

Imobilização Orgânica e Inorgânica de Lacase obtida do fungo *Trametes villosa*

Organic and Inorganic immobilization of Laccase obtained from fungus *Trametes villosa*

RESUMO

A Lacase é uma enzima da classe oxirredutase e o crescimento da utilização dessa enzima em suas diversas fontes de aplicação, deram espaço para novas pesquisas de maneiras que facilitam sua utilização ou reutilização em diversos processos, como o alimentícios, farmacológicos, catalizadores, entre outras utilizações. Dentre seus mais variados tipos, a imobilização, variando sua interação com a enzima, até com as características da matriz de imobilização, podem melhorar seus aspectos de dispersão por amostra, recuperação de atividade enzimática, melhoria de características mecânicas e biológicas, entre diversas aplicações. O trabalho apresenta como objetivos, avaliar a ativação e o rendimento de imobilização de algumas técnicas adaptadas. Imobilizações com matrizes orgânicas e inorgânicas, por diferentes meios de interação, foram realizadas como a deposição em nanopartículas de Óxido de Ferro, formação de nanoflor de Lacase-Cobre, encapsulamento em Alginato de Sódio e aprisionamento em gelatina comercial. A apresentação de melhorias da atividade em relação à percentagem de imobilização encontrada pode ser considerada moderada em situações inorgânicas e alta em interações orgânicas, principalmente no caso do Alginato de Sódio, porém, também se encontraram alguns problemas na manipulação dos substratos inorgânicos, devido sua escala e a quantificação do método se vê dificultada nas duas matrizes devido a adsorção do produto gerado

PALAVRAS-CHAVE: Enzima, Lacase fungica, Avaliação de Rendimento, Avaliação de Ativação.

ABSTRACT

Laccase is an enzyme of oxyreductase class and the increased use of that enzyme in its many application sources, opened ways to new researches that facilitated its use or reuse in many processes, such as foodstuff, pharmacological, catalysts, and others. Among its many variate types, immobilization, varying its interaction with the enzyme, even with the immobilization matrices aspects, may improve its sample dispersion characteristics, recovery of the enzymatic activity, biological and mechanical aspects improvement, between many applications. The paper presents as objectives, evaluates the activation and the yield of the immobilization of some adapted techniques. Organic and Inorganic matrices immobilizations by different ways of interaction were made, such as, deposition in Iron Oxide nanoparticles, formation of Laccase-Copper nanoflower, Sodium Alginate entrapment and Commercial Gelatin imprisonment. It has shown activity improvement in relation to the immobilization percentage found can be considered moderate on inorganic situations and elevate on organic interactions, mainly in the Sodium Alginate case, although, some problems were also faced during the inorganic substracts manipulation, because of its scale and the method quantification is diffculted on both matrices due the adsorption of the generated product.

KEYWORDS: Enzyme, Fungal Laccase, Yield assessment, Activation Evaluation.

Eduardo Fonseca Maia
eduardom@alunos.utfpr.edu.br
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Curitiba, Paraná, Brasil

Charles Windson Isidoro Haminiuk
haminiuk@utfpr.edu.br
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Curitiba, Paraná, Brasil

Recebido: 19 ago. 2019.

Aprovado: 01 out. 2019.

Direito autoral: Este trabalho está licenciado sob os termos da Licença Creative Commons-Atribuição 4.0 Internacional.



INTRODUÇÃO

A Lacase (p-difenol:oxigen *oxireductase*; E.C.1.10.3.2) é uma enzima da classe oxireductase, onde sua estrutura conta com quatro Cu^{2+} distribuídos pela estrutura da enzima, capaz de catalisar reações de oxidação de compostos fenólicos e aromáticos de maneira não específica, onde o substrato é submetido a uma reação de oxidação através da doação de um elétron, convertendo o mesmo a um grupo quinona; juntamente com a redução de oxigênio em água (Durán, Rosa, D'Annibale, & Gianfreda, 2002).

Devido a sua crescente aplicação, os estudos envolvendo a enzima, que é capaz de degradar fármacos, corantes, polimerizar compostos, tratamento de água, biosensores, entre outros, os estudos com a enzima acompanharam tal crescimento, gerando diversas aplicações (Nisha, Karthick, & Gobi, 2012).

Afim de melhoras diversas características da enzima e ampliar sua utilização, a imobilização da enzima se vê necessária. A alteração e fácil reutilização do material enzimático e a adaptação devido as características do material de matriz, podendo modificar a resistência do material enzimático à pH, temperatura, degradações químicas, assim como outros processos físico, químicos e biológicos (Nisha et al., 2012).

Seu funcionamento devido a imobilização se dá pela difusão controlada, onde há uma estabilização de acordo com as ligações e interações que a enzima realiza com a matriz (Nisha et al., 2012). Quando imobilizadas, a fácil deposição e retirada do meio, tais como sua maior disposição no meio, podem aumentar a atividade da enzima sobre o substrato que será analisado (Durán et al., 2002).

Para isto, o estudo de diversos métodos de imobilização, tal como avaliar seu funcionamento e desempenho se vê necessária, onde cada método pode ser organizado através do tipo funcional de sua matriz (orgânica ou inorgânica).

MATERIAIS E MÉTODOS

Na imobilização por gelatina comercial (Nishida et al., 2018), onde adicionou-se meia grama de gelatina comercial em 5 mL de tampão Acetato de Sódio a 50 mM e pH 5,0 sob aquecimento, até completa dissolução. Durante seu resfriamento, adicionou-se 500 μL de extrato enzimático diluído (1:100) e então transferiu-se para uma placa de Petri e foi armazenada em 4 °C durante uma hora. Após o tempo, adicionou-se sob a superfície da matriz de imobilização, 1 mL de Glutaraldeído 1% (w/v) e armazenou-se durante 4h a 4 °C.

Na imobilização por Alginato de Sódio (Chand, 2019; Olajuyigbe, Adetuyi, & Fatokun, 2019; Zhang, Wu, Chen, & Wang, 2018), preparou-se uma solução de Cloreto de Cálcio 0,2 M e uma solução de Sulfato de Cobre a 0,2 M, misturou-se ambas e se pré-resfriou até 4 °C. Com o auxílio de uma seringa de 10 mL, adicionou-se, gota a gota, Alginato de Sódio 2,5% (w/v) contendo 100 μL de extrato bruto de lacase, sob pequena agitação e armazenou-se o resultado sob 4 °C durante 4 horas.

Esse método, utilizando nanopartículas de Óxido de Ferro (Chatzikonstantinou, Gkantzou, Gournis, Patila, & Stamatis, 2018; Pospiskova, Prochazkova, & Safarik, 2013), produziu-se uma solução de FeSO_4 à 1% (w/v) em 100 mL de solução e adicionou-se lentamente gotas de Hidróxido de Sódio 1 mol/L, até a estabilização do pH da solução entre 10-12, formando precipitado de FeOH. Completou-se a solução até 200 mL e colocou-se no microondas em potência máxima durante 10 minutos, resultando em nanopartículas de ferro. Após isto, adicionou-se serina (0,05g de serina para cada 0,1g de nanopartículas) em 10 mL de tampão e deixou-se reagir durante 24 horas em 4 °C. Depois desta reação, adicionou-se 10 mL de Tween-20 em acetato de sódio (1:10) por 30 minutos e em seguida adicionou-se glutaraldeído 1% por mais 30 minutos. Finalizou-se lavando com acetato de sódio e deixou-se em solução de lacase com 10000 U/L em acetato de sódio (1:10) junto com as nanopartículas por 24 horas.

Para a nanoflor de Lacase-Cobre (Ge, Lei, & Zare, 2012; Patel et al., 2018) , adicionou-se em 5 mL de tampão PBS 10 mM em pH 7,4, 100 µL de extrato bruto de lacase juntamente com 50 µL de CuSO_4 2mM. Foi-se incubado durante 72 horas à 4 °C.

Para avaliar a atividade enzimática da lacase, utilizou-se, em banho maria à 40 °C, adicionou-se 1,7 mL de Acetato de Sódio 50 mM (pH 5,0), 200 µL de ABTS (2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico)) a 10 mM, durante exatos 5 minutos de reação. Leu-se o resultado da reação após 5 minutos no espectrofotômetro UV-Vis à 420 nm. A atividade é expressa em U/mL:

Após, calculou-se todas as atividades a partir do peso da sua composição de matriz, medindo frações de suas partes (Brugnari et al., 2018), onde:

$$RI(\%) = \left[\frac{Ua - Ue}{Ua} \right] \times 100 \quad A(\%) = \left[\frac{Uh}{Ua - Ue} \right] \times 100$$

$$AM(U/g) = [AEI / m]$$

- RI: Rendimento de Imobilização;
- A: Ativação;
- AM: Atividade em relação a massa;
- Ua: Unidades adicionadas;
- Ue: Unidades não imobilizadas;
- Uh: Unidades imobilizadas;
- AEI: Atividade da Enzima Imobilizada;

Depois da primeira reação, realizou-se lavagens com o tampão Acetato de Sódio 50 mM com pH 5,0 e em seguida realizou-se o mesmo experimento de atividade enzimática de Lacase por ABTS para verificar se houve decaimento da atividade.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

Todos os extratos brutos utilizados foram obtidos do fungo *T. villosa* com atividade de 3,9116 U/mL e em todos os métodos de imobilização adicionou-se 100 µL de extrato bruto.

Nas imobilizações por matrizes orgânicas, obteve-se da gelatina um filme fino de cerca de 1mm e massa de 3,39g e do alginato formou-se pequenas esferas azuis, caracterizadas pela adição de íon Cobre e íon Cálcio, onde apresentou-se 103 unidades. Para o cálculo, pesou-se algumas unidades de cada matriz (da gelatina, utilizou-se três pequenos discos de 0,01 mm e para o alginato, 10 unidades) e fez-se sua relação de massa por unidade.

Após isso, a leitura realizada dos sobrenadantes, juntamente com a atividade colocada, foi utilizada para o cálculo de unidades teóricas colocadas na matriz e também fez sua relação com a sua massa.

Tabela 1 – Atividades das Matrizes Orgânicas

	Gelatina Comercial	Alginato de Sódio
Unidades Teóricas (U/mL)	0,3247	0,1830
Unidades Teóricas (U/g)	0,0958	0,0357
Rendimento de Imobilização (%)	83,00	46,79
Atividade Resultante (U/g)	0,2450	0,0577
Ativação (%)	256	162

Fonte: O Autor (2019).

Na última análise a ser feita, utilizou-se as medidas de 10 discos de gelatina e 20 esferas de alginato, conforme descrita previamente, e realizou-se a relação com o número de unidades totais e peso, resultando na atividade de 0,2450 U/g para a gelatina comercial e 0,0577 U/g para o alginato de sódio.

Os *Turn-Overs* realizados não apresentaram queda da atividade, e sim, aumento a cada reação feita, assim como alterou-se suas colorações em relação as iniciais, devido ao efeito de adsorção do produto do ABTS gerado pela quebra que a lacase realiza na molécula.

Para as matrizes inorgânicas, a imobilização com nanopartículas de ferro foi a única onde seguiu-se exatamente a quantidade apresentada no artigo, onde foram inseridas 10 U/mL. As nanopartículas de ferro apresentaram coloração preta após sua redução e sua imobilização e as nanoflores Cobre-Lacase apresentaram colocação azul-esverdeada.

Tabela 2 – Atividades das Matrizes Inorgânicas

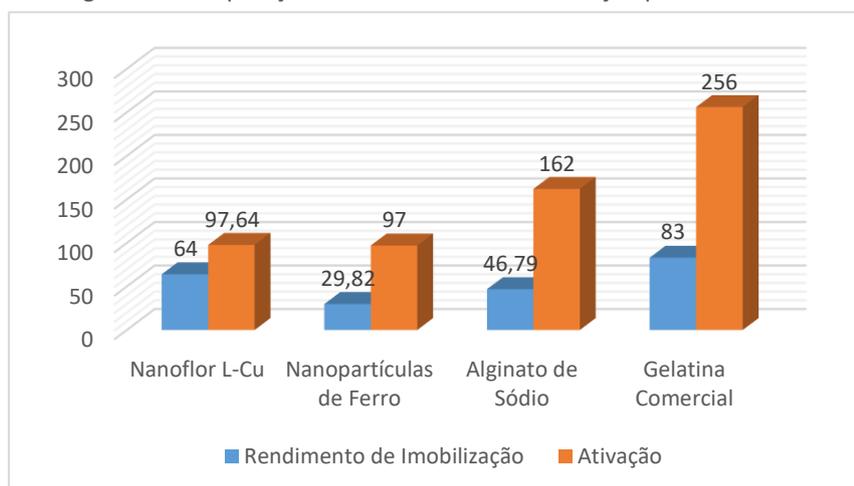
	Nanopartículas de Fe	Nanoflores Cu-Lcs
Unidades Colocas (U/mL)	10	0,3912
Unidades Teóricas (U/mL)	2,8710	0,2539
Rendimento de Imobilização (%)	29,82	64
Atividade Resultante (U/mL)	5,65	0,2474
Ativação (%)	97	97,64

Fonte: O Autor (2019).

Todas as imobilizações apresentaram uma boa taxa de imobilização da enzima, porém sua avaliação difícil ou inviável devido a reagentes e produtos podem tornar o seu uso limitado, como no caso da nanoflor de Lacase, sua manipulação necessita de um passo extra de imobilização, onde pode-se realizar

uma deposição da nanopartícula em uma superfície de sílica ou vítrea (Rao et al., 2007). Mesmo na deposição das nanopartículas de ferro sendo possível, sua porcentagem de deposição ainda é muito baixa e, através de meios reacionais, pode-se melhorar sua deposição (Rao et al., 2007). Os demais métodos apresentaram resultados satisfatórios conforme apresentado no gráfico abaixo.

Figura 1 – Comparação entre Rendimento e Ativação por método



Fonte: O Autor (2019).

CONCLUSÃO

Os métodos de imobilizações com matrizes orgânicas apresentaram melhor ativação em comparação com a inorgânicas, com destaque da imobilização em gelatina que apresentou o melhor resultado de rendimento também, mostrando-se como o métodos mais eficaz dos escolhidos para este trabalho. Também pode-se concluir que por mais o percentual de ativação não está diretamente relacionado com o rendimento de imobilização (Brugnari et al., 2018).

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao CNPq pela concessão de bolsa de iniciação, à UTFPR pelo meu desenvolvimento profissional e ao Laboratório de Biotecnologia pela possibilidade de desenvolver esse projeto.

REFERÊNCIAS

- Brugnari, T., Pereira, M. G., Bubna, G. A., de Freitas, E. N., Contato, A. G., Corrêa, R. C. G., ... Peralta, R. M. (2018). A highly reusable MANAE-agarose-immobilized *Pleurotus ostreatus* laccase for degradation of bisphenol A. *Science of the Total Environment*, 634, 1346–1351. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.04.051>
- Chand, D. (2019). Comparative Study of Dye Decolorization using free and Alginate Gel Entrapped Laccase from *Cercospora* sp. SPF-6. *Advances in Biotechnology & Microbiology*, 11(3).

<https://doi.org/10.19080/aibm.2018.11.555813>

Chatzikonstantinou, A. V., Gkantzou, E., Gournis, D., Patila, M., & Stamatias, H. (2018). Stabilization of Laccase Through Immobilization on Functionalized GO-Derivatives. In *Methods in Enzymology* (1st ed., Vol. 609).
<https://doi.org/10.1016/bs.mie.2018.05.014>

Durán, N., Rosa, M. A., D'Annibale, A., & Gianfreda, L. (2002). Applications of laccases and tyrosinases (phenoloxidasas) immobilized on different supports: a review. *Enzyme and Microbial Technology*, 31(7), 907–931.
[https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(02\)00214-4](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(02)00214-4)

Ge, J., Lei, J., & Zare, R. N. (2012). Protein-inorganic hybrid nanoflowers. *Nature Nanotechnology*, 7(7), 428–432. <https://doi.org/10.1038/nnano.2012.80>

Nisha, S., Karthick, A. S., & Gobi, N. (2012). Chemical Science Review and Letters A Review on Methods, Application and Properties of Immobilized Enzyme *Correspondence. *Che Sci Rev Lett*, 1(3), 148–155. Retrieved from <http://iguruji.in/assets/uploads/downloads/files/1499060112.pdf>

Nishida, V. S., Oliveira, R. F. De, Brugnari, T., Carvalho, R., Correa, G., Peralta, R. A., ... Peralta, R. M. (2018). International Journal of Biological Macromolecules Immobilization of *Aspergillus awamori* β -glucosidase on commercial gelatin : An inexpensive and efficient process. *International Journal of Biological Macromolecules*, 111, 1206–1213.
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.01.146>

Olajuyigbe, F. M., Adetuyi, O. Y., & Fatokun, C. O. (2019). Characterization of free and immobilized laccase from *Cyberlindnera fabianii* and application in degradation of bisphenol A. *International Journal of Biological Macromolecules*, 125, 856–864. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.12.106>

Patel, S. K. S., Otari, S. V., Li, J., Kim, D. R., Kim, S. C., Cho, B., ... Lee, J. (2018). Synthesis of cross-linked protein-metal hybrid nanoflowers and its application in repeated batch decolorization of synthetic dyes. *Hazardous Materials*, 347, 442–450.

Pospiskova, K., Prochazkova, G., & Safarik, I. (2013). One-step magnetic modification of yeast cells by microwave-synthesized iron oxide microparticles. *Letters in Applied Microbiology*, 56(6), 456–461.
<https://doi.org/10.1111/lam.12069>

Rao, A., Schoenenberger, M., Gnecco, E., Glatzel, T., Meyer, E., Brändlin, D., & Scandella, L. (2007). Characterization of nanoparticles using atomic force microscopy. *Journal of Physics: Conference Series*, 61(1), 971–976.
<https://doi.org/10.1088/1742-6596/61/1/192>

Zhang, S., Wu, Z., Chen, G., & Wang, Z. (2018). An Improved Method to Encapsulate Laccase from *Trametes versicolor* with Enhanced Stability and Catalytic Activity. *Catalysts*, 8(7), 286. <https://doi.org/10.3390/catal8070286>