidróxido de amônio P.A (NH₄OH 28%) foram da DINAMICA. A CHI com grau de desacetilação de 75%, Guaiacol (2-metoxifenol, éter monometílico catecol, éter monometílico de pirocatecol) e a solução de glutaraldeído 25% (v v⁻¹) foram provenientes da Sigma-Aldrich.

Para o suporte foi utilizado o equipamento sonicador de ponteira, Sonics, Vibra-Cell - VCX 500, na produção do suporte. O corante utilizado no presente estudo foi cedido pela empresa DyStar. Todos os outros reagentes foram de grau analítico.

Para elaboração do delineamento experimental pelo método Taguchi foi utilizado o *software* Statistica® 10 (Statsoft, TULSA, OK, USA) e, para a criação dos gráficos, o OriginPro®2019 (OriginLab, Northampton, MA, USA). Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

4.3.1 Preparação dos nanocompósitos magnéticos de magnetita e funcionalização numa etapa rápida

A CHI (0,1 g) foi inicialmente dissolvida em 4 mL de ácido acético 1% (v v⁻¹). Posteriormente, 15 mL de solução de ferro (0,33 M, FeCl₃·6H₂O/FeSO₄·7H₂O, seguindo a razão molar 2Fe³⁺: Fe²⁺) foram adicionados à solução contendo CHI. A solução final foi homogeneizada usando um sonicador de ponteira (amplitude de 50%, em um regime de pulso 20s *on* - 10s *off*) por 4min. E, então, ainda sob irradiação ultrassônica, 7 mL de NH₄OH foram adicionados lentamente e o sistema foi mantido sob sonicação por mais 4min. Feito isso, o precipitado (MNP@CHI) foi lavado com cetona e precipitado com um imã até obter pH neutro, depois de seco; foi armazenado em dessecador sob vácuo (FREIRE *et al.*, 2016a). Os nanocompósitos magnéticos revestidos com quitosana, foram denominados MNP@CHI.

4.3.2 Ativação dos nanocompósitos magnéticos revestidos com quitosana

Os grupos amino do suporte modificado foram ativados com glutaraldeído, para promover a ligação covalente entre a enzima e o suporte (MNP@CHI-GLU). Um volume de 10 mL de solução de glutaraldeído 1% (v/v), em tampão pH 5, em contato direto com 100 mg de suporte funcionalizado, previamente seco. A mistura foi mantida sob agitação constante, 150 rpm, por 6h a 25°C e foi lavada 10 vezes com água deionizada para remover o excesso de glutaraldeído (MOREIRA *et al.*, 2022; SILVA *et al.*, 2012).

4.3.3 Estudo de imobilização da Lacase de *Aspergillus sp.* em suporte MNP@CHI-GLU

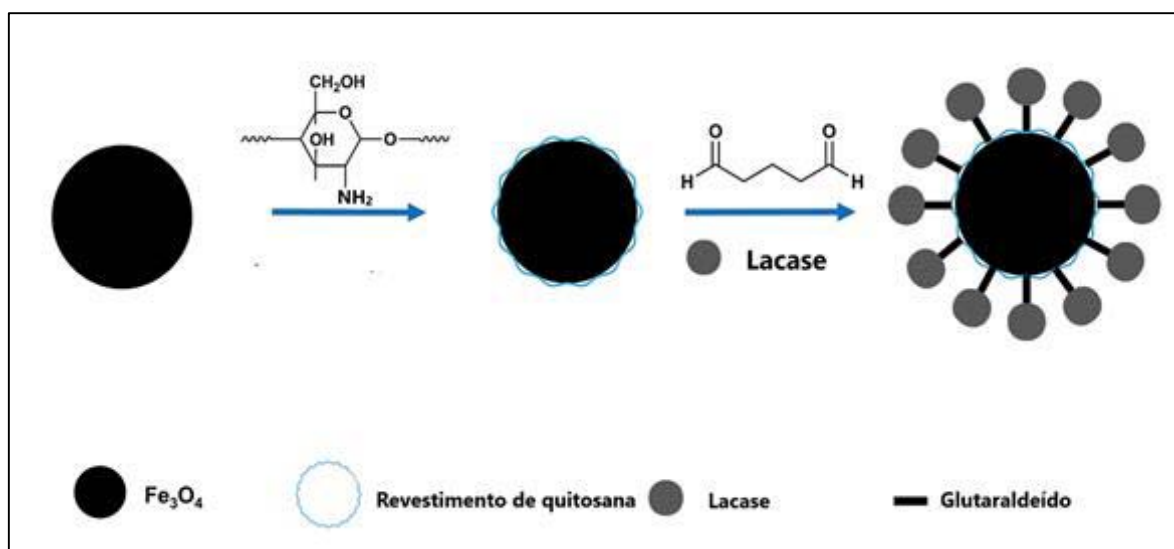
No presente estudo, foi realizado o planejamento de imobilização da lacase de *Aspergillus sp.* através do método Taguchi que tem um arranjo ortogonal L9, em que “L” representa o quadrado latino e “9” o número de experimentos.

Para isso, foi investigado quatro fatores (carga de proteína, força iônica, pH e tempo) em três níveis.

Experimentalmente, 0,1 g de MNP@CHI-GLU foi suspenso em 1 mL de tampão a ser otimizado (pH 3, pH 4 e pH 5) com variação na força iônica (5, 50 e 95 mM), contendo uma carga de proteína da lacase de *Aspergillus sp.* (carga de enzima: 1, 3 e 5 mg g⁻¹ de suporte). O sistema foi mantido sob agitação em 150 rpm durante 4–6h a 25°C. Por fim, a lacase imobilizada no suporte foi separada da solução por decantação magnética e lavada com solução

tampão de acetato 10 mM em pH 5 por três vezes, seca sob vácuo e armazenada em dessecador. Essas partículas foram nomeadas MNP@CHI-GLU-LAC. O esquema do processo de imobilização do suporte funcional pode ser visto na Figura 34.

Figura 34 – Ilustração esquemática da imobilização de Lacase no suporte funcional MNP@CHI-GLU.



Fonte: Adaptado de Zhang *et al* (2020).

A quantidade de enzima imobilizada no suporte foi determinada medindo a atividade inicial e final de LAC no sobrenadante da suspensão de imobilização. A Tabela 5 apresenta os fatores independentes que foram utilizados no planejamento.

Tabela 5 – Fatores independentes e seus respectivos níveis para a imobilização da LAC em MNP@CHI-GLU.

Níveis	Carga de proteína (mg g ⁻¹)	Força iônica (mM)	pH	Tempo (h)
Nível 1	1	5	3	4
Nível 2	3	50	4	5
Nível 2	5	95	5	8

Fonte: Elaborada pela autora.

A função objetiva usada é a relação sinal/ruído (S/N), que é otimizada, movendo os parâmetros alvo dentro do espaço de planejamento; a fim de, reduzir não só os efeitos de variações externas no comportamento do processo; como também, reduzir a sensibilidade dos

parâmetros de processos à fatores incontrolláveis, ou ruídos (RAMACHANDRAN e TSOKOS, 2014). As variáveis são divididas em dois tipos, fatores de controle e fatores de ruídos; cujo, os fatores de controles, são designados com fatores que podem ser praticamente controladas; já, os fatores de ruído são designados com fatores de difíceis controle na prática.

Para a estimativa do nível ótimo da característica e atingir uma robustez do processo, a função "maior é melhor" é usada uma vez que o objetivo do estudo é maximizar a resposta variável. Para calcular os valores das relações S/N que correspondem aos valores da atividade do MNP@CHI-GLU-LAC, o cálculo das relações S/N para cada experimento, foi feito a partir da Equação (4.1).

$$\frac{S}{N} = -10 \log \left(\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \frac{1}{y_i^2} \right) \quad (4.1)$$

Em que, y é a atividade do biocatalisador para o experimento correspondente, i é o número de repetições n é o número de respostas para a combinação de níveis de fator em qualquer combinação paramétrica específica de acordo com a Tabela 5. A relação S/N prevista em condições ótimas para o processo de obtenção da atividade do biocatalisador foi estimada pela Equação (4.2) (CHAKRABORTY; ROYCHOWDHURY, 2013).

$$\frac{S}{N_{previsto}} = \frac{\bar{S}}{\bar{N}} + \sum_{j=1}^n \left(\frac{S}{N_j} - \frac{\bar{S}}{\bar{N}} \right) \quad (4.2)$$

Em que, \bar{S}/\bar{N} é a média aritmética de todas as razões S/N, S/N_j é a razão S/N no ponto ótimo para cada fator, n é o número de fatores que afetam significativamente o processo.

4.3.4 Determinação da atividade enzimática e concentração de proteínas

A atividade da enzima foi medida utilizando guaiacol como substrato padrão. Esse método é baseado na oxidação do guaiacol gerando sua quinona respectiva (absorção a 420 nm $\epsilon = 12.100 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). As determinações foram conduzidas em um espectrofotômetro UV-Vis (Shimatzu UV-1800). Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para oxidar $1 \mu\text{mol L}^{-1}$ de substrato por minuto. A concentração de

proteína foi então determinada usando o método de Bradford conforme descrito, e a albumina de soro bovino foi usada como referência (BRADFORD, 1976).

4.3.5 Parâmetros de imobilização

Os parâmetros de imobilização foram determinados segundo a metodologia descrita por Moreira *et al.* (2022) com objetivo de analisar o desempenho da estratégia de imobilização proposta. O rendimento de imobilização (IY) foi definido como a porcentagem de atividade enzimática no sobrenadante antes e depois de um período de tempo definido. A atividade teórica (At_T) da enzima imobilizada foi calculada usando o valor IY e a carga proteica oferecida por g de suporte (BEZERRA *et al.*, 2020). A atividade recuperada (At_R) foi determinada minado como a relação entre a atividade do biocatalisador (At_D) e o valor At_T (MOREIRA *et al.*, 2022; PINHEIRO *et al.*, 2019).

4.3.6 Efeito da concentração da enzima sobre a imobilização da Lacase

Para determinar o efeito da quantidade de enzima adicionada, os MNP@CHI-GLU reagiram com tampão acetato (0,50 mM, pH 4) a 150 rpm e 25°C, e a quantidade de lacase na mistura de imobilização foi aumentada de 0,5 a 3 mg de lacase pela adição de diferentes volumes da solução inicial de lacase.

4.3.7 Efeito do pH na Lacase solúvel e imobilizada

Para avaliar o efeito do pH (em pH variando de 3 a 13) nas enzimas solúveis e imobilizadas (FIGURA 35), estas foram incubado por 15min em 1 mL de diferentes tampões 95 mM (acetato, fosfato e carbonato). Para calcular os valores de atividade, o guaiacol foi usado conforme descrito na Seção 4.3.4

Figura 35 – Ilustração esquemática do estudo do efeito do pH na Lacase solúvel e imobilizada.



Fonte: Elaborada pela autora.

4.3.8 Efeito da temperatura na atividade da enzima solúvel e imobilizada

A atividade oxidativa das enzimas livres e imobilizadas foi avaliada sob diferentes temperaturas conforme metodologia de Melo *et al.* (2017), com modificações. Para isso, LAC e MNP@CHI-GLU-LAC foram incubados em tampão acetato (95 mM; pH 4) a 30, 40, 50, 60 e 70°C durante 10min.

Após o processo de aquecimento, as amostras foram resfriadas em banho de gelo e imediatamente aquecidas à temperatura ambiente (25°C) em banho-maria antes da análise. A atividade foi medida usando guaiacol, e a atividade residual foi expressa como uma porcentagem da atividade inicial.

4.3.9 Ensaio de degradação de corante

O corante têxtil, RB250, foi selecionado como corante modelo para estudar a capacidade de descoloração da lacase imobilizada de *Aspergillus sp.* sobre suporte magnético revestido de quitosana. A mistura de reação continha 10 mg de enzima de lacase em tampão acetato (95 mM, pH 4), num volume total de 5 mL, onde 0,2 ml da solução de corante foram incubados por 1 a 15 horas. A concentração total da solução do corante foi de 20,5 mg L⁻¹.

Um segundo grupo de frascos foi incubado com os mesmos componentes, porém, sem a enzima imobilizada, para a obtenção de valores do controle negativo. Os frascos foram mantidos sob agitação 150 rpm e temperatura de 25°C. A porcentagem de degradação dos corantes foi especificada em vários intervalos de tempo, medindo a redução da absorção de cor na solução de ensaio no comprimento de onda máximo de cada corante usando um

espectrofotômetro UV-Vis de feixe duplo (Shimatzu, UV-1800). Foram realizados 4 ciclos de degradação do corante. Depois de encontrar a degradação máxima do corante, a quantidade de descoloração foi calculada pela seguinte Equação (4.3):

$$\% \text{ Descoloração} = \frac{A_{inicial} - A_{final}}{A_{inicial}} * 100 \quad (4.3)$$

Onde:

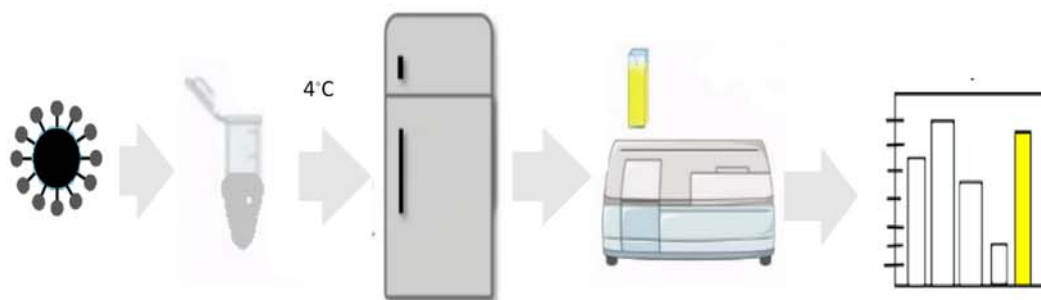
A_i = absorbância inicial;

A_f = absorbância final.

4.3.10 Estabilidade de armazenamento da Lacase imobilizada

Para avaliar o efeito da estabilidade no armazenamento do biocatalizador após a fase de imobilização, os biocatalisadores foram lavados, secos a vácuo e armazenados sob refrigeração a 4°C (FIGURA 36). Os biocatalisadores produzidos tiveram sua atividade residual avaliadas a cada intervalo de 7 a 10 dias em um período de 30 dias. Os resultados obtidos no momento de cada ensaio enzimático foram comparados com os dias anteriores. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

Figura 36 – Ilustração esquemática do estudo de estabilidade de armazenamento da Lacase imobilizada.



Fonte: Elaborada pela autora.

4.3.11 Reutilização de Lacase imobilizada

A fim de investigar a reutilização, a lacase imobilizada em nanocompósitos magnéticas revestidas com quitosana foi usada em vários ciclos consecutivos. Primeiro, 1 mL tampão acetato 95 mM pH 4 foram adicionados ao eppendorf e, em seguida, 10 mg de enzima imobilizada foram adicionados ao tampão. Após agitação, foi retirada uma alíquota de 0,2 mL para a realização dos ensaios de atividade enzimática. Após completa oxidação do substrato (4.3.4), a enzima imobilizada foi coletada por um forte campo magnético externo, lavada com tampão acetato 10 mM pH 4 e, novamente analisado o seu reuso. Dessa forma, a possibilidade de reuso da enzima imobilizada foi determinada através das medidas de atividade enzimática residual em cinco ciclos consecutivos de oxidação do substrato.

4.4 Instrumentação

4.4.1 Difração de raios X (DRX)

As análises de DRX foram realizadas em um difratômetro de raios X X'Pert MPD (Panalytical), com uma faixa de varredura de $2\theta = 20 - 80^\circ$. Um tubo $\text{CuK}\alpha$ (1,54059 Å) foi usado para as amostras, operando a 40 kV e 30 mA e faixa de varredura de $20^\circ - 100^\circ$. Os padrões de difração foram obtidos usando a Geometria Brentano Bragg em modo contínuo com uma velocidade de $0,5^\circ/\text{min}$ e um tamanho de passo de $0,02^\circ$ (2θ). A estrutura de refinamento de Rietveld foi usada para interpretar e analisar os dados de difração usando o *software* Maud®. O tamanho do cristal de cada amostra foi calculado usando a Equação de Scherrer.

4.4.2 Espectroscopia de absorção na região do infravermelho (FTIR)

Os espectros de absorção na região do infravermelho foram obtidos no aparelho Espectrofotômetro Perkin Elmer 2000. As amostras foram previamente misturadas com KBr e, colocadas em uma prensa para formar uma pastilha e então, os espectros foram obtidos na faixa de $400 - 4000 \text{ cm}^{-1}$.

4.4.3 Análise termogravimétrica (TG)

Os ensaios de termogravimetria foram executados elevando-se a temperatura da amostra de 25°C até 900°C sob fluxo de nitrogênio em um analisador termogravimétrico Q50 TA Instruments, V20.13. Resumidamente, 5 mg de amostra foi adicionada em um cadinho e colocada sob fluxo de N₂, esperou-se a temperatura da amostra ficar constante; e, então, foi iniciada uma rampa de aquecimento de 10°C min⁻¹ até atingir a temperatura de 900°C.

4.4.4 Microscopia eletrônica de varredura (MEV) e espectroscopia de fluorescência de raios X (FRX)

As imagens de MEV foram realizadas para avaliar o aspecto, forma e aparência e morfologia. Já, a análise de espectroscopia de FRX foi utilizada para verificar a composição química. Nas análises de MEV foi utilizado o microscópio QUANTA 450 FEG. As amostras foram fixadas em fita de carbono e metalizadas com prata utilizando o equipamento de metalização Quorum QT150ES. Foi aplicado um feixe de elétrons com 20 kV. As análises de FRX foi efetuada no equipamento SHIMADZU modelo EDX-7000 equipado com um tubo de ródio, aplicando uma potência de 4 kV nas amostras de pó.

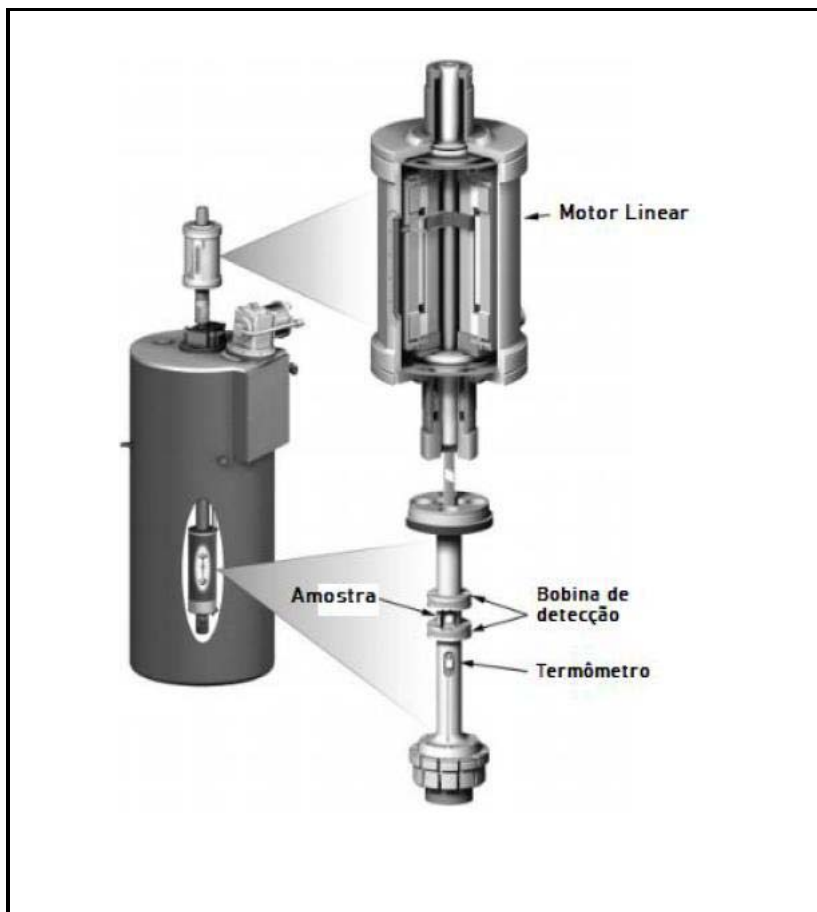
4.4.5 Magnetômetro de amostra vibrante (VSM)

Um magnetômetro de amostra vibratória (VSM) é usado para medir as propriedades magnéticas dos materiais. Em um VSM (FIGURA 37), a amostra é colocada dentro de bobinas de detecção e, mantidas no ângulo desejado, já o componente da amostra vibratória é feito para sofrer movimento sinusoidal. Em sequência, um campo magnético H aparece ao redor da amostra e, uma vez que a amostra começa a vibrar, a magnetização da amostra pode ser analisada conforme ocorrem alterações em relação ao tempo de movimento, porque as alterações de fluxo magnético induzem uma tensão nas bobinas de detecção; que é, então proporcional ao momento magnético da amostra.

O princípio de funcionamento dessa técnica se baseia na lei de indução de Faraday; no qual, o movimento da amostra leva à uma variação de fluxo magnético nas bobinas de detecção, que por sua vez gera força eletromotriz nas bobinas de detecção. A lei de indução de Faraday afirma que a força eletromotriz de indução é diretamente proporcional à taxa de

variação do fluxo magnético que passa por um determinado circuito fechado (DURANIK; RUZBARKY; STOPPER, 2012).

Figura 37 – Esquema 3D de um VSM



Fonte: Cullity e Graham Jr. (2009) *apud* Isabelle (2022).

Para as análises do VSM foi usando um magnetômetro de amostra vibrante a 300K, para obtenção das curvas magnéticas. Para garantir a precisão dos momentos magnéticos adquiridos, o equipamento foi previamente calibrado usando material de referência padrão. Para todas as medições, o momento magnético obtido para cada campo aplicado foi normalizado pela massa dos nanocompósitos.

4.5 Resultados e Discussões

4.5.1 Imobilização de Lacase em nanocompósitos

No planejamento experimental foram obtidas as combinações dos fatores independentes em seus respectivos níveis, os valores do fator dependente, e a razão S/N para o projeto experimental de matriz ortogonal L9, segundo o método de Taguchi. Esses dados podem ser observados na Tabela 6. A relação S/N foi determinada pela função "maior é melhor", com o objetivo de maximizar a atividade MNP@CHI-GLU-LAC.

A maior atividade MNP@CHI-GLU-LAC foi obtida pela maior relação S/N, que sugere o melhor nível para cada parâmetro. A relação S/N ideal prevista para condições otimizada foi calculada a partir da Equação (4.2).

Para esse estudo, a maior relação S/N obtida foi 23,79, que sugere que os melhores valores para cada parâmetro sejam: a) para carga de proteína: 5 mg g⁻¹; b) força iônica 95 mM; c) para pH: pH 4; d) para tempo: 6 horas, como pode ser visto na Figura 38. Para esta combinação de parâmetros, a atividade teórica de MNP@CHI-GLU-LAC foi de 14,69 U g⁻¹, enquanto a atividade experimental foi de 14,40 ± 0,1 U g⁻¹.

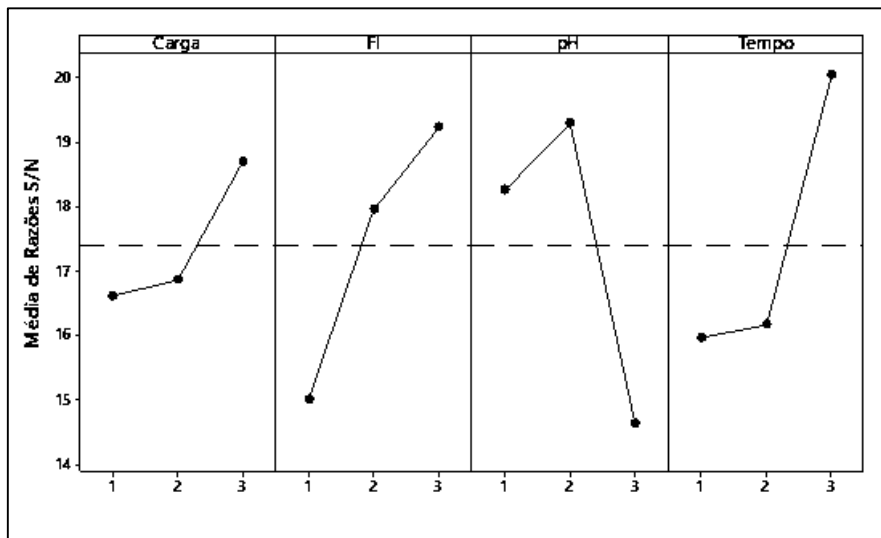
A classificação dos parâmetros (carga de proteína, força iônica, pH e tempo) com base nos valores delta (a diferença dos valores da razão S/N entre os níveis mais altos e mais baixos dos fatores de processo) é mostrada na Tabela 7. De acordo com essa classificação, oriundo do método experimental, o pH foi o fator que mais influenciou na imobilização da lacase de *Aspergillus* sp. no suporte MNP@CHI; depois disso, a força iônica foi a que mais influenciou; e, por último a carga de proteína, como pode ser visto na Tabela 7 e na Figura 39.

Tabela 6 – Descritivo de matriz ortogonal L9 junto com os valores de atividade MNP@CHI-GLU-LAC e as razões S/N.

Experimento	Carga de Proteína (mg g ⁻¹)	Força iônica (mM)	pH	Tempo (h)	Atividade do biocatalisador (U g ⁻¹)	S/N
1	1	5	3	4	4,82 ± 0,97	13,66
2	1	50	4	5	7,81 ± 0,80	17,85
3	1	95	5	6	8,26 ± 0,00	18,34
4	3	5	4	6	8,95 ± 0,97	19,04
5	3	50	5	4	4,95 ± 0,79	13,24
6	3	95	3	5	8,26 ± 0,00	18,34
7	5	5	5	5	4,13 ± 0,00	12,32
8	5	50	3	6	13,77 ± 0,80	22,78
9	5	95	4	4	11,25 ± 1,05	21,02

Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 38 – Razões S/N para carga de proteína, força iônica (FI), pH e tempo para otimização da imobilização MNP@CHI-GLU-LAC.



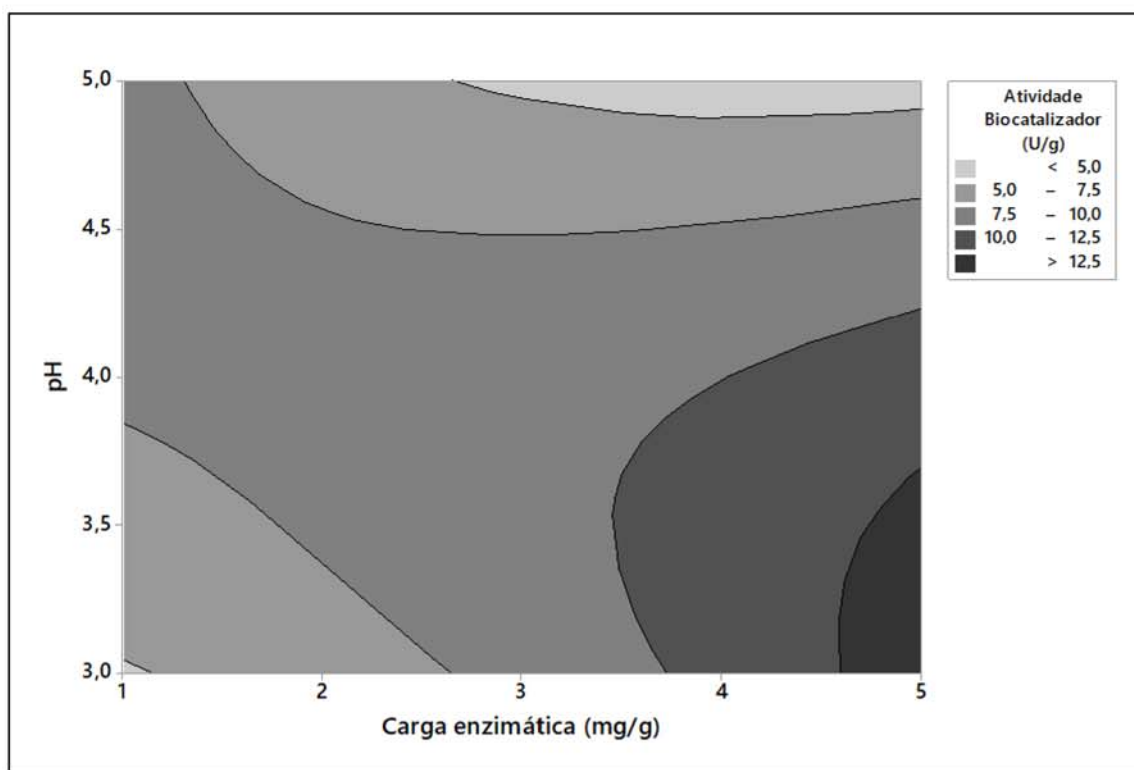
Fonte: Elaborado pela autora.

Tabela 7 – Tabela de resposta das razões sinal-ruído.

Nível	S/N - Carga de Proteína (mg g ⁻¹)	S/N - Força iônica (mM)	S/N - pH	S/N - Tempo (h)
1	16,62	15,01	18,26	15,97
2	16,87	17,96	19,30	16,17
3	18,71	19,24	14,64	20,06
Delta	2,09	4,23	4,67	4,08
Rank	4	2	1	3

Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 39 – Superfície de contorno para a imobilização de MNP@CHI-GLU-LAC, demonstrando carga de proteína (mg g^{-1}) versus pH, levando em consideração a atividade do biocatalisador como resposta.



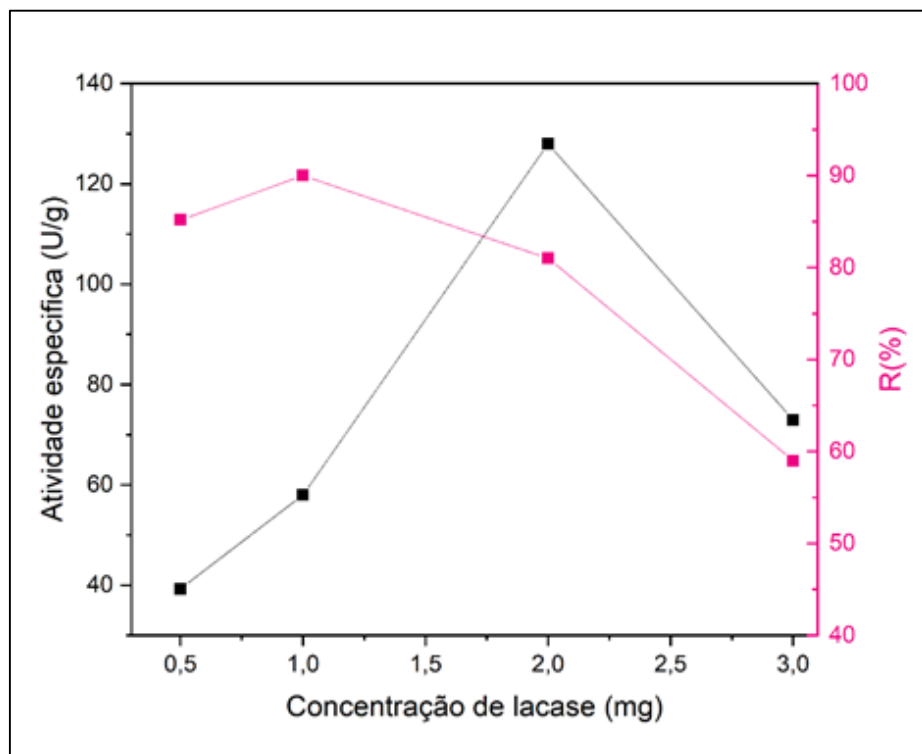
Fonte: Elaborado pela autora.

Segundo Gomes *et al.* (2006), o pH e a força iônica estão entre os parâmetros que devem ser considerados como os mais importantes. Pois, esses fatores influenciam no desempenho do suporte, na conformação da enzima; portanto, afetam o comportamento da enzima imobilizada. Pinto *et al.* (2023) relata que a eficiência da imobilização em 4 diferentes processos de imobilização utilizados, tem como atributos importantes para o processo de imobilização, aspectos como estabilidade enzimática em pH e temperatura, carga enzimática, dentre outros. Diante dos fatos apresentados, esses parâmetros como pH e força iônica contribuem para a eficiência do processo de imobilização da enzima em questão.

4.5.2 Efeito da concentração da enzima sobre a imobilização da Lacase

A atividade da lacase imobilizada e o rendimento de imobilização foram analisados e os resultados são mostrados na Figura 40. A imobilização de lacase foi realizada em pH 4 e 25°C, e a quantidade de lacase na mistura de imobilização foi aumentada de 0,5 a 3 mg de lacase.

Figura 40 – Efeito da quantidade de LAC nos nanocompósitos magnéticos revestidos e ativados.



Fonte: Elaborado pela autora.

A quantidade de lacase aumentou com o acréscimo na quantidade inicial de lacase adicionada, e o rendimento de imobilização aumentou com a concentração de lacase, variando de 0,5 mg a 1 mg; apresentando, portanto, o melhor rendimento em 1 mg. Entretanto, diminuiu com o posterior aumento na concentração de lacase, atingindo um nível de saturação em 3 mg de lacase.

Por outro lado, a atividade específica da lacase imobilizada aumentou com a concentração de lacase, variando de 0,5 mg a 2 mg, mas diminuiu com o aumento da concentração de lacase. Portanto, a quantidade ideal de lacase para imobilização foi determinada em 2 mg na mistura de imobilização.

Quando usado 0,5 mg de lacase, a quantidade imobilizada de enzima não foi suficiente para mostrar alta atividade. Quando a mistura de imobilização continha 3 mg da quantidade de lacase, a atividade específica da enzima imobilizada foi diminuída. Nessas situações, mesmo que o rendimento de imobilização fosse quase o mesmo, a quantidade de enzima imobilizada foi aumentada. Por causa disso, pode ocorrer limitação da difusão e mudança na conformação da enzima, bem como alguns locais dos sítios ativos podem estar ocultos, o que levou à diminuição da atividade quando foi usado 3 mg de lacase (SAHIN; OZMEN, 2020).

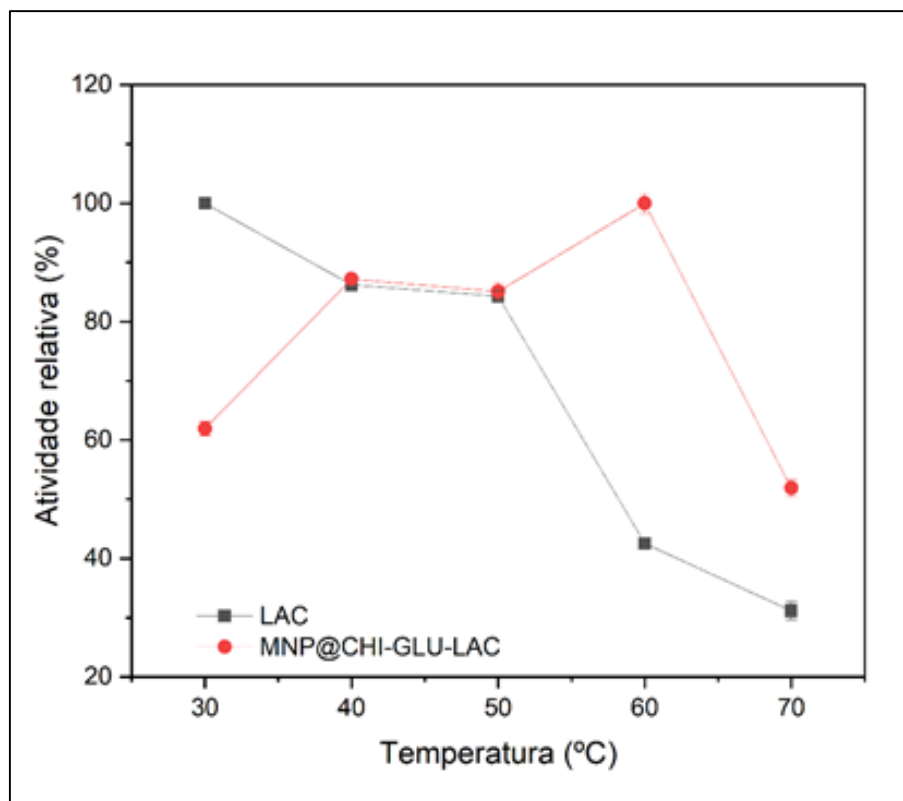
4.5.3 Efeito do pH e da temperatura sobre a atividade da Lacase livre e imobilizada

O pH e a temperatura são dois dos fatores importantes que afetam a atividade enzimática, que foram investigados nesse estudo. Pois, após a imobilização, a estrutura da lacase pode ser alterada, o que alteraria o acesso ao sítio ativo, a estabilidade e a especificidade da enzima. Então, se torna importante investigar a influência do pH e da temperatura na atividade entre enzimas livres e imobilizadas (MO; QIU, 2020; SOUSA *et al.*, 2022).

Verifica-se através da Figura 41, que a imobilização contribuiu para o aumento da estabilidade térmica da lacase, uma vez que em todas as temperaturas estudadas, ela apresentou uma atividade maior que sua forma na solúvel, exceto em 30°C. Isso se justifica porque as enzimas são geralmente mais estáveis em temperaturas mais baixas, enquanto que a rápida desnaturação térmica ocorre em altas temperaturas (JIANG *et al.*, 2005). A lacase imobilizada, portanto, manteve sua alta atividade em uma ampla faixa de pH em comparação com a lacase livre. Esta propriedade pode ser devida ao aumento da estabilidade e conformidade da enzima após a imobilização. Além disso, um alto número de grupos hidroxila na quitosana fornecem um microambiente desejável para a lacase imobilizada ser eficaz em reter a atividade (MAFTOON; TARAVATI; TOHIDI, 2023).

Outro fato decorrente, é que em 60°C o biocatalisador apresentou a sua maior atividade, enquanto a enzima livre praticamente não teve mais atividade significativa. Esse aumento de resistência na temperatura após a imobilização pode estar relacionado com o aumento da rigidez da enzima imobilizada (SAHIN; OZMEN, 2020).

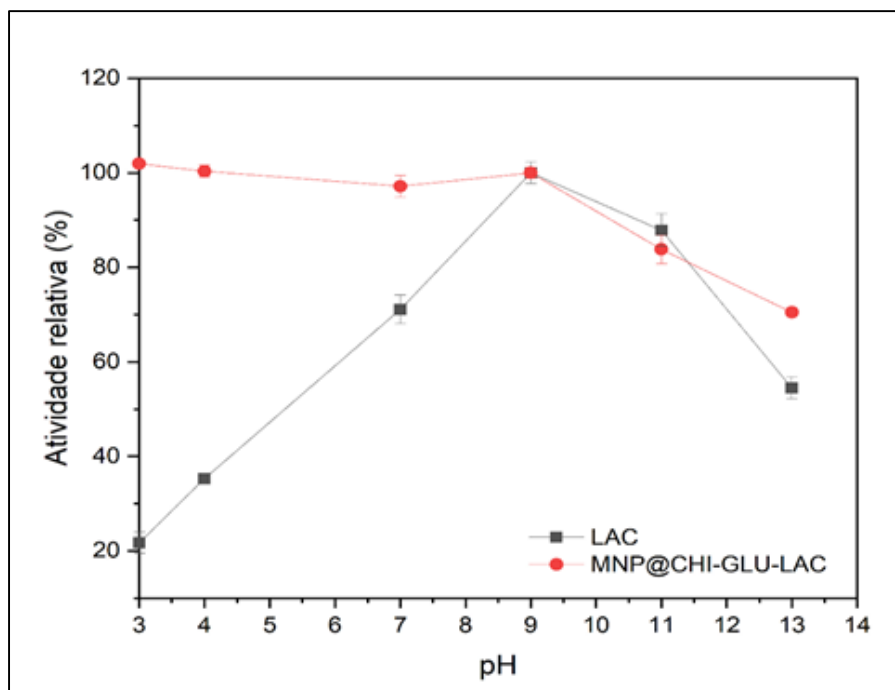
Figura 41 – O efeito da temperatura (condições de reação: tampão acetato 95 mM a pH 4) na Lacase livre e imobilizada. Cada ponto representa a média de três experimentos \pm SD.



Fonte: Elaborado pela autora.

O efeito do pH na atividade relativa da lacase livre e MNP@CHI-GLU-LAC foi estudado em uma faixa de pH 3–13 a 25°C (Figura 42). As lacases livres e imobilizadas apresentaram diferentes perfis de pH-atividade, pois ambas apresentaram comportamento diferente em tampões com diferentes pHs; visto que, a lacase imobilizada mostrou alta atividade em uma ampla faixa de pH, em comparação com a enzima livre. O pH ótimo para lacase livre e imobilizado foi de 9 e 3, respectivamente. É possível perceber que a enzima livre apresentou estabilidade em uma faixa de pH alcalino de 7 a 9. Todavia, a imobilização contribuiu para o aumento da atividade enzimática em valores de pH ácidos, elevando a atividade da lacase até 80% em pH 3. Isso pode ser explicado devido ao aumento da estabilidade da enzima e/ou alterações conformacionais causadas durante a imobilização (MELO *et al.*, 2017; VILLENEUVE *et al.*, 2000). Rekuć *et al.* (2009) também relataram que após a imobilização, o pH ótimo da lacase mudou para a faixa ácida e essa mudança foi devido ao efeito de tamponamento da superfície de suporte.

Figura 42 – O efeito do pH (condições de reação: tampão acetato 95 mM a 25°C) na Lacase livre e imobilizada. Cada ponto representa a média de três experimentos \pm SD.



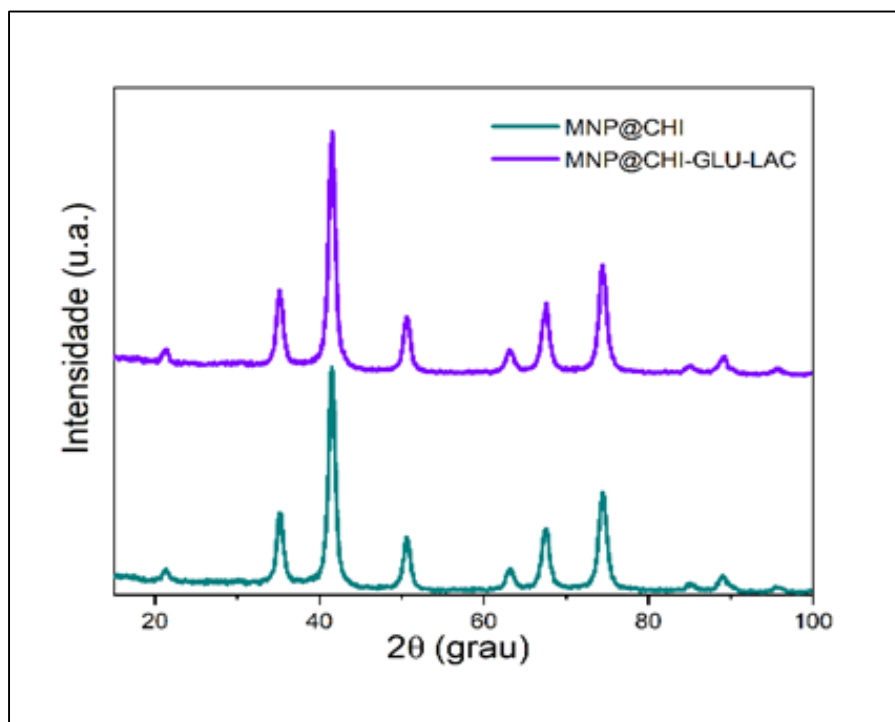
Fonte: Elaborado pela autora.

4.5.4 Caracterização dos nanocompósitos e biocatalisadores

4.5.4.1 Análise de DRX

A estrutura cristalina presente nos sistemas foi determinada por difração de raios X (DRX). A Figura 43 mostra os picos de difração de perfil obtidos para MNP@CHI e MNP@CHI-GLU-LAC. Para análise de DRX, seis picos característicos foram identificados ($2\theta = 21,3^\circ, 35,3^\circ, 41,3^\circ, 50,7^\circ, 63^\circ, \text{ e } 67,5^\circ$) marcados por seus índices (111), (220), (311), (400), (422), (511) e foram detectados tanto para MNP@CHI e MNP@CHI-GLU-LAC (ZANOTTO; MARQUES; CASTRO, 2021). Assim, é importante observar que a estratégia usada para sintetizar nanocompósitos foi eficiente, dado que os nanocompósitos magnéticas formadas foram detectadas como Fe_3O_4 e a natureza nanocristalina foi confirmada. O revestimento CHI pode atuar como um agente protetor contra oxidação de magnetita e como local para imobilização de lacase (MONTEIRO *et al.*, 2019).

Figura 43 – DRX das amostras sintetizadas.



Fonte: Elaborado pela autora.

4.5.4.2 Análise de FTIR

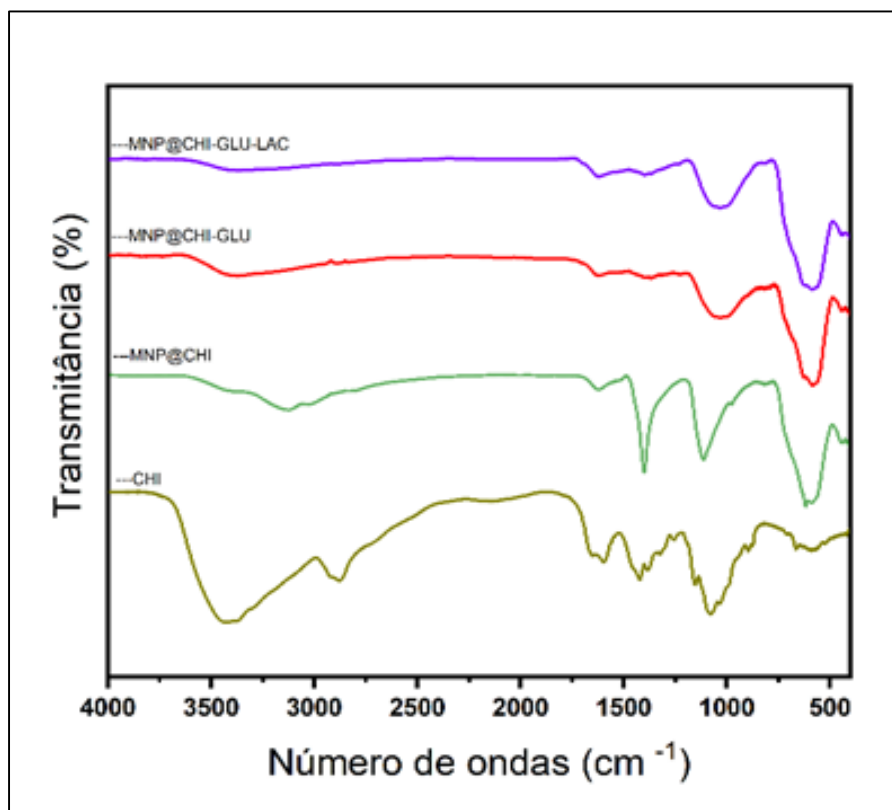
Para verificar a incorporação da magnetita, quitosana e a imobilização da lacase no material funcional, foi usada a técnica de espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) para medir as amostras: CHI, MNP@CHI, MNP@CHI-GLU e MNP@CHI-GLU-LAC (FIGURA 44).

Os picos característicos em 590, 594 e 588 cm^{-1} apareceram no espectro de MNP@CHI, MNP@CHI-GLU e MNP@CHI-GLU-LAC, respectivamente e confirmam a presença de espinélio na estrutura de Fe_3O_4 . Esses picos apareceram devido à vibração Fe-O que pode indicar a presença de componentes magnéticos (MAFTOON; TARAVATI; TOHIDI, 2023). Como também, as bandas em torno 3340 cm^{-1} foram atribuídos, nos espectros de MNP@CHI, MNP@CHI-GLU e MNP@CHI-GLU-LAC, respectivamente; à vibração de estiramento de O-H da água adsorvida na superfície do Fe_3O_4 (YANG *et al.*, 2019).

Nos espectros CHI, MNP@CHI, MNP@CHI-GLU, a vibração de estiramento C-O da CHI foi observada em torno de 1075 cm^{-1} , o que confirma o revestimento bem-sucedido de quitosana na superfície dos nanocompósitos de Fe_3O_4 (LONG *et al.*, 2015; MAFTOON; TARAVATI; TOHIDI, 2023).

Para amostras de CHI e MNP@CHI, a absorção em torno de 1580 cm^{-1} é característica da vibração de flexão $-\text{NH}_2$. Entretanto, essa banda não foi observada no espectro $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@CHI-GLU}$, sugerindo que ocorreu a reação de reticulação entre CHI e glutaraldeído (RASOULZADEH *et al.*, 2019).

Figura 44 – FTIR das amostras sintetizadas.



Fonte: Elaborado pela autora.

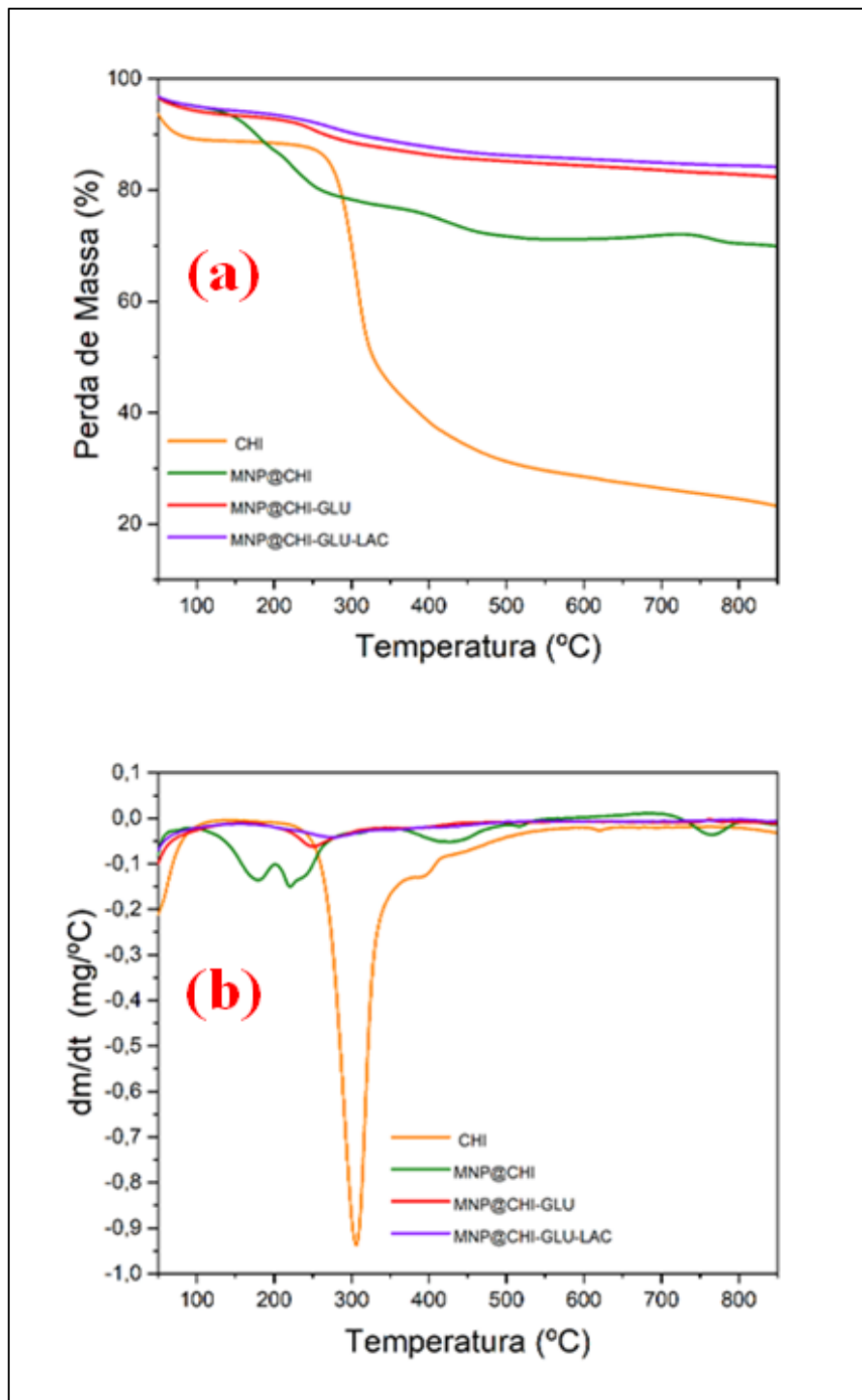
4.5.4.3 Análise de TG

A TG foi utilizada para avaliar a estabilidade térmica e quantificar a quantidade relativa de matéria orgânica nos nanocompósitos. Na Figura 45 (a) e (b), para a amostra CHI, o primeiro evento ocorre em uma faixa de temperatura de $25\text{--}110^\circ\text{C}$ e pode ser atribuída a perda de voláteis. A perda de massa total para esse evento foi de 11,09%.

O segundo evento térmico é onde se dá início a degradação polimérica, ele tem início em 200°C e continua até 414°C . A perda de massa total para esse evento foi de 51,58% e está ligada à ruptura das cadeias de polissacarídeos (incluindo desidratação), vaporização e eliminação de produtos de degradação (ZIEGLER-BOROWSKA; CHEŁMINIAK;

KACZMAREK, 2015). A taxa de perda máxima desse evento foi encontrada na temperatura de 305,78°C.

Figura 45 – Curva de (a) TG e (b) DTG das amostras sintetizadas.



Fonte: Elaborado pela autora.

Para análise do nanocompósito MNP@CHI, na Figura 45 (a) e (b), o termograma apresentou 4 eventos térmicos. O primeiro evento pode ser associado à dessorção de água na

amostra e ocorre em um faixa de temperatura de 25–100°C. Até 100°C, a degradação está associada à água adsorvida na superfície e, acima de 100°C a degradação está associada à água ligada inter e intramolecularmente. A perda de massa foi de 4,81%, nesse evento. Já o segundo evento (100 a 350°C); contudo, caracterizou-se com a presença de dois eventos térmicos que ocorrem concomitantemente: a) o primeiro ocorre na faixa de 100 a 200°C, com pico de degradação máxima em 178,67°C e com perda de 8,31%; b) o segundo ocorre no intervalo de 200 a 350°C, com pico de degradação máxima em 222,07°C, correspondendo à perda de 9,85%; sendo, portanto, associado à massa atribuída à remoção de moléculas de água retidas na rede.

O terceiro evento térmico ocorre no intervalo de 350 a 550°C, com temperatura de perda máxima em 515,01°C, correspondente à perda de 5,84%, sendo associada à decomposição da magnetita em outras espécies de óxidos de ferro. O quarto evento, no intervalo de 650 a 800°C, está associada à transição de fase de Fe₃O₄ para FeO; porque FeO é termodinamicamente estável acima de 570°C no diagrama de fases do Fe-O (ZHAO *et al.*, 2006; RAHMAN; MOHAPATRA; AHMAD, 2012); correspondendo, então, numa perda de 1,69%.

Já, para as análises dos nanocompósitos ativados e imobilizados com a enzima, o termograma apresentou dois eventos térmicos. O primeiro evento (25–175°C), refere-se à perda de água adsorvida ou superfície hidroxiladas, pois ocorre até uma temperatura de 175°C, correspondendo a uma perda de 6,96% e 5,82%, respectivamente. O segundo evento ocorre no intervalo de 175 a 350°C, com perda de 11,48% e 10,32, respectivamente, de massa atribuída à remoção de moléculas de água retidas na rede (RAHMAN; MOHAPATRA; AHMAD, 2012).

A temperatura da taxa de perda máxima encontrada, para o segundo evento para as amostras MNP@CHI, MNP@CHI–GLU e MNP@CHI–GLU–LAC, foi de 222,07, 251,94 e 275,29°C, respectivamente. Em comparação com a quitosana pura, onde a taxa de perda máxima foi de 305,78°C, todos os nanocompósitos apresentaram uma temperatura da taxa de perda máxima menor. As diferentes temperaturas podem ser relacionadas ao efeito da magnetita sobre o processo de degradação da quitosana e à extensão da reação de reticulação no processo de imobilização (FREIRE *et al.*, 2016b; POON; WILSON; HEADLEY, 2014).

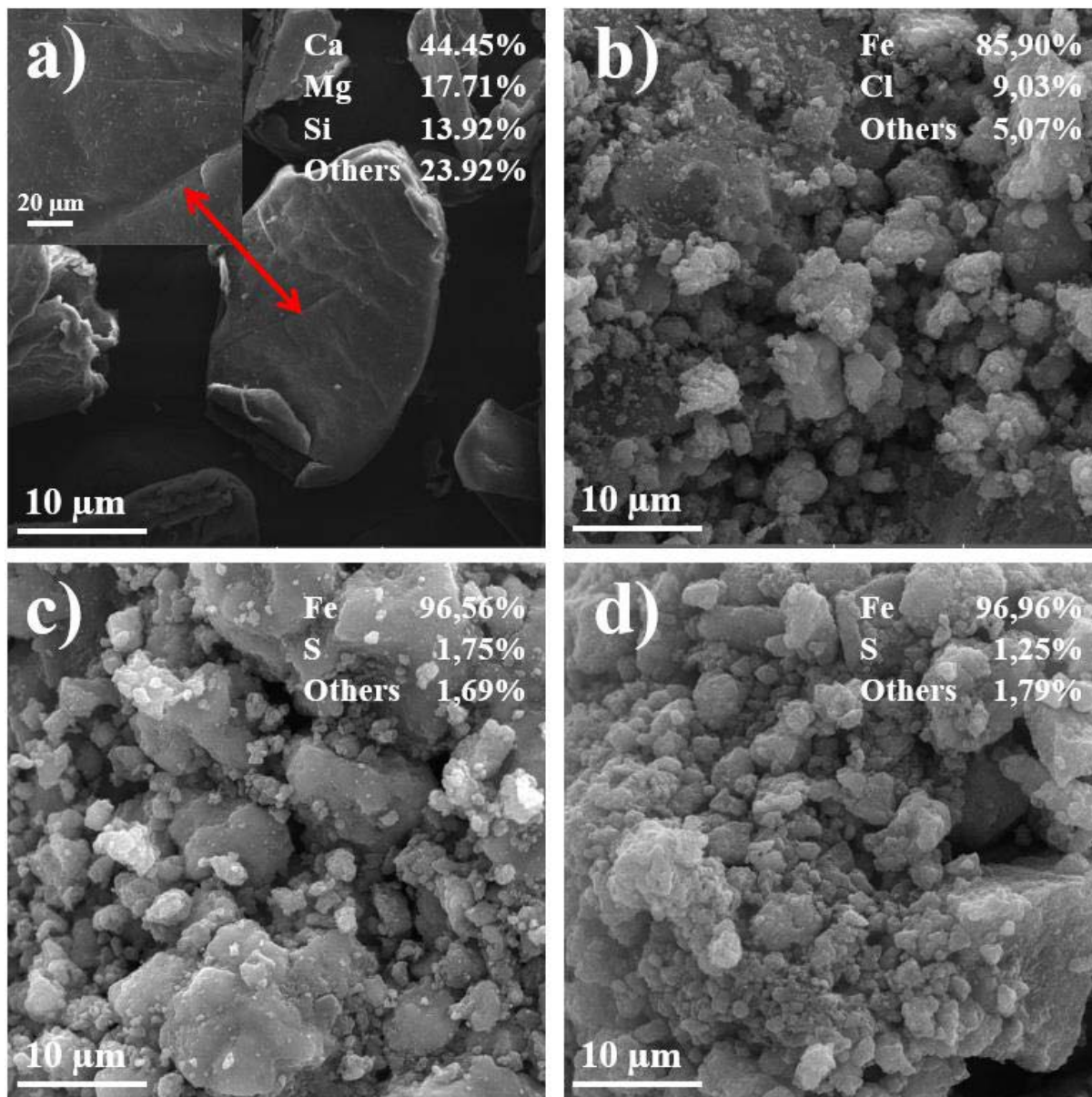
4.5.4.4 Análise de MEV e FRX

Imagens adquiridas por MEV e FRX (inseridas) foram empregadas para análise das amostras denominadas CHI, MNP@CHI, MNP@CHI–GLU e MNP@CHI–GLU–LAC, conforme representado nas Figuras 46 (a), (b), (c) e (d). Estas representações visuais têm por

objetivo ilustrar as transformações ocorridas na estrutura da superfície do CHI após o processo de modificação com MNP. A morfologia original da CHI é caracterizada por uma configuração laminar, como evidenciado na Figura 46 (a).

A introdução de partículas de magnetita na matriz de quitosana resultou em sutis modificações tanto na morfologia quanto na porosidade do material funcional, como pode ser observado nas Figuras 46 (b), (c) e (d). Além disso, a análise das composições elementares por meio do FRX revelou variações discretas nos teores de elementos como cálcio, silício, ferro e enxofre. Portanto, a combinação das técnicas de MEV e FRX se mostraram fundamental para fornecer informações complementares que permitiram avaliar se a LAC estava de fato imobilizado na superfície do material funcional.

Figura 46 – Imagens MEV e composição dos espectros FRX de (a) CHI, (b) MNP@CHI, (c) MNP@CHI-GLU e (d) MNP@CHI-GLU-LAC.



Fonte: Elaborado pela autora.

4.5.4.5 Análise de VSM

As nanopartículas exibem rápida resposta ao ser aplicado um campo magnético externo; como também, na ausência de magnetização após a remoção do campo magnético. As nanopartículas de óxido de ferro em tubos de eppendorf, como apresentado na Figura 47 (a), com aproximação de um ímã por aproximadamente 30 s, as partículas são atraídas para a parede do recipiente na horizontal (FIGURA 47 (b)) e na vertical (FIGURA 47 (c)). Esse fenômeno é devido às propriedades superparamagnéticas das nanopartículas de óxido de ferro.

Figura 47 – Fotografias das amostras de MNP@CHI-GLU-LAC: (a) na ausência de um imã, (b) após a aproximação de um imã por 30s na horizontal e (c) após a aproximação de um imã por 30s na vertical.

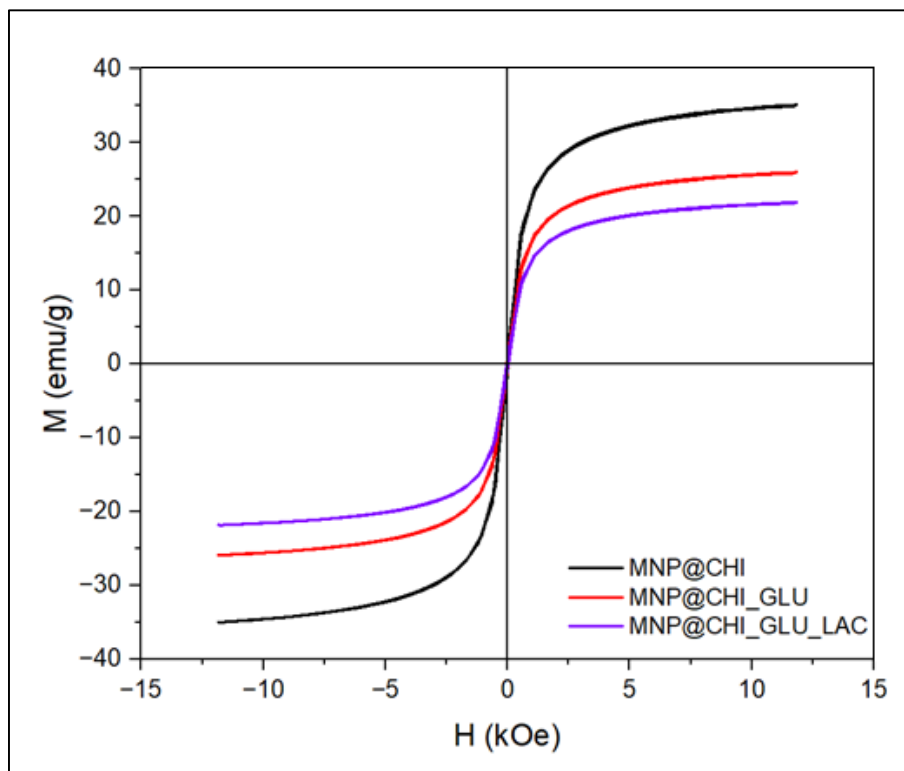


Fonte: Elaborado pela autora.

O perfil de magnetização, tanto do suporte quanto da lacase imobilizada em nanocompósitos magnéticas revestidas com quitosana, foi delineado na Figura 48. A análise dos resultados revelou que as amostras manifestaram notáveis propriedades superparamagnéticas, uma característica que viabilizou a pronta separação dessas partículas durante as reações em questão.

A magnitude da magnetização de saturação foi aferida em torno de 35,15; 29,22 e 21,92 emu g⁻¹ para o suporte, o suporte ativado e a lacase imobilizada no suporte ativado, respectivamente. Além disso, essas curvas de magnetização dos nanocompósitos não apresentaram ciclo de histerese e são reversíveis à temperatura ambiente. Os valores de magnetização de saturação consideram a soma de todos os momentos magnéticos dos materiais presentes nas nanopartículas; isso significa que esse valor corresponde à combinação do material magnético (partículas de óxido de ferro) e do material não magnético (quitosana). Em processos de revestimento das superfícies dos óxidos de ferro com diferentes materiais, Petcharoen e Sirivat (2012) relataram os variados valores de magnetização de saturação de 33,29 emu g⁻¹ e 58,72 emu g⁻¹, através do revestimento com ácido oleico e ácido hexanóico, respectivamente.

Figura 48 – Análise VSM para o suporte e a Lacase immobilizada no suporte.



Fonte: Elaborado pela autora.

Dessa forma, a diminuição da magnetização de saturação observada na lacase immobilizada nos nanocompósitos magnéticos de quitosana encontra sua explicação na presença da quitosana, que apresenta características diamagnéticas. Tal propriedade diamagnética da quitosana tem um impacto adverso na natureza superparamagnética das partículas, levando à observada redução. Esse fenômeno foi recentemente abordado por Maftoon, Taravati e Tohidi (2023). A magnetização reduzida em MNPs revestidas pode ser atribuído também ao efeito de superfície de pequenas partículas (MARTÍNEZ *et al.*, 1998; SHETE *et al.*, 2015), que se refere ao alinhamento desordenado dos spins atômicos da superfície induzido pela coordenação reduzida e troca quebrada entre os spins da superfície (MOHAPATRA *et al.*, 2006; SHETE *et al.*, 2015).

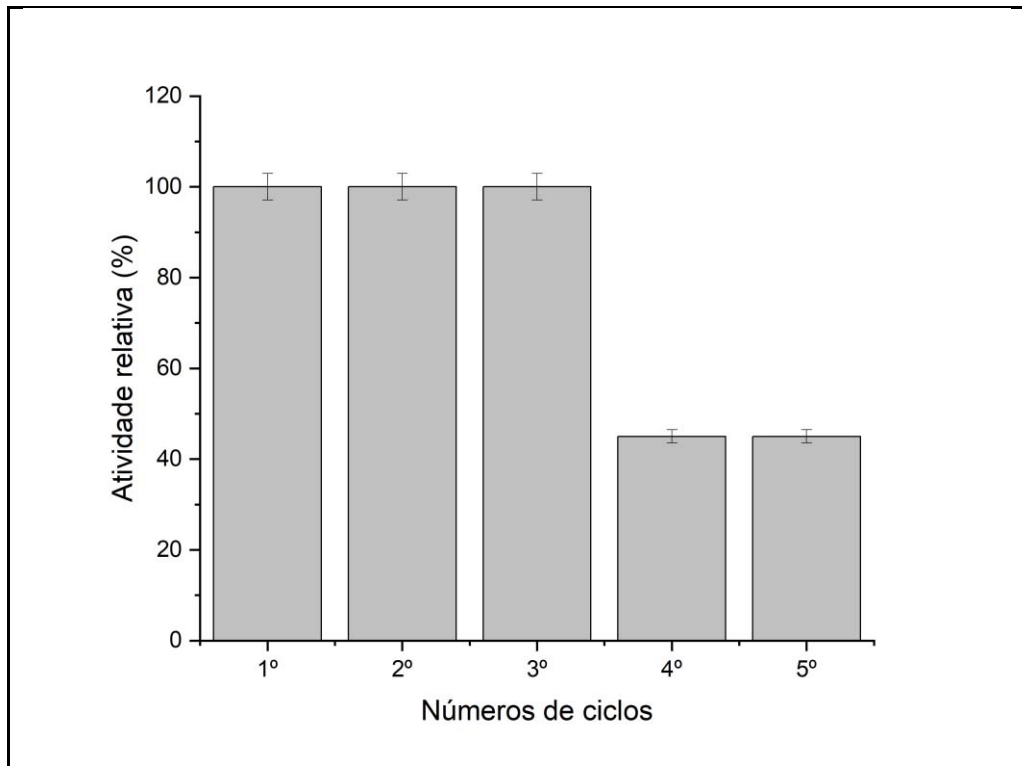
As observações fornecem indícios de que o comportamento magnético dos nanocompósitos pode ser consideravelmente moldado pelo perfil molecular associado à superfície das mesmas, conforme referenciado pelos citados estudos. Corroborando, então, com os resultados de espectroscopia vibracional na região do infravermelho, na qual evidência a presença de material orgânico; e, com a análise termogravimétrica que atribui uma camada de revestimento de 16,14% de material fisisorvido e quimissorvido.

4.5.4.6 Estabilidade de armazenamento e reutilização de Lacase imobilizada

Os nanocompósitos magnéticas fornecem a oportunidade para a recuperação da enzima das reações usando campos magnéticos externos. A reutilização de enzimas imobilizadas é um dos principais fatores para baratear o custo em aplicações práticas, o que foi avaliado aqui por meio da medição da atividade do substrato em cada ciclo de oxidação. Por isso, o potencial de reutilização da lacase de *Aspergillus* sp. imobilizada em MNP@CHI foi avaliado em 5 ciclos sucessivos pela oxidação do guaiacol.

Embora a lacase imobilizada tenha mostrado boa reutilização, visto que foi possível reutilizar o biocatalisador por 3 ciclos, mantendo aproximadamente 100% de sua atividade inicial; sua atividade diminuiu moderadamente nos ciclos seguintes (Figura 49), porém permaneceu em 45,0% após 5 usos repetidos.

Figura 49 – Potencial de reutilização da Lacase imobilizada em ciclos de oxidação do guaiacol.



Fonte: Elaborado pela autora.

A razão por trás dessa redução pode ser atribuída a diversos fatores, como desnaturação da proteína e o desprendimento da enzima de seu suporte (MAFTOON; TARAVATI; TOHIDI, 2023). Jiang *et al.* (2005) imobilizaram a lacase nas microesferas

magnéticas de quitosana e com base nos resultados obtidos, após 10 ciclos consecutivos, a lacase imobilizada foi capaz de reter aproximadamente 80% de sua atividade residual.

Outros autores também estudaram a recuperação e reutilização de enzima imobilizada. Como Asgher, Noreen e Bilal (2012) que relataram a lacase de *Trametes versicolor* IBL-04 imobilizada em microesferas de quitosana ativadas com glutaraldeído, que manteve mais de 60% da sua atividade inicial após 9 ciclos de uso na remoção de corante. Mo e Qiu (2020) relataram que a enzima celulase imobilizada em biocarvão magnético, ativada e revestida de quitosana, manteve em 86,0% de sua atividade inicial, após 10 ciclos repetidos. Aqui, os resultados sugerem que as enzimas imobilizadas podem ser usadas várias vezes, indicando seu potencial em aplicações práticas.

A imobilização de lacase em nanocompósitos de magnetita causou uma melhora na estabilidade da enzima tanto em pH quanto em altas temperaturas. A estabilidade de armazenamento também pode ser outra característica importante a ser melhorada. A estabilidade de armazenamento é um parâmetro importantes para sua aplicação prática, principalmente do ponto de vista econômico. O alto custo das enzimas utilizadas para fins industriais e o tempo necessário para sua imobilização têm levado ao aumento do interesse pela estabilidade de estocagem dessas enzimas. A estabilidade de armazenamento é uma vantagem importante das enzimas imobilizadas sobre as enzimas livres, porque as enzimas livres podem perder rapidamente sua atividade.

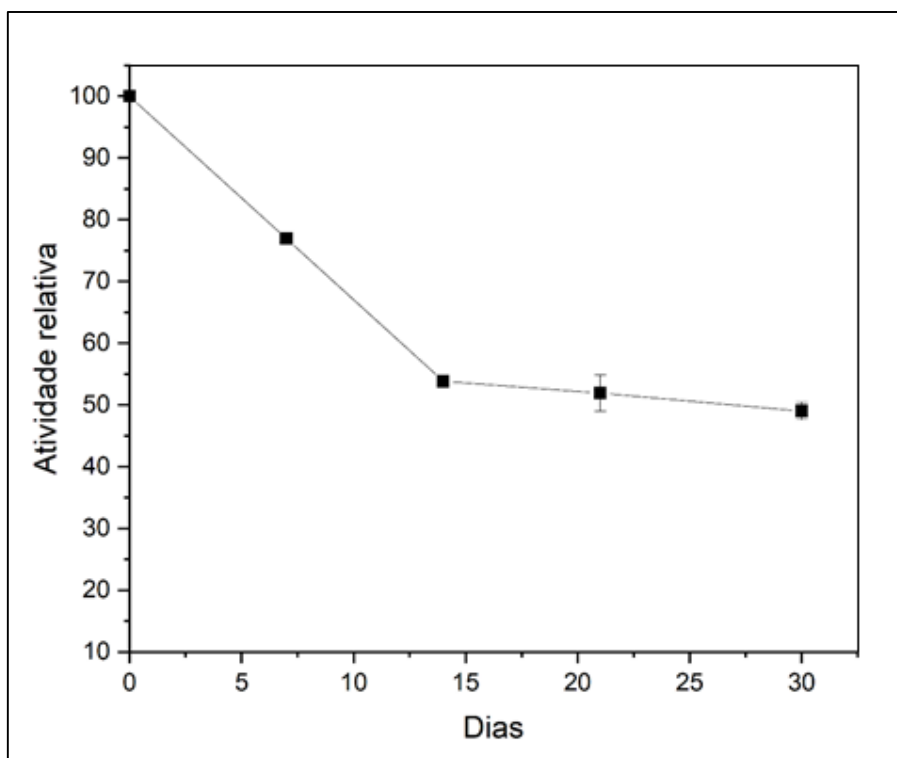
Nesse presente estudo, a lacase imobilizada foi armazenada a 4°C, e as medidas de atividade residual foram determinadas em diferentes intervalos de tempo, por um período de 30 dias. Na qual a atividade inicial foi definida como 100%. Conforme demonstrado na Figura 50, durante a primeira semana de armazenamento, houve uma queda de 28% na atividade. A partir daí a atividade continuou se reduzindo na mesma proporção, e uma perda de aproximadamente 53%, em 14 dias, foi registrada. Posteriormente, a atividade diminuiu mais lentamente nas semanas seguintes, ao tempo restante do armazenamento.

Nessa condição de armazenamento, ao examinar a Figura 50, podemos observar que a lacase imobilizada teve uma diminuição cerca de 50% na atividade residual durante o período de armazenamento de 4 semanas. Essa severa diminuição na atividade relativa da enzima imobilizada pode ser devido à sua autólise suscetível durante o tempo de armazenamento. Efeito que ocorre em maior proporção na enzima livre; pois, à interação entre a enzima e o suporte deve proporcionar uma maior estabilidade conformacional da lacase imobilizada (ATACAN; ÖZACAR, 2015).

Mediante aos dados apresentados, esse resultado equivale aos resultados de Sahin e Ozmen (2020); na qual, a tripsina imobilizada reteve 50% de sua atividade inicial, após 12 dias a 4°C. A literatura também relata que a estabilidade de armazenamento de dois tipos de lacase foi testada, durante o armazenamento a 4°C em tampão de acetato de sódio, no período de 4 semanas (ZHANG *et al.*, 2020). Neste estudo, a atividade da IM-lacase (enzima imobilizada) apresentou 75,2% da atividade inicial após 4 semanas de armazenamento; já, a atividade da lacase livre diminuiu drasticamente, apresentando 40,2% da atividade inicial. Logo, nesse estudo a lacase imobilizada apresentou uma estabilidade de armazenamento melhor do que a lacase livre.

Em virtude dos fatos mencionados, o experimento revelou que a estabilidade de armazenamento da lacase imobilizada foi melhorada, e 4°C foi adequado para seu armazenamento.

Figura 50 – Estabilidade da Lacase imobilizada no suporte modificado em armazenamento durante 30 dias, sob 4°C.



Fonte: Elaborado pela autora.

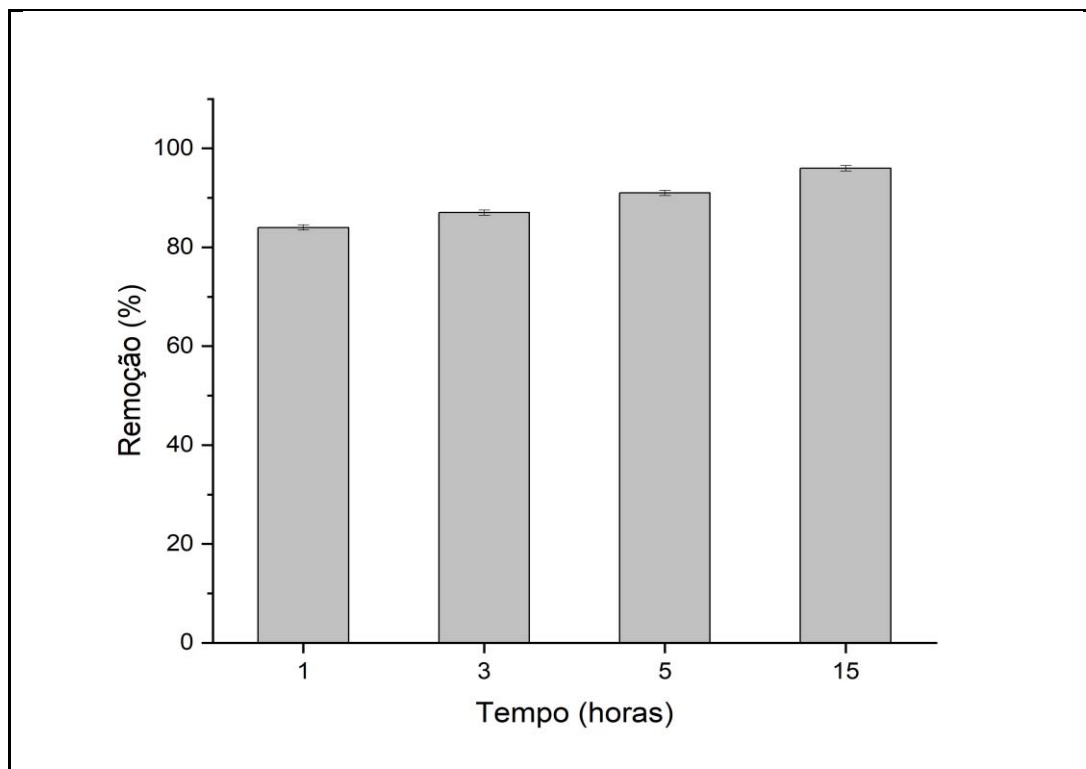
4.5.4.7 Uso de Lacase imobilizada para descoloração de corante

Nesse estudo, o potencial de descoloração da lacase imobilizada em nanocompósitos magnéticas revestidas de quitosana foi demonstrado para o corante RB250. Este composto fenólico, com base na sua estrutura química, pertencem a classe dos corantes azo, que são encontrados na maioria dos efluentes têxteis.

Para avaliar a eficiência da lacase imobilizada como biocatalisador, foi analisada a atividade enzimática da lacase imobilizada em relação à descoloração do corante reativo, por meio de medição de absorvância de UV. As soluções de corante foram submetidas à degradação usando a lacase de *Aspergillus* sp. imobilizada em nanocompósitos magnéticas revestidas de quitosana, em várias durações de tempo e as soluções resultantes foram submetidas à medição de absorvância de UV.

A descoloração nas melhores condições (pH 4, tampão acetato 95 mM e carga enzimática 5 mg g⁻¹), foi seguida pela medição da diminuição da absorvância no comprimento de onda máximo. Os resultados obtidos para a descoloração biocatalítica do corante pela lacase imobilizada são apresentados na Figura 51. Na qual, a taxa de descoloração de aproximadamente 96,24%, após 15h de operação, para o RB250 foi observado; todavia, após 5 horas de tratamento obteve-se 92,88% de remoção.

Figura 51 – Tempo de descoloração do corante RB250 por Lacase imobilizada, concentração do corante 20,5 mg L⁻¹.



Fonte: Elaborado pela autora.

O efeito do tempo de reação na porcentagem de descoloração de RB250 pela lacase imobilizada em nanocompósitos revestidos em quitosana foi determinado em 15 horas. Os resultados revelaram que a descoloração do RB250 foi associada a um aumento no tempo de reação, que atingiu um valor máximo de 96,24% em 15 horas. Durante o estágio inicial da reação (60min), a porcentagem de descoloração aumentou significativamente e tendeu a ser mais estável após 180min, quando atingiu o valor de 89,61% de remoção. A mudança de descoloração é muito pequena entre os pontos de tempo 180min e 300min. Aos 300min., quase 92,88% do RB250 foi descolorido, respondendo por aproximadamente a totalidade de remoção do corante do tratamento efetuado. Pois, daqui em diante a descoloração procedeu muito lentamente e atingiu um valor de 96,24% em 15h. Isso pode ser devido a inibição enzimática por alguns produtos gerados na descoloração do corante azo ou inibição do substrato.

Esse resultado corrobora com o trabalho de outros autores como Lin *et al.* (2017) que imobilizou a lacase de *Trametes versicolor* em nanopartículas magnéticas funcionalizadas com siloxano; no qual, obteve mais de 80% de descoloração do corante *Methyl Red*. Abdulla *et al.* (2000) efetuou o tratamento de corantes antraquinônicos com a lacase de *Trametes hirsuta* imobilizada em pellets de alumina ativadas, e reduziu em 80% a toxicidade dos corantes.

Outrossim, Mehandia, Sharma e Arya (2020) realizaram a imobilização de lacase *Alcaligenes faecalis* XFI em esferas compostos de quitosana-argila (CCB); e, diminuíram em 69% a descoloração de corante azo (RB5), em 24 horas de tratamento. E, foi observado por Asgher, Noreen e Bilal (2012) que a lacase imobilizada foi um descolorante mais eficiente em todos os corantes reativos em comparação com a enzima livre.

Esses resultados mostraram que a lacase de *Aspergillus* sp. imobilizada degradou efetivamente o corante de azo RB250 em 15 horas.

4.6 Conclusão

Em face aos dados apresentados nesse trabalho, conclui-se que a imobilização da enzima lacase de *Aspergillus* sp. foi efetuada nas melhores condições de trabalho, como carga de proteína de 5 mg g⁻¹, pH 4, força iônica de 95 mM e tempo de 6 horas, em temperatura de 25°C. Produzindo, então, um biocatalisador MNP@CHI-GLU-LAC com atividade, nas melhores condições, de 14,40 ± 0,1 U g⁻¹.

A instrumentação utilizada para caracterizar os materiais (DRX, FTIR, TGA, MEV, FRX e VSM) confirmaram a junção da quitosana com magnetita na formação do nanocompósito; pois, o revestimento CHI pode atuar como um agente protetor contra oxidação de magnetita e como local para imobilização de lacase. Como também, ratificou o processo de ativação realizada com glutaraldeído e imobilização da lacase no nanocompósito. Além disso, o perfil de magnetização, tanto do suporte quanto da lacase imobilizada em nanocompósitos magnéticas revestidas com quitosana, revelou notáveis propriedades superparamagnéticas, uma característica que viabilizou a pronta separação dessas partículas durante as reações em questão.

Nos ensaios de armazenamento (a 4°C) e reciclo, o biocatalisador apresentou uma boa atividade mesmo após 30 dias de armazenamento e 5 ciclos de reuso, respectivamente. Além disso, sua atividade aumentou nos pH ácidos, e apresentou boa estabilidade em 60°C. Demonstrando que a imobilização de lacase em nanocompósitos de magnetita causou uma melhora na estabilidade da enzima tanto em pH quanto em altas temperaturas.

O biocatalisador mostrou excelente resultado na biodegradação de corante, pois apresentou uma remoção de 96,24 ± 0,56% do corante RB250. Sendo este um representante da classe dos azos corantes, a classe de corante sintéticos mais usados na indústria têxtil, atualmente.

Diante dos resultados obtidos, o estudo apresentado elenca um biocatalisador com propriedades interessantes, trazendo consigo materiais que se destacam em inúmeras vantagens

como bom desempenho, versatilidade, tecnologia avançada, sustentabilidade, e fácil isolamento magnético com o uso de ímãs externos; permitindo com isso, reutilizar a enzima imobilizada em uma série de ensaios.

4.7 Referências

ABADULLA, E. *et al.* Decolorization and detoxification of textile dyes with a laccase from *Trametes hirsuta*. **Applied and environmental microbiology**, [s. l.], v. 66, n. 8, p. 3357-3362, 2000.

ASGHER, M.; KAMAL, S.; IQBAL, H. M. N. Improvement of catalytic efficiency, thermostability and dye decolorization capability of *Pleurotus ostreatus* IBL-02 laccase by hydrophobic sol gel entrapment. **Chemistry Central Journal**, [s. l.], v. 6, p. 1-10, 2012.

ATACAN, K.; ÖZACAR, M. Characterization and immobilization of trypsin on tannic acid modified Fe₃O₄ nanoparticles. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, [s. l.], v. 128, p. 227-236, 2015.

BEZERRA, F. A. *et al.* Chemoenzymatic synthesis of both enantiomers of propafenone hydrochloride through lipase-catalyzed process. **Molecular Catalysis**, [s. l.], v. 529, p. 112540, 2022.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, [s. l.], v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.

CHAKRABORTY, R.; ROYCHOWDHURY, D. Fish bone derived natural hydroxyapatite-supported copper acid catalyst: Taguchi optimization of semibatch oleic acid esterification. **Chemical Engineering Journal**, [s. l.], v. 215, p. 491-499, 2013.

CIPOLATTI, E. P. *et al.* Nanomaterials for biocatalyst immobilization—state of the art and future trends. **RSC Advances**, [s. l.], v. 6, n. 106, p. 104675-104692, 2016.

DATTA, S.; CHRISTENA, L. R.; RAJARAM, Y. R. S. Enzyme immobilization: an overview on techniques and support materials. **3 Biotech**, [s. l.], v. 3, p. 1-9, 2013.

DURAN, N.; ESPOSITO, E. Potential applications of oxidative enzymes and phenoloxidase-like compounds in wastewater and soil treatment: a review. **Applied catalysis B: Environmental**, [s. l.], v. 28, n. 2, p. 83-99, 2000.

DURANIK, T.; STOPPER, M.; RUZBARSKY, J.: Using VSM method to increase value creation in manual production system. In: KATALINIC, B. (ed.). **Daaam international scientific book**. Vienna: DAAAM International Vienna, 2012. v. 11, p. 565-572. Disponível em: <https://daaam.info/sc-book-2012>. Acesso em: 01 agost. 2023

FREIRE, T. M. *et al.* Fast ultrasound assisted synthesis of chitosan-based magnetite nanocomposites as a modified electrode sensor. **Carbohydrate Polymers**, [s. l.], v. 151, p.

760-769, 2016a.

GOMES, F. M. *et al.* Determinação das propriedades catalíticas em meio aquoso e orgânico da lipase de *Candida rugosa* imobilizada em celulignina quimicamente modificada por carbonildiimidazol. **Quím. Nova**, [s. l.], v. 29, p. 710-718, 2006.

ISBELLE, S. O. **Caracterização magnética de aços por VSM**. 2022. Monografia (Graduação em Engenharia Química) - Departamento de Engenharia Química e de Petróleo, Universidade Federal Fluminense, Niteroi, 2022. Disponível em: <https://app.uff.br/riuff/handle/1/2604>. Acesso em: 01 out. 2023.

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

JIMÉNEZ-GÓMEZ, C. P.; CECILIA, J. A. Chitosan: a natural biopolymer with a wide and varied range of applications. **Molecules**, [s. l.], v. 25, n. 17, p. 3981, 2020.

LIN, J. *et al.* Laccase–methacrylyol functionalized magnetic particles: highly immobilized, reusable, and efficacious for methyl red decolourization. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 102, p. 144-152, 2017.

LONG, J. *et al.* In situ synthesis of new magnetite chitosan/carrageenan nanocomposites by electrostatic interactions for protein delivery applications. **Carbohydrate Polymers**, [s. l.], v. 131, p. 98-107, 2015.

MAFTOON, H.; TARAVATI, A.; TOHIDI, F. Immobilization of laccase on carboxyl-functionalized chitosan-coated magnetic nanoparticles with improved stability and reusability. **Monatshefte für Chemie-Chemical Monthly**, [s. l.], v. 154, n. 2, p. 279-291, 2023.

MARTÍNEZ, B. *et al.* Low Temperature Surface Spin-Glass Transition in γ -Fe₂O₃ Nanoparticles. **Physical Review Letters**, [s. l.], v. 80, n. 1, p. 181-184, 1998.

MEHANDIA, S.; SHARMA, S. C.; ARYA, S. K. Immobilization of laccase on chitosan-clay composite beads to improve its catalytic efficiency to degrade industrial dyes. **Materials Today Communications**, [s. l.], v. 25, p. 101513, 2020.

MELO, A. D. Q *et al.* Synthesis of benzyl acetate catalyzed by lipase immobilized in nontoxic chitosan-polyphosphate beads. **Molecules**, [s. l.], v. 22, n. 12, p. 2165, 2017.

MO, H.; QIU, J. Preparation of chitosan/magnetic porous biochar as support for cellulase immobilization by using glutaraldehyde. **Polymers**, [s. l.], v. 12, n. 11, p. 2672, 2020.

MOHAPATRA, S. *et al.* Synthesis and characterization of ultrafine poly (vinylalcohol phosphate) coated magnetite nanoparticles. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, [s. l.], v. 6, n. 3, p. 823-829, 2006.

MONTEIRO, R. R. C. *et al.* Immobilization of lipase A from *Candida antarctica* onto chitosan-coated magnetic nanoparticles. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 20, n. 16, p. 4018, 2019.

MOREIRA, K. S. *et al.* Taguchi design-assisted co-immobilization of lipase A and B from *Candida antarctica* onto chitosan: Characterization, kinetic resolution application, and docking studies. **Chemical Engineering Research and Design**, [s. l.], v. 177, p. 223-244, 2022.

NETTO, C. G. C. M.; TOMA, H. E.; ANDRADE, L. H. Superparamagnetic nanoparticles as versatile carriers and supporting materials for enzymes. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, [s. l.], v. 85, p. 71-92, 2013.

NICOLÁS, P. *et al.* Preparation of iron oxide nanoparticles stabilized with biomolecules: Experimental and mechanistic issues. **Acta Biomaterialia**, [s. l.], v. 9, n. 1, p. 4754-4762, 2013.

PACHECO, S.; SOARES, C. H. L. Immobilization and characterization of laccase and its use in the biodegradation of paper mill effluent. **Quím. Nova**, [s. l.], v. 37, p. 209-214, 2014.

PETCHAROEN, K.; SIRIVAT, A. Synthesis and characterization of magnetite nanoparticles via the chemical co-precipitation method. **Materials Science and Engineering: B**, [s. l.], v. 177, n. 5, p. 421-427, 2012.

PIEKARSKA, K. *et al.* Chitin and Chitosan as Polymers of the Future-Obtaining, Modification, Life Cycle Assessment and Main Directions of Application. **Polymers**, [s. l.], v. 15, n. 4, p. 793, 2023.

PINTO, G. C. *et al.* Evaluation of the alternating magnetic field (AMF) influence in catalytic activities of enzymes immobilized into magnetic graphene oxide: A new approach. **Materials Today Communications**, [s. l.], v. 36, p. 106441, 2023.

PISCITELLI, A.; PEZZELLA, C.; LETTERA, V. Fungal Laccases: Structure, Function and Application. In: POLIZELI, M. D. L. T. M. (ed.) **Fungal Enzymes**. 1. ed. Boca Raton: CRC Press, 2013. p. 123-161.

POON, L.; WILSON, L. D.; HEADLEY, J. V. Chitosan-glutaraldehyde copolymers and their sorption properties. **Carbohydrate Polymers**, [s. l.], v. 109, p. 92-101, 2014.

RAHMAN, O. U.; MOHAPATRA, S. C.; AHMAD, S. Fe₃O₄ inverse spinal super paramagnetic nanoparticles. **Materials Chemistry and Physics**, [s. l.], v. 132, n. 1, p. 196-202, 2012.

RAMACHANDRAN, KANDETHODY M.; TSOKOS, Chris P. **Mathematical Statistics with Applications**. California: [s. n.], 2009. Disponível em: [http://www.mim.ac.mw/books/Mathematical statistics with applications.pdf](http://www.mim.ac.mw/books/Mathematical%20statistics%20with%20applications.pdf). Acesso em: 28 nov. 2023.

RASHEED, T. *et al.* Environmentally-related contaminants of high concern: potential sources and analytical modalities for detection, quantification, and treatment. **Environment International**, [s. l.], v. 122, p. 52-66, 2019.

RASOULZADEH, H. *et al.* Mechanistic investigation of ciprofloxacin recovery by magnetite-imprinted chitosan nanocomposite: isotherm, kinetic, thermodynamic and

reusability studies. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 133, p. 712-721, 2019.

REKUĆ, Adriana et al. Laccase immobilization on mesostructured cellular foams affords preparations with ultra high activity. **Process Biochemistry**, [s. l.], v. 44, n. 2, p. 191-198, 2009.

RODRIGUES, A. F. S *et al.* A scientometric analysis of research progress and trends in the design of laccase biocatalysts for the decolorization of synthetic dyes. **Process Biochemistry**, [s. l.], v. 126, p. 272-291, 2023.

ROSU, Marcela-Corina *et al.* Azo dyes degradation using TiO₂-Pt/graphene oxide and TiO₂-Pt/reduced graphene oxide photocatalysts under UV and natural sunlight irradiation. **Solid State Sciences**, [s. l.], v. 70, p. 13-20, 2017.

SADEGHI, M.; MOGHIMIFAR, Z.; JAVADIAN, H. Fe₃O₄@ SiO₂ nanocomposite immobilized with cellulase enzyme: Stability determination and biological activity. **Chemical Physics Letters**, [s. l.], v. 811, p. 140161, 2023.

SAHIN, S.; OZMEN, I. Covalent immobilization of trypsin on polyvinyl alcohol-coated magnetic nanoparticles activated with glutaraldehyde. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, [s. l.], v. 184, p. 113195, 2020.

SALAMI, F. *et al.* Covalent immobilization of laccase by one pot three component reaction and its application in the decolorization of textile dyes. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 120, p. 144-151, 2018.

SANTOS, J. C. S *et al.* Immobilization of CALB on activated chitosan: Application to enzymatic synthesis in supercritical and near-critical carbon dioxide. **Biotechnology Reports**, [s. l.], v. 14, p. 16-26, 2017.

SHETE, P. B. *et al.* Water dispersible oleic acid-coated Fe₃O₄ nanoparticles for biomedical applications. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, [s. l.], v. 377, p. 406-410, 2015.

SILVA, J. A. *et al.* Immobilization of *Candida antarctica* lipase B by covalent attachment on chitosan-based hydrogels using different support activation strategies. **Biochemical Engineering Journal**, [s. l.], v. 60, p. 16-24, 2012.

SOUSA, I. G. *et al.* A novel hybrid biocatalyst from immobilized Eversa® Transform 2.0 lipase and its application in biolubricant synthesis. **Biocatalysis and Biotransformation**, [s. l.], p. 1-22, 2022.

SOUZA, M. C. M. *et al.* Production of flavor esters catalyzed by lipase B from *Candida antarctica* immobilized on magnetic nanoparticles. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, [s. l.], v. 34, p. 681-690, 2017.

TAGUCHI, G. Quality engineering (Taguchi methods) for the development of electronic circuit technology. **IEEE Transactions on Reliability**, [s. l.], v. 44, n. 2, p. 225-229, 1995.

VILLENEUVE, P. *et al.* Customizing lipases for biocatalysis: a survey of chemical, physical and molecular biological approaches. **Journal of molecular catalysis B: enzymatic**, [s. l.], v. 9, n. 4-6, p. 113-148, 2000.

XIMENES, I. A. T. *et al.* Magnetic particles for enzyme immobilization: a versatile support for ligand screening. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, [s. l.], v. 204, p. 114286, 2021.

XU, W.; LING, P.; ZHANG, T. Polymeric micelles, a promising drug delivery system to enhance bioavailability of poorly water-soluble drugs. **Journal of drug delivery**, [s. l.], v. 2013, 2013.

YANG, X. *et al.* Improved removal capacity of magnetite for Cr (VI) by electrochemical reduction. **Journal of Hazardous Materials**, [s. l.], v. 374, p. 26-34, 2019.

ZAAK, H. *et al.* Exploiting the versatility of aminated supports activated with glutaraldehyde to immobilize β -galactosidase from *Aspergillus oryzae*. **Catalysts**, [s. l.], v. 7, n. 9, p. 250, 2017.

ZANOTTO, C.; MARQUES, P. T.; CASTRO, E. G. Caracterização estrutural do compósito pani-magnetita com potencial aplicabilidade em sensor eletroquímico. **Quím. Nova**, [s. l.], v. 44, p. 1101-1106, 2021.

ZHANG, C.; ZHU, Z.; ZHANG, H. Mg-based amorphous alloys for decolorization of azo dyes. **Results in Physics**, [s. l.], v. 7, p. 2054-2056, 2017.

ZHANG, K. *et al.* Laccase immobilized on chitosan-coated Fe₃O₄ nanoparticles as reusable biocatalyst for degradation of chlorophenol. **Journal of Molecular Structure**, [s. l.], v. 1220, p. 128769, 2020.

ZHAO, Shi-Yong Y. *et al.* Synthesis of magnetic nanoparticles of Fe₃O₄ and CoFe₂O₄ and their surface modification by surfactant adsorption. **Bulletin of the Korean Chemical Society**, [s. l.], v. 27, n. 2, p. 237-242, 2006.

ZIEGLER-BOROWSKA, M.; CHEŁMINIAK, D.; KACZMAREK, H. Thermal stability of magnetic nanoparticles coated by blends of modified chitosan and poly (quaternary ammonium) salt. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, [s. l.], v. 119, p. 499-506, 2015.

Capítulo 5

Considerações Finais

5.1 Considerações Finais

Levando-se em conta o que foi observado, que a enzima livre teve boa capacidade em descolorir o corante RB19 sem qualquer mediador redox. Esse estudo mostrou claramente que a lacase comercial de *Aspergillus* sp. pode ser usada como um método de tratamento de águas residuais ecologicamente correto, denominado como degradação enzimática. No entanto, com o uso da enzima lacase livre, a estabilidade é perdida em diferentes condições (temperatura, pH ou tempo de armazenamento) e não pode ser reutilizada. Essas razões são desvantagens para o uso de enzima livre. Devido a esses motivos, processos mais econômicos estão sendo desenvolvidos na indústria para aplicações em escala industrial, especialmente na remediação de efluentes aquosos. Dentre esses processos, a enzima pode ser usada repetidamente por imobilização e a enzima imobilizada torna-se vem mais estável, mais resistentes a mudanças do ambiente reacional, incluindo influências de temperatura, pH e solventes orgânicos. Outras importantes vantagens como facilidade de separação do biocatalisador do meio reacional, sem qualquer perda de sua atividade; além da possibilidade de conduzir processos contínuos.

A imobilização de enzimas em materiais bioativos aliados a nanosuportes, fornece uma maneira de melhorar a estabilidade e reutilização, modificar as propriedades catalíticas e, em certos casos, obter maior atividade ou seletividade. Entre os nanomateriais, os suportes magnéticos apresentam vários méritos como: não toxicidade, possuem grande área de superfície e a capacidade de produzir propriedades magnéticas desejadas para que possam ser separados usando ímãs e reutilizados. Por isso, a imobilização em nanomateriais tem se destacado em pesquisas científicas e em diversas áreas, como a ambiental, química, farmacêutica, biotecnológica, alimentícia, dentre outras. Portanto, é possível determinar que biocatalisadores em suportes nanoestruturados representam a possibilidade de um processo ambientalmente amigável e que não dependem de recursos fósseis.

Muitos estudos, objetivando desenvolver tecnologia capaz de minimizar o volume e a toxicidade dos efluentes industriais, têm sido realizados. As lacases imobilizadas foram capazes de realizar a biodegradação do corante. De fato, os resultados da remoção de corantes, anteriormente apresentados, indicam que os métodos utilizados nesse trabalho têm potencial para estudos mais aprofundados na área em questão, pois contribuem para o desenvolvimento de mais estudos nesta área. O trabalho estatístico provou ser eficaz na redução dos custos, com apresentação das melhores condições do processo, aliadas a estudos teóricos, que possibilitam uma melhor obtenção do processo. Os dois estudos sinalizam que o uso de enzimas como catalisadores biológicos deve ser uma ferramenta primordial para o uso industrial, e com potencial aplicação para o uso em larga escala.

Em suma, a aplicação do biocatalisador (MNP@CHI-GLU-LAC) apresentou os resultados esperados, com base nos estudos experimentais realizados, e sua eficácia comprovada superior ao uso da lacase de *Aspergillus* sp. na forma livre.