

**UNIVERSIDADE REGIONAL INTEGRADA DO ALTO URUGUAI E DAS MISSÕES
PRÓ-REITORIA DE ENSINO, PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO CAMPUS DE
ERECHIM
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE ALIMENTOS**

ANA PAULA DARIFF

**SINTESE E FUNCIONALIZAÇÃO DE SUPORTE DE PARAFINA PARA
IMOBILIZAÇÃO ENZIMÁTICA**

ERECHIM – RS

2020

ANA PAULA DARIFF

**PRODUÇÃO E FUNCIONALIZAÇÃO DE SUPORTE DE PARAFINA PARA
IMOBILIZAÇÃO ENZIMÁTICA**

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre, pelo Curso de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, Departamento das Ciências Agrárias da Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – Campus de Erechim.

**Orientadores: Dr. Rogério M. Dallago
Dr. Marcelo L. Mignoni**

ERECHIM - RS

2020

ANA PAULA DARIFF

**PRODUÇÃO E FUNCIONALIZAÇÃO DE SUPORTE DE PARAFINA PARA
IMOBILIZAÇÃO ENZIMÁTICA**

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre, pelo Curso de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, Departamento das Ciências Agrárias da Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – Campus de Erechim.

**Orientadores: Dr. Rogério M. Dallago
Dr. Marcelo L. Mignoni**

Erechim, 28 de fevereiro de 2020.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Rogério Marcos Dallago (Orientador)

Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – URI Erechim

Prof. Dr. Marcelo Luis Mignoni (Orientador)

Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – URI Erechim

Prof. Dr. Alexander Junges (Banca examinadora)

Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – URI Erechim

Profa Dra. Gean Delise Pasquali Vargas (Banca examinadora)

Universidade Federal da Fronteira Sul - UFFS Erechim

D218s Dariff, Ana Paula

Síntese e funcionalização de suporte de parafina para imobilização enzimática [recurso eletrônico] / Ana Paula Dariff. – 2020.

1 recurso eletrônico

Dissertação (Mestrado) – Universidade Regional do Alto Uruguai e das Missões, Erechim, RS.

“Orientação: Dr. Rogério M. Dallago, Dr. Marcelo L. Mignoni.”

1. Parafina 2. Imobilização enzimática 3. Pectinase 3. Ligação covalente

I. Título

C.D.U.:664

Catálogo na fonte: bibliotecária Sandra Milbrath CRB 10/1278

AGRADECIMENTOS

Considero-me uma pessoa privilegiada por chegar até aqui, pelos caminhos que escolhi e pelas oportunidades que me foram concedidas, e para isso devo meu agradecimento àqueles que contribuíram para a realização desta conquista.

A Deus por me iluminar, pela saúde, pelas pessoas que colocou no meu caminho, enfim, por me dar forças para ir além.

A minha família, por me apoiar e aconselhar nos momentos tristes e felizes, por me incentivar a seguir em frente e por estar ao meu lado pacientemente em todos os momentos.

Aos meus orientadores, Prof. Dr. Rogério M. Dallago e Prof. Dr. Marcelo Mignoni, pelos conhecimentos repassados, pela dedicação, incentivo e disponibilidade.

À minha colega e amiga Carolina Oro e as bolsistas de iniciação científica, agradeço imensamente a vocês pela disponibilidade, paciência, ajuda e colaboração para o desenvolvimento de nossa pesquisa.

Por fim, a todas as pessoas que de uma maneira ou de outra, perto ou distantes, contribuíram para a realização deste trabalho. Seja pelo apoio em todos os momentos, ou pelos obstáculos impostos, que contribuíram ainda mais para o meu crescimento.

Se hoje eu estou aqui devo muito a vocês. Meu muito obrigado!

“Quando penso que cheguei ao meu limite, descobro que tenho forças para ir além.”

Ayrton Senna

RESUMO

As enzimas apresentam várias propriedades que as tornam atrativas como catalisadores para biotransformações. A imobilização enzimática é uma técnica de retenção de um biocatalisador na aplicação de vários processos envolvidos na produção industrial de alimentos, processamento de materiais, indústrias bioquímicas e químicas, biotecnologia e usos farmacêuticos. O caráter inovador deste trabalho está na produção e funcionalização de suporte de parafina para que este possa ser empregado na imobilização por ligação covalente, reduzindo e simplificando as metodologias de produção de suportes, oferecendo uma melhor estabilidade e maior número de ciclos para a enzima. Os testes de imobilização enzimática em suporte de parafina foram conduzidos baseados no preceito da ligação covalente entre o suporte e a enzima. Para a base do suporte foi escolhida a parafina, como aditivos para induzir a funcionalização foi escolhido o corante anilina e o carvão ativado e por fim, para a funcionalização foi escolhido o glutaraldeído. A enzima estudada foi uma pectinase comercial (Pectinex® Smash XXL), sendo o ancoramento realizado em pH 10. Como resposta, avaliou-se o rendimento, cinética, reusos, aspectos físicos e visuais além de testes qualitativos para comprovação da eficiência do processo. O rendimento, para todas as condições testadas, foi de aproximadamente 50%. Observou-se que o suporte apresentou duas faces distintas, devido a metodologia empregada para a síntese do suporte. Além disso, os imobilizados apresentaram 20 ciclos de reuso enzimático mantendo a estabilidade em aproximadamente 100%, o que comprova a eficiência do processo proposto.

Palavras-chave: Parafina. Imobilização. Ligação Covalente. Pectinase.

ABSTRACT

Enzymes have several properties that make them attractive as catalysts for biotransformations. Enzymatic immobilization is a technique for retaining a biocatalyst in the application of various processes involved in industrial food production, material processing, biochemical and chemical industries, biotechnology and pharmaceutical uses. The innovative character of this work is in the production and functionalization of paraffin support so that it can be used in immobilization by covalent bonding, reducing and simplifying support production methodologies, offering better stability and a higher number of recycles for the enzyme. The enzymatic immobilization tests on paraffin support were conducted based on the precept of the covalent bond between the support and the enzyme. Paraffin was chosen for the base of the support, as additives to induce functionalization, aniline dye and activated carbon were chosen and finally, for functionalization, glutaraldehyde was chosen. The enzyme studied was a commercial pectinase (Pectinex® Smash XXL), with anchoring carried out at pH 10. In response, the performance, kinetics, reuses, physical and visual aspects were evaluated, in addition to qualitative tests to prove the efficiency of the process. The yield, for all conditions tested, was approximately 50%. It was observed that the support had two distinct faces, due to the methodology used for the synthesis of the support. In addition, all conditions tested presented 20 cycles of enzymatic reuse maintaining stability at approximately 100%, which proves the efficiency of the proposed process.

Keywords: Paraffin. Immobilization. Covalent bond. Pectinase.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Formação da ligação peptídica.....	17
Figura 2 – Estrutura química da pectina.....	18
Figura 3 – Métodos de imobilização de enzimas.....	22
Figura 4 - Diferentes abordagens para a obtenção de enzimas imobilizadas livre de suporte: (a) cristalização, (b) agregação; (c) secagem por atomização; e (d) reticulação direta. CRY, cristais de enzima; AGG, agregados enzimáticos; SDE: enzima atomizada; CLECs, cristais de enzima reticulados; CLEAs, agregados enzimáticos reticulados; CSDEs, enzimas atomizadas reticuladas; CLEs, enzimas solubilizadas reticuladas.....	25
Figura 5 - Imobilização covalente de enzima em suporte sólido. (A) resíduo de aminoácido ativo; (B) funcionalidade ligante do suporte; (C) suporte; (D) braço espaçador.....	27
Figura 6 – Detalhes de parafina (a) macrocristalina e (b) microcristalina.....	31
Figura 7 – Fluxograma das Etapas de síntese e imobilização enzimática em suporte de parafina funcionalizado com glutaraldeído.....	33
Figura 8 - Suporte de imobilização em parafina. Em (a) a superfície que ficou em contato com o ar, em (b) a superfície que ficou em contato com a água e em (c) o suporte após quebra manual.....	35
Figura 9 - Amostra preparada na lâmina de vidro para análise no microscópio óptico.....	38
Figura 10 - Aspectos visuais das faces dos suportes obtidos. Em (a) e (b) faces superior e inferior do suporte de corante anilina, respectivamente; em (c) e (d) faces superior e inferior do suporte de carvão ativado, respectivamente; e em (e) e (f) faces superior e inferior do suporte de corante anilina + carvão ativado, respectivamente.....	40
Figura 11 - Microscopias de superfície das faces dos suportes obtidos com aumento de 100x. Em (a) e (b) faces superior e inferior do suporte de corante anilina, respectivamente; em (c) e (d) faces superior e inferior do suporte de carvão ativado, respectivamente; e em (e) e (f) faces superior e inferior do suporte de corante anilina + carvão ativado, respectivamente.....	41
Figura 12 – Resultado visual do teste de Fehling.....	42

Figura 13 - Microscopias ópticas de estrutura dos suportes obtidos com aumento de 100x. Em (a) e (b) suporte de corante anilina com e sem glutaraldeído, respectivamente; em (c) e (d) suporte de carvão ativado com e sem glutaraldeído, respectivamente; e em (e) e (f) suporte de corante anilina + carvão ativado com e sem glutaraldeído, respectivamente.....	43
Figura 14 - Microscopia óptica de estrutura da parafina pura após ensaio de funcionalização com glutaraldeído.....	44
Figura 15 – Cinética de imobilização dos suportes funcionalizados com corante anilina e/ou carvão ativado.....	45
Figura 16 – Número de ciclos enzimáticos avaliando os diferentes suportes testados.....	47
Figura 17 – Curva de calibração para medida da atividade para a PG.....	62

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Vantagens e desvantagens da utilização de biocatalisadores imobilizados.....	21
Quadro 2 – Rendimento (%) dos suportes de parafina funcionalizados com corante anilina e/ou carvão ativado.....	45

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 OBJETIVOS	16
2.1 Objetivo geral	16
2.2 Objetivos específicos	16
3 REFERENCIAL TEÓRICO	17
3.1 A importância das enzimas	17
3.2 Pectina	18
3.3 Imobilização de enzimas	20
3.4 Métodos de imobilização	21
3.4.1 Adsorção física	23
3.4.2 Reticulação	23
3.4.3 Retenção física	25
3.4.4 Ligação covalente	26
3.6 SUPORTES PARA IMOBILIZAÇÃO	29
3.5.1 Parafina	30
4 MATERIAIS E MÉTODOS	33
4.1 Preparo do suporte	34
4.1.1 Materiais	34
4.1.2 Síntese do suporte	34
4.1.3 Funcionalização do suporte com glutaraldeído	35
4.2 Imobilização enzimática em suporte de parafina funcionalizado com glutaraldeído	36
4.2.1 Atividade de exo-poligalacturonase (PG)	36
4.2.2 Estudo cinético do tempo ótimo de imobilização	37
4.2.3 Rendimento	37
4.2.4 Estabilidade operacional (reciclos)	37
4.3 Determinação da estrutura e superfície dos suportes por microscopia	38
4.3.1 Determinação da estrutura dos suportes	38

4.3.2 Determinação da superfície dos suportes	38
4.4 Teste de Fehling	39
5 RESULTADOS E DISCUSSÕES	40
5.1 Síntese do suporte de parafina com corante anilina e/ou carvão ativado	40
5.2 Funcionalização do suporte com glutaraldeído	42
5.3 Imobilização enzimática	44
6 CONCLUSÃO.....	48
7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	49
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	50
APÊNDICE I: Curva de calibração	622

1 INTRODUÇÃO

A busca por processos alternativos para a síntese de produtos de interesse para a indústria de alimentos, farmacêutica e cosmética, que não causem ou reduzam os danos ao meio ambiente, vem se tornando prioridade entre os pesquisadores em todo o mundo. Dentre os processos alternativos, os baseados em rotas enzimáticas ganham destaque pois apresentam inúmeras vantagens em relação às rotas química, tais como: seletividade, a qual conduz a redução de subprodutos e resíduos, efluentes com maior tratabilidade, menor consumo energético entre outros (LERIN, 2010).

O mercado industrial de moléculas biologicamente ativas com maior crescimento é o da biocatálise (ANTUNES, 2005). Estima-se que, até o ano de 2025, cerca de 50% dos processos químicos possam ser substituídos por processos biotecnológicos isolados, ou mesmo pela integração entre catálise enzimática e reações químicas (NICOLETTI, 2014).

Diversos os segmentos que utilizam os biocatalisadores, sendo que o mercado mundial concentra-se em três: i) indústrias de alimentos (produção de xarope e compostos aromatizantes); ii) enzimas técnicas (formulação de detergentes, produção de papel e celulose) e iii) produção de ração animal (PEREIRA, 2014).

As principais enzimas de aplicação industrial são proteases, amilases, lipases, celulases, xilanases e fitases, e as maiores empresas produtoras, líderes do mercado, são: Novozymes, Gist-Brocades e Genencor International Inc. (MENONCINI et al., 2009).

As enzimas apresentam características peculiares que favorecem seu emprego em processos biotecnológicos, sendo relevantes as vantagens de conversões enzimáticas nos processos industriais (COLEN, 2006). Neste contexto, a imobilização de enzimas em suportes inertes é muito utilizada para facilitar a aplicação dos biocatalisadores em processos industriais (BORGES, 2016).

As enzimas imobilizadas são definidas como enzimas ou células fisicamente confinadas ou localizadas em uma região determinada do espaço com retenção de suas atividades catalíticas (CARVALHO; CANILHA; SILVA, 2006).

Imobilizações podem ocorrer por diversas formas, usualmente as técnicas empregadas para imobilizar enzimas em suportes sólidos são baseadas em mecanismos físicos e químicos (GOLÇALVES, 2018), podendo ocorrer por adsorção

(ALMEIDA et al., 2017), ligação da enzima em um material insolúvel (GIRELLI et al., 2012), emprego de um reagente multifuncional através de ligações cruzadas (CHEN et al., 2017), confinamento em matrizes formadas por géis poliméricos (DALLAGO et al., 2015) ou ainda por encapsulação em membrana polimérica (PEREIRA et al., 2015).

A técnica de imobilização tem grande importância porque, além de permitir a reutilização de biocatalisadores, também permite uma fácil e eficiente separação destas moléculas do meio reacional, e oferece uma melhor estabilidade à enzima em presença de determinados solventes, inibidores e outros agentes desnaturantes, e estabilidade em faixas mais amplas de pH e temperatura (CARVALHO; CANILHA; SILVA, 2006, CORCORAN, 1985, PEREIRA et al. 2015, NYARI et al., 2016).

Na imobilização por ligação covalente, normalmente a interação da enzima com o suporte se dá mediante ligação covalente entre grupos aldeído (-CHO) do suporte com os grupos aminas (-NH₂) terminais das enzimas (BABAKI et al., 2015).

A imobilização por ligação covalente da enzima com o suporte apresenta elevada estabilidade química, minimiza perdas da enzima por lixiviação, permitindo um maior número de ciclos. Além disso, a etapa de imobilização pode ser conduzida em temperaturas controladas, normalmente temperatura ambiente, evitando possíveis inativações térmicas (MATEO et al., 2007).

Uma das grandes questões do processo de imobilização é a escolha do suporte. Neste sentido, a busca por um suporte de imobilização enzimática, reaproveitável e de baixo custo, respondendo às necessidades do mercado e às vantagens da utilização dos mesmos em relação ao potencial de suas aplicações.

Tendo em vista a inexistência de relatos na literatura sobre a imobilização em parafina, este trabalho teve como objetivo avaliar a potencialidade deste suporte na imobilização celular.

O caráter inovador deste trabalho está na produção e funcionalização de suporte de parafina para que este possa realizar imobilização por ligação covalente, reduzindo e simplificando as metodologias de produção de suportes, oferecendo uma melhor estabilidade e maior número de ciclos para a enzima.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O objetivo do presente trabalho consiste em uma proposta de imobilização das enzimas pectinolíticas por ligações covalentes utilizando como suporte parafina funcionalizada.

2.2 Objetivos específicos

Com base no objetivo geral, os seguintes objetivos específicos foram delineados:

- Determinar os suportes de imobilização obtidos quanto a sua funcionalização através do teste de Fehling;
- Estudar o efeito da incorporação do corante anilina e carvão ativado à parafina, sob a atividade enzimática;
- Realizar um estudo de atividade enzimática, rendimento e reuso dos suportes após imobilização covalente utilizando pectinase.
- Caracterizar os suportes funcionalizados obtidos através de microscopia óptica e mecatrônica;
- Avaliar o melhor coadjuvante para a imobilização (corante anilina ou carvão ativado).

3 REFERENCIAL TEÓRICO

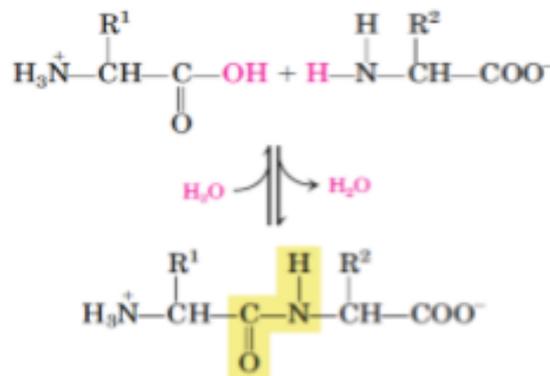
Neste capítulo apresenta-se uma breve explicação sobre a importância das enzimas, especialmente a pectinase com ênfase em imobilização enzimática. Na sequência, encontra-se descrito o processo de imobilização covalente com a utilização de corantes, carvão ativado e glutaraldeído.

3.1 A importância das enzimas

As enzimas têm sido usadas em sua forma nativa há séculos na indústria de alimentos, sendo elas, encontradas na panificação (GOMES et al., 2012), produtos lácteos e processamento de bebidas (DICOSIMO et al., 2013) e graças a avanços tecnológicos, muitas indústrias, tais como, cuidados de saúde & produtos farmacêuticos e fabricação química estão utilizando a natureza catalítica de enzimas para melhorar a sua produção (ALI et al., 2013).

As enzimas apresentam várias propriedades que as tornam atrativas como catalisadores para biotransformações (DALLA-VECHIA et al., 2004). São biomoléculas que atuam como catalisadores, aumentando a velocidade de reações químicas sem alterar o equilíbrio e sem serem consumidos. Com exceção de um pequeno grupo de RNA catalítico, todas as enzimas são de natureza proteica, sendo constituídas por longas cadeias de aminoácidos ligados entre si por ligações peptídicas (Figura 1). Essas ligações são resultantes da reação de condensação entre o grupo carboxila de um aminoácido e o grupo amina de outro (LIMA, 2016).

Figura 1 - Formação da ligação peptídica.



Fonte: LEHNINGER; NELSON; COX (2008).

Hoje em dia, cerca de 6.000 enzimas são catalogadas e destas cerca de 200 são utilizadas em nível industrial (BADGUJAR et al., 2013, REZENDE et al., 2016, GOLÇALVES, 2018).

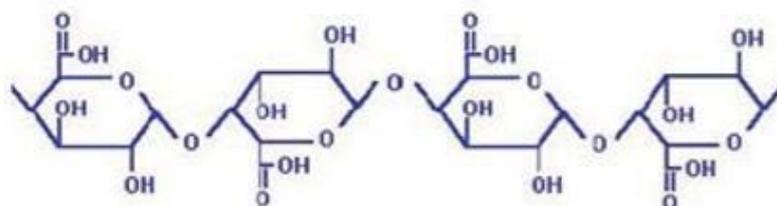
Até a presente data, existem muitos relatos disponíveis sobre as enzimas e suas aplicações, como amilase, celulase, b-galactosidase, protease, lipases, pectinase, amiloglucosidase e pullanase, glicose oxidase e xilanase (CHOI et al., 2015; YI-KANG, 2016).

A busca por tecnologias “limpas” e processos mais sofisticados vem estimulando o uso destas enzimas, sua seletividade as tornam muito atrativas para o uso industrial, pela alta qualidade dos produtos obtidos e uma menor formação de subprodutos indesejáveis ao fim do processo (MATOS, 2010, CHIARADIA, 2015).

3.2 Pectina

A pectina foi descoberta em 1790, quando Nicolas Louis Vauquelin encontrou uma substância solúvel nos sucos de frutas. A primeira produção comercial de um extrato de pectina líquida foi efetuada em 1908, na Alemanha, logo após o processo espalhou-se rapidamente para os Estados Unidos onde, em 1913, foi registrada uma patente. Em 1937, Schneider e Bock estabeleceram, a sua fórmula, cuja estrutura é apresentada na Figura 2 (FOOD INGREDIENTES BRASIL, 2014).

Figura 2 – Estrutura química da pectina.



Fonte: FOOD INGREDIENTES BRASIL, N° 39, 2014.

As pectinas são um grupo de polissacarídeos estruturalmente heterogêneos amplamente distribuídos nas paredes celulares primários e na lamela média da parede celular dos vegetais (LUO et al., 2017).

As pectinas comumente encontradas na natureza apresentam-se sob diferentes formas primárias: as protopectinas, ácidos pectínicos e ácidos pécticos (FOOD INGREDIENTES BRASIL, 2014).

- Protopectinas: Estão presentes nos tecidos dos frutos imaturos. Nesta condição as protopectinas se encontram ligadas ao cálcio das paredes celulares formando o pectato de cálcio, o qual é insolúvel em água, e tem a maior parte dos seus grupos carboxílicos esterificados (ALKORTA, 1998; SUHAIMI, 2016).
- Ácidos pectínicos: São obtidos a partir da hidrólise da protopectina pela ação das enzimas poligalacturonases. São consideradas substâncias coloidais, não necessariamente solúveis em água e que contém uma proporção variável de grupos metoxilas na forma de ésteres (ALKORTA, 1998; SUHAIMI, 2016).
- Ácidos pécticos: São oriundos da ação das enzimas pectinametilesterase durante o processo de amadurecimento, promovendo a remoção dos grupos metílicos dos polímeros, dando origem às substâncias pécticas que não formam gel (ALKORTA, 1998; SUHAIMI, 2016).

As pectinas são subdivididas em função do grau de esterificação ou metoxilação sendo descritas como pectinas de alto teor de metoxilação (ATM) ou pectinas de baixo teor de metoxilação (BTM) (DAMODARAN; PARKIN, 2019).

As com elevada esterificação (acima de 50%) formam géis após aquecimento em soluções com concentração de açúcar superior a 60% e pH inferior 3,6; por outro lado, pectinas de baixa esterificação (abaixo de 50%) formam géis na presença de íons bivalentes, como o cálcio (MAY, 2000).

Em ambos os casos, os grupos carboxilas remanescentes estão presentes como uma mistura na forma de ácidos livres (-COOH) e sais (-COO⁻Na⁺). O grau de metoxilação influencia fortemente as propriedades funcionais, tais como solubilidade, capacidade de gelificação, temperatura e condições de gelificação das pectinas (DAMODARAN; PARKIN, 2019).

3.3 Imobilização de enzimas

O interesse por técnicas que envolvem processos de imobilização enzimática está presente na comunidade acadêmica, científica e industrial desde o século XX, almejando diminuir situações adversas como má solubilidade, variações de pH e altas temperaturas que conseqüentemente degradavam as enzimas (KOCHANE, et al., 2017; MESQUITA, et al., 2018).

Para realizar a imobilização de enzimas deve considerar diversos aspectos e integrar o conhecimento em diversas áreas, incluindo enzimologia, reações químicas, ciência dos materiais e superfícies (GARCIA-GALAN et al., 2011).

A imobilização de enzimas é uma das etapas mais importantes na utilização das mesmas, pois permite superar as desvantagens, instabilidades operacionais, além de permitir o reuso das mesmas (BRAGA, 2013).

A imobilização enzimática é uma técnica de retenção de um biocatalisador na aplicação de vários processos envolvidos na produção industrial de alimentos, processamento de materiais, indústrias bioquímicas e químicas, biotecnologia e usos farmacêuticos. Nesse processo a enzima é retida em um suporte ou matriz de material orgânico ou inorgânico, na qual, a matriz orgânica (naturais e sintéticas) é a classe que compõe os polímeros (MESQUITA, et al., 2018). Apesar dos materiais sintéticos possibilitarem combinações variadas para um suporte ideal, os naturais apresentam vantagens como baixo custo, fácil degradação, além de evitar danos ao meio ambiente (LIMA, et al., 2013)

O principal interesse em imobilizar uma enzima é obter um biocatalisador com atividade e estabilidade que não sejam afetadas durante o processo, em comparação à sua forma livre. Idealmente, a enzima imobilizada deverá exibir uma atividade catalítica superior. Além disso, não deverão ocorrer alterações estruturais, bem como modificações no sítio ativo que comprometam a atividade enzimática (DALLA-VECCHIA et al., 2004).

Um decréscimo na atividade enzimática total pode ser observado devido a alterações de sua estrutura durante a imobilização e/ou limitações de difusão, todavia um aumento na quantidade de ciclos que a enzima imobilizada apresenta, compensa esta perda de atividade (REGULY, 2000; GONÇALVES, 2018).

A utilização de enzimas imobilizadas apresenta inúmeras vantagens e

desvantagens, conforme se apresenta no Quadro 1.

Quadro 1 - Vantagens e desvantagens da utilização de biocatalisadores imobilizados.

Vantagens	Desvantagens
<ul style="list-style-type: none"> • Retenção do biocatalisador no reator • Concentrações elevadas do biocatalisador • Microambiente controlado do biocatalisador • Fácil separação do meio reacional 	<ul style="list-style-type: none"> • Perda de atividade catalítica • Processo empírico

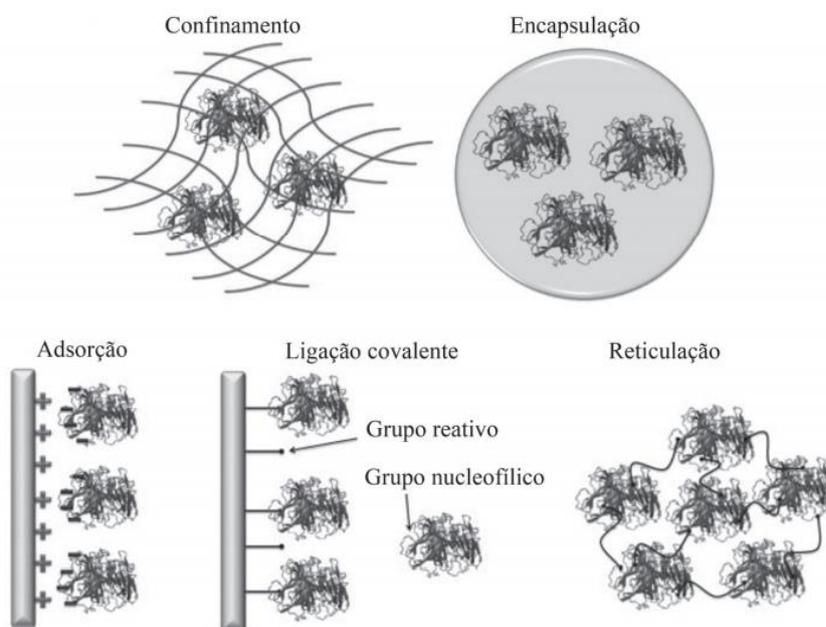
Fonte: Adaptado de Cabral (2013).

Vários suportes são encontrados na literatura, sendo testados para a imobilização de enzimas mediante diversas técnicas. A imobilização em suportes sólidos ocorre basicamente de três formas, por adsorção (carvão ativo), ligação covalente (celulose e sílica) ou ligação iônica (celulose), ou ainda, por combinações destas técnicas. A escolha do método vai depender da enzima a ser imobilizada e sua finalidade, ou seja, um importante requisito para imobilização de enzimas é de que a matriz deverá fornecer um ambiente inerte e biocompatível, isto é, não deve interferir com a estrutura nativa da proteína, que, assim, possa comprometer sua atividade biológica (MITCHELL et al., 2002).

3.4 Métodos de imobilização

Enzimas podem ser imobilizadas por diferentes métodos, tais como: encapsulação em membranas poliméricas; confinamento em matrizes poliméricas; adsorção em materiais insolúveis hidrofóbicos ou em resinas de troca iônica; ligação covalente a uma matriz insolúvel ou por reticulação (Figura 3) (MATEO et al., 2007; ILLANES et al., 2012; FERNANDEZ-FERNANDEZ; SANRAMAN; MOLDES, 2013).

Figura 3 – Métodos de imobilização de enzimas.



Fonte: Modificada de FERNANDEZ; SANRAMAN; MOLDES (2013).

As principais características a serem observadas na seleção de um suporte para uma determinada aplicação são: área superficial, permeabilidade, insolubilidade, capacidade de regeneração e inativação, morfologia e composição, natureza hidrofílica ou hidrofóbica, resistência ao ataque microbiano, resistência mecânica, custo do procedimento de imobilização e outras (DALLA-VECCHIA et al., 2004; MESQUITA, et al., 2018).

A maior contribuição para o bom desempenho da enzima imobilizada é dada pelo suporte e, apesar de existirem diferentes materiais e métodos que podem ser aplicados na imobilização de enzimas, a sua escolha dependerá, essencialmente, das características peculiares da enzima e das condições de uso da biomolécula imobilizada (MILETIC et al., 2009).

Assim, apresenta-se a seguir, algumas técnicas que vêm sendo empregadas para a imobilização de enzimas.

3.4.1 Adsorção física

A adsorção é um método simples e muito empregado para imobilização de enzimas. Neste método, as enzimas são imobilizadas no suporte por ligações de baixa energia: princípios fundamentais e tipos de suporte ligações como interações hidrofóbicas, forças de Van der Waals, ligações de hidrogênio e ligações iônicas (FERNÁNDEZ et al., 2013; ZHOU et al., 2012; ZHENG et al. 2012).

O método consiste na exposição da solução enzimática ao suporte sob condições apropriadas, tais como, pH, natureza do solvente, força iônica da solução, quantidade de enzima, tempo de contato e temperatura, separando a enzima imobilizada por centrifugação ou filtração. (HALLING et al., 2005; RUEDA et al., 2016; GOLGALVES, 2018).

As principais vantagens deste tipo de imobilização são a facilidade e a simplicidade do processo e, além disso, a estrutura conformacional da enzima é pouco alterada e pode ter elevada atividade catalítica (GAO et al., 2009; RASTIAN et al. 2014). Tal método promove pouca perturbação sobre a estrutura nativa da enzima. Porém como desvantagens, tem-se a aleatoriedade da interação enzima-suporte e a possibilidade de dessorção da enzima devido a variações de temperatura, pH e força iônica (BRADY, 2009; ARICA, et al., 2009; GUIDINNI, et al., 2010; MENDES, et al., 2011).

Além da utilização para a imobilização de enzimas, a técnica de adsorção física é também utilizada para a imobilização de outras biomoléculas, como por exemplo, anticorpos, com a vantagem da possível reutilização do suporte após a perda da sua capacidade de reconhecimento. Devido à possibilidade de dessorção das biomoléculas, a estratégia de adsorção por troca iônica apresenta limitações quando o complexo suporte-biomolécula é empregado em soluções salinas (MARCIELLO, et al., 2013).

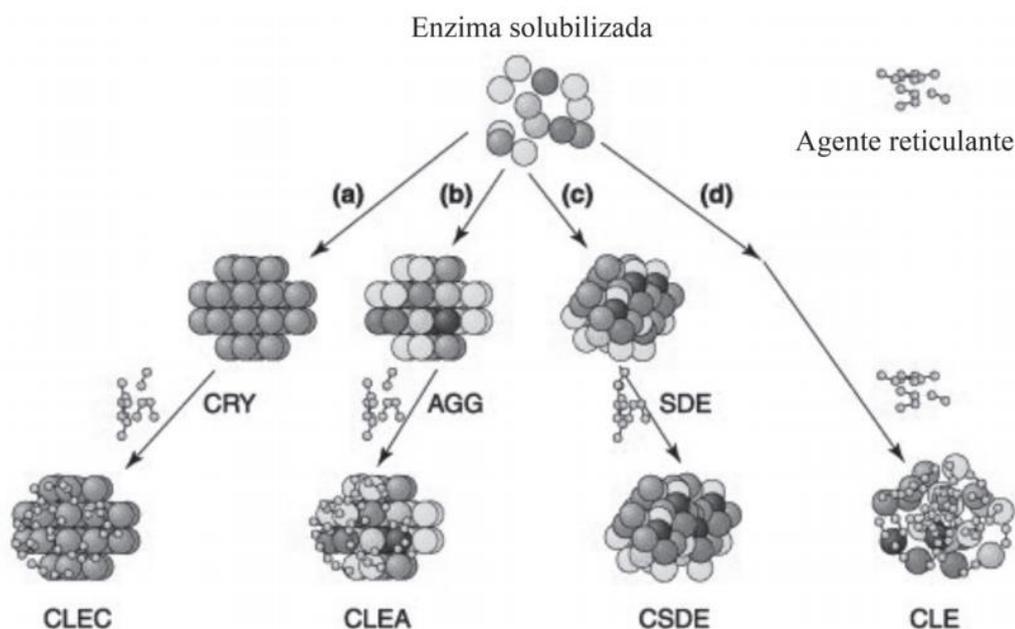
3.4.2 Reticulação

A reticulação de enzimas foi primeiramente descrita por Quioco e Richards, em 1964, com o objetivo de estabilizar cristais de enzimas para estudos de difração

de raios X. Os autores empregaram um agente bifuncional, como o glutaraldeído, e observaram a formação de cristais de enzima insolúveis com elevada atividade catalítica (cerca de 30% a 70% em comparação aos cristais de enzimas nativas (DOSCHER, et al., 1963; QUIOCHO e RICHARDS, 1964; QUIOCHO, et al., 1966; ZHENG, et al., 2012).

A enzima reticulada entre si é considerada um derivado enzimático isento de suporte (CAO et al., 2003). De acordo com a literatura especializada, diversos estudos têm sido realizados visando à obtenção de enzimas imobilizadas livres de suportes. Na maioria dessas abordagens, os derivados imobilizados são diretamente preparados a partir da reação de reticulação entre um agente reticulante e diferentes preparações enzimáticas, tais como a enzima solubilizada, cristalizada, atomizada e agregada, que ao final da reticulação resulta na formação de reticulados de enzimas (cross-linked enzyme – CLE), cristais de enzima reticulados (cross-linked enzyme crystals – CLEC), enzimas atomizadas reticuladas (cross-linked spray-dried enzyme – CSDE) e agregados enzimáticos reticulados (cross-linked enzyme aggregates – CLEA), conforme Figura 4 (MANECKE, 1972; AMOTZ, 1987; ABRAHAM, et al., 2004; ROY, et al., 2006; ABRAHAM, et al., 2006; GUPTA, et al., 2009; CRUZ, et al., 2012).

Figura 4 - Diferentes abordagens para a obtenção de enzimas imobilizadas livres de suportes: (a) cristalização, (b) agregação; (c) secagem por atomização; e (d) reticulação direta. CRY, cristais de enzima; AGG, agregados enzimáticos; SDE: enzima atomizada; CLECs, cristais de enzima reticulados; CLEAs, agregados enzimáticos reticulados; CSDEs, enzimas atomizadas reticuladas; CLEs, enzimas solubilizadas reticuladas.



Fonte: modificada de Cao et al. (2003).

Essa abordagem oferece vantagens como atividade enzimática altamente concentrada no catalisador, alta estabilidade e baixos custos de produção decorrentes da exclusão de um suporte sólido (CAO et al. 2003; SHELDON et al., 2005).

3.4.3 Retenção física

A imobilização de enzimas por retenção física (aprisionamento, confinamento ou encapsulação, envolvimento ou oclusão) envolve a polimerização *in situ* da matriz porosa em torno dos biocatalisadores a serem imobilizados. Nesse processo, a enzima é incorporada como parte da mistura reativa a ser polimerizada. À medida que a polimerização prossegue, a matriz polimérica se forma em torno da enzima, confinando-a em sua estrutura (MARCONI, 1989; HODGSON et al., 2002; KATO et al., 2002; DALLA-VECCHIA et al., 2004; GOLÇALVES, 2018).

As enzimas têm sido imobilizadas dentro de microcápsulas, lipossomas, fibras e matrizes constituídas de diferentes materiais produzidas especialmente pela técnica sol-gel (BRADY et al., 2009; FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ et al., 2013; GOLÇALVES, 2018).

Além de apresentar uma elevada simplicidade, este método não interfere com a configuração estrutural da enzima, o que se revela de extrema importância quando se fala em processos catalíticos que se baseiam na afinidade da enzima com o seu substrato (MARCONI, 1989; FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ et al., 2013).

As principais vantagens desse método é a grande área superficial disponível para o contato do substrato ao sítio ativo da enzima, o confinamento protege a enzima do contato direto com o meio reacional, minimizando, assim, os efeitos de inativação, por exemplo, por solventes orgânicos. Além disso, esse é o método de imobilização mais fácil de proceder e pode ser empregado para imobilizar um ou mais tipos de proteína com qualquer grau de purificação (MARCONI, 1989; DALLA-VECHIA et al., 2004; BRADY et al., 2009; MENDES et al., 2011; SHELDON, 2013).

No entanto, a oclusão apresenta graves problemas no que diz respeito à quantidade de enzima que pode ser incorporada na matriz e também em relação às limitações de transferência de massa, provocadas pelo difícil acesso do substrato ao biocatalisador (FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ et al., 2013; SIGLER; SKINNER, 1963).

Como desvantagens, têm-se as dificuldades associadas, como o controle do tamanho dos poros do suporte, a dessorção da enzima devido aos diferentes tamanhos de poros e inconvenientes de limitações de transferência de massa e difusão dos substratos pelos poros da matriz (KATO et al., 2002; ALFAYA; KUBOTA, 2002; HODGSON et al., 2004; DALLA-VECHIA et al., 2004; HANEFELD, 2009; BRADY et al., 2009; FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ et al., 2013).

Outra desvantagem é que muitos precursores utilizados para a polimerização das matrizes podem inativar as enzimas (HODGSON et al., 2004).

3.4.4 Ligação covalente

A imobilização por ligação covalente consiste na interação da enzima com o suporte por ligações covalentes, essa ligação é considerada bastante forte e

normalmente retêm vários resíduos de enzimas, viabilizando uma grande firmeza na sua estrutura, a qual mantém essa proteína estabilizada em condições de altas temperaturas, em meio orgânico, pH extremos e outros (REZENDE, et. al., 2016).

Dentre os métodos de imobilização disponíveis, a ligação covalente é o mais efetivo em termos de estabilização térmica e operacional das enzimas (PEDROCHE et al., 2007; MENDES, A. A et al., 2011).

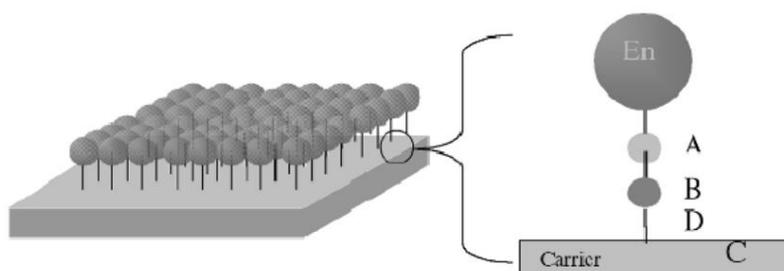
Na ligação covalente os átomos são ligados por meio da partilha de pares de elétrons. Estas ligações são formadas entre a enzima e o material utilizado como suporte, ocorrendo através dos aminoácidos de cadeia lateral, como histidina, lisina, arginina, cisteína ou ácido aspártico e glutâmico (de ALMEIDA, 2017).

Os métodos covalentes de imobilização são aplicados quando o produto final não possa, de forma alguma, conter resíduos da enzima. Portanto, o biocatalisador necessita apresentar forte estabilidade com a matriz, dependendo da sua natureza, para gerar as reações necessárias na obtenção do produto de interesse (BRADY et al., 2009).

Geralmente, a imobilização covalente de enzimas é realizada em três etapas sucessivas: a ativação inicial do suporte, seguido por modificação do suporte ativado e, finalmente, ligação da enzima com o suporte (BABAKI et al., 2015).

Os protocolos para a imobilização covalente da enzima frequentemente se iniciam com a modificação da superfície do suporte por meio de reações de ativação, na qual os grupos funcionais do suporte são modificados para produzir intermediários reativos (FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ et al. 2013). A Figura 5 apresenta um esquema da imobilização covalente de enzimas.

Figura 5 - Imobilização covalente de enzima em suporte sólido. (A) resíduo de aminoácido ativo; (B) funcionalidade ligante do suporte; (C) suporte; (D) braço espaçador.



Fonte: CAO, 2005.

As principais reações de ativação em suportes são realizadas utilizando-se agentes bifuncionais, como por exemplo: epicloridrina, glicidol, glioxal, diisocianato de hexametileno, diisocianato de tolueno e glutaraldeído (ADRIANO et al., 2008; RODRIGUES et al., 2008; GONÇALVES, 2018).

Geralmente, o glutaraldeído é um dos reagentes mais empregados na ativação de suportes e/ou como braço espaçador (MATEO et al., 2017; CHAUBEY et al., 2009; BARBOSA et al., 2012).

Nesse caso, a molécula de glutaraldeído reage com o suporte e a enzima, e estas são imobilizadas covalentemente no suporte por reação com seus grupos aminos (α -NH₂ da cadeia terminal, ϵ -NH₂ da lisina e/ou NH₂ proveniente de aminação química), que se ligam aos grupos aldeídos do suporte, formando as bases de Schiff. Entretanto, o glutaraldeído deve ser manuseado com cuidado, pois é um composto neurotóxico (ANVISA, 2007).

O número de ligações covalentes entre o suporte e a enzima depende da densidade dos grupos reativos por unidade de área do suporte, da reatividade dos grupos funcionais tanto da enzima quanto do suporte e do estado de protonação dos mesmos, bem como da especificidade dos grupos ativos do suporte (GUISÁN, 1988; ERDEMIR; YILMAZ, 2009; BRADY et al., 2009; FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ et al., 2013).

A diversidade de suportes com grupos funcionais capazes de promover ligações covalentes, ou suscetíveis à ativação, torna esse método de imobilização aplicável em muitas situações. Contudo, a seleção das condições para a imobilização por ligação covalente é mais difícil que em outros métodos de imobilização (COWAN, 2011).

Suas principais vantagens são a maior resistência do biocatalisador quanto à variação de pH, temperatura e influência de solventes orgânicos; os derivados preparados podem ser empregados em diversas conformações de reatores, como fluxo contínuo, empacotado, tanque agitado e leito fluidizado e, a carga de enzima permanece constante após a etapa de imobilização (MATEO et al., 2007; JEGANNATHAN et al., 2008; FREITAS et al., 2011).

A principal desvantagem da imobilização por ligação covalente está relacionada à parcial inativação e/ou redução da atividade catalítica da enzima, devido à alteração em sua conformação nativa impostas pelas ligações entre as enzimas e os grupos reativos do suporte (ERDEMIR; YILMAZ, 2009).

3.6 SUPORTES PARA IMOBILIZAÇÃO

A seleção da técnica e suporte empregados depende da aplicação a que o biocatalisador se destina. Não há um suporte universal para todas as enzimas e suas aplicações, mas a escolha do suporte dependerá da reação na qual o derivado imobilizado será aplicado, o biocatalisador a ser utilizado, e custos envolvidos no processo (DALLA-VECCHIA et al., 2004).

A maioria das matrizes tem apenas algumas das propriedades, portanto, a seleção da matriz de suporte para imobilização enzimática deve ser escolhida com base nas propriedades e limitações das matrizes (SIRISHA et al., 2016).

Tradicionalmente, a abordagem usada é a de tentativa e erro, até que um sistema satisfatório tenha sido alcançado (POPPE et al., 2015).

A interação entre suporte e enzima, fornece propriedades químicas, bioquímicas, mecânicas e cinéticas específicas. As características do suporte são de importância primordial no desempenho do sistema de enzima imobilizada. (PEREIRA, 2015). Entre elas inclui-se: elevada área superficial, permeabilidade, estabilidade química e mecânica sob as condições operacionais, capacidade de regeneração,

custo, morfologia e composição, natureza hidrofílica ou hidrofóbica, resistência ao ataque microbiano, alta densidade de grupos reativos presentes em sua superfície, dentre outras (MATEO et al., 2007; MENDES et al., 2011; TALBERT; GODDARD, 2012).

A uniformidade do tamanho de poros também é muito importante para suportes enzimáticos, uma distribuição de tamanho de poro não homogêneo interfere não apenas na otimização de carga proteica sobre as superfícies internas, mas também na difusão de substratos e/ou produtos (BLANCO et al., 2004).

Com base na sua composição química, as matrizes de suporte são classificadas em duas categorias principais: (a) material de suporte inorgânico e (b) material de suporte orgânico (os suportes orgânicos são subdivididos em suportes naturais e sintéticos). Suportes inorgânicos são mais adequados para o uso industrial devido as suas propriedades físicas, apresentando como vantagens elevada resistência mecânica e estabilidade térmica, resistência a solventes orgânicos e ataque de microrganismos e fácil regeneração. Além de não apresentarem modificação na estrutura em uma larga faixa de pH, temperatura e pressão. Incluem

vidro, gel de sílica, alumina, óxidos metálicos, zircônia e muitos outros materiais (SIRISHA, et al. 2016).

Os suportes orgânicos, em especial os polímeros, que podem ser naturais ou sintéticos, são uma classe de suportes muito importantes no campo da imobilização de biocatalisadores. Os polímeros sintéticos exibem variedades de formas físicas e estruturas químicas que podem ser combinadas para formar um suporte de acordo com as características desejadas, porém os polímeros naturais apresentam algumas vantagens quando comparados aos sintéticos, pois geralmente têm baixo custo e são facilmente degradáveis, não causando danos ao meio ambiente⁹⁶. Dentre os diferentes suportes empregados na imobilização de enzimas destacam-se os orgânicos naturais agarose e quitosana e resinas acrílicas comerciais (polímeros sintéticos) (MATEO et al., 2000; LÓPEZ-GALLEGO et al., 2005; MATEO et al., 2007).

Suportes que serão ativados com glutaraldeído devem ser preparados no momento da utilização, pois o grupo reativo tem baixa estabilidade (SANTOS, 2014).

No presente trabalho, o método de ligação covalente será empregado na imobilização da Pectinex® Smash XXL.

O suporte utilizado é a parafina com funcionalização *in situ* utilizando o glutaraldeído como agente de ligação entre enzima e o suporte.

Com isso tem-se uma etapa a menos no processo de imobilização de pectina, que ocorre normalmente com a produção do suporte e posteriormente a funcionalização do mesmo com grupos funcionais livres (aldeídos neste caso) para realizarem a ligação covalente com grupos amina desprotonados da enzima, produzindo uma imina, mais conhecida por base de Schiff (SANTOS, 2018). Portanto, ênfase será dada ao suporte utilizado no desenvolvimento deste estudo, a parafina.

3.5.1 Parafina

A parafina é um derivado do petróleo descoberto por Carl Reichenbach. Conhecida por sua alta pureza, é comumente encontrada com aparência de cera sólida branca, sem odor, sem gosto e com ponto de fusão típico entre 58 °C e 62 °C. A parafina não reage com a maioria dos reagentes químicos mais comuns, é insolúvel

em água, porém solúvel em dietil-éter, éter, benzeno e em certos ésteres (GANGOLLI, 1999; OLIVEIRA, 2018).

As parafinas são compostos orgânicos classificados como hidrocarbonetos alifáticos. O termo alifático é proveniente do grego *áleiphar*, que significa “que serve para ungir; óleo”, devido à sua característica oleosa (NETO; GURGEL, 2007).

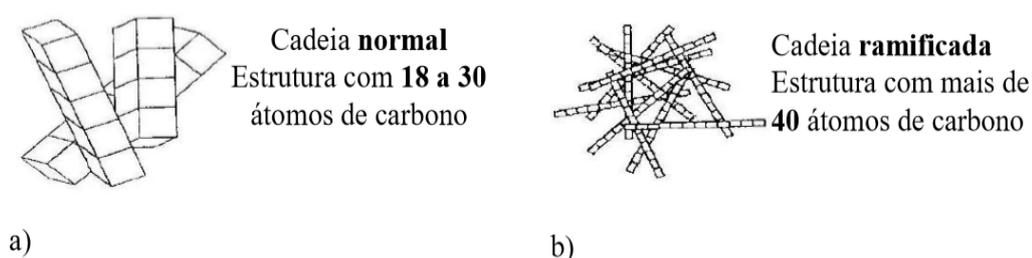
As parafinas são, essencialmente, uma mistura de longas cadeias de hidrocarbonetos (alifáticos saturados) com carbonos que vão do C15 ao C75, mantidas por forças de dipolos induzidos (MORÁN, 2007).

As cadeias carbônicas podem variar, contudo, na sua maioria possuem quantidades de carbono maior que vinte. Seus átomos realizam apenas ligações covalentes simples (C-C), com cadeias normais ou ramificadas. Conforme a massa molar das parafinas aumenta, isto é, o número de carbonos, a temperatura de fusão aumenta (SOUZA, 2005).

As parafinas podem ser divididas em dois grupos distintos: macrocristalinas e microcristalinas (Figura 6).

As parafinas macrocristalinas são constituídas de parafinas de cadeia normal com número de átomos de carbono entre 18 e 30. Essas parafinas possuem cristais bem definidos e visíveis a olho nu. Parafinas de cadeia ramificada e com átomos de carbono acima de 40 são denominadas de microcristalinas (GOMES, 2009).

Figura 6 – Detalhes de parafina (a) macrocristalina e (b) microcristalina.



As parafinas de cadeia ramificada, naftênicas e as lineares compõem a maior porção das parafinas microcristalinas e são conhecidas como iso-parafinas (YUPA, 2010; OLIVEIRA, 2018).

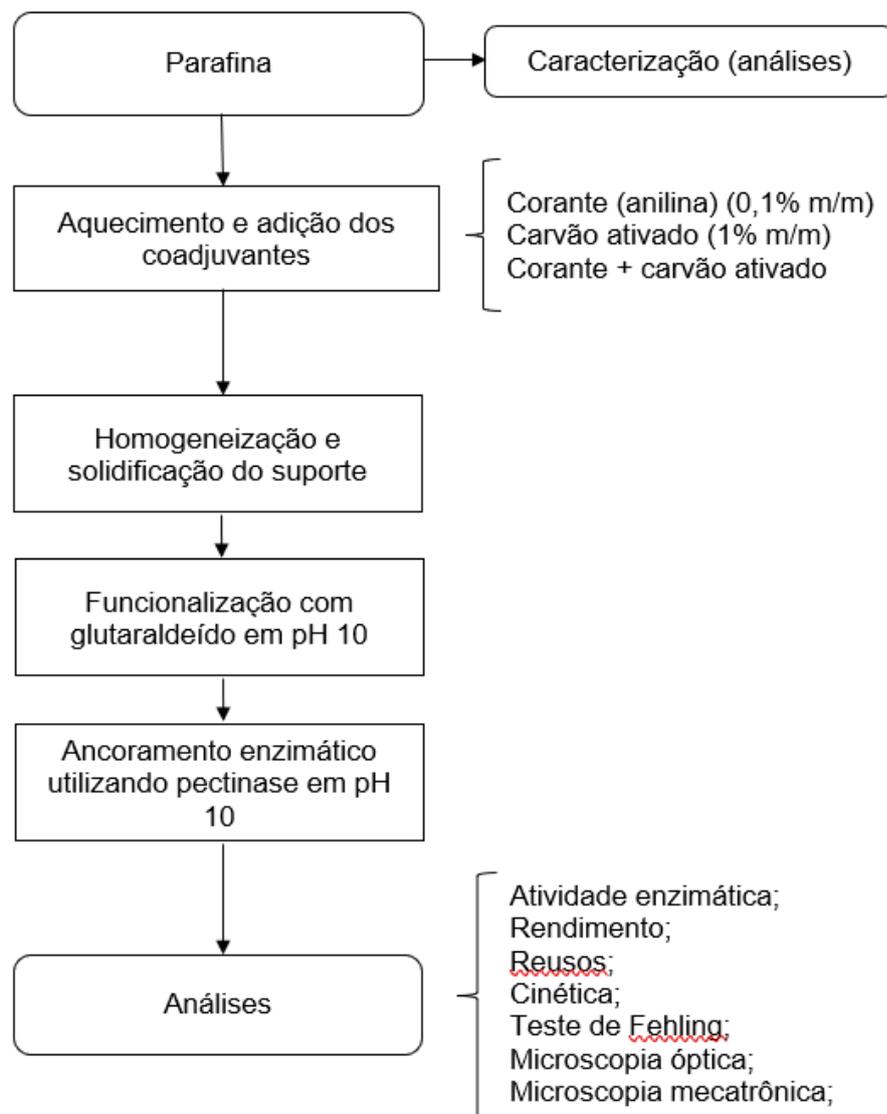
São encontradas em grandes quantidades na natureza, podendo ser obtidas como produto principal ou subproduto de alguns processos industriais. Sua

classificação depende intimamente do seu processo de fabricação, fornecendo ao mercado produtos de várias qualidades, com diferentes propostas de utilização. Está presente em diversos setores como alimentícios e farmacêuticos, fazendo parte do cotidiano do mundo moderno (SOUZA, 2005).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Neste capítulo são descritos os reagentes, métodos e equipamentos utilizados nos experimentos. Os experimentos foram realizados nas instalações da Universidade Regional e Integrada do Alto Uruguai e das Missões (URI – ERECHIM). O Fluxograma 1 apresenta a imobilização enzimática com as suas respectivas etapas.

Figura 7 – Fluxograma das Etapas de síntese e imobilização enzimática em suporte de parafina funcionalizado com glutaraldeído.



Fonte: A autora.

4.1 Preparo do suporte

4.1.1 Materiais

Os testes de imobilização enzimática em suporte de parafina foram conduzidos baseados no preceito da ligação covalente entre o suporte e a enzima.

Para a base do suporte foi escolhida a parafina, a qual foi obtida no comércio local. A anilina, o glutaraldeído 50% (Vetec®) e a solução tampão de amônia (pH 10) foram previamente preparadas utilizando os reagentes do laboratório da URI-Erechim.

4.1.2 Síntese do suporte

Para a síntese do suporte, pesou-se 10 g de parafina em um béquer e submeteu-se ao aquecimento, com auxílio de uma placa de aquecimento, até o completo derretimento da parafina. Após, adicionou-se o corante anilina (0,1% m/m) e/ou o carvão ativado (1% m/m). Como resposta, acompanhou-se o aspecto físico da mistura (se houve ou não solubilidade), sendo que a homogeneização com bastão de vidro só era cessada após a obtenção de uma solução homogênea. A fim de comparação, realizou-se o mesmo procedimento de obtenção do suporte apenas com a parafina pura (branco).

Após a obtenção da solução homogênea, a mesma era vertida em um béquer com água fria para solidificação. Após decorrido alguns minutos, o suporte era retirado da água, seco com papel toalha e quebrado manualmente em pequenos pedaços (Figura 2), para que os poros não fossem fechados nas laterais, como acontecia ao cortar com estilete ou faca. Notou-se duas superfícies distintas no suporte em todas as condições testadas, sendo elas a superfície que ficava em contato com o ar e a superfície que ficava em contato com a água.

Figura 8 - Suporte de imobilização em parafina. Em (a) a superfície que ficou em contato com o ar, em (b) a superfície que ficou em contato com a água e em (c) o suporte após quebra manual.



4.1.3 Funcionalização do suporte com glutaraldeído

Para a funcionalização dos suportes, utilizou-se uma solução de glutaraldeído 50% em tampão pH 10 a fim de se obter uma base conjugada de Schiff. Para cada teste de funcionalização, adicionou-se aproximadamente 10 g de suporte em um erlenmeyer contendo 15 mL de solução tampão (pH 10), 35 mL de água destilada e 6 mL de glutaraldeído (50%). A mistura ficou por 1h 30 min em shaker a 20 °C com agitação a 200 rpm. Após, filtrou-se o suporte com papel filtro e o mesmo foi lavado com água destilada para a remoção do excesso de tampão e glutaraldeído. O suporte foi deixado em temperatura ambiente por 6 horas antes da etapa de imobilização. O mesmo procedimento foi realizado para o suporte contendo apenas parafina (branco).

4.2 Imobilização enzimática em suporte de parafina funcionalizado com glutaraldeído

Após a síntese e funcionalização do suporte de parafina foi realizada a imobilização enzimática utilizando uma enzima pectinolítica. A enzima utilizada no presente estudo foi a Pectinex® Smash XXL, gentilmente cedida pela Novozymes Latin. America Ltda, onde foi mensurada a atividade para a exo-poligalacturonase (PG). A escolha da enzima pectinolítica foi devido às características do suporte, o qual não é solúvel e não interage com os reagentes da medida de atividade para a PG. Quando testado para imobilização com lipase, o suporte solubilizou no ácido oleico (substrato), o que não é desejável.

Para a imobilização, utilizou-se aproximadamente 1,5 g de suporte, o qual foi adicionado em um erlenmeyer contendo 15 mL de solução tampão (pH 10), 35 mL de água destilada e 2 mL de extrato enzimático. A solução ficou por 1 h 30 min em shaker a 20 °C com agitação a 200 rpm. Após, filtrou-se o suporte com papel filtro e o mesmo foi lavado com água destilada para a remoção do excesso da solução contendo tampão e extrato enzimático. O suporte foi deixado em temperatura ambiente até a realização dos testes de atividade enzimática.

4.2.1 Atividade de exo-poligalacturonase (PG)

A atividade de PG da pectinase comercial foi estimada, pela quantificação do ácido galacturônico produzido na reação de hidrólise da pectina cítrica, utilizando o método do ácido 3,5 dinitrosalicílico descrito por Miller (1959) e uma curva de calibração estabelecida com ácido α -D-galacturônico (massa molecular 212,6 g/mol) como açúcar redutor e o reagente DNS (ácido 3,5 dinitrosalicílico).

Um volume de 500 μ L de substrato (0,5 % m/v em tampão acetato de sódio 100 mM; pH 4,5) foi incubado a 37 °C por 15 minutos para a estabilização de temperatura. A seguir, 500 μ L da solução de pectinase foram adicionados ao substrato e a reação foi incubada a 37 °C por 5 minutos. Posteriormente, foram adicionados 1000 μ L do reagente DNS. Para a formação da cor, a mistura foi aquecida em banho maria a 100 °C por 8 minutos, resfriada em banho de gelo, após foram adicionados 8 mL de solução de tartarato duplo de sódio potássio (50 mM) para a estabilização da cor, e

finalmente as absorbâncias das amostras foram medidas em um espectrofotômetro (Beckman Coulter, modelo DU640) a 540 nm contra o branco, o qual foi preparado da mesma forma como descrito anteriormente, com a diferença que o volume de enzima foi substituído por água destilada.

Uma unidade de atividade pectinolítica foi definida como a quantidade de ácido galacturônico gerada por minuto ($U = \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1}$) por grama de imobilizado (U/g) ou mL de extrato enzimático (U/mL) sob as condições estudadas.

4.2.2 Estudo cinético do tempo ótimo de imobilização

O estudo cinético foi conduzido com o objetivo de determinar o melhor tempo de reação correspondente aos maiores valores de atividade pectinolítica para a enzima imobilizada em suporte de parafina com os diferentes coadjuvantes. As amostras dos suportes imobilizados e da parafina pura (0,5 g) foram incubadas em uma solução contendo 15 mL de solução tampão (pH 10), 35 mL de água destilada e 2 mL de enzima. Uma alíquota da solução foi retirada em 5, 10, 15, 30, 60, 90, 120, 180 e 210 minutos de reação em shaker a 20 °C com agitação a 200 rpm. Posteriormente, foi dosada a atividade enzimática como descrita no item 4.2.1.

4.2.3 Rendimento

O rendimento foi calculado considerando a atividade total oferecida (U_o) no extrato enzimático (a qual considera a atividade do extrato e o volume empregado) e a atividade total presente no imobilizado (U_i), a qual é calculada considerando a atividade do imobilizado e a massa produzida, de acordo com a Equação 1.

$$R(\%) = \frac{U_i}{U_o} \times 100 \quad \text{Equação (1)}$$

4.2.4 Estabilidade operacional (reciclos)

A reutilização da pectinase imobilizada nos suportes de parafina foi determinada empregando uma quantidade definida do derivado imobilizado, em

sucessivos ciclos, em batelada, durante a hidrólise da pectina cítrica (0,5% m/v, pH 4,5) a 37 °C. Após cada batelada, as amostras foram removidas do meio reacional, lavadas com água destilada e adicionadas em uma nova solução de pectina cítrica. A atividade do primeiro ciclo foi considerada como 100%. A eficiência do reuso foi calculada conforme apresentado na Equação 2.

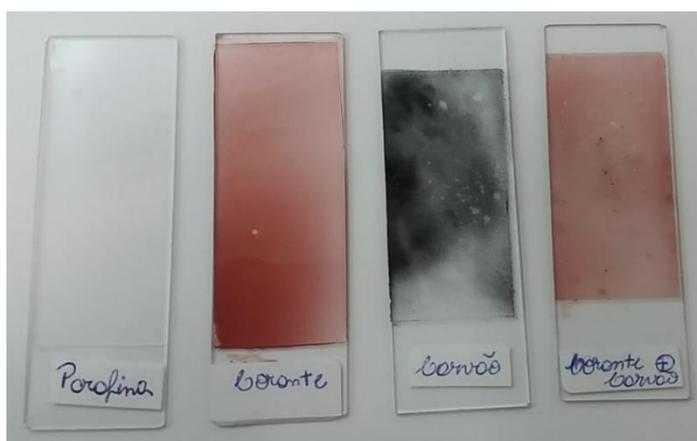
$$\text{Reciclo (\%)} = \frac{\text{Atividade pectinolítica no ciclo } n}{\text{Atividade pectinolítica no ciclo } 1} \times 100 \quad \text{Equação (2)}$$

4.3 Determinação da estrutura e superfície dos suportes por microscopia

4.3.1 Determinação da estrutura dos suportes

A estrutura dos diferentes suportes com e sem funcionalização com glutaraldeído foi observada em um microscópio óptico Standard 20 – Zeiss, utilizando uma lente objetiva com aumento de 100x para avaliação qualitativa. Uma pequena quantidade de cada amostra foi derretida em uma lâmina de vidro, com posterior sobreposição de uma lamínula (Figura 9) para ser possível a visualização no microscópio.

Figura 9 - Amostra preparada na lâmina de vidro para análise no microscópio óptico.



4.3.2 Determinação da superfície dos suportes

A determinação da superfície dos suportes sem funcionalização com

glutaraldeído foi realizada com um microscópio BEL Photonics com aumento de 100x para avaliação qualitativa. Para a análise, foi colocado o suporte inteiro (antes de ser quebrado para ser realizada a funcionalização). As duas faces do suporte foram analisadas (com/sem contato com a água na hora da solidificação da parafina).

4.4 Teste de Fehling

Para o teste de Fehling, 1 grama de cada suporte de imobilização, funcionalizado ou não, foi submetido a aquecimento em ebulição por 10 min com 5 mL de reagente de Fehling (Solução A e B na proporção 1:1). Após decorrido o tempo estipulado, foi observado se houve formação de precipitado no fundo do recipiente, bem como se houve alteração da coloração da parafina.

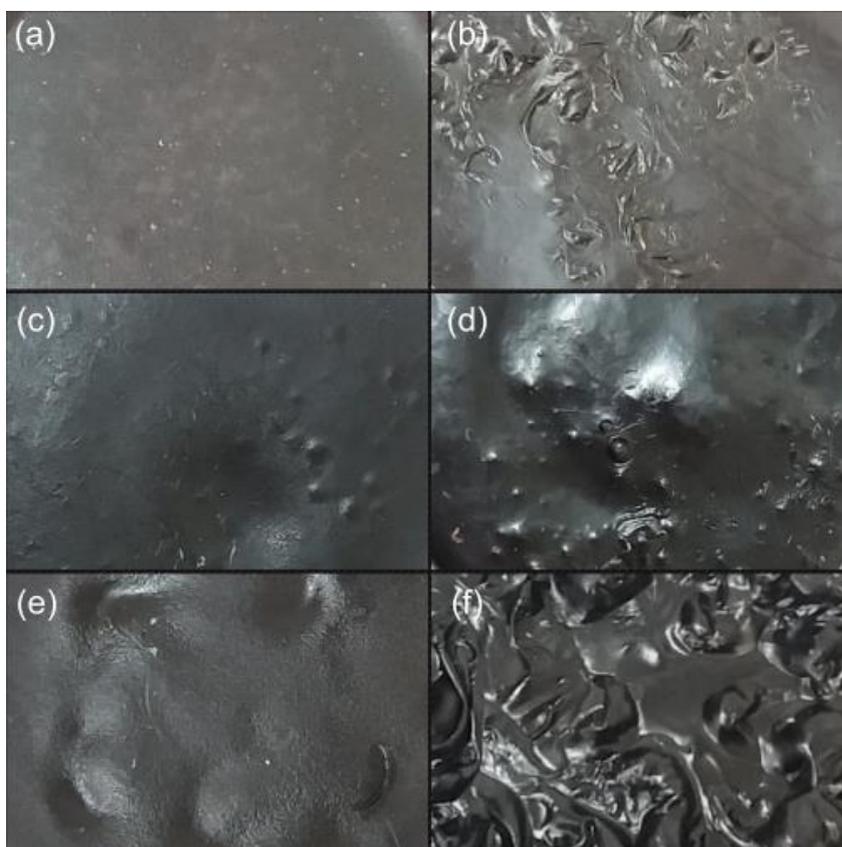
5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

O presente capítulo visa apresentar os resultados obtidos referentes ao processo imobilização da pectinase em suporte funcionalizado de parafina com corante anilina e/ou carvão ativado, bem como a caracterização dos suportes obtidos.

5.1 Síntese do suporte de parafina com corante anilina e/ou carvão ativado

Para todas as condições testadas, a parte superior do suporte apresentava-se porosa (face que ficou em contato com o ar), e a parte inferior irregular e lisa (face que ficou em contato com a água), resultado esse mais proeminente no suporte de corante + carvão (Figura 10).

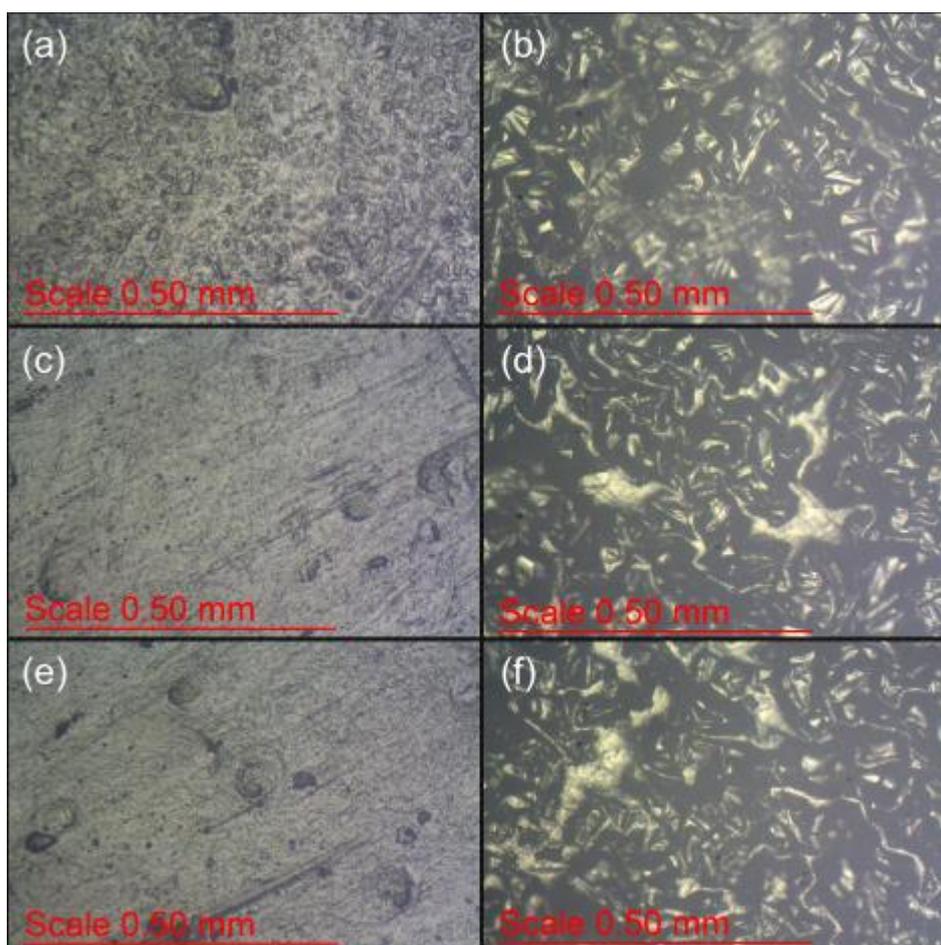
Figura 10 - Aspectos visuais das faces dos suportes obtidos. Em (a) e (b) faces superior e inferior do suporte de corante anilina, respectivamente; em (c) e (d) faces superior e inferior do suporte de carvão ativado, respectivamente; e em (e) e (f) faces superior e inferior do suporte de corante anilina + carvão ativado, respectivamente.



Corroborar com esta tendência as análises de microscopia da superfície (Figura 11), onde observa-se que a região porosa corresponde a que ficou em contato com o ar no momento de solidificação do suporte.

Esta tendência foi vinculada às características dos meios com que a parafina encontra-se em contato durante a sua solidificação. O contato com a água, a qual produz uma barreira mais densa que o ar, e por encontra-se sob a parafina tende a favorecer a compactação da parte inferior da mesma, conduzindo a uma face menos porosa, ou seja, mais lisa.

Figura 11 - Microscopias de superfície das faces dos suportes obtidos com aumento de 100x. Em (a) e (b) faces superior e inferior do suporte de corante anilina, respectivamente; em (c) e (d) faces superior e inferior do suporte de carvão ativado, respectivamente; e em (e) e (f) faces superior e inferior do suporte de corante anilina + carvão ativado, respectivamente.



5.2 Funcionalização do suporte com glutaraldeído

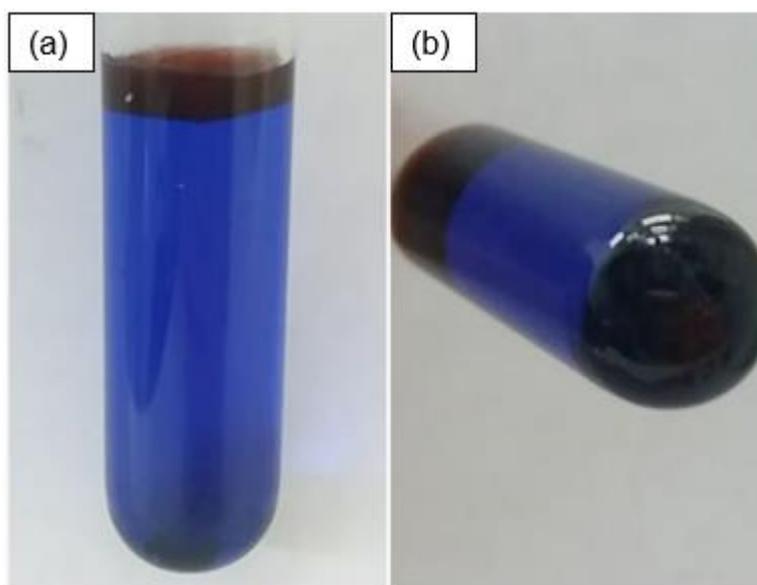
Após a funcionalização com glutaraldeído, as amostras foram analisadas qualitativamente em relação a presença de grupos reativos aldeídos na superfície do suporte mediante teste de Fehling, o qual conduz a formação de um precipitado de óxido cuproso (Cu_2O), de coloração avermelhada, empregado como critério qualitativo da presença de glutaraldeído no suporte.

Devido ao teste de Fehling requerer aquecimento em ebulição, a parafina funde, proporcionando a lixiviação de glutaraldeído para o meio, conduzido, em caso positivo a formação de precipitado no fundo do frasco empregado nos testes.

Para a amostra em branco, ou seja, conduzida empregando parafina pura submetida ao mesmo processo de funcionalização com glutaraldeído, a parte superior permaneceu branca e não constatou-se a formação de precipitado no fundo do tubo de ensaio, indicando que não houve incorporação de glutaraldeído neste suporte.

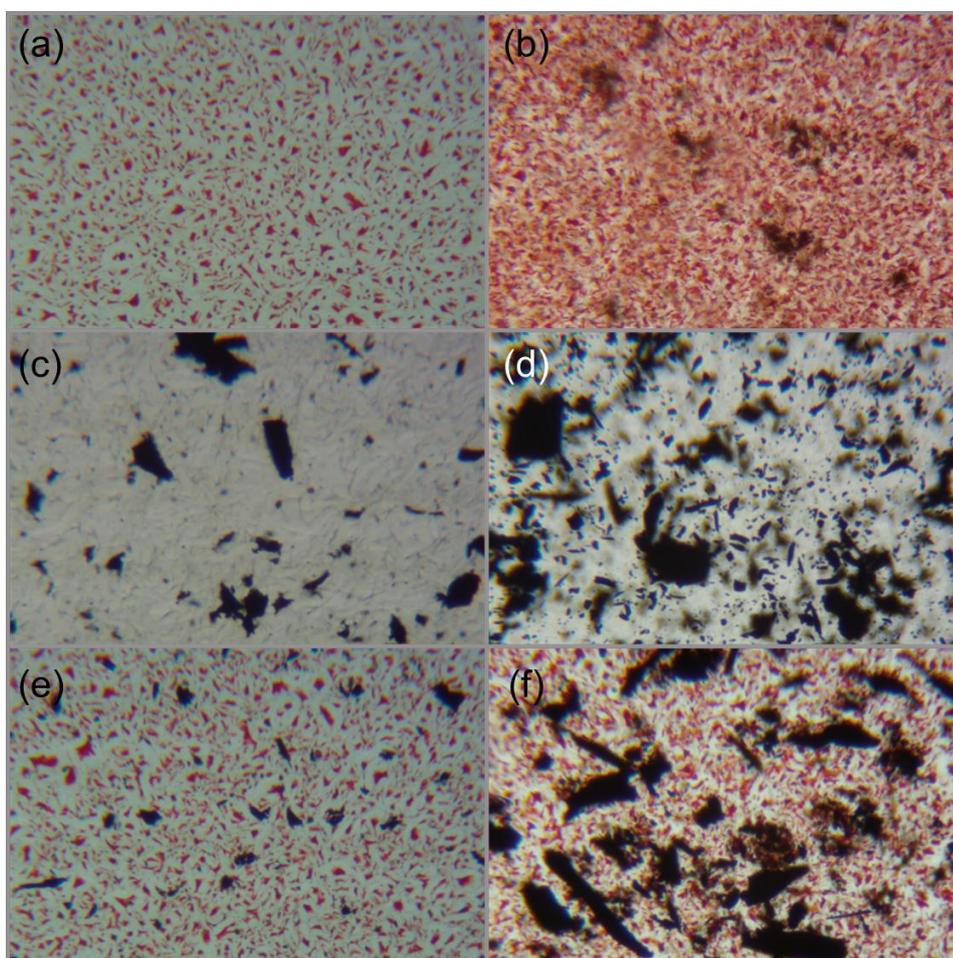
Diferentemente do ensaio em branco, os suportes contendo corante anilina e/ou carvão, após a funcionalização apresentaram uma mesma tendência, produzindo um precipitado avermelhado no fundo do recipiente (Figura 12) sugerindo a presença de glutaraldeído no meio, ou seja, que o processo de funcionalização foi eficiente.

Figura 12 – Resultado visual do teste de Fehling.



Paralelamente os diferentes suportes, foram analisados em microscópio óptico, com aumento de 100x. Para tanto, o suporte precisou ser derretido, resultando nas imagens apresentadas na Figura 13.

Figura 13 - Microscopias ópticas de estrutura dos suportes obtidos com aumento de 100x. Em (a) e (b) suporte de corante anilina com e sem glutaraldeído, respectivamente; em (c) e (d) suporte de carvão ativado com e sem glutaraldeído, respectivamente; e em (e) e (f) suporte de corante anilina + carvão ativado com e sem glutaraldeído, respectivamente.



Podemos observar que tanto o corante quanto o carvão apresentaram uma distribuição homogênea no suporte (Figuras 13a, 13c e 13e). Após a funcionalização com glutaraldeído constatou-se o surgimento de manchas marrons em pontos do suporte, não observadas antes da funcionalização, o qual foi vinculado a presença de glutaraldeído no suporte. Cabe destacar que a parafina pura após ser submetida a

etapa de funcionalização com glutaraldeído não apresentou a presença destas manchas (Figura 14).

Figura 14 - Microscopia óptica de estrutura da parafina pura após ensaio de funcionalização com glutaraldeído.

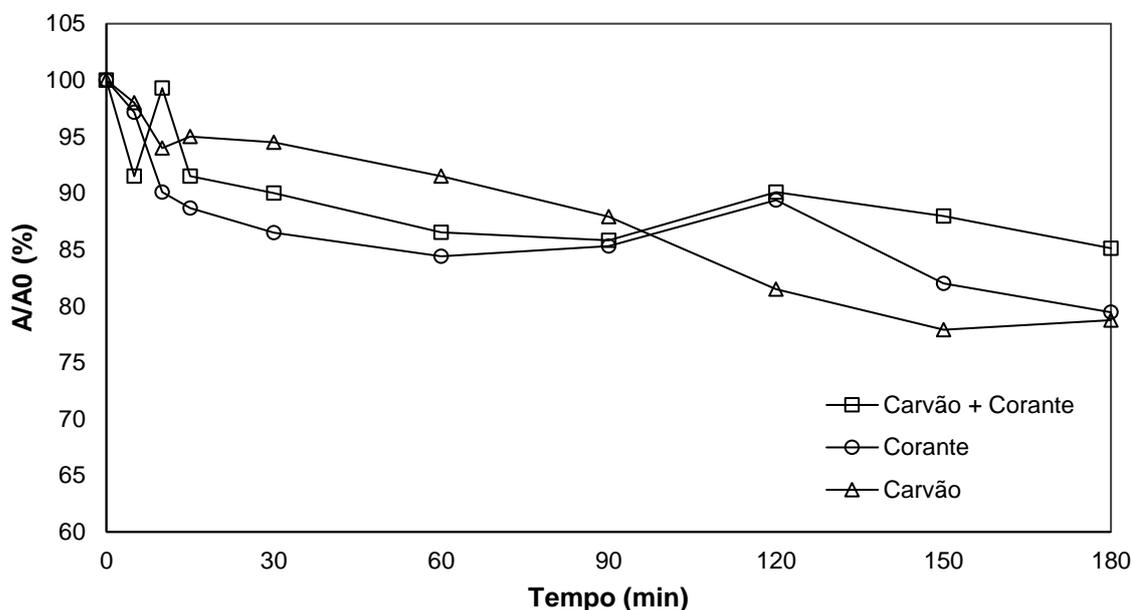


5.3 Imobilização enzimática

5.3.1 Estudo cinético

O estudo cinético busca otimizar o tempo ótimo reacional necessário para a maximização da incorporação da enzima no suporte. Nos ensaios de imobilização acompanhou-se a diminuição da atividade do extrato enzimático em contato como suporte funcionalizado em função do tempo (Figura 15).

Figura 15 – Cinética de imobilização dos suportes funcionalizados com corante anilina e/ou carvão ativado.



Os suportes funcionalizados contendo corante, de forma independente ou associado com carvão, foram os que apresentaram a melhor cinética reacional, conduzindo a uma diminuição significativa da atividade do extrato nos até os 30 minutos reacionais, permanecendo relativamente estável no restante do experimento, ou seja, até os 180 minutos empregados no ensaio. O suporte funcionalizado contendo somente carvão foi o que apresentou a cinética mais lenta, proporcionando uma diminuição gradativa da atividade no extrato até os 150 minutos, a partir deste tempo de contato observa-se uma região de estabilidade.

Esta tendência observada foi vinculada com a composição do suporte, visto que a incorporação do corante anilina conduz a funcionalização do mesmo com grupos amino, os quais servem de pontos de ancoramento para o glutaraldeído, conduzindo a uma disponibilização mais efetiva dos mesmos para o ancoramento da enzima em relação ao carvão ativado.

No carvão ativado o glutaraldeído encontra-se adsorvido, preferencialmente no interior dos poros, onde a área de contato é maior, proporcionando para a enzima um efeito difusional que retarda o processo de incorporação, o que justifica a remoção gradativa observada para a atividade do extrato.

5.3.2 Rendimento de imobilização

Em se tratando de imobilização, um parâmetro importante a ser considerado é o rendimento de imobilização, o qual nos permite estipular a quantidade de enzima imobilizada, bem como se o processo foi favorável ou não para a enzima em questão.

O rendimento de imobilização para os suportes funcionalizados encontra-se apresentados no Quadro 2.

Quadro 2 – Rendimento (%) dos suportes de parafina funcionalizados com corante anilina e/ou carvão ativado.

	Carvão	Corante	Carvão + Corante
Volume de extrato oferecido (mL)	2,00	2,00	2,00
Atividade do extrato (U/mL)	4,00	4,00	4,00
Atividade Total Oferecida (U _o)	8,00	8,00	8,00
Massa imobilizado (g)	1,50	1,50	1,50
Atividade do Imobilizado (U/g)	2,66	2,61	2,62
Atividade Total do Imobilizado (U _i)	3,99	3,91	3,93
Rendimento (%)	49,8	48,9	49,1

De acordo com a Quadro 2 todos os suportes funcionalizados apresentaram valores similares para o rendimento de imobilização, o qual, considerando a atividade total presente no imobilizado em relação a oferecida, foi de aproximadamente de 50%. Isto não significa que 50% da enzima presente no extrato foi incorporada, pois durante o processo de imobilização a atividade da enzima pode ser melhorada, por minimização de inibidores, exposição de novos sítios ativos por distorção da enzima, bem como facilidade do acesso de novos sítios ativos, como o observado por outros autores para diferentes enzimas em suportes distintos. Nyari et al (2015) e Antunes (2005) para a lipase imobilizada, Bustamante (2015) para pectinase, ambas imobilizadas em poliuretano, Gaio (2016) para uma pectinase imobilizada em gelatina-alginato, observaram rendimentos superiores a 100%, indicando que o processo de imobilização proporcionou em efeito positivo sobre a atividade da enzima.

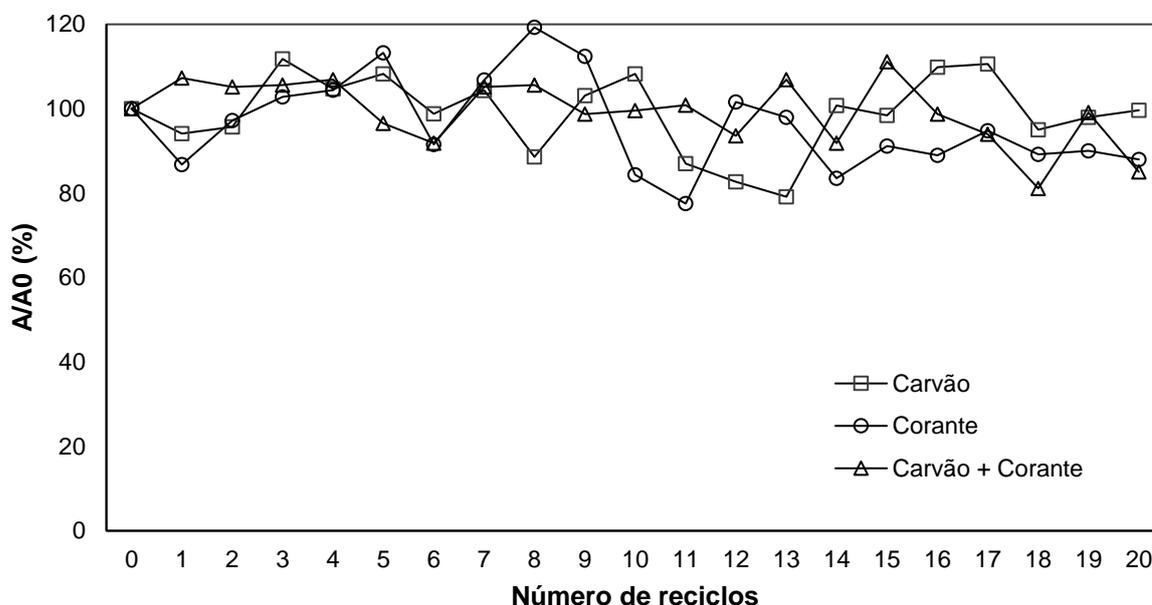
Cabe destacar que a imobilização também pode proporcionar inativação da

enzima, principalmente nos processos por ligação covalente, uma vez que a mesma ocorre nos grupos amino da enzima, os quais podem estar contribuindo para a atividade da mesma (GONÇALVES, 2018).

5.3.2 Reciclos enzimáticos

A reutilização do imobilizado pode ser estimada em função da variação da atividade dos mesmos após cada reciclo, a qual é apresentada na Figura 16.

Figura 16 – Número de reciclos enzimáticos avaliando os diferentes suportes testados.



De acordo com a Figura 16 todos os imobilizados apresentaram a mesma tendência, mantendo sua atividade em aproximadamente 100% durante os 20 ciclos testado, indicando que a enzima que encontrar-se ancorada de forma eficiente ao suporte uma vez que não houve perda de atividade a qual está normalmente relacionada com a lixiviação do suporte. Neste aspecto dá para estipular que a enzima não está perdendo atividade.

Resultados similares foram observados por Nyari (2015) para a lipase imobilizada em PU e Bustamante (2016) para pectinase imobilizada em PU, os quais observaram uma manutenção de 100% da atividade por mais de 20 ciclos.

6 CONCLUSÃO

Pode ser verificado no presente estudo a eficiência dos aditivos de imobilização empregados na estrutura da parafina antes da funcionalização. Ambos (corante e/ou carvão) apresentaram resultados similares para as análises empregadas. Fato esse importante, pois com a ausência dos mesmos, não é possível funcionalizar a parafina.

A enzima empregada nos testes foi uma pectinase, por sua característica desejável e fácil medida de atividade, com substrato não degradante do suporte escolhido (parafina). Foi possível verificar a eficiência do processo de imobilização frente ao rendimento (~50%) e ciclos (20 ciclos com ~100% de estabilidade).

A metodologia empregada é de baixo custo, rápida e de fácil reprodutibilidade e recuperação, características estas desejadas ao se escolher um suporte para imobilização enzimática.

7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Avaliar a estabilidade ao armazenamento;
- Avaliar outros aditivos com grupo(s) amino(s) em sua estrutura.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRAHAM T. E.; JOSEPH J. R.; BINDHU, L. B. V.; JAYAKUMAR, K. K. Crosslinked enzyme crystals of glucoamylase as a potent catalyst for biotransformations. **Carbohydrate Research**, v. 339, p. 1099-1104.
- ADRIANO, W. S.; MENDONÇA, D. B.; RODRIGUES, D. S.; MAMMARELLA, E. J.; GIORDANO, R. L. C. Improving the properties of chitosan as support for the covalent multipoint immobilization of chymotrypsin. **Biomacromolecules**, v. 9, p. 2170- 2179, 2008.
- ALFAYA, A. A. S.; KUBOTA, L. T. A utilização de materiais obtidos pelo processo de sol-gel na construção de biossensores. **Química Nova**, v. 25, p. 835-841, 2002.
- ALKORTA, I. Industrial applications of pectin enzymes: a review. **Process Biochemistry**, v. 33, p. 21-28. 1998.
- ALMEIDA, C. M. S.; OLIVEIRA, T. S.; JESUS, J. N.; FERREIRA, R. D. M.; VARANDAS, V. S.; CAVALCANTE, P. A. W.; COÊLHO, D. F.; RODRIGUES, J. R., de SOUZA, R. R. Immobilization of amylase using chitosan beads as support. **Scientia Plena**, v. 13, p. 1-7, 2017.
- ALMEIDA, S. T. **IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS (LIPASE FÚNGICAS) EM SUPORTES NANOZEOLÍTICOS TROCADOS COM CÁTIOS DE TERRAS-RARAS E SUA APLICAÇÃO COMO CATALISADORES HETEROGÊNEOS NA PRODUÇÃO DE BIOCONBUSTÍVEL**, São Paulo. 2017. 72f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, São José do Rio Preto.
- AMOTZ, S. Method for production of an immobilized enzyme preparation by means of a crosslinking agent. **Novo Industri A/S**, v. 46, p. 28-50, 1987.
- ANTUNES, O. A. C. Interfaces com a Indústria. **Química Nova**, v. 28, p. 64-75, 2005.
- ANVISA. INFORME TÉCNICO 04/07. **Glutaraldeído em estabelecimentos de assistência à saúde**, fundamentos para a utilização. 2007.
- ARICA, M. Y.; ALTINTAS, B.; BAYRAMOGLU, G. Immobilization of laccase onto spacerarm attached non-porous poly (GMA/EGDMA) beads: Application for textile dye degradation. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 665-669, 2009.
- BABAKI, M.; YOUSEFI, M.; HABIBI, Z.; BRASK, J.; MOHAMMADI, M. Preparation of highly reusable biocatalysts by immobilization of lipases on epoxy-functionalized

- silica for production of biodiesel from canola oil. **Biochemical Engineering Journal**, n. 101, p.23–31, 2015.
- BADGUJAR, C. K.; DHAKE, P. K.; BHANAGE. M. B. Immobilization of *Candida cylindracea* lipase on poly lactic acid, polyvinyl alcohol and chitosan based ternary blend film: Characterization, activity, stability and its application for N-acylation reactions. **Process Biochemistry**, v. 48, p. 1335–1347, 2013.
- BARBOSA, O.; TORRES, R.; ORTIZ, C.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Versatility of glutaraldehyde to immobilize lipases: Effect of the immobilization protocol on the properties of lipase B from *Candida antarctica*. **Process Biochemistry**, v. 47, p. 12220-1227, 2012.
- BLANCO, R. M.; TERREROS, P.; FERNANDEZ-P REZ, M.; OTERO, C.; DÍAZ-GONZÁLEZ, G. Functionalization of mesoporous silica for lipase immobilization: Characterization of the support and the catalysts. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 30, n. 2, p. 83-93, 2004.
- BORGES, J. P. **PRODUÇÃO, IMOBILIZAÇÃO E APLICAÇÃO DE LIPASE DE *Fusarium verticillioides***, São Paulo. 2016. 160f. Dissertação (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade Estadual Paulista - UNESP, Araraquara.
- BRADY D.; JORDAAN, J. Advances in enzyme immobilisation. **Biotechnology Letters**, v. 31, p. 1639-1650, 2009.
- BRAGA, A. R. C.; da SILVEIRA, T. J.; da SILVA, F. M.; TREICHEL, H.; de OLIVEIRA, V. J.; KALI, J. S. Determinação do Reuso e Caracterização Estrutural da Enzima β -Galactosidase Imobilizada em Eupergit® C. **Biochemistry and Biotechnology Reports**, v. 2, p. 58-61, 2013.
- BRENA, B. M. Immobilization of Enzymes. **Methods in Biotechnology: Immobilization of Enzymes and Cells**, v. 2, p. 15-26, 2006.
- BUSTAMANTE-VARGAS, C. E.; MIGNONI, M. L.; DE OLIVEIRA, D.; VENQUIARUTO, L. D.; VALDUGA, E.; TONIAZZO, G.; DALLAGO, R. M. Synthesis of a hybrid polymer-inorganic biomimetic support incorporating in situ pectinase from *Aspergillus niger* ATCC 9642. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 38, n. 8, p. 1569-77, 2015.
- CABRAL, J. M. S.; OLIVEIRA, A. C.; ROSA, M. F.; AIRES-BARROS, M. R. Enzymatic esterification of ethanol by an immobilised *Rhizomucor miehei* lipase in a perforated rotating disc bioreactor. **Enzymatic engineering**, v. 26, p.446–450, 2003.

- CAO, L. Immobilised enzymes: science or art? **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 9, p. 217-226, 2005.
- CAO, L.; LANGEN, L. V.; SHELDON, R. A. Immobilised enzymes: carrier-bound or carrierfree? **Current Opinion in Biotechnology**, v. 14, p. 387-394, 2003.
- CARVALHO, W.; CANILHA, L.; SILVA, S. S. da. Uso de biocatalisadores imobilizados: uma alternativa para a condução de bioprocessos. **Analytica**, v. 23, p. 60-70, 2006.
- CHAN, Y. S.; CHOO, S. W. W.S. Effect of extraction conditions on the yield and chemical properties of pectin from cocoa husks. **Food Chemistry**, v. 141, p. 3752-3758, 2013.
- CHAUBEY, A.; PARSHAD, R.; TANEJA, S. C.; QAZI, G. N. Arthrobacter sp. lipase immobilization on magnetic sol-gel composite supports for enantioselectivity improvement. **Process Biochemistry**, v. 44, p. 154-160, 2009.
- CHEN, Z.; WANG, Y.; LIU, W.; WANG, J.; CHEN, H. A novel cross-linked enzyme aggregates (CLEAs) of papain and neutrase-production, partial characterization and application. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 95, p. 650-657, 2017.
- CHIARADIA, V. **SÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS DE POLI(UREIA-URETANO) E APLICAÇÃO COMO SUPORTE NA IMOBILIZAÇÃO DA LIPASE B DE *Candida antarctica***, Florianópolis. 2015. 140f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC, Florianópolis
- CIPOLATTI, E. P.; SILVA, M. J. A.; KLEIN, M.; FEDDERN, V.; FELTES, M. M. C., OLIVEIRA, J. V.; NINOW, J. L.; OLIVEIRA, D. de. Current status and trends in enzymatic nanoimmobilization. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.99, p.56– 67, 2014.
- COLEN, G. **ISOLAMENTO E SELEÇÃO DE FUNGOS FILAMENTOSOS PRODUTORES DE LIPASES**, Belo Horizonte. 2006. 207f. Minas Gerais. Dissertação (Doutorado em Ciência de Alimentos) -Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG, Belo Horizonte.
- COWAN, D. A.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Enhancing the functional properties of thermophilic enzymes by chemical modification and immobilization. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 49, p. 326-346, 2011.
- Critical Reviews in Biotechnology**, v. 28, p. 253-64. 2008.

- CRUZ, J.; BARBOSA, O.; RODRIGUES, R. C.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; TORRES, R.; ORTIZ, C. Optimized preparation of CALB-CLEAs by response surface methodology: The necessity to employ a feeder to have an effective crosslinking. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 80, p. 7-14, 2012.
- DALLAGO, R.M.; BUSTAMANTE-VARGAS, C.E.; de OLIVEIRA, D.; NYARI, N.L.D.; SOARES, M.B.A.; VALDUGA, E., BACKES, G.T. In situ immobilization of commercial pectinase in rigid polyurethane foam and application in the hydrolysis of pectic oligosaccharides. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 122, p. 35-43, 2015.
- DALLA-VECCHIA, R.; NASCIMENTO, M. G.; SOLDI, V. Aplicações de lipases imobilizadas em polímeros. **Química Nova**, n. 4, p. 623–630, 2004.
- DAMODARAN, S.; PARKIN, L. K. **Química de alimentos de Fennema**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2019.
- de ALMEIDA, T. S. **IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS (LIPASE FÚNGICA) EM SUPORTES NANOZEOLÍTICOS TROCADOS COM CÁTIOS DE TERRAS-RARAS E SUA APLICAÇÃO COMO CATALISADORES HETERAGÊNEOS NA PRODUÇÃO DE BIOCOMBUSTÍVEL**, Araraquara. 2017. 81f. Dissertação (Mestrado Engenharia Química) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho - UNESP, Araraquara.
- DICOSIMO, R.; MCAULIFFE, J.; POULOSE, J. A.; BOHLMANN, G. Industrial use of immobilized enzymes. **Chemical Society Reviews**, v. 42, p. 6437-6474, 2013.
- DOSCHER, M. S.; RICHARDS, F. M. The Activity of an Enzyme in the Crystalline State: Ribonuclease S. **J Biol Chem**, v. 238, p. 2399- 2406, 1963.
- DWEVEDI, A. Enzyme Immobilization Advances in Industry, Agriculture, Medicine, and the Environment. **Springer**, p. 107, 2016.
- ERDEMIR, S.; YILMAZ, M. Synthesis of calix[n]arene-based silica polymers for lipase immobilization. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 58, p. 29-35, 2009.
- FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ, M.; SANROMÁN, M. A.; MOLDES, D. Recent developments and applications of immobilized laccase. **Biotechnology Advances**, v. 31, p. 1808-1825, 2013.
- FOOD INGREDIENTES, **Revista oficial da FI South América**, São Paulo, n. 39, p. 46-55, 2014.

- FREITAS, F. F.; MARQUEZ, L. D. S.; RIBEIRO, G. P.; BRANDÃO, G. C., CARDOSO, V. L.; RIBEIRO, E. J. A comparison of the kinetic properties of free and immobilized *Aspergillus oryzae* β -galactosidase. **Biochemical Engineering Journal**, v. 58-59, p. 33-38, 2011.
- GAIO, I. **Avaliação da atividade e estabilidade de pectinases comerciais imobilizadas e submetidas ao tratamento com gás liquefeito de petróleo (GLP)**. 224 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química e de Alimentos) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2016.
- GANGOLLI, S. The Dictionary of Substances and Their Effects. **Royal Society of Chemistry**, v. 6, p. 952, 1999.
- GAO, S.; WANG, Y.; WANG, T.; LUO, G.; DAI, Y. Immobilization of lipase on methyl-modified silica aerogels by physical adsorption. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 996–999, 2009.
- GIRELLI, A. M.; SALVAGNIB, L.; TAROLA, A. M. Use of Lipase Immobilized on Cellulose Support for Cleaning Aged Oil Layers. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 23, p. 585-592, 2012.
- GOLÇALVES T. dos S. **PRODUÇÃO E FUNCIONALIZAÇÃO “in situ” DE ESPUMA DE POLIURETANO SINTETIZADO NA PRESENÇA DE GLUTARALDEÍDO**, Rio Grande do Sul. 2018. 111f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai – URI, Erechim.
- GOMES, C. R.; CUNHA, R. H.; ALMEIDA, E. L.; CHANG Y. K.; STEEL C.J. Effect of the emulsifier sodium stearoyllactylate and of the enzyme maltogenic amylase on the quality of pan bread during storage. **LWT - Food Science and Technology**, v. 49, p. 96-101, 2012.
- GOMES, L. S.; MATOS, L. F.; de OLIVEIRA, A. B.; NUNES, D. B.; CAMBRUSSI, A. N. C. O.; FREITAS, A. R.; RIBEIRO, A. B. Imobilização enzimática em matrizes poliméricas. **Boletim Informativo Geum**, v. 9, n. 2, p. 38-50, 2018.
- GUIDINNI, C. Z.; FISCHER, J.; SANTANA, L. N. S.; RIBEIRO, E. J. Immobilization of *Aspergillus oryzae* β -galactosidase in ion exchange resins by combined ionic-binding method and cross-linking. **Biochemical Engineering Journal**, v. 52, p. 137-143, 2010.
- GUISÁN, J. M. Aldehyde gels as activated support for immobilization–stabilization of enzymes. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 10, p. 375–382, 1988.

- GUPTA, P.; DUTT, K.; MISRA, S.; RAGHUWANSHI, S.; SAXENA, R. K. Characterization of crosslinked immobilized lipase from thermophilic mould *Thermomyces lanuginosa* using glutaraldehyde. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 4074-4076, 2009.
- HALLING, P. J.; ULIJN, R. V.; FLITSCH, S. L. Understanding enzyme action on immobilised substrates. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 16, p. 136-142, 2005.
- HANEFELD, U.; GARDOSI, L.; MAGNER, E. Understanding enzyme immobilisation. **Chem Soc Ver**, v. 38, p. 453-468, 2009.
- HARTMEIER, W. Characteristics of Immobilized Biocatalysts. **Immobilized Biocatalysts**. p, 51- 71, 1988. Springer-Verlag, Berlin.
- HODGSON, R. J.; CHEN, Y.; ZHANG, Z.; TLEUGABULOVA, D.; LONG, H.; ZHAO, X. Proteindoped monolithic silica columns for capillary liquid chromatography prepared by the sol-gel method: Applications to frontal affinity chromatography. **Analytical Chemical**, v. 76, p. 2780-2790, 2004.
- IDRIS, A.; BUKHARI, A. Immobilized *Candida antarctica* lipase B: Hydration, stripping off and application in ring opening polyester synthesis. **Biotechnology Advances**, v. 30, p. 550-563, 2012.
- IGLESIAS, M. T.; LOZANO, J. E. Extration and characterization of sunflower pectin. **Journal of Food Engineering**, v. 62, p. 215-223, 2004.
- ILLANES, A.; CAUERHFF, A.; WILSON, L. CASTRO, G. R. Recent trends in biocatalysis engineering. **Bioresource Technology**, v. 115, p. 48-57, 2012.
- influence of pectin structures on the pasting properties of rice starch by multiple
- JEGANNATHAN, K. R.; ABANG, S.; PONCELET, D.; CHAN, E. S.; RAVINDRA, P. Production of biodiesel using immobilized lipase--a critical review. **Journal**
- KATO, M.; SAKAI-KATO, K.; MATSUMOTO, N.; TOYO'OKA, T. A protein-encapsulation technique by the sol-gel method for the preparation of monolithic columns for capillary electrochromatography. **Analytical Chemical**, v. 74, p. 1915-1921, 2002.
- KOCHANE, T.; BUDRIENE, S.; MIASOJEDOVAS, S.; RYSKEVIC, N.; STRAKSYS, A.; MACIULYTE, S.; RAMANAVICIENE, A. Polyurethane-gold and polyurethane-silver nanoparticles conjugates for efficient immobilization of maltogenase. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 532, p. 436-443, 2017.

- LEHNINGER, A.; NELSON, D. L.; COX, M. M. Carbon fixation reactions. **Principles of Biochemistry**, v. 5, p. 780-790, 2008.
- LERIN, L. A. **PRODUÇÃO ENZIMÁTICA DE ASCORBIL PALMITATO EM DIFERENTES SISTEMAS REACIONAIS**, Rio de Janeiro. 2010. 153f. Tese (Doutorado em Bioquímica) - Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ, Rio de Janeiro.
- LIMA, A. F. Comparative biochemical characterization of soluble and chitosan immobilized - galactosidase from *Kluyveromyces lactis* NRRL Y1564. **Process Biochemistry**. v. 48, p. 443–452, 2013.
- LIMA, J. S. **IMOBILIZAÇÃO DE CELULASE EM NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS ENCAPSULADAS EM POLI (METACRILATO DE METILA)**, Florianópolis. 2016. **85f**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Federal de Santa Catarina- UFSC, Florianópolis.
- LÓPEZ-GALLEGO, F.; MONTES, T.; FUENTES, M.; ALONSO, N.; GRAZU, V.; BETANCOR, L.; GUIÁN, J. M.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R. Improved stabilization of chemically aminated enzymes via multipoint covalent attachment on glyoxyl supports. **Journal of Biotechnology**, v. 116, p.1–10, 2005.
- LUO, J.; CHEN, R. Y. L.; HUANG, R. H.; LIANG, C. M.; LIU, J. Investigation on the MANECKE, G. Immobilization of enzymes by various synthetic polymers. **Biotechnol Bioeng Symp**, v. 3, p. 185-187, 1972.
- MARCIELLO, M.; BOLIVAR, J. M.; FILICE, M.; MATEO, C.; GUIAN, J. M. Preparation of Lipasecoated, stabilized, hydrophobic magnetic particles for reversible conjugation of biomacromolecules. **Biomacromolecules**, v. 14, p. 602-607, 2013.
- MARCONI, W. Immobilized enzymes: their catalytic behaviour and their industrial and analytical applications. **Reactive Polymers**, v. 11, p. 1-19, 1989.
- MATEO, C.; ABIAN, O.; FERNANDEZ-LORENTE, G.; GUIÁN, J. M. Increase in conformational stability of enzymes immobilized on epoxy-activated supports by favoring additional multipoint covalent attachment. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 26, p. 509-515, 2000.
- MATEO, C.; PALOMO, J. M.; FERNANDEZ-LORENTE, G.; GUIÁN, J. M.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. **Enzyme and Microbial Technology**, n. 40, p. 1451–1463, 2007.

- MATOS, L. M. C. **HIDRÓLISE PARCIAL DE ÓLEO DE PALMA CATALISADA POR LIPASES SOB IRRADIAÇÃO DE MICRO-ONDAS**, Rio de Janeiro. 2010. 107f. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ, Rio de Janeiro.
- MAY, C. D.; PHILLIPS, G. D.; WILLIAMS, P. A. Handbook of Hydrocolloids. **Woodhead Publishing in Food Science and Technology**, p. 169-188, 2000.
- MENDES, A. A.; de CASTRO, H. F.; GIORDANO, R. de L. C. Immobilization and stabilization of microbial lipases by multipoint covalent attachment on aldehyde-resin affinity: Application of the biocatalysts in biodiesel synthesis. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 68, p. 109-115, 2011.
- MENDES, A. A.; de CASTRO, H. F.; RODRIGUES, D. D. S. Multipoint covalent immobilization of lipase on chitosan hybrid hydrogels: influence of the polyelectrolyte complex type and chemical modification on the catalytic properties of the biocatalysts. **Journal of industrial microbiology & biotechnology**, v. 38, p. 1055–1066, 2011.
- MENDES, A. A.; OLIVEIRA, P. C.; CASTRO, H. F.; GIORDANO, R. L. C. Aplicação de quitosana como suporte para a imobilização de enzimas de interesse industrial. **Química Nova**, v. 34, p. 831-840, 2011
- MENONCIN, S.; DOMINGUES, N. M.; FREIRE, D. M. G.; OLIVEIRA, J. V.; Di LUCCIO, M.; TREICHEL, H.; OLIVEIRA, D. Imobilização de lipases produzidas por fermentação em estado sólido utilizando *Penicillium verrucosum* em suportes hidrofóbicos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 29, n. 2, p.440-443, 2009.
- METHACANON, J. P.; KRONGSIN, C. Gamonpilas Pomelo (*Citrus maxima*) pectin: Effects of extraction parameters and its properties. **Food Hydrocolloids**, v. 35, p. 383-391, 2014.
- MILETIC, N.; NASTASOVIC, A.; LOOS, K. Immobilization of biocatalysts for enzymatic polymerizations: Possibilities, advantages, applications. **Bioresource Technology**, v.115, p.126-135, 2012.
- MILETIC, N.; VUKOVIC, Z.; NASTASOVIC, A.; LOOKS, K. Macroporous poly (glycidyl methacrylate-co-ethylene glycol dimethacrylate) resins – Versatile immobilization supports for biocatalysts. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 56, p. 196-201, 2009.

- MITCHELL, D.T.; LEE, S.B.; TROFIN, L.; LI, N.; NEVANEN, T.K.; SÖDERLUND, H.; MARTIN, C. Smart Nanotubes for Bioseparations and Biocatalysis. **Journal of the American Chemistry Society**, v.124, p.11864–11865, 2002.
- MORÁN, L. R. M.; NIECKELE, A. O.; AZEVEDO, L. F. A. NUMERICAL SIMULATION OF WAX DEPOSITION IN CHANNEL FLOW, **Toxicological Sciences** v. 19, p. 5-38, 2007.
- MUNARIN, F.; TANZI, M.; PETRINI, P. Advances in biomedical applications of pectin gels International. **Journal of Biological Macromolecules**, v. 1, p. 27, 2012.
- NETO, A. A. D.; GURGEL, A. **Refino de Petróleo e Petroquímica**. Departamento de Engenharia Química. Rio Grande do Norte, 2007. Disponível em: >http://www.nupeg.ufrn.br/downloads/deq0370/curso_refino_ufrn-final_1.pdf< (acessado em Setembro de 2019).
- NICOLETTI, G. **IMOBILIZAÇÃO DE LIPASE B DE Candida antarctica EM ESPUMA DE POLIURETANO E APLICAÇÃO NA SÍNTESE DO ÉSTER GERANIL PROPIONATO**, Florianópolis. 2014. 81f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC, Florianópolis.
- NISHA, S.; KARTHICK, A.; GOBI, N. A review on methods, application and properties of immobilized enzyme. **Che Sci Rev Lett**, v. 1, p. 148-155, 2012.
- OLIVEIRA, E. C. **MODELAGEM E SIMULAÇÃO DA SOLUBILIZAÇÃO DA PARAFINA EM TUBOS EM REGIME E POÇOS E DA DEPOSIÇÃO DA PARAFINA EM TUBOS EM REGIME LAMINAR E TURBULENTO**, Rio Grande do Norte. 2018. 269f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte, UFRN, Natal.
- PAIVA, E. P.; LIMA, M. S.; PAIXÃO, J. A. Pectina: Propriedades Químicas e Importância sobre a Estrutura da Parede Celular de Frutos Durante o Processo de Maturação. **Revista Ibero-americana de Polímeros**, v. 4, p. 196, 2009.
- PEDROCHE, J.; del MAR, Y. M.; MATEO, C.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. GIRÓN-CALLE, J.; ALAIZ, M. Effect of the support and experimental conditions in the intensity of the multipoint covalent attachment of proteins on glyoxyl-agarose supports: Correlation between enzyme–support linkages and thermal stability. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, p. 1160-1166, 2007.
- PHILLIPS, G. O.; WILLIAMS, P. A. Handbook of Hydrocolloids. **Woodhead Publishing in Food Science and Technology**, v. 2, 2009.

- QUIOCHO, F. A.; RICHARDS, F. M. Intermolecular cross linking of a protein in the crystalline state: Carboxypeptidase-A. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the US**, v. 52, p. 833-839, 1964.
- QUIOCHO, F. A.; RICHARDS, F. M. The enzymic behavior of Carboxypeptidase-A in the solid state. **Biochemistry**, v. 5, p. 4062-4076, 1966.
- RASTIAN, Z.; KHODADADI, A. A.; VAHABZADEH, F.; BORTOLINID, C.; DONG, M.; MORTAZAVIA, Y.; MOGHAREI, A.; VESALI NASEHA, M.; GUO, Z. Facile surface functionalization of multi walled carbon nanotubes by soft dielectric barrier discharge plasma: Generate compatible interface for lipase immobilization. **Biochemical Engineering Journal**, v. 90, p. 16–26, 2014.
- regression. **Food Hydrocolloids**, v. 1, p. 63, 2017.
- REGULY, J. C. Biotecnologia dos processos fermentativos. V. 3. Pelotas: Editora e Gráfica Universitária - UFPEL, 2000.
- REZENDE, R.; SOCCOL, C.; FRANÇA, L.; FUENTES, A. **Biotecnologia aplicada à Agro&Indústria**. Fundamentos e Aplicações. V. 4. São Paulo: Editora Edgard Blücher Ltda, 2016.
- REZENDE, R.; SOCCOL, C.; FRANÇA, L.; FUENTES, A. **Biotecnologia aplicada à Agro&Indústria. Fundamentos e Aplicações**. V. 4. São Paulo: Editora Edgard Blücher Ltda, 2016.
- RODRIGUES, D. S.; MENDES, A. A.; ADRIANO, W. S.; GONÇALVES, L. R. B.; GIORDANO, R. L. C. Multipoint covalent immobilization microbial of lipase on chitosan and agarose actived by different methods. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 51, p. 100-109, 2008.
- ROY, J. J.; ABRAHAM, T. E. Preparation and characterization of cross-linked enzyme crystals of laccase. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 38, p. 31-36, 2006.
- RUEDA, N.; dos SANTOS, C. S.; RODRIGUEZ, M. D.; ALBUQUERQUE, T. L.; BARBOSA, O.; TORRES, R.; ORTIZ, C.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Reversible immobilization of lipases on octyl-glutamic agarose beads: A mixed adsorption that reinforces enzyme immobilization. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, n. 128, p. 10-18, 2016.
- SANTOS, A.F., **PRODUÇÃO E IMOBILIZAÇÃO DE CELULASES EM MATRIZ DE AGAROSE COM DIFERENTES ATIVAÇÕES QUÍMICAS**, Araraquara. 2014. 113f.

- Dissertação (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho - UNESP, Araraquara.
- SHELDON, R. A. Enzyme Immobilization: The quest for optimum performance. **Adv Synth Catal**, v. 34, p. 1289-1307, 2007.
- SHELDON, R. A.; PELT, S. V. Enzyme immobilization in biocatalysis: why, what and how. **Chemical Society Reviews**, v. 42, p. 6223 – 6235, 2013.
- SHELDON, R. A.; SCHOEVAART, R.; LANGEN, L. M. V. Cross-linked enzyme aggregates (CLEAs): A novel and versatile method for enzyme immobilization (a review). **Biocatal Biotransform**, v. 23, p. 141-147, 2005.
- SIGLER, P. B.; SKINNER, H. C. W. The reaction of diisopropylfluorophosphate with crystals of g-chymotrypsin. **Biochem Bioph Res Commun**, v.13, p. 236-240, 1963.
- SIRISHA, V.L; ANKITA JAIN; AMITA JAIN. Enzyme Immobilization: Na Overview on Methods, Support Material, and Applications of Immobilized Enzymes. **Advances in Food and Nutrition Research**, v. 79, p. 179-211, 2016.
- SOUZA, R. D. O. **AVALIAÇÃO DE MODELOS PARA A REMOÇÃO DE DEPÓSITOS DE PARAFINA EM DUTOS UTILIZANDO PIGS**, Rio de Janeiro. 2005. 129f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Mecânica) – Pontifícia Universidade Católica, PUC - RJ, Rio de Janeiro.
- SUHAIMI, N. Optimization of pectinase production by *Aspergillus niger* using orange pectin based medium. **Journal of Chemical and Pharmaceutical Research**, v. 8, n. 2, p. 259- 268, 2016.
- TALBERT, J. N.; GODDARD, J. M. Enzymes on material surfaces. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 93, p. 8-19, 2012.
- VORAGEN, A. G. J.; COENEN, G. J.; VERHOEF, R. P.; SCHOLS, H. A. Pectin, a versatile polysaccharide present in plant cell walls. **Structural Chemistry**, v. 20, p. 263–275, 2009.
- WALTER, R. H. **The chemistry and technology of pectin**. New York: Academic Press, 1991.
- YI-KANG, P.; SUN, L.; WEI, S.; LONG, J. Investigation of enzymatic activity, stability and structure changes of pectinase treated in supercritical carbon dioxide. **College of Textile and Clothing Engineering**, v. 57, p. 1948-1955, 2015.
- YUPA, L. F. P. **ESTUDO EXPERIMENTAL DA DEPOSIÇÃO DE PARAFINA EM ESCOAMENTO TURBULENTO**, Rio de Janeiro. 2010. 100f. Dissertação

(Mestrado em Engenharia Mecânica) - Pontifícia Universidade Católica – PUC, Rio de Janeiro.

ZHENG, M. M.; LU, Y.; DONG, L.; GUO, P. M.; DENG, Q. C.; LI, W. L. Immobilization of *Candida rugosa* lipase on hydrophobic/strong cation-exchange functional silica particles for biocatalytic synthesis of phytosterol esters. **Bioresour Technol**, v. 115, p. 141-146, 2012.

ZHOU, Z.; INAYAT, A.; SCHWIEGER, W.; HARTMANN, M. Improved activity and stability of lipase immobilized in cage-like large pore mesoporous organosilicas. **Microporous Mesoporous Mat**, v. 154, p. 133-141, 2012.

APÊNDICE I: Curva de calibração

Figura 17 – Curva de calibração para medida da atividade para a PG.

