



UNICAMP

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS**

PATRÍCIA FERNANDA SCHONS

**IMOBILIZAÇÃO DA TANASE DE *Paecilomyces variotii* E AÇÃO EM REAÇÕES
DE HIDRÓLISE E SÍNTESE**

**TESE DE DOUTORADO
APRESENTADA À FACULDADE DE ENGENHARIA
DE ALIMENTOS - UNICAMP PARA OBTENÇÃO DO
TÍTULO DOUTOR EM CIÊNCIA DE ALIMENTOS**

**Gabriela Alves Macedo
ORIENTADORA**

Este exemplar corresponde à versão final da tese defendida por Patrícia Fernanda Schons, aprovada pela comissão julgadora em ____/____/____ e orientada pela Profa. Dra. Gabriela Alves Macedo.

Gabriela Alves Macedo

CAMPINAS, 2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
CLAUDIA AP. ROMANO DE SOUZA – CRB8/5816 - BIBLIOTECA DA FACULDADE DE
ENGENHARIA DE ALIMENTOS – UNICAMP

Schons, Patrícia Fernanda
Sch65i Imobilização da tanase de *Paecilomyces variotii* e ação
em reações de hidrólise e síntese / Patrícia Fernanda
Schons. -- Campinas, SP: [s.n], 2012.

Orientador: Gabriela Alves Macedo.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de
Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. Tanase. 2. Imobilização. 3. Síntese. 4.
Hidrólise. 5. Encapsulação. I. Macedo, Gabriela Alves.
II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de
Engenharia de Alimentos. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em inglês: Immobilization of tannase from *Pecilomyces variotii* and
reactions of hydrolysis and synthesis

Palavras-chave em inglês:

Tannase

Immobilization

Synthesis

Hydrolysis

Encapsulation

Área de concentração: Ciência de Alimentos

Titulação: Doutor em Ciência de Alimentos

Banca examinadora:

Gabriela Alves Macedo [Orientador]

Carlos Raimundo Ferreira Grosso

Hélia Harumi Sato

Luciana Francisco Fleuri

Vânia Battestin Wiendl

Data da defesa: 06/06/2012

Programa de Pós Graduação: Ciência de Alimentos

Banca Examinadora

Prof^a. Dr^a. Gabriela Alves Macedo
Orientadora

Prof. Dr. Carlos Raimundo Ferreira Grosso
FEA/UNICAMP

Prof^a. Dr^a. Hélia Harumi Sato
FEA/UNICAMP

Prof^a Dr^a. Luciana Francisco Fleuri
UNESP - Botucatu

Dr^a. Vânia Battestin Wiendl
IFSP – São Roque

Prof. Dr. Francisco Maugeri Filho
FEA/UNICAMP

Prof^a. Dr^a. Maria Helena Andrade Santana
FEQ/UNICAMP

Prof. Dr. Rubens Monti
UNESP – Araraquara

Aos meus magníficos pais Valdir e Rosane Schons
e Minha amada irmã Ângela.

DEDICO.

AGRADECIMENTOS

À Prof^ª. Dr^ª. Gabriela Alves Macedo pela oportunidade, apoio e paciências nas mudanças durante essa jornada.

Aos amigos e colegas do laboratório de Bioquímica de Alimentos Joelise, Márcio, Lívia, Danielle, Haroldo, Tiago, Fabiano, Marcela, Juliana, Paula, Zé, Evandro, Pricila, Priscila Hoffmann, Bia, Valdecir, Ruann, Meliane pelo apoio e em especial à Viviane Toretto por, além do companheirismo ter me ajudado nos momentos finais de tese. Ao auxílio da aluna de iniciação científica Fernanda Lopes.

Aos meus pais, Valdir e Rosane, por me apoiarem sempre, me incentivarem a alcançar meus objetivos, me permitir continuar sonhando e pelo amor. À minha irmã Ângela e meu cunhado José pelas palavras de apoio e incentivo.

Às minhas colegas de república Dani gaúcha, Renata e Dani Bio. As gurias da república temporária Leandra, Milene, Dani Bio, Paula e Ritinha que tornaram as idas à Campinas possíveis e agradáveis. Ao Marcio Schmiele, amigo muito especial.

Ao Professor Carlos Grosso e o pessoal do seu laboratório por me ajudarem sempre que precisei.

Aos professores e amigos da Universidade Federal de Pelotas pelo conhecimento, incentivo e amizade, especialmente às Professoras Rosane e Mirian.

À todos os funcionários da Faculdade de Engenharia de Alimentos que de alguma forma contribuíram para a realização do meu trabalho.

Aos colegas do Instituto Federal de Santa Catarina pelo apoio nos momentos difíceis, especialmente a Keli Fabiane pelo incentivo e amizade.

À banca examinadora pela contribuição dada para o aprimoramento do trabalho.

À Fapesp pela bolsa de estudo concedida.

À Deus por me conduzir, me dando força nos momentos que mais necessito e sempre me fazer ter a certeza de que tudo que se deseja do fundo da alma é possível.

ÍNDICE GERAL

ÍNDICE DE TABELAS	ix
ÍNDICE DE FIGURAS	xi
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	xiv
RESUMO.....	xv
ABSTRACT.....	1
1 INTRODUÇÃO	3
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	5
2.1 Tanases	5
2.2 Métodos de imobilização de enzimas	9
2.3 Efeitos da imobilização nas propriedades bioquímicas e cinéticas das enzimas	26
3 OBJETIVOS.....	29
3.1 Objetivos gerais	29
3.2 Objetivos específicos	29
4 MATERIAL E MÉTODOS	30
4.1 Produção de tanase	31
4.2 Imobilização de tanase de <i>Paecilomyces variotii</i> por adsorção	32
4.3 Imobilização de tanase de <i>Paecilomyces variotii</i> em Amberlite e Dowex ativados com polietilenoimina e glutaraldeído	32
4.4 Imobilização de tanase de <i>Paecilomyces variotii</i> em sílica, celite e Accurel ativados com 3–aminopropiltrietoxisilano (ATPS) e glutaraldeído.....	34
4.5 Seleção de suporte para a imobilização de tanase de <i>Paecilomyces variotii</i> por gelificação iônica.....	35

4.5.1 Otimização da imobilização de tanase de <i>Paecilomyces variotii</i> por gelificação iônica com alginato de sódio por meio de planejamento experimental fracionado.....	37
4.5.2 Otimização da imobilização de tanase de <i>Paecilomyces variotii</i> por gelificação iônica em alginato de sódio por meio de planejamento experimental completo	37
4.5.3 Imobilização de tanase de <i>Paecilomyces variotii</i> por gelificação iônica em alginato de sódio com o uso de reticulante.....	39
4.6 Determinação de atividade enzimática de tanase livre e imobilizada	40
4.7 Proteína total no extrato de tanase liofilizada	41
4.8 Determinação da porcentagem da eficiência de imobilização de tanase de <i>Paecilomyces variotii</i> imobilizada.....	42
4.9 Reutilização da enzima imobilizada em bateladas.....	42
4.10 Determinação de umidade nas cápsulas	42
4.11 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	43
4.12 Caracterização bioquímica da enzima livre e imobilizada.....	43
4.12.1 Determinação do pH ótimo de atividade e de estabilidade	43
4.12.2 Determinação da temperatura ótima de atividade e de estabilidade ...	44
4.12.3 Atividade da enzima livre e imobilizada frente a inibidores.....	44
4.12.4 Quimioseletividade de tanase livre de <i>Paecilomyces variotii</i> nas reações de síntese de ésteres de ácido gálico	44
4.12.5 Quimioseletividade de tanase de <i>Paecilomyces variotii</i> imobilizada por gelificação iônica em alginato de sódio nas reações de síntese de ésteres de ácido gálico.....	46
4.13 Determinação da porcentagem de esterificação	46
4.14 Identificação dos ésteres formados por cromatografia em camada delgada	47

4.15 Análise estatística	48
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	49
5.1 Imobilização de tanase de <i>Paecilomyces variotii</i> por adsorção	49
5.2 Tanase imobilizada em Amberlite e Dowex ativados com polietilenoimina e glutaraldeído.....	52
5.3 Tanase imobilizada em sílica, Accurel e celite ativados com 3-aminopropiltriethoxisilano e glutaraldeído	56
5.4 Imobilização de tanase de <i>Paecilomyces variotii</i> por gelificação iônica.....	59
5.4.1 Estudo das condições ótimas para imobilização de tanase de <i>Paecilomyces variotii</i> em alginato de sódio	64
5.4.2 Reuso da tanase imobilizada em alginato de sódio	77
5.4.3 Estudo do efeito do pH, temperatura e inibidores na atividade e estabilidade da tanase livre e imobilizada em alginato de sódio.....	79
5.5 Efeito de reticulantes na imobilização de tanase	84
5.6 Microscopia eletrônica de varredura das cápsulas de tanase imobilizada em alginato por gelificação iônica com ou sem reticulantes.....	88
5.7 Quimioseletividade de tanase de <i>Paecilomyces variotii</i> livre e imobilizada por geleificação iônica em alginato de sódio nas reações de síntese de ésteres de ácido gálico	90
6 CONCLUSÕES	98
7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	100
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	101

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Publicações científicas sobre imobilização de tanase em ordem cronológica de desenvolvimento descrevendo os suportes, métodos empregados e principais resultados obtidos	23
Tabela 2. Valores codificados utilizados no planejamento experimental fracionado (2^{4-1}) para o estudo da influência do alginato de sódio, CaCl_2 , tempo de cura e concentração de tanase na atividade enzimática e eficiência de imobilização da tanase	37
Tabela 3. Valores codificados utilizados no delineamento composto central rotacional (2^3) para o estudo da influência da concentração de alginato de sódio, concentração de CaCl_2 e concentração de tanase na atividade enzimática e eficiência de imobilização da tanase.....	38
Tabela 4. Porcentagem de atividade enzimática e porcentagem de eficiência de imobilização de tanase imobilizada por adsorção em alumina, Amberlite, Accurel e celite	49
Tabela 5. Porcentagem de atividade enzimática e porcentagem da eficiência de imobilização de tanase adsorvida em celite variando a proporção enzima:suporte (v/m).....	51
Tabela 6. Porcentagem de atividade enzimática e porcentagem da eficiência de imobilização de tanase imobilizada por gelificação iônica em alginato de sódio, alginato de alga marrom, goma gelana e pectina	60
Tabela 7. Delineamento composto central rotacional fracionado (2^{4-1}) para o estudo da influência da concentração do alginato de sódio, concentração do CaCl_2 , tempo de cura e concentração de tanase na porcentagem de atividade enzimática e porcentagem de eficiência de imobilização.....	65
Tabela 8. Resultado dos efeitos da concentração do alginato de sódio, concentração do CaCl_2 , tempo de cura e concentração de tanase na porcentagem de atividade enzimática	65

Tabela 9. Resultado dos efeitos da concentração do alginato de sódio, concentração do CaCl_2 , tempo de cura e concentração de tanase na porcentagem de eficiência de imobilização.....	66
Tabela 10. Delineamento composto central rotacional (2^3) para o estudo da influência da concentração do alginato de sódio, concentração do CaCl_2 e concentração de tanase na imobilização de tanase com tempo de cura de 6, 12 e 24 horas quanto à atividade enzimática	67
Tabela 11. Resultados dos coeficientes de regressão do estudo da imobilização de tanase em alginato de sódio para a porcentagem de atividade enzimática após 6h de cura.....	68
Tabela 12. Análise de variância no estudo da imobilização de tanase em alginato de sódio para a porcentagem de atividade enzimática após 6h de cura	69
Tabela 13. Delineamento composto central rotacional (2^3) codificado para o estudo da influência da concentração do alginato de sódio, concentração do CaCl_2 e concentração de tanase na porcentagem de eficiência de imobilização de tanase com tempo de cura de 6, 12 e 24 horas.....	71
Tabela 14. Resultados dos coeficientes de regressão do estudo da imobilização de tanase em alginato de sódio para a resposta porcentagem de eficiência de imobilização após 6h de cura	72
Tabela 15. Análise de variância no estudo da imobilização de tanase em alginato de sódio para a resposta porcentagem de eficiência de imobilização após 6h de cura.....	73
Tabela 16. Porcentagem de atividade enzimática e porcentagem de eficiência de imobilização de tanase imobilizada em alginato de sódio com e sem reticulante.....	85
Tabela 17. Quimioseletividade da tanase livre de <i>Paecilomyces variotii</i> nas reações de síntese de ésteres de ácido gálico e alcoóis com cadeias carbônicas de tamanho distinto.....	91

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Hidrólise de ácido tânico por tanase formando ácido gálico e glicose (AGUILAR e GUTIÉRREZ-SANCHEZ, 2001).	5
Figura 2. Equilíbrio da reação da tanase em função do meio reacional.....	6
Figura 3. Reação de síntese de propilgalato pela tanase a partir de ácido gálico e propanol.	8
Figura 4. Imobilização de enzima por ligação covalente monopontual, por modificação química e por modificação química e ligação covalente multipontual. Adaptado de López-Gallego et al. (2005a).	15
Figura 5. Ligação covalente entre o grupo amina da enzima e o grupo aldeído do glutaraldeído. Adaptado de Fernández-Lafuente et al. (1999).	17
Figura 6. Ligações cruzadas entre resíduos de glutamina e lisina de proteínas (BAGAGLI, 2009).	18
Figura 7. Ligação entre genipina e quitosana. Adaptado de Muzarelli (2009).....	19
Figura 8. Composição de alginatos. (a) cadeia de resíduos de ácidos manurônicos (M). (b) cadeia de resíduos de ácidos gulurônicos (G). (c) cadeia de resíduos de ácidos manurônicos e ácidos gulurônicos alternados (MG). (KAWAGUTI e SATO, 2008).	20
Figura 9. Formação do gel de alginato de cálcio. (a) ligação entre as cadeias homopoliméricas através dos íons cálcio situados entre os grupos com carga negativa. (b) formação da rede de gel com cadeias homopoliméricas unidas através dos íons cálcio. Adaptado de Kawaguti e Sato (2008).	21
Figura 10. Ativação dos suportes com 3-aminopropiltietoxissilano (ATPS) e glutaraldeído. Adaptado de Melo et al. (2005).....	34
Figura 11. Esquema do processo de imobilização de tanase de <i>Paecilomyces variotii</i> por gelificação iônica.....	36
Figura 12. Esquema do processo de imobilização de tanase de <i>Paecilomyces variotii</i> por gelificação iônica com reticulante.	39

Figura 13. Materiais e metodologia empregada para efetuar as reações de síntese de ésteres de ácido gálico.....	45
Figura 14. Porcentagem de atividade enzimática de tanase imobilizada em Amberlite IRC-50 ativada com polietilenoimina (PEI) e glutaraldeído (GLU) a temperatura de 7 e 20°C. Letras distintas sobre as colunas indicam que houve diferença estatística significativa pelo teste Tukey ($p<0,05$).....	53
Figura 15. Porcentagem de atividade enzimática de tanase imobilizada em diferentes suportes (suporte normal, suporte ativado com 3-aminopropiltrietoxissilano e suporte ativado com 3-aminopropiltrietoxissilano e glutaraldeído).	56
Figura 16. Imobilização de tanase por gelificação iônica em alginato de sódio (A), alginato de alga marrom (B), pectina (C) e goma gelana (D).....	61
Figura 17. Solução de quitosana de baixa (A) e média massa molecular (B) com tanase.	63
Figura 18. Superfícies de resposta e curvas de contorno para a porcentagem de atividade enzimática de tanase imobilizada em alginato de sódio após 6 horas de cura	70
Figura 19. Superfícies de resposta e curvas de contorno para a resposta eficiência de imobilização com tanase imobilizada em alginato de sódio após 6 horas de cura	74
Figura 20. Reuso da tanase imobilizada em alginato de sódio em bateladas sucessivas.....	77
Figura 21. pH e temperatura ótimos de atividade e de estabilidade da tanase livre (quadrado vermelho) e imobilizada em alginato de sódio (círculo preto).....	80
Figura 22. Efeito de inibidores na atividade enzimática da tanase livre e imobilizada em alginato de sódio frente à iodoacetamida, azidasódica, EDTA e 4-cloromercuribenzoato.	83
Figura 23. Microscopia eletrônica de varredura com aumento de 200X de tanase encapsulada em alginato de sódio reticulado: 1 - transglutaminase de	

	<i>Streptomyces</i> sp. CBMAI 837; 2 – transglutaminase Activa® (Ajinomoto); 3 - genipina; 4 - glutaraldeído e 5 - controle (sem adição de reticulante).....	89
Figura 24.	Identificação de ésteres de galato sintetizados por tanase de <i>Paecilomyces variotii</i> livre por cromatografia em camada delgada. AG: ácido gálico, PG: propilgalato, 1: metanol, 2: etanol, 3: propanol, 4: 2-propanol, 5:butanol, 6: 3-metil-1-butanol, 7: t-butanol, 8: pentanol. ...	92
Figura 25.	Cinética da reação de síntese de propilgalato por tanase livre e imobilizada em alginato de sódio.	95

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

Pv. = *Paecilomyces variotii*

%AE = porcentagem de atividade enzimática

%EI = porcentagem de eficiência de imobilização

PEI = polietilenoimina

ATPS = 3-aminopropiltrietoxisilano

GLU = glutaraldeído

TG = transglutaminase

BSA = albumina de soro bovino

EDTA = ácido etilenodiaminotetracético

EDC = 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida)

RESUMO

Tanino acil hidrolase (TAH) conhecida como tanase (EC 3.1.1.20) é uma enzima que hidrolisa ésteres e taninos hidrolisáveis produzindo glicose e ácido gálico quando o meio reacional for polar. No entanto, a literatura indica sua capacidade de esterificar também ésteres de ácidos gálico em meio orgânico. Nosso grupo de pesquisa isolou um fungo, *Paecilomyces variotii*, produtor de tanase no ano de 2005 e desde então vem desenvolvendo estudos de produção, purificação, caracterização e aplicações desta enzima. Dando continuidade à linha de pesquisa, o objetivo deste trabalho foi estudar um processo de imobilização da tanase de *Paecilomyces variotii* empregando diferentes suportes e técnicas. Foram avaliados os parâmetros do processo de imobilização, a tanase livre e imobilizada foi caracterizada bioquimicamente ainda foi investigada a quimioseletividade da tanase imobilizada e livre para reações de síntese. A tanase foi imobilizada pelo método de adsorção em alumina, Amberlite, Accurel e celite; por ligação covalente em amberlite e Dowex ativados com polietilenoimina e glutaraldeído e em sílica, accurel e celite ativados com 3-aminopropiltrietoxisilano e glutaraldeído e por gelificação iônica em alginato de sódio, alginato de alga marrom, carragena, quitosana, pectina e goma gelana. A tanase imobilizada foi avaliada quanto a porcentagem de atividade enzimática e porcentagem de eficiência de imobilização. O processo de imobilização de tanase em alginato de sódio foi otimizado empregando a ferramenta de planejamento de experimentos. A tanase imobilizada em alginato na condição otimizada, foi avaliada quanto ao reuso e caracterizada bioquimicamente quanto ao pH e temperatura ótimos de atividade e de estabilidade e quanto a atividade frente a inibidores. Em adição ao processo de imobilização, foi avaliado o efeito do emprego de reticulantes: genipina, glutaraldeído, transglutaminase Activa® e transglutaminase de *Streptomyces* sp. CBMAI 837. As cápsulas obtidas foram avaliadas quanto à atividade enzimática, eficiência de imobilização e sua morfologia foi avaliada por microscopia eletrônica de varredura. Dentre os suportes empregados para

imobilização de tanase por adsorção, ligação covalente e gelificação iônica obteve-se maior porcentagem de atividade enzimática utilizando os suportes celite, sílica ativada com 3-aminopropiltietoxisilano e glutaraldeído e alginato de sódio, respectivamente. A condição otimizada para a imobilização de tanase em alginato de sódio foi com 3,6% de alginato de sódio, cloreto de cálcio 0,1M, 3,6mg de tanase/mL de alginato e 6h de cura. Após o processo de otimização a tanase aumentou 35 vezes sua atividade enzimática. A tanase imobilizada em alginato de sódio nas condições otimizadas pode ser reutilizadas por até 5X mantendo 60% de sua atividade catalítica, as cápsulas apresentaram maior estabilidade quanto ao pH, temperatura e inibidores comparando com a tanase livre. Por fim, avaliou-se a capacidade da tanase livre e imobilizada em sintetizar ésteres de ácido gálico. A tanase livre mostrou-se efetiva na síntese de galatos, especialmente, propilgalato com porcentagem de esterificação de 65%, já com a tanase imobilizada em alginato de sódio somente 8% de esterificação do propilgalato foi observado.

ABSTRACT

Tannin acyl hydrolase (TAH) known as tannase (EC 3.1.1.20) is an enzyme that hydrolyzes esters of hydrolysable tannins producing gallic acid and glucose as the reaction medium is polar. However, the literature indicates their ability to produce also gallic acid esters in organic media. Our research group has isolated a fungus, *Paecilomyces variotii*, tannase producer in 2005 and since then has been conducting studies of production, purification, characterization and applications of this enzyme. Continuing the research, the objective of this work was study a process to immobilize tannase from *Paecilomyces variotii* using different supports and techniques. Were evaluated the parameters of the immobilization process, free and immobilized tannase were characterized biochemically and yet been investigated quimioseletivity of tannase immobilized and free for synthesis reactions. Tannase was immobilized by adsorption onto alumina, Amberlite, Accurel and celite, by covalent binding in Amberlite and Dowex activated with polyethyleneimine and glutaraldehyde on silica, celite and Accurel activated with glutaraldehyde and 3-aminopropyltriethoxysilane and ionic gelation by sodium alginate, alginate from brown seaweed, carrageenan, chitosan, pectin and gellan gum. The immobilized tannase was evaluated as the percentage of enzyme activity and percentage of immobilization efficiency. The immobilization process of tannase in sodium alginate was optimized using the experimental design method. After the optimization process the tannase immobilized in alginate was evaluated for reuse and characterized biochemically for pH and temperature optima for activity and stability and the activity against inhibitors. In addition to the immobilization process, we evaluated the effect of the use of cross-linking: genipin, glutaraldehyde, Transglutaminase Activa ® and the transglutaminase from *Streptomyces* sp. CBMAI 837. The capsules obtained were evaluated for percentage of enzymatic activity, percentage of immobilization efficiency and their morphology was studied by scanning electron microscopy. Among the carriers used for immobilization of tannase by adsorption, covalent and ionic gelation has been a higher percentage of enzyme activity using the supports celite, silica activated with glutaraldehyde

and 3-aminopropyltriethoxysilane and sodium alginate, respectively. The optimal conditions for immobilization of tannase in sodium alginate were 3.6% sodium alginate, calcium chloride 0.1 M, 3.6 mg of tannase / mL alginate and 6h of cure. After the optimization process, the tannase activity increased by 35 times. The tannase immobilized on sodium alginate in the optimized conditions can be reused up to 5X keeping 60% of its catalytic activity, the capsules showed greater stability for pH, temperature and inhibitors compared with free tannase. Finally, we evaluated the ability of free and immobilized tannase in synthesizing esters of gallic acid. The free tannase proved to be effective in the synthesis of gallates, especially propyl gallate with a percentage of esterification of 65%, with the immobilized tannase in sodium alginate was observed only 8% of propyl gallate esterification.

1 INTRODUÇÃO

Enzimas são biocatalisadores com importantes propriedades como seletividade e especificidade, o que permite realizar uma grande variedade de processos químicos sob condições brandas, em solução aquosa, temperatura ambiente e pressão atmosférica (DIXON e WEBB, 1979).

A aplicação industrial das enzimas pode ser limitada devido a fatores como o elevado custo de produção, alta solubilidade em água, menor estabilidade quando comparadas com catalisadores químicos, baixa atividade em temperaturas elevadas e não ser viável sua recuperação após a utilização. Devido a isto, diversos estudos vem sendo desenvolvidos com o intuito de aumentar a atividade catalítica. Utilizando técnicas de imobilização de enzimas, modificação enzimática e modificação genética do micro-organismo produtor (KIM et al., 2006).

Enzimas imobilizadas são definidas como enzimas que estão fisicamente confinadas ou localizadas em certa região do espaço, com retenção de sua atividade catalítica e que podem ser utilizadas de forma contínua e/ou repetidas vezes (CHIBATA, 1978). O emprego de enzimas imobilizadas em bioprocessos oferece vantagens como, aumento da produtividade já que a mesma enzima pode ser usada por um longo período de tempo, maior controle e automação do processo, bem como a eliminação da etapa de inativação da enzima.

A tanino acil hidrolase, tanase, (EC 3.1.1.20) é uma esterase que tem capacidade de realizar reação de hidrólise em taninos hidrolisáveis e ésteres de ácido gálico em meio aquoso (FERNANDEZ-LORENTE et al., 2011) e síntese de ésteres de ácido gálico em meio orgânico (LEKA e LONSANE, 1997).

A tanase pode ser utilizada para diversas finalidades como a produção de ácido gálico, cujo éster é utilizado como agente antioxidante na indústria de alimentos e farmacêutica (BAJPAI e PATIL, 2008), diminuição de fatores

antinutricionais (SCHONS et al., 2011b), elaboração de chás instantâneos, clarificação e prevenção de precipitação em vinhos, cervejas e sucos e no tratamento de efluentes de curtumes (LEKA e LONSANE, 1997, AGUILAR e GUTIÉRREZ-SÁNCHEZ, 2001).

Na indústria de alimentos os aditivos sintéticos utilizados como antioxidantes são regulados pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) de forma limitada. Os antioxidantes sintéticos mais empregados atualmente são: butilhidroxitolueno (BHT), butilhidroxianisol (BHA), propilgalato (PG) e *t*-butilhidroquinona (TBHQ). Desta forma, uma especial atenção tem sido dada aos antioxidantes naturais, em especial, o propilgalato.

O estudo da seletividade da tanase livre e imobilizada nas reações de hidrólise e síntese servirá como base para estudos e aplicações futuras, pois ainda são poucos os relatos sobre tanase nesta área do conhecimento.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Tanases

Tanino acil hidrolases conhecidas como tanases (EC 3.1.1.20) são esterases capazes de hidrolisar ligações éster (entre o grupo anel aromático e o resíduo de glicose) e ligações depsídicas (ligação éster entre os anéis aromáticos) em substratos como ácido tânico, epicatequina galato, epigallocatequina galato em meio aquoso (Figura 1) e sintetizar ésteres de ácido gálico utilizando distintos alcoóis em meio orgânico (LEKHA e LONSANE, 1997), como ilustrado pela Figura 2. A tanase é uma glicoproteína esterase formada predominantemente por uma ácido gálico esterase e uma depsidase (AGUILAR e GUTIÉRREZ-SANCHEZ, 2001), sendo em geral extracelular, induzível e produzida na presença de ácido tânico por fungos, bactérias e leveduras (AGUILAR et al., 1999).

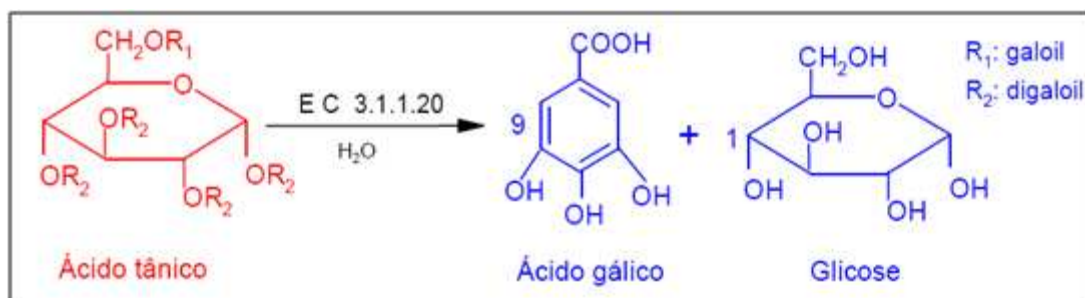


Figura 1. Hidrólise de ácido tânico por tanase formando ácido gálico e glicose (AGUILAR e GUTIÉRREZ-SANCHEZ, 2001).

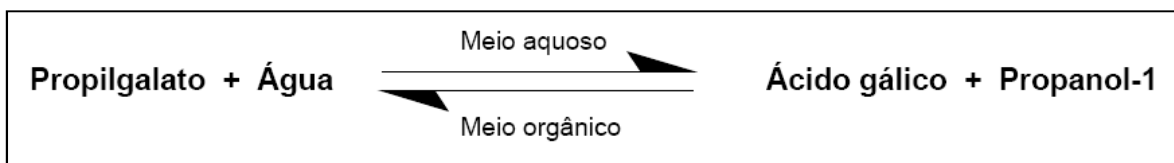


Figura 2. Equilíbrio da reação da tanase em função do meio reacional.

A produção da tanase que foi empregada neste estudo foi otimizada por Battestin e Macedo (2007a) e caracterizada por Battestin et al. (2007b, c), esta apresenta pH de estabilidade na faixa de 4,0 – 7,5, com pH ótimo de atividade a 6,5, temperatura de estabilidade entre 20°C e 70°C, e atividade ótima a 70°C. A enzima possui massa molecular entre 71kDa e 88kDa e é inibida por Ba²⁺, Ca²⁺, Zn²⁺, Mn²⁺ e Agg²⁺, tiosulfato, carbonato, bissulfito de sódio, EDTA, 2-mercaptoetanol, ácido 4-aminobenzóico, azida sódica, n-bromo succinato, cisteína, tween 80 e tween 20.

Segundo Aguilar e Gutiérrez-Sanchez (2001) estas propriedades dependem fortemente das condições de cultura e também da linhagem utilizada.

Battestin et al. (2007d) estudaram a aplicação de tanase de *Paecilomyces variotii* em chás, analisando a capacidade da enzima em hidrolisar epigallocatequina galato em epicatequina e ácido gálico e a atividade antioxidante dos compostos formados. Os autores verificaram uma ótima ação da enzima na hidrólise de galato de epigallocatequina extraído de chá verde comercial e em tanino comercial purificado e constataram que a atividade antioxidante é maior após a hidrólise enzimática.

Macedo et al. (2011) constataram aumento significativo na atividade antioxidante de extrato de chá verde e erva-mate após biotransformação dos compostos fenólicos pela tanase de *Paecilomyces variotii*. Os compostos majoritários, determinados por meio de HPLC, no extrato de chá verde e erva-mate foram epigallocatequina galato e ácido clorogênico, respectivamente. Os

autores sugerem que a tanase possui capacidade de hidrolisar estes compostos em outros com maior atividade antioxidante.

Schons et al. (2011b) estudaram o efeito *in vivo* de uma dieta elaborada a base de sorgo (*Sorghum bicolor*), tratada com tanase de *Paecilomyces variotii* e fitase comercial (Natuphos – BASF). Foi constatado que o tratamento enzimático do sorgo com as enzimas promoveu a diminuição nas concentrações de taninos e aumento da concentração de fósforo inorgânico. O ensaio biológico mostrou que os animais alimentados com a dieta feita à base de sorgo tratado enzimaticamente foi melhor em relação à dieta à base de sorgo cru, quanto à digestibilidade aparente de fósforo, níveis de glicose, colesterol e triacilgliceróis, além de resultar em menor atividade das enzimas aspartato amino transferase e alanina amino transferase.

Madeira, Macedo e Macedo (2011) constataram a capacidade da tanase de *Paecilomyces variotii* em detoxificar resíduo de mamona pela biotransformação de ricina após 48h de fermentação. A efetividade da detoxificação foi avaliada por meio de estudo citotóxico, o qual comprovou a efetividade do processo.

Schons et al. (2011a) avaliaram a imobilização da tanase de *Paecilomyces variotii* por encapsulação em alginato, alginato de alga marrom, pectina e goma gelana. Dentre os suportes empregados o alginato de sódio foi o mais adequado. A enzima imobilizada e livre apresentaram temperatura ótima de atividade a 40 e 60°C, respectivamente e atividade ótima em pH 5,5. A enzima imobilizada reteve 60% da atividade catalítica após 5 ciclos de uso.

Como citado anteriormente a tanase tem capacidade de realizar a hidrólise de taninos bem como a síntese de ésteres dependendo do solvente empregado, sendo que para as reações citadas é recomendado o uso de solvente polar (água, tampões) e solvente apolar (hexano e benzeno), respectivamente. Acredita-se que as enzimas sejam cataliticamente ativas em meio orgânico porque estas permanecem na sua forma original. Esta característica deve-se, principalmente, ao aumento das interações eletrostáticas entre os grupos

integrantes da enzima e, solventes orgânicos e à baixa constante dielétrica da maioria deles e, também ao aumento do número de ligações de hidrogênio intramoleculares (KLIBANOV, 2001).

Já foi comprovado que moléculas de água são componentes essenciais na retenção da atividade catalítica da enzima, contudo, como citado acima, a água no meio reacional favorece a reação de hidrólise. Alguns estudos já relataram que a reação de síntese necessita de uma concentração mínima de água para que esta possa acontecer (YU et al., 2005; YU et al., 2007; YU, LI e WU, 2004b).

O éster mais estudado atualmente por meio da síntese com tanase é o propilgalato, resultante da reação entre ácido gálico e propanol (Figura 3). Propilgalato é um antioxidante seguro e muito utilizado na produção de alimentos, cosméticos, produtos para cabelo, adesivos e lubrificantes. Atualmente este aditivo é produzido por via química, apesar dos métodos químicos oferecerem geralmente rendimentos altos, possuem também diversas desvantagens como produção de subprodutos, requerem condições extremas, como elevada concentração de ácidos, bases, temperaturas, pressão. Já em contrapartida, os métodos biológicos são mais eficientes e empregam condições brandas de reagentes, temperatura e pressão; além disto, origina-se por este método composto considerado natural, o que aumenta consideravelmente o seu valor agregado (YU e LI, 2005).

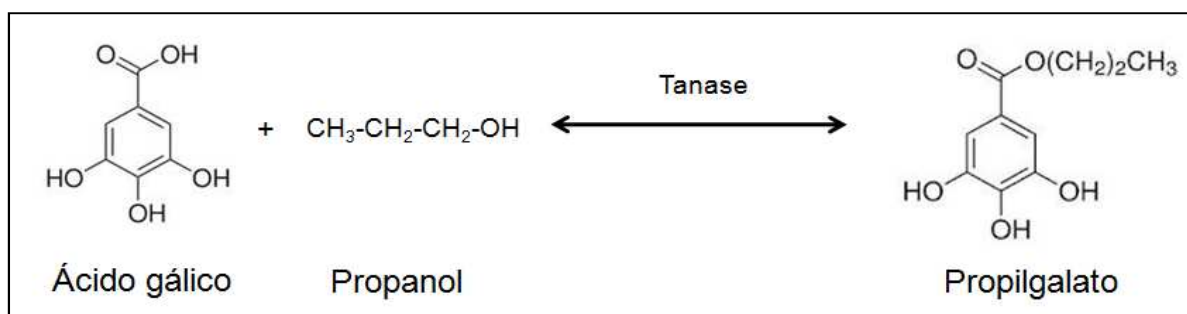


Figura 3. Reação de síntese de propilgalato pela tanase a partir de ácido gálico e propanol.

Yu et al. (2004b) estudaram a síntese de propilgalato em meio orgânico com tanase imobilizada, empregando as seguintes condições reacionais, 1 mL de ácido gálico 0,1M, 2 mL de solvente e 1 mg da enzima imobilizada, à 40°C, 200 rpm, pH 5,5, durante 12 horas. Os autores avaliaram o rendimento de propilgalato variando a relação água:solvente (hexano) no meio reacional e obtiveram maior produção deste éster empregando 100% de solvente na reação. No estudo com diferentes solventes e alcoóis foram obtidos rendimentos de 44,3% e 35,7% de propilgalato utilizando benzeno e hexano, respectivamente. Os autores também constataram a importância do emprego de peneiras moleculares ou o emprego de sais na remoção de água do sistema reacional.

Sharma e Gupta (2003) utilizaram uma rota alternativa baseada na transesterificação do ácido tânico a propil galato. A adição de água e sorbitol ao meio até 1% e 5 mmol/g de tanase, respectivamente, promoveram aumento no rendimento da reação. Em condições otimizadas foi obtido 86% de conversão do ácido tânico em propil galato.

2.2 Métodos de imobilização de enzimas

A imobilização de enzimas, de uma forma sucinta, corresponde à interação ou ligação química da mesma com determinado suporte insolúvel, ou seu confinamento dentro de uma matriz polimérica prevenindo assim sua migração para o meio, ou fase móvel, onde se encontram o substrato e produto (BICKERSTAFF, 1997; ROSEVEAR, 1984).

Na década de 1960, houve um grande interesse na imobilização de enzimas devido à possibilidade de reutilização e aumento da estabilidade, todavia o confinamento e encapsulamento das enzimas não apresentaram muito sucesso, devido a não retenção no suporte, baixa transferência de massa e consequentemente baixo desempenho. Isso foi compensado com os progressos no entendimento do processo de desenvolvimento de microcápsulas para enzimas

e a aceitação de que enzimas imobilizadas não necessitam possuir a mesma atividade catalítica, já que poderão ser reutilizadas por sucessivas vezes. Basicamente, as diferenças entre o encapsulamento de enzimas e células são: células possuem grandes dimensões (poucos micrômetros) ao contrário das enzimas (poucos nanômetros), assim enquanto às células são realmente imobilizadas, as enzimas podem se difundir no suporte; as células podem se multiplicar quando encapsuladas e a perda de determinado número de células pode ser aceitável, uma vez que elas podem aumentar durante o processo de fermentação, diferente das enzimas que podem ter sua concentração no suporte diminuída, porém isso pode ser compensado com aumento de atividade em alguns casos (PONCELET, 2006).

Em termos de aplicações industriais, a imobilização de enzimas e/ou células oferecem diversas vantagens em relação à utilização do biocatalisador na sua forma livre, por exemplo, a possibilidade de reutilização, maior facilidade da separação do produto, aumento da estabilidade da enzima e possibilidade de processos contínuos (OLIVEIRA et al., 1997).

O emprego de enzima livre acarreta a inevitável presença do biocatalisador como parte integrante do meio (se não houver uma etapa de separação da enzima) o que em muitos casos pode gerar alteração de *flavor* e ainda a necessidade de uma nova batelada de biocatalisador (SANGEETHA et al., 2005). Traços de enzima no produto final, em alimentos ou medicamentos, podem ainda, ser um fator de risco, ao desencadear reações alérgicas em seus usuários finais.

O reuso e aumento na estabilidade enzimática são atualmente uma das maiores razões para o emprego de enzimas imobilizadas industrialmente (HAKI e RAKSHIT, 2003). Os avanços científicos na área de imobilização fornecem uma enorme gama de suportes e diferentes técnicas de imobilização. Contudo, poucos estudos detalham e explicam as diferenças entre os métodos de imobilizações. Desta forma, não há um suporte ideal ou técnica que possa ser empregada como padrão. A escolha do suporte e do método de imobilização deve ser feito levando

em consideração as características e propriedades requeridas para a aplicação do material imobilizado frente às propriedades, limitações e características da combinação entre suporte e método de imobilização (BICKERSTAFF, 1997).

Para que enzimas imobilizadas sejam efetivamente empregadas pelas indústrias de alimentos, estas devem ser economicamente viáveis, isto pode ser atingido de duas maneiras: quando a imobilização resultar em um aumento significativo na estabilidade da enzima, resultando em aumento do tempo de uso deste biocatalisador e/ou quando o preço do processo de imobilização for baixo (suportes baratos e reutilizáveis) (PESSELA et al., 2003).

Uma das grandes desvantagens que devem ser evitadas no processo de imobilização é a inativação da enzima devido às mudanças na sua estrutura conformacional (KLIBANOV, 1983; LÓPEZ-GALLEGO et al., 2005b). Quando a enzima imobilizada é inativada, ambos enzima e suporte tornam-se resíduo para as indústrias. Desta forma processos de imobilização que permitam a dessorção da enzima após a sua inativação e reaproveitamento do suporte são muito atrativos industrialmente, especialmente pelo elevado custo que alguns suportes possuem. A dessorção do biocatalisador e reaproveitamento do suporte é possível nos métodos que envolvam interações químicas entre enzima e suporte como adsorção, ligação iônica e ligação covalente (TORRES et al., 2005).

Enzimas imobilizadas podem ter suas propriedades catalíticas (atividade, especificidade e enantioseletividade) modificadas em função do protocolo e suportes utilizados no processo (PALOMO et al., 2003).

A especificidade enzimática baseia-se nas interações entre a molécula do substrato/inibidor e o sítio ativo da enzima, como, por exemplo, as ligações de hidrogênio, as interações de Van der Waals e as interações eletrostáticas. Isto ocorre somente quando várias dessas interações acontecem simultaneamente entre as duas moléculas (enzima e substrato/inibidor) em uma estrutura tridimensional (DIXON e WEBB, 1979).

Dentre os métodos empregados para imobilizar enzimas, a adsorção é o método mais utilizado, pois, é o método mais simples, barato e que menos influencia a atividade catalítica da enzima. As interações envolvidas são eletrostáticas, como forças de Van der Waals, ligação iônica, ligação de hidrogênio e interação hidrofóbica. Estas interações são relativamente fracas, contudo se elas coexistirem em um grande número podem resultar em uma boa eficiência de imobilização. O procedimento consiste em misturar o material a ser adsorvido junto a um suporte, sob condições adequadas de pH, força iônica e temperatura, por determinado tempo. Em seguida, o material suporte+enzima deve ser coletado e lavado para remover a enzima que não foi adsorvido ao suporte (PAIVA et al., 2000).

Segundo Villeneuve et al. (2000) o sucesso e a eficiência da adsorção física da enzima ao suporte dependem, de alguns parâmetros como, força iônica, temperatura, agitação, tamanho e concentração da enzima, área superficial do suporte (porosidade e tamanho dos poros), natureza da superfície do suporte (caráter hidrofóbico e hidrofílico), estabilidade química e física, resistência mecânica, característica hidrofóbica e hidrofílica.

Como vantagens da imobilização por adsorção pode-se citar pequeno ou nenhum dano a enzima; metodologia simples, rápida e barata; não são feitas modificações químicas no suporte e/ou enzima; o suporte pode ser reutilizado e não são empregados reagentes tóxicos. As desvantagens são perda do material adsorvido durante a reação; ligação não específica entre enzima e suporte; sobrecarga do suporte e impedimento estérico. Algumas vezes, um biocatalisador fortemente adsorvido a um suporte pode ser desorvido durante a reação como resultado da ligação com o substrato, ligação com contaminantes presentes no substrato, mudança do meio devido à formação de produto, ou outras condições que mudem a conformação da proteína. Fatores físicos como fluxo, agitação, abrasão também podem provocar a desorção. A desorção pode ser positiva quando se deseja remover um biocatalisador antigo com atividade diminuída e adsorver um novo (BICKERSTAFF, 1997).

A imobilização por ligação covalente vem sendo bastante estudada, pois esta ligação formada entre enzima e suporte é a mais estável, dentre todas as interações possíveis no processo de imobilização, (PEREZ et al., 2007) por esta razão, esta metodologia mostra-se muito efetiva quanto à eficiência e melhoria na estabilidade da enzima (KIM et al., 2006). Este método de imobilização envolve a formação de ligação covalente entre o biocatalisador e o suporte, feita por meio dos grupos funcionais presentes na superfície dos mesmos.

Como vantagens, a imobilização covalente evita o fenômeno de desorção, a diminuição da velocidade de desativação espontânea além de aumentar o tempo de vida útil e da estabilidade térmica do biocatalisador. As ligações covalentes promovem rigidez na estrutura da enzima, limitando seu movimento quando submetida às altas temperaturas. No entanto, apresenta como desvantagem a facilidade em alterar a estrutura terciária nativa da enzima, com subsequente redução da atividade catalítica (GIRELLI e MATTEI, 2005).

Na imobilização por ligação covalente é de extrema importância considerar os aminoácidos presentes na enzima e seus respectivos grupos funcionais através dos quais a enzima pode ser ligada ao suporte, bem como características físicas e químicas do suporte, as quais possibilitarão a ligação com a enzima. As proteínas enzimáticas podem ser formadas por 20 aminoácidos distintos e os grupos funcionais que podem ser envolvidos na ligação covalente com o suporte são: grupos amino (NH_2) da lisina e arginina, NH_2 terminal, grupos carboxílicos (COOH) do ácido aspártico e glutâmico, hidroxilas (OH) da serina e treonina e grupos sulfidrílicos (SH) da cisteína. Quando estes grupos funcionais forem utilizados para estabelecer a ligação covalente entre enzima e o suporte é de fundamental importância que os mesmos não estejam envolvidos com a atividade catalítica da enzima (MORENO et al., 1997; PEREZ et al., 2007).

O grupo amino (NH_2) da lisina e NH_2 -terminal das proteínas são os mais utilizados na imobilização por ligação covalente, pois, a maioria das enzimas possuem diversos resíduos de lisina que geralmente não estão envolvidos com o

sítio ativo e encontram-se na sua superfície, são altamente reativos (sem nenhum processo prévio de ativação) com diversos grupos funcionais como aldeídos, epóxi, ciano brometo.

Quando se trata de imobilização um fator extremamente importante é o pK do composto em questão, pois a desprotonação torna os grupos químicos mais reativos. No caso específico dos grupos amina o pK da lisina e do NH_2 -terminal é entre 10,5 - 10,7 e 6,0 - 8,0, respectivamente. Sendo assim, quando o pH do processo de imobilização for neutro a interação entre suporte enzima vai ocorrer predominantemente por meio NH_2 -terminal. Se o pH for superior a 10 a interação é favorecida com o NH_2 da lisina. Dentre estas duas formas de interação enzima-suporte a mais estável é por meio dos grupamentos NH_2 da lisina, pois, geralmente, se encontram em maior número e na superfície da estrutura conformacional da enzima, isso possibilita a imobilização multipontual, a qual origina derivados imobilizados mais estáveis. A desvantagem de imobilizar a enzima por meio dos grupos NH_2 da lisina é devido ao elevado pH requerido, pH = 10, o que pode inativar a enzimas, já que estas são sensíveis às condições extremas de temperatura, pH e pressão (MATEO et al., 2005).

A interação entre enzima e suporte pode ser monopontual, quando há somente uma ligação covalente entre enzima e suporte ou multipontual, quando a enzima se liga ao suporte por meio de várias ligações covalentes. A grande vantagem da imobilização multipontual é a maior estabilidade da enzima devido a uma maior resistência a modificações conformacionais frente a meios adversos como temperatura e pH extremos, presença de solventes orgânicos. Como desvantagem da imobilização multipontual pode-se ressaltar o envolvimento de aminoácidos fundamentais para a atividade catalítica nas ligações covalentes. Além disso, outra desvantagem é o impedimento estérico, o qual pode ser solucionado ou melhorado pelo uso de agentes que servem como braços espaçadores e possibilitam maior mobilidade da enzima sem diminuir a eficiência de imobilização (GUISÁN, 1988). A Figura 4 representa a ligação covalente enzima-suporte monopontual, ligação covalente enzima-suporte utilizando

modificações químicas na enzima e ligação covalente multipontual enzima-suporte.

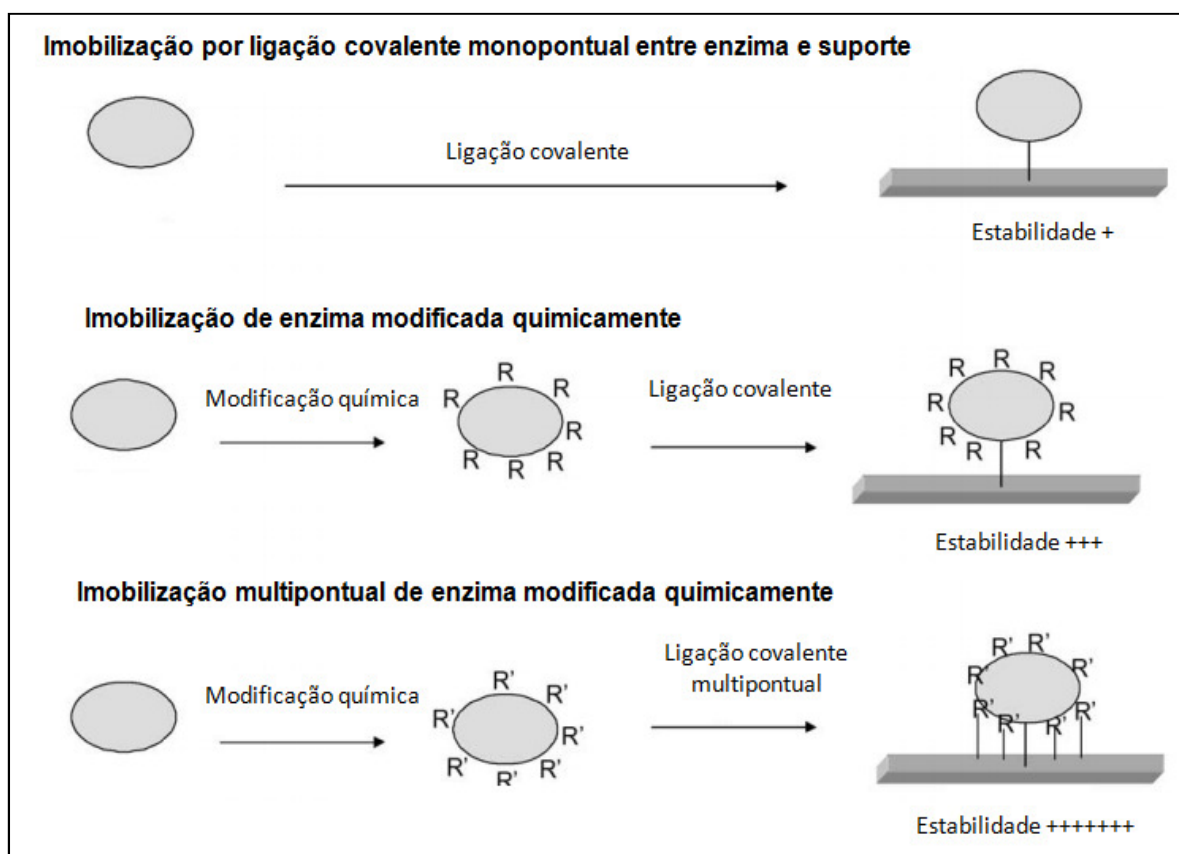


Figura 4. Imobilização de enzima por ligação covalente monopontual, por modificação química e por modificação química e ligação covalente multipontual. Adaptado de López-Gallego et al. (2005a).

Como relatado acima a imobilização de enzimas por ligações covalentes ocorre por meio de combinações químicas entre grupos reativos do suporte e grupos funcionais da enzima que não são essenciais para a atividade catalítica, porém poucos suportes contêm naturalmente esses grupos reativos que permitam o acoplamento direto da enzima, necessitando, na maioria das vezes, de um processo conhecido como ativação, no qual o suporte é modificado por meio de reações químicas e grupamentos reativos são introduzidos. Basicamente duas etapas são fundamentais na imobilização por ligação covalente, primeiramente é

feita a ativação dos grupos funcionais do suporte por meio de reagente específico após esta etapa a enzima é adicionada para formar a ligação covalente com o suporte ativado (BICKERSTAFF, 1997).

Em alguns casos, a ligação covalente altera a estrutura conformacional e o centro ativo da enzima, resultando em um aumento ou diminuição da atividade catalítica e/ou mudança da especificidade pelo substrato (CHIBATA, 1978).

Os agentes reticulantes são aqueles que possuem capacidade de fazer ligações intra e intermolecular unindo diferentes compostos, sendo interessante neste estudo aqueles que fazem essa ligação com aminoácidos, peptídeos ou proteínas.

No sentido de se ter maior controle na liberação do material de recheio, vários agentes reticulantes como glutaraldeído, formaldeído, carbodiimida, transglutaminase, genipina, éster N-hidroxisuccinimida e epóxidos são utilizados para diminuir a liberação destes compostos (MAJI et al., 2007; KUMBAR et al., 2002). Contudo, a maioria dos reticulantes são tóxicos ao organismo, este problema aumenta a demanda de agentes reticulantes capazes de formar ligação estável e biocompatível, com menos problemas citotóxicos (DEVI e MAJI, 2010)

A reticulação química entre as subunidades deveria ser uma das melhores abordagens para se estabilizar a estrutura multimérica da enzima. No entanto, essa é uma estratégia muito difícil, pois, não há controle sobre as reações formadas. A reação de enzimas com agentes reticulantes pode promover não só uma rápida e intensa reticulação inter-subunidades, mas também um elevado número de reações colaterais indesejáveis, o que poderá resultar na distorção e conseqüente inativação da enzima (FERNÁNDEZ-LAFUENTE et al., 1999).

O glutaraldeído é um dos reticulantes mais utilizados devido ao baixo custo e elevada reatividade. As ligações que se formam entre a enzima e o glutaraldeído são estáveis diante dos efeitos de pH, força iônica, solvente e temperatura (Figura 5). A maior desvantagem é que muitas enzimas são sensíveis à reação com o

glutaraldeído e podem perder a atividade catalítica. Entretanto, a efetividade da imobilização depende das condições experimentais em que o procedimento é realizado, devido à multiplicidade de estruturas químicas possíveis em cada situação (FERNANDEZ-LORENTE et al., 2001).

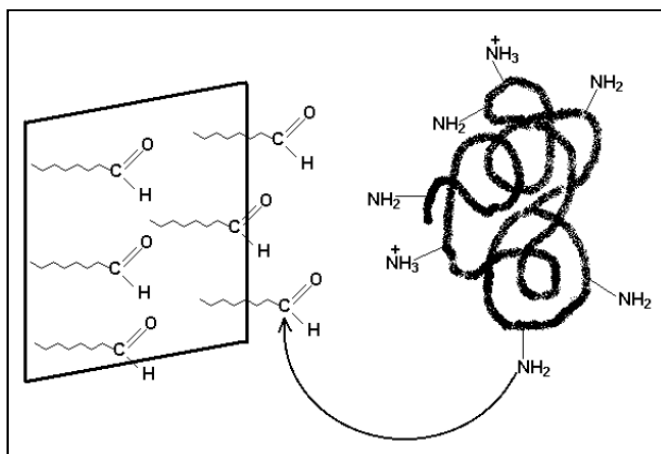


Figura 5. Ligação covalente entre o grupo amina da enzima e o grupo aldeído do glutaraldeído. Adaptado de Fernández-Lafuente et al. (1999).

A transglutaminase (TG) (EC 2.3.2.13) é uma enzima capaz de catalisar reações de transferência de grupos acil formando ligações cruzadas intra e intermoleculares em proteínas, peptídeos e várias aminas primárias, principalmente através de ligações covalentes entre o grupo γ -carboxílico dos resíduos de glutamina e o grupo ϵ -amino da lisina (Figura 6). A vantagem deste reticulante são as condições brandas da reação, o que é muito importante quando da imobilização de enzimas instáveis e a possibilidade do uso desta enzima na área alimentícia (SYNOWIECKI e WOLOSOWSKA, 2006).

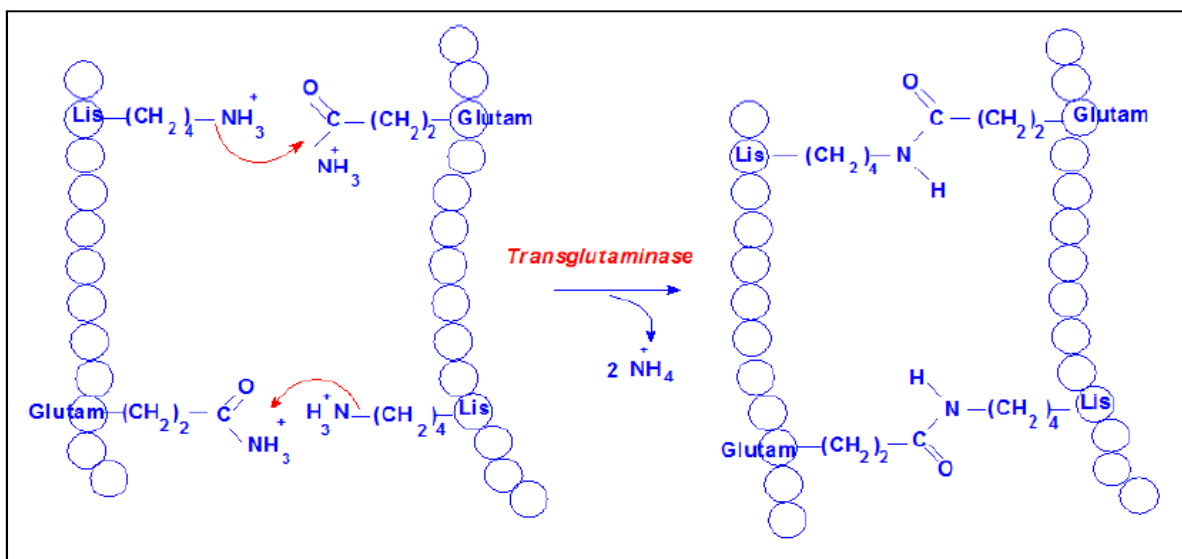


Figura 6. Ligações cruzadas entre resíduos de glutamina e lisina de proteínas (BAGAGLI, 2009).

Genipina é um reticulante natural encontrado na natureza, atóxico e biocompatível (SUNG et al., 1999; CHANG et al., 2003) ele é extraído de *Gardenia jasminoides* na forma de geniposídeo, um glicosídeo, que quando hidrolisado pela β -glicosidase produz genipina (FUJIKAWA et al., 1987). Genipina pode ligar-se espontaneamente com aminoácidos, proteínas como gelatina, polissacarídeos como, pectina, quitosana e carragena (LIANG et al., 2004; PALACE et al. 1999), esta reação produz coloração azul. A Figura 7 demonstra a forma como este composto pode se ligar a quitosana.

A encapsulação de enzimas ou células é outra técnica de imobilização bem difundida, ocorre por meio do envolvimento do material biológico em membranas semipermeáveis, desta forma a enzima fica livre na solução, mas restrita em um espaço. Proteínas de elevada massa molecular não conseguem entrar ou sair da cápsula, contudo substratos e produtos de menor massa molecular podem passar livremente pela membrana semipermeável. A limitação difusional é o maior obstáculo desta técnica, podendo levar a ruptura da membrana.

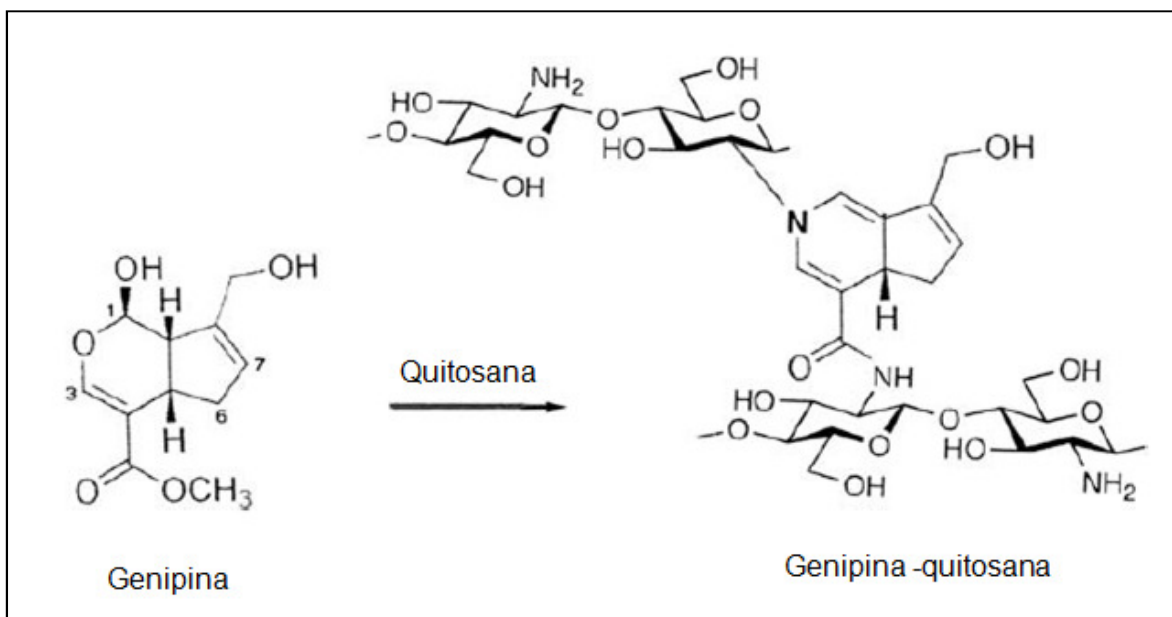


Figura 7. Ligação entre genipina e quitosana. Adaptado de Muzarelli (2009).

O alginato de sódio é um polímero extensivamente utilizado na imobilização de enzimas por gelificação iônica por ser um método simples, não tóxico, biodegradável e barato (MOHAPATRA, MONDAL e PATI, 2007). O alginato de sódio é um polímero extraído de algas marinhas, constituído por várias unidades de sais dos ácidos β -D-manurônico e α -L-gulurônico, unidos por ligações glicosídicas (MOFIDI, 2000). Estes monômeros podem ser organizados em cadeias consecutivas de resíduos G (G) $_n$, de resíduos M (M) $_n$, ou alternando resíduos M e G (MG) $_n$ (Figura 8). A diferença na sequência e no conteúdo de blocos destes polímeros determinará a flexibilidade da cadeia, influenciando na solubilidade e estabilidade do gel que será formado. Blocos MG, por exemplo, formam cadeias mais flexíveis e mais solúveis em valores de pH baixos e a estabilidade do gel está diretamente relacionada ao conteúdo de blocos G (ERTESVÁG e VALLA, 1998).

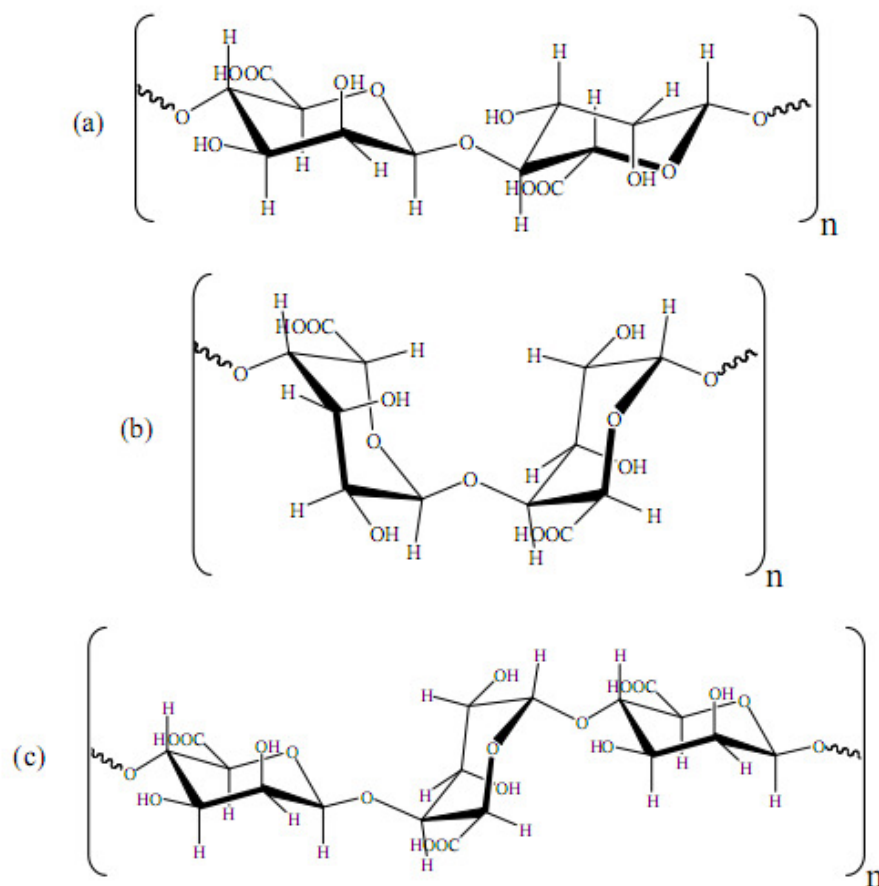


Figura 8. Composição de alginatos. (a) cadeia de resíduos de ácidos manurônicos (M). (b) cadeia de resíduos de ácidos gulurônicos (G). (c) cadeia de resíduos de ácidos manurônicos e ácidos gulurônicos alternados (MG). (KAWAGUTI e SATO, 2008).

Ácido alginico é o único polissacarídeo que contém, naturalmente, grupos carboxílicos em cada constituinte residual, e possui várias habilidades funcionais. A propriedade mais empregada é sua habilidade de reagir com cátions polivalentes, especialmente íons cálcio, para produzir géis fortes ou polímeros insolúveis (GRANT et al., 1973; KING, 1983). Allen et al. (1963) classificaram o cloreto de cálcio como o agente gelificante mais efetivo, tendo a função de estabelecer a associação cooperativa dos segmentos poliméricos M e G, formando estruturas agregadas. O efeito desses íons é estabelecer ligação entre

as cadeias de alginato através de interações iônicas, após terem ocorrido às ligações de hidrogênio entre as mesmas. Essa estrutura reticulada tridimensional tem grande capacidade de reter água, formando assim um gel muito estável. O mecanismo de formação do gel de alginato pode ser explicado pelo modelo “caixa de ovos”, para as interações de segmentos G com íons de cálcio. As regiões de blocos G são alinhadas lado a lado, resultando na formação de uma cavidade, onde os íons cálcio fazem a junção entre as cadeias, semelhante ao ovo numa embalagem de ovo formando uma rede tridimensional (Figura 9).

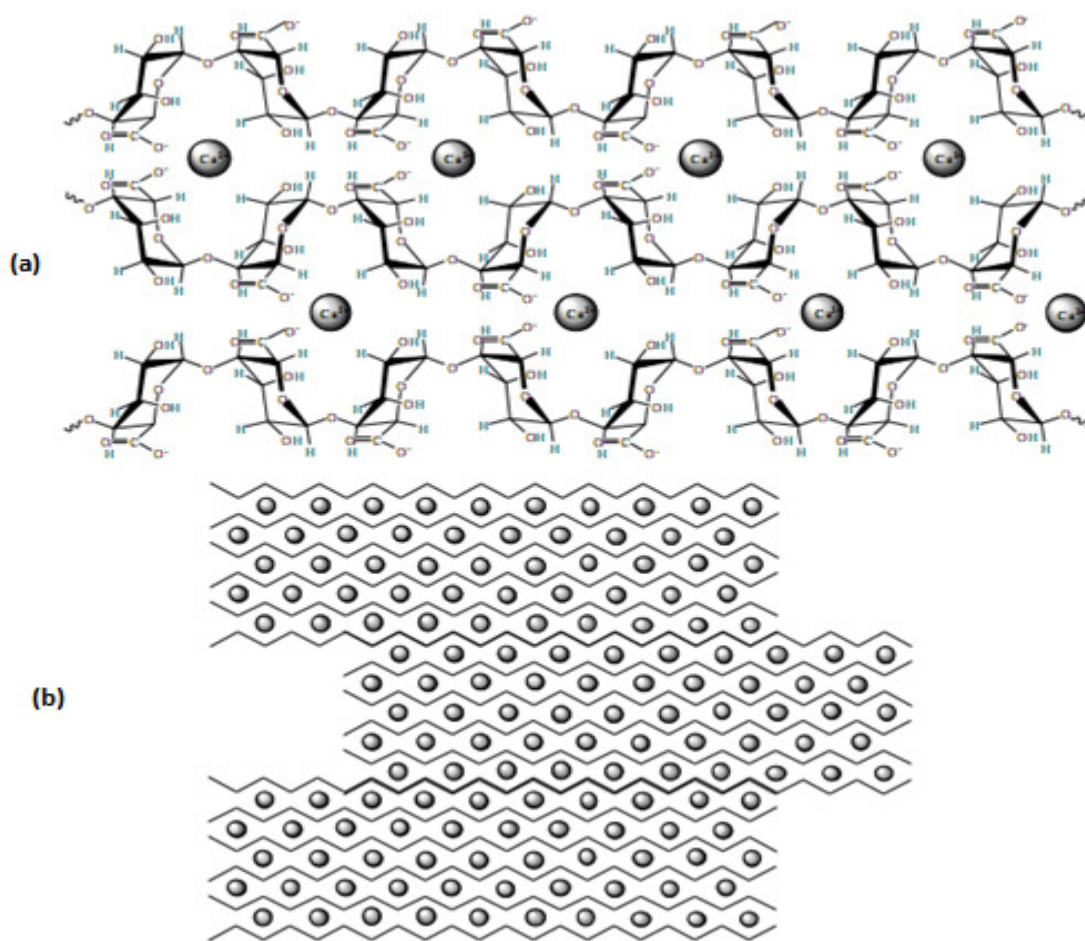


Figura 9. Formação do gel de alginato de cálcio. (a) ligação entre as cadeias homopoliméricas através dos íons cálcio situados entre os grupos com carga negativa. (b) formação da rede de gel com cadeias homopoliméricas unidas através dos íons cálcio. Adaptado de Kawaguti e Sato (2008).

A quantidade relativa de cada tipo de cadeia varia entre os diferentes alginatos. Existem distintas diferenças estruturais entre os tipos de cadeias (KLEIN et al., 1983; ERTESVAG e VALLA, 1998; CHAN et al., 2002). Géis com grande quantidade de (G)_n exibem alta porosidade, baixo encolhimento durante a formação do gel e menor inchamento após secagem, no entanto, têm maior propensão em apresentar sinerese. Com o aumento da quantidade de (M)_n, os géis tornam-se mais macios e apresentam poros de menor tamanho.

Pectina é um polissacarídeo extraído da parede celular de plantas, sendo a casca de frutas cítricas e polpa da maçã as principais fontes de pectina comercial. A pectina é usada industrialmente como agente gelificante e espessante e é constituída essencialmente por cadeias lineares de resíduos de ácido D-galacturônico unidos por ligações α -1,4 (THAKUR et al., 1997). Este polissacarídeo é usualmente caracterizado quanto ao seu grau de metoxilas dos grupos carboxílicos, assim soluções aquosas de pectina com grau de esterificação inferior a 50% formam géis em presença de íon cálcio (IMESON, 1997). A gelificação ionotrópica da pectina BTM é um método simples, brando e barato, sendo o gel formado facilmente pelo gotejamento da solução de pectina em solução iônica de cloreto de cálcio.

Os estudos referentes a imobilização de tanase obtidas de diferentes micro-organismos são consideráveis, e diversas técnicas vem sendo utilizadas com êxito para a obtenção de derivados imobilizados, dentre os trabalhos científicos pode-se ressaltar aqueles desenvolvidos empregando adsorção física, ligação covalente e iônica, coacervação complexa e encapsulação. Na Tabela 1, encontram-se sumarizados em ordem cronológica os trabalhos publicados sobre a imobilização de tanase, os suportes empregados, método empregado e principais resultados. Estes estudos foram adequadamente descritos e comparados com os dados obtidos no presente trabalho na parte que se refere aos “Resultados e Discussão”.

Tabela 1. Publicações científicas sobre imobilização de tanase em ordem cronológica de desenvolvimento descrevendo os suportes, métodos empregados e principais resultados obtidos

Suporte	Método	Resultados	Autores
Sílica alquilamino-glutaraldeído	Ligação covalente	O pH ótimo da enzima imobilizada apresentou pequeno aumento	Weetal e Detar (1974)
Eupergit C-etilenodiamino	Ligação covalente	A enzima imobilizada apresentou maior estabilidade térmica (20-60°C), já a tanase livre foi estável entre 20-40°C. Quanto ao reuso a tanase imobilizada permaneceu ativa após 400 ciclos	Nicolas et al. (1998)
Alumina, Quitina	Adsorção	Melhor resultado de eficiência de imobilização (26,6%), foi obtido utilizando-se quitosana-glutaraldeído. A tanase imobilizada apresentou atividade relativa menor que a tanase livre frente a taninos de diferentes fontes	Abdel-Naby et al. (1999)
Dowex-50W DEAE-Sephadex A-25	Ligação iônica		
Quitina-glutaraldeído Quitosana-glutaraldeído	Ligação covalente		
Poliacrilamida Alginato de cálcio	Encapsulação		
Alginato, Quitosana Carragena, Pectina	Encapsulação	A tanase imobilizada em alginato recoberto com quitosana reticulado com glutaraldeído foi a mais eficiente em reduzir turbidez de chá. Tanase encapsulada em carragena mostrou-se muito instável no chá e encapsulada na pectina não apresentou atividade catalítica	Boadi e Neufeld, (2001)
Alginato-quitosana de baixa massa molecular Alginato-quitosana de alta massa molecular	Coacervação complexa		
Alginato+ glutaraldeído Pectina+ glutaraldeído	Encapsulação e ligação covalente		
Alginato-quitosana+ glutaraldeído	Coacervação complexa e ligação covalente		
Concavalin A-Sepharose	Ligação covalente	A enzima imobilizada mostrou pH ótimo similar a da enzima livre, Km maior e após 3 ciclos de uso reteve 81% da atividade	Sharma, Bhat e Gupta, (2002)

Continuação Tabela 1. Publicações científicas sobre imobilização de tanase em ordem cronológica de desenvolvimento descrevendo os suportes, métodos empregados e principais resultados obtidos

Celite	Adsorção	Rendimento de 86% de propilgalato por transesterificação	Sharma e Gupta, (2003)
Alginato-quitosana	Coacervação complexa	Rendimento de 34,6% de propil galato	Yu et al. (2004a)
Alginato-quitosana	Coacervação complexa	Rendimento de 44% de propil galato	Yu et al. (2004b)
Alginato-carboximetilcelulose	Coacervação complexa	Atividade enzimática recuperada de 36,8%	Yu et al. (2004c)
Alginato-quitosana	Coacervação complexa	Rendimento de 36% de propil galato	Yu e Li, (2005)
Alginato	Encapsulação	Aumento de 1,7 vezes na produção de tanase pelo <i>Bacillus licheniformis</i> KBR6	Mohapatra, Mondal e Pati (2007)
Amberlite IR	Adsorção	A enzima imobilizada reteve 85% da atividade catalítica após 9 ciclos. A determinação do Km indicou que a enzima possui maior afinidade é o ácido tânico	Sharma, Agarwal e Saxena (2008)
Alginato	Encapsulação	A produção de ácido gálico foi maior quando empregou-se ácido tânico como substrato, comparado com o metil galato	Cruz-Aldaco et al. (2009)
Alginato Alginato-glutaraldeído Glutaraldeído-alginato- Glutaraldeído	Encapsulação e ligação covalente	Dentre os polissacarídeos utilizados e os diferentes métodos de imobilização a maior atividade recuperada (76,6%) foi empregando glutaraldeído-alginato-glutaraldeído. pH e temperatura ótimos de atividade da enzima imobilizada foram de 5,0 e 35 °C, para a enzima livre foi 5,0 e 45 °C, respectivamente. A enzima reteve 87% de atividade catalítica após 30 usos	Su et al. (2009)
Quitosana Quitosana-glutaraldeído Glutaraldeído- Quitosana Glutaraldeído- Quitosana -glutaraldeído	Encapsulação e ligação covalente		
Agarose-CNBr Agarose-glioxil	Ligação covalente	A maior estabilidade foi obtida com o suporte glioxil-agarose	Curiel et al. (2010)

Continuação Tabela 1. Publicações científicas sobre imobilização de tanase em ordem cronológica de desenvolvimento descrevendo os suportes, métodos empregados e principais resultados obtidos

Alginato	Encapsulação		
Quitina-glutaraldeído Gelatina-glutaraldeído Proteína bovina sérica-glutaraldeído	Ligação covalente	A imobilização por ligação covalente com gelatina resultou em maior % de imobilização e atividade específica. A enzima imobilizada apresentou maior estabilidade frente ao pH e temperatura. O valor de Km para a enzima imobilizada foi maior que o Km para a enzima livre e quanto ao reuso esta reteve 84% de atividade após 5 ciclos	El-Tanash, Sherief e Nour, (2011)
Agarose-CNBr Agarose-glioxil	Ligação covalente	A enzima imobilizada em agarose-glioxil foi 10 vezes mais estável que aquela imobilizada em agarose-CNBr. O rendimento de propilgalato foi de 45% quando se utilizou o substrato metilgalato, já a transesterificação com ácido tânico produziu 45% de propilgalato e 55% de ácido gálico	Fernández-Lorente et al. (2011)
Alginato de sódio Alginato de alga marrom Pectina Goma gelana	Encapsulação	Dentre os suportes empregados o alginato foi o mais adequado. A enzima imobilizada e livre apresentaram temperatura ótima de atividade 40 e 60 °C, respectivamente e atividade ótima em pH 5,5. A enzima imobilizada reteve 60% da atividade após 5 ciclos de uso.	Scions et al. (2011a)

2.3 Efeitos da imobilização nas propriedades bioquímicas e cinéticas das enzimas

Após a imobilização, as propriedades físicas e químicas da enzima podem sofrer modificações. Devem ser considerados os efeitos da imobilização sobre a estabilidade, as propriedades cinéticas e especificidade além da atividade catalítica da enzima (MARKGLOU e WAINER, 1976).

As diferenças no comportamento da enzima imobilizada, quando comparada à sua forma em solução, devem-se aos seguintes fatores:

- Efeitos conformacionais: modificação conformacional da molécula de enzima devido à alteração na estrutura terciária do sítio ativo;
- Efeitos estereoquímicos: uma parte da molécula da enzima é imobilizada numa posição tal que o sítio ativo é relativamente inacessível;
- Efeitos difusionais ou de transferência de massa: têm origem na resistência de difusão do substrato até o sítio catalítico da enzima, e do produto da reação;
- Efeitos microambientais: resultantes do método de imobilização utilizado ou da presença e natureza (hidrofóbica ou hidrofílica) do suporte na vizinhança da enzima.

Todos esses fatores podem influenciar as propriedades da enzima imobilizada que adquirem novas propriedades cinéticas, modificações em seus valores de K_m e V_{max} e deslocamento dos valores de pH e temperatura (MARKOGLOU e WAINER, 2003; VITOLO, 2001).

O aumento da estabilidade pode ocorrer em função da estabilização da estrutura da proteína ou simplesmente porque enzimas imobilizadas estão menos acessíveis a agentes desnaturantes ou à micro-organismos. Essa estabilidade é regida pelo número e a natureza das ligações formadas entre a enzima e o

suporte; pelo grau de confinamento da enzima ao suporte; pelo microambiente formado entre a enzima e o suporte e pelas condições de imobilização (MARCONI, 1989).

Algumas estratégias podem ser utilizadas para aumentar a estabilidade de enzimas imobilizadas (MARKGLOU, 1976). A imobilização multipontual, por exemplo, pode promover o aumento da rigidez da molécula da enzima tornando-a mais resistente às mudanças conformacionais. Outra estratégia é a introdução de espaçadores, o que permite o distanciamento entre a enzima e suporte promovendo maior liberdade reduzindo assim, a ocorrência de impedimentos estéricos (MATEO et al., 2000). Além disso, a resistência à transferência de massa diminui com o aumento da vazão e da agitação, tornando importante a investigação do efeito da vazão sobre os valores de K_m e $V_{m\acute{a}x}$ em enzimas imobilizadas. Além do efeito de impedimento estérico causado pelo suporte, as mudanças conformacionais e na estrutura tridimensional da molécula da enzima, especialmente no sítio ativo, tornam esse centro menos acessível causando uma diminuição da atividade catalítica (BALCÃO et al., 2001).

A estrutura terciária das enzimas é formada através de interações intermoleculares, como ligações hidrogênio, pontes de dissulfeto e interações eletrostáticas. As interações eletrostáticas são sensíveis ao pH de sua vizinhança e mudanças nesse pH podem resultar em mudanças no padrão de cargas e, conseqüentemente, em mudanças na estrutura terciária da enzima. Essas mudanças podem alterar o sítio ativo da enzima, promovendo o aumento ou diminuição da atividade enzimática. Estudos do efeito do ambiente da enzima, causado pelo processo de imobilização, demonstraram que o uso de suportes com cargas pode causar o deslocamento do pH de maior atividade da enzima (BALCÃO et al., 2001).

Um aspecto fundamental durante o processo de imobilização é que a enzima mantenha sua atividade catalítica. Para tanto, deve-se assegurar que o sítio ativo não esteja envolvido com o processo de imobilização. Isso pode ser feito pela

imobilização da enzima na presença do substrato, do produto da reação catalítica, ou de um inibidor competitivo em concentrações de saturação. Esse procedimento reduz a percentagem de enzima imobilizada em conformação não catalítica (CHAPLIN e BUCKE, 1990).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivos gerais

Estudar o emprego de diferentes técnicas e suportes para a imobilização de tanase de *Paecilomyces variotii* visando maior atividade enzimática e maior eficiência de imobilização da enzima. Além disso, estudar os parâmetros de imobilização, caracterizar bioquimicamente a tanase livre e imobilizada, estudar a quimioseletividade da tanase imobilizada e livre para reações de síntese.

3.2 Objetivos específicos

- Estudar a imobilização de tanase empregando técnicas de adsorção, ligação covalente e encapsulação em diferentes suportes;
- Otimizar o processo de imobilização de tanase que se mostrar mais adequado;
- Caracterizar a enzima imobilizada e livre quanto ao pH e temperatura ótimos de atividade e estabilidade, atividade da enzima frente a inibidores;
- Selecionar alcoóis para a reação de síntese de ésteres de ácido gálico com tanase livre;
- Estudar a síntese de ésteres de ácido gálico com tanase imobilizada.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Bioquímica de Alimentos da Faculdade de Engenharia de Alimentos e no Laboratório de Microscopia Eletrônica de Varredura no Instituto de Biologia da UNICAMP, Campinas - SP.

Os principais equipamentos empregados foram centrífuga (Beckman Coulter, Allegra TM X-22R Centrifuge), bomba peristáltica (Masterflex modelo nº 7523-40), espectrofotômetro (Beckman Coulter DU640), microscópio eletrônico de varredura, liofilizador L101 (Liotop), agitador orbital (Edison), estufa de secagem (FANEM).

Os reagentes empregados para a imobilização da enzima foram os seguintes: quitosana de baixa massa molecular (Sigma-Aldrich Brookfield viscosidade 20.000cps), quitosana de média massa molecular (Sigma-Aldrich Brookfield viscosidade 200.000cps), carragena (Genugel® tipo CI-121 CPKelco); alginato de sódio (viscosidade da solução 2% a 25°C de aproximadamente 25cps, Sigma), alginato de alga marrom (viscosidade da solução a 2%, 25°C de aproximadamente 250cps, Sigma), goma gelana (GelzanCM CPKelco), pectina de baixo teor de metoxilação (CPKelco), alumina neutra (Synth), Amberlite IR 120 (Aldrich), Amberlite IRC-50 (Rom and Haas), Dowex-1 (benzil-trimetilamônia – Fluka), Accurel XP 100 (Plasteng), celite 545 (Synth), sílica (Merck), glutaraldeído (Sigma), polietilenoimina (Sigma) 3-aminopropiltriétoxissilano (Sigma-Aldrich), cloreto de cálcio (Vetec), genipina (Sigma), transglutaminase (Ajinomoto) e transglutaminase de *Streptomyces sp.* CBMAI 837.

Os reagentes empregados nas determinações analíticas foram ácido tânico (Sigma-Aldrich), albumina sérica bovina (Biográs), cloreto férrico (Vetec), azul de Coomassie Brilhante G-250 (VETEC). Os demais reagentes utilizados foram de grau analítico.

4.1 Produção de tanase

A produção da enzima tanase foi realizada conforme estudo desenvolvido anteriormente por Battestin e Macedo (2007a) com algumas modificações, através de fermentação semi-sólida empregando farelo de trigo e o fungo *Paecilomyces variotii*, selecionado por Macedo et al. (2005).

O micro-organismo *Paecilomyces variotii* foi mantido em meio Agar batata – PDA, sob refrigeração à 7°C. A linhagem foi repicada em tubos inclinados neste mesmo meio contendo 0,2% (m/v) de ácido tânico (Tanal B – Omnicem) e incubados a 30°C por 72h. O pré-inóculo foi preparado adicionando-se 2,5mL de água esterilizada nos tubos de ensaios para obter uma suspensão de esporos contendo $1,6 \times 10^7$ esporos/mL.

O meio de fermentação foi composto por 20g de farelo de trigo, 20mL de água destilada e 10% (m/m) de ácido tânico (Tanal B – Omnicem). Este meio foi transferido para frascos Erlenmeyer de 500mL e autoclavados à 121°C por 15 minutos. Após atingir a temperatura ambiente, adicionou-se a suspensão de esporos (2,5 mL) do *Paecilomyces variotii* contendo $1,6 \times 10^7$ esporos/mL. Após a inoculação os frascos Erlenmeyers foram incubados em estufa à 30°C por 120 h.

Posteriormente procedeu-se a extração das enzimas adicionando-se 160mL de tampão acetato pH 5,0 - 0,02M em cada Erlenmeyer, estes foram agitados em agitador orbital a 200 rpm durante 1h, o meio foi filtrado em gase e centrifugado a 10.070xg por 30 minutos a 4°C. O sobrenadante saturado com 80% de sulfato de amônio (561g/L) e mantido refrigerado *over night*. A amostra foi centrifugada a 10.070xg por 30 minutos a 4°C, o precipitado foi dissolvido em pequena quantidade de água destilada e dializado por 48 horas contra água destilada a fim de remover o excesso de sulfato de amônio. O extrato bruto obtido foi congelado à -18°C e liofilizado, a enzima liofilizada foi mantida à - 18°C.

4.2 Imobilização de tanase de *Paecilomyces variotii* por adsorção

A imobilização de tanase pela técnica de adsorção foi testada de acordo com a metodologia descrita por Sharma, Agarwal e Saxena (2008) utilizando-se os suportes alumina, Amberlite, Accurel e celite. A imobilização foi feita por contato, empregou-se 500mg do suporte e 5mL de suspensão enzimática (1mg/mL em água destilada). O suporte e a enzima foram colocados em recipiente de vidro e permaneceram sob agitação a 200rpm por 1h a 20°C. Após este período o material foi separado por filtração em papel de filtro Whatman nº1. Os respectivos suportes foram lavados por 3 vezes empregando em cada uma das lavagens 5mL de água destilada refrigerada a 10°C. O material retido no papel de filtro foi armazenado aberto em placa de petri sob refrigeração de aproximadamente 7°C a fim de evaporar a água remanescente. As amostras de enzima imobilizada foram utilizadas na determinação da atividade enzimática residual e eficiência de imobilização como descrito no item 4.6 e 4.8, respectivamente.

Após este experimento selecionou-se o suporte para imobilização da tanase que resultou em maior atividade enzimática e maior eficiência de imobilização para estudar o efeito de diferentes proporções entre enzima:suporte. As proporções estudadas foram 1:100, 1:50 e 1:10 e o processo de imobilização da tanase empregado foi o mesmo citado acima. A avaliação dos suportes foi em relação à atividade enzimática e eficiência de imobilização como descrito no itens 4.6 e 4.8, respectivamente.

4.3 Imobilização de tanase de *Paecilomyces variotii* em Amberlite e Dowex ativados com polietilenoimina e glutaraldeído

Empregou-se a resina catiônica Amberlite e resina aniônica Dowex (1-benzil-trimetilamônio - mesh de 200 – 400) na imobilização de tanase de *Paecilomyces variotii*. A imobilização foi feita de 3 formas distintas para ambos suportes, empregando o suporte natural (submetido somente a etapa de lavagem,

como descrito abaixo), suporte ativado com polietilenoimina (PEI) e suporte ativado com PEI e glutaraldeído (GLU).

Os procedimentos de imobilização foram executados com adaptações como descrito por Obón et al. (2000). A lavagem efetuada em cada um dos suportes foi distinta, amostras de 10g de Amberlite foram lavadas 2 vezes com 100mL de água destilada, 2 vezes utilizando 100mL de tampão acetato 0,01M, pH 4,5. O suporte Dowex foi lavado 2 vezes utilizando 100mL de água destilada e 1 vez utilizando 100mL de solução tampão fosfato 0,1M, pH 7,0. Ambos os suportes foram secos a 40 °C em estufa durante 3h.

O processo de ativação para ambos os suportes foi o mesmo, ativação com PEI na proporção 2,5:1 (PEI:suporte) a 20 °C sob agitação de 100 rpm durante 2h, posteriormente os suportes foram filtrados e lavados com 300mL de água destilada e secos. O suporte-PEI foi ativado com 2,5% de glutaraldeído em tampão fosfato 0,1M pH 7,0, na proporção 5:1 (GLU:suporte) agitando-se por 1h a 20°C a 100 rpm. Os suportes produzidos foram lavados abundantemente com água destilada e secos em estufa a 40 °C durante 3h.

Para os testes de imobilização adicionou-se 5mL de solução de tanase (1mg de tanase em 10mL de tampão acetato 0,02M pH 5,0) em alíquotas de 1g de suporte Amberlite ou Dowex previamente tratados (suporte normal, suporte-PEI, suporte-PEI-GLU). As amostras foram incubadas a 100 rpm, durante 2h nas temperaturas de 7 °C e 20 °C. Após a imobilização, as amostras foram lavados 3 vezes com 5mL de água destilada resfriada a 10 °C e armazenadas sob refrigeração até o momento da análise.

A tanase imobilizada nos diferentes suportes foi avaliada quanto à atividade residual e eficiência de imobilização como descrito nos itens 4.6 e 4.8.

4.4 Imobilização de tanase de *Paecilomyces variotii* em sílica, celite e Accurel ativados com 3-aminopropiltrietoxissilano (ATPS) e glutaraldeído

Os suportes estudados para imobilizar tanase de *Paecilomyces variotii* foram sílica, celite e Accurel. O processo de imobilização proposto consiste em ligar covalentemente a enzima ao suporte, após ativação com 3-aminopropiltrietoxissilano (ATPS) e glutaraldeído (GLU), Figura 10. A primeira etapa é chamada de silanização e refere-se à formação de ligação covalente por meio da reação entre grupamentos hidroxila do suporte com o ATPS, gerando uma terminação amina. A segunda etapa da ativação consiste em ligar o grupamento amina formado na reação de silanização ao glutaraldeído, originando aldeídos livres que poderão ligar-se aos grupamentos amina da enzima por ligação covalente (FERNÁNDEZ-LAFUENTE et al., 1999).

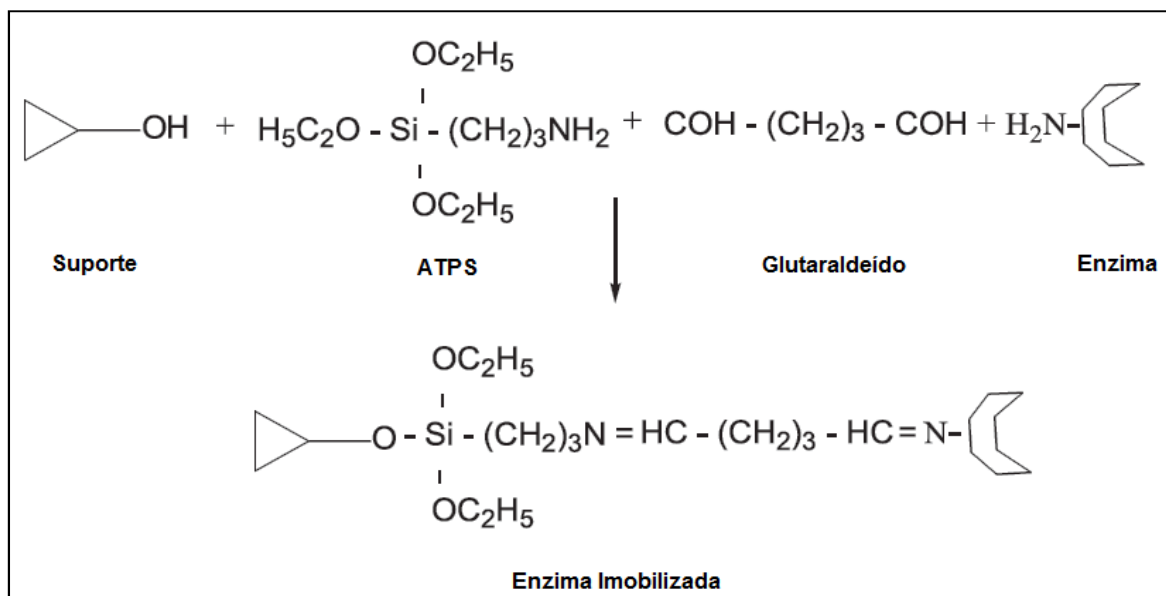


Figura 10. Ativação dos suportes com 3-aminopropiltrietoxissilano (ATPS) e glutaraldeído. Adaptado de Melo et al. (2005).

Primeiramente os suportes alumina, sílica, celite e Accurel foram submetidos a uma etapa de limpeza, na qual foram aquecidos em mufla a 370°C por 3h (exceto o Accurel). Em seguida os suportes foram lavados com solução de

ácido sulfúrico 10% (v/v) durante 30 minutos à temperatura ambiente, na razão de 30 mL/g suporte e posteriormente foram lavados em abundância com água destilada e secos a 40°C durante 3h. Os suportes limpos foram silanizados com solução de ATPS 0,5% (v/v) em tampão acetato 0,1M pH 4,0 sob agitação de 100 rpm durante 3 horas, na razão de 3 mL de solução/g de suporte. Após a silanização, repetiu-se a etapa de lavagem com água destilada e secagem como descrito anteriormente. O suporte silanizado foi ativado com solução de glutaraldeído a 2,5% (v/v) em tampão fosfato 0,1M, pH 7,0 a 100 rpm durante 1 hora a temperatura ambiente. Utilizou-se a razão de 3mL de solução/g de suporte. Após a ativação, os suportes foram lavados exaustivamente com água destilada. Para os testes de imobilização, adicionou-se 5mL de solução de tanase (1mg de tanase em 10mL de solução de tampão acetato 0,2M pH 5,0) em alíquotas de 1g de suporte ativados. A imobilização foi feita a 20°C por 2 horas, sob agitação de 100 rpm (MELO et al., 2005).

A tanase imobilizada nos diferentes suportes foi avaliada quanto à atividade residual e eficiência de imobilização como descrito nos itens 4.6 e 4.8.

4.5 Seleção de suporte para a imobilização de tanase de *Paecilomyces variotii* por gelificação iônica

O estudo da imobilização da tanase por meio da técnica de gelificação iônica foi realizado utilizando-se os polissacarídeos, quitosana de baixa massa molecular e quitosana de média massa molecular 1% (m/v) em ácido acético 1% (v:v); carragena a 2% (m:v), alginato de sódio a 4% (m:v), alginato de alga marrom a 4% (m:v), goma gelana a 2% (m:v) e pectina de baixo teor de metoxilação (BTM) a 2% (m:v) em água destilada.

As suspensões de polissacarídeo (nas concentrações citadas acima) foram incubadas em agitador orbital a 200 rpm a temperatura ambiente por 1h para homogeneização. Adicionou-se 25mg de tanase às amostras de 10mL de cada

suspensão de polissacarídeo e após homogeneização, as suspensões foram gotejadas com o auxílio de uma bomba peristáltica (Masterflex®, modelo nº 7523-40) em béquer contendo 60mL de solução de 0,55M de cloreto de cálcio. As cápsulas obtidas permaneceram na solução de cloreto de cálcio sob refrigeração a 7°C por 3h, posteriormente foram separadas por peneiramento, lavadas 2 vezes com 50mL de água destilada e reservadas em placas de Petri (GANGADHARAN et al., 2009). A Figura 11 ilustra o processo de imobilização. As respostas avaliadas foram porcentagem de atividade enzimática e porcentagem de eficiência de imobilização como descrito nos itens 4.6 e 4.8, respectivamente.

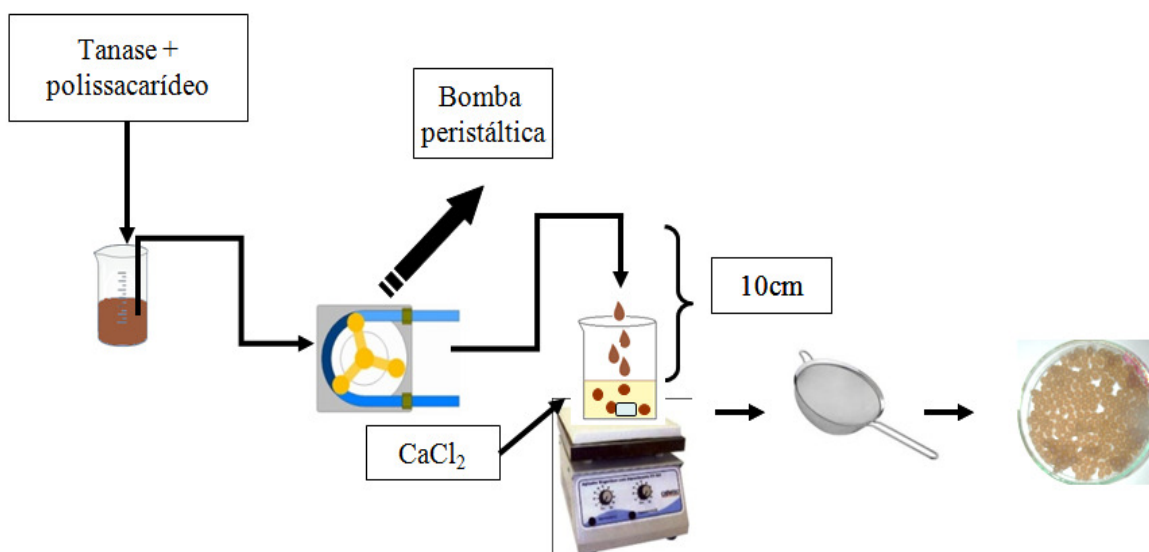


Figura 11. Esquema do processo de imobilização de tanase de *Paecilomyces variotii* por gelificação iônica.

Após estes experimentos selecionou-se o suporte que resultou em maior atividade enzimática e melhor eficiência de imobilização e procedeu-se a otimização da imobilização utilizando a ferramenta de planejamento de experimentos.

4.5.1 Otimização da imobilização de tanase de *Paecilomyces variotii* por gelificação iônica com alginato de sódio por meio de planejamento experimental fracionado

Após avaliação prévia dos suportes para a imobilização de tanase, foi selecionado o suporte que resultou em maior atividade enzimática. Desta forma, foi realizado planejamento fracionado usando o alginato de sódio como material de suporte a fim de otimizar a imobilização da tanase. As variáveis em estudo foram concentração de alginato (%), concentração de cloreto de cálcio (M), tempo de cura (horas) e concentração de tanase (mg tanase/mL alginato), os níveis estudados estão descritos na Tabela 2.

Tabela 2. Valores codificados utilizados no planejamento experimental fracionado (2^{4-1}) para o estudo da influência do alginato de sódio, CaCl_2 , tempo de cura e concentração de tanase na atividade enzimática e eficiência de imobilização da tanase

Variáveis		-1	0	1
Alginato de sódio (%)	x_1	1	3	5
CaCl_2 (M)	x_2	0,1	0,55	1
Tempo cura (h)	x_3	1	4	7
Tanase (mg enzima bruta /mL alginato)	x_4	1	5	10

4.5.2 Otimização da imobilização de tanase de *Paecilomyces variotii* por gelificação iônica em alginato de sódio por meio de planejamento experimental completo

Após avaliar o efeito da concentração de alginato de sódio, concentração de cloreto de cálcio, tempo de cura e concentração de tanase foi feito um planejamento completo ajustando os níveis de cada variável. No delineamento composto central rotacional as variáveis em estudo foram concentração de alginato de sódio, concentração de cloreto de cálcio e de tanase (Tabela 3). Quanto ao tempo de cura foi feito uma avaliação cinética, onde as cápsulas

permaneceram por 6, 12 e 24h em contato com o cloreto de cálcio, para serem avaliadas posteriormente quanto à porcentagem de atividade enzimática e porcentagem de eficiência de imobilização.

Tabela 3. Valores codificados utilizados no delineamento composto central rotacional (2^3) para o estudo da influência da concentração de alginato de sódio, concentração de CaCl_2 e concentração de tanase na atividade enzimática e eficiência de imobilização da tanase

Variáveis		-1	0	1
Alginato de sódio (%)	x_1	2,4	3	3,6
CaCl_2 (M)	x_2	0,28	0,55	0,82
Tanase (mg enzima bruta /ml alginato)	x_3	3,6	5	7,4

Os ensaios para imobilização de tanase foram feitos como demonstrado na Figura 11. Adicionou-se tanase liofilizada em 15mL de alginato (a solução de alginato foi preparada adicionando-se alginato em água destilada, a solução permaneceu sob agitação a 200 rpm em temperatura ambiente por 1 hora para completa homogeneização). A solução de alginato e tanase foi gotejada com o auxílio de uma bomba peristáltica (Masterflex, modelo nº 7523-40), a uma altura de 10cm, em CaCl_2 , na concentração estipulada para cada ensaio, a relação entre volume de alginato e de cloreto de cálcio foi de 1:6 (v:v). Após o gotejamento, deixou-se as cápsulas na solução de CaCl_2 em repouso sob refrigeração a 7°C durante o tempo de cura de 6, 12 e 24h. Transcorrido o tempo de cura removeu-se as esferas por peneiramento e estas foram lavadas com 200mL de água destilada a 10°C. Amostras controle foram obtidas pelo gotejamento da solução de alginato sem a adição de enzima no cloreto de cálcio (GANGADHARAN et al., 2009).

4.5.3 Imobilização de tanase de *Paecilomyces variotii* por gelificação iônica em alginato de sódio com o uso de reticulante

Após determinar as melhores condições para imobilizar tanase de *Paecilomyces variotii* em alginato de sódio por gelificação iônica procedeu-se o estudo do emprego de reticulante. Os reticulantes avaliados foram genipina (Sigma), glutaraldeído 25% (Sigma), transglutaminase Activa[®] (Ajinomoto), transglutaminase de *Streptomyces* sp. CBMAI 837, enzima cordialmente cedida pelo grupo de pesquisa da Prof. Hélia Harumi Sato, a produção da enzima foi realizada conforme Macedo et al. (2007), Bagagli (2009) e Lima (2010).

À solução de alginato (10mL) e enzima adicionou-se, separadamente, 5mg de genipina, 20mg de TG Activa[®], 20mg de TG de *Streptomyces* sp. CBMAI 837 ou 100μL de glutaraldeído 25%. O alginato, enzima e reticulante permaneceram em contato por 30 minutos a temperatura ambiente e foram gotejados na solução de cloreto de cálcio, como demonstrado na Figura 12 (SYNOWIECKI e WOLOSOWSKA, 2006).

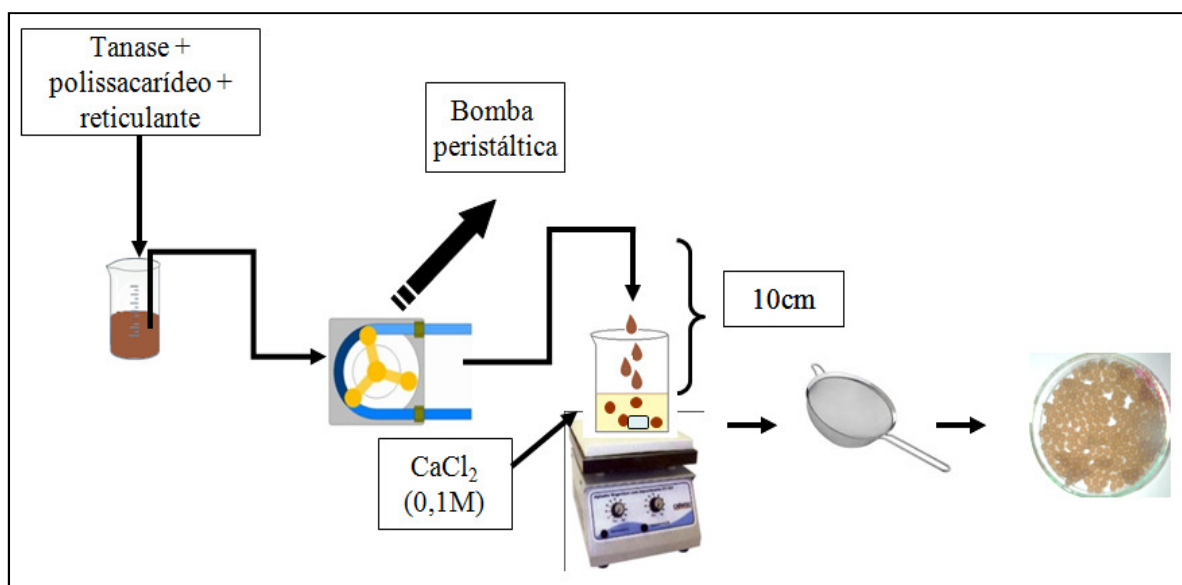


Figura 12. Esquema do processo de imobilização de tanase de *Paecilomyces variotii* por gelificação iônica com reticulante.

4.6 Determinação de atividade enzimática de tanase livre e imobilizada

A tanase livre e imobilizada foram avaliadas quanto à capacidade em hidrolisar ácido tânico utilizando-se a metodologia desenvolvida por Mondal et al. (2001) que consiste em quantificar o tanino que não foi hidrolisado pela tanase por meio de precipitação com proteína e posterior reação colorimétrica com FeCl_3 , o qual reage com compostos fenólicos do tanino por atração nucleofílica formando uma coloração marrom, quantificada por espectrofotômetro (Beckman Coulter DU640).

A reação foi realizada em recipientes de vidro adicionando-se 5mL de ácido tânico 0,2% (m:v) em tampão acetato de sódio 0,2M pH 5,5, que permaneceu durante 10 minutos a 60°C para homogeneizar a temperatura do substrato. Adicionou-se a enzima imobilizada ou livre, a reação ocorreu a 60°C em banho maria termostatizado durante 1h. Após este período transferiu-se uma alíquota de 150µL da mistura de reação para tubos Eppendorf contendo 1,5mL de solução 1mg/mL de albumina de soro bovino (Biográs) em tampão acetato 0,2M - pH 5,0 contendo 0,17M de cloreto de sódio, em seguida centrifugou-se a 10.070xg por 15 minutos a 4°C (Centrifuga Beckman Coulter, Allegra™ X-22R Centrifuge). O precipitado contendo o ácido tânico que a enzima não hidrolisou foi ressuspenso em 1,5mL de solução de dodecil sulfato de sódio (SDS)-trietanolamina (SDS 1% (p/v) adicionado de 5% (v/v) de trietanolamina em água destilada) acrescido de 0,5mL de solução de FeCl_3 (0,01M de FeCl_3 em 0,01M de ácido clorídrico). Após 15 minutos de repouso procedeu-se a medida da absorbância a 530nm. A atividade enzimática foi calculada através de uma curva de calibração de ácido tânico (Merck). A solução enzimática de tanase livre foi preparada com 1mg da enzima liofilizada em 1mL de água destilada. No tubo “controle” foi feita a reação substituindo-se a solução enzimática por água destilada. A absorbância final foi obtida como mostra a equação 1.

$$\text{Abs} = \text{Abs}_{\text{controle}} - \text{Abs}_{\text{teste}} \quad (\text{Equação 1})$$

Uma unidade de atividade específica foi definida como a quantidade em μmol de ácido tânico hidrolisado durante 1 minuto de reação por 1mg de proteína.

A porcentagem de atividade enzimática (%AE) da tanase imobilizada foi expressa em relação à atividade específica da tanase livre como mostra a equação 2.

$$\%AE = \frac{\text{atividade específica tanase imobilizada}}{\text{atividade específica tanase livre}} \times 100 \quad (\text{Equação 2})$$

4.7 Proteína total no extrato de tanase liofilizada

O método de Bradford é utilizado para quantificar proteínas totais e se baseia na interação entre o corante Azul Brilhante de Coomassie BG-250 e macromoléculas de proteínas que contêm aminoácidos básicos (histidina, lisina e arginina) ou aromáticos (tirosina, triptofano e fenilalanina). No pH de reação, as interações entre as proteínas e o corante provocam o deslocamento do equilíbrio do corante para a forma aniônica, que absorve fortemente em 595 nm (BRADFORD, 1976).

O reagente de Bradford foi preparado em balão volumétrico de 1000mL, adicionou-se 100 mg de Azul Brilhante de Coomassie BG-250, 50mL de etanol, 100mL de ácido fosfórico 85% (PA), o volume foi completado com água destilada. A solução foi agitada e filtrada em filtro Whatman nº1.

As proteínas totais foram determinadas de acordo com Bradford (1976), utilizando 100 μL da solução enzimática (1mg/mL em água destilada) e 2,5mL do reagente de Bradford, após 5 minutos de reação a temperatura ambiente determinou-se a coloração espectrofotometricamente a 595nm. A curva de calibração foi elaborada com albumina de soro bovino (Biográs) nas mesmas condições reacionais citadas acima. Preparou-se tubo “branco” substituindo-se o padrão de proteínas pelo mesmo volume de água destilada.

4.8 Determinação da porcentagem da eficiência de imobilização de tanase de *Paecilomyces variotii* imobilizada

A determinação da porcentagem da eficiência de imobilização de tanase de *Paecilomyces variotii* foi realizada pelo método de Bradford (1976) utilizando como amostra alíquotas da solução de cloreto de cálcio após o tempo de cura quando a imobilização foi feita por meio de gelificação iônica, ou a água de lavagem dos suportes após imobilização quando empregou-se técnica de imobilização adsorção e ligação covalente. Retirou-se alíquota de 100µL da solução contendo a enzima que não foi imobilizada e adicionou-se 2,5mL do reagente de Bradford. Agitou-se e mediu-se a absorbância após 5 minutos em espectrofotômetro a 595nm. A porcentagem da eficiência de imobilização foi determinada pela equação 3 (CHANG et al., 2007).

$$EI (\%) = \frac{(\text{mg de proteína encapsulada})}{(\text{mg proteína empregada})} \times 100 \quad (\text{Equação 3})$$

4.9 Reutilização da enzima imobilizada em bateladas

O estudo de reuso da tanase imobilizada foi feito em bateladas, sendo que após cada reação, uma alíquota foi retirada para verificar a porcentagem de atividade enzimática, utilizando como substrato solução de ácido tânico 0,2% em tampão acetato 0,2M pH 5,5 incubado a 60°C durante 60 minutos, como descrito no item 4.6. Após cada reação a tanase imobilizada foi removida por filtração, lavada e utilizada novamente na reação de hidrólise do ácido tânico, este procedimento foi realizado por seis vezes.

4.10 Determinação de umidade nas cápsulas

A determinação da umidade nas cápsulas foi feita em estufa a 105°C segundo Association of Official Analytical Chemists – AOAC (2006).

4.11 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

As cápsulas de tanase imobilizada por meio de gelificação iônica em alginato de sódio e reticuladas com genipina, glutaraldeído, TG Activa® (Ajinomoto) e TG de *Streptomyces* sp. CBMAI 837 e controle (sem adição de reticulantes) foram analisadas quanto as características da sua superfície por microscopia eletrônica de varredura (MEV). Primeiramente cápsulas secas foram aderidas por meio de uma fita de cobre sobre o *stub* de alumínio, as amostras permaneceram em dessecador até o momento da análise. Posteriormente foram recobertas por uma fina camada de ouro em evaporador (Balzers – Sputter Coater SCD050) 40mA/180s, a 24 °C. Na seqüência foram observadas em microscópio eletrônico de varredura com aceleração de 20kv.

4.12 Caracterização bioquímica da enzima livre e imobilizada

4.12.1 Determinação do pH ótimo de atividade e de estabilidade

O pH ótimo de atividade e de estabilidade da enzima livre e imobilizada foram determinados empregando amostra de 30mg de tanase encapsulada ou 0,25mL de solução para tanase livre (1mg/mL em água destilada) em 5mL do substrato ácido tânico 0,2%, a 60 °C durante 60 minutos.

O pH ótimo de atividade e de estabilidade foram determinados utilizando valores de pH entre 3,5 e 9,0. Para valores de pH 3,5; 4,0; 4,5; 5,0 e 5,5 empregou-se tampão acetato 0,2M, para valores de pH entre 7,0; 7,5; 8,0; 8,5 e 9,0 empregou-se tampão tris-HCl 0,2M. Na determinação do pH de estabilidade a enzima imobilizada ou livre permaneceu durante 1h a temperatura ambiente nos pH citados acima, após este período o pH foi ajustado para o valor correspondente à metodologia de atividade (pH 5,5) e a atividade relativa da enzima foi determinada como descrito no item 4.6, considerando-se a atividade máxima como 100%.

4.12.2 Determinação da temperatura ótima de atividade e de estabilidade

O efeito da temperatura ótima na atividade da tanase livre e imobilizada foi avaliada incubando-se amostra de 30mg de tanase encapsulada ou 0,25mL de solução de tanase livre (1mg/mL em água destilada) em 5mL do substrato ácido tânico 0,2% em tampão acetato 0,2M pH 5,5, nas temperaturas de 20, 30, 40, 50, 60, 70 e 80°C durante 60 minutos. A temperatura de estabilidade foi determinada incubando alíquota de 30mg de tanase encapsulada ou 0,25mL de solução para tanase livre (1mg/mL em água destilada) nas mesmas temperaturas citadas para a temperatura ótima durante 60 minutos. Após o tratamento térmico a atividade residual foi determinada como descrito em 4.6 utilizando como substrato o ácido tânico, considerando-se a atividade máxima como 100%.

4.12.3 Atividade da enzima livre e imobilizada frente a inibidores

Avaliou-se a atividade da tanase frente a inibidores como iodoacetamida, azidasódica, EDTA e 4-cloromercuribenzoato a uma concentração de 1mM. Incubando-se amostra de 30mg de tanase encapsulada ou 0,25mL de solução de tanase livre (1mg/mL em água destilada) em 5mL do substrato ácido tânico 0,2% em tampão acetato 0,2M pH 5,5, Determinou-se a atividade residual da tanase livre e imobilizada usando o procedimento descrito no item 4.6.

4.12.4 Quimioseletividade de tanase livre de *Paecilomyces variotii* nas reações de síntese de ésteres de ácido gálico

A tanase de *Paecilomyces variotii* livre foi avaliada, pela primeira vez, quanto à sua capacidade em sintetizar ésteres de ácido gálico. As reações foram realizadas em frascos de vidro âmbar cilíndricos de 8,5cm de comprimento, 3,5cm de diâmetro, capacidade para 60mL, com tampa de rosca e selados com

Parafilm[®], para evitar que os alcoóis com baixo ponto de ebulição fossem evaporados, a Figura 13 demonstra o sistema utilizado.

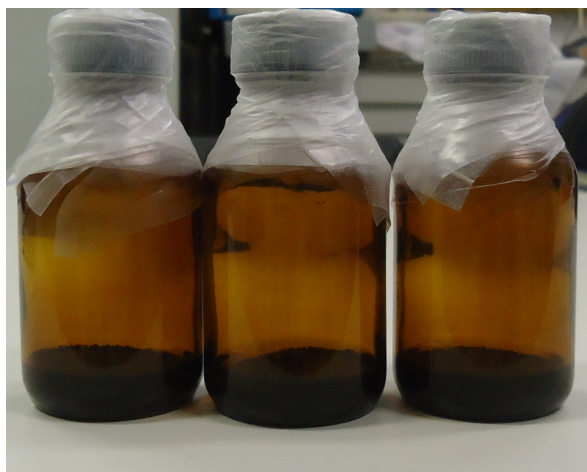


Figura 13. Materiais e metodologia empregada para efetuar as reações de síntese de ésteres de ácido gálico.

A reação de síntese de ésteres utilizando tanase de *Pecilomyces variotii* livre foi conduzida em banho-maria a 45 °C, sob agitação de 200 rpm durante 96h, empregando 2mL de ácido gálico 0,184M (Sigma-Aldrich) dissolvido em diferentes alcoóis, a saber: metanol (Ecibra), etanol (Synth), propanol (Synth), 2-propanol (Ecibra), 3-metil-1-butanol (Vetec), butanol (Vetec), terc-butanol (Vetec), pentanol (Sigma-Aldrich), hexanol (Fluka), octanol (Vetec), dodecanol (Vetec). Empregou-se 7% em massa de tanase livre em relação à massa total dos reagentes utilizados. Decorrido o tempo das reações, os frascos foram retirados do banho-maria e colocados em um recipiente plástico contendo água e gelo na temperatura de aproximadamente 0 °C. Este procedimento objetivava paralisar a reação, bem como promover a condensação dos reagentes utilizados no meio reacional. Desta forma o vapor resfriado no sistema fechado voltava ao estado líquido, através da combinação de pressão e temperatura do meio. Retirou-se alíquotas de 10 μ L para a identificação de ésteres de galato por meio de cromatografia em camada delgada (item 4.14). Posteriormente às alíquotas foram adicionadas 10mL de

acetona:etanol (1:1 v/v); o que também garantia o processo de paralisação e determinou-se a porcentagem de esterificação por meio de reação de neutralização do ácido gálico restante (item 4.13).

4.12.5 Quimioseletividade de tanase de *Paecilomyces variotii* imobilizada por gelificação iônica em alginato de sódio nas reações de síntese de ésteres de ácido gálico

A tanase imobilizada em alginato de sódio por gelificação iônica nas condições otimizadas pelo delineamento composto central rotacional foi avaliada quanto à capacidade de sintetizar propilgalato. A reação foi realizada utilizando 840mg de tanase encapsulada e 2mL de ácido gálico 0,184M em propanol. A reação foi conduzida em banho-maria a 45 °C, sob agitação de 200 rpm.

A formação de propilgalato foi avaliada através da determinação da porcentagem de esterificação após 1, 2, 12, 24, 48, 72 e 96h de reação, como descrito no item 4.13. A identificação do propilgalato foi realizada por meio de cromatografia em camada delgada como descrito no item 4.14.

4.13 Determinação da porcentagem de esterificação

A análise das porcentagens de esterificação nestes ensaios de síntese de ésteres de ácido gálico foi realizada por titulação do ácido residual do sistema. Este método foi escolhido por ser representativo e rápido, atendendo as necessidades deste estudo. As amostras foram tituladas contra NaOH 0,1M em pHmetro, pois, a tanase possui coloração escura, impossibilitando a visualização do ponto de viragem. O final da titulação foi estabelecido no pH de 8,72.

Foram preparadas ainda amostras “branco” contendo todos os reagentes do meio e a enzima inativada em banho-maria à temperatura de ebulição durante 10 minutos. A porcentagem de esterificação foi calculada considerando 100% de

ácido gálico livre nas amostras “branco” e subtraindo a porcentagem residual de ácido livre presente em cada amostra calculada pela equação 4.

$$\% \text{ de Esterificação} = \frac{V \text{ NaOH branco} - V \text{ NaOH (amostra)}}{V \text{ NaOH branco}} \times 100 \quad (\text{Equação 4})$$

Onde V = volume

A curva de calibração foi preparada com 2mL de ácido gálico em propanol na faixa de concentração de 0,02 a 0,2M e 7% de tanase desnaturada por ebulição durante 10 minutos.

4.14 Identificação dos ésteres formados por cromatografia em camada delgada

A identificação dos ésteres formados foi confirmada por meio de cromatografia em camada delgada (CCD), para isto empregou-se placas de sílica gel (60, 10x10cm, ALUGRANR Sil G/UV254), utilizando como fase móvel clorofórmio:metanol (4:1 v:v) adicionado de 2 gotas de ácido acético, a temperatura de 25°C. As placas foram previamente ativadas em estufa a 105°C por um tempo de 30 minutos.

Aplicou-se na extremidade inferior da placa, a cerca de 1cm, alíquotas de 10uL das misturas de reações com auxílio de pipetador automático. A aplicação da amostra foi efetuada em pequenas doses seguidas por secagem com secador para evitar alargamento de banda. A placa contendo as amostras das misturas de reações de síntese foi colocada em uma cuba retangular de vidro, devidamente limpa e saturada com a fase móvel durante 20 minutos. Após o término da corrida foi feita a revelação emergindo a placa em forma de alumínio contendo 5% de ácido sulfúrico em etanol, seguido de secagem em estufa a 100°C. A cada corrida

cromatográfica utilizou-se 10 μ L de propilgalato 0,184M em propanol (Vetec) e 10 μ L de ácido gálico 0,184M em água destilada (Sigma-Aldrich).

4.15 Análise estatística

Os dados foram analisados pelo programa Statistica 8.0 para determinação da análise de variância, comparação entre as médias dos tratamentos pelo teste de Tukey com nível de confiança de 95%; a análise do planejamento de experimentos foi realizada empregando o mesmo software.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Imobilização de tanase de *Paecilomyces variotii* por adsorção

A tanase de *Paecilomyces variotii* foi imobilizada pelo processo de adsorção em diferentes suportes, alumina, Amberlite, Accurel e celite. Os resultados da porcentagem de atividade enzimática e da porcentagem da eficiência de imobilização encontram-se na Tabela 4.

Tabela 4. Porcentagem de atividade enzimática e porcentagem de eficiência de imobilização de tanase imobilizada por adsorção em alumina, Amberlite, Accurel e celite

	Atividade enzimática (%)	Eficiência de imobilização (%)
Alumina	0	43,16 ± 2,85
Amberlite	0	50,40 ± 4,62
Accurel	26,10 ± 1,32	19,57 ± 1,38
Celite	42,11 ± 0,33	81,00 ± 4,31

Dentre os suportes estudados para a imobilização de tanase por adsorção apresentados na Tabela 4, a celite resultou em maior porcentagem de atividade enzimática de tanase (42%), seguida pelo Accurel (26%). Já a enzima imobilizada em alumina e Amberlite não demonstraram atividade catalítica apesar de possuírem eficiência de imobilização de 43 e 50%, respectivamente. Em relação ao derivado alumina observou-se ainda, por meio da reação controle (somente suporte) que este material por si só, foi capaz de hidrolisar ácido tânico, acredita-se que esta hidrólise do ácido tânico seja devido ao pH alcalino atingido pela solução, pH 9,0 (GOUVÊA e MURAD, 2001).

Resultado semelhante foi obtido por Wu et al. (2007), os autores estudaram a imobilização da lipase de *Mucor javanicus* em 4 suportes distintos e constataram

que o suporte que resultou em maior eficiência de imobilização não resultou em maior atividade enzimática. Os autores sugerem que a forte adsorção da lipase ao suporte tenha alterado a conformação da enzima, modificando sua atividade catalítica.

Contesini (2009) constatou que as condições ótimas de imobilização da glicosiltransferase bruta em celite foram pH 4,0 e 1.700 U/mL de enzima. A glicosiltransferase imobilizada converteu cerca de 50% de sacarose em isomaltulose, porém a conversão diminuiu com o tempo. O tratamento da glicosiltransferase imobilizada em celite com 0,1% de glutaraldeído não resultou em aumento da retenção e estabilidade da enzima.

Sharma et al. (2008) estudaram a imobilização de tanase de *Penicillium variable* por adsorção em Amberlite IR 1204, Amberlite XAD 7, DEAE celulose, celite e sílica, sendo que a eficiência de imobilização foi de 69, 25, 46, 13 e 5%, respectivamente.

Em estudo desenvolvido por Reshmi, Sanjay e Sugunan (2006) foi constatado que a imobilização de α -amilase em alumina previamente tratada com hidróxido de amônio e calcinada a 500 e 700 °C ocorre por meio de ligações com os grupamentos OH da alumina. Os autores constataram também que a calcinação do suporte em temperatura de 700 °C resultou em maior estabilidade enzimática.

Ivanov e Schneider (1997) avaliaram a capacidade de síntese de ésteres e reuso de lipase de *Pseudomonas fluorescens* imobilizada nos seguintes suportes: celite 545, octilsílica, Eupergit C250L, sílica ativada com 3-aminopropiltriétoxissilano e sílica ativada com 3-aminopropiltriétoxissilano e glutaraldeído. Os pesquisadores constataram que a lipase imobilizada nos suportes citados acima foi capaz de sintetizar ésteres, contudo dentre estes suportes a celite foi bem superior aos demais. Já no estudo avaliando o reuso da enzima imobilizada obtiveram melhor resultado com a lipase imobilizada em Eupergit C250L, a qual reteve 30% da sua atividade após 11 ciclos.

A partir destes dados foi feito um estudo utilizando celite como suporte, no qual variou-se a proporção enzima:suporte, os dados para %AE e %EI encontram-se na Tabela 5.

Tabela 5. Porcentagem de atividade enzimática e porcentagem da eficiência de imobilização de tanase adsorvida em celite variando a proporção enzima:suporte (v/m).

Proporção enzima:suporte (v:m)	Atividade enzimática (%)	Eficiência de imobilização (%)
Celite 1:100	59,16 ± 3,90	4,83 ± 2,75
Celite 1:50	0,00 ± 2,94	0,00 ± 1,87
Celite 1:10	0,00 ± 0,17	0,00 ± 0,05

Tanto para a porcentagem de atividade enzimática (%AE) quanto para a porcentagem de eficiência de imobilização (%EI) observa-se neste estudo que somente a maior quantidade de suporte empregado em relação à enzima resultou em alguma atividade enzimática. A imobilização de tanase em celite utilizando relação enzima:suporte de 1:50 e 1:10 não resultou em atividade enzimática.

Estes resultados podem ser justificados em função da forma pela qual a enzima é adsorvida em sistemas com quantidade insuficiente de suporte, nestes casos haverá formação de multicamadas da enzima em torno do suporte, gerando agregados enzimáticos. Estes agregados formados podem ser dessorvidos muito facilmente, quando se tratar de simples adsorção, já que a interação entre enzima e suporte ocorre por meio de interações fracas como pontes de hidrogênio, forças de van der Waals e interações hidrofóbicas (YADAV e JADHAV, 2005). Além disto, o excesso de enzima resulta em impedimento estérico e dificulta a dispersão entre substrato e produto (BAI et al., 2006; SOARES et al., 2003). Por outro lado, em processos de imobilização de enzima por adsorção, baixas concentrações de enzima imobilizada resultam em baixa atividade enzimática devido à inativação da enzima pelo suporte, pois pode ocorrer alteração conformacional já que existe

uma grande área de interação da enzima com o suporte (MANSOUR e DAWOUD, 2003).

Resultado semelhante foi relatado por Sharma, Bari e Singh (2009) visando imobilizar polifenoloxidase em celulose ativada com 1,1-carbonildiimidazol, foi constatado que quando a proporção enzima: suporte passou de 12:1000 à 36:1000 a atividade específica da polifenoloxidase foi reduzida de 84 para 33%.

Bai et al. (2006) avaliaram a proporção ideal entre enzima:suporte para a imobilização de lipase. A concentração de lipase variou de 12-32mg/60mg de sílica, os autores constataram que a maior atividade catalítica da lipase imobilizada foi quando se empregou proporção de 24mg de lipase:60mg de sílica.

Adriano et al. (2005) também constataram diminuição na eficiência de imobilização de penicilina G acilase em quitosana ativada com glutaraldeído a medida que a concentração da enzima foi aumentada. Os autores justificaram este comportamento devido a dificuldade da interação entre enzima e suporte ativado a medida que a concentração da enzima foi aumentada.

5.2 Tanase imobilizada em Amberlite e Dowex ativados com polietilenoimina e glutaraldeído

Realizou-se estudo de imobilização de tanase em resinas de troca iônica Amberlite IRC-50 (resina catiônica fraca) e Dowex-1 (resina aniônica forte) por meio da ativação dos suportes utilizando polietilenoimina (PEI) e glutaraldeído (GLU). A imobilização da enzima foi realizada a temperatura ambiente e sob refrigeração. A Figura 14 ilustra os resultados obtidos quanto a porcentagem de atividade enzimática da tanase imobilizada em Amberlite, Amberlite ativada com PEI e Amberlite ativada com PEI e GLU. Em todos os experimentos descritos abaixo e também para a imobilização de tanase em Dowex-1 a eficiência de imobilização foi superior a 80%.

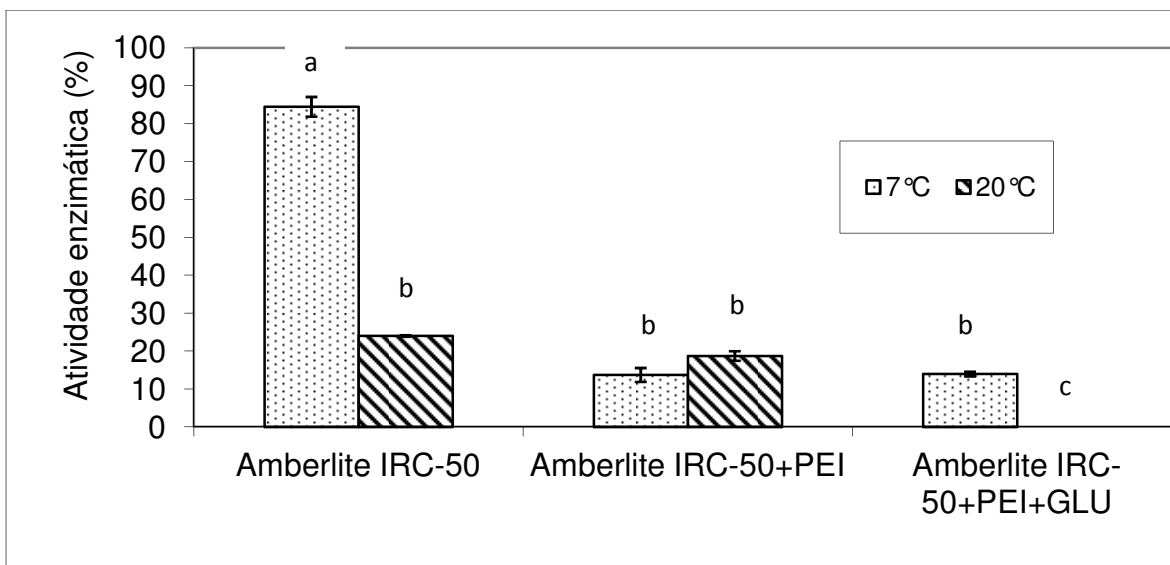


Figura 14. Porcentagem de atividade enzimática de tanase imobilizada em Amberlite IRC-50 ativada com polietilenoimina (PEI) e glutaraldeído (GLU) a temperatura de 7 e 20°C. Letras distintas sobre as colunas indicam que houve diferença estatística significativa pelo teste Tukey ($p < 0,05$).

Observa-se na Figura 14 que a enzima imobilizada a 7°C em Amberlite resultou na maior %AE dentre todos os ensaios realizados, já para a enzima imobilizada pelo mesmo processo variando apenas a temperatura empregada, para 20°C observa-se uma diminuição de 72% na %AE. Pode-se concluir que baixas temperaturas (em torno de 7°C) exercem efeito positivo na atividade catalítica da tanase de *Paecilomyces variotii* imobilizada em Amberlite IRC-50 por meio de adsorção. Resultado semelhante foi relatado por Chang et al. (2007), para imobilização de lipase de *Candida rugosa* em celite, no qual os autores constataram que a temperatura ótima foi de 10,7°C.

Quando a tanase foi imobilizada a 7°C no suporte Amberlite IRC-50+PEI e Amberlite IRC-50+PEI+GLU a %AE foi diminuída em 84 e 83%, respectivamente. Relata-se que a imobilização de enzima em suporte ativado resulta em maior estabilidade da enzima, contudo nem sempre isto irá acontecer.

A %AE da tanase imobilizada à temperatura de 20°C em Amberlite IRC-50 foi de 24%, já para o suporte Amberlite IRC-50+PEI houve diminuição da atividade para 19%. Pode-se constatar ainda que a tanase imobilizada no suporte Amberlite IRC-50+PEI+GLU teve sua atividade catalítica reduzida a zero. A diminuição da atividade catalítica da enzima imobilizada em suporte ativado provavelmente esteja relacionada a alterações na estrutura da enzima, limitação difusional, impedimento estérico, causando alterações nas suas características cinéticas (RESHMI, SANJAY e SUGUNAN, 2006).

Palomo et al. (2003) por meio de dados obtidos de estudo da imobilização de lipase de *Mucor miehei* empregando distintos suportes e diferentes ativadores, afirmam que as propriedades cinéticas das enzimas imobilizadas estão intimamente associadas aos protocolos de imobilização utilizados. Estudo similar foi realizado por Bevilaqua (2005), no qual os autores constataram que a enzima lipase de *Candida rugosa* (CRL) apresentou alterações importantes em suas propriedades catalíticas (atividade, especificidade e enantioseletividade) quando esta foi imobilizada através de adsorção em suporte hidrofóbico ativado com polietilenoimina e glutaraldeído. A lipase imobilizada no suporte por adsorção interfacial mostrou-se mais ativa na hidrólise de substratos mais simples como etil butirato, enquanto que a lipase imobilizada ao suporte ativado com polietilenoimina mostrou-se mais ativa na hidrólise de substratos iônicos (ácido 2-fenil-2-butirolacético em pH 7,0) ou metil mandelato.

Relatos indicam que a imobilização de enzimas promovem alterações na sua estrutura conformacional, levando a redução ou até, perda de sua atividade catalítica. Esta alteração conformacional também pode estar associada com modificações na atividade enzimática, características bioquímicas, afinidade com o substrato, enantioseletividade, entre outras (PESSELA et al., 2007; PEREZ et al., 2007).

O mesmo procedimento de imobilização foi feito utilizando a resina aniônica Dowex[®] 1, apesar de constatar elevada EI, superior a 95%, não foi observada

atividade catalítica da tanase. Além disto, também, pode-se observar por meio da reação controle que o substrato empregado pela enzima tanase, o ácido tânico não foi estável frente ao suporte Dowex-1, sendo hidrolisado sem que houvesse nenhum efeito da tanase. Tomotani e Vitolo (2006) estudaram a imobilização de invertase em Dowex[®] (1x8:50-400; 1x4:50-400 e 1x2:100-400), 1x8:50 apresentou elevada EI da invertase (87%) e baixa atividade enzimática retida no suporte (2%), esta baixa atividade foi justificada devido a alteração conformacional na estrutura ou sítio ativo da enzima e/ou devido à impedimento estérico resultante da imobilização, principalmente em função desta resina possuir poros muito pequenos (50 mesh) quando comparada as demais resinas utilizadas. Os autores sugerem que a resina Dowex 1x4-200 (constituída de 2% de divinilbenzeno e 4% de estireno e 400 mesh) foi a mais apropriada devido à completa adsorção das moléculas de invertase e a sua retenção de atividade catalítica de 100%.

Abdel-Naby et al. (1999) imobilizaram tanase de *Aspergillus oryzae* empregando distintas técnicas de imobilização, adsorção em alumina e quitina coloidal; ligação iônica em Dowex 50W, DEAE-Sephadex; ligação covalente em quitina e quitosana ativados com glutaraldeído e encapsulação em poliacrilamida e alginato de cálcio. Os melhores resultados para eficiência de imobilização (27%) e atividade específica (15U/mg proteína) foram obtidos com tanase imobilizada por ligação covalente em quitosana ativada com glutaraldeído. A imobilização resultou em atividade catalítica distinta quando empregavam substratos de diferentes origens. Já os piores resultados foram constatados quando a tanase foi imobilizada em Dowex 50W em que foi obtido 7% de eficiência de imobilização e atividade específica igual a 8U/mg proteína.

5.3 Tanase imobilizada em sílica, Accurel e celite ativados com 3-aminopropiltrietoxissilano e glutaraldeído

A tanase foi imobilizada por adsorção nos seguintes suportes: sílica, Accurel e celite. Os suportes foram empregados na sua condição normal, suporte ativado com 3-aminopropiltrietoxissilano (ATPS) e suporte ativado com ATPS e glutaraldeído (GLU), a Figura 15 mostra os resultados da %AE.

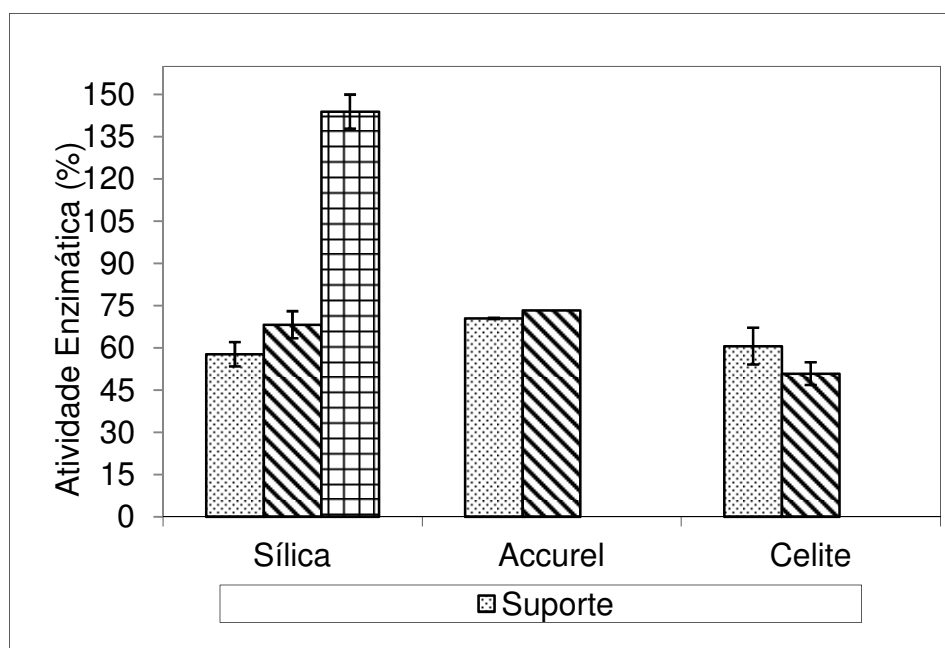


Figura 15. Porcentagem de atividade enzimática de tanase imobilizada em diferentes suportes (suporte normal, suporte ativado com 3-aminopropiltrietoxissilano e suporte ativado com 3-aminopropiltrietoxissilano e glutaraldeído).

A Figura 15 demonstra que os suportes sílica, Accurel e celite foram efetivos na imobilização da tanase nas 3 condições estudadas, suporte-normal, suporte+ATPS e suporte+ATPS+GLU, sendo que a maior %AE (144%) foi observada para o suporte sílica+ATPS+GLU, comparando a atividade catalítica da enzima livre. A imobilização de tanase em sílica, sílica+ATPS, Accurel,

Accurel+ATPS, celite e celite+ATPS resultou em valores de %AE, na faixa de 58 – 73%. As amostras de tanase imobilizadas em Accurel e celite ativadas com ATPS+GLU não apresentaram atividade catalítica. O processo de imobilização de tanase realizado no presente estudo em alumina, sílica, celite e Accurel ocorreu em pH 5,0, independente da ativação que o suporte havia sofrido. Esta condição indica que a ligação covalente entre o grupo aldeído dos suportes ativados com glutaraldeído ocorreu por meio do NH₂-terminal da enzima.

Alonso et al. (2005) pesquisaram o efeito da concentração de glutaraldeído (0 – 2%) como ativador na imobilização de glutarilacilase, e verificaram que a maior atividade catalítica foi obtida empregando glutaraldeído na faixa de 0,5 – 2%. Os autores constataram ainda que quando a concentração de glutaraldeído empregada variou de 0 a 0,5% a atividade da enzima glutarilacilase variou de 0 a 100%. Este estudo indica que há um limiar muito discreto na concentração de glutaraldeído para a obtenção da enzima imobilizada ativa e estável.

Yadav e Jadhav (2005) imobilizaram lipase em sílica por adsorção e constataram que a enzima era dessorvida muito rapidamente. Para solucionar este problema os autores usaram como estratégia encapsular a lipase já adsorvida na sílica utilizando alginato. O resultado obtido foi satisfatório, a enzima manteve sua atividade catalítica até o quarto reuso.

Ivanov e Schneider (1997) obtiveram baixíssima atividade de lipase de *Pseudomonas fluorescens* quando esta foi imobilizada em sílica ativada com 3-aminopropiltriétoxissilano e sílica ativada com 3-aminopropiltriétoxissilano e glutaraldeído.

Segundo Mateo et al. (2005) a eficiência de imobilização enzimática depende da ativação do suporte e principalmente dos grupos funcionais reativos da enzima, em função disto pode-se concluir que enzimas devem ser imobilizadas pelo grupo funcional que se encontra em maior quantidade, geralmente grupos lisina. Estas características individuais das enzimas são as responsáveis por tornar o processo de imobilização e as respostas obtidas tão distintas.

Pedroche et al. (2007) estudaram a imobilização de proteases em agarose ativada com 4 e 10% de glioxil e verificaram que as enzimas imobilizadas em agarose ativada com 10% de glioxil foram mais estáveis comparando com aquelas produzidas em agarose ativada com 4% de glioxil, segundo os autores isto ocorreu devido ao maior número de ligações multipontuais entre a enzima e a agarose ativada com 10% de glioxil.

Segundo Fernandez-Lorente et al. (2001) muitas enzimas são sensíveis e podem perder a atividade catalítica quando se utiliza glutaraldeído. Entretanto, a efetividade da imobilização depende das condições experimentais em que o procedimento é realizado, devido à multiplicidade de estruturas químicas possíveis em cada situação.

De acordo com Freire (1988) o processo de imobilização normalmente ocasiona modificações nas propriedades físico-químicas da enzima com conseqüente alteração na estabilidade e nas propriedades cinéticas. Desta forma, a redução da atividade catalítica pode ter ocorrido devido a mudanças na estrutura da enzima e/ou alteração no sítio ativo desta. Esse comportamento também se deve a menor transferência de massa do meio reacional para o sistema imobilizado, pois o processo da imobilização reduz a difusão do substrato para o interior do suporte (MATEO et al., 2000).

Estudo semelhante foi desenvolvido por Ivanov e Schneider (1997) que avaliaram a capacidade de síntese de ésteres e reuso de lipase de *Pseudomonas fluorescens* imobilizada nos seguintes suportes: celite 545, octilsílica, Eupergit C250L, sílica ativada com 3-aminopropiltriethoxisilano e sílica ativada com 3-aminopropiltriethoxisilano e glutaraldeído. Os pesquisadores constataram que a lipase imobilizada nos suportes citados acima foi capaz de sintetizar ésteres, contudo dentre estes suportes a celite foi bem superior aos demais. Já no estudo avaliando o reuso da enzima imobilizada obtiveram melhor resultado com a lipase imobilizada em Eupergit C250L, a qual reteve 30% da sua atividade após 11 ciclos.

Perez et al. (2007) avaliaram o efeito da imobilização de lipase de *Candida rugosa* utilizando como suporte madeira de *Eucalyptus grandis* a qual foi ativada com carbodiimina, glutaraldeído e meta-periodato de sódio nas características bioquímicas e afinidade de substrato nas reações de hidrólise e síntese. Os autores concluíram que o emprego de diferentes ativadores na imobilização resultou em distintas interações entre enzima-ativador-suporte, culminando consequentemente em alterações nas suas condições ótimas. Nas reações de hidrólise foi observada menor afinidade entre o substrato (p-nitrofenil palmitato) e lipase imobilizada com madeira-carbodiimina, quanto à reação de síntese a atividade catalítica da lipase imobilizada em madeira ativada com os três compostos foram muito próximas.

Curiel et al. (2010) imobilizaram tanase de *Lactobacillus plantarum* expressa em *Escherichia coli* com adição de grupos histidina em CNBr-agarose (interação enzima:suporte monopontual) e glioxil-agarose (interação multipontual) e avaliaram a atividade e estabilidade enzimática. Dentre os processos de imobilização de tanase desenvolvidos foi obtida maior estabilidade (500 vezes maior) com o suporte glioxil-agarose (altamente ativado a 25°C, pH 10 durante 24 horas). Em meio reacional contendo 30% de propanol a estabilidade do suporte foi 1000 vezes maior quando comparado com a enzima imobilizada em CNBr-agarose. Os autores concluíram que maior estabilidade de tanase foi obtida quando a ativação do suporte, a temperatura e o tempo de imobilização foram maiores, o que indica que a estabilidade enzimática está diretamente relacionada com a intensidade de interação multipontual entre enzima e suporte.

5.4 Imobilização de tanase de *Paecilomyces variotii* por gelificação iônica

Tanase de *Paecilomyces variotii* foi imobilizada por gelificação iônica em vários suportes entre eles, alginato de sódio, alginato de alga marrom, goma gelana, carragena e pectina, a Tabela 6 mostra a porcentagem de atividade enzimática (AE) e a porcentagem da eficiência de imobilização.

Tabela 6. Porcentagem de atividade enzimática e porcentagem da eficiência de imobilização de tanase imobilizada por gelificação iônica em alginato de sódio, alginato de alga marrom, goma gelana e pectina

Polissacarídeo	Atividade enzimática (%)	Eficiência de Imobilização (%)
Alginato de sódio	9,67 ± 1,02	38,69 ± 3,52
Alginato de alga marrom	4,63 ± 1,73	12,65 ± 1,59
Goma gelana	3,65 ± 0,89	15,60 ± 2,70
Pectina	1,55 ± 0,64	65,81 ± 3,98

Resultados estimados em triplicata (n= 3) ± desvio padrão.

A Tabela 6 mostra que a %AE da tanase imobilizada em alginato de sódio foi superior à aquela observada pela tanase imobilizada nos demais suportes avaliados. Quanto a %EI percebe-se que os melhores resultados foram obtidos para os suportes pectina e alginato de sódio, contudo a %AE da tanase imobilizada em pectina foi a menor dentre os 4 suportes avaliados. Na Figura 16 estão ilustradas as cápsulas obtidas. Por meio destas imagens pode-se constatar que as cápsulas de pectina não apresentam formato circular uniforme e também, não possuíam resistência mecânica quando comparado as cápsulas formadas pelo alginato de sódio, alginato de alga marrom e goma gelana. Observou-se ainda que, as cápsulas formadas com alginato de sódio mostraram-se superiores do que as formadas com os demais polissacarídeos com relação a esfericidade, resistência mecânica e uniformidade de tamanho.

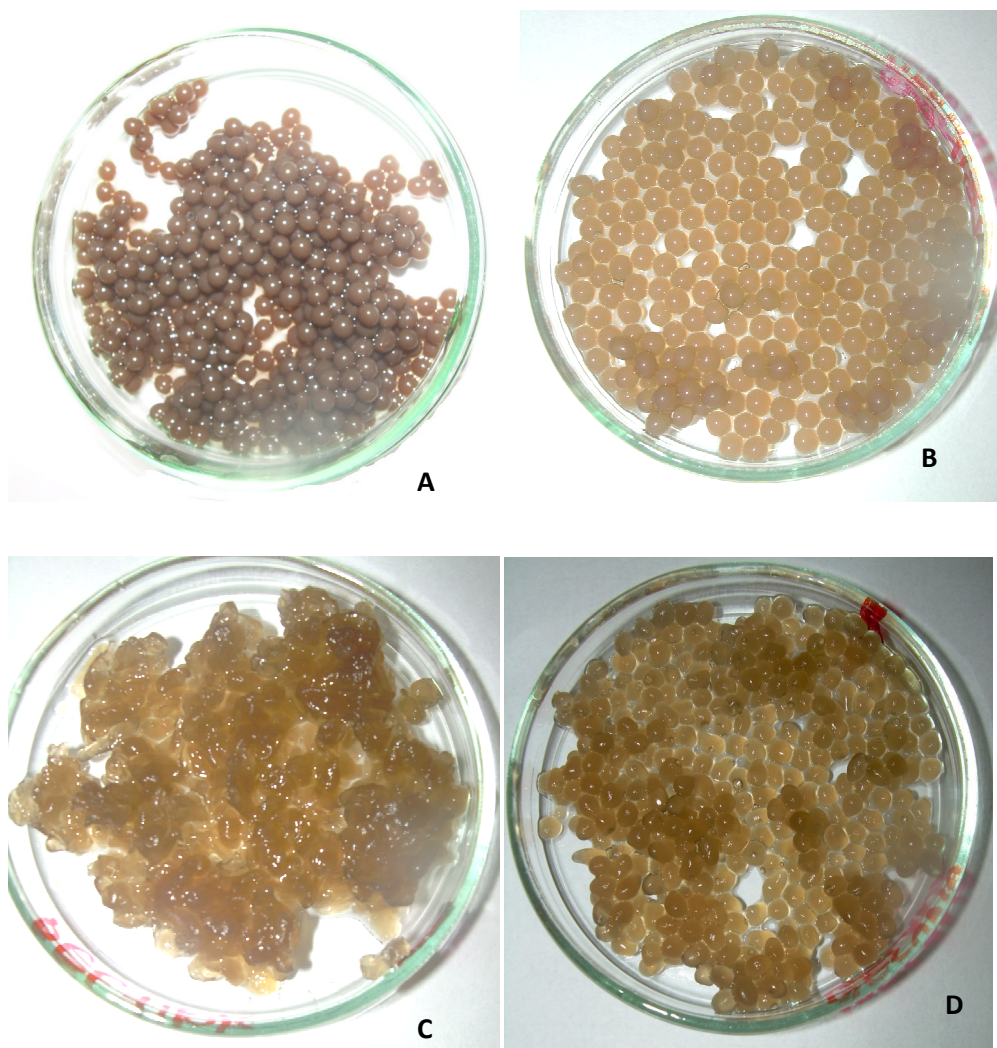


Figura 16. Imobilização de tanase por gelificação iônica em alginato de sódio (A), alginato de alga marrom (B), pectina (C) e goma gelana (D)

O método de imobilização por gelificação iônica forma uma membrana porosa em torno da enzima, semelhante às células vivas, as quais controlam o tamanho das moléculas que entram e saem da célula. Moléculas de alta massa molecular como proteínas podem ser mantidas no interior da cápsula e moléculas de menor massa molecular como, produtos e substratos podem passar livremente pelos poros da membrana (XIAOWEI et al., 2004). Desta forma é evidente que quando se emprega membranas porosas para encapsular enzimas a massa molecular do substrato enzimático e do produto formado é de extrema

importância, pois, estão diretamente relacionadas a limitação difusional e ao impedimento estérico do sítio ativo da enzima.

Contesini (2009) avaliou a imobilização da glicosiltransferase em gel de pectina BTM com e sem adição de gordura. Foi constatado que a enzima imobilizada em pectina BTM com adição de gordura manteve maior atividade de glicosiltransferase do que as preparações de enzima imobilizada sem gordura e liofilizadas. Quando essa preparação foi aplicada em processo de batelada foi observada conversão inicial em torno de 30% com queda gradativa nas posteriores bateladas. Em colunas de leito empacotado foi observado conversão de sacarose em isomaltulose máxima de 10,5% em 2 horas, sendo que após 60 horas foi igual a 3%.

Na imobilização de tanase utilizando carragena não houve formação de partículas esféricas quando a solução do polissacarídeo contendo a enzima foi gotejada na solução de cloreto de cálcio. A carragena é um polímero natural presente na estrutura de algas vermelhas. A solução de κ -carragena pode formar gel forte reversível sob refrigeração na presença específica de cátions.

Segundo Michel et al. (1997) em baixas concentrações de íons a formação de gel com a carragena ocorre melhor na seguinte ordem $K^+ > Ca^{2+}$. A formação de gel de carragena com íons monovalentes e divalentes ainda não são bem explicados. Em estudos realizados por Chen et al. (2002) observou-se uma forte sinergia no sistema de gel de carragena formado na presença de ambos os íons potássio e cálcio.

A imobilização em quitosana não foi possível por esta metodologia, pois a enzima não se misturou homogeneamente na solução de quitosana, como mostra a Figura 17.

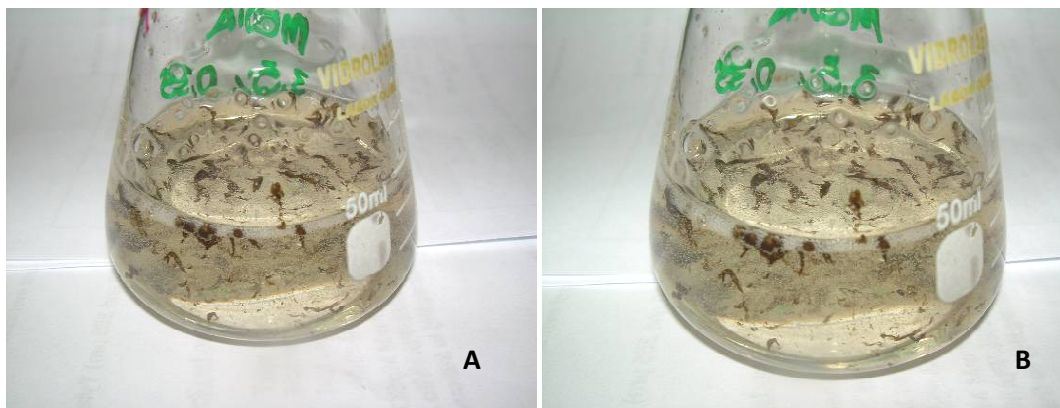


Figura 17. Solução de quitosana de baixa (A) e média massa molecular (B) com tanase.

Boadi e Neufeld, (2001) estudaram a imobilização de tanase comercial utilizando como suporte alginato, pectina, carragena, quitosana e alginato recoberto com quitosana de alta e baixa massa molecular. Os experimentos foram realizados utilizando estes suportes com e sem reticulação através de glutaraldeído. A tanase imobilizada foi aplicada em chás com o intuito de verificar a capacidade em reduzir a turbidez e decantação. Tanase encapsulada em carragena mostrou-se muito instável no chá e encapsulada na pectina não apresentou atividade catalítica. A tanase imobilizada em alginato recoberto com quitosana reticulado com glutaraldeído foi a mais eficiente. Os autores justificaram a baixa atividade catalítica da tanase imobilizada devido à limitação difusional do substrato pela cápsula.

O polissacarídeo selecionado para a imobilização de tanase de *Paecilomyces variotii* em função da %AE e %EI foi utilizado para os estudos de otimização das condições de imobilização como descrito a seguir.

5.4.1 Estudo das condições ótimas para imobilização de tanase de *Paecilomyces variotii* em alginato de sódio

A fim de se determinar as condições ideais para imobilizar a tanase de *Paecilomyces variotii* empregou-se a ferramenta de planejamento de experimentos. Primeiramente fez-se um planejamento fracionado a fim de determinar as variáveis importantes e estimar os níveis ideais para estas variáveis e posteriormente foi feito um planejamento completo. As respostas avaliadas foram porcentagem de atividade enzimática e porcentagem de eficiência de imobilização como descrito nos itens 4.6 e 4.8.

5.4.1.1 Planejamento fracionado

No planejamento fracionado avaliou-se o efeito das seguintes variáveis, x_1 - concentração de alginato de sódio (%), x_2 - concentração de cloreto de cálcio (M), x_3 - tempo de cura (horas) e x_4 - concentração de tanase (mg/mL de alginato), na Tabela 7 estão descritos os níveis empregados para as variáveis citadas acima.

Por meio da análise estatística dos resultados obteve-se os efeitos das variáveis em estudo quanto a %AE e %EI, os dados encontram-se nas Tabelas 8 e 9, respectivamente.

Tabela 7. Delineamento composto central rotacional fracionado (2^{4-1}) para o estudo da influência da concentração do alginato de sódio, concentração do CaCl_2 , tempo de cura e concentração de tanase na porcentagem de atividade enzimática e porcentagem de eficiência de imobilização

Ensaio	x_1	x_2	x_3	x_4	%AE*	%EI**
1	-1 (1)	-1 (0,1)	-1 (1)	-1 (1)	1,62	12,68
2	1 (5)	-1 (0,1)	-1 (1)	1 (10)	1,05	10,29
3	-1 (1)	1 (1)	-1 (1)	1 (10)	0,84	16,81
4	1 (5)	1 (1)	-1 (1)	-1 (1)	0,57	50,97
5	-1 (1)	-1 (0,1)	1 (7)	1 (10)	0,76	18,42
6	1 (5)	-1 (0,1)	1 (7)	-1 (1)	1,74	26,54
7	-1 (1)	1 (1)	1 (7)	-1 (1)	1,00	42,72
8	1 (5)	1 (1)	1 (7)	1 (10)	0,59	19,76
9	0 (3)	0 (0,55)	0 (4)	0 (5)	0,95	26,11
10	0 (3)	0 (0,55)	0 (4)	0 (5)	1,08	20,48
11	0 (3)	0 (0,55)	0 (4)	0 (5)	1,07	21,77

*%AE = porcentagem de atividade enzimática; ** %EI = porcentagem de eficiência de imobilização.

Tabela 8. Resultado dos efeitos da concentração do alginato de sódio, concentração do CaCl_2 , tempo de cura e concentração de tanase na porcentagem de atividade enzimática

Parâmetros	Efeitos	Erro puro	T (7)	p-valor
Média	1,02	0,08	12,82	0,00
Alginato de sódio	-0,07	0,19	-0,37	0,73
CaCl_2	-0,54	0,19	-2,89	0,03
Tempo de cura	0,00	0,19	0,02	0,99
Tanase	-0,42	0,19	-2,27	0,05

Para a resposta %AE, Tabela 8, verifica-se que as variáveis concentração de cloreto de cálcio e concentração de tanase tiveram efeito significativo e negativo para esta resposta quando estas variáveis foram do nível inferior (-1) para o superior (+1), desta forma pode-se dizer que o emprego da maior

concentração do CaCl_2 e tanase tiveram efeito negativo na %AE. Já as variáveis alginato e tempo de cura não exerceram efeito significativo nesta resposta.

Tabela 9. Resultado dos efeitos da concentração do alginato de sódio, concentração do CaCl_2 , tempo de cura e concentração de tanase na porcentagem de eficiência de imobilização

Parâmetros	Efeitos	Erro puro	T (7)	p-valor
Média	24,23	0,89	27,24	0,00
Alginato	4,23	2,09	2,03	0,18
CaCl_2	15,58	2,09	7,47	0,02
Tempo de cura	4,17	2,09	2,00	0,18
Tanase	-16,91	2,09	-8,10	0,01

Por meio da Tabela 9 pode-se observar que os fatores alginato de sódio e tempo de cura não tiveram efeito significativo na %EI da tanase. O cloreto de cálcio e tanase tiveram efeito significativo, sendo que o cloreto de cálcio exerceu efeito positivo e a tanase efeito negativo, quando estas variáveis foram do nível -1 para o nível +1.

Pode-se constatar que as variáveis estudadas exerceram efeito importante na %AE e na %EI da tanase, contudo estes efeitos não tiveram o mesmo comportamento em relação as variáveis cloreto de cálcio e tanase, desta forma optou-se por considerar a %AE como sendo a resposta de maior relevância uma vez que, somente imobilizar a enzima sem que ela retenha atividade catalítica não é interessante industrialmente.

Sendo assim, foram levados em consideração para estabelecer as variáveis e níveis que serão estudados pelo planejamento completo, os efeitos obtidos para a resposta AE, os quais indicam que níveis menores para estas variáveis podem resultar em maior atividade catalítica de tanase.

5.4.1.2 Planejamento completo

No planejamento completo estudou-se o efeito das variáveis x_1 - concentração de alginato de sódio (%), x_2 - concentração de cloreto de cálcio (molaridade) e x_3 - concentração de tanase (mg/mL de alginato). O tempo de cura foi retirado do planejamento e passou a fazer parte de um estudo de cinética no qual as cápsulas permaneceram durante 6, 12 e 24 horas em contato com o cloreto de cálcio. As respostas avaliadas foram %AE e %EI, Tabela 10 e 13.

Tabela 10. Delineamento composto central rotacional (2^3) para o estudo da influência da concentração do alginato de sódio, concentração do CaCl_2 e concentração de tanase na imobilização de tanase com tempo de cura de 6, 12 e 24 horas quanto à atividade enzimática

Ensaio	x_1	x_2	x_3	Porcentagem de Atividade enzimática		
				Após 6h	Após 12h	Após 24h
1	-1 (2,4)	-1 (0,28)	-1 (3,6)	12,45a	8,83a	8,00a
2	1 (3,6)	-1 (0,28)	-1 (3,6)	15,88a	11,55a	6,00b
3	-1 (2,4)	1 (0,82)	-1 (3,6)	8,28a	8,04a	8,25a
4	1 (3,6)	1 (0,82)	-1 (3,6)	3,80b	4,02b	8,82a
5	-1 (2,4)	-1 (0,28)	1 (7,4)	5,31c	8,08b	12,65a
6	1 (3,6)	-1 (0,28)	1 (7,4)	9,52c	15,97a	12,71b
7	-1 (2,4)	1 (0,82)	1 (7,4)	14,09a	9,89b	7,28b
8	1 (3,6)	1 (0,82)	1 (7,4)	10,30a	13,40a	12,86a
9	0 (3)	0 (0,55)	0 (5)	16,38a	8,09a	8,74a
10	0 (3)	0 (0,55)	0 (5)	10,22a	9,49a	7,82a
11	0 (3)	0 (0,55)	0 (5)	9,91a	7,99a	10,50a

Letras distintas nas mesmas linhas indicam que há diferença estatística pelo teste Tukey ($p < 0,05$).

Os resultados obtidos foram avaliados estatisticamente por meio de análise de variância e teste de Tukey com nível de confiança de 95% para a %AE após 6, 12 e 24h de cura. A Tabela 10 mostra que não houve padrão no aumento da %AE com o aumento no tempo de cura das cápsulas, sendo que nos ensaios 1, 3, 8, 9,

10 e 11 não há diferença estatística ($p < 0,05$) na %AE quando o tempo de cura foi de 6, 12 ou 24h. Nos ensaios 2 e 7 a %AE é diminuída significativamente com o aumento no tempo de cura das cápsulas, já nos ensaios 4, 5 e 6 se observa aumento na atividade em função do maior tempo de cura. Como na maioria dos ensaios o aumento no tempo de cura de 6 para 12 ou 24h não resultou em maior %AE foi fixado o tempo de cura de 6h.

A análise estatística para o Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) foi feita utilizando os dados obtidos para a %AE nas 6 horas de cura das cápsulas. Nas Tabelas 11 e 12 encontram-se os coeficientes de regressão e análise de variância (ANOVA), respectivamente, para a %AE após 6 horas de cura com a tanase imobilizada em alginato de sódio.

Tabela 11. Resultados dos coeficientes de regressão do estudo da imobilização de tanase em alginato de sódio para a porcentagem de atividade enzimática após 6h de cura

Parâmetros	Coeficiente de regressão	Erro puro	T (7)	P valor
Média	10,00	0,17	58,86	0,00
CaCl ₂ (M)	-0,71	0,20	-3,59	0,01
Interação alginato X CaCl ₂	-2,35	0,20	-11,78	0,00
Interação alginato X tanase	0,71	0,20	3,56	0,01
Interação CaCl ₂ X tanase	3,30	0,20	16,57	0,00

$R^2 = 98,65\%$

Os coeficientes de regressão obtidos na Tabela 11 podem ser usados para gerar uma equação de primeira ordem, onde Y representa a porcentagem de atividade enzimática. O modelo foi validado usando a análise de variância (Tabela 12), a qual demonstra erro puro mínimo indicando uma boa reprodutibilidade dos resultados, o coeficiente de correlação foi de 99% e o Teste-F foram satisfatórios para obter um modelo adequado que representa a real relação entre a resposta

%AE e as variáveis. O modelo matemático foi utilizado para gerar as superfícies de resposta e curvas de contorno para encontrar as melhores condições de imobilização da tanase (Figura 18). O modelo matemático foi obtido considerando somente as variáveis significativas para o processo como demonstra a Equação 5.

Tabela 12. Análise de variância no estudo da imobilização de tanase em alginato de sódio para a porcentagem de atividade enzimática após 6h de cura

Fonte de Variação	Soma quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F calculado
Regressão	139,23	3	46,41	170,66
Resíduos	1,90	7	0,27	
Falta de ajuste	0,91	5	0,18	0,37
Erro puro	0,99	2	0,50	
TOTAL	141,14	10		

$R^2 = 98,65\%$, $F_{\text{tab } 3;7; 0,05} = 4,35$

$$Y = 10 - 0,71 x_2 - 2,35 x_1x_2 + 0,71 x_1x_3 + 3,3 x_2x_3 \quad (\text{Equação 5})$$

Sendo que:

- x_2 - concentração de cloreto de cálcio (molaridade);
- $x_1 x_2$ – interação entre concentração de alginato de sódio (%) e concentração de cloreto de cálcio (molaridade);
- x_1x_3 - Interação alginato X tanase;
- $x_2 x_3$ – interação entre concentração de cloreto de cálcio (molaridade) e concentração de tanase (mg/mL de alginato).

As superfícies de resposta e curvas de contorno (Figura 18) indicam que a maior %AE ocorreu com o aumento na concentração de alginato de sódio, contudo, o aumento na concentração de alginato de sódio resulta no aumento da viscosidade da solução, acima de 5% o processo de extrusão por meio da bomba peristáltica é dificultado. Em concentrações menores que 2,5% as cápsulas

formadas possuem membranas muito porosas dificultando a formação de esferas e gerando cápsulas extremamente sensíveis e facilitando a difusão da proteína encapsulada para o meio externo (CHI et al., 2008).

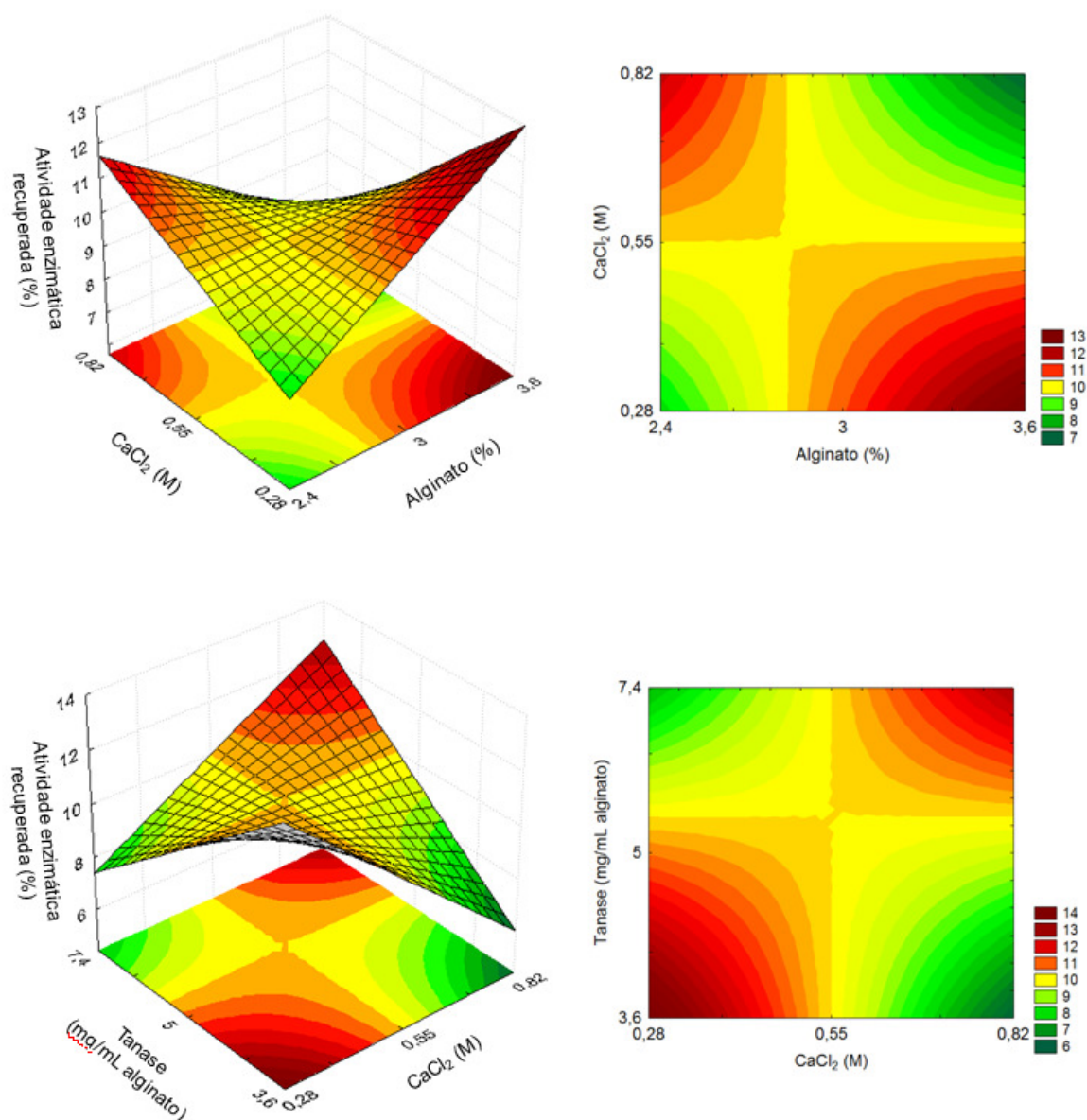


Figura 18. Superfícies de resposta e curvas de contorno para a porcentagem de atividade enzimática de tanase imobilizada em alginato de sódio após 6 horas de cura

Avaliando as superfícies de respostas para a %AE pela tanase imobilizada em alginato de sódio pode-se perceber que as melhores condições para imobilizar tanase e obter maior %AE foram alginato de sódio no nível superior 3,6%, cloreto de cálcio no nível inferior 0,1M. A concentração de tanase não teve efeito significativo na %AE após 6h de cura, por isto este parâmetro será fixado no nível inferior, ou seja, 3,6mg/mL de alginato.

A eficiência de imobilização enzimática também foi avaliada após 6, 12 e 24h, pelo mesmo planejamento completo, os resultados podem ser observados na Tabela 13.

Tabela 13. Delineamento composto central rotacional (2^3) codificado para o estudo da influência da concentração do alginato de sódio, concentração do CaCl_2 e concentração de tanase na porcentagem de eficiência de imobilização de tanase com tempo de cura de 6, 12 e 24 horas

Ensaio	x_1	x_2	x_3	Eficiência de imobilização (%)		
				Após 6h	Após 12h	Após 24h
1	-1 (2,4)	-1 (0,28)	-1 (3,6)	60,35a	50,53ab	46,78b
2	1 (3,6)	-1 (0,28)	-1 (3,6)	68,23a	59,23b	53,70c
3	-1 (2,4)	1 (0,82)	-1 (3,6)	74,99a	73,68a	67,77a
4	1 (3,6)	1 (0,82)	-1 (3,6)	74,14a	70,74b	59,38c
5	-1 (2,4)	-1 (0,28)	1 (7,4)	48,73a	42,50ab	34,72b
6	1 (3,6)	-1 (0,28)	1 (7,4)	60,99a	53,05b	44,10c
7	-1 (2,4)	1 (0,82)	1 (7,4)	59,42a	46,53b	47,30b
8	1 (3,6)	1 (0,82)	1 (7,4)	72,72a	60,20b	55,02b
9	0 (3)	0 (0,55)	0 (5)	58,29a	55,11a	47,91b
10	0 (3)	0 (0,55)	0 (5)	63,00a	54,81ab	50,52b
11	0 (3)	0 (0,55)	0 (5)	59,54a	51,78ab	42,76b

Letras distintas nas linhas indicam que há diferença estatística pelo teste Tukey ($p < 0,05$).

A Tabela 13 indica que o tempo de cura das cápsulas tem efeito significativo ($p < 0,05$) na %EI da tanase, sendo que os melhores índices foram

obtidos no menor tempo de cura. Nos ensaios 1, 3, 5, 9, 10 e 11 a %EI para tempo de cura de 6h e 12h não houve diferença estatística, ou seja, poderia ser usado o tempo de cura de 6 ou 12 horas. Já nos ensaios 2, 4, 6, 7 e 8 observou-se diminuição significativa ($p < 0,05$) nesta resposta com o aumento do tempo de cura de 6 para 12h. A %EI no tempo de cura de 24h foi menor estatisticamente ($p < 0,05$) em todos os experimentos exceto o ensaio 3, em relação a cura de 6h. Desta forma, para as respostas %AE e %EI o tempo de cura foi fixado em 6 horas.

Nas Tabelas 14 e 15 encontram-se os coeficientes de regressão e análise de variância (ANOVA) para a %EI após 6h de cura. Após a ANOVA, satisfeitos os parâmetros de R^2 e teste-F, o modelo matemático pode ser gerado, bem como as superfícies de resposta e curvas de contorno, Figura 19.

Tabela 14. Resultados dos coeficientes de regressão do estudo da imobilização de tanase em alginato de sódio para a resposta porcentagem de eficiência de imobilização após 6h de cura

Parâmetros	Coeficiente de regressão	Erro puro	T (7)	p-valor
Média	63,40	0,27	237,18	0,00
Alginato de sódio	4,07	0,63	13,00	0,01
CaCl ₂ (M)	5,37	0,63	17,15	0,00
Tanase (mg/mL alginato)	-4,48	0,63	-14,30	0,00
Interação alginato X tanase	2,31	0,63	7,39	0,02

$R^2 = 86,11\%$

A análise de variância (ANOVA) mostra uma variação explicada pelo modelo de 86% e F calculado 2 vezes maior que o F tabelado indicando que a partir destes dados pode-se gerar um modelo matemático que represente este estudo, além de superfícies de resposta e curvas de contorno (Figura 19).

Tabela 15. Análise de variância no estudo da imobilização de tanase em alginato de sódio para a resposta porcentagem de eficiência de imobilização após 6h de cura

Fonte de Variação	Soma quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F calculado
Regressão	567,39	4	141,85	9,30
Resíduos	91,51	6	15,25	
Falta de ajuste	89,9401	4	22,49	28,61
Erro puro	1,5719	2	0,79	
TOTAL	658,8995	10		

$R^2 = 86,11\%$, F tab 4;6; 0,05 = 4,53

O modelo matemático foi obtido considerando somente as variáveis significativas para o processo como demonstrada a Equação 6.

$$EI = 63,4 + 4,07x_1 + 5,37x_2 - 4,48x_3 + 2,310x_1 \cdot x_3 \quad (\text{Equação 6})$$

Sendo que:

x_1 - concentração de alginato de sódio (%);

x_2 - concentração de cloreto de cálcio (molaridade);

x_3 – concentração de tanase (mg/mL de alginato).

$x_1 x_3$ – interação entre concentração de alginato de sódio (%) e concentração de tanase (mg/mL de alginato).

Analisando as superfícies de resposta e curvas de contorno (Figura 19) e os coeficientes de regressão (Tabela 14) pode-se concluir que a maior porcentagem de EI da tanase foi obtida utilizando-se 3,6% de alginato, 1M de CaCl_2 e 3,6mg/mL de tanase/mL de alginato e tempo de cura de 6 horas.

Niladevi e Prema (2007) constataram a máxima eficiência de imobilização de lacase em alginato a 2,5%. O tempo de cura está relacionado com aumento na concentração de íons cálcio na membrana, resultando em uma membrana com maior resistência mecânica, o que pode reduzir a perda de proteínas (YU et al., 2004a), bem como aumentar a limitação difusional de produto e substrato.

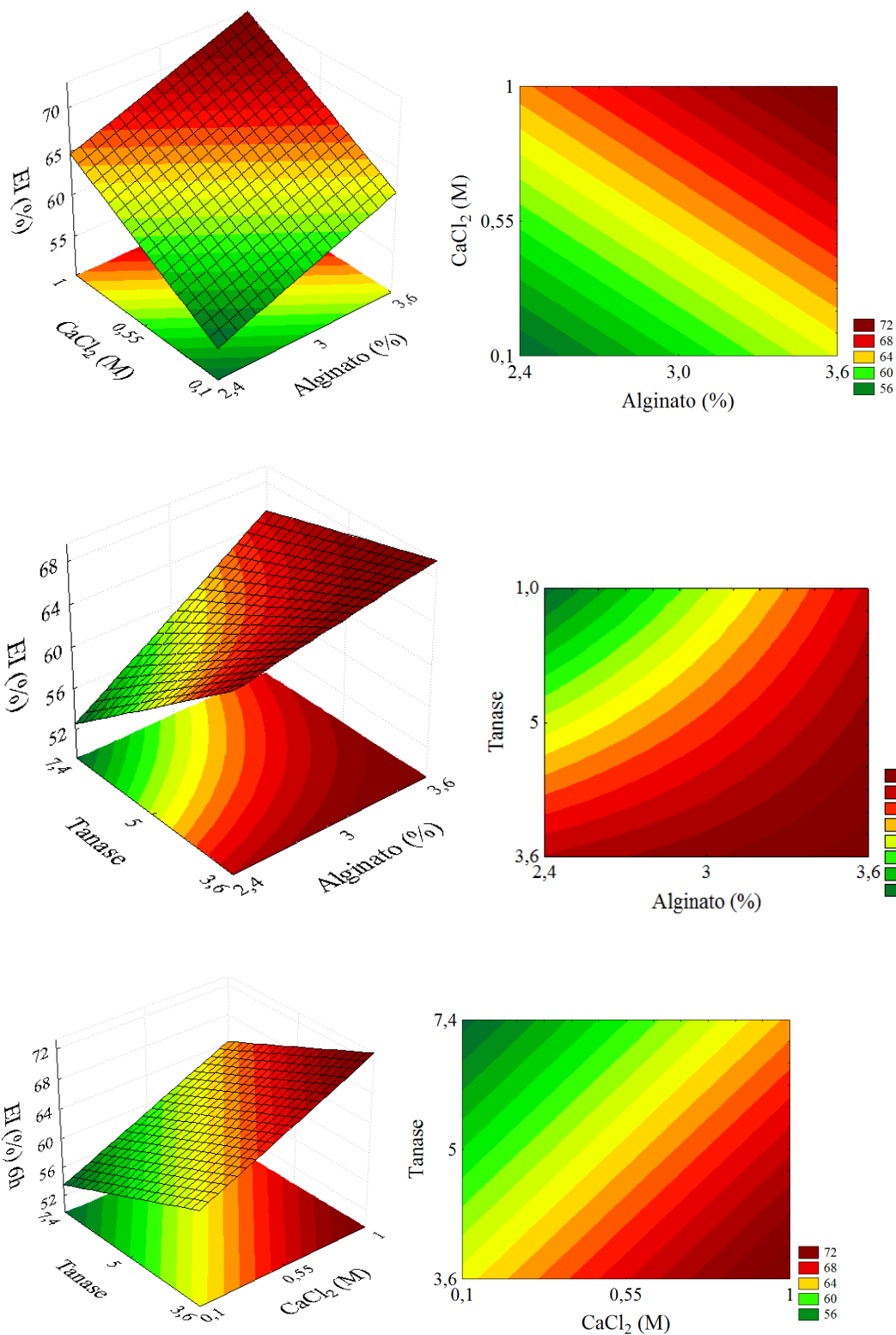


Figura 19. Superfícies de resposta e curvas de contorno para a resposta eficiência de imobilização com tanase imobilizada em alginato de sódio após 6 horas de cura

Estudo desenvolvido previamente por Chan et al., (2009) com o intuito de desenvolver um modelo matemático preditivo para obter cápsulas de alginato com tamanho pré determinado, indicou que a concentração de alginato deve estar abaixo de 5% (devido a elevada viscosidade da solução) e acima de 2,5% em processo utilizando 10mM de CaCl_2 e distância de gotejamento das soluções de alginato de sódio no CaCl_2 de 10cm.

A imobilização da enzima α -amilase foi efetuada por geleificação iônica em alginato de cálcio utilizando a ferramenta de planejamento de experimentos e as melhores condições para a imobilização foram 3% de alginato, 0,55M de CaCl_2 e tempo de cura de 4,5h (GANGADHARAN et al., 2009).

Tanase de *Aspergillus aculeatus* foi imobilizada por gelificação iônica em alginato empregando 3 concentrações distintas, 3, 5 e 7%. Os resultados demonstraram que a medida que a concentração de alginato aumentou de 3 para 7% a eficiência de imobilização diminuiu de 17 para 8% e atividade específica passou de 0,15 para 0,13U/ μg de proteína (EL-TANASH, SHERIEF, NOUR, 2011).

Mohapatra, Mondal e Pati (2007) produziram tanase de *Bacillus licheniformis* KBR6 empregando células imobilizadas em alginato, sendo que a concentração de alginato neste estudo variou de 0,5 a 3%. Os autores relataram que o maior rendimento de tanase ocorreu utilizando 2% de alginato, já a menor perda de células pelas cápsulas ocorreu para cápsulas com 3% de alginato. A condição selecionada pelos autores para imobilizar as células foi empregando 2% de alginato.

Este resultado pode ser explicado pelo fato de que a concentração de alginato está diretamente relacionada com o tamanho e distribuição dos poros na membrana da cápsula, influenciando consequentemente na difusividade da enzima, produto e substrato. A formação e as propriedades estruturais das cápsulas de alginato dependem de diversos fatores como: relação entre os ácidos manurônico e gulurônico, presença de impurezas e as condições do procedimento

(CHAN et al., 2009; GANGADHARAN et al., 2009; OUWERX et al., 1998; VELINGS e MESTDAGH 1995).

Yu et al. (2004a) estudaram a imobilização de tanase por coacervação complexa usando os polissacarídeos quitosana-alginato e constataram que a maior eficiência de imobilização de tanase ocorreu utilizando concentrações de 1,5% de quitosana, 1,4% de alginato e 30 minutos de tempo de cura em solução de cloreto de cálcio a 2%.

Yu et al. (2004b) imobilizaram tanase de *Aspergillus niger*, que foi purificada utilizando precipitação fracionada com sulfato de amônia, purificação em coluna de troca iônica DEAE-celulose e liofilização. Os autores investigaram a imobilização de tanase por coacervação complexa empregando quitosana-alginato na síntese de propilgalato em meio orgânico. Os autores verificaram aumento significativo no rendimento de propilgalato utilizando a enzima imobilizada (aproximadamente 40%) comparado com a enzima livre (cerca de 18%) e sugeriram que esse resultado era devido a inativação da enzima pelo solvente orgânico hexano.

Analisando as condições ótimas para imobilização de tanase e obtenção de maior %AE e %EI percebe-se que estes diferem quanto a concentração de CaCl_2 (1M para melhor %EI e 0,1M para maior %AE) e como justificado anteriormente foi dada maior relevância à atividade catalítica da enzima imobilizada. Desta forma estabeleceu-se como condição ótima 3,6% de alginato, 0,1M de CaCl_2 , 3,6mg de tanase/mL alginato e cura de 6h. A %AE de tanase imobilizada nas condições otimizadas foi de 20%.

A análise de variância e curvas de contorno possibilitaram a escolha das variáveis que exercem efeito significativo e a determinação das condições ótimas para obter a máxima %AE. A interação entre os componentes mais importantes (Ex.; concentração de alginato de sódio, de CaCl_2 e tempo de cura) foram estimados para a obtenção de um modelo matemático que represente os resultados obtidos. Desta forma pode-se afirmar que o emprego da ferramenta de

planejamento de experimentos possibilitou aumentar a atividade enzimática de 0,57 (Tabela 7) para 20% (Tabela 16), aumento de 35 vezes comparando com os resultados obtidos anteriormente à otimização.

5.4.2 Reuso da tanase imobilizada em alginato de sódio

Depois de estabelecida a melhor condição para a imobilização de tanase de *Paecilomyces variotii*, 3,6% de alginato de sódio, 0,1M de CaCl_2 , 3,6mg de tanase/mL de alginato de sódio e tempo de cura de 6h, estudou-se o reuso da enzima até a perda total da atividade catalítica (Figura 20). As condições reacionais empregadas foram as mesmas dos demais ensaios 60°C e tempo de reação de 60 minutos.

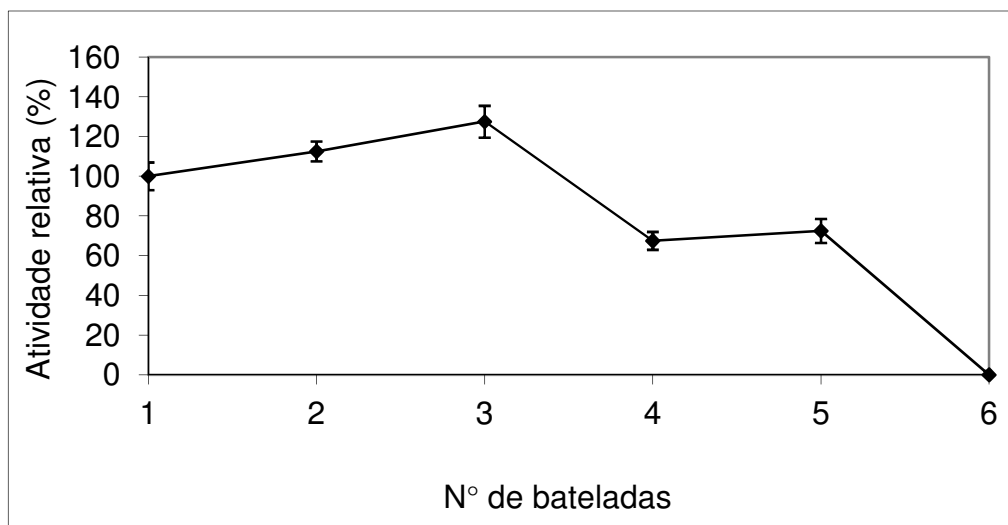


Figura 20. Reuso da tanase imobilizada em alginato de sódio em bateladas sucessivas

A Figura 20 mostra que a tanase imobilizada em alginato de sódio pode ser reutilizada, mantendo cerca de 100% da atividade enzimática até o terceiro uso, mostrando um leve aumento na atividade catalítica da enzima até o 3º uso. Resultado similar foi constatado no reuso de aminopetidases imobilizadas por gelificação iônica, os autores sugerem que o inchamento das cápsulas durante o uso pode resultar no aumento do tamanho dos poros facilitando a difusão do substrato, aumentando consequentemente a atividade catalítica da enzima (CHI et al., 2008). No quarto e quinto uso a atividade da enzima diminui para 60%, confirmando que a enzima pode ser usada por pelo menos 5 vezes consecutivas. Já no 6º uso a tanase imobilizada em alginato de sódio não mostrou atividade catalítica.

Resultados semelhantes já foram relatados, tanase de *Aspergillus aculeatus* imobilizada em gelatina reticulada com glutaraldeído reteve até 84% da sua atividade original após 5 ciclos (EL-TANASH, SHERIEF, NOUR, 2011), tanase de *Aspergillus niger* encapsulada em alginato reteve 77% de atividade catalítica após 7 ciclos (SRIVASTAVA e KAR, 2010), tanase imobilizada em quitosana ativada com glutaraldeído reteve após o 17º uso cerca de 85% de atividade catalítica (ABDEL-NABY et al., 1999), células de *Bacillus licheniformis* KBR6 encapsuladas em alginato para produzir tanase mantiveram 80% de atividade até o 6º ciclo (MOHAPATRA, MONDAL e PATI, 2007); tanase comercial encapsulada em alginato recoberto com quitosana reticulados com glutaraldeído reteve 100% de atividade após 3 ciclos de uso (BOADI e NEUFELD, 2001); tanase imobilizada em Eupergit C ativada com etilenodiamino permaneceu ativa após 400 ciclos (NICOLAS et al., 1998).

Rocha et al. (2006) verificaram que inulinase imobilizada em Amberlite ativada com polietilenoimina e glutaraldeído teve sua atividade catalítica diminuída na 2ª batelada para 60%, já após a 7ª batelada a atividade residual da enzima imobilizada foi diminuída para 25%.

Sabe-se que a força iônica do meio reacional pode influenciar a perda da atividade das enzimas, no presente estudo utilizou-se o tampão acetato 0,2M. Cloroperoxidase imobilizada em suportes ativados com grupos amina mostrou diferença considerável no reuso da enzima em função da força iônica do meio reacional. Quando foi utilizado no meio reacional tampão 0,01M a enzima manteve 70% de atividade após 20 ciclos, já quando utilizou-se tampão 0,1M a atividade enzimática foi mantida somente até o 15º ciclo de uso (HUDSON et al., 2007).

5.4.3 Estudo do efeito do pH, temperatura e inibidores na atividade e estabilidade da tanase livre e imobilizada em alginato de sódio

Feita a otimização dos parâmetros para imobilização de tanase em alginato de sódio, procedeu-se estudo comparativo das condições ótimas da atividade e estabilidade da tanase livre e imobilizada. Estudou-se o pH ótimo de atividade e de estabilidade, a temperatura ótima de atividade e de estabilidade, analisou-se a estabilidade da enzima frente a alguns inibidores. A determinação da atividade relativa da tanase foi determinada como descrito no item 4.6 utilizando como substrato o ácido tânico 0,2% em tampão acetato 0,2M pH 5,5.

5.4.3.1 Efeito do pH e temperatura na atividade e estabilidade da tanase livre e imobilizada

A Figura 21 mostra o pH e temperatura ótimos e de estabilidade da enzima livre e imobilizada em alginato de sódio em diferentes valores de pH e temperatura.

O pH e a temperatura são parâmetros que afetam a atividade catalítica da enzima. Como mostra a Figura 21a a máxima atividade da tanase livre e imobilizada foi praticamente a mesma, em torno de pH 5,5. Quanto ao pH de estabilidade na faixa estudada pode-se verificar que a tanase imobilizada mostrou-

se mais estável em pH entre 3,5 – 7,5, já a tanase livre mostrou-se mais estável em pH entre 5,5 – 7,5 (Figura 21b). Tanase imobilizada e livre mostraram 100% de estabilidade a pH 7,5 após 1 horas de incubação. Ambas mostraram uma ampla faixa de pH de estabilidade e foram moderadamente ativas em pH 8,0, apresentando retenção de 70 e 60% de atividade relativa, respectivamente e em pH ácido de 3,5 houve retenção de 80 e 60% de atividade respectivamente. Normalmente a imobilização de enzima em suportes carregados ionicamente (H^+ e OH^-) resulta em deslocamento do perfil de pH ótimo da enzima, devido a mudanças no microambiente reacional (CAO, 2005; PEREZ et al., 2007).

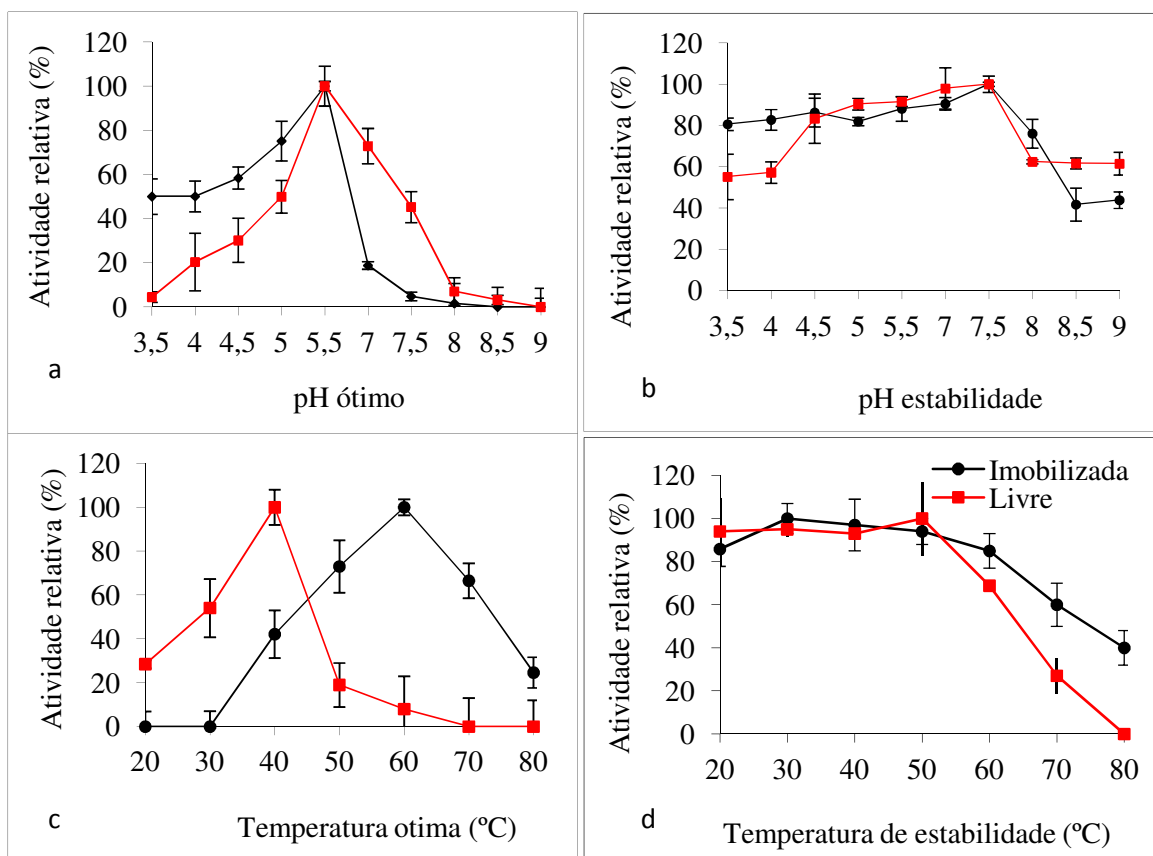


Figura 21. pH e temperatura ótimos de atividade e de estabilidade da tanase livre (quadrado vermelho) e imobilizada em alginato de sódio (círculo preto).

A tanase imobilizada e livre apresentou temperatura ótima de atividade a 60 °C e 40 °C respectivamente (Figura 21c) e mostraram-se estáveis a 50 °C durante 1h (Figura 21d). A tanase imobilizada e livre apresentou atividade residual de 85% e 69% após 1h de tratamento a 60 °C. O aumento na temperatura ótima de atividade pode ser devido ao aumento na estabilidade da enzima devido a membrana do alginato formada pelo processo de encapsulação (ABDEL-NABY et al., 1999; YU et al., 2004c). Estes resultados corroboram com pesquisas já relatadas, nas quais foi reportado que o pH ótimo da tanase de *Aspergillus aculeatus* passou de 5,5 para 5,0 após imobilização e o pH de estabilidade foi de 5,0 – 6,0 para enzima livre e de 4,5 – 8,0 para a tanase imobilizada. A temperatura ótima foi de 50 e 60 °C, para a tanase livre e imobilizada, respectivamente. Quanto à estabilidade térmica a enzima imobilizada mostrou-se mais estável, retendo 83% de atividade residual a 60 °C enquanto que a enzima livre reteve apenas 76% de atividade residual após 90 minutos de aquecimento (EL-TANASH, SHERIEF e NOUR, 2011).

Perez et al. (2007) verificaram que lipase imobilizada em celulignina de *Eucalyptus grandis* ativada com glutaraldeído manteve o mesmo perfil de estabilidade frente à temperatura que a enzima na sua forma livre.

Abdel-Naby et al. (1999) avaliaram a imobilização de tanase de *Aspergillus oryzae* em quitosana reticulada com glutaraldeído e observaram alterações nos valores de pH e temperatura ótimos de atividade de 5,5 para 4,5 e de 40 para 55 °C, para a tanase livre e imobilizada, respectivamente.

Nicolas et al. (1998) imobilizaram tanase em Eupergit C ativada com etilenodiamino e verificaram que a enzima imobilizada apresentou maior estabilidade térmica (20-60 °C) frente à tanase livre (20-40 °C).

Rocha et al. (2006) estudaram a imobilização de inulinase em Amberlite ativada com polietilenoimina e glutaraldeído a 4 °C para a hidrólise de inulina, os autores constataram que a imobilização resultou em pequena modificação no pH e

temperatura ótima de atividade sendo que estes valores passaram de pH 4,5 para pH 5,5 e de 55 °C para 50 °C.

Tanase de *Aspergillus niger* foi imobilizada por ligação covalente em Concavalina Sepharose-A, a enzima imobilizada apresentou pH ótimo similar ao da enzima livre (pH 6,0) (SHARMA, BHAT e GUPTA, 2002).

Sharma et al. (2008) reportaram que a tanase de *Penicillium variable* IARI 2031 imobilizada em Amberlite manteve praticamente as mesmas características bioquímicas da enzima livre, o pH e temperatura ótimos de atividade foram 5,0 e 50 °C, respectivamente. A enzima reteve 60% da atividade residual em pH 3,0 e 20% da atividade em pH 10, e apresentou atividade residual de 60 e 80% após 24h de tratamento a 25 e 50 °C, respectivamente.

Curiel et al. (2010) verificaram que a tanase de *Lactobacillus plantarum* imobilizada em glioxil-agarose reteve 80% da atividade após 24h a 50 °C e pH 7,0.

O pH e temperaturas ótimos de atividade de tanase de *Aspergillus niger* para a enzima livre e imobilizada foram 5 e 30 °C, e de 6 e 40 °C, respectivamente. O pH e temperaturas de estabilidade para a enzima livre e imobilizada foram de 3,0 - 5,5 e 30 - 45 °C, e 2,0 – 7,0 e 20 - 60 °C, respectivamente (YU et al., 2004c).

5.4.3.2 Efeito de inibidores na atividade da tanase livre e imobilizada

A Figura 22 mostra o efeito de diferentes inibidores como, iodoacetamida, azida sódica, EDTA e 4-cloromercuribenzoato na atividade da tanase imobilizada por gelificação iônica em alginato de sódio e tanase livre. Os resultados estão expressos em atividade relativa e foram determinados comparando a atividade da tanase sem e com a adição dos respectivos inibidores.

Observa-se ainda pela Figura 22 que a imobilização resultou em aumento significativo na estabilidade da enzima quando comparada com a tanase na sua

forma livre. Os efeitos dos inibidores utilizados foi bem distinto, na presença de iodoacetamida tanto a enzima imobilizada quanto a livre foram fortemente inibidas. Frente à azida sódica, EDTA e 4-cloromercuribenzoato verificou-se que a enzima livre manteve 60, 3 e 27% de atividade relativa, já para a tanase imobilizada a atividade residual foi de 93, 68 e 63%, respectivamente.

Inibidores enzimáticos são compostos que agem na enzima, geralmente em grupos funcionais presentes no seu sítio catalítico ou alteram sua conformação, diminuindo ou inibindo a atividade desta. Os inibidores podem ser utilizados para paralisar uma reação enzimática, porém sua presença pode inibir reações de interesse, portanto o conhecimento de sua ação é muito importante.

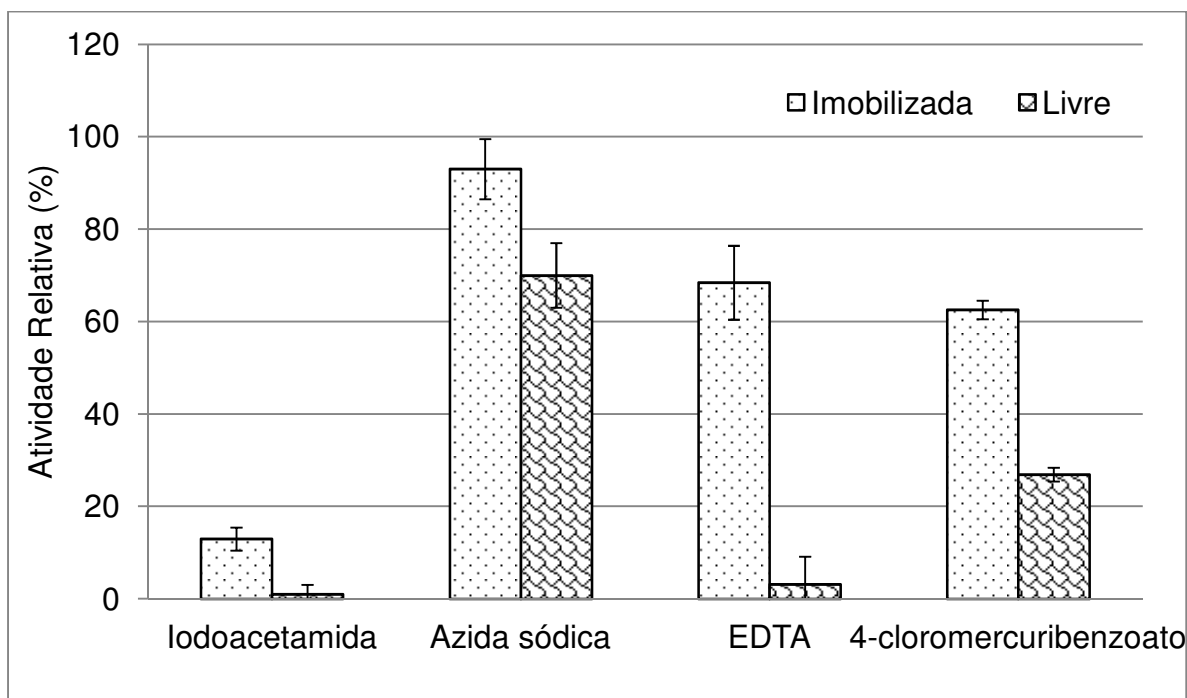


Figura 22. Efeito de inibidores na atividade enzimática da tanase livre e imobilizada em alginato de sódio frente à iodoacetamida, azidasódica, EDTA e 4-cloromercuribenzoato.

Observou-se que a azida sódica, EDTA e 4-cloromercuribenzoato exerceram maior efeito inibidor sobre a tanase livre quando comparada com a enzima encapsulada em alginato. Esse fato pode ser explicado devido a dificuldade dos compostos atingirem o sítio catalítico da enzima quando esta se encontra imobilizada. A tanase de *Aspergillus niger* foi inativada por EDTA (BARTHOMIEUF et al., 1994; KAR et al., 2003) e a tanase de *Aspergillus oryzae* foi completamente inativada pelo EDTA (IIBUCHI et al., 1968). A diminuição da atividade catalítica de tanase na presença de EDTA pode ser devido a influência do EDTA entre a interface substrato enzima (LOPES et al., 2002), além disso, o EDTA forma complexos com cátions divalentes (WHITAKER, 1972). De acordo com estudos realizados por Battestin et al. (2007b, c) cisteína, iodocetamida, EDTA e azidasódica na concentração de 1mM apresentam efeito inibidor na atividade hidrolítica da tanase de *Paecilomyces variotii*.

5.5 Efeito de reticulantes na imobilização de tanase

Estudou-se o efeito dos reticulantes, transglutaminase Activa[®] (Ajinomoto), transglutaminase de *Streptomyces* sp., genipina e glutaraldeído na imobilização de tanase de *Paecilomyces variotii* por gelificação iônica em alginato de sódio. Os dados obtidos foram comparados com ensaio controle (sem adição de reticulante), quanto a porcentagem de atividade enzimática e porcentagem de eficiência de imobilização, Tabela 16.

Tabela 16. Porcentagem de atividade enzimática e porcentagem de eficiência de imobilização de tanase imobilizada em alginato de sódio com e sem reticulante

	%AE	%EI
Alginato+TG <i>Streptomyces</i> sp. CBMAI 837	10,55 ± 1,13 ^b	60,89 ± 1,97 ^b
Alginato+TG Activa [®] Ajinomoto	9,91 ± 0,55 ^b	67,61 ± 11,73 ^b
Alginato+Genipina	11,84 ± 0,29 ^b	57,25 ± 3,08 ^{bc}
Alginato+Glutaraldeído	5,73 ± 0,76 ^c	92,48 ± 1,20 ^a
Alginato (Controle)	19,88 ± 0,19 ^a	55,01 ± 3,92 ^c

TG = transglutaminase; %AE = Porcentagem de atividade enzimática; %EI = Porcentagem de eficiência de imobilização

A Tabela 16 mostra que foi obtida maior %AE no ensaio controle, ou seja, sem adição de reticulante. Possivelmente os reticulantes utilizados formaram ligações intra e inter-moleculares, comprometendo regiões essenciais para manter a atividade catalítica da enzima ou ainda, as ligações cruzadas podem ter resultado em impedimento estérico do substrato ao sítio ativo.

Quanto à eficiência de imobilização foi observado exatamente o contrário, o emprego dos reticulantes resultou em aumento bem significativo neste parâmetro (Tabela 16). Esse fato já era esperado, pois esses agentes promovem a formação de ligações intra e inter moleculares, portanto houve uma maior retenção da enzima. A ligação covalente pode levar a diminuição da flexibilidade da enzima e conseqüente diminuição da sua atividade catalítica (GOTTSCALK e JAENICKE, 2011; CAO, 2005), além disto, o aumento da viscosidade do meio de imobilização pode restringir a interação entre suporte-enzima (ROCHA, GIL e GARCIA, 1998; SOARES e SANTANA, 2003).

Soares e Santana (2003) evidenciaram efeitos distintos quando utilizaram os reticulantes polietilenoglicol 10.000, polietilenoglicol 1.500 e albumina na imobilização de lipase em sílica, quanto a eficiência de imobilização e atividade catalítica. Foi constatado pelos autores que a reticulação com polietilenoglicol 10.000 diminui a eficiência de imobilização e atividade catalítica da lipase quando

comparada com a imobilização controle, sem adição de reticulantes. E concluíram ainda que a eficiência de imobilização e atividade catalítica de enzimas imobilizadas e reticuladas depende do tipo de agente reticulante utilizado e da sua concentração, bem como da concentração de enzima empregada.

Tanase de *Aspergillus aculeatus* foi imobilizada em gelatina e quitosana ativadas com glutaraldeído. A tanase imobilizada em gelatina ativada com glutaraldeído resultou em maior eficiência de imobilização (28%) e atividade específica (0,19U/ μ g proteína). A constante K_m da enzima imobilizada e livre foi de 11,8 e 6,5mg/mL, respectivamente, os autores justificaram que o aumento no K_m para a enzima imobilizada é devido a resistência difusional e/ou impedimento estérico (EL-TANASH, SHERIEF e NOUR, 2011).

Adriano et al. (2005) estudaram a imobilização de Penicilina G acilase em quitosana ativada com glutaraldeído em diferentes concentrações (1 a 9%) e constataram que a maior eficiência de imobilização e estabilidade da enzima ocorreram utilizando 1 e 5% de glutaraldeído, respectivamente. Segundo os autores a interação multipontual resultante da imobilização impediu que a enzima mantivesse sua estrutura conformacional.

Kawaguti et al. (2006) verificaram o efeito da adição de glutaraldeído e polietilenoimina (simultaneamente) na imobilização de células de *Erwinia* sp. D12 por gelificação iônica em alginato de sódio a 2% na produção de isomaltulose. Os autores verificaram que a reticulação das cápsulas de alginato utilizando somente o glutaraldeído a 0,06% resultou em células imobilizadas de elevada estabilidade, as quais mantiveram 50% de conversão de isomaltulose após 282h, enquanto as células imobilizadas sem adição de reticulantes perderam toda a sua função após 96h.

Rocha, Gil e Garcia (1998) constataram que a ordem de adição dos agentes reticulantes tem efeito significativo na eficiência de imobilização e na atividade enzimática. Quando a lipase de *Mucor miehei* foi imobilizada em 3 etapas (1ª – ativação com carbodiimida, 2ª - ativação com glutaraldeído e 3ª –

imobilização da lipase) foi obtido diminuição da atividade lipolítica da enzima. Quando o processo de imobilização foi alterado juntando a 2ª e 3ª etapa foi constatado aumento de 100% da atividade catalítica. Os autores justificaram que quando a ativação do suporte com glutaraldeído é feita antes da adição da enzima ocorre a formação de muitas ligações entre NH₂ do suporte com o aldeído do glutaraldeído, resultando em menor possibilidade para ligações entre enzima-suporte.

Abdel-Naby et al. (1999) imobilizaram tanase de *Aspergillus oryzae* empregando distintas técnicas de imobilização, adsorção em alumina e quitina coloidal; ligação iônica em Dowex 50W, DEAE-Sephadex; ligação covalente, quitina e quitosana ativados com glutaraldeído e encapsulação, poliacrilamida e alginato de cálcio. Os melhores resultados para eficiência de imobilização (27%) e atividade específica (15U/mg proteína) foram obtidos com tanase imobilizada por ligação covalente em quitosana ativada com glutaraldeído.

Na literatura há diversos relatos que demonstram maior estabilidade enzimática após o tratamento prévio da enzima com reticulantes, pois há intensa formação de ligações multipontuais entre enzima-suporte (PALOMO et al., 2007; LÓPEZ-GALLEG0 et al., 2005b; ALONSO et al., 2005; LÓPEZ-GALLEG0 et al., 2005c).

Synowiecki e Wolosowska (2006) realizaram estudo da imobilização de β -glicosidase em sílica gel ativada com ATPS e reticulada com transglutaminase (TG) comercial (Ajinomoto). No processo de imobilização primeiramente a sílica foi ativada com ATPS, posteriormente foram adicionados a β -glicosidase e a TG para efetuar a imobilização. Foi demonstrado que o emprego da TG como agente reticulante aumentou a atividade da β -glicosidase imobilizada em sílica gel ativada com ATPS de 853 (U/g suporte) para 3883 (U/g suporte). Os autores também verificaram que a maior atividade relativa de β -glicosidase ocorreu quando esta foi imobilizada em pH de 5,5, utilizando 40mg/mL de TG a 50 °C.

Slusarewicz et al. (2010) compararam a eficiência de diferentes agentes reticulantes em proteínas de tecido vivo, os reticulantes avaliados foram trealose (TR), genipina (GP), metil glioxal (MG), 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC), procianidina (PC) e glutaraldeído (GLU). Foi observado que a eficiência na ligação entre a proteína é dependente do pH e que a maioria dos reticulantes são mais eficiente em pH mais alcalino. Empregando pH ótimo e saturação do agente reticulante, foi observada a seguinte ordem de eficiência em unir proteínas PC = GLU > EDC > GP > MG >> TR.

5.6 Microscopia eletrônica de varredura das cápsulas de tanase imobilizada em alginato por gelificação iônica com ou sem reticulantes

As cápsulas de tanase imobilizada por gelificação iônica em alginato de sódio com ou sem reticulantes foram submetidas a análise de microscopia eletrônica de varredura (MEV), as fotografias se encontram na Figura 23.

A Figura 23 mostra a estrutura das cápsulas com aumento de 200X. Observou-se que as cápsulas obtidas usando como reticulante TG de *Streptomyces* sp. (1) apresentaram forma esférica, superfície lisa e orifícios na superfície. Para o reticulante TG Activa® (2) as cápsulas apresentaram forma esférica e superfície lisa, porém não apresentaram orifícios na superfície. Genipina (3) resultou em cápsulas com forma esférica, superfície lisa e com orifícios menores que os observados no reticulante 1. Glutaraldeído (4) originou cápsulas com forma esférica, superfície lisa e com orifícios na superfície. No controle (5) as esferas obtidas sem reticulante apresentaram forma arredondada, superfície lisa e orifícios grandes, maiores que os observados quando se usou reticulante TG de *Streptomyces* sp., genipina e glutaraldeído.

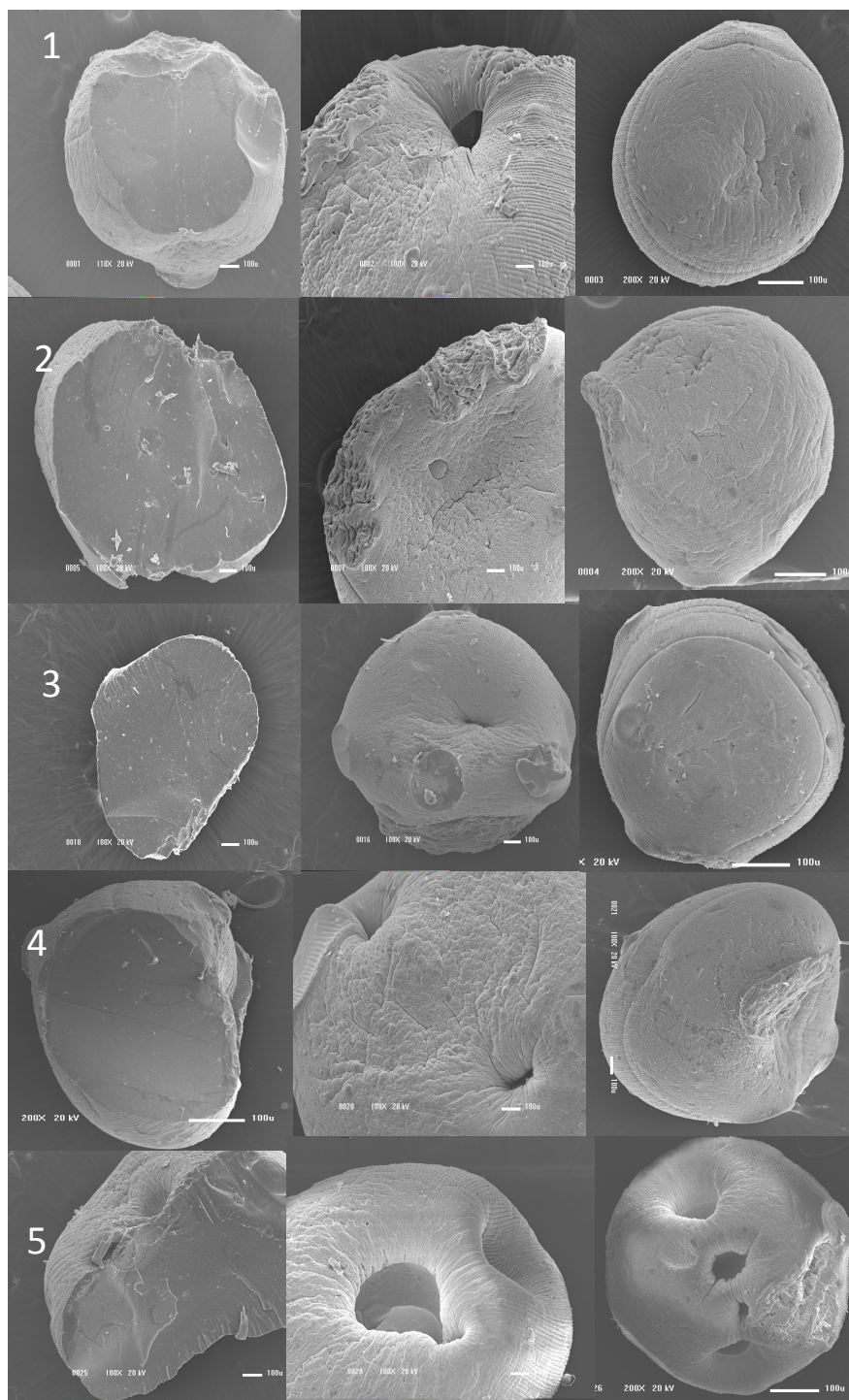


Figura 23. Microscopia eletrônica de varredura com aumento de 200X de tanase encapsulada em alginato de sódio reticulado: 1 - transglutaminase de *Streptomyces* sp. CBMAI 837; 2 – transglutaminase Activa® (Ajinomoto); 3 - genipina; 4 - glutaraldeído e 5 - controle (sem adição de reticulante).

As características observadas com a MEV (Figura 23) corroboram com os resultados demonstrados na Tabela 16 para a %EI. As cápsulas que possuem orifícios na superfície apresentaram menor %EI e menor a %AE, exceto para as cápsulas controle. Quando a %EI foi baixa, a %AE foi alta, acredita-se que isto seja devido a liberação da tanase da cápsula durante a reação, resultando em maior atividade enzimática. Contudo, se a enzima for liberada durante a reação, a cápsula terá menor atividade enzimática no reuso.

5.7 Quimioseletividade de tanase de *Paecilomyces variotii* livre e imobilizada por geleificação iônica em alginato de sódio nas reações de síntese de ésteres de ácido gálico

Na Tabela 17 encontram-se os álcoois utilizados para a reação de síntese, n° de carbonos dos álcoois, logaritmo do coeficiente de partição (log P) e % de esterificação nas reações de síntese de ésteres de galato com tanase de *P. variotii* livre. As condições empregadas nestes ensaios foram baseadas em estudo de dissertação que ainda não foram publicados. As reações foram realizadas sem uso de solvente orgânico, apenas o respectivo álcool e ácido gálico. O logaritmo do coeficiente de partição (log P) de um composto entre n-octanol e água, tem sido amplamente empregado para prever o rendimento de uma reação, em presença de determinado solvente (KRISHNA et al., 2001).

Como mostra a Tabela 17, a maior taxa de esterificação ocorreu empregando alcoóis com cadeia carbônica linear variando entre 3 - 5. A maior esterificação foi de 65% para o propilgalato, seguido de 56% para butilgalato e 49% para pentilgalato. Quanto aos demais alcoóis de cadeia linear não é percebida uma diferença muito grande, sendo que a maior taxa de esterificação, 32,5% ocorreu para o metilgalato e a menor 16,7%% para dodecanolgalato. A baixa taxa de esterificação observada com alcoóis mais polares como metanol e etanol pode ser devido a capacidade destes alcoóis em remover água da camada de hidratação da proteína, levando a sua desnaturação parcial.

Tabela 17. Quimioseletividade da tanase livre de *Paecilomyces variotii* nas reações de síntese de ésteres de ácido gálico e alcoóis com cadeias carbônicas de tamanho distinto

Alcoóis	N° de carbonos	Log P	Esterificação (%)
Metanol	1	-0,76	32,54 ± 1,12
Etanol	2	-0,24	28,57 ± 2,24
Propanol	3	0,28	65,08 ± 2,24
2-propanol	4	0,05	26,19 ± 3,37
Butanol	4	0,8	56,35 ± 1,12
Terc-butanol	4	0,8	23,81 ± 4,49
3-metil-1-butanol	4	1,22	24,60 ± 1,12
Pentanol	5	1,31	46,83 ± 1,12
Hexanol	6	1,8	24,60 ± 5,61
Octanol	8	2,9	26,98 ± 4,49
Dodecanol	12	5,0	16,67 ± 3,37

Quando empregou-se alcoóis de elevada massa molecular e, consequentemente mais hidrofóbicos, C6 – C12, pode-se observar diminuição da esterificação, o que está associado a menor solubilidade do ácido gálico no meio e também devido ao maior tamanho da cadeia do álcool dificultar/impedir a interação com o sítio ativo da enzima (YU et al., 2004b; YU et al., 2007). Em relação aos alcoóis ramificados percebeu-se uma maior afinidade pelo isopropanol, seguido pelo terc-butanol e iso-amílico, onde a taxa de esterificação foi de 26, 25 e 24%, respectivamente, mas não sendo evidenciada maior atividade por estes álcoois em relação aos alcoóis de cadeias lineares.

Outro aspecto a ser ressaltado é que os solventes podem agir na enzima inibindo sua atividade, alterando ligações de hidrogênio, interações hidrofóbicas, competindo pelo seu sítio ativo (MACARIE e BARATTI, 2000) e podem retirar a água essencial que se encontra na superfície externa das moléculas das enzimas que é crucial para manutenção da atividade catalítica (WU et al., 2002). Yu et al. (2005) constataram que quanto maior a hidrofobicidade do solvente menor a produção de propilgalato por tanase de *Aspergillus niger*.

Na Figura 24 encontra-se a identificação dos ésteres formados por cromatografia em camada delgada.

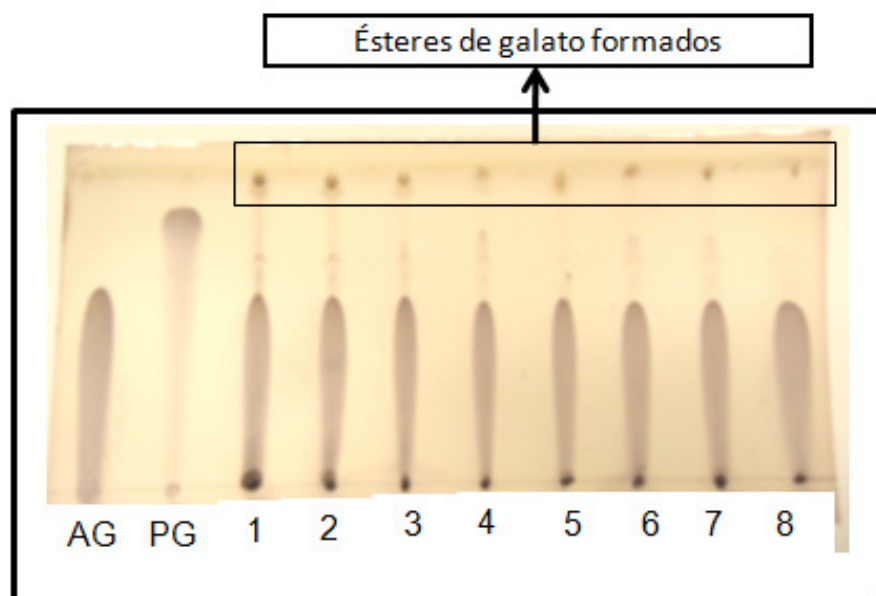


Figura 24. Identificação de ésteres de galato sintetizados por tanase de *Paecilomyces variotii* livre por cromatografia em camada delgada. AG: ácido gálico, PG: propilgalato, 1: metanol, 2: etanol, 3: propanol, 4: 2-propanol, 5:butanol, 6: 3-metil-1-butanol, 7: t-butanol, 8: pentanol.

A identificação dos ésteres sintetizados a partir de ácido gálico e distintos alcoóis pela tanase de *Paecilomyces variotii* foi feita utilizando cromatografia em camada delgada (CCD) (Figura 24), como pode-se constatar pela Tabela 17, houve formação de éster de galato em todos os alcoóis empregados, metanol, etanol, propanol, 2-propano, butanol, 3-metil-1-butanol, terc-butanol, pentanol, hexanol, octanol e dodecanol. Os respectivos ésteres formados são metilgalato, etilgalato, propil galato, 2-propil galato, butanogalato, 3-metil-1-butanogalato, terc-butanogalato, pentagalato, hexagalato, octagalato e dodecagalato.

Na CCD a identificação dos compostos pode ser feita pelo fator de retenção (R_f), que é determinado pela razão entre a distância percorrida pelo composto a ser identificado e a distância percorrida pelo composto padrão. Nos experimentos desenvolvidos utilizou-se como padrão o propilgalato, pois não foi possível adquirir o padrão de cada um dos ésteres formados, em função disto o R_f para o propilgalato não será exatamente o mesmo para os demais alcoóis utilizados. Todavia em função de usarmos reagentes padrões puros para as reações, pode-se dizer que se houve diminuição do ácido gálico do meio reacional, foi devido a formação do respectivo éster. Portanto, pode-se afirmar que a enzima tanase de *Paecilomyces variotii* pode ser utilizada para sintetizar propilgalato, obtendo-se rendimento de 65% (Tabela 17).

Yu et al. (2004b) estudaram a síntese de ésteres em meio orgânico empregando tanase imobilizada em quitosana-alginato, os experimentos foram realizados nas seguintes condições reacionais, 1mL de ácido gálico 0,1M, 2mL do solvente e 1mg da enzima imobilizada, a 40°C, 200rpm, pH 5,5, durante 12 horas. O primeiro experimento verificou o rendimento de propilgalato variando a relação água:solvente (hexano) no meio reacional, os resultados obtidos demonstraram maior produção deste éster empregando 100% de solvente na reação. Empregando distintos solventes e alcoóis, os autores obtiveram maiores rendimentos (44,3% e 35,7%) na síntese do éster propilgalato utilizando propanol e os solventes benzeno e hexano, respectivamente. Os autores também constataram a importância do emprego de peneiras moleculares ou de sais na remoção de água do sistema reacional.

Yu et al. (2007) avaliaram a síntese de éster de ácido gálico empregando esporos de *Aspergillus niger* produtor de tanase. Os autores constataram que a maior produção de propilgalato, 65% ocorreu empregando 0,35g de micélio, 7,3% de propanol, 5,5mM de ácido gálico em 10mL de benzeno, agitação de 200rpm, a 40°C, durante 24h, com adição de sulfato de sódio e polietilenoimina 10.000.

Sharma, Gupta (2003) utilizaram rota alternativa baseada na transesterificação do ácido tânico a propilgalato. A adição de água e sorbitol ao meio até 1% e 5 mmol/g de tanase, respectivamente, promoveram aumento no rendimento da reação. Em condições otimizadas foi obtido 86% de conversão do ácido tânico em propil galato. Empregando condições reacionais similares Beena et al. (2011) avaliaram a capacidade de tanase de *Aspergillus awamori* BTMFW032 em sintetizar propilgalato por transesterificação de ácido tânico, contudo os autores obtiveram produção baixa de propilgalato, 3,2%.

Khare et al. (2000) imobilizaram lipase de *Rhizopus japonicus* em celite. A enzima imobilizada apresentou aumento na sua atividade de transesterificação em 6,34 unidades em relação à enzima nativa, no entanto não houve melhora quanto a estabilidade térmica.

Yadav e Trivedi (2003) estudaram a transesterificação do n-octanol com acetato de vinila empregando lipases de *Pseudomonas sp*, *Canida rugosa*, Novozym 435 e Lipozyme IM-20, imobilizada em diatomita, macro-poros de resina poliacrílica e resina de troca aniônica, respectivamente. Destas lipases a mais eficiente foi a Novozym 435.

Weetall (1985) avaliou a síntese de diferentes ésteres de ácido gálico por tanases livres e imobilizadas. No sistema de enzima livre, cujo solvente é o próprio álcool utilizado na reação, foi observada a síntese de metil e etilgalato com conversões de 40,1 e 17,9%, respectivamente. Em contrapartida, com a enzima imobilizada foi verificada a síntese de propil (41,4%) e amilgalato (78,0%). Os autores também relataram que a presença de água foi desfavorável para a reação.

O presente estudo serviu de base para os experimentos que se seguem, nos quais avaliou-se a capacidade da tanase imobilizada em sintetizar propilgalato. Empregou-se as mesmas condições reacionais, 2mL de ácido gálico 0,184M em propanol, a reação foi conduzida em banho-maria a 45°C, sob agitação de 200rpm a quantidade de tanase imobilizada em alginato de sódio por gelificação iônica nas condições otimizadas anteriormente (3,6% de alginato, 0,1M

de CaCl_2 e 3,6mg de tanase/mL de alginato) foi de 840mg. Esta quantidade foi determinada levando em consideração a quantidade de proteína contida nas cápsulas de modo a equiparar a quantidade de proteína utilizada nas reações com a enzima livre. Na Figura 25 encontram-se os dados da síntese de propilgalato pela tanase livre e imobilizada após 1, 2, 12, 24, 48, 72 e 96h de reação.

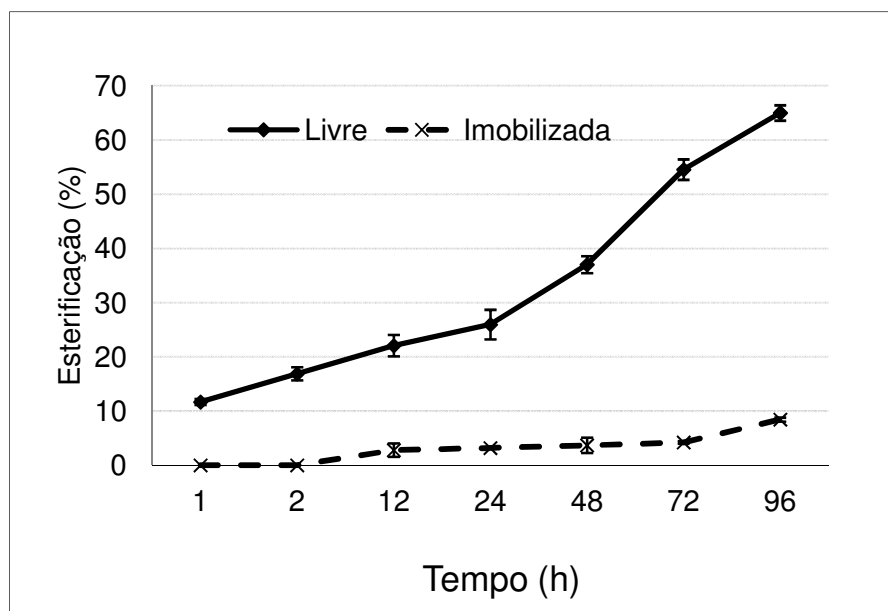


Figura 25. Cinética da reação de síntese de propilgalato por tanase livre e imobilizada em alginato de sódio.

A Figura 25 mostra que a tanase imobilizada em alginato foi capaz de sintetizar propilgalato, atingindo após 96h de reação 8% de propilgalato. Contudo, quando empregamos tanase livre a produção de propilgalato foi de 65%. Na reação de síntese com a enzima livre observou-se que a síntese de propilgalato aumentou significativamente após 24h, já a enzima imobilizada manteve linearidade na reação de síntese entre 12 e 72h variando entre 2,8 e 4,2% de esterificação, entre 72 e 96h pode-se observar que a síntese de propilgalato, ainda que pequena, dobrou.

Resultado semelhante foi observado pelos estudos reportados anteriormente, Yu et al. (2007) quando utilizaram esporos microbianos contendo tanase obtiveram esterificação de 65%, já quando empregaram tanase imobilizada em quitosana-alginato a esterificação foi diminuída para 44%. Possivelmente esta diminuição na atividade catalítica da enzima após imobilização esteja relacionada a limitações difusionais as quais podem ter sido aumentadas em função da remoção de água das cápsulas, diminuindo significativamente a velocidade de reação e também pode ter ocorrido impedimento estérico por meio da remoção de água do sistema.

Yu et al. (2007) constataram que a concentração de água contida nos esporos *Aspergillus niger* produtores de tanase exercem efeito muito significativo na atividade da enzima para reações de esterificação. Os autores empregaram esporos de *Aspergillus niger* em diferentes porcentagens de umidade, desidratados por meio de estufa à vácuo e por liofilização. Constataram que em concentração de água de 0% os esporos não apresentaram atividade de tanase para ambos os métodos de secagem. Os esporos secos em estufa à vácuo apresentaram maior atividade catalítica quando comparados aos secos em liofilizador. Provavelmente devido a maior alteração conformacional no processo de liofilização. A maior % de esterificação ocorreu com esporos secos em estufa à vácuo que possuem 70% de umidade, o que indica que os esporos de tanase necessitam de certa quantidade de água para manterem sua atividade catalítica em solvente orgânico. A remoção de água causa uma desidratação excessiva e/ou a perda da barreira de água protetora frente a solventes orgânicos.

Fernandez-Lorente et al. (2011) imobilizaram tanase de *Lactobacillus plantarum* expressa em *Escherichia coli* em agarose-CNBr (ligação monopontual) e em agarose-glioxil (ligação multipontual). Foi constatado que a enzima imobilizada em agarose-glioxil foi 10 vezes mais estável que aquela imobilizada em agarose-CNBr, portanto, os experimentos de produção de propilgalato foram efetuados com a tanase imobilizada em agarose-glioxil, a reação foi realizada empregando 100mg da enzima imobilizada, 5mL de ácido tânico a 2mM ou 10mM

de metilgalato, pH 5, 25 °C, agitação contínua e 30% de propanol. A produção de propilgalato foi de 45% quando utilizaram o substrato metilgalato, já a transesterificação com ácido tânico produziu 45% de propilgalato e 55% de ácido gálico.

Yu e Li (2005) imobilizaram tanase de *Aspergillus niger* em alginato-quitosana por coacervação complexa e estudaram sua aplicação na síntese de propilgalato. A reação de síntese foi realizada empregando 20 cápsulas de tanase imobilizada, 10mM de ácido gálico, 9% de propanol e 10mL dos seguintes solventes: N-N-dimetilformamida, acetona, propanol, piridina, benzeno, hexano, octano e dodecano, em pH de 5,5, 40 °C, 200rpm durante 72h. Dentre os solventes avaliados a maior produção de propilgalato foi com o solvente benzeno (26,8%). Os demais solventes utilizados resultaram em baixíssima esterificação 0,2 a 4,9%. A maior produção de propilgalato (36,2%) ocorreu empregando as seguintes condições 25 cápsulas de tanase imobilizada, 10mL de benzeno, 9,1% de propanol, 8mM de ácido gálico em pH de 5,5, 40 °C, 200rpm durante 72h.

Melo, Pastore e Macedo (2005) realizaram experimento comparando lipase de *Rhizopus sp* imobilizada em celite 545 e lipase livre quanto a síntese de butirato de citronela, no qual avaliou a capacidade catalítica da enzima e sua reutilização, obtendo como resultado conversão molar de 100% em 24 horas, o que representou em aumento de 43,2% na atividade enzimática em relação à enzima livre nas mesmas condições de estudo.

6 CONCLUSÕES

A tanase de *Paecilomyces variotii* pode ser imobilizada por adsorção e ligação covalente empregando ativadores. Dentre os suportes e métodos avaliados a imobilização de tanase em sílica ativada com 3-aminoetiltriethoxissilano e glutaraldeído resultou em elevada atividade enzimática recuperada (140%).

No estudo da imobilização de tanase por gelificação iônica os melhores resultados foram obtidos empregando como suporte o alginato. As condições otimizadas para a imobilização de tanase foram 3,6% de alginato, 0,1M de CaCl_2 , 3,6mg de tanase/mL de alginato e o tempo de cura das cápsulas de 6 horas. A imobilização da tanase nas condições otimizadas através de planejamento de experimentos resultou em aumento na atividade enzimática recuperada de 35 vezes. As cápsulas imobilizadas em alginato nas condições ótimas foram avaliadas frente ao reuso em bateladas e mostraram atividade relativa de 60% até o 5º uso em bateladas sucessivas. A caracterização da enzima livre e imobilizada mostra que estas são similares quanto ao pH e temperatura ótimos e de estabilidade. Frente aos inibidores a tanase imobilizada mostrou-se mais estável quando comparada a enzima livre.

A gelificação iônica em alginato de sódio nas condições ótimas estabelecidas pelo planejamento de experimentos, com uso de reticulantes, se mostrou efetiva principalmente quanto a eficiência de imobilização, já a atividade enzimática foi menor quando comparado com as cápsulas feitas sem adição de reticulante. A microscopia eletrônica de varredura mostrou que as cápsulas feitas com os reticulantes possuíam orifícios menores e maior esfericidade quando comparadas com as cápsulas controle.

Nas reações de síntese de ésteres de galato, a tanase na sua forma livre mostrou-se promissora, obtendo taxa de esterificação de até 65% para o

propilgalato. Nas mesmas condições reacionais obteve-se taxa de esterificação de 8% para o propilgalato empregando a tanase imobilizada em alginato nas condições otimizadas.

7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

1. Continuar os estudos de imobilização da tanase por ligação covalente em sílica ativada com 3-aminopropiltrietoxisilano e glutaraldeído devido aos resultados promissores demonstrados.
2. Estudar suportes e técnicas de imobilização para reações de síntese de ésteres.
3. Avaliar os ésteres produzidos quanto a sua capacidade antioxidante em produtos alimentícios.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDEL-NABY, M.A.; SHERIF, A.A.; EL-TANASH, A.B.; MANKARIOS, A.T. Immobilization of *Aspergillus oryzae* tannase and properties of the immobilized enzyme. **Journal of Applied Microbiology**, v.87, p.108–114, 1999.

ADRIANO, W.S.; FILHO, E.H.C.; SILVA, J.A.; GIORDANO, R.L.C.; Gonçalves, L.R.B. Stabilization of penicillin G acylase by immobilization on glutaraldehyde-activated chitosan. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v.22, p.529-538, 2005.

AGUILAR, C.; AUGUS, C.; GONZÁLEZ, G.V.; FAVELA, E. A comparison of methods to determine tannin acyl hydrolase activity. **Brazilian Archives of Biology and Techonology**, v.42, p.355-361, 1999.

AGUILAR, C.N., GUTIÉRREZ-SANCHEZ, G. Review: Sources, properties, applications and potential uses of tannin acyl hydrolase. **Food Science Technology International**, v.7, p.373-382, 2001.

ALLEN, L.; NELSON, A.I.; STEINBERG, M.P.; MCGILL, J.N. Edible corn-carbohydrate food coatings: Development and physical testing of a starch-alginate coating. **Food Technology**, v.17, p. 1437, 1963.

ALONSO, N.; LÓPEZ-GALLEGU, F.; BETANCOR, L.; HIDALGO, A.; MATEO, C.; GUISAN, J.M.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Immobilization and stabilization of glutaryl acylase on aminated sepabeads supports by the glutaraldehyde crosslinking method. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.35, p.57–61, 2005.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS - AOAC 10.ed. Washington, 2006. 1115p.

BAGAGLI, M. P. Produção de transglutaminase de *Streptomyces* sp. P20, caracterização e aplicação da enzima bruta. **Dissertação de mestrado** – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Campinas, SP, 113p, 2009.

BAI, Y.; LI, Y.; YANG, Y.; YI, L. Covalent immobilization of triacylglycerol lipase onto functionalized mesoporous silica support. **Journal of Biotechnology**, v.125, p.574-582, 2006.

BAJPAI, B.; PATIL, S. A new approach to microbial production of gallic acid. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.39, p.708-711, 2008.

BALCÃO, V. M.; MATEO, C.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; MALCATA, F. X.; GUISAN, J.M. Structural and functional stabilization of L-asparaginase via multisubunit immobilization onto highly activated supports. **Biotechnology Progress**, v.17, p.537-542, 2001.

BARTHOMEUF, C.; REGERAT, F.; POURATT, H. Production, purification and characterization of tannase from *Aspergillus niger* LCF 8. **Journal of Fermentation and Technology**, v.77, p.320-323, 1994.

BATTESTIN, V.; MACEDO, G.A. Tannase production by *Paecilomyces variotii*. **Bioresource Technology**, v.98, p.1832-1837, 2007a.

BATTESTIN, V.; PINTO G.A.S.; MACEDO, G.A. Biochemical characterization of tannases from *Paecilomyces variotii* and *Aspergillus niger*. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v.16, p.243-248, 2007b.

BATTESTIN, V.; MACEDO, G. A. Partial purification and biochemical characterization of tannase from a newly isolated strain of *Paecilomyces variotii*. **Food Biotechnology**, v.21, p.207-216, 2007c.

BATTESTIN, V.; MACEDO, G.A.; FREITAS, V.A.P. Hydrolysis of epigallocatechin gallate using a tannase from *Paecilomyces variotii*. **Food Chemistry**, v.108, p.228-233, 2007d.

BEENA, P.S.; BASHEER, S.M.; BHAT, S.G.; BAHKALI, A.H.; CHANDRASEKARAN, M. Propyl Gallate Synthesis using acidophilic tannase and simultaneous production of tannase and gallic acid by marine *Aspergillus awamori* BTMFW032. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.164, p.612–628, 2011.

BEVILAQUA, J. V. Estudo da catálise em meio orgânico para a produção de protótipo de fármaco antiasmático. Rio de Janeiro: Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2005. 35 p. Tese (Doutorado) – Programa de pós Graduação de Engenharia, faculdade de Engenharia Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2005.

BICKERSTAFF, G. F.; **Immobilization of Enzymes and Cells**; Methods in Biotechnology 1; Human Press, New Jersey; 367 pp.; 1997.

BOADI, D.K., NEUFELD, R.J. Encapsulation of tannase for the hydrolysis of tea tannins. **Enzyme and Microbial Technology**, v.28, p.590-595, 2001.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantifications of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, p.248-254, 1976.

CAO, L. **Carrier-bound Immobilized Enzymes: Principles, application and design**. WILEY-VCH Verlag GmbH e Co. KGaA, Weinheim, 2005.

CHAN, L.W.; LEE, H.Y.; HENG, P.W.S. Production of alginate microspheres by internal gelation using an emulsification method. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 242, p.259-262, 2002.

CHAN, E-S.; LEE, B-B.; RAVINDRA, P.; PONCELET, D. Prediction models for shape and size of ca-alginate macrobeads produced trough extrusion-dripping method. **Journal of Colloids and Interface Science**, v.338, p.63-72, 2009.

CHANG, W.H.; CHANG, Y.; LAI, P.H.; SUNG, H.W. A genipina-crosslinked gelatin membrane as wound-dressing material: in vitro and in vivo studies. **Journal of Biomaterials, Science and Polymers**, v.14, p.481–495, 2003.

CHANG, S-F, CHANG, S-W, YEN, Y-H, SHIEH, C-J. Optimum immobilization of *Candida rugosa* lipase on celite by RSM. **Applied Clay Science**, v.37, p.67-73, 2007.

CHAPLIN, M. F.; BUCKE, C. **Enzyme technology**. Cambridge University Press: Cambridge, 1990.

CHEN, Y.; LIAO, M.L.; DUNSTAN, D.E. The rheology of K^+ - κ -carrageenan as a weak gel. **Carbohydrate Polymers**, v.50, p. 109-116, 2002.

CHI, M-C.; LYU, R-C.; LIN, L-L.; HUANG H-B. Characterization of *Bacillus kaustophilus* leucine aminopeptidase immobilized in Ca-alinate/ κ -carragenen beads. **Biochemistry Engineering**, v.39, p.376-382, 2008.

CHIBATA, I. **Immobilized enzymes**. 1 ed. Tokyo, Kodansha Scientific Books, 284p. 1978.

CONTESINI, F.J. Purificação e imobilização de glicosiltransferase que converte sacarose em isomaltulose. **Dissertação de Mestrado**, Faculdade de engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas - SP, 112p, 2009.

CRUZ-ALDACO, K.; RIVAS-MARTÍNEZ, E.; RODRÍGUEZ-HERRERA, R.; AGUILAR, C. N. Immobilization of *Aspergillus niger* GH1 Tannase for the production of the antioxidant gallic acid. **International Journal of Engineering and Technology**, v.1, p.288-290, 2009.

CURIEL, J.A.; BETANCOR, L.; RIVAS, B.; MUNOZ, O.; GUISAN, J.M.; FERNANDEZ-LORENTE G. hydrolysis of tannic acid catalyzed by immobilized-stabilized derivatives of tannase from *Lactobacillus plantarum*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.58, p.6403-6409, 2010.

DEVI, N.; MAJI, T.K. Genipina crosslinked microcapsules of gelatin A and $\jmath$ -carrageenan polyelectrolyte complex for encapsulation of Neem (*Azadirachta Indica A.Juss.*) seed oil. **Polymer Bulletin**, v.65, p.347–362, 2010.

DIXON, M.; WEBB, E. C. **Enzymes**. Academic Press: New York, 1979.

EL-TANASH, A.B.; SHERIEF, A.A.; NOUR, A. Catalytic properties of immobilized tannase produced from *Aspergillus aculeatus* compared with the free enzyme. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v.28, p.381-391, 2011.

ERTESVAG, H.; VALLA, S. Biosynthesis and applications of alginates. **Polymer Degradation and Stability**, v. 59, p. 85-91, 1998.

FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R.; RODRIGUES, V.; MATEO, C.; PENZOL, G.; HERNANDEZ-JUSTIZ, O.; IRAZOQUI, G.; VILLARINO, O.K.; BATISTA, F.; GUISÁN, J.M. Stabilization of multimeric enzymes via immobilization and post-immobilization technique. **Journal of Molecular Catalysis: B Enzymatic**, v.7, p.181-189, 1999.

FERNÁNDEZ-LORENTE, G.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R.; PALOMO, J.M.; MATEO, C.; BASTIDA, A.; COCA, J.; HARAMBOURE, T.; HERNÁNDEZ-JUSTIZ, O.; TERRENI, M.; GUISÁN, J. M. Biocatalyst engineering exerts a dramatic effect on selectivity of hydrolysis catalyzed by immobilized lipases in aqueous medium. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 11, p. 649-656; 2001.

FERNANDEZ-LORENTE, G.; BOLIVAR, J.M.; ROCHA-MATIN, J.; CURIEL, J.A.; MUÑOZ, R.; RIVAS, B.; CARRASCOSA, A.V.; GUISAN, J.M. Synthesis of propyl gallate by transesterification of tannic acid in aqueous media catalysed by immobilized derivatives of tannase from *Lactobacillus plantarum*. **Food Chemistry**, v.128, p.214-217, 2011.

FREIRE, D.M.G. Imobilização de amiloglicosidase em quitina – caracterização e testes em reatores contínuos de leito expandido. **Tese de Mestrado**, Universidade Federal do Rio de Janeiro – RJ, 1988.

FUJIKAWA, S.; FUKUI, Y.; KOGA, K. Structure of genipocyanin G1, a spontaneous reaction product between genipina and glycine. **Tetrahedron Letters**, v.28, p.4699–4700, 1987.

GANGADHARAN, D.; NAMPOOTHIRI, K.M.; SIVARAMAKRISHNAN, S.; PANDEY A. Immobilized bacterial α -amilase for effective hidrolisis of raw and soluble starch. **Food Research International**, v. 42, p.436-442, 2009.

GIRELLI, A.M.; MATTEI, E. Application of immobilized enzyme reactor in on-line high performance liquid chromatography: a review. **Journal of Chromatography B: Analytical Technology Biomedical Life Science**, v. 819, 3-16, 2005.

GOTTSCHALK, N.; JAENICKE, R. Authenticity and reconstitution of immobilized enzymes: characterization and denaturation/renaturation of glucoamylase 11. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v.14, p.324-335, 1991.

GOUVÊA, D.; MURAD, B.B.S. Influência das características ácido-básicas da superfície dos óxidos na estabilidade de suspensões cerâmicas de Al_2O_3 ou SnO_2 com dispersantes comerciais. **Cerâmica**, v.47, p.51-56, 2001.

GRANT, G.T.; MORRIS, E.R.; REES, D.A.; SMITH, P.J.C.; THOM, D. Biological interactions between polysaccharides and divalent cations: The egg-box model, **FEBS Letters**, v. 32, p. 195-198, 1973.

GUISÁN, J.M. Aldehyde-agarose gels as activated supports for immobilization-stabilization of enzymes. **Enzyme and Microbial Technology**, v.10, p.375-382, 1988.

HAKI, G.D.; RAKSHIT, S.K. Developments in industrially important thermostable enzymes: a review. **Bioresource Technology**, v.89, p.17–34, 2003.

HUDSON, S.; COONEY, J.; HODNETT, B.K.; MAGNER, E. Chloroperoxidase on periodic mesoporous organosilanes: immobilization and reuse. **Chemistry Materials**, v.19, p.2049-2055, 2007.

IIBUCHI, S.; MINODA, Y.; YAMADA, S. Studies on tannin acyl hydrolase of microorganisms. Part III. Purification of the enzyme and some properties of it. **Agricultural Biology and Chemistry**, v.32, p.803-809, 1968.

IMESON, A. **Thickening and gelling agents for food**, London: Blackie Academic & professional, 1997. 258 p.

IVANOV, A.E.; SCHNEIDER, M.P. Methods for the immobilization of lipase and their use for ester synthesis. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.3, p.303-309, 1997.

KAR, B.; BANERJEE, R.; BHATTACHARYYA, B.M. Effect of additives on the behavioural properties of tannin acyl hydrolase. **Process Biochemistry**. v.38, p.1285-1293, 2003.

KAWAGUTI, H.Y.; BUZZATO, M.F.; ORSI, D.C.; SUZUKI, G.T.; SATO, H.H. Effect of the additives polyethyleneimine and glutaraldehyde on the immobilization of *Erwinia* sp. D12 cells in calcium alginate for isomaltulose production. **Process Biochemistry**, v.41, p.2035-2040, 2006.

KAWAGUTI, H.Y.; SATO, H.H. Produção de isomaltulose, um substituto da sacarose, utilizando glicosiltransferase microbiana. **Quimica Nova**, v.31, p.134-143, 2008.

KHARE, S.K.; NAKAJIMA, M. Imomobilization of *Rhizopus japonicus* lipase on celite and its application for enrichment of docosahexaenoic acid in soybean oil. **Food Chemistry**, v.68, p.153-157, 2000.

KIM, M.I.; HAM, O.H.; OH, S.; PARK, H.G.; CHANG, H.N.; CHOI, S. Immobilization of *Mucor javanicus* lipase on effectively functionalized sílica nanoparticles. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 39, p.62-68, 2006.

KING, A. H. Brown seaweed extracts (Alginates). **Food Hydrocolloids**, v. 2, p. 115-188, 1983.

KLEIN, J.; STOCK, J.; VORLOP, K. D. Pore size and properties of spherical Ca-alginate biocatalysts. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.18, p. 86-91, 1983.

KLIBANOV, A.M., 1983. Immobilized enzymes against thermal inactivation. **Advanced Applied Microbiology**, v.29, p.1–28, 1983.

KRISHNA, S.H.; DIVAKAR, S.; PRAPULLA, S.G.; KARANTH, N.G. Enzymatic synthesis of isoamyl acetate using immobilized lipase from *Rhizomucor miehei*. **Journal of Biotechnology**, v.87, p.193-201, 2001.

KUMBAR, S.G.; KULKARNI, A.R.; AMINABHAVI, T.M. Crosslinked chitosan microspheres for encapsulation of diclofenac sodium: effect of crosslinking agent. **Journal of Microencapsulation**, v.19, p.173–180, 2002.

LEKHA, P. K.; LONSANE, B. K. Production and application of tannic acyl hydrolase: State of the art. **Advances in Applied Microbiology**, v.44, p.215-260, 1997.

LIANG, H.C.; CHANG, W.H.; LIANG, H.F.; LEE, M.H.; SUNG, H.W. Crosslinking structures of gelatin hydrogels crosslinked with genipina or a water-soluble carbodiimide. **Journal of Applied Polymer Science**, v.91, p.4017–4026, 2004.

LIMA, E.A. Estabilização, concentração, purificação e aplicação da transglutaminase microbiana de *Streptomyces* sp. CBMAI 837. **Dissertação de mestrado** – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Campinas, SP, 152 p, 2010.

LOPES, M.F.S.; LEITÃO, A.L.; REGALLA, M.; MARQUES, J.J.F.; CARRONDO, M.J.T.; CRESPO, M.T.B. Characterization of a highly thermostable extracellular lipase from *Lactobacillus plantarum*. **International Journal of Food Microbiology**, v.115, p.107-115, 2002.

LÓPEZ-GALLEGU, F.; MONTES, T.; FUENTES M.; ALONSO, N.; GRAZU, V.; BETANCOR, L.; GUISÁN, 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, 2005a.

LÓPEZ-GALLEG0, F.; BETANCOR, L.; MATEO, C.; HIDALGO, A.; ALONSO-MORALES, N.; DELLAMORA-ORTIZ, G.; GUI SAN, J.M.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Enzyme stabilization by glutaraldehyde crosslinking of adsorbed proteins on aminated supports. **Journal Biotechnology**, v.119, p.70–75, 2005b.

LÓPEZ-GALLEG0, F.; BETANCOR, L.; HIDALGO, A.; ALONSO-MORALES, N.; FERNANDEZ-LORENTE, G.; GUI SÁN, J.M., et al. Preparation of a robust biocatalyst of D-amino acid oxidase on sepabeads supports using the glutaraldehyde crosslinking method. **Enzyme and Microbial Technology**, v.37, p.750–756, 2005c.

MACARIE, E. A.; BARATTI, J.; Short chain flavour ester synthesis by a new esterase from *Bacillus licheniformis*. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.10,p.377-383, 2000.

MACEDO, G. A.; KATSUDA, L. M. ; BATTESTIN, V. Seleção de fungos produtores de tanase em resíduos vegetais ricos em taninos. **Ciência e Agrotecnologia**, v.29, p.833-838, 2005.

MACEDO, J. A.; SETTE, L. D.; SATO, H. H. Optimization of medium composition for transglutaminase production by a Brazilian soil *Streptomyces* sp. **Eletronic Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 4, p. 618-626, 2007.

MACEDO, J.A.; BATTESTIN, V.; RIBEIRO, M.L.; MACEDO, G.A. Increasing the antioxidant power of tea extracts by biotransformation of polyphenols. **Food Chemistry**, v.126, p.491-497, 2011.

MADEIRA, J.V.Jr; MACEDO, J.A.; MACEDO, G.A. Detoxification of castor bean residues and the simultaneous production of tannase and phytase by solid-state fermentation using *Paecilomyces variotii*. **Bioresource Technology**, v.15, p7343-7348, 2011.

MAJI, T.K.; BARUAH, I.; DUBE, S.; HUSSAIN, M.R. Microencapsulation of *Zanthoxylum limonella* oil (ZLO) in glutaraldehyde cross-linked gelatin for mosquito repellent application. **Bioresource Technology**, v.98, p840–844, 2007.

MANSOUR, E.H.; DAWOUD, F.M. Immobilization of invertase on Celite and on polyacrylamide by an absorption procedure. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 83, p.446–450, 2003.

MARCONI, W. Immobilized enzymes: their catalytic behaviour and their industrial and analytical applications. **Reactive Polymers**, v.11, p.1-19, 1989.

MARKGLOU, N.; WAINER, I. W. **Methods in enzymology immobilized enzymes**. Academic Press: New York, vol. XLIV, 1976.

MATEO, C; ABIAN, O. FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R.; GUISÁN, 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.M.; ABIAN, O.; BERNEDO, M.; CUENCA, E.; FUENTES, M.; FERNANDEZ-LORENTE, G.; PALOMO, J.M.; GRAZU, V.; PESSELA, B.C.C.; GIACOMINI, C.; IRAZOQUI, G.; VILLARINO, A.; OVSEJEVI, K.; BATISTA-VIERA, F.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; GUISÁN, J.M.. Some special features of glyoxyl supports to immobilize proteins. **Enzyme and Microbial Technology**, v.37, p.456-462, 2005.

MELO, A. F. M., PINTO, G. A. S., GONÇALVES, L. R. B., FERREIRA, A. L. O. Imobilização de tanase em suporte vítreo utilizando γ -aminopropiltriétoxisilano (ATPS). Comunicado Técnico EMBRAPA, dezembro 2005.

MELO, L.L.M.; PASTORE, G.M.; MACEDO, G.A. . Optimized synthesis of citronellyl flavour esters using free and immobilized lipase from *Rhizopus* sp. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 3181-3185, 2005.

MICHEL, A.S.; MESTDAGH, M.M.; AXELOS, M.A.V. Physico-chemical properties of carrageenan gels in the presence of various cations. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.21, p.195-200, 1997.

MOFIDI, N.; AGHAI-MOGHADAM, M.; SARBOLOUKI, M.N. Mass preparation and characterization of alginate microspheres. **Process Biochemistry**, v.35, p.885-888, 1998.

MOHAPATRA, P.K.D.; MONDAL, K.C.; PATI, B.R.. Production of tannase by the immobilized cells of *Bacillus licheniformis* KBR6 in Ca-alginate beads. **Journal Applied Microbiology**, v.102, p.1462–1467, 2007.

MONDAL, K.C.; BANERJEE, D.; JANA, M.; PATI, B.R. Colorimetric assay method for determination of the tannin acyl hydrolase activity. **Analytical Biochemistry**, v.295, p168-171, 2001.

MORENO, J.M.; HERNANIZ, M.J.; SANCHES-MONTERO, J.M.; SINISTERRA, M.T.; BUSTOS, M.T.; SANCHES, M.E.; BELLO, J.F. Covalent immobilization of pure lipases A and B from *Candida rugosa*. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.2, p.177-184, 1997.

MUZARELLI, R.A.A. Genipina-crosslinked chitosan hydrogels as biomedical and pharmaceutical ids. **Carbohydrate Polymers** v.77, p. 1–9, 2009.

NICOLAS, P.; SAUVAGEAT, J.L.; REYMOND, S; RAETZ, E. Increase of thermal stability of tannin acyl hydrolase by covalent immobilization through its carbohydrate side chain: application in tea cream solubilisation. **Stability and stabilization of Biocatalysts**, 1998.

NILADEVI, K.N.; PREMA, P. Immobilization of laccase from *Streptomyces psammoticus* and its application in phenol removal using packed bed reactor. **World Journal Microbiology and Biotechnology**, v.24, p.1215-1222, 2007.

OBÓN, J.M.; CASTELLAR, M.R.; IBORRA, J.L.; MANJÓN, A. β -galactosidase immobilization for milk lactose hydrolysis: a simple experimental and modelling

study of batch and continuous reactor. **Biochemical Education**, v.28, p.164-168, 2000.

OLIVEIRA, A.C.; ROSA, M.F.; CABRAL, J.M.S.; AIRES-BARROS, M.R. Immobilization of *Saccharomyces cerevisiae* cells and *Rhizomucor miehei* lipase for the production and extractive biocatalysis of ethanol. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 16, n. 6, p.349-353, 1997.

OUWERX, C.; VELINGS, N.; MESTDAGH, M.M.; AXELOS, M.A.V. Physicochemical properties and rheology of alginate gel beads formed with various divalent cations. **Polymers Gels Networks**, v.6, p.393–408, 1998.

PAIVA, A.L.; BALCÃO, V.M.; MALCATA F.X. Kinetics and mechanisms of reactions catalyzed by immobilized lipases. **Enzyme and Microbial technology**, v.27, p.187-204, 2000.

PALACE, G.P., FIZPATRICK, R., TRAN, K.V., PHOEBE, H.C., NORTON, K. Determination of amino acids in diverse polymeric matrices using HPLC, with emphasis on agars and agaroses. **Biochemistry and Biophysic Acta (BBA)**, v.472, p.509–518, 1999.

PALOMO, J.M.; MUÑOZ, G.; FERNÁNDEZ-LORENTE, G.; MATEO, C.; FUENTES, M.; GUISÁN, J.M.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R. Modulation of *Mucor miehei* lipase properties via directed immobilization on different hetero-functional epóxi resins hydrolytic resolution of (*R,S*)-2-butyroyl-2-phenylacetic acid. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.21, p.201-210, 2003.

PALOMO, J.M.; SEGURA, R.L., FERNANDEZ-LORENTE, G.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; GUISÁN, J.M. Glutaraldehyde modification of lipases adsorbed on aminated supports: A simple way to improve their behaviour as enantioselective biocatalyst. **Enzyme and Microbial Technology**, v.40. p.704–707, 2007.

PEDROCHE, J.; YUST, M.M.; MATEO, C.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R.; GIRÓN-CALLE, J.; ALAIZ, M.; VIOQUE, J.; GUISÁN, J.M.; MILLÁN, F. 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 linkage and thermal stability. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, p.1160-1166, 2007.

PEREZ, V.H.; SILVA, G.S.; GOMES, F.M.; CASTRO, H.F. Influence of the functional activating agent on the biochemical and kinetic properties of *Candida rugosa* lipase immobilized on chemically modified cellulignin. **Biochemical Engineering Journal**, v.34, p.13-19, 2007.

PESSELA, B.C.C.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; FUENTES, M.; VIÁN, A.; GARCÍA, J.L.; CARRASCOSA, A.V.; MATEO, C.; GUISÁN, J.M. Reversible immobilization of a thermophilic β -galactosidase via ionic adsorption on PEI-coated Sepabeads. **Enzyme and Microbial Technology**, v.32, p.369-373, 2003.

PESSELA, C.C.B.; DELLAMORA-ORTIZ, G.; BETANCOR, L.; FUENTES, M.; GUISÁN, J.M.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R. Modulation of the catalytic properties of multimeric β -galactosidase from *E. coli* by using different immobilization protocol. **Enzyme and Microbial Technology**, v.40, p. 310-315, 2007.

PONCELET, D. **Encapsulation of enzymes: Potentiality and applications.** XIVth International Workshop on Bioencapsulation, Lausanne, CH. p. O8-1, 2006.

RESHMI, R.; SANJAY, G.; SUGUNAN, S. Enhanced activity and stability of α -amilase immobilized on alumina. **Catalysis Communication**, v.7, p.460-465, 2006.

ROCHA, J.M.S.; GIL, M.H.; GARCIA, F.A.P. Effects of additives on the activity of a covalently immobilized lipase in organic media. **Journal of Biotechnology**, v.66, p.61-67, 1998.

ROCHA, J.R.; CATANA, R.; FERREIRA, B.S.; CABRAL, J.M.S.; FERNANDES, P. Design and characterization of an enzyme system for inulin hydrolysis. **Food Chemistry**, v. 95, p.77-82, 2006.

ROSEVEAR, A. Immobilized Biocatalysts – a critical review. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 34; p. 127-150; 1984

SANGEETHA, P. T.; RAMESH, M. N.; PRAPULLA, S. G. Fructooligosaccharide production using fructosyl transferase obtained from recycling culture of *Aspergillus oryzae* CFR 202. **Process Biochemistry**, v. 40; pp. 1085-1088; 2005.

SCHONS, P.F.; LOPES, F.C.R.; BATTESTIN, V., MACEDO, G.A. Immobilization of *Paecilomyces variotii* tannase and properties of the immobilized enzyme. **Journal of Microencapsulation**, v.28, p.211-219, 2011a.

SCHONS, P. F.; RIES, E. F.; BATTESTIN, V.; MACEDO, G. A. Effect of enzymatic treatment on tannins and phytate in sorghum (*Sorghum bicolor*) and its nutritional study in rats. **International Journal of Food Science and Technology**, v.46, p.1253-1258, 2011b.

SHARMA, S.; BHAT, T.K.; GUPTA, M.N. Bioaffinity immobilization of tannase from *Aspergillus niger* on concanavalin A–Sepharose CL-4B. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v.35, p.165–169, 2002.

SHARMA, S.; GUPTA, M.N. Synthesis of antioxidant propyl gallate using tannase from *Aspergillus niger* van Teighem in nonaqueous media. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v.13, p.395–397, 2003.

SHARMA, S.; AGARWAL, L.; SAXENA, R. K. Purification, immobilization and characterization of tannase from *Penicillium variable*. **Bioresources Technology**, v.99, p.2544-2551, 2008.

SHARMA, K.; BARI, S.S.; SINGH, H.P. Biotransformation of tea catechins into theaflavins with immobilized polyphenol oxidase. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.56, p.253-258, 2009.

SLUSAREWICZ, P.; ZHU, K.; HEDMAN T. Kinetic characterization and comparison of various protein crosslinking reagents for matrix modification. **Journal of Material Science: Material Medicine**, v.21, p. 1175-1181, 2010.

SOARES, C.M.F; SANTANA, M.H.A. Efeito do polietilenoglicol e da albumina na imobilização de lipase microbiana e na catálise em meio orgânico. **Química Nova**, v.26, p.832-838, 2003.

SYNOWIECKI, J.; WOLOSOWKA, S. Immobilization of thermostable beta-glucosidase from *Sulfolobus shibatae* by cross-linking with transglutaminase. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, p.1417-1422, 2006.

SRIVASTAVA, A.; KAR, R. Applications of immobilized tannase from *Aspergillus niger* for the removal of tannin from myrobalan juice. **Indian Journal of Microbiology**, p.1-6, 2009.

SU, E.; XIA, T.; GAO, L.; DAI, Q.; ZHANG, Z. Immobilization and characterization of tannase and its haze-removing. **Food Science and Technology International**, v.15, p.545- 552, 2009.

SUNG, H.W.; HUANG, L.I.H.; TSAI, C.C. In vitro evaluation of cytotoxicity of a naturally occurring crosslinking reagent for biological tissue fixation. **Journal of Biomaterials, Science and Polymers**, v.10, p.63–78, 1999.

THAKUR, B.; SINGH, R.; HANDA, A. Chemistry and uses of pectin, a review. **Critical Review in Food Science and Nutrition**, v. 37, p.47-73, 1997.

TOMOTANI, E.J.; VITOLO, M. Method for immobilizing invertase by adsorption on Dowex® anionic exchange resin. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.42, p.245-249, 2006.

TORRES, R.; PESSELA, B.; FUENTES, M., MUNILLA, R.; MATEO, C.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R.; GUISÁN, J.M. Stabilization of enzymes by multipoint attachment via reversible immobilization on phenylboronic activated supports. **Journal of Biotechnology**, v.120, p.396-401, 2005.

VELINGS, N.; MESTDAGH, M. Physico-chemical properties of alginate gel beads. **Polymer Gels Networks**, v.3, p.311-330, 1995.

VILLENEUVE, P.; MUDERHWA, J.M.; GRAILLE, J.; HAAS, M.J. 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.

VITOLO, M. **Imobilização de enzimas em: Biotecnologia industrial: processos fermentativos e enzimáticos**. LIMA , U.A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. São Paulo: Blücher, vol.3, 2001.

WEETAL HH. Enzymatic gallic acid esterification. **Biotechnology Bioengineering**, v.27, p.124–127, 1985.

WEETAL, H.H.; DATER, C.C. Immobilized tannase. **Biotechnology and Bioengineering**, v.16, p.1095–1099, 1974.

WHITAKER, J.R. **Principles of Enzymology for Food Sciences**. In: Enzyme Inhibitors. New York; p.255-282, 1972.

WU, J.C.; LEE, S.S.; MAHMOOD, M.M.B.; CHOW, Y.; TALUKDER, M.M.R.; CHOI, W.J. Enhanced activity and stability of immobilized lipases by treatment with polar solvents prior to lyophilization. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 45, p.108-112, 2007.

WU, J.; SONG, B.; XING, A.; HAYASHI, Y.; TALUKDER, M. M. R.; WANG, S. Esterification reactions catalyzed by surfactant-coated *Candida rugosa* lipase in organic solvents. **Process Biochemistry**, v.37, p.1229-1233, 2002.

XIAOWEI, Y.; YONGQUAN, L.; DAN, W. Microencapsulation of tannase by chitosan–alginate complex coacervate membrane: synthesis of antioxidant propyl gallate in biphasic media. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v.79, p.475–479, 2004.

YADAV, G.D.; JADHAV, S.R. Synthesis of reusable lipase by immobilization on hexagonal mesoporous silica and encapsulation in calcium alginate: transesterification in non-aqueous medium. **Microporous and Mesoporous Materials**, v.86, p.215-222, 2005.

YADAV, G.D.; TRIVEDI, A.H. Kinetic modeling of immobilized-lipase catalysed transesterification of n-octanol with vinyl acetate in non-aqueous media. **Enzyme and Microbial Technology**, v.32, p.783-789, 2003.

YU, X.; LI, Y.; WU, D. Microencapsulation of tannase by chitosan-alginate complex coacervate membrane: synthesis of antioxidant propyl gallate in biphasic media. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v.79, p.475-479, 2004a.

YU, X.; LI, Y.; WU, D. Enzymatic synthesis of gallic acid esters using microencapsulated tannase: effect of organic solvent and enzyme specificity. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.30, p.69-73, 2004b.

YU, X.; LI, Y.; WANG, C.; WU, D. Immobilization of *Aspergillus niger* tannase by microencapsulation and its kinetic characteristics **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v.40, p.151–155, 2004c.

YU, X.; LI, Y. Microencapsulated mycelium-bound tannase from *Aspergillus niger*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.126, p.177-187, 2005.

YU, X.; LI, Y.; ZHOU, S.; ZHENG, Y. Synthesis of propyl gallate by mycelium-bound tannase from *Aspergillus niger* in organic solvent. **World Journal Microbiology and Biotechnology**, v.23, p.1091–1098, 2007.