



República Federativa do Brasil
Ministério da Indústria, Comércio Exterior
e Serviços
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) BR 102015020148-6 A2



(22) Data do Depósito: 21/08/2015

(43) Data da Publicação: 01/03/2017

(54) **Título:** PROCESSO DE OBTENÇÃO DE UM SUPORTE SÓLIDO PARA IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS, SUPORTE SÓLIDO DE FIBRA DE COCO VERDE, PROCESSO DE IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS E DERIVADO OBTIDO

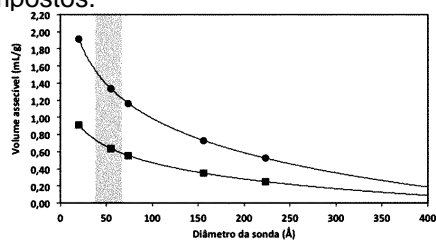
(51) **Int. Cl.:** C12N 11/12; C12N 11/04; A23L 2/52

(73) **Titular(es):** UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA JULIO DE MESQUITA FILHO

(72) **Inventor(es):** THAÍS MILENA DE SOUZA BEZERRA; JULIANA CRISTINA BASSAN; RUBENS MONTI

(74) **Procurador(es):** FABIÓLA DE MORAES SPIANDORELLO

(57) **Resumo:** Resumo PROCESSO DE OBTENÇÃO DE UM SUPORTE SÓLIDO PARA IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS, SUPORTE SÓLIDO DE FIBRA DE COCO VERDE, PROCESSO DE IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS E DERIVADO OBTIDO A presente invenção refere-se ao processo de obtenção de um substrato para imobilização de enzimas, ao processo de imobilização de enzimas e ao derivado obtido. O processo de obtenção consiste na modificação da lignocelulose proveniente da fibra de coco verde com o objetivo de reagir com enzimas (proteínas) e atuar na imobilização destas. O processo de imobilização possui como finalidade a reutilização, estabilização ou purificação destes compostos.



PROCESSO DE OBTENÇÃO DE UM SUPORTE SÓLIDO PARA IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS, SUPORTE SÓLIDO DE FIBRA DE COCO VERDE, PROCESSO DE IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS E DERIVADO OBTIDO

CAMPO DA INVENÇÃO

[001] A presente invenção se insere no campo de aplicação da Química, Farmácia, Biotecnologia, e, mais especificamente, na área de enzimas industriais, uma vez que se refere ao processo de obtenção de um suporte sólido para imobilização de enzimas, ao processo de imobilização de enzimas e ao derivado obtido.

FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

[002] A imobilização é um termo genérico empregado para descrever a retenção de uma enzima no interior ou na superfície de um material suporte. O complexo enzima-suporte mantém as características físicas do suporte e, ao mesmo tempo, retém a atividade biológica da enzima na forma solúvel. O complexo enzima-suporte é comumente denominado derivado.

[003] De forma geral as enzimas podem ser imobilizadas em suportes sólidos ou por "cross-linking". Ao utilizar suportes sólidos, a enzima pode interagir com o suporte de duas formas distintas: estar aprisionada no interior do suporte ou ligada em sua superfície. O primeiro método está fundamentado na diferença de tamanho entre as moléculas, neste caso a mobilidade da enzima é mantida, pois não são envolvidas ligações físicas ou químicas entre a enzima e o suporte. No segundo método, a enzima é fixada na superfície de um suporte por adsorção ou através de ligação química.

[004] As vantagens na utilização de enzimas

imobilizadas em relação à enzima livre são numerosas. Dentre elas destaca-se o aumento da estabilidade e separação do meio de reação, o que acarreta economia significativa no custo global do processo. Entretanto, algumas características do derivado são determinantes para aplicação como a atividade recuperada, que é a percentagem da enzima que foi imobilizada e permaneceu ativa após o processo de imobilização. A meia vida operacional da enzima imobilizada deve ser suficientemente longa, permitindo a reutilização do derivado por vários ciclos, constituindo um parâmetro operacional importante, assim como o custo de produção do derivado que tem impacto em sua viabilidade.

[005] A utilização de enzimas imobilizadas em processos industriais é associada a uma diminuição do custo benefício, devido à possibilidade de reuso das enzimas por diversos ciclos, tornando-se uma estratégia muito valorizada industrialmente. Entretanto os suportes sólidos utilizados na imobilização de enzimas frequentemente inviabilizam sua aplicação, já que apresentam alto custo de obtenção e aplicação. Embora seja grande o número de trabalhos publicados na área, processos utilizando enzimas imobilizadas em escala industrial são reduzidos e isto se deve principalmente ao custo de produção e a baixa eficiência das enzimas imobilizadas quando comparadas à enzima livre.

[006] A escolha do protocolo de imobilização mais adequado leva em consideração as condições e necessidades específicas do processo onde a enzima imobilizada será inserida. Alguns aspectos relevantes neste sentido são o tipo de reação catalisada pela enzima, o meio de reação

(aquoso ou solvente orgânico) e configuração do reator enzimático.

[007] Quando as enzimas são imobilizadas em suportes sólidos, propriedades do derivado como atividade, seletividade e estabilidade são profundamente influenciadas por características dos suportes como: composição química, porosidade e hidrofiliabilidade. Existe uma grande variedade de suportes sólidos para imobilização de enzimas que podem ser divididos quanto à obtenção (orgânicos e inorgânicos) e composição (poliméricos ou não poliméricos). Dentre os suportes poliméricos de origem orgânica, a agarose tem destaque devido a propriedades como elevada área específica, reduzida porosidade que propiciam uma elevada congruência geométrica entre enzima-suporte, levando à obtenção de derivados com excelentes propriedades cinéticas.

[008] Podem-se encontrar na literatura algumas enzimas que foram imobilizadas em agarose CL ativada com diversos grupos, como glioxil, glutaraldeído, amino, epóxi, ácido iminodiacético (IDA), polietilenimina (PEI) e CnBr. Contudo, dois aspectos dificultam a utilização da agarose em larga escala. O primeiro deles é a resistência mecânica dos "beads" de agarose que é muito baixa, inviabilizando sua utilização em reatores enzimáticos devido à degradação sob agitação. O segundo aspecto é a viabilidade econômica, já que a preparação de grandes quantidades de derivado utilizando este suporte tem custo elevado, tornando o processo economicamente inviável se a regeneração do suporte não for possível.

[009] A utilização de suportes alternativos vem da

necessidade de diminuir o custo de derivados enzimáticos e melhorar as propriedades cinéticas da enzima, viabilizando sua aplicação industrial. Estes suportes são preparados principalmente a partir de resíduos da agroindústria, materiais lignocelulósicos. Devido às suas propriedades físico-químicas (polímeros orgânicos e inorgânicos, silicatos, nanopartículas), apresentam alto desempenho na imobilização de enzimas, produzindo derivados com excelentes propriedades bioquímico-cinéticas; entretanto em muitos casos os custos de produção tornam sua aplicação inviável. Resíduos lignocelulósicos apresentam excelentes propriedades, permitindo que se equiparem em eficiência aos suportes tradicionais, entretanto seu custo de obtenção é significativamente menor.

[0010] Para viabilizar e expandir o uso de novas enzimas imobilizadas em escala industrial busca-se encontrar alternativas economicamente viáveis propondo e desenvolvendo continuamente protocolos de fácil execução e funcionalidade.

[0011] A procura por materiais suportes eficientes e de baixo custo é um ponto importante para viabilizar a aplicação industrial de enzimas imobilizadas. Embora se reconheça que não há suporte universal para todas as enzimas e suas aplicações, uma série de características desejáveis é comum a qualquer suporte; além disso, para responder à crescente consciência ambiental, os materiais devem ser biodegradáveis, além de apresentar viabilidade econômica e facilidade de obtenção.

[0012] A utilização da fibra de coco verde associa o aproveitamento de um potencial poluente sem o manejo

apropriado e a produção de um derivado com alto valor agregado. Estes aspectos melhoram o custo benefício para aplicação da enzima imobilizada.

[0013] As enzimas imobilizadas em fibra de coco verde apresentaram aumento de sua estabilidade térmica, dificultando alterações de sua estrutura terciária devido a longos tempos de incubação em determinada temperatura. Este aspecto é um fator determinante para a inclusão de um biocatalizador em determinado processo industrial.

[0014] As enzimas imobilizadas em fibra de coco verde apresentaram um excelente fator de reuso, o que significa que o biocatalizador pode ser reutilizado por vários ciclos consecutivos sem perda de eficiência. Testes mostraram que após dez ciclos de reuso os derivados ainda apresentam 100% de eficiência.

ESTADO DA TÉCNICA

[0015] A principal inovação do invento constitui utilizar um resíduo, a fibra de coco verde, que apresenta custo extremamente baixo, para produção de um produto de alto valor agregado, um biocatalizador industrial. As enzimas são extremamente eficientes e viabilizam muitos processos industriais que seriam impossíveis sem sua inclusão, entretanto elas têm alto custo, o que muitas vezes eleva demasiadamente o preço final do produto obtido.

[0016] A utilização da fibra de coco verde neste sentido tem o objetivo de apresentar a mesma eficiência de suportes sólidos comumente utilizados na imobilização de enzimas industriais, entretanto com um custo muito menor.

[0017] Várias iniciativas surgiram com o objetivo de reaproveitar este resíduo, como produção de substrato

vegetal e compósitos, porém nenhum dado da literatura prevê a utilização deste material como suporte sólido. O principal uso do suporte fibra de coco verde desenvolvido é a imobilização de enzimas, principalmente aquelas com aplicação industrial. Devido às suas características físico-químicas a fibra de coco verde é capaz de estabilizar a estrutura terciária das enzimas através de ligações covalentes enzima-suporte, levando a um aumento de sua estabilidade (temperatura, pH). Quando comparado aos suportes tradicionais, a fibra de coco verde apresenta uma alta resistência mecânica, o que permite sua aplicação sob condições mais extremas (agitação e pressão), sem que sofra degradação.

[0018] Além disso, existem vários trabalhos no estado da técnica nessa área de atuação, mas nenhum deles fere os requisitos de novidade e atividade inventiva da presente invenção, como por exemplo, o documento "Method for nitrogen-saturated immobilization of waste materials and fibrous materials based on raw materials containing lignocellulose from after-growing raw materials for utilization as peat substitutes" que descreve um método fermentativo de obtenção de material rico em lignocelulose para imobilização de resíduos ricos em nitrogênio; e o documento "Fibrous protein-immobilization systems" que descreve um processo de obtenção de nano fibras sintéticas para imobilização de proteínas.

BREVE DESCRIÇÃO DA INVENÇÃO

[0019] A presente invenção refere-se ao processo de obtenção de um suporte sólido para imobilização de enzimas, ao processo de imobilização de enzimas e ao derivado

obtido. O processo de obtenção consiste na modificação da lignocelulose proveniente da fibra de coco verde com o objetivo de reagir com enzimas (proteínas) e atuar na imobilização destas. O processo de imobilização possui como finalidade a reutilização, estabilização ou purificação destes compostos.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

[0020] A Figura 1 mostra fotos de microscopia eletrônica de varredura da fibra de coco submetida a diferentes tratamentos: (a,d) Fibra natural; (b,e) Explosão térmica em NaOH 2%; (c,f) Explosão térmica em H₂SO₄ 2%.

[0021] A Figura 2 representa graficamente a porosidade da fibra de coco tratada - o volume acessível por grama de FC foi determinado utilizando 6 sondas entre 10 e 533 Å - FC submetida ao pré-tratamento alcalino (●); FC submetida ao pré-tratamento ácido (■).

[0022] A Figura 3 representa graficamente os espectros de Infravermelho com refletância total atenuada - o perfil dos grupos presentes na superfície da fibra de coco submetida ao pré-tratamento alcalino (A) ou ácido foi obtido - Fibra tratada (verde); Glioxil-FC (vermelho); Glutaraldeído-FC (azul).

[0023] A Figura 4 mostra o SDS-PAGE do sobrenadante e dos derivados da lacase; (A) Imobilização da lacase em agarose onde (a) padrão de peso molecular, (b) enzima livre, (c) sobrenadante ao final da imobilização, (d) derivado Agarose-glioxil lacase antes da redução com NaBH₄, (e) derivado Agarose-glioxil lacase antes da redução com NaBH₄; (B) Imobilização da lacase em FC onde (a) padrão de peso molecular, (b) enzima livre, (c) sobrenadante ao final da

imobilização, (d) derivado FC-glioxil lacase antes da redução com NaBH_4 , (e) derivado FC-glioxil lacase antes da redução com NaBH_4 .

[0024] A Figura 5 representa graficamente o tratamento do suco de maçã com os derivados lacase: o suco (70 mL) foi tratado com 2 g de cada derivado por 1 hora a 38 °C; Suco natural (in natura), Lacase-Glioxil-FC (CF1 e CF2), Lacase-Glutaraldeído-FC (CF3 e CF4).

[0025] A Figura 6 representa graficamente o ensaio de reuso dos derivados FC-Lacase utilizando suco de maçã: o suco (5,0 mL) foi tratado com 0,2 g de cada derivado a 38 °C por 30 min em seguida foi realizada dosagem de fenólicos totais. Lacase-Glioxil-FC (CF1 e CF2), Lacase-Glutaraldeído-FC (CF3 e CF4).

[0026] A Figura 7 representa graficamente o tratamento do mosto com os derivados lacase: o mosto (70 mL) foi tratado com 2 g de cada derivado por 1 hora a 30 °C; Suco natural (NAT), Lacase-Glioxil-FC (CF1 e CF2), Lacase-Glutaraldeído-FC (CF3 e CF4).

[0027] A Figura 8 representa graficamente o ensaio de reuso dos derivados FC-Lacase utilizando mosto: o mosto (5,0 mL) foi tratado com 0,2 g de cada derivado a 30 °C por 30 min em seguida foi realizada dosagem de fenólicos totais; Lacase-Glioxil-FC (CF1 e CF2), Lacase-Glutaraldeído-FC (CF3 e CF4).

[0028] A Figura 9 representa graficamente o tratamento cerveja tipo malte com os derivados lacase: a cerveja (70 mL) foi tratada com 0,5 g de cada derivado por 5 horas a 10 °C; as cervejas puro malte (A), puro malte suplementada com 50% de caldo de cana (B) ou puro malte

suplementada com 75% de caldo de cana (C) foram testadas; Suco natural (NAT), Lacase-Glioxil-FC (CF1 e CF2), Lacase-Glutaraldeído- FC (CF3 e CF4).

[0029] A Figura 10 representa graficamente a citotoxicidade do suco de maçã antes e após tratamento com lacase imobilizada: o suco (1 L) foi tratado com o derivado Lacase-glutaraldeído-FC (5 g), concentrado e aplicado sobre células HepG2.

[0030] A Figura 11 representa graficamente a citotoxicidade do glicidol e glutaraldeído: os compostos foram aplicados sobre células HepG2 em concentrações entre 2-500 mM.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

[0031] A presente invenção descreve um processo de obtenção de um suporte sólido para imobilização de enzimas compreendendo as etapas de:

a) Pré tratamento da Fibra de coco verde:

[0032] Para obtenção da fibra a casca externa do fruto foi separada, e a massa fibrosa foi seca até peso constante em seguida, cortada e triturada utilizando um moinho de facas. A fibra moída foi tamisada para obter partículas de 20 mesh e em seguida submetida a tratamento térmico em autoclave em H_2SO_4 ou NaOH (2%). Após 20 min foi realizada uma descompressão térmica, abrindo-se a válvula de escape totalmente. A fibra tratada foi lavada várias vezes com água até que o pH da água de lavagem fosse neutro.

b) Ativação e derivatização da fibra de coco verde:

[0033] A fibra de coco verde tratada foi derivatizada: a partir da eterificação da lignocelulose com

glicidol (2,3-epoxi-propanol) em meio alcalino. Para a ativação com grupos gliceril adicionou-se água à fibra de coco verde em um volume de até 20 vezes a massa utilizada, sendo a proporção ótima 10:1 respectivamente. A esta suspensão adicionou-se NaOH para concentração final entre 0,5 e 2,0 mol/L, NaBH₄ para concentração final entre 10 e 30 mg/mL, e glicidol para concentração final entre 1,0 e 2,0 mol/L. Após agitação suave por até 18 h a temperatura ambiente, a solução foi filtrada e o suporte lavado com água destilada.

[0034] Nesta etapa os grupos hidroxila da lignocelulose foram convertidos em grupos gliceril e o próximo passo é a oxidação com periodato de sódio (NaIO₄), quando ocorre ruptura dos grupos gliceril formando grupos glioxil. O suporte-gliceril foi funcionalizado com grupos glioxil pela adição de 100 a 700 μmols de NaIO₄ por grama de suporte, em seguida adicionaram-se 10-20 volumes de água e agitou-se por até 2 h, ao final o suporte foi lavado com água.

[0035] Para a oxidação em grupos amino adicionou-se a fibra de coco verde ativada com grupos glioxil, até 8 vezes em volume de etilenodiamina (1 mol/L) com uma proporção ótima de 1:6 respectivamente. A solução permaneceu a pH 10 durante até 2 h e em seguida adicionou-se entre 10-20 mg de NaBH₄ por mL de solução. Após redução por até 30 minutos o suporte foi lavado com 4 volumes de tampão de acetato de sódio (pH 4) e água destilada.

[0036] Para derivatização da fibra de coco verde com glutaraldeído, adicionou-se entre 3-5 mmols de glutaraldeído por grama de fibra (derivatizada com grupos

amino) em tampão fosfato 0,05 mol/L (pH 7). Em seguida, o suporte foi lavado com até 20 volumes de tampão fosfato 25 mmol/L (pH 7) e água.

[0037] O suporte sólido de fibra de coco verde obtido de acordo com o processo descrito acima pode então ser empregado no processo de imobilização de enzimas.

[0038] Outro aspecto da presente invenção é um processo de imobilização de enzimas compreendendo as etapas de:

a) Imobilização da enzima em suportes glioxil:

[0039] Ao suporte sólido de fibra de coco verde (1-5 g) descrito anteriormente, adicionou-se bicarbonato de sódio 100 mol/L pH 10 (5-20 mL). Em seguida, foram adicionados de 5-10 unidades enzimáticas (U), e a mistura foi suavemente agitada a 25 °C.

b) Imobilização da enzima em suportes glutaraldeído:

[0040] Ao suporte sólido de fibra de coco verde (1-5 g) adicionou-se fosfato de sódio 100 mol/L pH 7 (5-20 mL). Em seguida, foram adicionadas 5-10 unidades enzimáticas (U), e a mistura foi suavemente agitada a 25 °C.

[0041] Periodicamente, as amostras dos sobrenadantes foram retiradas e a atividade da enzima foi analisada. Ao final da reação, foi adicionado borohidreto de sódio (1-5 mg/mL de solução) e manteve-se sob agitação suave por até 30 minutos, para redução de grupos remanescentes. Em seguida os derivados obtidos foram lavados com água destilada.

[0042] Os derivados obtidos, conforme processo descrito acima, foram testados com o objetivo de serem

utilizados em processos industriais apresentando a mesma eficiência de suportes sólidos comumente utilizados na imobilização de enzimas, entretanto com um custo muito menor.

Exemplo de concretização da invenção

[0043] O exemplo de concretização da invenção compreende a imobilização da enzima lacase de *Trametes versicolor* em fibra de coco verde e aplicação dos derivados na estabilização de bebidas.

[0044] O suporte sólido de fibra de coco verde e a imobilização da enzima foram realizados conforme o processo de obtenção de um substrato para imobilização de enzimas e o processo de imobilização de enzimas da presente invenção, respectivamente.

Clarificação de bebidas utilizando a lacase imobilizada

[0045] Suco de maçã: maçãs (*Malus domestica* cv. Fuji) foram enxaguadas com água destilada, e trituradas em liquidificador. O suco foi pressionado através de três camadas de gaze. Imediatamente foi adicionado kaolin (0,1 mg/mL de suco) e o suco mantido sob agitação durante 30 min (25 °C) e submetido à centrifugação a 4000 xg durante 30 min a 4 °C. Um volume de 70 mL de suco centrifugado foi passado através de uma coluna de vidro (2,1 x 8 cm) encamisada contendo 2 g (1,0-1,5 U) de derivado a 38 °C, e uma bomba peristáltica foi utilizada para manter o fluxo contínuo de 2,5 mL. min⁻¹ durante 60 min.

[0046] Mosto de uva: as uvas trituradas foram filtradas para separação das cascas e sementes. Um volume de 70 mL do mosto foi passado através de uma coluna de

vidro (2,1 x 8 cm) encamisada contendo 2 g (1,0-1,5 U) de derivado a 30 °C, e uma bomba peristáltica foi utilizada para manter o fluxo contínuo de 2,5 mL. min⁻¹ durante 60 min.

[0047] Cerveja tipo malte: a fermentação da cerveja foi conduzida a 12 °C por 5 dias pela ação da levedura *Saccharomyces cerevisiae* PPB01 e em seguida levada a maturação por 14 dias a 4 °C. Para o tratamento enzimático 70 mL da cerveja maturada foram tratados com 2 g de lacase imobilizada (1,0-1,5 U) por 5 horas a 10 °C.

[0048] Amostras de cada bebida foram colhidas antes e depois do tratamento enzimático e analisadas quanto à cor, turbidez, fenóis totais e atividade antioxidante.

Caracterização da fibra da casca de coco verde

[0049] Ao utilizar materiais lignocelulósicos como suportes para imobilização de enzimas, o pré-tratamento é empregado para eliminar componentes que atuam como uma barreira natural e aumentar a área superficial e tornando a celulose mais acessível. A explosão térmica associada ao tratamento ácido ou alcalino foi realizada para promover a exposição de grupos reativos, que posteriormente pudessem ser utilizados para derivatização da fibra da casca de coco verde (FC). Os tratamentos foram eficientes na remoção da camada superficial de material orgânico (Figura 1b; 1c), observada na fibra sem tratamento (Figura 1a). Ácidos graxos e ceras presentes nesta camada podem dificultar a derivatização da fibra e conseqüentemente a imobilização de enzimas.

[0050] No lume da fibra da casca de coco verde, cavidades que estão localizadas abaixo da superfície da

fibra, estão armazenados ácidos graxos e ceras. Quando submetida ao tratamento alcalino estas estruturas são significativamente reduzidas e o material presente em seu interior foi eficientemente removido (Figura 1e). A fibra submetida ao tratamento ácido não apresenta tiloses, indicando a remoção da camada superficial da fibra à qual estas estruturas estavam associadas (Figura 1f).

[0051] Quando submetida à descompressão térmica em meio alcalino a FC apresenta rachaduras e deformações em sua superfície (Figura 1b). Estas características podem ser resultado do rompimento das ligações estruturais entre a lignina e carboidratos, já que este mecanismo de hidrólise envolve a saponificação das ligações éster entre a lignina e a hemicelulose. A fibra da casca de coco verde submetida descompressão térmica em meio ácido apresenta uma superfície mais lisa e uniforme, com desprendimento superficial de finas camadas de material orgânico. Estas características podem ser atribuídas à remoção gradual da hemicelulose, solubilização da lignina.

[0052] A caracterização química indicou que 13,6% da FC é constituída de lignina ou polifenóis, 27,9% de polissacarídeos e 11,3% de componentes não quantificados que podem incluir pectinas, proteínas e outros componentes menores (Tabela 1). A extração com etanol indicou que 47,2% da FC é constituída de ceras ou ácidos graxos. O balanço de massa indica os tratamentos realizados promoveram grande dissolução dos componentes da FC, sendo que o pré-tratamento alcalino removeu 63,4% de seus constituintes, enquanto que o pré-tratamento ácido removeu 62,4%. No pré-tratamento alcalino esta perda foi devido à remoção de

ceras, ácidos graxos e lignina, enquanto que no pré-tratamento ácido ceras, ácidos graxos e xilana foram removidos em maior extensão.

Tabela 1: Quantificação dos constituintes da fibra da casca de coco verde

		Composição Química ^a					
Amostra	Massa residual %	Lignina	Glucana	Xilana	Grupos Arabino-sil	Grupos Acetil	Extra-tivos ^c
Não tratada	100	13,6±0,2	16,0±0,2	8,1±0,1	2,4±0,0	1,4±0,1	47,2
NaOH	36,6	17,8±0,1	48,0±0,9	16,9±0,4	2,9±0,1	0,1±0,0	1,0
H2SO4	37,6	49,0±0,0	39,3±0,4	2,5±2,2	0,1±0,0	0,7±0,1	2,0
		Balanço de Massa ^b					
Amostra	Massa residual %	Lignina	Glucana	Xilana	Grupos Arabino-sil	Grupos Acetil	Extra-tivos ^c
Não tratada	100	13,6±0,2	16,0±0,2	8,1±0,1	2,4±0,0	1,4±0,1	47,2
NaOH	36,6	6,6±0,1	17,7±0,5	6,3±0,2	1,1±0,0	0,0±0,0	0,4
H2SO4	37,6	18,8±0,0	15,1±0,2	1,0±1,2	0,0±0,0	0,2±0,1	0,7

^ag/ 100 g fibra de coco tratada. ^bg/ 10 0g de fibra de coco inicial. ^ccompostos solúveis em etanol.

[0053] A produtividade das enzimas imobilizadas ainda é pequena em relação a processos químicos, principalmente devido à área disponível para adsorção/ligação das enzimas que leva um baixo carregamento proteico pelos suportes. Para enzimas ligadas a suportes sólidos com partículas maiores que 100 µm, o volume ativo dos derivados usualmente varia entre 0,001-0,1 U. g⁻¹, e o volume ativo nos biorreatores é geralmente entre 10-20%. A

estes fatores associa-se uma atividade recuperada muito baixa para os suportes porosos (abaixo de 50%) devido a restrições de difusão. Nesse sentido métodos que auxiliam na determinação da área superficial e do volume dos poros do suporte são ferramentas importantes para caracterização de suportes sólidos.

[0054] A técnica de exclusão de solutos é utilizada para determinar o tamanho dos poros pela difusão de sondas com massa molar variada na matriz de estudo. A porosidade da FC foi expressa como volume de poros acessíveis (Figura 2). A FC submetida ao pré-tratamento alcalino apresenta maior porosidade mostrando mais acessibilidade para as sondas. Na faixa entre 40-50 Å, que corresponde ao diâmetro aproximado da lacase o volume acessível foi de 1,33 ml/g, e 0,64 ml/g para FC submetida ao pré-tratamento alcalino e ácido, respectivamente. Estes resultados indicam que para FC (NaOH 2%) a área acessível a enzima lacase é maior apresentando, em teoria, maior carreamento protéico. A imobilização de enzimas no interior dos poros do suporte minimiza seu contato com o meio externo, fornecendo um microambiente que inibe interações com outros compostos presentes no meio externo, prevenindo agregação, proteólise ou inativação por estes fatores. Entretanto, com o aumento da porosidade o K_M do derivado aumenta devido ao efeito difusional, sendo importante buscar um equilíbrio entre porosidade e efeito difusional.

[0055] Materiais que apresentam maior porosidade e hidroxilas de superfície apresentam melhores resultados quando funcionalizados utilizando a metodologia proposta neste estudo. Neste sentido o pré-tratamento ácido ou

alcalino associado com a descompressão térmica foi realizado para a exposição de grupos reativos na FC. A análise de infravermelho das fibras ativadas mostrou que a composição da fibra de coco exerceu grande influência no processo de ativação produzindo suportes com características distintas (Figura 3). Todas as bandas atribuídas são mostradas na Tabela 2 após a funcionalização com grupos aldeído. A intensidade da banda em 3313 cm^{-1} indica hidroxilas presentes na superfície da FC. Sendo as hidroxilas livres o principal grupo envolvido na ativação da fibra de coco utilizando a metodologia adotada, o aumento na transmitância nesta região indica uma diminuição das hidroxilas livre presentes na superfície do material. Esta diminuição indica eficiência do processo de ativação utilizando glicidol e glutaraldeído.

Tabela 2: Principais bandas observadas na análise de infravermelho com refletância total atenuada.

Comprimento de onda (cm^{-1})	Grupo funcional/Ligação	Polímero
1038,1027	C-O, C=C; C-C-O (estiramento)	Celulose, Hemicelulose, Lignina
1095,1103	Absorbância fraca	Lignina
1160, 1159	C-O-C(estiramnto assimétrico)	Celulose, Hemicelulose
1265	Vibração do anel aromático	Guaicil lignin
1313	CH_2	Celulose, Hemicelulose
1421	C-H (deformação no plano)	Lignina
1444	O-H (dobramento no plano)	Celulose, Hemicelulose and Lignina
1596, 1604	Anel aromatico (vibração) +	Lignina

	C=O (estiramento)	
--	-------------------	--

[0056] As bandas 1596 e 1604 cm^{-1} podem ser atribuídas aos grupos carboxila da lignina, sendo que o aumento da transmitância nesta região indica que, grupos da lignina podem estar participando das reações de ativação, aumentando a quantidade de grupos aldeído na FC submetida ao pré-tratamento ácido (Figura 3b). Uma diminuição também foi observada na região entre 1027-1038 cm^{-1} , onde é possível observar vibrações de ligações C-O na lignina/polifenóis e polissacarídeos. A determinação de grupos aldeído usando iodometria confirma os resultados obtidos pela análise de infravermelho, com um máximo de 656 μmol grupos aldeído/g para FC submetida ao pré-tratamento alcalino e 713 μmol s grupos aldeído/g para FC submetida ao pré-tratamento ácido. Em todos os casos, para fins comparativos a FC-gliceril foi oxidada para dar apenas 143 μmol s de grupos aldeído por grama, o grau máximo de ativação para da agarose CL-B6, utilizada como suporte comparativo.

Imobilização covalente da enzima lacase

[0057] A obtenção de derivados com excelente atividade, especificidade e estabilidade está diretamente relacionada à utilização de suportes adequados para a imobilização de enzimas, ou seja, materiais que ofereçam grandes áreas superficiais para a interação suporte-proteína e apresentem boa congruência geométrica para que estas interações sejam otimizadas o tanto quanto possível. Também é desejável que estes suportes apresentem uma alta densidade de grupos reativos que possa proporcionar a formação de ligações multipontuais entre proteína-suporte e

outros fatores como estabilidade e reatividade dos grupos presentes em sua superfície.

[0058] A fibra da casca de coco verde (FC) apresenta composição heterogênea sendo constituída principalmente de celulose, hemicelulose e lignina enquanto que, a agarose é constituída por cadeias lineares de β -D-galactopiranosil unidas por ligações (1,3) e unidades 3,6-anidro- α -D-galactopiranosil unidas por ligações (1,4). Esta composição diferenciada atribui aos dois suportes diferentes características que influenciam diretamente nas propriedades dos derivados obtidos, entretanto a presença de carboidratos permite que ambos sejam derivatizados utilizando reações amplamente conhecidas na química de polissacarídeos.

[0059] Algumas características bioquímicas dos suportes utilizados foram avaliadas (Tabela 3). Em relação ao carregamento proteico a FC mostrou desempenho muito próximo ao da agarose mesmo em altas concentrações de proteína, adsorvendo cerca de 96% de uma solução inicialmente com 60 mg de soroalbumina bovina. Contudo em concentrações extremas a agarose pode ser capaz de adsorver maior quantidade de proteína que a FC, já que a mesma apresenta alta porosidade e elevada área interna.

[0060] Em relação à densidade de grupos reativos na superfície dos suportes a FC apresenta uma densidade muito maior do que a agarose. Esta diferença pode estar relacionada à composição dos dois suportes, enquanto a agarose é constituída apenas de cadeias de D-galactopiranosil, a FC é constituída de celulose, hemiceluloses e lignina, apresentando uma quantidade maior

de grupos disponíveis para ativação. Embora a atividade recuperada tenha alcançado 100% para a fibra submetida ao tratamento ácido, esta atividade decai consideravelmente atingindo até 40% em uma semana. Esta instabilidade pode estar relacionada à quantidade de grupos reativos que causa uma rigidificação excessiva na estrutura terciária da lacase, levando a sua inativação.

Tabela 3: Características bioquímicas dos suportes derivatizados com glioxil

	Grupos reativos	Carreamento Proteico	AR	PI	TI
	$\mu\text{mol. g}^{-1}$	mg. g^{-1}	(%)	(%)	(horas)
Agarose 6BCL	100	57,9±0,1	60±0,01	98±0,1	2-5
Fibra de Coco ¹	656±0,06	57,4±0,18	54±0,09	78±0,05	5-10
Fibra de Coco ²	713±0,04	57,8±0,6	100±0,05	90±0,05	2-5

(1)Fibra da casca do coco tratada com NaOH 2%; (2)Fibra da casca do coco tratada com H₂SO₄ 2%; AR-Atividade recuperada; PI-Perfil de Imobilização; TI-Tempo de imobilização.

[0061] Para identificação das proteínas adsorvidas e não adsorvidas pelos suportes utilizados foi realizada SDS-PAGE do sobrenadante ao final do processo de imobilização (Figura 4). Em ambos os suportes não houve quantidades detectáveis da enzima lacase no sobrenadante após 5 horas de imobilização (Figura 4A.c e 4B.c), entretanto, uma proteína de aproximadamente 20 kDa ainda permanece em solução.

[0062] Os derivados antes e após redução com NaBH₄ foram tratados com β -mercaptoetanol e SDS, condições na qual ocorre a dissociação da enzima lacase ligada de forma

não covalentemente dos suportes. Antes e após a redução a enzima lacase se desprende do suporte agarose-glioxil (Figura 4A.d; 4A.e), enquanto que para os derivados da FC a enzima lacase não se desprende antes ou após a redução (Figura 3B.d; 3B.e). Este comportamento está relacionado ao tempo de imobilização, sendo que devido ao tempo reduzido de imobilização observado para os derivados agarose, provavelmente não houve formação de ligações multipontuais suficientes para manter a enzima ligada ao suporte nas condições dissociantes.

[0063] Enquanto que, ao utilizar a FC é necessário um tempo maior para que seja atingido o perfil máximo de imobilização, sendo que, este aumento do tempo de incubação da enzima e do suporte em pH 10 leva a formação de um número maior de ligações enzima-suporte estabilizando estes derivados mesmo antes da redução com NaBH_4 .

Caracterização cinética da enzima livre e dos derivados

[0064] Para os dois suportes utilizados a ligação covalente enzima-suporte ocorre entre os grupos aldeído do suporte e os grupos amino presentes na superfície protéica. Desta forma modificações químicas foram realizadas para promover um enriquecimento destes grupos e aumentando o perfil de imobilização. Modificações químicas que aumentam a estabilidade protéica desempenham importante função na imobilização. As lacases comercial e produzida perderam até 70% de sua atividade em meio alcalino após 2 horas e, quando aminadas conservaram até 100% de sua atividade em pH 10 após 24 horas. Considerando que a imobilização em agarose-glioxil ocorre em pH 10 a estabilidade resultante

da aminação constituiu um aspecto muito importante para a obtenção de um derivado ativo com excelente perfil de imobilização.

[0065] A aminação envolve a conversão dos grupos carboxílicos dos resíduos de aminoácidos glutâmico e aspártico e o carboxílico terminal em grupos amino, utilizando 1-etil-3-(dimetilamino-propil) carbodiimida (EDAC) na presença de etilenodiamina (EDA) pela formação de uma ponte amida entre os grupos carboxílicos da proteína e um dos grupos amino do EDA. Este novo grupo amino apresenta pKa de 9,2 e tem mais reatividade que os grupos amino dos resíduos de lisina presentes na superfície protéica. A percentagem de grupos carboxil modificados pode ser controlada pela concentração de EDAC utilizada, sendo que é desejável atingir o maior grau de modificação possível sem perdas de atividade e estabilidade.

[0066] Para avaliação da estabilidade e atividade das lacases aminadas com diferentes concentrações de EDAC foram utilizados os suportes agarose-glioxil e agarose-glutaraldeído. Em relação à atividade, os derivados agarose-glioxil foram mais ativos quando produzidos a partir da lacase aminada com 50 mmol.L⁻¹ de EDAC (Tabela 4 e 5), o que está diretamente relacionado a química destes grupos já que a imobilização em glioxil é estritamente dependente de regiões com alta densidade de grupos amino, características de uma enzima com maior percentagem de resíduos aminados.

Tabela 4: Lacase produzida imobilizada em Agarose 6BCL

Derivados	PI	AR	Temp. ótima	pH ótimo	T50*	Fator de estabilidade*
	(%)	(%)	(°C)	-	(horas)	-

LTv	-	-	70±0,01	3,0±0,03	1,30±0,3	-
LTv-Glioxil ¹	98±0,01	0,3±0,05	40±0,1	2,2±0,03	8,77±0,1	6,75±0,1
LTv-Glioxil ²	95±0,08	0,2±0,08	40±0,08	2,2±0,2	1,63±0,08	1,25±0,06
LTv-Glutaraldeído ¹	36±0,3	0,05±0,2	40±0,06	2,5±0,01	1,44±0,1	1,11±0,08
LTv-Glutaraldeído ²	48±0,1	0,05±0,03	50±0,01	2,5±0,01	1,19±0,2	0,92±0,1

LTv - Lacase de *Trametes versicolor*; (1) Lacase aminada com 50 mM EDAC; (2) Lacase aminada com 10 mM de EDAC. * Em tampão NaH₂PO₄/Na₂HPO₄ pH 6,0; 60 °C.

Tabela 5: Lacase comercial imobilizada em Agarose 6BCL

Derivados	PI	AR	Temperatura ótima	pH ótimo	T50*	Fator de estabilidade *
	(%)	(%)	(°C)	-	(horas)	-
LTv	-	-	60±0,02	3,5±0,1	1,24±0,4	-
LTv-Glioxil ¹	51±0,01	0,1±0,09	40±0,07	2,2±0,08	16,61±0,07	13,40±0,1
LTv-Glioxil ²	70±0,1	0,04±0,2	40±0,12	2,2±0,05	6,36±0,03	5,13±0,14
LTv-Glutaraldeído ¹	44±0,08	0,04±0,05	40±0,02	2,5±0,05	1,83±0,05	1,48±0,08
LTv-Glutaraldeído ²	35±0,01	0,09±0,02	50±0,18	2,5±0,15	1,33±0,05	1,07±0,2

LTv - Lacase de *Trametes versicolor*; (1) Lacase aminada com 50 mM EDAC; (2) Lacase aminada com 10 mM de EDAC. * Em tampão NaH₂PO₄/Na₂HPO₄ pH 6,0; 60 °C.

[0067] Para o suporte agarose-glutaraldeído a imobilização é realizada pelo grupo amino mais exposto e reativo em pH 7,0, ou seja, o amino terminal, neste caso a alta densidade de grupos amino obtida através da aminação não influencia diretamente a atividade e o perfil de imobilização do derivado. Como mostra a Tabela 4 os derivados agarose-glutaraldeído apresentam mesma atividade independente do grau de modificação química realizado, isto porque a imobilização nestes suportes ativados é dependente da quantidade total de grupos superficiais, mas não da densidade destes grupos por área se suporte como no caso do

glioxil.

[0068] A enzima lacase comercial imobilizada em agarose-glutaraldeído apresentou perfil de atividade diferente da enzima produzida porque o grau de modificações realizado afetou a atividade destes derivados. A imobilização utilizando glutaraldeído é estritamente dependente da força iônica e da presença de monômeros ou dímeros na superfície do suporte, sendo que, em alta força iônica a imobilização ocorre por regiões com maior carga negativa enquanto que em baixa força iônica a imobilização ocorre pelo grupo amino mais ativo em pH 7. Considerando que as lacases imobilizadas são de fontes diferentes é provável que alguns aspectos estruturais da lacase comercial tenham afetado sua imobilização em agarose-glutaraldeído, sendo que ao aumentar o grau de aminação das enzimas estas aspectos negativos foram maximizados.

[0069] O pH ótimo das lacases geralmente está localizado em faixas ácidas. Quando o ABTS é utilizado como substrato o pH ótimo normalmente está localizado abaixo de 4.0. Este perfil é atribuído a dois efeitos em particular, primeiramente a diferença de potencial entre o substrato e o íon cobre presente no centro T1, em segundo, a ligação de uma hidroxila nos íons cobre presentes no cluster T2/T3 em meio alcalino, que interrompe a transferência de elétrons do centro T1 para T2/T3.

[0070] Quando as lacases foram imobilizadas nos suportes agarose (glioxil ou glutaraldeído) apresentaram uma redução do pH ótimo. Independente do grau de modificação as duas lacases apresentaram o mesmo perfil frente aos dois suportes utilizados, onde os derivados

agarose-glioxil e agarose-glutaraldeído apresentaram pH de 2,2 e 2,5 respectivamente.

[0071] Em relação à temperatura ótima dos derivados o grau de modificações químicas realizado na enzima lacase influenciou apenas nos derivados agarose-glutaraldeído, onde as enzimas aminadas com 10 mmol.L^{-1} de EDAC apresentaram temperatura ótima maior em relação aos outros derivados. Este efeito pode estar relacionado ao estabelecimento de uma conformação mais termotolerante quando a enzima é aminada com concentrações menores de EDAC, considerando que um baixo grau de modificação química implica em pouca alteração conformacional e, que a imobilização em glutaraldeído leva a uma distorção muito reduzida da estrutura terciária em relação à imobilização em glioxil.

[0072] A estabilidade térmica foi maior para os derivados agarose-glioxil o que era esperado, já que utilizando este suporte é possível alcançar uma maior rigidificação da estrutura terciária protéica tornando-a menos susceptível a alterações conformacionais. As enzimas aminadas com maiores concentrações de EDAC foram mais estáveis, mesmo para o suporte glutaraldeído, sendo este aumento provavelmente associado à otimização de importantes interações enzima-suporte devido a presença de um número maior de grupos reativos na superfície protéica.

[0073] Estes resultados mostraram que a aaminação das enzimas com 50 mmol.L^{-1} de EDAC produz derivados mais estáveis e ativos por este motivo esta concentração foi utilizada para imobilização da enzima produzida pelo *T. versicolor* em FC (Tabela 6). Em relação à atividade,

temperatura e pH ótimos os derivados FC apresentaram resultados semelhantes a agarose, entretanto, o tratamento realizado na fibra afetou de diferentes formas estes parâmetros.

Tabela 6: Lacase produzida imobilizada em fibra da casca de coco verde

Derivados	PI	AR	Temp. ótima	pH ótimo	T50*	Fator de estabilidade
	(%)	(%)	(°C)	-	(horas)	-
LTV	-	-	70±0,01	3,0±0,03	1,3±0,3	-
LTV-Glioxil ¹	60±0.1	59±0.9	40±0,2	3,0±0,02	53,48±0,03	41±0,01
LTV-Glioxil ²	90±0.9	40±0.2	60±0,08	3,0±0,04	18,63±0,01	14±0,05
LTV-Glutaraldeído ¹	97±0.6	54±0.1	50±0,05	2,2±0,01	22,24±0,05	17±0,1
LTV-Glutaraldeído ²	98±1.0	44±0.0	40±0,15	3,0±0,01	5,10±0,08	4±0,08

Imobilização utilizando enzima aminada com 50 mM de EDAC. (1) FC tratada com NaOH; (2) FC tratada com H₂SO₄. * Em tampão NaH₂PO₄/Na₂HPO₄ pH 6,0; 60 °C.

[0074] A atividade dos derivados foi maior ao utilizar a FC submetida ao tratamento alcalino, efeito que pode em parte ser atribuído à otimização da congruência geométrica entre enzima-suporte, devido a sua composição e porosidade. A imobilização em FC não alterou o pH ótimo da enzima, contudo, a temperatura ótima dos derivados foi reduzida em cerca de 30-10 °C, entretanto observou-se um aumento da estabilidade da lacase, já que o tempo de meia vida dos derivados foi maior em relação a enzima solúvel a 60 °C (pH 6), sendo que o derivado FC-Glioxil lacase (NaOH) o apresentou fator de estabilidade de 41, destacando-se

como o mais estável nestas condições mesmo em relação aos derivados agarose.

[0075] Os dois suportes utilizados são constituídos de materiais muito diferentes e este aspecto influencia diretamente em seu desempenho operacional e nas características dos derivados obtidos (Tabela 7). Entretanto a FC apresentou resultados muito próximos a agarose em relação ao carreamento proteico, especificidade e atividade recuperada, indicando que este material quando submetido aos tratamentos citados neste trabalho leva a obtenção de um suporte para imobilização de enzimas com importantes características e de baixo custo. Sendo que quando a FC é ativada com as condições tradicionalmente utilizadas para a agarose pode-se obter um suporte com excelente estabilidade térmica e alta densidade de grupos reativos por grama de material.

Tabela 7: Principais características dos derivados mais estabilizados*

	AR (%)	K_M mmol. L ⁻¹	T ₅₀ horas	Fator de Estabilidade
LTV	-	0,071±0,01	1,3±0,3	-
Agarose-glioxil	0,3±0,05	10,60±0,01	8,77±0,1	6,75±0,1
FC-glioxil**	59±0,9	18,45±0,04	53,48±0,03	41±0,01

*Lacase produzida aminada com 50 mmol. L⁻¹ de EDAC; **Fibra tratada com NaOH (2%).

Clarificação de bebidas utilizando lacase imobilizada

[0076] Os substratos da lacase são constituintes importantes de vários alimentos e bebidas, sendo que, a modificação destes compostos pela enzima pode melhorar as

propriedades organolépticas e funcionais dos alimentos.

[0077] Os compostos fenólicos presentes no suco e seus produtos de oxidação natural atribuem cor e sabor a bebida. Contudo, a polimerização e as reações de co-oxidação destes compostos levam alterações indesejáveis de cor, sabor e aroma. A enzima lacase pode ser utilizada para oxidar alguns dos compostos fenólicos presente na bebida, produzindo radicais que reagem entre si formando polímeros insolúveis que podem ser separados por centrifugação. Esta estratégia aumenta a estabilidade coloidal da bebida e sua estabilidade dificultando sua turvação. Entretanto oligômeros mais leves podem permanecer em solução causando escurecimento e turvação do suco, caracterizados pela alta absorbância em 420 nm e 650 nm respectivamente.

[0078] O tratamento do suco de maçã (cv. Fuji) com derivados lacase-glioxil-FC levou a um aumento de sua cor e turbidez (Figura 5). Este efeito foi relatado anteriormente para o suco de romã e maçã, e pode ser atribuída a formação acentuada de oligômeros solúveis por estes derivados. Os derivados lacase-glutaraldeído-FC apresentaram eficiência na oxidação dos compostos fenólicos presentes no suco de maçã, com diminuição de até 61% da cor, e 29% da turbidez do suco. Os derivados Lacase-glioxil-FC removeram cerca de 40% destes compostos. Considerando que a proposta do tratamento utilizando a enzima é uma remoção branda, estes derivados apresentaram melhor potencial de aplicação já que, devido a sua ação de oxidação suave a capacidade antioxidante do suco diminuiu cerca de 40%. Os derivados Lacase-glutaraldeído-FC removeram até 65% dos compostos fenólicos do suco de maçã, levando a uma diminuição de 80%

em sua capacidade antioxidante.

[0079] Enzimas industriais frequentemente são utilizadas em um único ciclo. Contudo, quando imobilizadas podem ser reusadas por diversos ciclos, o que representa uma economia de tempo, enzima e custo. O ensaio de reuso dos derivados FC-lacase utilizando o suco de maçã mostrou que sua estabilidade é bastante elevada (Figura 6), já que todos conservaram mais de 90% de atividade após 10 ciclos de reuso, sendo que alguns derivados como FC-glioxil-lacase (NaOH) apresentaram mais de 100% de atividade após 10 ciclos. O número de ciclos de reuso varia de acordo com o método de imobilização utilizado e as características de cada derivado, sendo que alguns derivados industriais podem ser utilizados por até 1000 ciclos com excelente eficiência.

[0080] Embora a presença de compostos fenólicos nos alimentos seja frequentemente relacionada a benefícios a saúde limitando a oxidação lipídica, eles são os substratos iniciais para oxidação, participando no vinho, de reações enzimáticas e não-enzimáticas que levam ao seu escurecimento devido a formação de quinonas, processo conhecido como "madeirização". Um método não enzimático para prevenção do escurecimento consiste da adição de dióxido de enxofre e ácido ascórbico, entretanto, a formação de peróxido de hidrogênio pela oxidação do ácido ascórbico leva à necessidade de adicionar sulfito (SO_2) à bebida. Em contrapartida a todos estes aditivos o uso da lacase imobilizada leva a produção de um mosto livre de qualquer contaminante oriundo do processo de remoção de fenólicos, já que o derivado é removido de forma segura. O

tratamento do mosto é mostrado na Figura 7. Todos os derivados testados apresentaram alta eficiência para oxidação dos compostos fenólicos presentes no mosto. A redução na cor do mosto chegou a 90% para o derivado FC-glioxil-Lacase (H_2SO_4), com preservação de 40% e 60% dos fenólicos totais e capacidade antioxidante respectivamente.

[0081] Cada derivado apresentou um perfil diferente para a oxidação dos fenólicos do mosto. O tratamento com o derivado FC1 reduziu a cor e a claridade do suco em 61 e 40% respectivamente, entretanto a capacidade antioxidante foi bastante afetada, indicando que os fenólicos removidos contribuem de forma determinante para a alta atividade antioxidante apresentada. Em contrapartida, o derivado FC2 conseguiu uma eficiência muito maior na redução da cor e claridade 86 e 73% respectivamente, com concomitante redução de fenólicos. Contudo a atividade antioxidante foi similar à obtida no tratamento anterior (58%), indicando que os fenólicos removidos não são os mesmos observados no tratamento anterior, já que não são determinantes para a capacidade antioxidante da bebida. Embora nos dois casos a enzima tenha sido imobilizada utilizando grupos glioxil, os suportes ativados foram submetidos a dois tipos diferentes de pré-tratamento, modificações que levaram a obtenção de derivados com especificidades diferentes em relação aos compostos fenólicos presentes no mosto.

[0082] O ensaio de reuso dos derivados FC-Lacase utilizando mosto é mostrado na Figura 8. O perfil obtido foi semelhante ao observado para o suco de maçã com retenção de 80-100% da atividade enzimática após 10 ciclos de reuso. Os derivados glioxil apresentaram maior

estabilidade com retenção de 100-118% da atividade enzimática. Esta estabilidade pode estar relacionada tipo de interação observada nestes suportes, ligações multipontuais entre o suporte e regiões da superfície protéica com alta densidade de lisina, podem tornar a estrutura protéica mais rígida e menos susceptível a alterações conformacionais. Em contrapartida, a ligação entre suporte-amino terminal observada para os derivados glutaraldeído, podem não conferir rigidez suficiente à estrutura terciária para que a enzima apresente maior estabilidade térmica.

[0083] A cerveja não apresenta estabilidade coloidal sem tratamento adequado, estando sujeita a turvação (não permanente) e sedimentação (turvação permanente), efeitos resultantes da interação de seus componentes, que se agregam para formar partículas visíveis. Dentre os compostos presentes na cerveja, polifenóis e proteínas desempenham papel principal nas interações que levam a turvação da bebida. Diversos métodos têm sido empregados para estabilização coloidal da cerveja incluindo adsorventes e membranas filtrantes. As membranas de polivinilpirrolidina (PVPP) muito populares pelo baixo custo e fácil operação apresentam excelente eficiência na clarificação da cerveja, entretanto, diversas classes compostos fenólicos são afetadas, sendo que, modelos experimentais indicam que PVPP adsorve preferencialmente fenólicos pró-oxidantes. Embora alguns compostos fenólicos presentes na cerveja participem do processo de turvação e sedimentação, muitas propriedades bioativas são atribuídas a estes compostos sendo que uma remoção branda, seletiva e

específica se torna desejável. A utilização da enzima lacase livre da cerveja não maturada como agente floculante e estabilizante da bebida, apresentou alta eficiência em sua clarificação.

[0084] Nesse sentido o tratamento enzimático se torna uma ferramenta importante devido às características como seletividade e especificidade das enzimas. O tratamento enzimático da cerveja tipo malte com ou sem suplementação com caldo de cana esta representada na Figura 9. Para a cerveja puro malte (Figura 9A) os derivados Lacase-glutaraldeído-FC apresentaram maior eficiência, sendo que, a remoção dos fenólicos da cerveja foi muito branda (16%) com redução de até 27% da cor preservando 71% da capacidade antioxidante. A cerveja suplementada com 50% de caldo de cana (Figura 9B) a capacidade antioxidante preservada com maior eficiência (93-83%), entretanto a remoção da cor (27%) e dos compostos fenólicos (14%) foi similar à cerveja puro malte para os derivados Lacase-glutaraldeído-FC. Estes resultados indicam que os derivados Lacase-glutaraldeído-FC apresentam seletividade e especificidade em relação aos compostos fenólicos oxidados, já que na cerveja puro malte, os fenólicos removidos diminuíram 29% da capacidade antioxidante da bebida enquanto que na cerveja suplementada com caldo de cana esta diminuição foi de 11%. Com o aumento da proporção de caldo de cana na cerveja, observa-se um aumento na percentagem de álcool presente na bebida, esta é uma das principais diferenças entre as formulações, e um dos fatores que podem estar modulando a seletividade observada.

[0085] A clarificação da cerveja suplementada com

75% de caldo de cana apresentou os melhores resultados (Figura 9C). Todos os derivados apresentaram uma seletividade muito expressiva para remoção dos fenólicos que não contribuem significativamente para a capacidade antioxidante da bebida. Os derivados Lacase-glioxil-FC apresentaram melhores resultados em relação às formulações anteriores com redução de 25% da cor da cerveja preservando 78% de sua capacidade antioxidante. Os derivados FC3 e FC4 apresentaram desempenho ainda melhor com redução de 36% da cor preservando 86% da capacidade antioxidante.

[0086] Estes resultados mostram que a lacase imobilizada apresentou eficiência na oxidação dos compostos fenólicos da cerveja mesmo em baixas temperaturas e concentrações elevadas de álcool. A remoção de fenólicos efetuada pela enzima imobilizada foi bastante seletiva já que o produto final apresentou uma alta concentração de fenólicos, e excelente retenção da capacidade antioxidante após o tratamento.

Ensaio de citotoxicidade do suco de maçã após tratamento utilizando lacase imobilizada

[0087] Enquanto a utilização de microrganismos no processamento de alimentos é uma prática que apresenta séculos ou até mesmo milhares de anos, a aplicação de preparações enzimáticas de origem microbiana para a mesma finalidade é relativamente nova com os primeiros relatos surgindo apenas na metade do século XX. Estas preparações podem ser utilizadas nos processamentos dos alimentos como aditivos ou adjuvantes, e em ambos os casos são constituintes do produto final e serão ingeridas com o mesmo, entretanto, quando enzimas imobilizadas são

utilizadas as preparações enzimáticas não estão presentes no produto final.

[0088] O tipo de interação enzima-suporte é um aspecto importante já que compostos utilizados na preparação das enzimas imobilizadas podem contaminar o alimento, sendo necessária uma caracterização desta interação quanto a sua estabilidade. Neste sentido os testes realizados com os derivados FC na presença de SDS e β -mercaptoetanol comprovaram que a interação entre enzima-suporte não pode ser desfeita sem clivagem química da ligação covalente. Entretanto outros componentes presentes na preparação enzimática podem ser adsorvidos no suporte durante o processo de imobilização e liberados durante o processamento do alimento, a exemplo da proteína de 20 kDa presente na preparação que foi desorvida durante os testes com SDS e β -mercaptoetanol.

[0089] Devido à presença de outros componentes na preparação enzimática além da enzima de interesse, torna-se importante investigar a segurança das enzimas imobilizadas para utilização em alimentos e fármacos. Dentre as diversas estratégias disponíveis destacam-se testes de toxicidade utilizando animais, patogenicidade e de mutagenicidade utilizando células. Outra estratégia é a avaliação do produto final, quanto a sua segurança após ser tratado com enzimas imobilizadas.

[0090] Estudos toxicológicos de uma preparação enzimática da enzima lacase de *Myceliophthora thermophila* foram reportados anteriormente. Ensaio de toxicidade aguda por via oral, respiratória e dérmica mostraram que a preparação enzimática não apresentou efeitos tóxicos em

ratos, embora tenha mostrado um pequeno potencial para sensibilização dérmica em humanos. A preparação a base da enzima não apresentou mutagênicidade; mas testes de aberração cromossômica indicaram potencial clastrogênico, contudo a preparação foi considerada segura para uso alimentar e parâmetros como dose diária estimada e LD50 foram estabelecidos. Ensaio toxicológico foram realizados para uma preparação enzimática contendo lipase imobilizada, entretanto, ensaios toxicológicos para preparações utilizando enzimas imobilizadas não são usuais na literatura, sendo que poucos relatos são encontrados.

[0091] HepG2 é uma linha celular derivada de um tumor de fígado humano (hepatoma), realizando a secreção e esterificação do colesterol assim como síntese e metabolismo de ácidos biliares, sendo consideradas células metabólicas.

[0092] O suco de maçã apresenta densidade de 1,06 mg/mL, e nestas condições a viabilidade celular foi 100% (Figura 10), mostrando que após tratamento com a enzima lacase imobilizada a bebida não apresenta citotoxicidade, a concentração do suco em até 63 vezes não produziu efeitos citotóxicos sobre as células, entretanto, o suco tratado e não tratado quando concentrado 125 vezes apresenta citotoxicidade, diminuindo a viabilidade celular em 20%.

[0093] Nestas condições o suco apresenta elevada viscosidade e alta concentração de açúcares, aspectos que podem ser responsáveis pela diminuição da viabilidade celular, já que um perfil muito similar foi observado para o suco natural e tratado. A determinação da concentração inibitória (IC50) mostrou que não houve diferença

significativa entre o suco natural e tratado, sendo o IC50 170,3±17,4 e 184,7±42,4 mg/mL respectivamente.

[0094] Durante a preparação dos derivados vários reagentes químicos foram utilizados, dentre estes destacam-se o glutaraldeído e o glicidol por sua toxicidade e por estes serem os compostos utilizados para ligar a enzima lacase ao suporte. Devido ao caráter covalente da ligação entre enzima-suporte o desprendimento destes compostos e sua presença no produto final são improváveis, contudo, eles foram utilizados como controle positivo no ensaio de citotoxicidade. A concentração dos dois compostos nas condições do tratamento foi de 0,5 mmol. L⁻¹, sendo que nestas condições não foi observada diminuição da viabilidade células para os dois compostos (Figura 11). A concentração inibitória ao crescimento de 50% das células para o glutaraldeído e glicidol foi de 112,4±17,8 e 25,0±1,3 mM respectivamente.

[0095] A partir dos resultados apresentados concluiu-se que os pré-tratamentos utilizados na fibra de coco verde foram eficientes em preparar o material para o processo de funcionalização, levando a exposição de grupos reativos para posterior ativação. A metodologia adotada para o processo de ativação foi eficiente em modificar a superfície da fibra de coco verde com grupos aldeído, sendo que este suporte pode atingir um grau de ativação superior ao da agarose CL-BC.

[0096] O suporte desenvolvido a partir da fibra de coco verde foi eficiente em imobilizar a enzima lacase de *T. versicolor*, com excelentes perfis de imobilização e atividade recuperada e fator de estabilidade.

[0097] Ainda, ressalta-se que o derivado descrito nesta invenção não se limita às aplicações aqui mencionadas. Assim, é óbvio para aqueles versados na técnica que alterações e modificações podem ser implementadas visando o aprimoramento do projeto, sem que tais alterações não estejam cobertas pelo escopo da presente invenção.

Reivindicações

1. Processo de obtenção de um suporte sólido para imobilização de enzimas, **CARACTERIZADO** por compreender as etapas de:

- a) pré-tratamento da fibra de coco verde;
- b) ativação e derivatização da fibra de coco verde.

2. Processo, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** por a etapa a) compreender tratamento térmico da fibra moída e tamisada contendo partículas de 20 mesh em autoclave em H_2SO_4 ou NaOH 2% por 20 minutos e posterior lavagem da fibra tratada com água até que o pH da água de lavagem seja neutro.

3. Processo, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** por a etapa b) compreender a adição de água à fibra de coco verde em um volume de até 20 vezes a massa utilizada sendo a proporção ótima 10:1 respectivamente, contendo NaOH com concentração final entre 0,5 e 2,0 mol/L, $NaBH_4$ com concentração final entre 10 e 30 mg/mL, e 2,3-epoxi-propanol com concentração final entre 1,0 e 2,0 mol/L, permanecendo esta suspensão em agitação suave por até 18 h a temperatura ambiente e posterior filtragem da solução e lavagem do suporte com água destilada.

4. Processo, de acordo com a reivindicação 3, **CARACTERIZADO** por ser adicionado ao suporte lavado 100 a 700 μ mol de $NaIO_4$ por grama de suporte, 10-20 volumes de água em agitação por até 2 h e lavagem com água do suporte e em seguida, adição de um volume de até 8 vezes de etilenodiamina 1 mol/L, sendo 1:6 a proporção ótima, manutenção da solução em pH 10 por até 2 h e posterior adição de 10-20 mg de $NaBH_4$ por mL de solução por até 30

minutos e lavagem do suporte com 4 volumes de tampão de acetato de sódio em pH 4 e água destilada.

5. Processo, de acordo com as reivindicações 3 e 4, **CARACTERIZADO** por a derivatização compreender a adição de 3-5 mmols de glutaraldeído por grama de fibra em tampão fosfato 0,05 mol/L, pH 7 e lavagem do suporte com até 20 volumes de tampão fosfato 25 mmol/L, pH 7 e água.

6. Suporte sólido de fibra de coco verde **CARACTERIZADO** por ser obtido de acordo com o processo descrito nas reivindicações 1 a 5.

7. Processo de imobilização de enzimas **CARACTERIZADO** por compreender as etapas de:

- a) imobilização da enzima em suportes glioxil;
- b) imobilização da enzima em suportes glutaraldeído.

8. Processo, de acordo com a reivindicação 7, **CARACTERIZADO** por a etapa a) compreender a adição de 5-20 mL de bicarbonato de sódio 100 mol/L, pH 10 à 1-5 g de suporte sólido de fibra de coco verde, conforme definido na reivindicação 6 e posterior adição de 5-10 unidades enzimáticas em agitação suave a 25 °C.

9. Processo, de acordo com a reivindicação 7, **CARACTERIZADO** por a etapa b) compreender a adição de 5-20 mL de fosfato de sódio 100 mol/L, pH 7 à 1-5 g de suporte sólido de fibra de coco verde, conforme definido na reivindicação 6 e posterior adição de 5-10 unidades enzimáticas em agitação suave a 25 °C.

10. Processo, de acordo com as reivindicações 8 e 9, **CARACTERIZADO** por ser adicionado borohidreto de sódio 1 a 5 mg/mL de solução ao final das reações em agitação suave por até 30 minutos e posterior lavagem dos derivados obtidos

com água destilada.

11. Derivado **CARACTERIZADO** por ser obtido de acordo com o processo descrito nas reivindicações 7 a 10.

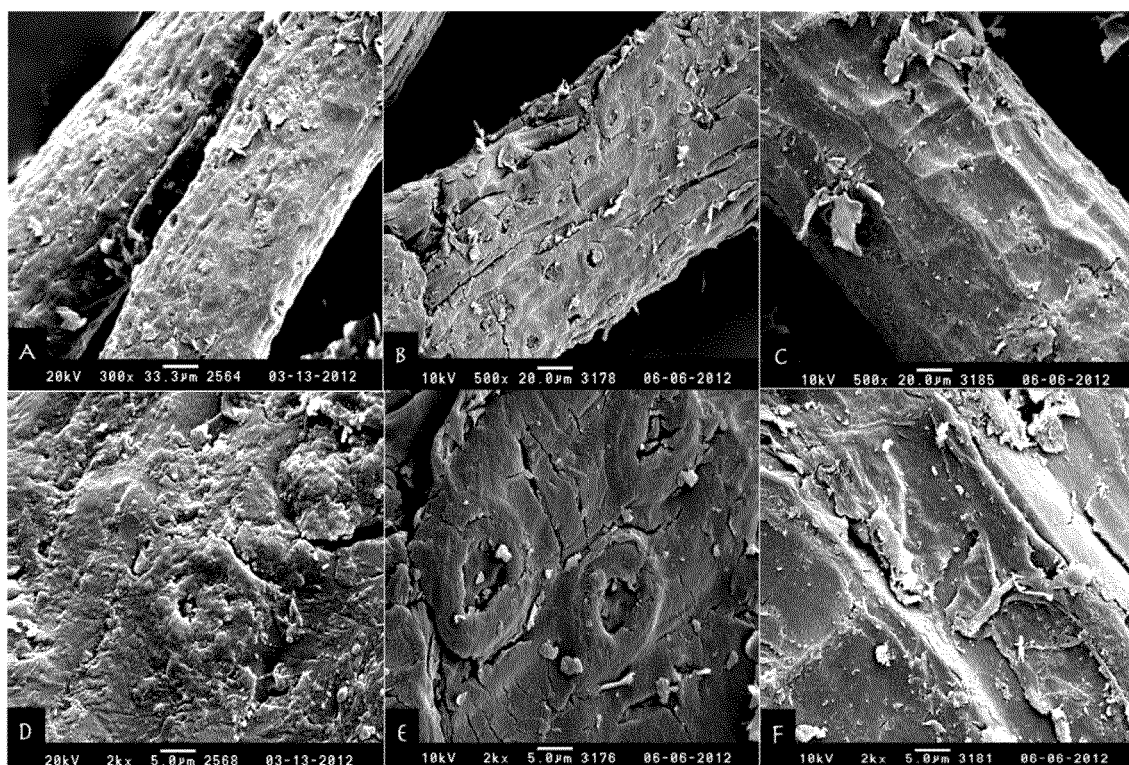


Figura 1

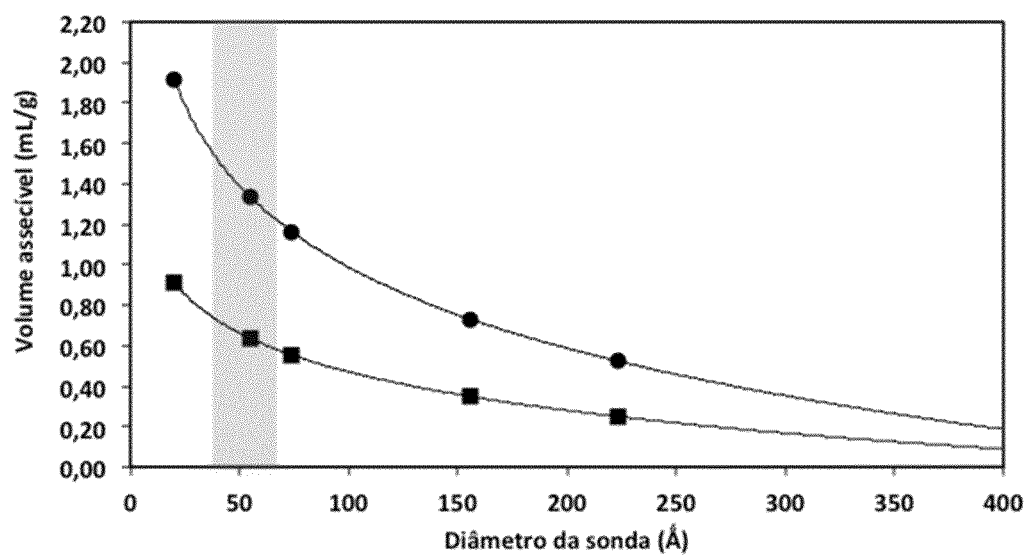


Figura 2

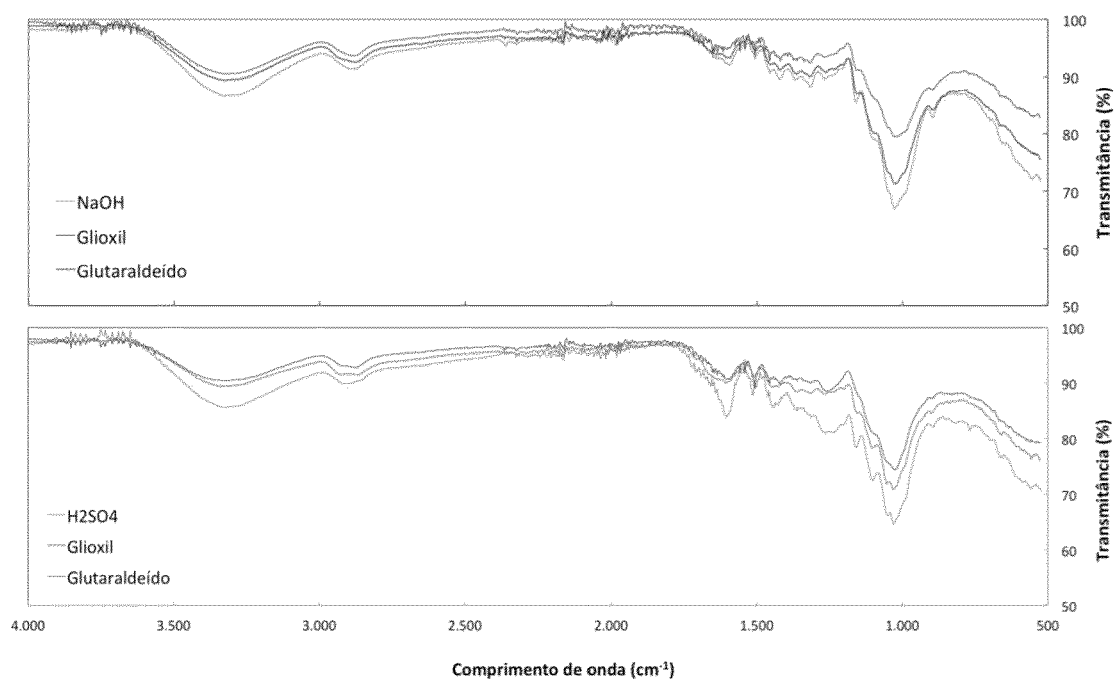


Figura 3

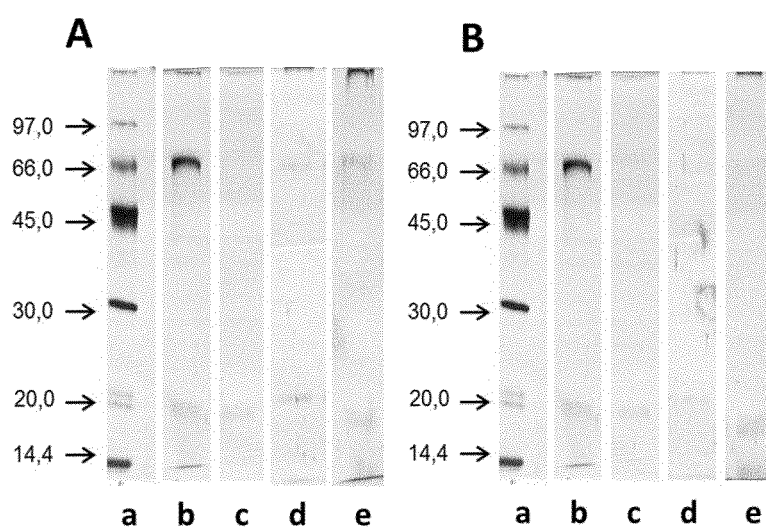


Figura 4

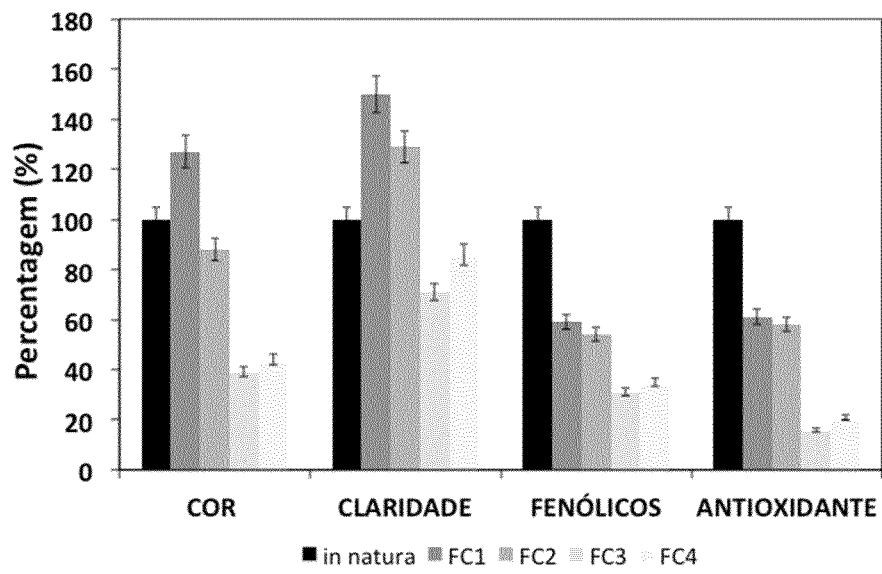


Figura 5

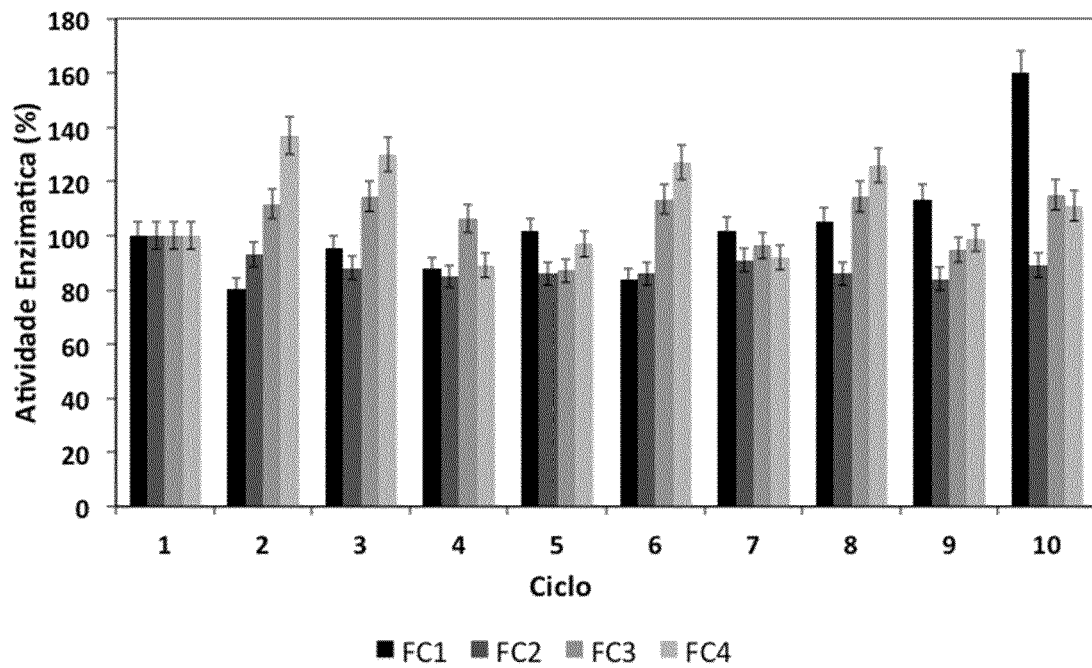


Figura 6

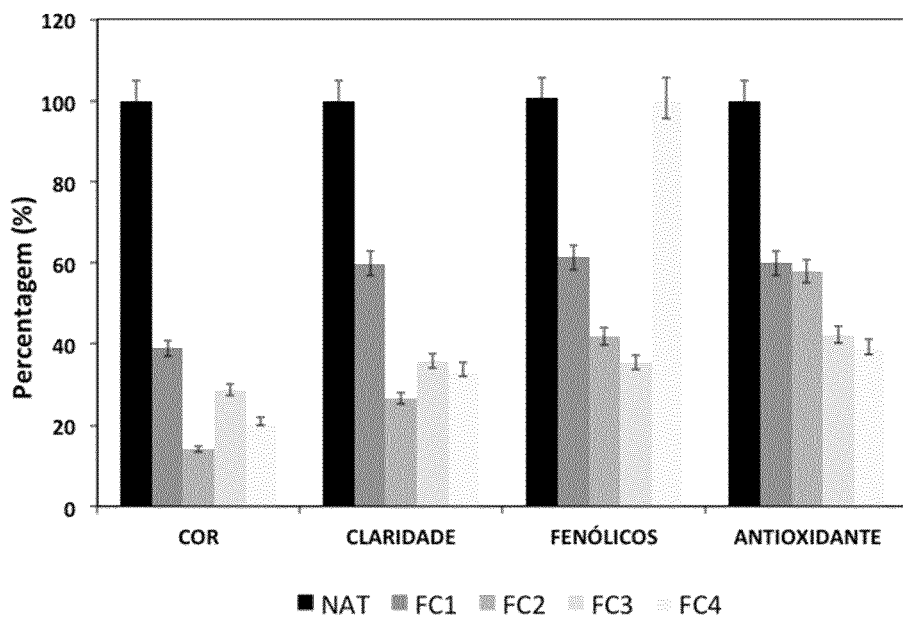


Figura 7

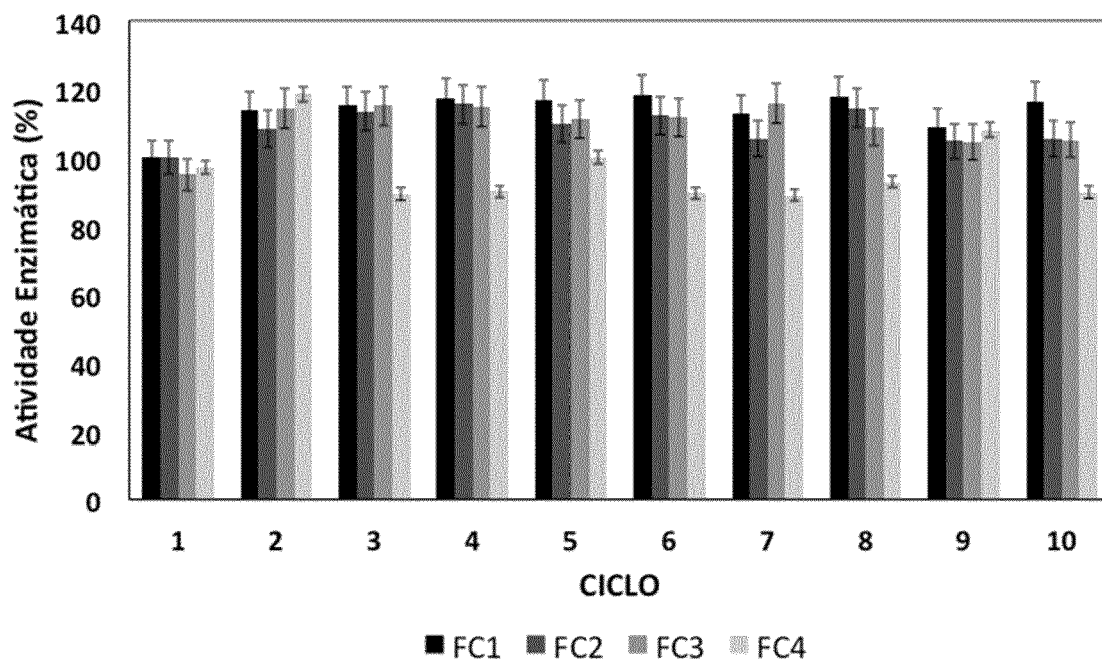


Figura 8

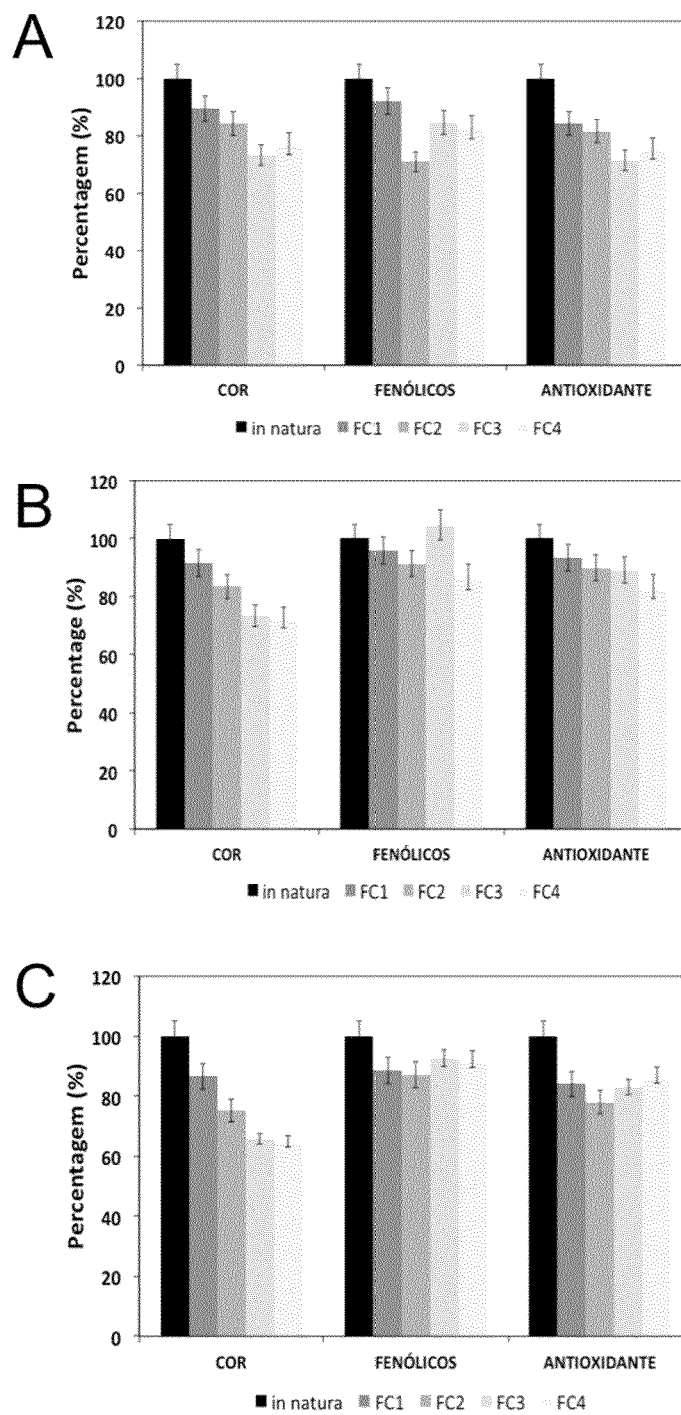


Figura 9

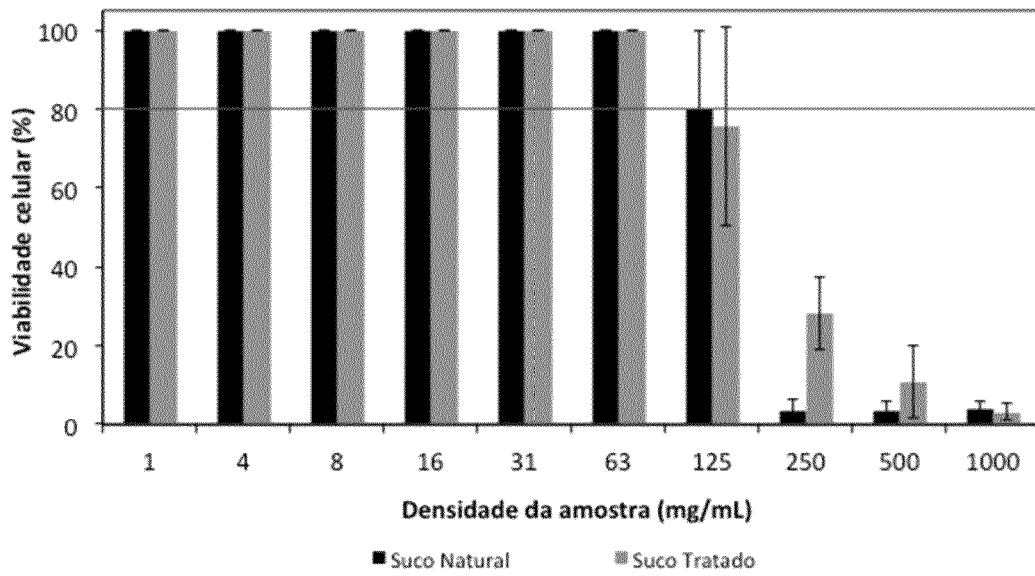


Figura 10

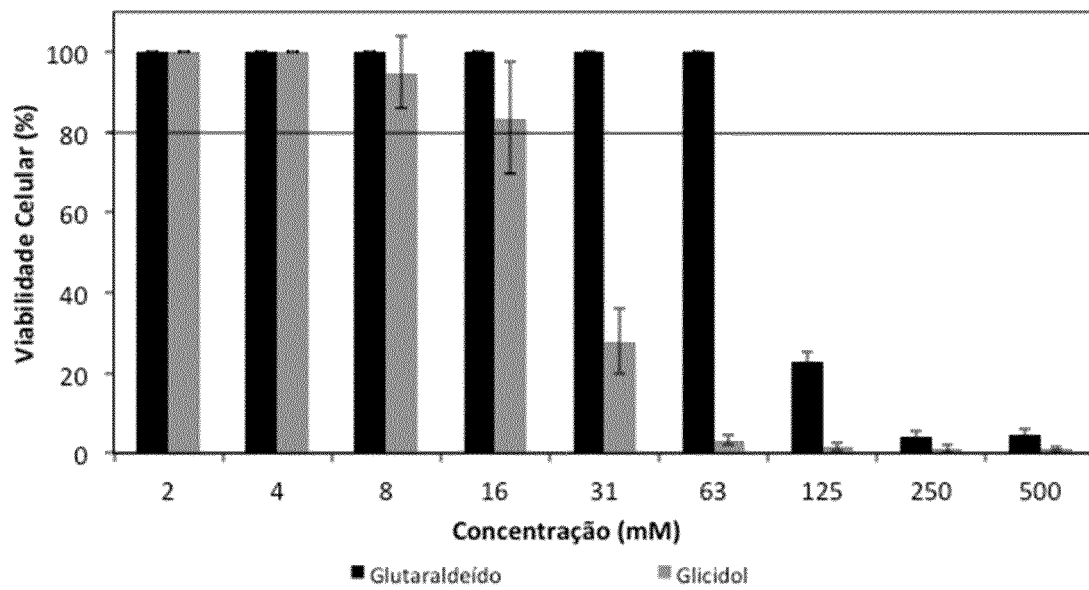


Figura 11

Resumo**PROCESSO DE OBTENÇÃO DE UM SUPORTE SÓLIDO PARA IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS, SUPORTE SÓLIDO DE FIBRA DE COCO VERDE, PROCESSO DE IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS E DERIVADO OBTIDO**

A presente invenção refere-se ao processo de obtenção de um substrato para imobilização de enzimas, ao processo de imobilização de enzimas e ao derivado obtido. O processo de obtenção consiste na modificação da lignocelulose proveniente da fibra de coco verde com o objetivo de reagir com enzimas (proteínas) e atuar na imobilização destas. O processo de imobilização possui como finalidade a reutilização, estabilização ou purificação destes compostos.