

IMOBILIZAÇÃO DE LACASE DE *Aspergillus Sp.* EM NANOFOLHAS DE GRAFENO E SUA APLICAÇÃO NA BIOCONVERSÃO DE FENOL

F. BROILO¹, C. ELY¹, M. G. GHISLANDI² e E. SKORONSKI¹

¹ Universidade Estadual de Santa Catarina, Departamento de Engenharia Ambiental

² Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste (CETENE), LMNANO

E-mail para contato: skoronski@cav.udesc.br

RESUMO –Enzimas lacase de *Aspergillus* foram imobilizadas em nanofolhas de grafeno, através de adsorção física. Experimentalmente foram preparadas soluções de enzima em diferentes condições de pH (2,0 a 9,0) e em seguida foram adicionadas quantidades diferentes de grafeno (200 - 1000 mg/L). A capacidade de adsorção foi determinada após incubação por 5 horas, analisando-se a atividade enzimática antes e após o contato da solução de enzima com grafeno. Para medição de atividade foi utilizado como substrato padrão a siringaldazina. Foram realizados ainda testes de remoção de fenol com o biocatalisador obtido e também avaliada a estabilidade operacional da enzima frente a vários ciclos reacionais. Os resultados apontam que as melhores condições de reação envolveram um tempo de contato de 120 minutos, pH 5,5 e temperatura de 30 °C. Após 4 ciclos reacionais, a enzima conservou 11 % da atividade inicial, demonstrando que a adsorção física não se apresenta como um método de imobilização que garanta a estabilidade da atividade da enzima.

1. INTRODUÇÃO

Efluentes contendo fenóis e aminas aromáticas são resíduos de indústrias, principalmente as de celulose e papel, petroquímica, plástico, tingimento e têxteis. Tais efluentes causam coloração e problemas de toxicidade nos corpos de águas receptoras (Peiton, 1984). Tratamentos biológicos convencionais são muitas vezes insuficientes para a remediação de compostos fenólicos e apresentam baixa eficiência, principalmente quando estes compostos estão em concentrações acima de 100 ppm, conferindo elevada toxicidade aos microrganismos (Chen *et al.*, 1974). A oxidação de fenol catalisada por enzimas oxidativas vem, recentemente, apresentando resultados promissores com relação à remoção do fenol em águas residuais (Duran e Espósito, 2000).

As lacases (EC 1.10.3.2) são enzimas polifenoloxidases (PPO) que catalisam a oxidação de uma variedade de substratos orgânicos e inorgânicos, incluindo mono e polifenóis, aminofenóis, metoxifenóis e aminas aromáticas, com concomitante redução de oxigênio para água. Essas enzimas vêm sendo estudadas para várias aplicações biotecnológicas, tais como: biodegradação de xenobióticos e efluentes industriais, descoloração de corantes, biorremediação de solos contaminados,

produção de etanol, clarificação de vinhos e chás e produção de biossensores (Whiteley e Lee, 2006).

A aplicação de enzimas em processos industriais torna-se mais atrativa quando o catalisador pode ser imobilizado em um suporte inerte ao meio reacional, possibilitando sua fácil separação após a reação. Além desse fator, a imobilização enzimática confere maior estabilidade ao catalisador, permitindo que ela possa ser reutilizada em vários ciclos experimentais. Os desafios nesta área têm sido então focados na exploração de novos suportes, com estruturas e composições adequadas (incluindo morfologia e funcionalidade da superfície) que possam melhorar a eficiência catalítica da enzima imobilizada (Bornscheuer, 2003). Recentemente, juntamente com o desenvolvimento de materiais nanoestruturados, que possuem uma maior área superficial, uma série de nanomateriais com diferentes tamanhos e formas tem sido utilizada como substrato para a imobilização de enzimas (Kin *et al.*, 2006).

O grafeno, uma camada densamente povoada por átomos de carbono entrelaçados numa estrutura bi-dimensional, tem atraído grande interesse desde sua descoberta em 2004 (Geim e Novoselov, 2007). Devido às suas propriedades únicas, tais como área superficial e condutividade elétrica extremamente elevadas, e altíssima resistência mecânica, o grafeno tem sido amplamente aplicado na síntese de nanocompósitos; na fabricação de sensores químicos e biossensores; na construção de dispositivos de armazenamento de energia, como células de combustível; em baterias recarregáveis e ultracapacitores (Meyer *et al.*, 2007). De forma geral, os estudos relacionados à aplicação de nanomateriais como suporte enzimático ainda são restritos e portanto existe um grande campo de pesquisa para a busca das aplicações dos materiais aqui citados na área enzimática.

Desta forma, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a capacidade de imobilização de enzimas lacases de *Aspergillus sp.* em nanofolhas de grafeno e a estabilidade operacional do biocatalisador obtido quando submetido à oxidação de fenol.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Grafeno

As nanofolhas de grafeno utilizadas (xGnP[®], Grade M - 25 μ m) são comercializadas pela XG Sciences (EUA). De acordo com a ficha técnica o material é produzido por expansão em microondas à altas temperaturas (Drzal e Fukushima, 2004) e contém menos de 1% de oxigênio retido na forma de grupos funcionais (ácido carboxílico, éter, hidroxila) aderidos à superfície. As nanofolhas apresentam uma espessura média de 6 a 8 nm e diâmetro médio de 25 μ m.

Imagens de microscopia eletrônica de transmissão (MET) das nanofolhas foram feitas utilizando-se um Tecnai 20 (Sphera, Fei Co.). O microscópio foi operado a 200 kV, com um filamento LaB6. Uma grelha revestida de carbono foi utilizada para deposição de amostras. A caracterização de grafeno também foi realizada por microscopia de força atômica (AFM) com um Molecular Imaging PicoPlus, operado em modo intermitente usando-se pontas de silício NSG11 (NT-MDT). Dispersões grafeno/clorofórmio foram depositadas em substratos de mica clivada por pulverização de uma gotícula da dispersão, utilizando-se uma pipeta (~ 10 mL) com uma rajada de ar

comprimido.

Análise de adsorção de nitrogênio (Micromeritics ASAP 2420) foi utilizada para posterior caracterização da área da superfície do grafeno. As amostras foram degaseificadas durante 12 horas a 195 °C em vácuo. A área de superfície foi calculado seguindo-se o método Brunauer-Emmett-Teller (BET).

2.2. Enzima utilizada

Os experimentos foram realizados com lacase de *Aspergillus sp.* comercializada pela Novozymes (Dinamarca) como Denilite™. A enzima é comercializada em sua forma livre.

2.3. Processo de imobilização

O processo de imobilização da enzima na superfície do grafeno foi realizado utilizando solução aquosa da enzima, dissolvida em água deionizada, com concentração fixa de enzima igual a 1 g/L, em erlenmeyers de 250 mL. A escolha da água deionizada como solução para o processo de imobilização está relacionada ao fato de que em ensaios preliminares (pH 2,0 a 9,0) a enzima apresentou maior estabilidade neste meio; em condições ácidas ou básicas a enzima sofre redução irreversível na atividade durante o tempo de contato necessário para imobilização. A esta solução foram adicionadas diferentes quantidades de grafeno (20 a 100 mg) à 100 mL da solução de enzima. O sistema ficou submetido à agitação orbital em um *Shaker*, a 25 °C e 200 rpm de rotação. Com base em ensaios preliminares, o tempo de 5 horas foi suficiente para que o sistema atingisse o equilíbrio. Para determinação da quantidade de enzima imobilizada na superfície do grafeno foi coletada uma amostra no início do processo de imobilização e outra ao final das 5 horas. A amostra final foi submetida à centrifugação à 5000 rpm durante 5 minutos para separação do grafeno do meio aquoso.

A quantidade de enzima foi determinada com base na medida da sua atividade, utilizando siringaldazina como substrato padrão. Este método é baseado na oxidação da siringaldazina gerando sua quinona respectiva (absorção a 525 nm e $\epsilon = 65.000 \text{ l/M}\cdot\text{cm}$). As determinações foram conduzidas em um espectrofotômetro UV-Vis (Spectroquant NOVA 60 Merck). Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para oxidar 1 $\mu\text{mol/L}$ de substrato por minuto.

O carregamento da enzima na superfície do OG foi calculada pela Equação 1.

$$q = \frac{(A-A_0) \cdot V}{W} \quad (1)$$

Onde:

q = carregamento (U/g), A = atividade enzimática (U), V = volume da solução (mL) e W = massa de grafeno (g)

Os valores de carregamento em função da concentração de enzima em equilíbrio foram

submetidos ao ajuste de isothermas de adsorção de Freundlich (Equação 2) e Langmuir (Equação 3). O ajuste da equação com maior valor de coeficiente de determinação (R^2) representou o modelo mais adequado do processo de adsorção.

$$q = K \cdot A^{1/n} \quad (2)$$

$$q = \frac{K_L b A}{1 + K_L A} \quad (3)$$

Onde K e $1/n$ são parâmetros da equação de Freundlich e K_L e b estão relacionados à isoterma de Langmuir, sendo que o primeiro parâmetro representa a capacidade máxima de adsorção.

A condição de saturação do grafeno com a enzima lacase foi utilizada como base para o processo de imobilização para obtenção do biocatalisador que seria utilizado nas próximas etapas do trabalho.

2.4. Avaliação da capacidade de bioconversão de fenol

Para determinação das condições otimizadas de bioconversão de fenol em solução aquosa, foram utilizados como parâmetros os fatores pH, temperatura e tempo de reação. O pH foi ajustado com solução tampão tartarato em diversos valores de pH. As reações foram conduzidas em erlenmeyers de 250 mL, sob agitação orbital em *shaker* a 200 rpm. Foi delineado um planejamento experimental do tipo 2^3 , com adição de triplicata do ponto central e adição de ponto rotacional, totalizando 17 experimentos. Os níveis das variáveis são apresentados na Tabela 2. Como resposta dos experimentos, foi determinada a quantidade de fenol bioconvertida, por quantidade de biocatalisador (-grafeno+ lacase) na unidade do tempo.

A concentração de fenol remanescente no meio foi medida através de análise colorimétrica de fenóis totais empregando 4-aminoantipirina como reagente. Para a medição da concentração de fenol, o -grafeno foi separado da fase aquosa por centrifugação à 5000 rpm por 5 minutos.

2.5. Avaliação da estabilidade operacional do biocatalisador

Com base no melhor resultado obtido na etapa anterior, o biocatalisador foi submetido à vários ciclos reacionais, de forma a avaliar a sua estabilidade operacional. O procedimento de análise de fenol e o tratamento de dados segue a metodologia descrita no item anterior.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Estrutura e morfologia do grafeno

As imagens de MET mostram que as nanofolhas de grafeno estão, em sua grande maioria, empilhadas ou dobradas umas sobre as outras. As dimensões da área lateral (diâmetro médio) das amostras analisadas (~20) variam em torno de 1-2 μm . Estas medidas estão bem abaixo dos 25 μm especificados na ficha técnica. Na Figura 1 é possível ver a morfologia do material. As folhas não se

mostram tão enrugadas, como seria de se esperar devido ao tratamento de explosão térmica durante a fabricação.

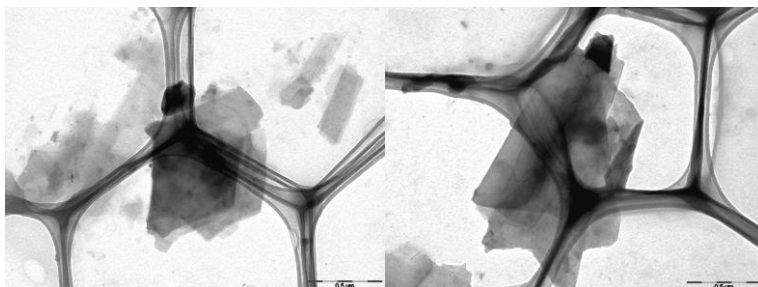


Figura 1. Imagens de MET, mostrando algumas nanofolhas de grafeno empilhadas. As escalas correspondem à 0.5 μm .

Através das análises de AFM foi possível estimar-se a espessura média corresponde ao indicado pelo fornecedor. Muitas amostras apresentaram resíduos externos na superfície ou estavam muito aglomeradas, ou que inviabiliza a sensível análise topográfica por AFM. Todavia, as poucas amostras de nanofolhas exfoliadas que foram encontradas apresentaram uma espessura em torno de 5 nm, conforme indicado na análise de perfil da Figura 2. Foi possível visualizar também que as amostras não apresentavam dimensões laterais superiores a 5 μm^2 , confirmando as informações obtidas por MET.

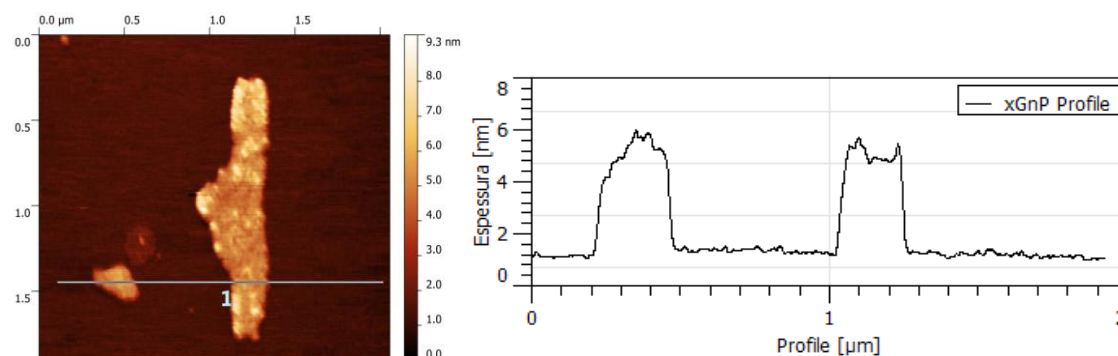


Figura 2. Análise de AFM, mostrando(à esquerda) a imagem topográfica de duas nanofolhas de grafeno isoladas. À direita é possível ver o perfil de espessura apresentado ao longo da linha 1.

De acordo com o estudo de BET, a amostra de grafeno apresentou uma área superficial média de $90.08 \pm 0.36 \text{ m}^2/\text{g}$. Esta média está abaixo do especificado pelo fornecedor (120-150 m^2/g). Uma área superficial elevada é de extrema importância neste contexto, já que possibilita diretamente uma maior superfície de adsorção para as moléculas de enzima.

3.2. Processo de imobilização

A Tabela 1 apresenta os valores obtidos referentes ao contato do grafeno com a solução de lacase em água deionizada.

Tabela 1 – Atividade enzimática inicial e remanescente nas soluções submetidas à imobilização da lacase com grafeno. pH igual a 7,0, temperatura de 25 °C e rotação de 200 rpm.

Massa de -grafeno (mg)	Atividade remanescente Na solução (U)	Carregamento (U/g)	Atividade do biocatalisador (U)
20	0,37	4,9	0,098
40	0,3	4,6	0,184
60	0,2	2,83	0,169
80	0,135	1,9	0,152
100	0,107	1,6	0,160

Com os valores obtidos foram determinadas as duas isotermas de adsorção propostas neste trabalho (Figura 2).

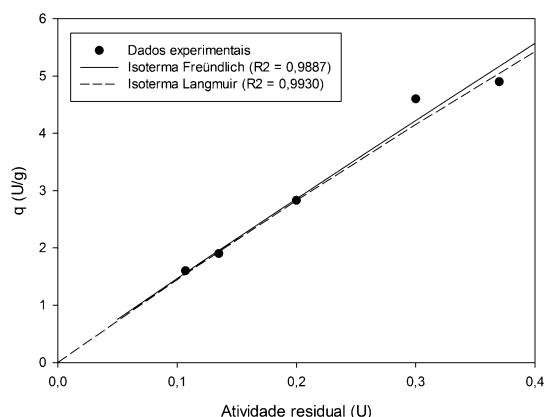


Figura 2 – Isotermas de Langmuir e Freundlich ajustadas aos dados experimentais.

Os resultados apontam que a isoterma de Langmuir apresenta melhor ajuste aos dados experimentais em relação à isoterma de Freundlich. Como a primeira isoterma modela sistemas de adsorção em monocamada, este efeito é esperado uma vez que o elevado peso molar das enzimas desfavorece a adsorção por mecanismo multicamada, proposto pela outra isoterma considerada no estudo. A Tabela 1 ainda mostra que a utilização de 40 mg de -grafeno em 100 mL de solução produz o meio com maior atividade enzimática total, combinando as condições de carregamento e a quantidade de biocatalisador presente no meio.

3.3. Bioconversão de fenol

Para a realização deste experimento, foi considerada a adição de 40 mg de -grafeno em 100 mL de solução de enzima com vistas à sua imobilização. Esta condição foi escolhida uma vez que apresentou a maior atividade enzimática nos testes anteriores. A Tabela 2 apresenta os resultados obtidos com a adição do biocatalisador na bioconversão do fenol.

Tabela 2 – Delineamento experimental utilizado para o estudo da bioconversão de fenol pela lacase

imobilizada em grafeno. Os testes foram realizados com agitação de 200 rpm.

Testes	pH	Tempo (min)	Temperatura (°C)	mg _{fenol} /g (grafeno+lacase)
1	3,11	30	20	96,29
2	3,11	30	40	135,64
3	3,11	30	20	150,92
4	3,11	90	40	168,05
5	4,88	30	20	125
6	4,88	30	40	86,57
7	4,88	90	20	104,62
8	4,88	90	40	107,4
9	2,5	60	30	32,83
10	5,5	60	30	189
11	4	10	30	136,11
12	4	110	30	91,2
13	4	60	13	25
14	4	60	47	68,51
15	4	60	30	120,37
16	4	60	30	113,42
17	4	60	30	114,35

Os resultados foram transformados em superfícies de forma a possibilitar a visualização da influência das variáveis na remoção de fenol por unidade de massa do biocatalisador (Figura 3).

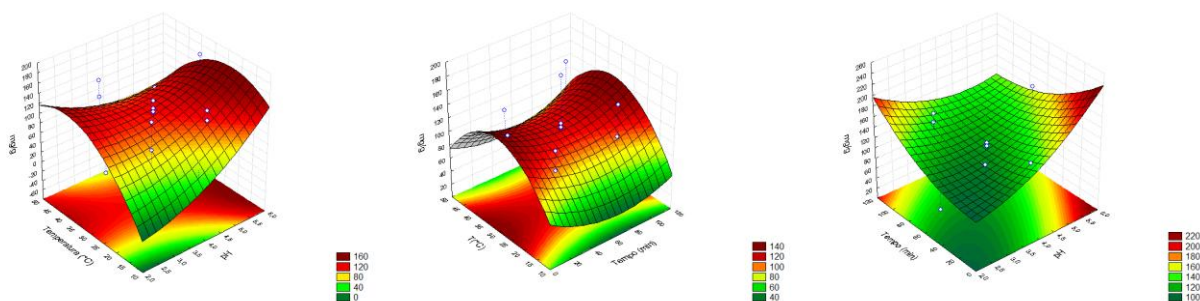


Figura 3 – Superfícies de resposta apresentando a influência das variáveis temperatura e pH, temperatura e tempo e tempo e pH, respectivamente, na remoção de fenol por unidade de massa do biocatalisador.

Os resultados apontam que o pH próximo a 5,5 favorece o desempenho da lacase imobilizada em grafeno. Esta observação está totalmente alinhada com os resultados obtidos por diversos autores com outros suportes e também com a enzima livre que possui atividade ótima na faixa de 4 a 5. (Duran e Espósito, 2000) Esta determinação é fundamental em sistemas de imobilização de enzimas, uma vez que as interações entre -grafeno e lacase modificam a conformação tridimensional da enzima

nativa e a condição de pH ótima para o desempenho do biocatalisador pode ser modificado por este processo.

O tempo apresentou influência na atividade do biocatalisador dentro da faixa estudada, sugerindo que um tempo igual a 120 minutos pode promover uma maior bioconversão de fenol. Além disso, a temperatura ótima situou-se na faixa de 30 °C, corroborando com as observações do desempenho da enzima livre e também com outros suportes sintéticos aplicados nos diversos trabalhos relatados na literatura.(Whiteley, 2006)

3.4. Estabilidade do biocatalisador em diversos ciclos de bioconversão

Os resultados apontam que após 4 ciclos reacionais a atividade do biocatalisador em relação à atividade observada no primeiro ciclo é de apenas 11 %. Este resultado está relacionado ao fato de a imobilização ter sido conduzida por meio de interações físicas(do tipo Van der Waals e interações π - π), portanto a proteína adsorvida na estrutura do -grafeno está sujeita à desorção. Avanços no processo de imobilização devem ser realizados de forma a garantir a estabilidade da enzima no processo de imobilização. Experimentos neste sentido já estão sendo conduzidos a partir desta proposta.

4. CONCLUSÃO

Os resultados apontam que a adsorção física possibilita a imobilização da lacase de *Aspergillus sp.* em óxido de grafeno, condicionado a mesma à bioconversão de fenol em meio aquoso. No entanto, o método empregado não apresenta estabilidade operacional que justifique o procedimento de imobilização, uma vez que após 4 ciclos operacionais a atividade residual do biocatalisador é de 11 %. No entanto, tal estudo é relevante, uma vez que existem poucos ou nenhum trabalho que aborde a imobilização de lacase de *Aspergillus sp.* em óxido de grafeno.

5. REFERÊNCIAS

- BORNSCHEUER, U. T. Immobilizing enzymes: How to create more suitable biocatalysts. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* v. 42, p. 3336-3337, 2003.
- CHEN, H. T.; FREDRICK, E. E.; CORMACK, J. F.; YOUNG, S. R. Biological-Systems for Treating Integrated Paper-Mill Effluent. *Tappi*, v. 57, p. 111-115, 1974
- DURAN, N.; ESPOSITO, E. Potential applications of oxidative enzymes and phenoloxidase-like compounds in wastewater and soil treatment: a review. *Appl. Catal., B.* v. 28, p. 83-99, 2000.
- GEIM, A. K.; NOVOSELOV, K. S. The rise of graphene *Nat. Mater.* v. 6, p. 183-191, 2007.
- KIM, J.; GRATE, J. W.; WANG, P. Nanostructures for enzyme stabilization. *Chem. Eng. Sci.* v. 61, p. 1017-1026, 2006.
- MEYER, J. C.; GEIM, A. K.; KATSNELSON, M. I.; NOVOSELOV, K. S.; BOOTH, T. J.; ROTH, S. 2007 The structure of suspended graphene sheets. *Nature*. v. 446, p. 60-3, 2007.

- DRZAL, L. T.; FUKUSHIMA, H. Expanded Graphite and Products Produced Therefrom. U.S. *patent application* 20040127621, 2004.
- PEYTON, T. O. Biological Disposal of Hazardous-Waste. *Enzyme. Microb. Technol.* v. 6, p. 146-54, 1984.
- WHITELEY, C. G.; LEE, D. J. Enzyme technology and biological remediation. *Enzyme Microb. Technol.* v. 38, p. 291-316, 2006.