



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Câmpus de São José do Rio Preto

Alex Henrique Miller

Nanozeólitas como suporte para imobilização de lacases:
aplicação dos biocatalisadores na reação de oxidação mediada do glicerol

São José do Rio Preto

2020

Alex Henrique Miller

Nanozeólitas como suporte para imobilização de lacases:

aplicação dos biocatalisadores na reação de oxidação mediada do glicerol

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Biofísica Molecular, junto ao Programa de Pós-Graduação em Biofísica Molecular, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Financiadoras: FAPESP – Proc. 2016/24303-0 e 2018/21483-3

CNPq – Proc. 141956/2016-0

Orientador: Prof. Dr. José Geraldo Nery

São José do Rio Preto

2020

M647n Miller, Alex Henrique
Nanozeólitas como suporte para imobilização de lacases : aplicação dos biocatalisadores na reação de oxidação mediada do glicerol / Alex Henrique Miller. -- São José do Rio Preto, 2020
187 f. : il., tabs.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto
Orientador: José Geraldo Nery

1. Oxidação. 2. Ressonância paramagnética eletrônica. 3. Lacase. 4. Nanopartículas. 5. Eletroquímica. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

Alex Henrique Miller

Nanozeólitas como suporte para imobilização de lacases:

aplicação dos biocatalisadores na reação de oxidação mediada do glicerol

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Biofísica Molecular, junto ao Programa de Pós-Graduação em Biofísica Molecular, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Financiadoras: FAPESP – Proc. 2016/24303-0 e 2018/21483-3

CNPq – Proc. 141956/2016-0

Comissão Examinadora

Prof. Dr. José Geraldo Nery
UNESP – Câmpus de São José do Rio Preto/SP
Orientador

Prof^a. Dr^a. Eleni Gomes
UNESP – Câmpus de São José do Rio Preto/SP

Prof. Dr. Marcelo de Freitas Lima
UNESP – Câmpus de São José do Rio Preto/SP

Prof. Dr. Antônio José da Costa Filho
USP – Câmpus de Ribeirão Preto/SP

Prof. Dr. Alistair John Fielding
LJMU – City Campus – Liverpool/United Kingdom

São José do Rio Preto

24 de setembro de 2020

Dedico este trabalho a minha mãe **Marlene** (*in memoriam*), a meu pai **Orival**, a minhas irmãs e aos meus sobrinhos e sobrinhas. Vocês sempre deram o amor e suporte que eu precisava para seguir firme nesta jornada.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais por tudo que fizeram por mim a vida toda. Deram-me tudo, mesmo quando não tinham nada. Sou grato pela educação, pelos valores ensinados e, principalmente, por terem plantado a semente da luta em mim e ensinado que as batalhas sempre virão, cabe a mim enfrentá-las.

Às minhas irmãs – Silvia, Solange, Simoni, Suze e Idamarcia – e aos meus sobrinhos, por serem a melhor família que eu poderia ter, e estarem sempre ao meu lado.

À Solange pelos anos de convivência, e por toda ajuda dada desde o início da amizade.

Ao Miza e ao João, por terem feito parte da minha vida acadêmica e pessoal durante estes anos de doutorado, e se tornado grandes amigos, para a vida toda.

Ao Oscar e a Angela, por terem sido sempre grades companheiros, em casa, na faculdade e na vida em geral.

Aos meus grandes amigos Janine, Carolina, Ingrid e Fernando, companheiros desde a Graduação até essa viagem selvagem pela Pós-Graduação. *The last of us will last forever!*

Aos amigos do vôlei Ibilce e vôlei Montanhês, pelas muitas horas de lazer e diversão.

To all the friends that have crossed my pathway in 2019 – during my internship in Liverpool/UK –, specially to Leandro, Tasson, Jake, Dominik, Patryk, Bel and Llew. It was such a year! You have definitely made my stay there memorable, and I am certain that our friendship will be for life.

To all LJMU's and The Manchester University's research fellows and staff – specially to Professor Fyaz, and lab technicians Nicola, Rob and Adam –, for the help provided, for the precious inputs on scientific work, and of course, for the laughs and drinks during PUB's time.

To my advisor abroad, Dr. Alistair J. Fielding. First of all, for accepting a strange in his research group. I am pleased to acknowledge all your work towards my research project. I

guess we've both learnt from each other, but I have certainly learnt more. I am sincerely thankful!

Aos professores e técnicos do Departamento de Física, pelos ensinamentos em disciplinas e apoio técnico geral.

Aos meus companheiros de pesquisa no LACET, pelo companheirismo e por toda a ajuda dada em caráter profissional e não profissional ao decorrer deste Doutorado.

À Profa. Dra. Eleni Gomes e alunos/pesquisadores do laboratório de Bioquímica e Microbiologia Aplicada – especialmente à Dra. Ana Lucia Ferrarezi – pela ajuda e recursos materiais fornecidos nos estudos em colaboração.

Aos Professores Marcelo de Freitas Lima e Maurício Boscolo pelas colaborações e por cederem espaço e tempo em seus respectivos laboratórios para coleta de dados.

Ao meu orientador, Prof. Dr. José Geraldo Nery, por todo o trabalho dedicado ao desenvolvimento dos projetos de pesquisa, desde a Iniciação

Científica até o Doutorado. Agradeço pela colaboração e empenho, no geral, mas principalmente por todas as discussões científicas relevantes, que contribuíram e continuarão contribuindo no meu enriquecimento intelectual e profissional. Sou sinceramente agradecido!

Agradeço ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo fomento aos meses iniciais de desenvolvimento deste projeto, através de concessão de bolsa de doutorado, processo nº 141956/2016-0.

Agradeço à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão da bolsa de pesquisa de doutorado regular no país, sob o processo nº 2016/24303-0, e da bolsa estágio de pesquisa no exterior, sob o processo nº 2018/21483-3.

Once you've accepted your flaws, no one can use them against you.

G.R.R. Martin (2002)¹

RESUMO

A oxidação do glicerol tem sido objeto de diversos estudos no mundo todo; em geral, o principal objetivo destes trabalhos é o encontro de um catalisador apropriado para converter, seletivamente, esta molécula bloco em produtos de alto valor agregado. Lacases imobilizadas em suportes sólidos são catalisadores heterogêneos não prejudiciais ao meio ambiente, que podem ser aplicados para a oxidação do glicerol num sistema lacase-mediador. Estas enzimas contêm átomos de cobre em sua estrutura e catalisam a oxidação de muitos compostos fenólicos com a concomitante redução de água a oxigênio molecular. Apesar da sua especificidade, quando apropriadamente combinada com mediadores, as lacases podem também agir na oxidação de compostos não fenólicos. Este trabalho abordou a síntese e caracterização de zeólitas em nano escala – morfologias FAU, BEA, LTA e MFI –, a aplicação destes materiais como suporte para a imobilização de diferentes lacases comerciais – dos organismos *A. bisporus*, *Aspergillus* sp. e *P. ostreatus* –, e o uso dos complexos obtidos para oxidação do glicerol mediada pelo composto *N*-oxil-2,2,6,6-tetrametilpiperidina (TEMPO). Todas as zeólitas foram sintetizadas de acordo com a literatura, e a forma sódica da zeólita FAU modificadas por troca iônica com Cu^{2+} para geração de um suporte extra. Os materiais sintetizados foram amino-funcionalizados para permitir a imobilização das lacases covalentemente. Os suportes foram caracterizados por XRD, SEM-EDX, HRTEM, FTIR, e as enzimas livres ou complexos espectroscopicamente avaliados através da oxidação do composto 2,2'-azino-bis(ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico) (ABTS). Com base nas atividades de oxidação do composto ABTS, os complexos FAU/ Cu^{2+} /APTMS/GA/LPO, FAU/ Cu^{2+} /APTMS/GA/LAB, FAU/ Cu^{2+} /APTMS/GA/LAsp, e BEAc/APTMS/GA/LAsp foram selecionados para aplicação nas reações de oxidação do glicerol. Para comparação, as enzimas LPO, LAB e LAsp na forma livre e os suportes FAU/ Cu^{2+} /APTMS/GA e BEAc/APTMS/GA foram aplicadas em condições reacionais similares. Todas as reações utilizando os complexos lacase/nanozeólitas apresentaram, após 48 h de reação, baixa conversão do glicerol – inferiores a 5%. No entanto, uma alta seletividade foi observada para gliceraldeído, acima de 88 % em todos os casos. Não houve conversão do glicerol utilizando apenas os suportes sem enzima. Por outro lado, quando as enzimas LPO e LAsp foram aplicadas nas suas formas livres, as conversões do glicerol obtidas foram significativamente superiores em comparação aos complexos – ~29% para a LAsp e mais de 80% para a LPO após 48 h de reação. Seletividades de 57,10% a gliceraldeído e 25,75% a ácido glicérico, foram quantificadas das reações com a enzimas livre LPO, enquanto da reação com LAsp, a seletividade a gliceraldeído foi de 78%, e o segundo produto mais obtido

foi ácido glioxílico, 11,47%. A lacase LAB na forma livre apresentou conversão muito menor quando comparada as demais – ~3,2% após 48 h. Visando compreender quais razões levaram a redução da atividade enzimática após imobilização nos materiais nanozeolíticos, um estudo sistemático utilizando voltametria cíclica foi empregado para a LAsp. Este estudo apontou que o potencial de redução desta enzima é um fator limitante na sua aplicação, e que em meio ácido, a taxa de oxidação do mediador TEMPO é bastante reduzida. Com o uso de ressonância paramagnética eletrônica (EPR), foi possível inferir que a imobilização enzimática causou distorções estruturais na LAsp, em específico, nos centros de cobre do seu sítio catalítico, pois variações significativas nos Hamiltonianos de spin (tensores g , e constantes de acoplamento hiperfino A) foram observadas quando comparadas enzimas em solução ou imobilizadas. Os espectros revelaram também uma alta dependência da acidez do meio na interação dos sítios de cobre com os ligantes de coordenação. Além disso, os Hamiltonianos de spin paralelos do cobre T2 da enzima imobilizada em zeólita BEAc/APTMS/GA ($g_{\parallel} = 2,275$, $A_{\parallel} = 173,4 \times 10^{-4} \text{cm}^{-1}$) são mais próximos da enzima livre em pH 7 ($g_{\parallel} = 2,275$, $A_{\parallel} = 170,1 \times 10^{-4} \text{cm}^{-1}$) do que em pH 4 ($g_{\parallel} = 2,275$, $A_{\parallel} = 220,2 \times 10^{-4} \text{cm}^{-1}$). Isso indica que o pH dos microambientes enzimáticos após imobilização é neutro, e isso é a provável razão pela redução na atividade enzimática após imobilização nos suportes zeolíticos.

Palavras-chave: Glicerol. Lacase. Nanozeólita. Imobilização. Oxidação. Voltametria Cíclica. EPR.

ABSTRACT

*The oxidation of glycerol has been the subject of several studies worldwide; in general, these studies main goal is to find an appropriate catalyst to selectively convert this building-block molecule into value-added products. Laccases immobilized on solid supports are environment-friendly heterogeneous catalysts, which can be applied for the oxidation of glycerol in a laccase-mediated system. These enzymes contain copper atoms in their structure and catalyze the oxidation of many phenolic compounds with the concomitant reduction of water to molecular oxygen. Despite their specificity, when properly combined with mediators, laccases can also act on the oxidation of non-phenolic compounds. This study addressed the synthesis and characterization of nanoscale zeolites – FAU, BEA, LTA and MFI morphologies –, the application of these materials as support for the immobilization of different commercial laccases – from *A. bisporus*, *Aspergillus sp.* and *P. ostreatus* –, and the use of the complexes obtained for 2,2,6,6-tetramethylpiperidine-N-oxyl (TEMPO) mediated glycerol oxidation. All zeolites were synthesized according to the literature, and the sodium form of the FAU zeolite modified by ion exchange with Cu^{2+} to generate an extra support. The synthesized materials were amino-functionalized to allow the laccases to be immobilized covalently. The supports were characterized by XRD, SEM-EDX, HRTEM, FTIR, and the free enzymes or complexes spectroscopically evaluated through the oxidation of the compound 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS). Based on the ABTS oxidation activities, the complexes FAU/ Cu^{2+} /APTMS/GA/LPO, FAU/ Cu^{2+} /APTMS/GA/LAB, FAU/ Cu^{2+} /APTMS/GA/LAsp, and BEAc/APTMS/GA/LAsp were selected to be applied in the glycerol oxidation reactions. For comparison, the enzymes LPO, LAB and LAsp in free form and the supports FAU/ Cu^{2+} /APTMS/GA and BEAc/APTMS/GA were applied under similar reaction conditions. All reactions using the laccases/nanozeolites complexes showed, after 48 h of reaction, low glycerol conversion – less than 5%. However, a high selectivity was observed for glyceraldehyde, above 88% in all cases. There was no conversion of glycerol using only supports without enzyme. On the other hand, when the enzymes LPO and LAsp were applied in their free forms, the glycerol conversions obtained were significantly superior in comparison to the complexes – ~29% for LAsp and more than 80% for LPO, after 48 h of reaction. Selectivities of 57.10% to glyceraldehyde and 25.75% to glyceric acid, were quantified from the reactions with the free LPO enzymes, while from the reaction with free LAsp, the selectivity to glyceraldehyde was 78%, and the second most yielded product was glyoxylic acid, 11.47%. The LAB laccase in the free form showed a much lower conversion when compared to the others*

– ~3.2% after 48 h. In order to understand what reasons led to the reduction of enzyme activity after immobilization on nanozeolitic materials, a systematic study using cyclic voltammetry was employed for LAsp. This study pointed out that the redox potential of this enzyme is a limiting factor in its application, and that in an acid environment, the oxidation rate of the TEMPO mediator is quite low. With the use of electronic paramagnetic resonance (EPR), it was possible to infer that the enzymatic immobilization caused structural distortions in the LAsp, in particular, in the copper centers of its catalytic site, since significant variations in the spin Hamiltonians (tensors \mathbf{g} , and hyperfine coupling constants \mathbf{A}) were observed when enzymes in solution or immobilized were compared. The spectra also revealed a high pH dependence on the interaction of the copper sites with the coordination ligands. In addition, the parallel spin Hamiltonians of copper T2 of the enzyme immobilized in zeolite BEAc/APTMS/GA ($g_{\parallel} = 2.275$, $A_{\parallel} = 173.4 \times 10^{-4} \text{cm}^{-1}$) are closer to the free enzyme at pH 7 ($g_{\parallel} = 2.275$, $A_{\parallel} = 170.1 \times 10^{-4} \text{cm}^{-1}$) than at pH 4 ($g_{\parallel} = 2.275$, $A_{\parallel} = 220.2 \times 10^{-4} \text{cm}^{-1}$). This indicates that the pH of the enzymatic microenvironments after immobilization is neutral, and this is likely to be the reason for the reduction in enzymatic activity after immobilization on the zeolitic supports.

Keywords: Glycerol. Lacase. Nanozeolite. Immobilization. Oxidation. Cyclic Voltammetry. EPR.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Processos de conversão catalítica do glicerol.	31
Figura 2. Possíveis caminhos de reação e produtos formados na reação de oxidação do glicerol.	33
Figura 3. Típicos espectros de absorção (A) e EPR (B) de lacases.....	38
Figura 4. Representação do sítio catalítico e esquema reacional da lacase de <i>Trametes hirsuta</i>	39
Figura 5. Estruturas moleculares de alguns mediadores empregados em sistemas lacase-mediador.	40
Figura 6. Voltamogramas cíclicos em eletrodo disco de carbono vítreo para soluções 10 mM de TEMPO em 50% <i>t</i> -butanol/50% água contendo carbonato de sódio/bicarbonato, pH 9,3. Velocidade de varredura 50 mV/s. Temperatura 293 K.....	42
Figura 7. Voltamograma cíclico de solução 10 mM ABTS. Velocidade de varredura 200 mV/s. Insert apresenta voltamogramas para diferentes velocidades de varredura.....	43
Figura 8. Métodos de imobilização enzimática.....	44
Figura 9. Estrutura de quatro tipos de zeólitas (faujasitas X e Y; ZSM-12; ZSM-5 ou silicalita-1; Theta-1 ou ZSM-22) e seus respectivos sistemas microporosos e dimensões.	48
Figura 10. Funcionalização química de superfície de silicatos por silanização com amino silanos e ativação com agente espaçador glutaraldeído, para posterior imobilização enzimática via ligação covalente.	58
Figura 11. Regressão linear da curva "Área abaixo da curva" vs. "Concentração" para o composto ácido tartrônico, com tempo de retenção $10,07 \pm 0,08$ minutos.	66
Figura 12. Difratogramas de raios X das nanozeólitas como sintetizada (FAU/Na ⁺) e após calcinação (TS-1c, ZSM-5c, LTAc e BEAc).	76
Figura 13. Difratogramas de raios X das nanozeólitas TS-1, ZSM-5, LTA e BEA como	

sintetizadas e após calcinação (TS-1c, ZSM-5c, LTAc e BEAc).	76
Figura 14. FTIR das nanozeólitas como sintetizadas (TS-1, ZSM-5, LTA e BEA) e após calcinação (TS-1c, ZSM-5c, LTAc e BEAc). Setas numeradas indicam as seguintes bandas: 1 – 2990 cm^{-1} , 2 – 2890 cm^{-1} , 3 – 3450 cm^{-1} , 4 – 3650 cm^{-1} , 5 – 1490 cm^{-1} , 6 – 1390 cm^{-1} , 7 – 1170 cm^{-1} e 8 – 960 cm^{-1}	77
Figura 15. Difratomogramas de raios X das amostras FAU/Na e LTAc.	78
Figura 16. Espectros de FTIR da região entre 2100 e 400 cm^{-1} das nanozeólitas FAU/Na ⁺ e LTAc.	79
Figura 17. Difratomogramas de raios X das nanozeólitas TS-1c e ZSM-5c.	80
Figura 18. Espectros de FTIR da região entre 1300 a 400 cm^{-1} das nanozeólitas TS-1c e ZSM-5c.	81
Figura 19. Difratomogramas de raios X da nanozeólita faujasita como sintetizada (FAU/Na ⁺) e após troca iônica com cobre 0,5 M (FAU/Cu ²⁺).	82
Figura 20. FTIR da nanozeólita faujasita antes (FAU/Na ⁺) e após troca iônica com cobre 0,5M (FAU/Cu ²⁺).	83
Figura 21. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) dos materiais nanozeolíticos.	85
Figura 22. MEV da amostra FAU/Cu ²⁺ com aumento de 2000x.	87
Figura 23. Captura de tela da janela de exibição do programa Match!* expondo o padrão de difração da amostra FAU/Cu ²⁺ (linha azul contínua) comparada com um padrão de difração do mineral “antlerite” (linhas verticais pretas e tracejadas).	88
Figura 24. Imagens por MET de campo claro (esquerda) e campo escuro (direita) da amostra FAU/Cu ²⁺	90
Figura 25. Mapeamento por EDXS de duas partículas com morfologias diferentes (1) dos componentes Oxigênio (2), Silício (3), Alumínio (4), Cobre (5) e Enxofre (6) do material FAU/Cu ²⁺	91
Figura 26. Análise de EDXS de regiões das morfologias tipo globular (1- Área 1) e placa (2-	

Área 2).....	92
Figura 27. Imagens de campo claro (1), campo escuro (2), e mapeamento por EDXS dos componentes Oxigênio (3), Silício (4), Alumínio (5), Cobre (6) e Enxofre (7) de aglomerados de partículas com morfologias diferentes do material FAU/Cu ²⁺	93
Figura 28. FTIR da nanozeólita TS-1c antes, e após silanização (TS-1c/APTMS) e funcionalização (TS-1c/APTMS/GA).	94
Figura 29. FTIR da nanozeólita ZSM-5c antes, e após silanização (ZSM-5c/APTMS) e funcionalização (ZSM-5c/APTMS/GA).....	95
Figura 30. FTIR da nanozeólita FAU/Na ⁺ antes, e após silanização (FAU/Na ⁺ /APTMS) e funcionalização (FAU/Na ⁺ /APTMS/GA).	96
Figura 31. FTIR da nanozeólita FAU/Cu ²⁺ antes, e após silanização (FAU/Cu ²⁺ /APTMS) e funcionalização (FAU/Cu ²⁺ /APTMS/GA).....	96
Figura 32. FTIR da nanozeólita LTAc antes, e após silanização (LTAc/APTMS) e funcionalização (LTAc/APTMS/GA).	97
Figura 33. FTIR da nanozeólita TS-1c antes, e após silanização (TS-1c/APTMS) e funcionalização (TS-1c/APTMS/GA).	97
Figura 34. Temperatura ótimas das lacases LPO, LAB e LAsp em solução. <i>A atividade da LPO em 60 °C foi adotada como 100%.</i>	99
Figura 35. Termoestabilidade da lacase de <i>P. ostreatus</i> . A atividade da LPO em 60 °C após 0 minutos foi adotada como 100%.	100
Figura 36. Termoestabilidade da lacase de <i>A. bisporus</i> . A atividade da LAB em 60 °C após 60 minutos foi adotada como 100%.	101
Figura 37. Termoestabilidade da lacase de <i>Aspergillus</i> sp.. A atividade da LAsp em 60 °C após 0 minuto foi adotada como 100%.....	102
Figura 38. pH ótimo para as lacases LPO, LAB e LAsp a 45 °C. <i>A atividade de cada lacase em pH 3 foi adotada como 100%.</i>	103

Figura 39. Estabilidade da lacase LPO para diferentes pHs.....	104
Figura 40. Estabilidade da lacase LAB para diferentes pHs.	105
Figura 41. Estabilidade da lacase LAsp para diferentes pHs.	105
Figura 42. Influência de metais de transição na atividade da lacase LPO a 45 °C. <i>A atividade da LPO na ausência de metais de transição foi adotada como 100%.</i>	107
Figura 43. Influência de metais de transição na atividade da lacase LAB a 45 °C. <i>A atividade da LAB na ausência de metais de transição foi adotada como 100%.</i>	107
Figura 44. Influência de metais de transição na atividade da lacase LAsp a 45 °C. <i>A atividade da LAsp na ausência de metais de transição foi adotada como 100%.</i>	108
Figura 45. Testes de atividade das amostras A, B e C diluídas 400 vezes em tampão fosfato, 100 mM, pH 7. Comprimento de onda = 436 nm. ABTS usado como substrato.....	110
Figura 46. Atividade enzimática da LAsp purificada após incubação em diferentes tampões a 8 °C acompanhada no tempo. Os tampões utilizados foram: a – 100 mM tampão acetato pH 4,5; b – 50 mM tampão acetato pH 4,5; c – 100 mM tampão fosfato pH 7,0; d – 100 mM tampão citrato pH 4,5; e – 100 mM tampão succinato pH 4,5; f – 50 mM tampão succinato pH 4,5. Parte (A) apresenta integralmente as curvas obtidas no experimento, (B) evidencia as primeiras 24 horas e (C) compara as primeiras 24 horas para os tampões com pH 4,5.....	112
Figura 47. ATR-FTIR das lacases LAB (sólido) e LAsp (solução). Bandas assinaladas correspondentes aos números de onda 2982 cm ⁻¹ (1), 2885 cm ⁻¹ (2), 1548 cm ⁻¹ (3), 1470 cm ⁻¹ (4), 1255 cm ⁻¹ (5), 1142 cm ⁻¹ (6) e 960 cm ⁻¹ (7).....	117
Figura 48. ATR-FTIR do material FAU/Na ⁺ /APTMS/GA antes e após a imobilização das lacases LPO, LAB e LAsp. Bandas assinaladas correspondentes aos números de onda 3400 cm ⁻¹ (1), 2982 cm ⁻¹ (2), 2885 cm ⁻¹ (3), 1640 cm ⁻¹ (4), 1311 cm ⁻¹ (5) e 1215 cm ⁻¹ (6).....	117
Figura 49. ATR-FTIR do material TS-1c/APTMS/GA antes e após a imobilização das lacases LPO, LAB e LAsp. Bandas assinaladas correspondentes aos números de onda 3400 cm ⁻¹ (1), 2982 cm ⁻¹ (2), 2885 cm ⁻¹ (3) e 1730 cm ⁻¹ (4).	118
Figura 50. ATR-FTIR do material ZSM-5c/APTMS/GA antes e após a imobilização das lacases	

LPO, LAB e LAsp. Bandas assinaladas correspondentes aos números de onda 3400 cm^{-1} (1), 2982 cm^{-1} (2), 2885 cm^{-1} (3), 1730 cm^{-1} (4) e 1380 cm^{-1} (5)..... 118

Figura 51. ATR-FTIR do material FAU/ Cu^{2+} /APTMS/GA antes e após a imobilização das lacases LPO, LAB e LAsp. Bandas assinaladas correspondentes aos números de onda 3400 cm^{-1} (1), 2982 cm^{-1} (2), 1640 cm^{-1} (3) e 1380 cm^{-1} (4). 119

Figura 52. ATR-FTIR do material LTAc/APTMS/GA antes e após a imobilização da lacase LAsp. Bandas assinaladas correspondentes aos números de onda 2982 cm^{-1} (1), 2885 cm^{-1} (2), 1380 cm^{-1} (3), 1255 cm^{-1} (4) e 1147 cm^{-1} (5). 119

Figura 53. ATR-FTIR do material BEAc/APTMS/GA antes e após a imobilização das lacases LPO, LAB e LAsp. Bandas assinaladas correspondentes aos números de onda 2982 cm^{-1} (1), 2885 cm^{-1} (2), região entre 1580 e 1150 cm^{-1} (3) e 960 cm^{-1} (4). 120

Figura 54. Efeito da temperatura e do pH na atividade catalítica do complexo FAU/ Cu^{2+} /APTMS/GA/LPO. *A atividade do complexo em 30 °C e pH 3 foi adotada como 100%.* 121

Figura 55. Efeito da temperatura e do pH na atividade catalítica do complexo FAU/ Cu^{2+} /APTMS/GA/LAB. *A atividade do complexo em 30° e pH 3 foi adotada como 100%.* 122

Figura 56. Efeito da temperatura e do pH na atividade catalítica do complexo FAU/ Cu^{2+} /APTMS/GA/LAsp. *A atividade do complexo em 30° e pH 3 foi adotada como 100%.* 123

Figura 57. Estabilidade do complexo FAU/ Cu^{2+} /APTMS/GA/LPO, pH 3, temperaturas 30 e 45 °C..... 124

Figura 58. Estabilidade do complexo FAU/ Cu^{2+} /APTMS/GA/LAB, pH 3, temperaturas 30 e 45 °C..... 124

Figura 59. Estabilidade do complexo FAU/ Cu^{2+} /APTMS/GA/LAsp, pH 3, temperaturas 30 e 45 °C..... 125

Figura 60. Acompanhamento temporal da concentração dos produtos ácido glicólico, ácido glicérico e gliceraldeído das reações de oxidação do glicerol catalisadas pelas enzimas LAsp e

LPO na forma livre mediadas por TEMPO. 130

Figura 61. CV de soluções 0,1 mM TEMPO (esquerda) e ABTS (direita) utilizando eletrodo GCE. Eletrólito suporte: tampão acetato, 100 mM, pH 5. Velocidade de varredura: 10 mV/s. Atmosfera ambiente. Protocolo 9. 135

Figura 62. CV de 0,5 mM ABTS em eletrodo GCE original e após modificação com lacase (GCE/LAsp). Eletrólito suporte: tampão acetato 100 mM, pH 5. Velocidade de varredura: 5 mV/s. Atmosfera ambiente. Protocolo 10. 136

Figura 63: CV de 0,5 mM TEMPO em eletrodo GCE original e após modificação com lacase (GCE/LAsp). Eletrólito suporte: tampão acetato 100 mM, pH 5. Velocidade de varredura: 5 mV/s. Atmosfera ambiente. Protocolo 10. 137

Figura 64. Voltamogramas cíclicos de 10 mM TEMPO no eletrodo GCE. Eletrólitos suporte: tampão acetato 100 mM, pH 4,5; tampão fosfato 100 mM, pH 7; tampão carbonato de sódio/bicarbonato 100 mM, pH 9;7. Velocidade de varredura: 50 mV/s. Atmosfera de nitrogênio. Protocolo 11. 138

Figura 65. CV de soluções 10 mM de TEMPO no eletrodo GCE original no eletrólito suporte apenas (a), logo após a adição de 100 µL de solução de glicerol 1 M glicerol (b), após 15 minutos (c) e por fim, após 30 minutos (d). Eletrólitos suportes: tampão acetato 100 mM, pH 4,5; tampão fosfato 100 mM, pH 7; e tampão carbonato/bicarbonato 100 mM, pH 9,7. Velocidade de varredura: 50 mV/s. Atmosferas ambiente ou nitrogênio. Protocolo 11. 139

Figura 66. CV de soluções 10 mM de TEMPO no eletrodo GCE original no eletrólito suporte apenas (a), logo após a adição de 20 µL de solução enzimática (LAsp) 60 mg/mL (b), e após 15 minutos (c). Logo após a varredura anterior, 100 µL de solução 1 M de glicerol foram adicionados à célula e varredura realizada imediatamente (d), após 15 minutos (e) and finalmente, após 30 minutos (f). Os passos **a, b, c, d, e e f** (esquerda) foram repetidos na ausência de TEMPO como controle, curvas 1, 2, 3, 4, 5 e 6 (direita), respectivamente. Eletrólitos suportes: tampão acetato 100 mM, pH 4,5; tampão fosfato 100 mM, pH 7; e tampão carbonato/bicarbonato 100 mM, pH 9,7. Velocidade de varredura: 50 mV/s. Atmosfera de nitrogênio. Protocolo 11. 141

Figura 67. CV de soluções 10 mM de TEMPO no eletrodo GCE original no eletrólito suporte apenas (a), logo após a adição de 20 µL de solução enzimática (LAsp) 60 mg/mL (b), e após 15

minutos (c). Logo após a varredura anterior, 100 μ L de solução 1 M de glicerol foram adicionados à célula e varredura realizada imediatamente (d), após 15 minutos (e) and finalmente, após 30 minutos (f). Os passos **a**, **b**, **c**, **d**, **e** e **f** (esquerda) foram repetidos na ausência de TEMPO como controle, curvas 1, 2, 3, 4, 5 e 6 (direita), respectivamente. Eletrólitos suportes: tampão acetato 100 mM, pH 4,5; tampão fosfato 100 mM, pH 7; e tampão carbonato/bicarbonato 100 mM, pH 9,7. Velocidade de varredura: 50 mV/s. Atmosfera ambiente. Protocolo 11. 142

Figura 68. CV no eletrodo GCE das soluções: A) eletrólito suporte apenas (1), logo após a adição de 100 μ L de solução de glicerol 1 M na célula (2), após 15 minutos (3) e finalmente, após 30 minutos (4) // B) 0,1 mM TEMPO no tempo zero (5), e após 15 minutos (6). Logo após a adição de 100 μ L de solução de glicerol 1 M na célula (7), após 15 minutos (8) e finalmente, após 30 minutos (9) // C) eletrólito suporte apenas (10), logo após a adição de 20 μ L de solução enzimática (LAsp) 60 mg/mL no tempo zero (11), e após 15 minutos (12). Por fim, 100 μ L de solução de glicerol 1 M foram adicionados à célula e varredura realizada imediatamente (13), após 15 minutos (14) and finalmente, após 30 minutos (15) // D) 0,1 mM TEMPO (16), logo após a adição de 20 μ L de solução enzimática (LAsp) 60 mg/mL no tempo zero (17), e após 15 minutos (18). Em sequência, 100 μ L 100 μ L de solução de glicerol 1 M foram adicionados à célula e varredura realizada imediatamente (19), repetida após 15 minutos (20) and finalmente, após 30 minutos (21). Eletrólito suporte: tampão acetato 100 mM pH 4,5. Velocidade de varredura: 50 mV/s. Atmosfera ambiente. Protocolo 11. 144

Figura 69. CV no eletrodo GCE das soluções: A) eletrólito suporte apenas (1), logo após a adição de 100 μ L de solução de glicerol 1 M na célula (2), após 15 minutos (3) e finalmente, após 30 minutos (4) // B) 0,1 mM TEMPO no tempo zero (5), e após 15 minutos (6). Logo após a adição de 100 μ L de solução de glicerol 1 M na célula (7), após 15 minutos (8) e finalmente, após 30 minutos (9) // C) eletrólito suporte apenas (10), logo após a adição de 20 μ L de solução enzimática (LAsp) 60 mg/mL no tempo zero (11), e após 15 minutos (12). Por fim, 100 μ L de solução de glicerol 1 M foram adicionados à célula e varredura realizada imediatamente (13), após 15 minutos (14) and finalmente, após 30 minutos (15) // D) 0,1 mM TEMPO (16), logo após a adição de 20 μ L de solução enzimática (LAsp) 60 mg/mL no tempo zero (17), e após 15 minutos (18). Em sequência, 100 μ L 100 μ L de solução de glicerol 1 M foram adicionados à célula e varredura realizada imediatamente (19), repetida após 15 minutos (20) and finalmente, após 30 minutos (21). Eletrólito suporte: tampão acetato 100 mM pH 4,5. Velocidade de varredura: 50 mV/s. Atmosfera ambiente. Protocolo 11. 145

Figura 70. CV de 50 μ M catecol em tampão fosfato, 100 mM, pH 5, no eletrodo GCE antes ou após modificação: A) não modificado GCE background (a1) e analito (a2); GCE/LAsp background (a3) e analito (a4). B) GCE/NF background (b1) e analito (b2); GCE/LAsp/NF background (b3) e analito (b4). C) GCE/BEAc/APTMS/GA/NF background (c1) e analito (c2); GCE/BEAc/APTMS/GA/LAsp/NF background (c3) e analito (c4). D) GCE/GO/NF background (d1) e analito (d2); GCE/GO/LAsp/NF background (d3) e analito (d4). E) GCE/FAU/Cu²⁺/APTMS/GA/NF background (e1) e analito (e2); GCE/FAU/Cu²⁺/APTMS/GA/LAsp/NF background (e3) e analito (e4). F) GCE/GNP/NF background (f1) e analito (f2); GCE/GNP/LAsp/NF background (f3) e analito (f4). G) GCE/BEAc/APTMS/GA/GO/NF background (g1) e analito (g2); GCE/BEAc/APTMS/GA/LAsp/GO/NF background (g3) e analito (g4). H) GCE/BEAc/APTMS/GA/GNP/NF background (h1) e analito (h2); GCE/BEAc/APTMS/GA/GNP/LAsp/NF background (h3) e analito (h4). I) GCE/FAU/Cu²⁺/APTMS/GA/GO/NF background (i1) e analito (i2); GCE/FAU/Cu²⁺/APTMS/GA/GO/LAsp/NF background (i3) e analito (i4). J) GCE/FAU/Cu²⁺/APTMS/GA/GNP/NF background (j1) e analito (j2); GCE/FAU/Cu²⁺/APTMS/GA/GNP/LAsp/NF background (j3) e analito (j4). Velocidade de varredura: 100 mV/s. Atmosfera de nitrogênio. Background trata da varredura na ausência de analito, eletrólito suporte apenas. Protocolo 12. 147

Figura 71. CV de 50 μ M catecol em tampão fosfato, 100 mM, pH 5, no eletrodo CGE antes e após modificação com BEA/APTMS/GA, GO e LAsp. Velocidade de varredura: 100 mV/s. Atmosfera de nitrogênio. Protocolo 12. 149

Figura 72. CV de tampão fosfato, 100 mM, pH 5, utilizando os eletrodos GCE/BEAc/APTMS/GA/GO/NF (A e C) 1^a varredura (a), 7^a varredura (b) e 2^a a 6^a varreduras (e); GCE/BEA/APTMS/GA/GO/LAsp/NF electrode (B e D) 1^a varredura (c), 7^a varredura (d) e 2^a a 6^a varreduras (f). (E) compara as curvas b e d. (F) mostra a subtração de da curva b da curva d. O insert em (F) evidencia os picos de corrente (p1 e p2), cuja forma é similar à de um “pato”, comum em voltametria cíclica. Velocidade de varredura: 100 mV/s. Atmosfera ambiente. Protocolo 12. 152

Figura 73. CV (esquerda) de solução 0,1 mM ABTS em tampão acetato 100 mM, pH 5, no eletrodo GCE para diferentes velocidades de varredura: a – 10 mV/s, b – 20 mV/s, c – 40 mV/s, d – 80 mV/s, e – 120 mV/s, f – 160 mV/s e g – 200 mV/s. No lado direito são mostrados as

intensidades de corrente dos picos I, II, III e IV versus a raiz quadrada da velocidade de varredura v. Fit linear em cinza. Protocolo 9.....	153
Figura 74. CV de soluções 0,1 mM TEMPO e derivados TEMPO em tampão acetato, 100 mM, pH 5, no eletrodo GCE. Velocidade de varredura: 10 mV/s. Atmosfera ambiente. Protocolo 9.	155
Figura 75. CV de soluções 0,1 mM TEMPO (A), 4-oxo-TEMPO (B), 4-hidroxi-TEMPO (C) e 4-amino-TEMPO em tampão acetato, 100 mM, pH 5, no eletrodo GCE electrode. Velocidades de varredura: a – 10 mV/s, b – 20 mV/s, c – 40 mV/s, d – 80 mV/s, e – 120 mV/s, f – 160 mV/s e g – 200 mV/s. Atmosfera ambiente. Protocolo 9.....	155
Figura 76. Espectros de EPR na banda X das nanozeólitas (linhas pontilhadas) e complexos nanozeólitas/LAsp (linhas contínuas). Aproximadamente 100 mg de material sólido foram transferidas para os tubos de EPR, e conteúdo congelado em nitrogênio líquido antes de ser transferido para a cavidade de amostra do espectrômetro.....	157
Figura 77. Espectros de EPR na banda X das nanozeólitas LTAc/APTMS/GA e BEAc/APTMS/GA para intervalo largo de 100 a 400 mT.	158
Figura 78. Espectros de EPR na banda X de lacase purificada – pH7 e 4,5 – e não purificada – pH 7 – (parte superior). 100 µL de solução 200 µM lacase em tampão citrato, 50 mM, pH 4,5, ou fosfato, 50 mM, pH 7, foram transferidos para os tubos de EPR, e os conteúdos congelados em nitrogênio líquido antes de serem transferidos para a cavidade de amostras do espectrômetro. Na parte inferior estão comparados os espectros da lacase purificada pH 7 com os diferentes complexos lacase/nanozeólitas na região espectral dos cobres T1 e T2: FAU/Na ⁺ /APTMS/GA/LAsp, TS1c/APTMS/GA/LAsp, ZSM-5c/APTMS/GA/LAsp, LTAc/APTMS/GA/LAsp e BEAc/APTMS/GA/LAsp. Espectros completos foram apresentados na Figura 76	159
Figura 79. Espectros de EPR na banda X experimentais (linhas pretas) da LAsp purificada pH 7 (A) e pH 4,5 (B), não purificada (C), e dos complexos BEAc/APTMS/GA/LAsp (D) e FAU/Na ⁺ /APTMS/GA/LAsp (E), comparados com os espectros teóricos obtidos das simulações no software Easyspin (linhas azuis).....	161
Figura 80. Contribuições isoladas da simulações dos sítios T1 e T2/ ¹⁴ N para geração do espectro combinado T1+T2/ ¹⁴ N para a LAsp purificada em pH7 e 4,5.	163

Figura 81. Sequência de resíduos de aminoácidos da lacase de <i>M. thermophila</i> extraída da patente WO2016007309A1.	164
Figura 82. Centro ativo da lacase de <i>M. thermophila</i> apresentando os sítios mononuclear de cobre T1 e trinuclear de cobres T2/T3 com os respectivos resíduos de coordenação equatorial. Figura gerada no software Pymol utilizando a sequência disponibilizada no PDB: 6F5K. ¹⁷⁶	165
Figura 83. Diagrama de Peisach-Blumberg, ¹⁷⁷ para um complexo quadrado-planar de Cu (II). Os domínios ($g//$, $A//$) estão definidos para diferentes coordenações equatoriais e diversas cargas do complexo. As linhas rosas são e os pontos A e B são aproximações dos cruzamentos dos valores determinados neste estudo para a LAsp/MtL.....	166
Esquema 1. Mecanismo proposto para oxidação de um substrato por TEMPO num sistema lacase-mediado.	41
Esquema 2. As formas oxidadas do ABTS.....	42
Quadro 1. Três passos de modificação do eletrodo GCE.....	73

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Concentração das soluções estoque das lacases LPO e LAB, e da solução comercial da LAsp e respectivas atividades específicas.	61
Tabela 2. Análises de EDS das nanozeólitas sintetizadas.	86
Tabela 3. Concentração estimada de amostras enzimáticas.	109
Tabela 4. Percentual de imobilização, atividade remanescente e atividade catalítica dos complexos nanozeólitas/lacases formados após a imobilização das lacases LPO, LAB e LAsp nos diferentes suportes sintetizados.	115
Tabela 5. Tempos de retenção e parâmetros de regressão linear das curvas padrão de diferentes possíveis produtos da reação de oxidação do glicerol por análises de HPLC.	127
Tabela 6. Catalisadores e temperaturas das reações de oxidação do glicerol.	128
Tabela 7. Conversão (%) e seletividade (%) da reação de oxidação do glicerol laccase/TEMPO-mediada por laccases livres ou imobilizadas.	129
Tabela 8. Comparação das condições experimentais e produção das reações de oxidação do glicerol laccase/TEMPO mediada relatadas na literatura com o presente trabalho.	133
Tabela 9. Comparação numérica entre GCE modificado e não modificado.	150
Tabela 10. Valores de g e da constante de acoplamento hiperfino A para os centros de cobre T1 e T2 dos espectros simulados.	162
Tabela 11. Potencial redox (E^0_{T1}), resíduo da posição axial do cobre T1, e parâmetros paramagnéticos dos cobres T1 e T2 de diversas lacases descritas na literatura.	168

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1. Concentração de proteína imobilizada.....	61
Equação 2. Atividade enzimática de lacases em solução ou imobilizadas.....	62

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABTS	2,2'-azino-bis(ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico)
APTMS	(3-aminopropil)trimetoxisilano
ATR-FTIR	Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier com reflexão total atenuada
BEA	Zeólita beta.
CLEAs	Agregados de enzima por ligação cruzada do Inglês “ <i>Cross-linked enzyme aggregates</i> ”
CV	Voltamograma Cíclico e Voltametria Cíclica do Inglês “ <i>Cyclic Voltammogram</i> ”
DCM	Diclorometano
DRX	Difração de Raios-X
EPR	Ressonância Paramagnética Eletrônica
FAU	zeólita Faujasita tipo X
FTIR	Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier
GA	Glutaraldeído
GNP	Nanoplatelets de grafeno
GO	Óxido de grafeno
LAB	Lacase de <i>Agaricus bisporus</i>
LAsp	Lacase de <i>Aspergillus</i> sp.
LPO	Lacase de <i>Pleurotus ostreatus</i>
LTA	Zeólita denominada “linde type A”
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MET	Microscopia Eletrônica de Transmissão
MFI	Morfologia das zeólitas TS-1 e ZSM-5
NF	Polímero Nafion
PDB	Protein Data Bank
TEMPO	<i>N</i> -oxil-2,2,6,6-tetrametilpiperidina
TS-1	Zeólita Titânio Silicato-1
U	Unidade de atividade enzimática
ZSM-5	Zeólita denominada “Zeolite Socony Mobil-5”

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	27
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	30
2.1	Biodiesel e a geração de glicerol	30
2.2	Química do glicerol	30
2.3	Oxidação do Glicerol	32
2.3.1	Oxidação do glicerol via catálise heterogênea	33
2.3.2	Oxidação do glicerol via catálise homogênea	34
2.3.3	Oxidação do glicerol via biocatálise	35
2.4	Lacases	36
2.4.1	UV-Vis e EPR dos cobres T1, T2 e T3 de lacases	37
2.4.2	Mecanismo geral de reação de lacases	38
2.4.3	Sistemas lacase-mediador	39
2.4.4	Eletroquímica dos mediadores TEMPO e ABTS	41
2.5	Imobilização de enzimas	43
2.5.1	Imobilização de enzimas lacases	45
2.6	Zeólitas, nanozeólitas e sínteses de materiais zeolíticos	47
2.6.1	Imobilização de enzimas em materiais zeolíticos	49
3	OBJETIVOS	52
3.1	Objetivos gerais	52
3.2	Objetivos específicos	52
4	MATERIAIS E MÉTODOS	54
4.1	Sínteses das nanozeólitas	54
4.1.1	Síntese da Nanozeólita Faujasita tipo X	54
4.1.2	Síntese da Nanozeólita Titanosilicalita 1	55
4.1.3	Síntese da Nanozeólita ZSM-5	55
4.1.4	Síntese da Nanozeólita LTA	56
4.1.5	Síntese da Nanozeólita Beta	56
4.1.6	Troca Iônica da Nanozeólita FAU/Na ⁺ com Cu ²⁺	57
4.2	Funcionalização química da superfície das nanozeólitas sintetizadas	57
4.2.1	Primeira etapa: Silanização das nanozeólitas sintetizadas	58
4.2.2	Segunda etapa: Funcionalização com glutaraldeído dos materiais silanizados	58

4.3	Caracterização dos materiais zeolíticos sintetizados	59
4.4	Imobilização de enzimas sobre as nanozeólitas	60
4.5	Medida da Atividade Enzimática por espectroscopia	61
4.5.1	Protocolo 1 – verificação da atividade enzimática das soluções estoque e das soluções antes ou após imobilização	62
4.5.2	Protocolo 2 – verificação da atividade enzimática variando-se a temperatura	63
4.5.3	Protocolo 3 – verificação da atividade enzimática variando-se o tempo de incubação	63
4.5.4	Protocolo 4 – verificação da atividade enzimática variando-se o pH	63
4.5.5	Protocolo 5 – verificação da atividade enzimática na presença de metais de transição	63
4.5.6	Protocolo 6 – verificação da atividade enzimática dos complexos enzima/nanozeólita	64
4.5.7	Protocolo 7 – verificação da estabilidade enzimática variando-se o pH	64
4.5.8	Protocolo 8 – verificação da estabilidade dos complexos enzima/nanozeólita nas condições ótimas determinadas	64
4.6	Oxidação do glicerol	65
4.7	Análise dos produtos das reações de oxidação do glicerol por Cromatografia Líquida de Alta Performance (HPLC)	65
4.8	Concentração, troca de tampão e estudos da estabilidade da lacase comercial de <i>Aspergillus sp.</i> (LAsp)	67
4.8.1	Protocolo de filtragem e medida de atividade dos filtrados	67
4.8.2	Verificação da estabilidade da enzima LAsp em diferentes tampões acompanhada no tempo	68
4.9	Avaliação da lacase LAsp por técnicas eletroquímicas	69
4.9.1	Protocolo 9 – voltametria cíclica de TEMPO e ABTS	69
4.9.2	Protocolo 10 – deposição de lacase (LAsp) na superfície do eletrodo GCE	70
4.9.3	Protocolo 11 – acompanhamento eletroquímico da oxidação do glicerol lacase/TEMPO-mediada	70
4.9.4	Protocolo 12 – modificação do eletrodo de carbono vítreo utilizando nano compostos de zeólitas e grafeno	71
4.10	Avaliação da lacase LAsp e complexos nanozeólita por Ressonância Paramagnética Eletrônica – EPR	73
5	RESULTADOS E DISCUSSÕES	75
5.1	Síntese e Caracterização dos Materiais Zeolíticos	75
5.1.1	Análises por DRX e FTIR das nanozeólitas sintetizadas	75
5.1.2	MEV e EDS das Nanozeólitas sintetizadas	83

5.1.3	MET e EDS do material FAU/Cu ²⁺	87
5.2	Silanização e funcionalização química dos materiais zeolíticos sintetizados	93
5.3	Estudo do comportamento das lacases LPO, LAB e LAsp na forma livre quando variadas as condições reacionais	98
5.3.1	Temperatura ótima das lacases LPO, LAB e LAsp	98
5.3.2	Termoestabilidade das lacases LPO, LAB e LAsp	99
5.3.3	pH ótimo das lacases LPO, LAB e LAsp	102
5.3.4	Estabilidade das lacases LPO, LAB e LAsp sob diferentes pHs	104
5.3.5	Efeito de metais de transição em solução na atividade catalítica das lacases estudadas	106
5.3.6	Concentração, troca de tampão e estudos da estabilidade da lacase comercial de <i>Aspergillus</i> sp. (LAsp)	109
5.4	Imobilização enzimática nos suportes nanozeolíticos e estudos dos complexos formados	113
5.4.1	Imobilização das lacases LPO, LAB e LAsp nos diferentes suportes nanozeolíticos sintetizados	113
5.4.2	Caracterização por ATR-FTIR dos complexos nanozeólitas/lacases	116
5.4.3	Estudo das condições ótimas de ação dos complexos formados pela imobilização das lacases LPO, LAB e LAsp no suporte FAU/Cu ²⁺ /APTMS/GA	120
5.5	Reações de oxidação do glicerol	125
5.5.1	Curvas padrão para quantificação dos produtos de oxidação do glicerol por HPLC	125
5.5.2	Reações de Oxidação do Glicerol utilizando os catalisadores selecionados	127
5.6	Estudos eletroquímicos	134
5.6.1	Investigação eletroquímica utilizando o eletrodo GCE original aplicado a TEMPO, ABTS, lacase e glicerol	134
5.6.2	Modificação da superfície de trabalho do eletrodo GCE utilizando nano compostos de zeólitas e grafeno	145
5.6.3	Estudos eletroquímicos de ABTS, TEMPO, e derivados de TEMPO	153
5.7	Análises de EPR na banda X da lacase LAsp livre em solução ou imobilizada em nanozeólitas	156
6	CONCLUSÕES	170
7	RECOMENDAÇÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	172
	REFERÊNCIAS	173

1 INTRODUÇÃO

Nas últimas duas décadas, foi crescente a produção de biodiesel, uma fonte alternativa e renovável de combustível. A busca por combustíveis renováveis foi e ainda é motivada pela preocupação mundial com o meio ambiente. No entanto, o aumento na produção de biodiesel levou ao aumento na produção de glicerol – coproduto principal da produção de biodiesel – e concomitante ao excesso deste produto no mercado, o que, por consequência, leva a sua desvalorização. O glicerol, é conhecidamente utilizado como solvente renovável em muitos processos químicos. No entanto, o glicerol bruto obtido das reações de transesterificação demanda altos custos com purificação para que possa ser utilizado no meio industrial, o que reduz sua apreciação e ao mesmo tempo, desvaloriza a produção do biodiesel, importante para a sustentabilidade no nosso planeta.

Alternativamente, o glicerol tem sido utilizado como um bloco de construção versátil. A síntese de produtos com valor agregado a partir do glicerol é bastante atrativa, pois valoriza a produção de biodiesel e torna a purificação do coproduto um processo economicamente viável e, além disso, sustentável.² Por outro lado, a transformação de glicerol em novos produtos é altamente dependente das rotas catalíticas e dos catalisadores utilizados. Dentre estas rotas, a oxidação é uma rota que permite a conversão do glicerol em diversos produtos de valor agregado.³ Entretanto, a oxidação seletiva do glicerol é desafiadora, pois demanda o uso de catalisadores apropriados e a determinação de condições de catálise específicas (pH, temperatura, pressão, etc.).⁴ Entre os produtos de oxidação do glicerol, destacam-se o ácido mesoxálico, o ácido tartrônico, a 1,3-dihidroxiacetona e o ácido glicérico. Esses produtos são classicamente aplicados nas indústrias químicas, farmacêuticas e de cosméticos,^{5; 6; 7; 8; 9; 10; 11;}¹² sendo geralmente obtidos utilizando catalisadores caros e em quantidades estequiométricas, com resíduos tóxicos de impacto ambiental negativo, reduzindo, portanto, o interesse industrial.^{8; 13}

Diversos trabalhos foram descritos na literatura sobre o uso de metais nobres suportados – platina, paládio, partículas de ouro, entre outros – aplicados na oxidação seletiva do glicerol.¹⁴ Apesar do caráter heterogêneo destes catalisadores, os custos deste catalisadores são elevados, e em alguns casos as condições de catálise exigem altas pressões e temperaturas, o que contribui para a desativação dos catalisadores. Isso reduz a vida útil dos catalisadores, limita suas reutilizações, e conseqüentemente torna o processo menos atrativo economicamente.^{3; 15}

Em 2009, um estudo descrevendo o uso de um novo tipo de catalisador para a oxidação do glicerol foi descrito por Liebminger *et al.* (2009).¹⁶ Trata-se do uso de enzimas oxidases contendo cobre – metaloproteínas – que num sistema mediado por *N*-oxil-2,2,6,6-tetrametilpiperidina (TEMPO) podem auxiliar na transformação do glicerol. Eles utilizaram a lacase de *T. hirsuta* livre em solução ou imobilizada em pellets de sílica para esta finalidade, e observaram a oxidação sequencial do glicerol a gliceraldeído, ácido glicérico, ácido tartrônico e, por fim, ácido mesoxálico. Além disso, verificaram uma dependência da produção com a concentração do mediador – quanto maior a concentração de TEMPO, maior a conversão de glicerol no período investigado. Ademais, um comportamento enzimático divergente – da enzima na forma livre comparada com a mesma imobilizada – foi destacado. Embora a enzima livre tenha sido mais efetiva cataliticamente, a mesma, careceu de estabilidade. A forma imobilizada, pelo contrário, apresentou maior estabilidade no tempo.

Ainda é pequeno o número de trabalhos que abordaram a oxidação do glicerol lacase/TEMPO-mediada, que além do trabalho pioneiro de Liebminger *et al.* (2009)¹⁶ foi estudado apenas – no melhor do nosso conhecimento – por Hong *et al.* (2015),¹⁵ (2018),¹⁷ e (2019).¹⁸ Muita informação e investimento são necessários para o aprimoramento desta tecnologia. Apesar disso, a ideia geral é bastante atrativa e têm vários pontos a seu favor. Por exemplo, faria o uso de um catalisador não tóxico e ambientalmente favorável para a oxidação do glicerol. Isso valorizaria economicamente o glicerol e, concomitantemente, valorizaria a produção de biodiesel, pois o glicerol produzido, que no momento tem pouca utilidade e é bastante barato, passaria a ser de maior interesse e competiria com o glicerol obtido por outras rotas. No entanto, o uso de enzimas em catálise é limitado devido, majoritariamente, aos seus altos custos de produção. Para contornar este empecilho, a estratégia de imobilização enzimática ganhou espaço, pois permite o uso múltiplo do catalisador (catálise heterogênea). A busca por suportes que mantenham – ou até mesmo aumentem – o potencial catalítico de enzimas é a base das pesquisas que envolvem imobilização.

Uma classe de materiais que se destaca como suporte para imobilização enzimática são as zeólitas. Estes materiais, tanto em escala micrométrica como nanométrica, foram descritos como suportes efetivos para imobilização e manutenção da atividade catalítica de várias enzimas. As aplicações destes complexos são diversas, abrangendo, por exemplo, sistemas catalíticos ou de sensoriamento.^{19; 20; 21; 22; 23; 24; 25} Em estudos anteriores do nosso grupo de pesquisa, foram descritos o uso de nanozeólitas como suportes para a imobilização de lipases e

respectivas aplicações para a produção de biodiesel.^{26; 27} A modulação destes materiais inorgânicos permitiu uma larga busca por suportes que não apenas mantiveram, como também aumentaram, a atividade das enzimas testadas. Além disso, os complexos apresentaram boa estabilidade e múltiplas reutilizações.

A redução dos tamanhos de zeólitas para a escala nanométrica pode levar a variações significativas em suas propriedades físico-químicas, como por exemplo, aumentar suas áreas externas, permitir melhor acesso e exposição de seus sítios ativos, e aumentar a dispersibilidade tanto em meio aquoso quanto orgânico. Ademais, as superfícies destas nanopartículas podem ser facilmente moduladas, especialmente no que diz respeito a carga superficial e hidrofobicidade/hidrofilicidade.²⁸ Com base nisso e, levando em consideração experiências anteriores,^{26; 27} esta classe de materiais foi escolhida para aplicação como suporte de imobilização de enzimas lacase neste trabalho visando a aplicação dos complexos formados na oxidação do glicerol num sistema TEMPO-mediado. Até o momento, no melhor do nosso conhecimento, não há relatos sobre o uso de nanozeólitas para imobilização de lacases e aplicação dos complexos na oxidação do glicerol.

Este trabalho teve como foco a síntese e caracterização de materiais nanozeolíticos, e o uso destes suportes para imobilização de lacases comerciais de diferentes organismos – lacases estas nunca antes utilizadas neste sistema. Os catalisadores obtidos foram aplicados na reação de oxidação do glicerol TEMPO-mediada. Além disso, estudos sistemáticos, das enzimas em solução e/ou imobilizadas, foram realizados com uso de diversas técnicas avançadas, para uma maior caracterização e compreensão do sistema.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Biodiesel e a geração de glicerol

Nas últimas décadas, o aumento na emissão de *gases do efeito estufa* devido à diversas atividades humanas, entre elas, a *queima de combustíveis fósseis*, foi amplamente indicado como um dos principais contribuintes ao *aquecimento global*. Sabe-se que, desde a revolução industrial, a humanidade tornou-se altamente dependente desta fonte de energia. No entanto, sabe-se também que, o aumento da temperatura média da Terra, pode ocasionar sérias catástrofes naturais, e colocar a vida neste planeta em risco. Esse confronto entre a necessidade energética versus os problemas que o consumo desta fonte pode ocasionar movimenta desde então a busca por fontes alternativas de energia. Esta constante busca por combustíveis alternativos, tem estimulado e intensificado o esforço da comunidade científica, na criação de novas tecnologias, a serem aplicadas na geração de *energia limpa e renovável* a partir de diversas fontes da *biomassa*. Neste aspecto, destaca-se o *biodiesel*, uma forma de energia *renovável e biodegradável*, constituída por uma mistura de ésteres monoalquílicos com longa cadeia de ácidos graxos.²⁹

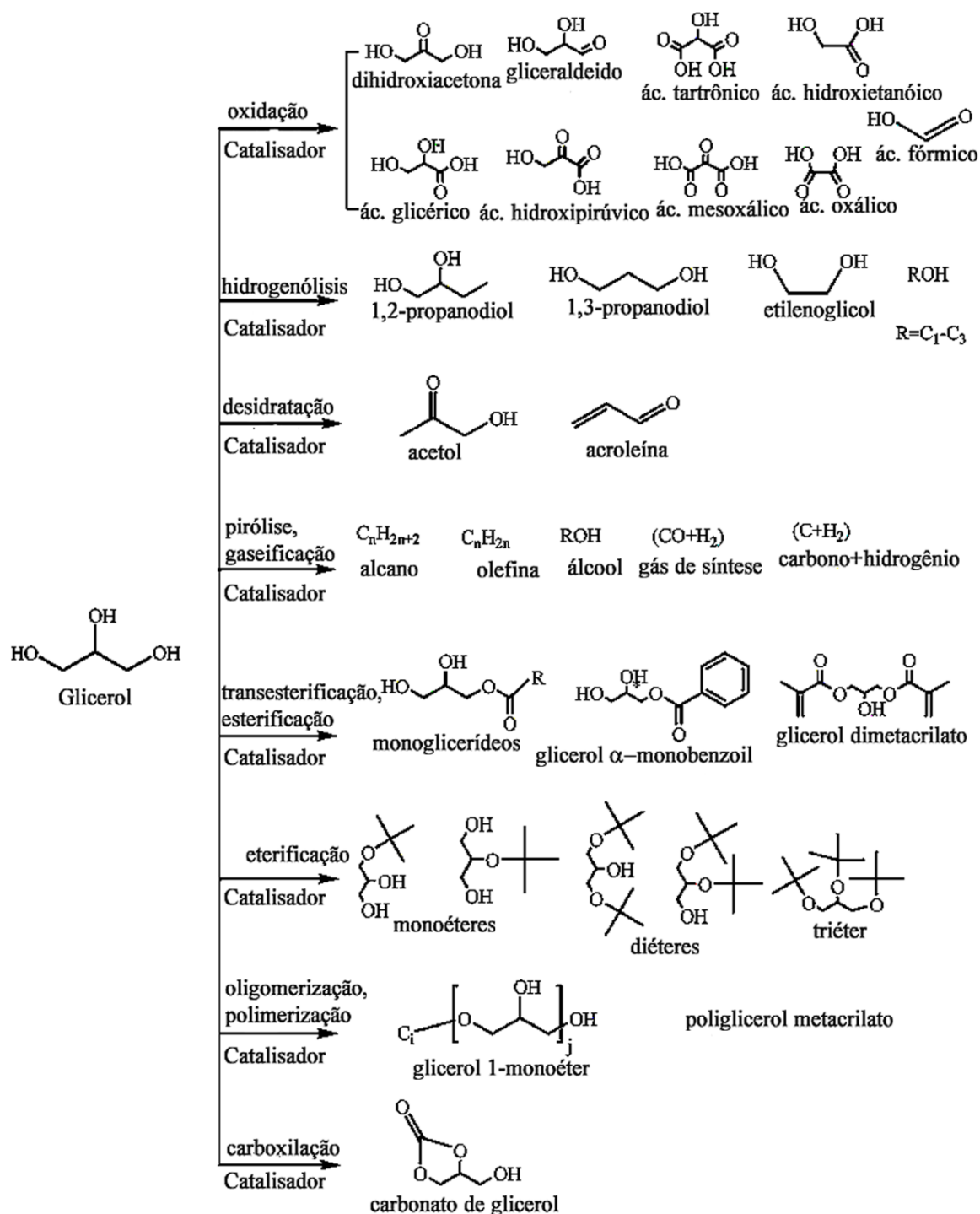
A firme política nacional de incorporação do biodiesel na matriz energética brasileira (Lei nº 11.097/2005), acarretou no crescimento acelerado de sua produção – desde março de 2020, 12% do diesel comercial é obrigatoriamente composto por biodiesel.³⁰ Como consequência, cresceu também a quantidade do coproduto gerado, o *glicerol bruto*. Atualmente o Brasil é o terceiro maior produtor e consumidor de biodiesel no mundo, produzindo também, grande quantidade de glicerol. Com esta grande produção, o glicerol do biodiesel acaba saturando o mercado brasileiro e levando à redução dos preços deste produto, e assim, sua desvalorização. *Com o objetivo de reduzir os futuros problemas por acumulação de glicerol e tornar a produção de biodiesel mais rentável, a implementação de estratégias tecnológicas que utilizam o glicerol como única fonte de carbono para obtenção de produtos de maior valor agregado, vem sendo estudada como uma promissora alternativa.*³¹

2.2 Química do glicerol

O glicerol (1,2,3-propanotriol), é utilizado principalmente nas indústrias de detergentes, alimentícia, de cosméticos e farmacêuticos, mas tem potencial para ser utilizado na *síntese de compostos químicos de alto valor econômico*, e que podem ser utilizados nestas mesmas

industrias.² Para isso, o glicerol pode ser submetido a vários processos químicos de transformação, entre eles, *oxidação*, *hidrogenólise*, *desidratação*, *pirólise/gaseificação*, *transesterificação/esterificação*, *eterificação*, *polimerização/oligomerização* e *carboxilação*, como pode ser visto na **Figura 1**.³

Figura 1. Processos de conversão catalítica do glicerol.



Fonte: adaptado de ZHOU *et al.* (2008).³

Como exemplo, a obtenção de *acroleína* pela *desidratação* do glicerol e sua *oxidação* a *ácido acrílico*, tem chamado atenção nos últimos anos.^{32; 33; 34; 35} Estas reações ocorrem na presença de catalisadores ácidos – principalmente heterogêneos –, em condições reacionais extremas – altas temperaturas e pressões –, que levam a perda de atividade do catalisador, o que muitas vezes, torna suas aplicações desvantajosas, por não ser possível a regeneração do mesmo após reação.³⁶ A síntese da acroleína segue duas rotas principais: a desidratação do grupo hidroxila primário gerando hidroxiacetona ou acetal, enquanto a desidratação do grupo hidroxila secundário produz Propano-1,3-diol, o qual pode ser, posteriormente, desidratado a acroleína, produto este, utilizado industrialmente na produção de ácido acrílico.³⁵

2.3 Oxidação do Glicerol

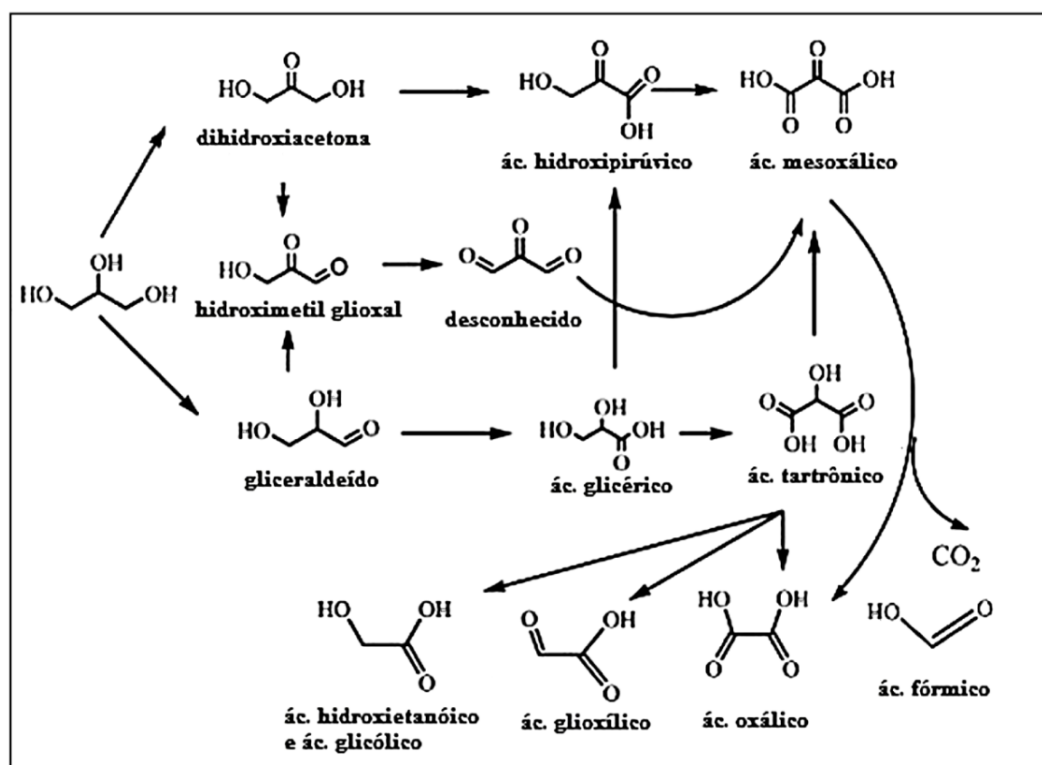
O glicerol é uma molécula altamente funcionalizada, pois possui três grupamentos –OH em sua estrutura. Essa característica permite sua utilização – como matéria prima – para a produção de derivados oxigenados de alto valor. Entretanto, como a oxidação do glicerol pode resultar na geração de um grande número de produtos (**Figura 2**) – estes sujeitos a superoxidação –, a *oxidação seletiva* desta molécula *é bastante desafiadora*. A oxidação de um grupo hidroxila primário da molécula de glicerol gera ácido glicérico e posteriormente ácido tartrônico. A oxidação do grupo hidroxila secundário gera dihidroxiacetona e a oxidação de todos os três grupos hidroxila leva a formação de ácido mesoxálico.¹⁶ *Portanto, o desafio associado com as reações de oxidação catalítica do glicerol é a oxidação seletiva versus a oxidação não seletiva.*

Dentre os possíveis derivados químicos passíveis de serem obtidos através da oxidação do glicerol, destacam-se: o *ácido mesoxálico*, que é utilizado na produção de 4-clorofenil-hidrazona, molécula conhecida como inibidora da HIV-1 reverse transcriptase;^{5; 6; 7} o *ácido tartrônico*, que pode ser utilizado tanto como agente potencializador ou adjuvante na absorção sanguínea do antibiótico tetraciclina, como coletor de oxigênio dissolvido em água alcalina⁸ e, alternativamente, ser utilizado como substrato na produção de ácido mesoxálico – por oxidação – na presença de catalisadores heterogêneos;^{9; 10; 11} o *ácido glicérico*, que é utilizado na produção de compostos de química fina, polímeros, e na indústria farmacêutica, por exemplo, atua como agente biologicamente ativo da atividade antitripsina; a *1,3-dihidroxiacetona*, que é

utilizada na indústria farmacêutica para a produção de bronzeadores; e, por fim, o **ácido hidroxipirúvico**, utilizado na produção de aminoácidos.¹²

Catalisadores **homogêneos**, **heterogêneos** e **biológicos** têm sido amplamente utilizados para a **oxidação seletiva do glicerol**. Mais recentemente, estudos têm sido direcionados para aplicação de processos fotocatalíticos e eletroquímicos para esta finalidade.^{14; 37}

Figura 2. Possíveis caminhos de reação e produtos formados na reação de oxidação do glicerol.



Fonte: adaptado ZHOU *et al.* (2008).³

2.3.1 Oxidação do glicerol via catálise heterogênea

A oxidação do glicerol via **catálise heterogênea** – catalisador em estado físico diferente dos demais componentes reacionais – utilizando oxigênio molecular como agente oxidante é considerada uma das rotas mais atrativas para produção de derivados de interesse industrial desta molécula.³⁷ A oxidação seletiva do glicerol tem sido obtida com uso de **catalisadores mono** ou **bimetálicos**, com destaque para Au, Pt, Pd, Rh, Co e Bi **suportados**, em geral, em materiais de **carbono** – nanotubos, nanofibras, nanoesferas, filmes, entre outros –, ou **óxidos** – SiO₂, TiO₂, CaO, entre outros.^{14; 37; 38}

A seletividade da reação de oxidação de glicerol via rota heterogênea pode ser afetada por vários fatores, tais como: tipo de solvente, pH, pressão parcial do oxigênio, temperatura, condições de transferência de massa, natureza dos catalisadores envolvidos no processo, métodos de síntese dos catalisadores, suas propriedades físico-químicas, concentração, e também, do tipo de reator utilizado.^{4; 14; 37}

Apesar do caráter heterogêneo destes catalisadores, seus *custos são muito elevados*. O preço do catalisador representa, por exemplo, cerca de 95% do valor total de produção para compostos como dihidroxiacetona, ácido tartrônico e ácido mesoxálico devido à presença de *metais nobres* – até mesmo após uso do catalisador por 10 ciclos.³⁹

Além disso, em alguns casos, altas pressões e temperaturas são necessárias para maior seletividade do produto de interesse. Problemas como a desativação devido ao envenenamento por oxigênio durante a reação são comumente relatados para estes catalisadores metálicos, e a desativação é, geralmente, proporcional a pressão parcial do oxigênio. Ademais, a deposição de coprodutos sobre a superfície dos catalisadores também pode levar a desativação, e etapas de recuperação são necessárias antes da reutilização dos mesmos. Isso tudo limita a reutilização dos catalisadores e, por consequência, torna o processo não atrativo economicamente.^{3; 15}

2.3.2 Oxidação do glicerol via catálise homogênea

A oxidação do glicerol via *catálise homogênea* – catalisador no mesmo estado físico que os demais componentes reacionais – é em geral realizada utilizando *oxidantes caros* e em *quantidades estequiométricas*, tais como, permanganato de potássio e ácido crômico – ambos com impacto ambiental negativo (*resíduos tóxicos*). Essas desvantagens contribuem para o reduzido interesse industrial na aplicação de processos deste tipo.^{8; 13}

Ciriminna e Pagliaro (2003),⁴⁰ fizeram a comparação entre a aplicação do radical nitroxil TEMPO livre em solução (catálise homogênea) e aprisionado em sílica-sol-gel (catálise heterogênea) na reação de oxidação do glicerol. Em ambos os casos, eles utilizaram hipoclorito de sódio (NaOCl) como agente restaurador e brometo (Br⁻) para a oxidação seletiva de glicerol a ácido mesoxálico. A conversão total do glicerol foi atingida para as duas rotas catalíticas, com alta seletividade (~100%) a ácido mesoxálico. Apesar de altas conversões e seletividades para ambos os casos, uma taxa de reação menor foi observada para o processo heterogêneo – o que

pode ser compensado pela fácil separação do produto no final da reação – e está possivelmente relacionada com fenômenos de transporte intrínsecos deste tipo de catalisadores. Por outro lado, os conhecidos processos oxidativos mediados por TEMPO na presença de NaOCl e brometo têm problemas ambientais e toxicológicos – típicos de catálise homogênea para oxidação do glicerol – que vão contra sua aplicação, apesar de altas seletividades.^{41; 42}

2.3.3 Oxidação do glicerol via biocatálise

Diversos microrganismos podem utilizar glicerol como fonte de carbono para produzir biomassa e metabólitos através de processos de fermentação aeróbica ou anaeróbica – em geral processos de longa duração e de baixa produção. Essa capacidade de biotransformação está diretamente relacionada com o conteúdo enzimático destes microrganismos, como por exemplo, as enzimas glicerol desidrogenase, glicerol desidratase, glicerol quinase e metanol desidrogenase.^{37; 43}

A produção de 1,3-dihidroxiacetona (DHA), por exemplo, é realizada em larga escala pela enzima glicerol desidrogenase da bactéria gram-negativa *Gluconobacter oxydans*,^{43; 44} a qual realiza a oxidação incompleta do glicerol – em contraste com a maioria dos microrganismos aeróbicos, os quais oxidam glicerol até a formação de dióxido de carbono e água – em grandes tanques aerados e sob agitação mecânica.

Além de DHA, podem ser obtidos da oxidação do glicerol realizada por enzimas/microrganismos produtos como ácido glicérico, ácido succínico, ácido acético, 1,3-propanodiol, ácido láctico, entre outros. Entretanto, esses processos ainda são muito custosos, pois exigem longos tempos de fermentação, com alta demanda de energia⁴⁵ e além disso, a formação dos produtos podem levar a inibição do catalisador, impedindo novas oxidações do glicerol.^{44; 45}

Visando contornar os altos custos enzimáticos, catalisadores formados pela imobilização da enzima glicerol desidrogenase de *Cellulomonas sp* em suportes sólidos foram aplicados na reação de oxidação do glicerol a dihidroxiacetona na presença do cofator NAD⁺.⁴⁵ O biocatalisador obtido apresentou melhora na estabilidade da enzima, e pode ser utilizado por 10 ciclos, com menos de 9% de perda de produção. Sistemas deste tipo ilustram a possibilidade

de combinação de mais de um tipo de rota catalítica, no caso, biocatálise e catálise heterogênea, na oxidação do glicerol.

Por fim, quando o potencial de redox do microrganismo – na verdade da(s) enzima(s) envolvidas – limita o seu uso para substratos de interesse, mediadores de reação podem ser utilizados para intermediar a transferência de elétrons do substrato para a enzima.³⁷ Por exemplo, o mediador TEMPO foi utilizado na oxidação do glicerol na presença de lacase de *Trametes hirsuta* para produção de gliceraldeído – outros produtos de oxidação do glicerol foram também obtidos, como será melhor descrito na seção 2.5.1.¹⁶

Com base no que foi revisado até o momento, é evidente que a industrialização de novos processos para a oxidação do glicerol requer o desenvolvimento de novos catalisadores que combinem as vantagens dos sistemas heterogêneos, homogêneos e biocatalíticos – mais baratos, eficazes e resistentes em comparação com os tradicionais catalisadores contendo metais nobres – que controlem a orientação quimioseletiva da reação de oxidação do glicerol e, em paralelo, sejam ambientalmente “limpos” e possam vir a ser economicamente viáveis – **sistema ideal**. O sistema descrito por Liebminger *et al.* (2009),¹⁶ combina o uso da enzima lacase – **biocatálise** – imobilizada em suporte sólido – **catálise heterogênea** – aplicada na oxidação do glicerol em um sistema TEMPO-mediado – **catálise homogênea** –, vai em direção ao **sistema ideal** mencionado acima. No entanto, é um sistema complexo, e o entendimento dos seus componentes é de extrema importância, a começar pela enzima utilizada: **lacase**.

2.4 Lacases

Lacase foi descrita pela primeira vez por Yoshida em 1883, após a extração desta enzima da árvore *Rhus vernicifera*.⁴⁶ Posteriormente, diversos tipos desta enzima foram isolados de plantas, insetos, fungos e de bactérias.⁴⁷ Lacases (*p*-difenoil oxidases, EC 1.10.3.2) são enzimas multi-cobre pertencentes ao grupo das oxidases azuis definidas como oxireductases. Elas catalisam a oxidação de vários compostos – principalmente fenólicos, seus substratos típicos – com a concomitante redução de O₂ a H₂O. A redução de oxigênio à água é possível devido à presença de um aglomerado de quatro átomos de cobre que formam o sítio catalítico da enzima.^{47; 48; 49} Os átomos de cobre presentes nas lacases podem ser classificados em três tipos: um do tipo 1 (T1) – onde ocorre a ligação do substrato redutor –, um do tipo 2 (T2) e dois do tipo 3 (T3), os quais formam um *cluster* trinuclear de cobre T2/T3. O oxigênio é

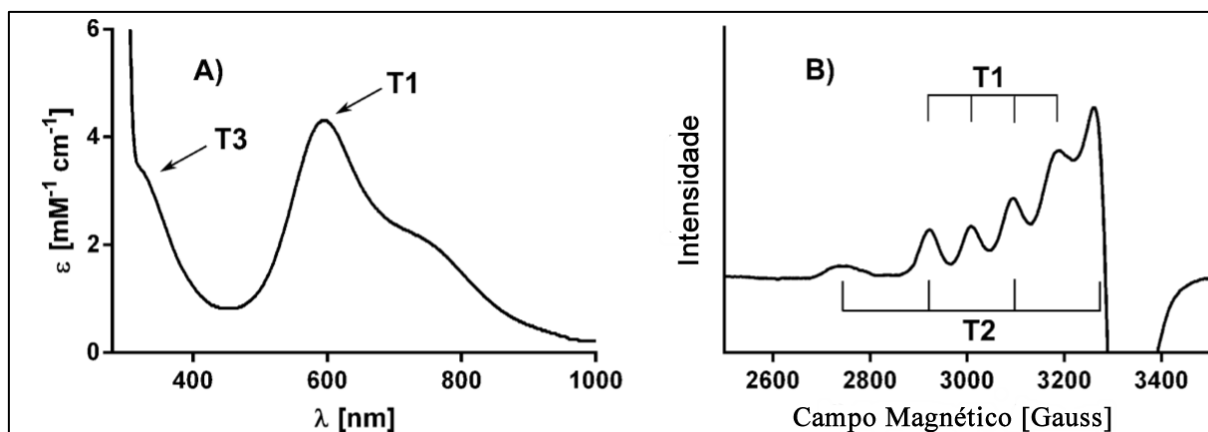
reduzido a água neste cluster, utilizando um elétron proveniente do sítio T1. Os diferentes tipos de cobre podem ser distinguidos utilizando técnicas espectroscópicas na região ultravioleta/visível (UV-Vis) e ressonância paramagnética eletrônica (EPR).⁴⁹

2.4.1 UV-Vis e EPR dos cobres T1, T2 e T3 de lacases

A análise de lacases por espectroscopia na região UV-Vis permite caracterizar parcialmente os cobres de seus sítios catalíticos. O sítio de cobre T1 em lacases é caracterizado por uma absorção intensa em ~ 600 nm e $\epsilon \sim 5000$ M⁻¹ cm⁻¹ devido à transferência de carga do ligante para o metal, transição S(Cys) $\pi \rightarrow$ Cu $d_{x^2-y^2}$, responsável pela cor intensa azul da forma oxidada da enzima. O cluster trinuclear, onde oxigênio molecular é reduzido a água, é formado por um íon cobre T2 e um centro binuclear de cobre T3. Ambos íons cobre no sítio T3 – geralmente antiferromagneticamente acoplados via ponte com ligante – apresenta uma absorção característica em 330 nm. O sítio T2 carece bandas de absorção intensa, mas pode ser detectado por EPR.^{50; 51; 52; 53}

EPR é uma técnica espectroscópica útil para o estudo e caracterização estrutural dos centros metálicos de cobre Cu(II) presentes em metaloproteínas contendo cobre, como as lacases. O elétron desemparelhado localizado no orbital $d_{x^2-y^2}$ gera um espectro de EPR característico $S = 1/2$ com $g_{\parallel} > g_{\perp} > 2.0023$. Os isótopos naturais de cobre ⁶³Cu e ⁶⁵Cu – abundância 69 e 31 %, respectivamente – possuem spin nuclear $I = 3/2$ que acopla com o elétron desemparelhado dando origem a divisão do sinal de EPR em quatro linhas ($2I + 1$) devido a interação hiperfina. O sítio T1 exibe uma divisão hiperfina paralela do cobre no espectro de EPR ($A_{\parallel} = (43-90) \times 10^{-4}$ cm⁻¹), enquanto o sítio T2, exibe uma larga divisão hiperfina paralela do espectro ($A_{\parallel} = (150-201) \times 10^{-4}$ cm⁻¹). Por fim, a acoplagem dos cobres no sítio T3 torna-os indetectáveis por EPR. Lacases possuem, portanto, um espectro de EPR resultado da combinação dos sinais dos sítios T1 e T2, enquanto o centro T3 não é detectado por EPR.^{50; 51; 52; 53} A **Figura 3** exibe os espectros de absorção e EPR típicos de lacases.⁵⁴

Figura 3. Típicos espectros de absorção (A) e EPR (B) de lacases.

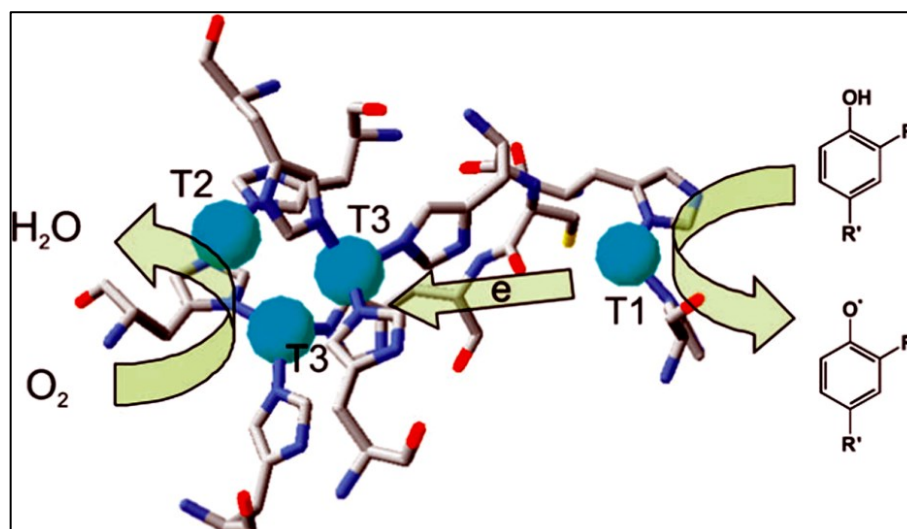


Fonte: adaptado de BRANDER *et al.* (2015).⁵⁴

2.4.2 Mecanismo geral de reação de lacases

Existem três etapas principais na catálise por lacase. Inicialmente, o cobre T1 é reduzido pelo substrato – agente redutor – que é, por sua vez, oxidado. O elétron obtido do substrato é então transferido internamente do cobre T1 para o cluster trinuclear formado pelos átomos de cobre T2 e T3. A molécula de oxigênio (O₂) se liga ao cluster onde é reduzida a peróxido de hidrogênio (H₂O₂). É postulado que a cavidade de ligação para o O₂ é formada para impedir o acesso de outros agentes oxidantes que não o O₂. O H₂O₂ não é detectado fora da lacase durante o estado estacionário da catálise, indicando que está ocorrendo uma redução de O₂ a água envolvendo 4 elétrons. Como um substrato que requer 1 elétron para sua oxidação está acoplado a um sistema de redução de oxigênio envolvendo 4 elétrons, o mecanismo da reação não pode ser inteiramente direto. A operação da lacase pode ser comparada a de uma bateria, onde ocorre armazenamento de elétrons de reações de oxidação individuais de modo a reduzir oxigênio molecular. Por isso, a oxidação de quatro moléculas de substrato (agente redutor) é necessária para reduzir completamente o oxigênio molecular à água.⁴⁹ A reação catalítica está esquematizada na **Figura 4**.

Figura 4. Representação do sítio catalítico e esquema reacional da lacase de *Trametes hirsuta*.



Fonte: SOSNA *et al.* (2010).⁵⁵

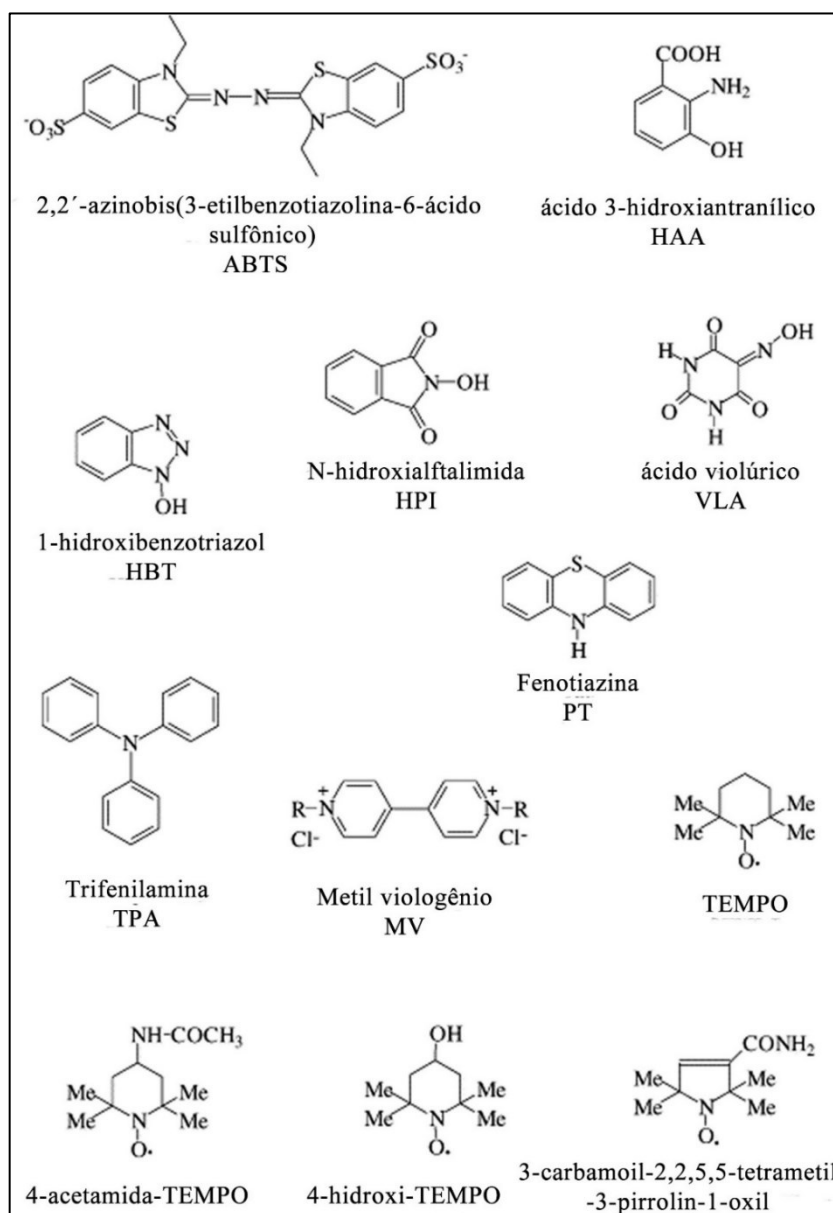
2.4.3 Sistemas lacase-mediador

Embora as enzimas lacase tenham como substratos específicos os compostos fenólicos, o uso dessa enzima para diferentes substratos é possível com o auxílio de radicais mediadores. Esse grupo de enzimas exibe diferentes potenciais redox – dependentes da fonte produtora –, e podem ser divididas em três grupos de acordo com seu potencial redutor: alto potencial redutor (730-790 mV *vs.* NHE), médio potencial redutor (460-730 mV *vs.* NHE) e baixo potencial redutor (< 460 mV *vs.* NHE).⁵⁶ Em geral, a oxidação de um composto não fenólico é impedida devido ao seu alto potencial redox. No entanto, quando utilizados na presença de radicais mediadores, por exemplo, 1-hidroxibenzotriazol (HBT), *N*-oxil-2,2,6,6-tetrametilpiperidina (TEMPO) ou 2,2'-azino-bis(ácido 3-etilbenzotiazolína-6-sulfônico) (ABTS) – ilustrados na **Figura 5** em conjunto com outros mediadores –, as enzimas lacase são capazes de oxidar compostos não fenólicos devido a um aumento considerável em sua reatividade. Este sistema conhecido como *sistema lacase-mediador*.⁴⁸

A família de mediadores TEMPO – radicais *N*-oxil estáveis – foram aplicadas com sucesso na oxidação de álcoois na presença de lacase.⁵⁷ Foi observado que a oxidação é *dependente da presença da enzima, e não somente da interação entre substrato e o radical N-oxil*. Além disso, foi sugerido que a forma ativa de TEMPO é o íon oxiamônio – resultante da oxidação do radical *N*-oxil – e que este íon seria responsável pela oxidação dos álcoois a aldeídos sem a necessidade de transferência eletrônica. A enzima lacase, por sua vez,

regeneraria TEMPO da forma hidroxilamina, assim, o íon oxiamônio seria recuperado tanto pela oxirredução de TEMPO, *ou através de oxidação pela lacase*. Como as lacases são reoxidadas por oxigênio, estes processos representam um sistema “limpo” de oxidação de álcoois por ar, catalisado pelo sistema lacase-mediador.^{57; 58}

Figura 5. Estruturas moleculares de alguns mediadores empregados em sistemas lacase-mediador.



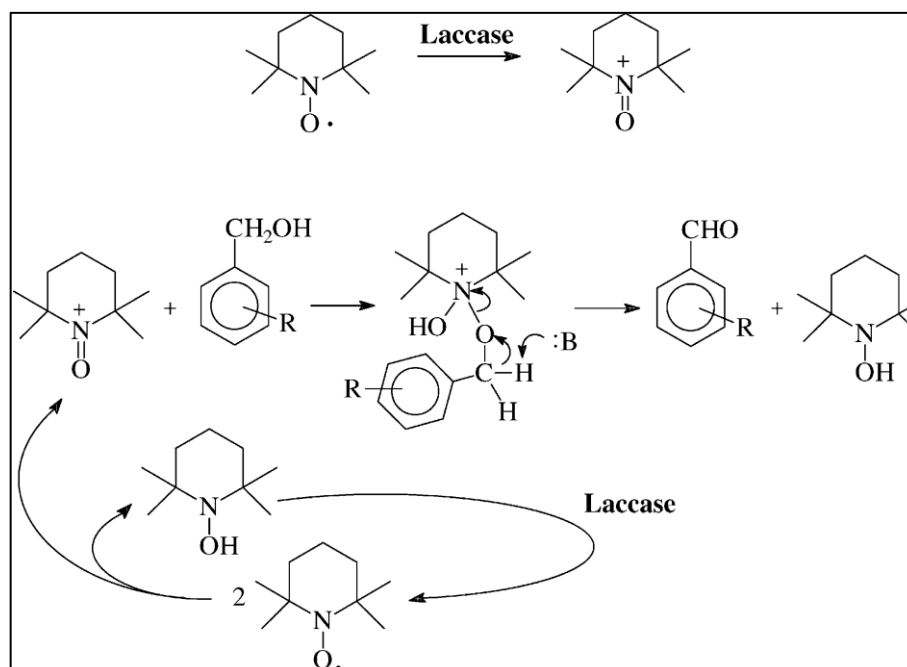
Fonte: adaptado de FABBRINI *et al.* (2002).⁵⁸

A oxidação/redução dos mediadores de lacases TEMPO e ABTS – principais mediadores utilizados neste trabalho – são processos eletroquímicos complexos, conforme descrito na próxima sessão.

2.4.4 Eletroquímica dos mediadores TEMPO e ABTS

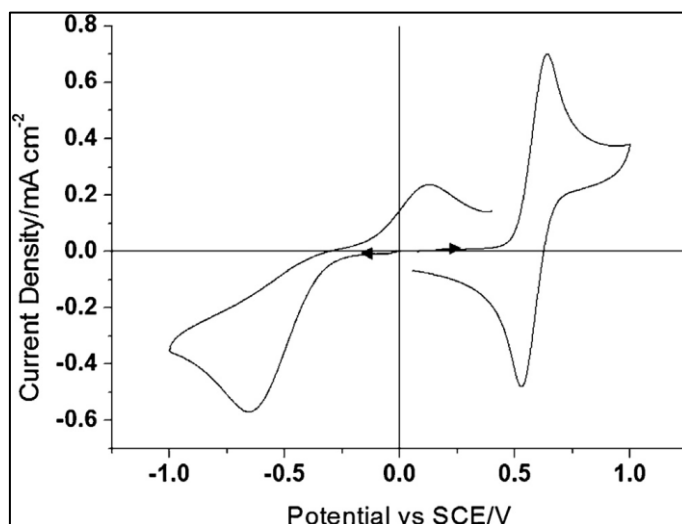
TEMPO é conhecido por ser um *radical N-oxil estável*, e apresenta um comportamento eletroquímico complexo. A forma ativa de TEMPO é o *cátion oxoamônio* (TEMPO⁺), obtido da oxidação do radical. Este íon é o responsável pela oxidação do substrato, que leva a redução de TEMPO⁺ para uma terceira espécie química, a *hidroxilamina* (TEMPO⁻). Para catálise efetiva, a re-oxidação da hidroxilamina é necessária, e este processo é descrito como lento. Num sistema lacase-mediado, a enzima atua sobre TEMPO para gerar TEMPO⁺ e também é responsável pela regeneração de TEMPO da oxidação da hidroxilamina. Dessa forma, o íon oxoamônio pode ser restaurado via desproporcionamento ácido-induzido (lento) ou via oxidação enzimática (rápido). O **Esquema 1** apresenta o mecanismo proposto de ação do sistema lacase/TEMPO mediado sobre um substrato⁵⁸. Voltametricamente, um par conjugado de oxidação-redução é reportado, assim como um pico de redução – frequentemente irreversível –, referente a formação da hidroxilamina. Este comportamento é descrito como dependente de pH, sendo que em meios básicos, a oxidação da hidroxilamina pode ser verificada, como mostrado na **Figura 6**.

Esquema 1. Mecanismo proposto para oxidação de um substrato por TEMPO num sistema lacase-mediado.



Fonte : FABBRINI *et al.* (2002).⁵⁸

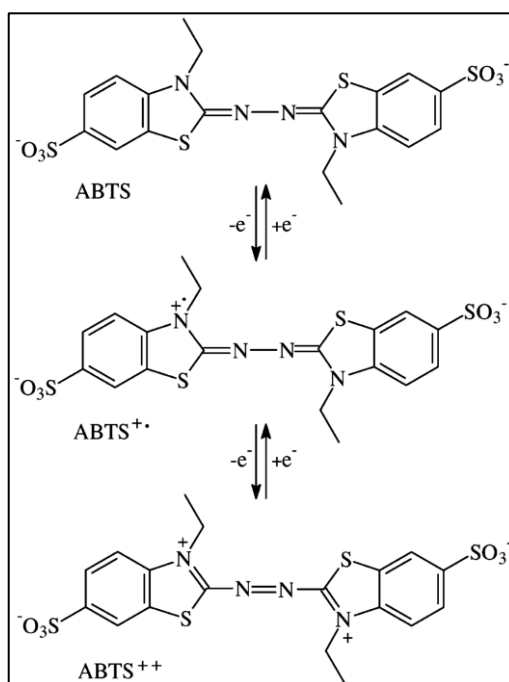
Figura 6. Voltamogramas cíclicos em eletrodo disco de carbono vítreo para soluções 10 mM de TEMPO em 50% *t*-butanol/50% água contendo carbonato de sódio/bicarbonato, pH 9,3. Velocidade de varredura 50 mV/s. Temperatura 293 K.



Fonte: GREEN *et al.* (2013).⁵⁹

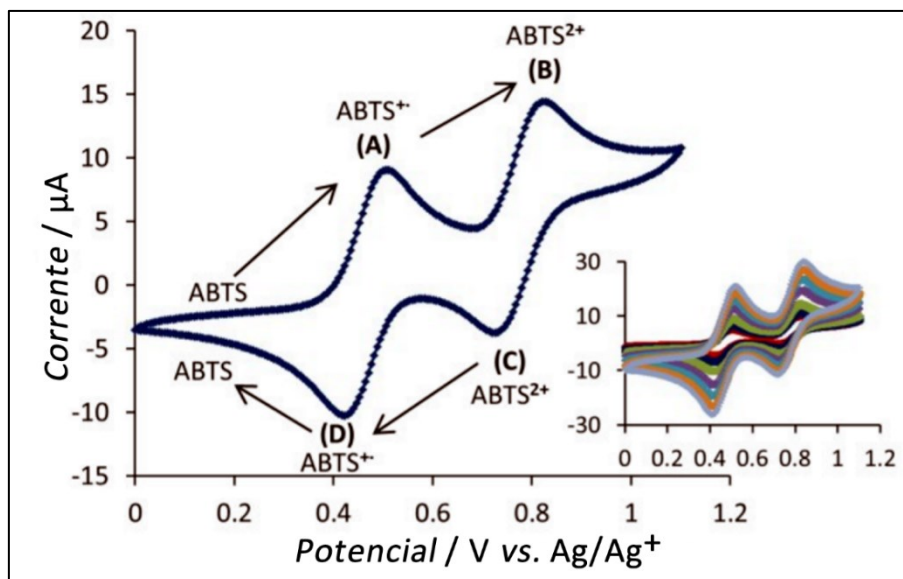
Para o ABTS, são descritos dois pares de oxidorredução reversíveis que envolvem um elétron ($\text{ABTS}/\text{ABTS}^+$, $\text{ABTS}^+/\text{ABTS}^{++}$), como mostrado no **Esquema 2**. A redução do cátion bivalente nem sempre é detectada voltametricamente, pois depende da velocidade de varredura e da concentração de analito na superfície do eletrodo.⁵⁸ A **Figura 7** ilustra o comportamento eletroquímico de ABTS.⁶⁰

Esquema 2. As formas oxidadas do ABTS.



Fonte: FABBRINI *et al.* (2002).⁵⁸

Figura 7. Voltamograma cíclico de solução 10 mM ABTS. Velocidade de varredura 200 mV/s. Insert apresenta voltamogramas para diferentes velocidades de varredura.



Fonte: adaptado de ESHTAYA *et al.* (2016).⁶⁰

Além de uma compreensão básica dos mecanismos reacionais de lacases, e a interação destas enzimas com mediadores, é importante abordar o tema aplicabilidade – em sentido de larga escala. Lacases, como a maioria das enzimas comercializadas, são produzidas em larga escala devido à tecnologia de DNA recombinante e aos avanços na engenharia de proteínas. Os processos envolvidos como sequenciamento, clonagem e expressão heteróloga, extração e purificação, são em geral muito caros.⁶¹ A aplicação de enzimas – catalisadores homogêneos – em processos catalíticos industriais é, portanto, desencorajada devido aos altos custos de produção. Uma alternativa encontrada para contornar esses problemas, vastamente discutida nas últimas décadas, é a imobilização de enzimas, e assim, torna-las catalisadores heterogêneos reutilizáveis. Imobilização enzimática será objeto das próximas seções.

2.5 Imobilização de enzimas

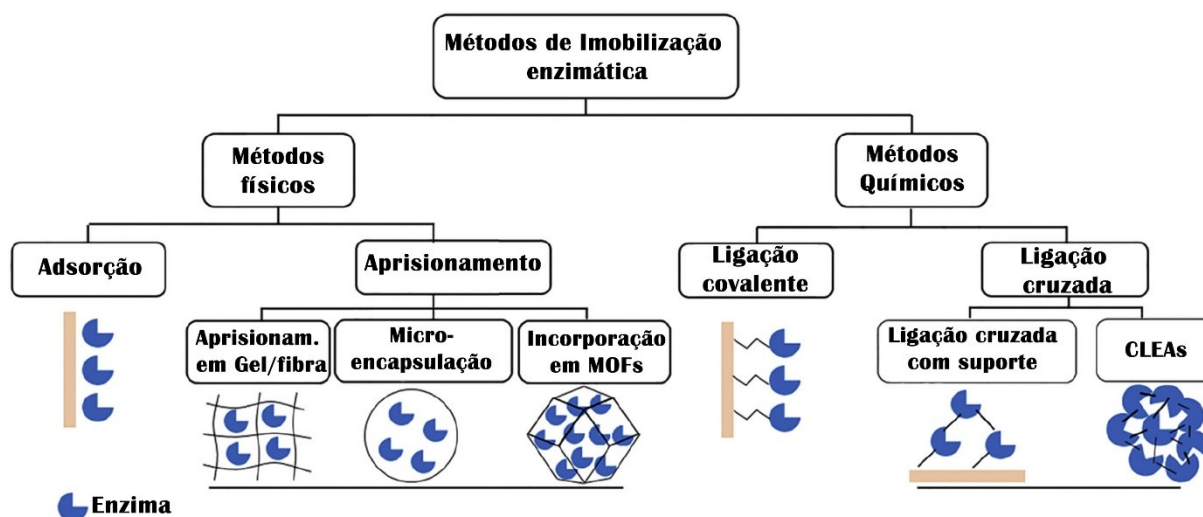
O uso de enzimas – catalisador homogêneo – em processos industriais é geralmente limitado pelos altos custos em suas produções. Para contornar esses empecilhos, a **imobilização enzimática** tem sido sistematicamente estudada. Existem diversos métodos de imobilização enzimática, que podem ser subdivididos em métodos de imobilização **físicos** – como adsorção e contenção entre barreiras (microencapsulação, aprisionamento e incorporação) –, ou **químicos**

– como ligação covalente e ligação cruzada (em suporte, ou formando agregados enzimáticos “CLEAs”),^{62; 63; 64} como ilustrado na **Figura 8**.

A adsorção – deposição da enzima sobre um suporte sólido – é o método mais simples de imobilização física de enzimas, no qual grupos superficiais do suporte interagem com grupos de superfície da enzima, por atração eletrostática, forças de van der Waals ou por ligação de hidrogênio.⁶⁵ Em geral, este tipo de imobilização causa pequenas modificação na estrutura nativa da enzima, quando comparado aos outros tipos de imobilização e, por isso, não promove perdas significativas da atividade catalítica.⁶⁶

O aprisionamento trata-se da contenção da enzima dentro de uma matriz polimérica, permitindo a entrada do substrato e a saída do produto, mas não da enzima. O aprisionamento pode ser em gel, em fibras ou em nano/microcápsulas. O método de ligação consiste em ligar enzima a suportes insolúveis, formando uma fase diferente do meio reacional, estas ligações podem ser iônicas (força iônica), no qual o suporte possui grupos ionizáveis que interagem com grupos da enzima; covalentes, como o próprio nome já diz, tratam-se da formação de ligações covalentes entre um grupo ligante da enzima e o suporte.⁶⁵

Figura 8. Métodos de imobilização enzimática



Fonte: adaptado de DONG-MEI *et al.* (2018).⁶⁴

A escolha do método de imobilização a ser utilizado depende das características do sistema no qual o catalisador gerado será aplicado, sendo assim, a avaliação das condições de cada técnica é imprescindível para a boa escolha, proporcionando um melhor resultado reacional. Parâmetros tais como especificidade, tempo reacional, custos, entre outros devem ser levados em consideração.⁶³

2.5.1 Imobilização de enzimas lacases

A **imobilização da enzima lacase** em diferentes suportes sólidos foi amplamente estudada nos últimos anos utilizando os diferentes métodos citados na seção anterior, como mostrado no trabalho de Fernández-Fernández *et al.*(2013).⁶² As áreas de aplicação para lacases estão aumentando, principalmente, devido à sua ampla faixa de possíveis substratos. Ademais, substratos de interesse que não podem ser oxidados devido unicamente ao impedimento estérico ou ao seu altos potenciais redox, podem ser oxidados em sistemas envolvendo a lacase e moléculas mediadoras da oxidação.⁶⁷

As aplicações destas enzimas abrangem diversos setores. Elas podem ser utilizadas, por exemplo, na descoloração de corantes, na degradação de xenobióticos no tratamento de águas residuais, no design de biosensores e na detecção de fenóis em águas residuais. Além disso, são diversas as aplicações nas indústrias alimentícia, de papéis – como exemplo os higiênicos –, e têxtil. A aplicação de lacases nos setores citados é ainda mais vantajosa quando feita a imobilização destas enzimas em suportes adequados, que possibilitam seu reuso, aumentam sua estabilidade, e até mesmo sua atividade catalítica. Essas propriedades têm atraído a atenção para o estudo de novos suportes para imobilização de lacases cada vez mais efetivos nas aplicações existentes e, além disso, para uso em novas aplicações.⁶² Lacases imobilizadas em **suportes orgânicos**,^{68; 69; 70; 71} e **inorgânicos**,^{72; 73; 74; 75; 76; 77; 78; 79; 80} são alguns exemplos destes catalisadores aplicados aos sistemas indicados.

Salis *et al.* (2009),⁷⁶ fizeram a extração, purificação e imobilização da lacase do cogumelo *P. sajor-cuju* em sílica mesoporosa (SBA-15), e aplicaram o complexo nas reações de oxidação de uma mistura de quatro compostos fenólicos: ácido protocatequínico, ácido ferúlico, ácido sinápico e ácido caféico. Estes compostos estão comumente presentes nas águas residuais das moendas de azeitonas, e são determinantes na fitotoxicidade destas águas. 100% dos compostos fenólicos foram eliminados em menos de 100 minutos para o primeiro ciclo de aplicação do complexo e, após 10 usos, 84% do substrato foi convertido. Em geral, os dados demonstraram excelente estabilidade enzimática após imobilização, e potencial aplicação para o tratamento de águas residuais.

Retornando ao trabalho de Liebminger *et al.* (2009),¹⁶ em que estudaram a oxidação de glicerol por *N*-oxil-2,2,6,6-tetrametilpiperidina (TEMPO) na presença de lacase de *T. hirsuta*. A análise dos produtos da reação indicou a oxidação sequencial a gliceraldeído, ácido glicérico

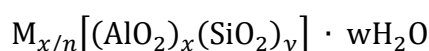
e ácido tartrônico, resultando finalmente em ácido mesoxálico. A obtenção dos produtos foi dependente da concentração de TEMPO utilizada. De modo a reduzir o custo da utilização da enzima, que atua na regeneração da molécula TEMPO, a oxidação do glicerol foi feita também com o uso de lacase imobilizada em *pellets* de alumina. Após 24 horas de reação utilizando a enzima livre, aproximadamente 70% do glicerol foi convertido, sendo que, para o caso de lacase imobilizada, a conversão foi de apenas 10%. A enzima livre sofreu perda de 76% de sua atividade após 24 horas de reação, enquanto que para a enzima imobilizada essa perda foi de 55%, indicando **maior estabilidade após a imobilização**. Em um trabalho similar, Hong *et al.* (2015),¹⁵ reportaram a conversão de glicerol a ácido glicérico – 7% do produto final – pela oxidação TEMPO-mediada da lacase de *Trametes versicolor* imobilizada em alginato de sódio. Eles compararam os resultados obtidos com os do trabalho pioneiro,¹⁶ e indicaram que as diferenças observadas são provavelmente relacionadas a natureza do suporte de imobilização, ao método de imobilização e as fontes enzimáticas – lacases de diferentes organismos apresentam diferentes potenciais redutores.

Em um outro trabalho, Hong *et al.* (2017),¹⁷ fizeram um estudo comparativo entre dois métodos de imobilização – aprisionamento em matriz de alginato de sódio e ligação covalente em aluminato sinalizado – para a lacase de *Trametes versicolor*. Foram realizados estudos sistemáticos da estabilidade e manutenção da enzima imobilizada, assim como a aplicação dos complexos em reações de oxidação de glicerol nas mesmas condições dos trabalhos citados no parágrafo anterior. Neste caso, os produtos principais obtidos foram gliceraldeído e ácido glicérico, e o método de aprisionamento teve produção duas vezes superior quando comparado com o método de ligação covalente. Os autores afirmaram que a complexidade de aplicação destes catalisadores na oxidação do glicerol é elevada, pois não é um sistema de oxidação direta, e envolve a ação de um intermediário de reação (TEMPO), com uma constante troca de elétrons entre todos os componentes reacionais.

Embora seja grande e variado o número de suportes utilizados para a imobilização de lacases, uma classe de materiais – vastamente utilizada para imobilização enzimática – tem sido também utilizada para imobilização de lacases, as **zeólitas**.^{77; 78; 79} Essa classe de materiais é descrita a seguir.

2.6 Zeólitas, nanozeólitas e sínteses de materiais zeolíticos

Zeólitas são alumino-silicatos cristalinos, microporosos e hidratados, formados a partir de uma rede tridimensional de $(\text{SiO}_4)^{4-}$ e $(\text{AlO}_4)^{5-}$ ligados tetraedricamente um ao outro pelo compartilhamento dos átomos de oxigênio.^{81; 82} Elas formam estruturas poliméricas a partir de unidades tetraédricas TO_4 , no qual T é um íon Si^{4+} ou Al^{3+} . Cada átomo O é compartilhado entre 2 átomos T, com ângulos T-O-T em torno dos átomos de oxigênio no intervalo de 125° a 180° , sendo esta a razão da existência de várias estruturas diferentes. A fórmula estrutural da zeólita é baseada na célula unitária cristalográfica:⁸³

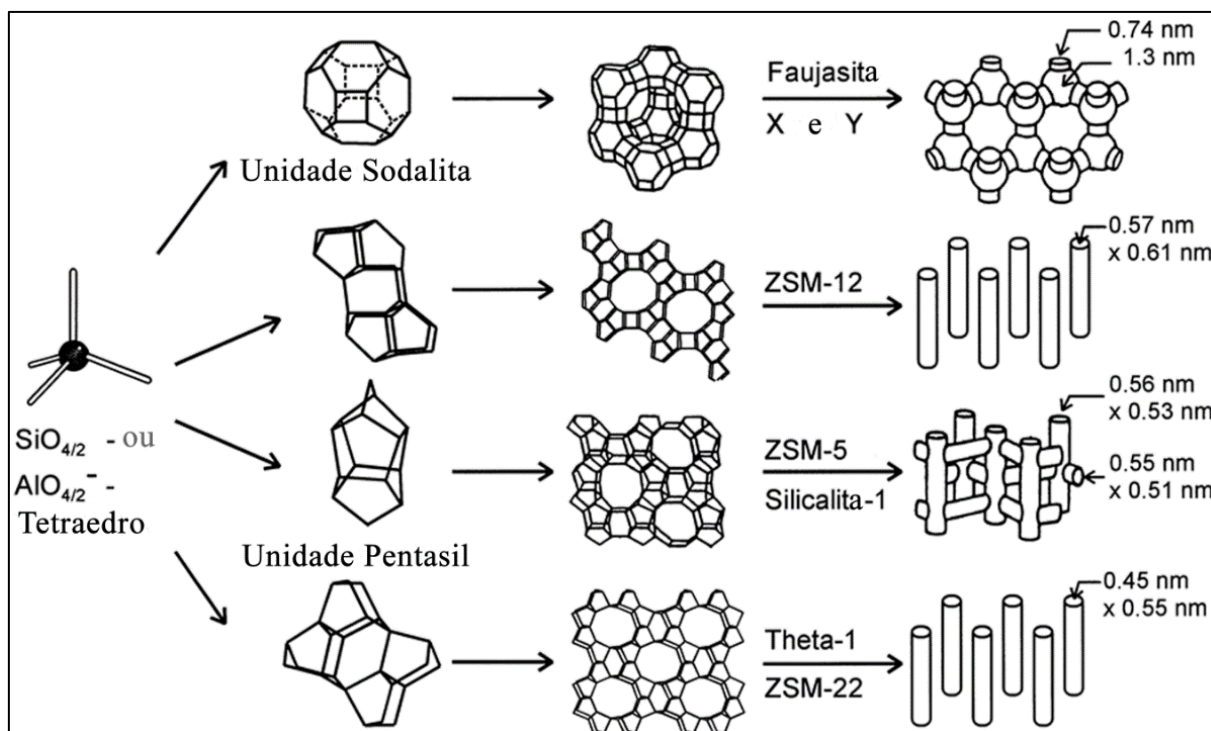


No qual M é um cátion alcalino ou alcalino terroso, n é a valência do cátion, w é o número de moléculas de água por célula unitária, x e y são os números totais de tetraedros por célula unitária.

A presença dos átomos de alumínio na rede induz a uma carga líquida negativa que pode ser variada mudando a relação Si/Al. Essa carga negativa é neutralizada pela presença de cátions metálicos ou orgânicos, denominados cátions extra-rede, geralmente localizados nos canais e cavidades, podendo ser trocados pelo tratamento de troca iônica com uma solução salina em condições físico-químicas apropriadas.

A estrutura tridimensional das zeólitas parte da formação das unidades primárias de construção composta pelos tetraedros do tipo TO_4 , seguidas das junções destas unidades para formação das unidades secundárias de construção constituídas de 4 a 16 átomos de T formando 16 tipos de unidades diferentes,⁸⁴ que então se ligam pra formar unidades mais complexas conhecidas como unidades poliédricas de construção,^{85; 86} e estas unidades formam os diferentes tipos de zeólitas. A **Figura 9** mostra a estrutura de alguns tipos de zeólitas.

Figura 9. Estrutura de quatro tipos de zeólitas (faujasitas X e Y; ZSM-12; ZSM-5 ou silicalita-1; Theta-1 ou ZSM-22) e seus respectivos sistemas microporosos e dimensões.



Fonte: adaptado de WEITKAMP (2000).⁸⁷

As **nanozeólitas** têm um tamanho menor que 1000nm e as suspensões coloidais de zeólitas com tamanho de partículas inferiores a 200 nm têm recebido uma atenção especial.²⁸ A diminuição dos materiais zeolíticos da escala micrométrica para a escala nanométrica acarreta **mudanças nas propriedades físico-químicas** desses materiais. A proporção entre o número de átomos (externos/internos) aumenta rapidamente com a redução do tamanho das partículas, assim nanozeólitas possuem uma ampla área de superfície externa e alta atividade catalítica superficial. A acidez da superfície externa tem grande importância quando a zeólita é destinada a ser utilizada como catalisador em reações envolvendo moléculas volumosas. Além disso, os nanocristais de zeólitas têm reduzida limitação de difusão em comparação com os cristais de zeólitas de tamanho micrométrico.^{28; 88}

A síntese dos nanocristais de zeólita na forma de suspensões coloidais estáveis foi um dos desenvolvimentos mais importantes na ciência das zeólitas durante na década de 1990. Vários materiais microporosos das famílias **MFI**-, **LTA**-, **FAU**-, **BEA**- foram preparados na forma de suspensões coloidais com distribuição de tamanho na escala nanométrica. Estudos indicam que a síntese desses materiais é direcionada pela composição química global da mistura dos reagentes e as variáveis termodinâmicas.⁸⁹

Nanozeólitas oferecem amplas vantagens em aplicações catalíticas e adsorptivas. Entre suas utilizações, podemos citar seu uso em sensores, filmes, diagnósticos médicos e separação de materiais. Além disso, elas também podem ser utilizadas na construção de materiais estruturados e na síntese de sólidos porosos.⁹⁰

A via hidrotérmica é o principal processo de síntese de zeólitas/nanozeólitas, no qual geralmente são necessários uma fonte de silício (SiO_2), uma fonte de alumínio (Al_2O_3), um solvente (H_2O) e um agente mineralizante como OH^- , e, para zeólitas com alta razão Si/Al, moléculas orgânicas atuantes no direcionamento de estruturas (*Structure Direction Agent - SDA*). Os cátions metálicos inorgânicos, como Na^+ ou K^+ tem importante papel na neutralização da carga da estrutura. Sílica coloidal e sílica amorfa são as fontes de silício mais comumente usadas na síntese de zeólitas, enquanto as fontes de alumínio são aluminato de sódio e hidróxido de alumínio.⁹¹

Na forma mais comum as zeólitas possuem Si e Al na sua composição, mas no protocolo de síntese o alumínio pode ser substituído por outros metais como o titânio, germânio, vanádio – entre outros –, possibilitando a síntese de novos materiais, com estruturas que além dos tetraedros de silício, possuem unidades octaédricas destes materiais. A ordem de adição e os tipos de reagentes são fatores influentes na síntese das zeólitas. Fatores como velocidade de agitação do sistema (homogeneização), envelhecimento do gel, temperatura de cristalização também são influentes na síntese. A interferência nos parâmetros de síntese permite a obtenção de diversas estruturas diferentes de zeólitas.⁹¹

Considerando, principalmente, as modificações físico-químicas na superfície externa desses materiais na escala nanométrica outras aplicações podem ser exploradas, tais como o *uso de nanozeólitas para a imobilização de enzimas*.²⁵

2.6.1 Imobilização de enzimas em materiais zeolíticos

O uso de zeólitas como suporte de imobilização enzimática é considerado uma maneira apropriada de combinar as vantagens de ambos catalisadores heterogêneos e enzimáticos. Este processo de imobilização de enzimas em suportes zeolíticos já vem sendo explorado, com sucesso, há cerca de duas décadas, principalmente para as zeólitas mais tradicionais.^{19; 20; 21}

As zeólitas apresentam algumas características físico-químicas peculiares que as tornam muito atraentes para a imobilização de enzimas. As zeólitas são materiais que apresentam propriedades de fácil modulação, tais como comportamento hidrofílico/hidrofóbico, caráter ácido/base, resistência química e mecânica, tamanho e morfologia cristalina, área externa/área superficial total e o diâmetro dos poros. Sua dispersão/recuperação fácil em água representa uma vantagem adicional.⁶⁶ Um dos mais importantes parâmetros na composição da estrutura da zeólita é a proporção Si:Al. De fato, a quantidade de alumínio da estrutura cristalina determinará o balanço de carga total da zeólita, além disso a quantidade e os diferentes tipos de cátions de compensação necessários para estabilizar a estrutura zeolítica influenciam drasticamente as características hidrofóbica/hidrofílica e ácido/base da zeólita.²¹

São, em geral, recentes os trabalhos utilizando zeólitas como suportes para imobilização de lacases. Celikbicak *et al.* (2014),⁷⁸ utilizaram a zeólita natural Heulandita modificada com polímeros funcionais para imobilização covalente da lacase de *T. versicolor* e obtiveram complexos mais estáveis e com maior eficiência na descoloração corantes, em comparação com a enzima livre. Em outro estudo, Wehaidy *et al.* (2019),⁷⁹ aplicaram a zeólita tipo X como suporte para imobilização da lacase de *P. durus* e obtiveram um bom catalisador – estável – para a descoloração de corantes e tratamento de águas residuais. Mais recentemente – 2020 – um estudo comparou a utilização de zeólita Y (NaY), e seus derivados após desaluminação (DAY) e dessilicação (DSY), para imobilização por adsorção da lacase de *T. versicolor* e aplicação dos complexos na biodegradação de bisfenol A. Eles observaram que todos os complexos foram mais estáveis e efetivos em comparação com a enzima livre, com destaque para o complexo DAY.⁷⁷

Embora desde a década de 1990 as **nanozeólitas** tenham recebido considerável atenção devido ao seu elevado potencial em solucionar problemas de difusão na catálise de moléculas grandes e na preparação de materiais zeolíticos estruturados com uma porosidade hierárquica, apenas recentemente esses nanomateriais começaram a ser utilizados para algumas aplicações não convencionais – imobilização de enzimas, por exemplo – devido às propriedades físico-químicas atrativas de suas superfícies.²²

De maneira análoga as zeólitas na escala micrométrica, as nanozeólitas são também capazes de imobilizar enzimas. Estudos sistemáticos da aplicação de nanozeólitas para imobilização enzimática são bastante recentes, datando da década de 2000. Os principais estudos reportados na literatura tratam da imobilização de biomoléculas em nanozeólitas das

famílias LTL (Citocromo C, Mioglobina e Transferrina),²³ Beta (Tripsina, Ferritina, Ovalbumina, Lisozima, Peptídeos e Tirosinase),^{22; 23; 24; 25} Silicalita-1 e ZSM-5 (Ferritina, Ovalbumina e Lisozima).^{22; 23}

Em um estudo bastante recente de Mahmoodi *et al.* (2020),⁹² um composto formado por nanozeólitas em conjunto com nanotubos de carbono foram utilizados para imobilização covalente da enzima lacase – organismo de origem não mencionado no texto – e aplicação na descoloração de **Direct Red 23**. O nanocomposto obtido foi utilizado por diversos ciclos manteve excelente performance de degradação do corante testado, e eles apontaram também melhora na termoestabilidade da enzima após imobilização.

Embora nanozeólitas de estruturas cristalográficas diferentes tenham sido utilizadas, os dados dos estudos mencionados acima revelam um padrão de comportamento bastante semelhante no tocante a **imobilização de enzimas**: grande quantidade de biomoléculas imobilizadas, alta estabilidade térmica, e alta eficiência dos complexos formados. A **alta eficiência catalítica** dos biocatalisadores – complexos nanozeólitas/enzimas – pode ser atribuída a grande área superficial e a uniformidade da estrutura cristalina,²⁸ e é certamente resultado das interações físico-químicas entre enzima e suporte.

Em síntese, a revisão bibliográfica realizada abordou um sistema pouco estudado até o momento – **a oxidação do glicerol lacase/TEMPO-mediada** –, de alto valor econômico-industrial e, principalmente, de caráter sustentável. Adicionalmente, foi levantada a necessidade de obter-se um catalisador efetivo e seletivo para esta aplicação. Este catalisador seria possivelmente obtido a partir da imobilização da enzima lacase em um suporte que mantivesse – ou até mesmo, melhorasse – sua atividade catalítica neste sistema. **Seriam nanozeólitas suportes efetivos para esta aplicação?** Essa pergunta chave foi a base e motivou este estudo. Além disso, até o presente momento – no melhor do nosso conhecimento – não se encontra na literatura registros do uso de nanozeólitas como suporte sólido para imobilização das enzimas lacases de *Pleurotus ostreatus*, *Agaricus bisporus* e *Aspergillus sp.* e aplicação dos complexos nas reações de oxidação seletiva do glicerol – não há relatos também do uso destas enzimas imobilizadas em outros suportes ou na forma livre no sistema proposto.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivos gerais

Este trabalho teve como objetivos principais: a síntese e caracterização de diferentes tipos de nanozeólitas; a preparação e estudo dessas matrizes zeolíticas como suporte para imobilização de lacases derivadas de diferentes microrganismos; e, por fim, avaliar a aplicação de enzimas livres ou imobilizadas na catálise oxidativa do glicerol TEMPO-mediada.

3.2 Objetivos específicos

- Sínteses das nanozeólitas FAU, TS-1, ZSM-5, BEA e LTA;
- Caracterização das nanozeólitas sintetizadas por técnicas de física do estado sólido, tais como: Difração de Raios-X de materiais policristalinos (DRX), Microscopia Eletrônica de Varredura e Transmissão (MEV e MET), Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR);
- Funcionalização dos materiais nanozeolíticos com uso de agentes espaçadores 3-aminopropil-trimetóxisilano (APTMS) e glutaraldeído (GA) para posterior utilização destes na imobilização de lacases covalentemente.
- Elaboração de protocolos para estudos enzimáticos no tangente às técnicas de imobilização, medida de atividades e caracterizações bioquímicas.
- Imobilização das lacases comerciais dos organismos *Pleurotus ostreatus*, *Agaricus bisporus* e *Aspergillus* sp. sobre os novos suportes zeolíticos funcionalizados;
- Quantificação da quantidade de proteína adsorvida nos suportes zeolíticos pela técnica de absorção molecular na região uv/vis em 595 nm utilizando Coomessie G-250;
- Avaliação das atividades enzimáticas dos complexos pela oxidação de 2,2-azinobis-(ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico) (ABTS), para a seleção dos complexos que apresentaram maiores atividades para aplicação na reação de oxidação do glicerol;
- Aplicação das nanozeólitas como sintetizadas e das enzimas livres em reações de oxidação do glicerol TEMPO-mediada para controle (branco) da ação isolada das biomoléculas e dos suportes na reação proposta;
- Aplicação dos complexos lacase/nanozeólita selecionados na reação de oxidação do glicerol TEMPO-mediada.

- Análise dos produtos de oxidação por cromatografia líquida de alta performance e variação das condições experimentais visando otimização de produção e maior seletividade catalítica dos materiais selecionados;
- Estudos por meio da técnica espectroscópica Ressonância Paramagnética Eletrônica (EPR), e da técnica eletroquímica Voltametria Cíclica (CV) da lacase LAsp na forma livre ou imobilizada, para auxiliar o entendimento dos mecanismos reacionais envolvidos, e também as variações em relação à sua estrutura-função devido às interações físico-químicas entre enzima e suportes.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Todos os reagentes utilizados neste trabalho, incluindo enzimas, foram adquiridos da Sigma-Aldrich. Foram utilizados sais inorgânicos e as bases orgânicas para a preparação das matrizes nanozeolíticas, assim como compostos orgânicos utilizados na funcionalização química destes materiais, de acordo com protocolos descritos nas próximas seções. As enzimas estudadas foram as lacases (EC 1.10.3.2) de *Pleurotus ostreatus*, *Agaricus bisporus* e *Aspergillus* sp.. Glicerol (>99%), *N*-oxil-2,2,6,6-tetrametilpiperidina (TEMPO) e 2,2'-azino-bis(ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico) (ABTS), 4-oxo-TEMPO, 4-amino-TEMPO, 4-hydroxy-TEMPO, óxido de grafeno (15-20 folhas, 4 – 10% bordas-oxidadas), nanoplatelets de grafeno, catecol, solução nafion (5% em álcoois de cadeia curta), etanol (99,8%), ácidos e solventes e padrões cromatográficos. Todos os reagentes foram utilizados como adquiridos, exceto a lacase de *Aspergillus* sp., que em certos casos passou por um processo de filtragem, protocolo descrito no item 4.8.

4.1 Sínteses das nanozeólitas

Seguindo as metodologias descritas na literatura, foram sintetizadas as nanozeólitas Faujasita tipo X (FAU),^{88; 93} Titanosilicalita 1 (TS-1),^{94; 95} ZSM-5,⁹⁶ Linde tipo A (LTA),⁹⁷ e Beta (BEA),⁹⁸ com adaptações pertinentes ao sistema estudado.

4.1.1 Síntese da Nanozeólita Faujasita tipo X

A nanozeólita faujasita tipo X foi sintetizada de acordo com o seguinte protocolo: 5,34 g de hidróxido de sódio e 2,42 g de aluminato de sódio foram solubilizados em 50,0 g de água destilada. À solução formada foram acrescentadas 3,43 g de sílica fumed, para que a proporção molar do gel de síntese, $5,5 \text{ Na}_2\text{O} : 1,0 \text{ Al}_2\text{O}_3 : 4,0 \text{ SiO}_2 : 190 \text{ H}_2\text{O}$, fosse completada. O gel foi então deixado sob agitação magnética (250 rpm) para cristalização por 2 dias a 60 °C. O produto obtido, denominado FAU/Na⁺, foi recuperado por centrifugação (15000 rpm), lavado com água deionizada repetidamente, e seco em estufa a 50 °C por 24 horas. Os padrões de DRX desta amostra estão ilustrados na **Figura 12**, e com mais detalhes na **Figura 15**.

4.1.2 Síntese da Nanozeólita Titanosilicalita 1

A síntese da nanozeólita Titanosilicalita 1 foi feita de acordo com o seguinte protocolo: 26,4 g de tetraetilortosilicato e 2,52 g de tetrabutylortotitanato foram adicionadas em um frasco de polipropileno e agitadas à temperatura ambiente (~10 min) até a formação de uma mistura homogênea. Em um recipiente separado, 44,14 g de uma solução de hidróxido de tetrapropilamônio 1M foi misturada com 6,91 g de água deionizada. A solução de base orgânica diluída foi então cuidadosamente adicionada à mistura de silicato e titanato (sob agitação vigorosa) à taxa de 1 mL min⁻¹ com auxílio de uma bureta. Ao fim da adição, o conteúdo foi deixado sob agitação por 1 hora, seguido da adição de 6,91 g de água destilada à mistura, para que a proporção molar final do gel, 0,36TPAOH: 0,06TiO₂: 1,00SiO₂: 16,2H₂O: 4EtOH: 0,24BuOH, fosse atingida. A solução resultante foi deixada sob agitação *overnight*, envelhecida em condições estáticas por 1h, transferida para recipiente de teflon 120 mL, e este colocado em uma autoclave de aço inox, hermeticamente fechada, e por fim levado para cristalização em estufa a 100 °C por 24 horas. O produto obtido foi recuperado por centrifugação (16.000 rpm), lavado com água deionizada repetidamente, e seco em estufa a 50 °C por 16 horas. O sólido final, denominado **TS-1**, foi calcinado a 500 °C por 8 horas para remoção da fase orgânica. A amostra calcinada foi denominada **TS-1c**. Os padrões de DRX das amostras como sintetizada e após calcinação estão ilustrados na **Figura 14**, com mais detalhes para a amostra calcinada na **Figura 17**.

4.1.3 Síntese da Nanozeólita ZSM-5

A síntese da nanozeólita ZSM-5 foi feita de acordo com o seguinte protocolo: uma solução contendo 0,34 g isopropóxido de alumínio, 30,60 g hidróxido de tetrapropilamônio 1M e 11,70 g de água destilada foi preparada em um frasco de polipropileno. A solução formada foi deixada sob agitação magnética à temperatura ambiente por uma hora. Depois de decorrido o tempo de agitação, 17,11 g tetraetilortosilicato foram adicionadas gota-a-gota com o auxílio de uma bureta à esta solução, e o conjunto deixado sob agitação por 72 horas em temperatura ambiente. Posteriormente, a suspensão formada foi transferida para recipiente de teflon 120 mL, e este colocado em uma autoclave de aço inox, hermeticamente fechada, e por fim levado para cristalização em estufa a 90 °C por 24 horas. A composição molar final foi 4,5(TPA)₂O: 0,25Al₂O₃: 25SiO₂: 599H₂O. O produto obtido foi recuperado por centrifugação (19000 rpm),

lavado com água deionizada repetidamente, e seco em estufa a 50 °C por 24 horas. O sólido final, denominado **ZSM-5**, foi calcinado a 500 °C por 8 horas para remoção da fase orgânica. A amostra calcinada foi denominada **ZSM-5c**. Os padrões de DRX das amostras como sintetizada e após calcinação estão ilustrados na **Figura 14**, e com mais detalhes para a amostra calcinada na **Figura 17**.

4.1.4 Síntese da Nanozeólita LTA

A síntese da nanozeólita LTA foi feita de acordo com o seguinte protocolo: em um frasco de polipropileno, 0,26 g de hidróxido de sódio foram dissolvidas em 17,90 g de água destilada. Após dissolução, 53,01 g de hidróxido de tetrametilamônio foram adicionados à mistura. A solução final anterior foi dividida igualmente em dois béqueres. Ao conteúdo de um dos béqueres, foram adicionadas 4,21 g de isopropóxido de alumínio, e a mistura deixada sob agitação magnética até clareamento da solução. Ao outro béquer, foram adicionadas 9,01 g de sílica coloidal (Ludox 40%), e o conteúdo mantido sob agitação magnética até homogeneização. Para prosseguimento da síntese, o conteúdo do béquer contendo isopropóxido de alumínio foi adicionado ao béquer contendo sílica coloidal, e mistura final agitada magneticamente até formação de um gel expesso. O gel foi então deixado sob condições estáticas e temperatura ambiente por 4 dias para envelhecimento. Após o envelhecimento, o gel foi transferido para recipiente de teflon 120 mL, e este colocado em uma autoclave de aço inox, hermeticamente fechada, e por fim, levado para cristalização em estufa a 100 °C por 24 horas. O produto obtido foi recuperado por centrifugação (18000 rpm), lavado com água deionizada repetidamente, e seco em estufa a 80 °C por 12 horas. O sólido final, denominado **LTA**, foi calcinado a 600 °C por 9 horas para remoção da fase orgânica. A amostra calcinada foi denominada **LTAc**. Os padrões de DRX das amostras como sintetizada e após calcinação estão ilustrados na **Figura 14**, e com mais detalhes para a amostra calcinada na **Figura 15**.

4.1.5 Síntese da Nanozeólita Beta

A síntese da nanozeólita Beta foi feita de acordo com o seguinte protocolo: em um frasco, 0,56 g de isopropóxido de alumínio foram dissolvidos em 37,0 g de hidróxido de tetraetilamônio, e o conteúdo agitado magneticamente por uma hora. Em seguida, 6,05 g de Cab-o-sil foram adicionadas à solução anterior, e o gel formado deixado sob agitação *overnight*

para envelhecimento. Após o envelhecimento, o gel foi transferido para recipiente de teflon 120 mL, e este colocado em uma autoclave de aço inox, hermeticamente fechada, e por fim, levado para cristalização em estufa por 5 dias a 140°C. O produto obtido foi recuperado por centrifugação (18000 rpm), lavado com água deionizada repetidamente, e seco em estufa a 80 °C por 12 horas. O sólido final, denominado **BEA**, foi calcinado a 600 °C por 9 horas para remoção da fase orgânica. A amostra calcinada foi denominada **BEAc**. Os padrões de DRX das amostras como sintetizada e após calcinação estão ilustrados na **Figura 14**.

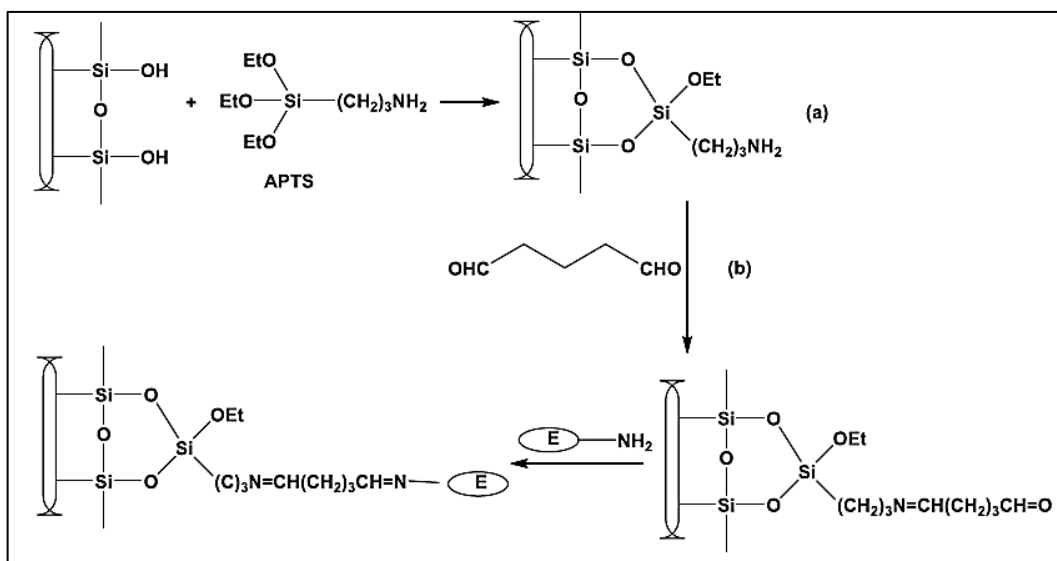
4.1.6 Troca Iônica da Nanozeólita FAU/Na⁺ com Cu²⁺

A troca iônica foi realizada conforme descrito na literatura.^{26; 99} Quantidades de sólido (FAU/Na⁺) foram suspensos em soluções 0,5 molar (0,5M) de sulfato de cobre penta-hidratado (proporção 1 g de nanozeólita para 30 mL de solução), mantidos em agitação magnética por 1 hora, e então deixados em estufa a 80 °C por 7 dias. Após este período, as amostras foram separadas por centrifugação (15000 rpm), lavadas com água deionizada repetidamente, e secas em estufa a 60 °C em placas de cristalização *overnight*. A amostra obtida foi denominada **FAU/Cu²⁺**. Os padrões de DRX desta amostra estão ilustrados na **Figura 19**.

4.2 Funcionalização química da superfície das nanozeólitas sintetizadas

Na literatura, é conhecido que as nanozeólitas contêm por toda superfície uma elevada densidade de grupos silanóis (Si–OH) distribuídos.⁸¹ Algumas nanozeólitas se apresentam como bons trocadores iônicos e outras não, o que implica em maiores ou menores percentuais de imobilização. Uma alternativa é a funcionalização química da superfície das nanozeólitas utilizando amino silanos como substituintes dos grupamentos OH dos grupos silanóis, e a adição de um agente reticulante “cross-linker”, como o glutaraldeído, permitindo a imobilização enzimática via ligação covalente. A ligação covalente entre glutaraldeído e enzimas preferencialmente ocorre com os resíduos de lisina das superfícies proteicas, e dessa forma, mantêm suas atividades biológicas.¹⁰⁰ Para isto, um experimento em duas etapas foi feito, conforme trabalho realizado por David *et al.* (2006),¹⁰¹ descrito em detalhes a seguir. A **Figura 10** apresenta um esquema da rota de funcionalização utilizada para o caso do amino silano 3-aminopropiltriétoxisilano (APTS) para exemplificar as ligações envolvidas neste processo.

Figura 10. Funcionalização química de superfície de silicatos por silanização com amino silanos e ativação com agente espaçador glutaraldeído, para posterior imobilização enzimática via ligação covalente.



Fonte: CARDOSO *et al.* (2009).¹⁰²

4.2.1 Primeira etapa: Silanização das nanozeólitas sintetizadas

Nesta etapa, as nanozeólitas FAU/Na^+ , TS-1c, ZSM-5c, FAU/Cu^{2+} , LTAc e BEAc foram suspensas em soluções contendo 3-aminopropil-trimetóxisilano (APTMS) ($\text{H}_2\text{N(CH}_2\text{)}_3\text{Si(OCH}_3\text{)}_3$), e diclorometano (DCM), na proporção 1g de zeólita para 1 mL de APTMS e 30 mL de DCM. As reações foram feitas em frascos de polipropileno fechados e selados, a temperatura ambiente, por 16 horas, sob agitação magnética. Após decorrido o tempo reacional as garrafas foram deixadas abertas em capela para evaporação do solvente (DCM). Em seguida, os produtos foram lavados e centrifugados (16000 rpm) repetidamente, colocados em placas de cristalização e deixados em estufa a 60°C para secagem por 12 horas. As amostras foram então chamadas **FAU/Na⁺/APTMS**, **TS-1c/APTMS**, **ZSM-5c/APTMS**, **FAU/Cu²⁺/APTMS**, **LTAc/APTMS** e **BEAc/APTMS**.

4.2.2 Segunda etapa: Funcionalização com glutaraldeído dos materiais silanizados

Após secagem, os materiais foram ressuspensos em solução de glutaraldeído (GA) 5% v/v, na proporção 1 g de zeólita quimicamente modificada para 20 mL de glutaraldeído. As reações foram feitas em balões de 50 mL (tampados), por 24 horas, a temperatura ambiente,

sob agitação magnética. Em seguida, os produtos foram centrifugados, os sobrenadantes descartados, e os precipitados lavados repetidamente com água destilada. Os materiais finais foram colocados para secagem em placas de cristalização a temperatura ambiente. As amostras resultantes desta etapa foram identificadas com os códigos **FAU/Na⁺/APTMS/GA**, **TS-1c/APTMS/GA**, **ZSM-5c/APTMS/GA**, **FAU/Cu²⁺/APTMS/GA**, **LTAc/APTMS/GA**, e **BEAc/APTMS/GA**, materiais estes utilizados para a imobilização das enzimas lacase em estudo.

4.3 Caracterização dos materiais zeolíticos sintetizados

As nanozeólitas sintetizadas foram caracterizadas pelas técnicas de física do estado sólido, Difração de Raios X (DRX) e Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), análises realizadas na UNESP – Campus de São José do Rio Preto/SP. As análises de Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier com Refletância Total Atenuada (ATR-FTIR) foram realizadas no Laboratório de Sucroquímica e Química Analítica (LSQA) na Unesp de São José do Rio Preto. Também foram realizadas análises de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Transmissão (MET) no Laboratório de Caracterização Estrutural do Departamento de Engenharia de Materiais (LCE/DEMa) da Universidade Federal de São Carlos (UFSCAR) – São Carlos/SP.

Os padrões de DRX das partículas sintetizadas foram coletados utilizando um Rigaku MiniFlex II (Tóquio, Japão) com uma fonte de ânodo rotativo com uma placa plana na geometria de Bragg-Brentano, operando com radiação Cu-K α (comprimento de onda = 1,5418 Å) à 40 kV e 40 mA, e equipado com um monocromador de grafite. Os padrões de difração em pó foram registrados na faixa de $2\theta = 3-50^\circ$ com razão do goniômetro de $2^\circ (2\theta) \text{ min}^{-1}$.

Os espectros de FTIR foram coletados por meio de espectrômetro SHIMADZU (IRTracer-100) e os de ATR-FTIR foram coletados por meio de espectrômetro Perkin-Elmer (FT-IR spectrum). Todas as amostras foram analisadas por 32 vezes na capacidade de resolução espectral de 2 cm^{-1} entre 4000 cm^{-1} e 400 cm^{-1} .

As imagens de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) foram registradas utilizando os instrumentos FEI Magellan 400 L e Philips XL-30 FEG, ambos acoplados a analisadores de energia dispersiva de raios X (EDS), e operando com um feixe de elétrons

regulável para tensões de 5 a 25 kV. Antes das análises, um revestimento fino de ouro foi depositado sobre as amostras.

As análises de microscopia eletrônica de transmissão foram feitas a partir de um microscópio FEI TECNAI G2 F20 HRTEM cuja fonte de emissão é um canhão de efeito de campo a 200 kV. Este equipamento possui detectores de campo claro e escuro e está acoplado a um analisador de energia dispersiva de raios X (EDS). Antes de realizar as medidas, as amostras foram dispersadas em isopropanol e em seguida depositadas numa grade de cobre e secas em alto vácuo.

4.4 Imobilização de enzimas sobre as nanozeólitas

As enzimas lacase comerciais dos organismos *Pleurotus ostreatus* (LPO), *Agaricus bisporus* (LAB) e *Aspergillus* sp. (LAsp) foram imobilizadas covalentemente sobre as diferentes nanozeólitas sintetizadas após respectivas modificações químicas realizadas. Os protocolos de imobilização foram adaptados do trabalho de Bautista *et al.* (2010).⁷³ Previamente, soluções estoque das lacases LPO e LAB foram preparadas, pela dissolução da enzima (extrato sólido) em tampão acetato (100 mM, pH 5), na proporção 0,5 mg de extrato para cada mL de tampão. Para o caso da lacase LAsp, produto adquirido em solução, não houve necessidade de preparação de solução estoque, e quantidades da solução comercial foram diluídas em tampão apenas no momento da imobilização ou demais usos.

Para imobilização, quantidades de nanozeólitas funcionalizadas foram suspensas em soluções enzimáticas 1,0 U/mL – atividades das soluções ajustadas com base nas atividades específicas de cada enzima, disponíveis na **Tabela 1** – na proporção 1 g de nanozeólita para cada 15 mL de solução enzimática, e mantidas sob agitação magnética branda por 16 horas em temperatura ambiente. Após este período, as amostras foram centrifugadas (13000 rpm), e os sobrenadantes armazenados para posteriores quantificações das porcentagens de enzimas imobilizadas, e/ou verificação da atividade enzimática remanescente. Os suportes com as enzimas imobilizadas foram secos a 25°C, e então armazenados em geladeira (8°C) para futuras aplicações.

As concentrações de enzimas imobilizadas foram determinadas através do método descrito por Bradford (1976),¹⁰³ que utiliza Albumina de Soro Bovino (ASB) como padrão. A

quantidade de proteína adsorvida sobre a matriz Pg (mg/g) foi calculada de acordo com Yagiz, Kazan e Akin (2007),¹⁰⁴ pela **Equação 1**.

$$Pg = V_0(C_0 - C_f)/m$$

Equação 1. Concentração de proteína imobilizada

Em que:

C_0 é a concentração de proteína inicial (mg/mL),

C_f concentração da proteína do filtrado (mg/mL),

V_0 o volume inicial da solução de lipase (mL),

m é a massa do suporte nanozeolítico utilizado (g).

De acordo com o protocolo adotado, 950 μ L de reagente Bradford foram adicionados em um eppendorf, seguido da adição de 50 μ L de solução enzimática. Após 20 minutos, as absorvâncias das amostras foram coletadas em espectrofotômetro utilizando um comprimento de onda de 595 nm.

As concentrações das soluções estoque de LPO e LAB e da solução comercial de LAsp ($\text{mg}_{\text{enzima}}/\text{mL}$) foram também determinadas com base neste protocolo, a partir da obtenção de uma curva de calibração do padrão ASB. Na **Tabela 1** estão apresentadas as concentrações determinadas para as soluções e as atividades específicas para oxidação de ABTS ($U/\text{mg}_{\text{enzima}}$) destas enzimas, determinadas de acordo com o Protocolo 1 que será descrito na próxima seção.

Tabela 1. Concentração das soluções estoque das lacases LPO e LAB, e da solução comercial da LAsp e respectivas atividades específicas.

Lacase	Concentração da solução estoque ($\text{mg}_{\text{enzima}}/\text{mL}$)	Atividade específica ($U/\text{mg}_{\text{enzima}}$)
<i>P. ostreatus</i> – LPO	$0,050 \pm 0,005$	28 ± 2
<i>A. Bisporus</i> – LAB	$0,020 \pm 0,004$	14 ± 2
<i>Aspergillus</i> sp. – LAsp	$13,6 \pm 0,3$	17 ± 2

4.5 Medida da Atividade Enzimática por espectroscopia

As atividades enzimáticas das lacases nas formas livres ou imobilizadas foram determinadas de acordo com Niku-Paavola *et al.* (1990),¹⁰⁵ e adaptações do trabalho de Liebminger *et al.* (2009).¹⁶ Pelo acompanhamento do produto da reação de oxidação do

substrato ABTS ($\epsilon_{436} = 29200 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$) em espectrofotômetro uv-vis (marca QUIMIS®, modelo Q798U); variando-se parâmetros, tais como: temperatura, tempo de exposição à diferentes temperaturas, pH e efeito de diferentes concentrações de metais de transição em solução; os comportamentos das lacases LPO, LAB e LAsp puderam ser avaliados, visando um melhor conhecimento desses catalisadores biológicos, conhecimento fundamental para as futuras aplicações objetivadas. A seguir estão descritos os diferentes protocolos utilizados para análise dos parâmetros mencionados. Os protocolos foram estabelecidos com base em uma série de ensaios sistemáticos prévios, fazendo-se adaptações cuidadosas do protocolo reportado, com a finalidade de adequar a metodologia para obter as informações necessárias para o nosso sistema. Uma unidade de atividade enzimática U é definida como sendo a quantidade de enzima (livre ou imobilizada) que oxida 1 μmol de ABTS por minuto.

4.5.1 Protocolo 1 – verificação da atividade enzimática das soluções estoque e das soluções antes ou após imobilização

Em cubeta de vidro ($l=0,5 \text{ cm}$) foram adicionados 1440 μL de tampão acetato (100 mM, pH 5), 20 μL de ABTS em solução aquosa (11 mg/mL) e 40 μL de solução enzimática, nessa ordem, integralizando um volume total de reação igual a 1500 μL . A variação da absorbância foi coletada por 3 minutos a 436 nm, e o valor de absorbância após 1 minuto padronizado como valor para cálculo da atividade (U), numericamente calculada pela **Equação 2** e expressa em U/L .

$$U = \left(\left\{ \frac{Abs * V_t}{\epsilon * l * V_e * T} \right\} * 10^3 \right) * D$$

Equação 2. Atividade enzimática de lacases em solução ou imobilizadas.

No qual U , unidade de atividade enzimática é expressa em $\mu\text{moles L}^{-1} \text{ min}^{-1}$; **Abs**, absorbância da amostra em 436 nm (em relação a um branco nas condições do ensaio sem a presença de enzima); V_t , o volume total da reação (1,5 mL); V_e , o volume de solução enzimática (40 μL) ϵ , o coeficiente de extinção molar ($29200 \text{ mol}^{-1} \text{ L cm}^{-1}$); l o caminho ótico (0,5 cm); T , o tempo de reação; 10^3 , é o fator de correção das unidades; D , a diluição da amostra, se necessário.

4.5.2 Protocolo 2 – verificação da atividade enzimática variando-se a temperatura

Inicialmente, uma solução estoque de substrato foi preparada pela diluição de ABTS em tampão acetato (100 mM, pH 5), 0,5 mg/mL. Para cada ensaio, 1460 μ L de substrato foram adicionados em tubos de ensaio e estes incubados em banho termostaticado, sob temperaturas no range de 20 a 90°C, por 5 minutos para estabilização térmica. Após estabilização, 40 μ L de solução enzimática foram adicionados ao tubo, seguido de leve agitação manual do mesmo para dispersão. A absorbância da amostra foi coletada em 436 nm após 3 minutos de incubação. Todos os ensaios feitos em triplicata. Branco determinado pela absorbância do substrato antes da adição de enzima.

4.5.3 Protocolo 3 – verificação da atividade enzimática variando-se o tempo de incubação

Em eppendorfs, quantidades das soluções enzimáticas estoque foram incubadas nas temperaturas 30, 45 ou 60°C, e a atividade enzimática verificada de acordo com o protocolo 2 para diferentes tempos de incubação.

4.5.4 Protocolo 4 – verificação da atividade enzimática variando-se o pH

Inicialmente, soluções estoque de substrato foram preparadas pela diluição de ABTS em diferentes tampões (100 mM), 0,5 mg/mL. Os tampões utilizados foram: fosfato (pH 2), citrato (pH 3), acetato (pHs 4 e 5), succinato (pH 6) e fosfato de sódio (pHs 7 e 8). Os ensaios foram realizados de acordo com o protocolo 2 na temperatura de 45 °C e utilizando os diferentes substratos mencionados neste protocolo.

4.5.5 Protocolo 5 – verificação da atividade enzimática na presença de metais de transição

Para este protocolo, o procedimento descrito no protocolo 2 foi adaptado. Sulfatos de cobre, níquel, zinco, manganês, cobalto e magnésio foram solubilizados previamente no substrato (ABTS em tampão acetato 0,15 mg/mL) para que as concentrações dos metais de transição variassem entre 20 a 100 mM. O restante do protocolo foi seguido sem modificações.

4.5.6 Protocolo 6 – verificação da atividade enzimática dos complexos enzima/nanozeólita

Em tubo de vidro (20 mL) contendo 1480 μL de tampão acetato (100 mM, pH 5) e 20 μL de ABTS em solução aquosa (11 mg/mL), 2 mg de complexo (lacase/nanozeólita) foram suspensos, em temperatura ambiente e sob agitação magnética branda. A mistura foi deixada nas condições do ensaio por 9,5 minutos, seguido de 0,5 minuto de centrifugação (13000 rpm), e por fim, o sobrenadante transferido para cubeta de vidro e absorvância coletada a 436 nm. Atividade determinada também pela **Equação 2**, substituindo a incógnita V_e pela massa (mg) de complexo utilizada no ensaio, atividade **U** expressa em $\mu\text{U}/\text{mg}$.

4.5.7 Protocolo 7 – verificação da estabilidade enzimática variando-se o pH

Inicialmente, soluções estoque de substrato foram preparadas pela diluição de ABTS em diferentes tampões (100 mM), 0,15 mg/mL. Os tampões utilizados foram: fosfato (pH 2), citrato (pH 3), acetato (pHs 4 e 5), succinato (pH 6). Foram preparadas também soluções enzimáticas em tampões de diferentes pHs: 2, 3, 4, 5 e 6 (LPO (0,1 mg/mL), LAB (0,5 mg/mL) e LAsp (0,8 $\mu\text{L}/\text{mL}$)). As soluções enzimáticas foram deixadas em temperatura ambiente por 24 horas, e as atividades enzimáticas destas soluções verificadas nos tempos 0, $\frac{1}{2}$, 1, 2, 4, 8 e 24 horas. Para verificação da atividade, 1460 μL de substrato foram adicionados em tubos de ensaio e incubados a 45 °C por 5 minutos para estabilização térmica. Após estabilização, 40 μL de solução enzimática foram adicionados ao tubo, seguido de leve agitação do mesmo para dispersão. A absorvância da amostra foi coletada em 436 nm após 3 minutos de incubação. Ensaios feitos em triplicata. Branco determinado pela absorvância do substrato antes da adição de enzima. A atividade relativa foi calculada com base no maior valor médio dentre as atividades de cada uma das lacases. Atividade determinada pela **Equação 2**.

4.5.8 Protocolo 8 – verificação da estabilidade dos complexos enzima/nanozeólita nas condições ótimas determinadas

Tubos de vidro (20 mL) contendo 1480 μL de tampão citrato (100 mM, pH 3) e aproximadamente 2 mg de complexo enzima/nanozeólita foram incubados em banho térmico a 30 e 45°C. Para diferentes tempos de incubação (0, 3, 6, 12 e 24 horas), foi realizada a medida

da atividade dos catalisadores incubados. Para isso, os tubos foram retirados do banho, seguido da imediata adição de 20 μL de ABTS em solução aquosa (11 mg/mL) aos seus conteúdos. As reações foram realizadas em temperatura ambiente e sob agitação magnética branda. A mistura foi deixada nas condições do ensaio por 9,5 minutos, seguido de 0,5 minuto de centrifugação (13000 rpm), e por fim, o sobrenadante transferido para cubeta de vidro e absorbância coletada a 436 nm. Atividade determinada também pela **Equação 2**, substituindo a incógnita V_e pela massa (mg) de complexo utilizada no ensaio, atividade U expressa em $\mu\text{U}/\text{mg}$.

4.6 Oxidação do glicerol

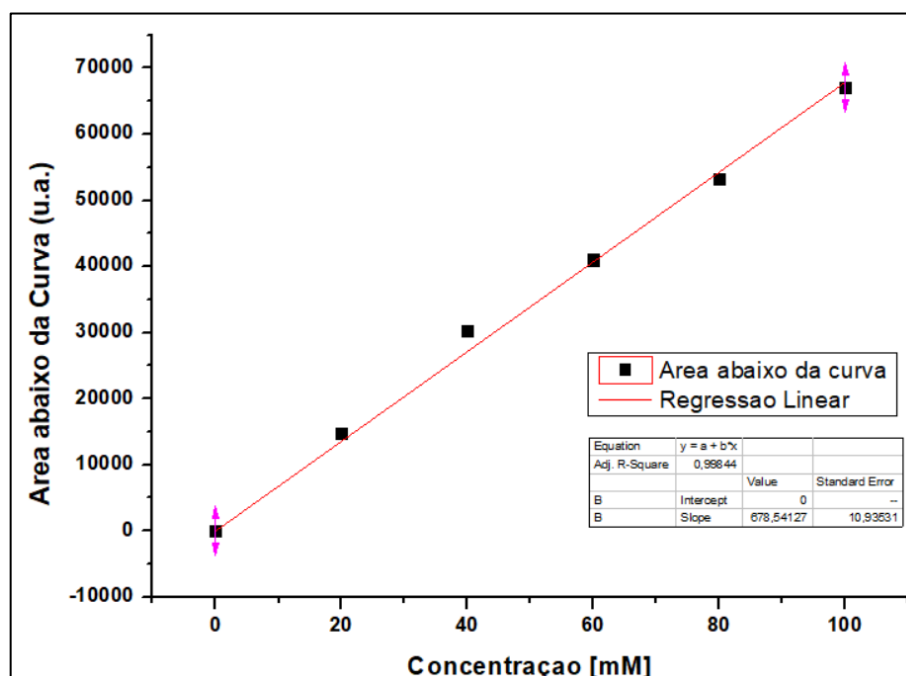
As reações de oxidação do glicerol foram realizadas de acordo com a metodologia descrita por Liebminger *et al.* (2009),¹⁶ fazendo as adaptações necessárias nas condições de sínteses para os nossos novos catalisadores. Um experimento típico foi feito da seguinte maneira: As reações foram realizadas em temperatura ambiente por diferentes intervalos de tempo (3, 6, 24 e 48 horas). Em tubos de vidro (20 mL) foram preparadas soluções contendo tampão acetato de sódio pH 4,5, glicerol (100 mM), de TEMPO (30 mM) e quantidades de catalisador (solução enzimática, ou complexo lacase/nanozeólita), totalizando um volume de 5 mL. A quantidade de enzima livre utilizada nas reações foi baseada na atividade do complexo testado. Nas mesmas condições, os derivados de TEMPO, 4-oxo-TEMPO, 4-amino-TEMPO and 4-hidroxi-TEMPO foram testados na reação de oxidação com a enzima LAsp na forma livre. A quantificação dos produtos obtidos pela oxidação do glicerol foi feita por cromatografia líquida de alta performance utilizando padrões dos respectivos componentes.

4.7 Análise dos produtos das reações de oxidação do glicerol por Cromatografia Líquida de Alta Performance (HPLC)

Foram realizadas análises sistemáticas na preparação de curvas de calibração de possíveis produtos formados a partir de reações de oxidação do glicerol por HPLC. Análises estas realizadas no Laboratório de Bioquímica e Microbiologia Aplicada (LBMA) da UNESP de São José do Rio Preto.

Inicialmente foram preparadas soluções dos padrões ácido tartrônico, ácido mesoxálico, dihidroxiacetona, gliceraldeído, ácido glicérico, ácido oxálico, ácido glicólico, ácido glioxílico, ácido fórmico e ácido hidroxipirúvico, em água duplamente destilada (Milli-Q), para concentrações de 20, 40, 60, 80 e 100 mM. Para análises foi utilizado o Cromatógrafo líquido sistema cromatográfico da *Agilent Technologies* (Waldbronn, Alemanha), modelo *1220 Infinity* com sistema *Photodiode Array* de detecção DAD; e a coluna *Aminex HPX-87H* (BioRad) 300 x 7,8 mm. Uma solução 4 mM de H₂SO₄/água destilada foi utilizada como fase móvel. A taxa de fluxo foi 0,5 mL/min, o volume injetado de 20 µL e a temperatura da coluna ajustada para 60°C. A corrida cromatográfica acompanhada por 25 minutos. Os dados coletados, tempo de retenção e área dos picos, foram tratados estatisticamente em software *OriginPro8* para determinação dos coeficientes de regressão linear para a curva da área abaixo do pico versus a concentração do composto com um tempo de retenção específico, conforme modelo apresentado na **Figura 11**. Os coeficientes de regressão linear (a e b), o coeficiente de determinação R² (Adj. R-Square) e tempos de retenção para todos os padrões estão expostos na **Tabela 5**, página 127.

Figura 11. Regressão linear da curva "Área abaixo da curva" vs. "Concentração" para o composto ácido tartrônico, com tempo de retenção 10,07 ± 0,08 minutos.



Fonte: elaborado pelo autor.

4.8 Concentração, troca de tampão e estudos da estabilidade da lacase comercial de *Aspergillus* sp. (LAsp)

Lacases são conhecidas como oxidases azuis, pois a cor azul é constantemente verificada para soluções destas enzimas purificadas. Entretanto, a enzima comercial LAsp utilizada neste trabalho apresenta uma coloração marrom forte. Esta cor está relacionada com a adição de estabilizadores à solução enzimática para armazenamento de longa duração. De acordo com os fornecedores, a solução comercial tem a seguinte composição: 66% água, 25% propilenoglicol, 4% sucrose/glucose, 2% glicina e 3% de lacase. Como esta enzima foi escolhida para estudos espectroscópicos e eletroquímicos, sua purificação foi necessária, e feita com o uso de filtros para concentração de proteínas por centrifugação. Entretanto, todos os trabalhos anteriores haviam sido realizados com enzima não purificada, no entanto, a solução comercial havia sido altamente diluída – no mínimo 100 vezes – e não era esperado que os componentes da solução enzimática tivessem contribuição significativa na performance catalítica desta enzima neste sistema. De toda forma, a enzima após purificação foi testada na forma livre ou imobilizada na oxidação do glicerol. Os resultados obtidos foram estatisticamente os mesmos utilizando a enzima antes ou após purificação.

4.8.1 Protocolo de filtração e medida de atividade dos filtrados

Dois tubos de centrifugação AMICON com filtros internos foram preenchidos com 500 μL de enzima comercial (amostra denominada amostra A, posteriormente referida como “não tratada”). Os tubos foram centrifugados por 20 minutos a 13200 rpm. Os concentrados obtidos do primeiro ciclo ($\sim 100 \mu\text{L}$) foram recuperados por centrifugação reversa seguindo instruções do fornecedor (dois minutos de centrifugação a 1000 rpm), e então diluídos em tampão fosfato 100 mM, pH 7, ao volume inicial. A solução diluída de um tubo foi separada para uso futuro, e denominada amostra B). A solução diluída do outro tubo foi submetida a novo processo de centrifugação, processo repetido por mais 8 vezes, nas mesmas condições. O concentrado recuperado ($\sim 50 \mu\text{L}$) foi diluído novamente em tampão para completar 500 μL , e armazenado, amostra denominada C. As amostras A, B, e C tiveram respectivas concentrações estimadas pelo método de Bradford, conforme protocolo descrito anteriormente, e curva de calibração feita utilizando Albumina de soro bovino (ASB).

Para verificar as atividades, as amostras foram diluídas 400 vezes em tampão fosfato. A medida de atividade foi feita com base no Protocolo 1, em que a variação da absorbância foi acompanhada em 436 nm após a adição de 50 μ L de amostra diluída em 1450 μ L de solução 0.1507 mg/mL de ABTS em 100 mM de tampão acetato (pH 4.5).

4.8.2 Verificação da estabilidade da enzima LAsp em diferentes tampões acompanhada no tempo

Que o pH tem um efeito direto na atividade de lacases é um fato vastamente discutido e aceito. Entretanto, tampões as vezes podem ser preparados utilizando diferentes componentes, e tamponar soluções para um mesmo intervalo de pH. Por exemplo, tampões de pH 4,5 podem ser preparados utilizando diferentes ácidos fracos, tais como ácido acético, ácido cítrico e ácido succínico com suas respectivas bases conjugadas. A questão que surge é se diferentes componentes podem influenciar diferentemente a atividade enzimática. Reagiriam com a enzima ou direcionariam variações estruturais no tempo levando a redução ou aumento de suas atividades? Na busca de esclarecimentos sobre as suposições levantadas, a enzima purificada LAsp foi encubada utilizando diferentes tampões, e sua atividade acompanhada no tempo.

Para isso, as amostras foram preparadas e armazenadas em geladeira (8°C). Os testes de atividade foram realizados periodicamente. Para evitar efeitos da temperatura externa, as amostras foram mantidas em geladeira o máximo possível (retiradas apenas por segundos necessários para coleta de alíquotas necessárias para os ensaios). Tampões acetato 50 and 100 mM; citrato 100 mM; succinato 50 and 100 mM; todos pH 4,5, foram preparados para os testes. Tampão fosfato, 100 mM, pH 7, foi utilizado como controle. 4 mL de solução enzimática foram preparadas diluindo 400 vezes a amostra purificada (LAsp, 12,7 mg/mL em tampão fosfato, 100 mM).

As atividades acompanhadas espectroscopicamente, variação na absorbância a 436 nm. Solução de ABTS 0,15 mM em tampão acetato 100 mM foi utilizada em todos os testes como substrato. Em cada teste, 1450 μ L de substrato foram adicionados em cubeta de policarbonato ($l = 1$ cm), e conjunto alocado no espectrofotômetro. A medida da absorbância foi iniciada, e cronômetro sincronizado. Após 5 segundos, 50 μ L de solução enzimática foi pipetada rapidamente na cubeta (o protocolo de pipetagem foi utilizado para auxiliar a dispersão da

enzima, pressionado a pipeta repetidamente for segundos). Absorbância foi coletada por 2 minutos. A absorbância medida no tempo 1 minuto e 10 segundos foi utilizada para determinação da atividade enzimática em todos os ensaios. Todos os ensaios foram realizados em triplicatas, para amostras encubadas por 0, 1, 3, 6, 24, 48, 96 e 188 horas. As atividades foram normalizadas utilizando a atividade do ensaio em tampão fosfato, pH 7, como 100%.

4.9 Avaliação da lacase LAsp por técnicas eletroquímicas

Uma série de diferentes protocolos eletroquímicos foram aplicados para investigar o sistema lacase-mediado em estudo. Estes estudos foram realizados na **Universidade Liverpool John Moores – Liverpool/Reino Unido**. Para melhor apresentar os métodos e discutir os resultados, os protocolos foram descritos separadamente, e numerados para posterior referência. Sequência numérica continuada da sequência da seção 4.5. Os títulos das respectivas figuras de resultados informam qual protocolo foi utilizado.

O aparato eletroquímico, incluindo eletrodos, foi adquirido da Metrohm, Holanda. O processamento eletroquímico foi feito utilizando um potenciostato/galvanostato Autolab (PGSTAT 101), e o software processador NOVA 2.1.4. Uma célula de três eletrodos foi empregada utilizando Ag/AgCl (3 M KCl) como eletrodo de referência (todos os potenciais apresentados com base nesta referência), e fio de platina como contra eletrodo. Um eletrodo de carbono vítreo (GCE, abreviação do inglês “glassy carbon electrode”), 3 mm de diâmetro, foi utilizado como eletrodo de trabalho na forma original ou após modificação superficial.

4.9.1 Protocolo 9 – voltametria cíclica de TEMPO e ABTS

O eletrodo GCE original foi utilizado para verificar o comportamento eletroquímico de TEMPO e ABTS. Para isso, tampão acetato, pH 5, 100 mM, foi utilizado como eletrólito de suporte. 15 mL de solução contendo 0,1 mM de analito foram adicionados à célula eletroquímica, e voltamogramas cíclicos coletados para diferentes velocidades de varredura em atmosfera ambiente, em específico intervalo de potencial, geralmente entre 0,3 e 1,1 V para ABTS e -0,3 e 1,0 V para TEMPO. As varreduras foram realizadas na direção de oxidação, se não indicado de outra forma. Entre medidas, a superfície do eletrodo de trabalho foi polida

utilizando alumina 0,3 μm numa almofada de polimento, seguido de sonicação em etanol e água ultrapura por 5 minutos cada, respectivamente, para eliminação de resíduos de polimento.

4.9.2 Protocolo 10 – deposição de lacase (LAsp) na superfície do eletrodo GCE

A modificação da superfície do eletrodo de trabalho (CGE) foi adaptada do trabalho descrito por Green *et al.* (2013),⁵⁹ o qual consistiu da deposição de enzima na superfície do eletrodo. 2 μL da amostra não tratada (comercial) de LAsp foram depositados na superfície do GCE. O eletrodo foi deixado ao ar-livre para evaporação do solvente, cerca de 45 minutos, denominado GCE/LAsp, e utilizado sem nenhum outro tratamento posterior.

Voltametria cíclica foi realizada nos intervalos entre 1,1 V e 0,3 V para ABTS e 0,9 V e -0,5 V para TEMPO, na direção de redução. Velocidade de varredura ajustada para 5 mV/s. O eletrodo GCE/LAsp foi imerso em 10 mL de solução 0,5 mM de ABTS ou TEMPO em tampão acetato, 100 mM, pH 5, e varredura iniciada imediatamente. O eletrodo original foi utilizado nas mesmas condições para comparação. Voltametria realizada em atmosfera ambiente. Entre medidas, a superfície do eletrodo de trabalho foi polida utilizando alumina 0,3 μm numa almofada de polimento, seguido de sonicação em etanol e água ultrapura por 5 minutos cada, respectivamente, para eliminação de resíduos de polimento.

4.9.3 Protocolo 11 – acompanhamento eletroquímico da oxidação do glicerol lacase/TEMPO-mediada

O objetivo deste experimento foi acompanhar voltametricamente a oxidação do glicerol lacase/TEMPO-mediada. O sistema de oxidação foi estudado utilizando enzima em diferentes pHs (4,5; 7 e 9,7), e a oxidorredução de TEMPO verificada utilizando o eletrodo GCE não modificado. Um protocolo típico foi realizado como descrito a seguir. 10 mL de solução 10 mM de TEMPO em tampão acetato, 100 mM, pH 4,5, foram adicionados na célula eletroquímica, e primeiro voltamograma cíclico (CV, abreviação do inglês “*cyclic voltammogram*”) coletado. Em seguida, 20 μL de solução de lacase concentrada (60 mg/mL em tampão fosfato, 100 mM, pH 7) foram adicionados à célula, e o segundo CV coletado imediatamente. Após 15 minutos, a medida foi repetida (terceira varredura). A seguir, 100 μL de solução 1 M de glicerol em tampão acetato, 100 mM, 4,5, foram adicionados à célula, e

quarto CV realizado. Após 15 e 30 minutos as medidas foram repetidas, quinta e sexta varredura, respectivamente. O processo foi repetido utilizando 100 mM tampão fosfato, e tampão carbonato de sódio/bicarbonato buffers, pH 7 and 9,7, respectivamente. Para comparação, TEMPO, glicerol and LAsp foram estudados separadamente ou em pares (um dos três componentes de reação deixado de fora).

Voltametria cíclica executada no intervalo entre 0,8 e -0,8 V. Varredura sempre iniciada em 0,3 V sentido potenciais positivos (0,3 V >> 0,8 V >> - 0,8 V >> 0,3 V). Velocidade de varredura ajustada para 50 mV/s em todas as varreduras. Entre medidas, a superfície do eletrodo de trabalho foi polida utilizando alumina 0,3 μm numa almofada de polimento, seguido de sonicação em etanol e água ultrapura por 5 minutos cada, respectivamente, para eliminação de resíduos de polimento. Voltametria realizada em atmosfera ambiente e sob atmosfera de nitrogênio. Nitrogênio ou ar foram purgados fortemente nas soluções por 10 minutos, e posteriormente um fluxo de ar/gás mantido logo acima da solução (dentro da célula). Isto foi feito para evitar variáveis extras na difusão do sistema, uma vez que purgar a solução enquanto medindo perturba a mesma. O gás sendo purgado logo acima da solução ajuda manter a atmosfera constante enquanto não perturba a solução.

O protocolo foi repetido utilizando uma concentração menor de TEMPO, 0,1 mM, utilizando apenas tampão acetato, e atmosfera ambiente.

4.9.4 Protocolo 12 – modificação do eletrodo de carbono vítreo utilizando nano compostos de zeólitas e grafeno

Uma série de diferentes modificadores foram preparados utilizando nanozeólitas alcoxisilano funcionalizadas (BEAc/APTMS/GA, and FAU/Cu²⁺/APTMS/GA), grafeno oxide (GO), nanoplatelets de grafeno (GNP) e lacase (LAsp), isoladamente ou em conjunto. Uma solução enzimática foi preparada em tampão fosfato, 100 mM, pH 7, com atividade de 50 U/mL. O eletrodo GCE foi modificado pelo método de deposição. Um protocolo típico está descrito a seguir. Inicialmente, suspensões estoque (5 mg/mL) de BEAc/APTMS/GA e GO foram preparadas em etanol, seguido de 30 minutos de sonicação para efetiva dispersão dos materiais sólidos. A suspensão de modificação BEAc/APTMS/GA/GO foi preparada misturando as suspensões obtidas anteriormente na proporção 1:1, BEAc/APTMS/GA:GO. Uma solução 1,5 % de Nafion (NF) foi preparada pela diluição da solução comercial (5%) em

água ultrapura. Antes da modificação, a superfície do eletrodo de trabalho foi polida utilizando alumina 0,3 μm numa almofada de polimento, seguido de sonicação em etanol e água ultrapura por 5 minutos cada, respectivamente, para eliminação de resíduos de polimento. O processo de deposição consistiu do gotejamento com uso de micropipeta de duas camadas de 2 μL cada da suspensão BEAc/APTMS/GA/GO, seguido de 5 minutos de espera para evaporação do etanol, e novo gotejamento de 2 μL de solução enzimática, e 30 minutos de espera para evaporação do solvente, para finalmente depositar uma camada de 2 μL da solução de NF. A evaporação do solvente da solução de NF foi feita em ao ar livre, e temperatura ambiente, por cerca de 30 minutos. O eletrodo modificado é de agora em diante denominado GCE/BEAc/APTMS/GA/GO/LAsp/NF. Outras modificações utilizando diferentes composições foram realizadas seguindo este protocolo. As preparações em três passos dos eletrodos estão ilustrados no **Quadro 1**, no total, 20 eletrodos foram testados.

Nesta etapa, outro substrato comum de lacases foi utilizado nos testes eletroquímicos, catecol. Tampão fosfato, 100 mM, pH 5 foi utilizado como eletrólito suporte. A concentração de catecol foi sempre ajustada para 50 μM para as medidas de voltametria cíclica. 19,9 mL de eletrólito suporte foram adicionados à célula eletroquímica, e o potencial variado no sentido de oxidação, no intervalo entre -0,3 e 0,7 V, com taxa de 100 mV/s. Em seguida, 100 μL de solução 10 mM de catecol foram pipetados na célula (resultando em solução de analito com concentração de 50 μM), e então CV foi coletado. Entre medidas, a superfície do eletrodo de trabalho foi polida utilizando alumina 0.3 μm numa almofada de polimento, seguido de sonicação em etanol e água ultrapura por 5 minutos cada, respectivamente, para eliminação de resíduos de polimento, e protocolo de deposição repetido. Nitrogênio ou ar foi purgado na solução por 5 minutos antes das medidas, e atmosfera mantida durante a medição com fluxo de gás acima da solução, evitando assim perturbação, e reduzindo efeitos sobre o transporte de massa das medidas eletroquímicas.

Quadro 1. Três passos de modificação do eletrodo GCE.

	1° passo de deposição	2° passo de deposição	3° passo de deposição
	4 µL suspensão de materiais sólidos	2 µL LAsp	2 µL NF
GCE		GCE/LAsp	
			GCE/NF
		GCE/LAsp	GCE/LAsp/NF
	GCE/BEAc/APTMS/GA		BEAc/APTMS/GA/NF
	GCE/BEAc/APTMS/GA	GCE/BEAc/APTMS/GA/LAsp	BEAc/APTMS/GA/LAsp/NF
	GCE/FAU/Cu ²⁺ /APTMS/GA		GCE/FAU/Cu ²⁺ /APTMS/GA/NF
	GCE/FAU/Cu ²⁺ /APTMS/GA	GCE/FAU/Cu ²⁺ /APTMS/GA/LAsp	GCE/FAU/Cu ²⁺ /APTMS/GA/LAsp/NF
	GCE/GO		GCE/GO/NF
	GCE/GO	GCE/GO/LAsp	GCE/GO/LAsp/NF
	GCE/GNP		GCE/GNP/NF
	GCE/GNP	GCE/GNP/LAsp	GCE/GNP/LAsp/NF
	GCE/BEAc/APTMS/GA/GO		GCE/BEAc/APTMS/GA/GO/NF
	GCE/BEAc/APTMS/GA/GO	GCE/BEAc/APTMS/GA/GO/LAsp	GCE/BEAc/APTMS/GA/GO/LAsp/NF
	GCE/BEAc/APTMS/GA/GNP		GCE/BEAc/APTMS/GA/GNP/NF
	GCE/BEAc/APTMS/GA/GNP	GCE/BEAc/APTMS/GA/GNP/LAsp	GCE/BEAc/APTMS/GA/GNP/LAsp/NF
	GCE/FAU/Cu ²⁺ /APTMS/GA/GO		GCE/FAU/Cu ²⁺ /APTMS/GA/GO/NF
GCE/FAU/Cu ²⁺ /APTMS/GA/GO	GCE/FAU/Cu ²⁺ /APTMS/GA/GO/LAsp	GCE/FAU/Cu ²⁺ /APTMS/GA/GO/LAsp/NF	
GCE/FAU/Cu ²⁺ /APTMS/GA/GNP		GCE/FAU/Cu ²⁺ /APTMS/GA/GNP/NF	
GCE/FAU/Cu ²⁺ /APTMS/GA/GNP	GCE/FAU/Cu ²⁺ /APTMS/GA/GNP/LAsp	GCE/FAU/Cu ²⁺ /APTMS/GA/GNP/LAsp/NF	

Azul - eletrodos que foram testados eletroquimicamente.

Branco – passo de deposição implementado

Amarelo – passo de deposição não implementado

4.10 Avaliação da lacase LAsp e complexos nanozeólita por Ressonância Paramagnética Eletrônica – EPR

Análises de EPR na banda X foram aplicadas para enzima LAsp na forma livre e imobilizada para verificar se após imobilização o sítio catalítico da enzima tem sua estrutura preservada, abordagem similar ao descrito por Umamaheswari *et al.* (2017),¹⁰⁶ em que foi investigada uma enzima ascorbato oxidase (com composição metálica similar a lacases, com

quatro cobres no sítio catalítico) imobilizada em materiais de sílica mesoporosa. Estes estudos foram realizados na **Universidade de Manchester – Manchester/Reino Unido**.

As medidas de EPR de onda contínua foram realizadas em 20 K na banda X (9.4 GHz) utilizando um espectrômetro EMX micro BRUKER (com controle de temperatura da Oxford Instrumentos CF935 criostato). A modulação do campo magnético (B_0) utilizada foi 0.8 mT, e a frequência de modulação ajustada para 100 kHz. A potência de micro-ondas utilizada foi de 0.27 mW. As simulações dos espectros de EPR de onda contínua foram realizadas utilizando o software Easyspin acoplado ao software Matlab.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 Síntese e Caracterização dos Materiais Zeolíticos

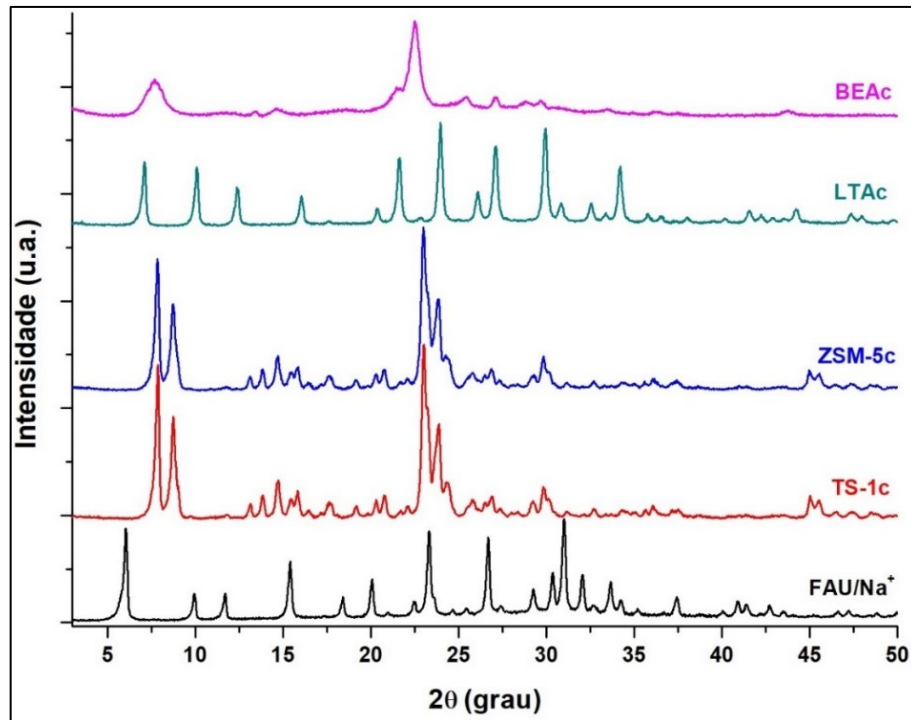
A síntese das nanozeólitas propostas inicialmente neste trabalho, protocolos descritos no item 4.1, foram realizadas com sucesso, levando-se em consideração as cristalinidades e morfologias observadas pelas técnicas de caracterização utilizadas até o momento, quando comparadas com a literatura, conforme será discutido a seguir.

5.1.1 Análises por DRX e FTIR das nanozeólitas sintetizadas

A **Figura 12** apresenta os difratogramas de raios X da nanozeólita Faujasita tipo X (FAU/Na⁺) – como sintetizada – e das nanozeólitas Titanosilicalita 1, ZSM-5, Linde tipo A e Beta (TS-1c, ZSM-5c, LTAc e BEAc, respectivamente) – após calcinação. As amostras calcinadas estão apresentadas nessa figura porque os materiais apenas após esta etapa foram utilizados para tratamento químico e imobilização enzimática. Na **Figura 13** estão ilustrados, para comparação, os difratogramas das nanozeólitas como sintetizadas e após a etapa de calcinação. Pode ser observado que não houve variação nos padrões de difração após remoção da fase orgânica das amostras – templates utilizados como direcionadores de estrutura –, o que evidencia que as estruturas cristalinas dos materiais foram conservadas.

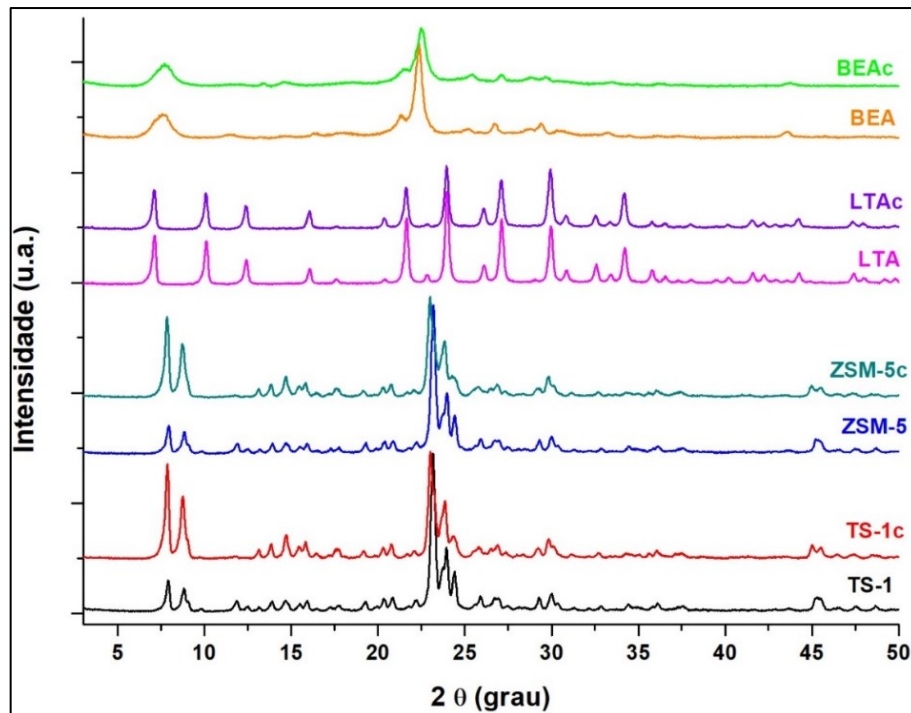
O padrão de difração do material FAU/Na⁺ está de acordo com o padrão reportado por Zhan *et al.* (2001),⁹³ e apresentou os picos alargados característicos da Faujasita em escala nanométrica em 2θ iguais a 6, 16, 27 graus. As nanozeólitas TS-1 e ZSM-5, ambas de estrutura MFI, apresentaram um padrão de difração de raios X característico, com reflexões de Bragg mais intensas localizadas nas regiões de 2θ iguais a 7,8; 8,7; 23,0 e 23,8 graus, confirmando estrutura e cristalinidades destes materiais.^{94; 95; 96; 107} Os difratogramas referentes as amostras LTA/LTAc retratam a alta cristalinidade do material sintetizado, e todas as reflexões associadas a esta estrutura foram verificadas.^{96; 97} Por fim, os padrões de difração para as amostras BEA/BEAc foram análogos aos reportados na literatura para materiais com este tipo de estrutura em escala nanométrica, contendo bandas alargadas em 2θ iguais a 7,8 e 22,5 graus.^{98;}

Figura 12. Difratogramas de raios X das nanozeólitas como sintetizada (FAU/Na⁺) e após calcinação (TS-1c, ZSM-5c, LTAc e BEAc).



Fonte: elaborado pelo autor.

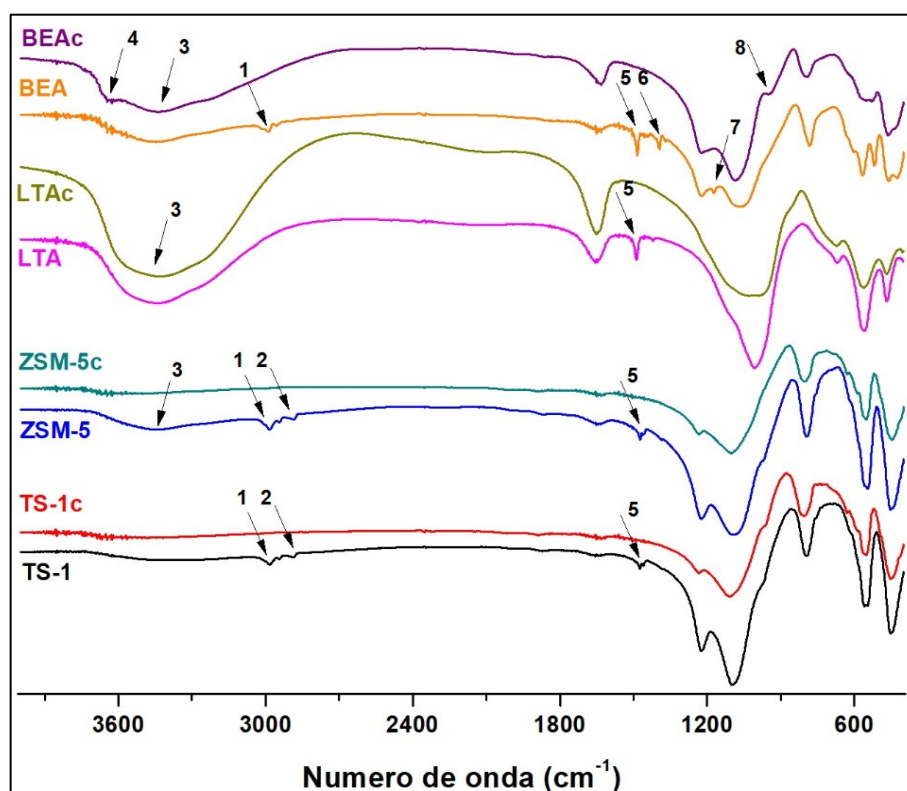
Figura 13. Difratogramas de raios X das nanozeólitas TS-1, ZSM-5, LTA e BEA como sintetizadas e após calcinação (TS-1c, ZSM-5c, LTAc e BEAc).



Fonte: elaborado pelo autor.

Embora os difratogramas da **Figura 13** não tenham apresentado o surgimento ou desaparecimento de reflexões de Bragg, no máximo aumento ou redução da intensidade para determinados picos após calcinação das amostras, os espectros de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), ilustrados na **Figura 14**, comparando novamente as amostras antes e após calcinação, apresenta o desaparecimento de diversas bandas de vibração após o tratamento térmico dos materiais. Essas bandas estão em geral relacionadas às bases orgânicas (templates) utilizadas nos processos de síntese desses materiais, as quais são justamente removidas pela calcinação, não afetando a estrutura zeolítica do material.

Figura 14. FTIR das nanozeólitas como sintetizadas (TS-1, ZSM-5, LTA e BEA) e após calcinação (TS-1c, ZSM-5c, LTAc e BEAc). Setas numeradas indicam as seguintes bandas: 1 – 2990 cm^{-1} , 2 – 2890 cm^{-1} , 3 – 3450 cm^{-1} , 4 – 3650 cm^{-1} , 5 – 1490 cm^{-1} , 6 – 1390 cm^{-1} , 7 – 1170 cm^{-1} e 8 – 960 cm^{-1} .



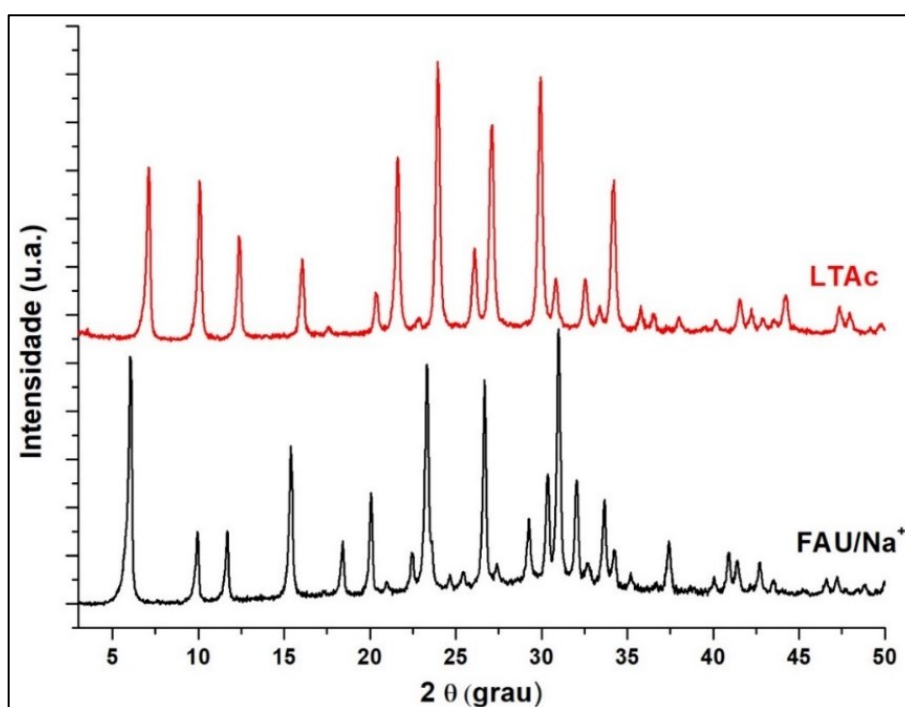
Fonte: elaborado pelo autor.

As bandas fracas verificadas em aproximadamente 2990 cm^{-1} e 2890 cm^{-1} fazem referência ao estiramento C–H das moléculas de template, assim como a banda em 3450 cm^{-1} , assinaladas aos modos de estiramento O–H das moléculas de tetraalquilamônio.¹⁰⁹ As bandas observadas na região entre 3700 e 3400 cm^{-1} podem também estar relacionadas a moléculas de água presente nestes materiais, assim como a banda em aproximadamente 1650 cm^{-1} ,¹¹⁰ que tem maior intensidade de transmitância após calcinação para as amostras LTA e BEA e menor intensidade para as amostras TS-1 e ZSM-5.

Além da eliminação das bases orgânicas utilizadas nas sínteses, são assinaladas bandas características das estruturas zeolíticas desses materiais, como por exemplo, os espectros de FTIR das nanozeólitas BEA e BEAc mostram bandas de transmissão típicas para nanozeólita BEA na região espectral de 525, 573 e 623 cm^{-1} . As bandas intensas e alargadas na faixa espectral de 1060-1090 cm^{-1} são atribuídas às vibrações assimétricas (T-O-T).¹¹¹

Apesar de todas as zeólitas propostas inicialmente terem sido sintetizadas, vale ressaltar algumas informações. É conhecido o fato de que zeólitas dos tipos FAU e LTA podem apresentar competição de fase, ou seja, num processo de síntese de um destes materiais pode ser verificado a presença de ambas as fases. Isso deve-se a sensibilidade verificada nos processos de síntese a parâmetros reacionais, tais como, concentração de íons Na^+ , razão Si/Al e tempo de envelhecimento.^{91; 112}

Figura 15. Difratogramas de raios X das amostras FAU/Na e LTAc.



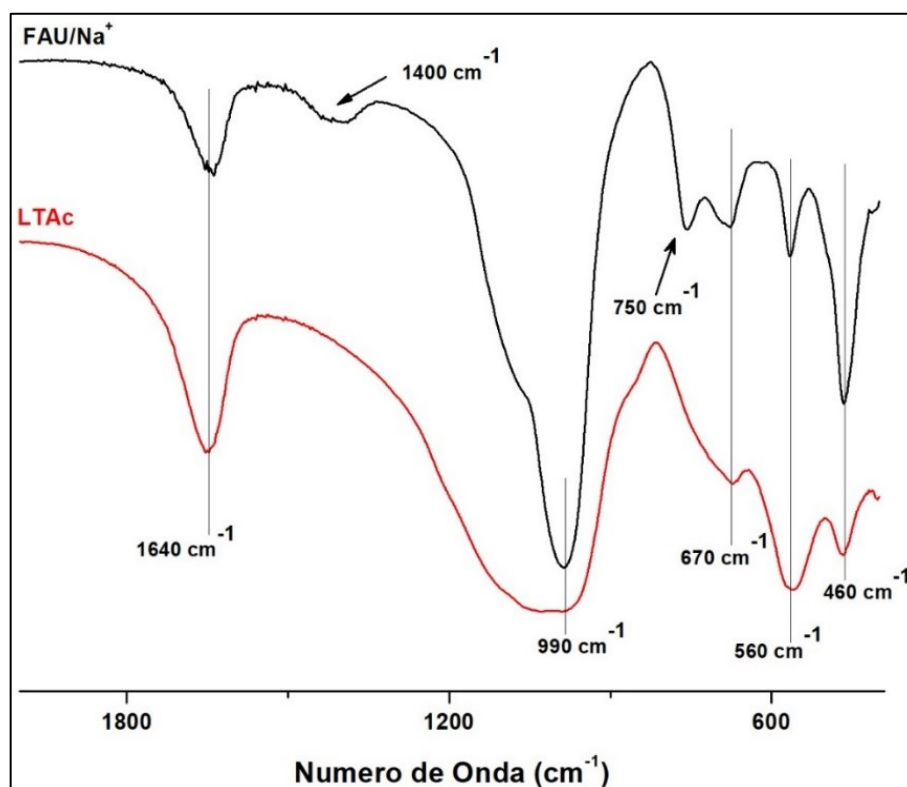
Fonte: elaborado pelo autor.

Pode-se observar a partir da **Figura 15**, a qual apresenta os padrões de difração dos materiais FAU/Na⁺ e LTAc com maior detalhamento para comparação, que os picos de difração dos dois materiais são diferentes, apesar de suas composições químicas serem bastante similares (de acordo com as análises de EDS, **Tabela 2**, que serão discutidas na próxima seção). A diferença principal nos dois processos de síntese é o uso de TMAOH na síntese da LTA, utilizado para direcionar a formação de cristais com estruturas desse tipo. Todavia, há reportes

de síntese de Linde tipo A sem uso de template orgânico, como no trabalho de Anfaro *et al.* (2007),¹¹³ nos quais os parâmetros acima citados foram controlados para que a fase LTA fosse a única obtida.

Além das análises por DRX, análises de FTIR foram realizadas para comparação das nanozeólitas FAU/Na⁺ e LTAc, **Figura 16**. O espectro de FTIR para a LTAc revela bandas em aproximadamente 460, 560, 670, 990 e 1648 cm⁻¹, estas bandas estão de acordo com os dados reportados na literatura.^{114;115} As vibrações internas e externas dos tetraedros TO₄ podem ser discriminadas, sendo atribuídas aos tetraedros internos as vibrações ligadas à abertura de poros na região 1250–920 cm⁻¹; enquanto as vibrações em 1150–1050 cm⁻¹, e do anel duplo em 650–500 cm⁻¹, são também de origem interna. Além disso, a presença do pico em 560 cm⁻¹, está relacionada ao anel duplo característico deste tipo de zeólita.^{113;115;116} No espectro da FAU/Na⁺, pode-se visualizar bandas em 460, 560, 670 e 990 cm⁻¹, análogas às encontradas na LTAc, com origens similares.^{115;117}

Figura 16. Espectros de FTIR da região entre 2100 e 400 cm⁻¹ das nanozeólitas FAU/Na⁺ e LTAc.



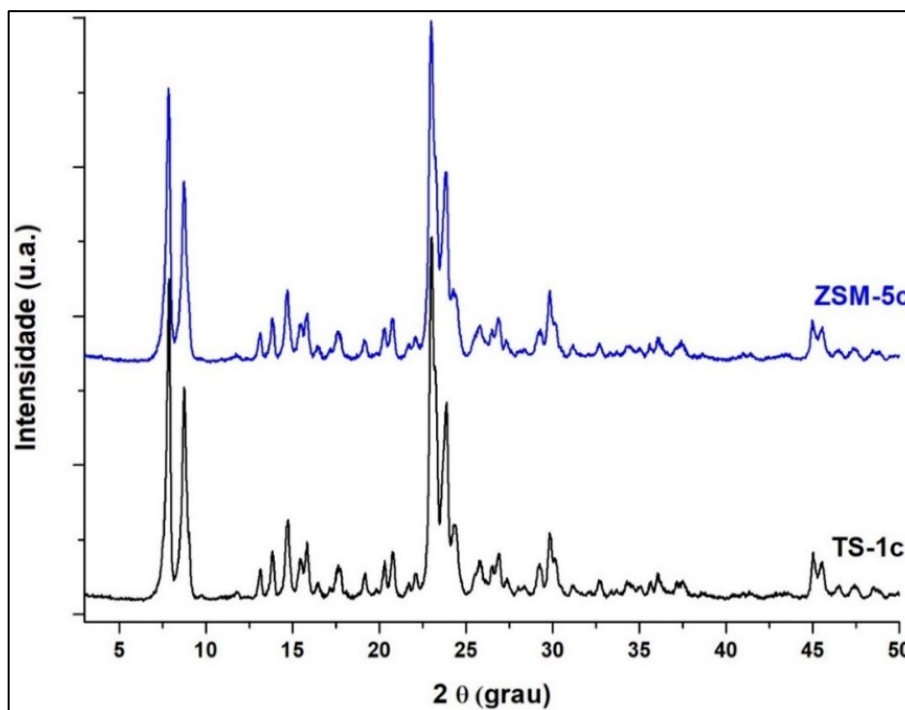
Fonte: elaborado pelo autor.

Também são verificadas duas bandas distintas na amostra de Faujasita, uma em aproximadamente 750 cm⁻¹, banda reconhecida como típica dessas estruturas,¹¹⁸ e outra na faixa de 1400 – 1490 cm⁻¹, análoga a reportada no trabalho de Azizi *et al.* (2014),¹¹⁹ em análises de

infravermelho de zeólitas faujasitas em escala nanométrica, porém não foi indicado qual tipo de vibração molecular resulta absorção neste número de onda. O aparecimento desta banda pode estar associado ao aumento de grupos silanóis e aluminóis devido ao aumento da superfície de contato quando o material passa da escala micrométrica para nanométrica.

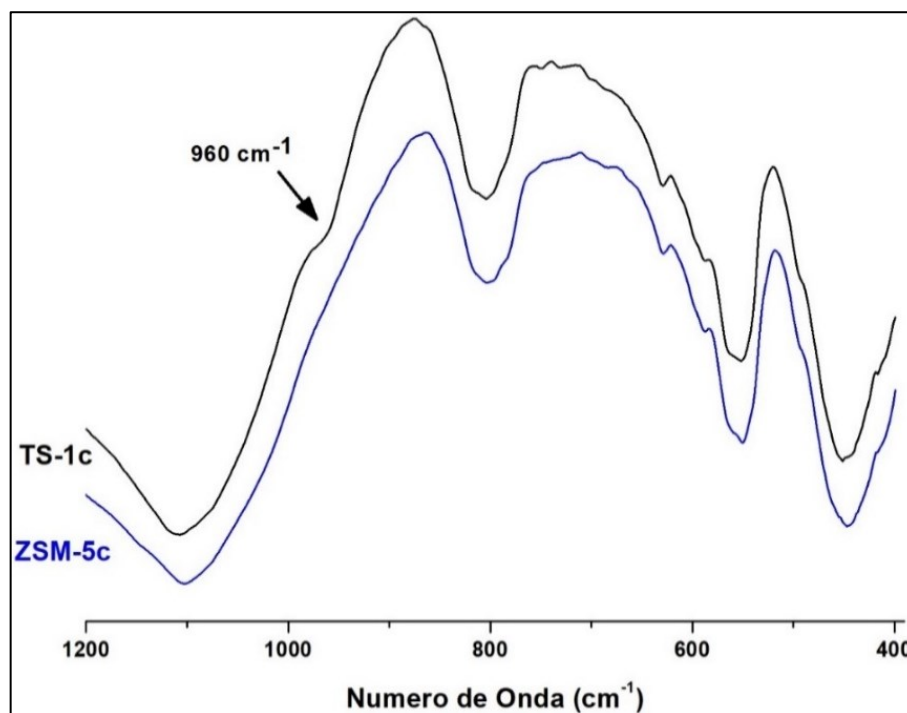
Como dito anteriormente, ambas as zeólitas TS-1 e ZSM-5 possuem estruturas do tipo MFI, e portanto não apresentam reflexões de Bragg distintas, como pode ser visualizado na **Figura 17**, o que não permite sua distinção por esta técnica. Por outro lado, análises de FTIR são tipicamente realizadas para assinalar a presença de titânio nas redes cristalinas da TS-1, referente aos grupos tetraédricos $\text{Ti}(\text{OSi})_4$, pela presença de uma banda em aproximadamente 960 cm^{-1} ,^{94; 120} não verificada para a ZSM-5. Na **Figura 18** está apresentado o espectro de FTIR na região entre $1200\text{ a }400\text{ cm}^{-1}$ para as amostras TS-1c e ZSM-5c, na qual uma banda discreta em 960 cm^{-1} pode ser apontada no espectro referente a TS-1c, e como esperado, não é encontrada no espectro relativo a ZSM-5c. No caso, a quantidade de titânio presente na estrutura é refletida na intensidade da banda, portanto, a amostra provavelmente apresentou uma baixa incorporação desse metal em sua estrutura devido à baixa intensidade da banda observada.

Figura 17. Difratogramas de raios X das nanozeólitas TS-1c e ZSM-5c.



Fonte: elaborado pelo autor.

Figura 18. Espectros de FTIR da região entre 1300 a 400 cm^{-1} das nanozeólitas TS-1c e ZSM-5c.



Fonte: elaborado pelo autor.

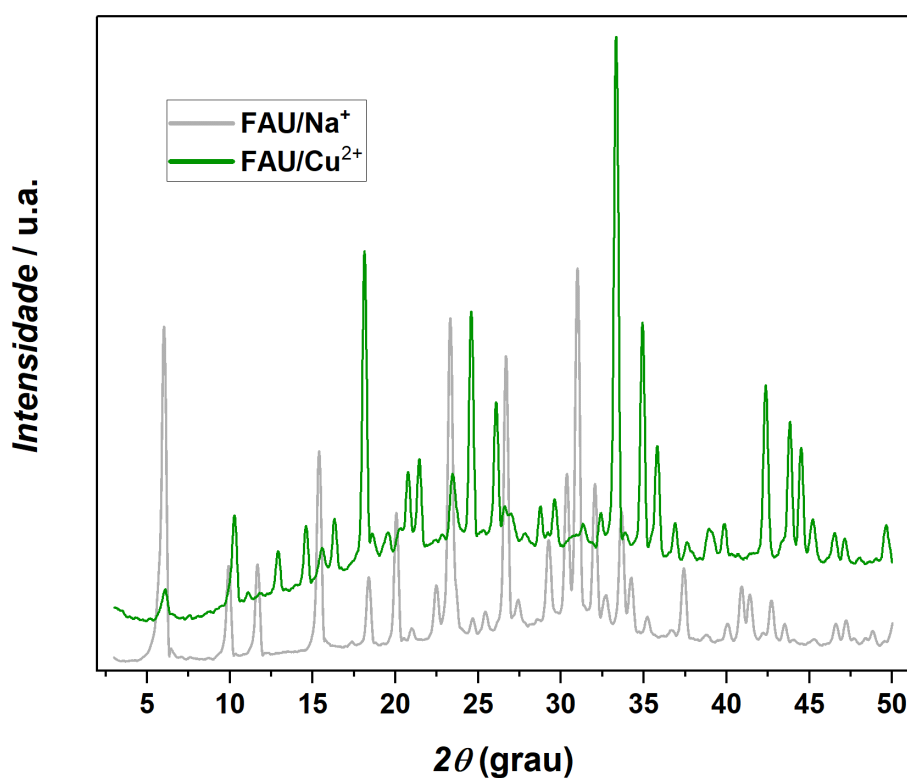
Embora nos planos iniciais (vide item 3.2, página 52) não tenha sido incluído tratamento por troca iônica para preparação de suportes zeolíticos, experiências anteriores em trabalhos envolvendo a imobilização enzimática em materiais deste tipo;²⁶ no qual foi observado a influência de metais de transição como o níquel, quando incorporados por troca iônica em nanozeólita faujasita tipo X, na atividade de lipases para aplicação em reações de transesterificação; uma busca na literatura foi realizada no intuito de verificar se há relatos de influência de metais de transição na atividade de lacases. Diversos trabalhos fizeram estudos da influência de metais em solução na atividade de diferentes lacases, e o cobre foi repetidamente apontado como potenciador da atividade destas enzimas.^{121; 122; 123; 124}

Considerando a experiência e as informações adquiridas da revisão bibliográfica, mais um suporte foi incluído no estudo. No caso, foi apenas realizada a modificação da nanozeólita FAU/ Na^+ pela troca iônica com cobre, conforme protocolo descrito no item 4.1.6. A nanozeólita FAU/ Na^+ foi escolhida devido à sua alta capacidade de troca iônica e alto rendimento após síntese.^{26; 125}

Como pode ser visualizado na **Figura 19**, que apresenta os padrões de difração da amostra FAU/ Na^+ em comparação com os da FAU/ Cu^{2+} , a troca iônica com cobre causa diversas alterações na estrutura cristalina da faujasita tipo X. A nanozeólita faujasita tem suas

reflexões mais intensas em 2θ iguais a 6; 23,3; 26,7 e 31° enquanto a amostra após troca iônica possui reflexões mais intensas completamente distintas, em 2θ iguais a 18,1; 24,6; 33,4 e $34,9^\circ$, e em geral, as reflexões de intensidades intermediárias também divergem, como exemplo, na região de 2θ entre 42 e 45° . Essas modificações após troca iônica com cobre foram indicadas em trabalho anterior,²⁶ como sendo resultado da ação do cobre como direcionador de estrutura. No caso, algumas reflexões de Bragg análogas aos reportados para materiais com topologia Gismondina (GIS) foram verificados. No entanto, essa indicação foi feita apenas com base nos dados de difração de raios X, e uma investigação mais aprofundada foi realizada neste trabalho, como será discutido na próxima seção.

Figura 19. Difratoogramas de raios X da nanozeólita faujasita como sintetizada (FAU/ Na^+) e após troca iônica com cobre 0,5 M (FAU/ Cu^{2+}).



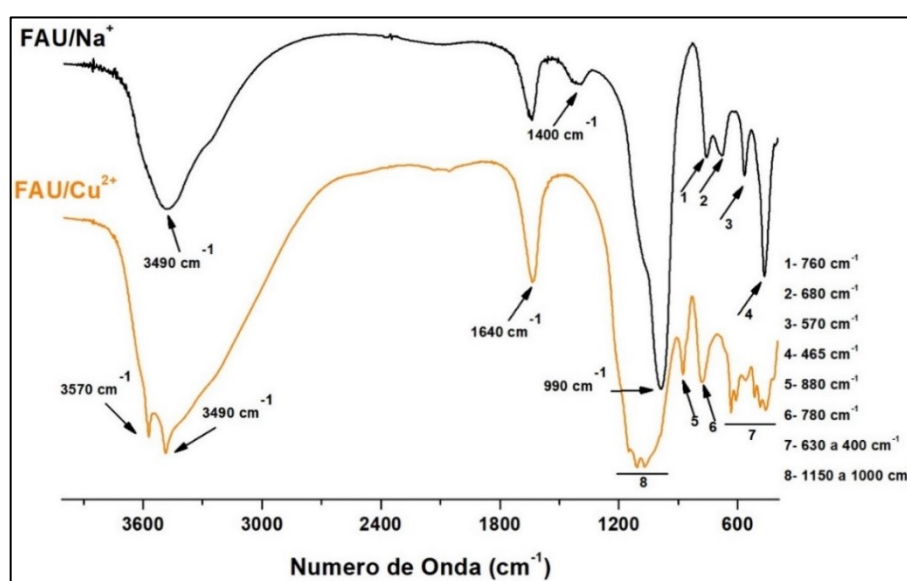
Fonte: elaborado pelo autor.

Além das análises por DRX, as amostras de faujasita antes e após troca iônica foram submetidas a análises de FTIR, **Figura 20**. Novamente, uma série de mudanças foram observadas, principalmente na região de 1200 a 400 cm^{-1} , que contém as principais bandas características relacionadas a estrutura cristalográfica de zeólitas. As bandas em 760 e 680 cm^{-1} da amostra FAU/ Na^+ não estão presentes na amostra FAU/ Cu^{2+} , e além disso, as duas bandas bem definidas em 570 e 435 cm^{-1} na amostra com sódio são desmembradas em uma série de

bandas na região 630 a 400 cm^{-1} na amostra com cobre, que também apresenta duas bandas novas em 880 e 780 cm^{-1} .

Outras modificações importantes após a troca iônica são o alargamento da banda bem definida em 990 cm^{-1} (da amostra FAU/ Cu^{2+}) dando origem a uma banda na região de 1150 a 1000 cm^{-1} , e o aparecimento de uma banda fina em 3570 cm^{-1} , que correspondia a uma banda larga com maior transmitância em 3490 cm^{-1} antes do tratamento. Além disso, um aumento da intensidade da banda em 1640 cm^{-1} e o desaparecimento da banda em 1400 cm^{-1} são observados.

Figura 20. FTIR da nanozeólita faujasita antes (FAU/ Na^+) e após troca iônica com cobre 0,5M (FAU/ Cu^{2+}).



Fonte: elaborado pelo autor.

5.1.2 MEV e EDS das Nanozeólitas sintetizadas

Com a finalidade de confirmar as morfologias dos materiais sintetizados, análises de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) foram realizadas, **Figura 21**.

As micrografias das nanozeólitas FAU/ Na^+ e FAU/ Cu^{2+} mostram aglomerados micrométricos de partículas menores, com tamanhos variados na faixa de 20-200 nm. A formação de aglomerados para este tipo de material é conhecida, e as respectivas imagens estão de acordo com a literatura.^{26; 93}

A amostra TS-1c apresentou cristais de morfologia esférica/cúbica – alguns cristais mais esféricos outros mais cúbicos –, com tamanhos na faixa de 80 a 150 nm. Cundy *et al.*,^{94; 95} apontaram morfologias aproximadamente cúbicas com base em suas análises de MEV para

nanozeólitas do tipo titanossilicalita. Morfologia e tamanhos similares foram verificados para a nanozeólita ZSM-5c. A morfologia e os tamanhos destes dois materiais de estrutura MFI podem estar diretamente ligados a quantidade de titânio incorporado nas amostras de TS-1c e também a proporção Si/Al nos dois materiais.^{95; 96; 109}

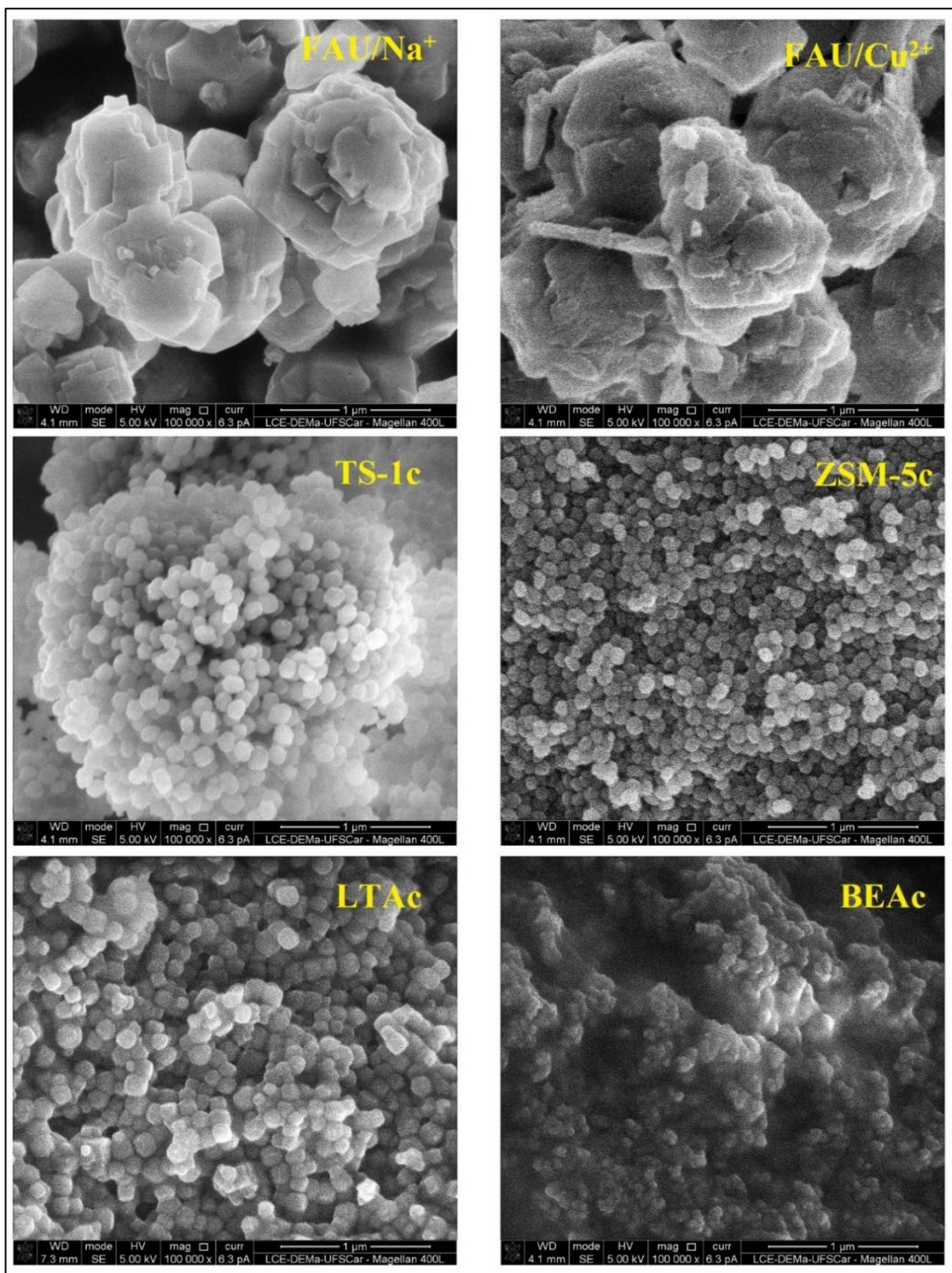
No caso da amostra de LTAc, observam-se também, cristais de morfologia esférica/cúbica – predominância esférica, mas algumas partículas cúbicas podem ser observadas –, com tamanhos da ordem de 100 nm. Estes resultados concordam bem com os dados reportados por Biemmi & Bien (2008).⁹⁶

Por fim, as análises de MEV da amostra BEAc não permitiram a determinação da morfologia ou tamanho de partículas com precisão. Entretanto, pode ser observado a formação de um aglomerado de partículas menores – menores que 100 nm –, assim como relatado por Larlus *et al.* (2011).⁹⁸

Durante as análises de MEV foram também realizadas análises por espectroscopia de energia dispersiva (EDS), para mensurar o percentual dos componentes atômicos das amostras sendo analisadas, **Tabela 2**. Em geral, todas as amostras apresentaram os componentes silício, alumínio e oxigênio – elementos esperados para este tipo de material, pois são formadores da rede básica cristalina de alumino silicatos, conforme revisado no item 2.6. As amostras FAU/Na⁺ e LTAc possuem composições muito similares, com proporções Si/Al de 1,07 e 0,92. Ambos materiais são conhecidos por serem ricos em alumínio e apresentam razão Si/Al por volta de 1.^{93; 126; 127} Isso reflete numa alta quantidade de sódio, que é utilizado para neutralizar as cargas negativas dos tetraedros de alumínio dessas estruturas.

Diferentemente, nas amostras TS-1c e ZSM-5c, assim como na amostra BEAc, a proporção Si/Al é alta, justificando o baixo percentual de sódio mensurado. Na amostra ZSM-5c foi encontrado um baixo percentual de potássio, provável impureza desta amostra, ou imprecisão da análise de EDS. A inexistência de sódio na amostra BEAc está de acordo com protocolo de síntese utilizado. Nesse protocolo, a formação da topologia BEA é atingida na ausência de sódio, com a predominância de tetraedros de silício em sua rede cristalina.⁹⁸

Figura 21. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) dos materiais nanozeolíticos.



Fonte: elaborado pelo autor.

As análises de EDS para a amostra FAU/Cu²⁺ foi realizada propositalmente em duas regiões diferentes, para verificar se a troca iônica realizada – substituição de átomos de sódio por átomos de cobre – foi uniforme. Nota-se que as duas análises realizadas divergem em

conteúdo atômico, sendo que uma delas apresenta um percentual de 7,69 % de cobre, enquanto a outra apresenta cerca de 4 vezes mais cobre. Levando-se em consideração apenas a troca iônica, seria esperado um valor de aproximadamente 7 % de cobre na amostra FAU/Cu²⁺ se todo o sódio presente na amostra FAU/Na⁺ fosse substituído por cobre – 1 átomo de cobre substitui dois átomos de sódio devido às suas valências –, o que se enquadraria a região 1 analisada. A princípio, o elevado percentual de cobre na região 2 indica uma aglomeração de cobre ou a formação de uma fase concorrente. Isso está de acordo com os dados de DRX dessa amostra, **Figura 19**, em que as reflexões de Bragg distintas da amostra não tratada são indicativos de alteração estrutural ou formação de mais de uma fase. Além da presença de cobre confirmada em ambas as regiões, foi detectado também um alto percentual de enxofre, elemento originário do sal utilizado para troca iônica – sulfato de cobre.

Tabela 2. Análises de EDS das nanozeólitas sintetizadas.

Amostra	Elemento	% atômico
FAU/Na ⁺	Si	13,25
	Al	12,37
	O	59,99
	Na	14,39
LTAc	Si	13,53
	Al	14,68
	O	57,88
	Na	13,90
TS-1c	Si	32,95
	Al	0,03
	O	66,62
	Na	0,04
	Ti	0,36
ZSM-5c	Si	41,06
	Al	1,06
	O	56,98
	Na	0,04
	K	0,86
BEAc	Si	26,12
	Al	2,63
	O	71,25
	Na	0,00
FAU/Cu ²⁺ região 1	Si	10,34
	Al	8,95
	O	63,22
	Na	1,21
	Cu	7,69
FAU/Cu ²⁺ região 2	S	4,30
	Si	3,35
	Al	1,33
	O	53,29
	Na	2,63
	Cu	27,39
S	12,00	

Posteriormente, uma micrografia com menor ampliação para a amostra FAU/Cu²⁺ foi adquirida, **Figura 22**. Nesta figura observam-se duas morfologias micrométricas principais: placas e esferas. Essas morfologias indicam também a formação de mais de uma fase neste material, em que, possivelmente, as partículas esféricas são de origem zeolítica, e as em forma de placa da fase concorrente.

Figura 22. MEV da amostra FAU/Cu²⁺ com aumento de 2000x.



Fonte: elaborado pelo autor.

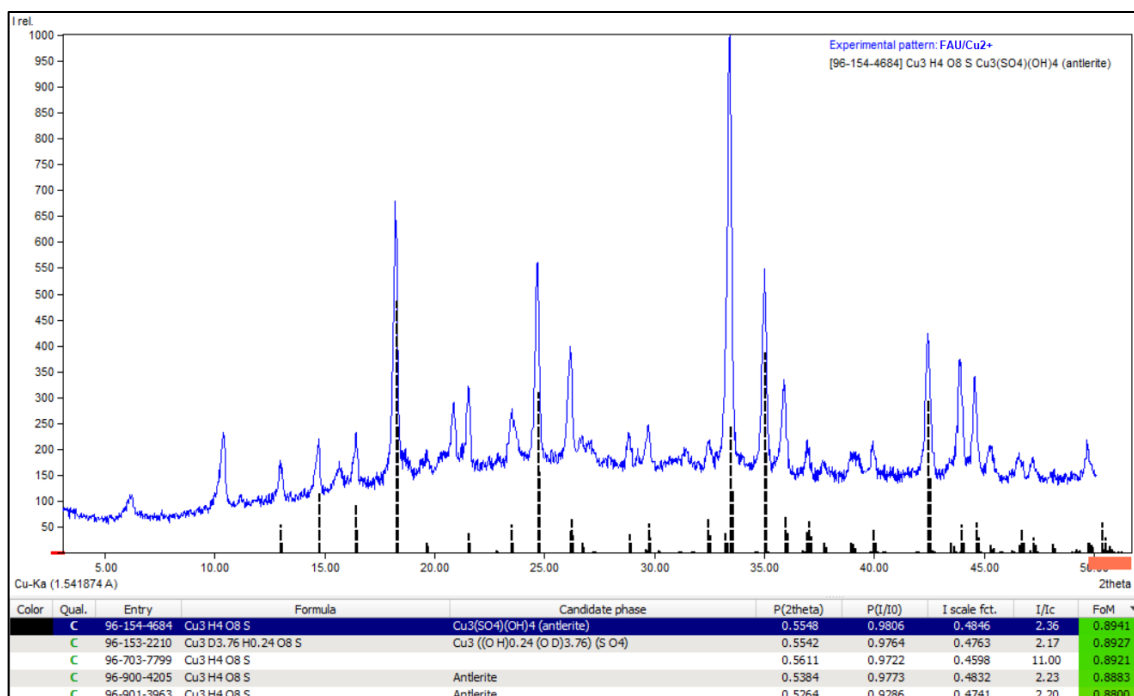
5.1.3 MET e EDS do material FAU/Cu²⁺

As diferenças nos padrões de difração das amostras FAU/Na⁺ e FAU/Cu²⁺ podem ser resultado, a princípio, da formação de uma fase zeolítica competitiva no material após o tratamento de troca iônica, como indicado na seção anterior. Visando maior esclarecimento, foi realizada inicialmente uma busca por padrões de difração análogos aos da amostra FAU/Cu²⁺ através do programa **Match!***.^{128; 129} Este programa faz a busca de um padrão de difração em um banco de dados com o maior número de reflexões análogas a amostra sendo investigada. O programa então aponta os padrões com maior número de reflexões análogas as da amostra, e também uma análise estatística geral da comparação, ilustrando o difratograma da amostra em comparação com o padrão de difração da fase de maior similaridade. Para o caso da amostra FAU/Cu²⁺, foi encontrado um padrão de difração com cerca de 90% de similaridade, referente

ao mineral “antlerite”, de composição química $\text{Cu}_3(\text{SO}_4)(\text{OH})_4$, conforme ilustrado na **Figura 23**. Esta figura é uma captura de tela editada da janela de exibição do programa **Match!*** em que são expostos o padrão de difração da amostra FAU/ Cu^{2+} (linha azul contínua) comparado com o padrão de difração referente ao mineral “antlerite” (linhas verticais tracejadas em preto). Também é apresentada nesta figura, parte de uma tabela (região inferior) com os dados estatísticos de análise de alguns padrões com alto percentual de similaridade, em todos os casos relativos ao mineral “antlerite”. Nota-se que diversas reflexões de Bragg são encontradas em ambos os padrões, mas reflexões na região de 2θ entre 3 e 12 graus – região em que reflexões características de zeólitas são geralmente verificadas – não são observadas no mineral.

O alto percentual de enxofre da amostra FAU/ Cu^{2+} , em conjunto com as diferentes morfologias (placas e esferas) verificadas na **Figura 22**, e os dados obtidos pelo programa **Match!** fortalece a hipótese de que a amostra FAU/ Cu^{2+} é mesmo formada por duas fases competitivas, uma fase zeolítica e uma outra fase, possivelmente, antlerite, um mineral que de acordo com literatura apresenta cristais em forma de placas.^{130; 131}

Figura 23. Captura de tela da janela de exibição do programa Match!* expondo o padrão de difração da amostra FAU/ Cu^{2+} (linha azul contínua) comparada com um padrão de difração do mineral “antlerite” (linhas verticais pretas e tracejadas).



Fonte: elaborado pelo autor.

Adicionalmente, foi realizada uma busca na literatura por dados de espectroscopia de infravermelho do mineral antlerite. Um padrão com bandas características em

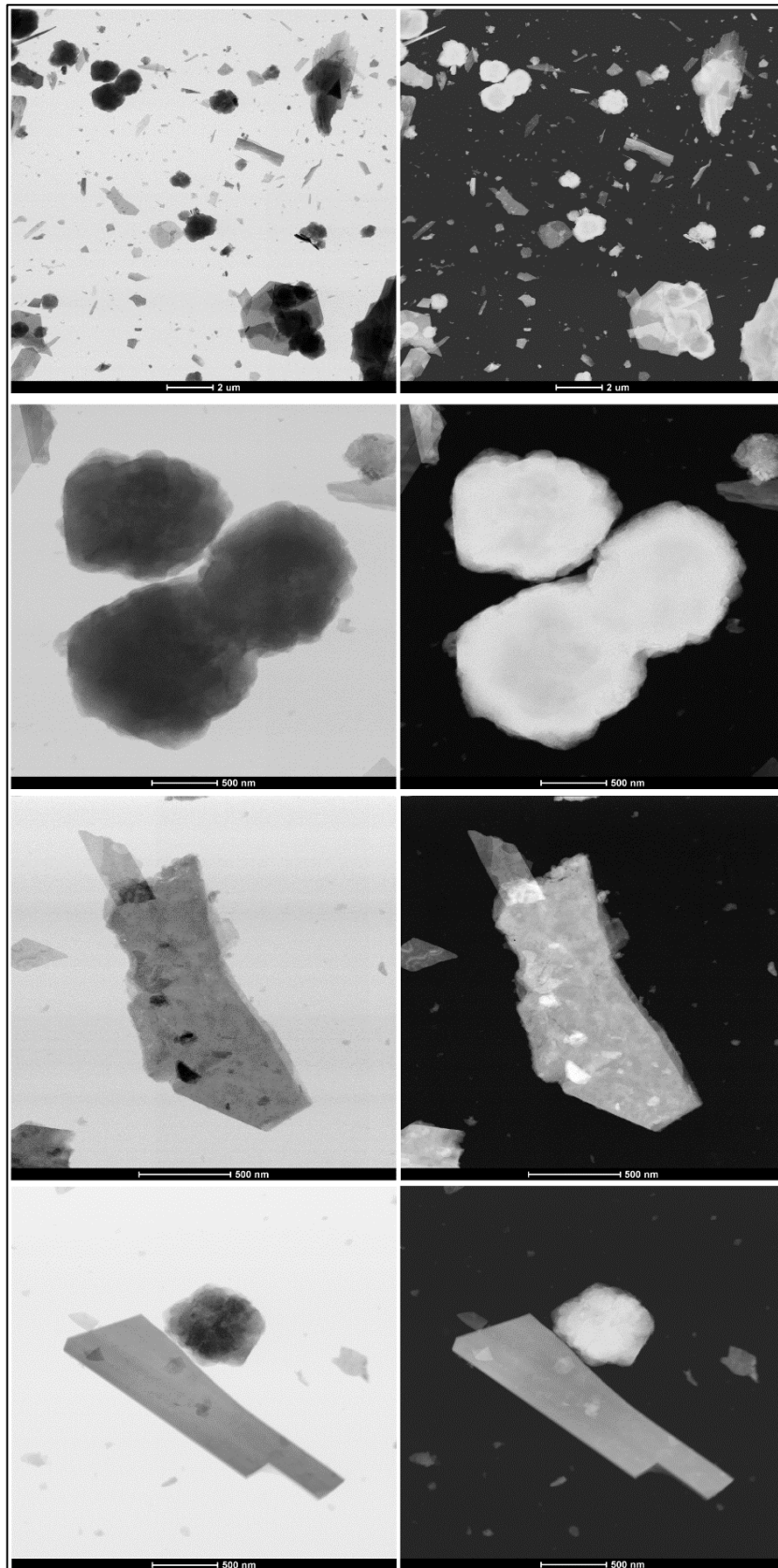
aproximadamente 3570, 3490, 1153 e 1109 cm^{-1} , além de diversas bandas na região entre 1000 e 400 cm^{-1} , foi descrito no trabalho de Zittlau *et al.* (2013).¹³⁰ Estas bandas têm números de onda análogos aos verificados para a amostra FAU/ Cu^{2+} . No entanto, algumas bandas observadas no material FAU/ Cu^{2+} estão em regiões que são comumente reportadas para materiais zeolíticos,¹¹⁵ e não são verificadas no mineral antlerite.

Apesar dos dados de difração, infravermelho e microscopia de varredura suportarem a hipótese levantada sobre a formação de mais de uma fase deste material, a confirmação final foi obtida por meio das técnicas de MET e EDXS.

A **Figura 24** apresenta imagens de campo claro em comparação com imagens de campo escuro de diversas regiões da amostra de análise por Microscopia Eletrônica de Transmissão. Nota-se inicialmente a existência de morfologias distintas. Partículas com forma mais globular contrastam com partículas de forma planar, ambas de tamanhos na escala micrométrica. Aglomerados destas partículas também são verificados.

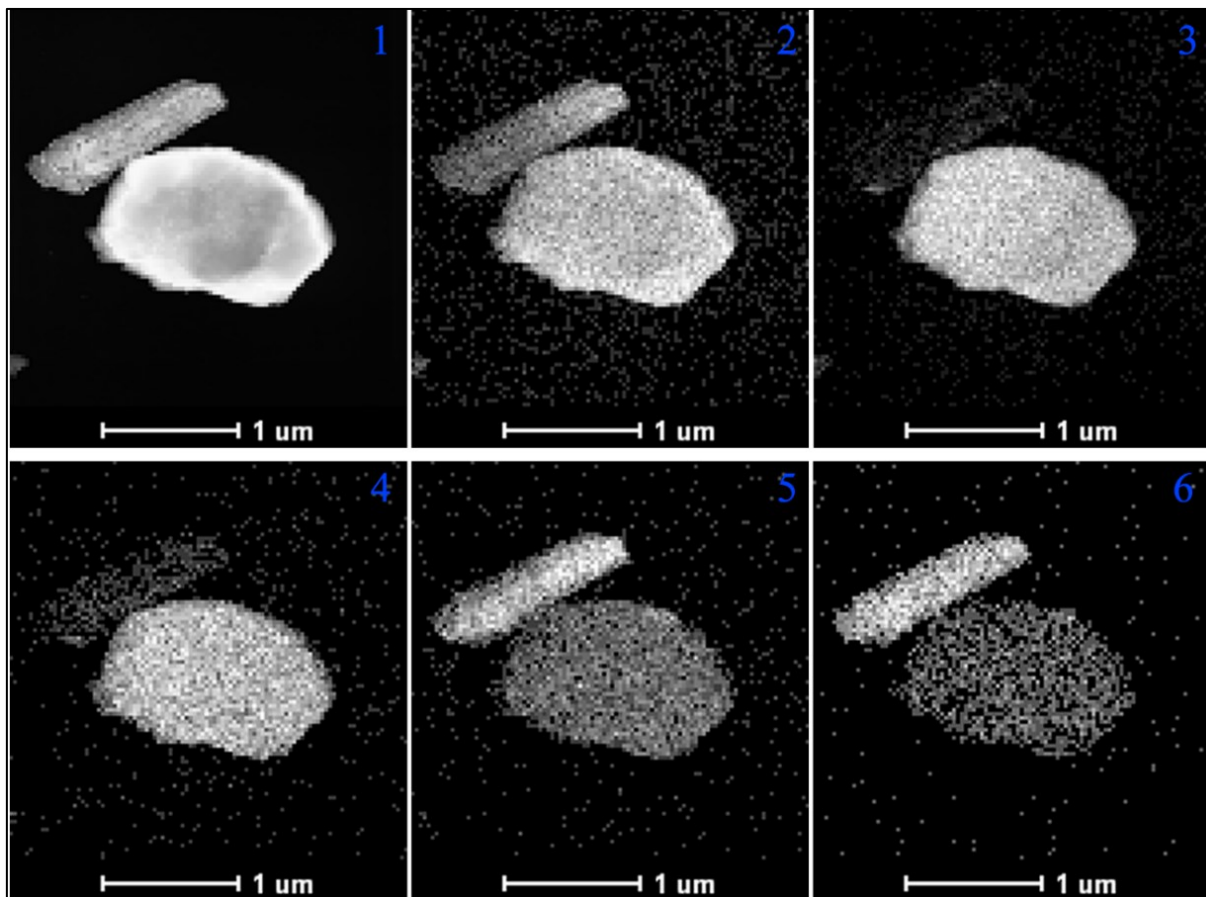
Para verificação dos conteúdos atômicos que compõem ambas as fases verificadas, uma região amostral contendo duas partículas de diferentes morfologias isoladas foram analisadas por EDXS, e os elementos Oxigênio, Silício, Alumínio, Cobre e Enxofre mapeados, como ilustrado na **Figura 25**. A fase globular apresentou altas concentrações dos elementos Oxigênio, Alumínio e Silício, e uma distribuição homogênea de Cobre e Enxofre, enquanto a fase em forma de placa, possui elevadas concentrações de Enxofre, Cobre e Oxigênio distribuídas, e apenas vestígios de Alumínio e Silício verificados. Este resultado claramente evidencia que, além de morfologias diferentes, o conteúdo atômico também é diferente. Adicionalmente, foi feita a contagem e assinalamento do percentual atômico de duas regiões, uma pertencente a fase globular e outra da fase planar (**Figura 26**). A fase globular apresenta uma alta contagem dos elementos Oxigênio, Alumínio e Silício, enquanto a outra destaca-se na alta concentração de cobre e enxofre.

Figura 24. Imagens por MET de campo claro (esquerda) e campo escuro (direita) da amostra FAU/Cu²⁺.



Fonte: elaborado pelo autor.

Figura 25. Mapeamento por EDXS de duas partículas com morfologias diferentes (1) dos componentes Oxigênio (2), Silício (3), Alumínio (4), Cobre (5) e Enxofre (6) do material FAU/Cu²⁺.



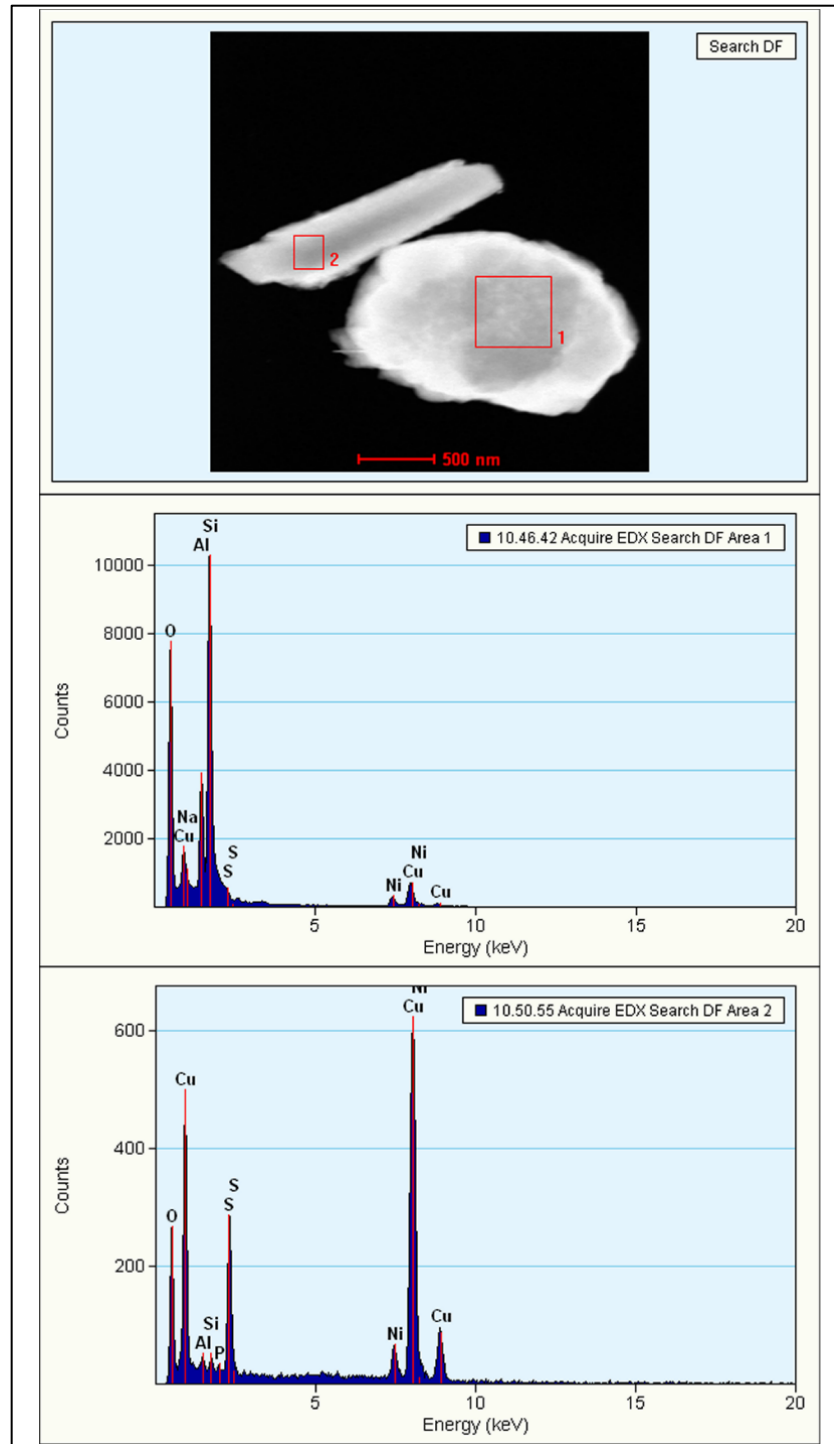
Fonte: elaborado pelo autor.

Uma segunda área amostral foi selecionada e analisada por EDXS. Esta área contém um aglomerado maior de partículas de ambas as fases, como pode ser visto nas imagens de campos claro (2-BF) e escuro (1-DF) da **Figura 27**, com regiões contendo uma maior quantidade de partículas da fase zeolítica, e a outra da fase mineral. O mapeamento atômico novamente evidencia as altas concentrações de silício e alumínio da fase zeolítica em contraste com as altas concentrações de cobre e enxofre da fase mineral.

No trabalho de Bhawe (2013),¹³² a formação de uma fase antlerite após troca iônica da zeólita Al-*BEA com sulfato de cobre foi mencionada. A fase formada foi atribuída às condições de troca iônica, em específico, a temperatura de 95 °C utilizada. Em outro trabalho, Long *et al.* (2015),¹³³ descreveu o uso de zeólita FAU tipo X, no qual novamente foi observado a formação da fase antlerite após troca iônica a 70 °C com CuSO₄. Os autores indicaram o colapso da estrutura faujasita ou a formação de camadas de antlerite na superfície zeolítica.

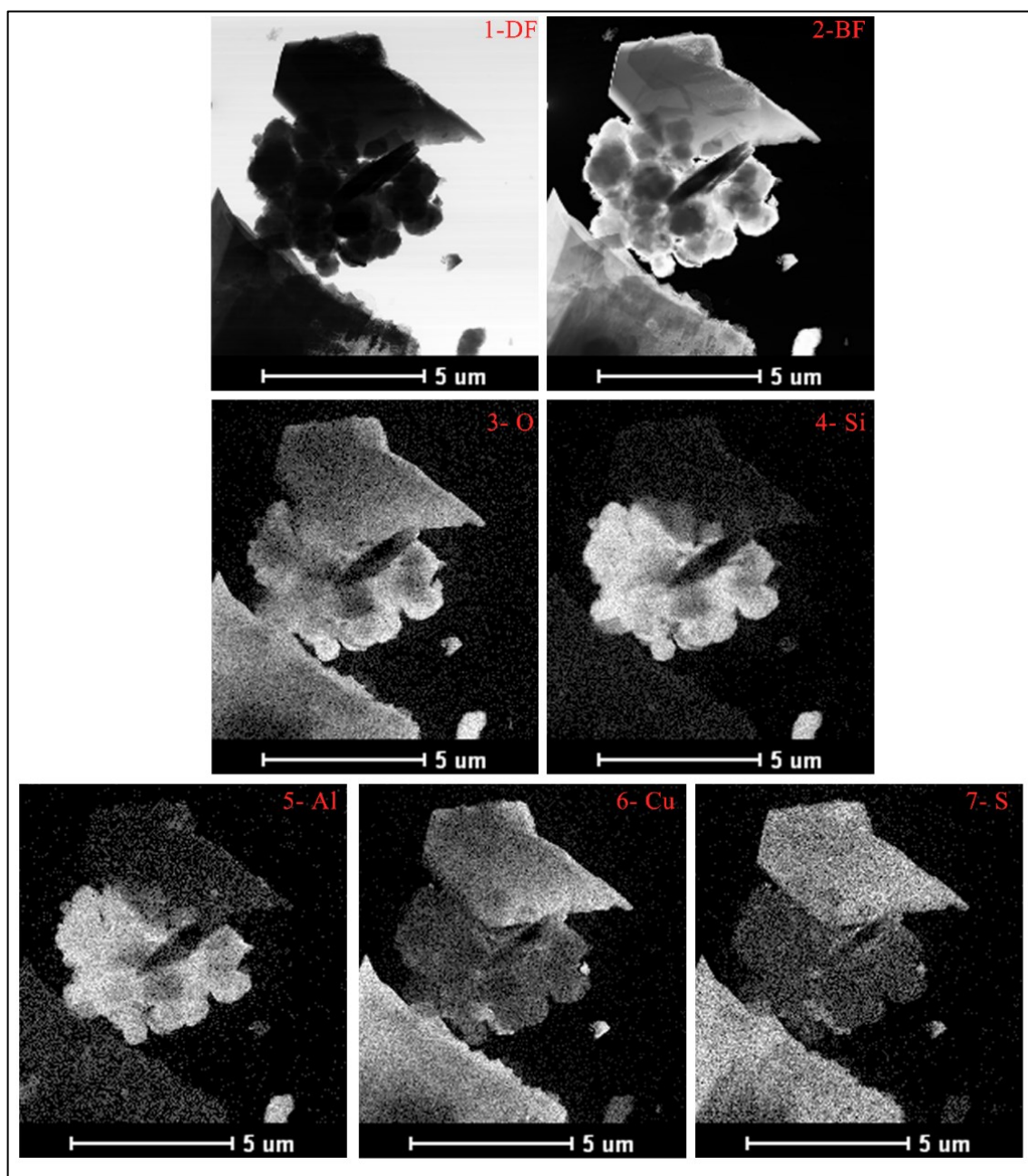
Ambos os trabalhos citados estão de acordo e suportam – juntamente com os dados experimentais deste trabalho – a hipótese da formação da fase antlerite na amostra FAU/Cu²⁺.

Figura 26. Análise de EDXS de regiões das morfologias tipo globular (1- Área 1) e placa (2- Área 2).



Fonte: elaborado pelo autor.

Figura 27. Imagens de campo claro (1), campo escuro (2), e mapeamento por EDXS dos componentes Oxigênio (3), Silício (4), Alumínio (5), Cobre (6) e Enxofre (7) de aglomerados de partículas com morfologias diferentes do material FAU/Cu²⁺.



Fonte: elaborado pelo autor.

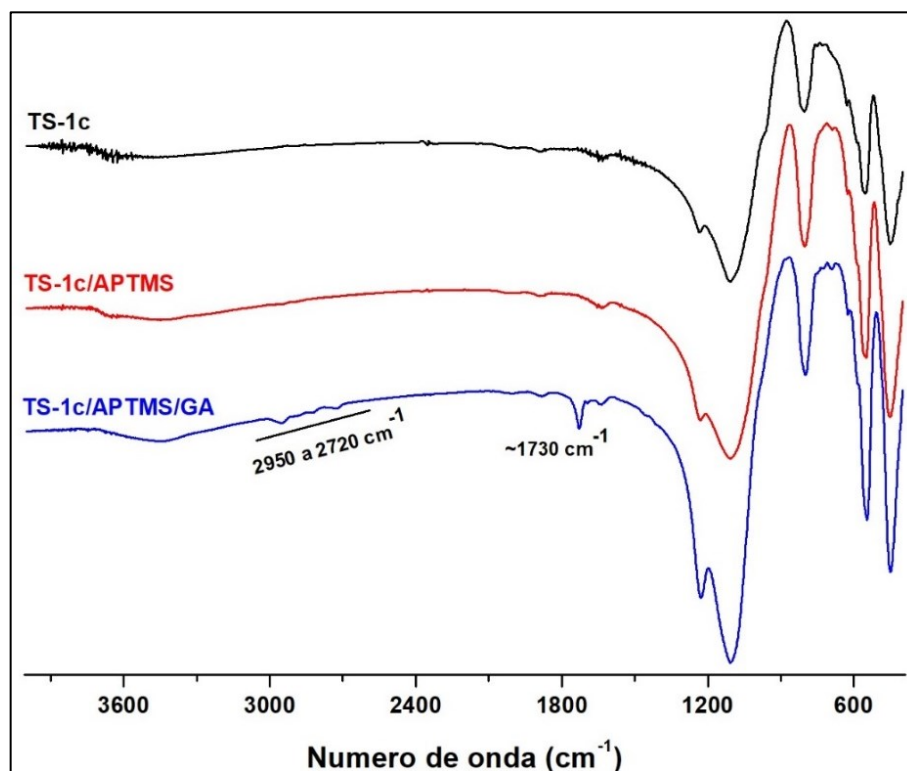
5.2 Silanização e funcionalização química dos materiais zeolíticos sintetizados

Como revisado no item 2.4.4, os métodos de imobilização enzimática em suportes sólidos são diversos, sendo os métodos de adsorção e ligação covalente os mais comuns. Levando-se em consideração os relatos na literatura e experiência com ambos os métodos de

imobilização no grupo, optou-se pela imobilização via ligação covalente das lacases sendo estudadas. Para isso, alguns dos suportes nanozeolíticos preparados e discutidos no item 5.1 passaram pelas etapas de silanização – substituição de hidroxilas dos grupos Si–OH por amino silano APTMS –, e funcionalização com glutaraldeído (GA), conforme detalhado no item 4.2.

Como forma de verificação da incorporação dos grupamentos químicos nas nanozeólitas, os materiais silanizados e funcionalizados foram submetidos a análises de FTIR na região de 4000 a 400 cm^{-1} . As **Figuras 28 e 29** apresentam, respectivamente, os espectros obtidos para os materiais TS-1c e ZSM-5c antes e após etapas de adição de APTMS e funcionalização.

Figura 28. FTIR da nanozeólita TS-1c antes, e após silanização (TS-1c/APTMS) e funcionalização (TS-1c/APTMS/GA).

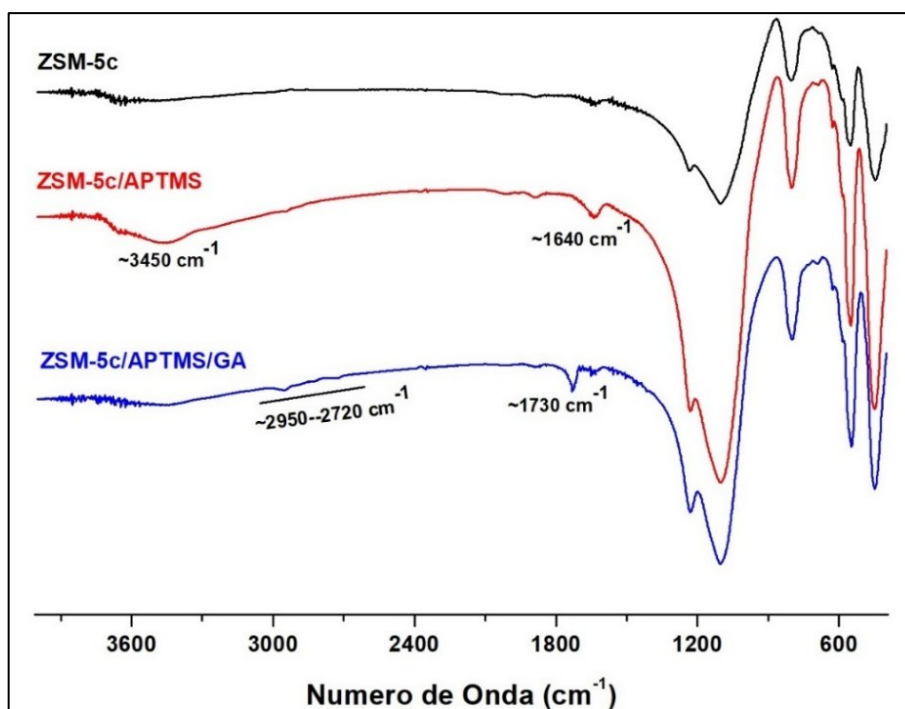


Fonte: elaborado pelo autor.

Após etapa de adição de APTMS, não foram notadas variações significantes nos espectros obtidos quando comparados com os espectros referentes aos materiais antes do tratamento. Mas, após adição do glutaraldeído, uma banda nas proximidades de 1730 cm^{-1} foi verificada, sendo que, bandas nessas proximidades estão relacionadas ao estiramento C=O e vibrações do grupo R-CH=N presentes no espaçador resultante da ligação entre APTMS e GA.^{134; 135} As bandas fracas verificadas na região entre 2950 cm^{-1} e 2720 cm^{-1} fazem referência ao estiramento C–H destas moléculas.¹⁰⁹ Na análise de FTIR da amostra ZSM-5c/APTMS um

leve aumento na absorção da banda em torno de 1640 cm^{-1} é observado. Essa banda é assinalada como resultado do estiramento C=O, ou a presença de água. Similarmente, a banda larga em 3450 cm^{-1} , está relacionada ao estiramento O–H de moléculas de água ou das hidroxilas presentes nos grupos Si–OH das superfícies zeolíticas e da molécula de APTMS.¹¹⁰

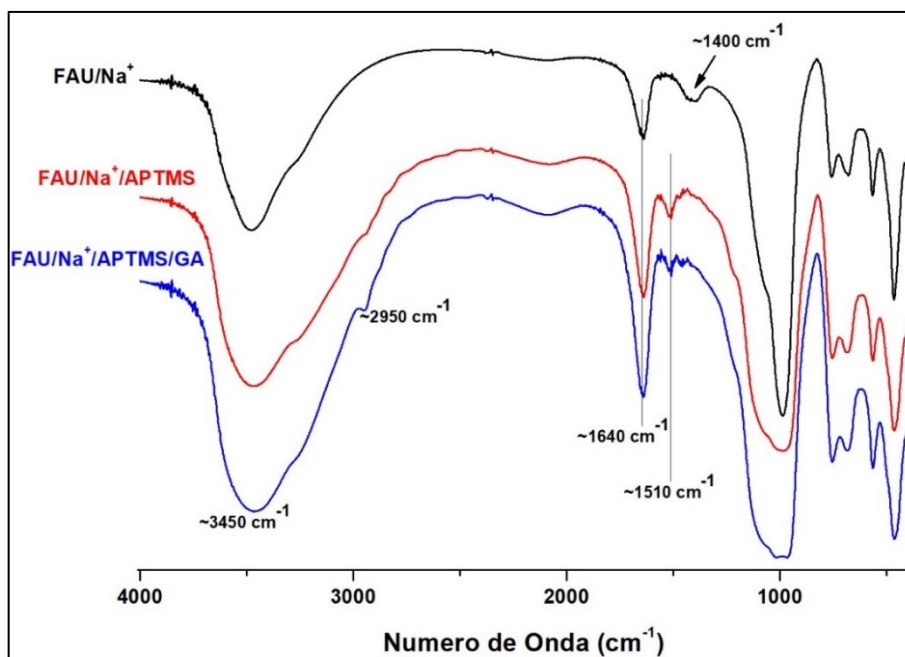
Figura 29. FTIR da nanozeólita ZSM-5c antes, e após silanização (ZSM-5c/APTMS) e funcionalização (ZSM-5c/APTMS/GA).



Fonte: elaborado pelo autor.

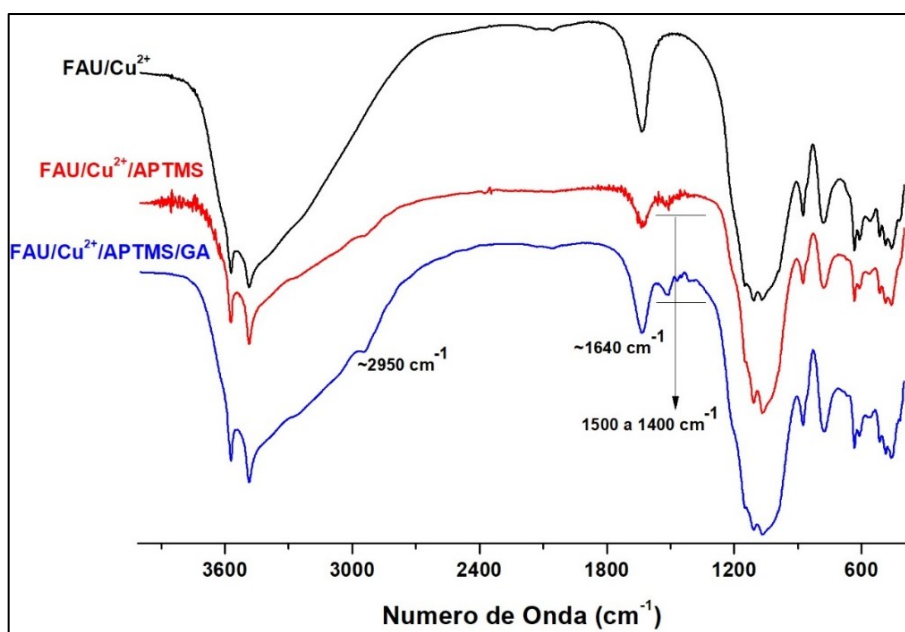
No caso das amostras obtidas da silanização e funcionalização das nanozeólitas FAU/ Na^+ e FAU/ Cu^{2+} , os espectros de FTIR, **Figuras 30 e 31**, respectivamente, apresentam o aparecimento de uma banda em torno de 1510 cm^{-1} após ambas as etapas de tratamento. Essa banda pode estar associada ao estiramento N–H,¹³⁶ nos agentes utilizados na silanização e funcionalização destas amostras. Nota-se também o desaparecimento da banda em 1400 cm^{-1} na amostra FAU/ Na^+ . A banda fraca verificada em 2950 cm^{-1} faz referência ao estiramento dos grupos C–H¹⁰⁹ presentes nas moléculas de glutaraldeído e APTMS. O aumento da intensidade na banda em 1640 cm^{-1} pode estar associado com a deformação dos grupos amina primário ou secundário protonados ($-\text{NH}_3^+\text{O}-\text{Si}/-\text{NH}_2^+\text{O}-\text{Si}$), produto da interação entre os grupos amina e os grupo silanóis (Si–OH) na superfície das zeólitas.¹³⁷ Essas bandas foram verificadas também para os materiais LTAc e BEAc, **Figuras 32 e 33**, respectivamente. Em geral, as vibrações observadas permitem inferir que o tratamento realizado foi bem-sucedido.

Figura 30. FTIR da nanozeólita FAU/Na⁺ antes, e após silanização (FAU/Na⁺/APTMS) e funcionalização (FAU/Na⁺/APTMS/GA).



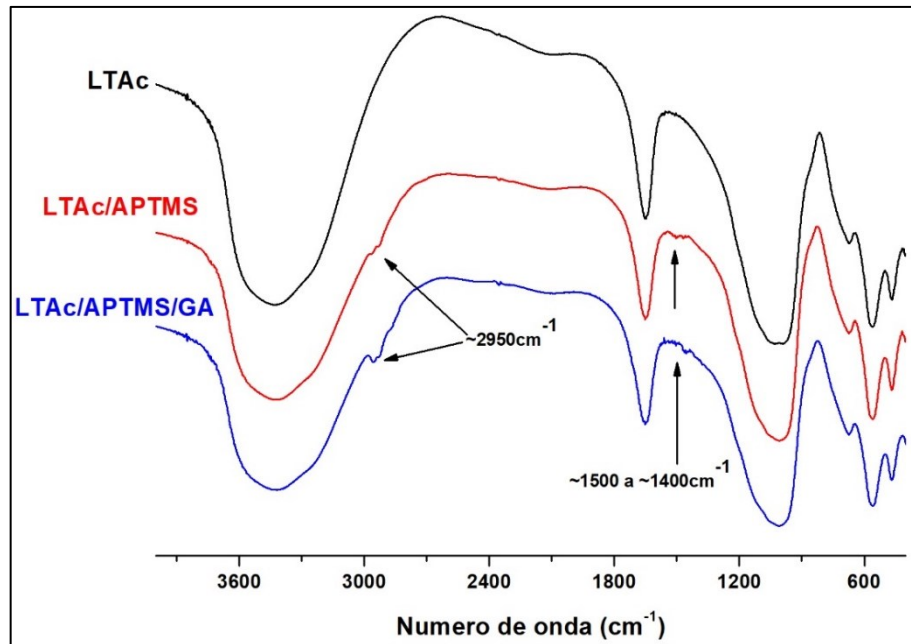
Fonte: elaborado pelo autor.

Figura 31. FTIR da nanozeólita FAU/Cu²⁺ antes, e após silanização (FAU/Cu²⁺/APTMS) e funcionalização (FAU/Cu²⁺/APTMS/GA).



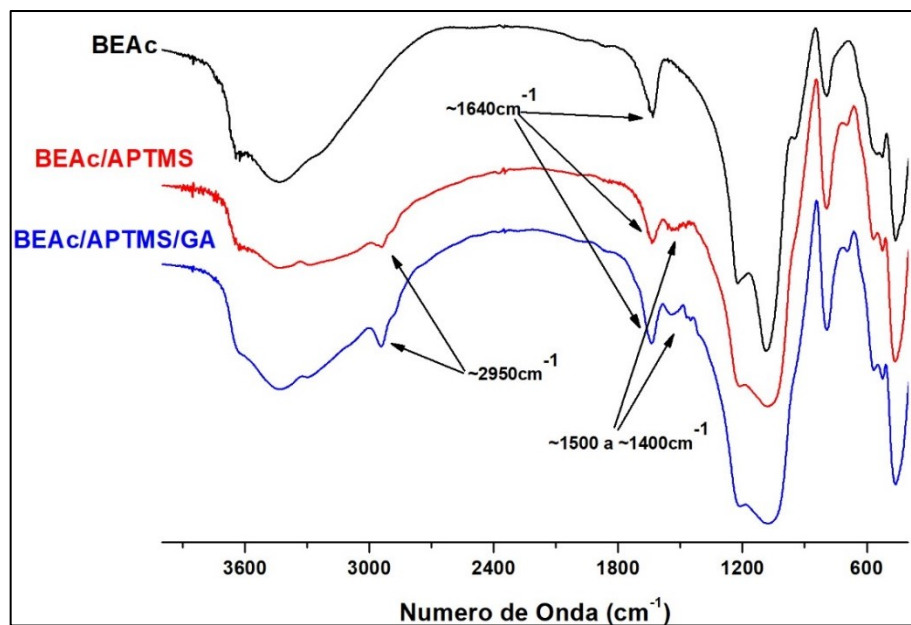
Fonte: elaborado pelo autor.

Figura 32. FTIR da nanozeólita LTAc antes, e após silanização (LTAc/APTMS) e funcionalização (LTAc/APTMS/GA).



Fonte: elaborado pelo autor.

Figura 33. FTIR da nanozeólita TS-1c antes, e após silanização (TS-1c/APTMS) e funcionalização (TS-1c/APTMS/GA).



Fonte: elaborado pelo autor.

5.3 Estudo do comportamento das lacases LPO, LAB e LAsp na forma livre quando variadas as condições reacionais

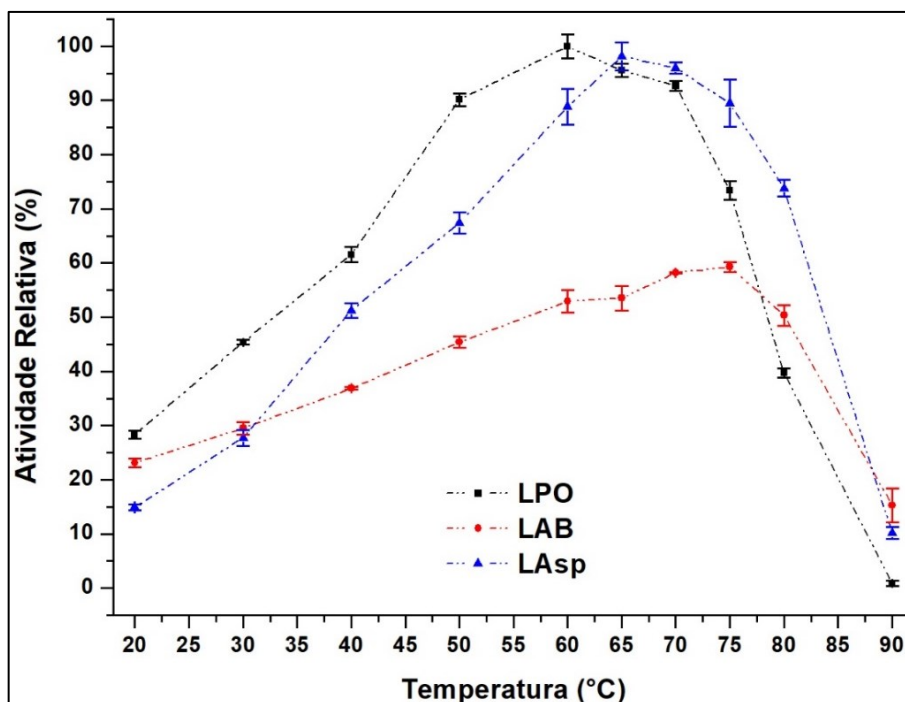
Sabe-se que enzimas são catalisadores biológicos de alta complexidade, com estruturas e funções diversificadas, e que abrangem uma enormidade de aplicações naturais. Esses catalisadores têm ganhado cada vez mais espaço em aplicações industriais devido ao desenvolvimento tecnológico na área de clonagem e expressão de proteínas. Mas, como são inúmeros os fatores que afetam a atividade catalíticas dessas macromoléculas, não existe um “manual” de uso das mesmas. Isso torna crucial um conhecimento mínimo do comportamento de uma enzima de interesse antes de sua aplicação em um sistema ainda não descrito.

Neste trabalho foram utilizadas três lacases comerciais de organismos diferentes. A lacase de *P. ostreatus* (LPO), a de *A. bisporus* (LAB) e a de *Aspergillus* sp. (LAsp). No intuito de conhecer melhor estas proteínas antes de imobilizá-las, foram realizados estudos sistemáticos para verificar o comportamento destas enzimas diante variações em parâmetros reacionais. A capacidade de oxidação de ABTS pelas lacases foi quantificada para diversas condições, conforme protocolos descritos no item 4.5.

5.3.1 Temperatura ótima das lacases LPO, LAB e LAsp

A primeira investigação realizada foi na busca da temperatura ótima de ação destas enzimas. Para isso, a atividade de oxidação para diferentes temperaturas foi determinada, e os dados coletados estão ilustrados na **Figura 34**. As lacases apresentaram temperaturas ótimas de 60 (LPO), 75 (LAB) e 65 °C (LAsp) – temperaturas altas quando se leva em consideração a origem biológica destes catalisadores. Temperaturas ótimas de 50 °C foram reportadas para as lacases de *P. ostreatus* e *A. bisporus*,^{68; 138; 139} enquanto Tonin *et al.* (2016),¹⁴⁰ verificou um ótimo de atividade para a LAB por volta de 80°C. No caso da LAsp, um temperatura ótima de 60 °C foi relatada.^{141; 142} Essas variações são provavelmente relacionadas as estruturas destas lacases. Apesar de conservada parcialmente a coordenação dos sítios catalíticos, estas enzimas apresentam variações nas composições, inclusive no grau de glicosilação, além de serem oriundas de organismos de diferentes classes.

Figura 34. Temperatura ótimas das lacases LPO, LAB e LAsp em solução. A atividade da LPO em 60 °C foi adotada como 100%.



Fonte: elaborado pelo autor.

5.3.2 Termoestabilidade das lacases LPO, LAB e LAsp

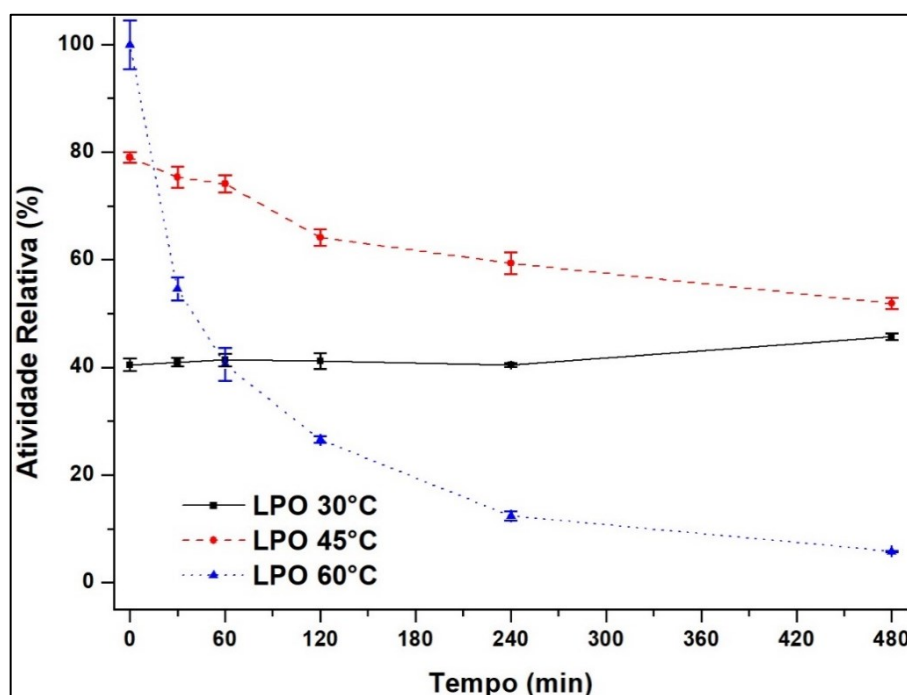
Embora as temperaturas ótimas para as lacases LPO, LAB e LAsp tenham sido determinadas, é importante salientar que os ensaios utilizados para tais análises são de curta duração (3 minutos), e não necessariamente estas enzimas são estáveis nas temperaturas encontradas para longos períodos de incubação. Para determinar as estabilidades térmicas das três enzimas, as respectivas atividades foram verificadas após diferentes intervalos de incubação. Foram escolhidas três temperaturas: uma temperatura mais amena e próxima da ambiente (30°C), uma temperatura intermediária (45°C), e uma temperatura mais elevada e próxima das temperaturas ótimas determinadas para estas lacases (60°C).

A lacase de *P. ostreatus*, apresentou uma instabilidade térmica elevada, **Figura 35**, perdendo cerca de 50% de sua atividade após apenas 30 minutos de incubação a 60°C. Após 8 horas, somente 10% da atividade inicial – atividade no tempo zero – foi verificada. A 45°C, houve também uma redução – menos acentuada – na atividade desta enzima. Após 8 horas de incubação, a enzima ainda manteve aproximadamente 75% da sua atividade inicial. Em último caso, para incubação a 30°C, a LPO não apresentou redução na atividade no intervalo

investigado. Observa-se um ligeiro aumento na capacidade oxidativa desta enzima com o aumento do tempo de exposição a esta temperatura.

A princípio, pode-se inferir que a temperatura adequada para aplicação desta enzima seja 30°C, na qual maior estabilidade foi observada. No entanto, quando as atividades desta enzima são comparadas para as diferentes temperaturas num mesmo intervalo – lembrando que a atividade relativa foi calculada com base na atividade no tempo zero a 60 °C –, percebe-se que, a 45°C, apesar da enzima apresentar redução na atividade para longos intervalos de incubação, ainda é mais ativa que a mesma a 30 °C, mantendo cerca de 50% da atividade máxima (100%) após 8 horas. Com isso, pode ser apontada a temperatura de 45 °C como sendo adequada para aplicação desta enzima por períodos longos.

Figura 35. Termoestabilidade da lacase de *P. ostreatus*. A atividade da LPO em 60 °C após 0 minutos foi adotada como 100%.

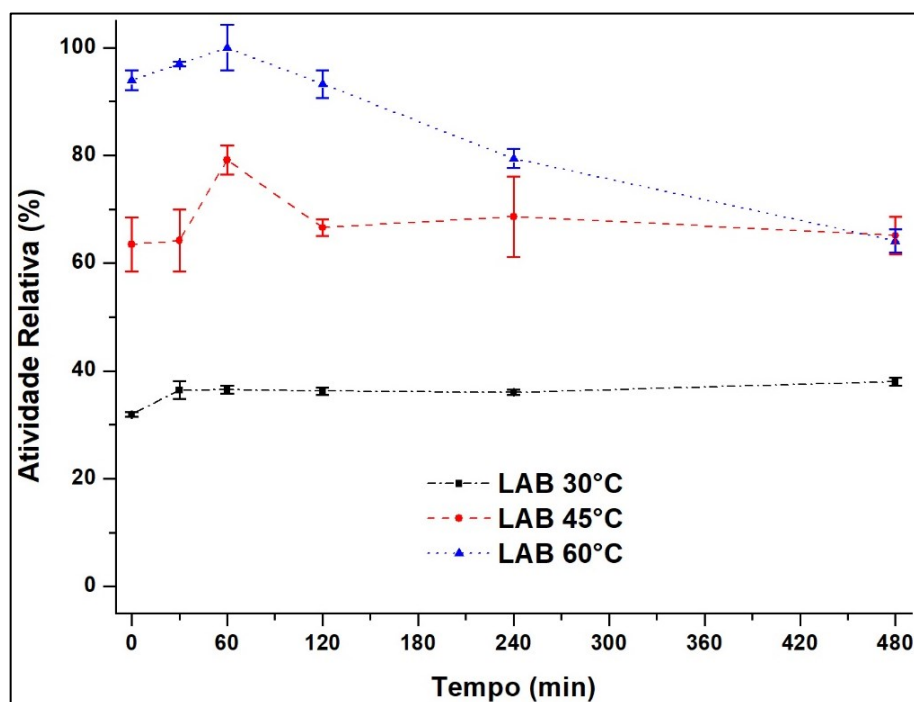


Fonte: elaborado pelo autor.

No caso da lacase de *A. bisporus*, uma maior estabilidade térmica foi observada, **Figura 36**, mesmo para a temperatura de 60°C. A enzima apresentou um comportamento recorrente para todas as temperaturas utilizadas, sua capacidade oxidativa aumentou na primeira hora de incubação. Após isso, houve uma ligeira redução na atividade para as temperaturas de 45 e 60°C, enquanto para a temperatura de 30 °C não houve redução durante as 8 horas de incubação.

Em relação à atividade máxima (100%) verificada a 60 °C após uma hora de incubação, a LAB apresentou 70% da atividade máxima após 8 horas tanto para 60 °C quanto para 45 °C, e atingiu 40% da atividade máxima após 8 horas a 30 °C. Neste caso, pode sim ser inferido que a temperatura mais elevada é adequada para aplicação desta enzima, assim como a temperatura intermediária, na qual a enzima não apresentou grande variação na atividade de oxidação durante todo o intervalo testado.

Figura 36. Termoestabilidade da lacase de *A. bisporus*. A atividade da LAB em 60 °C após 60 minutos foi adotada como 100%.



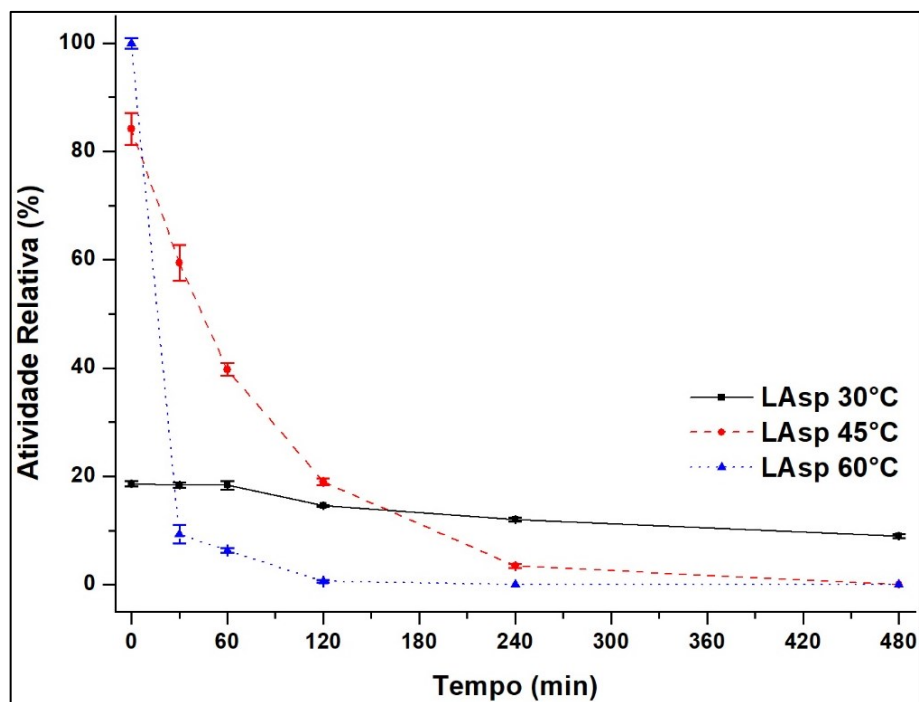
Fonte: elaborado pelo autor.

No que diz respeito a lacase de *Aspergillus* sp., **Figura 37**, uma forte instabilidade térmica foi observada. Para todas as temperaturas, até mesmo quando incubada a 30 °C, esta enzima teve redução de atividade com o aumento do tempo de incubação. A 60 °C a LAsp perdeu cerca de 90% de sua atividade inicial (100%) em apenas 30 minutos de exposição a esta temperatura. A 45 °C, essa redução foi atingida após 4 horas. A 30 °C, a atividade máxima verificada é apenas 20% da atividade geral máxima (60 °C, 0 minutos), chegando a 15% após as 8 horas de incubação. Neste caso, é difícil apontar qual temperatura é adequada para aplicação desta enzima, ao menos para aplicações que não sejam de curta duração.

Vale ressaltar que um dos motivos para a imobilização enzimática ser vantajosa é que, além da possibilidade de reuso desde catalisadores biológicos, em alguns casos, a imobilização

favorece a estabilização térmica da enzima,^{63; 143} e pode ser que a LAsp após imobilizada apresente uma melhor termoestabilidade, e sua aplicação seja pertinente no sistema proposto neste trabalho.

Figura 37. Termoestabilidade da lacase de *Aspergillus* sp.. A atividade da LAsp em 60 °C após 0 minuto foi adotada como 100%.



Fonte: elaborado pelo autor.

5.3.3 pH ótimo das lacases LPO, LAB e LAsp

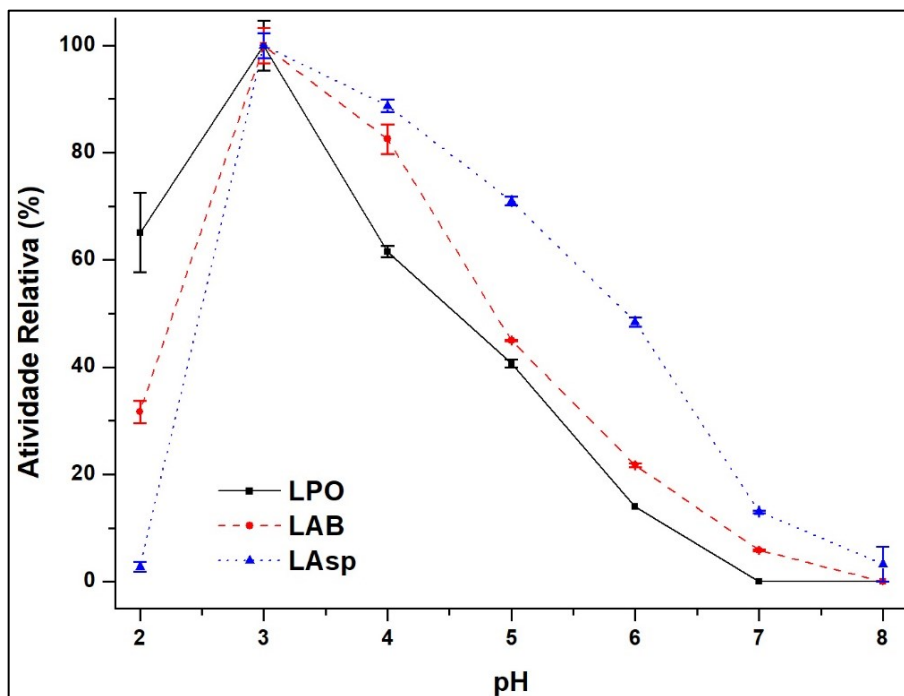
Além da temperatura, outro fator comumente descrito como influente na atividade de lacases é a alcalinidade/acidez do meio. Em geral, estas enzimas têm maior atividade oxidativa em meios de pH ácido.¹⁴⁰ Visando a determinação do pH ótimo das lacases LPO, LAB e LAsp, as atividades catalíticas destas enzimas foram verificadas a 45 °C fazendo-se a variação do pH do meio reacional.

A **Figura 38** apresenta as curvas obtidas, e todas as enzimas apresentaram um ótimo de atividade em pH 3. A LPO apresentou 65 e 60% da atividade máxima (pH 3) quando em meios com pH 2 e 4, respectivamente, e manteve aproximadamente 40% em pH 5. Esta lacase não apresentou atividade em pH neutro ou básico.

Em relação à LAB, uma redução mais elevada em pH 2 foi observada, cerca de 70% menor que a atividade máxima, enquanto em pH 4, 80% da atividade foi verificada. Aproximadamente 10% de atividade residual foi quantificada em pH neutro, e em pH básico não houve oxidação de ABTS. O comportamento da LAsp não divergiu muito das demais, com exceção em pH 2, que praticamente não foi verificada atividade. Em pH 4, 90% de atividade residual foi encontrada, enquanto em pH 5, 30% de redução na atividade foi atingida.

Em estudos a 25 °C, valores ótimos de atividade em pHs 4,¹³⁸ e 5,6,⁶⁸ foram reportados para a LPO, sendo que, no segundo caso, foi feito o uso de siringaldazina como substrato ao invés de ABTS. Tonin *et al.*(2016),¹⁴⁰ verificaram um ótimo de atividade em pH básico para a lacase LAB a 25 °C, enquanto Zhilin *et al.* (2016),¹³⁹ relaram o valor 3 como pH ótimo desta enzima também a 25 °C. Nos trabalhos de Lloret *et al.* (2011,2012),^{141; 142} o pH 3 foi descrito como ótimo para a LAsp. Esses dados da literatura estão de acordo com os dados coletados neste trabalho, e as diferenças observadas ilustram a sensibilidade destas enzimas à pequenas variações no sistema reacional.

Figura 38. pH ótimo para as lacases LPO, LAB e LAsp a 45 °C. A atividade de cada lacase em pH 3 foi adotada como 100%.



Fonte: elaborado pelo autor.

Assim como a verificação da termoestabilidade das lacases, é crucial determinar a estabilidade das mesmas em razão ao pH do meio, como demonstrado a seguir.

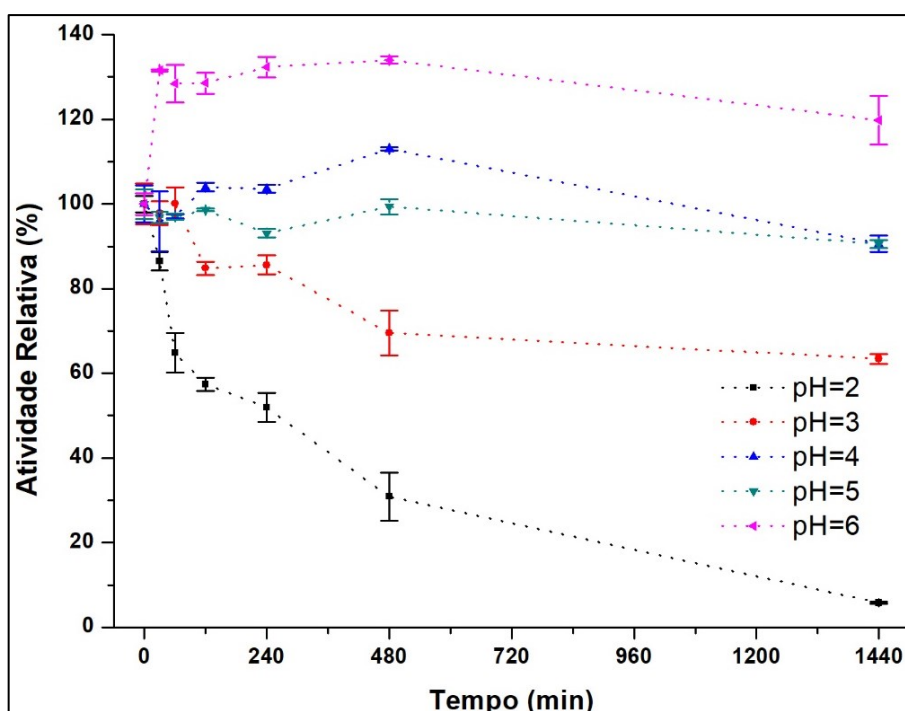
5.3.4 Estabilidade das lacases LPO, LAB e LAsp sob diferentes pHs

Da seção anterior, o pH 3 foi determinado como ótimo para as lacases LPO, LAB e LAsp. Entretanto, a determinação do pH ótimo foi realizada com ensaios de curta duração – menos de 5 minutos – o que não garante que estas sejam estáveis neste pH para períodos mais longos. Para verificar a estabilidade das enzimas em relação ao pH do meio, ensaios seguindo o protocolo 8 do item 4.5 foram realizados, e os resultados ilustrados nas **Figuras 39, 40 e 41**.

Todas as lacases são bastante instáveis em pH 2, e suas atividades reduzidas com o passar do tempo, em especial a LAsp (**Figura 41**), que em cerca de meia hora tem sua atividade reduzida a 10% da atividade inicial. O único pH no qual a LAsp não apresentou redução na atividade foi 6, o pH mais próximo ao neutro testado.

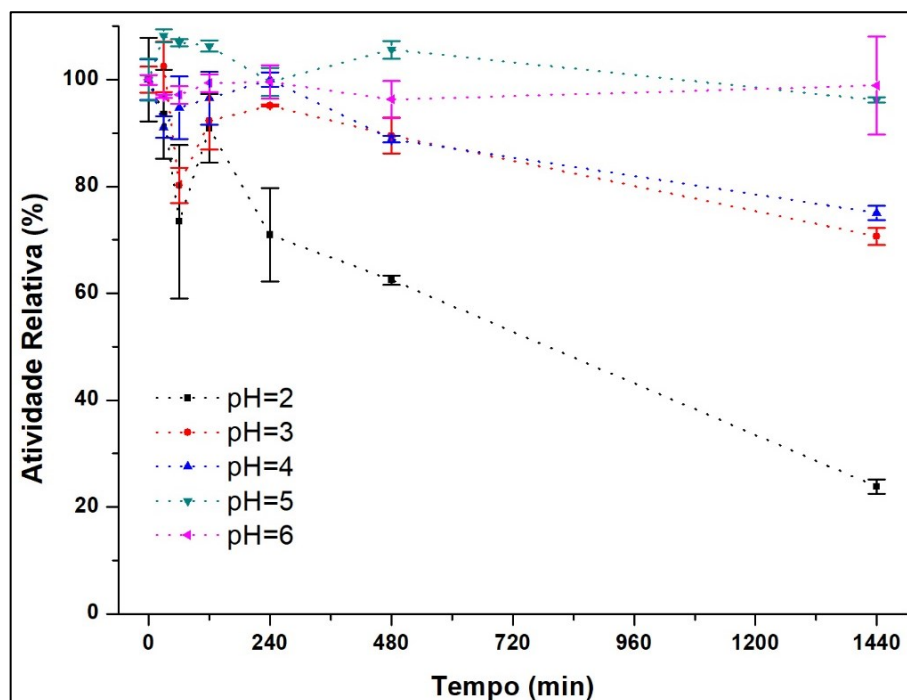
As lacases LPO e LAB são mais estáveis do que a LAsp nos pHs entre 3 e 5, sendo que a LAB é razoavelmente estável mesmo em pH 3, e tem certo aumento na atividade com o tempo quando em pH 5. Aumento similar ocorre pra LPO em pHs 4 e 6.

Figura 39. Estabilidade da lacase LPO para diferentes pHs.



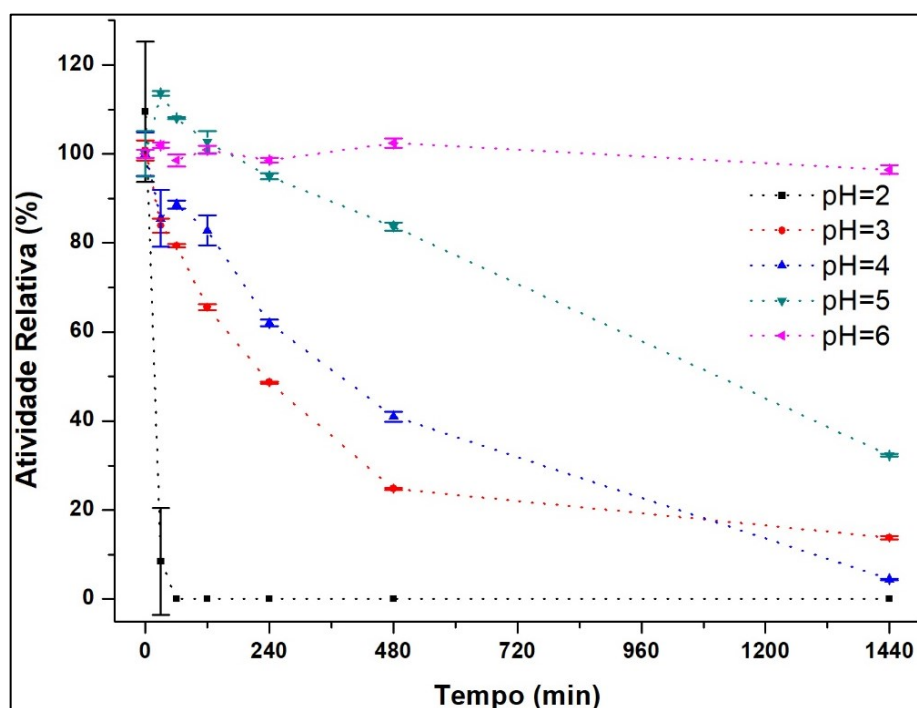
Fonte: elaborado pelo autor.

Figura 40. Estabilidade da lacase LAB para diferentes pHs.



Fonte: elaborado pelo autor.

Figura 41. Estabilidade da lacase LAsp para diferentes pHs.



Fonte: elaborado pelo autor.

Levando-se em consideração os pHs ótimos verificados para estas enzimas e suas estabilidades nestas condições, é possível afirmar que a aplicação destes catalisadores exige um cuidado grande com as condições reacionais.

5.3.5 Efeito de metais de transição em solução na atividade catalítica das lacases estudadas

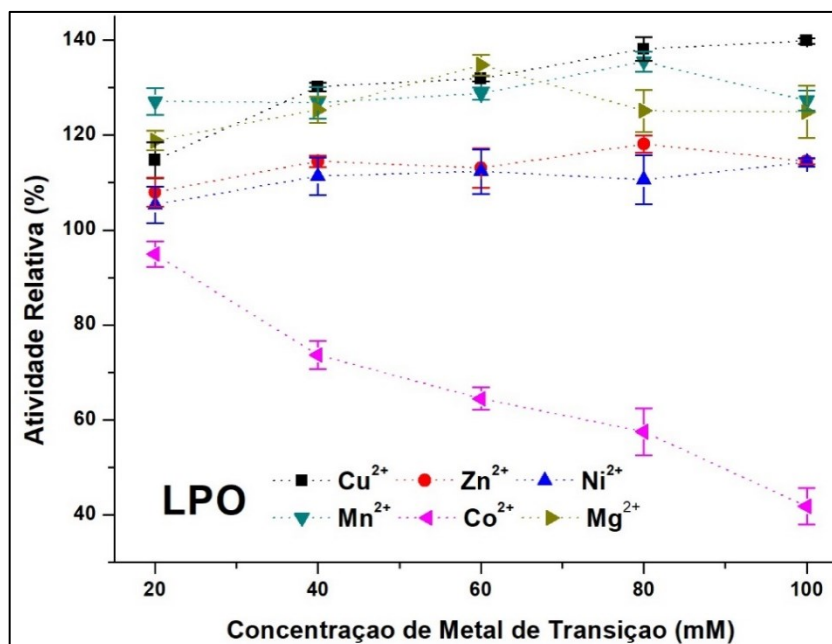
Como mencionado na seção 5.1, a inclusão do suporte FAU/Cu²⁺ neste trabalho foi baseada nos relatos da literatura, nos quais o cobre foi apontado como potenciador da atividade de lacases.^{121; 122; 123; 124} Esses relatos são corroborados com os dados que serão apresentados e discutidos a seguir, coletados com a intenção de justificar e fortificar a inclusão deste suporte nesta investigação. Além disso, auxiliam na caracterização comportamental dessas proteínas. No caso, foram realizados ensaios para analisar a influência dos metais de transição Cu²⁺, Zn²⁺, Ni²⁺, Co²⁺, Mn²⁺ e Mg²⁺, na capacidade oxidativa das lacases LPO, LAB e LAsp.

A **Figura 42** mostra as curvas de variação da atividade catalítica da LPO em função da concentração dos diferentes metais de transição. Apenas o cobalto em solução afetou negativamente a atividade enzimática, com uma redução discreta de aproximadamente 5% quando em baixa concentração (20 mM), e mais acentuada com o aumento da concentração, chegando a 60% na concentração mais alta (100 mM). Todos os demais metais testados influenciaram positivamente a capacidade oxidativa desta lacase, com destaque para o manganês, o cobre e o magnésio, que aumentaram em até aproximadamente 40% os produtos de oxidação. O níquel e o zinco tiveram efeitos mais discretos, chegando a um aumento máximo de 20%.

Para a lacase LAB o comportamento observado foi um pouco distinto. Na **Figura 43**, pode ser observado que, para a concentração mínima testada (20 mM), todos os metais de transição utilizados beneficiaram a atividade catalítica desta enzima. Destaca-se o níquel, que proporcionou um aumento de cerca de 40% na atividade enzimática nesta concentração. Entretanto, o aumento observado em 20 mM foi reduzido gradativamente para os metais Ni²⁺, Mn²⁺, Mg²⁺ e Co²⁺ com o aumento da concentração.

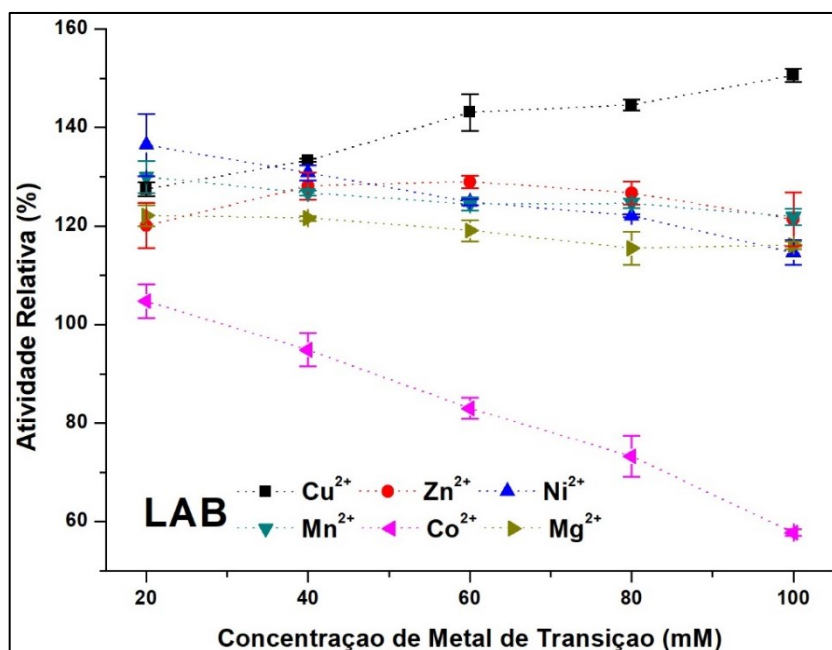
Além disso, o cobalto agiu como redutor de atividade da enzima para concentrações iguais ou maiores que 40 mM, atingindo uma redução de 40% em 100 mM. Por outro lado, o zinco aumentou a capacidade oxidativa da LAB gradativamente até a concentração de 60 mM, atingindo um aumento máximo de aproximadamente 30%. Após isso, o efeito potenciador deste metal foi reduzido para valores comparáveis ao de concentrações menores. O único metal que proporcionou aumento gradual na atividade enzimática com o aumento da concentração para todas as concentrações utilizadas foi o cobre, que atingiu um aumento de cerca de 50% a 100 mM.

Figura 42. Influência de metais de transição na atividade da lacase LPO a 45 °C. A atividade da LPO na ausência de metais de transição foi adotada como 100%.



Fonte: elaborado pelo autor.

Figura 43. Influência de metais de transição na atividade da lacase LAB a 45 °C. A atividade da LAB na ausência de metais de transição foi adotada como 100%.



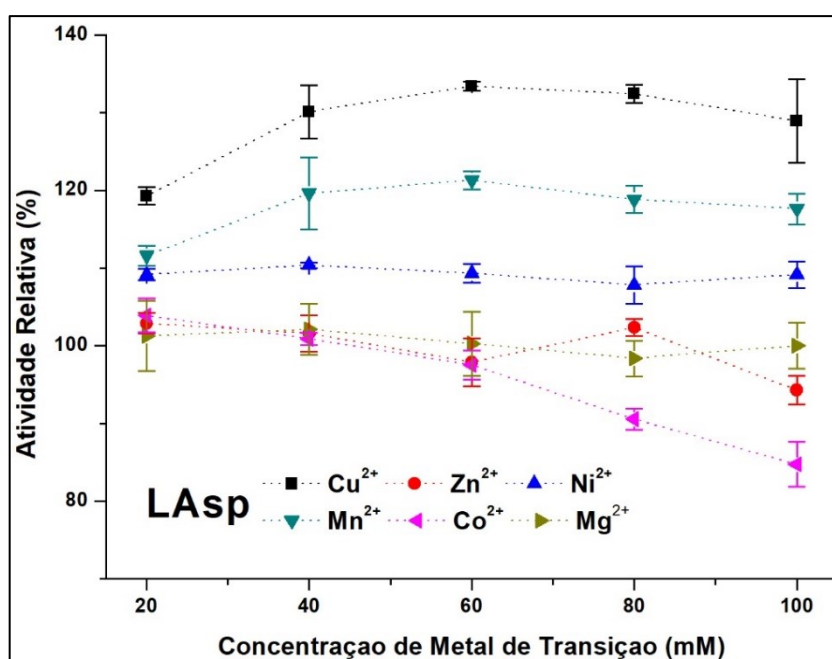
Fonte: elaborado pelo autor.

Para finalizar esta etapa de caracterização, a lacase LAsp também foi testada. A **Figura 44** ilustra as curvas obtidas para esta enzima no que diz respeito ao efeito dos metais de transição testados em sua atividade. Novamente o cobre foi o destaque como potenciador de atividade, e

para todas as concentrações utilizadas apresentou um aumento maior quando comparado com os demais metais, atingindo um aumento máximo de 35% a 60 mM.

Além do cobre, o níquel foi o único que proporcionou um aumento um pouco mais elevado, atingindo um máximo de 20% a 60 mM. Os demais metais não ultrapassaram a marca de 10% de aumento, sendo que, os metais Zn^{2+} e Mg^{2+} margearam a linha de efeito nulo para todas as concentrações, enquanto o Co^{2+} novamente apresentou efeito redutor de atividade com o aumento da concentração.

Figura 44. Influência de metais de transição na atividade da lacase LAsp a 45 °C. A atividade da LAsp na ausência de metais de transição foi adotada como 100%.



Fonte: elaborado pelo autor.

Para todas as lacases, um comportamento análogo foi observado: o cobre teve destaque como potenciador de atividade, enquanto o cobalto destacou-se como redutor. É importante indicar que estes ensaios foram feitos utilizando metais em solução, e os efeitos observados não necessariamente são refletidos quando os mesmos estão no interior dos suportes de imobilização, como cátion de compensação no caso.

No entanto, conhecendo a propriedade de troca iônica de zeólitas, assim como a lixiviação de cátions de compensação quando o equilíbrio químico favorece, conhecer a influência de metais em solução nas atividades das lacases é importante, principalmente considerando o fato de ter sido aplicado um suporte contendo cobre como cátion de compensação neste trabalho.

5.3.6 Concentração, troca de tampão e estudos da estabilidade da lacase comercial de *Aspergillus* sp. (LAsp)

A **Tabela 3** mostra a concentração de proteína estimada para a solução comercial (A), e para as amostras após troca de tampão B e C. As amostras B e C tiveram seus volumes ajustados manualmente para aproximadamente 500 μ L. Este ajuste manual (erro do experimentador) pode explicar o aumento aparente da concentração quando comparadas as amostra A e B. Se o processo de filtração recuperasse 100% da proteína, e o ajuste do volume fosse exato, a concentração da amostra B não poderia ser maior que da amostra A. O mesmo vale para a amostra A, em que redução da concentração é observada, não permite atribuir a perda de proteína no processo de filtração apenas, pois há incerteza no volume. Parcela da quantidade de proteína pode ter sido perdida durante a filtração, o que é provável ter acontecido, no entanto, a falta de exatidão no volume impossibilita determinar a quantidade recuperada com exatidão. De toda forma, estes erros são mínimos, e não reduzem a validade qualitativa dos dados. Além disso, os componentes desconhecidos que dão coloração marrom a amostra comercial A, com concentração menor em B, e bastante reduzida (tendendo a zero) na amostra C, podem ter interferido também na estimativa das concentrações. Com base nesta possibilidade, pode ser assumido que a amostra C tem uma concentração estimada com maior grau de confiabilidade. Em todo caso, perdas críticas de proteína não foram observadas.

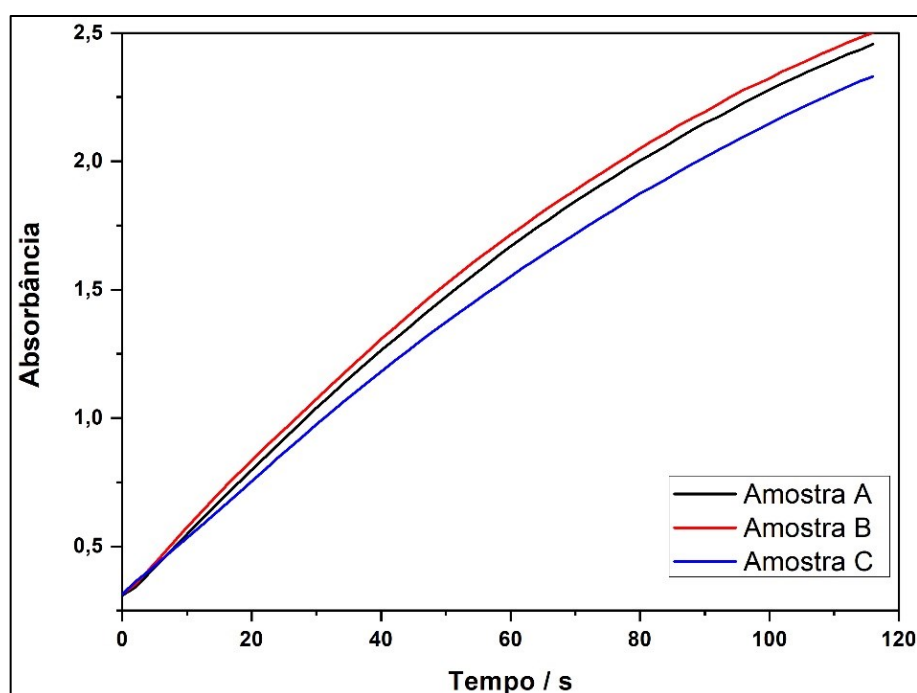
Tabela 3. Concentração estimada de amostras enzimáticas

Amostra	Concentração (mg/mL)
A	13,6 \pm 0,3
B	14,8 \pm 0,8
C	12,7 \pm 0,5

Considerando a diferença nas concentrações das amostras, cerca de 8% para o par A/B, ou menos para o par A/C, seria esperado diferenças nas atividades enzimáticas das amostras, uma vez que não foi feito ajuste de concentração antes das medidas espectrofotométricas. A **Figura 45** apresenta a variação da absorbância acompanhada por 2 minutos. Os espectros têm evolução similares no tempo, com valores pontuais obedecendo a regra: amostra B > amostra A > amostra C. Os valores são muito próximos quando as concentrações estimadas são utilizadas para normalização. As razões absorbância/concentração para o tempo 1 minuto são 0,123, 0,116, and 0,122 para as amostras A, B and C, respectivamente. Razões diferenciam

menos de 5% entre amostras A and B e menos de 1% comparando A com C. Com base nestes dados, pode ser inferido que as atividades enzimáticas específicas são bastante aproximadas para as amostras testadas. Sendo assim, o processo de filtragem e troca de tampão não afetou a atividade da enzima, pelo menos não a curto prazo (menos de 4 horas entre o início da filtragem e a medida de atividade).

Figura 45. Testes de atividade das amostras A, B e C diluídas 400 vezes em tampão fosfato, 100 mM, pH 7. Comprimento de onda = 436 nm. ABTS usado como substrato.



Fonte: elaborado pelo autor.

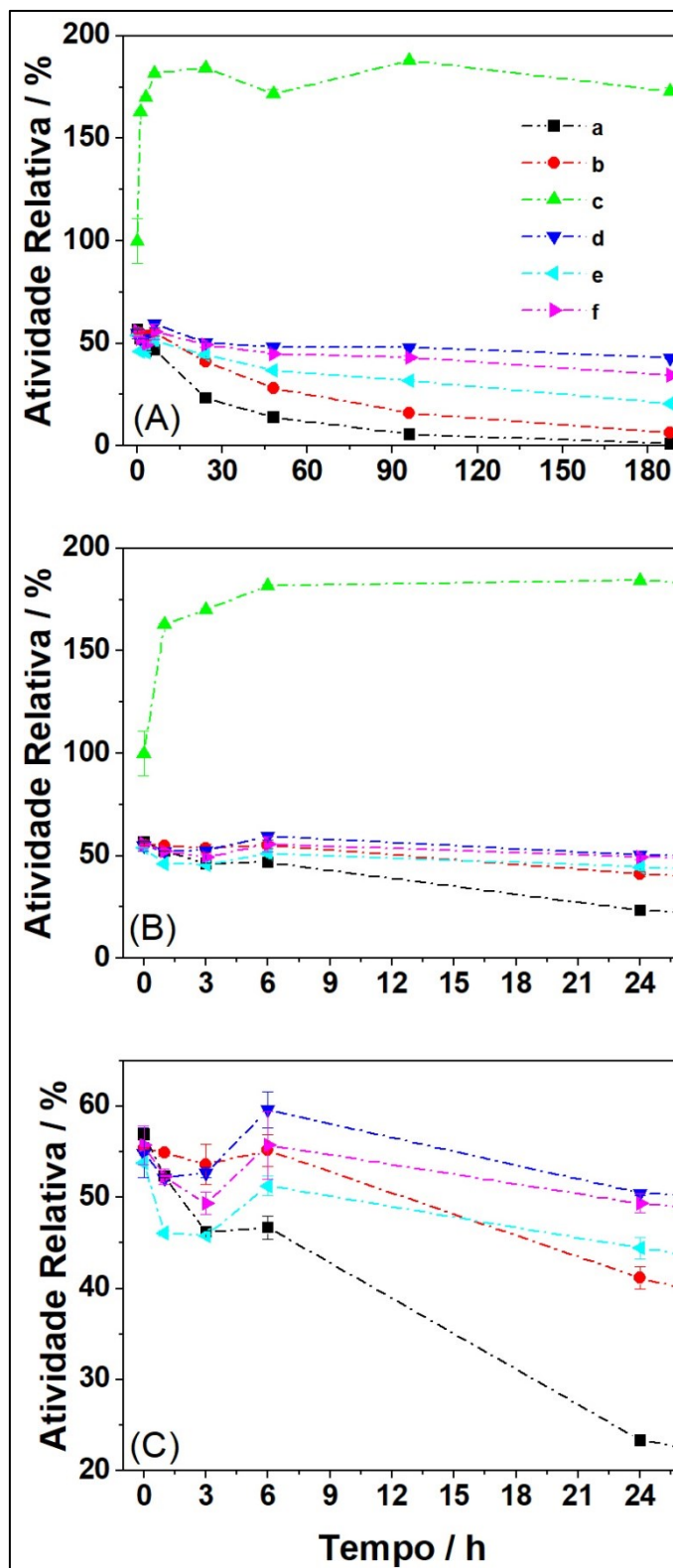
A **Figura 46A** mostra o acompanhamento da atividade da enzima LAsp no tempo após incubação em diferentes tampões. Esta figura é bastante informativa. É evidente que a enzima incubada sob mesmo pH mas para diferentes componentes de tampão teve sua atividade variada no tempo. Em pH neutro, a atividade inicial da enzima foi 40 % superior as atividades da mesma incubada em tampões com pH 4,5. Isso indica que um efeito rápido devido ao pH foi sentido pela enzima. Vale ressaltar que o tempo “zero” não foi exatamente zero, mas sim algo por volta de dois minutos, tempo este necessário para o preparo das respectivas soluções e primeira medida de atividade. A hora inicial não foi acurada justamente por rápidos efeitos que a enzima sofre nas condições experimentais. Entretanto, é visual que no tempo, a enzima incubada em pH neutro atingiu um patamar, e foi aproximadamente constante por todo o experimento. Por outro lado, quando exposta a meios ácidos, a atividade decresce no tempo, redução mais

acentuada para tampões do tipo acetato quando comparados com citrato e succinato. A enzima incubada em tampão citrato mostrou boa estabilidade, e menor redução na atividade em comparação com demais tampões de pH 4,5. Tampão succinato levou a um decréscimo intermediário entre citrato e acetato.

Para melhor analisar os resultados, a **Figura 46B** evidencia as primeiras 24 horas de testes. Pode ser observado que as atividades de todas as incubações variaram no mesmo intervalo por 24 horas, com exceção da incubação em tampão acetato, 100 mM, que apresentou redução acentuada entre 6 e 24 horas. Apesar de melhora visual, ainda é difícil comparar a evolução das curvas para os tampões ácidos, uma vez que o tampão neutro tem direção oposta e dificulta visualização. Para melhor exibição, a **Figura 46C** apresenta apenas os resultados para incubação em meio ácido. É claro que cada tampão induz um comportamento diferente na atividade enzimática com o passar do tempo. Embora inicialmente todas as atividades tenham sido bastante próximas, para longos prazos, a resposta foi acentuada. A enzima teve sua atividade bastante reduzida, tendendo a zero, após 188 horas de incubação em tampão acetato 100 mM, e mesmo em tampão com metade da concentração de ácido, a redução na atividade ainda foi bastante elevada. Os resultados referentes aos tampões succinato claramente indicam que a concentração do tampão tem efeito direto na redução da atividade, quando maior a concentração, maior a redução da atividade no tempo. Entre todas as soluções testadas, o tampão citrato 100 mM foi o que permitiu manutenção da atividade enzimática por maior duração.

No geral, estes testes auxiliaram na compreensão do efeito que os componentes dos tampões utilizados têm sobre a enzima estudada. O pH neutro é adequado para armazenamento de longa duração, no entanto, como a atividade de lacases é altamente dependente de pH para catálise, o uso de tampão citrato seria mais indicado para reações de longa duração.

Figura 46. Atividade enzimática da LAsp purificada após incubação em diferentes tampões a 8 °C acompanhada no tempo. Os tampões utilizados foram: a – 100 mM tampão acetato pH 4,5; b – 50 mM tampão acetato pH 4,5; c – 100 mM tampão fosfato pH 7,0; d – 100 mM tampão citrato pH 4,5; e – 100 mM tampão succinato pH 4,5; f – 50 mM tampão succinato pH 4,5. Parte (A) apresenta integralmente as curvas obtidas no experimento, (B) evidencia as primeiras 24 horas e (C) compara as primeiras 24 horas para os tampões com pH 4,5.



Fonte: elaborado pelo autor.

5.4 Imobilização enzimática nos suportes nanozeolíticos e estudos dos complexos formados

Os diferentes suportes funcionalizados e caracterizados nas seções anteriores foram utilizados para imobilização das três lacases comerciais em estudo. Foi iniciada a busca pelo protocolo correto de imobilização, e do suporte ideal para cada enzima – ideal no sentido de manter ou potencializar a atividade catalítica das lacases após a imobilização –, resultados discutidos a seguir.

5.4.1 Imobilização das lacases LPO, LAB e LAsp nos diferentes suportes nanozeolíticos sintetizados

A **Tabela 4** apresenta os dados coletados referente a imobilização enzimática: os percentuais de imobilização enzimática, as atividades das soluções remanescentes e dos complexos formados – atividades estas determinadas conforme descrito no item 4.5. Foram utilizados os suportes nanozeolíticos FAU/Na⁺/APTMS/GA, TS-1c/APTMS/GA, ZSM-5c/APTMS/GA e FAU/Cu²⁺/APTMS/GA para imobilização das lacases LPO, LAB e LAsp – protocolo descrito no item 4.4. Para completar esta etapa, os materiais LTAc/APTMS/GA e BEAc/APTMS/GA foram utilizados para imobilização da lacase LAsp. Para uso comparativo, em amarelo está indicado o valor teórico que seria esperado para a atividade dos complexos caso toda a enzima disponibilizada fosse imobilizada no suporte e mantivesse 100 % da sua atividade. Esse valor seria de 15000 $\mu U/mg$, e é consideravelmente superior as atividades de todos os complexos testados, mesmo aqueles que imobilizaram praticamente toda a enzima disponibilizada. Isso é resultado, principalmente, da mudança do sistema catalítico de homogêneo para heterogêneo. A dispersibilidade de uma enzima em solução é muito superior a dispersibilidade dos complexos nanozeólitas/enzimas. Isso deve-se a limitações de transferência de massa, que podem afetar criticamente a cinética de um sistema catalítico.⁷⁹ Portanto, as atividades dos complexos serão comparadas entre si, não com um suposto equivalente de enzima livre.

Como pode ser observado, a maioria das soluções remanescentes não apresentaram atividade, com exceção das soluções após a imobilização da LAsp nos suportes FAU/Na⁺/APTMS/GA, TS-1c/APTMS/GA, FAU/Cu²⁺/APTMS/GA e LTAc/APTMS/GA em que 86 ± 3 ; $6,2 \pm 0,5$; $9,3 \pm 0,4\%$ e $93,7 \pm 0,3\%$ de atividade remanescente foram verificados, respectivamente. Esses valores concordam bem com os percentuais de imobilização

mensurados para os suportes, em que a solução com maior atividade remanescente apresentou o menor percentual de imobilização ($26 \pm 2\%$); e as demais que apresentaram baixa atividade remanescente, apresentaram maiores percentuais de imobilização (88 ± 4 e $90 \pm 3\%$). Os suportes ZSM-5c/APTMS/GA e BEAc/APTMS/GA também apresentaram altos percentuais de imobilização para a LAsp (92 ± 4 e $94 \pm 4\%$, respectivamente), e praticamente nenhuma atividade enzimática remanescente.

Não foram verificadas atividades remanescentes para as lacases LPO e LAB após imobilização em todos os suportes testados. Isso supostamente indica que toda a proteína disponibilizada foi imobilizada. Entretanto, os desvios nas medidas são muito altos, o que implica na incerteza da real quantidade de enzima imobilizada (veja nota no rodapé da **Tabela 4**). Esses problemas podem ser atribuídos, a princípio, às características desconhecidas do material comercial utilizado. São materiais sólidos, dos quais desconhecemos a composição não enzimática, e que pode não estar distribuída homogeneamente, dificultando o controle das concentrações. No entanto, isso não inviabilizou seu uso, considerando que os demais ensaios de caracterização foram realizados com precisão. Apesar disso, os resultados mais relevantes apresentados na **Tabela 4** são os referentes às atividades dos complexos formados após a imobilização, todos obtidos com excelente precisão.

Como destacado em verde, todos os complexos formados com o suporte FAU/Cu²⁺/APTMS/GA possuem atividades catalíticas superiores a maioria dos complexos com os demais suportes, superiores em até 400 vezes, comparando-se o complexo mais ativo (FAU/Cu²⁺/APTMS/GA/LAsp) com o menos ativo (ZSM-5c/APTMS/GA/LAB). É importante evidenciar que os testes de atividade dos complexos foram realizados a temperatura ambiente, e os potenciais catalíticos verificados podem ou não ser os máximos – máximo nas condições ótimas –, pois não se sabia até este ponto se após a imobilização as condições ótimas observadas para as enzimas na forma livre foram mantidas.

Analisando isoladamente os resultados catalíticos para os complexos formados com a lacase LAsp, apesar dos suportes TS-1c/APTMS/GA, ZSM-5c/APTMS/GA, FAU/Cu²⁺/APTMS/GA e BEAc/APTMS/GA terem imobilizado aproximadamente a mesma quantidade de enzima – cerca de 90% da proteína disponibilizada – a atividade do complexo formado com suporte contendo Cu²⁺ foi por volta de 9 e 125 vezes maior que a dos complexos relacionados às nanozeólitas TS-1c e ZSM-5c, respectivamente. Além disso, ao comparar os complexos FAU/Cu²⁺/APTMS/GA/LAsp e FAU/Na⁺/APTMS/GA/LAsp, em que a única

diferença química dos suportes é a presença do cobre – estruturalmente os materiais são bastante distintos, mas essa informação ainda não será levada em consideração nesta parte da discussão –, seria esperado que a atividade do segundo complexo fosse aproximadamente o dobro da atividade do primeiro, se no caso a proporção entre os percentuais de imobilização (~90/40) fosse refletida na atividade do complexo. Isso não é verificado, mas sim uma atividade cerca de 11 vezes superior do complexo FAU/Cu²⁺/APTMS/GA/LAsp.

Tabela 4. Percentual de imobilização, atividade remanescente e atividade catalítica dos complexos nanozeólitas/lacases formados após a imobilização das lacases LPO, LAB e LAsp nos diferentes suportes sintetizados.

Suporte	Lacase	Imobilização / %	Atividade Remanescente / %	Atividade do Complexo (μU/mg)
SISTEMA HIPOTÉTICO ^β		100	0	15000
FAU/Na ⁺ /APTMS/GA	LPO	94 ± 32*	0	86 ± 5
	LAB	55 ± 30*	0	204 ± 11
	LAsp	39 ± 2	86 ± 3	291 ± 13
TS-1c/APTMS/GA	LPO	84 ± 25*	0	58 ± 4
	LAB	63 ± 21*	0	99 ± 4
	LAsp	88 ± 4	6,2 ± 0,5	364 ± 16
ZSM-5c/APTMS/GA	LPO	88 ± 35*	0	276 ± 14
	LAB	78 ± 33*	0	8 ± 2
	LAsp	92 ± 4	0	25 ± 3
LTA/APTM/GA	LPO	NR [#]	NR	NR
	LAB	NR	NR	NR
	LAsp	26 ± 2	93,7 ± 0,3	258 ± 13
BEA/APTMS/GA	LPO	NR	NR	NR
	LAB	NR	NR	NR
	LAsp	94 ± 4	0,8 ± 0,2	2133 ± 55
FAU/Cu ²⁺ /APTMS/GA	LPO	85 ± 25*	0	1879 ± 45
	LAB	90 ± 30*	0	1535 ± 39
	LAsp	90 ± 3	9,3 ± 0,4	3166 ± 57

^β SISTEMA HIPOTÉTICO – caso 100 % da enzima fosse imobilizada no suporte e mantivesse 100 % da atividade que possuía na forma livre, o complexo formado apresentaria atividade de 15000 μU/mg, independente do suporte ou enzima testada, pois a quantidade de enzima disponibilizada foi ajustada com base em suas respectivas atividades específicas, e constante para todos os ensaios: 1 U/mL.

[#] NR – não realizado

* Não foi possível determinar com precisão os percentuais de imobilização para as lacases LPO e LAB. Testes para determinação da concentração das soluções preparadas com estas enzimas, disponibilizadas na forma sólida, a partir da curva padrão de BSA e método de Bradford não foram realizados com sucesso. Estatisticamente não foi possível obter réplicas de medida que não excedessem o erro aceitável – ensaios repetidos por cinco vezes, no mínimo.

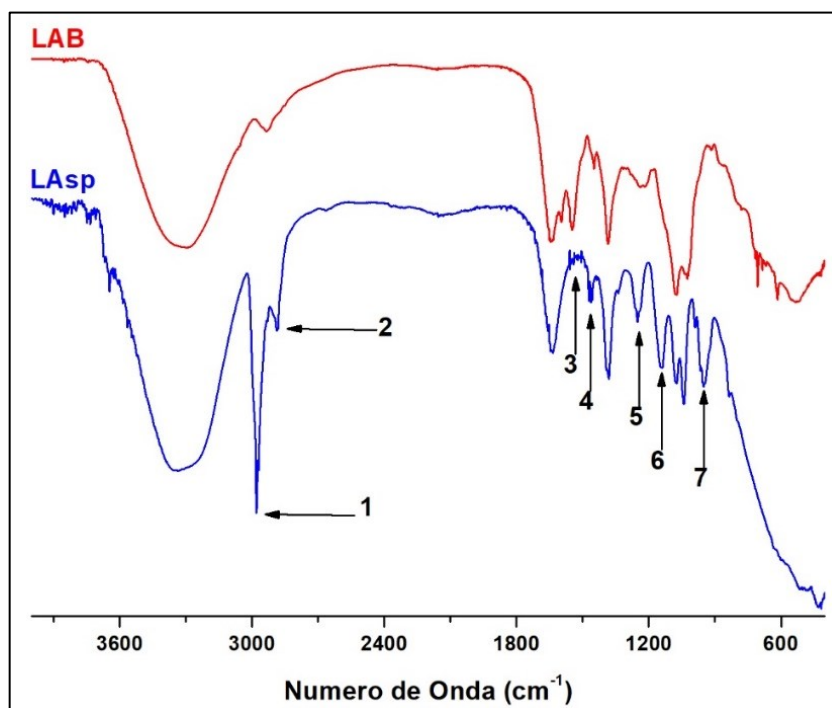
O complexo BEAc/APTMS/GA/LAsp apresentou uma alta atividade catalítica ($2133 \pm 55 \mu\text{U}/\text{mg}$) – destacada em laranja –, comparada com as obtidas para os complexos com o suporte FAU/ Cu^{2+} /APTMS/GA, $1879 \pm 45 \mu\text{U}/\text{mg}$ (LPO), $1535 \pm 39 \mu\text{U}/\text{mg}$ (LAB) e $3166 \pm 57 \mu\text{U}/\text{mg}$ (LAsp). O resultado para a zeólita BEA indica que a presença de cobre não é obrigatória para que a zeólita seja um suporte efetivo para imobilização desta lacase. É provável que, as interações enzima/suporte sejam sim beneficiadas pela presença deste metal de transição, mas, a LAsp foi imobilizada com sucesso no suporte BEAc/APTMS/GA, e o complexo apresentou alta atividade catalítica. Com base nas atividades catalíticas de oxidação do substrato ABTS, os quatro complexos com maior atividade foram selecionados para a reação de oxidação do glicerol.

5.4.2 Caracterização por ATR-FTIR dos complexos nanozeólitas/lacases

Para verificar espectroscopicamente a presença das lacases após imobilização nos suportes, análises de ATR-FTIR foram realizadas para os complexos e comparadas com os suportes antes do processo de imobilização. Foram realizadas análises de FTIR atenuadas com intuito de ter uma maior resolução nas análises, uma vez que as bandas características dos materiais zeolíticos são de elevada intensidade, e dificulta a identificação de variações no material que possam ser assinaladas as enzimas presas as superfícies zeolíticas via ligação covalente.

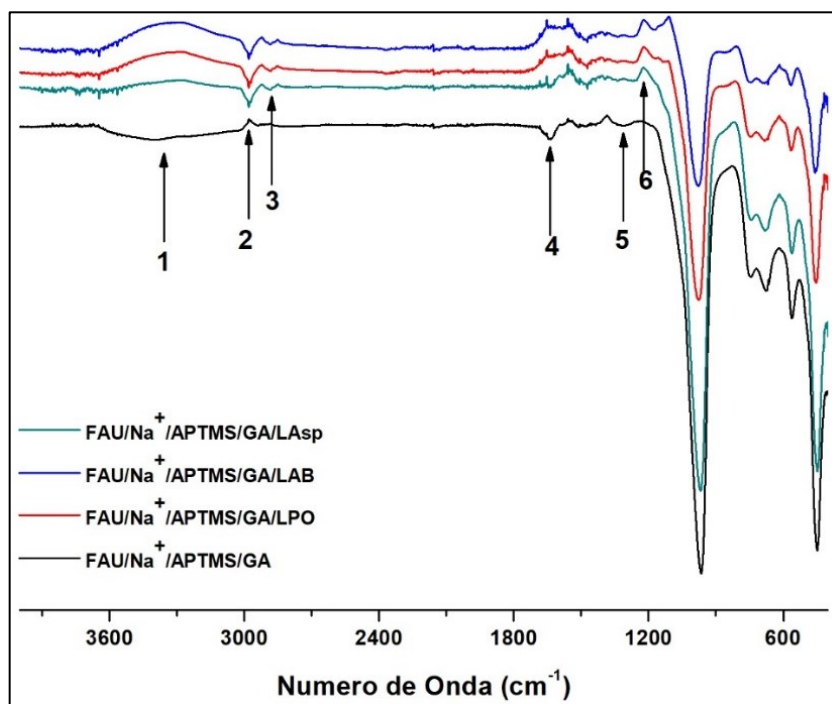
As análises de ATR-FTIR das lacases LAsp e LAB antes da imobilização, **Figura 47**, apresentaram bandas características destas enzimas, como por exemplo, as banda em $\sim 3400 \text{ cm}^{-1}$ – estiramento OH e/ou vibração do estiramento NH –, na proximidade de 2800 cm^{-1} – estiramento CH –, em 1630 cm^{-1} – correspondente ao grupo carbonila das estruturas de amida secundária (CONH) –, e em $\sim 1100 \text{ cm}^{-1}$ – atribuídas as vibrações COC.¹⁴⁴ Outras bandas observadas, tanto nas enzimas livres quanto nos complexos (**Figuras 47 a 53**), são indicativas da efetiva imobilização destas proteínas nos suportes testados.¹⁴⁵ Picos na região entre $1718\text{--}1613 \text{ cm}^{-1}$ podem ser relacionados as vibrações de estiramento da ligação amida ($\text{N}=\text{C}=\text{O}$). As bandas alargadas na região entre $1650\text{--}1550 \text{ cm}^{-1}$ são atribuídas ao estiramento C=O (da amida I, 1650 cm^{-1}) e ao dobramento N-H (da amida II, 1550 cm^{-1}) das estruturas enzimáticas, assim como o estiramento C=O em 1730 cm^{-1} .

Figura 47. ATR-FTIR das lacases LAB (sólido) e LAsp (solução). Bandas assinaladas correspondentes aos números de onda 2982 cm^{-1} (1), 2885 cm^{-1} (2), 1548 cm^{-1} (3), 1470 cm^{-1} (4), 1255 cm^{-1} (5), 1142 cm^{-1} (6) e 960 cm^{-1} (7).



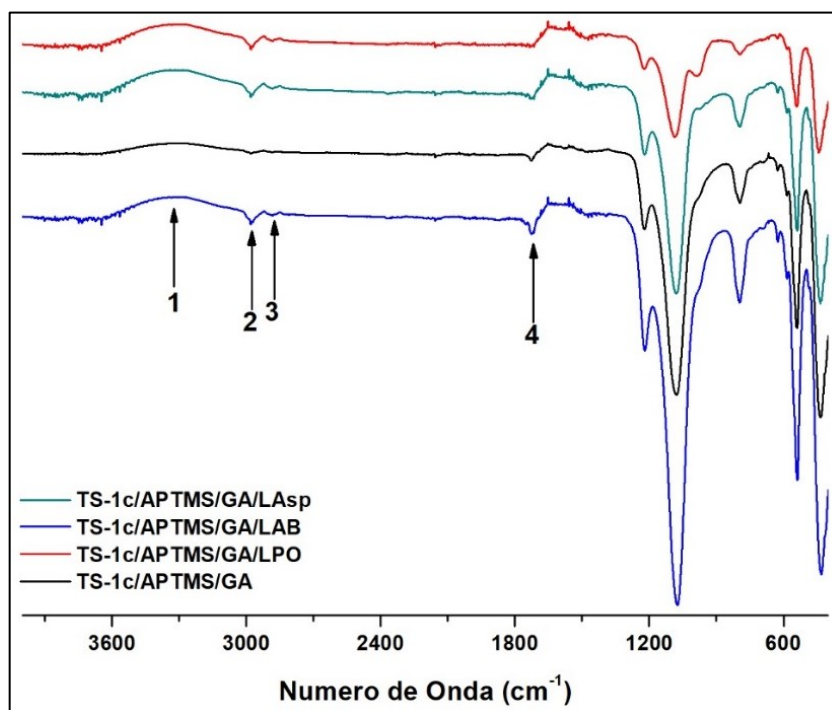
Fonte: elaborado pelo autor.

Figura 48. ATR-FTIR do material FAU/ Na^+ /APTMS/GA antes e após a imobilização das lacases LPO, LAB e LAsp. Bandas assinaladas correspondentes aos números de onda 3400 cm^{-1} (1), 2982 cm^{-1} (2), 2885 cm^{-1} (3), 1640 cm^{-1} (4), 1311 cm^{-1} (5) e 1215 cm^{-1} (6).



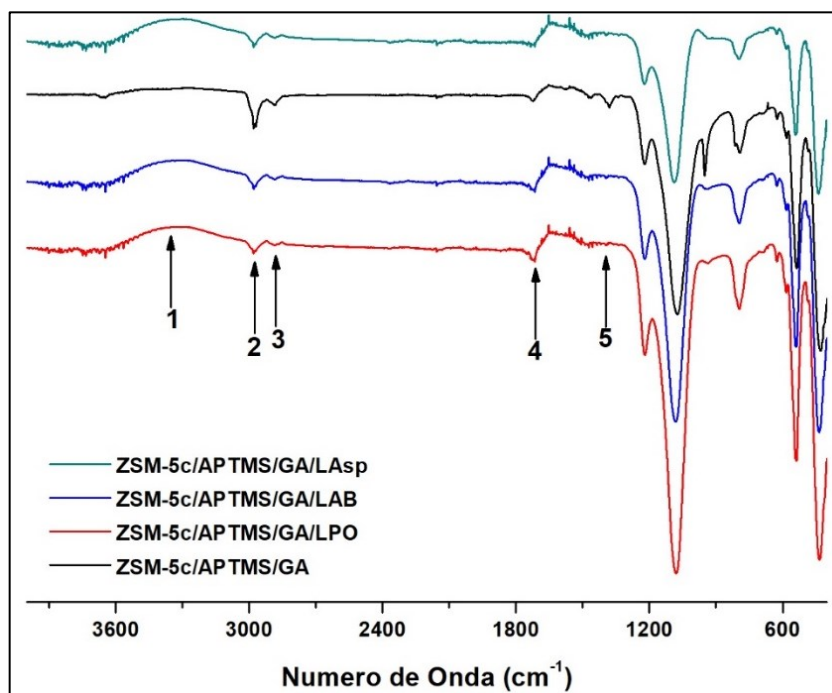
Fonte: elaborado pelo autor.

Figura 49. ATR-FTIR do material TS-1c/APTMS/GA antes e após a imobilização das lacases LPO, LAB e LAsp. Bandas assinaladas correspondentes aos números de onda 3400 cm^{-1} (1), 2982 cm^{-1} (2), 2885 cm^{-1} (3) e 1730 cm^{-1} (4).



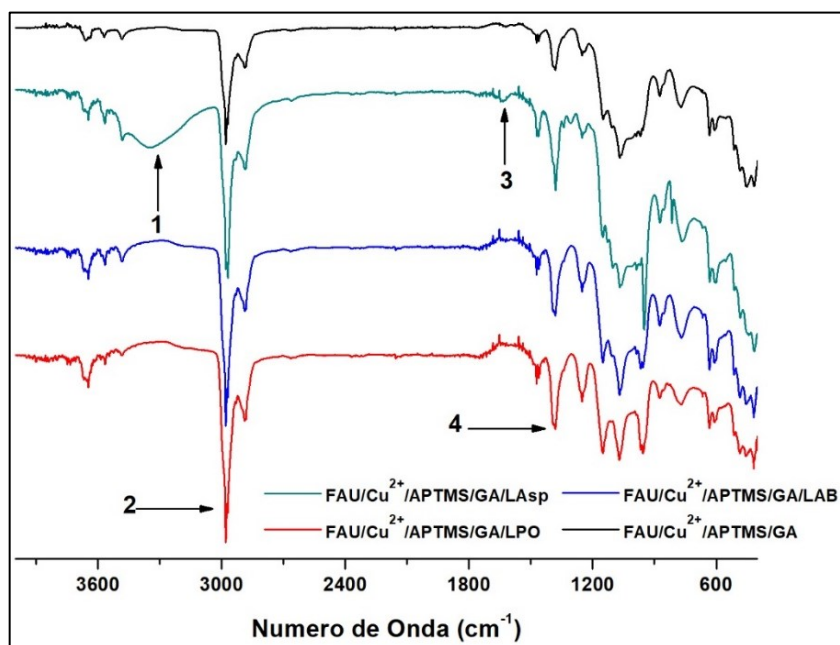
Fonte: elaborado pelo autor.

Figura 50. ATR-FTIR do material ZSM-5c/APTMS/GA antes e após a imobilização das lacases LPO, LAB e LAsp. Bandas assinaladas correspondentes aos números de onda 3400 cm^{-1} (1), 2982 cm^{-1} (2), 2885 cm^{-1} (3), 1730 cm^{-1} (4) e 1380 cm^{-1} (5).



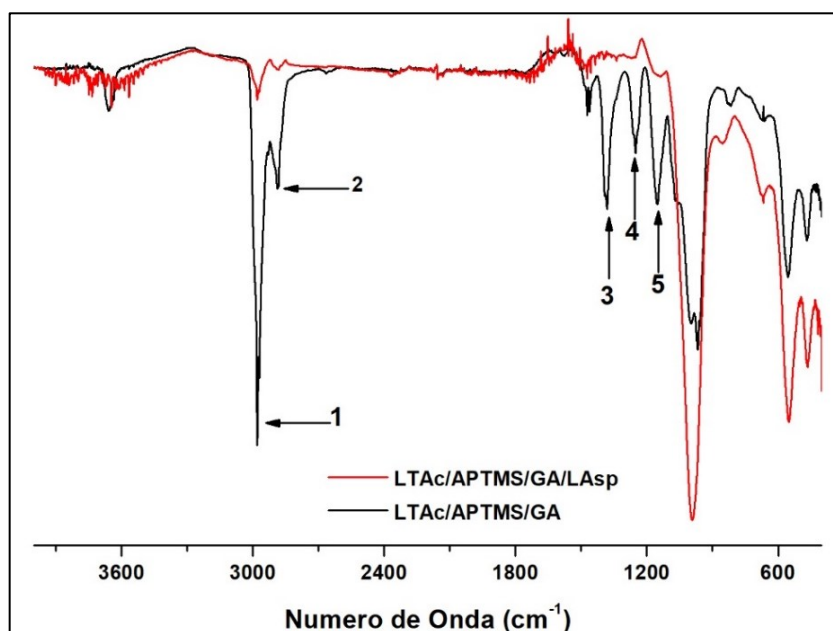
Fonte: elaborado pelo autor.

Figura 51. ATR-FTIR do material FAU/Cu²⁺/APTMS/GA antes e após a imobilização das lacases LPO, LAB e LAsp. Bandas assinaladas correspondentes aos números de onda 3400 cm⁻¹ (1), 2982 cm⁻¹ (2), 1640 cm⁻¹ (3) e 1380 cm⁻¹ (4).



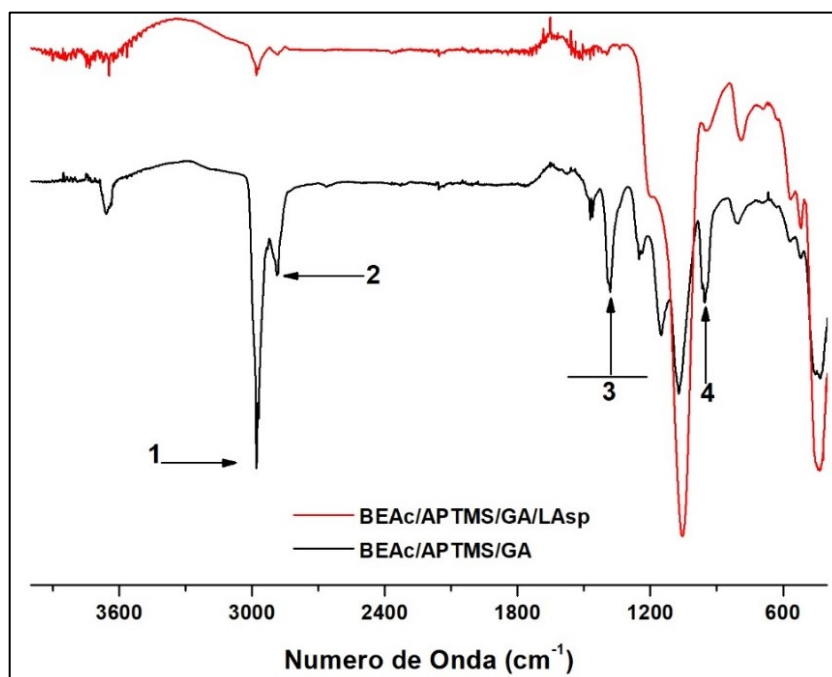
Fonte: elaborado pelo autor.

Figura 52. ATR-FTIR do material LTAc/APTMS/GA antes e após a imobilização da lacase LAsp. Bandas assinaladas correspondentes aos números de onda 2982 cm⁻¹ (1), 2885 cm⁻¹ (2), 1380 cm⁻¹ (3), 1255 cm⁻¹ (4) e 1147 cm⁻¹ (5).



Fonte: elaborado pelo autor.

Figura 53. ATR-FTIR do material BEAc/APTMS/GA antes e após a imobilização das lacases LPO, LAB e LAsp. Bandas assinaladas correspondentes aos números de onda 2982 cm^{-1} (1), 2885 cm^{-1} (2), região entre 1580 e 1150 cm^{-1} (3) e 960 cm^{-1} (4).



Fonte: elaborado pelo autor.

5.4.3 Estudo das condições ótimas de ação dos complexos formados pela imobilização das lacases LPO, LAB e LAsp no suporte FAU/Cu²⁺/APTMS/GA

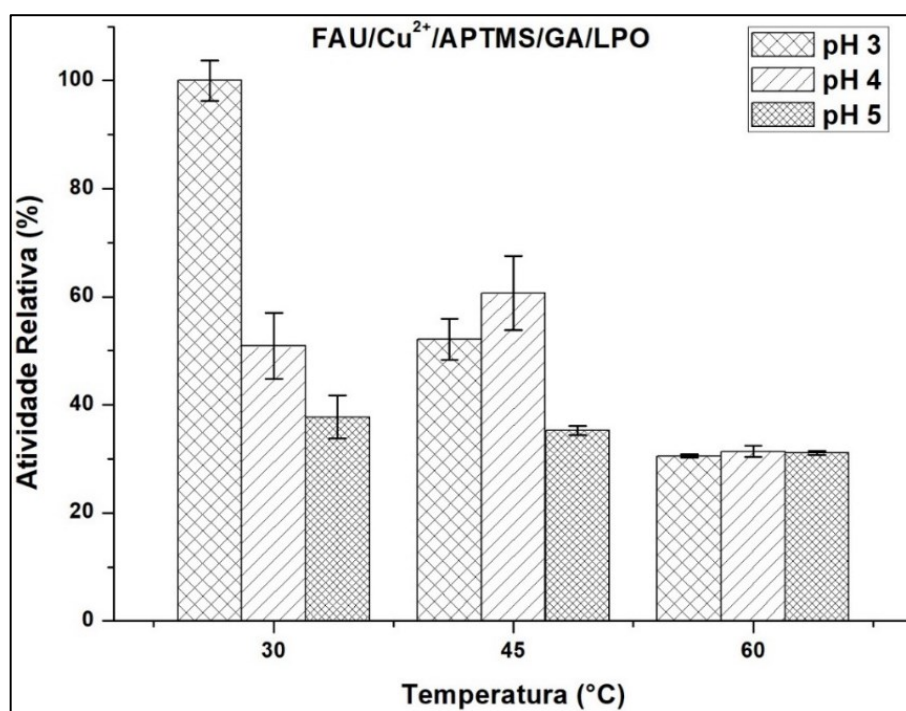
As altas atividades dos complexos com o suporte FAU/Cu²⁺/APTMS/GA, permitiu a seleção destes complexos para alguns estudos posteriores, buscando condições ideais de ação destes catalisadores. Uma varredura abrangendo alguns parâmetros – selecionados com base nas informações coletadas para as enzimas livres – foi realizada para os complexos FAU/Cu²⁺/APTMS/GA/LPO, FAU/Cu²⁺/APTMS/GA/LAB e FAU/Cu²⁺/APTMS/GA/LAsp.

As atividades dos complexos foram avaliadas variando-se a temperatura (30, 45 e 60 °C) para diferentes valores de pH (3, 4 e 5). Na **Figura 54** estão ilustrados em gráfico de colunas os resultados obtidos para o complexo FAU/Cu²⁺/APTMS/GA/LPO. Em pH 3 – lembrando que este foi o pH ótimo encontrado para todas as enzimas a 45 °C – e a 30 °C, o complexo teve seu desempenho mais elevado. Essa atividade máxima – adotada como 100% – foi reduzida gradativamente com o aumento da temperatura, chegando a 30% em 60 °C. Por outro lado, em pH 4, o máximo de atividade observado foi a 45 °C, enquanto em pH 5 não houve muita variação na atividade catalítica com a variação da temperatura. Vale frisar que, se comparadas

as atividades do complexo apenas para a temperatura de 45 °C – temperatura na qual foi determinado o pH ótimo das enzimas em solução –, o ótimo seria apontado como sendo pH 4, e essa variação pode ser atribuída às interações entre enzima e suporte após imobilização.

Como não foi feita a determinação do pH ótimo das lacases na forma livre para diferentes temperaturas, não é adequado assumir que o pH 3 seja o pH ótimo para qualquer temperatura. Todavia, é possível apontar um ótimo reacional deste complexo a 30 °C e pH 3, ao menos para ensaios de curta duração. Além disso, a 60 °C o percentual de atividade relativa foi similar para todos os pHs testados, sendo este percentual o menor observado dentre todos os ensaios.

Figura 54. Efeito da temperatura e do pH na atividade catalítica do complexo FAU/Cu²⁺/APTMS/GA/LPO. A atividade do complexo em 30 °C e pH 3 foi adotada como 100%.

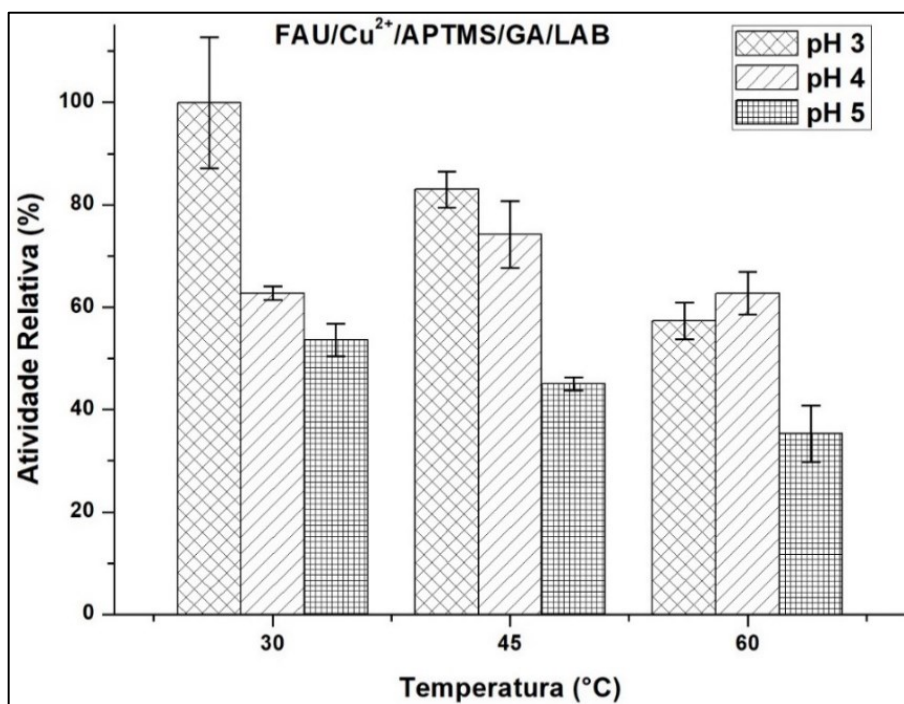


Fonte: elaborado pelo autor.

Na **Figura 55** estão apresentados os resultados para o complexo FAU/Cu²⁺/APTMS/GA/LAB. Novamente, a atividade máxima encontrada foi para os ensaios a 30 °C e pH 3. Nota-se uma redução na atividade com o aumento da temperatura para os pHs 3 e 5. Somente em pH 4 é verificado um máximo a 45 °C. Nesta temperatura, diferentemente do complexo com LPO, a maior atividade catalítica foi mensurada em pH 3, indicando que as interações entre enzima e suporte após imobilização não alteraram o pH ótimo da enzima. A atividade mínima foi observada para o complexo à 60 °C e pH 5. Observa-se também que, as

atividades em pH 5 são sempre as menores observadas em comparação com os pHs 3 e 4 para uma mesma temperatura, para ambos os complexos com LPO e LAB.

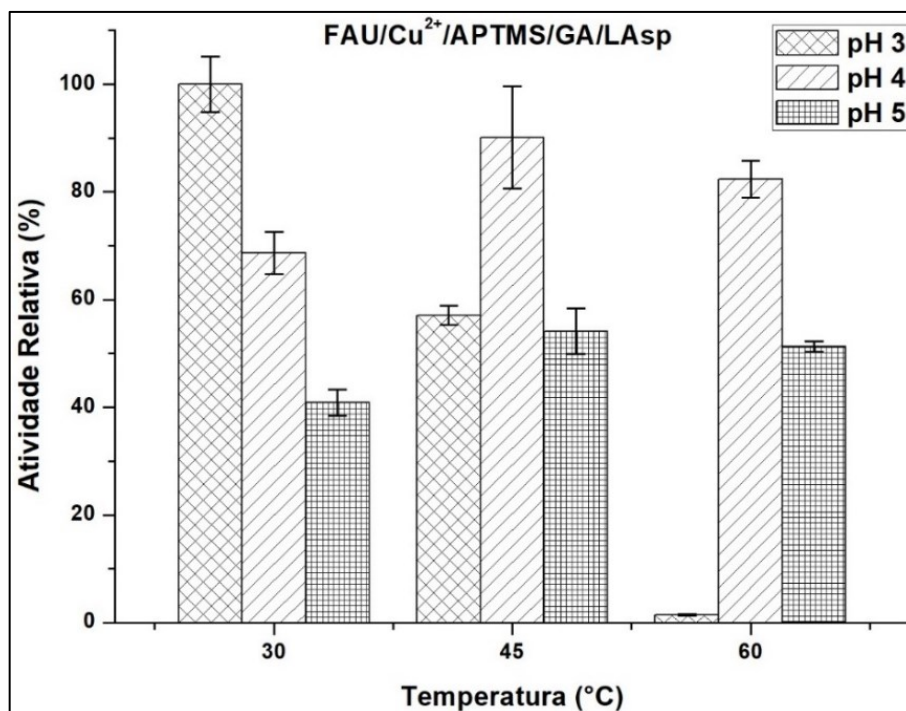
Figura 55. Efeito da temperatura e do pH na atividade catalítica do complexo FAU/Cu²⁺/APTMS/GA/LAB. A atividade do complexo em 30° e pH 3 foi adotada como 100%.



Fonte: elaborado pelo autor.

Por fim, o complexo FAU/Cu²⁺/APTMS/GA/LAsp também tem máxima capacidade catalítica em pH 3 e a 30 °C, como pode ser visto na **Figura 56**. Entretanto, uma particularidade é observada. Em pH 3, a atividade do complexo é praticamente reduzida a zero quando a 60 °C, condições de mínimo global. Isso difere do que foi observado para os complexos com LPO e LAB. Além disso, uma estabilidade maior – ao menos para curtos períodos –, pode ser constatada para o complexo em pH 4, mesmo para a temperatura mais alta, apresentando 60% da atividade máxima neste pH a 60 °C.

Figura 56. Efeito da temperatura e do pH na atividade catalítica do complexo FAU/Cu²⁺/APTMS/GA/LAsp. A atividade do complexo em 30° e pH 3 foi adotada como 100%.



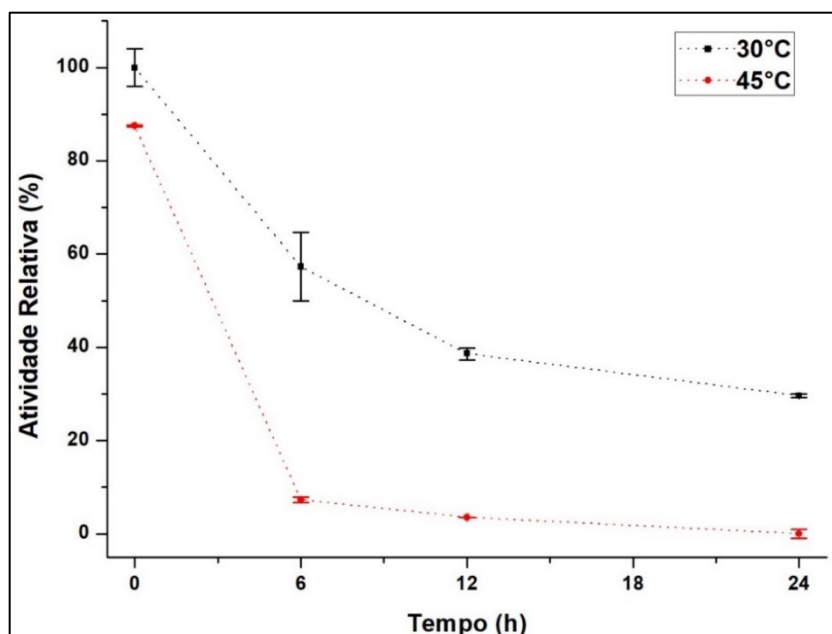
Fonte: elaborado pelo autor.

Apesar de parcialmente, ótimos reacionais podem ser indicados para os complexos estudados nesta seção. Em todos os casos, pH 3 e temperatura ambiente – aproximadamente – são verificados como ótimos reacionais. Entretanto, ainda foi necessário verificar a estabilidade destes complexos para períodos mais longos de reação – os ensaios anteriores foram de curta duração, menos de 10 minutos –, e assim realmente definir suas prováveis condições ótimas para aplicação nas reações de oxidação do glicerol, reações estas relatadas como de longa duração para obtenção seletiva de produtos.^{15; 16; 17}

A estabilidade dos complexos foram avaliadas nas condições ótimas estabelecidas nesta seção (pH 3, T = 30 °C), e para temperatura de 45 °C, de acordo com Protocolo 8 do item 4.5. O complexo com a enzima LPO (**Figura 57**) teve sua atividade reduzida a 60% após 6 horas de incubação a 30 °C, chegando a 30% após 24 horas. A 45 °C, o mesmo complexo teve perda de 90% de sua atividade em apenas 6 horas. Isso mostra que apesar de estar nas condições ótimas, quando expostos por longos períodos nestas condições, o complexo tem sua atividade reduzida. Já o complexo com a enzima LAB (**Figura 58**) apresentou maior estabilidade em ambas as temperaturas testadas, mantendo 65% e 40% da sua atividade após 6 horas de reação nas temperaturas de 30 e 45 °C, respectivamente. O complexo teve sua atividade reduzida até chegar a 15% (45 °C). No entanto, sob temperatura de 30 °C, um comportamento diferente foi

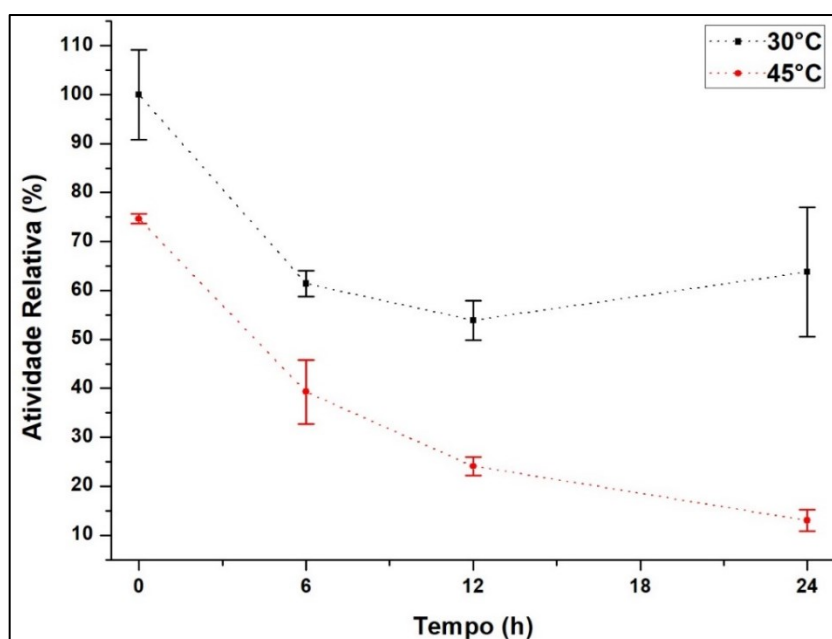
observado. Nas últimas 12 horas de acompanhamento, o complexo teve sua atividade aumentada, chegando novamente a 60%. Essa última observação indica que – com o passar do tempo – o meio reacional levou o catalizador a recuperar a sua atividade. Ou seja, as condições físico-químicas do meio contribuíram para – ou até induziram – uma estabilidade estrutural-funcional da enzima.

Figura 57. Estabilidade do complexo FAU/Cu²⁺/APTMS/GA/LPO, pH 3, temperaturas 30 e 45 °C.



Fonte: elaborado pelo autor.

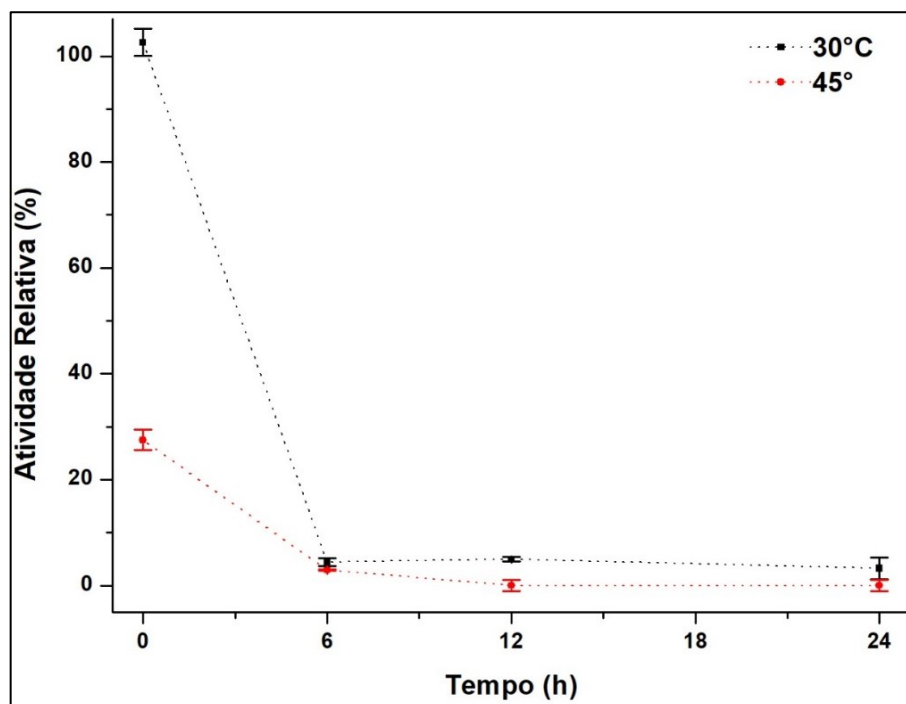
Figura 58. Estabilidade do complexo FAU/Cu²⁺/APTMS/GA/LAB, pH 3, temperaturas 30 e 45 °C.



Fonte: elaborado pelo autor.

O último caso, relacionado ao complexo com a lacase LAsp (**Figura 59**) apresentou a maior instabilidade dentre os testados. Mais de 90% da atividade catalítica foi reduzida em apenas 6 horas para ambas as temperaturas, e esta redução continuou até o final do ensaio.

Figura 59. Estabilidade do complexo FAU/Cu²⁺/APTMS/GA/LAsp, pH 3, temperaturas 30 e 45 °C.



Fonte: elaborado pelo autor.

Estes ensaios indicaram que as condições ótimas determinadas para os complexos em reações de curta duração não podem ser consideradas para aplicações dos catalisadores por períodos longos. Portanto, foi importante considerar um meio termo, em que apesar da reação do complexo não fosse máxima, sua instabilidade não fosse tão pronunciada. Com base nisso, foi considerado pHs entre 4 e 5 para as reações de oxidação do glicerol, valores que estão de acordo com os dados discutidos até o momento e com os protocolos relatados na literatura.^{15; 16; 17}

5.5 Reações de oxidação do glicerol

5.5.1 Curvas padrão para quantificação dos produtos de oxidação do glicerol por HPLC

Antes do início da aplicação dos biocatalisadores obtidos nas reações de oxidação do glicerol, foram realizados trabalhos minuciosos na preparação de curvas de calibração de

análise por HPLC de padrões cromatográficos dos possíveis produtos de oxidação deste composto, conforme descrito no item 4.7.

Para todas as curvas geradas, foi feita uma regressão linear do tipo “*fit linear*” no software OriginPro8, para obtenção estatística dos parâmetros **a** e **b** de uma reta do tipo $y = a + bx$, em que *y* é a área abaixo da curva de determinado pico, *x* é a concentração da amostra sendo analisada, **a** o intercepto no eixo *y* para concentração 0 (em todos os casos, também 0) e **b** o coeficiente angular da reta gerada. Os valores obtidos estão expostos na **Tabela 5**.

Para confirmação se os tratamentos estatísticos realizados estão dentro de um limite apropriado de aceitação, foram analisados os coeficientes de confirmação em todas as curvas ($R^2_{ajustado}$). Valores acima de 0,95 podem ser considerados representativos de uma boa regressão (o modelo está adequado para os dados). No caso, todas as curvas apresentaram valores de $R^2_{ajustado}$ superiores a 0,993, portanto, os valores encontrados para os coeficientes *a* e *b* estão estatisticamente coerentes, e podem ser utilizados para correta quantificação dos compostos analisados quando realizadas as reações de oxidação do glicerol.

Além claro da obtenção dos parâmetros de regressão, é importante ressaltar que os tempos de retenção para quase todos os compostos foram diferentes – mais de meio minuto de diferença –, com exceção dos compostos ácido tartrônico e ácido hidroxipirúvico, cujos tempos de retenção são muito aproximados ($10,07 \pm 0,08$ e $9,85 \pm 0,09$ minutos, respectivamente). Nesse caso, em uma análise de produtos de reação, a diferenciação destes dois compostos é imprecisa, ao menos não nas condições cromatográficas descritas. Para contornar este problema, os parâmetros técnicos cromatográficos foram variados, para então ser determinado com precisão qual é o composto obtido, similar ao trabalho de Beltrán-Prieto (2013),¹⁴⁶ no qual foi realizada a otimização de um método de cromatografia líquida para analisar corretamente os produtos de oxidação do glicerol – no caso, para eliminar sobreposição de picos referentes a diferentes compostos –, variando parâmetros tais como temperatura do da coluna cromatográfica e fluxo da fase móvel. No entanto, esta otimização não foi efetiva neste estudo. Em geral, as condições de análise que separam um pico, levam a sobreposição de outro. Portanto, análises por outras técnicas seriam necessárias caso houvesse a detecção de algum desses compostos em quantidade significativa, que não foi o caso neste estudo.

Tabela 5. Tempos de retenção e parâmetros de regressão linear das curvas padrão de diferentes possíveis produtos da reação de oxidação do glicerol por análises de HPLC.

Padrão	T _{retenção}	a	b	R ² _{ajustado}
<i>Ácido Tartrônico</i>	10,07 ± 0,08	0	679 ± 11	0,99844
<i>Ácido Mesoxálico</i>	8,49 ± 0,09	0	665 ± 9	0,99887
<i>Dihidroxiacetona</i>	15,90 ± 0,04	0	96,5 ± 0,7	0,99966
<i>Gliceraldeído</i>	13,21 ± 0,02	0	25,9 ± 0,5	0,99771
<i>Ácido Glicérico</i>	12,762 ± 0,003	0	140,1 ± 0,2	0,99998
<i>Ácido Oxálico</i>	7,8 ± 0,2	0	2460 ± 90	0,99332
<i>Ácido Glicólico</i>	14,421 ± 0,002	0	111 ± 1	0,99946
<i>Ácido Glioxílico</i>	11,21 ± 0,02	0	58 ± 1	0,99618
<i>Ácido hidroxipirúvico</i>	9,85 ± 0,09	0	810 ± 6	0,99975
<i>Ácido Fórmico</i>	16,31 ± 0,02	0	107 ± 1	0,99917

5.5.2 Reações de Oxidação do Glicerol utilizando os catalisadores selecionados

Após elaboração das curvas de calibração dos possíveis produtos de oxidação do glicerol, foram iniciadas as aplicações dos complexos selecionados na reação proposta, de acordo com item 4.6.

A **Tabela 6** apresenta os 10 ensaios que foram realizados utilizando os complexos obtidos a partir da imobilização das lacases LPO, LAB e LAsp no suporte FAU/Cu²⁺/APTMS/GA e da LAsp no suporte BEAc/APTMS/GA, selecionados de acordo com suas atividades de oxidação de ABTS discutida no item 5.4. Foram realizados ensaios para estas lacases também na sua forma livre – foi utilizada uma quantidade de enzima com atividade equivalente a atividade do complexo da respectiva enzima com o suporte FAU/Cu²⁺/APTMS/GA –, para comparar com suas performances após imobilização. Para os complexos formados com o suporte FAU/Cu²⁺/APTMS/GA foram realizados ensaios em temperatura ambiente, e a 45 °C. O pH reacional foi ajustado para 4,5, e este valor escolhido

com base na literatura e nos testes de otimização das condições reacionais deste trabalho.^{15; 16;}
17

Tabela 6. Catalisadores e temperaturas das reações de oxidação do glicerol

Ensaio	Catalisador	Temperatura
1	LAsp livre	ambiente
2	LPO livre	ambiente
3	LAB Livre	ambiente
4	FAU/Cu ²⁺ /APTMS/GA/LAsp	ambiente
5	FAU/Cu ²⁺ /APTMS/GA/LPO	ambiente
6	FAU/Cu ²⁺ /APTMS/GA/LAB	ambiente
7	FAU/Cu ²⁺ /APTMS/GA/LAsp	45 °C
8	FAU/Cu ²⁺ /APTMS/GA/LPO	45 °C
9	FAU/Cu ²⁺ /APTMS/GA/LAB	45 °C
10	BEAc/APTMS/GA/LAsp	ambiente

A **Tabela 7** apresenta todos os resultados obtidos para a quantificação dos produtos de oxidação do glicerol após 48 horas de reação. Os produtos que foram detectados foram: ácido oxálico, ácido mesoxálico, ácido tartrônico, ácido glioxílico, ácido glicérico, gliceraldeído e dihidroxiacetona.

A obtenção de produtos de oxidação quando utilizados os complexos enzima/zeólitas, assim como a lacase LAB livre, foi bastante baixa em todas as condições testadas – conversões inferiores a 5%. Apesar de baixa conversão, a seletividade a gliceraldeído – derivado da oxidação do grupo hidroxila primário da molécula de glicerol – foi sempre superior, acima de 88%.

Por outro lado, quando foram utilizadas as lacases LPO e LAsp livres, resultados consideravelmente distintos foram obtidos. Altas conversões de glicerol a gliceraldeído, ácido glicérico e ácido glioxílico foram quantificadas. Seletividades de conversão a gliceraldeído superior para ambas as enzimas após 48 horas, 78% (LAsp) e 57% (LPO).

Tabela 7. Conversão (%) e seletividade (%) da reação de oxidação do glicerol lalcase/TEMPO-mediada por laccases livres ou immobilizadas.

Catalisador	Produto	Conversão / %	Seletividade / %
ENZIMAS LIVRES			
LAsp* [‡]	Ácido Oxálico	1,57	5,46
	Ácido mesoxálico	0,24	0,83
	Ácido Tartrônico	0,09	0,31
	Ácido Glioxílico	3,30	11,47
	Ácido Glicérico	1,13	3,93
	Gliceraldeído	22,44	78,00
	total	28,77	-
LPO* [‡]	Ácido Oxálico	1,95	2,39
	Ácido mesoxálico	2,90	3,56
	Ácido Tartrônico	2,70	3,31
	Ácido Glioxílico	6,43	7,89
	Ácido Glicérico	21,00	25,75
	Gliceraldeído	46,56	57,10
total	81,54	-	
LAB* [‡]	Ácido Oxálico	0,07	2,19
	Gliceraldeído	3,12	97,81
	total	3,19	100
ENZIMAS IMOBILIZADAS			
A ^{&} /LAsp [‡]	Ácido Oxálico	0,08	4,06
	Gliceraldeído	1,89	95,94
	total	1,97	-
A ^{&} /LPO [‡]	Ácido Oxálico	0,08	1,64
	Gliceraldeído	4,79	98,36
	total	4,87	-
A ^{&} /LAB [‡]	Ácido Oxálico	0,08	4,19
	Gliceraldeído	1,83	95,81
	total	1,91	-
A ^{&} /LAsp [□]	Ácido Oxálico	0,17	11,64
	Gliceraldeído	1,29	88,36
	total	1,46	-
A ^{&} /LPO [□]	Ácido Oxálico	0,20	8,44
	Gliceraldeído	2,17	91,56
	total	2,37	-
A ^{&} /LAB [□]	Ácido Oxálico	0,11	8,94
	Gliceraldeído	1,12	91,06
	total	1,23	-
B ^{&} /LAsp [‡]	Gliceraldeído	1,88	100
	total	1,88	-
SUPORTE S/ ENZIMA			
A [#]	Nenhum produto verificado		
B [#]	Nenhum produto verificado		

* enzima livre (quantidade de enzima com atividade equivalente a atividade do complexo da respectiva enzima com o suporte A)

[&] enzima immobilizada nos suportes: A – FAU/Cu²⁺/APTMS/GA e B – BEAc/APTMS/GA

[#] apenas suporte

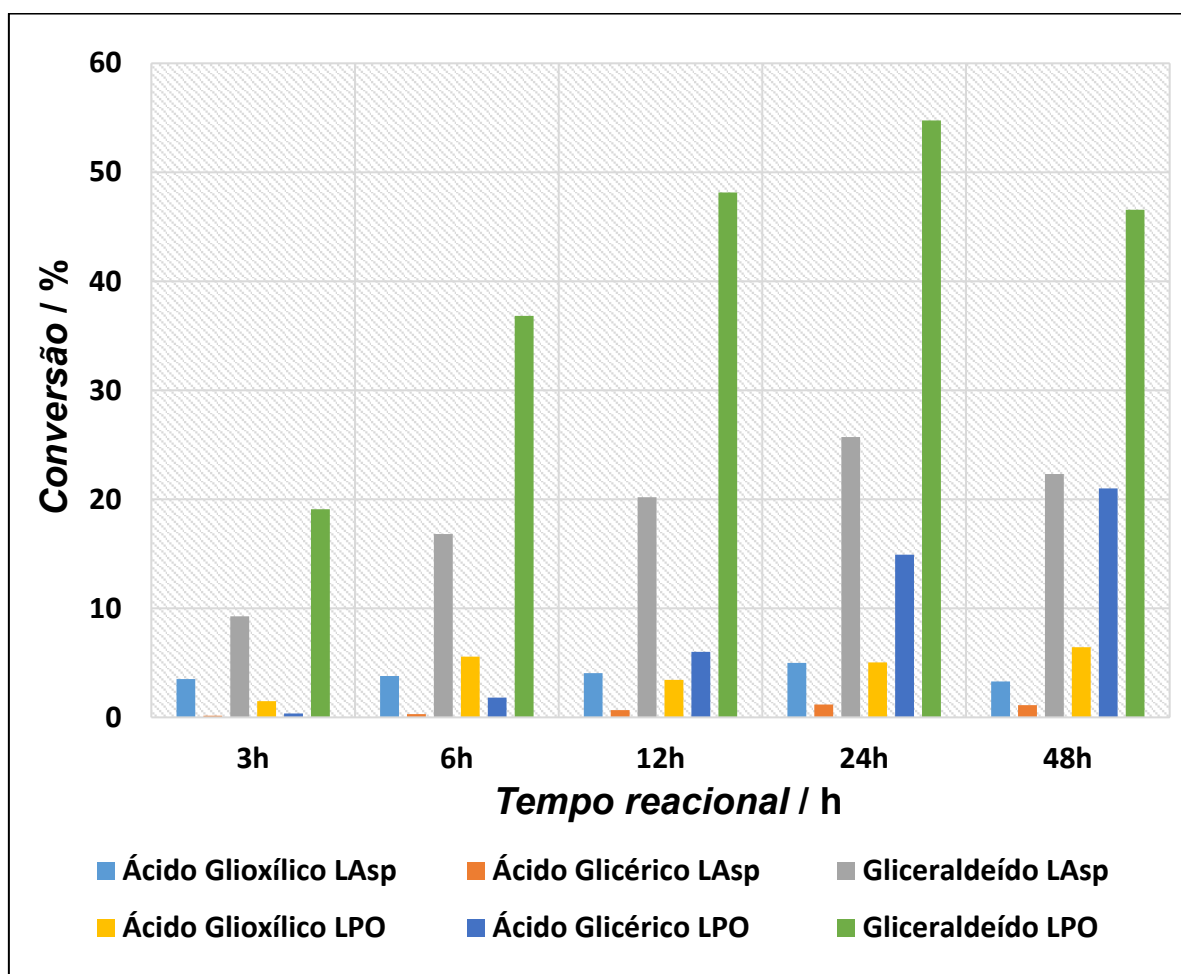
[§] após 48 h de reação

[‡] temperatura ambiente ~25 °C

[□] 45 °C

As conversões utilizando as lacases LPO e LAsp foram acompanhadas temporalmente, conforme ilustrado na **Figura 60**. Gliceraldeído foi o principal produto obtido das reações com ambas as enzimas. Após 24 horas, cerca de 55% do glicerol foi convertido a gliceraldeído no ensaio 2 (LPO livre), e esse valor reduzido para 47% após 48 horas de reação. No ensaio 2 a quantidade de glicerol convertido a ácido glicérico atingiu seu máximo após 48 horas reacionais, 21%. No ensaio 1 (LAsp), a produção de gliceraldeído foi máxima após 24 horas de reação (~26%), sendo que após 48 horas, 23% do glicerol havia sido convertido a este produto. Ambas os ensaios apresentaram quantidades consideráveis de ácido glicólico com o decorrer do tempo, atingindo máximos de ~5% após 24 horas (LAsp) e ~6,5% após 48 horas (LPO). A redução da quantidade de gliceraldeído obtida quando se compara os valores após 24 e 48 horas é explicada pelo aumento da quantidade de ácido glicérico, uma vez que ácido glicérico é obtido da oxidação de gliceraldeído.

Figura 60. Acompanhamento temporal da concentração dos produtos ácido glicólico, ácido glicérico e gliceraldeído das reações de oxidação do glicerol catalisadas pelas enzimas LAsp e LPO na forma livre mediadas por TEMPO.



Fonte: elaborado pelo autor.

Hong *et al* (2015, 2017 e 2019),^{15;17; 18} fizeram estudos similares utilizando outras lacases, e obtiveram resultados análogos, maiores quantidades de ácido glicérico e gliceraldeído foram obtidos. No trabalho de Liebminger *et al.* (2009),¹⁶ primeiro a abordar este sistema, um maior número de produtos foi obtido, mas, aqueles obtidos da oxidação de apenas um grupo hidroxila da molécula de glicerol, foram sempre quantificados em maior quantidade.

A **Tabela 8** apresenta os principais resultados dos estudos anteriormente realizados neste sistema em comparação com os resultados obtidos para as lacases na forma livre LAsp e LPO – que levaram às maiores conversões do glicerol. A princípio, as enzimas utilizadas nos trabalhos anteriores são diferentes das testadas neste trabalho. Os autores em geral discutem e comparam seus resultados considerando os diferentes potenciais de redução de cada enzima. Tanto *T. versicolor* e *T. hirsuta* são conhecidas por seus altos potenciais de redução (0,78 V vs. NHE). A LAsp – cujo gene expresso é oriundo da lacase de *M. thermophila* – tem potencial redox de aproximadamente 0,5,⁵² enquanto o potencial redox da LPO é 0,74.¹⁴⁷ A princípio, as diferenças de potencial redutor das enzimas deste estudo podem explicar as diferenças de conversão do glicerol obtidas. Embora as quantidades de enzimas aplicadas nos ensaios catalíticos tenham sido baseadas na atividade de oxidação do ABTS – foram utilizadas quantidades com a mesma atividade –, não é possível afirmar que as atividades destas enzimas para a oxidação do mediador TEMPO sejam equiparáveis. É esperado que a enzima com maior potencial redutor tenha maior facilidade em oxidar o mediador TEMPO, o que explicaria maior conversão de glicerol no sistema utilizando LPO (~81%) em comparação com o sistema utilizando LAsp (~29%). Entretanto, ao analisar a **Tabela 8**, as conversões e seletividades observadas são bastante variadas. Em geral, gliceraldeído e ácido glicérico são os principais produtos, assim como neste estudo. No entanto, a quantidade de enzima – quando utilizadas livres – dos demais estudos são superiores as quantidades utilizadas neste trabalho, na ordem de 6 vezes. Isso permite dizer que tanto LPO quanto LAsp, nunca antes estudadas neste sistema, são sim potenciais catalisadores para a reação proposta.

Por outro lado, quando se atenta aos estudos em que as lacases foram imobilizadas, nenhum apresentou conversões altas – menores que 30% –, e estão de acordo com este estudo. Os autores discutiram brevemente o tipo de suporte e processo de imobilização utilizado. A imobilização por ligação covalente foi a mais utilizada, no entanto, Hong *et al.* (2017) compararam o método de ligação covalente com o método de aprisionamento, e obtiveram maior conversão com o segundo método. Eles indicaram que, apesar da contenção enzimática

e menor acesso ao substrato – em comparação com a enzima imobilizada por ligação covalente – a retenção da atividade e a estabilidade observadas foram superiores para a enzima aprisionada. Nota-se que, dentre os trabalhos citados, quando um complexo foi utilizado, o gerado por aprisionamento foi o que levou a maior conversão do glicerol (27%), enquanto dentre os que utilizaram ligação covalente, a maior conversão foi 10%. Neste trabalho, em que zeólitas foram utilizadas, o método de ligação covalente foi utilizado, e com base nos relatos anteriores, esse método pode não ser o mais adequado – pelo menos não nas condições estudadas. Entretanto, essas observações foram pouco aprofundadas nos trabalhos anteriores. Certamente, maior ou menor atividade residual das enzimas imobilizadas está diretamente relacionada com as interações físico-químicas entre enzimas e suportes, assim como a interação com os mediadores envolvidos. Na busca por um maior esclarecimento sobre interações enzima/suporte, e como essas interações afetam a cinética reacional destas lacases, estudos eletroquímicos e espectroscópicos foram realizados, e os dados coletados serão discutidos nas próximas seções.

Tabela 8. Comparação das condições experimentais e produção das reações de oxidação do glicerol laccase/TEMPO mediada relatadas na literatura com o presente trabalho.

Laccase	Suporte	Condições experimentais					Conversão / % [‡]	Seletividade / % [‡]	Método de Imobilização	Ref.
		pH	T / °C	t / h	[TEMPO]: [Glicerol]	catalisador				
<i>T. hirsuta</i>	livre	4,5	25	24	3:10	10 U/mL	70	23,4 – GCA 23,4 – AG 12,8 – AT 19,1 – AM	-	16
	“pellets” de alumínio	4,5	25	24	3:10	0,1 U/mL	10	N.I.	ligação covalente	16
<i>T. versicolor</i>	Alginato de sódio	4,5	25	24	3:10	20 mg/mL [¥]	30	23 – AG 67 – GCA	aprisionamento	15
	livre	4,5	25	24	3:10	N.I.	40	75 – GCA 20 – AG	-	15
	Alginato de sódio	4,5	25	24	3:10	2 mg/mL [¥]	27	85 – GCA 9 – AG	aprisionamento	17
	“pellets” de alumínio	4,5	25	24	3:10	2 mg/mL [¥]	8	>90 – GCA	ligação covalente	17
	livre	4,5	25	76	3:10	10 U/mL	76	30 – AG 30 – AM	-	18
	livre	5,5	19	76	3:1	10 U/mL	~100%	26 – GCA 90 – AM	-	18
<i>P. ostreatus</i>	livre	4,5	25	48	3:10	0,15 U/mL	81,54	57 – GCA 26 – AG	-	Este trabalho
	FAU/Cu ²⁺ /APTMS/GA	4,5	25	48	3:10	0,15 U/mL	< 5	>98 GCA	ligação covalente	
<i>Aspergillus</i> sp.	livre	4,5	25	48	3:10	0,15 U/mL	28,77	78 – GCA 11,5 – AGO	-	
	FAU/Cu ²⁺ /APTMS/GA	4,5	25	48	3:10	0,15 U/mL	< 2	>95 – GCA	ligação covalente	

N.I. – não informado AG – ácido glicérico AGO – ácido glioxílico GCA – gliceraldeído AM – ácido mesoxálico AT – ácido tartrônico

[‡] Os valores de conversão e seletividade foram aproximados das figuras quando não explicitamente informados nos textos, e barras de erro não consideradas.

[¥] Não foi possível determinar a partir dos procedimentos descritos qual a atividade U/mg dos complexos obtidos, e assim determinar a atividade U/mL utilizada nas reações.

5.6 Estudos eletroquímicos

Como o sistema catalítico de lacases é um sistema de oxidorredução – envolve a transferência de elétrons –, o sistema lacase-mediador pode ser investigado por técnicas eletroquímicas.

Inicialmente foi realizado um estudo básico de caracterização dos mediadores TEMPO e ABTS, variando-se ambientes químicos reacionais, visando o comportamento eletroquímico dos mesmos. Em sequência, a lacase LAsp e glicerol foram adicionados ao sistema, e novamente foram variados os meios reacionais. Os dados indicaram alta dependência tanto da lacase quanto dos mediadores ao pH do meio, o que já era conhecido e está de acordo com a literatura. No entanto, estudar enzima em solução por eletroquímica é um estudo indireto, pois depende do mediador, uma vez que a quantidade de enzima que atinge a superfície ativa do eletrodo utilizado é mínima, e a contribuição da transferência direta de elétrons (TDE) internamente nas lacases é dificilmente observada. Para contornar esta limitação, uma maneira adequada é a preparação de um eletrodo contendo a enzima.

A segunda etapa deste estudo consistiu da preparação de plataformas – eletrodos modificados – que permitissem a imobilização da enzima, e além disso, permitisse a observação de TDE. Foram preparados diversos eletrodos diferentes utilizando zeólitas e nanopartículas de grafeno como plataforma para a LAsp. Os eletrodos formados foram testados para a oxidação de um substrato conhecido de lacases, catecol, para verificar a existência de contribuição por parte da enzima, além da típica oxidorredução de catecol em eletrodos sem enzima. Por fim, um eletrodo foi selecionado, e com um método de acumulação, foi possível determinar o potencial redox da lacase LAsp – ou seja, a TDE –, da ordem de 0,5 V. Este valor concorda com a literatura. Uma etapa adicional, apenas para completude, incluiu o estudo de variação de parâmetros voltamétricos para ABTS, TEMPO e derivados de TEMPO.

Apesar das limitações, foi possível coletar dados informativos no tangente ao mecanismo de ação da lacase testada para os mediadores, e do sistema geral de oxidação do glicerol lacase/TEMPO-mediado, e que podem ser úteis em estudos posteriores.

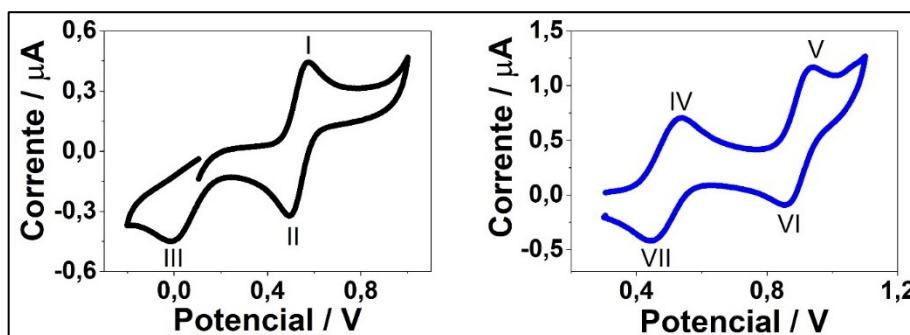
5.6.1 Investigação eletroquímica utilizando o eletrodo GCE original aplicado a TEMPO, ABTS, lacase e glicerol

Preliminarmente, ambos TEMPO e ABTS foram voltametricamente verificados em meio ácido, mesmo tampão utilizado para as reações de oxidação do glicerol, acetato de sódio,

100 mM, pH 5. Ambos apresentaram os picos esperados, **Figura 61**. O par de oxidação/redução (I e II), TEMPO/cátion oxoamônio, com potencial de redução formal $E^0 = 0,533 \text{ V vs. Ag/AgCl}$ (3 M), e o pico de redução irreversível referente a formação de hidroxilamina (III), resultado da reação de desproporcionamento ácido-induzida em $\sim 0 \text{ V}$. No caso do ABTS, o par de oxidação/redução $\text{ABTS}/\text{ABTS}^+$ apresentou $E^0 = 0,489 \text{ V}$, enquanto o par $\text{ABTS}^+/\text{ABTS}^{++}$ mostrou potencial de redução formal de $0,899 \text{ V}$. Potencial formal de redução é definido como a média entre os potenciais dos picos de oxidação (anódico) e redução (catódico). Estes resultados estão de acordo com dados da literatura quando colocados sob mesmo referencial.⁵⁸

59

Figura 61. CV de soluções 0,1 mM TEMPO (esquerda) e ABTS (direita) utilizando eletrodo GCE. Eletrólito suporte: tampão acetato, 100 mM, pH 5. Velocidade de varredura: 10 mV/s. Atmosfera ambiente. Protocolo 9.



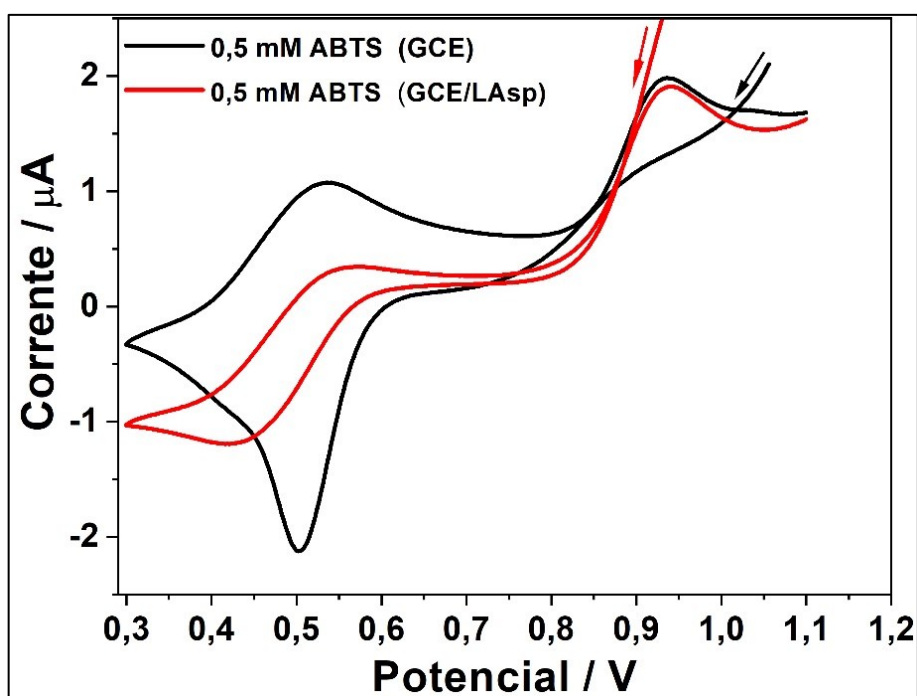
Fonte: elaborado pelo autor.

A **Figura 62** compara os voltamogramas obtidos utilizando o eletrodo GCE original e após modificação com lacase aplicado a análise voltamétrica do ABTS. São claras que as intensidades dos picos do par de redução em aproximadamente 0,5 V decrescem quando o eletrodo modificado é utilizado. Resposta relacionada a reação bioquímica era esperada, e, portanto, confirmada. Entretanto, o método de deposição utilizado foi inapropriado. Dispersão da enzima depositada aconteceu após submersão do eletrodo no eletrólito suporte. Isso porque a deposição realizada foi simplificada, sem uso de agente de retenção para firmar a enzima próximo a superfície do eletrodo, o que facilita a difusão da enzima na solução. Como foi utilizada nesta análise amostra comercial não purificada, era evidente a dispersão da solução enzimática marrom pelo eletrólito suporte, e uma coloração esverdeada foi sendo formada acompanhando o caminho da dispersão marrom. Neste caso, ambas enzimas ainda depositadas no eletrodo e dispersas rapidamente oxidaram o ABTS, reduzindo então a concentração de analito que pudesse ser eletroquimicamente oxidada. Este é um resultado típico da ocorrência

simultânea de reações eletroquímicas e químicas/bioquímicas. O pico por volta de 0,9 V, relacionado à oxidação do radical $\text{ABTS}^{\bullet+}$ para formação do cátion bivalente ABTS^{++} tiveram intensidades aproximadas para ambos os eletrodos testados. Para velocidades de varredura baixas e altas concentrações (metade a velocidade e 5 vezes a concentração do experimento ilustrado na **Figura 61**), o pico de redução referente ao cátion ABTS^{++} não é detectado, devido à reação de comproporcionamento, como discutido por Eshtaya *et al.* (2016).⁶⁰

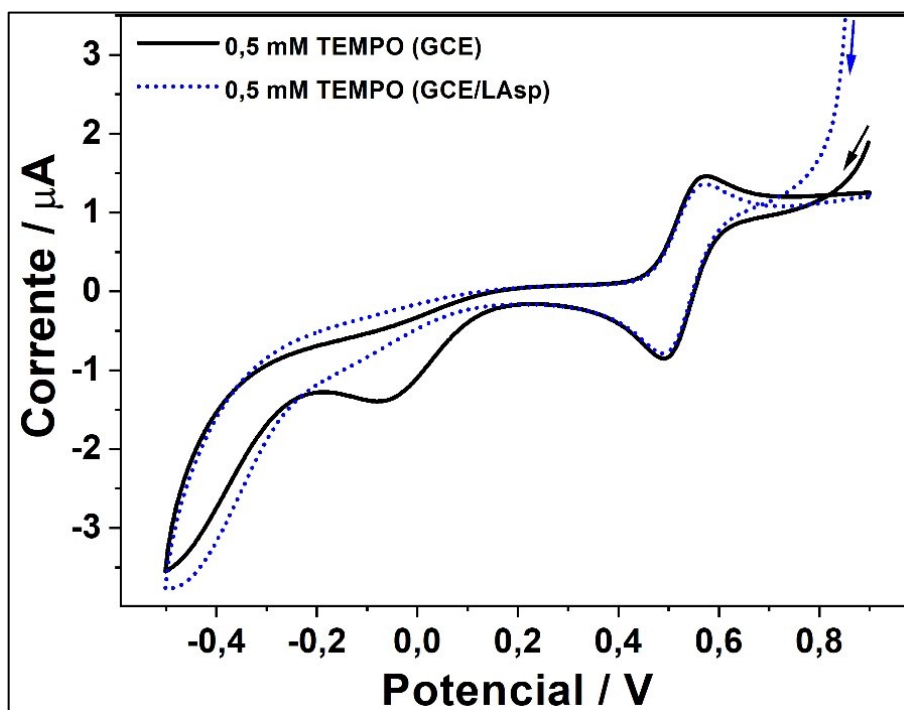
Comportamento similar é observado para TEMPO, **Figura 63**. As intensidades dos picos de redução de TEMPO ($\sim 0,5$ V) são aproximadamente as mesmas para ambos os eletrodos, e pequena redução é observada para os picos de ($\sim 0,6$ V) quando o eletrodo modificado com enzima foi utilizado. O pico de redução ($\sim -0,1$ V) relacionado ao TEMPO^+ /hidroxilamina não é detectado quando o eletrodo modificado é utilizado. Isto concorda bem com o mecanismo apresentado anteriormente, **Esquema 1**, página 41, em que a ausência do pico pode ser correlacionada com a ação enzimática, sendo que a lacase é responsável pela oxidação da hidroxilamina, reduzindo a concentração deste derivado na superfície do eletrodo, e concomitantemente reduzindo a intensidade do pico.

Figura 62. CV de 0,5 mM ABTS em eletrodo GCE original e após modificação com lacase (GCE/LAsp). Eletrólito suporte: tampão acetato 100 mM, pH 5. Velocidade de varredura: 5 mV/s. Atmosfera ambiente. Protocolo 10.



Fonte: elaborado pelo autor.

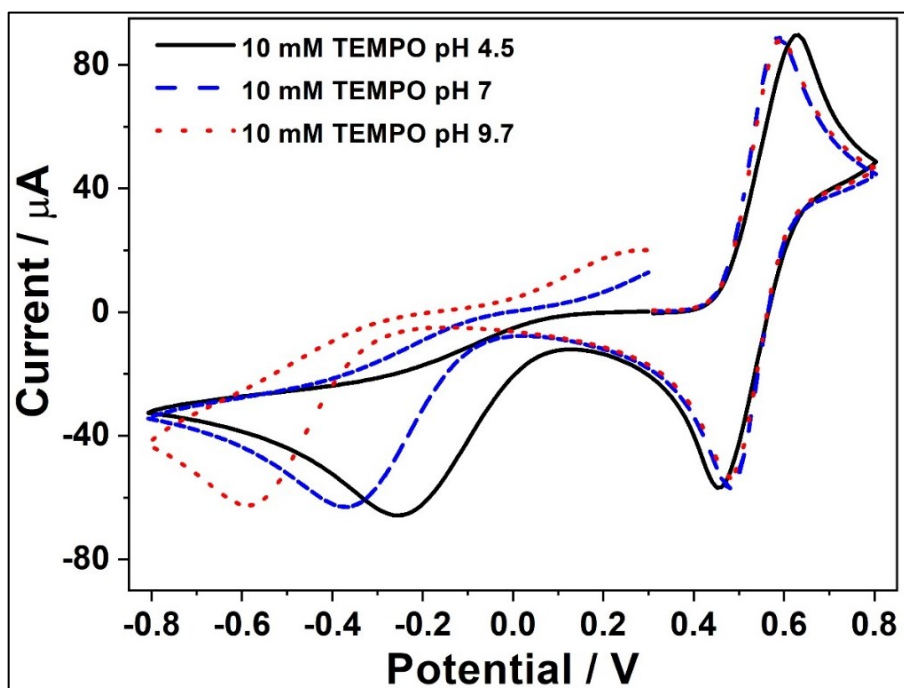
Figura 63: CV de 0,5 mM TEMPO em eletrodo GCE original e após modificação com lacase (GCE/LAsp). Eletrólito suporte: tampão acetato 100 mM, pH 5. Velocidade de varredura: 5 mV/s. Atmosfera ambiente. Protocolo 10.



Fonte: elaborado pelo autor.

A **Figura 64** apresenta o comportamento eletroquímico de TEMPO para valores de pH 4,5, 7 e 9,7. Os voltamogramas obtidos em atmosfera de nitrogênio estão comparados. Como discutido anteriormente, o pico referente a hidroxilamina não é reversível em meio ácido, mas com o aumento no pH, um pico de oxidação se forma, apesar de quase sobreposto com os picos do par TEMPO/TEMPO⁺. Isso comprova que o pH afeta a reversibilidade do pico em potenciais negativos, se tornando parcialmente reversível. A larga separação entre bandas, para pH neutro ou básico, sugere que o comproporcionamento é mais favorável para pH mais alto. Além disso, quanto mais alto o pH mais negativo é potencial do pico de redução, o que está de acordo com o reportado por Green *et al.* (2013).⁵⁹

Figura 64. Voltamogramas cíclicos de 10 mM TEMPO no eletrodo GCE. Eletrólitos suporte: tampão acetato 100 mM, pH 4,5; tampão fosfato 100 mM, pH 7; tampão carbonato de sódio/bicarbonato 100 mM, pH 9,7. Velocidade de varredura: 50 mV/s. Atmosfera de nitrogênio. Protocolo 11.



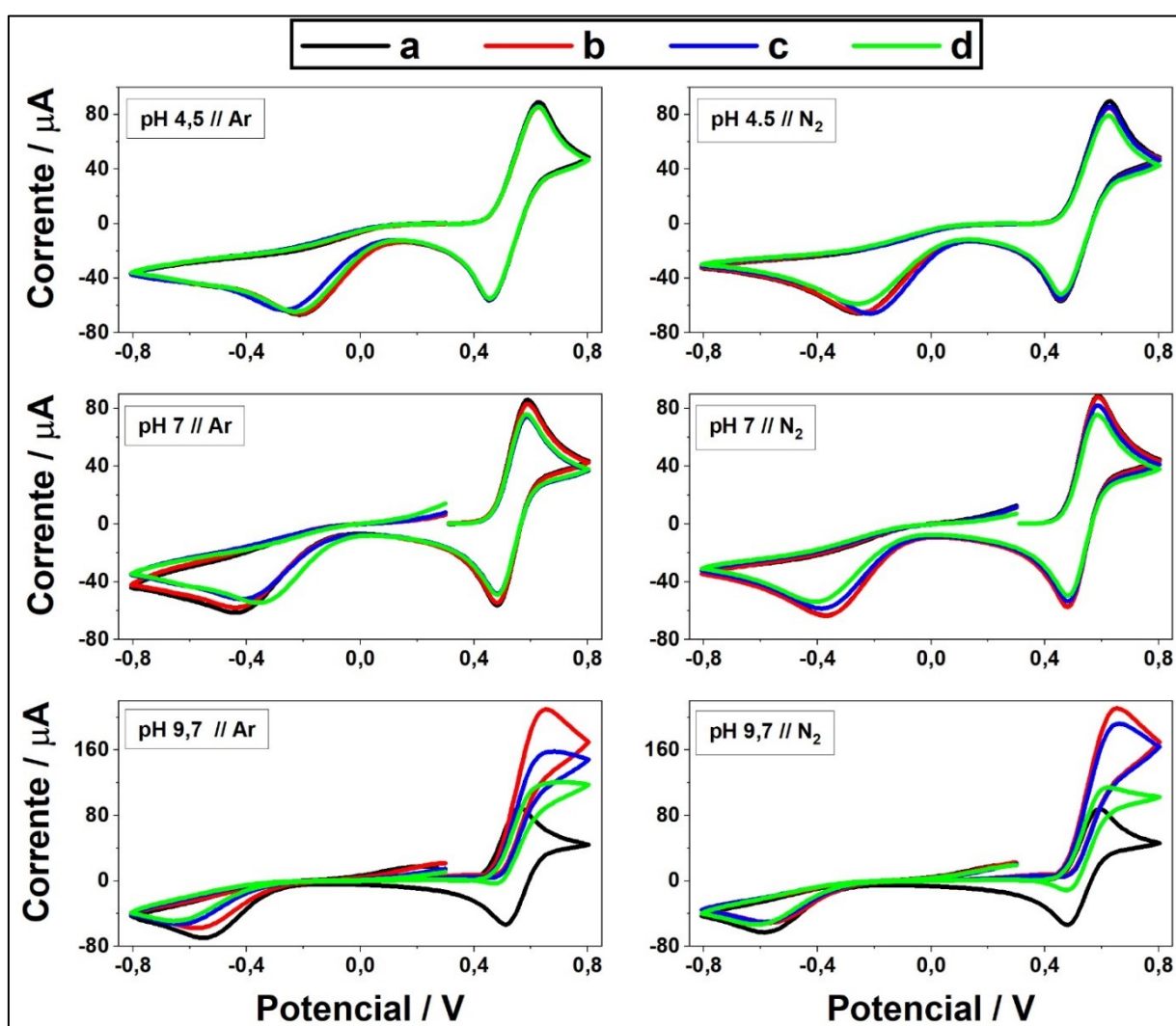
Fonte: elaborado pelo autor.

Após a caracterização eletroquímica dos mediadores TEMPO e ABTS, o passo seguinte foi investigar como o sistema, que envolve a enzima lacase, o mediador TEMPO e glicerol, se comporta, e como o meio afeta a eletroquímica tanto da lacase como de TEMPO.

É conhecido que lacases em maioria são mais ativas em pH ácido, e inativas em pH básico. Este é o caso para a enzima LAsp como descrito nos testes de estabilidade e pH ótimo. Entretanto, o que ainda não estava comprovado é se a em estudo atua sobre TEMPO em meio ácido. Se lacase em solução oxida TEMPO, uma influência na voltametria é esperada, quando se compara os voltamogramas cíclicos na presença ou na ausência de enzima no sistema de oxidação do glicerol TEMPO-mediado em pH ácido. Como a oxidação de TEMPO é fator limitante na oxidação do glicerol, uma compreensão mais detalhada nesse aspecto é crucial. Visando compreender melhor este sistema, simulações da reação de oxidação do glicerol foram acompanhadas eletroquimicamente. Antes de estudar o sistema por completo, controles foram realizados para verificar a relação entre os pares, TEMPO/glicerol, TEMPO/lacase e lacase/glicerol. A **Figura 65** ilustra os voltamogramas cíclicos de TEMPO em diferentes meios, com pHs 4,5, 7 e 9,7, antes ou após a adição de quantidade equimolar de glicerol, nas atmosferas ambiente e de nitrogênio. Pequenas variações podem ser notadas em pH 4,5, o que indica que

o glicerol não afeta no comportamento eletroquímico de TEMPO neste meio. Interferências levemente maiores são observadas em pH neutro, principalmente na região em que o pico de redução referente a hidroxilamina está presente. O que chama a atenção nesta figura são os voltamogramas obtidos em pH básico, em que uma influência rápida do glicerol é verificada, que levou ao aumento da intensidade do pico de oxidação ligado ao par TEMPO/TEMPO⁺. Nota-se também que a atmosfera não interferiu nos voltamogramas.

Figura 65. CV de soluções 10 mM de TEMPO no eletrodo GCE original no eletrólito suporte apenas (a), logo após a adição de 100 μ L de solução de glicerol 1 M glicerol (b), após 15 minutos (c) e por fim, após 30 minutos (d). Eletrólitos suportes: tampão acetato 100 mM, pH 4,5; tampão fosfato 100 mM, pH 7; e tampão carbonato/bicarbonato 100 mM, pH 9,7. Velocidade de varredura: 50 mV/s. Atmosferas ambiente ou nitrogênio. Protocolo 11.

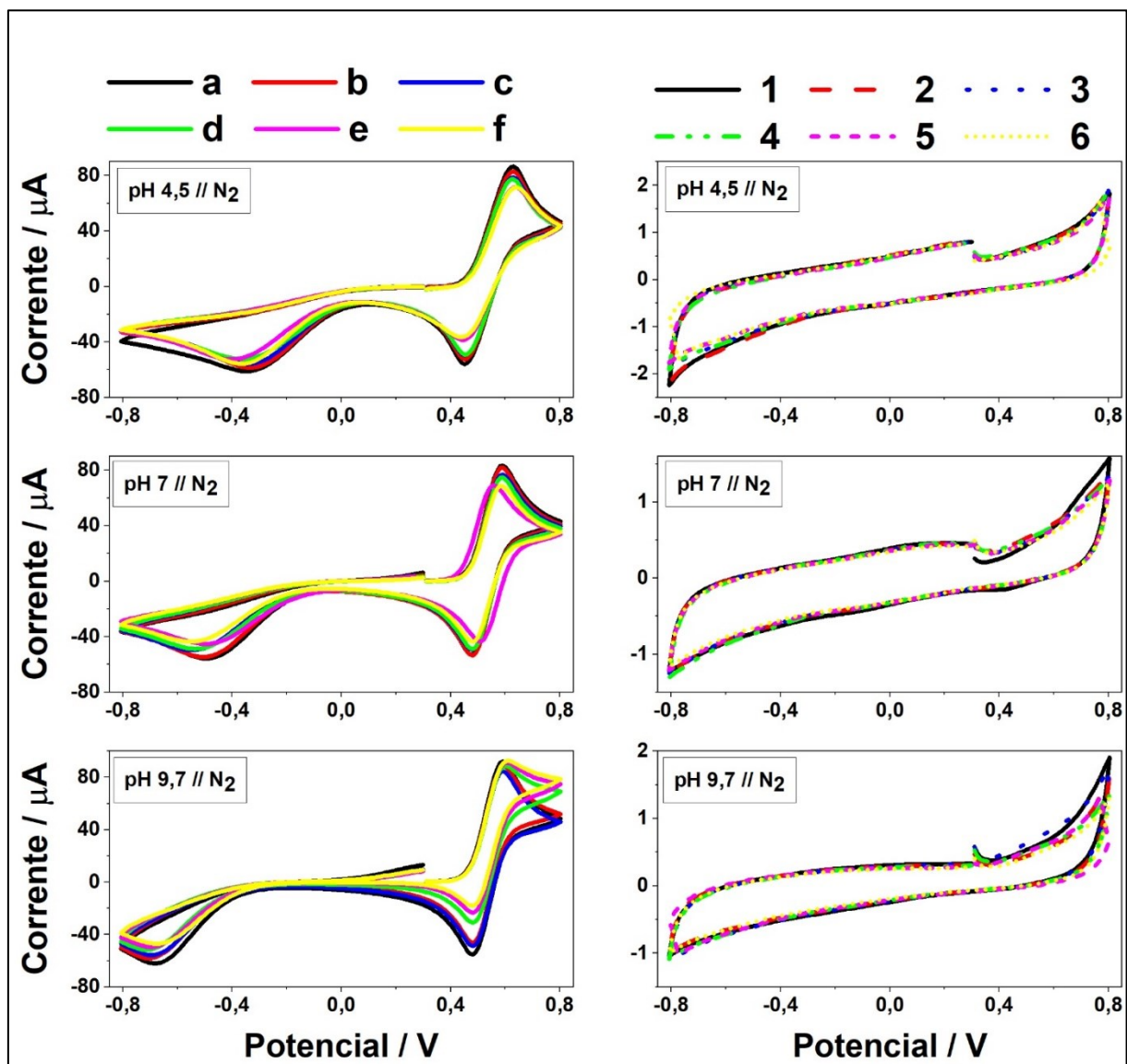


Fonte: elaborado pelo autor.

As Figuras 66 e 67 apresentam os dados coletados para o sistema completo (direita) e para o controle glicerol/lacase (esquerda), nas atmosferas de nitrogênio e ambiente, respectivamente. Em geral, os controles não mostraram variações significantes,

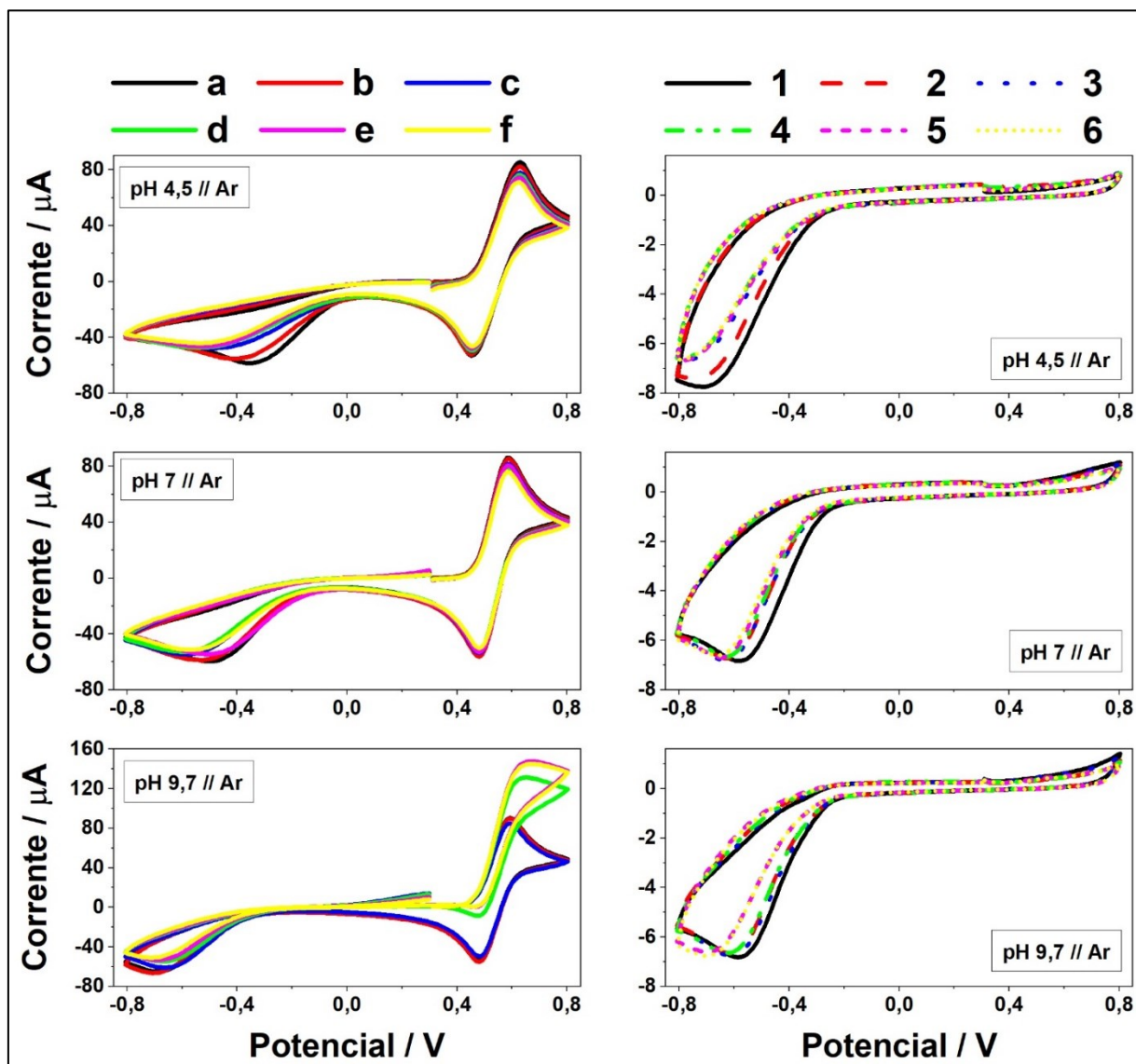
independentemente da atmosfera. Mudanças indicariam possível ação direta da enzima sobre glicerol, não esperada para este sistema. Os aumentos das correntes catódicas nos experimentos em atmosfera ambiente podem ser atribuídos à evolução do oxigênio molecular. Picos e intensidades para todos os ensaios utilizando TEMPO em pH 4,5 e 7 mostram apenas pequenas variações entre os passos do protocolo. Um comportamento completamente diferente é observado em pH 9,7. Para ambas as atmosferas, variações significantes podem ser notadas nos picos em potenciais positivos (TEMPO/TEMPO⁺). Sob atmosfera de nitrogênio, **Figura 66** (base, esquerda), embora a intensidade dos picos de oxidação serem aproximadamente constantes, o decaimento dos picos tem formas variadas, e os picos de redução tem intensidade reduzida após a adição do glicerol. Em pH 9,7 e atmosfera ambiente, **Figura 67** (base, esquerda), após a adição do glicerol, a reação química é fortemente aumentada, e os picos de oxidação apresentam formas típicas de sistemas catalíticos, com intensidades dos picos de redução significantemente reduzidos. Resultados catalíticos similares foram descritos por Ciriminna *et al.* (2006).¹⁴⁸ Eles aplicaram um potencial constante de 1,1 V a uma solução 0,2 M de carbonato de sódio contendo glicerol e TEMPO, e obtiveram dihidroxiacetona como produto principal, e pequenas quantidades de ácido hidroxipirúvico após longas reações. A principal diferença entre o trabalho citado e este trabalho é que neste trabalho não foi aplicado potencial constante. Apenas voltamogramas cíclicos foram coletados no intervalo de 0,8 V a -0,8 V. Outra diferença foi a presença de enzima neste trabalho. Apesar de não ser esperada atividade enzimática em meio básico, os experimentos de controle foram realizados na ausência de enzima, curvas b e c, para todos os pHs estudados e ambas atmosferas. A voltametria do mediador TEMPO permaneceu inalterada. Isso permite assumir que não há ação da enzima sobre TEMPO, e os resultados em pH 9,7 são relacionados apenas aos demais componentes reacionais, TEMPO e glicerol.

Figura 66. CV de soluções 10 mM de TEMPO no eletrodo GCE original no eletrólito suporte apenas (a), logo após a adição de 20 μL de solução enzimática (LAsp) 60 mg/mL (b), e após 15 minutos (c). Logo após a varredura anterior, 100 μL de solução 1 M de glicerol foram adicionados à célula e varredura realizada imediatamente (d), após 15 minutos (e) and finalmente, após 30 minutos (f). Os passos **a**, **b**, **c**, **d**, **e** e **f** (esquerda) foram repetidos na ausência de TEMPO como controle, curvas 1, 2, 3, 4, 5 e 6 (direita), respectivamente. Eletrólitos suportes: tampão acetato 100 mM, pH 4,5; tampão fosfato 100 mM, pH 7; e tampão carbonato/bicarbonato 100 mM, pH 9,7. Velocidade de varredura: 50 mV/s. Atmosfera de nitrogênio. Protocolo 11.



Fonte: elaborado pelo autor.

Figura 67. CV de soluções 10 mM de TEMPO no eletrodo GCE original no eletrólito suporte apenas (a), logo após a adição de 20 μL de solução enzimática (LAsp) 60 mg/mL (b), e após 15 minutos (c). Logo após a varredura anterior, 100 μL de solução 1 M de glicerol foram adicionados à célula e varredura realizada imediatamente (d), após 15 minutos (e) and finalmente, após 30 minutos (f). Os passos **a**, **b**, **c**, **d**, **e** e **f** (esquerda) foram repetidos na ausência de TEMPO como controle, curvas 1, 2, 3, 4, 5 e 6 (direita), respectivamente. Eletrólitos suportes: tampão acetato 100 mM, pH 4,5; tampão fosfato 100 mM, pH 7; e tampão carbonato/bicarbonato 100 mM, pH 9,7. Velocidade de varredura: 50 mV/s. Atmosfera ambiente. Protocolo 11.



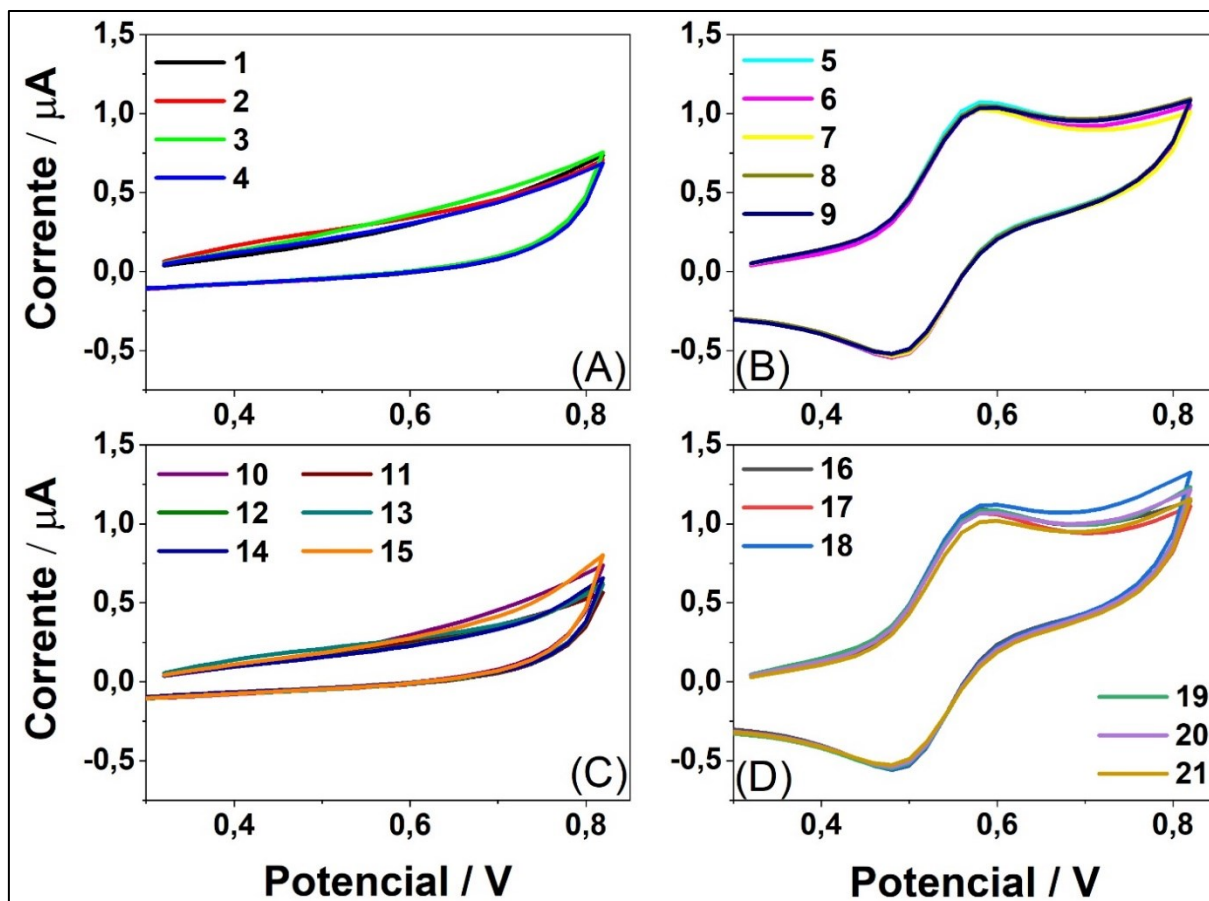
Fonte: elaborado pelo autor.

Em geral, estes testes eletroquímicos de lacase em solução indicam que TEMPO em meio ácido ou neutro não oxida o glicerol, ao menos não em reações de curta duração. A presença de enzima não afeta a taxa de oxidação de TEMPO, pois não são observadas respostas voltamétricas. Podem ser levantadas duas explicações para estas observações: 1- taxas muito lentas de oxidação de TEMPO pela enzima lacase não seriam detectadas voltametricamente nas condições testadas, e uma taxa lenta seria esperada para uma enzima com baixo potencial de redução, típico de lacases amarelas. 2- A concentração de TEMPO utilizada é muito alta, e a

influência da enzima não pode ser discriminada. Para verificar a segunda hipótese, um ensaio foi planejado utilizando TEMPO dez vezes menos concentrado. O ensaio foi realizado em atmosfera ambiente, e pH ácido. Nestas condições a enzima é certamente ativa, e como oxigênio está envolvido na catálise de lacases, podendo ser fator limitante, esta atmosfera foi selecionada.

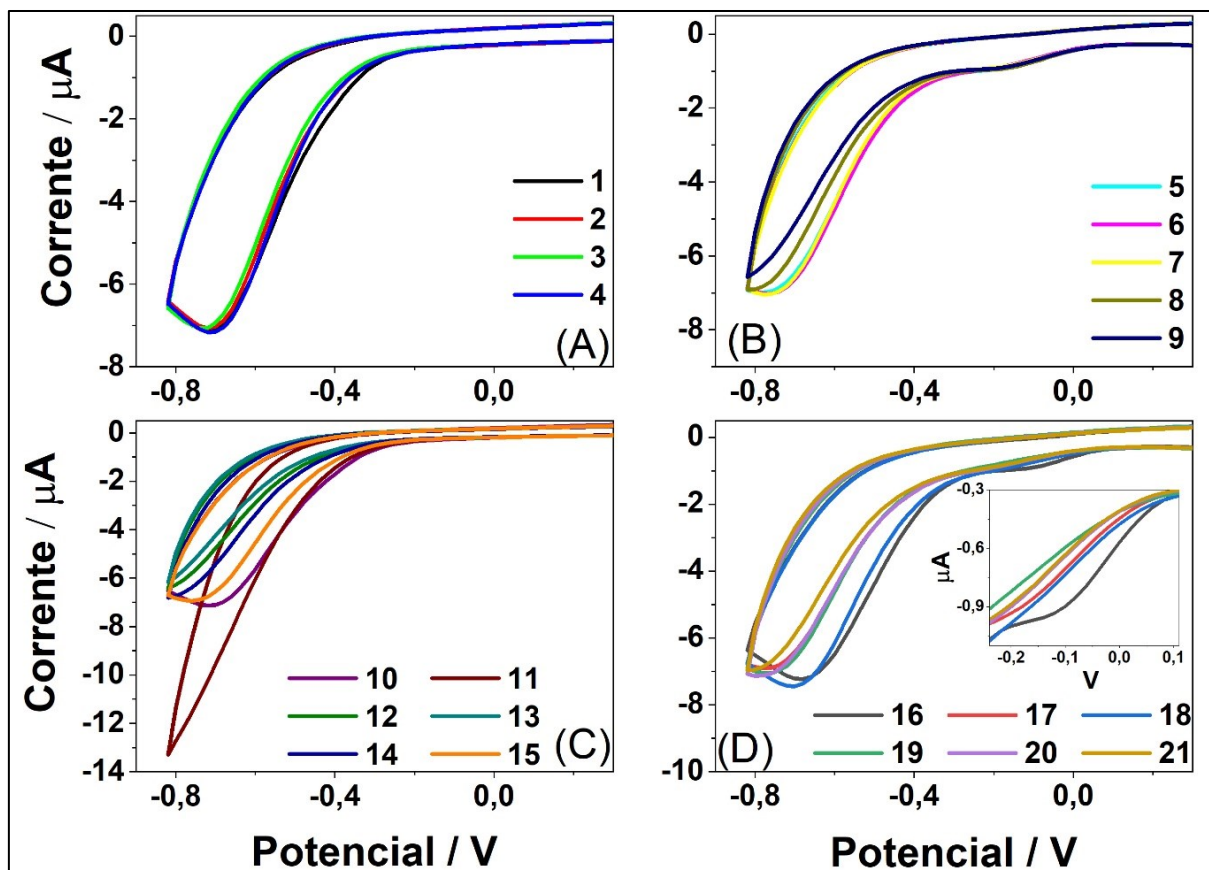
A **Figura 68** mostra os resultados do acompanhamento sequencial para potenciais positivos. Não são verificadas diferenças significantes nos experimentos controle (ausência de TEMPO, A e C) ou para o analito (presença de TEMPO, B e D). Por outro lado, para potenciais negativos, **Figura 69**, o pico referente a hidroxilamina pode ser assinalado, apesar de aparentemente “escondido”, devido à intensa corrente catódica atribuída a presença de oxigênio. Na ausência de lacase, este pico permanece constante (B – 6 até 9), enquanto que, após a adição de enzima (D – 17 até 21), é claramente evidenciado que o pico tem sua intensidade reduzida (veja o *insert*). Isto está fundamentalmente relacionado a ação da enzima sobre a oxidação da hidroxilamina em TEMPO, e concorda com os resultados discutidos anteriormente (**Figura 63**). De fato, uma menor concentração de TEMPO permitiu inferir sobre a ação enzimática. Entretanto, informações sobre a transferência de elétrons internas da lacase ainda são necessárias. Como membro da família de oxido redutases, a transferência direta de elétrons (TDE) é uma propriedade natural de lacases, cada uma possuindo um potencial de redução específico, o que juntamente com a estrutura da cavidade de acesso do substrato ao sítio catalítico, pode aumentar ou limitar a ação enzimática sobre o grande número de substratos possíveis. Investigar a TDE da lacase LAsp utilizando o eletrodo GCE original não é apropriado, como será discutido na seção seguinte.

Figura 68. CV no eletrodo GCE das soluções: A) eletrólito suporte apenas (1), logo após a adição de 100 μL de solução de glicerol 1 M na célula (2), após 15 minutos (3) e finalmente, após 30 minutos (4) // B) 0,1 mM TEMPO no tempo zero (5), e após 15 minutos (6). Logo após a adição de 100 μL de solução de glicerol 1 M na célula (7), após 15 minutos (8) e finalmente, após 30 minutos (9) // C) eletrólito suporte apenas (10), logo após a adição de 20 μL de solução enzimática (LAsp) 60 mg/mL no tempo zero (11), e após 15 minutos (12). Por fim, 100 μL de solução de glicerol 1 M foram adicionados à célula e varredura realizada imediatamente (13), após 15 minutos (14) and finalmente, após 30 minutos (15) // D) 0,1 mM TEMPO (16), logo após a adição de 20 μL de solução enzimática (LAsp) 60 mg/mL no tempo zero (17), e após 15 minutos (18). Em sequência, 100 μL 100 μL de solução de glicerol 1 M foram adicionados à célula e varredura realizada imediatamente (19), repetida após 15 minutos (20) and finalmente, após 30 minutos (21). Eletrólito suporte: tampão acetato 100 mM pH 4,5. Velocidade de varredura: 50 mV/s. Atmosfera ambiente. Protocolo 11.



Fonte: elaborado pelo autor.

Figura 69. CV no eletrodo GCE das soluções: A) eletrólito suporte apenas (1), logo após a adição de 100 μL de solução de glicerol 1 M na célula (2), após 15 minutos (3) e finalmente, após 30 minutos (4) // B) 0,1 mM TEMPO no tempo zero (5), e após 15 minutos (6). Logo após a adição de 100 μL de solução de glicerol 1 M na célula (7), após 15 minutos (8) e finalmente, após 30 minutos (9) // C) eletrólito suporte apenas (10), logo após a adição de 20 μL de solução enzimática (LAsp) 60 mg/mL no tempo zero (11), e após 15 minutos (12). Por fim, 100 μL de solução de glicerol 1 M foram adicionados à célula e varredura realizada imediatamente (13), após 15 minutos (14) and finalmente, após 30 minutos (15) // D) 0,1 mM TEMPO (16), logo após a adição de 20 μL de solução enzimática (LAsp) 60 mg/mL no tempo zero (17), e após 15 minutos (18). Em sequência, 100 μL 100 μL de solução de glicerol 1 M foram adicionados à célula e varredura realizada imediatamente (19), repetida após 15 minutos (20) and finalmente, após 30 minutos (21). Eletrólito suporte: tampão acetato 100 mM pH 4,5. Velocidade de varredura: 50 mV/s. Atmosfera ambiente. Protocolo 11.



Fonte: elaborado pelo autor.

5.6.2 Modificação da superfície de trabalho do eletrodo GCE utilizando nano compostos de zeólitas e grafeno

A transferência direta de elétrons (TDE) entre lacases e eletrodos é um processo conhecido, e pode fornecer informação crucial sobre a termodinâmica enzimática e sua cinética. Indiretamente, o entendimento das propriedades de oxidorredução destas enzimas beneficiam setores em que lacases são amplamente empregadas, como, por exemplo, nos setores de biosensoriamento de produção de células de biocombustíveis. A característica chave de lacases

é o potencial de redução intrínseco ao sítio de cobre tipo 1 (T1). Estes potenciais são reportados em geral no intervalo entre 430 and 790 mV vs. Eletrodo normal de hidrogênio (NHE, abreviação do inglês “normal hydrogen electrode”). Tem sido demonstrado que o sítio T1 é o centro primário no qual elétrons de substratos redutores são aceitos. Além disso, a taxa de ação da enzima sobre o substrato é altamente dependente do potencial de redução do cobre T1, o que torna lacases com alto potencial de redução de alto interesse nos setores mencionados.^{149; 150; 151}

Apesar de ser um processo constantemente estudado em lacases, a TDE fortemente depende na comunicação entre os cobres (sítio catalítico) da enzima e o eletrodo quando avaliados eletroquimicamente. Não há um protocolo geral descrito para esta finalidade general. O que é claro é a necessidade de um agente de “comunicação” quando eletrodos comuns são utilizados, como o GCE, eletrodos de grafite, eletrodos de ouro, etc. Avanços na área de materiais nano estruturados, tem possibilitado o desenvolvimento de uma série de sensores eletroquímicos.

Dentre diferentes materiais, zeólitas em escala micro e nanométrica tem atraído atenção para aplicação em sensoriamento,^{152; 153; 154; 155} e biosensoriamento,^{78; 156; 157; 158; 159; 160; 161} devido às suas propriedades multifuncionais, tais como, pequenos tamanhos, biocompatibilidade, grande área superficial, além da facilidade de modulação de suas propriedades físico-químicas (hidrofobicidade/hidrofilicidade). A criação de eletrodos combinando nanozeólitas com óxido de grafeno (GO) foi também reportada.¹⁵⁵ GO é conhecido por sua alta condutividade eletrônica, eletroquímica relativamente inerte, biocompatibilidade, ampla faixa de potencial e baixo custo.¹⁶² Estas propriedades combinadas com as propriedades zeolíticas levaram a um grande aumento na sensibilidade de eletrodos comuns quando depositados sobre estes. Utilizar uma composição de zeólita/grafeno como modificador seria uma possível alternativa para investigar a TDE da enzima LAsp, ou outras lacases. Além disso, em paralelo permitiria um estudo eletroquímico dos materiais zeolíticos, que foram utilizados neste trabalho como suporte para imobilização destas enzimas.

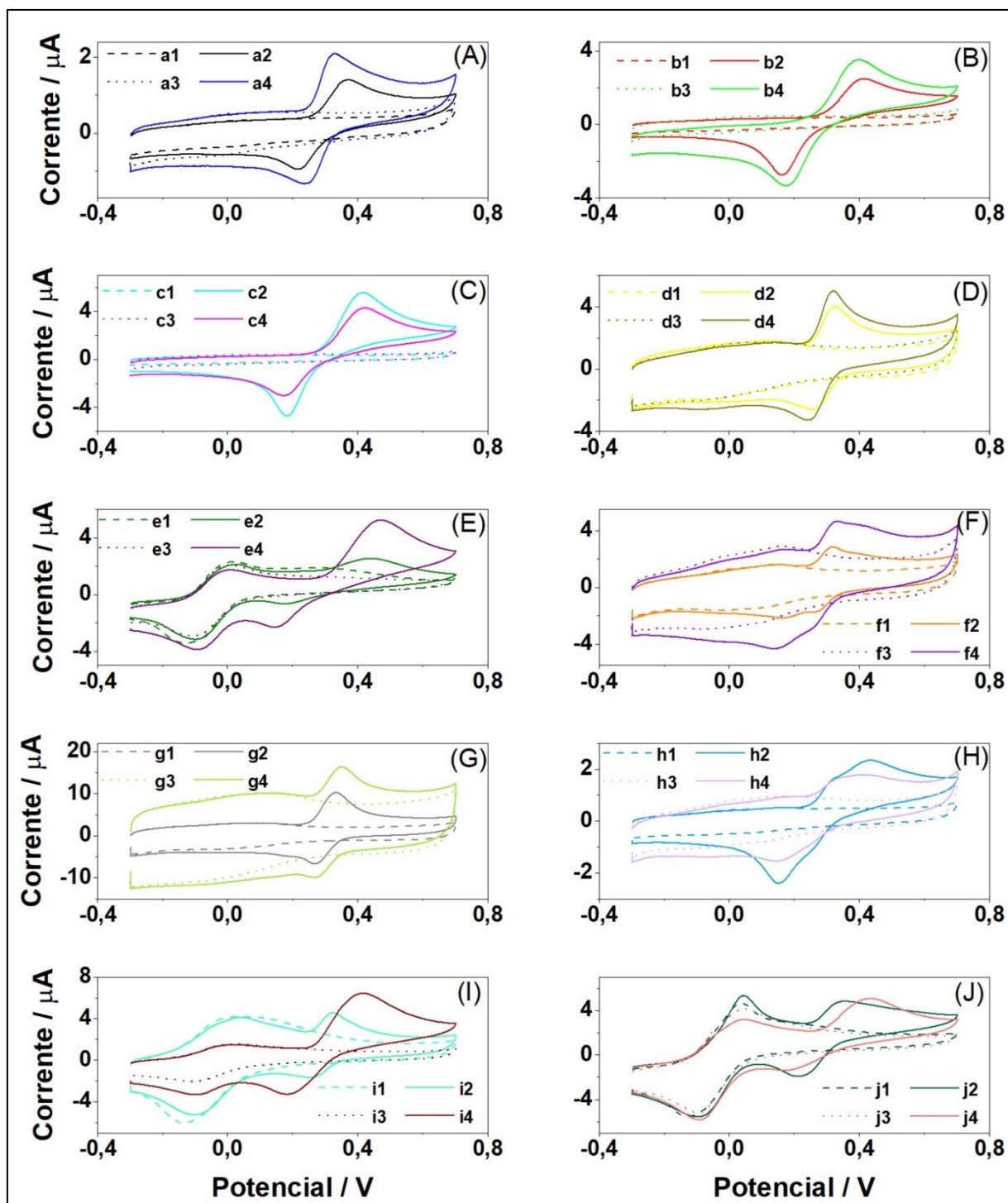
Como discutido anteriormente, a atividade da lacase LAsp sobre alguns substratos foi estudada por voltametria cíclica, contudo, não foi detectada TDE entre enzima e o eletrodo GCE, o que é compreensível, pois a enzima obrigatoriamente precisaria estar próxima o suficiente da superfície do eletrodo, e mais, a comunicação entre o sítio catalítico e o electrode ser favorável, o que pode não acontecer dependendo da posição em que a enzima faz contato

com o eletrodo. Foram selecionados então dois dos materiais zeolíticos alcóxissilano funcionalizados, os que haviam apresentado melhor atividade catalítica quando complexados com a LAsp, BEAc/APTMS/GA and FAU/Cu²⁺/APTMS/GA, dois materiais derivados de grafeno, óxido de grafeno (GO) e nanoplatelets de grafeno (GNP) para preparação dos nano compostos que foram utilizados para a modificação da superfície do eletrodo GCE pelo método de deposição. O polímero nafion (NF) foi utilizado como membrana de retenção, para assegurar que os modificadores permanecessem na superfície do eletrodo, e mais, que não houvesse dispersão enzimática quando utilizadas. Protocolo experimental descrito em detalhes na seção 4.9.4.

Para desafiar o eletrodo modificado, caso TDE não fosse detectado, um substrato comum de lacases foi escolhido como analito, catecol, que possui um comportamento eletroquímico conhecido e estabelecido, e indicaria se a modificação do GCE levou ao aumento ou redução de sua sensibilidade. Os materiais selecionados, assim como a enzima, foram estudados separadamente, e posteriormente combinados para modificação do GCE. A **Figura 70** compara os voltamogramas cíclicos obtidos na ausência de enzima e analito (linhas tracejadas), ausência de analito mas presença de enzima (linhas pontuadas), presença de analito mas ausência de enzima (linha contínua, com cores específicas para cada eletrodo testado), para todos os eletrodos testados. Para comparação, o eletrodo não modificado foi testado também (**Figura 70A**). Algumas observações importantes precisam ser apontadas a partir destes voltamogramas. Inicialmente, o par de oxidação/redução do composto catecol foi verificado em todos os casos, apesar de variações nas intensidades e separação entre picos. Quando os eletrodos em que o material FAU/Cu²⁺/APTMS/GA foi utilizado (E, I and J), um par de picos em potenciais negativos foi encontrado, e pode ser assinalado aos cobres da composição zeolítica.

Figura 70. CV de 50 μ M catecol em tampão fosfato, 100 mM, pH 5, no eletrodo GCE antes ou após modificação: A) não modificado GCE background (a1) e analito (a2); GCE/LAsp background (a3) e analito (a4). B) GCE/NF background (b1) e analito (b2); GCE/LAsp/NF background (b3) e analito (b4). C) GCE/BEAc/APTMS/GA/NF background (c1) e analito (c2); GCE/BEAc/APTMS/GA/LAsp/NF background (c3) e analito (c4). D) GCE/GO/NF background (d1) e analito (d2); GCE/GO/LAsp/NF background (d3) e analito (d4). E) GCE/FAU/Cu²⁺/APTMS/GA/NF background (e1) e analito (e2); GCE/FAU/Cu²⁺/APTMS/GA/LAsp/NF background (e3) e analito (e4). F) GCE/GNP/NF background (f1) e analito (f2); GCE/GNP/LAsp/NF background (f3) e analito (f4). G) GCE/BEAc/APTMS/GA/GO/NF background (g1) e analito (g2); GCE/BEAc/APTMS/GA/LAsp/GO/NF background (g3) e analito (g4). H) GCE/BEAc/APTMS/GA/GNP/NF background (h1) e analito (h2); GCE/BEAc/APTMS/GA/GNP/LAsp/NF background (h3) e analito (h4). I) GCE/FAU/Cu²⁺/APTMS/GA/GO/NF background (i1) e analito (i2); GCE/FAU/Cu²⁺/APTMS/GA/GO/LAsp/NF background (i3) e analito (i4). J) GCE/FAU/Cu²⁺/APTMS/GA/GNP/NF background (j1) e analito (j2); GCE/FAU/Cu²⁺/APTMS/GA/GNP/LAsp/NF background (j3) e analito (j4). Velocidade de varredura: 100 mV/s.

Atmosfera de nitrogênio. Background trata da varredura na ausência de analito, eletrólito suporte apenas. Protocolo 12.

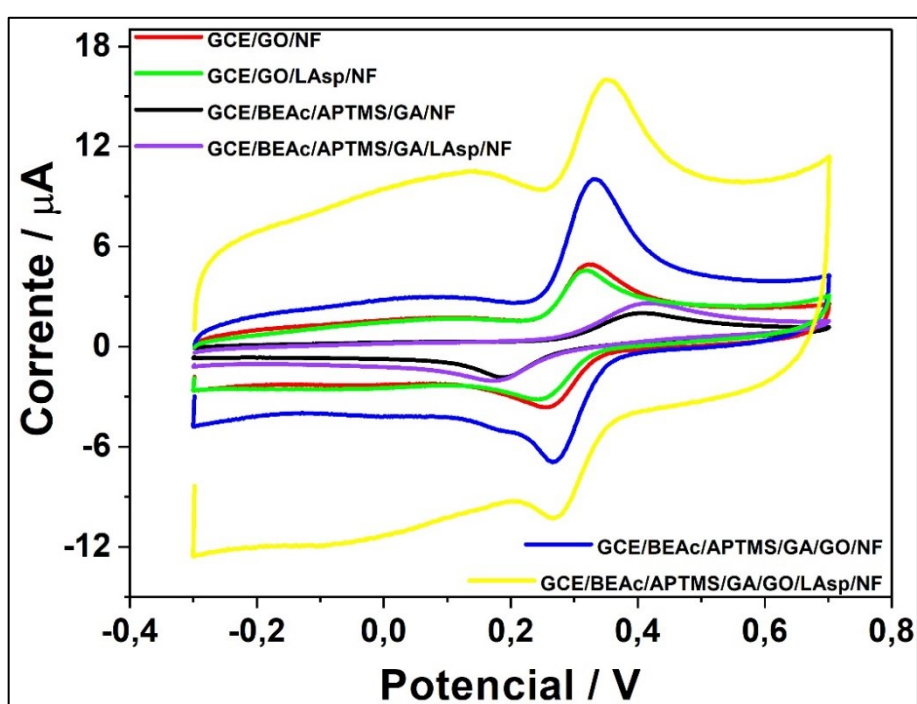


Fonte: elaborado pelo autor.

Os eletrodos obtidos quando foi utilizado grafeno oxide apresentaram, aparentemente, maiores intensidade de correntes para o analito, como pode ser observado com maiores detalhes na **Figura 71**. O que é evidenciado nesta figura é que a combinação de GO e BEA/APTMS/GA

substancialmente aumentou a intensidade dos picos catódicos e anódicos do catecol, e estas intensidades foram, aparentemente, ainda maiores quando a lacase foi utilizada. Até este ponto, o background tem sido ignorado, o que pode levar a inferências enganosas. Uma maneira apropriada de avaliar a sensibilidade dos eletrodos seria subtrair dos voltamogramas do analito os voltamogramas do background, assim, o aumento real das intensidade das correntes seriam quantificados. Esse tratamento foi realizado, utilizando os picos de oxidação do catecol como parâmetro, dados apresentados na **Tabela 9**.

Figura 71. CV de 50 μM catecol em tampão fosfato, 100 mM, pH 5, no eletrodo CGE antes e após modificação com BEA/APTMS/GA, GO e LAsp. Velocidade de varredura: 100 mV/s. Atmosfera de nitrogênio. Protocolo 12.



Fonte: elaborado pelo autor.

Visando analisar a sensibilidade dos eletrodos, o parâmetro Δ_i foi adotado, o qual é expresso como:

$$\Delta_i = A_i - B_i$$

Em que B_i é a intensidade do pico de oxidação do background, que é subtraído da intensidade do pico referente ao analito A_i .

Para comparar as diferentes modificações, o valor Δ_i do eletrodo não modificado foi definido como padrão (Δ_{GCE}), e a sensibilidade de um eletrodo específico definida como a razão

$\Delta i/\Delta_{GCE}$, também expressa como variação percentual assumindo Δ_{GCE} como 100%. Ambos parâmetros expressam como a modificação aumentou ou reduziu a sensibilidade do eletrodo, sendo este um método mais confiável de avaliar a sensibilidade ao invés de utilizar, visualmente, os voltamogramas como dado. Na **Tabela 9** estão apresentados os valores obtidos para os 19 eletrodos testados, e para o eletrodo padrão GCE. Quase todos os eletrodos modificados apresentaram variação positiva, o que significa aumento na sensibilidade, com exceção do eletrodo GCE/BEAc/APTMS/GA/GNP/LAsp /NF. Além disso, os eletrodos contendo enzima foram em maioria mais sensíveis que aqueles sem LAsp, com exceção dos eletrodos GCE/BEAc/APTMS/GA/LAsp/NF e GCE/BEAc/APTMS/GA/GNP/LAsp/NF. Em amarelo estão evidenciadas as modificações que resultaram em aumentos na intensidade superiores a 200% da corrente do pico de oxidação.

Tabela 9. Comparação numérica entre GCE modificado e não modificado.

Eletrodo	Pico / V	A_i / μA	B_i / μA	$\Delta_i = A_i - B_i$ / μA	Δ_i/Δ_{GCE}	Varição / %
GCE	0,370	1,40198	0,3981	1,00388	1	-
GCE/LAsp	0,328	2,09015	0,5238	1,56635	1,56	56,0
GCE/NF	0,414	2,4823	0,37073	2,11157	2,10	110,0
GCE/LAsp/NF	0,400	3,51746	0,4563	3,06116	3,05	205,0
GCE/BEAc/APTMS/GA/NF	0,416	5,55756	0,3381	5,21946	5,20	420,0
GCE/BEAc/APTMS/GA/LAsp/NF	0,424	4,28558	0,41232	3,87326	3,86	286,0
GCE/GO/NF	0,322	4,01001	1,29669	2,71332	2,70	170,0
GCE/GO/LAsp /NF	0,322	4,99908	1,43982	3,55926	3,55	255,0
GCE/FAU/Cu ²⁺ /APTMS/GA/NF	0,439	2,5354	1,50482	1,03058	1,027	2,7
GCE/FAU/Cu ²⁺ /APTMS/GA/LAsp /NF	0,469	5,24017	1,08307	4,1571	4,14	314,0
GCE/GNP/NF	0,314	2,85522	1,22406	1,63116	1,62	62,0
GCE/GNP/LAsp /NF	0,330	4,66461	2,17133	2,49328	2,48	148,0
GCE/BEAc/APTMS/GA/GO/NF	0,330	10,2753	2,0047	8,2706	8,24	724,0
GCE/BEAc/APTMS/GA/GO/LAsp /NF	0,350	16,3269	7,66907	8,65783	8,62	762,0
GCE/BEAc/APTMS/GA/GNP/NF	0,429	2,33948	0,47018	1,8693	1,86	86,0
GCE/BEAc/APTMS/GA/GNP/LAsp/NF	0,406	1,78314	0,78796	0,99518	0,99	-1,0
GCE/FAU/Cu ²⁺ /APTMS/GA/GO/NF	0,322	4,57214	2,32971	2,24243	2,23	123,0
GCE/FAU/Cu ²⁺ /APTMS/GA/GO/LAsp /NF	0,418	6,43616	0,83801	5,59815	5,58	458,0
GCE/FAU/Cu ²⁺ /APTMS/GA/GNP/NF	0,356	4,81384	2,24609	2,56775	2,56	156,0
GCE/FAU/Cu ²⁺ /APTMS/GA/GNP/LAsp /NF	0,431	5,0705	1,80054	3,26996	3,26	226,0

A_i – Corrente do analito B_i – corrente do background

Os eletrodos que foram anteriormente destacados, com análise visual dos voltamogramas, também apresentaram as maiores variações entre todos, GCE/BEAc/APTMS/GA/GO/NF e GCE/BEAc/APTMS/GA/GO/LAsp/NF. Apesar de alta variação, não houve diferença significativa entre os dois eletrodos, indicando que a presença da enzima não afetou a performance do eletrodo. O eletrodo GCE/BEAc/APTMS/GA/GO/NF seria potencial sensor para a detecção de catecol, no entanto, essa não foi a intenção inicial das modificações propostas, e outros estudos decorrentes desta descoberta não serão descritos neste trabalho.

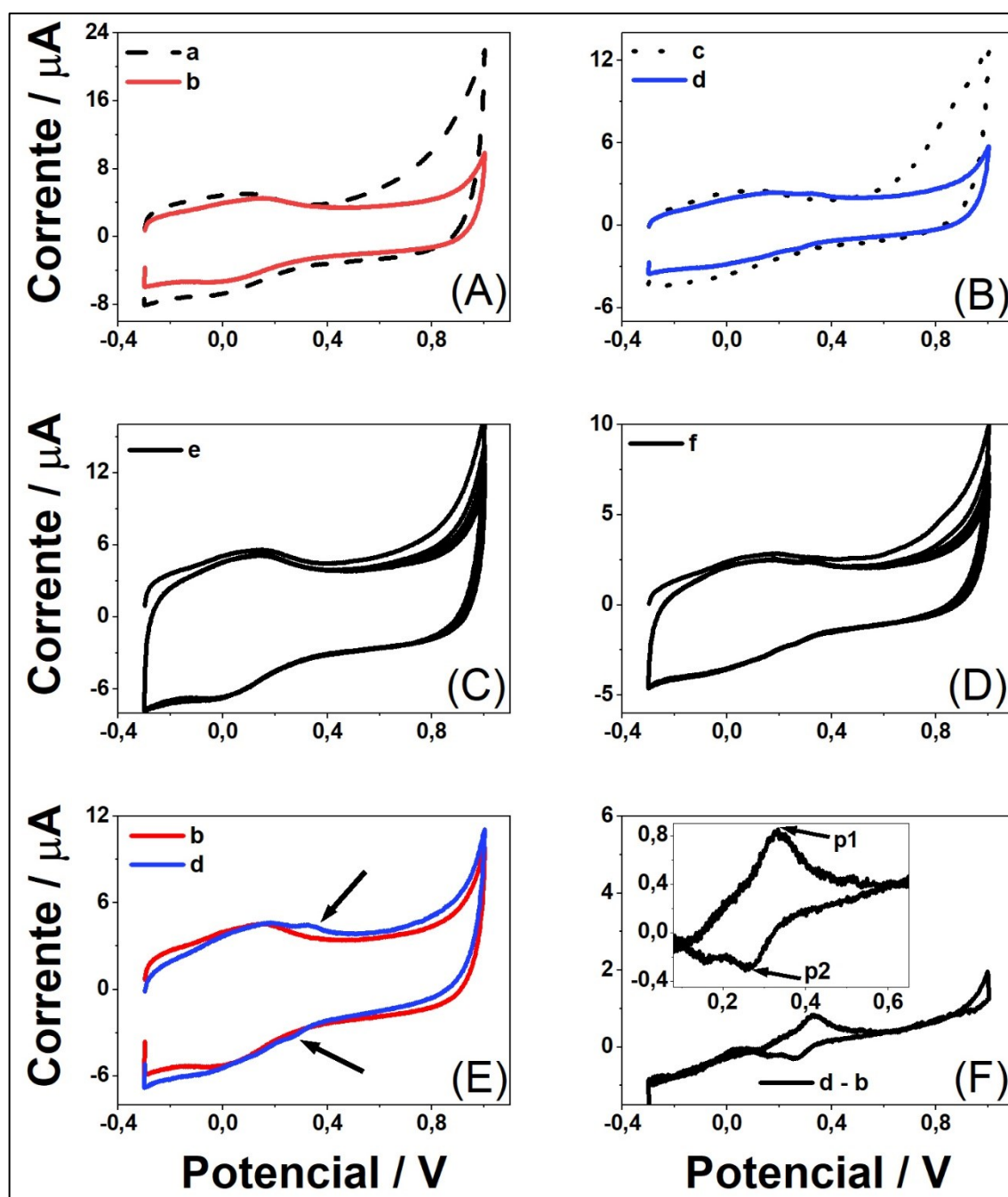
Essencialmente, nestes testes iniciais não foi verificada TDE quando os eletrodos contendo enzima foram testados na ausência do analito. Isso a princípio indica que os compostos utilizados para modificação não foram efetivos para auxiliar a comunicação entre enzima e eletrodo. De fato, TDE é uma reação bastante complexa, com detecção limitada. Além disso, a concentração de enzima poderia definitivamente ser um fator limitante, sendo que, pequena quantidade de enzima acarretaria em intensidade de correntes muito pequenas da TDE. Fortuitamente, durante testes de estabilidade dos eletrodos, aplicação de varreduras consecutivas foram empregadas utilizando o eletrólito suporte apenas.

Surpreendentemente, quando os eletrodos GCE/BEAc/APTMS/GA/GO/NF e GCE/BEAc/APTMS/GA/GO/LAsp/NF foram testados, dois ombros começaram a ser formados e aumentados a cada repetição, enquanto os voltamogramas do primeiro eletrodo foram praticamente constantes após as repetições. A **Figura 72** ilustra estas descobertas. Quando os voltamogramas da primeira e da sétima varredura são comparados para ambos os eletrodos (A e B), é difícil visualizar variações significativas, pois como os eletrodos foram testados em atmosfera ambiente, correntes derivadas da evolução do oxigênio molecular próximo a superfície do eletrodo acarretam em diferenças extras ao eletrodo, na primeira varredura, o que com as repetições é reduzido. As varreduras sequenciais apresentadas em C e D mostra redução do efeito causado pelo oxigênio, e indica que o mesmo está sendo consumido nas proximidades do eletrodo.

Finalmente, quando a sétima varredura de ambos os eletrodos são comparadas (E), os ombros mencionados podem ser visualizados no voltamograma referente ao eletrodo contendo enzima. Um tratamento intuitivo dos dados seria subtrair o voltamograma de GCE/BEAc/APTMS/GA/GO/NF do voltamograma do eletrodo GCE/BEAc/APTMS/GA/GO/LAsp/NF. Esta subtração está apresentada na **Figura 72F**, e o

respectivo *insert* evidencia a região em que os ombros foram detectados. Notavelmente, a subtração resultou numa curva com região com formato de “pato”, formato este comum em voltametria cíclica para pares de oxidação/redução. Dois picos são evidentes (p1 e p2). Como não foi utilizado nenhum analito, a única diferença entre os eletrodos é a presença de enzima.

Figura 72. CV de tampão fosfato, 100 mM, pH 5, utilizando os eletrodos GCE/BEAc/APTMS/GA/GO/NF (A e C) 1ª varredura (a), 7ª varredura (b) e 2ª a 6ª varreduras (e); GCE/BEA/APTMS/GA/GO/LAsp/NF electrode (B e D) 1ª varredura (c), 7ª varredura (d) e 2ª a 6ª varreduras (f). (E) compara as curvas b e d. (F) mostra a subtração de da curva b da curva d. O insert em (F) evidencia os picos de corrente (p1 e p2), cuja forma é similar à de um “pato”, comum em voltametria cíclica. Velocidade de varredura: 100 mV/s. Atmosfera ambiente. Protocolo 12.



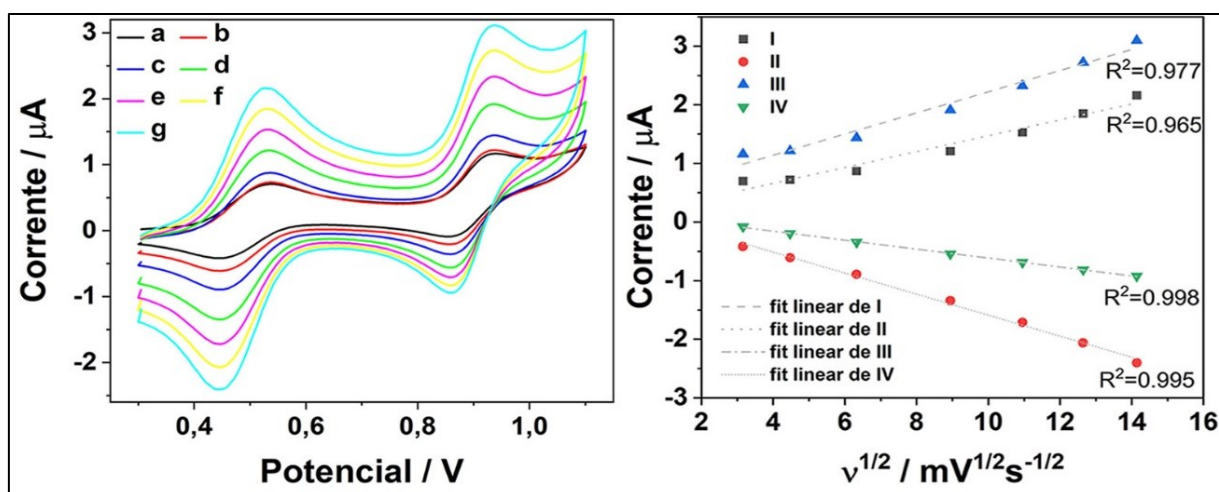
Fonte: elaborado pelo autor.

Portanto, os picos obtidos podem ser atribuídos à LAsp, picos estes claramente relacionados com a transferência direta de elétrons entre enzima e eletrodo. As varreduras sequenciais funcionaram como um tipo de acumulação, que em eletroquímica é comum quando se quer concentrar analito na superfície do eletrodo. Considerando p1 o pico de oxidação e p2 o pico de redução do cobre T1 da LAsp, o potencial de redução formal foi eletroquimicamente determinado, sendo este 0,295 V vs. Ag/AgCl, ou 0,503 V vs. NHE. Este valor é muito próximo ao valores obtidos em outros trabalhos para esta enzima, 0,48 V⁵³ e 0,45 V¹⁶³, determinados por titulação redox espectroscópica.

5.6.3 Estudos eletroquímicos de ABTS, TEMPO, e derivados de TEMPO

Por uma questão de completude, a variação da velocidade de varredura foi investigada para o mediador ABTS por voltametria cíclica. A **Figura 73** apresenta os voltamogramas obtidos para variações de velocidades de varredura entre 10 até 200 mV/s, lado esquerdo. No lado direito estão apresentados os gráficos da intensidade de corrente dos picos I, II, III e IV versus a raiz quadrada das respectivas velocidades de varredura. Regressão linear com R^2 superior 0,965 é verificada em todos os casos. Isto permite inferir que ABTS tem um comportamento eletroquímico controlado por difusão.⁶⁰

Figura 73. CV (esquerda) de solução 0,1 mM ABTS em tampão acetato 100 mM, pH 5, no eletrodo GCE para diferentes velocidades de varredura: a – 10 mV/s, b – 20 mV/s, c – 40 mV/s, d – 80 mV/s, e – 120 mV/s, f – 160 mV/s e g – 200 mV/s. No lado direito são mostrados as intensidades de corrente dos picos I, II, III e IV versus a raiz quadrada da velocidade de varredura v . Fit linear em cinza. Protocolo 9.



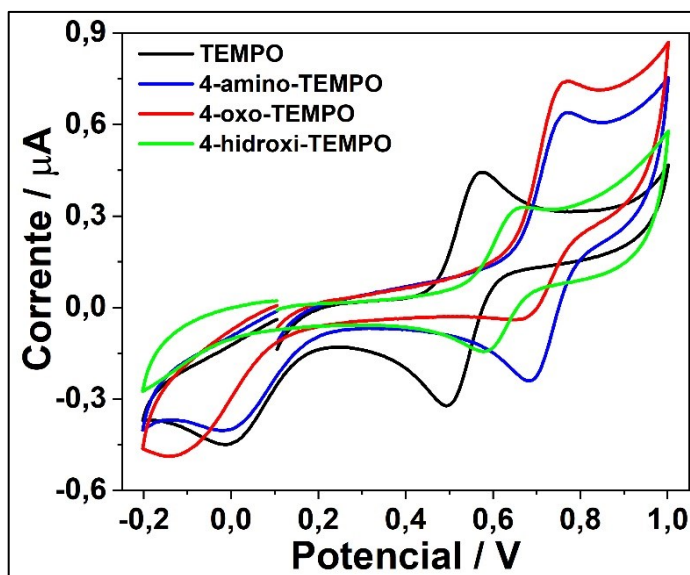
Fonte: elaborado pelo autor.

Após a purificação necessária da enzima comercial (LAsp) para os estudos espectroscópicos e eletroquímicos, e a observação que o potencial redutor desta enzima é provavelmente fator limitante na oxidação de TEMPO, e concomitantemente na oxidação do glicerol, a enzima purificada foi aplicada na reação de oxidação de glicerol, nas mesmas condições que a enzima não purificada descrito anteriormente. A quantidade de produtos obtidos foram estatisticamente os mesmos, e, portanto, o processo de purificação utilizado não afetou negativa ou positivamente a ação da enzima.

É conhecido da literatura a existência de uma série de derivados de TEMPO, 4-TEMPO substituídos. Visando verificar se talvez algum derivado de tempo é mais apropriado como mediador no sistema em estudo, 4-oxo-TEMPO, 4-hidroxi-TEMPO, e 4-amino-TEMPO foram testados para a enzima purificada nas mesmas condições experimentais que TEMPO. Produções ínfimas de gliceraldeído foram obtidas em alguns casos, muito inferiores que as produções utilizando TEMPO não substituído. Isso indica que os derivados testados não são apropriados para o sistema, ao menos não nas condições testadas.

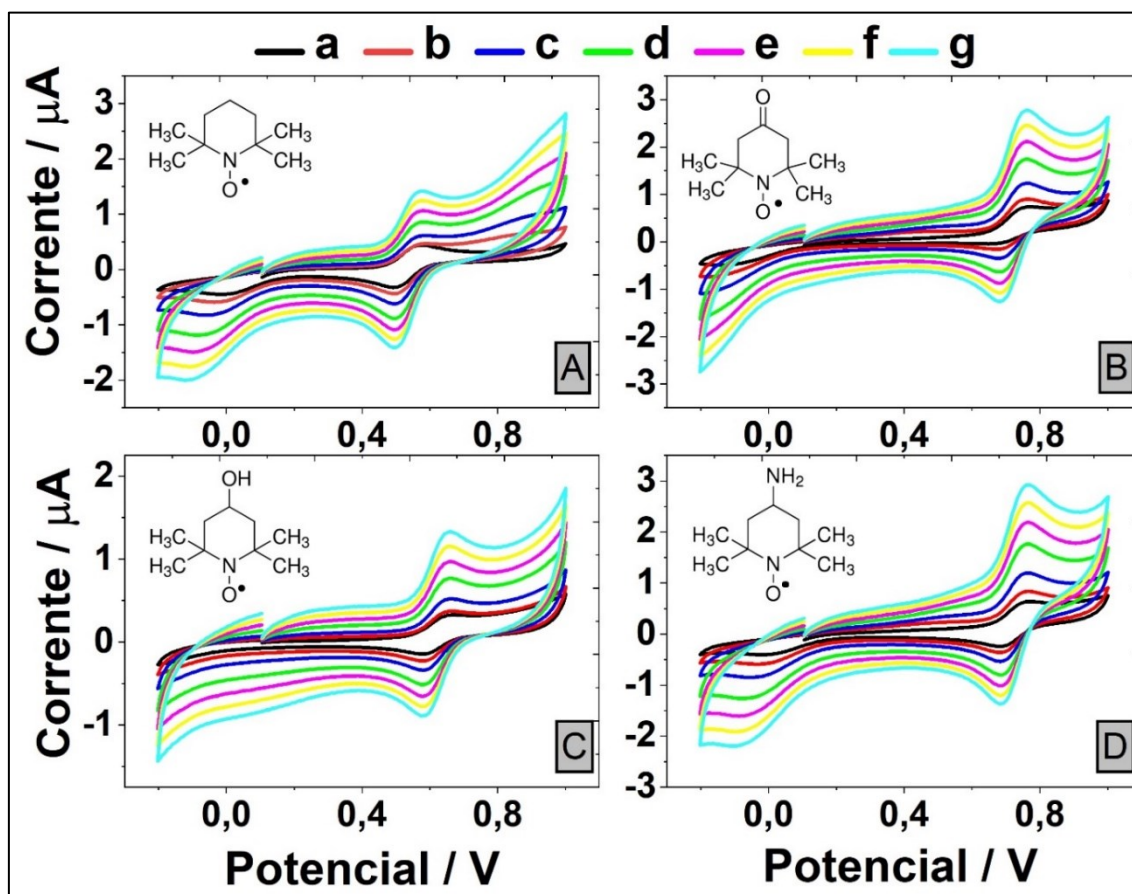
Além de diferenças estruturais, TEMPO e seus derivados também possuem diferenças eletroquímicas, como pode ser visto na **Figura 74**. O excesso de potencial necessário para oxidação dos derivados de TEMPO é consideravelmente superior que o necessário para oxidação de TEMPO. Variações na região da hidroxilamina também são contrastantes. Estes resultados reforçam a indicação de que o potencial redutor desta lacase é fator limitante para oxidação do glicerol no sistema proposto, e corrobora as baixas produções obtidas. Além disso, TEMPO e seus derivados têm processos eletroquímicos controlados por difusão, de acordo com o estudo feito variando as velocidades de varredura, **Figura 75**. As intensidades do pico de oxidação variaram linearmente com a raiz quadrada da velocidade de varredura, assim como ABTS, com R^2 superiores a 0.98 (regressões não apresentadas).

Figura 74. CV de soluções 0,1 mM TEMPO e derivados TEMPO em tampão acetato, 100 mM, pH 5, no eletrodo GCE. Velocidade de varredura: 10 mV/s. Atmosfera ambiente. Protocolo 9.



Fonte: elaborado pelo autor.

Figura 75. CV de soluções 0,1 mM TEMPO (A), 4-oxo-TEMPO (B), 4-hidroxi-TEMPO (C) e 4-amino-TEMPO em tampão acetato, 100 mM, pH 5, no eletrodo GCE electrode. Velocidades de varredura: a – 10 mV/s, b – 20 mV/s, c – 40 mV/s, d – 80 mV/s, e – 120 mV/s, f – 160 mV/s e g – 200 mV/s. Atmosfera ambiente. Protocolo 9.



Fonte: elaborado pelo autor.

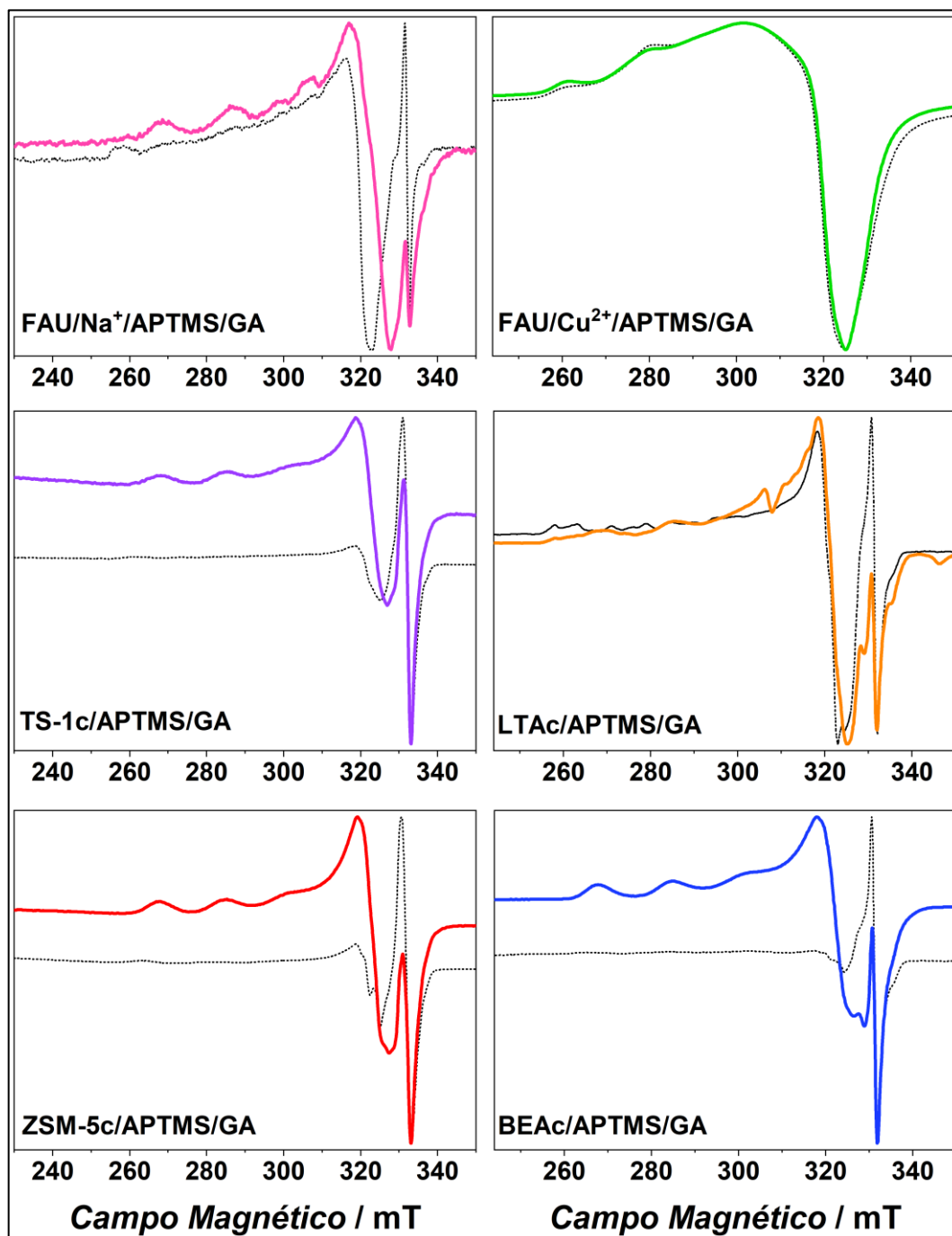
5.7 Análises de EPR na banda X da lacase LAsp livre em solução ou imobilizada em nanozeólitas

A **Figura 76** mostra os espectros de EPR na banda X obtidos para os complexos lacase/nanozeólita (linhas contínuas) comparados com os espectros das nanozeólitas sem enzima (linhas pontilhadas). Em todos os casos, diferenças significativas são evidentes na comparação dos espectros – uma forte contribuição paramagnética por parte da lacase, em específico, dos cobres T1 e T2 de seu sítio catalítico –, com exceção para o par FAU/Cu²⁺/APTMS/GA e FAU/Cu²⁺/APTMS/GA/LAsp, em que a alta concentração de Cu (II) presente na zeólita suprimiu os sinais dos cobres da lacase. Ambos os espectros das nanozeólitas FAU/Na⁺/APTMS/GA e LTAc/APTMS/GA apresentaram um conjunto de bandas espectrais alargadas de baixa intensidade, possivelmente relacionadas a impurezas metálicas nas nanozeólitas. Estas zeólitas são conhecidas por suas altas capacidades de troca iônica e, portanto, bastante suscetíveis a contaminação metálica – mesmo em concentração reduzida, se paramagnéticos, são detectados por EPR. Além disso, a região perpendicular dos espectros – entre 320 e 340 mT – de todas as zeólitas sem enzima – exceto a contendo cobre – apresentou linhas espectrais não esperadas, principalmente uma banda bem definida em 331 mT. Para investigar a ocorrência de contaminação metálica, foram coletados espectros para um intervalo maior, da região de alto spin – campo baixo – até a região de baixo spin – campo alto.

A **Figura 77** apresenta os espectros obtidos para as nanozeólitas funcionalizadas LTAc e BEAc. Em ambos espectros, duas bandas em $g = 4,3$ e $g = 2,03$ estão presentes, a primeira com maior intensidade no material LTAc enquanto a segunda com maior intensidade no material BEAc. Essas bandas são características de Fe (III) em materiais zeolíticos. A banda em $g = 4,3$ pode ser atribuída a íons Fe (III) coordenados tetraedricamente em sítios da rede zeolítica, enquanto a banda em $g = 2,03$ assinalada a íons Fe (III) em coordenação octaédrica isolados ou dentro de oligômeros de FeO_x.^{164; 165} A contaminação com ferro é provavelmente resultante das etapas de preparação do material zeolítico, principalmente da etapa de calcinação – a mufla de calcinação é utilizada constantemente para materiais contendo ferro. Apesar desta contaminação ter sido observada em todos os suportes zeolíticos testados, a região paralela dos cobres T1 e T2 da lacase não apresenta bandas competidoras, apenas na região perpendicular – região esta que frequentemente apresenta sobreposições em lacases, ou seja, baixas resoluções, e por isso os estudos teóricos são imprecisos. Portanto, os estudos foram continuados assumindo

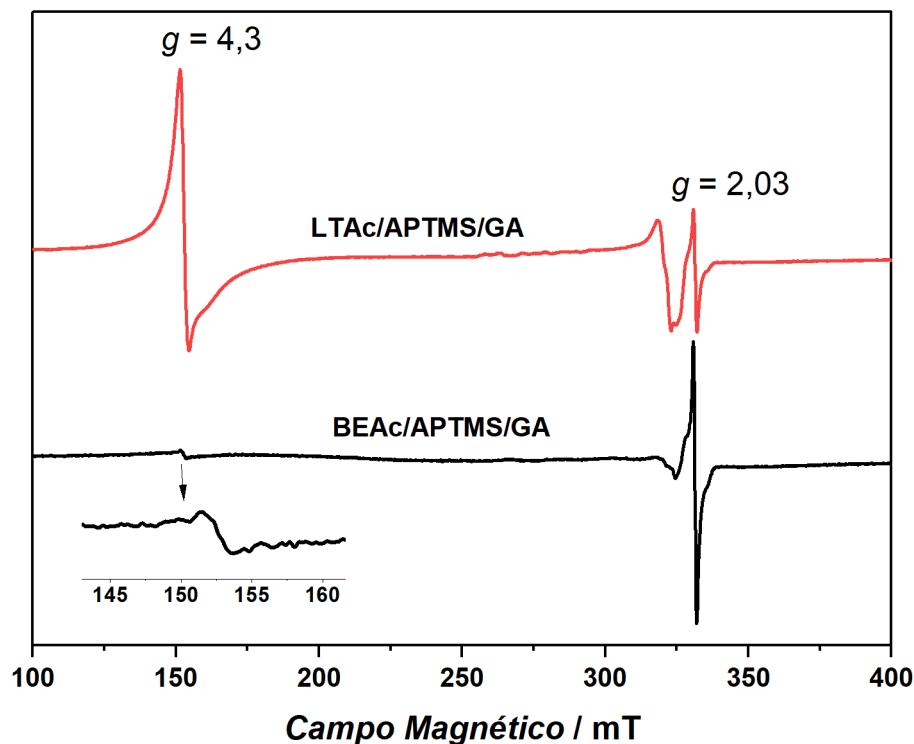
que essas impurezas não teriam contribuição direta nas variações espectrais das lacases immobilizadas.

Figura 76. Espectros de EPR na banda X das nanozeólitas (linhas pontilhadas) e complexos nanozeólitas/LAsp (linhas contínuas). Aproximadamente 100 mg de material sólido foram transferidas para os tubos de EPR, e conteúdo congelado em nitrogênio líquido antes de ser transferido para a cavidade de amostra do espectrômetro.



Fonte: elaborado pelo autor.

Figura 77. Espectros de EPR na banda X das nanozeólitas LTAc/APTMS/GA e BEAc/APTMS/GA para intervalo largo de 100 a 400 mT.

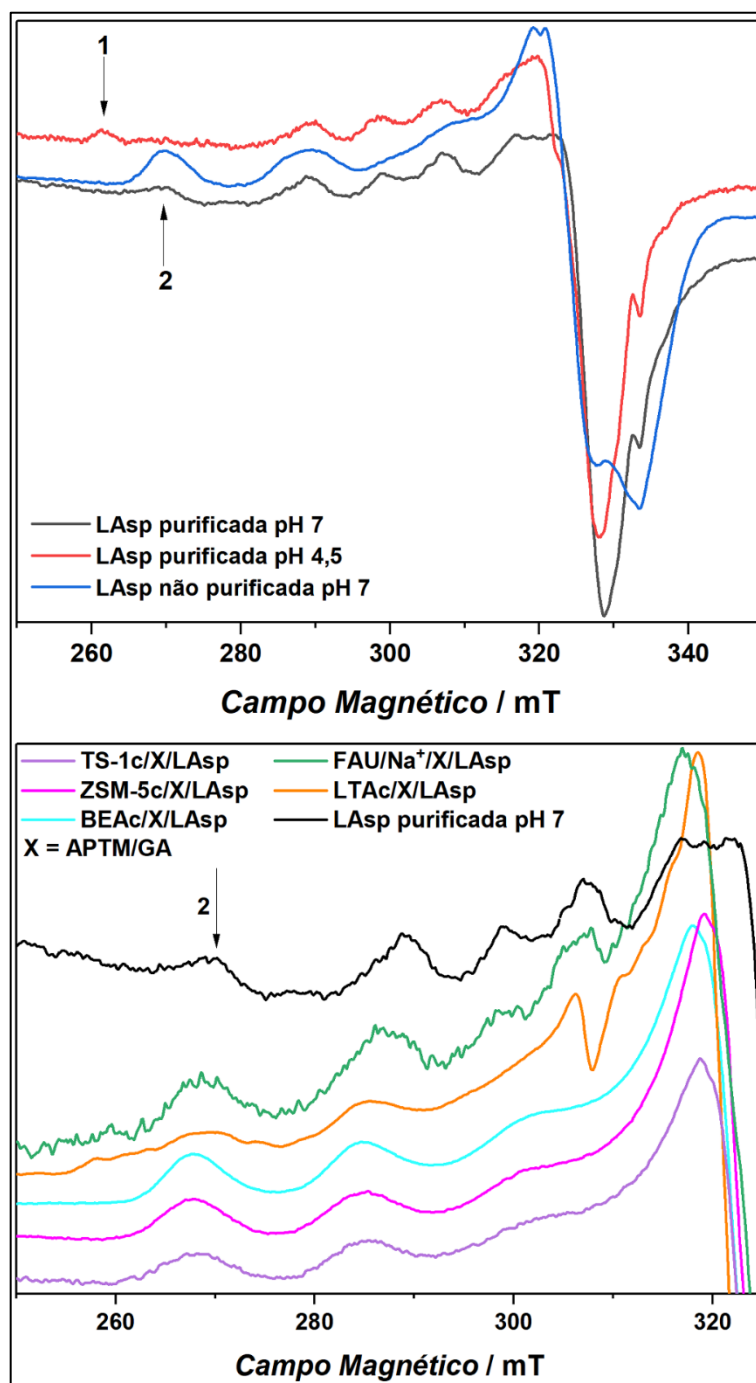


Fonte: elaborado pelo autor.

Como indicado na seção 4.8, a lacase comercial LAsp passou por um processo de concentração/purificação e troca de tampão antes de aplicações espectroscópicas e eletroquímicas. Para comparação, as amostras de lacase em solução purificada – pH 7 e 4,5 – e não purificada – pH 7 – foram submetidas a análise de EPR na banda X, **Figura 78** – parte superior. A enzima purificada, pH 4,5, apresentou as linhas espectrais típicas de lacases azuis,^{50; 51; 52; 166; 167; 168; 169} enquanto a enzima purificada em pH 7 apresentou um deslocamento na banda isolada característica de cobre T2 (seta 1) para a direita (seta 2). A amostra não tratada, pH 7, apresentou um espectro com bandas próximas das observadas para a enzima purificada em pH 7 – apesar de um alargamento e indefinição das bandas sobrepostas dos cobres T1 e T2. Além disso, a região perpendicular do espectro é significativamente diferente em comparação com a enzima purificada. Divergências espectrais são também verificadas nas lacases imobilizadas em nanozeólitas, **Figura 78** – parte inferior. A banda mais a esquerda (seta 2) em todos os materiais zeolíticos está aproximadamente na mesma posição que a da enzima livre purificada pH 7. Entretanto, a resolução – separação – das demais bandas é em geral reduzida – similares

as bandas da enzima não purificada –, com exceção do complexo FAU/Na⁺/APTMS/GA/LAsp, que apresenta um espectro bastante similar ao da enzima livre – ao menos na região paralela.

Figura 78. Espectros de EPR na banda X de lacase purificada – pH 7 e 4,5 – e não purificada – pH 7 – (parte superior). 100 μ L de solução 200 μ M lacase em tampão citrato, 50 mM, pH 4,5, ou fosfato, 50 mM, pH 7, foram transferidos para os tubos de EPR, e os conteúdos congelados em nitrogênio líquido antes de serem transferidos para a cavidade de amostras do espectrômetro. Na parte inferior estão comparados os espectros da lacase purificada pH 7 com os diferentes complexos lacase/nanozeólitas na região espectral dos cobres T1 e T2: FAU/Na⁺/APTMS/GA/LAsp, TS1c/APTMS/GA/LAsp, ZSM-5c/APTMS/GA/LAsp, LTAc/APTMS/GA/LAsp e BEAc/APTMS/GA/LAsp. Espectros completos foram apresentados na **Figura 76**.



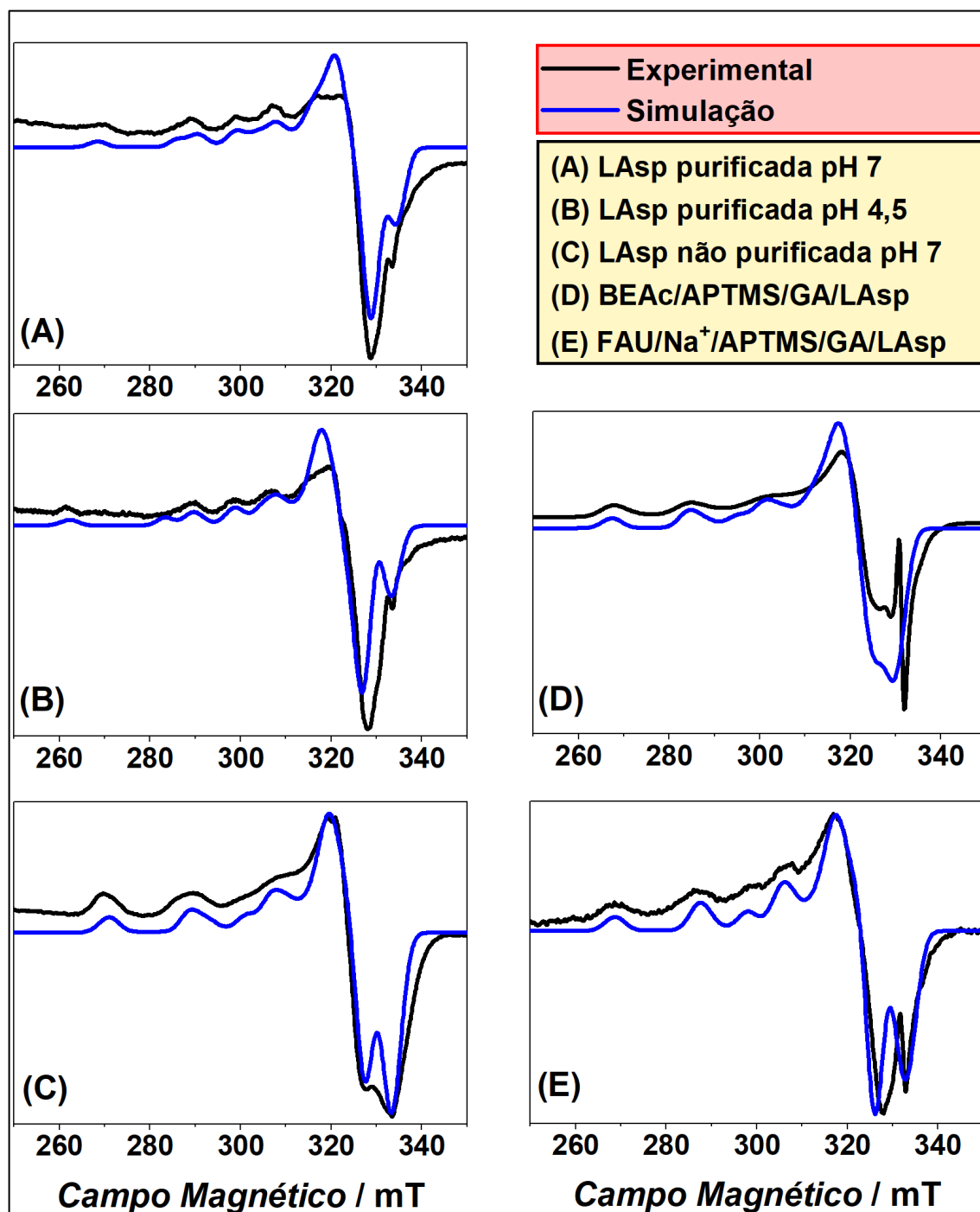
Fonte: elaborado pelo autor.

Os dados da **Figura 78** indicam uma forte influência do pH na espectroscopia da lacase LAsp, e além disso, que as linhas espectrais observadas para a enzima imobilizada são muito próximas àsquelas observadas para a enzima em pH 7. Intuitamente, isso permite levantar a hipótese que os microambientes das enzimas imobilizadas estão sujeitos a pH neutro. Ademais, isso poderia justificar a redução da atividade catalítica das lacases imobilizadas em zeólitas, uma vez que os dados claramente indicaram ótimo de atividade para as enzimas livres em pH ácido e, apesar do meio reacional para oxidação do glicerol ter sido ajustado para pH 4,5, não necessariamente o pH nos microambientes enzimáticos é este quando nas proximidades zeolíticas. Infelizmente, a determinação dos sítios ácidos Brønsted/Lewis não foi levada em consideração neste estudo, e é fortemente indicada para estudos posteriores. Além disso, o tunelamento da acidez zeolítica é possível, e neste caso, pode permitir a modulação destes suportes para maior eficiência na manutenção da atividade de lacases, e assim melhorar a eficiência destes catalisadores no sistema proposto – ou mesmo em outros.^{170; 171}

Em sequência, foram realizadas simulações para determinação dos parâmetros Hamiltonianos de spin no estado fundamental – valores dos tensores g e das constantes de acoplamento hiperfino A . A **Figura 79** compara os espectros experimentais e simulados – melhores resultados teóricos obtidos –, ambos normalizados, para a lacase purificada (pH 7 e 4,5), não purificada (pH 7) e para os complexos FAU/Na⁺/APTMS/GA/LAsp e BEAc/APTMS/GA/LAsp. Os parâmetros de EPR simulados estão apresentados na **Tabela 10**. A partir dos espectros simulados, pode ser visto que os componentes relacionados ao centro T1 da enzima purificada (pH 7) e não purificada são bastante próximos numericamente, com pequenas variações dos valores de g_{\parallel} e g_{\perp} – <0,016. Por sua vez, os parâmetros obtidos para T2 apresentam divergências mais destacadas, principalmente na região paralela dos espectros.

As variações dos Hamiltonianos de spin da enzima livre são significativas quando se comparam os valores para a enzima purificada em pH 7,0 e 4,5. Apesar dos tensores g serem bastante próximos, as constantes de acoplamento são claramente divergentes. Por exemplo, a constante de acoplamento hiperfino paralela é $220,2 \times 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$ para a enzima purificada em pH 4,5 enquanto a constante determinada para a enzima em pH 7 é $170,1 \times 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$, e indica grande variação na deslocalização do elétron desemparelhado na enzima em função do pH. As constantes de acoplamento perpendiculares dos centros T1 e T2 são as mesmas para todos os espectros simulados.

Figura 79. Espectros de EPR na banda X experimentais (linhas pretas) da LAsp purificada pH 7 (A) e pH 4,5 (B), não purificada (C), e dos complexos BEAc/APTMS/GA/LAsp (D) e FAU/Na⁺/APTMS/GA/LAsp (E), comparados com os espectros teóricos obtidos das simulações no software Easyspin (linhas azuis).



Fonte: elaborado pelo autor.

Por sua vez, os valores teóricos simulados para os complexos nanozeólitas/lacase são próximos dos valores obtidos para a enzima livre em pH 7. Isso é esperado, uma vez que visualmente os espectros experimentais obtidos para todos os complexos são similares ao da enzima livre em pH 7 – **Figura 78**, parte inferior. Entretanto, algumas pequenas variações

podem ser destacadas quando se comparam os complexos entre si, principalmente na região paralela. Os valores de g_{\parallel} do sítio T1 do complexo BEAc/APTMS/GA/LAsp é 0,022 superior ao do complexo FAU/Na⁺/APTMS/GA/LAsp, enquanto g_{\parallel} do sítio T2 é 0,03 inferior. Além disso, as constantes de acoplamento paralelas variam na ordem de $5 \times 10^{-4} \text{cm}^{-1}$ e $13 \times 10^{-4} \text{cm}^{-1}$ nos sítios T1 e T2, respectivamente. Em comparação com a enzima livre em pH 7, os valores obtidos para o complexo BEAc/APTMS/GA/LAsp são bastante próximos e, portanto, os do outro complexo levemente divergentes na região paralela. Essas variações indicam variações na deslocalização do elétron desemparelhado e na geometria de coordenação dos átomos de cobre da lacase quando imobilizados em diferentes materiais zeolíticos, o que pode estar relacionado com a acidez/basicidade das superfícies destes suportes.

Tabela 10. Valores de g e da constante de acoplamento hiperfino A para os centros de cobre T1 e T2 dos espectros simulados.

Amostra	Cobre T1				Cobre T2				T1:T2
	g_{\parallel}	g_{\perp}	A_{\parallel}	A_{\perp}	g_{\parallel}	g_{\perp}	A_{\parallel}	A_{\perp}	
LAsp purificada pH 7	2,211	2,060	86,7	16,7	2,275	2,046	170,1	16,7	1:0,7
LAsp purificada pH 4,5	2,200	2,064	91,7	16,7	2,270	2,065	220,2	16,7	1:0,7
LAsp não purificada pH 7	2,195	2,065	86,7	16,7	2,249	2,057	183,5	16,7	1:2,5
FAU/Na ⁺ /APTMS/GA/LASP	2,197	2,064	91,7	16,7	2,245	2,048	186,7	16,7	0,8:1,5
BEAc/APTMS/GA/LAsp	2,219	2,065	86,7	16,7	2,275	2,055	173,4	16,7	0,7:1

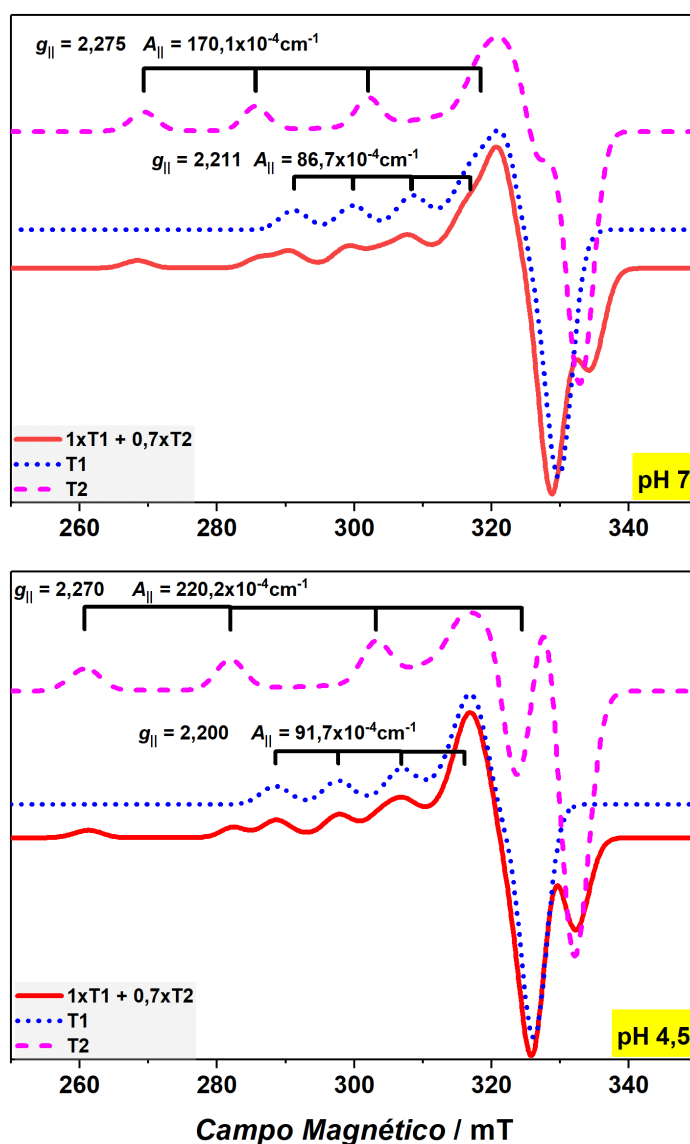
Constante de acoplamento hiperfino A expresso em número de onda (cm^{-1}) com fator de multiplicação 10^{-4} .

Foram utilizados os parâmetros $A_{\parallel} = 1,67$ e $A_{\perp} = 13,3$ para a interação superhiperfina do cobre T2 com ^{14}N das histidinas de coordenação.

Apesar de serem evidentes as alterações espectrais, e os espectros simulados terem representado os espectros experimentais com boa precisão, assinalar o que exatamente leva a essas mudanças espectrais não é algo trivial. Para as simulações, por exemplo, foram considerados a interação do núcleo de cobre T2 com ^{14}N , uma vez que é conhecido da literatura a divisão superhiperfina de uma das bandas do cobre T2 devido à interação deste núcleo com os nitrogênios dos resíduos de coordenação (histidinas) e os oxigênios de coordenação na região equatorial.^{172; 173; 174} Entretanto, este tipo de consideração é frequentemente não realizado na prática devido a fatores fenomenológicos, como por exemplo: linhas alargadas devido à presença dos isótopos de cobre, sobreposição de $A(^{14}\text{N})$ com $A_{\perp} (^{63/65}\text{Cu})$, sobreposição das ressonâncias eletrônicas principais de Zeeman com linhas de “overshoot”.¹⁷⁴ Como pode ser visto na **Figura 80**, as contribuições isoladas das simulações dos cobres T1 e T2/ ^{14}N para

geração do espectro combinado (T1+T2/¹⁴N) apresenta excelente resolução na região paralela, entretanto, a última componente das linhas do cobre T2 (linha mais à direita) não é bem resolvida. A simulação considerando o núcleo ¹⁴N aproxima bem o espectro simulado do espectro experimental, no entanto, a linha que aparece por volta de 330 mT para as enzimas livres e para os complexos pode ser também resultante de “overshoot” – anomalia angular resultante da variação diferencial no campo ressonante devido às variações nos tensores anisotrópicos g e $A(\text{Cu})$, os quais são dependentes da orientação.¹⁷⁴ Além disso, para os complexos, esta banda pode ainda ser atribuída a presença do contaminante metálico Fe (III), como discutido anteriormente.

Figura 80. Contribuições isoladas das simulações dos sítios T1 e T2/¹⁴N para geração do espectro combinado T1+T2/¹⁴N para a LAsp purificada em pH7 e 4,5.



Fonte: elaborado pelo autor.

A coordenação dos cobres de lacases são bastante similares entre diferentes fontes, em que a tríade *His-Cis-His* está envolvida na coordenação equatorial do cobre T1 e oito *His* estão envolvidas na coordenação equatorial dos cobres T2/T3 do cluster trinuclear. Entretanto, muitos estudos indicaram a direta ligação de um dos resíduos axiais não coordenador do cobre T1 ao potencial redox deste sítio – potencial redutor formal das lacases.^{51; 52; 175} A lacase comercial de *Aspergillus* sp. (*M. thermophila* – MtL) utilizada neste estudo – Produto Novozym 51003 – teve a sequência de resíduos de amino ácido informada na patente WO2016007309A1, sequência ilustrada na **Figura 81**, em que o resíduo axial não coordenador do cobre T1 é a Ile-505 (marcado em amarelo). Este resíduo axial, assim como os resíduos de coordenação equatorial dos cobres da lacase MtL, estão alinhados com a sequência relatada para esta enzima por Ernst *et al.* (2018),¹⁷⁶ disponibilizada no *Protein Data Bank* (PDB) sob o código 6F5K. Portanto, a sequência 6F5K foi utilizada para gerar o diagrama ilustrado na **Figura 82**. O cobre T2 é coordenado pelas histidinas 93 e 94 e por uma molécula de água (coordenação 2N1O), e têm ainda no plano equatorial o oxigênio da hidroxila que une os átomos de cobre T3 (coordenação 2N2O).

Figura 81. Sequência de resíduos de aminoácidos da lacase de *M. thermophila* extraída da patente WO2016007309A1.

```

SEQ ID NO 1 : Myceliophthora thermophila Laccase

QQSCNTPSNR ACWTDGYDIN TDYEVDSPT GWRPYTLTL TEVDNWTGPD GWKEKV
LV 60

NNSIIGPTIF ADWGDTIQVT VINNLETNGT SIHWHGLHQQ GTNLHDGANG
ITECPIPPKG 120

GRKVYRFKAQ QYGTSWYHSH FSAQYNGW GAIQINGPAS LPYDIDLGVF
PISDYSSA 180

DELVELTKNS GAPFSDNVLF NGTAKHPETG EGEYANVTLT PRRHRLRLI
NTSVENHFQV 240

SLVNHT CII AADMVPVNA TVDSLFLGVG QRYDVVIEAN RTPGNYWFNV
TFGGLLCGG 300

SRNPYPAAIF HYAGAPGGPP TDEGKAPVDH NCLDLPNLKP WARDVPLSG
FAKRADNTLD 360

VTLDTTGTPL FVWKVNGSAI NIDWGRAVVD YVLTQNTSFP PGYNIVEVNG
ADQWSYWLIE 420

NDPGAPFTLP HP HLHGDF YVLRSPDES PASNERHVFD PARDAGLLSG
ANPVRDVS 480

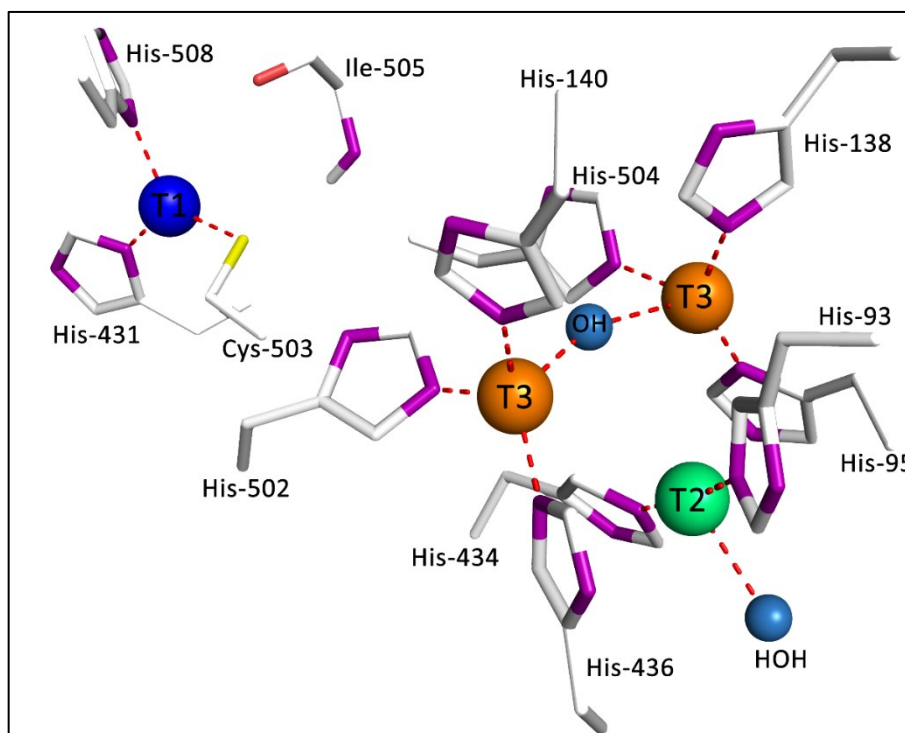
LPAFGWWLS FRADNPGAWL FHCHIAWHVS GGLGVVYLER ADDLRGAVSD
ADADDLRLC 540

ADWRRYWPTN PYPKSDSGLK HRWVEEGEWL VKA 573

```

Fonte: adaptado da patente WO2016007309A1.

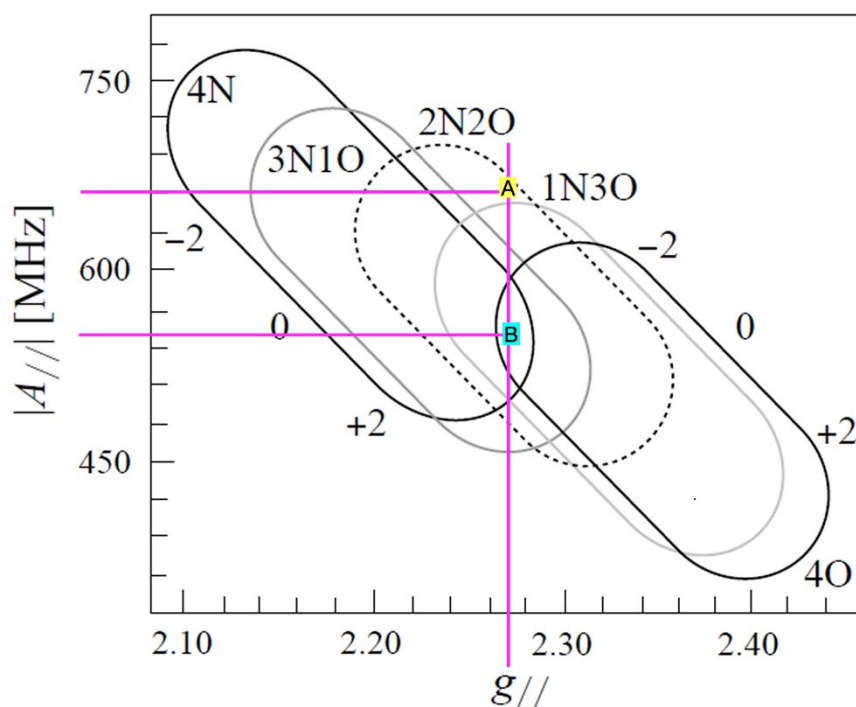
Figura 82. Centro ativo da lacase de *M. thermophila* apresentando os sítios mononuclear de cobre T1 e trinuclear de cobres T2/T3 com os respectivos resíduos de coordenação equatorial. Figura gerada no software Pymol utilizando a sequência disponibilizada no PDB: 6F5K.¹⁷⁶



Fonte: elaborado pelo autor.

Com base no diagrama de Peisach-Blumberg,¹⁷⁷ **Figura 83**, e nos valores de g_{\parallel} e A_{\parallel} determinados neste estudo para o cobre T2 da LAsp/MtL, pH 7 (2,275 e 550 MHz) e pH 4,5 (2,270 e 660 MHz) – valores das constantes de acoplamento convertidos de cm^{-1} para *Hertz* neste caso –, o cruzamento dos valores do cobre T2 da enzima em pH 7 (ponto B), cai numa região do diagrama com várias sobreposições (4N, 3N1O, 2N2O, 4O, 1N3O). Pode-se especular que isso provavelmente indica a distorção da coordenação ilustrada na **Figura 82**, forçando a interação do cobre T2 com mais núcleos de N ou O. Diferentemente, para a enzima em pH 4,5, o cruzamento ocorre numa região não sobreposta do diagrama, referente a coordenação 2N2O. Essa coordenação é a coordenação equatorial esperada da interação do núcleo de cobre T2 com dois nitrogênios das histidinas de coordenação e com os oxigênios da molécula de água e da hidroxila de ligação dos cobres T3. Ou seja, em pH 4,5 não há ambiguidade no assinalamento da coordenação, isso claro, considerando o diagrama de Peisach-Blumberg.

Figura 83. Diagrama de Peisach-Blumberg,¹⁷⁷ para um complexo quadrado-planar de Cu (II). Os domínios ($g_{//}$, $A_{//}$) estão definidos para diferentes coordenações equatoriais e diversas cargas do complexo. As linhas rosas são e os pontos A e B são aproximações dos cruzamentos dos valores determinados neste estudo para a LAsp/MtL.



Fonte: adaptado de BERTRAND (2020).¹⁷³

Para comparação, os parâmetros paramagnéticos determinados neste estudo foram comparados com diversos dados da literatura. Foram coletados também informações sobre o potencial redox do sítio T1 – quando informado – e do resíduo axial não coordenador das lacases comparadas. Estes dados estão apresentados na **Tabela 11**. Inicialmente, comparando-se apenas MtL com MtL, a posição axial ao T1 é geralmente ocupada por leucina – isômero da isoleucina –, com exceção dos estudos em que mutações sítio-dirigidas foram realizadas justamente no resíduo axial. O potencial redutor na maioria dos casos é da ordem de 0,5 V vs. NHE – em concordância com o potencial determinado neste estudo, 0,53 V –, com exceção dos potenciais descritos por Zumarraga *et al.* (2008),¹⁷⁸ em que o potencial é da ordem de 0,7 V vs. NHE. Neste caso, a diferença principal foi o pH de determinação do potencial, 7, enquanto os demais foram em maioria determinados em pH por volta de 5.

Em relação aos parâmetros paramagnéticos, a maioria dos estudos não informa os dados para região perpendicular. Como dito anteriormente, esta região é em geral de baixa resolução e, portanto, não determinada a partir dos espectros de EPR. Já para a região paralela, os dados da literatura estão dentro do esperado para lacases e são comparáveis aos obtidos para a

LAsp/MtL em pH 7. O contraste principal está na comparação da constante de acoplamento paralela do cobre T2 da enzima em pH 4,5 com todos os demais valores tabelados, assim como foi contrastante com as demais constantes dos espectros simulados neste estudo. Isso pode colocar em questão a veracidade da coordenação determinada com base no diagrama de Peisach-Blumberg. Apesar de um assinalamento preciso, o diagrama foi feito com base em complexos de cobre mononuclear, e a comparação com cobres de metaloproteínas é meramente aproximativa.

Por outro lado, ao comparar os dados da lacase deste estudo com lacases de outros organismos, novamente, os parâmetros paramagnéticos estão dentro do comumente relatado para este tipo de enzima, e aproximados dos os valores determinados para LAsp/MtL em pH 7. A variação principal está no resíduo que ocupa a posição axial do cobre T1, e os respectivos potenciais redutores. Apesar de na maioria dos casos resíduos diferentes serem indicados, e os potenciais serem superiores ao da MtL – $>0,7\text{ V}$ –, há casos em que leucina é o resíduo axial, e mesmo assim o potencial redutor é alto. Tipicamente, altos potenciais redutores são relatados para lacases de basidiomicetos – Phe na posição axial –, potenciais médios para lacases de ascomicetos – Leu na posição axial –, e potenciais baixos para lacases de plantas – Met na posição axial. No entanto, isso não é regra, pois alguns estudos verificaram altos potenciais redutores para asco-lacases, por exemplo.¹⁷⁶

Tabela 11. Potencial redox (E^0_{T1}), resíduo da posição axial do cobre T1, e parâmetros paramagnéticos dos cobres T1 e T2 de diversas lacases descritas na literatura.

Lacase	E^0_{T1} / V (pH)	T1 Resíduo axial #	Cobre T1				Cobre T2				REF.
			$g_{ }$	g_{\perp}	$A_{ }$	A_{\perp}	$g_{ }$	g_{\perp}	$A_{ }$	A_{\perp}	
<i>M. thermophila</i>	0,48 (5,5)	L	2,201	ndi@	87	ndi	2,247	ndi	185	ndi	52
<i>M. thermophila</i>	ndi	L	2,201	2,045	87	15	2,247	ndi	185	ndi	179
<i>M. thermophila</i> L513F	0,50 (5,5)	F	2,201	ndi	87	ndi	2,248	ndi	183	ndi	52
<i>M. thermophila</i> L513H	0,42 (7,0)	H	2,240	2,053	102	15	2,247	ndi	180	ndi	179
<i>M. thermophila</i> T2	0,70 (7,0)	L	2,212	ndi	80	ndi	ndi	ndi	ndi	ndi	178
<i>M. thermophila</i> T2 S510G	0,69 (7,0)	L	2,207	ndi	77	ndi	ndi	ndi	ndi	ndi	178
<i>M. thermophila</i> V509L/S510E/G511A	0,47 (5,5)	L	2,192	ndi	90	ndi	2,247	ndi	175	ndi	52
<i>P. ostreatus</i>	0,74 (5,0)	L	2,191	2,046	96,4	ndi	2,257	2,040	200,8	ndi	147
<i>R. lignosus</i>	ndi	L	2,204	2,041	93	ndi	2,242	2,038	193	ndi	172
<i>R. solani</i>	0,73 (5,5)	L	2,208	ndi	84	ndi	2,265	ndi	160	ndi	52
<i>R. solani</i> L466V/E467S/A468G	0,74 (5,5)	L	2,208	ndi	84	ndi	ndi	ndi	ndi	ndi	52
<i>R. solani</i> L470F	0,72 (5,5)	F	2,208	ndi	84	ndi	ndi	ndi	ndi	ndi	52
<i>T. hirsuta</i>	0,78 (6,5)	F	2,19	ndi	95	ndi	2,24	ndi	193	ndi	180; 181
<i>T. versicolor</i>	0,78 (5,5)	F	2,182	ndi	90	ndi	2,281	ndi	190	ndi	182; 183
<i>T. villosa</i>	0,79 (5,5)	F	2,194	2,046	90	8	2,248	2,057	182	12	51
<i>T. villosa</i> F463L	0,74 (5,5)	L	2,203	2,044	86	8	2,235	2,042	182	12	51
<i>T. villosa</i> F463M	0,68 (5,5)	M	2,214	2,047	78	9	2,248	2,060	183	9	51
<i>M. thermophila</i>	0,503 (5,0)	I	2,200	2,064	91,7	16,7	2,270	2,065	220,2	16,7	Este trabalho
	ndi - (7,0)	I	2,211	2,060	86,7	16,7	2,275	2,046	170,1	16,7	

& – Potencial redox do cobre T1 versus NHE (pH de medida entre parênteses).

– Resíduo da posição axial da esfera de coordenação do cobre T1.

Constante de acoplamento hiperfino A expresso em número de onda (cm^{-1}) com fator de multiplicação 10^{-4} .

@ – **ndi**: não determinado ou informado.

Apesar do difícil e complexo assinalamento dos parâmetros paramagnéticos à estrutura da lacase estudada, a obtenção de espectros bem definidos para enzimas imobilizadas é um ganho deste estudo. Não há na literatura – no melhor do nosso conhecimento –, estudos que relatem a determinação de tensores g e constantes de acoplamento A para lacases imobilizadas. No entanto, uma abordagem similar foi realizada, para outra enzima da classe de cobre-oxidases no estudo descrito por Umamaheswari *et al.* (2017).¹⁰⁶ Neste estudo, EPR na banda X foi utilizada para verificar se o processo de imobilização levou a variações nos sítios de cobre de uma ascorbato oxidase – oxidase com sítios de cobre similares aos das lacases – imobilizada em materiais de sílica mesoporosos. Foi verificado que os sítios de cobre foram mantidos após imobilização, contudo, dependendo do grupo químico presente nos poros dos materiais, o cobre enzimático foi verificado no estado oxidado, e atribuíram isto como resposta ao pH neutro sentido pela enzima após imobilização, o que comumente leva ao estado oxidado.

Por fim, para correlacionar parcialmente os dados espectroscópicos e eletroquímicos com os dados catalíticos deste estudo, algumas informações precisam ser lembradas. Primeiramente, o substrato utilizado para seleção de potenciais complexos para a oxidação do glicerol foi o ABTS, entretanto, o mediador utilizado para a oxidação foi na verdade o radical TEMPO. Os dados eletroquímicos ilustraram que a LAsp atua para ambos os compostos, no entanto, não foi possível um acesso metuculoso em relação a cinética de atuação da enzima nestes substratos. De toda forma, o potencial redox da enzima é um potencial médio, 0,53 V, menor, por exemplo, que o potencial da LPO – 0,74 V de acordo com a literatura –, o que poderia explicar maior conversão da reação de oxidação do glicerol para esta enzima. Todavia, uma informação estrutural interessante é discutida no trabalho de Ernest *et al.* (2018),¹⁷⁶ para a lacase MtL. Eles apontam para a presença de um sítio alternativo de ligação do composto ABTS na proteína – ou compostos de alto peso molecular –, distante do sítio comum de ligação nas proximidades do cobre T1. Isso permite especular, por exemplo, que as boas atividades dos complexos com o suporte FAU/Cu²⁺/APTMS/GA para o substrato ABTS não tenha sido refletida para o substrato TEMPO devido à presença de um segundo sítio de ligação. Pode ser que, apesar da imobilização ter gerado distorções no sítio catalítico e reduzido a atividade da enzima para o substrato TEMPO, o mesmo não aconteceu para ABTS, caso estas distorções não tenham afetado o outro sítio. Dessa forma, talvez ABTS não seja o melhor substrato para a seleção de complexos ativos para o sistema proposto. Alternativamente, a avaliação eletroquímica do mediador TEMPO iniciada neste estudo possa ser otimizada e utilizada para esta finalidade.

6 CONCLUSÕES

Este trabalho teve como objetivos principais: 1) a síntese e caracterização de diferentes tipos de nanozeólitas. 2) o estudo dessas matrizes zeolíticas como suporte para imobilização de lacases derivadas de diferentes microrganismos. 3) avaliar a aplicação de enzimas livres ou imobilizadas na catálise oxidativa do glicerol TEMPO-mediada. Os objetivos gerais foram atingidos, e os dados coletados permitem as seguintes conclusões:

Os materiais zeolíticos foram preparados em escala nanométrica, conforme demonstrado pelas análises de MEV, apesar de em alguns casos aglomerados terem sido formados. O processo de troca iônica da nanozeólita faujasita X (FAU/Na⁺) resultou na formação de uma fase competidora no material FAU/Cu²⁺. Com base em dados de DRX, MEV, EDS, EDX, FTIR e MET, esta fase foi assinalada a formação do mineral antlerite, formada devido à alta temperatura do processo de troca iônica. Todos os demais suportes sintetizados com sucesso, pois os dados de caracterização estão de acordo com a literatura.

As três lacases testadas, LPO, LAB e LAsp apresentaram temperaturas ótimas acima de 60 °C e pH ótimo 3. No entanto, a estabilidade das enzimas em condições de baixo pH e altas temperaturas é bastante reduzida. Isso deve-se a potencial desnaturação destas enzimas para longos períodos de incubação.

Os materiais zeolíticos sintetizados e funcionalizados foram capazes de imobilizar as lacases testadas, entretanto, com baixa manutenção das atividades enzimáticas em comparação com a atividade das enzimas livres na oxidação de ABTS. Dentre os suportes testados, o mais efetivo foi o material contendo cobre em sua composição – FAU/Cu²⁺/APTMS/GA. Essa observação pode ser correlacionada com o potencial ativador que o cobre apresentou quando as atividades das enzimas livres foram testadas em ambientes químicos contendo concentrações variadas deste metal. Entretanto, a contribuição da fase competidora do material com cobre não foi considerada neste estudo, e pode sim estar relacionada com o resultado observado.

Apesar de terem sido obtidos complexos lacases/nanozeólitas com atividades razoáveis para a oxidação do composto ABTS, quando os complexos selecionados foram testados para a reação de oxidação do glicerol TEMPO-mediada, as conversões obtidas foram substancialmente inferiores as conversões obtidas utilizando as enzimas livres, mesmo em quantidades equivalentes de atividade. Apesar de baixas conversões, alta seletividade para

formação de gliceraldeído foi observada quando utilizados os complexos. Por outro lado, as enzimas livres LPO e LAsp altas conversões em comparação com os complexos. No entanto, a enzima LPO se destacou, com conversão superior a 80%, enquanto a LAsp apresentou conversão por volta de 30%. Essa diferença de conversão pode ser relacionada ao potencial redutor de cada enzima, enquanto a LAsp tem potencial redutor da ordem de 0,53 V *vs.* NHE, e LPO tem potencial redox de 0,74 V. Isso permite concluir que o potencial redutor deve ser levado em consideração para a aplicação de lacases no sistema proposto, e enzimas de maior potencial são mais indicadas. Além disso, é a primeira vez que as lacases LPO, LAsp e LAB são empregadas neste sistema, tanto em forma livre como imobilizada, e tanto LPO quanto LAsp apresentaram conversões comparativas ou superiores as lacases investigadas anteriormente em outros estudos.

Os dados de ressonância paramagnética eletrônica indicaram uma alta dependência da lacase LAsp ao pH do meio, e sugerem que os pH dos microambientes enzimáticos após imobilização são próximos ao pH neutro. Os Hamiltonianos de spin obtidos a partir de simulações dos espectros de EPR indicaram variação na coordenação do cobre T2 do sítio catalítico da lacase quando o pH do meio foi alterado de 4,5 para 7, e os valores obtidos para enzima livre em pH 7 são aproximadamente os mesmos da enzima imobilizada nos diferentes suportes. Isso pode ter contribuído para a redução da atividade enzimática quando comparada com a enzima livre em pH ácido. Estas observações estão de acordo os dados de caracterização enzimática coletados, em que a atividade enzimática foi altamente dependente do pH.

Em geral, os dados permitem concluir que materiais zeolíticos tem sim potencial para imobilização de lacases. No entanto, uma caracterização prévia das propriedades físico-químicas dos suportes e das enzimas é altamente recomendada para o direcionamento na busca pela combinação correta de suporte com lacase. Os pH dos microambientes enzimáticos após imobilização devem ser investigados, e o potencial redutor destas enzimas considerados, para efetiva aplicação no sistema proposto: oxidação do glicerol lacase/TEMPO-mediada.

7 RECOMENDAÇÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Para dar continuidade ao estudo realizado, recomenda-se as seguintes etapas:

- i. A verificação dos sítios ácidos de Brønsted/Lewis dos materiais zeolíticos testados neste estudo, ou outros suportes zeolíticos, considerando a existência de um número enorme de zeólitas com diferentes estruturas e propriedades físico-químicas.
- ii. A modulação da acidez da superfície zeolítica na tentativa de deixar este tipo de material mais adequado para imobilização de lacases. E a busca por um protocolo de determinação do pH dos microambientes enzimáticos após imobilização.
- iii. Cálculos termodinâmicos dos sítios catalíticos das enzimas lacases (estudos não-miméticos) para otimização das reações de oxidação do glicerol.
- iv. Imobilização de lacases em estruturas zeolíticas hierarquicamente estruturadas.
- v. Verificação do grau de contaminação por Fe (III). Se possível tentar reduzir ao máximo a presença deste contaminante, visando espectros de EPR mais limpos e resolvidos.
- vi. Ampliação dos estudos espectroscópicos e eletroquímicos para as lacases de LPO e LAB. O teste de lacases de outros organismos é recomendado também, principalmente lacases de alto potencial redutor.
- vii. A busca por um protocolo alternativo de seleção dos complexos lacase/zeólitas. O protocolo utilizando ABTS pode não ser o mais adequado, como ilustrado neste trabalho. Sugere-se a investigação eletroquímica direta do mediador TEMPO, possivelmente pela modificação de um eletrodo de carbono e montagem de uma plataforma que permita a investigação da conversão direta de TEMPO em TEMPO⁺. Uma vez que TEMPO é utilizado para a oxidação do glicerol, seria conveniente selecionar um complexo com alta atividade para este mediador.
- viii. Uma sugestão extra é a aplicação de engenharia genética na busca por enzimas mais estáveis em pH ácido por mutação sítio dirigida. Apesar de lacases em geral terem ótimos reacionais em pH ácido, a estabilidade para longos períodos de incubação destas enzimas é baixa, e limita sua aplicação em sistemas catalíticos de reações lentas, como o deste estudo.

REFERÊNCIAS

- 1 MARTIN, G. R. **A clash of kings**. Bantam, 2012. ISBN 0345535413.
- 2 FAIRBANKS, M. Glicerina: Crescimento do biodiesel provoca inundação no mercado de glicerina, incentivando a descobrir novas aplicações. **Revista Química e Derivados**, n. 487, 2009.
- 3 ZHOU, C.-H. C. et al. Chemoselective catalytic conversion of glycerol as a biorenewable source to valuable commodity chemicals. **Chemical Society Reviews**, v. 37, n. 3, p. 527-549, 2008.
- 4 CHHEDA, J. N.; HUBER, G. W.; DUMESIC, J. A. Liquid-phase catalytic processing of biomass-derived oxygenated hydrocarbons to fuels and chemicals. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 46, n. 38, p. 7164-7183, 2007.
- 5 BERNATCHEZ, J. A. et al. Derivatives of mesoxalic acid block translocation of HIV-1 reverse transcriptase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 290, n. 3, p. 1474-1484, 2015.
- 6 GABBARA, S. et al. Inhibitors of DNA strand transfer reactions catalyzed by HIV-1 reverse transcriptase. **Biochemistry**, v. 38, n. 40, p. 13070-13076, 1999.
- 7 DAVIS, W. R. et al. Inhibition of HIV-1 reverse transcriptase-catalyzed DNA strand transfer reactions by 4-chlorophenylhydrazone of mesoxalic acid. **Biochemistry**, v. 39, n. 46, p. 14279-14291, 2000.
- 8 BEHR, A. et al. Improved utilisation of renewable resources: new important derivatives of glycerol. **Green Chemistry**, v. 10, n. 1, p. 13-30, 2008.
- 9 FORDHAM, P.; BESSON, M.; GALLEZOT, P. Catalytic oxidation with air of tartronic acid to mesoxalic acid on bismuth-promoted platinum. **Catalysis letters**, v. 46, n. 3-4, p. 195-199, 1997.
- 10 FORDHAM, P.; BESSON, M.; GALLEZOT, P. Selective oxidation with air of glyceric to hydroxypyruvic acid and tartronic to mesoxalic acid on PtBi/C catalysts. **Studies in surface science and catalysis**, v. 108, p. 429-436, 1997.
- 11 CIRIMINNA, R.; PAGLIARO, M. Oxidation of tartronic acid and dihydroxyacetone to sodium mesoxalate mediated by TEMPO. **Tetrahedron letters**, v. 45, n. 34, p. 6381-6383, 2004.
- 12 JOHNSON, D. T.; TACONI, K. A. The glycerin glut: Options for the value-added conversion of crude glycerol resulting from biodiesel production. **Environmental Progress**, v. 26, n. 4, p. 338-348, 2007.
- 13 VILLA, A. et al. Glycerol Oxidation Using Gold-Containing Catalysts. **Accounts of Chemical Research**, v. 48, n. 5, p. 1403-1412, 2015/05/19 2015.

- ¹⁴ DODEKATOS, G.; SCHÜNEMANN, S.; TÜYSÜZ, H. Recent advances in thermo-, photo-, and electrocatalytic glycerol oxidation. **ACS Catalysis**, v. 8, n. 7, p. 6301-6333, 2018.
- ¹⁵ HONG, C. S. et al. Enzymatic Conversion of Glycerol to Glyceric Acid with Immobilised Laccase in Na-Alginate Matrix. **Procedia Chemistry**, v. 16, p. 632-639, 2015.
- ¹⁶ LIEBMINGER, S.; SIEBENHOFER, M.; GUEBITZ, G. Oxidation of glycerol by 2, 2, 6, 6-tetramethylpiperidine-N-oxyl (TEMPO) in the presence of laccase. **Bioresource technology**, v. 100, n. 20, p. 4541-4545, 2009.
- ¹⁷ HONG, C. S. et al. A comparison of entrapped and covalently bonded laccase: Study of its leakage, reusability, and the catalytic efficiency in TEMPO-mediated glycerol oxidation. **Biocatalysis and Biotransformation**, p. 1-10, 2017.
- ¹⁸ HONG, C. S. et al. Selective oxidation of glycerol to mesoxalic acid by laccase/2, 2, 6, 6-tetramethylpiperidine-N-oxyl system: Effect of process conditions and the kinetic modeling. **Chemical Engineering Communications**, v. 206, n. 12, p. 1645-1660, 2019.
- ¹⁹ GONCALVES, A. P. V. et al. Effect of the immobilization support on the hydrolytic activity of a cutinase from *Fusarium solani pisi*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 20, n. 2, p. 93-101, Feb 1 1997.
- ²⁰ GONCALVES, A. P. V. et al. Zeolites as supports for enzymatic hydrolysis reactions. Comparative study of several zeolites. **Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic**, v. 1, n. 2, p. 53-60, Apr 4 1996.
- ²¹ SERRALHA, F. N. et al. Zeolites as supports for an enzymatic alcoholysis reaction. **Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic**, v. 4, n. 5-6, p. 303-311, Aug 3 1998.
- ²² KANG, Y. J. et al. Uniform nanozeolite microspheres with large secondary pore architecture. **Chemistry of Materials**, v. 18, n. 7, p. 1861-1866, Apr 4 2006.
- ²³ ZHANG, Y. H. et al. Enrichment of low-abundance peptides and proteins on zeolite nanocrystals for direct MALDI-TOF MS analysis. **Angewandte Chemie-International Edition**, v. 44, n. 4, p. 615-617, 2005 2005.
- ²⁴ YU, T. et al. Controlled nanozeolite-assembled electrode: Remarkable enzyme-immobilization ability and high sensitivity as biosensor. **Chemistry-a European Journal**, v. 12, n. 4, p. 1137-1143, Jan 23 2006.
- ²⁵ JI, J. et al. Enhanced protein digestion through the confinement of nanozeolite-assembled microchip reactors. **Analytical Chemistry**, v. 80, n. 7, p. 2457-2463, Apr 1 2008.

- 26 DE VASCONCELLOS, A. et al. Potential new biocatalysts for biofuel production: the fungal lipases of *Thermomyces lanuginosus* and *Rhizomucor miehei* immobilized on zeolitic supports ion exchanged with transition metals. **Microporous and Mesoporous Materials**, 2015.
- 27 DE VASCONCELLOS, A. et al. Biocatalysts based on nanozeolite-enzyme complexes: effects of alkoxysilane surface functionalization and biofuel production using microalgae lipids feedstock. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, 2018.
- 28 TOSHEVA, L.; VALTCHEV, V. P. Nanozeolites: Synthesis, crystallization mechanism, and applications. **Chemistry of Materials**, v. 17, n. 10, p. 2494-2513, May 17 2005.
- 29 MA, F. R.; HANNA, M. A. Biodiesel production: a review. **Bioresource Technology**, v. 70, n. 1, p. 1-15, Oct 1999.
- 30 MINISTÉRIO DE MINAS E ENERGIA. Percentual obrigatório de biodiesel sobe para 12%. 2020. Acesso em: 26 de Agosto.
- 31 SONNATI, M. O. et al. Glycerol carbonate as a versatile building block for tomorrow: synthesis, reactivity, properties and applications. **Green Chemistry**, v. 15, n. 2, p. 283-306, 2013.
- 32 DEVAUX, J.-F.; FAUCONET, M.; TLILI, N. **Method for producing acrolein and/or acrylic acid from glycerol**: Google Patents 2013.
- 33 CHIEREGATO, A. et al. Glycerol oxidehydration into acrolein and acrylic acid over W–V–Nb–O bronzes with hexagonal structure. **Catalysis Today**, v. 197, n. 1, p. 58-65, 2012.
- 34 CHIEREGATO, A. et al. One-pot glycerol oxidehydration to acrylic acid on multifunctional catalysts: Focus on the influence of the reaction parameters in respect to the catalytic performance. **Applied Catalysis B: Environmental**, v. 150–151, p. 37-46, 5/5/ 2014.
- 35 PESTANA, C. F. M. et al. Oxidative dehydration of glycerol to acrylic acid over vanadium-impregnated zeolite beta. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 24, n. 1, p. 100-105, 2013.
- 36 KATRYNIOK, B. et al. Glycerol dehydration to acrolein in the context of new uses of glycerol. **Green Chemistry**, v. 12, n. 12, p. 2079-2098, 2010.
- 37 BELTRÁN-PRIETO, J. C.; KOLOMAZNÍK, K.; PECHA, J. A Review of Catalytic Systems for Glycerol Oxidation: Alternatives for Waste Valorization. **Australian Journal of Chemistry**, v. 66, n. 5, p. 511-521, 2013.
- 38 HE, Z. et al. Selective oxidation of glycerol over supported noble metal catalysts. **Catalysis Today**, 2020.

- 39 KATRYNIOK, B. et al. Selective catalytic oxidation of glycerol: perspectives for high value chemicals. **Green Chemistry**, v. 13, n. 8, p. 1960-1979, 2011.
- 40 CIRIMINNA, R.; PAGLIARO, M. One-Pot Homogeneous and Heterogeneous Oxidation of Glycerol to Ketomalonic Acid Mediated by TEMPO. **Advanced Synthesis & Catalysis**, v. 345, n. 3, p. 383-388, 2003.
- 41 CHANG, P. S. et al. Physicochemical Properties of Partially Oxidized Corn Starch from Bromide-Free TEMPO-Mediated Reaction. **Journal of food science**, v. 73, n. 3, p. C173-C178, 2008.
- 42 BRAGD, P. L.; BESEMER, A. C.; VAN BEKKUM, H. Bromide-free TEMPO-mediated oxidation of primary alcohol groups in starch and methyl α -d-glucopyranoside. **Carbohydrate Research**, v. 328, n. 3, p. 355-363, 9/22/ 2000.
- 43 TALEBIAN-KIAKALAIIEH, A. et al. Oxidation of bio-renewable glycerol to value-added chemicals through catalytic and electro-chemical processes. **Applied Energy**, v. 230, p. 1347-1379, 2018.
- 44 GÄTGENS, C. et al. Biotransformation of glycerol to dihydroxyacetone by recombinant *Gluconobacter oxydans* DSM 2343. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 76, n. 3, p. 553-559, 2007.
- 45 ZHENG, M.; ZHANG, S. Immobilization of glycerol dehydrogenase on magnetic silica nanoparticles for conversion of glycerol to value-added 1, 3-dihydroxyacetone. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 29, n. 6, p. 278-287, 2011.
- 46 THURSTON, C. F. The structure and function of fungal laccases. **Microbiology**, v. 140, n. 1, p. 19-26, 1994.
- 47 MADHAVI, V.; LELE, S. S. Laccase: properties and applications. **BioResources**, v. 4, n. 4, p. 1694-1717, 2009.
- 48 CRESTINI, C.; JURASEK, L.; ARGYROPOULOS, D. S. On the mechanism of the laccase–mediator system in the oxidation of lignin. **Chemistry-A European Journal**, v. 9, n. 21, p. 5371-5378, 2003.
- 49 DESAI, S. S.; NITYANAND, C. Microbial laccases and their applications: a review. **Asian J Biotechnol**, v. 3, n. 2, p. 98-124, 2011.
- 50 JONES, S. M.; SOLOMON, E. I. Electron transfer and reaction mechanism of laccases. **Cellular and molecular life sciences**, v. 72, n. 5, p. 869-883, 2015.
- 51 XU, F. et al. Targeted mutations in a *Trametes villosa* laccase axial perturbations of the T1 copper. **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 18, p. 12372-12375, 1999.
- 52 XU, F. et al. Site-directed mutations in fungal laccase: effect on redox potential, activity and pH profile. **Biochemical Journal**, v. 334, n. 1, p. 63-70, 1998.

- 53 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**, v. 1292, n. 2, p. 303-311, 1996.
- 54 BRANDER, S.; MIKKELSEN, J. D.; KEPP, K. P. TtMCO: A highly thermostable laccase-like multicopper oxidase from the thermophilic *Thermobaculum terrenum*. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 112, p. 59-65, 2015.
- 55 SOSNA, M. et al. Monolayer anthracene and anthraquinone modified electrodes as platforms for *Trametes hirsuta* laccase immobilisation. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 12, n. 34, p. 10018-10026, 2010.
- 56 MATE, D. M.; ALCALDE, M. Laccase engineering: from rational design to directed evolution. **Biotechnology advances**, v. 33, n. 1, p. 25-40, 2015.
- 57 FABBRINI, M. et al. An oxidation of alcohols by oxygen with the enzyme laccase and mediation by TEMPO. **Tetrahedron Letters**, v. 42, n. 43, p. 7551-7553, 2001.
- 58 FABBRINI, M.; GALLI, C.; GENTILI, P. Comparing the catalytic efficiency of some mediators of laccase. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 16, n. 5, p. 231-240, 2002.
- 59 GREEN, R. A. et al. A voltammetric study of the 2, 2, 6, 6-tetramethylpiperidin-1-oxyl (TEMPO) mediated oxidation of benzyl alcohol in tert-butanol/water. **Electrochimica Acta**, v. 113, p. 550-556, 2013
- 60 ESHTAYA, M. et al. Developing energy efficient lignin biomass processing—towards understanding mediator behaviour in ionic liquids. **Faraday discussions**, v. 190, p. 127-145, 2016.
- 61 SINGH, R. et al. Microbial enzymes: industrial progress in 21st century. **3 Biotech**, v. 6, n. 2, p. 174, 2016.
- 62 FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ, M.; SANROMÁN, M. Á.; MOLDES, D. Recent developments and applications of immobilized laccase. **Biotechnology Advances**, v. 31, n. 8, p. 1808-1825, 12// 2013.
- 63 SHELDON, R. A. Enzyme immobilization: the quest for optimum performance. **Advanced Synthesis & Catalysis**, v. 349, n. 8-9, p. 1289-1307, 2007.
- 64 LIU, D.-M.; CHEN, J.; SHI, Y.-P. Advances on methods and easy separated support materials for enzymes immobilization. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 102, p. 332-342, 2018.
- 65 FERNÁNDEZ-PACHÓN, M. S. et al. Determination of the phenolic composition of sherry and table white wines by liquid chromatography and their relation with antioxidant activity. **Analytica Chimica Acta**, v. 563, n. 1-2, p. 101-108, 3/23/ 2006.

- 66 MACARIO, A. et al. Study of lipase immobilization on zeolitic support and transesterification reaction in a solvent free-system. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 25, n. 2-4, p. 328-335, 2007.
- 67 KUDANGA, T. et al. Potential applications of laccase-mediated coupling and grafting reactions: a review. **Enzyme and microbial technology**, v. 48, n. 3, p. 195-208, 2011.
- 68 HUBLIK, G.; SCHINNER, F. Characterization and immobilization of the laccase from *Pleurotus ostreatus* and its use for the continuous elimination of phenolic pollutants. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 27, n. 3, p. 330-336, 2000.
- 69 JOLIVALT, C. et al. Immobilization of laccase from *Trametes versicolor* on a modified PVDF microfiltration membrane: characterization of the grafted support and application in removing a phenylurea pesticide in wastewater. **Journal of Membrane Science**, v. 180, n. 1, p. 103-113, 2000.
- 70 SILVA, C. et al. Laccase immobilization on enzymatically functionalized polyamide 6, 6 fibres. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 41, n. 6, p. 867-875, 2007.
- 71 GEORGIEVA, S. et al. Advantages in using non-isothermal bioreactors in bioremediation of water polluted by phenol by means of immobilized laccase from *Rhus vernicifera*. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 55, n. 3, p. 177-184, 2008.
- 72 REKUĆ, A. et al. Very stable silica-gel-bound laccase biocatalysts for the selective oxidation in continuous systems. **Bioresource technology**, v. 101, n. 7, p. 2076-2083, 2010.
- 73 BAUTISTA, L. F.; MORALES, G.; SANZ, R. Immobilization strategies for laccase from *Trametes versicolor* on mesostructured silica materials and the application to the degradation of naphthalene. **Bioresource technology**, v. 101, n. 22, p. 8541-8548, 2010.
- 74 WANG, F. et al. Magnetic mesoporous silica nanoparticles: fabrication and their laccase immobilization performance. **Bioresource technology**, v. 101, n. 23, p. 8931-8935, 2010.
- 75 REKUĆ, A. et al. Laccase immobilization on mesostructured cellular foams affords preparations with ultra high activity. **Process Biochemistry**, v. 44, n. 2, p. 191-198, 2009.
- 76 SALIS, A. et al. Laccase from *Pleurotus sajor-caju* on functionalised SBA-15 mesoporous silica: Immobilisation and use for the oxidation of phenolic compounds. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 58, n. 1, p. 175-180, 2009.
- 77 TAGHIZADEH, T. et al. Biodegradation of bisphenol A by the immobilized laccase on some synthesized and modified forms of zeolite Y. **Journal of Hazardous Materials**, v. 386, p. 121950, 2020.

- 78 CELIKBICAK, O. et al. Immobilization of laccase on hairy polymer grafted zeolite particles: Degradation of a model dye and product analysis with MALDI–ToF-MS. **Microporous and mesoporous materials**, v. 199, p. 57-65, 2014.
- 79 WEHAIDY, H. R. et al. Nanoporous Zeolite-X as a new carrier for laccase immobilization and its application in dyes decolorization. **Biocatalysis and agricultural biotechnology**, v. 19, p. 101135, 2019.
- 80 NASERI, M. et al. Lipase and Laccase Encapsulated on Zeolite Imidazolate Framework: Enzyme Activity and Stability from Voltammetric Measurements. **ChemCatChem**, v. 10, n. 23, p. 5425-5433, 2018.
- 81 BRECK, D. W. Zeolite molecular sieves: structure. **Chemistry and Use, Wiley, New York**, v. 636, 1974.
- 82 BRECK, D. W. **Zeolite molecular sieves**. Krieger, 1984. ISBN 0898746485.
- 83 BEKKUM, H. V.; JANSEN, J. C.; FLANIGEN, E. M. Introduction to zeolite science and practice. 1991.
- 84 MEIER, W. M. Zeolite structures. **Molecular sieves**, p. 10-27, 1968.
- 85 BAERLOCHER, C.; MCCUSKER, L. B.; OLSON, D. H. **Atlas of zeolite framework types**. Elsevier, 2007.
- 86 GHOBARKAR, H.; SCHÄF, O.; GUTH, U. Zeolites—from kitchen to space. **Progress in Solid State Chemistry**, v. 27, n. 2–4, p. 29-73, // 1999.
- 87 WEITKAMP, J. Zeolites and catalysis. **Solid State Ionics**, v. 131, n. 1–2, p. 175-188, 6/1/ 2000.
- 88 ZHAN, B. Z. et al. Control of particle size and surface properties of crystals of NaX zeolite. **Chemistry of Materials**, v. 14, n. 9, p. 3636-3642, Sep 2002.
- 89 VALTCHEV, V. P.; FAUST, A.-C.; LÉZERVANT, J. Rapid synthesis of silicalite-1 nanocrystals by conventional heating. **Microporous and mesoporous materials**, v. 68, n. 1, p. 91-95, 2004.
- 90 PÉREZ-RAMÍREZ, J. et al. Hierarchical zeolites: enhanced utilisation of microporous crystals in catalysis by advances in materials design. **Chemical Society Reviews**, v. 37, n. 11, p. 2530-2542, 2008.
- 91 CUNDY, C. S.; COX, P. A. The hydrothermal synthesis of zeolites: History and development from the earliest days to the present time. **Chemical Reviews**, v. 103, n. 3, p. 663-701, Mar 2003.
- 92 MAHMOODI, N. M.; SAFFAR-DASTGERDI, M. H.; HAYATI, B. Environmentally friendly novel covalently immobilized enzyme bionanocomposite: From synthesis to the destruction of pollutant. **Composites Part B: Engineering**, v. 184, p. 107666, 2020.

- 93 ZHAN, B. Z. et al. A novel, organic-additive-free synthesis of nanometer-sized NaX crystals. **Chemical Communications**, n. 13, p. 1176-1177, 2001 2001.
- 94 CUNDY, C. S.; FORREST, J. O. Some observations on the preparation and properties of colloidal silicalites Part II: Preparation, characterisation and properties of colloidal silicalite-1, TS-1, silicalite-2 and TS-2. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 72, n. 1-3, p. 67-80, Jul 8 2004.
- 95 CUNDY, C. S.; FORREST, J. O.; PLAISTED, R. J. Some observations on the preparation and properties of colloidal silicalites. Part 1: synthesis of colloidal silicalite-1 and titanosilicalite-1 (TS-1). **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 66, n. 2-3, p. 143-156, Dec 5 2003.
- 96 BIEMMI, E.; BEIN, T. Assembly of Nanozeolite Monolayers on the Gold Substrates of Piezoelectric Sensors. **Langmuir**, v. 24, n. 19, p. 11196-11202, 2008/10/07 2008.
- 97 JAFARI, M. et al. Investigations on hydrothermal synthesis parameters in preparation of nanoparticles of LTA zeolite with the aid of TMAOH. **Powder technology**, v. 237, p. 442-449, 2013.
- 98 LARLUS, O. et al. A powerful structure-directing agent for the synthesis of nanosized Al- and high-silica zeolite Beta in alkaline medium. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 142, n. 1, p. 17-25, Jun 2011.
- 99 NERY, J. G.; MASCARENHAS, Y. P.; CHEETHAM, A. K. A study of the highly crystalline, low-silica, fully hydrated zeolite P ion exchanged with (Mn²⁺, Cd²⁺, Pb²⁺, Sr²⁺, Ba²⁺) cations. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 57, n. 3, p. 229-248, Feb 4 2003.
- 100 MIGNEAULT, I. et al. Glutaraldehyde: behavior in aqueous solution, reaction with proteins, and application to enzyme crosslinking. **Biotechniques**, v. 37, n. 5, p. 790-802, 2004.
- 101 DAVID, A. E. et al. Chemically surface modified gel (CSMG): An excellent enzyme-immobilization matrix for industrial processes. **Journal of Biotechnology**, v. 125, n. 3, p. 395-407, Sep 18 2006.
- 102 CARDOSO, C. L.; MORAES, M. C. D.; CASS, Q. B. Imobilização de enzimas em suportes cromatográficos: uma ferramenta na busca por substâncias bioativas. **Química Nova**, v. 32, n. 1, p. 175-187, 2009.
- 103 BRADFORD, M. M. Rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976 1976.
- 104 YAGIZ, F.; KAZAN, D.; AKIN, A. N. Biodiesel production from waste oils by using lipase immobilized on hydrotalcite and zeolites. **Chemical Engineering Journal**, v. 134, n. 1-3, p. 262-267, Nov 2007.

- 105 NIKU-PAAVOLA, M. L.; RAASKA, L.; ITÄVAARA, M. Detection of white-rot fungi by a non-toxic stain. **Mycological Research**, v. 94, n. 1, p. 27-31, 1990.
- 106 UMAMAHESWARI, V. et al. Electron Paramagnetic Resonance Spectroscopic Study of Ascorbate Oxidase Immobilized on Mesoporous Silica Materials. **Advanced Porous Materials**, v. 5, n. 2, p. 113-121, 2017.
- 107 VAN GRIEKEN, R. et al. Anomalous crystallization mechanism in the synthesis of nanocrystalline ZSM-5. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 39, n. 1, p. 135-147, 2000.
- 108 MAJANO, G. et al. Zeolite Beta nanosized assemblies. **Microporous and mesoporous materials**, v. 80, n. 1, p. 227-235, 2005.
- 109 SHIRAZI, L.; JAMSHIDI, E.; GHASEMI, M. R. The effect of Si/Al ratio of ZSM-5 zeolite on its morphology, acidity and crystal size. **Crystal Research and Technology**, v. 43, n. 12, p. 1300-1306, 2008.
- 110 ANGELL, C. L.; SCHAFFER, P. C. Infrared Spectroscopic Investigations of Zeolites and Adsorbed Molecules. I. Structural OH Groups¹. **The Journal of Physical Chemistry**, v. 69, n. 10, p. 3463-3470, 1965.
- 111 KANTAM, M. L. et al. Synthesis of nanocrystalline zeolite beta in supercritical fluids, characterization and catalytic activity. **Journal of Molecular Catalysis A: Chemical**, v. 252, n. 1-2, p. 76-84, 6/1/ 2006.
- 112 HU, L. et al. Phase selection controlled by sodium ions in the synthesis of FAU/LTA composite zeolite. **Science and technology of advanced materials**, v. 10, n. 1, p. 015001, 2009.
- 113 ALFARO, S. et al. Aging time effect on the synthesis of small crystal LTA zeolites in the absence of organic template. **Materials Letters**, v. 61, n. 23, p. 4655-4658, 2007.
- 114 PIRUTKO, L. V. et al. Preparation and catalytic study of metal modified TS-1 in the oxidation of benzene to phenol by N₂O. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 48, n. 1-3, p. 345-353, Nov 1 2001.
- 115 FLANIGEN, E. M.; KHATAMI, H.; SZYMANSKI, H. A. Infrared structural studies of zeolite frameworks. In: (Ed.): ACS Publications, 1971.
- 116 AZIZI, S. N.; DEHNAVI, A. R.; JOORABDOOZHA, A. Synthesis and characterization of LTA nanozeolite using barley husk silica: Mercury removal from standard and real solutions. **Materials Research Bulletin**, v. 48, n. 5, p. 1753-1759, 5// 2013.
- 117 THUADAIJ, P.; NUNTIYA, A. Effect of the SiO₂/Al₂O₃ ratio on the synthesis of Na-x zeolite from Mae Moh fly ash. **Scienceasia**, v. 38, n. 3, p. 295-300, Sep 2012.

- 118 VALTCHEV, V. P.; BOZHILOV, K. N. Transmission electron microscopy study of the formation of FAU-type zeolite at room temperature. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 108, n. 40, p. 15587-15598, 2004.
- 119 AZIZI, S. N.; GHASEMI, S.; KAVIAN, S. Synthesis and characterization of NaX nanozeolite using stem sweep as silica source and application of Ag-modified nanozeolite in electrocatalytic reduction of H₂O₂. **Biosensors & Bioelectronics**, v. 62, p. 1-7, Dec 15 2014.
- 120 THANGARAJ, A. et al. Catalytic properties of crystalline titanium silicalites I. Synthesis and characterization of titanium-rich zeolites with MFI structure. **Journal of Catalysis**, v. 130, n. 1, p. 1-8, 1991.
- 121 BALDRIAN, P.; GABRIEL, J. Copper and cadmium increase laccase activity in *Pleurotus ostreatus*. **FEMS Microbiology letters**, v. 206, n. 1, p. 69-74, 2002.
- 122 MURUGESAN, K. et al. Effect of metal ions on reactive dye decolorization by laccase from *Ganoderma lucidum*. **Journal of hazardous materials**, v. 168, n. 1, p. 523-529, 2009.
- 123 MUKHOPADHYAY, A.; DASGUPTA, A. K.; CHAKRABARTI, K. Thermostability, pH stability and dye degrading activity of a bacterial laccase are enhanced in the presence of Cu₂O nanoparticles. **Bioresource technology**, v. 127, p. 25-36, 2013.
- 124 SI, J.; PENG, F.; CUI, B. Purification, biochemical characterization and dye decolorization capacity of an alkali-resistant and metal-tolerant laccase from *Trametes pubescens*. **Bioresource technology**, v. 128, p. 49-57, 2013.
- 125 SHERRY, H. S. The ion-exchange properties of zeolites. I. Univalent ion exchange in synthetic faujasite. **The Journal of Physical Chemistry**, v. 70, n. 4, p. 1158-1168, 1966.
- 126 YANG, S. et al. Competition of FAU and LTA in the synthesis system (TMA, Na)₂O–Al₂O₃–SiO₂–H₂O. **Microporous and mesoporous materials**, v. 87, n. 3, p. 261-267, 2006.
- 127 VERBOEKEND, D. et al. Hierarchical FAU-and LTA-Type Zeolites by Post-Synthetic Design: A New Generation of Highly Efficient Base Catalysts. **Advanced Functional Materials**, v. 23, n. 15, p. 1923-1934, 2013.
- 128 BRANDENBURG, K.; PUTZ, H. Match: Phase identification from powder diffraction. **User Manual, version**, v. 1, p. 2003-2009, 2003.
- 129 IMPACT, C. **Match! Phase Identification from Powder Diffraction** 2014.
- 130 ZITTLAU, A. H. et al. Thermodynamics of the basic copper sulfates antlerite, posnjakite, and brochantite. **Chemie der Erde-Geochemistry**, v. 73, n. 1, p. 39-50, 2013.

- 131 SEGAL, E.; PERELSHTEIN, I.; GEDANKEN, A. A novel sonochemical synthesis of antlerite nanorods. **Ultrasonics sonochemistry**, v. 22, p. 30-34, 2015.
- 132 BHAWE, Y. I: Materials for thermochemical water splitting. II: Structure-property relations for the zeolite catalyzed conversion of methanol to light olefins. 2013.
- 133 LONG, N. Q. et al. Preparation, characterization and h₂s adsorptive removal of ion-exchanged zeolite x. **Asean Engineering Journal Part B**, Vol 5, No 1, 2016.
- 134 PANDYA, P. H. et al. Studies on the activity and stability of immobilized α -amylase in ordered mesoporous silicas. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 77, n. 1, p. 67-77, 1/3/ 2005.
- 135 SELVASEKARAPANDIAN, S. et al. Laser Raman and FTIR studies on Li⁺ interaction in PVAc-LiClO₄ polymer electrolytes. **Spectrochimica Acta Part a-Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 65, n. 5, p. 1234-1240, Dec 2006.
- 136 ZHOU, C. et al. Facile synthesis of zeolite FAU molecular sieve membranes on bio-adhesive polydopamine modified Al₂O₃ tubes. **Journal of Membrane Science**, v. 494, p. 174-181, 2015.
- 137 SU, F. et al. Adsorption of CO₂ on amine-functionalized Y-type zeolites. **Energy & Fuels**, v. 24, n. 2, p. 1441-1448, 2010.
- 138 LIU, L. et al. Fermentation optimization and characterization of the laccase from *Pleurotus ostreatus* strain 10969. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 44, n. 6, p. 426-433, 2009.
- 139 ZHILIN, L. et al. Immobilization of Agaricus Bisporus Laccase on Ceramic-Chitosan Composite Support and Their Properties: Potential for Oily Wastewater Treatment. **CHINA PETROLEUM PROCESSING & PETROCHEMICAL TECHNOLOGY**, v. 18, n. 4, p. 51-60, 2016.
- 140 TONIN, F. et al. Comparison of different microbial laccases as tools for industrial uses. **New biotechnology**, v. 33, n. 3, p. 387-398, 2016.
- 141 LLORET, L. et al. Immobilisation of laccase on Eupergit supports and its application for the removal of endocrine disrupting chemicals in a packed-bed reactor. **Biodegradation**, v. 23, n. 3, p. 373-386, 2012.
- 142 LLORET, L. et al. Immobilization of laccase by encapsulation in a sol-gel matrix and its characterization and use for the removal of estrogens. **Biotechnology progress**, v. 27, n. 6, p. 1570-1579, 2011.
- 143 MATEO, C. et al. Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, n. 6, p. 1451-1463, 5/2/ 2007.

- 144 FORTES, C. C. S. et al. Optimization of enzyme immobilization on functionalized magnetic nanoparticles for laccase biocatalytic reactions. **Chemical Engineering and Processing: Process Intensification**, v. 117, p. 1-8, 2017.
- 145 ANWAR, M. Z. et al. SnO₂ hollow nanotubes: a novel and efficient support matrix for enzyme immobilization. **Scientific reports**, v. 7, n. 1, p. 15333, 2017.
- 146 BELTRÁN-PRIETO, J. C. et al. Development of an HPLC method for the determination of glycerol oxidation products. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 36, n. 19, p. 2758-2773, 2013.
- 147 BROGIONI, B. et al. Characterization of radical intermediates in laccase-mediator systems. A multifrequency EPR, ENDOR and DFT/PCM investigation. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 10, n. 48, p. 7284-7292, 2008.
- 148 CIRIMINNA, R. et al. One-pot electrocatalytic oxidation of glycerol to DHA. **Tetrahedron Letters**, v. 47, n. 39, p. 6993-6995, 9/25/ 2006.
- 149 SHLEEV, S. et al. Direct electron transfer reactions of laccases from different origins on carbon electrodes. **Bioelectrochemistry**, v. 67, n. 1, p. 115-124, 2005.
- 150 KUNAMNENI, A. et al. Laccases and their applications: a patent review. **Recent patents on biotechnology**, v. 2, n. 1, p. 10-24, 2008.
- 151 FRASCONI, M. et al. Electrochemical evaluation of electron transfer kinetics of high and low redox potential laccases on gold electrode surface. **Electrochimica acta**, v. 56, n. 2, p. 817-827, 2010.
- 152 SALIH, F. E. et al. Electrochemical sensor based on low silica X zeolite modified carbon paste for carbaryl determination. **Journal of advanced research**, v. 8, n. 6, p. 669-676, 2017.
- 153 MAICANEANU, A. et al. Physical-chemical and electrochemical characterization of Fe-exchanged natural zeolite applied for obtaining of hydrogen peroxide amperometric sensors. **Chemie der Erde-Geochemistry**, v. 74, n. 4, p. 653-660, 2014.
- 154 ZHANG, R. et al. Zeolite-encapsulated M (Co, Fe, Mn)(SALEN) complexes modified glassy carbon electrodes and their application in oxygen reduction. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 643, n. 1-2, p. 31-38, 2010.
- 155 HE, P. et al. Zeolite A functionalized with copper nanoparticles and graphene oxide for simultaneous electrochemical determination of dopamine and ascorbic acid. **Analytica chimica acta**, v. 739, p. 25-30, 2012.
- 156 CARVALHO, R. et al. Electro-oxidation of phenol on a new type of zeolite/graphite biocomposite electrode with horseradish peroxidase. **Journal of Molecular Catalysis A: Chemical**, v. 278, n. 1-2, p. 47-52, 2007.

- 157 DONG, J. et al. Reagentless amperometric glucose biosensor based on the immobilization of glucose oxidase on a ferrocene@ NaY zeolite composite. **Microchimica Acta**, v. 174, n. 3-4, p. 281-288, 2011.
- 158 ZHOU, X. et al. Nanozeolite-assembled interface towards sensitive biosensing. **Electrochemistry communications**, v. 9, n. 7, p. 1525-1529, 2007.
- 159 KIRDECILER, S. K. et al. A novel urea conductometric biosensor based on zeolite immobilized urease. **Talanta**, v. 85, n. 3, p. 1435-1441, 2011.
- 160 NOROOZIFAR, M. et al. Simultaneous and sensitive determination of a quaternary mixture of AA, DA, UA and Trp using a modified GCE by iron ion-doped natrolite zeolite-multiwall carbon nanotube. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 28, n. 1, p. 56-63, 2011.
- 161 YU, T. et al. Controlled Nanozeolite-Assembled Electrode: Remarkable Enzyme-Immobilization Ability and High Sensitivity as Biosensor. **Chemistry–A European Journal**, v. 12, n. 4, p. 1137-1143, 2006.
- 162 LIU, E.; ZHANG, X. Electrochemical sensor for endocrine disruptor bisphenol A based on a glassy carbon electrode modified with silica and nanocomposite prepared from reduced graphene oxide and gold nanoparticles. **Analytical Methods**, v. 6, n. 21, p. 8604-8612, 2014.
- 163 LI, K.; XU, F.; ERIKSSON, K.-E. L. Comparison of fungal laccases and redox mediators in oxidation of a nonphenolic lignin model compound. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 65, n. 6, p. 2654-2660, 1999.
- 164 ZHILINSKAYA, E. A. et al. EPR investigation of Fe-exchanged beta-zeolites. **Langmuir**, v. 19, n. 9, p. 3596-3602, 2003.
- 165 DZWIGAJ, S. et al. Effect of iron impurities on the catalytic activity of BEA, MOR and MFI zeolites in the SCR of NO by ethanol. **Applied Catalysis B: Environmental**, v. 86, n. 1-2, p. 45-52, 2009.
- 166 POGNI, R. et al. Spectroscopic and computational characterization of laccases and their substrate radical intermediates. **Cellular and molecular life sciences**, v. 72, n. 5, p. 885-896, 2015.
- 167 RIBEIRO, L. F. et al. Engineering bifunctional laccase-xylanase chimeras for improved catalytic performance. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 50, p. 43026-43038, 2011.
- 168 GUPTA, A. et al. Involvement of Tyr108 in the enzyme mechanism of the small laccase from *Streptomyces coelicolor*. **Journal of the American Chemical Society**, v. 134, n. 44, p. 18213-18216, 2012.

- 169 MOT, A. C. et al. “Yellow” laccase from *Sclerotinia sclerotiorum* is a blue laccase that enhances its substrate affinity by forming a reversible tyrosyl-product adduct. **PloS one**, v. 15, n. 1, p. e0225530, 2020.
- 170 SILVA, D. S. A. et al. Tuning the Brønsted and Lewis acid nature in HZSM-5 zeolites by the generation of intracrystalline mesoporosity—Catalytic behavior for the acylation of anisole. **Molecular Catalysis**, v. 492, p. 111026, 2020.
- 171 LI, S. et al. Brønsted/Lewis acid synergy in dealuminated HY zeolite: a combined solid-state NMR and theoretical calculation study. **Journal of the American Chemical Society**, v. 129, n. 36, p. 11161-11171, 2007.
- 172 BONOMO, R.; CASTRONOVO, B.; SANTORO, A. A spectroscopic investigation of the interaction between nitrogen monoxide and copper sites of the fungal laccase from *Rigidoporus lignosus*. **Dalton Transactions**, n. 1, p. 104-112, 2004.
- 173 BERTRAND, P. **Electron Paramagnetic Resonance Spectroscopy: Applications**. Springer Nature, 2020.
- 174 BENNETT, B.; KOWALSKI, J. M. EPR methods for biological Cu (II): L-band CW and NARS. In: (Ed.). **Methods in enzymology**: Elsevier, v.563, 2015. p.341-361.
- 175 LI, H. et al. Determinants of the relative reduction potentials of type-1 copper sites in proteins. **Journal of the American Chemical Society**, v. 126, n. 25, p. 8010-8019, 2004.
- 176 ERNST, H. A. et al. A comparative structural analysis of the surface properties of asco-laccases. **PloS one**, v. 13, n. 11, p. e0206589, 2018.
- 177 PEISACH, J.; BLUMBERG, W. E. Structural implications derived from the analysis of electron paramagnetic resonance spectra of natural and artificial copper proteins. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 165, n. 2, p. 691-708, 1974.
- 178 ZUMARRAGA, M. et al. Combinatorial Saturation Mutagenesis of the *Myceliophthora thermophila* Laccase T2 Mutant: the Connection between the C-Terminal Plug and the Conserved. **Combinatorial chemistry & high throughput screening**, v. 11, n. 10, p. 807-816, 2008.
- 179 PALMER, A. E. et al. Spectroscopic characterization of the Leu513His variant of fungal laccase: effect of increased axial ligand interaction on the geometric and electronic structure of the type 1 Cu site. **Inorganic chemistry**, v. 42, n. 13, p. 4006-4017, 2003.
- 180 SHLEEV, S. V. et al. Comparison of physico-chemical characteristics of four laccases from different basidiomycetes. **Biochimie**, v. 86, n. 9-10, p. 693-703, 2004.
- 181 SHLEEV, S. et al. Electrochemical redox transformations of T1 and T2 copper sites in native *Trametes hirsuta* laccase at gold electrode. **Biochemical Journal**, v. 385, n. 3, p. 745-754, 2005.

- ¹⁸² LI, X. et al. An electrochemical method for investigation of conformational flexibility of active sites of *trametes versicolor* laccase based on sensitive determination of copper ion with cysteine-modified electrodes. **Analytical chemistry**, v. 84, n. 21, p. 9416-9421, 2012.
- ¹⁸³ REINHAMMAR, B. R. M. Oxidation-reduction potentials of the electron acceptors in laccases and stellacyanin. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics**, v. 275, n. 2, p. 245-259, 1972.