



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

ANA CAMILA VAITKEVICIUS FERREIRA

**IMOBILIZAÇÃO DE β -GLICOSIDASE DE SOJA EM BUCHA
VEGETAL (*Luffa cylindrica*)**

Londrina
2017

ANA CAMILA VAITKEVICIUS FERREIRA

**IMOBILIZAÇÃO DE β -GLICOSIDASE DE SOJA EM BUCHA
VEGETAL (*Luffa cylindrica*)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Biotecnologia da Universidade Estadual de Londrina como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientadora: Profa. Dra. Mara Lúcia Luiz
Ribeiro

Londrina
2017

ANA CAMILA VAITKEVICIUS FERREIRA

**IMOBILIZAÇÃO DE β -GLICOSIDASE DE SOJA EM BUCHA
VEGETAL (*Luffa cylindrica*)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Biotecnologia da Universidade Estadual de Londrina como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Profa. Dra. Mara Lúcia Luiz
Ribeiro
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dr. Luiz Henrique Dall'Antonia
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Profa. Dra. Fabiana Guillen Moreira Gasparin
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina
2017

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Ferreira, Ana Camila Vaitkevicius.

Imobilização de beta-glicosidase de soja em bucha vegetal (*Luffa cylindrica*) / Ana Camila Vaitkevicius Ferreira. - Londrina, 2017.

56 f. : il.

Orientador: Mara Lúcia Luiz Ribeiro.

Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, 2017.

Inclui bibliografia.

1. beta-glicosidase - Tese. 2. imobilização de enzimas - Tese. 3. bucha vegetal - Tese. I. Ribeiro, Mara Lúcia Luiz. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Exatas. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. III. Título.

FERREIRA, Ana Camila Vaitkevicius. **Imobilização de β -glicosidase de soja em bucha vegetal (*Loofa cylindrica*)**. 2017. 56 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2017.

RESUMO

A bucha vegetal foi utilizada como suporte para imobilização de β -glicosidase, propondo um sistema catalítico estável para uso industrial. A β -glicosidase foi extraída da soja, parcialmente purificada por precipitação fracionada com sulfato de amônio e imobilizada por ligação covalente em bucha vegetal lavada e ativada. A ativação foi feita com os reagentes glutaraldeído e trimetafosfato de sódio. As condições de imobilização foram otimizadas por metodologia da superfície de resposta e o rendimento de imobilização foi avaliado. O rendimento de imobilização para o glutaraldeído foi de 103% e para o trimetafosfato de sódio foi de 93%. As condições ótimas para imobilização da enzima utilizando glutaraldeído 2,5% como ativador foram 24 h de incubação; pH 4,0 e 2 mg/mL de proteína inicial. Com o trimetafosfato de sódio 12%, as condições ótimas foram 24 h de incubação; pH 7,0 e 0,6 mg/mL de proteína inicial. Os dois ativadores foram eficientes na ativação da bucha vegetal para a imobilização da β -glicosidase da soja.

Palavras chave: β -glicosidase. Imobilização de enzimas. Bucha vegetal.

FERREIRA, Ana Camila Vaitkevicius. **Immobilization of β -glycosidase from soybeans in loofa sponge (*Loofa cylindrica*)**. 2017. 56 pp. Dissertation (Master in Biotechnology) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2017.

ABSTRACT

The loofa sponge was used as support for β -glycosidase immobilization, proposing a stable catalytic system for industrial use. β -glycosidase was extracted from soybeans, partially purified by fractional precipitation with ammonium sulfate and immobilized by covalent binding in washed and activated loofa sponge. The activation was done with two different reagents: glutaraldehyde and sodium trimetaphosphate. The immobilization conditions were optimized by response surface methodology, and the immobilization yield was evaluated. The immobilization yield for glutaraldehyde was 103 % and for sodium trimetaphosphate was 93 %. The optimum conditions for glutaraldehyde were 24 h incubation; pH 4,0; 2 mg/mL initial protein and activation with 2,5 % glutaraldehyde. For sodium trimetaphosphate the optimal conditions were 24 h of incubation; pH 7,0; 0,6 mg/mL of initial protein and activation with 12% sodium trimetaphosphate. Both activators were efficient for the activation of the vegetal bush for β -glucosidase immobilization.

Key words: β -glycosidase. Enzyme immobilization. Loofa sponge.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra Mara Lucia Luiz Ribeiro, que durante todo o tempo em que me orientou me ofereceu suporte, conhecimento, compreensão, correções e incentivos que fizeram com que eu pudesse chegar aqui hoje.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de estudos e pelo apoio financeiro na execução deste projeto.

A Universidade Estadual de Londrina, ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, a todos Docentes, Técnicos e demais pessoas direta ou indiretamente proporcionaram conhecimento essencial para minha formação acadêmica.

À minha família, meus Pais e Irmão, que sempre estiveram do meu lado, me dando amor, força e apoio incondicional durante todo esse período, por nunca me deixarem desanimar ou desistir, por fazerem todos os sacrifícios que fizeram, para que eu concluísse essa etapa.

Ao meu noivo, por se fazer presente em todos os momentos, mesmo quando longe, por toda compreensão, carinho, amor, paciência e incentivo para que eu pudesse completar essa fase da minha vida.

Enfim, a todas aquelas pessoas que, direta ou indiretamente, contribuíram para que esse trabalho se realizasse.

Meu agradecimento especial e incondicional a Deus, por ter me abençoado com saúde, energia, paciência e determinação para que a realização desse trabalho fosse possível.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Classificação internacional das enzimas	11
Tabela 2 - Principais aplicações industriais das β -glicosidases	12
Tabela 3 - Estudos sobre a imobilização de β -glicosidase obtida de diferentes fontes e em diferentes suportes.....	13
Tabela 4 - Principais aplicações das enzimas imobilizadas na indústria.....	14
Tabela 5 - Estudos sobre imobilização de células em bucha vegetal	23
Tabela 6 - Variáveis independentes e níveis do planejamento Box Hunter and Hunter completo 24	29
Tabela 7 - Variáveis independentes e níveis do delineamento composto central rotacional, com 2 variáveis	29

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Ação da β -glicosidase em ligações glicosídicas β (1,4)	11
Figura 2 - Imobilização de enzimas por ligações físicas: métodos de confinamento e encapsulação	17
Figura 3 - Etapas do processo de imobilização por confinamento.....	17
Figura 4 - Etapas do processo de imobilização por encapsulação	17
Figura 5 - Imobilização de enzimas por ligações químicas: adsorção e ligação covalente.....	19
Figura 6 - Estrutura molecular do glutaraldeído e do trimetafosfato de sódio.....	21
Figura 7 - Interação enzima-suporte por ligação covalente	21
Figura 8 - Plantação de <i>Luffa cylindrica</i> e estrutura da popular bucha vegetal	22

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	7
2 OBJETIVOS	9
2.1 OBJETIVO GERAL.....	9
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	9
3 REVISÃO DA LITERATURA	10
3.1 DEFINIÇÃO, CLASSIFICAÇÃO E ESTRUTURA DAS ENZIMAS	10
3.2 AS B-GLICOSIDASES: CLASSIFICAÇÃO, AÇÃO E APLICAÇÃO.....	11
3.3 IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS	14
3.3.1 <i>Suportes para imobilização</i>	15
3.3.2 <i>Métodos físicos para imobilização de enzimas</i>	16
3.3.3 <i>Métodos químicos para imobilização de enzimas</i>	18
3.4 BUCHA VEGETAL (<i>LUFFA CYLINDRICA</i>): CARACTERÍSTICAS E UTILIZAÇÃO COMO SUPORTE PARA IMOBILIZAÇÃO.....	21
4. MATERIAL E MÉTODOS	24
4.1 MATERIAL	24
4.1.1. MATÉRIA PRIMA	24
4.1.2. <i>Reagentes</i>	24
4.2 MÉTODOS ANALÍTICOS	24
4.2.1 <i>Determinação de Atividade de β-glicosidase</i>	24
4.2.2 <i>Determinação da atividade específica da β-glicosidase</i>	25
4.2.3 <i>Determinação do rendimento da imobilização</i>	25
4.3 PROCEDIMENTOS	25
4.3.1 <i>Obtenção de β-glicosidase da soja</i>	25
4.3.1.1 Extração de β -glicosidase.....	26
4.3.1.2 Fracionamento do Extrato Bruto com Sulfato de Amônio.....	26
4.3.2 <i>Tratamento da bucha vegetal</i>	26
4.3.2.1 Tratamento A	27
4.3.2.2 Tratamento B	27
4.3.2.3 Tratamento C	27
4.3.2.4 Tratamento D	27
4.3.2.5 Tratamento E	27

4.3.2.6 Tratamento F	27
4.4 Avaliação do Efeito dos tratamentos da bucha no rendimento da imobilização.....	27
4.5 Ativação do suporte e imobilização da enzima utilizando delineamento fatorial e análise de superfície de resposta	28
4.5.1 Ativação do suporte	28
4.5.2 Imobilização da enzima em bucha vegetal tratada	28
4.6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	30
REFERÊNCIAS	31
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
INTRODUÇÃO	42
PARTE EXPERIMENTAL.....	43
1. Materiais.....	43
2. Obtenção da β -glicosidase.....	43
3. Determinação de atividade da β -glicosidase e sua atividade específica.....	44
4. Tratamentos da bucha vegetal	44
5. Delineamentos experimentais e avaliação do rendimento de imobilização	45
6. Ativação do suporte e imobilização da enzima	47
RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
1. Rendimentos de imobilização de β -glicosidase imobilizada em bucha vegetal tratada	47
2. Rendimento de imobilização de β -glicosidase em bucha vegetal tratada: análise exploratória	48
2.1 Imobilização de β -glicosidase em bucha vegetal tratada e ativada com glutaraldeído	48
2.2 Imobilização de β -glicosidase em bucha vegetal tratada e ativada com trimetafosfato de sódio	50
CONCLUSÃO	54
REFERÊNCIAS	54
6 CONCLUSÃO	56

1 INTRODUÇÃO

As β -glicosidases (β -D-glicosídeo hidrolases, E.C. 3.2.1.21) são um grupo de enzimas que atuam em ligações glicosídicas, presentes em dissacarídeos, oligossacarídeos e outros glicosídeos conjugados, hidrolisando-as e liberando glicose. Essas enzimas podem ser encontradas em plantas (principalmente na soja), em microrganismos, como fungos e bactérias, e também em animais, sendo secretada pela microbiota do cólon. As β -glicosidases apresentam diversas funções nos organismos onde são encontradas e é essa diversidade que possibilita sua utilização em diferentes áreas e processos industriais. E, apesar de haver muitas possibilidades de aplicação industrial, seu uso ainda é limitado devido à instabilidade de sua estrutura, dificuldade de separação da enzima do produto final e a sua recuperação para aplicações repetidas. Uma alternativa para essa limitação é a imobilização da enzima.

O processo de imobilização consiste na ligação de uma enzima a um suporte com o objetivo de manter a sua atividade catalítica. Esse processo pode resultar em vantagens para a indústria, como maior resistência das enzimas às condições adversas dos meios reacionais, possibilidade de reutilização, redução dos custos e sua ausência no produto final, evitando possíveis alterações de sabor, odor e textura. Isso faz com que enzimas imobilizadas tenham uma ampla utilização industrial.

Os métodos de imobilização podem ser realizados por confinamento, encapsulação, adsorção ou ligação covalente da enzima ao suporte. A escolha do método deve ser feita analisando-se as características dos agentes envolvidos, o custo total do procedimento, a possível toxicidade dos agentes utilizados, a estabilidade operacional, as características finais desejadas e a aplicação final.

A imobilização da enzima por ligação covalente exige o tratamento do suporte com reagente ativador, que liga a enzima ao suporte de maneira estável. O ativador mais comumente utilizado para esse processo é o glutaraldeído, com ótimos resultados nos processos onde é utilizado. O trimetafosfato de sódio (TMP) é um reagente que também pode ser utilizado como ativador para a imobilização de enzimas. Ele possui características não tóxicas e por isso seu uso é mais amplo,

sendo utilizado na indústria de alimentos e na indústria farmacêutica na liberação cólon-específica de fármacos.

O suporte a ser utilizado para imobilização de enzimas é um fator muito importante neste processo e para sua escolha deve-se observar que tenha área superficial elevada, permeabilidade, estabilidade química e mecânica às condições operacionais, capacidade de regeneração, custo baixo, natureza hidrofílica ou hidrofóbica e morfologia e composição favoráveis ao processo. Um material que se adequa a esses requisitos é a bucha vegetal.

A bucha vegetal (*Luffa cylindrica*) é uma planta facilmente encontrada na América do Sul, inclusive no Brasil. Sua estrutura é formada por uma rede de fibras finas, resistentes, elásticas e macias, constituídas de celulose, hemicelulose e lignina. É um material altamente poroso, de volume específico elevado, biodegradável, de custo baixo, proveniente de fonte renovável e atóxico. Essas características a tornam uma boa opção como suporte para imobilização de enzimas.

Dessa forma, considerando que a imobilização de β -glicosidase pode favorecer sua aplicação industrial possibilitando o seu reuso e diminuição de custos, e que a bucha vegetal possui as características adequadas de um suporte, o objetivo desse trabalho foi otimizar as condições de imobilização de β -glicosidase de soja em bucha vegetal (*Luffa cylindrica*).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Imobilizar β -glicosidase de soja em bucha vegetal.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obter β -glicosidase de cotilédones de soja;
- Purificar parcialmente a enzima utilizando fracionamento com sulfato de amônio;
- Desenvolver diferentes tratamentos físico-químicos para a bucha vegetal;
- Otimizar as condições de imobilização da β -glicosidase na bucha vegetal tratada;
- Caracterizar a enzima livre e imobilizada.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 DEFINIÇÃO, CLASSIFICAÇÃO E ESTRUTURA DAS ENZIMAS

Enzimas são moléculas de natureza proteica (com exceção de um pequeno grupo de moléculas de RNA catalítico) e que apresentam atividade catalítica. O desempenho de sua atividade catalítica depende da integridade de sua estrutura nativa, portanto, a manutenção de suas estruturas primária, secundária, terciária e quaternária essenciais para sua atividade. Isso ocorre porque as reações catalisadas ocorrem no interior do sítio ativo, uma região da estrutura enzimática composta por resíduos de aminoácidos que se ligam ao substrato da enzima, tornando a reação possível. Caso ocorra alguma alteração nos resíduos de aminoácidos constituintes do sítio ativo, o substrato não consegue se ligar e a reação não ocorre (LEHNINGER, 2014).

Cada enzima atua sobre um substrato específico, que pode ser uma única molécula (especificidade absoluta) ou um grupo de moléculas com características semelhantes (especificidade relativa). De acordo com o seu substrato e as reações que elas catalisam, as enzimas podem ser divididas em 6 grandes classes, de acordo com a classificação internacional das enzimas: oxidorreduções, transferases, hidrolases, liases, isomerases e ligases (Tabela 1). De acordo com esse sistema internacional, a cada enzima é atribuído um número classificatório de 4 dígitos e um nome sistemático, que permite identificar a reação que ela catalisa (LEHNINGER, 2014).

Como a atividade enzimática é dependente da estrutura proteica, fatores que são capazes de alterar ou desnaturar a conformação nativa da enzima podem influenciar na sua atividade. Por esse motivo, cada enzima possui condições ideais de pH e temperatura para sua atuação, chamados de pH ótimo e temperatura ótima, que representam as condições na qual a enzima apresenta maior formação do produto. Em valores de pH e temperatura distantes do ótimo, a atividade começa a diminuir, sendo que para cada enzima há valores que resultam em desnaturação e completa perda de atividade (LEHNINGER, 2014).

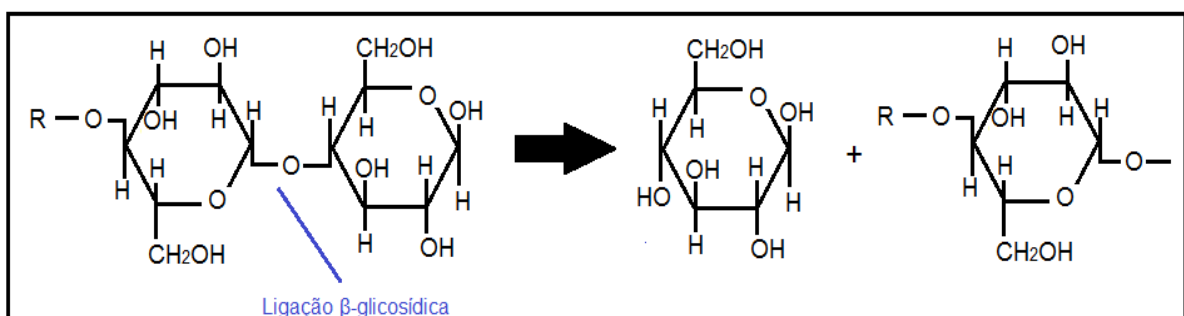
Tabela 1 — Classificação internacional das enzimas.

Número	Classe	Tipo de reação catalisada
1	Oxidoredutases	Transferência de elétrons (íons hidretos ou átomos de H)
2	Transferases	Reações de transferência de grupos
3	Hidrolases	Reações de hidrólise (reações de transferência de grupos funcionais para a água)
4	Liases	Adição de grupos às duplas ligações ou formação de duplas ligações por meio de remoção de grupos
5	Isomerases	Transferência de grupos dentro da mesma molécula para formar isômeros
6	Ligases	Formação de ligações do tipo C-C, C-S, C-O e C-N por meio de reações de condensação acopladas à quebra do ATP

Fonte: Lehninger, 6ª edição, 2014.

3.2 AS β -GLICOSIDASES: CLASSIFICAÇÃO, AÇÃO E APLICAÇÃO

As β -glicosidases (β -D-glicosídio glicohidrolase, EC 3.2.1.21) são um grupo heterogêneo de enzimas que atuam em ligações glicosídicas de dissacarídeos, oligossacarídeos e outros glicosídeos conjugados liberando glicose (CHEN et al, 1977; BHATIA, 2002) (Figura 1). Elas apresentam maior atividade quando em meio reacional de pH 5,0 a 6,0 e temperatura de 30 a 40 °C (MATSUURA; OBATA, 1993; HSIEH; GRAHAM, 2001; RIBEIRO et al., 2007). Essas enzimas podem ser encontradas em plantas, como a soja (HSIEH; GRAHAM, 2001), em microrganismos, fungos (BELANCIC et al., 2003), bactérias (SESTELO et al., 2004), podem também ser secretadas pela microbiota do cólon de humanos (SETCHELL et al., 2002) e por animais (PONTOH; LOW, 2002).

Figura 1 — Ação da β -glicosidase em ligações glicosídicas β (1,4)

Fonte: o autor.

As β -glicosidases são classificadas como aril- β -glicosidases, com maior especificidade por aril-glicosídeos; como celobiasas verdadeiras, que hidrolisam somente celobiose; ou como β -glicosidases com ampla especificidade ao substrato, que hidrolisam ligações glicosídicas de diferentes substratos, sendo este último grupo o que engloba a maioria das enzimas conhecidas (BHATIA et al., 2002).

Esse grupo de enzimas possui uma diversidade de funções nos organismos em que são encontradas. Nas plantas podem atuar na hidrólise de precursores hormonais (SARRY, 2004), auxiliam no amadurecimento dos frutos (FAURE, 2002), na germinação de sementes (OPARISSI et al., 2003), na emissão do aroma em flores (HAYASHI et al., 2004), nas interações patógeno-planta (HAERTER; VOEGELE, 2004) e também nas interações herbívoros-plantas (BHATIA et al., 2002). Dessa forma, essa enzima apresenta grande potencial para ser utilizada em diversos processos biotecnológicos (Tabela 2). Porém, mesmo havendo possibilidades de aplicação na indústria, existem limitações devido a instabilidade da estrutura, dificuldade de separação da enzima do produto e a sua recuperação para aplicações repetidas (NISHA; GOBI, 2012; SHELDON; VAN PELT, 2013).

Tabela 2 — Principais aplicações industriais das β -glicosidases.

Aplicação	Fonte
Hidrólise de compostos amargos durante a extração de sucos de frutas cítricas	BHIRI, et al., 2008
Liberção de compostos do aroma em vinhos e sucos de frutas	POGORZELSKI; ILKOWSKA, 2007
Utilizadas nos processos de sacarificação e fermentação	HAN; CHEN, 2008
Tratamento de celulose	BALDRIAN; VALASKOVA, 2008
Síntese de alquil e aril- β -glicosídeos a partir de polissacarídeos e seus derivados	SATHISHKUMAR et al., 2008
Produção de isoflavonas glicosiladas em produtos derivados de soja	KAYA et al., 2008
Degradação de biomassa de resíduos agrícolas	SONIA et al., 2008

Fonte: o autor.

Devido a essa variedade de aplicações industriais e visando otimizar o processo de imobilização, a β -glicosidase tem sido objeto de vários estudos. Nesses

estudos são utilizados diferentes suportes e métodos de imobilização com obtenção de resultados satisfatórios. Mazzei et al. (2009) estudaram esta enzima obtida de amêndoas e obtiveram os mesmos parâmetros cinéticos da enzima livre e melhor estabilidade operacional quando a imobilizam em membranas capilares de polissulfona pelo método de encapsulamento. Borges (2011) estudou o uso de diferentes suportes e métodos e concluiu que a imobilização da enzima em resina poliacrílica funcionalizada com grupos carboxílicos por adsorção foi mais eficiente. Com esse experimento obteve-se um rendimento de 71% da atividade da enzima livre e aproximadamente 97% de recuperação após quatro horas de reação. Além destes, outros estudos foram realizados (Tabela 3).

Tabela 3 — Estudos sobre a imobilização de β -glicosidase obtida de diferentes fontes em suportes diversos.

Suporte	Fonte da enzima	Método de imobilização	Autores
Partículas coloidais de terra	Comercial	Adsorção	Yan et al., 2010
Alginato	Comercial	Confinamento	Su et al., 2010
Poliestireno aminados quitosana/ Poliestireno aminados quitosana-glutaraldeído	Comercial	Ligação covalente	Zhang et al., 2011
Agarose	Comercial	Ligação iônica e ligação covalente	Vieira et al., 2011
Acrílico (Eupergit® C, Eupergit® C250L, cryogel)-glutaraldeído	Thermotoga neapolitana	Ligação covalente	Khan et al., 2012
Espumas sílica-glutaraldeído	Comercial	Ligação covalente cruzada	Reshmi e Sugunan (2013)
Alginato	Comercial	Confinamento	Zhang et al., 2013
Bagaço de cana; Alginato	Cotilédones de soja	Ligação covalente; adsorção; encapsulação	Moreira, 2014.
Quitosana	Comercial	Ligação covalente	Zaluski, 2015

Fonte: o autor

3.3 IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS

A tecnologia de imobilização de enzimas começou se destacar e ter maior investigação a partir de 1960, com técnicas para a utilização em processos químicos. Desde então, tem sido aplicada em diferentes segmentos, como na síntese de compostos bioativos e biopolímeros, construção de biossensores, terapia com enzimas e processos industriais tradicionais (MENDES et al., 2011). Como a aplicação de enzimas imobilizadas têm se mostrado eficiente, ela se expandiu para diversas áreas, como a de alimentos (Tabela 4) (HOMAEI et al., 2013).

Tabela 4 — Principais aplicações das enzimas imobilizadas na indústria de alimentos.

Enzima	E.C.	Produto industrial
β-galactosidase	3.2.1.23	Leite sem lactose
Lipase	3.1.1.3	Substitutos da manteiga de cacau
Nitrílica hidratase	4.2.1.84	Nicotinamida
Aminociclase	3.5.1.14	L-aminoácidos
Raffinase	3.2.1.22	Galactose e sacarose
Invertase	3.2.1.26	Mistura de glicose e frutose
Termolisina	3.4.24.27	Aspartame
Glicoamilase	3.2.1.3	D-glicose
Papaína	3.4.22.2	Remoção de sedimentos de lúpulo, proteínas e resíduos do malte em cervejas

Fonte: o autor.

O processo de imobilização de enzimas consiste basicamente na ligação da enzima de interesse a um suporte para manutenção de sua atividade catalítica. A imobilização é considerada uma forma de proteção da enzima contra as condições adversas que podem existir no meio de reação (CANILHA; CARVALHO; SILVA, 2006). O processo tem recebido destaque uma vez que permite que a enzima seja utilizada em processos contínuos, na presença de diferentes solventes, pH e temperaturas. Também diminui os riscos de contaminação em operações com altas taxas de diluição e aumenta a estabilidade da enzima. Além disso, a imobilização permite o reaproveitamento da enzima, facilita a sua separação do produto final e reduz o custo de operação (PRADELLA, 2001; CANILHA; CARVALHO; SILVA, 2006; BRADY; JORDAAN, 2009). Porém, nesse processo pode ser observadas

mudanças de conformação da enzima com redução de atividade catalítica e perdas durante o processo podem ocorrer. Para aplicações industriais, o custo total da imobilização pode ser compensado pela vida útil e o rendimento do produto final (MATEO et al., 2007; MENDES et al., 2011).

De maneira geral, as enzimas podem ser imobilizadas de duas maneiras: por ligações físicas ou por ligações químicas utilizando-se de diferentes métodos. (FERNANDÉZ-FERNENDÉZ; SANROMÁN; MOLDES, 2013). Na escolha do método para a imobilização considera-se parâmetros como atividade global do biocatalizador, características de regeneração e inativação, custo total do procedimento, possível toxicidade dos reagentes envolvidos, estabilidade operacional, características finais desejadas para o biocatalizador imobilizado, aplicação da enzima imobilizada, características do suporte escolhido e afinidade suporte-enzima (DALLA-VECCHIA; NASCIMENTO; SOLDI, 2004; MENDES et al., 2011).

3.3.1 *Suportes para imobilização*

Na literatura são relatados diferentes tipos de suportes para a imobilização de enzimas, diferindo nas estruturas físicas que podem ser geliformes, como alginato e carragena e sólidas, como vidros porosos e Eupergit C®. Os diferentes suportes podem ser divididos em duas grandes classes: os que confinam fisicamente a enzima e aqueles em que as enzimas se aderem à superfície (CANILHA; CARVALHO; SILVA, 2006). Quanto à sua origem, também são caracterizados como orgânico ou inorgânico (MENDES et al., 2011).

Os suportes porosos apresentam vantagens sobre os outros tipos, devido a sua elevada área de superfície interna que está disponível para a ligação com a enzima (DALLA-VECCHIA; NASCIMENTO; SOLDI, 2004). Os poros também conferem proteção à enzima imobilizada dentro dessa estrutura (MATEO et al., 2007). Porém, o tamanho dos poros pode acarretar uma limitação difusional das moléculas em sua estrutura, uma vez que a enzima e o substrato devem ser capazes de passar por eles (MENDES et al., 2011).

Os suportes não porosos são capazes de imobilizar enzimas em sua superfície, promovendo maior interação do catalisador com o seu substrato. Porém, a superfície externa do suporte é pequena para a ligação das biomoléculas imobilizando uma menor quantidade de enzimas (DALLA-VECCHIA; NASCIMENTO; SOLDI, 2004; MATEO et al., 2007; MENDES et al., 2011).

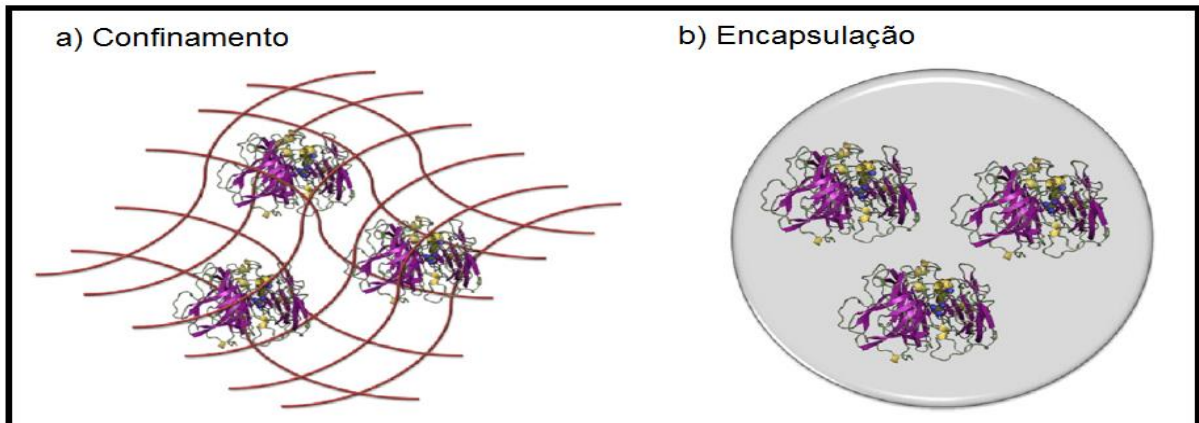
A escolha do suporte adequado contribui para o bom desempenho da enzima imobilizada. Portanto, as características do suporte, da enzima e as condições de utilização do complexo enzima-suporte deverão ser avaliadas (MILETIC et al., 2009). Considerando o grande número de enzimas conhecidas, suas diferentes características físicas e químicas e possíveis aplicações, não existe um suporte universal. Dessa forma, um estudo deve ser feito para determinar o melhor suporte para a enzima que se deseja imobilizar e sua aplicação (CANILHA; CARVALHO; SILVA, 2006). Um suporte adequado tem como requisitos básicos área superficial elevada, permeabilidade, estabilidade química e mecânica em condições operacionais, possibilidade de regeneração, custo baixo, resistência à contaminação por microrganismos, morfologia e composição favoráveis entre outros (TALBERT, 2012).

3.3.2 Métodos físicos para imobilização de enzimas

Os métodos físicos de imobilização consistem no aprisionamento da enzima pelo suporte com formação de uma matriz tridimensional (confinamento) ou por encapsulação (Figura 2).

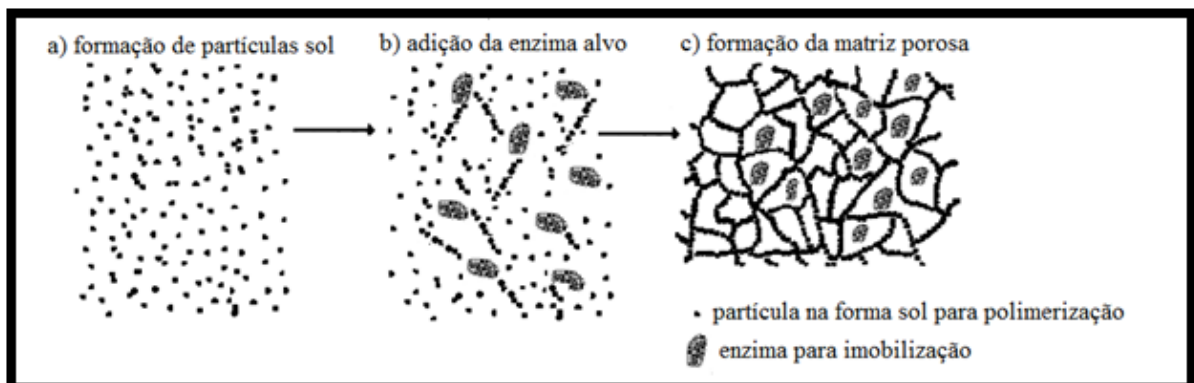
A imobilização por confinamento ou por encapsulação consiste na retenção da enzima alvo em uma matriz porosa, que pode ser formada por poliacrilamida, alginato, entre outros. Nesse processo, a enzima é parte da mistura que resultará na matriz porosa. Conforme a matriz vai se formando em torno da enzima ocorre o seu aprisionamento, por confinamento (Figura 3) ou por formação de cápsulas (Figura 4). O processo sol-gel é a melhor alternativa para realizar estes métodos de imobilização, pois ocorre em meio aquoso e a atividade catalítica da enzima pode ser mantida (KATO, et al., 2002; HODGSON et al., 2004; HAGE, 2005).

Figura 2 — Imobilização de enzimas por ligações físicas: métodos de confinamento e encapsulação.



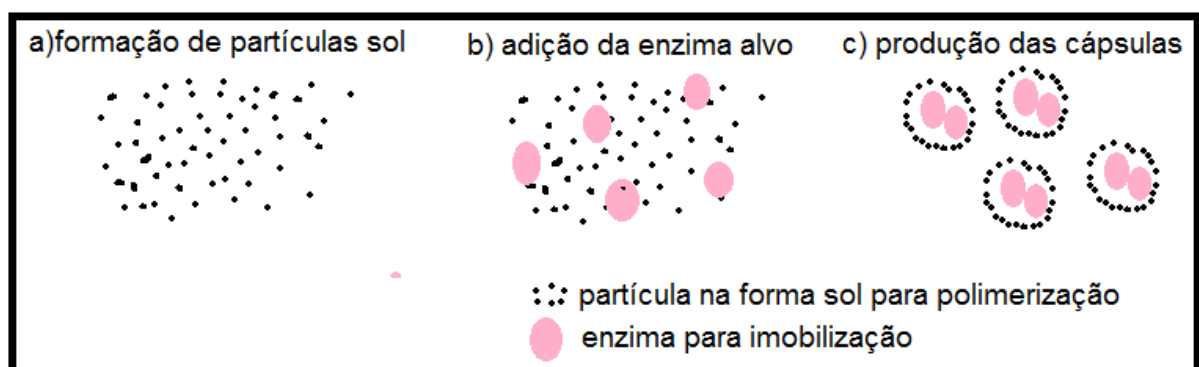
Fonte: adaptado de FERNANDEZ-FERNANDEZ; SANROMÁN; MOLDES, 2013.

Figura 3 — Etapas do processo de imobilização de enzimas por confinamento.



Fonte: Adaptado de MALLIK; HAGE, 2006.

Figura 4 — Etapas do processo de imobilização de enzimas por encapsulação



Fonte: o autor.

A principal vantagem dos métodos por confinamento ou encapsulação é a proteção da enzima do contato direto com o meio de reação, devido a sua retenção no interior da matriz porosa. Dessa forma, os efeitos dos solventes e condições do meio são minimizados. Além disso, esses são métodos de fácil procedimento e aplicável a uma ampla variedade de enzimas (DALLA-VECCHIA; NASCIMENTO; SOLDI, 2004; SHELDON, 2007; BRADY, JORDAAN, 2009).

As desvantagens relacionadas ao confinamento ou encapsulação das enzimas estão relacionadas com a dificuldade em se controlar o tamanho dos poros formados na matriz. Poros muito grandes não retêm a enzima e poros muito pequenos impedem o contato da enzima com o seu substrato. Pode ocorrer o encolhimento do gel durante o processo de secagem com possibilidade de desnaturação da enzima (DALLA-VECCHIA; NASCIMENTO; SOLDI, 2004; HODGSON et al., 2004; BRADY; JORDAN, 2009; HANEFELD, GARDOSI; MAGNER, 2009; FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ; SANROMÁN; MOLDES, 2013). Assim, a escolha dos reagentes da mistura sol-gel deve ser cuidadosa, pois a produção de subprodutos alcoólicos durante o processo pode desnaturar a enzima (HODGSON, 2004).

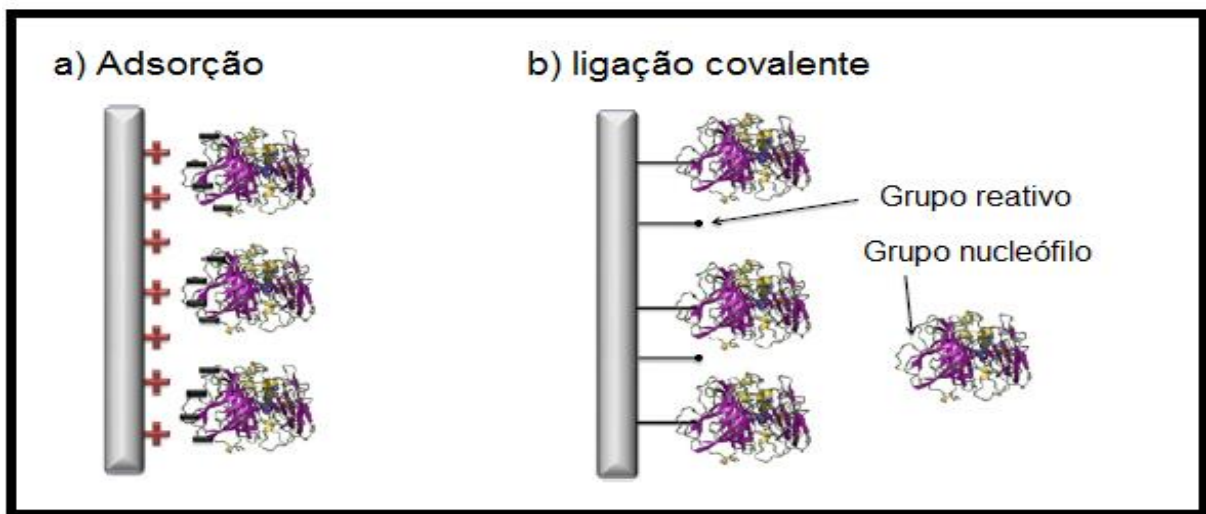
3.3.3 Métodos químicos para imobilização de enzimas

Os métodos químicos para imobilização consistem na ligação da enzima ao suporte por meio de ligações químicas, sejam elas fortes ou fracas, por métodos conhecidos como adsorção e ligação covalente (FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ; SANROMÁN; MOLDES, 2012; ZHENG et al., 2012; ZHOU, Z. et al., 2013) (Figura 5).

A adsorção é um dos métodos mais simples e utilizado para a imobilização e consiste na ligação da enzima em suportes pré-selecionados por meio de ligações de baixa energia, como interações hidrofóbicas, de van der Waals, ligações de hidrogênio e iônicas (Figura 5a) (FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ; SANROMÁN; MOLDES, 2013; ZHENG et al., 2012; ZHOU, Z. et al., 2012). A eficiência do método depende do tamanho da enzima, da área superficial do suporte, da sua porosidade e da presença de grupos reativos (MENDES et al., 2011).

A imobilização por adsorção tem como vantagens o custo baixo, execução fácil e pouca alteração de conformação da enzima (ZHOU et al., 2012). Como desvantagens tem-se a possibilidade de separação da enzima do suporte devido a variações de temperatura, pH, força iônica no meio reacional e a formação de ligações fracas (GUIDINI et al., 2010; MENDES et al., 2011).

Figura 5 — Imobilização de enzimas por ligações químicas: adsorção e ligação covalente



Fonte: adaptado de FERNANDEZ-FERNANDEZ; SANROMÁN; MOLDES, 2013.

A imobilização de enzimas ao suporte por ligações covalentes é muito utilizada devido a maior estabilidade da ligação enzima-suporte entre os grupos funcionais presentes na superfície dos mesmos (KIM et al., 2006). As ligações covalentes conferem rigidez na estrutura da enzima, aumentando a resistência e a estabilidade na presença de agentes desnaturantes como pH extremo e calor (MACARIO et al., 2009). Os grupos funcionais dos aminoácidos (grupamentos amino da lisina e da arginina, amino terminal, carboxílicos dos ácidos aspártico e glutâmico, hidroxilas da serina e da treonina e os sulfídricos da cisteína) podem ser envolvidos nas ligações covalentes formadas (PEREZ et al., 2007 *apud* MOREIRA, 2014).

Para a imobilização, o suporte escolhido deve ser ativado para que possa interagir com os grupos funcionais da enzima (MENDES et al., 2011). No processo

de ativação, os grupos funcionais do suporte são modificados a intermediários reativos que poderão se ligar a enzima alvo (FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ; SANROMÁN; MOLDES, 2012). Os principais agentes ativadores de suporte são glutaraldeído, glicidol e epícloridrina, sendo a eficiência da ativação variável conforme as características do suporte e da enzima a ser imobilizada (MENDES; CASTRO; GIORDANO, 2013).

O glutaraldeído, principal agente ativador conhecido, é um produto químico que pode ser utilizado em várias aplicações industriais, como biocida no tratamento de água, fabricação de papel, celulose e óleo, na fabricação de filmes de raios-X e também na imobilização de enzimas (LEUNG, 2001). Em seu estado natural, o glutaraldeído pode ser encontrado na forma de um líquido espesso oleoso ou de cristais incolores e possui um cheiro característico de aldeídos (SANTANA et al., 2009 *apud* NOGUEIRA, 2012). Sua utilização como ativador se deve a presença de dois grupamentos aldeído em sua estrutura (Figura 6a), que favorecem a interação com grupos amino. Sua atuação, ligando o suporte e a enzima, ocorre com a formação de uma base de Schiff (C=N) com grupos aldeído do glutaraldeído enquanto o outro grupamento permanece livre para ser ligado à enzima (MONTEIRO JR, 1999, *apud* COSTA JUNIOR, 2008).

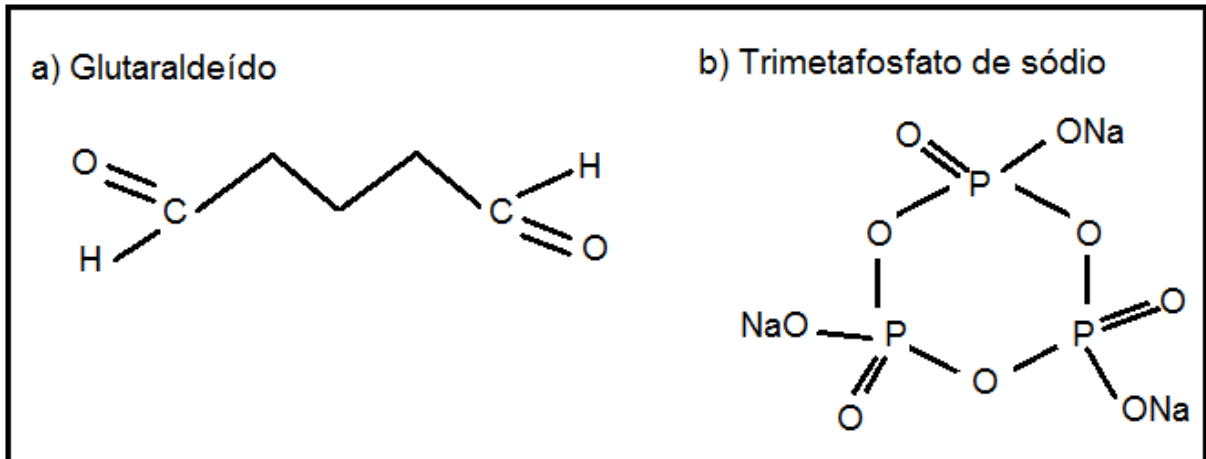
O trimetafosfato de sódio (TMP) também é um agente ativador utilizado na imobilização de enzimas e que, ao contrário do glutaraldeído, possui características não tóxicas (PAULINO, 2008). Devido a sua não toxicidade ele tem sido utilizado na indústria de alimentos para reticular amido e também na produção de sistemas de liberação cólon-específica de fármacos (MAIRE et al., 2005).

O TMP é um trifosfato cíclico (Figura 6b) (BEJENARIU et al., 2009) que não reage com grupos carboxílicos, sendo que sua utilização como ativador se deve a reação por ligações tipo éster formadas entre os grupos hidroxila de sua estrutura (AUTISSIER et al., 2010).

A interação formada entre a enzima e o suporte pode ser monopontual, quando somente uma ligação covalente se forma, ou multipontual, quando várias ligações covalentes são formadas (Figura 7). Este último tipo proporciona uma maior estabilidade, por envolver vários resíduos de aminoácidos nas ligações, e rigidez da

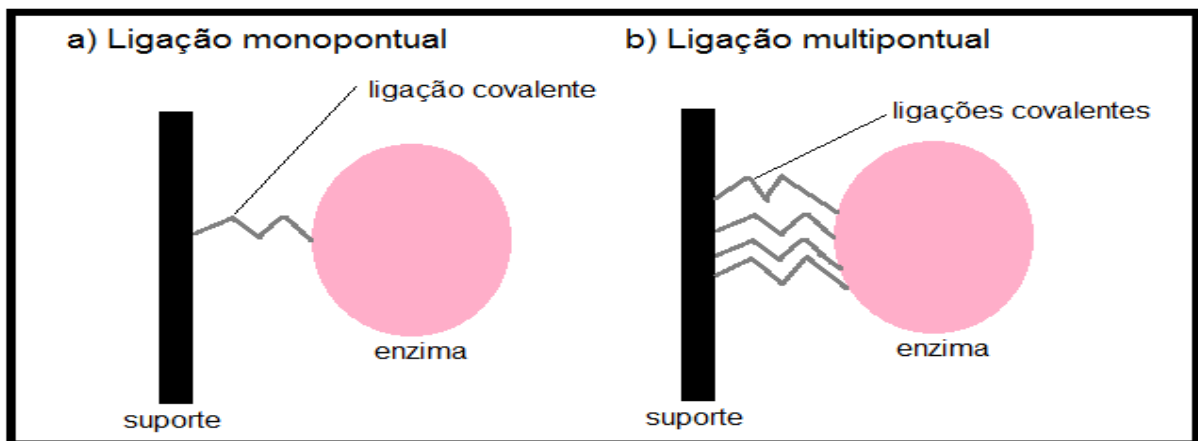
estrutura, reduzindo as mudanças conformacionais que poderiam ocasionar a inativação da enzima (MATEO et al., 2007).

Figura 6 — Estruturas moleculares do glutaraldeído e do trimetafosfato de sódio.



Fonte: o autor.

Figura 7 — Interação enzima-suporte por ligação covalente.



Fonte: o autor.

3.4 BUCHA VEGETAL (*Luffa cylindrica*): CARACTERÍSTICAS E UTILIZAÇÃO COMO SUPORTE PARA IMOBILIZAÇÃO

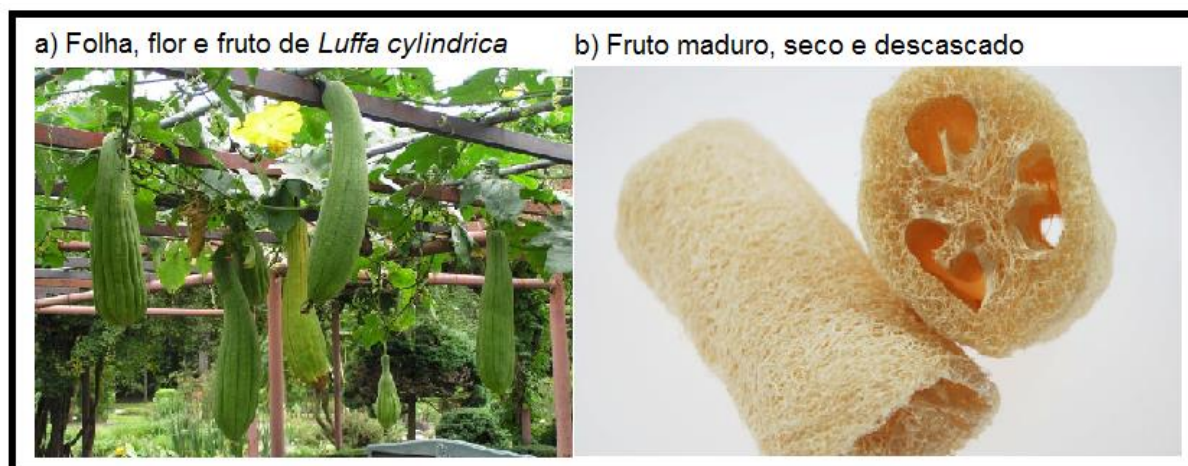
A bucha vegetal (*Luffa cylindrica*) é uma planta pertencente à família das Cucurbitáceas e ao gênero *Luffa*, que engloba sete diferentes espécies. A espécie

cylindrica é uma trepadeira herbácea, caracterizada por possuir folhas grandes, flores amarelas e fruto verde, cilíndrico e com um comprimento que pode variar de 15 a 30 cm e diâmetro de 8 a 10 cm (Figura 8a) (OBOH; ALUYOR, 2009). Essa espécie é subtropical e é facilmente encontrada na Ásia, na América Central e na América do Sul, inclusive no Brasil (TANOBE et al., 2005; DEMIR et al., 2006).

A estrutura popularmente conhecida como bucha vegetal é obtida do fruto maduro, seco e descascado da *Luffa cylindrica* (Figura 8b). Ela é formada por uma rede de fibras finas, resistentes, elásticas e macias, constituídas de celulose (60%), hemicelulose (30%) e lignina (10%) (OBOH; ALUYOR, 2009). A celulose é o principal componente da parede celular da fibra, a hemicelulose facilita a absorção de umidade e a lignina confere firmeza e rigidez a estrutura (COELHO, 2007).

As fibras lignocelulósicas presentes na bucha apresentam grupos hidroxila reativos livres, que podem reagir com outros grupos polares, como os presentes em possíveis ativadores do suporte, como o glutaraldeído, e na enzima (TITA, 2002 *apud* MOREIRA, 2014).

Figura 8 — Plantação de bucha vegetal (*Luffa cylindrica*) e a estrutura do fruto



Fonte: Figura “a” retirada do site: <http://www.pensamentoverde.com.br/dicas/aprenda-plantar-bucha-vegetal-saiba-sao-beneficios/> Acessado em 27/01/2017.

Figura “b” retirada do site: <http://www.mulher.com.br/9955/bucha-vegetal-pode-ser-criadouro-de-bacterias-sabia-como-evitar> Acessado em 27/01/2017.

A bucha vegetal é altamente porosa, possui elevado volume específico, é de baixo custo, é biodegradável, sua fonte é renovável e ela é atóxica, características

que fazem com que ela apresente uma grande variedade de aplicações industriais (OBOH; ALUYOR, 2009). Sua aplicação mais conhecida é como bucha de banho, porém ela é utilizada atualmente para vários outros fins, como para a fabricação de peneiras, matéria prima para artesanatos, componente na fabricação de amortecedores, revestimentos a prova de sons, filtros de chaminés de fábricas, para a fabricação de partes de sola de sapatos (OBOH; ALUYOR, 2009), como reforço fibroso para materiais compósitos com matriz de poliéster (BOYNAARD et al., 2003) e propileno (DEMIR et al., 2006), material absorvente de contaminantes no derramamento de óleos (ANNUNCIADO et al., 2005) e é também utilizada na construção civil como fibras de refrigeração interno (AL-SULAIMAN, 2002). Seu uso mundial engloba várias áreas como agricultura, medicina, engenharia e biotecnologia ambiental, incluindo fins industriais e também alimentos (SILVA, RANIL, FONSECA, 2012).

Mais estudos têm sido realizados para a utilização da bucha vegetal como adsorvente considerando seu teor de celulose que pode ser modificada por processos químicos relativamente simples e de baixo custo (FILHO et al., 2008). As características desse material ainda conferem a ele um alto potencial de uso como suporte para imobilização (OGBONNA; TOMIYAMA; TANAKA, 1996). Vários estudos já utilizam a bucha vegetal para a imobilização de células (Tabela 5), porém há poucos estudos em que é feita a imobilização de enzimas nesse suporte.

Tabela 5 — Estudos sobre imobilização de células em bucha vegetal

Célula imobilizada	Agente ativador	Fonte
<i>Candida guilliermondii</i> FTI 20037	Polietilenoimina, hidróxido de sódio	Coelho, 2007
<i>Botryosphaeria rhodina</i>	Não utilizado	Covizzi, 2007
<i>Bacillus firmus</i> cepa 37	Não utilizado	Ferreira et al., 2010
<i>Rhizomucor pusillus</i>	Não utilizado	Vendramini et al., 2012

Fonte: o autor.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAL

4.1.1. *Matéria prima*

Foram utilizados grãos de soja do cultivar BRS 213, fornecidos pela Dra. Mercedes C. Carrão-Panizzi, da Embrapa Trigo, Passo Fundo - RS. Os grãos foram selecionados para o uso.

4.1.2. *Reagentes*

Os reagentes utilizados foram de grau analítico.

4.2 MÉTODOS ANALÍTICOS

4.2.1 DETERMINAÇÃO DE ATIVIDADE DE β -GLICOSIDASE

Para determinação de atividade de β -glicosidase livre, foi utilizado o substrato sintético *p*-nitrofenil- β -D-glucopiranosídeo (*p*-NPG) conforme metodologia descrita por Matsuura e Obata (1993).

Para o ensaio, 1 mL de *p*-NPG 1 mM em tampão fosfato citrato 100 mM, pH 5,0 foi colocado em banho-Maria a 30°C por 10 min. Após esse período, 0,25 mL de amostra foram adicionados e mantidos novamente em banho-maria a 30°C por 30 min. Decorrido esse tempo, foram adicionados 1,25 mL de carbonato de sódio 500 mM, interrompendo a reação. O *p*-nitrofenol (*p*-NP) liberado, de cor amarelada, foi quantificado por espectrofotometria a 420 nm, utilizando uma curva padrão (*p*-NP: 0,016 a 0,160 μ mol).

Uma unidade de atividade da enzima (UA) foi definida como a quantidade de β -glicosidase que libera 1 μ mol de *p*-NP min^{-1} , nas condições de ensaio.

Análises controle de reação foram realizadas para o substrato e amostras. Dessa forma, a absorvância (ABS) líquida foi definida como:

$$\text{ABS}_{\text{líquida}} = \text{ABS}_{\text{teste}} - (\text{ABS}_{\text{controle do substrato}} + \text{ABS}_{\text{controle da amostra}})$$

Onde,

ABS_{líquida}: absorvância final;

ABSteste: absorvância referente às amostras;

ABScontrole do substrato: absorvância referente aos controles de p-NPG;

ABScontrole da amostra: absorvância referente aos controle das amostras.

4.2.2 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ESPECÍFICA DA β -GLICOSIDASE

O teor de proteínas solúveis das amostras foi quantificado pelo método de Lowry et al. (1951). Foi utilizada uma curva de calibração de albumina de soro bovino (ASB) com concentrações de 40 a 400 $\mu\text{g/mL}$.

A atividade específica da enzima foi definida como unidade de atividade da enzima por mg de proteínas (UA/mg).

4.2.3 DETERMINAÇÃO DO RENDIMENTO DA IMOBILIZAÇÃO

Os rendimentos de imobilização (RI) dos experimentos foram expressos como:

$$RI = \frac{\text{Atividade específica da enzima inicial} - \text{Atividade específica no } S_0}{\text{Atividade específica inicial da enzima}} \times 100 \quad (\text{Equação 1})$$

Onde,

RI = Rendimento de imobilização (%)

S_0 = Solução de enzima após o processo de imobilização e retirada dos pedaços de bucha

A atividade de β -glicosidase e o teor de proteínas foram determinados conforme itens 4.3 e 4.4, respectivamente.

4.3 PROCEDIMENTOS

4.3.1 Obtenção de β -glicosidase da soja

4.3.1.1 Extração de β -glicosidase

A extração de β -glicosidase foi realizada conforme Matsuura e Obata (1993). Os grãos de soja selecionados foram moídos até se tornarem uma farinha fina, na qual foi adicionado tampão fosfato de sódio 100 mM, pH 6,6, na proporção de 1:10 (peso/volume). A solução foi deixada sob agitação constante durante 1 h a 4°C e posteriormente foi centrifugada a 4 °C, 4000 rpm por 20 min. O precipitado foi descartado e o sobrenadante acidificado com HCl 100 mM até atingir pH 5,0 e novamente centrifugado sob as mesmas condições. O sobrenadante obtido foi denominado extrato bruto (EB).

4.3.1.2 Fracionamento do Extrato Bruto com Sulfato de Amônio

As proteínas do EB foram precipitadas com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ de 40 até 85 %. Para isso, ao extrato bruto foi adicionado lentamente o sulfato de amônio até atingir 85 % de saturação em duas etapas. Na primeira etapa foi feita a saturação de 0 – 40 %, com agitação constante em banho de gelo. Após a adição de todo o sal, a solução foi mantida em repouso a 4°C, por 24 h, para completa precipitação. O material foi centrifugado a 10000 rpm, 4 °C, durante 20 min. O sobrenadante foi utilizado na etapa subsequente, onde foi feita a saturação de 40- 85 %, seguindo as mesmas etapas e condições. O precipitado ($P_{40-85\%}$) foi ressuspenso em tampão fosfato-citrato 50 mM, pH 5,0, e dialisado por 24 h a 4 °C. Durante a diálise, o tampão foi trocado três vezes, sendo que nas duas primeiras vezes foi utilizado tampão fosfato-citrato 50 mM, pH 5,0 e na última troca foi adicionado tampão fosfato-citrato 100 mM, pH 5,0 permanecendo assim por 16 h. (SANTOS et al., 2013). Essa fração parcialmente purificada foi utilizada como fonte de enzima para a aplicação na bucha vegetal.

4.3.2 TRATAMENTO DA BUCHA VEGETAL

A bucha vegetal foi cortada em pedaços de 2 cm³, mantidos em água fervente por 30 min, lavados abundantemente em água corrente e então deixados por 24 h em água destilada (trocada três vezes durante esse período). Posteriormente, o material foi seco em estufa a 70 °C e armazenado a temperatura ambiente até o uso (IQBAL, et al., 2005).

Os pedaços de bucha lavados foram submetidos a seis diferentes tratamentos para testes de imobilização, sendo que o tratamento com melhores resultados foi escolhido para as etapas seguintes.

4.3.2.1 Tratamento A

A bucha foi lavada com água conforme descrito no item 4.5.

4.3.2.2 Tratamento B

A bucha lavada com água foi ativada com glutaraldeído 2,5 % por 30 min a 25 °C e agitação de 120 rpm.

4.3.2.3 Tratamento C

A bucha lavada foi tratada com hidróxido de sódio 0,5 M na proporção 1:100 (g/ mL). A mistura foi mantida em shaker, com agitação de 120 rpm a 25 °C por 24 h e posteriormente autoclavada a 121 °C por 20 min. A bucha foi então lavada com água destilada até atingir pH neutro e secada na estufa a 60 °C, até peso constante.

4.3.2.4 Tratamento D

Os pedaços de bucha lavados e tratados conforme tratamento C foram ativados com glutaraldeído 2,5 % por 30 min a 25 °C e com agitação de 120 rpm.

4.3.2.5 Tratamento E

A bucha lavada foi tratada com álcool 70 % na proporção 1:100 (g/ mL) e a mistura foi mantida em shaker, com agitação de 120 rpm, 25 °C por 24 h. Decorrido o tempo, a solução foi autoclavada por 20 min a 121 °C. A bucha foi então lavada três vezes com água destilada e seca na estufa a 60 °C, até peso constante.

4.3.2.6 Tratamento F

Os pedaços de bucha lavados e tratados, conforme o tratamento D, foram ativados com glutaraldeído 2,5 % por 30 min, a 25 °C e agitação de 120 rpm.

4.4 AVALIAÇÃO DO EFEITO DOS TRATAMENTOS DA BUCHA NO RENDIMENTO DA IMOBILIZAÇÃO

Para avaliar os efeitos dos tratamentos da bucha vegetal no rendimento de imobilização (Equação 1) foi realizado um planejamento experimental inteiramente casualizado com triplicata de cada tratamento, totalizando 18 experimentos realizados aleatoriamente. Análise de variância e teste de Tukey ($p \leq 0,05$) foram

utilizados para avaliação dos resultados. Dessa forma, o tratamento com maior rendimento de imobilização foi selecionado para ser utilizado na etapa de otimização das condições de imobilização.

A atividade de β -glicosidase e o teor de proteínas foram determinados conforme itens 4.3 e 4.4, respectivamente. O rendimento de imobilização foi expresso como

4.5 ATIVAÇÃO DO SUPORTE E IMOBILIZAÇÃO DA ENZIMA UTILIZANDO DELINEAMENTO FATORIAL E ANÁLISE DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA

4.5.1 Ativação do suporte

Os procedimentos da ativação da bucha vegetal com o glutaraldeído ou com o trimetafosfato de sódio foram realizados da mesma forma, variando as concentrações destes agentes conforme planejamento (Tabela 6). Ao suporte tratado foi adicionada a solução do agente reticulante (50 mL de solução para cada 4 pedaços de bucha) e mantidos sob agitação lenta e constante (120 rpm), a 25 °C por 30 min. Decorrido o tempo, a solução do agente reticulante foi descartada e o suporte foi lavado três vezes. Na sequência foi realizado o procedimento de imobilização.

4.5.2 Imobilização da enzima em bucha vegetal tratada

Para a imobilização da enzima foram utilizados quatro pedaços de 2 cm³ de bucha vegetal tratada adicionados de 50 mL de solução de enzima. Os fatores pH (X_1), tempo de incubação da enzima (X_2), concentração de proteínas da solução inicial de enzima (X_3) e concentração do agente espaçador (X_4) foram testados utilizando delineamento Box, Hunter e Hunter completo 2⁴ para os agentes ativadores glutaraldeído e trimetafosfato de sódio (Tabela 6). Foram realizadas cinco repetições do ponto central para cada um dos delineamentos e a função resposta foi calculada conforme modelo matemático proposto (Equação 2).

As funções resposta Y_1 (glutaraldeído) e Y_2 (trimetafosfato de sódio) (RI, %) foram avaliadas pelo modelo matemático $Y = \beta_0 + \beta_1X_1 + \beta_2X_2 + \beta_3X_3 + \beta_4X_4 + \beta_{12}X_1X_2 + \beta_{13}X_1X_3 + \beta_{14}X_1X_4 + \beta_{23}X_2X_3 + \beta_{24}X_2X_4 + \beta_{34}X_3X_4 + \varepsilon$ (equação 2), onde Y (função resposta), x_1 , x_2 , x_3 e x_4 (variáveis codificadas); β (coeficientes estimados para cada termo do modelo de superfície de resposta) e ε (erro experimental).

Tabela 6 — Variáveis independentes e níveis do planejamento Box Hunter and Hunter completo 2⁴.

Variáveis independentes	Níveis do planejamento		
	-1	0	1
X ₁ : pH	4,0	5,5	7,0
X ₂ : Incubação da enzima (h)	16	24	32
X ₃ : Proteínas da solução de enzima (mg/mL)	0,5	1,0	1,5
X ₄ : Agente ativador (%)			
Glutaraldeído	0,5	1,5	2,5
Trimetafosfato de sódio	10	20	30

Fonte: o autor.

Após a análise dos resultados obtidos nesse delineamento (Tabela 6), as variáveis pH e tempo de incubação foram fixadas em pH 4,0 para glutaraldeído e pH 7,0 para trimetafosfato de sódio e 24 h de incubação para ambos.

Para otimizar a imobilização da β -glicosidase foi realizado um delineamento composto central rotacional 2² para avaliar a influência das variáveis independentes concentração do ativador (x₁) e concentração inicial de proteínas (x₂) (Tabela 7). Foram feitos cinco pontos centrais para cada um dos delineamentos.

Tabela 7 — Variáveis independentes e níveis do delineamento composto central rotacional, com 2 variáveis

Variáveis independentes	Níveis do planejamento				
	-1,41	-1	0	1	1,41
X ₁ : Agente ativador (%)					
Glutaraldeído	1,1	1,5	2,5	3,5	3,9
Trimetafosfato de sódio	1	4	12	20	23
X ₂ : Proteínas inicial (mg/mL)					
Glutaraldeído	0,6	1	2	3	3,4
Trimetafosfato de sódio	0,04	0,2	0,6	1	1,16

Fonte: o autor.

As funções resposta Y_1 (glutaraldeído) e Y_2 (trimetafosfato de sódio) (RI, %) foram avaliadas pelo modelo matemático $Y = \beta_0 + \beta_1X_1 + \beta_2X_2 + \beta_{12}X_1X_2 + \varepsilon$ (equação 3), onde Y (função resposta), X_1 e X_2 (variáveis codificadas); β (coeficientes estimados para cada termo do modelo de superfície de resposta) e ε (erro experimental).

4.6 Análises estatísticas

Para análise estatística dos dados foi utilizado o programa *Statistica 7.0*.

REFERÊNCIAS

- AL-SULAIMAN, F. Evaluation of the performance of local fibers in evaporative cooling. **Energy Conversion and Management**, v. 43, p. 2267-2273, 2002
- AMORIM, R. V. S. et al. Chitosan from *Syncephalastrum racemosum* used as a film support for lipase immobilization. **Bioresource Technology**, v. 89, p.35-39, jan. 2003.
- ANNUNCIADO, T. R.; SYDENSTRICKER, T. H. D.; AMICO, S. C. Experimental investigation of various fibers as sobernt materials for oil apills. **Marine Pollution Bulletin**, v. 50, p. 1340-1346, 2005.
- AOAC – Association of Official Analytical Chemists (2006). **Official Methods of Analysis of AOAC International** (18 ed) Airlingtin, (Revision 1)
- AUTISSIER, A.; LE VISAGE, C.; POUZET, C. Fabrication of porous polysaccharide-based scaffolds using a combined freeze/drying/cross-linking process. **Acta Biomaterialia**, v. 6, p. 3640 – 3648, 2010.
- ÁVILA, G. A. C. e LOPES, J. F. – *Bucha vegetal: características*. 2009. Revista Globo Rural. Disponível em: <<http://revistagloborural.globo.com/GloboRural/0,6993,EEC1051338-2584-4,00.html>> Acessado em 22/12/2015.
- BALDRIAN, P.; VALASKOVA, V. Degradation of cellulose by basidiomycetous fungi. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 32, p. 501–521, 2008.
- BEJENARIU, A; POPA, M.; DULONG, V. Trisodium trimetaphosphate crosslinked xanthan networks: synthesis, swelling, loading and releasing behavior. **Polymer Bulletin**, v. 62, n. 4, p. 525 – 538, 2009.
- BELANCIC, A.; GUNATA, Z.; VALLIER, M. J.; AGOSIN, E. β -glucosidase from the native yeast *Debaryomyces vanriijiae*: purification, characterization, and its effect on monoterpene content of a Muscat grape juice. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 51, n. 5, p. 1453-1459, 2003.
- BHATIA, Y.; MISHRA, S.; BISARIA, V. S. Microbial b-glucosidases: cloning, properties and applications. **Critical Reviews in Biotechnology**, Philadelphia, v.22, p. 375-407. 2002.
- BHIRI, F.; CHAABOUNI, S.E.; LIMAN, F.; GHRIR, R.; MARZOUKI, N. Purification and biochemical characterization of extracellular β -glucosidases from the hypercellulolytic Pol6 mutant of *Penicillium occitanis*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 149, p. 169-182, 2008.
- BORGES, D. G. **Preparação de derivados de β -glicosidase por imobilização em suportes sólidos derivarizados**. 2011. 118f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal de São Carlos – UFSCar. São Carlos, 2011.
- BOYNARD, C. A.; MONTEIRO, S. N.; D'ALMEIDA, J. R. M. Aspects of álcali treatment of sponge gourd (*Luffa cylindrica*) fibers on the flexual properties of polyester matrix composites. **Journal of Applied Polymers Science**, v. 87, p. 192701932, 2003.

BRADY, D.; JORDAAN, J. Advances in enzyme immobilisation. **Biotechnology Letters**, v. 31, n. 11, p. 1639-1650, 2009.

CANILHA, L.; CARVALHO, W. de; SILVA, J. B. A. Biocatalisadores Imobilizados: Uso de células e enzimas imobilizadas em processos biotecnológicos. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, v. 9, n. 36, p.48-57, 2006.

COELHO, T. C. - Avaliação das condições de imobilização de células de *Candida guilliermondii* FTI 20037 em bucha vegetal (*Luffa cylindrica*) visando a produção de xilitol. Lorena, 2007. Escola de Engenharia de Lorena. Universidade de São Paulo.

COSTA JÚNIOR, E. S. Desenvolvimento de matriz de quitosana/PVA quimicamente reticulada para aplicação potencial em engenharia de tecido epitelial. **Tese de Doutorado**, UEM, Paraná, 2008.

COVIZZI, L.G.; GIESE, E.C.; GOMES, E.; DEKKER, R.F.H.; SILVA, R. Imobilização de células microbianas e suas aplicações biotecnológicas. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, v. 28, n. 2, p. 143-160, 2007.

COWAN, D. A.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Enhancing the functional properties of thermophilic enzymes by chemical modification and immobilization. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 49, n. 4, p. 326-346, 2011.

DALLA-VECCHIA, R.; NASCIMENTO, M. D. G.; SOLDI, V. Aplicações sintéticas de lipases imobilizadas em polímeros. **Química Nova**, v. 27, n., p. 623-630, 2004.

DEMIR, H.; ATIKLER, A.; BALKOSE, D.; TIHMINHOGLU, F. The effect of fiber surface treatments on the tensile and water sorption properties of polypropylene-luffa fibers composites. *Composites Part A37*, p. 447-456, 2006.

DIXON, R. A.; FERREIRA, D. Genistein. **Phytochemistry**, v. 60, p. 205–211, 2002.

ERDEMIR, S.; YILMAZ, M. Synthesis of calix[*n*]arene-based silica polymers for lipase immobilization. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 58, n. 1–4, p. 29-35, 2009.

FAURE, D. The Family-3 glycoside hydrolases: from housekeeping functions to host-microbe interactions. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, p.1485-1490. 2002.

FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ, M.; SANROMÁN, M. Á.; MOLDES, D. Recent developments and applications of immobilized laccase. **Biotechnology Advances**, v. 31, n. 8, p. 1808-1825, 2012.

FERREIRA, S. B. S; PAZZETO, R.; FENELON, V. C.; MATIOLI, G. Otimização da produção de ciclodextrinas a partir de microrganismo imobilizado. In: Encontro Anual de Iniciação Científica, XIX, 2010, Guarapuava. **Anais do XIX EAIC**, Guarapuava: Unicentro, 2010.

FILHO, E. C. DA S.; OLIVEIRA, F. J. V. E.; MELO, J. C. P. e AIROLDI, C. Celuloses quimicamente modificadas para remoção de cobre de soluções aquosas. **Sociedade Brasileira de Química**, Campinas – SP, 2008.

GUIDINI, C. Z.; FISCHER, J.; SANTANA, L. N. S.; CARDOSO, V. L.; RIBEIRO, E. J. Immobilization of *Aspergillus oryzae* β -galactosidase in ion exchange resins by

combined ionic-binding method and cross-linking. **Biochemical Engineering Journal**, v. 52, n. 2–3, p. 137-143, 2010.

GRADE, L. C. Imobilização de β -glicosidase de soja em quitosana. 2011. 93f. dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Estadual de Londrina. Londrina, 2011.

HAERTER, A. C.; VOEGELE, R. T. A novel beta-glucosidase in *Uromyces fabae*: feast or fight? **Current Genetics**, v. 45, p. 96-103. 2004

HAGE, D.; RUHN, P. An Introduction to Affinity Chromatography. In: Hage, D. S. (Ed.). **Handbook of Affinity Chromatography**. Boca Raton: CRC Press, p.3-13, 2005. (Chromatographic Science Series).

HAN, Y.; CHEN, H. Characterization of β -glucosidase from corn stover and its application in simultaneous saccharification and fermentation. **Bioresource Technology**, v.99, p.6081–6087, 2008.

HANEFELD, U.; GARDOSI, L.; MAGNER, E. Understanding enzyme immobilisation. **Chemical Society Reviews**, v. 38, n. 2, p. 453-468, 2009.

HAYASHI, S.; YAGI, K.; ISHIKAWA, T.; KAWASAKI, M.; ASAI, T.; PICONE, J.; TURNBULL, C.; HIRATAKE, J.; SAKATA, K.; TAKADA, M.; OGAWA, K.; WATANABE, N. Emission of 2-phenylethanol from its β -D-glucopyranoside and the biogenesis of these compounds from [2H8] L-phenylalanine in rose flowers. **Tetrahedron**, v. 60, p. 7005-7013. 2004.

HODGSON, R. J.; CHEN, Y.; ZHANG, Z.; TLEUGABULOVA, D.; LONG, H.; ZHAO, X.; ORGAN, M.; BROOK, M. A.; BRENNAN, J. D. Protein-Doped Monolithic Silica Columns for Capillary Liquid Chromatography Prepared by the Sol–el Method: Applications to Frontal Affinity Chromatography. **Analytical Chemistry**, v. 76, n. 10, p. 2780-2790, 2004.

HOMAEI, A. A., SARIRI, R., VIANELLO, F., STEVANATO, R. Enzyme immobilization: an update. **Journal of Chemical Biology**, v. 6, p. 185 – 205, 2013.

HSIEH, M. C.; GRAHAM, T. L. Partial purification and characterization of a soybean beta-glucosidase with high specific activity towards isoflavone conjugates. **Phytochemistry**, v. 58, p. 995-1005, 2001.

IQBAL, M.; SAEED, A.; EDYVAN, R. G. J.; O’SULLIVAN, B.; STYRING, P. Production of fungal biomass immobilized loofa sponge (FBILS)-discs for the removal of heavy metal ions and chlorinated compounds from aqueous solution. **Biotechnology Letters**, v. 27, p. 1319 – 1323, 2005.

KATO, M.; SAKAI-KATO, K.; MATSUMOTO, N.; TOYO’OKA, T. A Protein-Encapsulation Technique by the Sol–el Method for the Preparation of Monolithic Columns for Capillary Electrochromatography. **Analytical Chemistry**, v. 74, n. 8, p. 1915-1921, 2002.

KAYA, M.; ITO, J.; KOTAKA, A.; MATSUMURA, K.; BANDO, H.; SAHARA, H.; OGINO, K.; SHIBASAKI, S.; KURODA, K.; UEDA, M.; KONDO, A.; HATA, Y. Isoflavone aglycones production from isoflavone glycosides by display of β -

glucosidase from *Aspergillus oryzae* on yeast cell surface. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 79, p. 51-60, 2008.

KHAN, S.; LINDAHL, S.; TURNER, C.; KARLSSON, E. N. Immobilization of thermostable β -glucosidase variants on acrylic supports for biocatalytic processes in hot water. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 80, p. 28– 38, 2012.

SILVA, B. P.; KISCHKEL, B.; SANTOS, N. R.; COSTA, A. I. C.; BENEDICTO, G. B.; MONGE NETO, A. A. Triagem de tratamento de *Luffa cylindrica* para imobilização de *Saccharomyces cerevisiae* visando a produção de invertase. In: Congresso Paranaense de Microbiologia, II, Londrina. **Anais do II Congresso Paranaense de Microbiologia**, Londrina: UEL, 2015.

NELSON, D. L.; COX, M. M. Princípios de bioquímica de Lehninger. Porto Alegre: Artmed, 2011. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v. 193, p. 265–275, 1951.

MACARIO, A.; MOLINER, M.; CORMA, A.; GIORDANO, G. Increasing stability and productivity of lipase enzyme by encapsulation in a porous organic–inorganic system. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 118, n. 1–3, p. 334-340, 2009.

MAICAS, S.; MATEO, J. J. Hydrolysis of terpenyl glycosides in grape juice and other fruit juices: a review. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 67, p. 322-335, 2005.

MAIRE, M.; LOGEART-AVRAMOGLU, D.; DEGAT, M. C. Retention of transforming growth factor β 1 using functionalized dextran-based hydrogels. **Biomaterials**, v. 26, n. 14, p. 1771 – 1780, 2005.

MAITAN, G. P. **Produção, purificação e caracterização de β -glicosidases livre e imobilizada de *Debaryomyces hansenii* UFV-1**. 2011, 105f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica Agrícola) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2011.

MALLIK, R.; HAGE, D. S. Affinity monolith chromatography. **Journal of Separation Science**, v. 29, n. 12, p. 1686-1704, 2006.

MATEO, C.; PALOMO, J. M.; FERNANDEZ-LORENTE, G.; GUIBAN, J. M.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, n. 6, p. 1451-1463, 2007.

MATSSURA, M.; OBATA, A. β -Glucosidases from soybeans hydrolyse daidzin and genistin. **Journal of Food Science**, v. 58, n. 1, p. 144-147, 1993.

MAZZEI, R.; GIORNO, L.; PIACENTINI, E.; MAZZUCA, S.; DRIOLI, E. Kinetic study of a biocatalytic membrane reactor containing immobilized β -glucosidase for the hydrolysis of oleuropein. **Journal of Membrane Science**, v. 339, p. 215-223, 2009.

MENDES, A. A.; OLIVEIRA, P. C. D.; CASTRO, H. F. D.; GIORDANO, R. D. L. C. Aplicação de quitosana como suporte para a imobilização de enzimas de interesse industrial. **Química Nova**, v. 34, n., p. 831-840, 2011.

MENDES, A. A.; CASTRO, H. F. de; GIORDANO, R. de L. C. Triagem de suportes orgânicos e protocolos de ativação na imobilização e estabilização de lipase de *Thermomyces lanuginosus*. **Química Nova**, v. 36, n. 2, p.245-251, jan. 2013.

MESSING, R. A. Immobilized enzymes for industrial reactors. **Academic Press**: New York, 232 p., 1975.

MILETIĆ, N.; VU OVIĆ, Z.; NASTASOVIĆ, A.; LOOS, . Macroporous poly(glycidyl methacrylate-co-ethylene glycol dimethacrylate) resins—Versatile immobilization supports for biocatalysts. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 56, n. 4, p. 196-201, 2009.

NÉMETH, K.; PLUMB, G. W.; BERRIN, J. G.; JUGE, N.; JACOB, R.; NAIM, H. Y.; WILLIAMSON, G.; SWALLOW, D. N.; KROON, P. A. Deglycosylation by small intestinal epithelial cell β -glucosidases is a critical step in the absorption and metabolism of dietary flavonoid glycosides in humans. **European Journal of Nutrition**, Darmstadt, v. 42, p. 29-42, 2003.

NELSON, D. L.; COX, M. M. Lehninger: Princípios de bioquímica. São Paulo: Savier, 5 ed., 2011.

NISHA, S., GOBI, N. A Review on methods, application and properties of immobilized enzymes. **Chemical Science Review and Letters**, v. 1, n. 3, p. 148 – 155, 2012.

OBOH, I. O. e ALUYOR, E. O. - *Luffa cylindrica* - an emerging cash crop. Nigéria, **African Journal of Agricultural Research**, v. 4, n. 8, p. 684-688, 2009.

OGBONNA, J. C.; TOMIYAMA, S.; TANAKA, H. Development of a method for immobilization of non flocculating cells in loofa (*Luffa cylindrica*) sponge. **Process Biochemistry**, London, v.31, n.8, p737-744, 1996.

OGBONNA, J. C.; LIU, Y. C.; LIU, Y. K. AND TANAKA, H. Loofa (*Luffa cylindrica*) sponge as a carrier for microbial cell Immobilization. **J. Ferment.Bioeng.**, v. 78, p. 437-442, 1994.

OPARISSI, R.; KETUDAT-CAIRNS, J. R.; AKIYAMA, T.; WARA-ASWAPATI, O.; SVASTI, J.; ESEN, A. Characterization of a rice β -glucosidase highly expressed in flower and germinating shoot. **Plant Science**, v. 165, p. 627-638, 2003.

PALMERI, R.; SPAGNA, G. β -Glucosidase in cellular and acellular form for winemaking application. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, p. 382–389, 2007.

PAULINO, A T. Produção de adsorventes não convencionais e aplicação na remediação de águas efluentes industriais. **Tese de Doutorado**, Doutor em Ciências, UEM, Paraná, 2008.

PONTOH, J.; LOW, N. H. Purification and characterization of β -glucosidase from honey bees (*Apis mellifera*). **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v. 32, p. 679-690, 2002.

- POÇAS, E. C.; BUZATO, J.B.; CELLIGOI, M.A.P.C.; CAMILIOS NETO, D. Aplicação de bucha vegetal (*Luffa Cylindrica*) como suporte para produção de xarope de açúcar invertido. **Semina: Ciências Exatas e da Tecnológicas**, v.25, n.1, p. 53 – 58, 2004.
- POGORZELSKI, E.; WILKOWSKA, A. Flavour enhancement through enzymatic hydrolysis of glycosidic aroma precursors in juices and wine beverages: a review. **Flavor and Fragrance Journal**, v. 22, p. 252-254, 2007.
- PRADELLA, J. G. C. Reatores com células imobilizadas. In: SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. **Biotecnologia Industrial**, São Paulo: ed. Edgard Blucher, cap. 16, p. 355-372, 2001.
- RESHMI, R.; SUGUNAN, S. Improved biochemical characteristics of crosslinked β -glucosidase on nanoporous silica foams. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 85, n. 86, p. 111-118, 2013.
- RUEGGER, M. J. S.; TAU-K-TORNISIELO, S. M. Atividade da celulase de fungos isolados do solo da Estação Ecológica de Juréia-Itatins, São Paulo, Brasil. **Revista brasileira de Botânica**, v. 27, n. 2, p. 205-211, 2004.
- SANTOS, R. F.; OLIVEIRA, C. F.; VÁREA, G. S.; ORRADI DA SILVA, M. L. C.; IDA, E. I.; MANDARINO, J. M. G.; CARRÃO-PANIZZI, M. C.; RIBEIRO, M. L. L. Purification and characterization of soy cotyledon β -glucosidase. **Journal of Food Biochemistry**, v 37, p. 302-312, 2013
- SARRY, J. E.; GÜNATA, Z. Plant and microbial glycoside hydrolases: volatile release from glycosidic aroma precursors. **Food Chemistry**, v. 87, p. 509-521. 2004.
- SATHISHKUMAR, M.; JEONG, E.S.; YUN, S.E.; MUN, S.P.; RUSLING, J.F. Biocontinuous microemulsion as reaction medium for the β -glucosidase-catalyzed synthesis of n-hexyl- β -D-glucopyranoside. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 42, p. 252-258, 2008.
- SESTELO, A. B. F.; POZA, M.; VILLA, T. G. β -glucosidase activity in a *Lactobacillus plantarum* wine strain. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, New York, v. 20, p. 633-637, 2004.
- SETCHELL, K. D. R.; BROWN, N. M.; ZIMMER-NECHEMIAS, L.; BRASHEAR, W. T.; WOLFE, B. E.; KIRSCHNER, A. S.; HEUBI, J. E. Evidence for lack of absorption of soy isoflavone glycosides in humans, supporting the crucial role intestinal metabolism for bioavailability. **American Journal of Nutrition**, v. 76, p. 447-453, 2002.
- SHELDON, R. A. Enzyme Immobilization: The Quest for Optimum Performance. **Advanced Synthesis & Catalysis**, v. 349, n. 8-9, p. 1289-1307, 2007.
- SHELDON, R. A.; VAN PELT, S. Enzyme immobilization in biocatalysis: why, what and how. **Chemical Society Reviews**, v. 42, n. 15, p. 6223 – 6235, 2013.
- SILVA, M. W. K.; RANIL, R. H. G.; FONSEKA, R. *Luffa cylindrica* (L.) M. Roemer Sponge Gourd-Niyan wetakolu): An Emerging High Potential Underutilized Cucurbit. **Trop Agric Res.**v. 23, n.2, p. 186 – 191, 2012.

SONIA, K. G.; CHADHA, B. S.; BADHAN, A. K.; SAINI, H. S.; BHAT, M. K. Identification of glucose tolerant acid active β -glucosidases from thermophilic and thermotolerant fungi. **World J. Microbiology Biotechnology**, v. 24, p. 599-604, 2008.

SU, E.; XIA, T.; GAO, L.; DAI, Q.; ZHANG, Z. Immobilization of β -glucosidase and its aroma-increasing effect on tea beverage. **Food and Bioproducts Processing**, v. 88, p. 83–89, 2010.

TALBERT, J. N.; GODDARD, J. M. Enzymes on material surfaces. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 93, n. 0, p. 8-19, 2012.

TANOBE, V. O. A.; SYDENSTRICKER, T. H. D.; MURANO, M.; AMICO, S. C. A comprehensive characterization of chemically treated Brazilian sponge gourds (*Luffa cylindrica*). **Polymer testing**, 2005.

VAIDYA, N. A., MATHIAS, K., ISMAIL, B., HAYES, K. D., CORVALAN, C. M. Kinetic modeling of malonylgenistin and malonyldaidzin conversions under alkaline conditions and elevated temperatures. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p. 3408–3413, 2007.

VAN SOEST, O. J.; ROBERTSON, J. B.; LEWIS, B. A. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 74, n. 10, p. 3583-3587, 1991.

VENDRAMINI, P. H.; OHE, T. H. K.; BORGES, J. P.; BOSCOLO, M.; GOMES, E.; SILVA, R.; THOMÉO, J. C.; FERRAREZI, A. L. Produção de biodiesel etílico catalisado por lipases presentes nas hifas imobilizadas do fungo termofílico *Rhizomucor pusillus*. Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 35, 2012.

VIEIRA, M. F.; VIEIRA, A. M.; ZANIN, G. M.; TARDIOLI, P. W.; MATEO, C.; GUISSÁN, J. M. β -glucosidase immobilized and stabilized on agarose matrix functionalized with distinct reactive groups. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 69, p. 47-53, 2011

YAN, J.; PAN, G.; DING, C.; QUAN, G. Kinetic and thermodynamic parameters of β -glucosidase immobilized on various colloidal particles from a paddy soil. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 79, p. 298–303, 2010.

ZALUSKI, F. **Imobilização de β -glicosidase em quitosana visando a melhora do perfil aromático de vinhos**. 2015. 42f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal do Rio Grange do Sul – UFRGS. Porto Alegre, 2015.

ZHANG, Y.; ZHANG, Y.; JIANG, J.; LI, L.; YU, C.; HEI, T. Surface derivatization with spacer molecules on glutaraldehyde-activated amino-microplates for covalent immobilization of β -glucosidase. **Applied Surface Science**, n. 57, p. 2712–2716, 2011.

ZHANG, D. Y.; ZU, Y. G.; FU, Y. J.; LUO, M.; WANG, W.; GU, C. B.; YAO, X. H. Application of immobilized enzymes to accelerate the conversion of genistin to genistein in pigeon pea root extracts and the evaluation their antioxidant activity. **Industrial Crops and Products**, n. 42, p. 409– 415, 2013.

ZHENG, M.-M.; LU, Y.; DONG, L.; GUO, P.-M.; DENG, Q.-C.; LI, W.-L.; FENG, Y.-Q.; HUANG, F.-H. Immobilization of *Candida rugosa* lipase on hydrophobic/strong cationexchange functional silica particles for biocatalytic synthesis of phytosterol esters. **Bioresource Technology**, v. 115, n. 0, p. 141-146, 2012.

ZHOU, Z.; INAYAT, A.; SCHWIEGER, W.; HARTMANN, M. Improved activity and stability of lipase immobilized in cage-like large pore mesoporous organosilicas. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 154, n. 0, p. 133-141, 2012.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos estão apresentados na forma de artigo científico intitulado “Imobilização de β -glicosidase em bucha vegetal (*Luffa cylindrica*)” que será submetido à revista Química Nova.

IMOBILIZAÇÃO DE β -GLICOSIDASE DE SOJA EM BUCHA VEGETAL (*Luffa cylindrica*)

Ana C. V. Ferreira^a, Amanda Aleixo Moreira^a, Mara L. L. Ribeiro^{a,*}

^aDepartamento de Bioquímica e Biotecnologia, Universidade Estadual de Londrina, 86.057-970, Londrina – PR, Brasil.

-----*marque uma alternativa, não apague o texto em azul*-----

--

() Manuscrito com material suplementar

(x) Manuscrito sem material suplementar

*e-mail: maraluciaribeiro@uel.br

IMMOBILIZATION OF SOYBEAN β -GLYCOSIDASE IN LOOFA SPONGES (*Luffa cylindrica*)

The loofa sponge was used as support for β -glycosidase immobilization, proposing a stable catalytic system for industrial use. β -glycosidase was extracted from soybeans, partially purified by fractional precipitation with ammonium sulfate and immobilized by covalent binding in washed and activated loofa sponge. The activation was done with two different reagents: glutaraldehyde and sodium trimetaphosphate. The immobilization conditions were optimized by response surface methodology, and the immobilization yield was evaluated. The immobilization yield for glutaraldehyde was 103 % and for sodium trimetaphosphate was 93 %. The optimum conditions for glutaraldehyde were 24 h incubation, pH 4,0 , 2 mg/mL initial protein and activation with 2,5 % glutaraldehyde. For sodium trimetaphosphate the optimal conditions were 24 h of incubation, pH 7,0, 0,6 mg / mL of initial protein and activation with 12% sodium trimetaphosphate. Both activators were efficient for the activation of the vegetal bush for β -glucosidase immobilization.

Keywords: loofa sponge, betaglucosidase, immobilization

INTRODUÇÃO

As β -glicosidasas (β -D-glicosídeo hidrolases, E.C. 3.2.1.21) são um grupo de enzimas que atuam em ligações glicosídicas, presentes em dissacarídeos, oligossacarídeos e outros glicosídeos conjugados, hidrolisando-as e liberando glicose (BHATIA, 2002). Nos vários organismos onde são encontradas, as β -glicosidasas apresentam diversas funções, e é essa diversidade que possibilita sua utilização em diferentes áreas e processos industriais. Porém, seu uso ainda é limitado devido à instabilidade de sua estrutura, dificuldade de separação da enzima do produto final e a impossibilidade de sua recuperação para aplicações repetidas (NISHA; GOBI, 2012; SHELDON; VAN PELT, 2013). Uma alternativa para a recuperação da enzima seria a sua imobilização.

A imobilização de enzimas é um processo que consiste basicamente na ligação de uma enzima a um suporte, com o objetivo de manter a sua atividade catalítica (CANILHA; CARVALHO; SILVA, 2006). Esse processo pode trazer vantagens para a indústria, como por exemplo a maior resistência das enzimas às condições adversas dos meios reacionais, a possibilidade de reutilização, a redução dos custos, e a sua ausência no produto final, evitando possíveis alterações de sabor, odor e textura (PRADELLA, 2001; BRADY; JORDAAN, 2009).

O processo de imobilização pode ser feito por quatro diferentes métodos: imobilização por confinamento, por encapsulação, por adsorção ou por ligação covalente (FERNANDÉZ-FERNENDÉZ; SANROMÁN; MOLDES, 2013). A escolha deve ser feita analisando as características dos agentes envolvidos — enzima e suporte — além do custo total do procedimento, a possível toxicidade dos agentes envolvidos, a estabilidade operacional, as características finais e a aplicação desejada (DALLA-VECCHIA; NASCIMENTO; SOLDI, 2004; MENDES et al., 2011).

O método de imobilização por ligação covalente exige o tratamento do suporte com reagente ativador, que vai ligar a enzima ao suporte de maneira estável (MENDES et al., 2011), como o glutaraldeído, reagente mais utilizado para esse processo (LEUNG, 2001). Além dele, o trimetafosfato de sódio (TMP) é um reagente que também pode ser utilizado como ativador para a imobilização de enzimas. Ele possui características não tóxicas e por isso seu uso é mais amplo, tendo sido utilizado na indústria de alimentos e na indústria farmacêutica na liberação cólon-específica de fármacos (MAIRE et al., 2005).

Outro fator muito importante no processo de imobilização de enzimas é a escolha adequada do suporte. O suporte deve ter elevada área superficial, ser permeável, estável química e

mecanicamente às condições operacionais, regenerável, ter baixo custo e ter uma morfologia e composição favoráveis ao processo (TALBERT, 2012). A bucha vegetal é um material que se adequa a esses requisitos.

A bucha vegetal (*Luffa cylindrica*), facilmente encontrada no Brasil (DEMIR et al., 2006), é formada por uma rede de fibras finas, resistentes, elásticas e macias, constituídas de celulose, hemicelulose e lignina. É um material altamente poroso, de elevado volume específico, biodegradável, de baixo custo, proveniente de fonte renovável e atóxico, características que a tornam uma boa opção como suporte para imobilização de enzimas (OBOH; ALUYOR, 2009).

Dessa forma, considerando que a imobilização de β -glicosidase pode favorecer sua aplicação industrial, possibilitando o seu reuso e diminuindo custos, e que a bucha vegetal possui as características adequadas de um suporte, o objetivo desse trabalho foi a imobilização de β -glicosidase de soja em bucha vegetal (*Luffa cylindrica*).

PARTE EXPERIMENTAL

1. Materiais

Como matéria prima para a obtenção de β -glicosidase foram utilizados grãos de soja do cultivar BRS 213, fornecidos pela Dra. Mercedes C. Carrão-Panizzi, da Embrapa Trigo, Passo Fundo - RS. Os grãos danificados, manchados e materiais estranhos foram removidos. Os demais reagentes utilizados foram de grau analítico.

2. Obtenção da β -glicosidase

A extração de β -glicosidase dos grãos de soja foi realizada conforme Matsuura e Obata (1993). Os grãos foram moídos até se tornarem uma farinha fina. À farinha de soja foi adicionado tampão fosfato de sódio 100 mM, pH 6,6, na proporção de 1:10 (peso/volume). A solução foi deixada sob agitação constante durante 1 h a 4°C e posteriormente foi centrifugada a 4 °C, 10000 x g por 20 min. O precipitado foi descartado e o sobrenadante acidificado com HCl 100 mM até atingir pH 5,0 e novamente centrifugado sob as mesmas condições. O sobrenadante obtido foi denominado extrato bruto (EB).

Para purificação parcial da enzima foi feita precipitação fracionada com sulfato de amônio até 85%. Para isso, ao extrato bruto foi adicionado o sulfato de amônio até atingir 85 % de

saturação em duas etapas, 0 – 40 % e 40 – 85%. O precipitado da última etapa (P40–85%), foi ressuspenso em tampão fosfato-citrato 50 mM, pH 5,0 e submetido a diálise por 24 h a 4 °C (SANTOS et al., 2013). Essa fração parcialmente purificada foi denominada de extrato de enzima (EE) e utilizada para imobilização de β -glicosidase em bucha vegetal.

3. Determinação de atividade da β -glicosidase e sua atividade específica

Para determinação de atividade de β -glicosidase livre, foi utilizado o substrato sintético *p*-nitrofenil- β -D-glucopiranosídeo (*p*-NPG) conforme metodologia descrita por Matsuura e Obata (1993).

Para análise de atividade de β -glicosidase, 1 mL de *p*-NPG 1 mM em tampão fosfato citrato 100 mM, pH 5,0 foi colocado em banho-Maria a 30°C por 10 min. Após esse período, 0,25 mL de EE foram adicionados e mantidos novamente em banho-maria a 30°C por 30 min. Decorrido esse tempo, foram adicionados 1,25 mL de carbonato de sódio 500 mM. O *p*-nitrofenol (*p*-NP) liberado foi quantificado por espectrofotometria a 420 nm, utilizando uma curva padrão de 0,016 - 0,160 μ mol.

Uma unidade de atividade da enzima (UA) foi definida como a quantidade de β -glicosidase que libera 1 μ mol de *p*-NP min^{-1} , sob as condições de ensaio.

Para determinação da atividade específica da enzima o teor de proteínas foi determinado pelo método de Lowry et al. (1951). Foi utilizada uma curva de calibração com albumina de soro bovino (ASB) com concentrações de 40 a 400 μ g/mL. A atividade específica da enzima foi definida como unidade de atividade da enzima por mg de proteínas (UA/mg).

4. Tratamentos da bucha vegetal

A bucha vegetal foi cortada em pedaços de 2 cm^3 , mantidos em água fervente por 30 min, lavados abundantemente em água corrente e então deixados por 24 h em água destilada (trocada 3 vezes durante esse período). Posteriormente, o material foi seco em estufa a 70 °C e armazenado até o uso (IQBAL, et al., 2005).

A bucha lavada foi submetidos a seis diferentes tratamentos para testes de imobilização (Tabela 1), sendo que o tratamento com melhores resultados foi escolhido para as etapas seguintes.

Tabela 1: condições utilizadas para os diferentes tratamentos da bucha vegetal para testes de imobilização

Identificação do tratamento	Tratamento	Uso de ativador (glutaraldeído 2,5%)
A	Sem tratamento	Não
B	Sem tratamento	Sim
C	Tratamento alcalino* + autoclave***	Não
D	Tratamento alcalino* + autoclave***	Sim
E	Tratamento alcoólico** + autoclave***	Não
F	Tratamento alcoólico** + autoclave***	Sim

Fonte: o autor.

*Para o tratamento alcalino ao suporte foi adicionado hidróxido de sódio 0,5 M e **para o tratamento alcoólico foi adicionado álcool 70 %, ambos na proporção 1:100 (g/mL) sendo mantidos com agitação constante de 120 rpm, 25 °C, por 24 h. ***O suporte tratado foi autoclavado por 20 min a 121 °C.

5. Delineamentos experimentais e avaliação do rendimento de imobilização

A bucha vegetal tratada que apresentou maior rendimento de imobilização de β -glicosidase foi utilizada para análises exploratórias por delineamento Box Hunter & Hunter completo. Foi avaliada a influência das variáveis independentes pH (X1), tempo de incubação enzima-suporte (X2), concentração inicial de proteínas (X3) e concentração do agente ativador (glutaraldeído ou trimetafosfato de sódio) (X4) (Tabela 2).

Após a análise dos resultados obtidos nesse delineamento, as variáveis pH e tempo de incubação foram fixadas em pH 4,0 para glutaraldeído e 7,0 para trimetafosfato de sódio e 24 h de incubação. Para otimizar a imobilização da β -glicosidase foi utilizado um delineamento composto central rotacional 2^2 para avaliar a influência das variáveis independentes concentração do ativador (x1) e concentração inicial de proteínas (x2) (Tabela 3).

Tabela 2: Variáveis independentes e níveis do planejamento Box Hunter and Hunter completo 2^4 para imobilização de β -glicosidase.

Variáveis independentes	Níveis do planejamento		
	-1	0	1
X1 pH	4,0	5,5	7,0
X2 tempo de incubação da enzima (h)	16	24	32
X3 concentração de proteínas da solução de enzima (mg/mL)	0,5	1,0	1,5
X4 concentração do agente ativador (%)			
Glutaraldeído	0,5	1,5	2,5
Trimetafosfato de sódio	10	20	30

Fonte: o autor.

Tabela 3: Variáveis independentes e níveis do DCCR com 2 variáveis para otimização da imobilização de β -glicosidase

Variáveis independentes	Níveis do planejamento				
	-1,41	-1	0	1	1,41
X1 concentração do ativador (%)					
Glutaraldeído	1,1	1,5	2,5	3,5	3,9
Trimetafosfato de sódio	1	4	12	20	23
X2 concentração de proteínas inicial (mg/mL)					
Delineamento do glutaraldeído	0,6	1	2	3	3,4
Delineamento do Trimetafosfato de sódio	0,04	0,2	0,6	1	1,16

Fonte: o autor.

As funções resposta (Rendimento de imobilização) foram avaliadas pelo modelo matemático $y = \beta_0 + \sum \beta_i x_i^2 + \sum \beta_{ij} x_i x_j + \varepsilon$ (equação 1), onde y (função resposta), $x_i x_j$ (variáveis codificadas), β (coeficientes estimados para cada termo do modelo matemático de superfície de resposta) e ε (erro experimental).

O rendimento de imobilização foi determinado pela equação

$$RI = \frac{\text{Atividade específica da enzima inicial} - \text{Atividade específica no S0}}{\text{Atividade específica inicial da enzima}} \times 100 \text{ (equação 2)}$$

onde RI (rendimento de imobilização) e S0 (Solução de enzima após o processo de imobilização e retirada dos pedaços de bucha).

6. Ativação do suporte e imobilização da enzima

O suporte tratado foi colocado em contato com solução do agente reticulante (50 mL de solução para cada 4 pedaços de bucha) e deixados sob agitação lenta (120 rpm) e constante, a 25 °C, por 30 min.

Para a imobilização da enzima foram utilizados 4 pedaços de 2 cm³ de bucha vegetal tratada com o tratamento escolhido. Aos pedaços de bucha vegetal foram adicionados 50 mL de solução de enzima.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

1. Rendimentos de imobilização de β -glicosidase imobilizada em bucha vegetal tratada

Após a realização dos tratamentos da bucha vegetal, o rendimento da imobilização foi determinado e os dados foram analisados pelo teste de Tukey, no programa *Statistica 7.0* (Tabela 4).

Tabela 4: Rendimento de imobilização (RI) de β -glicosidase de soja em bucha vegetal modificada com tratamentos químico e térmico

Bucha vegetal	RI (%)
A (Água 100 °C)	77,2 ($\pm 4,6$) a*
B (Água 100 °C + glutaraldeído 2,5%)	82,8 (± 12) a
C (NaOH 2% + autoclave)	1,70 ($\pm 1,5$) c
D (NaOH 2% + autoclave + glutaraldeído 2,5%)	30,9 ($\pm 9,8$) b
E (Etanol 70% + autoclave)	70,4 ($\pm 0,9$) a
F (Etanol 70% + autoclave + glutaraldeído 2,5%)	65,8 (± 12) a

Condições autoclave= 121 °C por 15 min.

*Média de RI seguidas de letras iguais não diferem significativamente entre si – Tukey 5%.

Fonte: o autor.

Os rendimentos de imobilização (RI) variaram de 1,7 a 82,8 %. Pode-se observar que os tratamentos C e D apresentaram os resultados inferiores (1,7 e 30,9 %) e apresentaram diferença significativa ($p \leq 0,05$) quando comparados entre si e com os outros tratamentos. Assim, pode-se observar que o tratamento alcalino da bucha vegetal dificultou a imobilização da enzima.

Os tratamentos A e B, que consistiram da bucha lavada com água a 100 °C apresentaram os melhores resultados (77,2 e 82,8%). Indicando que a estrutura nativa da bucha vegetal já é adequada para a interação enzima-suporte. O tratamento B foi selecionado para as etapas seguintes do trabalho.

2. Rendimento de imobilização de β -glicosidase em bucha vegetal tratada: análise exploratória

2.1 Imobilização de β -glicosidase em bucha vegetal tratada e ativada com glutaraldeído

A análise de variância dos resultados indicou que a variável X_2 (tempo) e a interação das variáveis X_1 e X_2 (pH e tempo) não foram significativas ($p \geq 0,05$). Todas as outras variáveis e interações foram significativas ($p \leq 0,05$) (Tabela 5). A variável concentração de proteínas se mostrou significativa e positiva, quanto maior a quantidade de proteínas na solução inicial de imobilização, maior foi o rendimento de imobilização. O mesmo pode ser observado para a concentração de glutaraldeído, enquanto o pH apresentou-se significativo porém negativo. O coeficiente de determinação (R^2) foi de 0,81, ou seja, 81 % dos dados experimentais se ajustam adequadamente ao modelo proposto (equação 3), dessa forma, o modelo pode ser utilizado para fins preditivos.

$$Y1 = 77,48 - 47,94x_1 + 47,58x_3 + 9,16x_4 - 50,68x_1x_3 - 32,73x_1x_4 - 2,51x_2x_3 - 4,02x_2x_4 + 29,53x_3x_4 \quad (\text{equação 3})$$

O rendimento de imobilização no experimento variou entre 18 e 355 %, sendo que os resultados maiores que 100 % indicam que houve uma grande imobilização de proteínas, provavelmente com ligações cruzadas entre elas. Os dois melhores resultados foram encontrados nas mesmas condições: pH 4,0, concentração inicial de proteínas de 1,5 mg/mL e ativação feita com glutaraldeído 2,5 %, a diferença entre eles foi o tempo de incubação, porém não foi significativo.

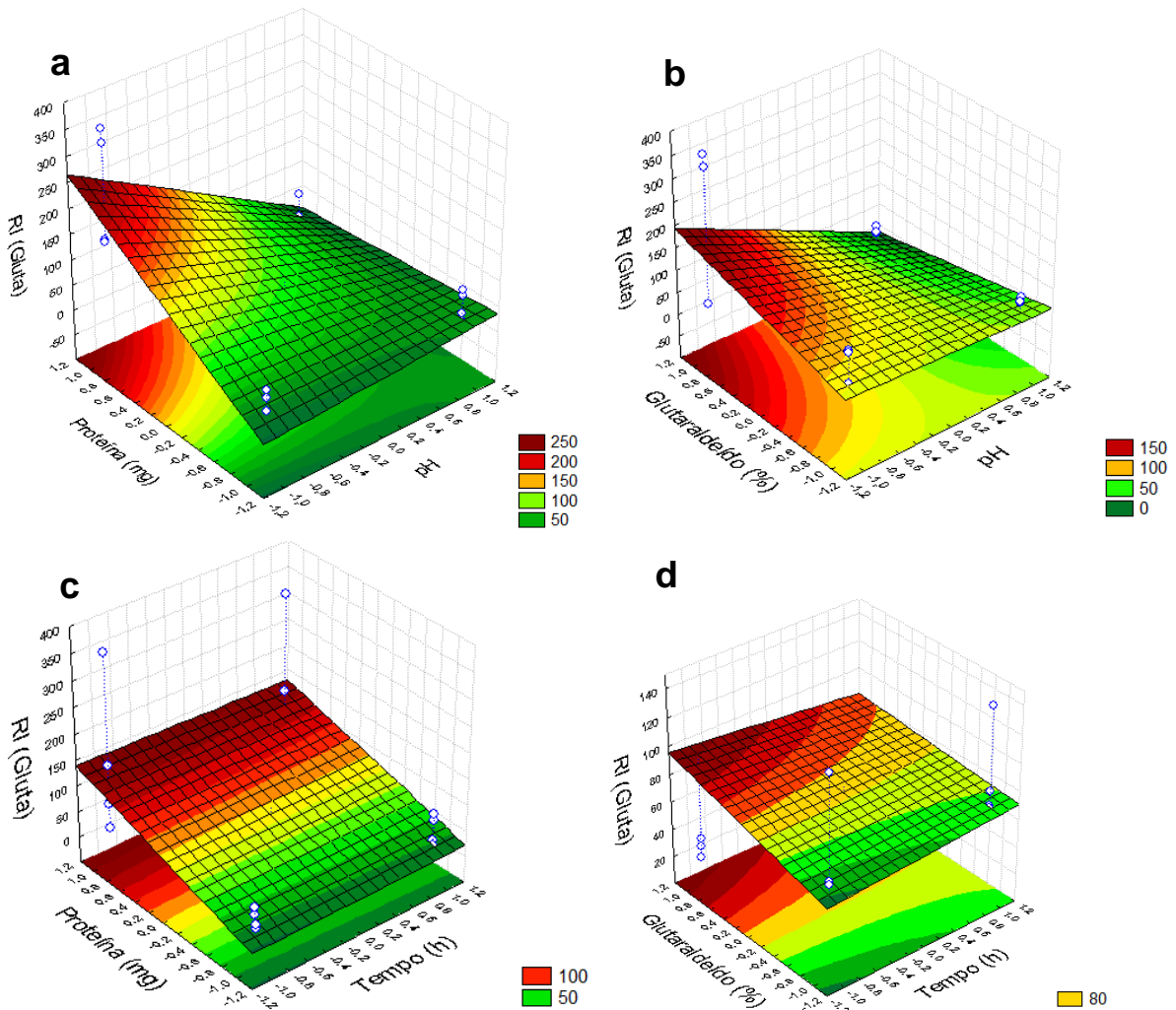
Os melhores resultados para o rendimento de imobilização da β -glicosidase de soja na bucha vegetal foram obtidos para 1,5 mg de proteínas, pH 4,0 (Figura 1a), 2,5 % de glutaraldeído (Figura 1b).

Tabela 5: ANOVA do Delineamento Box, Hunter e Hunter completo 2^4 para ativação de bucha vegetal com glutaraldeído para imobilização de β -glicosidase de soja

Fontes de Variação	SQ	GL	QM	F-value	p-value
X1 Ph	36778,8	1	36778,8	3626,53	0,000000
X2 Tempo	24,4	1	24,0	2,36	0,199159
X3 Proteína	36223,8	1	36223,8	3571,81	0,000000
X4 Glutaraldeído	1342,6	1	1342,6	132,39	0,000326
X1X2 (pH+tempo)	10,9	1	10,9	1,75	0,358427
X1X3 (pH+Proteína)	41097,0	1	41097,0	4052,33	0,000000
X1X4 (pH+Glutaraldeído)	17142,4	1	17142,4	1690,31	0,000002
X2X3 (Tempo+Proteína)	100,9	1	100,9	9,95	0,034363
X2X4 (Tempo+Glutaraldeído)	258,0	1	258,0	25,44	0,007262
X3X4 (Proteína+Glutaraldeído)	13786,2	1	13786,2	1359,37	0,000003
Erro puro	40,6	4	10,14		
Total SQ	181200,5	20			
$R^2 = 0,81$					

*Parâmetros significativos $p \leq 0,05$.

Fonte: O autor.



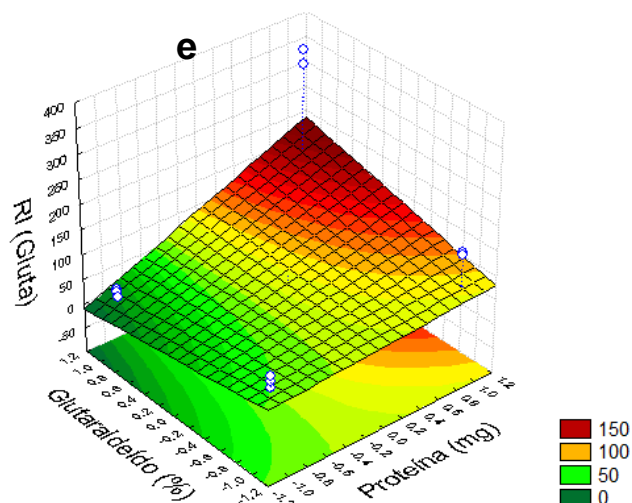


Figura 1: Superfície de resposta em função da pH/proteína (a), pH/glutaraldeído (b), tempo/proteína (c), tempo/glutaraldeído (d) e proteína/glutaraldeído (e) para o RI (%) da ativação com glutaraldeído

Fonte: o autor.

2.2 Imobilização de β -glicosidase em bucha vegetal tratada e ativada com trimetafosfato de sódio

A partir da análise dos resultados pode-se observar que todas as variáveis foram significativas ($p \leq 0,05$), porém, a interação entre as variáveis X_1X_2 , X_2X_3 e X_2X_4 não foram significativas ($p \geq 0,05$) (Tabela 6). A variável pH foi significativa e positiva, experimentos com um pH mais neutro (7,0), apresentaram maior rendimento de imobilização. O contrário pode ser observado para a concentração de trimetafosfato, experimentos onde foi feita a ativação do suporte com uma menor concentração do agente reticulante apresentaram maior rendimento, para o tempo e para a concentração de proteínas. O coeficiente de determinação (R^2) foi de 0,83, ou seja, 83 % dos dados experimentais se ajustam adequadamente ao modelo proposto (equação 4), dessa forma, o modelo pode ser utilizado para fins preditivos.

$$Y_2 = 77,64 + 55,33x_1 - 9,24x_2 - 30,28x_3 - 23,98x_4 - 26,55x_1x_3 - 22,84x_1x_4 + 12,66x_3x_4$$

(equação 4)

O rendimento de imobilização no experimento variou entre 9 e 287 %, sendo que os resultados maiores que 100 % indicam que houve uma grande imobilização de proteínas, provavelmente muitas ligações cruzadas entre elas. Os dois melhores resultados foram encontrados nas mesmas condições: pH 7,0, concentração inicial de proteínas de 0,5 mg e ativação feita com Trimetafosfato 10 %, a única diferença entre eles foi o tempo de incubação.

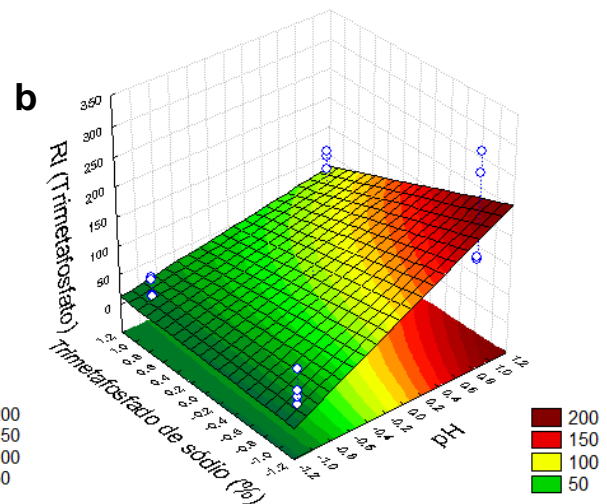
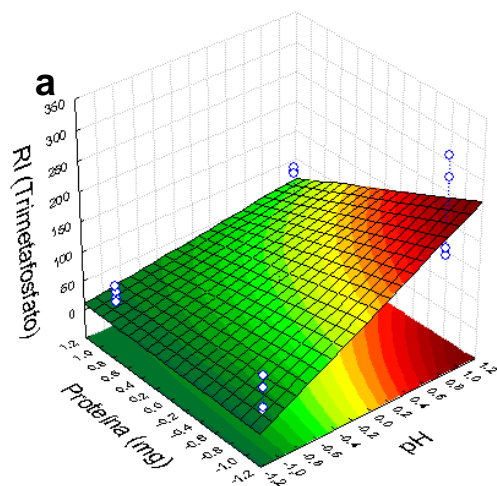
A região ótima para maior RI da β -glicosidase de soja na bucha vegetal foi para 1,5 mg de proteínas, pH 4,0 (Figura 2a), 10 % de trimetafosfato de sódio (Figura 2b).

Tabela 6: ANOVA do Delineamento Box, Hunter e Hunter completo 2^4 para ativação com trimetafosfato de sódio

Fontes de Variação	SQ	GL	QM	F-value	p-value
X1 Ph	48995,5	1	48995,5	735,99	0,000011
X2 Tempo	1364,9	1	1364,9	20,50	0,010594
X3 Proteína	14670,2	1	14670,2	220,37	0,000120
X4 Trimetafosfato de sódio	9199,3	1	9199,3	138,19	0,000300
X1X2 (pH+tempo)	174,2	1	174,2	2,62	0,181002
X1X3 (pH+Proteína)	11276,1	1	11276,1	169,39	0,000201
X1X4 (pH+Trimetafosfato de sódio)	8352,5	1	8352,5	125,47	0,000362
X2X3 (Tempo+Proteína)	102,2	1	102,2	1,54	0,283033
X2X4 (Tempo+TMP)	11,2	1	11,2	0,17	0,702771
X3X4 (Proteína+TMP)	2562,9	1	2562,9	38,50	0,003432
Erro puro	266,3	4	66,57		
Total SQ	116078,7	20			
$R^2 = 0,83$					

*Parâmetros significativos $p \leq 0,05$.

Fonte: O autor.



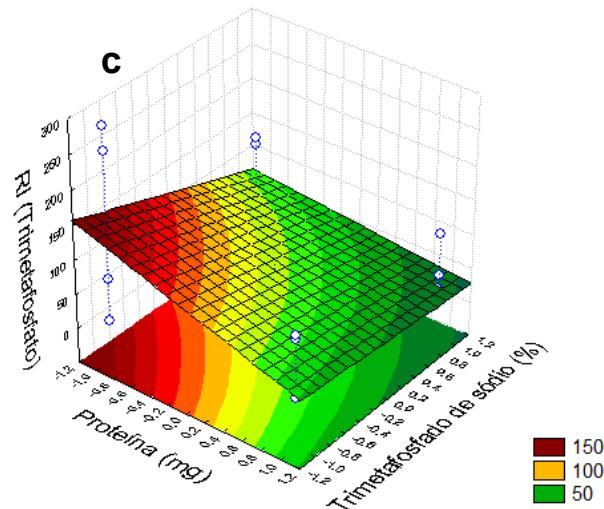


Figura 2: Superfície de resposta em função da pH/proteína (a), pH/trimetafosfato de sódio (b) e proteína/trimetafosfato de sódio (c) para o RI (%) da ativação com trimetafosfato de sódio

Fonte: o autor.

3. Rendimento de imobilização de β -glicosidase em bucha vegetal tratada: Otimização

3.1 Imobilização de β -glicosidase em bucha vegetal tratada e ativada com glutaraldeído

A partir da análise dos resultados pode-se observar que as duas variáveis analisadas apresentaram influência significativa sobre o RI ($p \leq 0,05$), porém, a interação entre elas não se apresentou significativa ($p \geq 0,05$) (Tabela 7). O coeficiente de determinação (R^2) foi de 0,91, ou seja, 91 % dos dados experimentais se ajustam adequadamente ao modelo proposto (equação 5), dessa forma, o modelo pode ser utilizado para fins preditivos.

$$Y = 99,6 - 44,03x_1 - 48,61x_2 \quad (\text{equação 5})$$

Tabela 7: ANOVA do Delineamento Composto Central 2^2 para ativação com glutaraldeído

Fontes de variação	SQ	GL	QM	F-value	p-value
X_1 concentração de glutaraldeído (%)	3370,975	1	3370,975	30,86975	0,000854*
X_2 concentração inicial de proteínas (mg/mL)	4108,813	1	4108,813	37,62651	0,000475*
X_1X_2 (glutaraldeído+proteína)	20,748	1	20,748	0,19000	0,676042
Erro puro	764,400	7	109,200		
Total SQ	8321,022	12			
$R^2 = 0,91$					

*Parâmetros significativos $p \leq 0,05$.

Fonte: O autor.

O rendimento de imobilização no experimento variou entre 32,96 e 103 %. Os melhores resultados foram encontrados na repetição do ponto central, condição que valida o experimento.

3.2 Imobilização de β -glicosidase em bucha vegetal tratada e ativada com trimetafosfato de sódio

A partir da análise dos resultados pode-se observar que somente a variável concentração de TMP apresentou influência significativa sobre o RI ($p \leq 0,05$), assim como a interação entre ambas as variáveis (Tabela 8). O coeficiente de determinação (R^2) foi de 0,89, ou seja, 89 % dos dados experimentais se ajustam adequadamente ao modelo proposto (equação 6), dessa forma, o modelo pode ser utilizado para fins preditivos.

$$Y = 91,6 - 72,5887x_1 - 62,1550x_1x_2 \quad (\text{equação 6})$$

Tabela 8: ANOVA do Delineamento Composto Central 2^2 para ativação com TMP

Fontes de variação	SQ	GL	QM	F-value	p-value
X_1 concentração de TMP (%)	9163,70	1	9163,698	31,49002	0,000806*
X_2 concentração inicial de proteínas (mg/mL)	1130,22	1	1130,222	3,88388	0,089392
X_1X_2 (TMP+proteína)	3863,24	1	3863,244	13,27560	0,008248*
Erro puro	2037,02	7	291,003		
Total SQ	18846,46	12			
$R^2 = 0,89$					

*Parâmetros significativos $p \leq 0,05$.

Fonte: o autor.

O rendimento de imobilização no experimento variou entre 0 e 93 %. Os melhores resultados foram encontrados na repetição do ponto central, condição que valida o experimento. A região ótima para imobilização da β -glicosidase nesse experimento foi com 0,6 mg/mL de proteína e ativação com TMP 12% (Figura 3).

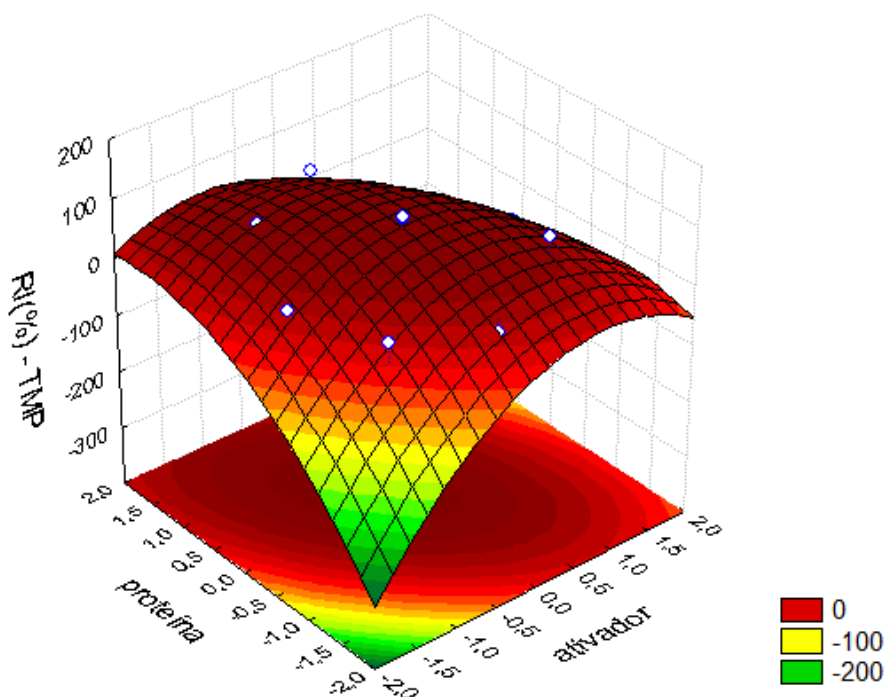


Figura 3: Superfície de resposta em função da concentração de proteína/ativador para o RI (%) da ativação com trimetafosfato de sódio

Fonte: o autor.

CONCLUSÃO

O tratamento alcalino não foi eficiente para a imobilização da β -glicosidase em bucha vegetal, sendo que a bucha vegetal somente lavada apresentou os melhores resultados. O glutaraldeído e o trimetafosfato de sódio se mostraram eficientes para ativação da bucha vegetal para imobilização, sendo o TMP uma boa alternativa para a indústria devido a sua não toxicidade.

REFERÊNCIAS

1. Bhatia, Y.; Mishra, S.; Bisaria; *Crit. Rev. Biotechnol.*, 2002, 22, 375.
2. Brady, D.; Jordaan, J.; *Biotechnol. Lett.*, 2009, 31 (11), 1639.
3. Canilha, L.; Carvalho, W. de; Silva, J. B. A.; *Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento*, 2006, 9 (36), 48.
4. Dalla-Vecchia, R.; Nascimento, M. D. G.; Soldi, V.; *Quim. Nova*, 2004, 27, 623.

5. Fernández-Fernández, M.; Sanromán, M. Á.; Moldes, D.; *Biotechnol. Adv.*, **2012**, 31(8), 1808.
6. Iqbal, M.; Saeed, A.; Edyvan, R. G. J.; O'Sullivan, B.; Styring, P.; *Biotechnol. Lett.*, **2005**, v. 27, p. 1319.
7. Leung, H. W.; *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, **2001**, 49, 26.
8. Lowry, O. H.; Rosenbrough, N. J.; Farr, A. L.; Randall, R. J.; *J. Biol. Chem.*, **1951**, 193, 265.
9. Maire, M.; Logeart-Avramoglou, D.; Degat, M. C.; *Biomaterials*, **2005**, 26(14), 1771.
10. Matsuura, M.; Obata, A.; *J. Food Sci.*, **1993**, 58(1), 144.
11. Mendes, A. A.; Oliveira, P. C. D.; Castro, H. F. D.; Giordano, R. D. L. C.; *Quím. Nova*, 34, 831.
12. Nelson, D. L.; COX, M. M. *Princípios de bioquímica de Lehninger*. Porto Alegre: Artmed, 2014. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014.
13. Nisha, S., Gobi, N.; *Chem. Sci. Rev. Lett.*, 2012, 1(3), 148.
14. Oboh, I. O.; Aluyor, E. O.; *Afr. J. Agric. Res.*, **2009**, 4(8), 684.
15. Pradella J. G. C.; *Biotecnologia Industrial*, São Paulo: ed. Edgard Blucher, cap. 16, 355, 2001.
16. Santos, R. F.; Oliveira, C. F.; Várea, G. S.; Orradi da Silva, M. L. C.; Ida, E. I.; Mandarino, J. M. G.; Carrão-Panizzi, M. C.; Ribeiro, M. L. L.; *J. Food Biochem.*, **2013**, 37, 302.
17. Sheldon, R. A.; van Pelt, S.; *Chem. Soc. Rev.*, **2013**, 42(15), 6223.
18. Talbert, J. N.; Goddard, J. M.; *Colloids Surf., B*, **2012**, 93(0), 8.

6 CONCLUSÃO

O tratamento alcalino não foi eficiente para a imobilização da β -glicosidase em bucha vegetal, sendo que a bucha vegetal somente lavada apresentou os melhores resultados. O glutaraldeído e o trimetafosfato de sódio se mostraram eficientes para ativação da bucha vegetal para imobilização, sendo o trimetafosfato uma boa alternativa para a indústria devido a sua não toxicidade.