

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

ANA LUIZA PESSANHA DA SILVA

IMOBILIZAÇÃO DE LACASE DE *Aspergillus niger*
EM SUPORTE 3D PARA TRATAMENTO DE
EFLUENTES INDUSTRIAIS

RIO DE JANEIRO

2026

Ana Luiza Pessanha da Silva

IMOBILIZAÇÃO DE LACASE DE *Aspergillus niger* EM
SUPORTE 3D PARA TRATAMENTO DE EFLUENTES
INDUSTRIAIS

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa
de Pós Graduação em Química,
Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como
requisitos parciais à obtenção do título de
Mestre em Química.

Orientador:

Rodrigo Octavio Mendonça Alves de Souza

Rio de Janeiro
2026

CIP - Catalogação na Publicação

P475i Silva, Ana Luiza Pessanha
Imobilização de Lacase de *Aspergillus niger* em
suporte 3D para tratamento de efluentes industriais
/ Ana Luiza Pessanha da Silva. -- Rio de Janeiro,
2026.
77 f.

Orientador: Rodrigo Octavio Mendonça alves de
Souza.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do
Rio de Janeiro, Instituto de Química, Programa de Pós
Graduação em Química, 2026.

1. Imobilização. 2. Lacase. 3. Impressão 3D. 4.
Efluente industrial. 5. Biocatálise. I. Mendonça
alves de Souza, Rodrigo Octavio, orient. II. Título.

Elaborado pelo Sistema de Geração Automática da UFRJ com os dados fornecidos pelo(a) autor(a), sob a
responsabilidade de Miguel Romeu Amorim Neto - CRB-7/6283.

Ana Luiza Pessanha da Silva

IMOBILIZAÇÃO DE LACASE DE *Aspergillus niger* EM
SUPORTE 3D PARA TRATAMENTO DE EFLUENTES
INDUSTRIAIS

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Química,
Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro,
como requisitos parciais à obtenção do título de Mestre em Química.

Aprovada em

Rodrigo Octavio Mendonça Alves de Souza

Monica Costa Padilha (membro interno, UFRJ)

José Celestino de Barros Neto (membro externo, UFRJ)

À Deus, pela vida
e pela força que me permitiu
chegar até aqui.

AGRADECIMENTOS

A Deus, princípio de todas as coisas. Por ter sido meu refúgio e fortaleza nos momentos de incerteza e minha fonte inesgotável de ânimo. Agradeço pela vida, pela sabedoria concedida em cada etapa deste trabalho e por ter colocado as pessoas certas em meu caminho.

Ao meu orientador, Prof. Rodrigo, pela oportunidade de integrar seu grupo de pesquisa e pela confiança depositada em meu trabalho. Sua orientação segura, rigor científico e visão crítica foram fundamentais não apenas para esta dissertação, mas para minha formação como pesquisadora.

Ao meu coorientador, Ivaldo, pela parceria constante, pela paciência e pelas contribuições valiosas que enriqueceram imensamente o desenvolvimento deste estudo.

Um agradecimento especial à Dra. Raquel e ao Dr. Caio, pela generosidade em compartilhar conhecimento. Obrigado pelo suporte técnico e por estarem sempre dispostos a ajudar no que fosse preciso para o andamento dos experimentos.

Aos professores Wiler e Gustavo, minha gratidão sincera e especial. O apoio de vocês transcendeu a sala de aula do curso técnico; as dicas práticas, o incentivo e a torcida foram alicerces fundamentais nesta jornada. Obrigado por acreditarem no meu potencial desde o início.

Aos meus pais, Fernando e Selma, os grandes arquitetos da minha história. Agradeço por terem plantado em mim os valores da honestidade e da persistência. Obrigado por nunca medirem esforços para investir na minha educação e por serem meu solo firme. Cada conquista minha é, na verdade, uma extensão da dedicação e do amor de vocês.

Ao meu irmão, Luiz Fernando, por ser muito mais que um irmão: você é meu grande amigo e parceiro de vida. Obrigado pela cumplicidade de sempre, por me ouvir, por me apoiar incondicionalmente e por estar ao meu lado em todas as batalhas. Sua presença e seu apoio foram essenciais para que eu não desistisse.

À psicóloga Larissa, por me ajudar a ressignificar as dificuldades, gerenciar a ansiedade e manter a serenidade necessária para concluir este ciclo.

Aos amigos do BossGroup, pela parceria no trabalho, pela amizade e pelo incentivo durante esta caminhada.

Aos amigos e colegas do Laboratório 107, pelo convívio diário, pela troca de experiências e pela solidariedade nas bancadas. A ciência se constrói no coletivo, e sou grato por ter dividido este espaço com vocês.

À minha cachorrinha, Luna, minha fiel companheira. Obrigado por sua companhia silenciosa durante as longas horas de estudo e pela alegria pura que renovava minhas energias sempre que eu precisava.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo apoio financeiro e fomento concedido, indispensáveis para a viabilização e realização desta pesquisa.

A todos os familiares e amigos que, de perto ou de longe, torceram pelo meu sucesso.

"A persistência é o caminho para o êxito."

Charles Chaplin

RESUMO

SILVA, Ana Luiza Pessanha. Imobilização de Lacase em suporte 3D para tratamento de efluentes industriais. Rio de Janeiro, 2026. Dissertação (Mestrado em Química) Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2026.

A intensificação da busca global por alternativas sustentáveis para enfrentar problemas ambientais e demandas industriais tem impulsionado o desenvolvimento de biocatalisadores mais eficientes e ambientalmente seguros. Diferentemente dos catalisadores químicos convencionais, as enzimas, em especial as lacases (EC 1.10.3.2, p-difenol:oxigênio oxidorreductase), destacam-se por sua alta seletividade e pela capacidade de atuar sob condições reacionais amenas, apresentando grande versatilidade na oxidação e degradação de compostos fenólicos variados. Dentro desse cenário, a imobilização enzimática surge como uma ferramenta essencial para ampliar a estabilidade operacional, a vida útil e o desempenho catalítico das lacases, tornando seu uso industrial mais viável. Neste trabalho, investiga a imobilização de lacase utilizando como suporte de polilactídeo com carbono acoplado (C-PLA), obtido por impressão 3D. Esse polímero foi escolhido devido às suas propriedades desejáveis, como biodegradabilidade, compatibilidade ambiental e resistência mecânica. Os experimentos realizados mostraram resultados extremamente satisfatórios, evidenciando eficiências de imobilização superiores a 80% quando a lacase foi ancorada nas estruturas produzidas em PLA. Além disso, o biocatalisador imobilizado demonstrou desempenho expressivo na degradação de corantes utilizados na indústria têxtil, alcançando taxas de remoção acima de 70%, o que reforça seu potencial de aplicação em processos de remediação ambiental. Dessa forma, conclui-se que a integração entre a biocatálise baseada em lacases e a tecnologia de impressão 3D configura uma abordagem inovadora, sustentável e alinhada às necessidades industriais atuais. Essa combinação oferece um caminho promissor para o aprimoramento da eficiência enzimática e para a consolidação de novas soluções aplicáveis ao tratamento de efluentes.

Palavras-chave: Lacase. Impressão 3D. C-PLA. Imobilização de Enzimas. Tratamento de Efluentes.

ABSTRACT

SILVA, Ana Luiza Pessanha. Immobilization of Laccase on a 3D support for industrial effluent treatment. Rio de Janeiro, 2026. Master's Thesis (M.Sc. in Chemistry) – Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2026.

The intensification of the global search for sustainable alternatives to address environmental problems and industrial demands has driven the development of more efficient and environmentally safe biocatalysts. Unlike conventional chemical catalysts, enzymes—especially laccases (EC 1.10.3.2, p-diphenol:oxygen oxidoreductase)—stand out for their high selectivity and ability to operate under mild reaction conditions, showing great versatility in the oxidation and degradation of various phenolic compounds. In this context, enzymatic immobilization emerges as an essential tool to enhance the operational stability, shelf life, and catalytic performance of laccases, making their industrial use more viable. This work investigates laccase immobilization using carbon-coupled polylactide (C-PLA), obtained through 3D printing, as a support. This polymer was chosen due to its desirable properties, such as biodegradability, environmental compatibility, and mechanical strength. The experiments conducted showed extremely satisfactory results, highlighting immobilization efficiencies exceeding 80% when the laccase was anchored to the PLA-produced structures. Furthermore, the immobilized biocatalyst demonstrated significant performance in the degradation of dyes used in the textile industry, achieving removal rates above 70%, which reinforces its potential application in environmental remediation processes. Thus, it is concluded that the integration of laccase-based biocatalysis and 3D printing technology constitutes an innovative and sustainable approach aligned with current industrial needs. This combination offers a promising path for enhancing enzymatic efficiency and consolidating new solutions for effluent treatment.

Keywords: Laccase. 3D Printing. C-PLA. Enzyme Immobilization. Wastewater Treatment.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Tipos de imobilização	19
Figura 2: Fluxograma do uso de água em etapas características do Processamento de Tecidos	22
Figura 3: Registro de coleta manual de água em ambiente contaminado (TECMUNDO, 2011).....	23
Figura 4: Representação 3D da estrutura da lacase de <i>Myceliophthora thermophila</i> . As cores azul, verde e vermelho destacam os três domínios da enzima	27
Figura 5: Estrutura dos sítios T1 e T2/T3 das lacases	29
Figura 6: Diversos campos de aplicação industrial da lacase	30
Figura 7: Método de funcionamento da impressora	36
Figura 8: Fluxograma das etapas experimentais utilizadas neste trabalho	37
Figura 9: Impressora 3D utilizada na fabricação do suporte.....	38
Figura 10: Etapas da marcha analítica para ativação do suporte: tratamento de superfície, hidroxilação e silanização.....	38
Figura 11: Processo de ativação da superfície do suporte	39
Figura 12: Aspecto visual do suporte de C-PLA após a etapa de funcionalização por radicais hidroxila ($\bullet\text{OH}$)	40
Figura 13: Aspecto do suporte C-PLA-OH após o processo de silanização	41
Figura 14: Aspecto do suporte ativado pronto para a imobilização	42
Figura 15: Reação de imobilização da Lacase	44
Figura 16: Estrutura do corante Rosa de Bengala	47
Figura 17: Fluxograma da abordagem utilizada para biodegradação	47

Figura 18: Esquema reacional da biodegradação do corante Rosa Bengala	48
Figura 19: Curva analítica para quantificação de proteínas totais. A reta representa o ajuste linear dos dados experimentais ($R^2 = 0,9915$)	49
Figura 20: Gráfico de barras sobre a eficiência da imobilização	50
Figura 21: Gráfico de Pareto dos efeitos estimados para o Rendimento de Imobilização	53
Figura 22: Gráfico de Pareto dos efeitos estimados para a Atividade Enzimática	54
Figura 23: Perfil de atividade relativa (%) da lacase imobilizada em suportes de C-PLA sob diferentes condições experimentais.....	56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Processos convencionais de tratamento de efluente	24
Tabela 2: Principais classes de enzimas no sistema EC	26
Tabela 3: Comprimento da estrutura primária de diferentes lacases segundo o número de aminoácidos	28
Tabela 4: Variáveis utilizadas no planejamento, com variações de pH, concentração de tampão e de enzima	43
Tabela 5: Valores para determinação da curva padrão	45
Tabela 6: Capacidade de carga (mg/g) e eficiência de imobilização (%) da lacase para as diferentes condições experimentais ensaiadas.....	51
Tabela 7: Comparação dos parâmetros de imobilização obtidos neste estudo com dados da literatura recente	55
Tabela 8: Validação experimental dos modelos matemáticos nas condições otimizadas (pH 3,8 e Enzima nível +1)	55
Tabela 9: Estabilidade operacional da lacase imobilizada (Amostra 7) ao longo de cinco ciclos de reuso.....	58
Tabela 10: Estabilidade operacional da lacase imobilizada (Amostra 9) ao longo de cinco ciclos de reuso.....	59

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CAD	Computer-Aided Design
C-PLA	Ácido Polilactídeo com Fibra de Carbono
Cys	Cisteína
DBO	Demanda Bioquímica de Oxigênio
DCCR	Delineamento Composto Central Rotacional
DQO	Demanda Química de Oxigênio
FDM	Modelagem por Fusão e Deposição
FFF	Fabricação de Filamento Fundido
Hys	Histidina
MCO	Superfamília das Multicobre Oxidase
MSR	Metodologia de Superfície de Resposta
PLA	Ácido Polilactídeo
PP	Polipropileno
SLA	Estereolitografia
TNC	Cluster Trinuclear

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
1.1 OBJETIVO GERAL	20
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	20
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	21
2.1 O DESAFIO DOS EFLUENTES INDUSTRIAIS E A PERSISTÊNCIA DE POLUENTES	21
2.2 BIOCATÁLISE MEDIADA POR LACASES: FUNDAMENTOS BIOQUÍMICOS E APLICABILIDADE	25
2.3 ENGENHARIA DE BIOCATALISADORES: INTERFACES DE IMOBILIZAÇÃO E IMPRESSÃO 3D	33
3 METODOLOGIA	37
4 MATERIAIS E MÉTODOS	37
4.1 PREPARO E ATIVAÇÃO DO SUPORTE 3D	39
4.1.2 Tratamento de Superfície	39
4.1.3 Hidroxilação	39
4.1.4 Silanização	40
4.1.4.1 <i>Aminossilano</i>	40
4.1.4.2 Glutaraldeído	41
4.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	42
4.3 Protocolo de Imobilização	44
4.3.1 Quantificação das proteínas	45
4.4 Biodegradação do Corante Rosa de Bengala	46
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	49
5.1 VALIDAÇÃO DO MÉTODO DE QUANTIFICAÇÃO E EFICIÊNCIA DE IMOBILIZAÇÃO	49
5.2 Análise do Delineamento Experimental: Influência do pH e da Carga Enzimática	52
5.3 Avaliação da Capacidade Catalítica na Biodegradação do Rosa de Bengala	56
5.4 Estabilidade Operacional e Ciclos de Reuso	58

6 CONCLUSÃO	60
7 REFERÊNCIAS	62
Anexos	

1. INTRODUÇÃO

Os efluentes industriais representam um desafio crítico devido à complexidade e variabilidade de sua composição química. Diferentemente do esgoto doméstico, os descartes industriais frequentemente contêm compostos recalcitrantes, metais pesados, corantes sintéticos e contaminantes emergentes que persistem no ambiente, bioacumulando-se na cadeia trófica e ameaçando a saúde pública e a biodiversidade (UN Water, 2021). Historicamente, o enfrentamento dessa poluição tem se apoiado em processos físico-químicos e biológicos convencionais. Entretanto, embora essas tecnologias sejam eficazes na redução de parâmetros globais como a Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO), elas apresentam limitações técnicas e econômicas significativas quando confrontadas com poluentes tóxicos ou não biodegradáveis (Metcalf & Eddy, 2016). Processos físico-químicos, por exemplo, frequentemente operam apenas uma transferência de fase, removendo o poluidor do efluente líquido e concentrando-o em um lodo sólido, o que gera um passivo ambiental secundário de difícil disposição (Crittenden *et al.*, 2012). Além disso, o elevado consumo energético e a demanda por reagentes químicos tornam muitas dessas abordagens insustentáveis a longo prazo.

Diante das ineficiências desses métodos de remediação clássicos, ou "fim de tubo" (*end-of-pipe*), a Química Verde surge como um paradigma orientador necessário. Definida por Anastas e Warner (1998), esta filosofia propõe o design de processos que reduzam ou eliminem o uso e a geração de substâncias perigosas, priorizando a prevenção da poluição na fonte em detrimento da remediação posterior. A aplicação desses princípios no tratamento de águas residuárias exige a transição para tecnologias que operem em condições amenas e minimizem a pegada ecológica (Lancaster, 2010).

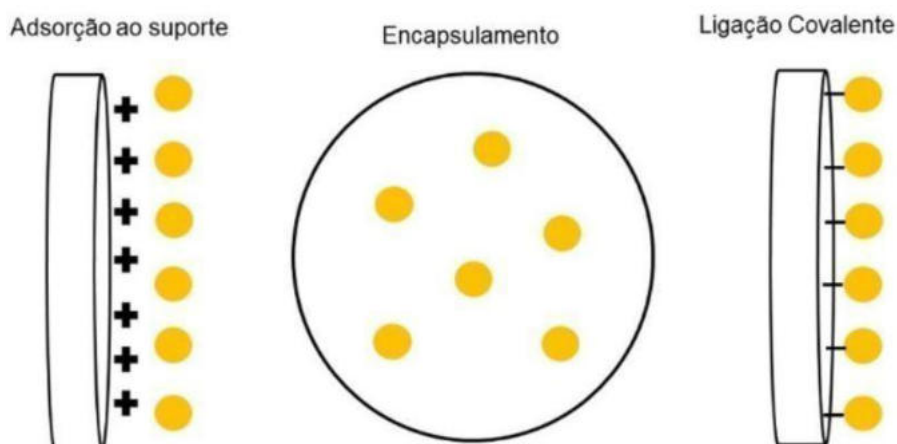
É sob essa ótica de sustentabilidade que a Biotecnologia Ambiental se consolida como uma solução convergente e promissora. Ao utilizar o potencial metabólico de sistemas biológicos como microrganismos, enzimas ou biomassa, a biotecnologia permite não apenas a remoção, mas a mineralização de contaminantes complexos, transformando-os em subprodutos como água e dióxido de carbono (Rittmann & Mccarty, 2001). Esta abordagem, alinhada aos preceitos da Química Verde, oferece uma alternativa robusta, de menor custo energético e baixo impacto ambiental para o tratamento de efluentes industriais. Dentro dessa estratégia, o uso de biocatalisadores isolados aparece como um dos caminhos mais eficazes. Por isso, o emprego de enzimas em processos industriais tem ganhado

crescente relevância devido às suas características altamente desejáveis como catalisadores biológicos (Gadd, 2009). Em particular, destacam-se sua elevada seletividade, capacidade de operar em ampla faixa de pH, temperatura e salinidade, além de serem biodegradáveis e facilmente controláveis em processos contínuos ou em batelada (Nicell *et al.*, 1993; Torres *et al.*, 2003).

Um exemplo prático é o setor têxtil, onde o uso de lacases para a descoloração de efluentes substitui processos de oxidação química baseados em hipoclorito ou outros agentes agressivos, permitindo que a reação ocorra em condições de temperatura e pH menos extremos (Rodríguez-Couto, 2013). Apesar desses benefícios, limitações como alto custo de extração e purificação, sensibilidade térmica, inativação por solventes orgânicos ou inibidores e, principalmente, a impossibilidade de reutilização, comprometem sua aplicação direta em larga escala. Nesse contexto, a imobilização enzimática tem se consolidado como uma estratégia chave para ampliar a vida útil das enzimas, melhorar sua estabilidade operacional, permitir sua recuperação e reutilização e, conseqüentemente, reduzir custos operacionais (Kunz, 2002; Sheldon & van Pelt, 2013).

Dentre as técnicas de imobilização enzimática, representados na figura 1, a adsorção física fundamenta-se na interação direta entre a enzima e a superfície do suporte sob condições controladas de tempo, pH e temperatura. Nesse processo, a proteína é fixada à matriz por meio de ligações de baixa energia, como as interações de Van der Waals. A seleção do suporte é criteriosa e depende diretamente da aplicação pretendida, bem como das propriedades físico-químicas exigidas pelo processo. Adicionalmente, a eficiência desse método é influenciada por variáveis como o peso molecular da proteína, a natureza e porosidade do material suporte, além da concentração enzimática inicial (Villeneuve *et al.*, 2000).

Figura 1: Tipos de imobilização.



Fonte: Adaptado de Souza *et al.*, 2017.

Em contrapartida, no método de encapsulamento (ou aprisionamento), a enzima é retida no interior de uma rede polimérica insolúvel ou envolta por membranas em forma de microcápsulas. Embora o uso de géis e polímeros como matrizes seja recorrente, essa técnica apresenta como principal limitação a resistência à transferência de massa, uma vez que as membranas das cápsulas podem dificultar a dispersão e o contato pleno entre as moléculas enzimáticas e o substrato (Villeneuve *et al.*, 2000).

Por fim, a ligação covalente a uma matriz ativada configura-se como um processo essencialmente químico, ocorrendo via interação com grupos funcionais de aminoácidos específicos da estrutura proteica. Tal mecanismo permite não apenas a preservação dos sítios ativos, mas também a otimização das propriedades nativas da enzima e o desenvolvimento de novas funcionalidades. Esse procedimento pode ser executado por meio de diferentes estratégias, incluindo a fixação direta a matrizes pré-ativadas, a modificação de resíduos de aminoácidos para acoplamento em materiais insolúveis ou, ainda, a formação de redes enzimáticas reticuladas (*cross-linking*) mediante o emprego de reagentes bifuncionais (Villeneuve *et al.*, 2000).

Para viabilizar o uso de lacases nesses contextos, a imobilização da enzima tem sido amplamente explorada. Suportes e metodologias variados têm sido reportados, buscando maior estabilidade térmica, resistência a variações de pH, aumento da tolerância a solventes e maior número de ciclos de reutilização (Rodríguez-Couto, 2013). O desenvolvimento de suportes mais eficientes e ambientalmente compatíveis continua sendo um campo ativo de pesquisa, impulsionado pelo aumento da demanda industrial por catalisadores mais

robustos, sustentáveis e economicamente viáveis. Assim, a imobilização de lacases se destaca como uma estratégia essencial para aplicações biotecnológicas modernas, especialmente em biorremediação, síntese verde e processos industriais limpos. Avanços recentes em tecnologias de fabricação têm permitido expandir significativamente as possibilidades de desenvolvimento de suportes mais eficientes. A manufatura aditiva, especialmente a impressão 3D por modelagem por fusão e deposição (FDM), destaca-se por possibilitar a produção de matrizes poliméricas com geometrias complexas, alta área superficial e custo reduzido. Materiais como o ácido polilático (PLA) e suas variantes modificadas, como o carbono-PLA (C-PLA), vêm sendo explorados devido à sua facilidade de processamento, estabilidade mecânica e compatibilidade com modificações químicas posteriores (Jiajie, 2019).

Segundo Sun *et al.* (2018) e outros autores, a impressão 3D oferece vantagens únicas, como a possibilidade de personalização do suporte, controle preciso da porosidade e construção de canais internos que favorecem transferência de massa. Estudos recentes demonstram que, após tratamentos químicos adequados (como oxidação por solução piranha e posterior hidroxilação), é possível gerar uma superfície altamente reativa, capaz de receber agentes silanizantes e, posteriormente, enzimas de interesse (Zhu *et al.*, 2019). A literatura evidencia que a combinação entre impressão 3D e métodos clássicos de funcionalização, como acoplamento via glutaraldeído, resulta em suportes com elevada capacidade de carga proteica, maior eficiência catalítica e excelente reusabilidade. Ademais, a possibilidade de modificação regional ou total da peça impressa, conforme o desenho computacional, torna essa abordagem extremamente versátil e adaptável a diferentes escalas de produção (Wong *et al.*, 2021).

1.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver e caracterizar um sistema biocatalítico fundamentado na imobilização de lacase em suportes de C-PLA obtidos por impressão 3D, avaliando seu potencial na degradação de compostos fenólicos sob a perspectiva de reuso e sustentabilidade processual.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Os objetivos específicos deste trabalho compreendem, primeiramente, a definição das condições ideais para a ancoragem da enzima no suporte de C-PLA, buscando maximizar a atividade residual e a robustez do complexo enzima-suporte. O estudo dedica-se, também,

à análise do comportamento cinético na degradação de poluentes orgânicos, avaliando como a estrutura tridimensional do suporte influencia a interação substrato-enzima. Conclui-se a abordagem com a avaliação da estabilidade de reuso, na qual será determinado o perfil de desativação do biocatalisador e a viabilidade técnica da sua aplicação em múltiplos ciclos operacionais.

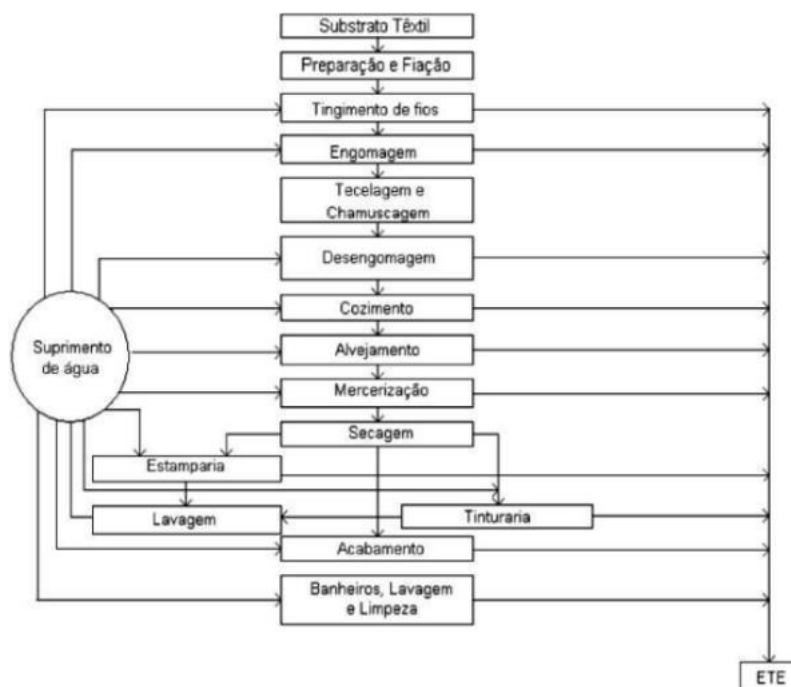
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 O DESAFIO DOS EFLUENTES INDUSTRIAIS E A PERSISTÊNCIA DE POLUENTES

A dispersão de corantes sintéticos representa um dos maiores desafios para a preservação dos recursos hídricos globais. A natureza intensiva do consumo de água no setor têxtil, somada à baixa eficiência na fixação dos insumos às fibras, culmina na geração de efluentes caracterizados por elevados índices de carga orgânica e intensa persistência cromática (Asghar *et al.*, 2015). Esse cenário de vulnerabilidade ambiental tem impulsionado investigações científicas voltadas à concepção de tecnologias de tratamento que priorizem a redução da periculosidade desses rejeitos e a otimização do descarte de efluentes industriais (Barreto *et al.*, 2011).

O déficit de tratamento de efluentes em países em desenvolvimento atinge níveis alarmantes, com cerca de 70% dos resíduos industriais sendo lançados in natura nos corpos hídricos (Santos, 2015). A indústria têxtil contribui significativamente para esse quadro devido à sua alta intensidade hídrica; o processamento de cada quilograma de produto demanda de 80 a 150 litros de água, dos quais 88% são convertidos em efluentes (Diniz, 2015). Essa carga hídrica é predominantemente consumida nas etapas de beneficiamento e lavagem de fios e tecidos (Figura 2), além de ser requerida para a manutenção sanitária de máquinas e instalações fabris.

Figura 2: Fluxograma do uso de água em etapas características do Processamento de Tecidos.



Fonte: Braile & Cavalcanti, 1993.

Os efluentes gerados nas etapas de beneficiamento têxtil apresentam uma matriz química complexa e multifatorial. Entre suas principais características, destaca-se a cor instensa, decorrente de frações significativas de corantes que não se fixam às fibras durante o processo de tingimento. Do ponto de vista analítico, esses resíduos exibem concentrações de matéria orgânica comparáveis ao esgoto doméstico, sulfitos e metais pesados provenientes de agentes alvejantes e fixadores. A presença de enxofre e metais é frequentemente intrínseca à própria estrutura molecular de certas classes de corantes (Lim *et al.*, 2010).

A gravidade da negligência industrial no manejo de corantes é exemplificada por episódios de contaminação aguda, como o ocorrido em 2011 no Rio Jian, em Luoyang, na China. Na ocasião, o curso d'água apresentou uma súbita e intensa alteração cromática, tornando-se completamente avermelhado em decorrência do descarte clandestino de efluentes brutos por duas unidades fabris que operavam ilegalmente na região. Este evento não apenas evidenciou a fragilidade da fiscalização ambiental em economias em rápido crescimento, mas também demonstrou o poder de dispersão e a persistência visual dos corantes em matrizes hídricas. Casos como este corroboram a tese de que os corantes, mesmo quando não apresentam toxicidade aguda imediata em baixas concentrações, provocam um impacto ecológico profundo. A coloração extrema impede a penetração de luz,

colapsando os ciclos de fotossíntese subaquática e alterando drasticamente a Demanda Química de Oxigênio (DQO). A recorrência desses desastres ambientais, somada à dificuldade de remediação de grandes volumes de água contaminada por métodos físico-químicos convencionais, reforça a urgência de sistemas biocatalíticos eficientes que possam atuar na descoloração e destoxificação desses efluentes antes mesmo de sua liberação no ambiente (Tecnundo, 2011).

Figura 3: Registro de coleta manual de água em ambiente contaminado.



Fonte: Tecnundo, 2011.

O tratamento de efluentes industriais fundamenta-se na transformação química de contaminantes em subprodutos estáveis e de baixa toxicidade (Brito *et al.*, 2004). Para a complexa matriz de efluentes têxteis, a configuração padrão de tratamento envolve o acoplamento de métodos físico-químicos a processos de biorremediação. Atualmente, o refinamento de técnicas biotecnológicas, a exemplo dos sistemas aeróbios em lagoas e lodos ativados, constitui uma área estratégica de pesquisa, buscando conciliar eficiência de degradação com a viabilidade econômica necessária para o setor produtivo (Lade *et al.*, 2012). Um panorama comparativo entre esses sistemas de tratamento está sintetizado na Tabela 1.

Tabela 1: Processos convencionais de tratamento de efluente.

Tratamento	Tipo de Processo	Operação Unitária
Preliminar	Físico Químico	Gradeamento Equalização Neutralização
Primário	Físico Químico	Clarificação Sedimentação Flotação Coagulação Precipitação
Secundário Biológico	Biológico	Lodos Ativos Lagoas de Aeração Filtros Biológicos
Terciário ou Avançado	Físico Químico	Carvão Ativo Ultrafiltração Osmose Reversa Oxidação Avançada

Fonte: Adaptado de Peres, 1998

A arquitetura dos sistemas de tratamento de efluentes é segmentada em níveis de complexidade crescente, iniciando-se pelo caráter preliminar, voltado à retenção de sólidos grosseiros, seguido pelo tratamento primário, focado na remoção de frações sedimentáveis. As etapas secundárias concentram-se na oxidação da carga orgânica biodegradável, tanto em suspensão quanto em solução. Por fim, o tratamento terciário ou avançado é implementado para o polimento final do efluente, visando a recirculação de água ou a adequação a padrões rigorosos de descarte. Este nível envolve operações unitárias específicas, tais como desinfecção, remoção de nutrientes e a eliminação de cor e compostos recalcitrantes (Almeida, 2017).

No que tange à descoloração de efluentes têxteis, processos de adsorção, oxidação avançada e separação por membranas têm demonstrado elevada eficácia (Kunz *et al.*, 2002). No entanto, essas tecnologias enfrentam gargalos operacionais, como o elevado custo e a geração de resíduos sólidos secundários ou subprodutos de toxicidade desconhecida. Nesse cenário, o uso de microrganismos que utilizam os constituintes do

efluente como substrato metabólico surge como uma alternativa promissora. Além do baixo custo operacional, os processos biotecnológicos minimizam a produção de lodos químicos, desde que a remoção ocorra via biodegradação (Lim *et al.*, 2010).

2.2 BIOCATÁLISE MEDIADA POR LACASES: FUNDAMENTOS BIOQUÍMICOS E APLICABILIDADE

As enzimas constituem elementos fundamentais nos sistemas biológicos, uma vez que reduzem a energia de ativação das reações químicas e, conseqüentemente, aceleram processos metabólicos essenciais sem sofrerem alterações permanentes. Essas biomoléculas estão distribuídas por todos os domínios da biodiversidade, sendo encontradas em organismos de origem animal, vegetal e microbiana (Guerrand, 2018). No entanto, a crescente demanda industrial por biocatalisadores tem revelado limitações importantes nas fontes vegetais e animais, sobretudo em relação à escala e custo de produção (Singh R, 2019).

A produção microbiana de enzimas destaca-se por sua rapidez, menor custo operacional e elevada escalabilidade, além da possibilidade de manipulação genética para aprimorar rendimento, estabilidade e especificidade, ou seja, características altamente desejáveis no setor industrial. Dentro desse contexto, os fungos representam um grupo particularmente relevante, uma vez que correspondem a uma das principais fontes de enzimas comerciais disponíveis no mercado global. As enzimas fúngicas apresentam vantagens marcantes, como altas taxas de produção, processos de purificação relativamente simplificados, especialmente no caso de fungos filamentosos, e elevada eficiência catalítica mesmo sob condições ambientais adversas (Kango N.,2019).

Outro fator que reforça a segurança e aplicabilidade dos fungos industriais é seu uso historicamente consolidado em processos tradicionais como fermentações alimentares, panificação e produção de bebidas. Tais práticas milenares fornecem uma base sólida para a aceitação de fungos como plataformas produtivas modernas, reforçando sua confiabilidade biotecnológica. Atualmente, estima-se que as enzimas de origem fúngica correspondam a mais de 50% de todo o mercado enzimático mundial, refletindo tanto sua versatilidade quanto seu desempenho em diferentes setores produtivos (Kango N.,2019).

As enzimas podem ser organizadas, de acordo com sua função catalítica, em sete classes principais: oxidorreduases, transferases, hidrolases, liases, isomerases, ligases e

translocases, e essa classificação reflete a diversidade de mecanismos bioquímicos que sustentam processos metabólicos essenciais (Tabela 2) (Robinson PK.; 2015).

Tabela 2: Principais classes de enzimas no sistema EC.

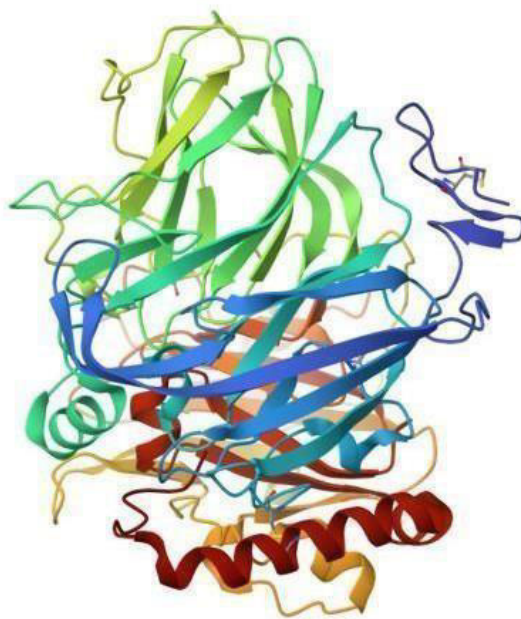
Primeiro dígito EC	Classe de enzimas	Tipo de reação
1	Oxidoredutases	Oxidação/redução
2	Transferases	Transferência de átomo/grupo (excluindo outras classes)
3	Hidrolases	Hidrólise
4	Liasas	Remoção do grupo (excluindo o grupo 3).
5	Isomerases	Isomerização
6	Ligases	União de moléculas ligadas à quebra de uma ligação pirofosfato

Nos fungos, a atividade enzimática pode ocorrer tanto no ambiente intracelular quanto no extracelular. Por atuarem como decompositores naturais, os fungos possuem a capacidade de secretar grandes quantidades de enzimas extracelulares, essenciais para a degradação e bioconversão de variados substratos complexos (Berbee ML, 2017).

Entre as enzimas extracelulares de maior relevância comercial destacam-se as hidrolases e as oxidoredutases. Dentro deste último grupo, as lacases e diferentes tipos de peroxidases que constituem as principais subclasses estudadas para aplicações em biorremediação. Essas enzimas têm se mostrado particularmente eficazes na degradação de xenobióticos e na remoção de compostos fenólicos tóxicos presentes em efluentes industriais e ambientes contaminados (Verma M., 2020).

A lacase (p-difenol:oxigênio oxidoredutase, EC 1.10.3.2) é uma oxidoredutase multicobre produzida por plantas, bactérias e, de forma mais relevante, por fungos filamentosos (Figura 4). Essa enzima catalisa a oxidação de uma ampla diversidade de compostos fenólicos, aminofenóis, aromáticos heterocíclicos e até mesmo alguns compostos inorgânicos, com concomitante redução do oxigênio molecular a água (Lindley, PF; 2001). Sua versatilidade catalítica decorre da estrutura particular de seus sítios de cobre e da possibilidade de uso de mediadores redox de baixa massa molecular, que expandem consideravelmente seu repertório de substratos (Tavares *et al.*, 2008).

Figura 4: Representação 3D da estrutura da lacase de *Myceliophthora thermophila*. As cores azul, verde e vermelho destacam os três domínios da enzima.



Fonte: Protein Data Bank (https://c dn.rcsb.org/images/structures//6f5k_chain-A.jpeg).

Estas enzimas estão envolvidas em funções fisiológicas essenciais que variam de acordo com o organismo hospedeiro. Em bactérias, elas contribuem para a síntese de pigmentos, a esporulação e a proteção contra o estresse oxidativo e a radiação UV, enquanto nas plantas, a lacase é crucial no processo de lignificação da parede celular e na modulação da resposta a danos e estresse (Dittmer, NT; 2010; Janusz, G.;2020). Em insetos, sua atividade está ligada à esclerotização da cutícula e à pigmentação (Dittmer, NT; 2010, Janusz, G.;2020). Contudo, o papel mais extensivamente estudado e de maior interesse biotecnológico é o das lacases fúngicas. Nestes organismos, além de estarem implicadas na defesa, virulência e formação de pigmentos, são primariamente reconhecidas por seu envolvimento na biodegradação da lignina (Thurston, C.; 1994; Claus, H. 2004).

Predominantemente caracterizadas como glicoproteínas extracelulares, tipicamente apresentando massas moleculares que variam de 60 a 70 kDa. A natureza glicoproteica é definida pela presença de diversas porções de carboidratos, cujo conteúdo geralmente se situa entre 10% e 25% da massa total da enzima, embora haja relatos de teores de sacarídeos significativamente mais elevados (Baldrian, P.; 2006). A Tabela 3 apresenta a caracterização de diferentes lacases, correlacionando suas origens à extensão da estrutura primária em número de resíduos de aminoácidos (Mot; Silaghi-Dumitrescu, 2012).

Tabela 3: Comprimento da estrutura primária de diferentes lacases segundo o número de aminoácidos.

Microrganismo	Número de aminoácidos da estrutura primária	Referências
<i>Thermothelomyces thermophila</i>	De 576 a 650 aminoácidos formando três domínios	(Kosinas; <i>et al.</i> , 2023; Zerva; <i>et al.</i> , 2019)
<i>Myceliophthora thermophila</i>	Cadeia de 559 aminoácidos em três domínios	(Ernst; <i>et al.</i> ,2018)

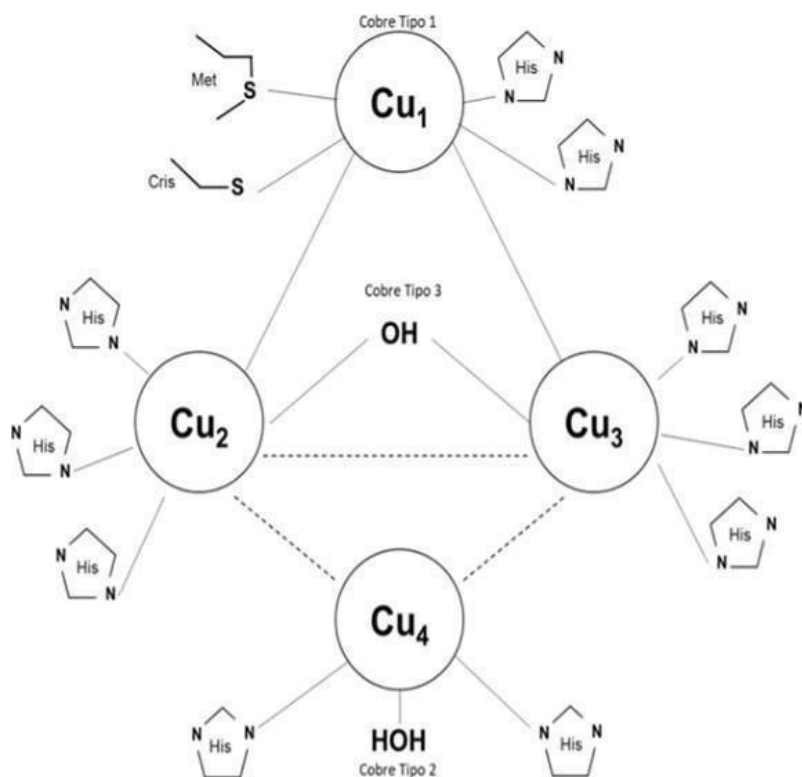
O perfil de glicosilação dessas enzimas caracteriza-se por cadeias de manose ramificadas, as quais se ligam a resíduos de asparagina via unidades de N-acetilglicosamina através de ligações glicosídicas do tipo β (Mot; Silaghi-Dumitrescu, 2012). Esta modificação pós-traducional é determinante para as propriedades biofísicas da proteína, influenciando diretamente a estabilidade térmica, a atividade catalítica e a solubilidade das lacases (Kallio *et al.*, 2011; Kosinas *et al.*, 2023; Maestre-Reyna *et al.*, 2015; Vite- Vallejo *et al.*, 2009).

A funcionalidade catalítica da lacase está ligada à presença de quatro íons de cobre no estado de oxidação Cu^{2+} , distribuídos em centros metálicos específicos (Leonowicz *et al.*, 2001). Esses íons são categorizados em três tipos (T1, T2 e T3) com base em suas propriedades espectroscópicas e magnéticas, sendo coordenados por resíduos de aminoácidos que definem a geometria e o potencial de oxirredução de cada sítio (Christopher *et al.*, 2014).

O centro Tipo 1 (T1), frequentemente denominado "cobre azul", apresenta uma esfera de coordenação composta por duas histidinas, uma cisteína e uma metionina. A coloração azul característica desta enzima deriva de uma intensa transferência de carga entre o átomo de enxofre da cisteína e o íon cobre; funcionalmente, este sítio atua como o receptor primário de elétrons, sendo o local onde ocorre a oxidação do substrato orgânico concomitante à redução inicial da enzima. Em contraste, os centros Tipo 2 (T2) e Tipo 3 (T3) organizam-se para formar um cluster trinuclear (TNC), essencial para a etapa final do ciclo catalítico. O cobre T2, coordenado por duas histidinas e uma molécula de água, não contribui para a coloração da proteína e desempenha o papel de intermediário na transferência de elétrons. Já o centro T3 consiste em um par binuclear de cobres, no qual cada íon é coordenado por

três histidinas, mantendo-se unidos por uma ponte de ligação hidroxila (Figura 5) (Christopher *et al.*, 2014).

Figura 5: Estrutura dos sítios T1 e T2/T3 das lacases.



Adaptado de Dwivedi, 2011.

O ciclo catalítico das lacases é iniciado pela oxidação do substrato no centro de cobre T1, onde ocorre a abstração de elétrons individuais. Subsequentemente, estes elétrons migram via transferência intramolecular para o cluster trinuclear, constituído pelos sítios de cobre T2 e T3. Este arranjo metálico atua como uma unidade cooperativa de captação eletrônica, promovendo a redução multieletrônica do oxigênio molecular (O_2) a água (H_2O) (Christopher *et al.*, 2014; Desai; Nityanand, 2011).

A seletividade deste processo é regulada pela coordenação do O_2 ao centro trinuclear por meio de uma ativação assimétrica. Tal mecanismo é fundamental para restringir a interferência de agentes oxidantes competidores, assegurando a exclusividade do oxigênio como receptor eletrônico terminal (Desai; Nityanand, 2011). Adicionalmente, a dinâmica de redução observada nos centros T2 e T3 desempenha um papel determinante na estabilização conformacional da enzima durante o *turnover* catalítico (Christopher *et al.*, 2014; Desai; Nityanand, 2011).

Devido a essas características, lacases têm sido amplamente alvos de pesquisa para utilização em diversos setores (Jiao *et al.*, 2025) (Figura 6). Entre as aplicações mais relevantes estão a designificação e branqueamento de polpa celulósica, visando substituir reagentes agressivos como cloro (Gamelas *et al.*, 2005); a síntese enantiosseletiva de intermediários farmacêuticos (Ceylan *et al.*, 2008); tratamentos de pré-acabamento têxtil, melhorando higroscopicidade e removendo impurezas da fibra (Pazarlioglu *et al.*, 2005); e o tratamento de efluentes industriais contendo compostos aromáticos tóxicos ou recalcitrantes (Couto & Herrera, 2006). Dentro desse último campo, destaca-se seu uso na degradação de corantes têxteis, especialmente corantes azo, antraquinônicos e triarilmetânicos, amplamente presentes em efluentes de indústrias têxteis (Cristóvão *et al.*, 2008, 2009). Corantes não tratados reduzem a transmissão de luz nos corpos hídricos, prejudicam a fotossíntese, afetam a biodiversidade aquática e podem liberar subprodutos carcinogênicos por degradação abiótica ou microbiana (Saratale *et al.*, 2011).

Figura 6: Diversos campos de aplicação industrial da lacase.



Fonte: Adaptado de Jiao *et al.*, 2025.

As bebidas de frutas naturais também se beneficiam com o uso das lacases. A oxidação dos compostos fenólicos nas frutas é um processo natural e é parcialmente responsável pelo sabor e aroma da fruta e afeta a sua clareza. Porém, quando a oxidação é

excessiva, seus efeitos prejudicam a qualidade das bebidas principalmente após o armazenamento (Debnath; Saha, 2020; Kyomuhimbo; Brink, 2023). Foi relatada a adição de lacase ao suco de cereja, que foi então aquecido por uma hora a 50°C, eliminando 70% dos compostos fenólicos (Debnath; Saha, 2020).

Na fabricação de pão, foi demonstrado que as lacases aumentam a resistência e a estabilidade da massa, concomitantemente reduzindo sua dureza, resultando em um pão de maior volume e maciez quando assado com lacases (Debnath; Saha, 2020). A extração de azeite gera resíduos mistos de azeitona em quantidades de 30 milhões por ano e é conhecida pela sua elevada toxicidade ambiental nos ecossistemas aquáticos. Por sua vez, a produção de cerveja produz grandes quantidades de resíduos fenólicos. As lacases são conhecidas por serem capazes de degradar resíduos de cerveja, soja e destilarias. Os resíduos mistos de azeitona podem ser valorizados ao serem utilizados como substratos na produção das lacases através de fermentação submersa (Bhardwaj *et al.*, 2022; Kyomuhimbo; Brink, 2023).

As lacases também podem ser utilizadas na indústria têxtil e de confecção atuam no branqueamento de tecidos de linho, síntese de corantes e tratamento de águas residuais da indústria (Rivera-Hoyos *et al.*, 2013). A indústria têxtil consome dois terços dos corantes produzidos mundialmente. Os corantes são compostos químicos de estrutura complexa, em sua maioria de origem sintética, utilizados no processo de tingimento de tecidos (Kyomuhimbo; Brink, 2023). Espera-se que os corantes sejam resistentes à luz solar, às lavagens frequentes, à água, aos microrganismos e a vários produtos químicos e é por isso que a sua eliminação dos corpos de água e do solo é uma tarefa muito difícil, uma vez acumulados. Estas substâncias são cancerígenas, tóxicas, mutagênicas e a sua acumulação na água impede a entrada da luz solar e dos níveis de oxigênio dissolvido, afetando assim os ecossistemas aquáticos (Kyomuhimbo; Brink, 2023; Zofair *et al.*, 2022).

Também são capazes de branquear corantes como Verde Malaquita, Vermelho Congo, Cristal Violeta, Azul direto, Vermelho Procion MX-5B, Vermelho Reativo, Azul Reativo, Vermelho Fenol, Azul Ácido, Ácido Laranja, Remazol Azul Brilhante R (RBBR), Verde Reativo, Azul Cibacron, Bromaminic Ácido, Verde direto, Bismark Brown e Lanaset cinza G. Lacases dos fungos *Aspergillus* sp, *M. thermophila* e *Cerrena* sp degradaram vários dos corantes acima mencionados com alta eficiência e as lacases bacterianas degradaram-nos em 60% (Kyomuhimbo; Brink, 2023).

Outra aplicação muito interessante é na indústria papelreira na deslignificação de celulose, lavagem sem cloro, branqueamento, tratamento de efluentes, fabricação de papel e na formação de enxertos de fibra de madeira para aumentar as propriedades físicas e químicas do papel (Debnath; Saha, 2020; Rivera-Hoyos *et al.*, 2013; Rodriguez Couto; Toca Herrera, 2006). O processo tradicional de branqueamento de papel é realizado principalmente com cloro e isso gera efluentes muito tóxicos, além de grande consumo de energia e tempo. Na revisão do grupo de pesquisa do Rodriguez, menciona-se a utilização das lacases para substituir a utilização de cloro no branqueamento de papel de alta qualidade e acessível por sistemas mediadores-lacase com resultados favoráveis (Rodriguez Couto; Toca Herrera, 2006). Debnath e Saha relataram um processo de branqueamento de papel com sistema mediador-lacase com quantidades mínimas de peróxido de hidrogênio com eficiência de 90% acima do processo tradicional (Debnath; Saha, 2020).

A indústria do papel gera grande quantidade de polpa de madeira para fabricação de papel, liberando derivados de lignina como produto residual. Devido à sua composição, a polpa é branqueada através de processos químicos ou bioquímicos, agregando mais substâncias tóxicas aos resíduos da indústria (Zofair *et al.*, 2022). As lacases fúngicas da podridão branca demonstraram alta eficiência na degradação destes contaminantes sem obtenção considerável de contaminantes secundários. Lacase de *Paenibacillus* sp., a cepa LD-1 degradou eficientemente os contaminantes do solo provenientes da indústria de papel (Zofair *et al.*, 2022).

Antibióticos, anti-inflamatórios, betabloqueadores, hormônios terapêuticos e analgésicos são alguns dos maiores contaminantes da indústria farmacêutica. Estes compostos são produzidos em grandes quantidades e inevitavelmente fazem parte dos efluentes devido à impossibilidade de separação completa do fluxo de resíduos durante o processo de fabricação. Ao mesmo tempo, muitos desses medicamentos permanecem quase inalterados no corpo humano após cumprirem sua função e são excretados sem degradação, fato que contribui para a poluição ambiental (Bhardwaj *et al.*, 2022; Zofair *et al.*, 2022).

A alta industrialização da sociedade humana trouxe consigo uma elevada produção de compostos químicos extremamente recalcitrantes e prejudiciais ao meio ambiente. Estas substâncias são geralmente quimicamente estáveis, resistentes à atividade biológica, ao

calor e à radiação, entre outros agentes naturais de degradação (Bhardwaj *et al.*, 2022; Rodriguez Couto; Toca Herrera, 2006; Zofair *et al.*, 2022). Os níveis industriais de produção trazem consigo um elevado nível de acumulação destas substâncias em massas de água ou no solo, desde a eliminação pelas fábricas até à excreção por pessoas e animais domésticos e pecuários. A sua acumulação provoca efeitos alarmantes nos ecossistemas e, através do seu consumo, principalmente através de água contaminada, provoca doenças em pessoas e animais (Debnath; Saha, 2020; Rivera-Hoyos *et al.*, 2013; Rodriguez Couto; Toca Herrera, 2006; Zhou *et al.*, 2021; Zofair *et al.*, 2022).

Os atuais processos de tratamento de resíduos industriais são, na sua maioria, excessivamente dispendiosos, ineficientes na remoção de contaminantes e, por vezes, transformam compostos nocivos em outros ainda mais problemáticos do que aqueles que os originaram. Para resolver este grande problema ambiental, os cientistas estão investigando vigorosamente alternativas mais ecológicas, economicamente viáveis e menos dispendiosas (Kyomuhimbo; Brink, 2023; Zofair *et al.*, 2022).

A biorremediação tem sido amplamente estudada pelo seu baixo custo, baixa formação de compostos mais poluentes do que aqueles que lhe deram origem e pela integração dos seus produtos na natureza ou em novos processos produtivos, valorizando assim os resíduos industriais através de uma economia circular verde. A biodegradação por microrganismos, bactérias e fungos, apresenta uma alternativa tentadora embora tenha desvantagens como a geração de muitos metabólitos residuais e biomassa microbiana típica do crescimento celular que, embora biodegradáveis, se tornarão novos resíduos a serem tratados (Debnath; Saha, 2020; Kyomuhimbo; Brink, 2023; Zofair *et al.*, 2022). Neste cenário, a utilização de enzimas para degradação se apresenta como a solução mais atrativa, pois por serem biocatalisadores não necessitam de substratos como complementos ao processo (como microrganismos para seu desenvolvimento), podendo ser reaproveitados por diversos ciclos. Entre as enzimas com melhor desempenho até o momento estão as enzimas fúngicas, como lignina peroxidase, manganês peroxidases e lacases (Kyomuhimbo; Brink, 2023; Zofair *et al.*, 2022).

2.3 ENGENHARIA DE BIOCATALISADORES: INTERFACES DE IMOBILIZAÇÃO E IMPRESSÃO 3D

A aplicabilidade industrial das lacases em processos de biorremediação tem sido amplamente investigada, com destaque para aquelas secretadas pelo fungo filamentoso *Aspergillus niger*. Este microrganismo é valorizado biotecnologicamente por sua capacidade

de produzir altos títulos de enzimas extracelulares robustas, tolerantes a amplas faixas de pH e temperatura. No entanto, apesar da alta eficiência intrínseca das lacases de *A. niger* na oxidação de compostos fenólicos recalcitrantes, sua implementação em larga escala é severamente limitada pela instabilidade operacional da enzima livre. Em solução, estas proteínas estão suscetíveis à desnaturação, proteólise e inibição pelo próprio produto da reação, além da inviabilidade econômica decorrente da impossibilidade de recuperação e reutilização do biocatalisador (ARSALAN *et al.*, 2020; LIN *et al.*, 2017; PING *et al.*, 2008).

Diante deste cenário, a imobilização em suportes insolúveis consolida-se como a estratégia central de engenharia enzimática. O objetivo primordial é converter o sistema homogêneo em heterogêneo, visando proteger a estrutura terciária da proteína, maximizar sua estabilidade térmica e operacional, e permitir ciclos sucessivos de uso. A eficácia desse processo, contudo, depende intrinsecamente da seleção criteriosa do método de fixação e da compatibilidade com as propriedades físico-químicas da lacase fúngica (LIN *et al.*, 2017). A Adsorção Física destaca-se pela simplicidade e baixo custo, preservando o sítio ativo da enzima através de interações fracas. Embora vantajoso para enzimas sensíveis, a reversibilidade dessas forças frequentemente acarreta a lixiviação (*leaching*) da enzima para o meio reacional quando submetida a flutuações de pH, força iônica ou altas taxas de fluxo. Em contrapartida, a Ligação Covalente oferece uma fixação robusta e irreversível através da formação de vínculos multipontuais entre o suporte e os resíduos de aminoácidos da superfície da lacase (geralmente lisinas). Isso elimina o risco de lixiviação, conferindo rigidez estrutural que previne a desnaturação térmica. Todavia, essa rigidez excessiva pode induzir alterações conformacionais deletérias ou bloquear estericamente o acesso do substrato ao sítio ativo, exigindo por vezes a quelação prévia de íons estruturais (como Cu^{2+}) ou o uso de substratos protetores durante a imobilização para manter a orientação correta da molécula (BAIG *et al.*, 2015).

Sob outra perspectiva, técnicas de confinamento físico, como o Aprisionamento (*Entrapment*) e o Encapsulamento, isolam a enzima em microambientes protegidos, simulando o ambiente celular natural. Matrizes poliméricas biocompatíveis, como hidrogéis de alginato de cálcio e quitosana, são frequentemente empregadas para proteger as lacases de *A. niger* contra proteases externas e estresse mecânico, sem promover modificação química direta na proteína (KHAN *et al.*, 2020). A quitosana, em particular, tem sido explorada em sistemas híbridos avançados, como compósitos de quitosana-nanobiochar,

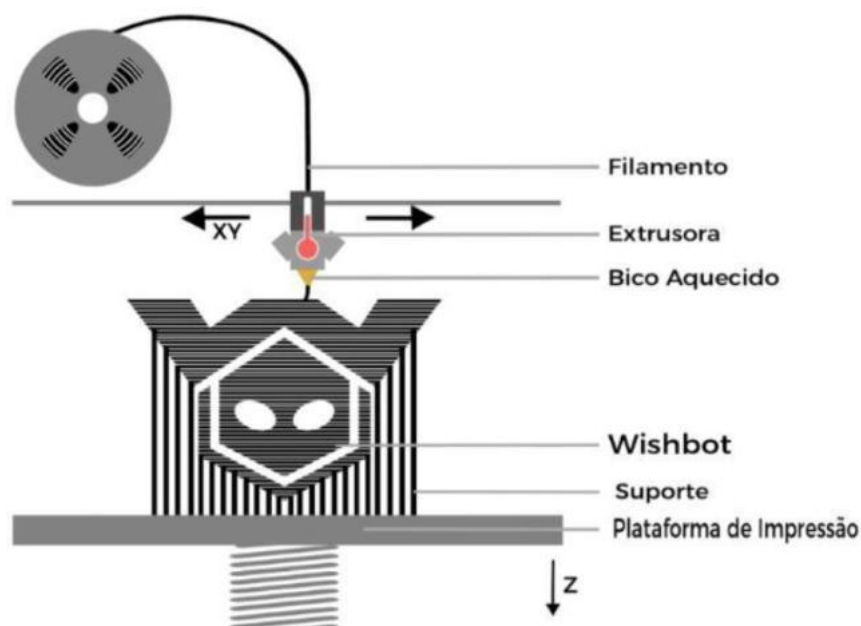
que combinam a proteção enzimática com a alta capacidade de adsorção de poluentes do suporte, criando um sistema de tratamento duplo (Naghdi *et al.*, 2019).

O advento da nanotecnologia revolucionou essas abordagens tradicionais através do uso de nanomateriais, notadamente as nanopartículas magnéticas de magnetita (Fe_3O_4). Estes suportes oferecem uma elevada área superficial específica para carga enzimática e introduzem uma vantagem operacional crítica: a separação magnética instantânea. Isso facilita drasticamente a recuperação do biocatalisador do efluente tratado, superando as dificuldades de filtração de suportes convencionais (Wang *et al.*, 2013). Além disso, observa-se frequentemente um efeito sinérgico onde o suporte nanométrico adsorve e concentra o contaminante próximo ao sítio ativo da enzima, potencializando a taxa de degradação.

Contudo, a eficácia química desses agentes deve ser complementada por uma arquitetura física que minimize as barreiras difusionais macroscópicas. É nesse cenário que a tecnologia de impressão 3D, especificamente via modelagem por deposição fundida (FDM), emerge como uma solução estratégica para o design de suportes customizados. Superando o papel tradicional de mera prototipagem rápida, a impressão 3D consolidou-se na infraestrutura de pesquisa como uma ferramenta para a fabricação de dispositivos funcionais (*labware*), permitindo a criação de matrizes com porosidade e geometria controladas. No contexto da química moderna, essa capacidade de customização permite que suportes poliméricos de baixo custo, como o C-PLA, substituam materiais comerciais dispendiosos, oferecendo estruturas que otimizam a dinâmica de fluidos e a área superficial disponível para a ancoragem enzimática (Alimi *et al.*, 2022; Booeshaghi *et al.*, 2019; Penny; Hilton, 2020).

Essa flexibilidade projetual introduz o conceito de "laboratório sob medida", onde a geometria do reator é desenhada especificamente para a cinética da reação ou para as necessidades do biocatalisador, algo inviável via métodos tradicionais de moldagem ou usinagem (Montaner; Penny; Hilton, 2023; Rao *et al.*, 2017). Dentre as tecnologias de MA disponíveis, destaca-se a Modelagem por Deposição Fundida (FDMTM), também referida como FFF (Fabricação por Filamento Fundido). O método fundamenta-se na extrusão controlada de termoplásticos, onde um filamento polimérico é aquecido até seu estado semilíquido e depositado seletivamente, camada por camada, para edificar a geometria tridimensional pré-definida em software CAD (*Computer-Aided Design*) (Figura 7).

Figura 7: Método de funcionamento da impressora.



Fonte: Wishbox Technologies , 2024.

A predominância da FDM neste cenário justifica-se não apenas pela acessibilidade dos equipamentos, mas pela vasta gama de materiais termoplásticos funcionais disponíveis. Polímeros como o Poliacido Lático (PLA), Polipropileno (PP) e o PETG oferecem diferentes graus de resistência química e térmica, permitindo a adequação do reator à natureza dos efluentes ou solventes utilizados (PHUNG HAI *et al.*, 2021). Além disso, a capacidade da FDM de criar canais internos complexos e estruturas de alta área superficial torna-a ideal para o desenvolvimento de microrreatores e sistemas de leito fixo estruturado, superando limitações de transferência de massa comuns em equipamentos convencionais.

Enquanto a técnica FDM fundamenta-se na extrusão física de termoplásticos, a Estereolitografia (SLA) representa o estado da arte em termos de precisão e acabamento superficial na manufatura aditiva (Melchels *et al.*, 2010). Este método baseia-se na fotopolimerização vat (*vat photopolymerization*), onde uma resina líquida fotossensível é solidificada seletivamente, camada por camada, através da incidência de um feixe de laser UV ou projetor de luz (DLP/LCD). A principal vantagem da SLA para aplicações biotecnológicas reside na sua capacidade de fabricar microestruturas com resoluções na ordem de 25 a 50 micrômetros (Ngo *et al.*, 2018), permitindo a criação de suportes com elevada área superficial específica e canais internos complexos, livres das ranhuras típicas

da deposição de filamentos, o que favorece a adesão homogênea do biofilme de *Aspergillus niger* (PARRA-CABRERA *et al.*, 2018).

3. METODOLOGIA

A metodologia experimental delineada para o desenvolvimento desta pesquisa foi estruturada em cinco etapas fundamentais, que abrangem desde o preparo do suporte até a interpretação estatística dos dados obtidos.

Figura 8: Fluxograma das etapas experimentais utilizadas neste trabalho.



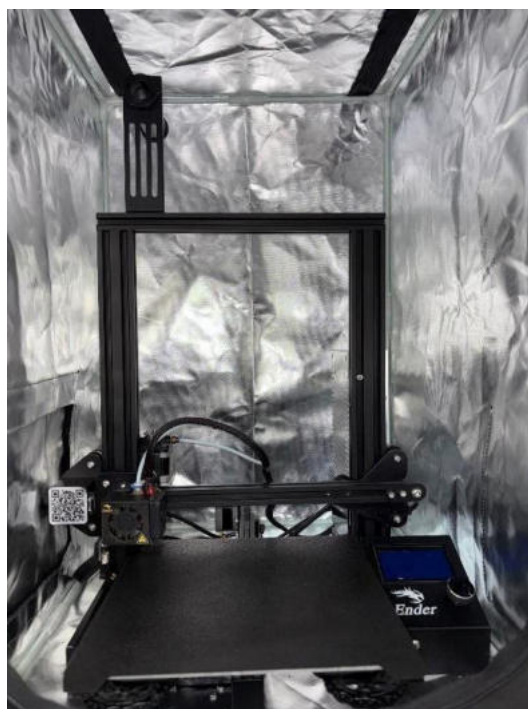
Elaborado pela própria autora.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 PREPARO E ATIVAÇÃO DO SUPORTE 3D

O design do suporte de imobilização baseou-se no conceito proposto por Hilton e colaboradores (Thavarajah *et al.*, 2023), que utiliza um suporte impresso em 3D acoplado a um agitador magnético para maximizar a transferência de massa e a formação de vórtex, conforme validado por modelos computacionais. Para atender às necessidades específicas de imobilização enzimática deste estudo, os suportes foram projetados e fabricados pela FlowPrint (Incubadora/UFRJ), e obtidos por colaboração. Foi empregada a tecnologia de Modelagem por Deposição Fundida (FDM), utilizando uma impressora Creality™ Ender v2 (Figura 9). O material selecionado foi o filamento compósito Sunlu PLA Carbon Fiber (C-PLA), cuja matriz é reforçada com fibras de carbono concilia a sustentabilidade do polímero com propriedades superficiais que favorecem a ancoragem proteica.

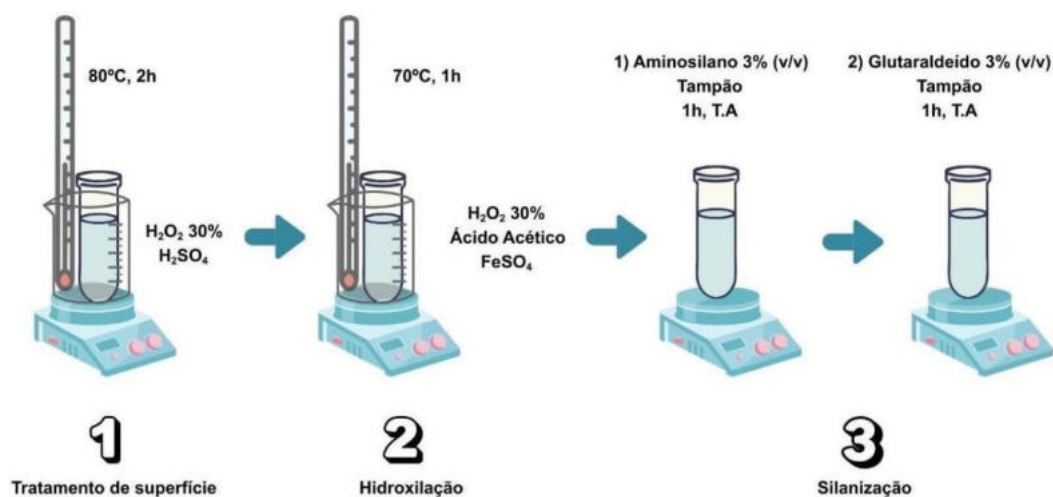
Figura 9: Impressora 3D utilizada na fabricação do suporte.



Fonte: Própria autora.

Para a ativação do suporte, foi desenvolvida uma marcha analítica estruturada em três etapas principais: (1) tratamento de superfície, (2) hidroxilação e (3) silanização. Na terceira etapa, procedeu-se à aplicação de aminossilano seguida pelo uso de glutaraldeído, conforme detalhado na Figura 10.

Figura 10: Etapas da marcha analítica para ativação do suporte: tratamento de superfície, hidroxilação e silanização.



Elaborado pela própria autora.

4.1.1 Tratamento de Superfície

O tratamento de superfície dos suportes de C-PLA (1,8 g) foi conduzido em tubos de ensaio de 25 mL, equipados com barras magnéticas de 13 mm x 8 mm para garantir a homogeneidade térmica. A oxidação foi realizada utilizando uma solução composta por 4,32 mL de H_2SO_4 P.A. (99 %) e 6,48 mL de H_2O_2 (30 %), mantida a 80 °C por 2 horas sob agitação constante. A ação oxidativa gera micro-erosões e amplia a rugosidade superficial, aumentando a área disponível para interação melhorando a eficiência das etapas de funcionalização e imobilização. (Figura 11).

Figura 11: Processo de ativação da superfície do suporte.



Fonte: Autora.

4.1.2 Hidroxilação

Após a etapa inicial de oxidação, a solução reacional foi descartada e o suporte de C-PLA foi submetido a um processo de lavagem em banho ultrassônico com 11 mL de água destilada por 30 minutos, visando a remoção de resíduos ácidos remanescentes. Sequencialmente, procedeu-se à funcionalização secundária mediante a adição de 3,6 mL de ácido acético, 5,04 mL de H_2O_2 (30%) e 144 mg de FeSO_4 . A reação foi conduzida a 70 °C sob agitação constante.

Nessa etapa do processo ocorre a geração de radicais hidroxila ($\bullet\text{OH}$), que são espécies extremamente reativas e de forte caráter oxidante. Esses radicais passam a interagir diretamente com a superfície do C-PLA previamente tratado, atacando suas ligações e promovendo modificações químicas adicionais (Figura 12). Como consequência, há a inserção de novos grupos hidroxila ($-\text{OH}$) ao longo da superfície do material, intensificando seu grau de funcionalização. Esse aumento na densidade de grupos funcionais favorece de maneira significativa as etapas subsequentes de modificação, uma vez que cria mais sítios ativos disponíveis para ancoragem.

Figura 12: Aspecto visual do suporte de C-PLA após a etapa de funcionalização por radicais hidroxila ($\bullet\text{OH}$).



Fonte: Autora.

4.1.3 Silanização

4.1.3.1 *Aminossilano*

Após a funcionalização oxidativa, os suportes foram submetidos a uma nova lavagem com água destilada em banho ultrassônico por 30 minutos para assegurar a neutralidade da superfície. Subsequentemente, procedeu-se à etapa de silanização utilizando uma solução de aminossilano (3% v/v) em tampão citrato. A reação foi conduzida sob agitação constante, em temperatura ambiente, por um intervalo de 1 hora.

Nessa etapa do processo, o material C-PLA-OH é submetido à reação com um aminossilano, composto caracterizado por conter simultaneamente um grupo amina (-NH_2) e unidades siloxânicas (-Si-O-Si-). As porções siloxânicas do aminossilano são capazes de interagir com os grupos hidroxila presentes na superfície do C-PLA-OH por meio de reações de condensação, resultando na formação de ligações covalentes do tipo Si-O-C . Após essa ancoragem, o grupo amina remanescente permanece exposto na superfície do material, conferindo ao C-PLA uma funcionalização rica em grupos amina, os quais servirão como sítios ativos para modificações químicas posteriores ou processos de imobilização. (Figura 13).

Figura 13: Aspecto do suporte C-PLA-OH após o processo de silanização.



Fonte: Autora.

4.1.3.2 Glutaraldeído

A solução anterior foi removida e os suportes foram submetidos à ativação com glutaraldeído (3% v/v) em tampão citrato. A reação ocorreu por 1 hora a 25 °C sob agitação contínua. Durante essa etapa, uma das funções aldeído presentes no glutaraldeído reage diretamente com os grupos amina expostos na superfície do C-PLA-Si, originando uma ligação do tipo imina (C=N), característica das reações de condensação entre aminas e aldeídos (Figura 14). A formação dessa imina fixa o glutaraldeído ao suporte, mas mantém disponível o segundo grupo aldeído da molécula, que permanece reativo. Essa

funcionalidade livre permite que o glutaraldeído estabeleça uma segunda interação covalente, agora com grupos funcionais presentes na enzima, atuando assim como uma ponte molecular que conecta o suporte ao biocatalisador de forma estável.

Figura 14: Aspecto do suporte ativado pronto para a imobilização.



Fonte: Autora.

4.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

A otimização das condições operacionais envolvidas no processo de imobilização da lacase foi desenvolvida por meio de um Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR), uma abordagem amplamente utilizada em estudos de superfície de resposta devido à sua capacidade de investigar simultaneamente vários parâmetros experimentais e as interações existentes entre eles. Essa metodologia permite ajustar um modelo de regressão quadrático, o que é essencial para detectar efeitos curvilíneos e, conseqüentemente, identificar regiões que representem condições ótimas de operação, seja de máxima eficiência ou de mínima resposta indesejada.

No contexto deste trabalho, o planejamento experimental foi estruturado de modo a avaliar profundamente a influência de três fatores considerados determinantes para o desempenho da imobilização enzimática: o pH do meio reacional, a concentração de lacase adicionada ao sistema e a concentração do tampão utilizado durante o procedimento. Cada

variável foi estudada dentro de uma faixa cuidadosamente selecionada, permitindo a construção de uma superfície de resposta robusta e estatisticamente confiável.

O pH foi investigado em um intervalo que variou de valores mais ácidos até valores próximos da neutralidade, situando-se entre 3,0 e 7,0; a concentração da enzima foi modulada entre 0,5 e 3,5 mg/mL, de forma a contemplar tanto condições de baixa disponibilidade enzimática quanto situações de maior saturação; e, por fim, a concentração do tampão foi ajustada entre 0,1 e 0,5 mM, buscando compreender como a força iônica e a estabilidade do meio poderiam interferir na eficiência da imobilização. (Tabela 4)

Tabela 4: Variáveis utilizadas no planejamento, com variações de pH, concentração de tampão e de enzima.

Código	X1	X2	X3
1	3,81	1,11	0,18
2	6,19	1,11	0,18
3	3,81	2,89	0,18
4	6,19	2,89	0,18
5	3,81	1,11	0,42
6	6,19	1,11	0,42
7	3,81	2,89	0,42
8	6,19	2,89	0,42
9	3,00	2,00	0,30
10	7,00	2,00	0,30
11	5,00	0,50	0,30
12	5,00	3,50	0,30
13	5,00	2,00	0,10
14	5,00	2,00	0,50
15	5,00	2,00	0,30
16	5,00	2,00	0,30
17	5,00	2,00	0,30

A matriz experimental resultante foi composta por 17 ensaios distribuídos de maneira estratégica para garantir a exploração adequada do espaço experimental. Esse conjunto incluiu experimentos em pontos axiais, centrais e fatoriais, assegurando a obtenção de informações suficientes para a construção do modelo matemático e para a análise estatística

subsequente. Assim, o DCCR permitiu não apenas avaliar os efeitos isolados de cada variável, mas também identificar sinergias e antagonismos entre os fatores estudados, fornecendo uma visão abrangente e detalhada do processo de imobilização da lacase.

4.3 Protocolo de Imobilização

A lacase de *Myceliophthora thermophila* expressa em *Aspergillus niger* foi obtida por meio de colaboração com o Laboratório de Biocatálise e Bioquímica Tecnológica (LABBIT), pertencente à Escola de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ). A enzima foi recebida em forma de extrato bruto e mantida sob refrigeração a 4 °C para a preservação de sua estabilidade catalítica até o momento da utilização nos ensaios de imobilização.

Para a etapa de imobilização, o suporte estruturado (previamente ativado) foi imerso em uma solução, contendo a enzima e 18 mL de tampão citrato. O procedimento de acoplamento transcorreu sob agitação constante por um período de 16 horas (*overnight*) a 25 °C, conforme esquematizado na Figura 15. Essas condições foram estabelecidas para assegurar a formação das ligações covalentes entre a biomolécula e a matriz funcionalizada.

Figura 15: Reação de imobilização da Lacase.



Fonte: Autora.

Nesta fase do processo, ocorre a etapa de imobilização da enzima no suporte C-PLA-Si previamente funcionalizado com glutaraldeído. A lacase, assim como diversas outras enzimas, apresenta em sua superfície grupos amino expostos, predominantemente os grupos ϵ -amino pertencentes aos resíduos de lisina. Essas funcionalidades atuam como sítios nucleofílicos capazes de reagir com o segundo grupo aldeído do glutaraldeído que permanece disponível após a etapa anterior de ativação do suporte. A interação entre o grupo amino da enzima e o aldeído livre resulta na formação de uma nova ligação imina ($C=N$), estabelecendo assim um vínculo covalente entre a lacase e o material C-PLA-Si. Essa ligação estável garante a fixação irreversível da enzima à superfície do suporte, possibilitando sua utilização em processos catalíticos subsequentes sem perda significativa de atividade.

4.3.1 Quantificação das proteínas

A concentração proteica das amostras foi determinada empregando o método colorimétrico de Bradford, um procedimento amplamente utilizado devido à sua sensibilidade, rapidez e facilidade de execução. Inicialmente, preparou-se uma série de diluições da proteína padrão BSA, seguindo as concentrações estabelecidas na tabela 5. Em tubos separados, adicionou-se o reagente de Bradford tanto às soluções padrão quanto às amostras desconhecidas. Esse reagente consiste em uma solução ácida contendo o corante Coomassie Brilhante Blue G-250, o qual sofre alteração no espectro de absorção ao se ligar às proteínas. Após a adição, as misturas foram cuidadosamente homogeneizadas e deixadas em repouso por cerca de cinco minutos à temperatura ambiente, período necessário para o completo desenvolvimento da coloração característica do método.

Tabela 5: Valores para determinação da curva padrão.

Tubo	Volume Padrão (uL)	Fonte do Padrão	Volume do Diluente (uL)	Proteína Final (ug/mL)
1	10	2 mg/mL stock	790	25
2	10	2 mg/mL stock	990	20
3	6	2 mg/mL stock	794	15
4	500	tubo 2	500	10
5	500	tubo 4	500	5
6	500	tubo 5	500	2,5
7	500	tubo 6	500	1,25
8 (blanc)	-	-	500	0

Posteriormente, as leituras espectrofotométricas foram realizadas no Spectra Max M2e em 595 nm, comprimento de onda correspondente ao máximo de absorção do complexo formado entre o corante e as proteínas presentes nas amostras.

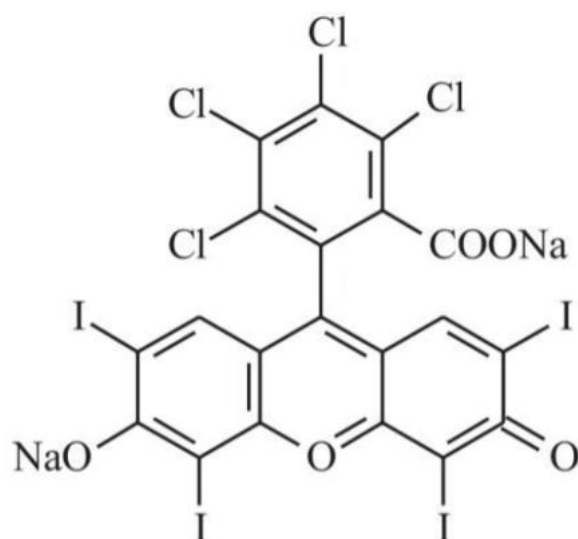
A análise dos parâmetros da equação revela aspectos importantes sobre a sensibilidade do ensaio. O coeficiente angular (0,0095) representa a sensibilidade do método cromogênico, enquanto o intercepto linear (-0,0089), muito próximo de zero, sugere uma interferência mínima de reagentes ou da matriz no "branco" da reação.

Com a validação da curva padrão, foi possível determinar a concentração proteica das amostras desconhecidas (extrato bruto e sobrenadantes de imobilização) por interpolação direta. É importante ressaltar que a quantificação precisa de proteínas é crítica para o cálculo do Rendimento de Imobilização. Ao comparar a proteína total oferecida inicialmente com a proteína residual encontrada no sobrenadante após o contato com o suporte impresso em 3D, será possível inferir a quantidade de enzima que efetivamente adsorveu ou ficou retida na matriz polimérica.

4.4 Biodegradação do Corante Rosa de Bengala

A capacidade catalítica da lacase imobilizada na descoloração de efluentes sintéticos. O corante modelo utilizado neste estudo foi o Rosa de Bengala (CAS 632-69-9), classificado como um corante xantênico da classe azo, conferem alta solubilidade em meio aquoso e carga negativa em pH operacional (Figura 16). Este corante apresenta um pico de absorção máxima em 545 nm. A escolha deste composto justifica-se por sua ampla aplicação na indústria têxtil e pelo potencial impacto ambiental decorrente de seu descarte inadequado, o que o torna um contaminante de interesse para processos de biodegradação.

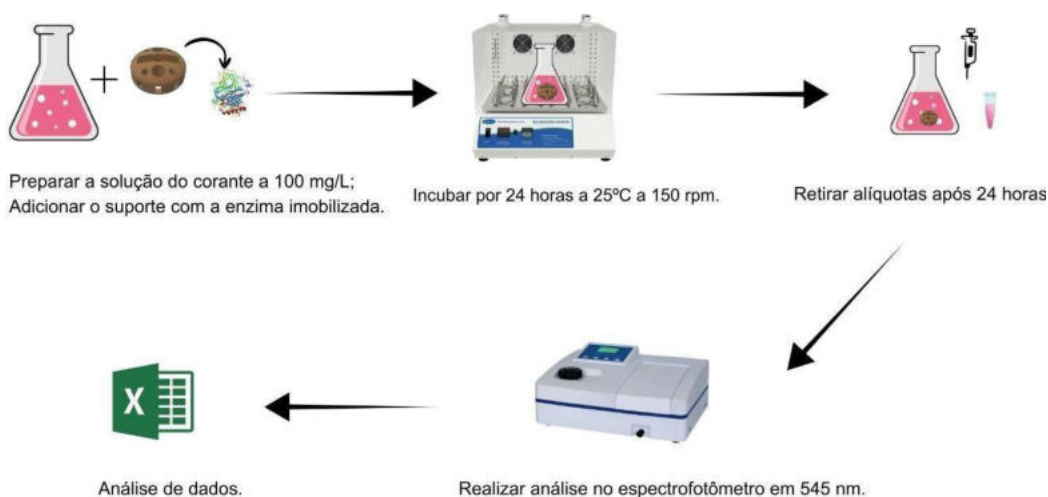
Figura 16: Estrutura do corante Rosa de Bengala.



Fonte: Adaptado, PERUSSI, 2007.

Os experimentos de biodegradação foram preparados em água destilada na concentração de 100 mg/L, conduzidos em frascos Erlenmeyer de 250 mL, contendo um volume reacional de 100 mL da solução de corante. Em cada sistema, introduziu-se integralmente um suporte estruturado de C-PLA (Ácido Polilactídeo acoplado a Carbono), previamente imobilizado com lacase sob as condições otimizadas de pH e carga enzimática (Figura 17).

Figura 17: Fluxograma da abordagem utilizada para biodegradação.



Fonte: Autora.

Os reatores foram submetidos à incubação em agitador orbital (*shaker*) a uma frequência de 150 rpm e temperatura constante de 25°C, por um período operacional de 24 horas. Após o período de incubação, alíquotas foram submetidas à análise espectrofotométrica para determinação da concentração residual, onde a leitura foi realizada no comprimento de onda de máxima absorção do corante 545 nm, e os dados analisados no Microsoft Excel.

Os ensaios foram realizados em triplicata, como mostrado na Figura 18. Paralelamente, conduziram-se controles utilizando suportes de C-PLA isentos de enzima, visando quantificar a contribuição da adsorção física do corante pelo suporte no processo global de remoção. A eficiência de descoloração foi expressa conforme a seguinte equação:

$$\%Descoloração = \left(\frac{I - F}{I} \right) \times 100$$

Onde:

- I = Absorbância inicial;
- F = Absorbância do meio descolorido.

Figura 18: Esquema reacional da biodegradação do corante Rosa Bengala.



Fonte: Autora.

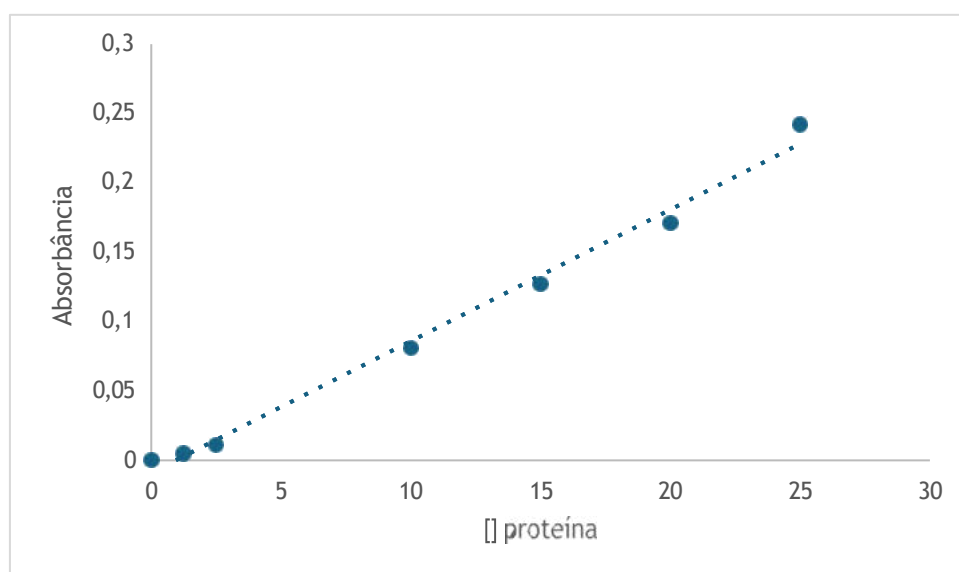
Após a etapa inicial, os suportes foram submetidos a novos ciclos reacionais para a avaliação da capacidade de reuso.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 VALIDAÇÃO DO MÉTODO DE QUANTIFICAÇÃO E EFICIÊNCIA DE IMOBILIZAÇÃO

A quantificação de proteínas totais constitui uma etapa fundamental para a caracterização do extrato enzimático, servindo como base para a normalização da atividade enzimática (cálculo da atividade específica) e para a determinação da eficiência de carregamento no suporte. A curva analítica foi construída correlacionando a absorbância (eixo Y) em função da concentração do padrão de albumina sérica bovina (BSA) (eixo X), conforme apresentado na Figura 19.

Figura 19: Curva analítica para quantificação de proteínas totais. A reta representa o ajuste linear dos dados experimentais ($R^2 = 0,9915$).



Os dados experimentais foram submetidos à regressão linear, resultando na Equação 1:

$$y = 0,0095x - 0,0089 \text{ (Equação 1)}$$

Onde:

- y =Absorbância;
- x =Concentração de proteína.

O elevado coeficiente de determinação obtido ($R^2 = 0,9915$) atesta a robustez do modelo, indicando que mais de 99% da variação na absorbância é explicada pela concentração de proteína. Tal linearidade evidencia a precisão do método analítico e a conformidade à Lei de Beer-Lambert na faixa de trabalho, garantindo a confiabilidade dos dados de balanço de massa.

Apoiada na precisão analítica da curva de BSA, a eficiência do processo de imobilização da lacase no suporte de C-PLA (impressão 3D) foi determinada de forma indireta. A quantidade de enzima retida foi calculada pela diferença entre a concentração inicial e a concentração residual no sobrenadante, conforme a Equação abaixo:

$$EI (\%) = \left(\frac{Abs_n - Abs_i}{Abs_n} \right) \times 100 \quad (\text{Equação 2})$$

Onde:

- EI é a eficiência de imobilização (%);
- Abs_n é a Absorbância de proteína não imobilizada (mg/mL);
- Abs_i é a Absorbância de proteína não imobilizada (mg/mL).

Os resultados obtidos para as 17 condições experimentais, expressos em termos de capacidade de carga (mg/g de suporte) e eficiência (%), estão sintetizados na Tabela 6 e detalhados no perfil de imobilização da Figura 20.

Figura 20: Gráfico de barras sobre a eficiência da imobilização.

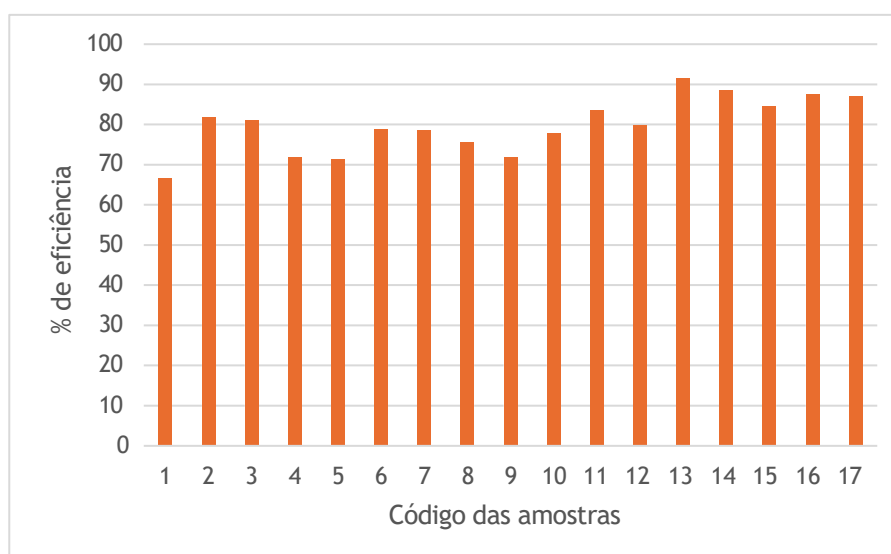


Tabela 6: Capacidade de carga (mg/g) e eficiência de imobilização (%) da lacase para as diferentes condições experimentais ensaiadas.

Código	mg/g de suporte	Eficiência de imobilização (%)
1	38,842	66,69
2	45,158	81,84
3	68,316	81,06
4	46,211	71,78
5	45,158	71,35
6	38,842	78,89
7	59,895	78,4
8	53,579	75,66
9	58,842	71,93
10	93,579	77,85
11	62,000	83,55
12	50,421	79,77
13	51,474	91,56
14	47,263	88,44
15	36,737	84,56
16	44,105	87,61
17	43,053	87,07

A análise do perfil revelou um desempenho satisfatório do protocolo, com valores de eficiência oscilando majoritariamente entre 65% e 91%. Destaca-se que 8 das 17 amostras superaram a marca de 80% de eficiência, com a Amostra 13 atingindo o pico máximo de retenção (91,56%). Estes dados indicam que a afinidade entre a matriz polimérica do C-PLA e a enzima fúngica foi estabelecida com sucesso, resultando em uma deposição significativa da proteína na estrutura do suporte.

Observa-se, contudo, uma distinção importante entre a eficiência percentual e a capacidade absoluta de carga. A Amostra 10 apresentou a maior incorporação proteica por massa de suporte (93,579 mg/g). Este valor elevado sugere que o suporte possui uma porosidade ou área superficial disponível capaz de acomodar grandes densidades enzimáticas, embora a eficiência nessa condição específica (77,85%) tenha sido inferior à da amostra 13. Embora uma eficiência próxima a 90% seja um indicativo excelente de migração proteica, isso não garante linearmente que toda essa biomassa permaneça cataliticamente ativa. A elevada capacidade de carga observada (chegando a >90 mg/g) pode desencadear fenômenos de superlotação molecular (*crowding*).

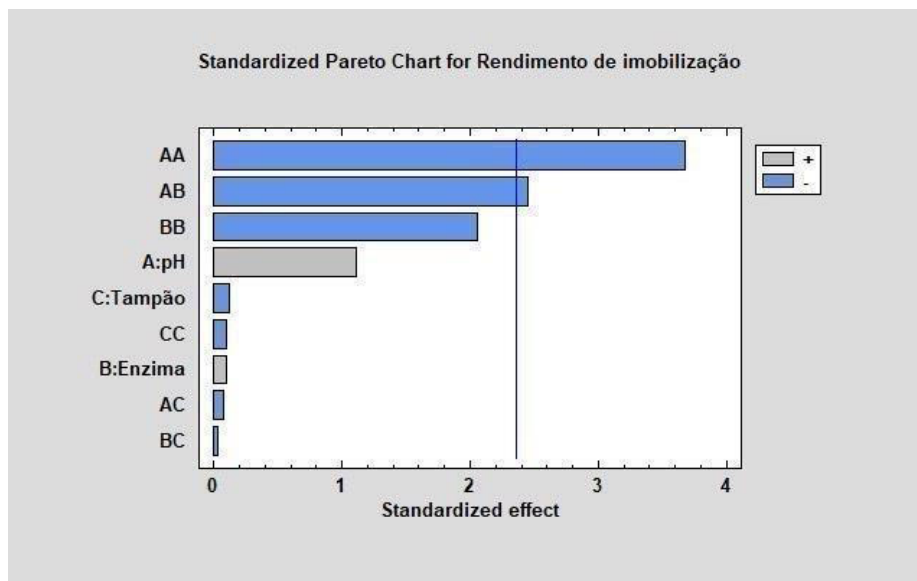
Quando a carga proteica é excessivamente alta, a orientação desfavorável da enzima sobre a superfície ou o impedimento físico entre moléculas vizinhas podem levar ao bloqueio estérico do sítio ativo (ARSALAN *et al.*, 2020). Portanto, a condição da Amostra 13 parece representar o melhor equilíbrio entre aproveitamento do material biológico e densidade de cobertura. Para compreender como as variáveis experimentais (pH, temperatura, tempo) governam esses fenômenos e impactam a atividade final, os resultados foram integrados a uma análise multivariada a seguir.

5.2 Análise do Delineamento Experimental: Influência do pH e da Carga Enzimática

A modelagem matemática do processo, conduzida via Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR), apresentou coeficientes de determinação (R^2) de 0,77 para o rendimento de imobilização (Y_1) e 0,80 para a atividade enzimática (Y_2). Estes valores indicam que, apesar da variabilidade inerente a bioprocessos e das complexas interações de interface discutidas anteriormente, os modelos de segunda ordem ajustados são estatisticamente robustos e preditivos para a região estudada.

A hierarquização dos efeitos sobre a eficiência física do processo pode ser visualizada através da análise do Gráfico de Pareto para o Rendimento de Imobilização (Figura 21), utilizando o Statgraphics Centurion versão 19.7.02. A análise revela que o processo é governado predominantemente por comportamentos de segunda ordem e interações, em detrimento de efeitos lineares isolados. O efeito de maior magnitude sobre o rendimento foi o termo quadrático do pH (AA). A significância deste termo, associada ao sinal negativo do efeito padronizado, indica que a superfície de resposta apresenta uma curvatura convexa (concavidade voltada para baixo) ao longo do eixo do pH.

Figura 21: Gráfico de Pareto dos efeitos estimados para o Rendimento de Imobilização.

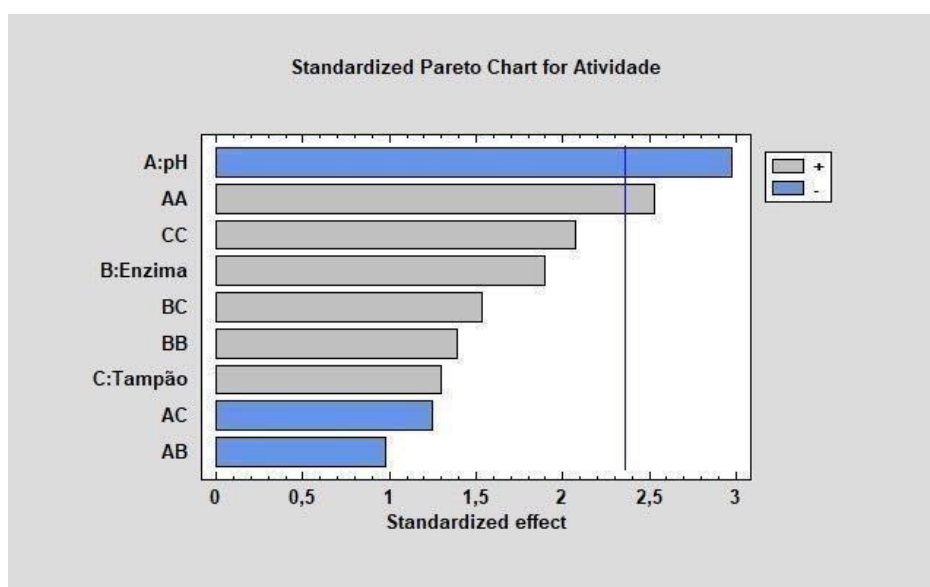


Isto sugere a existência de um ponto de pH ótimo bem definido dentro da região experimental investigada, onde o rendimento é maximizado. Desvios para valores de pH superiores ou inferiores a este ponto resultam em decréscimo da eficiência de imobilização, provavelmente devido a alterações no estado de ionização dos grupos funcionais tanto do suporte quanto da enzima, afetando a afinidade de ligação. Adicionalmente, observou-se significância estatística na interação entre o pH e a Concentração de Enzima (AB), com efeito negativo. O efeito negativo implica um comportamento antagônico: o ajuste do pH para otimização do rendimento é dependente da carga enzimática utilizada. Em termos práticos, o aumento simultâneo de ambos os fatores tende a desfavorecer o rendimento, sugerindo que altas concentrações de enzima podem requerer ajustes específicos de pH para evitar saturação do suporte ou impedimento estérico.

Para a variável resposta Atividade (Figura 22), o perfil de influências difere substancialmente do observado para o rendimento, evidenciando a complexidade de conciliar alta imobilização com a manutenção da atividade catalítica. O efeito linear do pH (A) apresentou-se como a variável de maior impacto, com sinal negativo. Estatisticamente, isso indica uma correlação inversa dentro da faixa estudada: o deslocamento do pH para níveis mais altos resulta em uma redução significativa da atividade enzimática recuperada. Este comportamento é condizente com a natureza proteica das enzimas, que são suscetíveis à desnaturação ou alterações conformacionais que afetam o sítio ativo quando expostas a

pHs fora de sua faixa de estabilidade. Contudo, a análise não se resume à linearidade. O termo quadrático do pH (AA) mostrou-se significativo e positivo. A presença deste termo quadrático positivo denota uma curvatura côncava (formato de "U" ou uma desaceleração da queda) na superfície de resposta. Isso sugere que, embora a tendência geral seja de queda da atividade com o aumento do pH, existe uma região onde essa queda é atenuada. As variáveis relacionadas à concentração de enzima (B) e tampão (C), bem como suas interações, não ultrapassaram o limite de significância ($p > 0,05$). Isso implica que, nas condições testadas, a atividade recuperada foi robusta às variações de massa de enzima e força iônica do meio, sendo o pH o fator limitante.

Figura 22: Gráfico de Pareto dos efeitos estimados para a Atividade Enzimática.



A análise conjunta dos diagramas de Pareto evidencia que, enquanto o Rendimento depende de um ajuste fino de pH para encontrar um ponto de máximo, a Atividade tende a decair com o aumento deste mesmo parâmetro. Portanto, a otimização global do processo não deve focar na maximização isolada de uma única variável, mas sim na busca por uma condição de compromisso onde o pH favoreça a ligação enzima-suporte sem promover a inativação excessiva do biocatalisador. Para contextualizar este desafio frente ao estado da técnica, a Tabela 7 apresenta um comparativo com a literatura recente, demonstrando como diferentes estratégias de imobilização lidam com esse *trade-off*.

Tabela 7: Comparação dos parâmetros de imobilização obtidos neste estudo com dados da literatura recente.

Referência	Suporte / Método	Condição Ótima	Rendimento (%)	Atividade Recuperada (%)
Mendes <i>et al.</i> (2011)	Matriz Polimérica	pH 6,0; 30°C	85,5	60,2
Goncalves <i>et al.</i> (2022)	Suporte Hidrofóbico	pH 7,0; 4h	92	45
Este Trabalho	C-PLA	pH 3,8; Alta [Enzima]	78,4	83

A análise da Tabela 6 evidencia que, embora o rendimento obtido neste trabalho seja comparável aos pares, a atividade recuperada em pH ácido (3,8) é superior a muitos sistemas reportados em pH neutro, validando a estratégia de priorizar a integridade conformacional da enzima.

Por fim, a modelagem matemática gerada pelo DCCR foi validada como ferramenta essencial para prever esse ponto de operação ideal. A Tabela 8 apresenta a validação experimental nas condições otimizadas sugeridas pelo modelo (pH 3,8 e Enzima nível +1).

Tabela 8: Validação experimental dos modelos matemáticos nas condições otimizadas (pH 3,8 e Enzima nível +1).

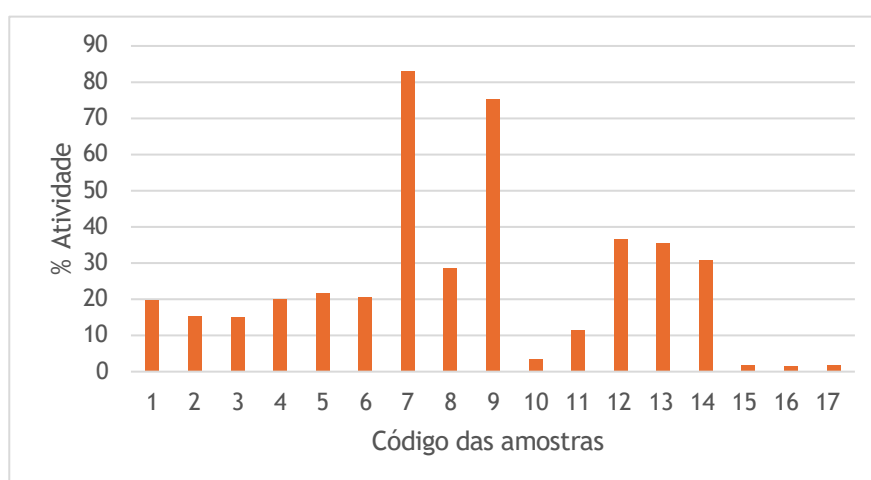
Variável Resposta	Valor Predito pelo Modelo (%)	Valor Experimental (Real) (%)	Erro Relativo (%)
Rendimento	81,04	78,40	3,37
Atividade	78,18	82,96	5,76

Os dados da tabela acima demonstram erros relativos baixos (inferiores a 5%), confirmando a alta preditividade das equações geradas e a viabilidade técnica da condição de compromisso estabelecida.

5.3 Avaliação da Capacidade Catalítica na Biodegradação do Rosa de Bengala

A avaliação da atividade catalítica da lacase imobilizada, apresentada na Figura 23, revela um cenário complexo e dependente das condições do meio, contrastando com a eficiência de imobilização que se manteve alta e constante. Enquanto a retenção física da proteína no suporte foi bem-sucedida na maioria dos ensaios, a atividade recuperada variou drasticamente, de níveis residuais (< 2%) a picos de alta performance (> 80%). Essa disparidade evidencia que a retenção de proteína não é sinônimo de preservação de funcionalidade.

Figura 23: Perfil de atividade relativa (%) da lacase de imobilizada em suportes de C-PLA sob diferentes condições experimentais.



A análise detalhada do planejamento experimental (Tabela 1) permite elucidar os fatores determinantes para esse comportamento. O melhor resultado foi obtido na Amostra 7, com uma atividade relativa de aproximadamente 83%. As condições deste ensaio como o pH ácido (3,81), a alta concentração de enzima (2,89 mg/mL) e a alta concentração de tampão (0,42 M), sugerem um efeito sinérgico favorável. O pH ácido é condizente com o pH ótimo típico de lacases fúngicas, que frequentemente operam melhor na faixa de 3,0 a 4,0. Além disso, a alta força iônica (tampão 0,42 M) pode ter estabilizado a estrutura terciária da enzima durante a adsorção na superfície hidrofóbica da resina, enquanto a alta carga enzimática (2,89 mg/mL) compensou possíveis perdas por inativação ou impedimento estérico, garantindo uma densidade suficiente de sítios ativos funcionais na superfície do suporte.

Corroborando a preferência ácida da enzima, a Amostra 9 apresentou o segundo melhor desempenho (~75%). Este ensaio foi conduzido no pH mais baixo do planejamento (pH 3,00). O fato de a Amostra 9 (pH 3,00) e a Amostra 7 (pH 3,81) serem os destaques isolados do experimento indica fortemente que a acidez do meio é o parâmetro crítico para a manutenção da atividade da lacase neste sistema.

Em contrapartida, o comportamento das amostras do ponto central (15, 16 e 17) revela um fenômeno de inativação severa. Nestas triplicatas, conduzidas em pH 5,00, a atividade foi praticamente nula (< 2%), apesar de a eficiência de imobilização ter sido superior a 85%, conforme a figura 14. Isso sugere que, em pH 5,00, a enzima interage fortemente com o suporte (adsorve bem), mas sofre alterações conformacionais irreversíveis ou bloqueio do sítio ativo, perdendo sua capacidade catalítica. O mesmo padrão de inativação é observado na Amostra 10, realizada em pH 7,00 (atividade < 5%), confirmando que a alcalinização ou neutralidade do meio desfavorece a estabilidade operacional desta lacase quando imobilizada.

Interessantemente, observa-se uma anomalia nas Amostras 13 e 14, que também foram realizadas em pH 5,00, mas apresentaram atividades moderadas (~30-35%), superiores aos pontos centrais (15-17). A diferença reside na concentração do tampão: a Amostra 13 usou tampão muito diluído (0,10 M) e a 14 muito concentrado (0,50 M), enquanto os pontos centrais usaram 0,30 M. Isso pode indicar que, em pHs menos favoráveis (como 5,0), a força iônica desempenha um papel complexo na modulação da atividade, onde concentrações extremas de sais podem oferecer alguma proteção contra a desnaturação que ocorre na concentração intermediária (0,30 M), embora nenhum desses cenários supere o desempenho obtido em pH ácido.

Portanto, os dados permitem concluir que o protocolo otimizado para este sistema de imobilização 3D deve priorizar condições ácidas (pH entre 3,0 e 3,8) combinadas com altas cargas enzimáticas. A imobilização em pH 5,0, embora eficiente na captura da proteína, resulta em um biocatalisador inerte, destacando a importância de otimizar não apenas a química de superfície, mas o microambiente da reação.

5.4. Estabilidade Operacional e Ciclos de Reuso

A viabilidade industrial de biocatalisadores imobilizados é determinada pela sua capacidade de manutenção da atividade catalítica ao longo de ciclos sucessivos de reação. Na tabela 9 apresenta o perfil de reuso da Amostra 7, selecionada por ter apresentado a maior atividade inicial no planejamento experimental (pH 3,81; 2,89 mg/mL; 0,42M).

Tabela 9: Estabilidade operacional da lacase imobilizada (Amostra 7) ao longo de cinco ciclos de reuso.

Ciclo operacional	Atividade residual (%)
1º	85,32
2º	61,94
3º	28,36
4º	22,14
5º	18,72

Os resultados demonstram que o sistema preservou um desempenho robusto na fase inicial, registrando uma atividade de 85,32 % no primeiro ciclo e 61,94% no segundo. Esse decaimento inicial, situado na ordem de 27 %, é um fenômeno recorrente e amplamente documentado na literatura de enzimas imobilizadas, sendo atribuído à lixiviação de frações proteicas que não estabeleceram ligações covalentes definitivas com o suporte. Mesmo com a ativação prévia do C-PLA via glutaraldeído, é provável que uma parcela considerável das moléculas de lacase tenha permanecido retida apenas por adsorção física ou oclusão simples nos poros da matriz. Consequentemente, durante as etapas de lavagem e o início do reuso, essas enzimas fracamente associadas ou retidas por interações hidrofóbicas superficiais são removidas, restando no suporte apenas o biocatalisador efetivamente ancorado ou retido por forças moleculares mais estáveis.

A análise da estabilidade operacional revelou um declínio acentuado na capacidade catalítica entre o segundo e o terceiro ciclo reacional, com a atividade residual retraindo para 28,36 %, o que sugere uma fragilidade na manutenção da integridade do sistema C-PLA/Lacase sob as condições testadas. Esse cenário de desativação pode ter sido exacerbado por modificações no microambiente iônico após ciclos sucessivos, em que a exposição contínua ao tampão e o acúmulo de subprodutos podem ter alterado o estado de ionização da interface enzima-suporte, desestabilizando as interações eletrostáticas que complementavam a fixação química no pH 3,81.

Entretanto, é fundamental destacar o comportamento de estabilização observado nos ciclos finais, em que a taxa de perda de atividade desacelerou significativamente entre o 3º e o 5º ciclo, atingindo um patamar de 18,72 %. A persistência de quase 20 % da atividade original após cinco ciclos operacionais indica a existência de uma fração de enzimas fortemente ancorada, sugerindo que os domínios de carbono presentes no compósito C-PLA foram eficazes em estabelecer interações hidrofóbicas robustas. Essa estabilidade residual demonstra que o suporte de C-PLA possui potencial para operação contínua, embora o protocolo possa ser refinado em estudos futuros através da otimização dos parâmetros de reticulação com glutaraldeído, visando converter a elevada adsorção inicial em uma estabilidade operacional mais perene e eficiente

Em suma, os resultados obtidos com a Amostra 7 corroboram a viabilidade do suporte impresso em C-PLA como uma matriz biocompatível e eficaz na preservação da atividade enzimática ao longo de múltiplos ciclos operacionais. Essa configuração supera a limitação ao uso único da enzima livre, promovendo o reuso do biocatalisador.

Paralelamente, avaliou-se a estabilidade operacional da Amostra 9, conduzida sob a condição de maior acidez do planejamento experimental (pH 3,00; 2,00 mg/mL; 0,30M). Os dados de atividade residual ao longo dos cinco ciclos são apresentados na Tabela 10.

Tabela 10: Estabilidade operacional da lacase imobilizada (Amostra 9) ao longo de cinco ciclos de reuso.

Ciclo operacional	Atividade residual (%)
1º	68,16
2º	57,21
3º	28,61
4º	10,70
5º	4,34

Diferentemente do comportamento exibido pela Amostra 7, a Amostra 9 revela uma dinâmica operacional que evidencia o compromisso crítico entre a afinidade eletrostática inicial e a estabilidade conformacional da enzima. Inicialmente, o sistema apresentou uma retenção de atividade de 68,16 %, com um declínio moderado para 57,21 % no segundo ciclo, uma queda menos acentuada que a da amostra anterior, sugerindo que o pH 3,00 potencializou a interação entre a lacase e a superfície do C-PLA, mitigando o efeito de *wash-out* imediato. Contudo, essa vantagem cinética inicial não se sustentou ao longo do tempo; a partir do terceiro ciclo, a atividade sofreu um colapso severo, se estabilizando em 4,34 %

no encerramento dos ensaios. Esse perfil de decaimento contínuo, sem a formação de um platô de estabilização, indica que, embora o pH altamente ácido favoreça a atividade catalítica pontual da lacase, a exposição prolongada a esse microambiente desencadeou uma inativação tempo-dependente. Nesse sentido, a acidez severa parece ter provocado a desnaturação progressiva ou o comprometimento estrutural da proteína, superando os benefícios da ancoragem química e inviabilizando a reutilização do biocatalisador em escalas temporais mais extensas

6. CONCLUSÃO

A presente investigação científica consolidou o desenvolvimento de uma plataforma biocatalítica heterogênea de alto desempenho, fundamentada na integração sinérgica entre a manufatura aditiva por extrusão (FDM) e a funcionalização química de superfícies para a remediação ambiental. Ao longo deste estudo, demonstrou-se que a utilização do compósito C-PLA (Ácido Polilactídeo acoplado a Carbono) como suporte estruturado, atua como uma matriz de alta afinidade para a lacase. O diferencial estratégico deste trabalho residiu na etapa de ativação prévia do suporte utilizando o agente bifuncional glutaraldeído, que permitiu a transição de uma simples adsorção física para uma imobilização por ligação covalente. A introdução de grupos aldeído na superfície do C-PLA, antes do contato com a enzima, viabilizou a formação de Bases de Schiff com os grupos amino livres da proteína, conferindo uma estabilidade química superior à interface enzima-suporte.

A fundamentação analítica, baseada na quantificação proteica pelo método de Bradford, estabeleceu um elevado rigor estatístico, com uma curva de calibração apresentando coeficiente de determinação $R^2 = 0,9915$ e equação da reta $y = 0,0095x - 0,0089$. Esses dados permitiram validar que a ativação química da superfície rugosa impressa em 3D resultou em eficiências de imobilização superiores a 80% na maioria das condições ensaiadas. Verificou-se que a presença do glutaraldeído foi fundamental para maximizar a retenção enzimática, criando sítios de ancoragem estáveis que resistiram às forças de cisalhamento inerentes ao processo de agitação, superando limitações comuns de lixiviação observadas em sistemas puramente físicos.

No entanto, a investigação revelou que a robustez da ligação covalente deve ser equilibrada com a manutenção do microambiente químico adequado para a preservação do sítio ativo. O planejamento experimental demonstrou que a competência catalítica da enzima

imobilizada é estritamente governada pelo pH operacional. Verificou-se que a neutralidade do meio induziu à inativação quase total, possivelmente devido à rigidez conformacional excessiva imposta pela reticulação química em pH inadequado. Em contrapartida, as condições ácidas, especificamente o pH 3,81 (Amostra 7), consagraram-se como o ponto de equilíbrio ideal, garantindo atividades recuperadas superiores a 80%. Este resultado evidencia que a ativação com glutaraldeído, quando conduzida sob controle rigoroso de pH, protege a estrutura terciária da lacase contra a desnaturação. A eficácia desse biocatalisador foi comprovada na biodegradação do corante recalcitrante Rosa de Bengala (100 mg/L), onde a descoloração efetiva em 24 horas ratificou que o reator estruturado é capaz de superar resistências difusionais e atuar na degradação de poluentes complexos.

Em suma, este trabalho conclui que a associação entre a impressão 3D e a ativação covalente via glutaraldeído representa uma fronteira inovadora para a biotecnologia e a Química Verde. O sistema desenvolvido não apenas provê uma solução sustentável e reutilizável para o tratamento de efluentes industriais, mas também estabelece o C-PLA funcionalizado como um padrão de suporte biocompatível de baixo custo. O sucesso desta abordagem abre precedentes para o design de biorreatores customizados com geometrias complexas, otimizados para operações contínuas de remediação ambiental, aliando a precisão da manufatura aditiva à estabilidade da biotecnologia moderna.

7. REFERÊNCIAS

ALIMI, O. A. *et al.* The synthesis of Aspirin and Acetobromo- α -D-glucose using 3D printed flow reactors: an undergraduate demonstration. **Journal of Flow Chemistry**, v. 12, n. 3, p. 265–274, 2022.

ALMEIDA, A. P. **Proposta de tratamento biológico utilizando fungos para degradação de corantes em efluentes têxteis**. 2017. Monografia (Bacharelado em Engenharia Química) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2017.

ANASTAS, P. T.; WARNER, J. C. **Green chemistry**: theory and practice. Oxford: Oxford University Press, 1998.

ARSALAN, A. *et al.* Imobilização da beta-galactosidase em nanopartículas de prata estabilizadas com ácido tânico: uma via mais safer para sua aplicação industrial. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 226, p. 117637, 2020.

ASGHAR, A.; AZIZ, A. A. R.; MOHD, W. A. W. D. Advanced oxidation processes for in-situ production of hydrogen peroxide/hydroxyl radical for textile wastewater treatment: a review. **Journal of Cleaner Production**, v. 87, p. 826-838, 2015.

BALDRIAN, P. Fungal laccases - occurrence and properties. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 30, p. 215–242, 2006.

BARRETO, W. J. *et al.* Biodegradação de uma mistura de corantes têxteis usando o fungo *Ganoderma* sp: um estudo cinético. **Química Nova**, v. 34, n. 4, p. 568-572, 2011.

BERBEE, M. L.; JAMES, T. Y.; STRULLU-DERRIEN, C. Fungi of early divergence: diversity and impact at the dawn of terrestrial life. **Annual Review of Microbiology**, v. 71, p. 41–60, 2017.

BERTRAND, G. Sur La Presence Simultanee de La Lacase et de La Tyrosinase Dans Le Suc de Quelques Champignons. **Comptes Rendus Hebdomadaires des Séances de L'académie des Sciences**, v. 123, p. 463–465, 1896.

- BHARDWAJ, P. *et al.* Laccase-assisted degradation of emerging recalcitrant compounds - A review. **Bioresource Technology**, v. 364, p. 128031, 2022.
- BOOESHAGHI, A. S. *et al.* Principles of open source bioinstrumentation applied to the poseidon syringe pump system. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 12385, ago. 2019.
- BRAILE, P. M.; CAVALCANTI, J. E. W. A. **Manual de tratamento de águas residuárias industriais**. 18. ed. São Paulo: CETESB, 1993.
- CEYLAN, F. *et al.* Optimization of laccase production by *Lentinus tigrinus* in submerged culture. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 35, n. 12, p. 1591-1596, 2008.
- CHAN, J. C. *et al.* Structural studies of *Myceliophthora Thermophila* Laccase in the presence of deep eutectic solvents. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 150, p. 109890, 2021.
- CHRISTOPHER, L. P.; YAO, B.; JI, Y. Lignin biodegradation with laccase mediators systems. **Frontiers in Energy Research**, v. 2, p. 1-12, 2014.
- CLAUS, H. Lacases: Estrutura, Reações, Distribuição. **Micron**, v. 35, p. 93–96, 2004.
- COUTO, S. R.; HERRERA, J. L. T. Industrial and environmental applications of laccases: a review. **Biotechnology Advances**, v. 24, n. 5, p. 500-513, 2006.
- CRISTÓVÃO, R. O. *et al.* Kinetic study of two phenolic compounds degradation by laccase from *Trametes versicolor* in free and immobilized systems. **Biochemical Engineering Journal**, v. 42, n. 1, p. 1-7, 2008.
- CRISTÓVÃO, R. O. *et al.* Study of laccase immobilisation onto an Eupergit C support and its application in the degradation of pharmaceutical drugs. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 159, n. 3, p. 770-785, 2009.
- CRITTENDEN, J. C. *et al.* **MWH's Water Treatment: principles and design**. 3. ed. Hoboken: John Wiley & Sons, 2012.

DEBNATH, R.; SAHA, T. An insight into the production strategies and applications of the ligninolytic enzyme laccase from bacteria and fungi. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 26, 2020.

DESAI, S. S.; NITYANAND, C. Microbial laccases and their applications: A review. **Asian Journal of Biotechnology**, v. 3, n. 2, p. 98-124, 2011.

DINIZ, G. F. D. **Emprego de Fungos na Descolação e Redução da Toxicidade de Corantes Têxteis**. 2015. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Engenharia Agrônoma) – Centro Universitário de Sete Lagoas, Sete Lagoas, 2015.

DITTMER, N. T.; KANOST, M. R. Oxidases de multicobre de insetos: diversidade, propriedades e funções fisiológicas. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 40, p. 179–188, 2010.

DWIVEDI, U. N. *et al.* Structure-function relationship among bacterial, fungal and plant laccases. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 68, n. 2, p. 117-128, 2011.

ERNST, H. A. *et al.* A comparative structural analysis of the surface properties of asco-laccases. **PLoS One**, v. 13, n. 11, 2018.

GADD, G. M. Biosorption: critical review of scientific rationale, environmental importance and significance for pollution treatment. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 84, n. 1, p. 13–28, 2009.

GALLI, C. *et al.* Mecanismo de transferência concertada de elétrons/prótons na oxidação de fenóis pela lacase. **ChemBioChem**, v. 14, p. 2500–2505, 2013.

GAMELAS, J. A. F. *et al.* New approach to pulp bleaching using a laccase-mediator system. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 37, n. 4, p. 436-441, 2005.

GIVAUDAN, A. *et al.* Polifenol oxidase em *Azospirillum lipoferum* isolado da rizosfera do arroz: Evidência de atividade de lacase em cepas não móveis de *Azospirillum lipoferum*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 108, p. 205–210, 1993.

GUERRAND, D. Economia de enzimas para alimentos e rações: situação atual e perspectivas. *In*: NUNES, C. S.; KUMAR, V. (eds.). **Enzimas na nutrição humana e animal**: princípios e perspectivas. Londres: Academic Press, 2018. p. 487–514.

JANUSZ, G. *et al.* Propriedades da lacase, funções fisiológicas e evolução. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, p. 966, 2020.

JIAO, M. *et al.* Avanços recentes na produção de lacase: desafios e perspectivas futuras. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 35, p. e2507052, 2025.

JONES, S. M.; SOLOMON, E. I. Transferência de elétrons e mecanismo de reação das lacases. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 72, p. 869–883, 2015.

KALLIO, J. P. *et al.* Crystal structure of an ascomycete fungal laccase from *Thielavia arenaria*--common structural features of asco-laccases. **The FEBS Journal**, v. 278, n. 13, p. 2283-2295, 2011.

KANGO, N.; JANA, U. K.; CHOUKADE, R. Enzimas fúngicas: fontes e aplicações biotecnológicas. *In*: SATYANARAYANA, T.; DESHMUKH, S. K.; DESHPANDE, M. V. (eds.). **Avançando as fronteiras da micologia e da micotecnologia**. Singapura: Springer, 2019. p. 515–538.

KOSINAS, C. *et al.* Structure-function studies of a novel laccase-like multicopper oxidase from *Thermothelomyces thermophila* provide insights into its biological role. **Acta Crystallographica Section D**, v. 79, p. 641-654, 2023.

KUMAR, S. V. *et al.* Combined sequence and structure analysis of the fungal laccase family. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 83, n. 4, p. 386-394, 2003.

KUNZ, A. *et al.* Novas tendências no tratamento de efluentes têxteis. **Química Nova**, v. 25, p. 78-82, 2002.

KYOMUHIMBO, H. D.; BRINK, H. G. Applications and immobilization strategies of the copper-centred laccase enzyme; a review. **Heliyon**, v. 9, n. 2, p. e13156, 2023.

LANCASTER, M. **Green Chemistry**: an introductory text. 2. ed. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 2010.

LEONOWICZ, A. *et al.* Fungal laccase: properties and activity on lignin. **Journal of Basic Microbiology**, Berlim, p. 185-227, 2001.

LIN, J. *et al.* Partículas magnéticas funcionalizadas com lacase e metacrilil: altamente imobilizadas, reutilizáveis e eficazes para a descoloração do vermelho de metila. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 102, p. 144–152, 2017.

LIN, J. *et al.* Síntese de nanopartículas de Fe₃O₄ funcionalizadas com amina para imobilização de lacase. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 96, p. 377-383, 2017.

LINDLEY, P. F. **Manual sobre Metaloproteínas**. Hoboken: John Wiley & Sons, 2001. p. 763–811.

MAESTRE-REYNA, M. *et al.* Structural and functional roles of glycosylation in fungal laccase from *Lentinus* sp. **PLoS One**, v. 10, n. 4, p. e0120601, 2015.

METCALF & EDDY; AECOM. **Wastewater Engineering: treatment and resource recovery**. 5. ed. New York: McGraw-Hill Education, 2014.

MONTANER, M. B.; PENNY, M. R.; HILTON, S. T. Digitisation of a modular plug and play 3D printed continuous flow system for chemical synthesis. **Digital Discovery**, v. 2, n. 6, p. 1797–1805, 2023.

MOROZOVA, O. V. *et al.* Lacases “Azuis”. **Bioquímica**, v. 72, p. 1136–1150, 2007.

MOT, A. C.; SILAGHI-DUMITRESCU, R. Lacases: Arquiteturas complexas para oxidações de um elétron. **Bioquímica**, v. 77, p. 1395–1407, 2012.

NICELL, J. A. *et al.* The kinetics of peroxidase-catalyzed polymerization of phenols. **Water Research**, v. 27, n. 11, p. 1629-1637, 1993.

PAZARLIOGLU, N. K. *et al.* Enhancement of laccase production by *Trametes versicolor* in submerged culture. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 12, p. 3649-3654, 2005.

PENNY, M. R.; HILTON, S. T. Design and development of 3D printed catalytically-active stirrers for chemical synthesis. **Reaction Chemistry and Engineering**, v. 5, n. 5, p. 853–858, 2020.

PERES, C. S.; ABRAHÃO, A. J. Características e sistemas de tratamento de águas residuais das indústrias têxteis. **Química Têxtil**, v. 21, p. 73-80, 1998.

PHUNG HAI, T. A. *et al.* Laboratory Ozonolysis Using an Integrated Batch-DIY Flow System for Renewable Material Production. **ACS Omega**, 2021.

PING, W. *et al.* Descoloração de corantes reativos por lacase imobilizada em mistura de alginato/gelatina com PEG. **Journal of Environmental Sciences**, v. 20, p. 1519–1522, 2008.

POLYAKOV, K. M. *et al.* Estudo estrutural da redução enzimática induzida por raios X do oxigênio molecular a água pela lacase de *Steccherinum Murashinskyi*... **Acta Crystallographica Section D: Structural Biology**, v. 73, p. 388–401, 2017.

RAO, Z. X. *et al.* 3D-Printed Polypropylene Continuous-Flow Column Reactors: Exploration of Reactor Utility in SNAr Reactions and the Synthesis of Bicyclic and Tetracyclic Heterocycles. **European Journal of Organic Chemistry**, v. 2017, n. 44, p. 6499–6504, 2017.

RITTMANN, B. E.; MCCARTY, P. L. **Environmental Biotechnology**: principles and applications. New York: McGraw-Hill, 2001.

RIVERA-HOYOS, C. M. *et al.* Fungal laccases. **Fungal Biology Reviews**, v. 27, n. 3-4, p. 67-82, 2013.

ROBINSON, P. K. Enzymes: principles and biotechnological applications. **Essays in Biochemistry**, v. 59, p. 1-41, 2015.

RODRIGUEZ COUTO, S.; TOCA HERRERA, J. L. Industrial and biotechnological applications of laccases: a review. **Biotechnology Advances**, v. 24, n. 5, p. 500-513, 2006.

SALIH, R. *et al.* Acrylic modified kraft lignin microspheres as novel support for immobilization of laccase from *M. thermophila* expressed in *A. oryzae* (Novozym® 51003) and application in degradation of anthraquinone textile dyes. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 11, n. 1, 2023.

SANTOS, G. C. **Biossorção e Biodegradação de Azo Corante – Desenvolvimento de Processos Utilizando Resíduos Como Fonte de Micro-organismos**. 2015. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2015.

SARATALE, R. G. *et al.* Bacterial degradation of azo dyes: a review. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v. 42, n. 1, p. 138-150, 2011.

SEKRETARYOVA, A. *et al.* Redução de O₂ a água por oxidases multicobre de alto potencial... **Journal of the American Chemical Society**, v. 141, p. 11304–11314, 2019.

SHELDON, R. A. Enzyme immobilization: the quest for optimum performance. **Advanced Synthesis & Catalysis**, v. 349, n. 8-9, p. 1289-1307, 2007.

SHELDON, R. A.; VAN PELT, S. Enzyme immobilisation in biocatalysis: why, what and how. **Chemical Society Reviews**, v. 42, n. 15, p. 6223-6235, 2013.

SINGH, R. *et al.* Enzimas microbianas — Uma visão geral. *In*: SINGH, R. S. *et al.* (eds.). **Avanços na Tecnologia de Enzimas**. Amsterdã: Elsevier, 2019. p. 1–40.

SOUZA, L. T. A. *et al.* Imobilização enzimática: princípios fundamentais e tipos de suporte. *In*: **Biotecnologia aplicada à Agro&indústria**. Ed. Blucher, 2017. v. 4, cap. 15, 2017.

SUN, H. L. *et al.* An organic solvent-stable protease from organic solvent-tolerant *Bacillus cereus* WQ9-2... **Bioresource Technology**, v. 101, n. 20, p. 7991–7994, 2010.

TAVARES, A. P. M. *et al.* Sequential decolourization of reactive textile dyes by laccase mediator system. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 83, n. 10, p. 1334-1341, 2008.

THURSTON, C. A estrutura e função das lacases fúngicas. **Microbiology**, v. 140, p. 19–26, 1994.

TORRES, M. G. R. S. *et al.* Regulation of laccase production in white-rot fungi. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 34, n. 2, p. 163-170, 2003.

UN WATER. **The United Nations World Water Development Report 2021**: valuing water. Paris: UNESCO, 2021.

VERMA, M. *et al.* Aplicações biotecnológicas de enzimas fúngicas com referência especial à biorremediação. *In*: GOTHANDAM, K. M. *et al.* (eds.). **Biotecnologia Ambiental**. Cham: Springer, 2020. p. 221–247.

VILLENEUVE, P. *et al.* Customizing lipases for biocatalysis: a survey of chemical, physical and molecular biological approaches. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 9, p. 113–148, 2000.

VITE-VALLEJO, O. *et al.* The role of N-glycosylation on the enzymatic activity of a *Pycnoporus sanguineus* laccase. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 45, n. 3, p. 233-239, 2009.

WANG, H. *et al.* Laccase immobilization and its degradation of emerging pollutants: A comprehensive review. **Journal of Environmental Management**, v. 359, p. 120984, 2024.

WONG, J. *et al.* 3D-printed biocatalysts: recent advances and future outlook. **Trends in Biotechnology**, v. 39, n. 12, p. 1245-1258, 2021.

XU, F. *et al.* Um estudo de uma série de lacases fúngicas recombinantes e bilirrubina oxidase que exibem diferenças significativas no potencial redox... **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology**, v. 1292, p. 303–311, 1996.

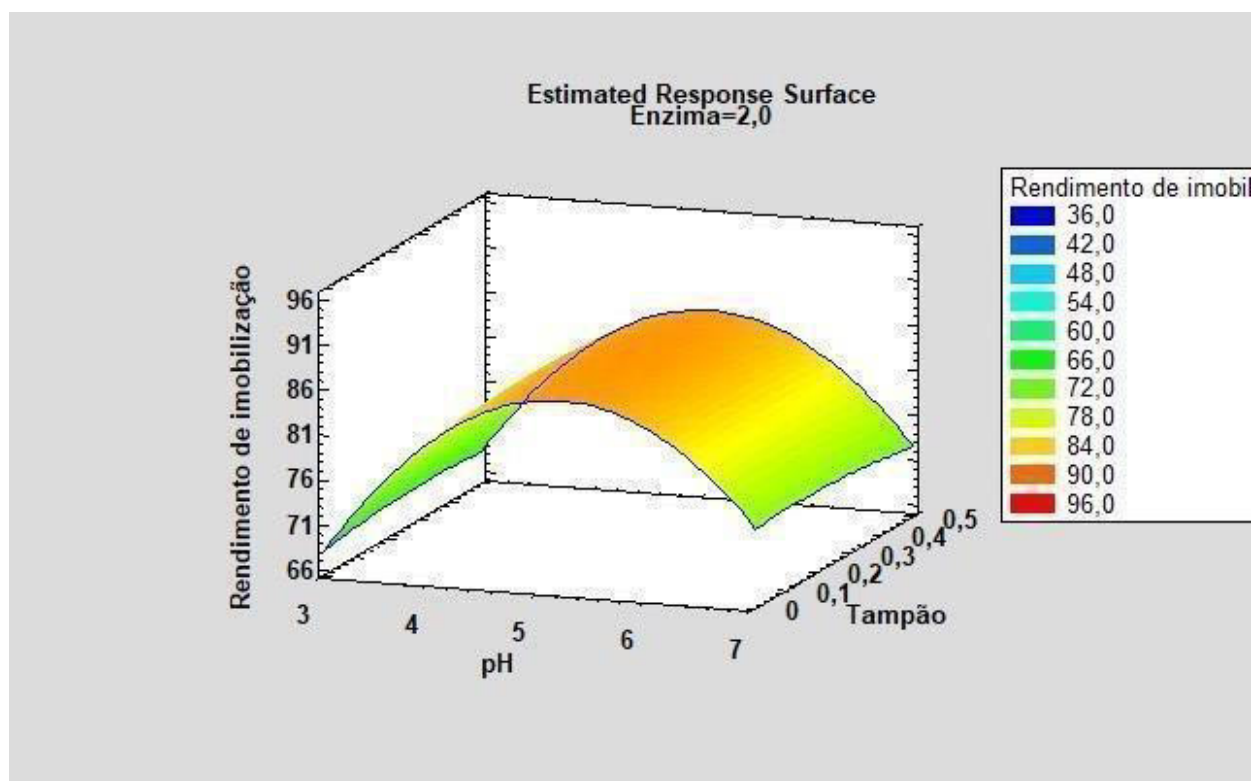
YE, J. *et al.* Uma abordagem versátil para imobilização de enzimas usando estruturas impressas em 3D modificadas quimicamente. **ACS Química e Engenharia Sustentáveis**, v. 7, n. 21, p. 18048-18054, 2019.

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

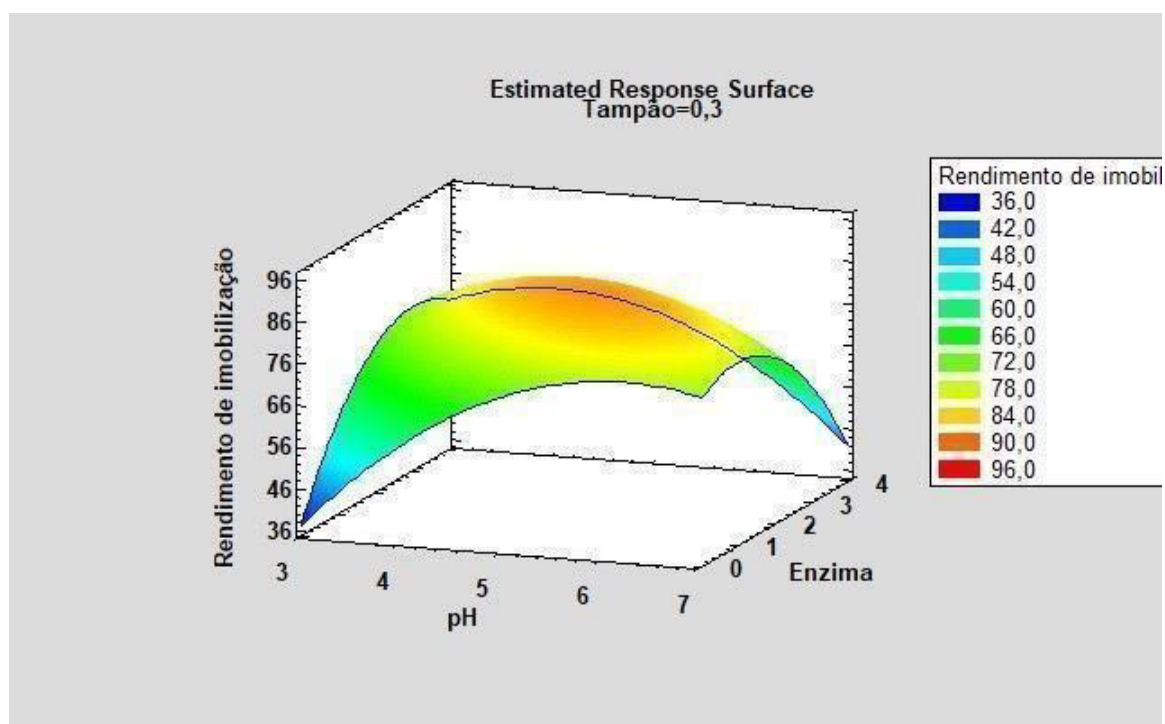
ZHU, S. *et al.* Facile surface modification of 3D printed poly(lactic acid) for enhancing cell adhesion and proliferation. **Materials Science and Engineering: C**, v. 99, p. 1195-1204, 2019.

ZOFAIR, S. F. F. *et al.* Catalytic roles, immobilization and management of recalcitrant environmental pollutants by² laccases... **Journal of Environmental Management**, v. 309, p. 114676, 2022.

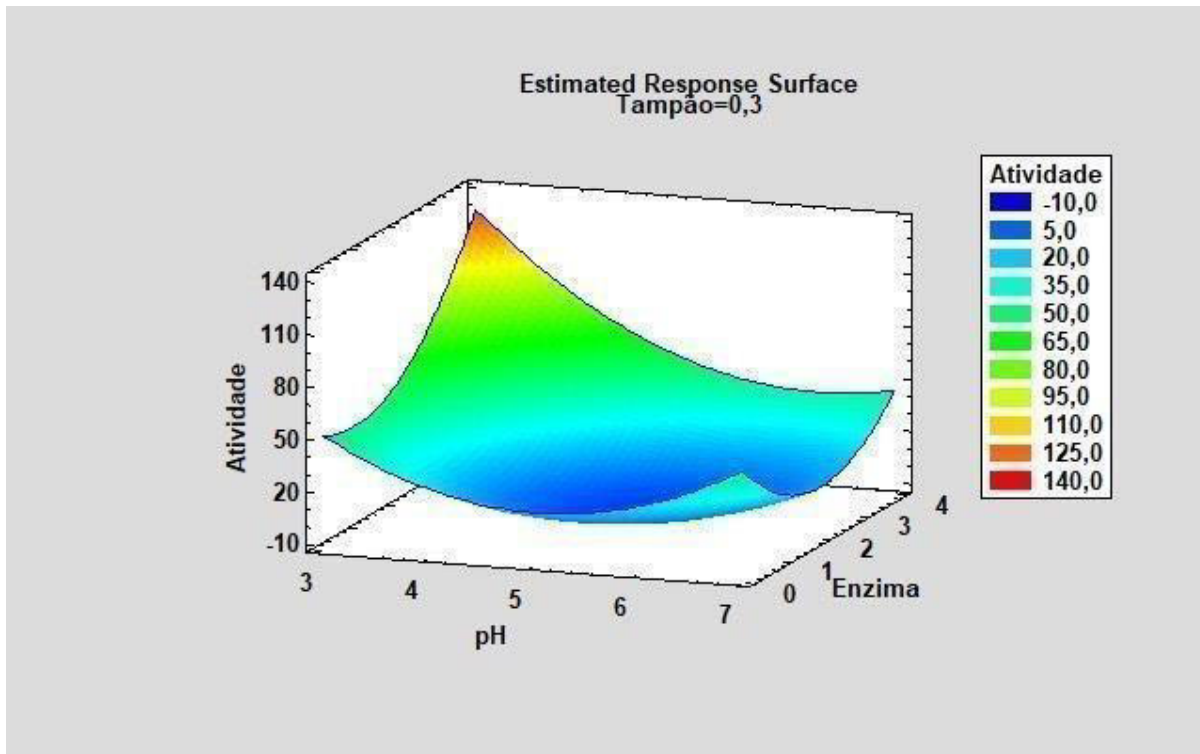
Anexos



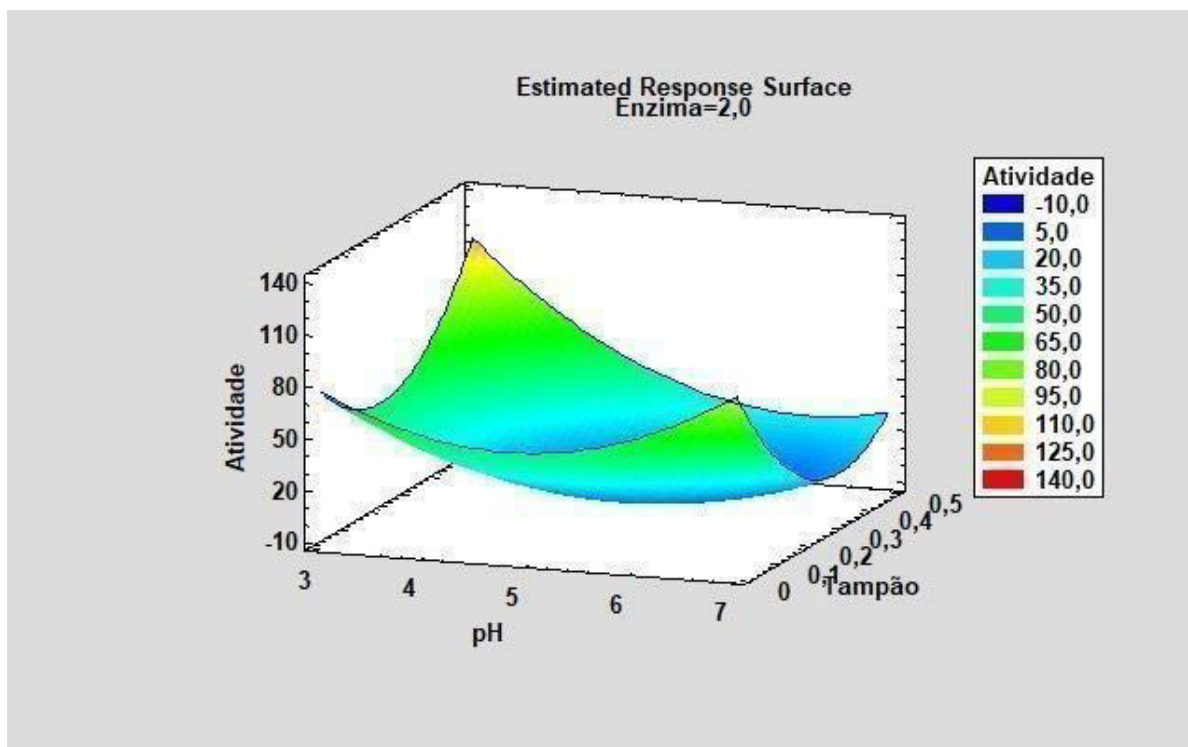
Superfície de resposta estimada para o rendimento de imobilização (%) em função do pH e da concentração de tampão (Enzima = 2,0). A região de maior eficiência (áreas em laranja/vermelho) concentra-se em pH próximo a 5,0 e valores intermediários de tampão.



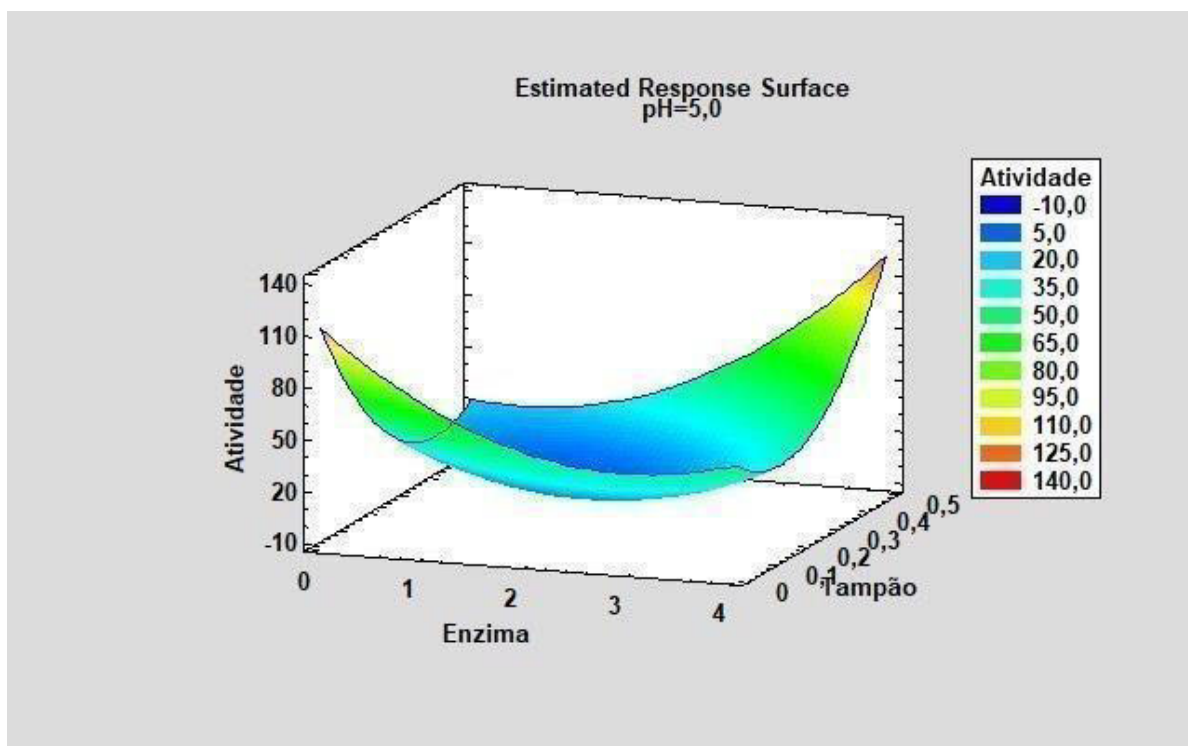
Superfície de resposta para o rendimento de imobilização (%) correlacionando o pH e a concentração de enzima (Tampão = 0,3). Nota-se uma queda acentuada no rendimento em condições de pH extremo (abaixo de 4,0 ou acima de 6,0) e baixas concentrações enzimáticas.



Superfície de resposta para a atividade enzimática em função do pH e da carga de enzima, com concentração de tampão fixada em 0,3. Observa-se maior atividade em condições de pH ácido (3,0) e maior concentração enzimática.



Superfície de resposta para a atividade enzimática correlacionando o pH e a concentração de tampão (Enzima = 2,0). O perfil mostra que a atividade é fortemente influenciada pelo pH, com valores máximos atingidos no limite inferior da faixa testada (pH 3,0).



Superfície de resposta para a atividade enzimática fixada no pH de melhor rendimento (5,0). O gráfico apresenta um perfil em formato de sela, sugerindo que a atividade aumenta nos extremos das concentrações de enzima e tampão testadas para este pH específico.