

UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS

HENRY EVANDRO GONÇALVES GRANADO

JOÃO RICARDO GONÇALVES VIEIRA

**IMOBILIZAÇÃO DE  $\beta$ -GLICOSIDASE DO FUNGO *Thermoascus aurantiacus* POR  
LIGAÇÃO COVALENTE EM MATRIZ ORGÂNICA DE QUITOSANA E  
ALGINATO**

DOURADOS-MS

2024

HENRY EVANDRO GONÇALVES GRANADO

JOÃO RICARDO GONÇALVES VIEIRA

**IMOBILIZAÇÃO DE  $\beta$ -GLICOSIDASE DO FUNGO *Thermoascus aurantiacus* POR  
LIGAÇÃO COVALENTE EM MATRIZ ORGÂNICA DE QUITOSANA E  
ALGINATO**

Projeto de conclusão de curso apresentado ao programa de graduação em Biotecnologia da Universidade Federal da Grande Dourados como parte dos requisitos necessários à obtenção do diploma de graduação.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Fossa da Paz

DOURADOS-MS

2024

HENRY EVANDRO GONÇALVES

GRANADOJOÃO RICARDO GONÇALVES

VIEIRA

**IMOBILIZAÇÃO DE  $\beta$ -GLICOSIDASE DO FUNGO *Thermoascus aurantiacus*  
POR LIGAÇÃO COVALENTE EM MATRIZ ORGÂNICA DE QUITOSANA E  
ALGINATO**

Projeto de conclusão de curso aprovado pela banca examinadora como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia, da Universidade Federal da Grande Dourados.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Fossa da Paz

Aprovado em: 29/02/2024

**BANCA EXAMINADORA**

Documento assinado digitalmente



**MARCELO FOSSA DA PAZ**

Data: 23/07/2024 12:07:29-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

---

Prof. Dr. Marcelo Fossa da Paz

Documento assinado digitalmente



**Presidente**

**RODRIGO SIMÕES RIBEIRO LEITE**

Data: 23/07/2024 11:57:47-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

---

Prof. Dr. Rodrigo Simões Ribeiro Leite

Documento assinado digitalmente



**Membro**

**LUIZ HENRIQUE BOVI DE QUADROS**

Data: 22/07/2024 12:34:56-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

---

Luiz Henrique Bovi de Quadros

Membro

## RESUMO

O extrato enzimático retirado do cultivo em estado sólido de *Thermoascus aurantiacus* foi imobilizado em esferas de alginato de sódio e quitosana pela técnica de ligação covalente, tendo como foco, a análise da ação da  $\beta$ -glicosidase do fungo *T. aurantiacus*. A atividade da enzima nativa e imobilizada foi mensurada em diferentes temperaturas, níveis de pH e em concentrações de etanol. O pH ótimo da enzima livre foi de 4,0, enquanto que a sua forma imobilizada apresentou pH ótimo de 3,0, suportando assim, um ambiente mais ácido. A enzima imobilizada apresentou maior estabilidade na presença de etanol em comparação com enzima livre, reteve 50% da sua atividade catalítica em 15% de etanol. A enzima imobilizada reteve 50% da sua atividade depois de 4 ciclos. Os resultados obtidos no estudo demonstram que a técnica de imobilização pode tornar a enzima mais robusta para alguns parâmetros industriais.

**Palavras-chave:** ligação covalente; reutilização; suporte orgânico; indústria.

## ABSTRACT

The enzyme extract from the solid-state culture of *Thermoascus aurantiacus* was immobilized on sodium alginate and chitosan beads by the covalent binding technique, focusing on the analysis of the action of  $\beta$ -glucosidase from the fungus *T. aurantiacus*. The activity of the native and immobilized enzyme was measured at different temperatures, pH levels and ethanol concentrations. The optimum pH of the free enzyme was 4.0, while its immobilized form presented an optimum pH of 3.0, thus supporting a more acidic environment. The immobilized enzyme showed greater stability in the presence of ethanol compared to the free enzyme, retaining 50% of its catalytic activity in 15% ethanol. The immobilized enzyme retained 50% of its activity after 4 cycles. The results obtained in the study demonstrate that the immobilization technique can make the enzyme more robust for some industrial parameters.

**Keywords:** covalent bond; reuse; organic support; industry.

## 1. INTRODUÇÃO

Os fungos filamentosos podem exercer diversos papéis na biotecnologia, seja na alimentação ou na extração de suas moléculas promissoras para vários processos industriais, como as enzimas celulolíticas. Os fungos filamentosos do gênero *Thermoascus* são comumente encontrados no território brasileiro, mas especificamente no bioma amazônico. São seres heterotróficos e absorvem substâncias orgânicas de materiais em decomposição sob condições termofílicas, principalmente de material vegetal disponível no solo. O *T. aurantiacus* é uma das espécies conhecidas por produzir diversas enzimas, entre elas está a  $\beta$ -glicosidase, um catalisador imprescindível no processo de hidrólise da celulose para obtenção de glicose (McClendon *et al.*, 2012).

Os catalisadores naturais, por si só, demonstram muita eficiência e sustentabilidade, mas frequentemente não se encontram totalmente adequados para a aplicação industrial devido a fatores desnaturantes no processo, tais como, pH, temperatura, reagentes e metabólitos (Bilal *et al.*, 2017). As  $\beta$ -D-glicosídeo glucohidrolases, também conhecidas como  $\beta$ -glicosidases, fazem parte do conjunto enzimático das celulasas do fungo *T. aurantiacus* e são extremamente favoráveis para processos biotecnológicos. Elas quebram ligações  $\beta$ -glicosídicas por meio da hidrólise, seja da celobiose, liberando dois grupos menores de glicose, ou reagindo até com compostos glicosilados. Elas apresentam uma ampla gama de aplicações nas indústrias de bioetanol, alimentos e bebidas, pois ajudam na disponibilização de moléculas de glicose para diversos processos fermentativos contendo celulose, como também, podem ser utilizadas para aumentar o sabor e o aroma de bebidas devido à quebra de terpenos, flavonóides e óleos essenciais glicosilados (Tiwari, Misra e Sangwan, 2013; Raghu e Pennathur, 2018).

Neste ramo industrial, a engenharia de imobilização pode modificar positivamente a conformação das enzimas, melhorando ainda mais sua ação no meio. Com isso, as enzimas imobilizadas garantem variadas vantagens em relação às enzimas livres, além deste favorecimento reativo com o substrato, podem facilitar na etapa de purificação do produto final, separando as enzimas sem que haja contaminação. Outro ponto positivo é a capacidade de reutilização das enzimas imobilizadas em outros ciclos ou reações seguintes (Raghu e Pennathur, 2018).

A imobilização refere-se ao processo de agregar catalisadores a uma estrutura de suporte que não se dissolve, um transportador, de modo que mantenha em uma posição favorável aos eventos reacionais (Bilal *et al.*, 2017). Pode-se encontrar uma variedade de técnicas na literatura, como a encapsulação, confinamento, adsorção, reticulação e ligação covalente. Essas variedades de metodologias se dão pelas diferentes características físico-químicas que cada enzima apresenta, como também as diferentes propriedades dos substratos e as diversificadas aplicações. Um fator indispensável para a técnica de imobilização por ligação covalente é a escolha de uma matriz/suporte adequado para a técnica (Sousa *et al.*, 2017).

Para a matriz de imobilização a quitosana tem se mostrado um bom polímero, pois, de acordo com Brahmi *et al.* (2023), a quitosana é o segundo biopolímero natural mais abundante do mundo, chamando a atenção pela sua não toxicidade, biodegradabilidade e forma de obtenção, onde ocorre a desacetilação da quitina. Em meio ácido os grupos aminos distribuídos ao longo deste polímero são protonados, permitindo que reajam com moléculas carregadas negativamente, como por exemplo, o alginato de sódio, um segundo polímero que pode ser mesclado nesta matriz, ele apresenta características aniônicas e pode ser facilmente obtido, além de não apresentar toxicidade. O alginato em pH básicos e neutros se solubiliza, enquanto que em pH abaixo do ~3,65, ele tende a se precipitar devido protonação dos seus grupos carboxílicos (Pawariya *et al.*, 2023).

Com o uso da matriz e de componentes ativadores a imobilização por ligação covalente se forma com a tendência de manter as características catalíticas e reduzir a inativação das enzimas, porém como descrito por Sousa *et al.* (2017) e Pawariya *et al.* (2023) o uso de ativadores com alta reatividade como o glutaraldeído, pode acarretar a formação das bases Schiff, onde os grupos aminos se ligam aos aldeídos, formando iminas.

Diante do exposto, objetiva-se, com esse trabalho, estudar os efeitos da imobilização pela técnica de ligação covalente da  $\beta$ -glicosidase do fungo *T. aurantiacus* em suporte de quitosana e alginato de sódio, visando verificar quais parâmetros são favorecidos para a aplicação industrial.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 PRODUÇÃO ENZIMÁTICA

#### 2.1.1 Microrganismo

O fungo utilizado foi o *Thermoascus aurantiacus*, isolado de serapilheira de um fragmento de Mata Atlântica Semidecidual (Mata do Azulão) localizado em Dourados, Mato Grosso do Sul, Brasil; e mantido pela equipe do Laboratório de Enzimologia e Processos Fermentativos (LEPFER/UFGD) sendo identificado pelo Laboratório de Ecologia e Sistemática Fúngica do Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista, IB/UNESP Rio Claro, Estado de São Paulo, Brasil.

#### 2.1.2 Inóculo

Com o intuito de produzir o inóculo para a produção enzimática, o fungo foi cultivado em frascos Erlenmeyer de 250 mL, contendo 50 mL do meio Ágar Sabouraud Dextrose, sendo mantido a uma temperatura de 45 °C por um período de 48 horas. A suspensão do fungo foi obtida por meio da raspagem suave da superfície do meio de cultura, utilizando 30 mL de uma solução nutriente composta por 0,1% de sulfato de amônio, 0,1% de sulfato de magnésio hepta-hidratado e 0,1% de nitrato de amônia. A inoculação do fungo no substrato (resíduo agroindustrial) ocorreu mediante a transferência de 5 mL desta suspensão (Costa *et al.*, 2019).

#### 2.1.3 Cultivo em estado sólido para produção de $\beta$ -glicosidase

O substrato empregado no cultivo consistiu exclusivamente de farelo de trigo, sendo submetido a processos prévios de limpeza para remoção de impurezas e açúcares por meio de lavagens, seguidas de secagem a 50 °C durante 48 horas. Após a completa secagem, 5 gramas de substrato foram transferidos para frascos Erlenmeyer de 250 mL e

umedecidos com 4,5 mL da solução nutriente mencionada anteriormente. Em seguida, procedeu-se à esterilização em autoclave (20 minutos, 121 °C, 1 atm). Foi adicionada uma quantidade de 5 mL da suspensão do inóculo aos substratos, e os frascos foram mantidos a uma temperatura de 45 °C. Dessa maneira, a umidade foi mantida a 65%, enquanto a temperatura foi controlada a 45 °C, ao longo de um período de 72 horas (Costa *et al.*, 2019).

#### 2.1.4 Extração enzimática

O extrato enzimático foi obtido adicionando 50 mL de água destilada aos frascos Erlenmeyer contendo o resíduo miceliado, seguido por uma maceração de 10 minutos. Em seguida, os frascos foram agitados a 150 rpm por 1 hora. As amostras foram filtradas em tecido de *Nylon*® e submetidas à centrifugação a 1500 x g por 10 minutos. O sobrenadante resultante foi utilizado nos ensaios subsequentes (Costa *et al.*, 2019).

#### 2.1.5 Determinação da atividade enzimática da enzima livre e imobilizada

Para a determinação da atividade da  $\beta$ -glicosidase foi utilizado 50  $\mu$ L de extrato enzimático ou 2 esferas com a enzima imobilizada, 250  $\mu$ L de tampão acetato de sódio (0,1 M, pH 4,5) e 250  $\mu$ L de pNPG (p-nitrofenil  $\beta$ -D-glucopiranosídeo), mantendo essa mistura a 10 minutos em banho-maria a 50°C. A fim de paralisar a reação e interromper a atividade da enzima, foi utilizado 2 mL de carbonato de sódio (2 M) e o produto liberado foi quantificado em espectrofotômetro a 410 nm. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1  $\mu$ mol de nitrofenol por minuto de reação (De Palma-Fernandez *et al.*, 2002).

## 2.2 IMOBILIZAÇÃO DA ENZIMA

### 2.2.1 Preparo da quitosana

Na matriz de imobilização foi utilizada a quitosana obtida a partir da metodologia química alcalina adaptada de Gapsari *et al.* (2022), onde ocorre a desacetilação da quitina utilizando uma solução 50% de NaOH a 111 °C durante 1 hora na autoclave a 0,5 atm, ocorrendo assim, a remoção dos grupos acetila (COCH<sub>3</sub>) (Priyadarshi *et al.*, 2020). Dessa forma, a quitosana obtida passou por filtração utilizando papel filtro, com lavagens sequenciais em água destilada, até que a água saia limpa e transparente. O resíduo sólido foi então seco em estufa a 50 °C por 24 horas e, em seguida, ressuspendido em água destilada, para que o pH possa ser neutralizado e filtrado novamente. Após isso, o resíduo foi seco novamente em estufa a 50 °C por 24 horas. Posteriormente, misturou-se este resíduo seco em uma solução de ácido acético 10% e incubado em shaker por 48 horas, a fim de solubilizar a quitosana. Após isso, filtrou-se a solução novamente e o pH da fase líquida foi neutralizado, para permitir a precipitação da quitosana, que, por conseguinte, foi filtrada e seca mais uma vez, para obter a quitosana em pó (Brahmi *et al.*, 2023).

### 2.2.2 Preparação do gel alginato + quitosana

Para a elaboração do gel foi utilizada a metodologia modificada descrita no trabalho de Mendes *et al.* (2013), onde foi preparado o gel de alginato de sódio e quitosana na proporção de 2,5% e 1,2% respectivamente, no qual a quitosana foi dissolvida em ácido acético a 0,5% (50 mL) sob agitador magnético durante 1 hora, em seguida o alginato de sódio foi adicionado a mistura sob aquecimento e sob agitação com a ajuda de um bastão de vidro, sem deixar que fervesse até que ficasse com uma boa consistência. Com a ajuda de uma pipeta, o gel foi gotejado em uma solução de cloreto de cálcio a 2 molar em 50 mL de água destilada, configurando ao gel um formato esférico e com uma consistência mais rígida. As esferas ficaram submersas no cloreto de cálcio durante 24

horas e, após esse tempo, foram retiradas e lavadas com água destilada para retirar o excesso de cálcio.

### 2.2.3 Ativação dos suportes com glutaraldeído

A ativação da matriz de alginato/quitosana foi realizada de acordo com a modificação da metodologia de Kumar *et al.* (2017), em que ocorre a imersão das esferas em glutaraldeído a 0,25% preparado pela diluição em água destilada e em temperatura ambiente. Após 2 dias no glutaraldeído, as esferas são retiradas e lavadas repetidamente com água para remover o glutaraldeído não ligado.

### 2.2.4 Imobilização

A imobilização ocorreu a partir da modificação da metodologia de Mendes *et al.* (2013), onde o extrato enzimático foi diluído em água destilada na proporção de 1:9 (enzima:água mL), configurando um extrato diluído em 10 vezes em um volume final de 4 mL, no qual a matriz suporte foi imersa, em uma proporção de 4:100 (4 mL:100 esferas). O conjunto extrato e suporte foram deixados na incubadora B.O.D por 72 horas a 28 °C. O rendimento de imobilização foi calculado medindo as concentrações de proteínas e atividades enzimáticas nos suportes e no sobrenadante.

### 2.2.5 Rendimento de imobilização

O rendimento da imobilização é calculado pela relação entre a concentração de enzima inicial no meio pela quantidade de enzima imobilizada no suporte (Sousa *et al.*, 2017).

$$\text{(Equação 1) } RI(\%) = (U_{\text{imob}} / U_0) * 100\%$$

Onde RI é o rendimento da imobilização, U<sub>imob</sub> é a atividade enzimática das enzimas que foram imobilizadas e U<sub>0</sub> é a atividade total inicial oferecida no meio antes da imobilização.

## 2.3 CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA

### 2.3.1 Efeito do pH e da temperatura

O pH ótimo tanto da enzima livre quanto da enzima imobilizada foi determinada através de ensaios de atividade em diferentes valores de pH do tampão McIlvaine (0,1 M) variando de 3,0-8,0 a 50 °C. Para a definição da temperatura ótima, a atividade enzimática foi avaliada em diferentes temperaturas (30-80 °C), no respectivo pH ótimo. A estabilidade do pH foi determinado pela atividade enzimática da enzima em sua forma livre e da matriz de imobilização que foi previamente incubada por 24 horas a 25 °C nos tampões McIlvaine (3,0-8,0), tampão Tris-HCl (8,0-8,5), tampão Glicina-NaOH (8,5-10,5), tampão Acetato de Sódio (3,0-4,0) e tampão Borato (5,5-9,0).

A termoestabilidade foi definida pela dosagem de atividade da enzima incubada por 1h em diferentes temperaturas, que variaram de 30 a 80 °C. A metodologia foi realizada utilizando como referência Martins *et al.* (2012) e modificada para se adequar a matriz de imobilização.

### 2.3.2 Efeito de etanol

A atividade enzimática foi quantificada pela adição de etanol em diferentes concentrações na mistura reacional, levando a concentrações de 5, 10, 15, 20, 25 e 30% de etanol. A atividade da enzima livre e imobilizada foi realizada em pH ótimo e temperatura ótima por 10 minutos, e a leitura para quantificação foi executada no espectrofotômetro. A metodologia utilizada como referência foi de Garbin *et al.* (2021).

### 2.3.3 Reutilização da $\beta$ -glicosidase imobilizada

Levando como referência os testes de reutilização feitos por Al-harbi *et al.* (2022), modificando-o para que se encaixe na metodologia de imobilização do atual trabalho, foram feitos ensaios a partir das condições ótimas de pH e temperatura, onde os suportes imobilizados foram retirados antes do tempo de paralisação da reação com o carbonato de sódio. A atividade da reação foi quantificada em espectrofotômetro e as esferas foram lavadas com água destilada e utilizadas em mais dosagens de atividade seguintes. Foram realizados cálculos para determinar a atividade residual em porcentagem da atividade inicial (100%).

## 2.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os experimentos foram realizados em triplicata e os dados foram expressos como o valor médio dos três ensaios independentes.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.1 RENDIMENTO DE IMOBILIZAÇÃO

O fungo *T. Aurantiacus* teve uma produção média de  $\beta$ -glicosidase de 9,74 U/mL, apresentando após a diluição 3,9 U totais, assim foram quantificados nos 100 suportes utilizados 1,28 U totais imobilizados, chegando a um rendimento de 32,8%.

Para ter conhecimento do percentual de perdas, segue-se a mesma lógica. Levando em consideração que o sobrenadante apresenta uma atividade de 2,42 U totais, sobressaindo assim, 62% da enzima que não foi imobilizada, e subtraindo do que foi

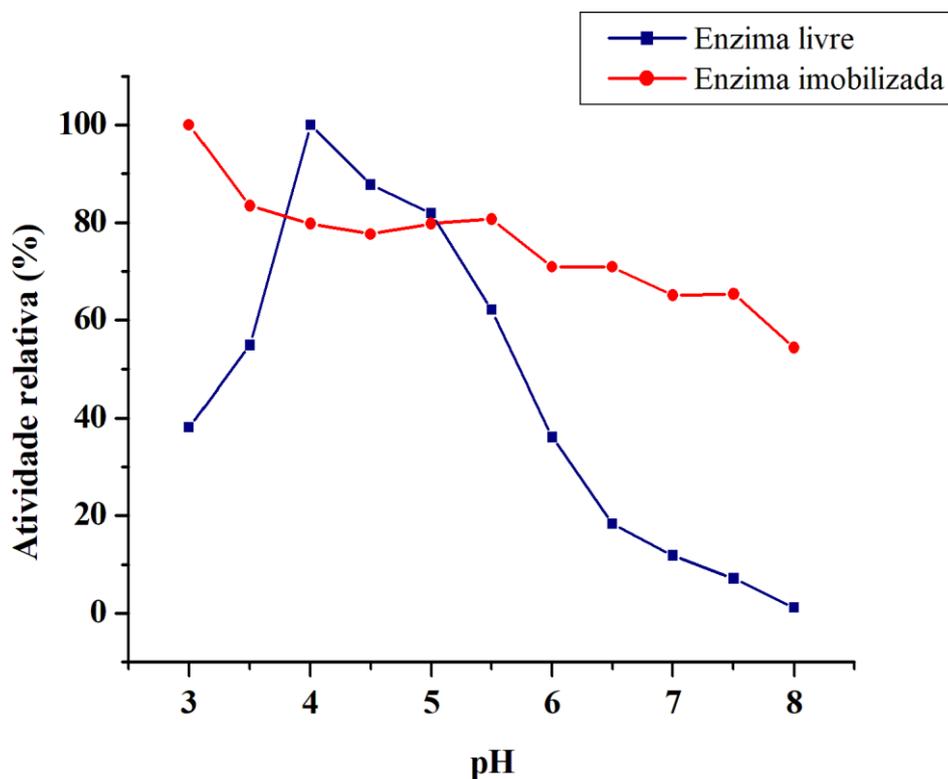
imobilizado, constatou-se que 5,2% das enzimas foram perdidas, podendo ser por inativação ou erro experimental.

### 3.2 CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA

#### 3.2.1 pH ótimo

A  $\beta$ -glicosidase livre apresentou ótima atividade em pH 4,0, enquanto que a mesma enzima imobilizada mostrou ótima atividade em pH 3,0 (Gráfico 1). A imobilização conseguiu que a enzima trabalhasse melhor em pH mais ácido como também mantivesse uma atividade enzimática mais constante durante a variação de pH, enquanto que a enzima livre apresenta uma queda de atividade a partir do pH 5,0.

**Gráfico 1.** Efeito do pH sobre atividade enzimática (pH ótimo) entre as enzimas livres e imobilizadas.



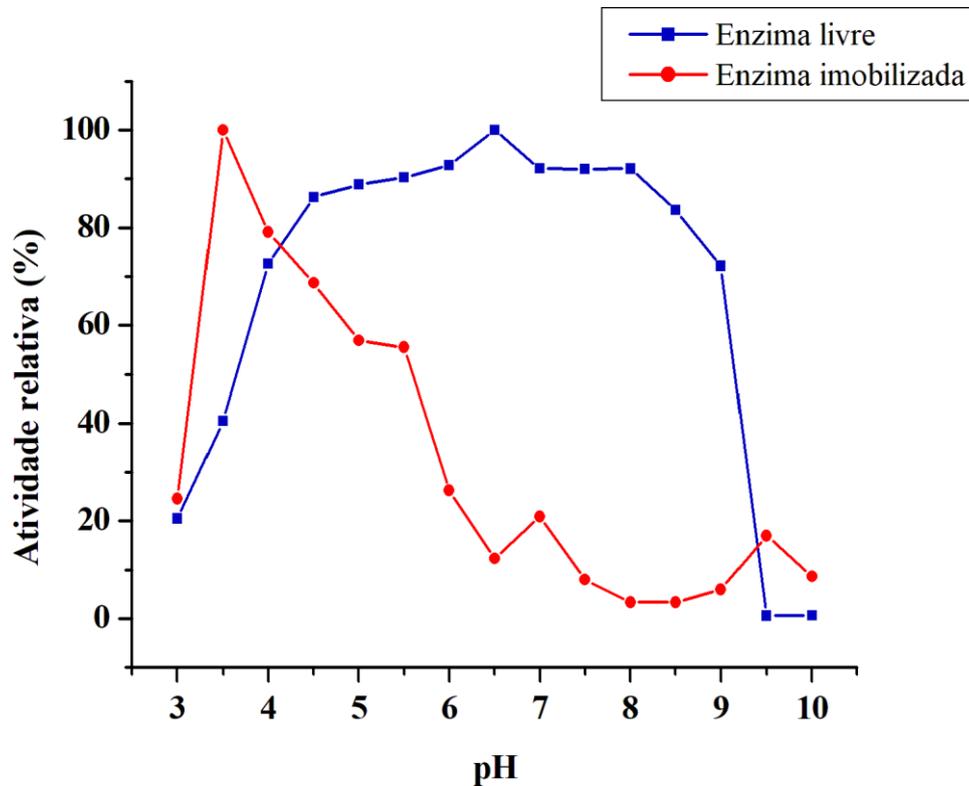
Em comparação com os resultados descritos por Garbin *et al.* (2021) a  $\beta$ -glicosidase livre do *T. crustaceus* segue o mesmo padrão de pH ótimo do *T. aurantiacus* do atual trabalho, obtendo seu pico de atividade em 4 e 4,5, decaindo conforme o pH vai se tornando mais alcalino. Com o deslocamento de pH ótimo passando de 4 (enzima livre) para 3 (imobilizada), é demonstrado que a imobilização covalente tornou a enzima mais estável em meios mais ácidos e nas faixas de pH seguintes. Por meio dos métodos de reticulação e adsorção (Igbal *et al.*, 2022), conseguiu-se deslocar o pH da enzima para um meio mais alcalino, o que pode se diferenciar com a metodologia da ligação covalente que envolve vários resíduos da enzima, proporcionando uma grande rigidez na sua estrutura, podendo mantê-la de forma inalterada perante agentes desnaturantes, como pH extremos (Souza *et al.*, 2017). Além disso, esta atividade positiva em ambientes mais ácidos pode ser justificado pelo excesso de moléculas da enzima ao redor da matriz, que pode prejudicar a atração dos íons de  $\text{OH}^-$ , dessa forma, os íons  $\text{H}^+$  são atraídos pela carga negativa da enzima, o que torna o microambiente catalítico enzimático mais ácido e, como consequência, altera seu valor de pH ótimo para mais ácido (Cardoso *et al.*, 2020).

Este aspecto catalítico da enzima imobilizada em locais mais ácidos pode ser de grande relevância para processos vinícolas, onde o pH do vinho pode variar de 3,0 a 4,0. A enzima atuaria de forma mais eficaz na hidrólise de compostos aromáticos glicosilados durante a fermentação e o armazenamento do vinho (Gao *et al.*, 2022).

### 3.2.2 Estabilidade ao pH

Como pode ser observado no gráfico 2, a enzima livre apresentou estabilidade e constância durante as faixas 4,5 a 8,0 de pH e uma queda brusca em 9,5. Já a enzima imobilizada não apresentou estabilidade perante as mudanças de pH, tendo seu pico em 3,5 e caindo conforme o pH se tornava menos ácido, onde o suporte apresentava maior fragilidade.

**Gráfico 2.** Comparação de estabilidade das enzimas livres e imobilizadas em diferentes tampões e faixas de pH.



Com as variações de tampões utilizados, a enzima livre conseguiu uma maior estabilidade em uma ampla faixa de pH comparando-a com a enzima imobilizada. Igbal *et al.* (2022) relata que a enzima imobilizada apresentou maior estabilidade tanto em pH ácido quanto em pH básico utilizando nano- $\text{CaCO}_3$  como carreador, confirmando que os valores do método atual no presente trabalho não confere à enzima uma forma de estabilidade perante longos tempos de contato em diferentes faixas de pH.

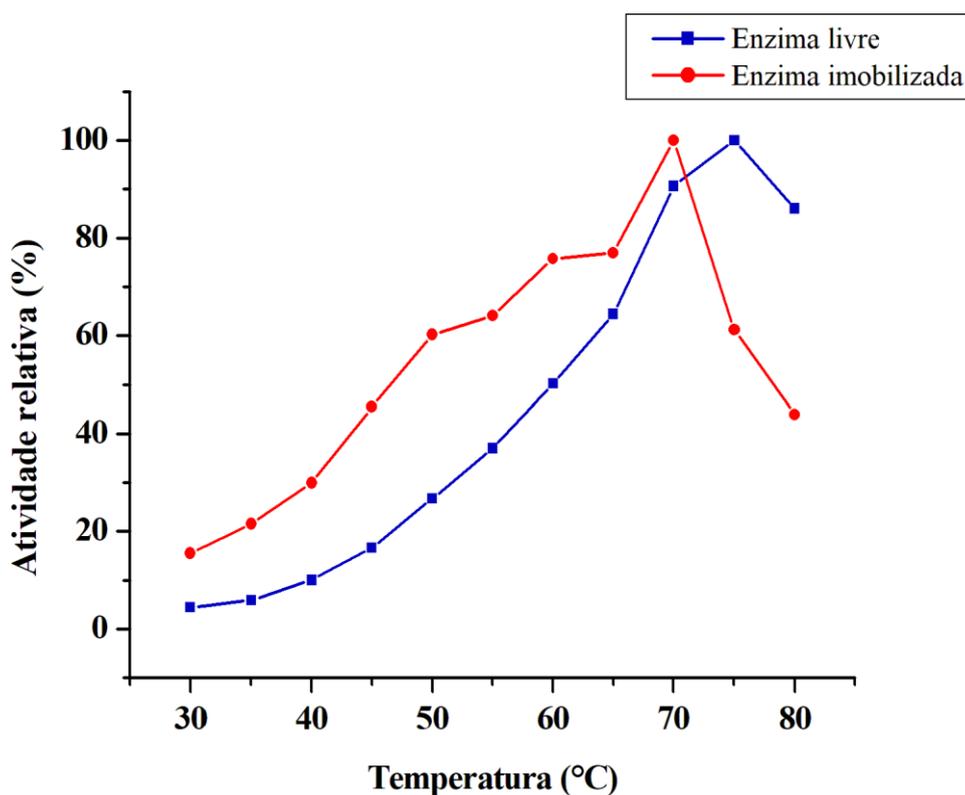
Esta instabilidade pode-se relacionar pela metodologia de produção da matriz alginato/quitosana, em que a mistura (alginato-quitosana) é gotejada em  $\text{CaCl}_2$ , promovendo a reticulação da superfície, aproximando as cadeias do polímero e formando uma superfície menos permeável, assim, as esferas podem ser utilizadas na imobilização covalente. Porém, a estabilidade da imobilização ao pH pode ser afetada quando exposto a agentes químicos que contenham citrato ou fosfatos, como nos tampões utilizados,

havendo o sequestro dos íons de cálcio da matriz devido a alta afinidade, resultando na desestabilização do gel, como descrita por Zerbini (2020).

### 3.2.3 Temperatura ótima

Na apresentação do gráfico 3 pode ser observado que a enzima livre exibiu sua maior atividade em 75 °C, enquanto que a enzima imobilizada mostrou seu pico de atividade em 70 °C e decaiu conforme a temperatura aumentava.

**Gráfico 3.** Efeito da temperatura sobre a atividade enzimática entre as enzimas livres e imobilizadas.



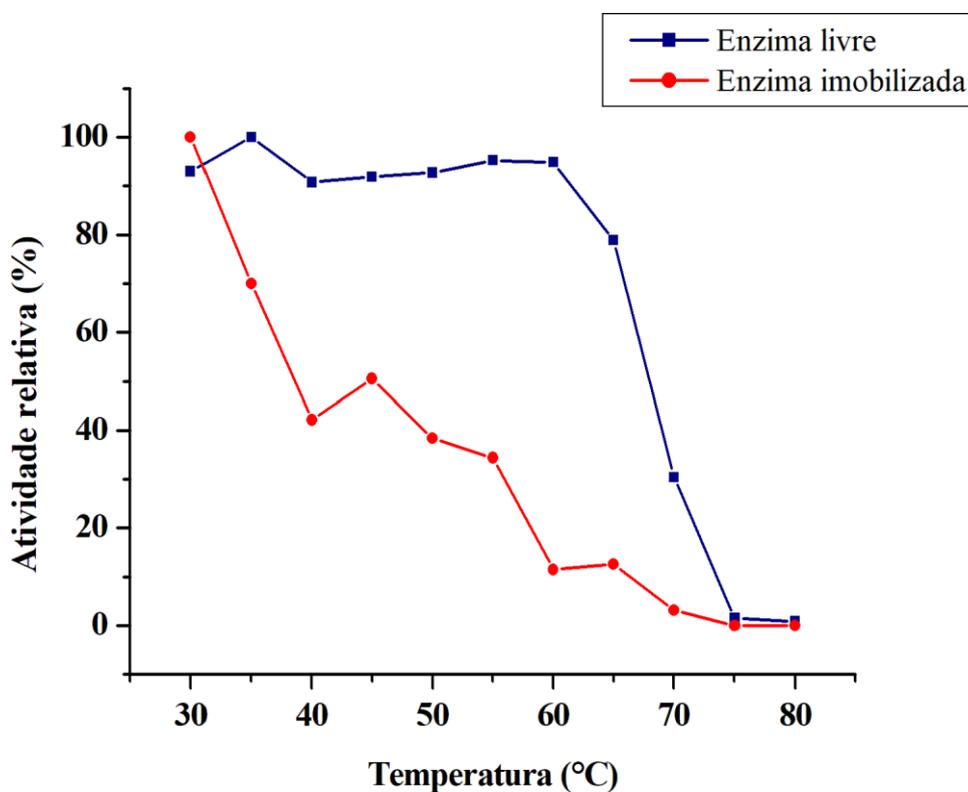
Proveniente de fungo termofílico, a  $\beta$ -glicosidase apresenta valores ótimos em temperatura mais elevadas, como foi descrito por Garbin *et al.* (2021) no estudo do fungo *T. crustaceus*, e o mesmo segue com a enzima imobilizada, mostrando seu pico de reação

a 70 °C e uma queda em 75 e 80 °C, caindo para 40% de atividade, enquanto que a enzima livre, após atingir o pico de atividade, não apresenta uma queda tão grande, mantendo 80% de atividade a 80 °C.

### 3.2.4 Estabilidade térmica

Visando a comparação de estabilidade entre a sua forma livre e imobilizada, o gráfico 4 demonstra que a enzima livre apresentou uma maior estabilidade térmica em relação a imobilizada, tendo seu pico de atividade em 35 °C e depois cai somente em 70 °C, enquanto que a enzima imobilizada teve seu pico em 30 °C e apresentou seu decaimento até 80 °C.

**Gráfico 4.** Comparação de estabilidade das enzimas livres e imobilizadas em diferentes faixas de temperatura.



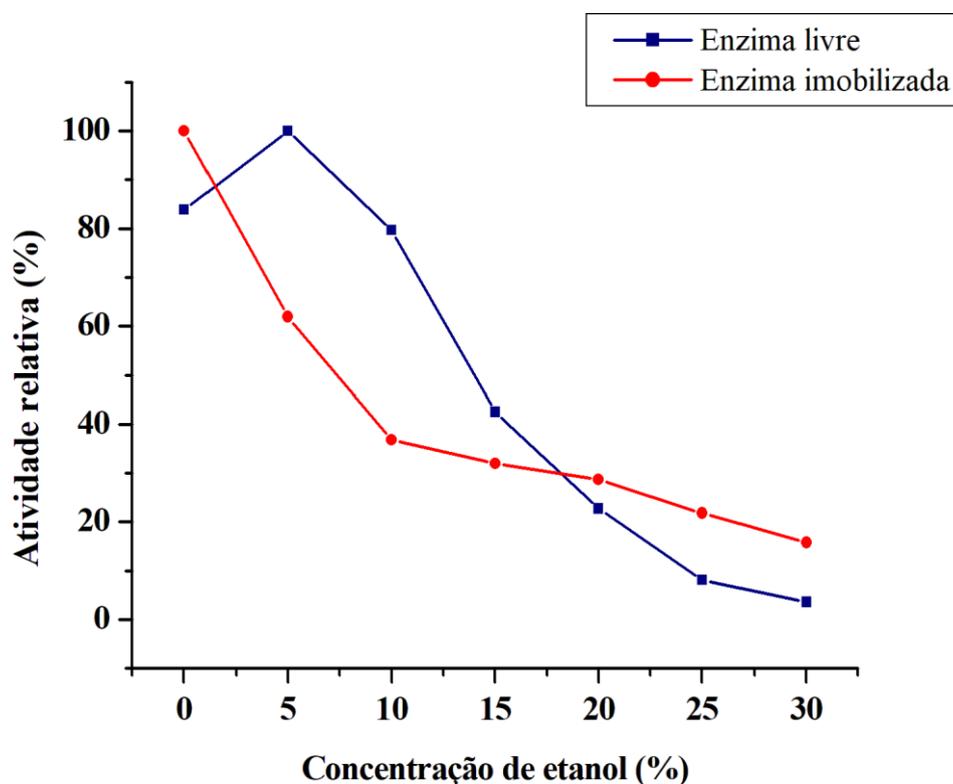
É muito importante conhecer a estabilidade em que a enzima nos permite trabalhar, sendo um dos maiores problemas de sua aplicação, que, se não controlada, pode levar a inativação enzimática, porém, a enzima livre trabalha em uma ampla faixa de temperatura, como pode ser vista no trabalho de Garbin *et al.* (2021). A imobilização tende a manter as características catalíticas e reduzir a inativação das enzimas, contudo a enzima imobilizada apresentou baixa estabilidade térmica, podendo ser explicada pela possível desorganização da matriz utilizada, que são unidas por instáveis ligações de Schiff (Sousa *et al.*, 2017 e Pawariya *et al.*, 2023).

A formação das bases de Schiff em hidrogéis são frequentemente abordados pela rápida degradação, como descrito por Wu *et al.* (2024), apresentando fatores desfavoráveis, como a perda de atividade enzimática e instabilidade térmica, causadas pelo desprendimento da enzima do suporte, que pode ocorrer pelo aumento da temperatura do meio reacional como também pelas faixas de pH, que pode ser tanto em meio ácido quanto em meio alcalino (Gonçalves, 2018). Dessa forma, para amenizar o problema deveríamos ter reduzido as bases de Schiff a ligações covalentes simples, que é mais estável, como foi feito na tese do Rodrigues (2009), onde realizou a imobilização de lipases em agarose por ligação covalente, ou ter feito um tratamento prévio do suporte, para torná-los mais estáveis, como feita por Pawariya *et al.* (2023), que utilizou o ácido cloroetanóico para esta finalidade.

### 3.2.5 Efeito do etanol

A realização do teste ocorreu para a avaliação do efeito do etanol sobre a atividade enzimática, tanto da enzima imobilizada quanto da enzima livre, em suas respectivas temperaturas e pH ótimos. Quando avaliamos o gráfico, pode-se observar que a presença de etanol acarreta em uma queda da atividade enzimática, sendo a enzima livre com 100% de atividade a 5% de etanol e tendo uma queda brusca em 15%, já a enzima imobilizada tem o seu 100% de atividade a 5% de etanol com uma queda em 10%, porém, apresentando estabilidade na atividade reacional até 30% da concentração de etanol.

**Gráfico 5.** Avaliação da concentração de etanol sobre as atividades enzimáticas das enzimas livres e imobilizadas em pH e temperatura ótima.



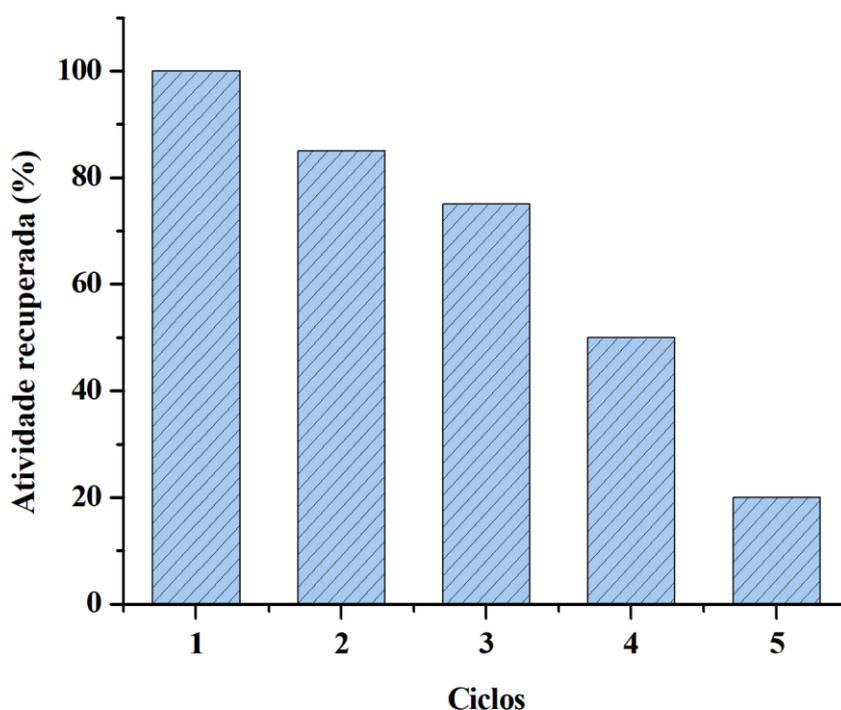
Essa estabilidade da enzima imobilizada pode ser vista e comparada com a enzima livre, onde a enzima imobilizada, mesmo em 20% de etanol, conseguiu manter sua atividade catalítica próxima dos 50%, permanecendo em um padrão até os 30% de etanol, enquanto que a enzima livre, a 20% de etanol, cai para menos de 30% de atividade reacional, não mantendo uma estabilidade. Essa diferença pode se dar pela metodologia da ligação covalente, que envolve também a agregação de vários resíduos da enzima, ampliando a estabilidade em ambientes desnaturantes (Sousa *et al.*, 2017).

De acordo com Garbin *et al.* (2021), em alguns processos fermentativos, o uso de mais de 10% de concentração de etanol pode ser prejudicial ao microrganismo, como por exemplo, os processos que fazem uso de *Saccharomyces cerevisiae*, e considerando uso enzimático do presente estudo, é apontado um resultado positivo para seu uso industrial, levando em consideração o seu ápice de atividade em 5% de etanol e sua estabilidade.

### 3.2.6 Reutilização da $\beta$ -glicosidase imobilizada

Foram realizados 5 ciclos de dosagem de atividade enzimática utilizando as mesmas esferas imobilizadas, sob as mesmas condições, notando uma perda gradual de atividade, em que, a partir do quarto ciclo, se encontra com 50% de sua atividade inicial. Com isso, foi demonstrado que a reutilização é possível e que pode beneficiar processos industriais.

**Gráfico 6.** Atividade recuperada da enzima imobilizada a cada ciclo de dosagem realizada em seu pH e temperatura ótima.



A aplicação da imobilização enzimática também existe para amenizar os gastos da utilização de biocatalisadores livres no meio reacional, esta vantagem se deve a possível reutilização enzimática permitida por esta técnica, mas, para que isso ocorra, é evidente que a imobilização mantenha uma boa estabilidade entre a enzima e o suporte

diante de fatores desnaturantes (Sousa *et al.*, 2017). Como pode ser visto no gráfico 6, existe uma perda gradual normal em sua atividade, o que pode indicar a instabilidade do suporte orgânico escolhido e o desprendimento das enzimas, sendo assim, é necessário maiores estudos, testes e aperfeiçoamento da metodologia.

#### 4. CONCLUSÃO

Com a imobilização, conseguiu-se o deslocamento positivo de certos parâmetros industriais, com relação à enzima livre, fazendo com que o catalisador atuasse melhor em determinadas temperaturas, em faixas de pH mais ácidas (pH 3,0) e em meios com altas concentrações de etanol, mantendo-se estável com 50% de sua atividade a 20% de etanol. Outro ponto que se deve acentuar é a reutilização dos suportes imobilizados, em que o mesmo, se utilizado 4 vezes, manterá a metade de sua atividade inicial, amenizando as perdas e diminuindo os custos das enzimas em processos industriais.

Esta atividade da enzima imobilizada em ambientes mais ácidos é bastante promissora, pode ser muito benéfica nos processamentos de vinho e cerveja, onde, geralmente, o pH varia entre 3,0 a 4,0. Estes catalisadores, ao entrar em contato com estas bebidas, liberariam maiores quantidades de terpenos que realçam sabor e aroma.

#### 5. REFERÊNCIA

AL-HARBI, S. A.; ALMULAIKY, Y. Q. Cu-trimesic acid-based metal organic frameworks for improved  $\beta$ -galactosidase immobilization: Enhanced stability, reusability and lactose hydrolysis. **Journal of Molecular Liquids**, v. 392, part. 1, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2023.123456>.

BILAL, M.; ASGHER, M.; PARRA-SALDIVAR, R.; HU, H.; WANG, W.; ZHANG, X.; HAFIZ, M. N. Immobilized ligninolytic enzymes: An innovative and

environmental responsive technology to tackle dye-based industrial pollutants. **A review, Science of The Total Environment**, v. 576, p. 646-659, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.10.137>.

BRAHMI, M.; ESSIFI, K.; BAKIRHAN, N. K.; BACHIRI, A. E.; OULDRIANE, S. D.; TAHANI, A. New insights into physicochemical aspects involved in the formation of chitosan/alginate biobased polyelectrolyte complexes on natural montmorillonite clay surface. **Journal of Molecular Liquids**, v. 387, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2023.122635>.

CARDOSO, K. F.; MIRANDA, J. S.; DE PAULA, J. A.; DE PAULA CARMO, T.; ELLER, M. R. Enhancement of the activity, stability and reusability of an extracellular protease from *Pseudomonas fluorescens* 07A via three different strategies of immobilization. **Journal of Chemical Engineering**, v. 37, n. 3, p. 485–493, 2020.

COSTA, A. C.; CAVALHEIRO, G. F.; QUEIROZ, E. R. V.; GANDRA, J. R.; BUSCHINELLI, R. H. D. T; PAZ, M. F.; LEITE, R. S. R. Catalytic properties of xylanases produced by *Trichoderma piluliferum* and *Trichoderma viride* and their application as additives in bovine feeding. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 19, p. 101161, 2019.  
DOI:<https://doi.org/10.1016/j.bcab.2019.101161>.

DE PALMA-FERNANDEZ, E. R.; GOMES, E.; DA SILVA, R. Purification and characterization of two beta-glucosidases from the thermophilic fungus *Thermoascus aurantiacus*. **Folia Microbiol (Praha)**, v. 47, n. 6, p. 685-690, 2002. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF02818672>.

GAO, P.; SAM, F. E.; ZHANG, B.; PENG, S.; LI, M.; WANG, J. Enzymatic characterization of purified  $\beta$ -glucosidase from *non-saccharomyces* yeasts and application on Chardonnay aging. **Foods**, v. 11, n. 6, p. 852, 2022. DOI: [10.3390/foods11060852](https://doi.org/10.3390/foods11060852).

GAPSARI, F.; HIDAYATULLAH, S.; SETYARINI, P. H.; MADURANI, K. A.; HERMAWAN, H. Effectiveness of a fish scales-derived chitosan coating for corrosion protection of a carbon steel. **Egyptian journal of petroleum**, v. 31, p. 25-31, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ejpe.2022.02.001>.

GARBIN, A. P.; GARCIA, N. F. L.; CAVALHEIRO, G. F.; SILVESTRE, M. A.; RODRIGUES, A.; PAZ, M. F. D.; FONSECA, G. G.; LEITE, R. S. R.  $\beta$ -glucosidase from thermophilic fungus *Thermoascus crustaceus*: production and industrial potential. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 93, n. 1, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1590/0001-3765202120191349>.

GONÇALVES, T. S. Produção e funcionalização “IN SITU” de espuma de poliuretano sintetizado na presença de glutaraldeído. Dissertação - Universidade Regional Integrado Do Alto Do Uruguai e Das Missões, Erechim-RS, 2018.

IGBAL, M.; DENG, Y.; CHEN, Q.; YANG, C.; ZHU, Y.; CHEN, Z.; WANG, J.; HU, K.; ELE, G.; LI, D. The effect of nano-calcium carbonate on  $\beta$ -glucosidase immobilized by alginate and chitosan. **Green Synthesis and Catalysis**, v. 3, n. 3, p. 265-271, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.gresc.2022.03.006>.

KUMAR, S.; HAQ, I.; PRAKASH, J.; RAJ, A. Improved enzyme properties upon glutaraldehyde cross-linking of alginate entrapped xylanase from *Bacillus licheniformis*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 98, p. 24-33, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.01.104>.

MARTINS, E. S.; LEITE, R. S. R.; SILVA, R.; GOMES, E. Production and characterization of polygalacturonase from thermophilic *Thermoascus aurantiacus* on submerged fermentation. **Ann Microbiol**, v. 62, p. 1199-1205, 2012. DOI: [10.1007/s13213-011-0360-0](https://doi.org/10.1007/s13213-011-0360-0).

MCCLENDON, S. D.; TANVEER, B.; PETZOLD, C. J.; ADAMS, P. D.; SIMMONS, B. A.; CANTOR, S. W. *Thermoascus aurantiacus* é uma fonte promissora de enzimas para desconstrução de biomassa em condições termofílicas. **Biotechnol Biocombustíveis**, v. 5, 2012. DOI: <https://doi-org.ez50.periodicos.capes.gov.br/10.1186/1754-6834-5-54>.

MENDES, A. A.; CASTRO, H. F.; ANDRADE, G. S. S.; TARDIOLI, P. W.; GIORDANO, R. L. C. Preparation and application of epoxy–chitosan/alginate support in the immobilization of microbial lipases by covalent attachment. **Reactive and Functional Polymers**, v. 73, n. 1, p. 160-167, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.reactfunctpolym.2012.08.023>.

PAWARIYA, V.; DE, S.; DUTTA, J. Synthesis and characterization of a new developed modified-chitosan Schiff base with improved antibacterial properties for the removal of a Bismarck Brown R and Eosin Y dyes from wastewater. **Carbohydrate Polymer Technologies and Applications**, v. 6, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.carpta.2023.100352>.

PEREIRA, J. C.; MARQUES, N. P.; RODRIGUES, A.; OLIVEIRA, T. B.; BOSCOLO, M.; SILVA, R.; MARTINS, D. A. B. Thermophilic fungi as new sources for production of cellulases and xylanases with potential use in sugarcane bagasse saccharification. **Journal of Applied Microbiology**, v. 118, n. 4, p. 928-939, 2015. DOI: [10.1111/jam.12757](https://doi.org/10.1111/jam.12757).

PRIYADARSHI, R.; RHIM, J. W. Chitosan-based biodegradable functional films for food packaging applications. **Innovative Food Science And Emerging Technologies**, v. 62, p. 102346, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2020.102346>.

RAGHU, S.; PENNATHUR, G. Enhancing the stability of a carboxylesterase by entrapment in chitosan coated alginate beads. **Turk Journal of Biology**, v. 42, art. 4, p. 307-318, 2018. DOI: 10.3906/biy-1805-28.

RODRIGUES, R. C. Síntese de biodiesel através de transesterificação enzimática de óleos vegetais catalisada por lipase imobilizada por ligação covalente multipontual. Tese - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. 2009.

ROSA-GARZON, N. G.; LAURE, H. J.; ROSA, J. C.; CABRAL, H. Valorization of agricultural residues using *Myceliophthora thermophila* as a platform for the production of lignocellulolytic enzymes for cellulose saccharification. **Biomass and Bioenergy**, v. 161, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2022.106452>.

SOUSA, L. T. A.; VERÍSSIMO, L. A. L.; JOÃO, B. C. A.; SANTORO, M. M.; RESENDE, R. R.; MENDES, A. A. Imobilização enzimática: princípios fundamentais e tipos de suporte. **Biotecnologia Aplicada a Agro & Indústria**, cap. 15. v. 4, 2017.

TIWARI, P.; MISRA, B. N.; SANGWAN, N. S.  $\beta$ -glucosidases from the fungus *Trichoderma*: an efficient cellulase machinery in biotechnological applications. **Biomed Res Int**, 2013. DOI: 10.1155/2013/203735.

WU, Y.; XU, W.; LI, J.; ZHONG, Z.; HUANG, L.; LI, S.; TAN, H. Influence of tannic acid post-treatment on the degradation and drug release behavior of Schiff base crosslinked konjac glucomannan/chitosan hydrogel. **European Polymer Journal**, v. 202, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2023.112592>.

ZERBINI, M. T. Imobilização e caracterização bioquímica da enzima  $\beta$  glicosidase (BG-Lfa2) em polímeros de alginato de sódio. Dissertação - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto-SP, 2020. DOI: <https://doi.org/10.11606/D.17.2020.tde-05102020-104729>.