

**UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA AMBIENTAL**

EGON PETERSOHN JUNIOR

**IMOBILIZAÇÃO DE PAPAÍNA EM MEMBRANAS DE
NANOCELULOSE BACTERIANA**

DISSERTAÇÃO

CURITIBA

2019

EGON PETERSOHN JUNIOR

**IMOBILIZAÇÃO DE PAPAÍNA EM MEMBRANAS DE
NANOCELULOSE BACTERIANA**

Dissertação de mestrado apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia Ambiental, do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – Campus Curitiba.

Área de concentração: Biotecnologia Ambiental.

Orientador: Prof. Dr. Gustavo Henrique Couto
Coorientador: Prof. Dr. José Domingos Fontana

CURITIBA

2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

Petersohn Junior, Egon

Imobilização de papaína em membranas de nanocelulose bacteriana
/ Petersohn Jr., Egon.-- 2019.

1 arquivo de texto : PDF ; 1,92 MB

Disponível via World Wide Web

Texto em português, com resumo em inglês

Dissertação (Mestrado) - Universidade Tecnológica Federal do
Paraná. Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia
Ambiental, Curitiba, 2019

Bibliografia: p. 100-116

1. Tecnologia ambiental - Dissertações. 2. Papaína. 3. Enzimas
imobilizadas. 4. Celulose. 5. Biorremediação. I. Couto, Gustavo
Henrique, orient. II. Fontana, José Domingos, coorient. III. Universidade
Tecnológica Federal do Paraná - Programa de Pós-graduação em Ciência
e Tecnologia Ambiental, inst. IV. Título.

CDD: Ed. 22 -- 363.7

Biblioteca Ecoville da UTFPR, Câmpus Curitiba
Lucia Ferreira Littiere - CRB 9/1271

TERMO DE APROVAÇÃO DE DISSERTAÇÃO Nº 119

A Dissertação de Mestrado intitulada: IMOBILIZAÇÃO DE PAPAÍNA EM SUPORTE DE NANOCELULOSE BACTERIANA, defendida em sessão pública pelo(a) candidato(a) **Egon Petersohn Junior**, no dia 28 de fevereiro de 2019, foi julgada para a obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia Ambiental, área de concentração Tecnologias e Processos Ambientais, e aprovada em sua forma final, pelo Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental.

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Gustavo Henrique Couto - Presidente - UTFPR

Profa. Dra. Giselle Maria Maciel – UTFPR

Prof. Dr. Marcelo Müller dos Santos - UFPR

A via original deste documento encontra-se arquivada na Secretaria do Programa, contendo a assinatura da Coordenação após a entrega da versão corrigida do trabalho.

Curitiba, 28 de fevereiro 2019.

Carimbo e Assinatura do(a) Coordenador(a) do Programa

À Roberta, por todos os momentos.

AGRADECIMENTOS

De antemão, gostaria de dizer que as poucas palavras que aqui cabem não são suficientes para expressar o meu agradecimento. Assim, se porventura estas linhas soarem rasas, faltosas e/ou de pouca justiça, é porque o são. Espero que todos compreendam. E se alguém sentir que foi esquecido, espero que perdoe...

Meus mais sinceros e humildes agradecimentos aos meus professores orientadores Gustavo H. Couto e José D. Fontana, que me guiaram por esta etapa do conhecimento.

Às professoras Cristiane Pilissão e Giselle M. Maciel, cujas sugestões e correções na qualificação foram de uma ajuda inestimável.

A todos os professores do programa de pós-graduação, cujos conhecimentos e amor ao ensino são de grande inspiração aos que seguem seus passos.

Aos colegas de laboratório, sempre presentes e solícitos.

Ao Centro Multiusuário de Caracterização de Materiais – CMCM – e seus profissionais, os quais com muita paciência e boa vontade ajudaram neste trabalho.

O Laboratório Multiusuário de Análises Químicas (LAMAQ), em especial a Rúbia Bottini, sempre solícita e bem-disposta.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Capes – que torna possível o sonho de muitos.

E a todos os professores, funcionários, pessoal de apoio e alunos da UTFPR meus sinceros agradecimentos. Afinal, uma Universidade não é feita de paredes e muros, mas de pessoas de valor que se dedicam ao conhecimento.

Você não sente nem vê
Mas eu não posso deixar de dizer, meu amigo
Que uma nova mudança em breve vai acontecer
E o que há algum tempo era jovem e novo, hoje é antigo
E precisamos todos rejuvenescer

Velha Roupa Colorida
Belchior

A ciência é, portanto, uma perversão de si mesma, a menos que tenha como fim
último, melhorar a humanidade.

Nikola Tesla

RESUMO

Petersohn Jr., Egon. **Imobilização de papaína em membranas de nanocelulose bacteriana**. 119 f. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Curitiba, 2019.

Nanocelulose bacteriana é um tipo de celulose produzido na forma de membrana hidrogel por algumas bactérias e que possui propriedades únicas, tais como, elevada pureza e cristalinidade, alta capacidade de retenção de água (>98%), resistência mecânica, estrutura tridimensional das fibrilas de celulose em escala nanométrica e biocompatibilidade. A papaína é uma protease vegetal de amplo uso comercial, principalmente na indústria de alimentos, cosmética e na área médica. O estudo teve como objetivo produzir e utilizar a membrana de nanocelulose bacteriana para imobilizar papaína empregando dois métodos - adsorção e reticulação – visando avaliar o biopolímero quanto a atividade proteolítica sob diferentes condições reacionais e seu reuso. Membranas nanocelulose bacteriana foram produzidas por cultivo estático de *Gluconacetobacter* sp. Após 5-7 dias de cultivo a 28 °C foram produzidas membranas num rendimento de 5,3 g/L de meio de cultivo (peso seco). A melhor faixa de pH para imobilização por ambas as técnicas foi próxima ao neutro. A temperatura ótima de hidrólise de azocaseína nas duas formas da papaína imobilizada ficou entre 70-80 °C, com um pH ótimo de atividade sendo 7,0. Com relação a estabilidade após incubação prévia de 2 h em diferentes pHs, a papaína livre apresentou maior estabilidade nos pHs 3, 7, e 11 que as formas imobilizadas na membrana de nanocelulose bacteriana. Considerando a estabilidade frente a temperaturas elevadas, após incubação a 75 °C durante 2 h, a papaína imobilizada pelo método de adsorção apresentou 81% de atividade residual contra 43 % de atividade residual da forma livre. A atividade relativa residual medida após 4 horas de pré-incubação em diferentes solventes orgânicos, a papaína imobilizada por adsorção apresentou elevada estabilidade frente ao etanol (96,4% contra 85,6% da papaína livre) ao passo que a papaína imobilizada por reticulação teve uma maior estabilidade ao dimetilsulfóxido (35,2% contra 0,5% da papaína livre). Frente ao hexano, as duas formas imobilizadas de papaína apresentaram atividades residuais equivalentes (92,3% para as duas contra 83,7% da forma livre). A incubação durante 1 h com metais bivalentes (20 mM) mostrou atividade residual 13,4% e 29,5% em relação ao cobre e 16,2% e 34,2% para o zinco nas formas imobilizadas de papaína por adsorção e reticulação, respectivamente. Após sete ciclos de reuso a papaína imobilizada por reticulação apresentou 53,5% de sua atividade original sendo de 31,6 % para a imobilizada por adsorção. A estocagem a 28 °C a seco da forma imobilizada por reticulação e adsorção permitiu a manutenção de 100 e 80% de sua atividade proteolítica, respectivamente, após 4 semanas. Os resultados mostram que é possível agregar características novas tanto para a enzima quanto para a nanocelulose em si, com possibilidade de aplicação como curativos com ação desbridante.

Palavras-chave: Nanocelulose bacteriana. Papaína. Imobilização de enzimas.

ABSTRACT

Petersohn Jr., Egon. **Immobilization of papain on bacterial nanocellulose membranes**. 119 p. Masters dissertation. Postgraduate Program in Environmental Science and Technology. Federal Technological University of Paraná. Curitiba, 2019.

Bacterial nanocellulose is a type of cellulose produced in the form of a hydrogel membrane by some bacteria and has unique properties such as high purity and crystallinity, high water retention capacity (> 98%), mechanical strength, three-dimensional structure of fibrils of cellulose at nanometric scale and biocompatibility. Papain is a plant protease of wide commercial use, mainly in the food, cosmetic and medical industry. The study aimed to produce and use bacterial nanocellulose membrane to immobilize papain using two methods - adsorption and crosslinking - to evaluate the biopolymer as the proteolytic activity under different reaction conditions and its reuse. Bacterial nanocellulose membranes were produced by static culture of *Gluconacetobacter* sp. After 5-7 days of culturing at 28 °C membranes were produced in a yield of 5.3 g/L of culture medium (dry weight). The best pH range for immobilization by both techniques was close to neutral. The optimum azocasein hydrolysis temperature in the two forms of immobilized papain was between 70-80 °C, with an optimum pH of activity being 7.0. Regarding the stability after 2 h incubation at different pHs, free papain presented higher stability at pHs 3, 7, and 11 than the forms immobilized on the bacterial nanocellulose membrane. Already considering stability to high temperatures, after incubation at 75 °C for 2 h, papain immobilized by the adsorption method presented 81% residual activity against only 43% residual free form activity. Regarding the residual relative activity measured after 4 hours of preincubation in different organic solvents, papain immobilized by adsorption presented high stability against ethanol (96.4% of residual relative activity against 85.6% of free papain) whereas papain immobilized by crosslinking had a higher stability to dimethylsulfoxide (35.2% residual activity versus 0.5% free papain). Compared to hexane, the two immobilized forms of papain showed equivalent residual activities (92.3% for the two forms versus 83.7% of the free form). Incubation for 1 h with bivalent metals (20 mM) showed residual activity 13.4% and 29.5% relative to copper and 16.2% and 34.2% for zinc in the immobilized forms of papain by adsorption and crosslinking, respectively. After seven cycles of reuse the papain immobilized by crosslinking presented 53.5% of its original activity and 31.6% for the immobilized by adsorption. Storage at 28 °C in dry form of immobilized form by crosslinking allowed the maintenance of 100% of its proteolytic activity, while the immobilized by adsorption had 80% of its preserved activity after 4 weeks. The results show that it is possible to add new characteristics to both the enzyme and the nanocellulose itself, with the possibility of application as curatives with debriding action.

Key words: Bacterial nanocellulose. Papain. Immobilization of enzymes.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação esquemática do mecanismo catalítico das cisteína proteases lisossomais, exemplificado pela papaína.	21
Figura 2 Estrutura terciária (3D) da papaína (em verde) associada ao ligante N-[(benzyloxi)carbonil]-L-leucil-N-[(2S)-1-hidroxi-4-metilpentano-2-yl]-L-leucinamida (em azul) no sítio ativo.	24
Figura 3. Representação dos principais métodos de imobilização. A) Ligação covalente; B) Adsorção; C) Reticulação; D) Interação iônica; E) Aprisionamento/Encapsulamento.....	29
Figura 4. Estrutura molecular da celulose.	35
Figura 5. Representação de um material lignocelulósico.	36
Figura 6. (a) Membrana de celulose bacteriana. (b) Pele substituta. (c) Nata de coco.	39
Figura 7. Extrusão de nanofibrilas de celulose por <i>Gluconacetobacter xylinus</i>	43
Figura 8. Fluxograma esquemático das etapas da pesquisa	45
Figura 9. Extração do látex do mamão contendo papaína (papaína bruta).....	46
Figura 10. Representação esquemática do procedimento empregado para o cultivo de NCBs em placas de cultivo celular de 6 poços.	49
Figura 11. Esquema do processo de limpeza das membranas de NCB.	50
Figura 12. Curva de atividade de papaína livre em função do tempo (A) e Curva de calibração de azocaseína.....	52
Figura 13. Curva de calibração para quantificação de proteínas.	59
Figura 14. Aspecto visual da papaína comercial (A) e da papaína coletada (B).	64
Figura 15. Produção de membranas de NCB em placa de cultivo de células.	65
Figura 16. Aspecto nas membranas de NCB hidratada e secas	67
Figura 17 Morfologia das membranas de NCB hidratada e liofilizada e NCB-Papaína	68
Figura 18. Microscopia eletrônica de varredura. A: membrana de NCB; B: membrana de NCB com papaína imobilizada por adsorção com o uso de tampão; C: membrana de NCB com papaína imobilizada por adsorção sem o uso de tampão; D: membrana de NCB com papaína imobilizada por reticulação sem o uso de tampão	69

Figura 19. Ensaio de Lowry adaptado para detecção de papaína nas amostras de NCB	70
Figura 20. Espectros de análise FTIR das NCBs e papaína	71
Figura 21. Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) de caseína e BSA digeridos com papaína imobilizada em NCB.....	73
Figura 22. Cinética de imobilização de papaína em membrana de NCB hidratada. .	75
Figura 23. Atividade enzimática de papaína imobilizada em diferentes pHs.....	79
Figura 24. Gráfico duplo-recíproco de Lineweaver-Burk	82
Figura 25. Efeito do pH do meio reacional na atividade enzimática	84
Figura 26. Efeito da temperatura na atividade enzimática.....	86
Figura 27. Estabilidade da papaína livre e imobilizada incubada em pH 3,0 (A), pH 7,0 (B) e 10,0 (C)	88
Figura 28. Estabilidade térmica a 50 °C (A), 75 °C (B) e 90 °C (C).....	89
Figura 29. Estabilidade de reuso da papaína imobilizada	95
Figura 30. Estabilidade de estocagem da papaína livre e imobilizada por adsorção (Ads) reticulação (CL).	97

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Características da papaína.....	25
Tabela 2 - Classificação dos suportes para imobilização de enzimas.....	32
Tabela 3 - Características da celulose vegetal e da celulose bacteriana	38
Tabela 4 - Espécies produtoras de NCB com as respectivas fontes de C e rendimentos	41
Tabela 5 - Propriedades das papaínas coletadas e comercial (Sigma®).....	63
Tabela 6 - Percentual de proteínas imobilizadas pela técnica de adsorção em diferentes faixas de pH.....	76
Tabela 7 - Análise de variância do ensaio de melhor faixa de pH para imobilização de proteínas por adsorção.	77
Tabela 8 - Percentual de proteínas imobilizadas pela técnica de reticulação (CL) em diferentes faixas de pH.....	78
Tabela 9 - Análise de variância do ensaio de melhor faixa de pH para imobilização de proteínas por reticulação.....	78
Tabela 10 - Análise de variância do teste de atividade para o ensaio de melhor faixa de pH para imobilização de papaína por adsorção (Ads) e reticulação (CL).	79
Tabela 11 - Eficiência de imobilização de papaína pela técnica de adsorção (Ads) e reticulação (CL).....	81
Tabela 12 - Parâmetros cinéticos para papaína livre e imobilizada por papaína imobilizada por adsorção e reticulação.	82
Tabela 13 - Estabilidade da papaína livre e imobilizada em solventes orgânicos.	92
Tabela 14 - Efeito de vários metais em diferentes concentrações sobre a atividade da papaína livre e imobilizada.....	93

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ABTS	Ácido 2,2-azinobis-3-etilbenzotiazole-6-sulfonato
AC	Acetato de celulose
A.C.	Antes de Cristo
Ads	Papaína imobilizada pela técnica de adsorção
Asn	Asparagina
BSA	Albumina do soro bovino
CL	Papaína imobilizada pela técnica de reticulação
CMC	Carboximetilcelulose
Cys	Cisteína
DQO	Demanda química de oxigênio
FTIR	<i>Fourier-transform infrared spectroscopy</i> (Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier)
His	Histidína
H-S	Hestrin e Schramm (Meio de cultivo)
LAS	<i>Linear alkylbenzene sulphonate</i> (Alquilbenzeno linear sulfonato de sódio)
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
NCB	Nanocelulose bacteriana
PLCP	<i>Papain-like cysteine protease</i> (Cisteína protease tipo papaína)
ST	Sólidos totais
TCA	Ácido tricloroacético
UFC	Unidade formadora de colônia

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	OBJETIVOS	17
2.1	Objetivo Geral	17
2.2	Objetivos específicos	17
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
3.1	Enzimas	18
3.1.1	Proteases	19
3.1.2	Cisteína proteases	20
3.1.3	Cisteína protease tipo papaína (<i>papain-like cysteine proteases - PLCPs</i>)	22
3.1.4	Papaína	23
3.1.4.1	Aplicações da papaína	25
3.2	Imobilização de enzimas	27
3.2.1	Suportes para imobilização	31
3.2.1.1	Celulose como suporte para imobilização de enzimas	32
3.2.1.2	Imobilização de enzimas em nanocelulose bacteriana	33
3.3	Celulose	34
3.4	Nanocelulose bacteriana (NCB)	37
3.4.1	Propriedades da nanocelulose bacteriana	37
3.4.2	Aplicações da Celulose Bacteriana	38
3.5	Microrganismos e produção de NCB	40
3.5.1	<i>Gluconacetobacter xylinus</i>	42
3.6	Meios de cultivo para a produção de NCB	43
4	MATERIAIS E MÉTODOS	45
4.1	Caracterização da papaína	46
4.1.1	Coleta da papaína	46
4.1.2	Caracterização parcial da papaína coletada e comercial	47
4.2	Ativação da cepa e preparo do inóculo	47
4.3	Produção de membranas NCB em placas de cultivo de células	48
4.4	Purificação das membranas de NCB	49
4.5	Imobilização de Papaína em membranas de NCB	50
4.6	Determinação da atividade proteolítica	51
4.6.1	Determinação dos parâmetros cinéticos	54
4.6.2	Avaliação das condições ótimas de reação de atividade enzimática	55
4.6.3	Avaliações de estabilidade	55
4.7	Cinética de imobilização	56
4.8	Quantificação e caracterização de enzimas livres e imobilizadas	57

4.8.1	Quantificação de proteínas.....	57
4.8.1.1	Método de Bradford.....	58
4.8.1.2	Método de Lowry adaptado	59
4.8.2	Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).....	60
4.9	Caracterização físico-química.....	61
4.9.1	Percentual de Massa Seca e Capacidade Reabsorção de Água	61
4.9.2	Microscopia Eletrônica de Varredura.....	61
4.9.3	Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIV)	62
4.10	Tratamento estatístico dos dados	62
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	63
5.1	Comparação da papaína coletada e comercial	63
5.2	Produção e purificação das membranas de NCB.....	65
5.3	Caracterização das membranas de NCB e NCB-papaína	68
5.3.2	Estudos de imobilização de papaína em membranas de NCB hidratadas	74
5.3.3	Influência do pH de imobilização da papaína em NCB.....	76
5.4	Determinação dos parâmetros cinéticos	81
5.5	Avaliação das condições ótimas de atividade da NCB-papaína	83
5.5.1	Determinação do efeito do pH na atividade enzimática.....	84
5.5.2	Efeito da temperatura na atividade enzimática.....	85
5.6	Ensaio de Estabilidade	87
5.6.1	Estabilidade ao pH	87
5.6.2	Estabilidade térmica	89
5.6.3	Estabilidade a solventes.....	91
5.6.4	Estabilidade a metais	93
5.6.5	Estabilidade da papaína imobilizada em termos de reuso	94
5.6.6	Estabilidade de estocagem	96
6	CONCLUSÕES	98
7	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	100
	BIBLIOGRAFIA.....	101
	Anexos	118

1 INTRODUÇÃO

As proteases são enzimas hidrolases que catalisam a quebra de ligações peptídicas tendo como produto formado pequenos fragmentos (peptídeos) e, eventualmente, seus respectivos componentes (aminoácidos). Além de estarem envolvidas em vários processos biológicos, as proteases respondem por mais de 60% do mercado global de enzimas (FERNÁNDEZ-LUCAS; CASTAÑEDA; HORMIGO, 2017).

Dentre as proteases destaca-se a papaína, uma cisteína protease (proteases que contém em seu sítio ativo uma tríade catalítica de formada por resíduos de cisteína, histidina e asparagina) obtida do látex de várias partes da planta do mamoeiro (*Carica papaya* L.), que é nativa de regiões tropicais e produz frutos conhecidos como mamão, papaia ou ababaia. Como possui elevada atividade proteolítica sobre diversos substratos a papaína apresenta amplo leque de aplicação em diversos segmentos (RAO et al., 1998). Na indústria é aplicada principalmente na área de alimentos (amaciante de carnes, produção hidrolisados proteicos, dentre outros), como enzima modelo para pesquisas e desenho de fármacos (AMRI; MAMBOYA, 2012; POLAINA; MACCABE, 2007); produtos cicatrizantes com ação debridante, remoção de cáries, detergentes (AMRI; MAMBOYA, 2012; BAYRAMOGLU et al., 2011; FERNÁNDEZ-LUCAS; CASTAÑEDA; HORMIGO, 2017; KHAPARDE; SINGHAL, 2001; POLAINA; MACCABE, 2007), no desenvolvimento de biossensores (HOMAEI et al., 2010; SHUKOR et al., 2006) e na remoção de metais pesados (DUTTA et al., 2009). Além disso, a papaína pode apresentar atividade antimicrobiana e anti-inflamatória, com possibilidade de aplicação no desenvolvimento de embalagens com ação conservante (CYNTHYA; PRABHAWATHI; MUKESH, 2014).

A imobilização enzimática possibilita uma excelente alternativa para aumentar a estabilidade e meia-vida das enzimas, além de simplificar sua aplicação e potencial reuso nos processos. Para isso, diversos métodos podem ser utilizados - ligações covalentes ou iônicas, adsorção, reticulação e encapsulamento/aprisionamento (BRENA; BATISTA-VIERA, 2006; PINTO et al., 2011; ZHAO; SHI; MA, 2005). Os suportes ou superfícies a serem utilizados na imobilização enzimática podem ser os mais variados, sendo estes classificados, de forma geral, como polímeros naturais,

sintéticos e materiais inorgânicos. As características desejáveis de suportes candidatos incluem a presença de elevada área superficial, possuir certa resistência física e mecânica, estabilidade, biocompatibilidade, biodegradabilidade e preferencialmente apresentar um baixo custo (BRENA; BATISTA-VIERA, 2006; FRAZÃO et al., 2014).

Dentre os vários tipos de materiais que podem servir como suporte para imobilização de enzimas, a celulose e seus derivados são de grande interesse em razão de sua matriz ser fisiologicamente inerte, por ser biocompatível, biodegradável, possuir um caráter hidrofílico/hidrofóbico passível de ser manipulado de acordo com as necessidades de trabalho e por ser um polímero abundante e barato (HUANG et al., 2011; KOSAKA et al., 2007).

Além das plantas, nas quais a celulose é produzida como principal componente estrutural da parede celular, diversas espécies de microrganismos são capazes de produzir celulose com características estruturais e mecânicas particulares. Nesse caso a celulose é denominada comumente como nanocelulose bacteriana (NCB) devido a suas características nanométricas. A NCB é um biopolímero sintetizado principalmente por bactérias pertencentes aos gêneros *Acetobacter*, *Gluconacetobacter*, *Rhizobium*, *Agrobacterium* e *Sarcina* (PETERSEN; GATENHOLM, 2011). De fórmula molecular idêntica à da celulose vegetal, a NCB difere desta por apresentar maior grau de pureza (não possui lignina e hemicelulose associados à sua estrutura) e possuir um elevado nível de polimerização e fibras com diâmetro nanométrico (~30–50 nm). Devido as suas características biológicas agregadas a sua elevada porosidade e área superficial, a NCB constitui uma possibilidade interessante para imobilização de enzimas.

Até o presente momento, poucos estudos utilizando NCB como suporte para imobilização de enzimas foram realizados, e entre alguns exemplos utilizando NCB estão as lacase (DROZD et al., 2018; FRAZÃO et al., 2014; KIM, J. H. et al., 2017; LI et al., 2017; SAMPAIO et al., 2016; SONG et al., 2018), a urease (PESARAN; AMOABEDINY; YAZDIAN, 2015), lipases (CAI et al., 2018; WU; WU; SU, 2016) e glucoamilase (WU; LIA; HO, 2013). Considerando que o método empregado para imobilização apresenta características únicas para um dado suporte e enzima aliado à falta de estudos desse tipo com NCB, esse trabalho teve a proposta geral de produzir e utilizar a NCB para imobilizar papaína aplicando duas metodologias distintas - adsorção e reticulação - seguido pela caracterização da papaína imobilizada. A

conjugação das qualidades dessas duas biomoléculas abrirá um leque de possibilidades de aplicações.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Estudar a imobilização de papaína em membranas de nanocelulose bacteriana e caracterizar o biopolímero formado.

2.2 Objetivos específicos

- Produzir membranas de nanocelulose bacteriana utilizando uma cepa de *Gluconacetobacter* spp.;
- Extrair e processar papaína da espécie *Carica papaya* L. e caracterizar parcialmente em relação a papaína comercial;
- Imobilizar papaína em nanocelulose bacteriana utilizando duas técnicas: adsorção e reticulação (*crosslinking*);
- Caracterizar a NCB (microscopia eletrônica de varredura – MEV e espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR); ensaio qualitativo de proteínas pelo método de Lowry para confirmação da presença de proteínas na NCB e percentual de água e matéria seca);
- Realizar uma cinética de imobilização enzimática em termos de proteína adsorvida e atividade retida;
- Analisar o efeito do pH na imobilização da papaína em matriz de nanocelulose bacteriana;
- Avaliar as condições ótimas de pH e temperatura de atividade da imobilizada e sua estabilidade quanto o pH, temperatura, solventes e metais divalentes;
- Avaliar a atividade residual da papaína imobilizada após vários ciclos de uso e sua estabilidade após estocagem.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Enzimas

Enzimas são na sua maior parte proteínas constituídas por um longo polímero de aminoácidos possuindo uma estrutura tridimensional complexa, cuja função é atuar como catalisadores bioquímicos. Em outras palavras, as enzimas atuam para diminuir a energia de ativação de uma dada reação química na célula, aumentando assim a velocidade de reação, sem, no entanto, serem alteradas durante a reação como ocorre com os catalisadores químicos. As enzimas diferem substancialmente dos catalisadores químicos em vários aspectos importantes, tais como: possuir elevada taxa de reação (acelerada por fatores de 10^6 - 10^{12}), atuar sob condições suaves de pH, temperatura, pressão, dispensar do uso de produtos químicos agressivos; e possuir especificidade de reação, o que significa que a maioria das enzimas são capazes de usar apenas um único ou alguns substratos semelhantes (CALL; MÜCKE, 1997).

As enzimas são divididas em seis grandes classes, de acordo com o tipo de transformação química, a saber: (a) oxirredutases, catalisadoras de reações de oxidação/redução; (b) transferases, que atuam na transferência de grupos químicos; (c) hidrolases, que promovem a hidrólise de ligações químicas; (d) liases, promovem a clivagem de ligações químicas; (e) isomerases, que catalisam mudanças entre isômeros; e (f) ligases, que promovem a formação de ligação covalente. Essas classes, por sua vez, são divididas em subclasses, relacionadas a vários critérios, tais como ligação química formada ou clivada, cofator envolvido na catálise e centro de reação (MARTÍNEZ CUESTA et al., 2015).

As enzimas vêm sendo empregadas em processos biotecnológicos há milhares de anos. Há 6.000 A.C. já eram aplicadas na produção de pães, queijos e vinhos. Porém, só mais recentemente a sua exploração industrial foi possível, graças aos avanços técnicos e científicos. Foi a partir do século XVII, com as descobertas e experimentos de Leeuwenhook, Pasteur, Buchner e Summer, que passou a ser entendido o papel das enzimas, possibilitando assim o seu emprego em larga-escala, o qual veio a se tornar realidade somente a partir de 1960 (CHAUDHARY et al., 2015).

Atualmente cerca de 4.000 enzimas são conhecidas e, destas, em torno de 200 enzimas são de uso comercial. Dentre as enzimas, as proteases, que catalisam a hidrólise de ligações peptídicas, respondem a mais de 60 % deste mercado no mundo. Dentre essas a papaína, enzima de origem vegetal com alta atividade proteolítica, tem se mostrado presente em uma ampla gama de aplicações na indústria e na pesquisa, e será discutida com mais detalhes posteriormente (CHANALIA et al., 2011; FERNÁNDEZ-LUCAS; CASTAÑEDA; HORMIGO, 2017; SANGEETHA; ABRAHAM, 2006; SHARMA; CHISTI; CHAND, 2001).

3.1.1 Proteases

Proteases (também conhecidas como enzimas proteolíticas) são um grupo de enzimas que hidrolisam das ligações peptídicas das proteínas. Em geral, a clivagem das ligações peptídicas pode levar à degradação completa de substratos proteicos, reduzindo-os aos seus aminoácidos constituintes. Em algumas situações, sua ação catalítica pode ser específica, levando a clivagem da proteína para a geração de peptídeos, modificação de proteínas ou ainda no processamento pós-translacional (SABOTIČ; KOS, 2012; SOUZA et al., 2015).

De natureza ubíqua, proteases são enzimas essenciais a todas as formas de vida, incluindo procariotos, fungos, plantas e animais (GUPTA, 2005; SABOTIČ; KOS, 2012). Sua ação tem um papel crítico em vários processos fisiológicos como, por exemplo, no catabolismo protéico, coagulação sanguínea, digestão de proteínas, divisão celular, crescimento tumoral, processamento de hormônios polipeptídicos, apoptose e ciclo de vida de vários organismos (MÓTYÁN; TÓZSÉR, 2013; SOUZA et al., 2015).

As proteases são de forma geral divididas em dois grupos: as endopeptidases e as exopeptidases, a depender de seu sítio de ação. As endopeptidases são caracterizadas por sua ação preferencial sobre as ligações peptídicas internas da cadeia polipeptídica. Já as exopeptidases são caracterizadas por agirem somente próximas às extremidades das cadeias polipeptídicas. Com base em seu sítio de ação, proteases são classificadas como carboxipeptidases (atuam nas extremidades carbóxi-terminal da cadeia polipeptídica) e aminopeptidases (atuam na extremidade

N-terminal livre da cadeia polipeptídica) (MÓTYÁN; TŐZSÉR, 2013; SOUZA et al., 2015).

Ainda, as proteases são classificadas com base em seu mecanismo catalítico e baseadas na presença de resíduos de aminoácidos em seu sítio ativo. Assim, são classificadas como treonina proteases, serina proteases, proteases aspárticas, cisteína proteases, proteases glutâmicas, metaloproteases, asparagina proteases, e proteases com mecanismo desconhecido (MÓTYÁN; TŐZSÉR, 2013; SABOTIČ; KOS, 2012).

A classificação e nomenclatura das enzimas proteolíticas estão disponíveis no Banco de Dados MEROPS (<https://www.ebi.ac.uk/merops/>). Neste banco, as proteases são classificadas hierarquicamente em famílias, de acordo com similaridades na sequência de aminoácidos, e em clãs, com base nas semelhanças entre famílias.

3.1.2 Cisteína proteases

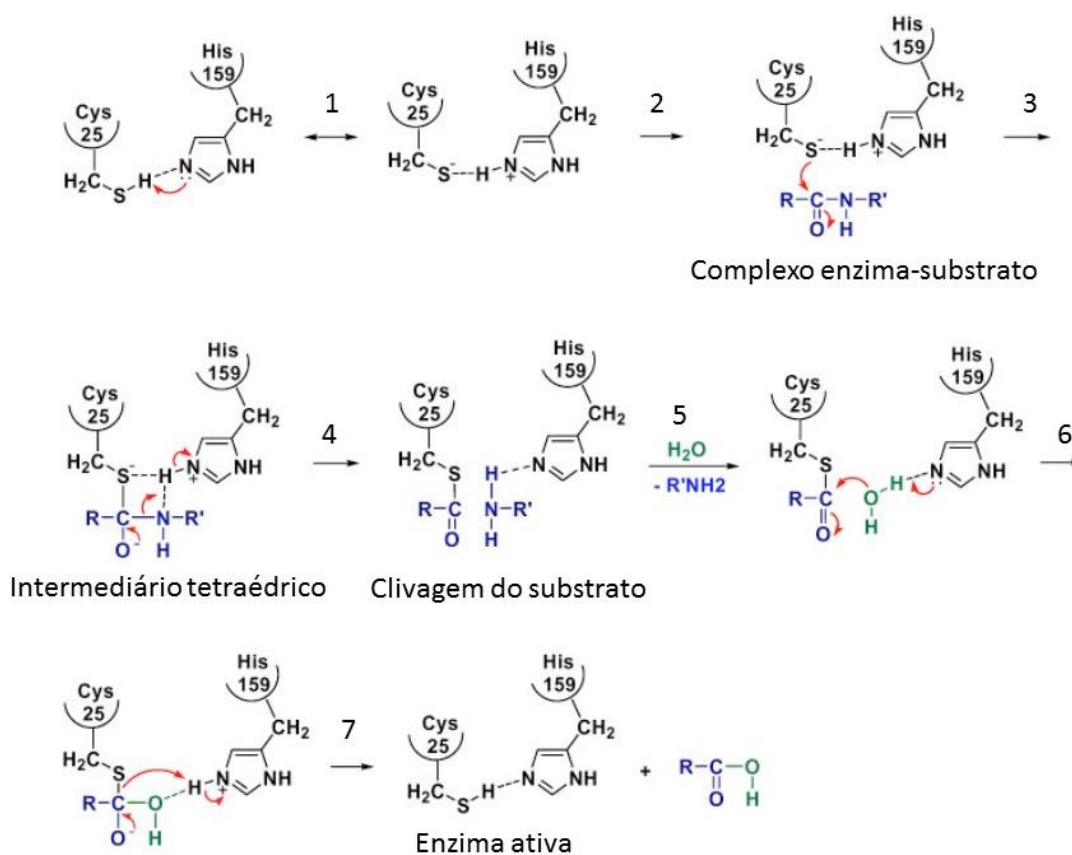
Cisteína proteases são enzimas amplamente distribuídas na natureza, sendo encontradas em todas as formas de vida (RAO et al., 1998; VERMA; DIXIT; PANDEY, 2016). Nas plantas, as cisteína proteases estão localizadas nos vacúolos de células da parede celular. Sua atuação tem papel importante nos processos anabólicos e catabólicos da plantas, atuando desde a maturação, degradação e reconstrução de proteínas nas plantas, até nos processos inflamatórios e tumorais em outros organismos (DICKINSON, 2002; GONZÁLEZ-RÁBADE et al., 2011).

As cisteína proteases apresentam em seu sítio ativo uma tríade formada pelos resíduos de histidina (His), cisteína (Cys) e asparagina (Asn). O resíduo de histidina funciona como um doador de prótons, aumentando a nucleofilicidade da cisteína (VERMA; DIXIT; PANDEY, 2016).

Na Figura 1 está representado o mecanismo catalítico geral das cisteína proteases. Esse mecanismo tem como etapa fundamental (1) a formação da díade reativa tiolato/imidazol (Cys-S⁻/His-Im⁺), resultante da transferência de próton entre Cys-25 e His-159. Na etapa 2 o ânion tiolato ataca o carbono da carbonila da ligação peptídica a ser clivada; a dupla ligação entre o carbono e o oxigênio é convertida a

uma só, fazendo o oxigênio assumir uma carga negativa, permitindo a formação de um intermediário tetraédrico. Na etapa 3 é transferido um próton do cátion imidazólico para o nitrogênio da amida que sofrerá hidrólise. O grupamento amina é liberado da enzima (etapa 4), e sucede a clivagem. A porção amina do substrato clivado se liga ao resíduo His-159, ao passo que a parte carboxílica do substrato é ligada ao resíduo Cys-25 por uma ligação tio éster, formando um acil-enzima (etapa 5). Na etapa 6 ocorre a dissociação da parte amina do substrato (acilação) e sua substituição por uma molécula de água, que irá atacar o carbono da carbonila da acil-enzima, levando a formação de um segundo intermediário tetraédrico. Na etapa final (7), a deacilação do tioéster leva à reconstrução do grupo carboxila do substrato hidrolisado, que é combinado com a liberação da enzima ativa (CHANG, W. S. W. et al., 2007; CLARK, 2016; OTTO; SCHIRMEISTER, 1997; RZYCHON; CHMIEL; STEC-NIEMCZYK, 2004)

Figura 1. Representação esquemática do mecanismo catalítico das cisteína proteases lisossomais, exemplificado pela papaína.



Fonte: Adaptado de CHANG, W. S. W. et al., 2007.

Baseado na especificidade de sua cadeia lateral, as cisteína proteases são classificadas em quatro grupos: tipo papaína, tipo tripsina, específica ao ácido glutâmico e outras. Destes, o mais caracterizado é o grupo do tipo papaína (RAO et al., 1998).

3.1.3 Cisteína protease tipo papaína (*papain-like cysteine proteases - PLCPs*)

A cisteína proteases tipo papaína (*PLCPs*) são as mais abundantes, e são encontradas nos mais diversos organismos. Sua ação catalítica está envolvida nos mais diferentes processos biológicos, desde a maturação e degradação proteínas, processos de senescência e resposta imune e defesa (LIU et al., 2018).

As *PLCPs* pertencem ao clã CA, família CA1 no banco de dados MEROPS (<https://www.ebi.ac.uk/merops/>). Sua estrutura proteica é semelhante à da papaína, sendo formada por dois domínios: hélice α e folha β . Os domínios são ligados entre si de maneira a formar uma fenda, a qual atua como o sulco de ligação ao substrato, onde se encontra a tríade catalítica formada pelos aminoácidos cisteína-histidina-asparagina (Cys-His-Asn) (LIU et al., 2018; RICHAU et al., 2012). As *PLCPs* são produzidas como pré-proteases, contendo um peptídeo sinal N-terminal para a secreção e um pró-domínio auto inibitório que precisa ser removido para a ativação da proteína, liberando uma protease ativa madura de 25-35 KDa (MISAS-VILLAMIL; HOORN, VAN DER; DOEHLEMANN, 2016).

A primeira *PLCP* a ser isolada e caracterizada quanto a estrutura tridimensional (por cristalografia de raios X) foi a papaína da espécie frutífera *Carica papaya L.* (popularmente conhecido como planta do mamão, mamoeiro ou papaeira); sendo assim, o principal membro representativo das *PLCPs* (DUBEY et al., 2007; LIU et al., 2018).

3.1.4 Papaína

Como dito anteriormente, a papaína (EC 3.4.22.2) é uma cisteína protease obtida da planta mamoeiro (*Carica papaya L.*) que pode ser obtida a partir do látex, fruto, folhas, sementes e raiz da planta. O látex está presente em maior concentração nas partes aéreas da planta, principalmente na superfície da casca de frutos verdes em estruturas denominadas laticíferos. Seu conteúdo é uma suspensão aquosa complexa de substâncias produzidas por células especializadas que desempenha principalmente função imune e de proteção contra o ataque de insetos herbívoros (AMRI; MAMBOYA, 2012). Quando o fruto do mamão sofre algum tipo de dano ou ferimento, inevitavelmente acaba atingindo os laticíferos resultando na liberação abrupta do látex, um líquido tixotrópico com aparência leitosa que contém aproximadamente 15% de matéria seca.

Quarenta por cento da matéria seca do látex é constituída por enzimas, principalmente cisteína proteases que juntas representam mais de 80% da fração enzimática (AZARKAN et al., 2003). A outra fração representa enzimas como lipases, quitinases, linamarases (beta-D-glucosidases), e outras presentes em menor concentração (KONNO et al., 2004).

Dentre as cisteína proteases do látex, além da papaína (EC 3.4.22.2), estão presentes a quimopapaína (EC 3.4.22.6), a caricaína (EC 3.4.22.30) e a glicil-endopeptidase (EC 3.4.22.25). Embora a papaína (EC 3.4.22.2) esteja em menor concentração em relação as outras cisteínas proteases (aproximadamente 8%), ela tem sido a mais estudada e pode ser purificada mais facilmente em relação as demais. Embora o termo “papaína” seja alusivo a uma única enzima na forma pura, essa terminação também é utilizada indistintamente para designar o látex seco do mamão; ou seja, a papaína bruta que é normalmente usada na indústria de alimentos e em outras indústrias (ADLER-NISSEN, 1993; STORER; MÉNARD, 2013).

Este emprego indistinto do termo papaína se justifica pelo fato de mesmo sendo purificada pelos métodos tradicionais de precipitação, a papaína ainda pode apresentar “contaminações” de outras enzimas, chegando a uma pureza máxima de 39 % em alguns casos. Para a obtenção da papaína em alto grau de pureza faz-se necessário o emprego de técnicas cromatográficas de maior complexidade, as quais

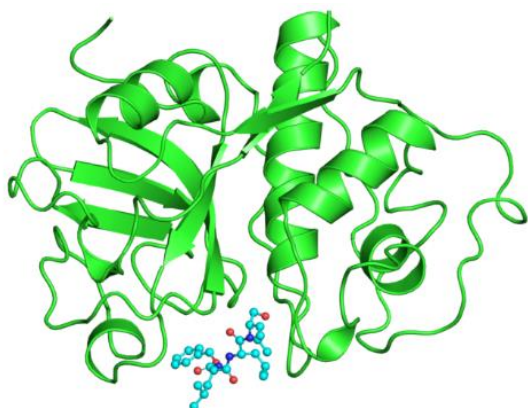
normalmente são limitadas a pequena escala (FERNÁNDEZ-LUCAS; CASTAÑEDA; HORMIGO, 2017; NIE, HUA LI; CHEN; ZHU, 2007; POLAINA; MACCABE, 2007)

A estrutura primária da papaína foi elucidada em 1970, sendo que um pouco antes, em 1968 teve sua estrutura determinada por difração de raio-X de cristais de papaína. Historicamente foi a segunda enzima a ter a estrutura tridimensional determinada por esse método (a primeira foi a lisozima da clara do ovo, no ano de 1965) (DRENTH et al., 1968; MITCHEL; CHAIKEN; SMITH, 1970).

A papaína é uma cadeia proteica única constituída de 212 aminoácidos, com peso molecular de 23,4 kDa, cuja estrutura tridimensional é elipsoide rotacional composto de dois domínios, sendo ambos separados por uma fenda, na qual situa-se o seu sítio ativo de ligação ao substrato (Figura 2). O primeiro domínio, constituído pelos resíduos 1-110, contém sobretudo hélices α ; o segundo domínio é formado pelos resíduos 111-212, o qual apresenta um grande conteúdo de folhas β antiparalelas e um menor número de hélices α (SZABÓ et al., 2006; VERNET et al., 1995).

O sítio ativo é formado por resíduos catalíticos de cisteína-25 e histidina-159 que estão situados na interface do sítio ativo em domínios opostos. Ainda, o sítio catalítico é complementado da asparagina-158, a qual garante uma orientação do anel imidazólico da histidina para os estágios sucessivos de hidrólise (POLAINA; MACCABE, 2007; RZYCHON; CHMIEL; STEC-NIEMCZYK, 2004).

Figura 2 Estrutura terciária (3D) da papaína (em verde) associada ao ligante N-[(benzyloxi)carbonil]-L-leucil-N-[(2S)-1-hidroxi-4-metilpentano-2-yl]-L-leucinamida (em azul) no sítio ativo.



Fonte: Protein Data Bank (<https://www.ebi.ac.uk/pdbe/entry/pdb/1BP4>, acessado em 02/09/2018)

A papaína é uma enzima de grande estabilidade, mantendo-se ativa a elevadas temperaturas (60-75°C) e altas concentrações de agentes desnaturantes como ureia 8 M e etanol a 70 % (AMRI; MAMBOYA, 2012; GHOSH, 2005; POLAINA; MACCABE, 2007).

Na tabela 1 são apresentadas as principais características da papaína.

Tabela 1 - Características da papaína

Propriedades físicas	Característica/Valor
Apresentação	Pó branco ou branco acinzentado, altamente higroscópico
Ponto Isoelétrico	pH 8,75
Constante de sedimentação $S_{20, w}$	2,42 +/- 0,04S
Constante de difusão $D_{20, w}$	10,27 +/- 0,13 x 10 ⁻⁷ cm ² sec ⁻¹
Massa molecular	23,350 Dalton
Coeficiente de extinção, $E^{1\%}_{1cm}$	25,0
K_m (BAEE)	0,023M
Rotação óptica (pH 5,7; 25 °C) $[\alpha]_D$	-66,7°
Conteúdo de α -hélice	17 %
Solubilidade	Água e glicerol incompleto Álcool, clorofórmio e éter - Insolúvel
Faixa de temperatura favorável para a reação proteolítica	60 a 90° C, sendo 65° C a temperatura ótima para hidrólise
Faixa de pH ótimo para a reação enzimática	5,0 a 7,0
Faixa de pH da solução a 2 % em água	4,8 a 6,2

Fonte: PINTO, 2005.

3.1.4.1 Aplicações da papaína

A comercialização da papaína tem liderado o mercado mundial frente a outras enzimas de origem vegetal. Sua grande importância comercial se deve a alta atividade

proteolítica frente uma vasta variedade de substratos e a manutenção de sua atividade frente as diversas condições operacionais (*Global Meat Tenderizing Agents Market Re- search Report- Forecast to 2023* apud FERNÁNDEZ-LUCAS; CASTAÑEDA; HORMIGO, 2017). Isto permite o seu amplo emprego nos mais diversos segmentos, como na indústria de alimentos, farmacêutica, têxtil e cosmética (AMRI; MAMBOYA, 2012). Abaixo são apresentados de maneira sucinta os principais empregos da papaína:

- **Aplicações na indústria alimentícia.** De amplo emprego na indústria de alimentos, a papaína é utilizada como amaciante de carnes, na produção de queijos, na produção de hidrolisados de proteínas, na panificação, na produção de cerveja e vinho (FERNÁNDEZ-LUCAS; CASTAÑEDA; HORMIGO, 2017).

- **Desenvolvimento de fármacos.** É utilizada como modelo experimental para o desenvolvimento de fármacos. Como exemplo, foi utilizada para o desenvolvimento de inibidores específicos da catepsina L, e relata-se como útil no desenvolvimento de inibidores da catepsina K e na co-oligomerização catalisada de α -aminoácidos (AMRI; MAMBOYA, 2012).

- **Indústria de detergentes.** Embora haja limitações quanto ao emprego da papaína nas formulações de detergentes, sobretudo no que diz respeito a sua perda de atividade em condições alcalinas, a sua utilização é possível. Por exemplo, Khaparde e Singhal (2001), realizaram um estudo sobre papaína modificada incorporada em formulações detergentes, o qual demonstrou a possibilidade da utilização da papaína em lugar de outras proteases obtidas com maior custo final (KHAPARDE; SINGHAL, 2001).

- **Uso farmacêutico e médico.** A papaína é utilizada no desbridamento (remoção do tecido desvitalizado presente na ferida) de feridas e queimaduras, tratamento de verrugas e cicatrizes, depilação, tratamento de acne e limpeza de pele, como constituinte de dentifrícios, no preparo de derivados de tirosina e vacinas contra o tétano (POLAINA; MACCABE, 2007).

- **Química orgânica.** Papaína é aplicada na síntese de amidrazona (DUFOR et al., 1998), drogas anticâncer, aminoácidos biologicamente ativos e poli aspartato (POLAINA; MACCABE, 2007).

- **Indústria Têxtil.** A papaína, assim como outras proteases, possui a propriedade de remoção da serina e hidrólise da queratina. Assim, pode ser empregada no

processamento da lã e no refinamento da seda (FREDDI; MOSSOTTI; INNOCENTI, 2003; GOUDARZI et al., 2008).

- **Cosméticos.** Na formulação de cosméticos, a papaína tem as funções de agente de condicionamento de cabelo, lítico e condicionamento de pele. No mercado estão disponíveis inúmeros produtos contendo a papaína como ingrediente ativo, como Osmosis Purify, Paul Penders Citrus Fruit Exfoliant e Nubian Heritage Coconut & Papaya Hand Cream (Skin Deep® Cosmetics Database, 2018).

- **Indústria do couro.** No setor de curtimento, a papaína associada com silicatos pode ser usada no processo depilatório. Seu uso tem como vantagens a completa remoção dos pelos, aumento da área final da pele e significativa redução na demanda química de oxigênio (DQO) e sólidos totais (ST) dos efluentes gerados (SARAVANABHAVAN et al., 2005).

- **Deteção e remoção de metais pesados.** A papaína apresenta alta afinidade para se ligar a metais devido à presença de quatro grupos sulfidril (S-H) em sua estrutura, fazendo com que dependendo do metal possa haver inativação. Tal característica possibilita seu uso como biossensor de metais pesados (GUO et al., 2011; SHUKOR et al., 2006) e na remoção de metais pesados (DUTTA et al., 2009).

- **Atividade antimicrobiana.** Além das propriedades já mencionadas, a papaína apresenta atividade antimicrobiana e anti-inflamatória, as quais podem ser exploradas em diversas finalidades (CHUKWUEMEKA; ANTHONIA, 2010; CYNTHYA; PRABHAWATHI; MUKESH, 2014). Por exemplo, Cynthia; Prabhawathi e Mukesh, (2014) desenvolveram uma embalagem antimicrobiana para queijo utilizando poliuretano como matriz para imobilização da papaína.

3.2 Imobilização de enzimas

A utilização de enzimas como catalisadores de reações químicas surge como uma alternativa mais ecológica aos processos químicos, atendendo assim a demanda atual por uma química verde mais amigável ao meio ambiente. Sabe-se que muitos processos de transformação química ocorrem sob condições extremas de temperatura e pressão, com alto consumo de produtos químicos e energia. Além disso, há geração de subprodutos danosos ao meio ambiente, devido a não

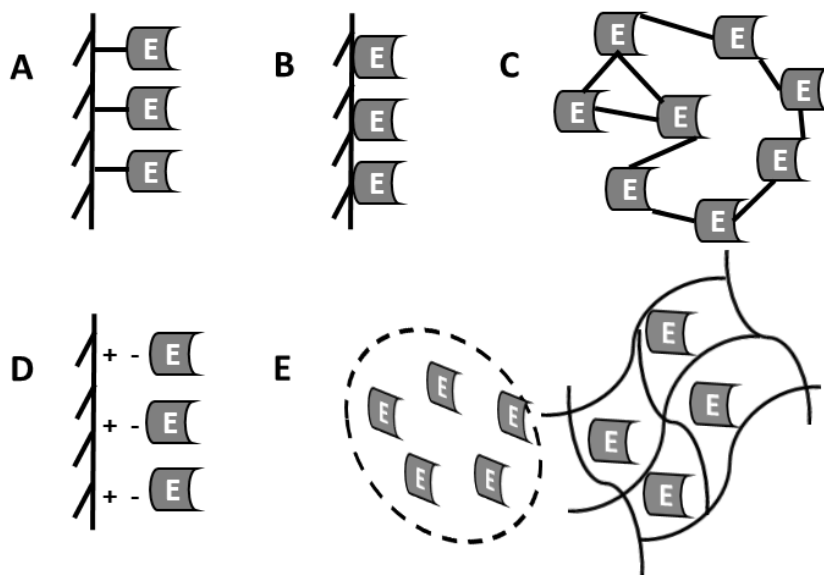
especificidade. Por outro lado, enzimas apresentam elevadas taxas de reação, são altamente seletivas e específicas, trabalham sob condições moderadas, o que resulta na redução de consumo de matérias-primas, energia e geração de resíduos (NADAR; PAWAR; RATHOD, 2017).

Todavia, apesar das vantagens do uso de enzimas como biocatalizadores, há problemas de ordem prática que devem ser superados para possibilitar o seu uso pleno em processos industriais. Deve-se observar que de forma geral enzimas apresentam baixa estabilidade térmica, atuam sob uma faixa estreita de pH e frequentemente possuem sensibilidade a solventes orgânicos, o que as tornam propensas a desnaturação e conseqüente inativação. Além disso, em geral as enzimas estão na forma solubilizada no meio reacional, o que torna sua recuperação e reutilização problemática, podendo inclusive resultar na contaminação do produto. Dos vários métodos desenvolvidos para sanar estes problemas, o mais difundido e amplamente utilizado é o método de imobilização de enzimas (KRAJEWSKA; JESIONOWSKI; ZDARTA, 2014; SHELDON, 2011).

Uma definição apropriada da técnica de imobilização de enzimas foi dada por Katchalski Katzir durante a 1ª Conferência sobre Engenharia Enzimática realizada em Henniker, New Hampshire, EUA, em 1971, com sendo: “enzimas fisicamente confinadas ou localizados em uma região definida do espaço com retenção de suas atividades catalíticas, e que podem ser usados repetida e continuamente” (KATCHALSKI-KATZIR, 1993).

A imobilização de enzimas pode ser efetuada por diversos métodos (Figura 3), os quais são classificados de forma geral em duas categorias: união química e retenção física (BOMMARIUS; RIEBEL, 2004).

Figura 3. Representação dos principais métodos de imobilização. A) Ligação covalente; B) Adsorção; C) Reticulação; D) Interação iônica; E) Aprisionamento/Encapsulamento



Fonte: Autor.

A seguir são apresentadas as principais técnicas de imobilização, divididas em união química (A-D) e retenção física (E).

- Ligação covalente (Figura 3a): baseia-se na ativação química do suporte por um reagente específico, de modo a este formar ligações covalentes com os resíduos de aminoácidos na superfície da enzima. Em geral, os processos de ativação buscam gerar grupos eletrofílicos no suporte para reagir com os nucleófilos fortes das proteínas. As vantagens são a maior força de ligação e estabilidade da imobilização, o que resulta em uma carga de enzima constante após a imobilização; pode ser utilizada em reatores contínuos, empacotados, de leito fluido ou com agitação. Também apresenta maior resistência a desativação pelo efeito da temperatura, solventes e pH. Os métodos covalentes são comumente empregados quando se requer a total ausência de enzimas no produto. Os inconvenientes da técnica são custos altos e baixos rendimentos (ARROYO, 1998; BRENA; BATISTA-VIERA, 2006; MURTY; BHAT; MUNISWARAN).

- Adsorção (Figura 3b): as enzimas se unem a um suporte por meio de interações de superfície reversíveis. Baseia-se, em geral, em adsorção física (ligações de hidrogênio, forças de van der Waals ou interações hidrofóbicas) ou em interações

iônicas. Trata-se de um método simples, barato, rápido, que dispensa alterações estruturais químicas e sem mudanças conformacionais significativas nas enzimas. As desvantagens são a possível perda da enzima do suporte quando as interações são fracas, possível impedimento estérico pelo suporte e a ligação não específica (ARROYO, 1998; BRENA; BATISTA-VIERA, 2006; MURTY; BHAT; MUNISWARAN).

- Reticulação (ligação cruzada ou *crosslinking*) (Figura 3c): técnica de imobilização livre de suporte que é realizada pela formação de ligações cruzadas entre as moléculas enzimáticas com o uso de reagentes bi- ou multifuncionais, como o glutaraldeído. Em geral, prepara-se os derivados imobilizados por meio de uma reação de reticulação entre um reticulante e um preparado enzimático, o qual pode ser enzima solubilizada, cristalizada, atomizada e agregada. Como as enzimas atuam como seu próprio suporte, esta técnica elimina as vantagens e desvantagens associadas ao veículo, apresentando como principais inconvenientes o baixo rendimento de imobilização, ausência de propriedades mecânicas e menor estabilidade (BRENA; BATISTA-VIERA, 2006; MURTY; BHAT; MUNISWARAN, 2002; SOUSA et al., 2016).

- Interações iônicas (Figura 3d): baseia-se na união iônica das moléculas de enzimas a uma matriz com grupos iônicos carregados. As vantagens e desvantagens são as mesmas do processo de adsorção, com a diferença de que as interações são mais fortes entre enzima e matriz do que por adsorção, e menor que a que ocorre por ligação covalente (BRENA; BATISTA-VIERA, 2006; MURTY; BHAT; MUNISWARAN).

- Encapsulamento/aprisionamento (Figura 3e): Trata-se de um método de retenção física da enzima por ligações covalentes ou não covalentes no interior de géis ou fibras, onde as enzimas encontram-se livres em solução ao mesmo tempo que seu movimento está restringido pela matriz. A sua realização pode se dar por diferentes métodos, como gelificação induzida por temperatura, polimerização por reação química/fotoquímica, gelificação ionotrópica de macromoléculas com cátions multivalentes e micro-encapsulamento. Suas principais vantagens são estabilidade mecânica, minimização da lixiviação enzimática e a não interação química da enzima com o suporte. O método, no entanto, apresenta algumas limitações: atuação do suporte como uma barreira à transferência de massa, ocorrência de liberação da enzima se o tamanho dos poros do suporte for muito amplo, baixa capacidade de carga enzimática e a possibilidade do suporte corromper como efeito da

polimerização. (DATTA; CHRISTENA, 2013; MOHAMAD et al., 2015; NGUYEN; KIM, 2017; MURTY; BHAT; MUNISWARAN, 2002).

3.2.1 Suportes para imobilização

Para se obter a melhor performance da enzima imobilizada, deve-se proceder uma escolha criteriosa com relação a matriz/suporte e enzima. Isso porque as características finais da imobilização enzimática são regidas tanto pelas propriedades da enzima quanto as do suporte, resultando da interação de ambas. Para a seleção do suporte inicialmente deve-se sempre considerar as características próprias da enzima e das condições de seu uso, ou seja, em que tipo de processo ou situação será utilizada (SOUSA et al. 2016; SHELDON, 2007).

Dentre as propriedades que devem ser observadas na escolha de um suporte “ideal” pode-se considerar a área superficial elevada, a resistência física, a natureza hidrofílica ou hidrofóbica, a inércia às proteínas, a fácil derivação, resistência ao ataque microbiano (em casos específicos), biodegradabilidade, biocompatibilidade, morfologia e composição, capacidade de regeneração, alta densidade de grupos reativos e finalmente preferencialmente baixo custo de produção ou obtenção (BRENA; BATISTA-VIERA, 2006; SOUZA et al. 2016).

A respeito da composição química, os suportes podem ser classificados como orgânicos e inorgânicos; podendo ainda os suportes orgânicos ser subdivididos em naturais e sintéticos. Além disso, os suportes podem ser classificados segundo a sua morfologia, sendo divididos em porosos e não porosos (BRENA; BATISTA-VIERA, 2006; SOUSA et al. 2016). Na tabela 2 são apresentados alguns suportes segundo a sua classificação química (BRENA; BATISTA-VIERA, 2006).

Tabela 2 - Classificação dos suportes para imobilização de enzimas.

Orgânicos	Inorgânicos
Polímeros naturais • Polissacarídeos: celulose, dextranas, ágar, agarose, quitina, alginato • Proteínas: colágeno, albumina • Carbono Polímeros sintéticos • Poliestireno • Outros polímeros: polimetacrilatos de poliacrilato, poliacrilamida, poliamidas,	Minerais naturais • bentonita, sílica Materiais processados • vidro (poro não poroso e controlado), metais, óxidos metálicos de poros controlados

Fonte: BRENA; BATISTA-VIERA, 2006.

3.2.1.1 Celulose como suporte para imobilização de enzimas

Celulose e seus derivados são materiais de grande interesse para suportes de imobilização de enzimas em virtude de suas matrizes serem fisiologicamente inertes e biocompatíveis, possuírem caráter hidrofílico/hidrofóbico passível de ser manipulado de acordo com as necessidades de trabalho e pelo fato da celulose ser um polímero abundante e barato (HUANG et al., 2011; KOSAKA et al., 2007). A celulose apresenta grupos hidroxilas em sua superfície que podem reagir quimicamente, o que possibilita ser derivatizada por via química, enzimática ou métodos microbiológicos. Exemplos de celulose derivatizada que são comumente empregadas na imobilização de enzimas são a carboximetilcelulose (CMC), o acetato de celulose (CA) e o nitrato de celulose (LIU; CHEN, 2016). Matrizes de celulose foram empregadas na imobilização de lacase de fungos, penicilina G acilase, glucoamilase, α -amilase, tirosinase, lipase e β -galactosidase (DATTA; CHRISTENA, 2013).

Huang et al. (2011), em um trabalho sobre imobilização de lipase de *Candida rugosa* em membrana de nanofibra de celulose produzida pela técnica de eletrofiação obtiveram, sob condições operacionais ótimas, atividade enzimática de 29,6 U/g utilizando *p*-nitrofenil palmitato (*p*-NPP) como substrato. Murtinho et al. (1998) realizaram a imobilização de glucose oxidase usando como suportes acetato de celulose, propionato de celulose e acetato-butirato de celulose. A membrana de

acetato de celulose preparada por evaporação resultou em maior atividade enzimática, ao passo que as membranas de propionato e de acetato-butirato de celulose apresentaram menores atividades enzimáticas e maior estabilidade de estocagem, empregando a *orto*-dianisidina como substrato.

Embora diversas técnicas estejam disponíveis para a imobilização de enzimas em suportes de celulose, como por exemplo a técnica de automontagem camada por camada (KARIMPIL; MELO; SOUZA, 2012), a imobilização em celulose nanofibrilada derivatizada (AROLA et al., 2012) e o filme de celulose/líquido iônico (POLETTTO et al., 2011), pesquisas recentes tem reportado que suportes de celulose pura não tratadas ou derivatizadas não são adequadas para o suporte de proteínas. Exceção à regra, segundo estudos recentes, é a celulose de origem bacteriana, a qual devido à sua alta porosidade e grande área superficial pode reter elevadas quantidades de proteínas (CHEN; ZOU; HONG, 2015).

3.2.1.2 Imobilização de enzimas em nanocelulose bacteriana

Wu, Wu e Su (2016) realizaram um estudo sobre imobilização de lipases em matrizes de NCB, empregando quatro metodologias diferentes baseadas na absorção repetida em duas etapas, na qual a membrana de NCB foi seca e após imersa na solução com glutaraldeído (ativador) ou solução da enzima, alterando essa ordem. O melhor resultado obtido foi a ativação com glutaraldeído seguido de imobilização da lipase, na qual se obteve 93,5 % de atividade comparada à atividade da enzima livre, e que manteve 60 % de sua atividade após reuso da membrana por 15 ciclos de reações utilizando emulsão de óleo de oliva como substrato.

Em um estudo sobre o efeito do tempo e condições de cultivo da NCB na imobilização de urease, Pesaran, Amoabediny e Yazdian (2015) realizaram a imobilização enzimática por meio de adsorção seguida de reticulação com glutaraldeído. Após 15 semanas, a enzima imobilizada ainda conservou 41 % de sua atividade inicial, apresentando pH e temperatura ideal de trabalho em torno de 7,0 e 50 °C, respectivamente.

Chen, Zou e Hong (2015) investigaram a imobilização de lacase fúngica em NCB natural comparando os métodos de adsorção simples e adsorção seguida de

reticulação utilizado. A técnica de adsorção seguida de reticulação apresentou maior estabilidade em relação a adsorção simples, mantendo 69 % de sua atividade inicial após sete ciclos, empregando como substrato 2,2'-azinobis-(3-etil-benzotiazolin-6-sulfônico ácido (ABTS).

Sampaio et al. (2016) estudaram a imobilização física de lacase em NCB visando agregar propriedades antibacterianas. Nesse trabalho a atividade específica da lacase imobilizada e livre foram similares sugerindo que a estrutura porosa da NCB permitiu a lacase aprisionada manter algum grau de flexibilidade e favorecer a acessibilidade ao substrato.

Li et al. (2017) oxidaram os grupos hidroxila da NCB para grupos aldeído que serviram como ancoras para imobilização covalente de lacase. TiO_2 foi co-imobilizado visando produzir um novo material para a degradação de corantes. Os autores verificaram um aumento da estabilidade da lacase frente a condições extremas de pH e temperatura, sendo que o pH ótimo foi para um valor abaixo daquele para a lacase livre enquanto que a temperatura ótima diminuiu de 50°C para 55°C.

Wu e Lia (2008) utilizaram NCB na forma de pellets hidratados, obtidos por cultivo agitado, para imobilização de glucoamilase usando o método epoxi conjugado com glutaraldeído. A imobilização estabilizou a enzima com relação a mudanças no pH e temperatura, principalmente temperaturas mais baixas. Com relação ao pH, a glucoamilase imobilizada manteve 77% de atividade em pH 2,0; um dos valores mais baixos encontrado na literatura. Atividade relativa chegou a 68% a 20°C.

Na literatura foi encontrado até o momento apenas um trabalho utilizando protease de plantas. Ataíde et al. (2017) imobilizaram bromelina extraída de abacaxi em NCB para liberação controlada da protease visando atividade antimicrobiana. Os resultados demonstraram que o suporte com bromelina carregada foi capaz de melhorar a atividade microbiana em até 9 vezes.

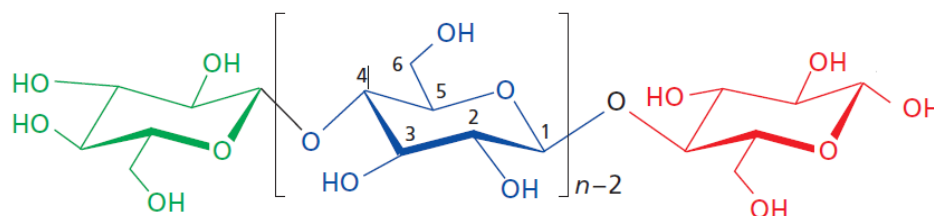
3.3 Celulose

A celulose $(\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5)_n$ é um polímero natural, sintetizado majoritariamente pelos vegetais. Estima-se que 10^{11} toneladas de celulose sejam sintetizadas anualmente pelas plantas, o que a torna o polímero de maior abundância na biosfera

e uma fonte inesgotável de novos materiais para uma ampla gama de aplicações (JARAMILLO et al., 2013; NELSON; COX, 2014).

Principal constituinte da parede celular das plantas, a celulose (Figura 4) é um polissacarídeo estrutural que confere rigidez e resistência à célula, impedindo que a membrana plasmática venha a se romper sob condições osmóticas que favoreçam a entrada de água na célula. Assim como a amilose, a celulose é um polímero linear formado por unidades de glucose, diferindo no tipo de ligação entre as suas unidades: a glucose apresenta ligações do tipo β -(1 \rightarrow 4), ao passo que a amilose tem enlaces α -(1 \rightarrow 4) (MATHEWS; HOLDE, 2002; NELSON; COX, 2014). O tipo de ligação β da celulose proporciona uma conformação estendida rígida, estando rotacionado 180° cada unidade de glucose em relação a outra. Sua estrutura é estabilizada por uma rede intramolecular de ligações de hidrogênio, que torna a celulose relativamente estável, não dissolvendo com facilidade em solventes aquosos e não tendo um ponto de fusão mensurável (HORTON et al., 2008).

Figura 4. Estrutura molecular da celulose.



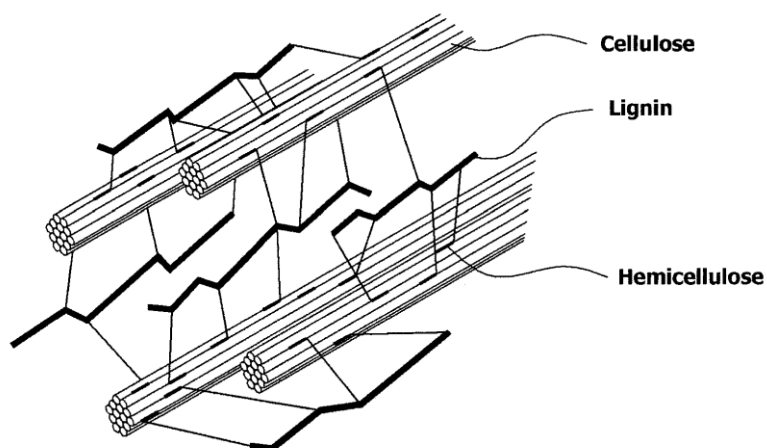
Fonte: WERTZ; BEDUE; MERCIER, (2010).

Em células vegetais, a celulose é sintetizada como moléculas individuais de D-glucose que sofrem automontagem no próprio local de biossíntese. As moléculas de celulose se juntam para formar moléculas maiores, chamadas de protofibrilas, que são empacotadas em unidades maiores denominadas microfibrilas. (LYND et al., 2002).

Um dos inconvenientes para o emprego da celulose vegetal é que raramente se apresenta em um estado puro. Nas plantas suas fibras estão incorporadas numa matriz de outros biopolímeros, principalmente lignina e hemicelulose (Figura 5), que

limita sua utilização direta em várias aplicações. Para contornar este problema, faz-se necessário o uso de diferentes tipos de tratamentos que empregam produtos químicos, tais como sulfeto de sódio, hidróxido de sódio, gás cloro e outros químicos com potencial poluente (JOZALA et al., 2016; LYND et al., 2002).

Figura 5. Representação de um material lignocelulósico.



Fonte: KIM et al. (2010)

Além das plantas, algumas espécies de bactérias, algas e microrganismos eucarióticos semelhantes a fungos (*fungus-like eukaryotic microorganisms*), são capazes de produzir celulose intracelular e/ou extracelular. A alga *Pleurochrysis scherffellii*, pertencente ao grupo Chrysophyceae, é capaz de sintetizar celulose no complexo de Golgi como componente de sua parede celular na forma de uma complexa rede de fibrilas (10 a 25 angstroms de diâmetro) (BROWN et al., 1969). Os Oomycetes, são uma classe peculiar de microrganismos filamentosos unicelulares, que se assemelham morfológicamente a fungos filamentosos, mas que diferem dos fungos verdadeiros pela presença de celulose invés da quitina em sua parede celular (HARDHAM, 2007). Já as bactérias por exemplo, do gênero *Gluconacetobacter*, são capazes de produzir um tipo singular de celulose que apresenta alto grau de pureza, dispensando assim o uso de tratamentos (JARAMILLO et al., 2013).

3.4 Nanocelulose bacteriana (NCB)

Adrian Brown, em 1886, fez o primeiro relato a respeito da NCB. Durante uma fermentação visando a produção de vinagre, observou o crescimento de uma membrana gelatinosa translúcida sobre o meio de cultivo. Uma análise posterior mais criteriosa revelou se tratar de celulose, sendo o microrganismo produtor identificado da espécie *Acetobacter xylinum* (DONINI et al., 2010; DUARTE, 2014).

A NCB é um exopolissacarídeo produzido por diversos gêneros de bactérias, tais como *Acetobacter*, *Agrobacterium*, *Achromobacter*, *Aerobacter*, *Sarcina*, *Escherichia*, *Azotobacter*, *Rhizobium*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Alcaligenes*, dentre outros. Essas bactérias produzem a NCB na forma de agregados extracelulares, formando uma matriz polimérica com diversas funções para as células. Autores sugerem que a NCB seja produzida para atuar: a) como um mecanismo de flutuação, possibilitando que as bactérias permaneçam na interface ar-água, onde o oxigênio e os nutrientes estão mais disponíveis; b) como uma forma de armazenamento de alimento para ser utilizado em momentos de escassez; c) como uma estratégia para aumentar a colonização do substrato pela bactéria; e d) como barreira física para proteger a bactéria da radiação UV (PINEDA; MESA; RIASCOS, 2012; WILLIAMS; CANNON, 1989).

3.4.1 Propriedades da nanocelulose bacteriana

A NCB vem despertando interesse da comunidade científica devido a suas algumas qualidades que a tornam ideal para várias aplicações (ZHONG et al, 2013). Dentre essas qualidades destacam-se maior grau de pureza, elevado nível de polimerização e índice de cristalinidade, maior resistência à tração e capacidade de retenção de água, e suas fibrilas de celulose são em torno de 100 vezes mais finas do que a celulose vegetal. (CHAWLA et al., 2009). A NCB é metabolicamente inerte, não tóxica e não alergênica (CHÁVEZ-PACHECO et al., 2004). É solúvel em ácidos concentrados, como o ácido sulfúrico e ácido nítrico e em solução de NaOH a 8,5% (CHAWLA et al., 2009).

Apesar da fórmula molecular idêntica à da celulose vegetal, a NCB apresenta características bem diferentes (CHAWLA et al., 2009). Na Tabela 3 são comparadas algumas características da celulose vegetal e NCB.

Tabela 3 - Características da celulose vegetal e da celulose bacteriana

Características	Celulose vegetal	Nanocelulose bacteriana
Largura da fibra	1,4 - 4,0 × 10 ⁻² mm	70 – 80 nm
Cristalinidade	56 - 65%	65 – 79%
Grau de polimerização	13000 – 14000	2000 - 6000
Módulo de elasticidade	5,5 – 12,6 GPa	15 -30 GPa
Teor de água	60%	98,5%

Fonte: PECORARO et al. (2008).

3.4.2 Aplicações da Celulose Bacteriana

Em virtude de suas propriedades únicas, a NCB (Figura 6a) apresenta uma ampla variedade de aplicações: matriz alimentar, fibra dietética, membrana acústica e itens médicos (CHÁVEZ-PACHECO et al., 2004; CHAWLA et al., 2009; KESHK, 2014).

Valendo-se das excelentes qualidades sônicas que possui uma membrana de NCB, a empresa Sony Corporation juntamente com a Ajinomoto desenvolveram diafragmas de alta fidelidade (CHÁVEZ-PACHECO et al., 2004). Por apresentar alta permeabilidade para gases e líquidos e alta resistência no estado úmido, a NCB foi e tem sido aplicada com sucesso como pele artificial para o tratamento de queimaduras e curativos para feridas (Figura 6b). Exemplos de produtos médicos e curativos de NCB incluem Biofill[®], Gengiflex[®], dentre outros que possuem amplas aplicações (KESHK, 2014). Atualmente são produzidos e comercializados no Brasil membranas de celulose bacteriana com função regeneradora da pele. A Membracel[®], produzida e comercializada pela Vuelo Pharma no Paraná; e a Biocel[®], produzida e comercializada pela empresa Bionext Produtos Biotecnológicos no estado de São Paulo).

Nas Filipinas, a NCB é produzida em larga escala por métodos ainda artesanais como um alimento, uma fina iguaria. Conhecido como “nata de coco”, é uma sobremesa de natureza celulósica produzida pela fermentação da água de coco pela bactéria *Acetobacter xylinum*. Geralmente é servida com frutas, bebidas, cremes ou sorvetes (Figura 6c) (DANESI; WOSIACKI, 1998).

Figura 6. (a) Membrana de celulose bacteriana. (b) Pele substituta. (c) Nata de coco.



Fonte: (a) KESHK, 2014; (b) PEARSON, 2013; (c) FILSTOP, 2017.

Além dessas principais aplicações comerciais de NCB, outras estão em andamento ou estudo como apresentado no Quadro 1 abaixo.

Quadro 1. Aplicações da celulose bacteriana.

Setor	Aplicação	Referência
Alimentos	Espessante, estabilizante, redutor de calorias, fibra dietética.	EL-SAIED et al., 2004.
Papel	Restauração de documentos, papel de alta qualidade.	IGUCHI et al., 2000.
Mineração e refinaria	Material para absorção e toxinas e óleos.	BIELECKI et al., 2005.
Têxtil	Couro e têxteis artificial, material de absorção de água elevado.	BIELECKI et al., 2005.

Setor	Aplicação	Referência
Cosméticos	Estabilizador de emulsionantes, condicionadores cremes	
Componentes de áudio	Diafragmas de alta sensibilidade ou fones.	EL-SAIED et al., 2004.
Medicina e farmácia	Pele artificial, tratamento de feridas, regeneração de tecidos, implantes dentais, implantes de artérias, transplantes de vasos sanguíneos e uretras artificiais	BACKDAHI et al., 2008; TROVATTI et al., 2011
Pesquisa	Imobilização de proteínas, resinas para cromatografia.	BIELECKI et al., 2005.
Indústria mecânica	Partes de carros, aviões, selagem de fissuras em foguete.	BIELECKI et al., 2005.
Indústria Florestal	Substituto de madeira artificial.	BIELECKI et al., 2005.
Materiais	Material de reforço em compostos, propriedades de barreira, embalagens de alimentos.	CHAWLA et al., 2009.
Tratamento de águas	Purificação de águas residuárias, ultrafiltração de águas.	BIELECKI et al., 2005.
Maquiladora	Componentes e peças de reposição.	EL-SAIED et al., 2004.

Fonte: Adaptado de CASTRO, 2012 Apud RIASCOS, 2015.

3.5 Microrganismos e produção de NCB

Diversas espécies de bactérias são reportadas como capazes de produzir NCB utilizando diferentes fontes de carbono além de suplementos (Tabela 4). Embora seja também produzida pela espécie gram-positiva *Sarcina ventriculi*, em geral a NCB é sintetizada por espécies gram-negativas como *Acetobacter*, *Agrobacterium*, *Achromobacter*, *Aerobacter*, *Sarcina*, *Azotobacter*, *Rhizobium*, *Pseudomonas*, *Salmonella* e *Alcaligenes*. Dentre estas, as produtoras mais efetivas são *A. xylinum* (posteriormente renomeada para *Gluconacetobacter xylinum*), *A. hansenii* e *A. pasteurianus*. A espécie *G. xylinum* tem sido extensivamente aplicada em estudos de produção de celulose, tanto pela sua capacidade de produzir níveis relativamente altos de NCB, quanto pela fisiologia versátil para utilizar uma grande variedade de

fontes de nitrogênio e carbono (glucose, frutose, sacarose, glicerol, dentre outras) (CHAWLA et al., 2009; RAGHUNATHAN, 2013; RIASCOS, 2015).

Tabela 4 - Espécies produtoras de NCB com as respectivas fontes de C e rendimentos

Microrganismo	Fonte de carbono	Suplemento	Tempo de cultura	Produção (g/L)	Referências
<i>A. xylinum</i> BRC 5	glicose	etanol, oxigênio	50 h	15,30	Hwang et al., 1999.
<i>G. hansenii</i> PJK (KCftC 10505 BP)	glicose	oxigênio	48 h	1,72	Jung; Park; Chang, 2005
<i>G. hansenii</i> PJK (KCftC 10505 BP)	glicose	etanol	72 h	2,50	Park; Jung; Park, 2003
<i>Acetobacter</i> sp. V6	glicose	etanol	8 dias	4,16	Son et al., 2003
<i>Acetobacter</i> sp. A9	glicose	etanol	8 dias	15,20	Son et al., 2001
<i>A. xylinum</i> BPR2001	melaço	-	72 h	7,820	Keshk; Sameshima, 2006
<i>A. xylinum</i> BPR2001	frutose	ágar oxigênio	72 h	14,10	Bae; Sugano; Shoda, 2004
<i>A. xylinum</i> BPR2001	frutose	ágar	56 h	12,00	Bae; Sugano; Shoda, 2004
<i>Acetobacter xylinum</i> ssp. <i>sucrofermentans</i> BPR2001	frutose	oxigênio	52 h	10,40	Chao et al., 2000
<i>Acetobacter xylinum</i> ssp. <i>sucrofermentans</i> BPR2001	frutose	ágar oxigênio	44 h	8,70	Chao et al., 2000
<i>Acetobacter xylinum</i> E25	glicose	-	7 dias	3,50	Krystynowicz et al., 2002
<i>G. xylinus</i> cepa (K3)	manitol	chá verde	7 dias	3,34	Nguyen et al., 2008
<i>Gluconacetobacter xylinus</i> IFO 13773	glicose	lignosulfonato	7 dias	10,10	Keshk; Sameshima, 2006a
<i>Acetobacter xylinum</i> NUSft4.1	glicose	Alginato de sódio	5 dias	6,00	Zhou et al., 2007

Microrganismo	Fonte de carbono	Suplemento	Tempo de cultura	Produção (g/L)	Referências
<i>Gluconacetobacter xylinus</i> IFO 13773	melaço de cana de açúcar	-	7 dias	5,76	Keshk; Sameshima, 2006b
<i>Gluconacetobacter</i> sp. RKY5	glicerol	-	144 h	5,63	Kim et al., 2006
Co-culture of <i>Gluconacetobacter</i> sp. st-60–12 and <i>Lactobacillus mali</i> JCM1116	sacarose		72 h	4,20	Seto et al., 2006

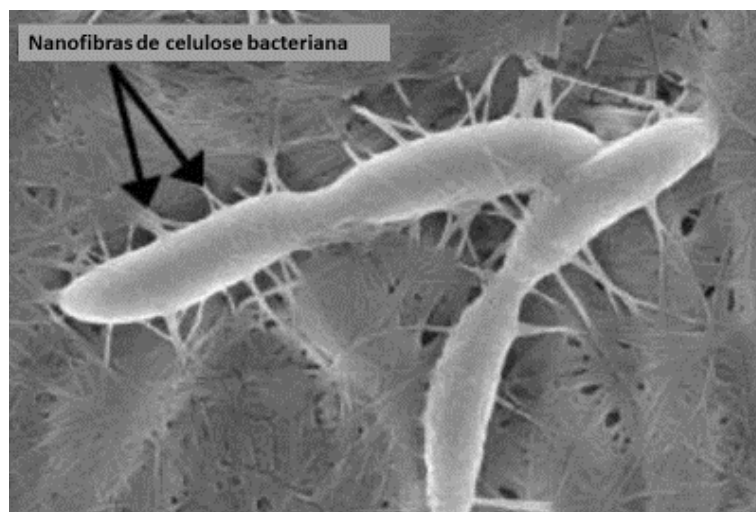
Fonte: Adaptado de CHAWLA et al., 2009.

3.5.1 *Gluconacetobacter xylinus*

O *Gluconacetobacter xylinus*, anteriormente denominada *Acetobacter xylinum*, é uma bactéria gram-negativa, estritamente aeróbia encontrada no solo, e que produz ácido acético durante a oxidação de açúcares ou etanol, sendo, portanto, membro do grupo das bactérias acéticas ou bactérias do ácido acético (Figura 7). De distribuição ampla na natureza, pode ser isolada de frutos caídos no solo, hortaliças e água de coco fermentada. Como dito anteriormente é capaz de produzir celulose em quantidades variáveis a partir de diferentes substratos tanto em cultura agitada como em cultura estática.

Para a produção de celulose, tem como pH ótimo 5,0, no entanto, a faixa de tolerância é até 3,5 (JAGANNATH et al., 2008; SKINNER; CANNON, 2000; THOMPSON; HAMILTON, 2001).

Figura 7. Extrusão de nanofibrilas de celulose por *Gluconacetobacter xylinus*



Fonte: Adaptado de TIBONI, 2011.

3.6 Meios de cultivo para a produção de NCB

Para a produção de NCB, o meio de cultivo deve conter, ao menos, uma fonte de carbono, uma de nitrogênio e alguns outros nutrientes necessários para o crescimento do microrganismo (JOZALA et al., 2016). Um dos meios mais utilizados em estudos de produção de NCB é o meio HS, desenvolvido por Hestrin e Schramm (1954) que utiliza a glicose (2% p/v) com principal fonte de carbono e a peptona (0.5 %) e o extrato de levedura (0.5 %) como principais fontes de N e vitaminas (PINEDA; MESA; RIASCOS, 2012).

Porém, a utilização de glicose como única fonte de carbono para o cultivo da NCB apresenta limitações, tanto de ordem econômica, pelo custo do substrato (JUNG et al., 2010), quanto de rendimento. O uso da glicose promove a co-produção, por parte do *Gluconacetobacter xylinus* de ácido ceto-glucônico, o qual diminui a disponibilidade de glicose para a polimerização da NCB e pode dificultar a viabilidade celular em função da queda de pH (PINEDA; MESA; RIASCOS, 2012).

No sentido de viabilizar a produção de NCB, muitos estudos vêm sendo realizados com diversas fontes alternativas de carbono, como resíduos da indústria de biocombustíveis e da agroindústria, tais como bagaços, sucos de frutas e glicerol (TSOUKO et al., 2015).

KUROSUMI et al. (2009) relataram o emprego de diferentes sucos de frutas (laranja, abacaxi, maçã, pêra japonesa e uva) como fonte de carbono para a produção de NCB pela bactéria *A. xylinum*. Neste estudo foram comparados três tipos de meios: meio H-S e suco de fruta; apenas suco de fruta com ajuste de pH; e meio H-S com glucose, frutose e sacarose, nas proporções encontradas nos sucos de frutas citados. Os melhores resultados foram obtidos com meio H-S acrescido de suco de frutas (para todas as frutas), ao passo que os meios compostos apenas de suco de fruta obtiveram resultados inferiores em termos de rendimento de NCB produzida. Segundo os autores, isso ocorre em razão de o meio H-S conter fontes de nitrogênio que favoreceram o crescimento dos microrganismos.

Mikkelsen et al. (2009), em um estudo utilizando *Gluconacetobacter xylinus*, estudaram a influência de diferentes fontes de carbono (glucose, glicerol, manitol, frutose, sacarose e galactose) na produção de NCB, empregando o meio H-S. Os melhores resultados foram obtidos com sacarose e glicerol, apresentando produção de NCB após 96 h de fermentação 3,83 e 3,75 g/L (g NCB/L de meio de cultivo), respectivamente.

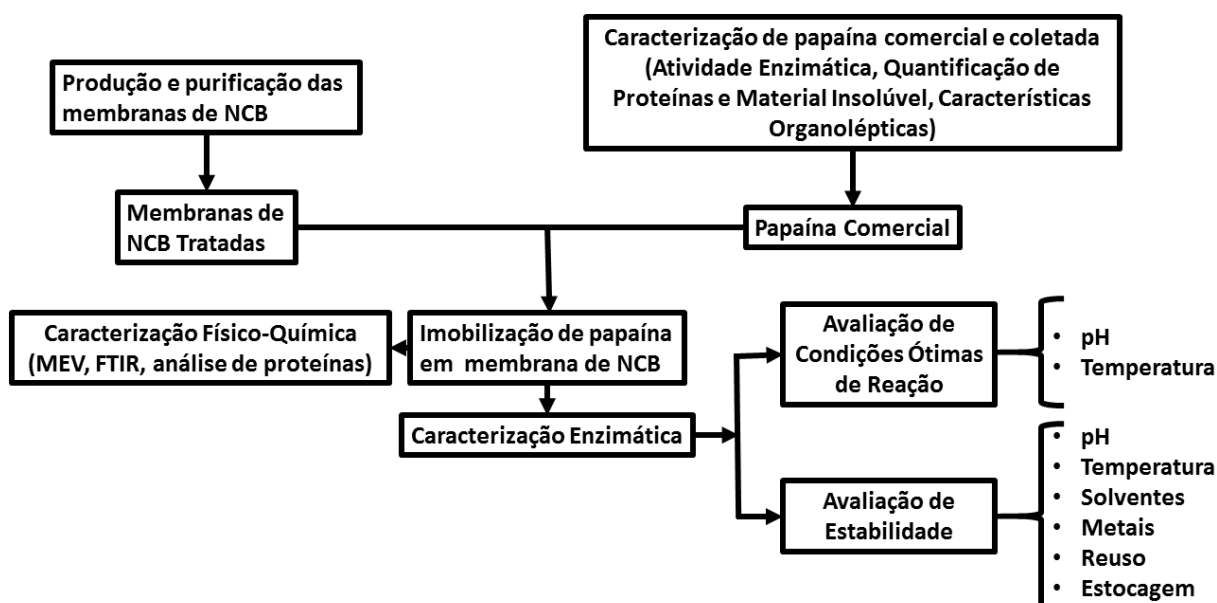
Além da substituição da fonte de carbono, também são empregadas outras fontes de nitrogênio, tais como peptona, extrato de levedura e licor de infusão de milho (CHAWLA et al., 2009; RUKA; SIMON; DEAN, 2012).

Yim, Song e Kim (2016) empregaram como fontes de nitrogênio quatro tipos de chá (chá verde, chá preto, chá roibos e chá de cabelo de milho), sacarose, frutose, mel e xarope de milho como fontes de carbono. O trabalho mostrou que as maiores e menores taxas de produção foram obtidas com chá verde ($243 \pm 0,25\%$) e chá roibos ($30 \pm 0,2\%$), respectivamente.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Na Figura 8 é mostrado um fluxograma, no qual são apresentadas todas as etapas desenvolvidas nessa pesquisa.

Figura 8. Fluxograma esquemático das etapas da pesquisa



Na primeira etapa foram produzidas as membranas de NCB e a extração de papaína e seu processamento, para comparação com a papaína comercial da marca Sigma[®], que foi de fato utilizada nos experimentos. A NCB foi caracterizada por microscopia de varredura eletrônica (MEV), espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR), teor de água e capacidade de absorção. As papaínas foram caracterizadas por FTIR, teor de proteínas, atividade proteolítica e teor de material não solúvel.

Na segunda etapa foi realizado um ensaio linear para avaliar a melhor faixa de pH para imobilização de papaína em matriz de NCB pelas técnicas de adsorção (Ads) e adsorção seguida de reticulação (CL). Para as melhores condições de imobilização foi realizada a caracterização por MEV, FTIR, análise de proteínas,

avaliação das condições ótimas de reação (pH e temperatura) e avaliação de estabilidade (pH, temperatura, solventes, metais, reuso e estocagem).

4.1 Caracterização da papaína

4.1.1 Coleta da papaína

O látex fresco contendo papaína foi obtido a partir da casca de frutos verdes (variedade Formosa) de mamoeiros cultivados no campus da UTFPR – Sede Ecoville, Curitiba-PR. Sua extração foi realizada de acordo com o protocolo de Nitsawang; Hatti-Kaul e Kanasawud (2006) no qual utilizando um bisturi são realizadas incisões longitudinais de 3 mm (espaço de 5 cm as incisões) na superfície dos frutos seguido da coleta do látex exsudado que no caso desse trabalho foi em placas de Petri (Figura 9). O tempo de coleta em cada fruto foi em média 10 min.

Figura 9. Extração do látex do mamão contendo papaína (papaína bruta).



Após a coleta, as placas foram fechadas, vedadas com filme de PVC, sendo então o material conservado a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Após, o látex foi liofilizado (liofilizador marca Liotop, a -48 ° e $0,1\text{ mbar}$, por 24 h), obtendo-se, então uma massa seca de coloração branco-amarelada. Esta massa foi macerada com um pistilo em almofariz de porcelana, obtendo-se assim um pó fino de mesma coloração, o qual foi transferido para um frasco de vidro com tampa e mantido sob refrigeração a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$.

4.1.2 Caracterização parcial da papaína coletada e comercial

As papaínas coletada e comercial (marca Sigma-Aldrich[®], pó bruto, 1,5-10 unidades/mg de sólido, referência P3375) foram caracterizadas e comparadas em termos de conteúdo de proteínas pelo método de Bradford (1946) (item 4.8.1.1.), de atividade enzimática pelo método de Charney e Tomarelli (1947) utilizando como substrato a azocaseína (item 4.6), e análise gravimetria da fração insolúvel em água. Para esta análise gravimétrica, 100 mg de papaína (coletada e comercial) foram solubilizadas em 10 mL de água deionizada pH 7,0 por agitação magnética durante 1 h a temperatura de $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Em seguida as soluções foram centrifugadas a 5000 x g por 10 min, o precipitado seco em estufa a $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 24 h, seguido por pesagem em balança analítica. A diferença de massa seca inicial de papaína e a massa residual não solubilizada constituiu a fração insolúvel.

4.2 Ativação da cepa e preparo do inóculo

Para a produção de NCB foi utilizada a bactéria acética *Gluconacetobacter* sp., inicialmente isolada de um mosto fermentado de vinho tinto no trabalho de dissertação de Tiboni (2011). A cepa foi gentilmente cedida pelo prof. Dr. José Domingos Fontana para este trabalho. Todos os meios de cultivo, frascos, ponteiras, dentre outros materiais que entraram em contato com a bactéria ou meio de cultivo foram previamente autoclavado a $120\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 15 min e os procedimentos

realizados em condições assépticas apropriadas (utilizando fluxo laminar ou a área estéril do bico de Bunsen).

A cepa foi ativada em meio H-S modificado (o qual tem por fonte de carbono o glicerol) (glicerol 2% (p/v), peptona 0.5 %, extrato de levedura 0.5 %, fosfato dissódico 0.27% e ácido cítrico 0.115%), e incubada a 28°C por um período de sete dias, até a formação de uma membrana de celulose de 3-5 cm de espessura. Após, foi repicada em ágar H-S modificado pelo método de esgotamento por estrias e incubada por 48 h a 28°C, para então ser mantida sob refrigeração a 4°C

O inóculo foi preparado de acordo com a metodologia empregada por Mikkelsen et al. (2009). Para isso, uma colônia do meio H-S ágar foi transferida para um frasco contendo 10 mL de meio H-S modificado e tradicional, e foi incubado a 28 °C por 48 h. Após incubação, o frasco com meio foi agitado vigorosamente para liberar as células ligadas ao biofilme em formação. A suspensão (10 mL) foi então transferida para 90 mL de meio H-S modificado (pH 5,0 ajustado com HCl ou NaOH 1 M). O antifúngico nistatina foi adicionado na concentração de 5 mg/L para evitar a contaminação por leveduras e bolores. Após suave homogeneização orbital manual, o volume foi distribuído nos poços de placas de cultivo de células conforme descrito no item a seguir.

4.3 Produção de membranas NCB em placas de cultivo de células

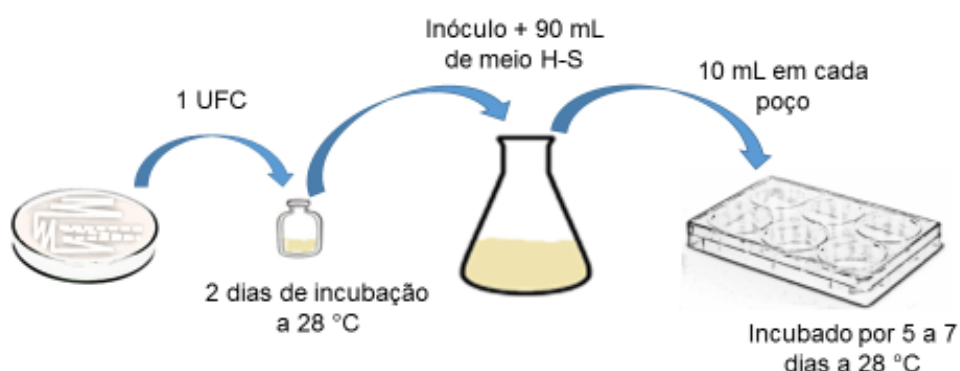
A NCB foi produzida em placas de cultivo de células de seis poços (marca Kasvi, fundo chato, área de crescimento 9,60 cm², volume máximo dos poços 17 mL). Cada poço foi preenchido com 10 mL de meio H-S modificado com 10% de inóculo (item 4.2), conforme empregado por Castro et al. (2011). Foi aplicado com cola quente como um pequeno “calço” (~4 mm) em 4 pontos da base na placa de cultivo como um pequeno apoio para a tampa visando permitir melhor troca gasosa.

Os cultivos foram realizados sob condição estática aeróbica a 28°C durante 5-7 dias até a formação de membranas de NCB com uma espessura em torno de 3-5 mm e um peso úmido médio de 4,0 ± 1,0 g. Para os experimentos de imobilização foram selecionadas e separadas membranas que apresentaram peso úmido de 4,3 ±

0,3 g e espessura de 4 mm para a padronização dos experimentos, uma vez que a imobilização da papaína foi realizada com as membranas úmidas de NCB.

Na Figura 10 é apresentado o procedimento empregado para a produção das membranas de NCBs.

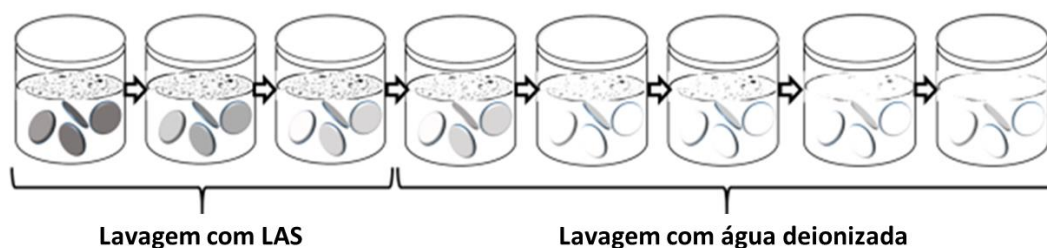
Figura 10. Representação esquemática do procedimento empregado para o cultivo de NCBs em placas de cultivo celular de 6 poços.



4.4 Purificação das membranas de NCB

Para a purificação das membranas de NCB (remoção das células, meio de cultivo, dentre outros) foi utilizada metodologia de Fontana et al. (1997) (Figura 11). Após o período de produção, as membranas de NCB foram coletadas e enxaguadas com água deionizada para remover o excesso de células bacterianas e meio residual de cultivo. Posteriormente, foram realizadas três lavagens sucessivas por imersão em solução contendo 1 % do surfactante alquilbenzeno linear sulfonato de sódio (LAS). Cada lavagem teve duração de 24h até que as membranas adquirirem aspecto opaco-esbranquiçado ou opaco-transparente, diferente do aspecto marrom-opaco pós cultivo. Para a remoção do surfactante, as membranas foram imersas em água deionizada durante 48 h com 6 substituições da água durante esse período.

Figura 11. Esquema do processo de purificação das membranas de NCB.



As membranas de NCB limpas foram mantidas na forma hidratada para a imobilização enzimática, sendo conservadas em frascos de vidro fechados contendo água deionizada, sob refrigeração a 4 °C. Outra parte das membranas foi seca em liofilizador (marca Liotop) a -48°C, 0,1 mbar, durante 24 h para os experimentos de caracterização estrutural ou como controle nos experimentos enzimáticos.

4.5 Imobilização de Papaína em membranas de NCB

Para os experimentos de imobilização foi utilizada papaína comercial do látex do mamão (*Carica papaya*) (marca Sigma-Aldrich®, pó bruto, 1,5-10 unidades/mg de sólido, referência P3375) seguindo a metodologia descrita por Chen, Zou e Hong (2015). Neste estudo optou-se em realizar a imobilização com a membrana hidratada (na forma de hidrogel, após a lavagem com água destilada), ao invés da imobilização após a liofilização como descrito por Chen, Zou e Hong (2015).

Desta forma, na imobilização por adsorção, NCBs com uma massa de $4,3 \pm 0,3$ g foram imersas em 5 mL de solução de uma papaína (5 mg/mL) durante 24 h a 4 °C. Diversos valores de pHs (4,0-8,0) foram testados nessa solução para determinar o melhor pH de imobilização. Em seguida, as membranas foram retiradas da solução de papaína, lavadas com água deionizada, congeladas a -80 °C em ultrafreezer e então liofilizadas.

Na imobilização por adsorção seguida de reticulação com o emprego de glutaraldeído, procedeu-se de maneira idêntica à imobilização por adsorção, com a diferença que após 24 h de imersão em solução de papaína (5 mg/mL) num dado pH foram acrescentados 250 µL de glutaraldeído (2,5 % em água) à solução de papaína

com a NCB (5mL). A mistura foi então mantida a 30°C durante 2 h sob agitação em movimento gangorra seguido de lavagem com água deionizada, congelamento a -80 °C em ultrafreezer e liofilização. O volume restante da solução de imobilização em ambos os casos foi medido e a concentração de proteínas determinada pelo método de Bradford (item 4.8.1.1) pela diferença na concentração de papaína antes e após a imobilização.

4.6 Determinação da atividade proteolítica

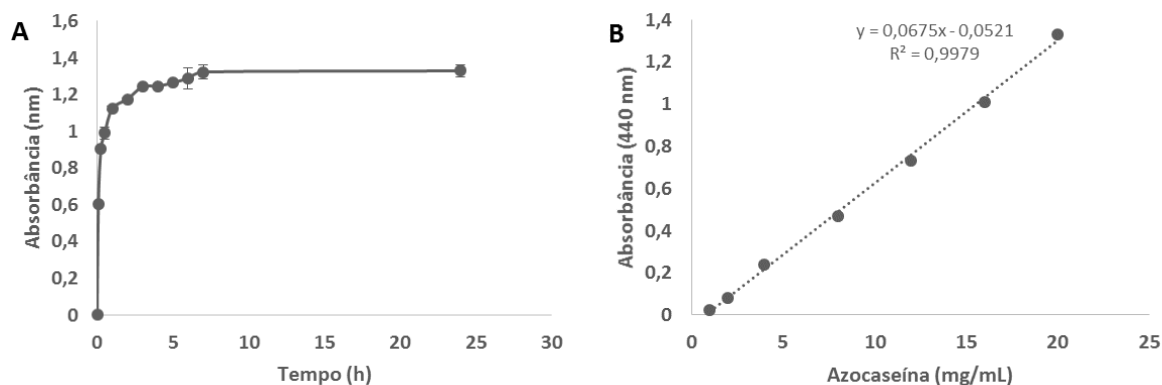
Para avaliar a atividade proteolítica da papaína (livre e imobilizada) foi utilizado como substrato a azocaseína (Sigma-Aldrich, EUA) segundo a metodologia proposta por Charney e Tomarelli (1947), pioneiros no emprego da azocaseína, com adaptações de Coelho et al. (2016) que diminuíram os volumes reacionais. A base dessa metodologia é a utilização da azocaseína, um derivado da caseína com um corante azo (sulfonilamida) de coloração alaranjada. A hidrólise da caseína libera o corante azo para o meio, sendo detectado por absorvância a 440 nm.

Devido ao tipo de estudo, o tampão utilizado na concentração de 100 mM dependeu do pH de cada experimento. Para isso 250 µL de azocaseína 2,0% e 250 µL de solução de papaína 1 mg/mL solubilizados em tampão cisteína foram incubados em banho-maria a 40 °C (exceto para o ensaio de temperatura ótima para atividade enzimática, o qual foi realizado com a temperatura variando entre 30 e 96 °C). A reação foi interrompida pela retirada da membrana e adição de 1,5 mL de (TCA) 5 % à solução. Após centrifugação a 2000 x g por 10 min a temperatura ambiente a azocaseína residual foi precipitada, e ao sobrenadante foi adicionado 2 mL de uma solução de NaOH 0,5 N (proporção 1:1), seguido por homogeneização e leitura a 440 nm em espectrofotômetro. Para o branco, foi previamente misturado o substrato com o TCA, para então ser acrescentado a enzima.

Para determinar a atividade enzimática da papaína livre e da papaína imobilizada, inicialmente foi realizada uma curva cinética para se determinar o tempo necessário para a completa digestão da azocaseína na concentração de 20 mg/mL (Figura 12a). A partir dessa curva, foi construída uma curva de calibração de azocaseína com concentrações variando entre 1 e 20 mg/mL. Para isso foram

preparadas as soluções de azocaseína nas diversas concentrações de trabalho e as mesmas foram digeridas por 9 h (tempo suficiente para a completa digestão da azocaseína) com uma solução de papaína na concentração de 1 mg/mL.

Figura 12. Curva de atividade de papaína livre em função do tempo (A) e Curva de calibração de azocaseína



Nota: A) Digestão de azocaseína 20 mg/mL por uma solução de papaína 1 mg/mL, incubada a 40 °C por 24h. B) Reação realizada com azocaseína com concentrações variando entre 1 e 20 mg/mL; solução de papaína 1 mg/mL; incubada em banho-maria a 40 °C por 9 h.

Na Figura 12b é apresentada a curva de calibração de azocaseína, a qual apresentou $R^2 = 0,9979$ e equação da reta $Y = 0,0675x - 0,0521$.

A partir da equação da reta obtida foi possível converter a absorbância resultante da digestão do substrato pela enzima livre e imobilizada em concentração de substrato digerido. De posse da concentração de substrato digerido, a determinação da atividade foi feita de acordo com as equações 1 e 2 do item 4.6 dos materiais e métodos.

Para o ensaio de atividade com as membranas de NCB, $\frac{1}{4}$ de uma membrana com papaína de $27,5 \pm 0,5$ mg foi colocada em 250 μ L de solução de azocaseína 2,0% e 250 μ L de tampão cisteína pH 7, incubados a 40 °C (exceto para o ensaio de temperatura ótima para atividade enzimática, do qual já foi comentado). A adição de TCA, leitura no espectrofotômetro e preparo do branco foi realizado conforme já descrito para enzima livre.

Como controle negativo, utilizou-se membranas de NCB puras incubadas em pH de 4 a 7 e posteriormente secas por liofilização. Ainda, para avaliar se havia

subestimação de atividade, em virtude da área de contato com o substrato, como controle foram utilizadas membranas picadas em pedaços com dimensões médias de 2mm (papaína imobilizada em membranas de NCB hidratada por ambas as técnicas em pH 7).

A quantificação da atividade enzimática foi realizada em três etapas, seguindo a metodologia empregada por Coelho et al. (2016). Primeiro foi construída uma curva de atividade *versus* tempo, com tempo total de reação de 20 h, a 40 °C, a fim de verificar o tempo necessário para a completa digestão de azocaseína 2 mg/mL por uma solução de papaína 1 mg/mL. Em seguida foi feita uma curva de concentração de azocaseína de 1 a 20 mg/mL. Para isso, as várias concentrações de azocaseína foram digeridas com uma solução de papaína 1 mg/mL pelo período de 9 h (tempo suficiente para a completa digestão do substrato na sua mais alta concentração). A curva resultante forneceu a equação da reta com a qual é possível correlacionar a intensidade na coloração (valor de absorbância a 440 nm) com a concentração de substrato consumido.

A quantificação da atividade enzimática foi obtida pela equação 1 e 2, na qual uma unidade (U) de atividade proteolítica foi definida como a quantidade de enzima capaz de digerir 1 mg de substrato por min (COELHO et al., 2016).

$$A_{(U)} = \frac{C_{AZO} \cdot V_{total}^2}{t \cdot V_{ENZ}} \quad (1)$$

$$A_{(U)} = \frac{C_{AZO} \cdot V_{total}^2}{t \cdot V_{tp} \cdot imo} \quad (2)$$

Onde **C_{AZO}** é a concentração de azocaseína; **V_{total}** é a soma dos volumes de TCA, substrato e solução de enzima; **V_{ENZ}** é o volume de solução enzimática usada na digestão; **t** o tempo de digestão (em minutos) e **imo** a massa de CB-papaína (mg).

4.6.1 Determinação dos parâmetros cinéticos

Os parâmetros cinéticos da papaína livre e imobilizada foram determinados por meio da equação (3) de Michaelis-Menten (NELSON; COX, 2014):

$$\frac{V_{m\acute{a}x} [S]}{K_m + [S]} \quad (3)$$

A equação de Michaelis-Menten (equação 3) é linearizada separando os componentes do numerador no lado direito, obtendo-se a equação 4:

$$\frac{1}{V_0} = \frac{K_m}{V_{m\acute{a}x} [S]} + \frac{[S]}{V_{m\acute{a}x}} \quad (4)$$

A equação 4 é simplificada, obtendo-se a equação 5, conhecida como equação de Lineweaver-Burk:

$$\frac{1}{V_0} = \frac{K_m}{V_{m\acute{a}x} [S]} + \frac{[S]}{V_{m\acute{a}x}} \quad (5)$$

Onde $[S]$ é a concentração do substrato, $V_{m\acute{a}x}$ é a taxa máxima de reação, e K_m é a constante de Michaelis-Menten.

Neste estudo foram realizados os ensaios de atividade variando a concentração do substrato azocaseína entre 1 e 20 mg/mL solubilizado em tampão

fosfato pH 7. Os ensaios foram feitos de acordo com o item 4.6, com algumas modificações. As reações foram efetuadas em banho-maria a 40 °C, sob agitação de 120 rpm por 4 min.

4.6.2 Avaliação das condições ótimas de reação de atividade enzimática

Os ensaios de avaliação das condições ótimas de reação de atividade enzimática para a papaína livre e imobilizada foram realizados em relação ao pH do meio reacional e da temperatura de incubação. A avaliação da temperatura ótima de reação foi realizada em pH 7, em temperaturas variando entre 30 e 96 °C em banho maria, por 20 min. Para o pH, os ensaios foram realizados com o pH do meio reacional variando entre 4 e 8, com tempo de reação de 20 min a 40 °C.

Os ensaios de atividade foram realizados com azocaseína como descrito no item 4.6.

4.6.3 Avaliações de estabilidade

A estabilidade da atividade da papaína livre e imobilizada foi avaliada em relação à temperatura, pH, solventes, metais, reuso e estocagem. Para o ensaio de estabilidade frente ao pH, a papaína livre e imobilizadas foram incubadas a 25 °C em tampão citrato 0,1 M, pH 3, tampão fosfato 0,1 M, pH 7, e tampão bicarbonato-NaOH 0,1 M, pH 11. Alíquotas foram retiradas entre 15 e 120 min para serem submetidas ao ensaio de atividade.

No ensaio de termoestabilidade, a papaína livre e imobilizadas foram incubadas em tampão fosfato 0,1 M, pH 7, nas temperaturas 50, 75 e 95 °C. Alíquotas foram retiradas entre 15 e 120 min, resfriadas e rapidamente submetidas ao ensaio de atividade.

A estabilidade da papaína livre e imobilizadas em solventes orgânicos foi estudada por meio da medida de atividade após incubação por 1 e 4 h nos solventes

polares etanol e dimetilsulfóxido (DMSO) e nos solventes apolares clorofórmio e hexano.

Para o ensaio de estabilidade a metais, papaína livre e imobilizadas foram incubadas a 25 °C por 1 h em soluções de MgCl₂, MnCl₂, ZnCl₂ e CuSO₄, nas concentrações de 1, 10 e 20 mM. Para este ensaio não foi utilizado EDTA no tampão.

Para a determinação de sua possibilidade de reuso, foi realizado o ensaio de atividade para a papaína imobilizada pelas técnicas de adsorção e reticulação por sete ciclos de reuso para cada membrana. Após cada ciclo, as membranas foram lavadas com 5 mL de água deionizada, pH 7, por agitação em vortex por 10 s em tubos com rosca. Entre cada ciclo de reuso foi verificada a atividade da água residual de lavagem para se verificar se houve perda de enzima durante essa etapa.

Para o ensaio de estabilidade ao armazenamento, solução de papaína 1 mg/mL armazenada em frasco vedado com rosca e papaína-NCB acondicionada em embalagens *ziplock foram* mantidas em estufa a 28 °C por 30 dias. A cada 7 dias eram retiradas amostras e realizado os ensaios de atividade.

Para todos os ensaios de estabilidade foi realizado o ensaio de atividade com azocaseína como descrito no item 4.6.

4.7 Cinética de imobilização

Para este ensaio foram utilizadas membranas de NCB hidratada de $4,3 \pm 0,3$ g em frascos contendo 5 mL de solução de papaína 5 mg/mL em tampão fosfato pH 7, a 4 °C, em agitador basculante (ANEXO A) a 150 rpm. O acompanhamento da cinética de imobilização foi realizado pela medida da atividade residual do sobrenadante pelo método de Charney e Tomarelli (1947) utilizando como substrato a azocaseína (item 4.6). Para isso, amostras foram retiradas nos tempos de 0, 0,25, 0,5, 1, 2, 3, 4, 22, 23 e 24 h. Para a quantificação de proteínas foi empregado o método de Bradford, apresentado no item 4.8.1.1.

Com base nos resultados experimentais, calculou-se os parâmetros eficiência da imobilização (E) e a retenção de atividade (R), através das Equações 6 e 7, respectivamente (MADALOZZO et al., 2015). Porém, como a imobilização foi realizada em condições estáticas, os dados experimentais utilizados para os cálculos

foram os da própria imobilização. Pois a cinética de imobilização foi realizada em período posterior a imobilização por falta de recursos materiais. Assim, este ensaio serviu para verificar se o tempo de imobilização era satisfatório.

$$E = \frac{(At_i - At_f)}{At_i} \times 100 \quad (6)$$

$$R = \frac{A_0}{A_T} \times 100 \quad (7)$$

Onde At_i é a atividade inicial total proteolítica em meio aquoso frente à azocaseína no sobrenadante, antes da imobilização (U); At_f é a atividade final total de proteólise em meio aquoso frente à azocaseína no sobrenadante após imobilização (U); A_0 é a atividade de proteólise do imobilizado (U/mg); e A_T é a atividade teórica do imobilizado (U/mg), calculada de acordo com a equação 8:

$$A_T = (M_{PI} - M_{PF}) \times A_{ESPorG} \quad (8)$$

Onde M_{PI} é a massa de proteínas (mg) presente na solução enzimática antes da imobilização; M_{PF} é a massa de proteínas remanescente no sobrenadante após a imobilização, e A_{ESPorG} é a atividade de proteólise específica da enzima livre (U/mg).

4.8 Quantificação e caracterização de enzimas livres e imobilizadas

4.8.1 Quantificação de proteínas

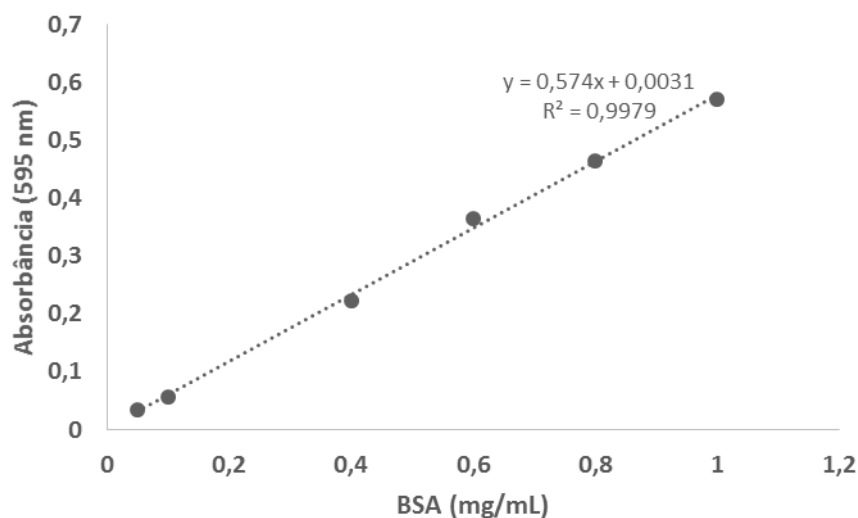
4.8.1.1 Método de Bradford

A quantificação de proteínas foi realizada de acordo com a metodologia de Bradford (1946). Para o preparo do reagente de Bradford em balão volumétrico (capacidade de 1 L) foram adicionados 100 mg de corante Coomassie G-250. O corante foi dissolvido com 50 mL de etanol 95%, seguido pelo acréscimo de 100 mL de ácido fosfórico 85%, sendo o volume restante para 1 L completado com água destilada.

A curva de calibração foi realizada com albumina do soro bovino (BSA) 1 mg/mL tendo os pontos da curva em diferentes concentrações (0,1 - 1,0 mg/mL). Para o procedimento 100 µL da amostra a ser analisada (ou de sua diluição, dependendo de sua concentração) foram transferidos a um tubo de ensaio com rosca seguido pela adição de 5 mL do reagente de Bradford. A solução resultante foi homogeneizada e sua leitura foi realizada em espectrofotômetro a 595 nm.

Por se tratar de um reagente cuja absorvância varia de acordo com a sua idade, para cada ensaio foi necessário construir uma nova curva de calibração (KRUGER, 2002). Assim, pela inviabilidade de exibir todas as curvas construídas ao longo da pesquisa, na Figura 13 é mostrada a curva de calibração para quantificação de proteínas imobilizadas por adsorção, a título de exemplo. A partir da equação da reta obtida foi possível converter a absorvância em concentração de proteínas.

Figura 13. Curva de calibração para quantificação de proteínas.



Nota: Método Bradford. Padrão utilizado: albumina de soro bovino (BSA).

A determinação de proteína imobilizada nas membranas foi feita pelo cálculo da diferença entre a quantidade total de proteína introduzida no meio reacional e a quantidade de proteína no sobrenadante, de acordo com a equação 9 (CHEN; ZOU; HONG, 2015). E o percentual de imobilização foi determinado pela equação 10.

$$P_t = \frac{(P_i - P_f)}{S} \quad (9)$$

$$P_{\%} = \frac{P_i - P_f}{P_i} \cdot 100 \quad (10)$$

Onde P_i e P_f são as concentrações de proteínas inicial e final, respectivamente; e S é a massa de suporte de NCB.

A quantidade de proteínas presentes na água de lavagem da membrana foi desconsiderada em razão do valor da absorbância ser muito abaixo do primeiro ponto da curva de calibração com BSA.

4.8.1.2 Método de Lowry adaptado

O método de Lowry (LOWRY; RANDALL; LEWIS, 1951) foi adaptado e empregado qualitativamente para comprovação da presença da papaína na membrana de NCB (amostra sólida) utilizando placa de toque de 12 cavidades. O princípio dessa metodologia se baseia em duas reações que ocorrem sequencialmente. A primeira é a reação do biureto, na qual, sob condições alcalinas, ligações peptídicas da proteína reagem com o cobre, produzindo Cu^+ . Este, por sua vez, reage com o reagente de Folin (reação de Folin-Ciocalteu), o qual é reduzido concomitantemente à oxidação de resíduos de aminoácidos aromáticos (em geral triptofano e tirosina). A reação resulta em uma coloração azul forte, a depender do conteúdo do triptofano e tirosina na proteína. Para o reagente formador de complexo são utilizadas três soluções: solução A (solução aquosa de Na_2CO_3 2 % (m/v)); solução B (solução aquosa de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 1 % (m/v); e solução C (solução aquosa de tartarato de sódio e potássio 2 % (m/v). Seu preparo deve ser realizado imediatamente antes do uso, nas proporções 100:1: 1 (WATERBORG, 2002).

No o ensaio deste trabalho 5 mg do controle positivo (BSA), 5 mg de NCB pura (controle negativo), 5 mg NCB-papaína (imobilizada por adsorção) e 5 mg NCB-papaína (imobilizada por reticulação) foram colocados nesta ordem em cada cavidade da placa de toque. Após, foram colocados em cada cavidade 100 μL de NaOH 2 M seguido de aquecimento a 100°C por 10 min. O hidrolisado foi então resfriado a temperatura ambiente seguido pela adição de 1 mL do reagente formador do complexo. Após 10 min a temperatura ambiente foram adicionados 100 μL do reagente de Folin (Folin Ciocalteu 2 M, LABORCLIN) e deixou-se a mistura reagir em temperatura ambiente por 30 min. As amostras foram analisadas visualmente pela mudança de coloração e comparação com os controles.

4.8.2 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Para avaliar a eficiência de hidrólise da papaína imobilizada foi realizado análise eletroforética (SDS-PAGE) utilizando o sistema de eletroforese vertical (SE300

miniVE, Hoefer) contendo géis pré-fabricados (12% Mini-PROTEAN® TGX Stain-Free, Biorad).

Para a realização dos ensaios de hidrólise, 400 µL de caseína (1 mg/mL) e albumina de soro bovino (BSA) (1 mg/mL) foram digeridos com 10 mg NCB-papaína imobilizada por adsorção e reticulação. A reação foi realizada em banho-maria com agitação de 120 rpm, a 40 °C por 15 e 30 min. Após, os hidrolisados foram diluídos em tampão de amostra (Tris-HCl 12 mM, pH 6,8, glicerol 5%, SDS 0,4%, 2-mercaptoetanol 2 mM e azul de bromofenol 0,02%) (Laemmli, 1970) e desnaturadas a 90°C durante 5 minutos. Depois alíquotas de 10 µL foram aplicadas nos poços do gel de poliacrilamida e a eletroforese foi realizada numa voltagem de 150 V em tampão de corrida Tris 25 mmol/L pH 8,3, glicina 192 mmol/L e SDS 0,1%. Finalizada a corrida, os géis foram corados com solução corante (Coomassie Blue R-250 0,1% em solução de ácido acético/metanol/água (1:4:5) e descorados em solução de ácido acético/metanol/água (1:4:5).

4.9 Caracterização físico-química

4.9.1 Percentual de Massa Seca e Capacidade Reabsorção de Água

Membranas de NCB *in natura*, após lavagem, foram pesadas em balança analítica e secas por liofilização e estufa a 60 °C, para estimar o seu percentual de massa seca e água. Posteriormente elas foram reidratadas por imersão em água deionizada por um período de 24 h, e então novamente pesadas.

4.9.2 Microscopia Eletrônica de Varredura

As superfícies das membranas de celulose foram analisadas por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV), utilizando microscópio eletrônico de

varredura Carl Zeiss / EVO MA 15, do Centro Multiusuário de Caracterização de Materiais – CMCM da UTFPR-CT.

Para sua realização, as amostras de NCB foram fixadas nos tubos stubs com fita adesiva dupla face de carbono e, em seguida, metalizadas no metalizador Quorum, modelo Q150RES. Após este preparo, as amostras foram observadas com magnificação de 10 e 20 kx.

4.9.3 Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIV)

Os espectros das membranas de NCB foram obtidos por meio do equipamento de espectroscopia Varian 640 FTIR do Laboratório Multiusuário do Departamento de Química e Biologia da UTFPR.

Para as análises, as amostras foram secas em estufa a 40 °C por 12 h. Depois, foram trituradas e misturadas com 99% de KBr para a confecção da pastilha. As leituras foram realizadas no comprimento de onda de transmitância na faixa de 650-4000 cm^{-1} com resolução de 4 cm^{-1} .

4.10 Tratamento estatístico dos dados

Todos os experimentos foram realizados em triplicata, cujos resultados foram apresentados como média de desvio padrão. Os dados foram tratados por ANOVA e teste de Tukey com o auxílio do programa estatístico Minitab 17.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Comparação da papaína coletada e comercial

Devido à enorme variabilidade na literatura com relação a papaína utilizada em estudos (com relação a fonte, atividade, grau de pureza, etc) uma comparação prévia entre a papaína comercial e a papaína coletada foi realizada levando em conta algumas características gerais (fração insolúvel, % proteínas totais, atividade enzimática). O intuito de tal comparação foi constatar o quanto são diferentes, uma vez que a papaína comercial foi, segundo descrição no catálogo do produto, obtida a partir do látex seco do fruto do mamoeiro da mesma forma que procedemos para a papaína coletada. Na tabela 5 são apresentadas algumas características obtidas.

Tabela 5 - Propriedades das papaínas coletadas e comercial (Sigma®).

Papaína	% Fração insolúvel em água (peso seco)	% de proteínas totais (peso seco)	Atividade (U) ¹	Coloração
Comercial (Sigma, P3375)	31,17 ± 1,25	21,09 ± 1,32	11,83 ± 0,23	Bege-amarela
Coletada	46,75 ± 3,04	29,19 ± 0,51	13,62 ± 0,22	Branca
Diferença entre as papaínas (%)	50,00 ± 3,29	38,43 ± 2,49	15,13 ± 0,38	-

Nota: Todos os parâmetros foram significativamente diferentes ($P < 0,05$).

A diferença (%) dos parâmetros entre as papaínas foram calculados considerando a papaína comercial como 100% (papaína comercial/papaína coletada · 100).

Os ensaios de atividade foram realizados com soluções de papaína 1 mg/mL.

¹ Digestão de 20 mg/mL de azocaseína a 40 °C em pH 7,0 durante 20 minutos.

Uma unidade (U) de atividade proteolítica foi definida como a quantidade de enzima capaz de digerir 1 mg de substrato por min.

Como pode ser observado, as enzimas apresentam algumas diferenças significativas entre si. As papaínas comercial e coletada apresentaram,

respectivamente, 31,17% e 46,75% de fração insolúvel em água; 21,09% e 29,19% de teor de proteínas total, e 11,83 e 13,62 U de atividade. Em termos de fração insolúvel em água a diferença entre as papaínas foi de 50%, ao passo que a diferença apresentada em termos de proteínas e atividade foi de 38,43 e 15,13%, respectivamente. Com relação a algumas propriedades organolépticas foi verificado que a papaína comercial foi apresentada na forma de pó higroscópico, com odor forte característico e coloração variando do branco ao bege amarelado (Figura 14a), enquanto que a papaína coletada após liofilização e maceração apresentou um aspecto de pó higroscópico, odor fraco característico e coloração branca (14b).

Figura 14. Aspecto visual da papaína comercial (A) e da papaína coletada (B).



As características da papaína são variáveis de acordo com a fonte da planta de mamão (podendo a planta que produz o fruto ser fêmea, macho ou hermafrodita; de acordo com a idade do fruto e da árvore), parte da planta e a técnica empregada na secagem (ADLER-NISSEN, 1993; LUIS MADRIGAL et al., 1980; BORELLA; PÁDUA; STEVANATO, 2015; ORTIZ et al., 1980). Para exemplificar, Borella, Pádua e Stevanato (2015) em um estudo comparativo da qualidade da papaína comercializada em São Paulo, encontraram uma variação na atividade enzimática das amostras de até 458%. Por isso, é sempre importante levar em consideração a fonte e outros fatores quando se pretende utilizar papaína para um determinado fim.

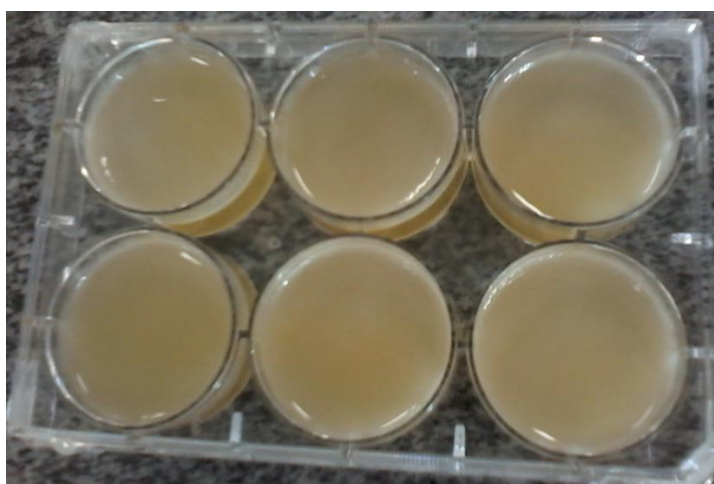
Neste estudo optou-se por utilizar a papaína comercial por algumas razões de ordem prática: a facilidade de obtenção, maior reprodutibilidade nas técnicas e métodos utilizados, principalmente tendo em vista comparação de resultados com outras pesquisas que por ventura sejam realizadas nesse tema. Por se tratar de um

produto comercial de uma marca difundida e conhecida, tende a apresentar uma relativa homogeneidade entre seus lotes, no qual um pesquisador em qualquer local ou país pode ter acesso.

5.2 Produção e purificação das membranas de NCB

Membranas de NCB foram produzidas por *Gluconacetobacter* sp. em placas para cultivo de células como apresentado na Figura 15. Os cultivos foram realizados em condição aeróbica e estática. A condição estática de cultivo foi escolhida por apresentar na literatura maiores rendimentos, apesar do menor fornecimento de O₂ e nutrientes em relação à condição agitada. Uma desvantagem importante do cultivo agitado e que tem ampla divulgação na literatura, é a maior possibilidade de ocorrência de mutações gênicas em *Gluconacetobacter* e outros gêneros próximos. Tais alterações que em algum momento podem atingir genes responsáveis pelo controle e produção do polímero, acarretando assim uma diminuição ou até perda da produção de NCB pela bactéria (JOZALA et al., 2016).

Figura 15. Produção de membranas de NCB em placa de cultivo de células.



NOTA: Condições de cultivo: 10 mL por poço de meio HS modificado, incubação a 28 °C sob condição estática por 5 a 7 dias.

A matriz de NCB tem por natureza tomar a forma do recipiente no qual é cultivada (KLEMM et al., 2001). Assim, sua forma bidimensional foi obtida pelo formato do poço de cultivo, um disco perfeito de 4,2 cm de diâmetro. Já a sua espessura foi variável de acordo com o tempo de incubação, como demonstrado previamente em alguns trabalhos (DANESI; WOSIACKI, 1998; MACHADO, 2016), o que vem se refletir em sua massa úmida e seca.

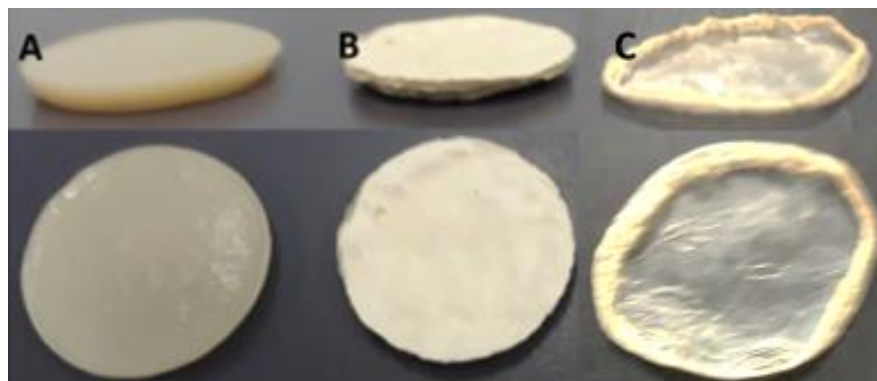
O meio de cultivo utilizado foi o meio Hestrin e Schramm (H-S) modificado, na qual a fonte de carbono original (glicose) foi substituída por glicerol loiro. Este representa o glicerol bruto parcialmente tratado para a remoção de impurezas grosseiras. A escolha do glicerol loiro como fonte principal de carbono se deu por algumas razões de ordem prática, como o seu baixo custo valor aproximado de mercado: US\$100-200/tonelada), a fácil obtenção (é gerado em abundância durante o processo industrial de transesterificação na produção do biodiesel), ser uma fonte de carbono altamente assimilável e por apresentar menor possibilidade da ocorrência de contaminações por outros microrganismos em relação à glicose.

Alguns estudos mostram que a fermentação de glicerol por *Gluconacetobacter* spp. resulta em maiores taxas de produção de NCB por volume de meio (rendimento) quando comparado com outras fontes de carbono (incluindo, em alguns casos, a glicose) (ADNAN et al., 2015; TABAII; EMTIAZI, 2016; VAZQUEZ et al., 2013). Um fator importante a se destacar no cultivo estático é o nível de oxigenação no sistema de produção de NCB. Uma produção consideravelmente mais rápida de NCB foi observada quando uma pequena elevação na tampa da placa de cultivo foi adaptada (conforme item 4.3 dos Materiais e Métodos) antes de colocar as placas sob incubação, permitindo, portanto, maior aeração dos poços e meio de cultivo nas placas. Por exemplo, para cada membrada de NCB ($4,0 \pm 1$ g em seu estado hidratado) obtida anteriormente após 20-25 dias, após a adaptação foi obtido o mesmo peso em 5 a 7 dias. Estes detalhes mesmo que pormenores, não são normalmente descritos nos artigos científicos, porém trazem uma considerável diferença.

As membranas produzidas tiveram um aspecto e textura de hidrogel gelatinoso, cuja massa analisada foi composta majoritariamente por água (Figura 16a). Após a secagem por liofilização as membranas mantiveram relativamente sua espessura original, apresentaram uma coloração branca, textura macia, e um aspecto de “papel espesso rugoso” (Figura 16b). Quando secas em estufa as membranas

ficaram mais compactadas, finas, translúcidas e semelhantes a um papel vegetal (Figura 16c).

Figura 16. Aspecto nas membranas de NCB hidratada e secas



Nota: NCB produzida com meio H-S modificado em placas de cultivo celular em condição estática por 5-7 dias a 28 °C.

A) Hidratada após processo de lavagem; B) após lavagem e seca por liofilização durante 24 h; C) após lavagem e seca em estufa a 60 °C durante 24 h.

As membranas produzidas tiveram massa média de $4,0 \pm 1$ g em seu estado hidratado (*in natura* pós-lavagem). Destes 4 gramas, as membranas apresentaram um peso seco de 52 ± 11 mg após a secagem por liofilização. As secas em estufa apresentaram peso seco de 48 ± 13 mg. Assim, as membranas produzidas apresentaram em média 1,3% de massa seca (liofilizada, 98,7% de umidade) e 1,2% de massa seca (seca em estufa, 98,8% de umidade) apresentando, portanto, um rendimento médio de 5 g/L de NCB no cultivo em placas sob condições estáticas. Jung et al. (2010), obtiveram 2.16 ± 0.03 g/l utilizando o glicerol no meio de cultivo como fonte de carbono em meio H-S como neste trabalho (cultivo em frascos cônicos de 250 mL, com 50 mL e meio, 30°C e 200 rpm durante 7 dias).

Com intuito de verificar a capacidade de reabsorção de água após a secagem por liofilização foi observado que a membrana quando colocada em água destilada durante 24 h a temperatura ambiente atingiu menos da metade ($40 \pm 4,7\%$) de sua capacidade original (considerando umidade de 98,7%). Essa perda pode ter ocorrido em razão de mudanças estruturais ocorridas no processo de secagem. Ainda que a liofilização seja uma das técnicas de secagem que mais preserva as características originais de um material úmido, e mesmo em relação a secagem em estufa, algumas

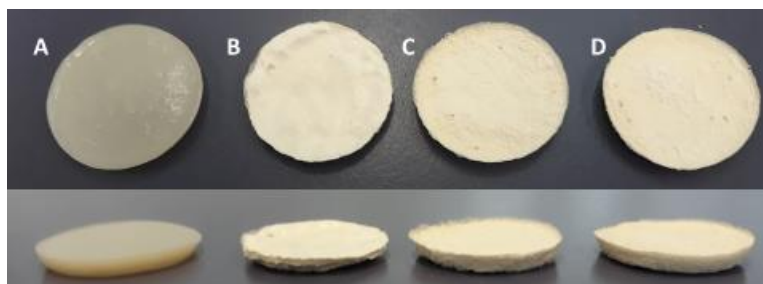
mudanças e colapsos estruturais podem ocorrer (CLASEN et al., 2006). Clasen et al. (2006) em um estudo sobre o efeito do processo de secagem nas propriedades da NCB, constataram que a membrana pode apresentar reduções em sua capacidade de dilatação em 5 e 50 vezes quando seca por liofilização e evaporação, respectivamente.

As análises por microscopia eletrônica de varredura (MEV) e de reflexão total atenuada (ATR) no infravermelho médio (FTIR), estão discutidas na seção 6.2.1, conjuntamente com a caracterização de papaína immobilizada em membranas de NCB para melhor análise comparativa.

5.3 Caracterização das membranas de NCB e NCB-papaína

A imobilização de papaína em NCB, tanto pela técnica de adsorção quanto por reticulação, seguiu a metodologia de Chen, Zou e Hong (2015) com algumas adaptações. Diferentemente do trabalho referido, o qual utilizou membranas de NCBs previamente liofilizadas, a imobilização foi realizada com membranas ainda hidratadas, de modo a explorar melhor o potencial nativo de sua elevada área superficial e retenção de água. A ideia foi de usar a diferença na concentração proteica da solução de papaína (água + papaína) em relação ao hidrogel (água) visando uma elevada “captação” da papaína na matriz da NCB que tende a entrar em equilíbrio durante o processo de imobilização. A Figura 17 mostra as diferentes formas das membranas NCB antes e após imobilização da enzima.

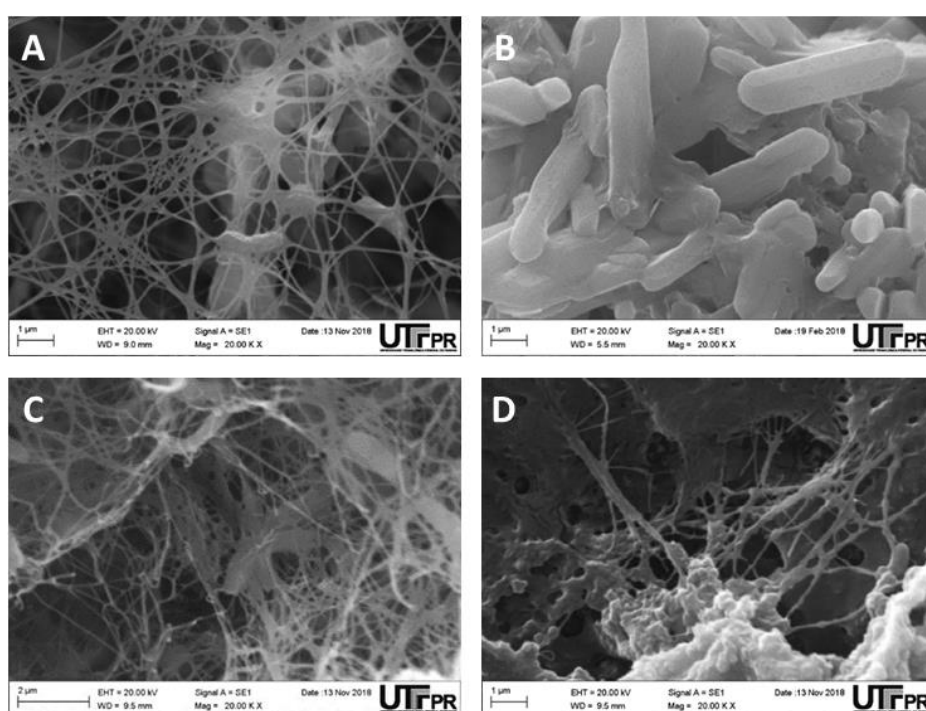
Figura 17 Morfologia das membranas de NCB hidratada e liofilizada e NCB-Papaína



Nota: A: NCB hidratada pós-lavagem B: NCB liofilizada; C: NCB com papaína imobilizada por adsorção e seca por liofilização; D: NCB com papaína imobilizada por reticulação e seca por liofilização.

Na Figura 18a, pode-se observar a morfologia da NCB produzida formando uma rede aleatória de nanofibrilas com a maior parte dos poros medindo entre 20-100 nm. Tal estrutura confere ao material uma extensa área superficial assim como descrito na literatura (CHEN; ZOU; HONG, 2015).

Figura 18. Microscopia eletrônica de varredura. A: membrana de NCB; B: membrana de NCB com papaína immobilizada por adsorção com o uso de tampão; C: membrana de NCB com papaína immobilizada por adsorção sem o uso de tampão; D: membrana de NCB com papaína immobilizada por reticulação sem o uso de tampão



Nota: Aumento de 20.000X.

Como pode ser observado anteriormente na Figura 17, as NCBs com papaína immobilizada apresentaram maior espessura quando comparadas à membrana liofilizada livre de papaína. Provavelmente isso seja decorrente da presença dos sais presentes no tampão de imobilização que juntamente com a enzima puderam preencher todos os poros da membrana com concomitante menor compactação das fibrilas de celulose. Enquanto NCBs hidratadas de $4,3 \pm 0,3$ g sem papaína apresentaram massa seca de $48 \pm 2,9$ mg, NCBs de mesma massa, após o processo de imobilização seguido por liofilização apresentaram massa seca de $109,7 \pm 7,3$. Isso representa uma diferença de 128,5%. Para verificar essa diferença através de uma

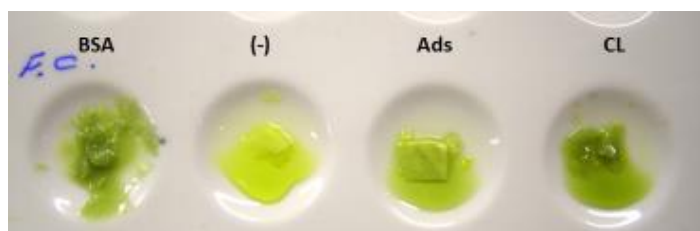
imagem de MEV foi confirmada a presença de cristais de sais (do tampão de imobilização) sobre toda superfície e interior dos poros da membrana de NCB (Figura 18b).

Ainda na tentativa de verificar se a imobilização de papaína traria alguma mudança na morfologia da NCB procedeu-se a imobilização com água ultrapura sem o uso do tampão ou sais (Figura 18c e 18d).

Na microscopia de papaína imobilizada por reticulação (Figura 18d), pode-se observar alterações significativas em sua morfologia quando comparada as da NCB pura e papaína imobilizada por adsorção (Figuras 18a e 18c). Enquanto nas imagens de NCB e papaína imobilizada por adsorção observa-se uma rede fina de fibrilas de celulose, na imagem da papaína imobilizada por reticulação observa-se uma superfície mais densa e globular (principalmente na parte inferior na imagem), que se deve a reticulação da papaína na superfície das fibrilas de celulose. Resultados semelhantes foram obtidos por Bibi; Qader; Aman, (2015) e Kumar et al. (2017), cujos estudos investigaram a imobilização de enzimas em matriz de alginato de cálcio com o uso de glutaraldeído. Em ambos os trabalhos foi observada esta alteração da superfície do suporte, o qual adquire esta aparência após a imobilização de enzimas por reticulação.

Em seguida, foi utilizado o método de Lowry em placa de toque para uma confirmação qualitativa da presença de papaína na matriz de NCB (Figura 19). Quando positivo o teste, a reação tem uma coloração azulada, a depender de seu conteúdo de tirosina e triptofano na amostra (WATERBORG, 2002).

Figura 19. Ensaio de Lowry adaptado para detecção de papaína nas amostras de NCB

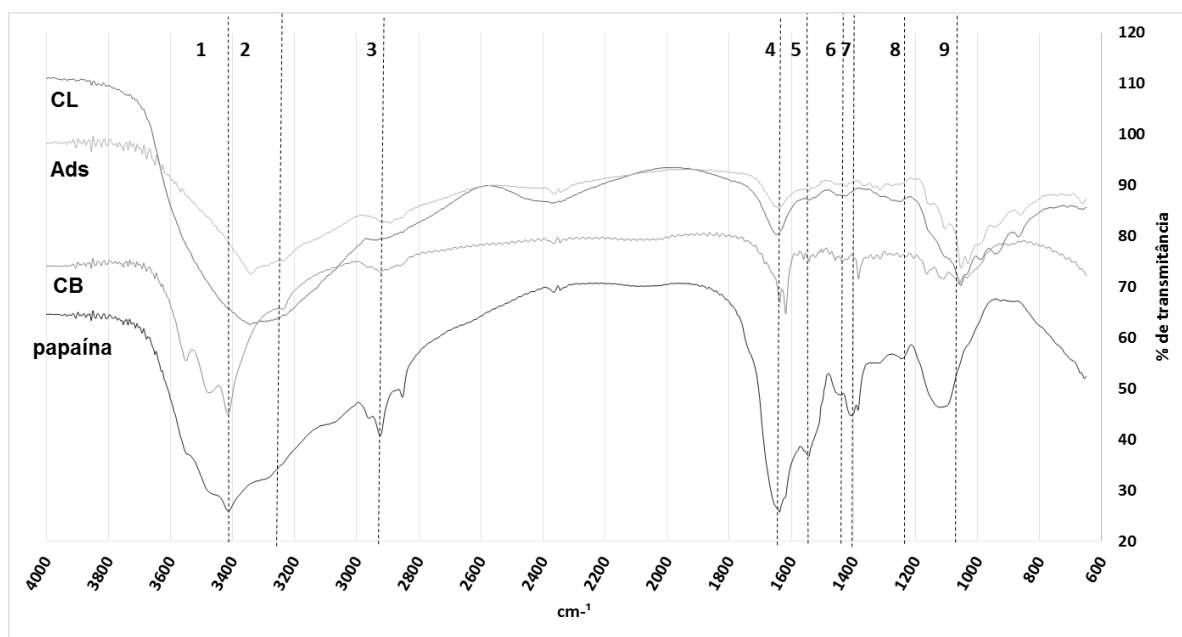


Nota: **BSA**: controle positivo (albumina de soro bovino); **(-)**: NCB pura liofilizada; **Ads**: NCB-papaína imobilizada por adsorção; **CL**: papaína imobilizada por reticulação.

Como pode ser observado, nas cavidades contendo NCB-papaína foi confirmado a presença de papaína. Comparando as amostras imobilizadas por adsorção e reticulação, percebe-se que a reticulação apresentou uma coloração azul esverdeada mais intensa, o que sugere maior quantidade de proteínas imobilizadas. É importante notar que o controle negativo (NCB pura) não acusou traços de proteínas, atestado pela manutenção da cor amarela e a confirmação que o processo de purificação da CB foi efetivo na remoção das células e seus debrís contendo proteínas.

Visando obter informação molecular estrutural e dados sobre a composição química e grupos funcionais na NCB, NCB-papaína e papaína livre, foram realizadas análises de espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) (Figura 20).

Figura 20. Espectros de análise FTIR das NCBs e papaína



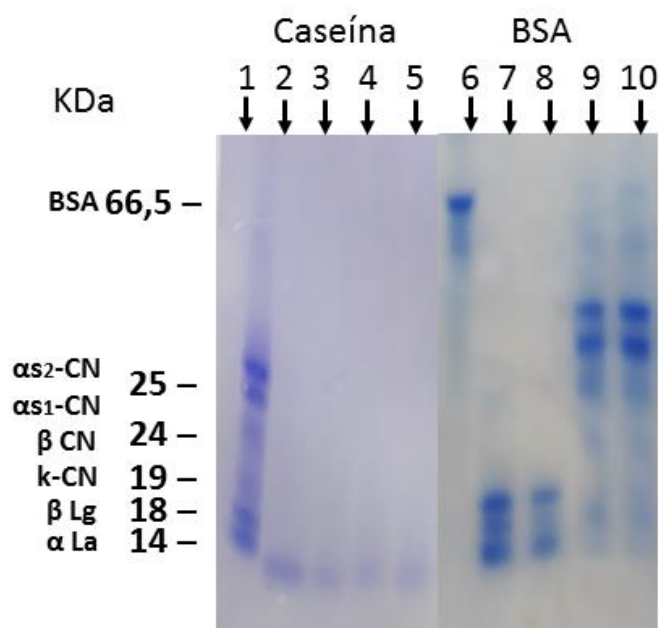
Nota: **CB**: NCB pura, **Ads**: NCB-papaína imobilizada por adsorção, **CL**: NCB-papaína imobilizada por reticulação, e papaína livre. Os espectros foram obtidos pela técnica de pastilha em KBr.

As bandas entre $3450\text{-}3225\text{ cm}^{-1}$ (faixas pontilhadas 1 e 2) são correspondentes aos estiramentos das ligações O-H da celulose I (MOHARRAM; MAHMOUD, 2008), do glutaraldeído (PATRO; WAGNER, 2016) e dos estiramentos das ligações N-H de uma amina secundária (SHARMA et al., 2011). O decréscimo no

estiramento de O-H para as papaínas imobilizadas podem ser atribuídos pela formação de ligações de hidrogênio entre os grupos OH da celulose com os grupos NH_2 da papaína (ATAIDE et al., 2017). A banda próxima a 2900 cm^{-1} (faixa 3) corresponde ao estiramento assimétrico do grupo CH_2 (PERES et al., 2015; TIBONI, 2011). A banda entre $1600\text{-}1700\text{ cm}^{-1}$ (faixa 4) corresponde a vibração de estiramento das ligações $\text{C}=\text{O}$ presentes nas aminas I (BAI et al., 2013) e no glutaraldeído (PATRO; WAGNER, 2016), e do estiramento do OH da absorção de água pela NCB (GEA et al., 2011; MOHARRAM; MAHMOUD, 2008). Como pode ser observado, tanto a papaína pura quanto as NCB-papaínas apresentam um único pico em torno de 1640 cm^{-1} , enquanto a NCB apresentou dois picos finos entre 1647 e 1616 cm^{-1} . O pico situado entre $1480\text{-}1575\text{ cm}^{-1}$ (faixa 5) é característico dos estiramentos das ligações C-N da amida II (BAI et al., 2013). Em $1340\text{-}1430\text{ cm}^{-1}$ (faixas 6 e 7) ocorrem os picos típicos da papaína pura (ZHANG et al., 2016). A amina alifática (1236 cm^{-1}) (ATAIDE et al., 2017) foi observado em 1238 cm^{-1} (faixa 8), tanto para a papaína quanto para NCB-papaína. Por fim, os picos em $1150\text{-}1050\text{ cm}^{-1}$ são atribuídos aos estiramentos CO (TIBONI, 2011) e do C-S do sulfeto (SHARMA et al., 2011).

O perfil de hidrólise de proteínas (caseína e BSA) utilizando as papaínas imobilizadas foi analisado por eletroforese em gel de poliacrilamida sob condições desnaturantes (SDS-PAGE) (Figura 21).

Figura 21. Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) de caseína e BSA digeridos com papaína immobilizada em NCB



Nota: **Linha 1:** reação controle com caseína, **Linha 2 e 3:** hidrólise de caseína por NCB-papaína immobilizada por adsorção durante 15 e 30 min, respectivamente; **Linha 4 e 5:** hidrólise de caseína por NCB-papaína immobilizada por reticulação durante 15 e 30 min, respectivamente; **Linha 6:** reação controle com BSA, **Linha 7 e 8:** hidrólise de BSA por NCB-papaína immobilizada por adsorção durante 15 e 30 min, respectivamente; **Linha 9 e 10:** hidrólise de BSA por NCB-papaína immobilizada por reticulação durante 15 e 30 min, respectivamente. Condições de hidrólise: 400 µL de solução de substrato 1 mg/mL em tampão de atividade (caseína ou BSA) digeridos com 10 mg de NCB-papaína a 40°C, 120 rpm durante 15 e 30 min.

Na linha 1 pode-se observar o perfil das frações da caseína: α-caseína, β-caseína, k-caseína, β-lactoglobulina e α-lactoalbumina. A hidrólise da caseína por NCB-papaína immobilizada por adsorção e reticulação (Linha 2 e 3: hidrólise de caseína por NCB-papaína immobilizada por adsorção durante 15 e 30 min, respectivamente; Linha 4 e 5: hidrólise de caseína por NCB-papaína immobilizada por reticulação durante 15 e 30 min, respectivamente) resultou em hidrolisados com massas molares inferiores a 14 KDa nos dois tempos analisados, confirmando, portanto, sua ação sobre as frações da caseína.

Com o substrato BSA (66,5 KDa) verifica-se nas linhas 7 e 8 os perfis de hidrólise com papaína immobilizada por adsorção em ambos os tempos (15 e 30 min) teve como produto fragmentos inferiores a 18 KDa, com três faixas bem distintas. Já a hidrólise do BSA pela papaína immobilizada por reticulação levou a obtenção de hidrolisados com massas molares superiores a 25 KDa, também com três faixas

distintas. Ocorre que a plasticidade conformacional dos resíduos do sítio ativo da enzima conjuntamente com a flexibilidade de conformação do substrato possibilitam certa permissividade de reconhecimento do substrato (HSU et al., 2008). Como o processo de reticulação com glutaraldeído pode promover a rigidez conformacional da enzima, se ligar ao seu sítio ativo ou mesmo bloqueá-lo (XU et al., 2018), provavelmente ocorreu uma modificação nos sítios de reconhecimento do substrato pela enzima, o que explicaria a papaína imobilizada por reticulação ter gerado três faixas de fragmentos de massas moleculares superiores às geradas pela papaína imobilizada por adsorção.

Em um estudo sobre a hidrólise enzimática da caseína do leite de cabra, LIRA et al. (2010) obtiveram alta eficiência de hidrólise com o uso de pepsina, com hidrolisados de massa molar inferior a 14,4 KDa. Já com o uso de papaína e tripsina a eficiência de hidrólise se mostrou mais baixa. MIYAGUCHI et al. (2001), em uma pesquisa sobre o aumento da digestibilidade de BSA por meio de tratamento químico, relataram a degradação parcial do BSA nativo com o uso de pepsina, pancreatina e tripsina. Sendo a pepsina a enzima mais efetiva na hidrólise do BSA, levando a obtenção de hidrolisados com massa molecular inferior a 20 KDa.

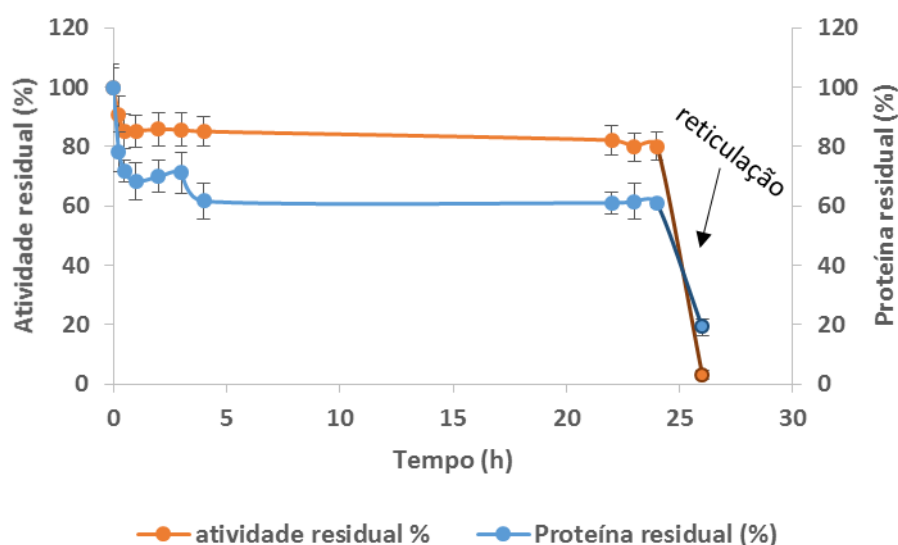
5.3.2 Estudos de imobilização de papaína em membranas de NCB hidratadas

O efeito do tempo de adsorção na imobilização de papaína em matriz de NCB foi avaliado em termos de retenção de atividade e de proteínas. Neste ensaio, buscou-se determinar o tempo de imobilização onde a atividade e a concentração de proteínas residual fosse constante. Isto é, o tempo necessário para o máximo de adsorção de enzimas e retenção de atividade pela matriz. Este ensaio permitiu determinar tanto o tempo ótimo para imobilização como o cálculo do parâmetro de eficiência de imobilização (E), que é a razão entre a atividade inicial e final do sobrenadante.

Como pode ser observado na Figura 22, a taxa residual de proteínas e atividade vai diminuindo gradualmente ao longo do tempo, chegando quase a seu máximo em 4 h. Após este período, aproximadamente 62-63% de proteínas permanecem na solução sendo mantidos 84-85% da atividade residual no sobrenadante, não apresentando mudanças significativas. Isso provavelmente se

deve ao fato de que o espaço de adsorção da rede de nanofibrilas da NCB já estivesse quase totalmente ocupado após o período de incubação de 4 h (CHEN; ZOU; HONG, 2015). Porém, a estabilização completa só vem a ser atingida após um período de 23 h, confirmando que o tempo previamente estabelecido de 24 h de incubação é apropriado para a imobilização, garantindo o tempo necessário para a penetração e difusão da enzima na trama interna da NCB.

Figura 22. Cinética de imobilização de papaína em membrana de NCB hidratada.



Nota: NCBs ($4,3 \pm 0,3$ g) incubadas a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ em 5mL solução de papaína 5 mg/mL sob agitação de 150 rpm durante 24 h. Após 24 h foi acrescentado glutaraldeído ao sobrenadante e incubado a $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 2 h para promover a reticulação da enzima. Atividade residual da solução sobrenadante medida com azocaseína em banho-maria a $40\text{ }^{\circ}\text{C}$, por 20 min.

Após o período de incubação de 24 h para a cinética de imobilização por adsorção, foi acrescentado o glutaraldeído ao sobrenadante e a mistura foi incubada por mais 2 h, para avaliar a cinética de imobilização por reticulação. O resultado é apresentado na mesma Figura 24, sendo o último ponto das curvas o período de reticulação. Como pode ser observado, após a incubação com o agente reticulante ocorre forte decréscimo da quantidade de proteínas e atividade no sobrenadante, com 3 e 29%, respectivamente. Esta discrepância apresentada entre o teor residual de proteínas e atividade provavelmente esteja relacionada ao fato de o glutaraldeído promover a inativação parcial da enzima (XU et al., 2018).

Estes resultados são consistentes com os apresentados pela literatura. Chen, Zou e Hong (2015), em um estudo sobre imobilização de lacase em matriz de NCB previamente liofilizada, obtiveram resultados semelhantes. Após 4 h de incubação a taxa de adsorção da enzima ($34,7\% \pm 1,5$) e atividade da lacase imobilizada em U/g NCB ($4,8 \pm 0,2$ U), se manteve constante. Em outro trabalho, Ataide et al. (2017), em um estudo sobre carregamento de bromelina em matriz de NCB hidratada, também obtiveram resultados semelhantes, com incorporação de enzimas quase máxima em 4 h de incubação.

5.3.3 Influência do pH de imobilização da papaína em NCB

A eficiência de retenção de papaína em diferentes pHs foi avaliada em termos da medida de proteínas através do método de Bradford, com o pH variando entre 4 e 8, tanto para as técnicas de imobilização por adsorção quanto reticulação. Como pode ser observado na Tabela 6, em pH 5 houve máximo de adsorção com 44,2 % utilizando membranas hidratadas. Embora pareça haver diferenças entre os resultados obtidos, pela análise de variância simples (com 95 % de confiança) constata-se que os mesmos não diferem significativamente entre si. Na Tabela 7 são apresentados os dados da análise de variância, com valor de $p > 0,005$ e valor de $F_{2,5}$ menor que o $F_{5\%}$ tabelado ($F_{2,5} = 5,786$), confirmando a similaridade entre as amostras.

Tabela 6 - Percentual de proteínas imobilizadas pela técnica de adsorção em diferentes faixas de pH

pH	4,0	5,0	6,0	7,0	8,0
% Ptn Ads	$41,96 \pm 1,74$	$44,24 \pm 5,42$	$37,44 \pm 1,83$	$35,05 \pm 3,08$	$37,35 \pm 6,21$

Nota: Resultados apresentados como média e desvio padrão.

%Ptn Ads: % de proteína imobilizadas por adsorção.

Tabela 7 - Análise de variância do ensaio de melhor faixa de pH para imobilização de proteínas por adsorção.

Fonte	GL	SQ (Aj.)	QM (Aj.)	Valor F	Valor P
Ensaio	5	198,3	39,67	1,55	0,235
Erro	15	384,8	25,66		
Total	20	583,2			

Nota: GL: graus de liberdade; SQ: soma quadrática; QM: média quadrática.

É fato que o pH quando deslocado do ponto isoelétrico (PI) do adsorbato e do adsorvente torna os mesmos carregados eletrostaticamente, contribuindo para a interação de adsorção (KOTEL'NIKOVA; MIKHAILOVA; VLASOVA, 2007). Cahyaningrum et al. (2013), em um estudo sobre imobilização de papaína em esferas de quitosana conjugada com íons metálicos, obtiveram melhor taxa de adsorção em pH 8, um pouco abaixo do ponto isoelétrico da papaína, o qual se situa em 8,75. No presente trabalho, porém, não se atinge uma faixa de pH ótima determinada, muito provavelmente em razão de a enzima utilizada ser a papaína bruta, composta por uma variedade de enzimas e outras proteínas (ORTIZ et al., 1980), cujos PIs são muito variáveis. Por exemplo, enquanto a papaína apresenta PI de 8,75, como já citado, a caricaina e a endo- β -1,3-glucanase exibem PI de 11,7 e 5,8-6,2, respectivamente (BUTTLE, 2011; .; MARU; ISHIHARA, 1990).

Os resultados para a papaína imobilizada por reticulação são exibidos na Tabela 8, no qual é observado que maior taxa de imobilização ocorre no pH 5, com 88,99% de proteínas imobilizadas. No entanto, assim como ocorreu no ensaio imobilização de papaína por adsorção, estatisticamente (análise de variância simples com 95 % de confiança) essa diferença é puramente aparente. Na Tabela 9 são apresentados os dados da análise de variância, com valor de $p > 0,005$ e valor de $F_{2,4}$ menor que o $F_{5\%}$ tabelado ($F_{2,5} = 6,944$), confirmando a similaridade entre as amostras.

Tabela 8 - Percentual de proteínas imobilizadas pela técnica de reticulação (CL) em diferentes faixas de pH.

pH	4	5	6	7	8
% Ptn CL	66,81 ± 8,97	88,99 ± 7,59	87,74 ± 11,62	78,06 ± 1,69	82,03 ± 1,13

Nota: Resultados expressos como média e desvio padrão.
%Ptn CL: % de proteína imobilizadas por reticulação.

Tabela 9 - Análise de variância do ensaio de melhor faixa de pH para imobilização de proteínas por reticulação.

Fonte	GL	SQ (Aj.)	QM (Aj.)	Valor F	Valor P
Ensaio	45	959,3	239,3	2,88	0,08
Erro	10	832,3	83,23		
Total	14	1791,6			

Nota: GL: graus de liberdade; SQ: soma quadrática; QM: média quadrática.

Quando comparada com papaína imobilizada por adsorção, em termos de rendimento de proteínas imobilizadas (%), a papaína imobilizada por reticulação apresenta-se bastante superior, contrapondo, nas melhores condições, 89,98% contra 44,2 % por papaína imobilizada por adsorção. Ocorre que a combinação das técnicas de aprisionamento e reticulação promovem um aumento na eficiência de imobilização de enzimas e evitam a fuga de enzimas da matriz (SUKRI; MUNAIM, 2017).

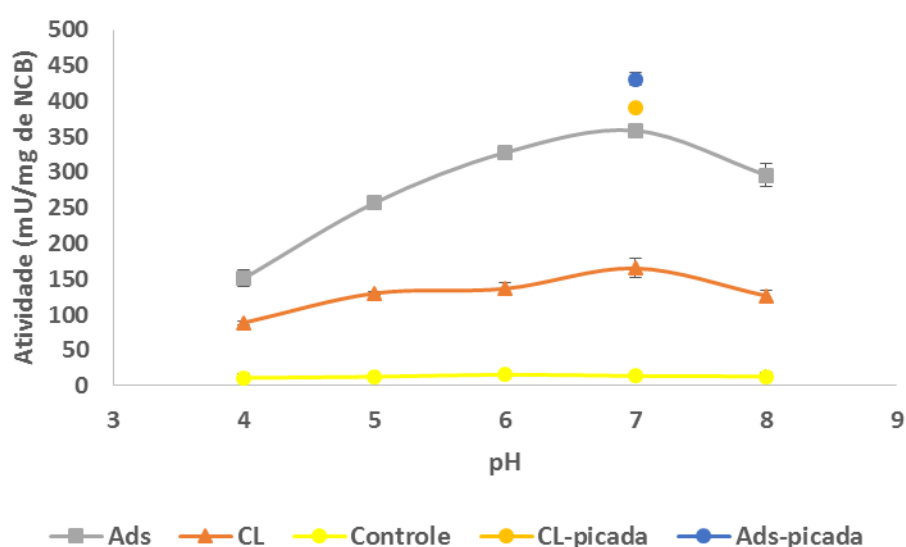
No entanto, é importante observar que o método Bradford por si só não é suficiente para avaliar a eficiência de imobilização em diferentes pHs. Isso porque o método quantifica proteínas presentes em geral, tanto enzimas como outras proteínas, e enzimas ativas mas também inativas (PESARAN; AMOABEDINY; YAZDIAN, 2015).

De modo a confirmar a melhor faixa de pH para imobilização de papaína em matriz de NCB, procedeu-se ainda o teste em termos de atividade enzimática utilizando azocaseína como substrato.

Conforme a Figura 23, constata-se que, contrariando o resultado aparente da quantificação de proteína adsorvida, a melhor faixa de pH para imobilização enzimática, para ambas as técnicas é o pH 7,0. De acordo com a análise de variância simples, o pH de imobilização influi de maneira significativa o rendimento de atividade

da enzima imobilizada. Como se observa nos Tabela 10, os valores P para papaína imobilizada por adsorção e reticulação foram menores que 0,001; e o valor $F_{7,2}$ (70,22) e $F_{5,2}$ foram maiores que os $F_{5\%}$ tabelados (4,737 e 5,786, para papaína imobilizada por adsorção e reticulação, respectivamente). O que denota que em ambos experimentos houve pelo menos dois ensaios que apresentaram diferenças significativas entre si.

Figura 23. Atividade enzimática de papaína imobilizada em diferentes pHs



Nota: **Ads**: papaína imobilizada por adsorção; **CL**: papaína imobilizada por reticulação; **controle**: NCB pura; **CL-picada**: papaína imobilizada por reticulação picada; **Ads-picada**: papaína imobilizada por adsorção picada. Ensaio de atividade com azocaseína em banho-maria a 40 °C durante 20 min.

Tabela 10 - Análise de variância do teste de atividade para o ensaio de melhor faixa de pH para imobilização de papaína por adsorção (Ads) e reticulação (CL).

Técnica	Fonte	GL	SQ (Aj.)	QM (Aj.)	Valor F	Valor P
Ads	Ensaio	5	135989	27197,8	186,82	< 0,001
	Erro	12	1747	145,6		
	Total	15	137736			
CL	Ensaio	5	179477	35895,3	411,90	< 0,001
	Erro	12	1046	87,1		
	Total	17	180522			

Nota: GL: graus de liberdade; SQ: soma quadrática; QM: média quadrática.

Pelo teste de Tukey (Anexo B), para papaína imobilizada por adsorção os pHs de imobilização 6 e 8, e 6 e 7 não apresentaram diferenças significativas entre si. Para a papaína imobilizada por reticulação (Anexo C), as condições 5, 6 e 8 não apresentaram diferenças significativas entre si. Assim sendo, tem-se que a melhor faixa de pH para imobilização de papaína por adsorção e reticulação situa-se em 6-7 e 7, respectivamente. Desta forma, próximo a um pH neutro.

Semelhante resultado foi obtido por Ding et al. (2003), em um estudo de imobilização de papaína em um polímero macroporoso, onde obtiveram maior atividade em pH 7,5. Uma menor atividade observada em pHs mais altos ou mais baixos pode, provavelmente, estar ligada a alterações na conformação da enzima, de importância vital para a sua atividade. Além disso, é importante salientar que o pH ótimo de imobilização também é afetado pelo tipo de matriz empregada (BUSSAMARA et al., 2012).

Outro aspecto importante a abordar é a questão da atividade aparente, ou subestimada, e a atividade real.

Como ficou demonstrado no gráfico da Figura 23, a papaína imobilizada tanto por adsorção quanto por reticulação exibiram atividade consideravelmente maior quando a membrana de NCB-papaína foi picada (mesma massa, a nível de comparação) (Figura 23). Isso representa um aumento de 20,2 % e de 136,7 % em comparação com papaína imobilizada por adsorção e reticulação, respectivamente, com membranas inteiras de NCB-papaína.

Esta diferença de eficiência apresentada pode ser explicada pela resistência à transferência de massa. Quando a enzima se encontra em seu estado livre, ela tem acesso facilitado ao substrato. Porém, a enzima quando associada a uma matriz (no caso a rede porosa de NCB) pode apresentar maior resistência à difusão do substrato dificultando que enzima acesse o substrato como anteriormente. Ao contrário, quando a matriz (NCB) se apresenta em pedaços menores (neste caso, picada) maior é a área superficial de contato substrato/enzima e menor é o obstáculo para a difusão do substrato (CHEN; ZOU; HONG, 2015).

A retenção de atividade de papaína imobilizada por adsorção e reticulação, quando em peças inteiras, foram de 39,53 e 8,79%, respectivamente. Em contrapartida, quando o ensaio de atividade é realizado com as membranas picadas, a retenção de atividade de papaína imobilizada por adsorção e reticulação são de 46,1

e 18,75 %, respectivamente (no Tabela 11 são apresentados os dados de eficiência de atividade e imobilização).

Tabela 11 - Eficiência de imobilização de papaína pela técnica de adsorção (Ads) e reticulação (CL)

Imobilização (pH 7)	$P_{\%}$	mU/mgNCB	R (%)	E(%)	mgE/mgNCB
Ads	35,05 ± 3,08	358,36 ± 6,02	39,53 ± 0,92	36,53 ± 4,79	0,080 ± 0,009
Ads-p	35,05 ± 3,08	430,70 ± 9,12	46,10 ± 1,07	36,53 ± 4,79	0,080 ± 0,009
CL	78,06 ± 1,69	164,96 ± 13,50	8,79 ± 0,72	86,63 ± 4,88	0,175 ± 0,013
CL-p	78,06 ± 1,69	390,40 ± 3,92	18,75 ± 0,27	86,63 ± 4,88	0,175 ± 0,013

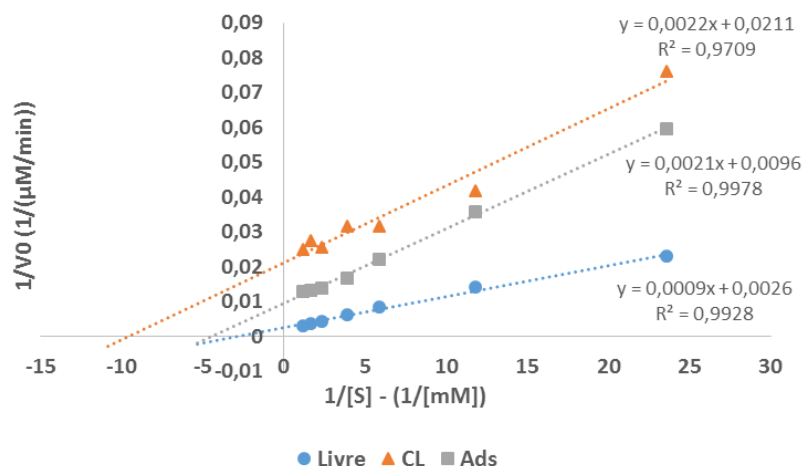
Nota: $P_{\%}$) percentual de enzima imobilizada; mU/mgNCB) atividade (mU) por mg de NCB-papaína; R(%) retenção de atividade; E(%) eficiência de imobilização; e mgE/mgNCB) mg de enzima imobilizada por mg de NCB.

De modo a validar esses resultados, foram feitos controles utilizando membranas de NCB imersas em tampões com pH de 4 a 8, sob as mesmas condições de imobilização, para proceder os ensaios de atividade. A atividade média obtida dos controles foi de 13,3 mU/mg de papaína imobilizada, o que afasta a hipótese de degradação do substrato.

5.4 Determinação dos parâmetros cinéticos

A cinética da papaína livre e imobilizada foi realizada através da proteólise da azocaseína em diferentes concentrações. A partir dos resultados obtidos foi construído um gráfico duplo-recíproco de Lineweaver-Burk (Figura 24) para determinar os parâmetros cinéticos K_m e V_{max} .

Figura 24. Gráfico duplo-recíproco de Lineweaver-Burk



Nota: Ensaio realizado com azocaseína (1-20 g/L), pH 7,0 sob agitação 120 rpm a 40 °C durante por 4 min.

Na Tabela 12 são apresentados os resultados. Como se pode observar, o K_m para papaína livre, papaína imobilizada por adsorção e reticulação foram 0,35, 0,22 e 0,19 mM, respectivamente. Já o V_{max} foram 384,62, 104,17 e 47,39 $\mu\text{M}/\text{min}$ para papaína livre, papaína imobilizada por adsorção e reticulação, respectivamente.

Tabela 12 - Parâmetros cinéticos para papaína livre e imobilizada por papaína imobilizada por adsorção e reticulação.

Papaína	K_m (mM)	V_{max} ($\mu\text{M}/\text{min}$)	R^2
Livre	0,35	384,62	0,9928
Adsorção	0,22	104,17	0,9978
Reticulação	0,19	47,39	0,9709

Nota: K_m : valor máximo da velocidade inicial; V_{max} : constante de Michaelis.

A constante cinética K_m tem dois significados. No primeiro, K_m representa a concentração de substrato na qual metade dos sítios ativos encontram-se ocupados. Ou seja, K_m é uma medida de concentração de substrato necessária para ocorrência de catálise expressiva. No segundo, K_m é uma medida de afinidade que a enzima apresenta por um determinado substrato, onde um menor valor de K_m denota uma

maior afinidade ao substrato. Já a velocidade máxima (V_{max}), é a taxa máxima com que uma enzima catalisa uma reação (BERG, J. M.; TYMOCZKO, J. L.; STRYER, L., 2014; SAMPAIO et al., 2016). Sendo o K_m igual à concentração de substrato que produz a metade de V_{max} e as papaínas imobilizadas apresentaram K_m e V_{max} significativamente mais baixos que a papaína livre, observa-se neste caso específico que o K_m das papaínas imobilizadas está relacionada ao conceito de catálise no sentido que as papaínas imobilizadas precisaram de uma menor concentração de substrato para terem todos os seus sítios ativos ocupados do que a papaína livre. Possíveis causas para isso são impedimento estérico, resistência à difusão do substrato e inativação parcial das enzimas por parte do agente reticulante (HOMAEI; SAMARI, 2017; XU et al., 2018); este último explicaria a razão de a papaína imobilizada por reticulação apresentar K_m e V_{max} menores do que a papaína imobilizada por adsorção.

Os resultados reportados na literatura são diversos entre si. Por exemplo, Zhang et al. (2016), obtiveram K_m menor e V_{max} maior para papaína livre quando comparada a papaína imobilizada em matriz nanoestruturada, tendo por substrato a caseína. Homaei e Samari (2017), reportaram resultados semelhantes ao estudo citado de Zhang et al. (2016), utilizando papaína imobilizada em nanotubos de carbono, e caseína como substrato. Por outro lado, Metin e Alver, (2016), obtiveram K_m e V_{max} maiores para papaína livre do que para papaína imobilizada em compósito de quitosana, utilizando L-arginina etil éster N-benzoil (BAEE) como substrato.

Homaei e Samari (2017) atribuem como possível causa de um k_m menor o impedimento estérico do sítio ativo ou a resistência à difusão do substrato. Já a ocorrência de uma velocidade máxima (V_{max}) menor para a enzima imobilizada, Metin e Alver, (2016) atribuem como causa a perda de atividade da enzima após a imobilização.

5.5 Avaliação das condições ótimas de atividade da NCB-papaína

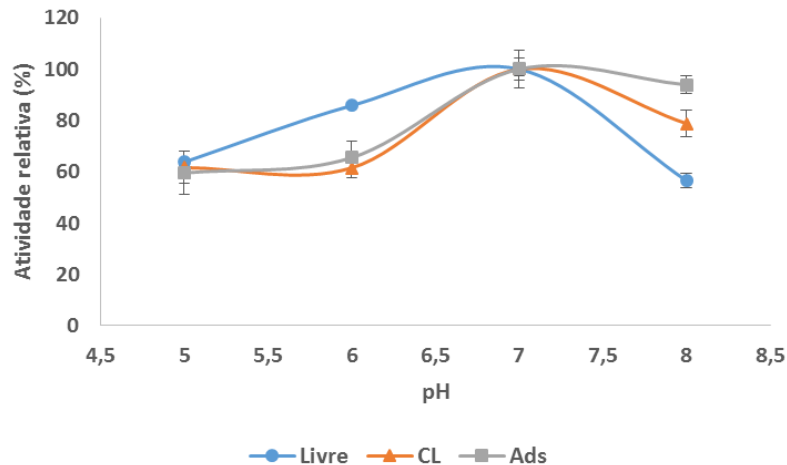
Os ensaios de avaliação das condições ótimas de reação de atividade da papaína livre e imobilizada foram realizados de acordo com a metodologia empregada para teste de atividade, utilizando a azocaseína como substrato, como já descrita

anteriormente. Nesse item, os resultados foram expressos em termos de atividade relativa (%), como comumente são apresentados na literatura, considerando o máximo de atividade como 100 % (HOMAEI et al., 2010; NIE, HUA-LI; ZHU, 2007; SUN et al., 2012).

5.5.1 Determinação do efeito do pH na atividade enzimática

O efeito do pH do meio sobre a atividade da papaína livre e imobilizada foi analisado na faixa de 5-8, à temperatura de 40 °C por 20 min. Na Figura 25 são apresentados os resultados, onde se observa que a atividade máxima utilizando azocaseína em todos os casos ocorre em pH 7,0.

Figura 25. Efeito do pH do meio reacional na atividade enzimática



Nota: **Ads**: papaína imobilizada por adsorção; **CL**: papaína imobilizada por reticulação; e **Li**: papaína livre. Ensaios de atividade realizados com azocaseína em tampão citrato 0,1 M (pH 4,0) e fosfato 0,1 M (pH 6,0, 7,0 e 8,0), sem agitação, a 40 °C, 20 min.

Em pH 6,0 a papaína livre exibiu melhor performance em relação as papaínas imobilizadas, ao passo que em pH 8 sua atividade tende a diminuir. Por outro lado, a papaína imobilizada por adsorção e reticulação tiveram maior estabilidade em meio alcalino (pH 8), apresentando 94% e 79 % de atividade, respectivamente. Estes

resultados são consistentes com alguns apresentados na literatura. Em um estudo sobre imobilização de papaína em carvão ativado, Sun et al. (2012) obtiveram, em consonância com a presente pesquisa, maior estabilidade da papaína imobilizada em pH alcalino, sendo 6,5 o pH ótimo para ambas as condições. Outro exemplo é o trabalho de Mosafa, Moghadam e Shahedi (2013), o qual apresenta resultados similares para papaína imobilizada em nanopartículas magnéticas, com valores de pH ótimo de 6 e 7 para papaína livre e imobilizada, respectivamente.

Esta influência do pH sobre a atividade ocorre em razão da dependência da estrutura terciária da enzima em relação ao pH, onde extremos de pH podem vir a desnaturá-la. No caso específico da papaína, em seu estado livre ela apresenta maior resistência a condições ácidas, de forma que não ocorre mudanças conformacionais (SUN et al., 2012). Por outro lado, quando imobilizada, a enzima geralmente adquire maior estabilidade, podendo a mesma ser deslocada para um pH maior ou menor a depender da interação iônica entre a enzima e a superfície da matriz. No presente estudo, uma possível explicação se correlaciona aos grupos hidroxila da NBC, que poderiam atrair mais íons hidrogênio da solução de reação, fazendo com que a enzima imobilizada fique num ambiente com pH mais baixo no suporte de NCB do que no meio reacional, levando a uma maior tolerância a meios mais alcalinos (CHEN; ZOU; HONG, 2015).

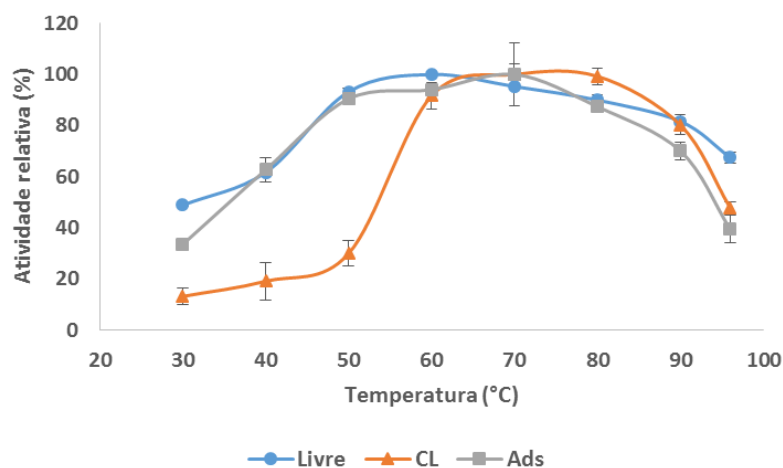
Um aspecto a se observar é a maior estabilidade da papaína imobilizada por adsorção em pH alcalino, quando comparado com a papaína imobilizada por reticulação. Tal resultado contradiz outros estudos que comparam ambos os métodos a imobilização por reticulação apresenta maior estabilidade, pois a ligação covalente pode reduzir a flexibilidade conformacional da enzima e, conseqüentemente, levar a mudança de pH ótimo e estabilidade a uma mais ampla faixa de pH (WANG et al., 2013).

5.5.2 Efeito da temperatura na atividade enzimática

O efeito da temperatura sobre a atividade da papaína imobilizada foi investigado na faixa de temperatura compreendida entre 30°C e 96°C, no pH 7. Na

Figura 26 se observa a grande influência da temperatura sobre a atividade, a qual aumenta em função do aumento da temperatura até os 70°C.

Figura 26. Efeito da temperatura na atividade enzimática



Nota: **Ads**: papaína immobilizada por adsorção; **CL**: papaína immobilizada por reticulação; e **Li**: papaína livre. Ensaios realizados com temperaturas variando entre 30 e 96 °C, utilizando azocaseína como substrato, sem agitação durante 20 min.

A papaína livre e a papaína immobilizada por adsorção apresentam uma linha ascendente similar, conforme a temperatura aumenta, com grande incremento de atividade. Por outro lado, a papaína immobilizada por reticulação exibe um aumento menos pronunciado da atividade em função da temperatura, até atingir 50°C, ponto em que sua atividade aumente, indo de 30% para 91%. Este fenômeno pode ser explicado pelo aumento do impedimento estérico promovido pelas ligações cruzadas das moléculas de papaína na superfície do suporte resultantes do uso do agente reticulante (glutaraldeído), o que vem a interferir o acesso do substrato ao sítio ativo da enzima (NAJIHAH; MOHD; WAHAB, 2017). E, possivelmente, com o aumento de temperatura o processo de difusão seja ampliado, afetando o índice de atividade.

A atividade máxima da papaína livre ocorreu a 60°C, ao passo que a papaína immobilizada por adsorção e reticulação tiveram maior valor a 70°C. Este deslocamento de temperatura ótima sugere uma melhora na resistência térmica da papaína immobilizada, o que pode estar relacionado a mudanças físicas e químicas da enzima

imobilizada (CHEN; ZOU; HONG, 2015). A partir de 80°C, ocorre o decaimento da atividade em todas as formas da papaína.

5.6 Ensaio de Estabilidade

Os ensaios de estabilidade da papaína imobilizada foram realizados de acordo com a metodologia empregada para teste de atividade, tendo como substrato a azocaseína, como explicitado no item 4.6. Neste item, os resultados foram expressos em termos de atividade relativa (%), como comumente são apresentados na literatura, considerando o máximo de atividade como 100 % (HOMAEI et al., 2010; NIE, HUA-LI; ZHU, 2007; SUN et al., 2012)

5.6.1 Estabilidade ao pH

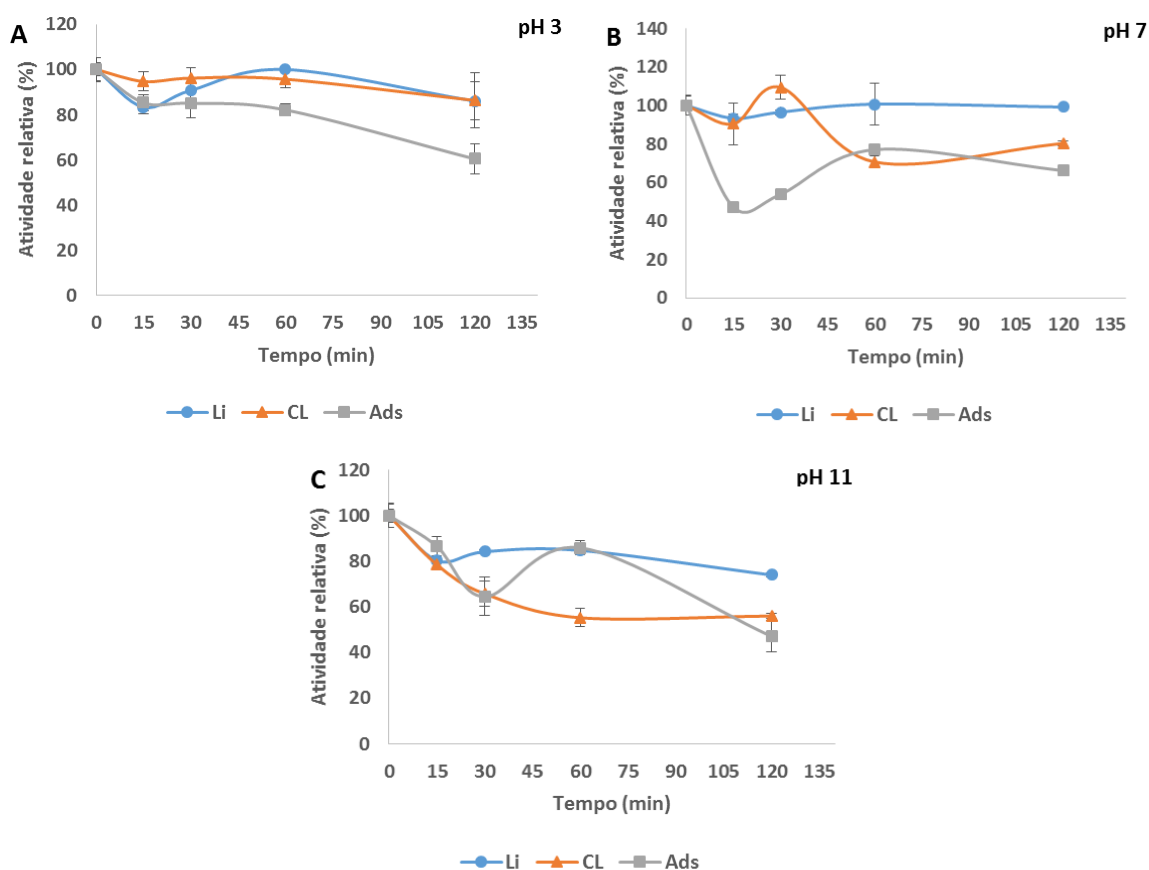
Na Figura 27 são apresentados os resultados de estabilidade da papaína livre e imobilizada previamente incubadas em diferentes faixas de pH em diversos tempos até 120 min. Na Figura 27a, como pode ser observado, a papaína livre e imobilizada por reticulação apresentam uma estabilidade semelhante em pH 3, com atividade remanescente de 86%, após 120 min. A papaína imobilizada por adsorção, por outro lado, exibiu menor estabilidade a pH 3, com 60% de atividade, após 120 min.

Na Figura 27b são apresentados os resultados da papaína livre e imobilizadas incubadas a pH 7. Nesta condição a papaína livre apresentou maior estabilidade do que a papaína imobilizada por adsorção e reticulação, com 99% de atividade remanescente após 120 min de incubação. A papaína imobilizada por adsorção e reticulação, por outro lado, após mesmo período de incubação, retiveram 66 e 80% de atividade, respectivamente.

Quando a papaína livre e imobilizadas foram incubadas em pH 11 (Figura 27c), novamente a papaína livre exibiu maior estabilidade do que as imobilizadas, com 74% de atividade residual, após 120 min de incubação. Já a papaína imobilizada por

adsorção e reticulação mantiveram 47 e 56% de sua atividade original, respectivamente.

Figura 27. Estabilidade da papaína livre e imobilizada incubada em pH 3,0 (A), pH 7,0 (B) e 11,0 (C)



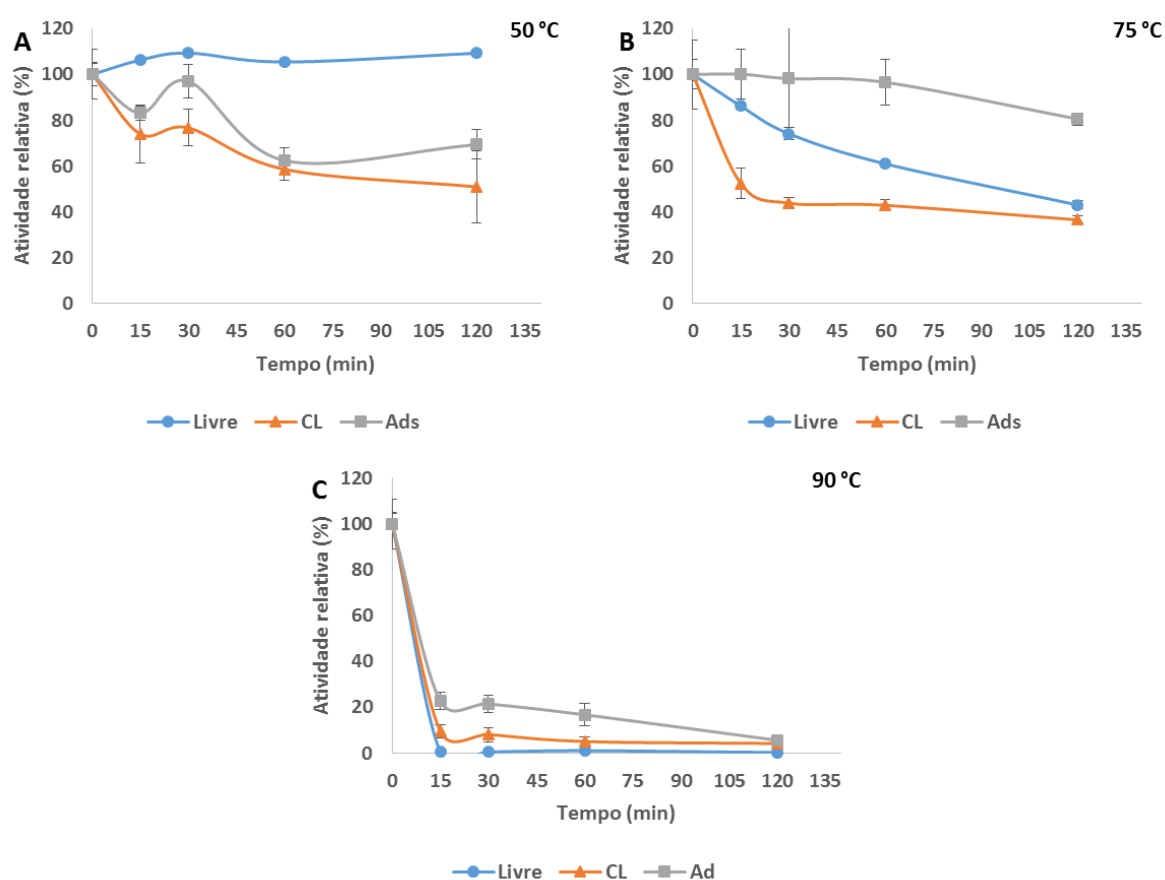
Nota: **Ads**: papaína imobilizada por adsorção; **CL**: papaína imobilizada por reticulação; e **Li**: papaína livre. Incubação prévia em tampão citrato (pH 3), tampão fosfato (pH 7) e tampão bicarbonato/NaOH (pH 11) em diferentes tempos, para realização subsequente dos ensaios de atividade com azocaseína a 40 °C, por 20 min, em pH 7.

Cutiño-Avila et al. (2014), em um estudo sobre imobilização de bromelina e papaína utilizando glicoxi-sepharose como suporte, obtiveram resultados distintos para pHs extremos. Utilizando N-benzoil-DL-arginina p-nitroanilida como substrato, a papaína imobilizada se mostrou muito mais estável do que a papaína livre, após incubação de 120 min. Quando incubada a pH 7,0 a papaína livre demonstrou maior atividade residual do que a enzima imobilizada como nesse trabalho.

5.6.2 Estabilidade térmica

A estabilidade térmica da papaína livre e imobilizada foi investigada por meio de sua pré-incubação nas temperaturas de 50, 75 e 90 °C por até 120 min. Os resultados são apresentados na Figuras 28.

Figura 28. Estabilidade térmica a 50 °C (A), 75 °C (B) e 90 °C (C).



Nota: **Ads**: papaína imobilizada por adsorção; **CL**: papaína imobilizada por reticulação; e **Li**: papaína livre. Incubação prévia nas temperaturas de 50°C (A), 75°C (B) e 90°C (C) em tampão fosfato pH 7,0 em diferentes tempos. Após foram realizados ensaios de atividade com azocaseína a 40 °C, por 20 min.

Quando incubadas a 50°C, foi verificado que a papaína livre apresentou maior estabilidade em relação a papaína imobilizada por adsorção e reticulação, chegando inclusive a exibir um aumento de atividade da ordem de 9% (Figura 28a). Em contrapartida, a papaína imobilizada por adsorção e reticulação apresentaram um

decaimento apreciável em sua atividade. Após 120 min, a papaína immobilizada por adsorção e reticulação tiveram suas atividades reduzidas a 70 e 51%.

Após incubação a 75°C a papaína livre apresentou um decaimento mais acentuado em sua atividade, com 43% de atividade remanescente após 120 min (Figura 28b). A atividade da papaína immobilizada por reticulação decaiu para 53% após 15 min e, ao final de 2 h, conservou 37%. Já a papaína immobilizada por adsorção apresentou maior estabilidade. Enquanto a 50 °C sua atividade remanescente foi de 70%, após incubação a 75 °C durante 2 h a atividade foi de 81%.

Com relação à pré-incubação a 90 °C (Figura 28c), após 15 min a papaína livre sofreu inativação quase completa, apresentando 0,4% de atividade remanescente. Por outro lado, a papaína immobilizada por adsorção e reticulação, após 15 min, ainda conservaram 23% e 9,5% de atividade, respectivamente. E, após 120 min, a papaína immobilizada por adsorção e reticulação apresentaram 5,6 e 4,2%, respectivamente.

Em termos gerais, considerando temperaturas mais elevadas, a papaína immobilizada por ambas as técnicas exibiu maior estabilidade térmica do que a papaína livre. Sobretudo a papaína immobilizada por adsorção, a qual, em termos absolutos, exibiu maior atividade remanescente a 75°C e 90°C, quando comparada as demais. Esta maior estabilidade pode estar relacionada a mudanças no microambiente no qual a enzima está confinada após a imobilização (WANG; SHAO, 2018), à diminuição da autólise da enzima fixada à matriz e à rigidez conformacional da enzima como resultado da sua ligação ao suporte AFAQ; IQBAL, 2001).

Esta maior estabilidade térmica da enzima immobilizada foi observada em outros trabalhos. Afaq e Iqbal (2001), em um estudo sobre imobilização de papaína em sefarose quelante, obtiveram 87% de atividade remanescente (medida com substrato caseína) após 1 h de incubação a 65 °C. Em outro trabalho, Wang e Shao (2018) imobilizaram papaína em microesferas magnéticas de alginato poroso, a qual reteve 32% de atividade (medida com substrato caseína) após 10 h de incubação a 60 °C.

5.6.3 Estabilidade a solventes

Enzimas, na qualidade de catalisadores altamente específicos e que tipicamente operam em condições reacionais suaves, são de grande interesse na química sintética, em especial na síntese de fármacos. No entanto, muitos compostos orgânicos utilizados nessas reações são instáveis e/ou insolúveis em água. O que é um grande inconveniente para o emprego de enzimas, pois a presença de solventes pode interferir na atividade e estabilidade da enzima (OGINO; ISHIKAWA, 2001).

Uma das características dos solventes que afetam a atividade das enzimas é expresso pelo seu valor log P (coeficiente de partição do solvente em um sistema bifásico octanol/água). Os solventes hidrofílicos, quando em altas concentrações, podem levar à desativação enzimática, ao passo que os solventes apolares são mais compatíveis com enzimas, visto que, ao contrário dos polares, eles não têm a tendência de retirar a água de hidratação em contato com as enzimas (FELTES et al., 2011). Assim sendo, foram testados para a papaína livre e imobilizada quatro solventes, dois polares (etanol e DMSO) e dois apolares (clorofórmio e hexano).

Como se observa, após 1 h de incubação, a papaína livre se mostrou mais estável frente a todos os solventes, com exceção do DMSO, apresentado uma atividade residual de 6,2% (Tabela 13). Em contrapartida, a papaína imobilizada por adsorção e reticulação exibiram uma atividade residual frente ao DMSO de 12,3% e 6,4%, respectivamente.

Após 4 h de incubação, a papaína livre teve uma diminuição de atividade frente a todos os solventes enquanto papaína imobilizada nos dois métodos tem em alguns casos aumento de atividade. Imobilizada por adsorção teve um aumento com etanol, clorofórmio e hexano; enquanto a imobilizada por reticulação apresenta aumento para o etanol, DMSO e o hexano.

Tabela 13 - Estabilidade da papaína livre e imobilizada em solventes orgânicos.

Papaína	Solvente	Log P	Atividade Residual (%)		
			0 h	1 h	4 h
Livre	Etanol	-,24	100 ± 0,7	97,1 ± 2,5	85,6 ± 5,4
	DMSO	-1,3		6,2 ± 0,8	0,5 ± 0,3
	Clorofórmio	2		90,8 ± 0,9	78,0 ± 1,1
	Hexano	3,5		97,9 ± 0,2	83,7 ± 0,9
Adsorção	Etanol	-,24	100 ± 4,8	78,2 ± 2,7	96,4 ± 2,7
	DMSO	-1,3		12,3 ± 2,1	7,6 ± 2,9
	Clorofórmio	2		65,3 ± 3,8	84,6 ± 6
	Hexano	3,5		74,8 ± 0,5	92,3 ± 6
Reticulação	Etanol	-,24	100 ± 2,3	48,0 ± 3,6	58,8 ± 3
	DMSO	-1,3		6,4 ± 1,5	35,2 ± 5
	Clorofórmio	2		62,2 ± 2,5	49,5 ± 1,7
	Hexano	3,5		49,8 ± 7,2	92,3 ± 6,2

Nota: A atividade da enzima não incubação foi considerada 100%. Condições de incubação: NCB-papaína ou papaína livre incubadas em 2 mL de cada solvente a 40 °C, sob condição estática. Condições de reação: Ensaio de atividade com azocaseína a 40 °C, por 20 min.

Llerena-Suster et al. (2012), em um estudo sobre a estrutura e a atividade da papaína em meios orgânicos miscíveis aquosos, obtiveram após tempos de incubação de 1 e 24 h, forte decaimento da atividade (caseína como substrato) frente ao metanol, ao passo que não houve decaimento significativo frente a acetonitrila. Em um trabalho sobre imobilização de protease alcalina de *Bacillus sp.* em nanoesferas de sílica, Ibrahim et al. (2016) obtiveram um grande aumento na estabilidade da enzima imobilizada frente a vários solventes. Frente a etanol e clorofórmio, por exemplo, a enzima imobilizada teve um acréscimo em sua estabilidade em torno de 1,8 vezes.

5.6.4 Estabilidade a metais

Na tabela 14 são apresentados os resultados do efeito de metais bivalentes a diferentes concentrações sobre a atividade da papaína livre e imobilizada. Como pode ser observado, Mg^{2+} produziu um efeito ativador na papaína livre e imobilizada por reticulação, sendo mais pronunciado em 1 e 10 mM, e apresentado um efeito inibidor para a papaína imobilizada por reticulação a 20 mM, sendo reduzida a sua atividade em 21 %. Para a papaína imobilizada por adsorção o efeito foi inverso, produzindo uma inibição mais pronunciada a 1 mM e diminuindo a inibição a concentrações mais altas.

Tabela 14 - Efeito de vários metais em diferentes concentrações sobre a atividade da papaína livre e imobilizada

íon metálico (mM)	Atividade relativa (%)		
	Papaína livre	Adsorção	Reticulação
Controle	100,0 ± 2,13	100,0 ± 5,0	100,0 ± 4,3
Mg^{2+}			
1	107,2 ± 3,5	83,7 ± 9,9	101,3 ± 8,8
10	104,9 ± 2,0	88,4 ± 7,7	116,2 ± 3,1
20	103,1 ± 2,8	90,3 ± 13,2	79,1 ± 7,2
Mn^{2+}			
1	150,8 ± 1,3	115,6 ± 10,3	80,2 ± 1,3
10	122,0 ± 2,8	114,6 ± 9,1	78,2 ± 12,7
20	118,8 ± 1,9	96,6 ± 5,4	86,8 ± 3,4
Cu^{2+}			
1	121,2 ± 11,0	102,5 ± 12,3	100,1 ± 4,0
10	22,0 ± 1,2	16,2 ± 1,5	29,3 ± 0,5
20	12,9 ± 0,3	13,4 ± 0,3	29,5 ± 0,2
Zn^{2+}			
1	69,8 ± 0,6	65,1 ± 14,1	56,4 ± 0,8
10	15,3 ± 0,5	21,3 ± 2,2	34,5 ± 3,4
20	12,9 ± 0,1	16,2 ± 0,5	34,2 ± 3,1

Nota: A enzima não incubada com metais foi considerada atividade de 100%. Condições de incubação: NCB-papaína ou papaína livre incubadas com íons metálicos nas concentrações de 1, 10 e 20 mM à temperatura ambiente por 1 h, sob condição estática. Condições de reação: Ensaio de atividade com azocaseína a 40 °C, por 20 min.

Para papaína livre e imobilizada por adsorção, Mn^{2+} teve efeito ativador mais forte a baixas concentrações e menor a altas concentrações, aumentando a atividade da papaína livre e imobilizada por adsorção em 50,8 e 15,6%, respectivamente, na concentração de 1 mM. Por outro lado, a para papaína imobilizada por reticulação Mg^{2+} exerceu efeito inibidor, tendo reduzido a sua atividade a 80% a 1 mM.

Cu^{2+} e Zn^{2+} exerceram efeito inibidor para a papaína livre, imobilizada por adsorção e reticulação, sendo mais pronunciado para a papaína livre e menos para a papaína imobilizada por reticulação. A 20 mM de Cu^{2+} e Zn^{2+} , a papaína imobilizada por reticulação apresentou atividade de 29,5 e 34,2%, respectivamente, enquanto que a papaína imobilizada por adsorção conservou 13,4 e 16,2% de sua atividade para Cu^{2+} e Zn^{2+} .

Estes resultados concordam parcialmente com os obtidos por Homaei et al. (2014), no qual a papaína foi imobilizada em nanobastões de ouro. Para Cu^{2+} e Zn^{2+} , os autores obtiveram resultados semelhantes aos apresentados neste trabalho, com forte inibição para a enzima livre, e menor para a imobilizada. Quanto a Mg^{2+} e Mn^{2+} , os autores também obtiveram menor inibição para a enzima imobilizada, ao contrário dos resultados aqui apresentados.

Borkar (2018), em um estudo sobre imobilização de protease alcalina de *Bacillus subtilis* em tri (4-formil fenoxi) cianurato, obteve efeito ativador para Mg^{2+} e nenhum efeito significativo para Cu^{2+} Zn^{2+} , empregando 5 mM de cada metal.

Ainda, outros estudos utilizando a papaína livre como biossensor para detecção de metais pesados tiveram resposta inibitória para metais bivalentes, como Cu^{2+} Zn^{2+} , sem, no entanto, apresentar qualquer efeito significativo para Mg^{2+} e Mn^{2+} (GUNASEKARAN; AHMAD; HALMI, 2015; SHUKOR et al., 2006).

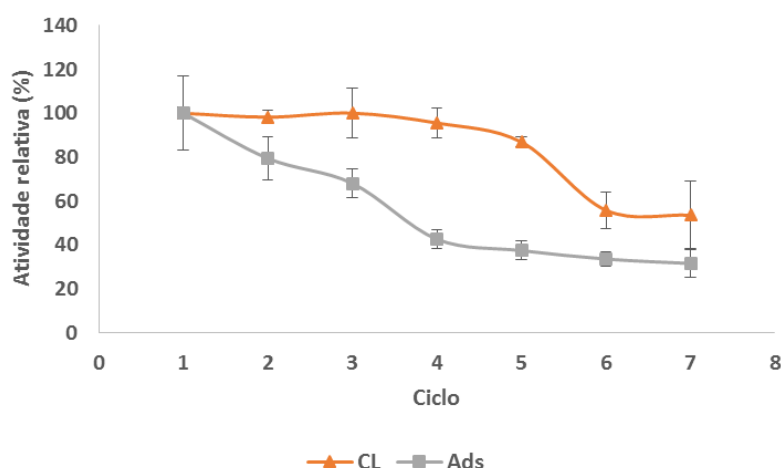
5.6.5 Estabilidade da papaína imobilizada em termos de reuso

A imobilização enzimática possibilita a sua reutilização, o que ajuda a diminuir custos operacionais e de produção, tornando viável o processo enzimático (YE et al., 2006). Para avaliar o reuso da papaína imobilizada, após cada ensaio as membranas foram lavadas para então serem utilizadas em um novo ciclo, sendo a água de

lavagem também avaliada entre os ensaios de atividade. Este processo foi repetido por sete ciclos.

A papaína immobilizada por reticulação manteve quase 100% de atividade após 4 ciclos de reuso (Figura 29). Após sete ciclos a reticulação manteve 53,5 % de atividade original, contra 31,6 % pela papaína immobilizada por adsorção. Esse menor valor provavelmente é resultante das interações fracas entre a enzima e a matriz, quando por adsorção, em contraposição a reticulação, que resulta em ligações covalentes mais estáveis, como já discutido (ARICA; ALTINTAS; BAYRAMOGLU, 2009; CHEN; ZOU; HONG, 2015).

Figura 29. Estabilidade de reuso da papaína immobilizada



Nota: **Ads**: papaína immobilizada por adsorção, **CL**: papaína immobilizada por reticulação. Ensaio de atividade realizado por sete ciclos com a mesma membrana de NCB. Ensaio de atividade com azocaseína a 40 °C, por 20 min.

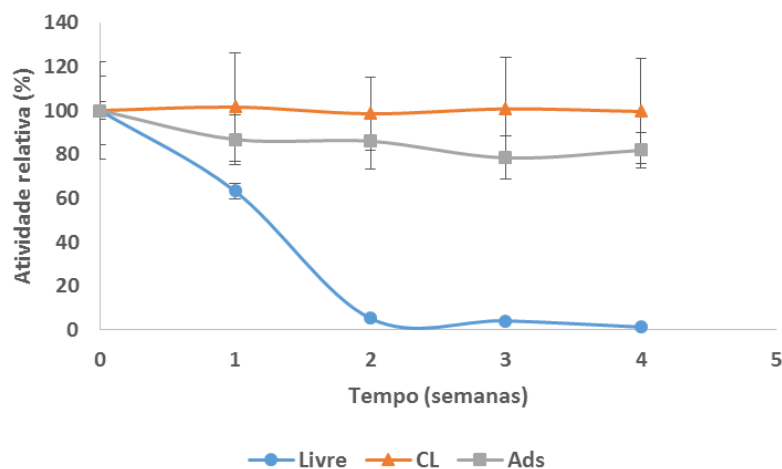
Uma das hipóteses levantada seria a perda de enzimas entre os ciclos no caso da adsorção (CHEN; ZOU; HONG, 2015). Ao se realizar o ensaio de atividade à água de lavagem das membranas, as absorbâncias obtidas foram todas muito próximas de zero, tanto para papaína immobilizada por adsorção como para reticulação. Isso, por si só, não significa que não haja fuga de enzima da matriz, podendo as mesmas estarem presentes na solução em seu estado inativo. As possíveis causas para o decréscimo de atividade podem estar relacionadas à autólise, desnaturação e fuga de enzimas da matriz (CHEN; ZOU; HONG, 2015; MOSAFA; MOGHADAM; SHAHEDI, 2013; SEABRA; GIL, 2007).

Comparando os resultados com outros trabalhos, a imobilização de papaína em matriz de NCB mostrou-se promissora e de grande viabilidade. Moreno-cortez et al. (2015), em um estudo sobre imobilização por reticulação de papaína em membranas de nanofibras de PVA, após seis ciclos obtiveram uma atividade remanescente de 12 %. Noutro estudo, no qual papaína foi imobilizada em nanopartículas magnetizadas, Mosafa, Moghadam e Shahedi (2013) alcançaram após seis ciclos atividade remanescente de 75,15 %. Já em se tratando de imobilização enzimática em matriz de NCB, Chen, Zou e Hong (2015), trabalhando com a enzima lacase, após sete ciclos a enzima imobilizada reteve 69 e 23 % da atividade original pelos métodos de adsorção e reticulação com glutaraldeído, respectivamente.

5.6.6 Estabilidade de estocagem

A avaliação de estabilidade de estocagem da papaína livre e imobilizada foi realizada a 28 °C, por 4 semanas. Na Figura 30 é apresentado o gráfico com os resultados, no qual pode-se observar que, após 2 semanas, a papaína livre havia perdido em torno de 95% de sua atividade, e veio a ser praticamente inativada após 4 semanas. Em contrapartida, após 4 semanas a papaína imobilizada por adsorção manteve 80% de sua atividade, e por reticulação teve a sua atividade praticamente inalterada.

Figura 30. Estabilidade de estocagem da papaína livre e imobilizada por adsorção (Ads) reticulação (CL).



Nota: **Ads**: papaína imobilizada por adsorção; **CL**: papaína imobilizada por reticulação; e **Li**: papaína livre. Estocagem a 28 °C por 4 semanas. Condições de reação: Ensaio de atividade com azocaseína a 40 °C, por 20 min.

Estes resultados demonstram que a imobilização conferiu maior estabilidade à papaína, sobretudo por reticulação, a qual não apresentou decaimento apreciável de sua atividade após 4 semanas.

ZHANG et al. (2016), em um trabalho sobre síntese de nanocristais de celulose magnética e seu uso para imobilização de papaína, reportaram que após 15 dias de estocagem a papaína imobilizada reteve 92,3% de sua atividade (substrato caseína), contra 37,6% da papaína livre. Com papaína imobilizada em nanobastões de ouro, Homaei et al. (2014) obtiveram 80% de atividade (substrato caseína), após dois meses de estocagem a temperatura ambiente; já a papaína livre perdeu a sua atividade após 30 dias.

Já em se tratando de imobilização de enzimas em matriz de NCB, Frazão et al. (2014) tiveram como resultado 54% de atividade (substrato ABTS (ácido 2,2-azinobis-3-etilbenzotiazole-6-sulfonato)) remanescente para lipase imobilizada, estocada a 4 °C, por 42 dias. Para a lipase livre, sob as mesmas condições de estocagem, a atividade remanescente foi de 94%. O que sugere que a lipase imobilizada em NCB vem a ser menos estável que a lipase livre.

6 CONCLUSÕES

Através dos resultados obtidos se permite concluir que a membrana de nanocelulose bacteriana é um suporte viável para a imobilização de papaína. A papaína suportada manteve sua atividade proteolítica, com melhorias principalmente em relação a estabilidade térmica e frente a alguns solventes. A possibilidade de reuso também foi uma característica fundamental para sua potencial aplicação. Desta forma, pode-se afirmar que:

- Foram produzidas membranas de NCB utilizando glicerol loiro como principal fonte de carbono com um rendimento médio de 5 g de NCB por litro de meio de cultivo.
- NCB demonstrou ser um bom material a ser utilizado como matriz para imobilização de papaína pelas duas metodologias empregadas. Essa imobilização pode ser realizada com a membrana de NCB ainda hidratada, aproveitando assim ao máximo sua propriedade de atuar como um hidrogel na qual a papaína pode ser facilmente retida. Essa simples técnica dispensa qualquer tipo de tratamento ou modificação da NCB como a derivatização, por exemplo.
- O uso de glutaraldeído na imobilização apresentou maior percentual de papaína imobilizada do que por adsorção, porém sugere-se que o glutaraldeído possa ter causado inativação de uma fração da enzima imobilizada. O método de adsorção apresentou maior retenção da atividade de forma geral.
- A condições de atividade da NCB-papaína não tiveram mudança acentuada em relação com a enzima livre em termos de pH ótimo (pH 7,0) e temperatura ótima (~70°C).
- A imobilização da papaína em NCB por adsorção conferiu maior resistência para a enzima frente incubação a temperatura de 75°C. Após 2 h de incubação,

a atividade residual medida foi de 81%, versus 43% remanescente da papaína livre.

- Com relação a estabilidade após 4h de incubação em solventes, a papaína imobilizada por adsorção mostrou-se mais estável que a papaína livre. A imobilizada por reticulação foi mais estável que a papaína livre em DMSO (atividade residual de 35,2% versus 0,5% para a livre) com alta atividade residual frente ao hexano (92,3%).
- A papaína imobilizada por adsorção e reticulação apresentaram maior estabilidade do que a papaína livre quando na presença de Cu^{2+} e Zn^{2+} .
- Quanto ao reuso, após sete ciclos reacionais, papaína imobilizada por reticulação e adsorção preservaram 53,5% e 31,6 % de sua atividade original, respectivamente. Isso possibilita a aplicação da membrana em processos contínuos. A papaína imobilizada por reticulação manteve quase 100% de atividade após 4 ciclos de reuso.
- Após quatro semanas de armazenamento a 28°C as papaínas imobilizadas mantiveram entre 80-95% de sua atividade original, ao passo que a papaína livre perdeu mais de 90% de sua atividade após duas semanas nessa temperatura.

7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Avaliar o uso potencial da papaína imobilizada como curativos para feridas e queimaduras com ação desbridante e cicatrizante;
- Otimizar os parâmetros de imobilização;
- Para o seu uso como curativos, avaliar a concentração ótima da papaína como agente desbridante;
- Realizar estudo sobre ação antimicrobiana da papaína imobilizada;

BIBLIOGRAFIA

ADLER-NISSEN, J. Proteases. **Enzymes in Food Processing** n. category 3, p. 159–203 , 1993.

AFAQ, S.; IQBAL, J. Immobilization and stabilization of papain on chelating sepharose: a metal chelate regenerable carrier. **Electronic journal of biotechnology**, v. 4, n. 3, p. 32–36, 2001.

ALGIERI, C.; DONATO, L.; GIORNO, L. Tyrosinase immobilized on a hydrophobic membrane. **Biotechnology and Applied Biochemistry** v. 64, n. 1, p. 92–99 , 2017.

AMRI, E; MAMBOYA, F. Papain, a plant enzyme of biological importance: A review. **American Journal of Biochemistry and Biotechnology** v. 8, n. 2, p. 99–104 , 2012.

ARICA, M. Y.; ALTINTAS, B.; BAYRAMOGLU, G. Bioresource Technology Immobilization of laccase onto spacer-arm attached non-porous poly (GMA / EGDMA) beads : Application for textile dye degradation. **Bioresource Technology** v. 100, p. 665–669 , 2009.

AROLA, S. et al. Immobilization – stabilization of proteins on nanofibrillated cellulose derivatives and their bioactive film formation. **Biomacromolecules**v. 13, p. 594–603, 2012.

ARROYO, M. Inmovilización de enzimas: fundamentos, métodos y aplicaciones. **Ars pharmaceutica**, v. 39, n. 2, p. 23–39, 1998.

ATAIDE, J. A. *et al.* Bacterial nanocellulose loaded with bromelain : assessment of antimicrobial , antioxidant and physical-chemical properties. **Scientific reports**,. v. 7, p. 2–10, 2017.

AZARKAN, M. et al. Fractionation and purification of the enzymes stored in the latex of carica papaya. **Journal of chromatography b: analytical technologies in the biomedical and life sciences**, v. 790, n. 1–2, p. 229–238, 2003.

BAI, Z. et al. Partitioning behavior of papain in ionic liquids-based aqueous two-phase systems. **Journal of chemistry**, 2013.

BEKHIT, A. A. et al. Exogenous Proteases for Meat Tenderization. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 54, n. 8, p. 1012–1031 , 2014.

BERG, J. M.; TYMOCZKO, J. L.; STRYER, L. **Bioquímica**. 7 ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan LTDA, 2014.

BHATTACHARYYA, A. et al. Removal of mercury (II) from aqueous solution using papain immobilized on alginate bead: Optimization of immobilization condition and modeling of removal study. **Bioresource Technology** v. 101, n. 24, p. 9421–9428.

BIBI, Z.; QADER, S. A. U.; AMAN, A. Calcium alginate matrix increases the stability and recycling capability of immobilized endo- β -1,4-xylanase from *Geobacillus stearothermophilus* kibge-ib29. **Extremophiles**, v. 19, n. 4, p. 819–827, 2015.

BORELLA, J. C.; PÁDUA, M.; STEVANATO, M. C. B. Estudo comparativo para avaliação da qualidade de amostras de papaína comercializadas por empresas fornecedoras de insumos farmacêuticos do estado de são paulo. **Electronic Journal of Pharmacy**, v. 12, n. 4, p. 24-31, 2015.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, v. 72, n. 1–2, p. 248–254, 1976.

BRENA, B. M.; BATISTA-VIERA, F. Immobilization of enzymes. In: Guisan, Jose M. (Ed). **Methods in biotechnology: immobilization of enzymes and cells**. 2 Ed. Humana Press Inc., 2006.

BUSSAMARA, R. et al. Optimal conditions for continuous immobilization of *Pseudozyma hubeiensis* (Strain HB85A) lipase by adsorption in a packed-bed reactor by response surface methodology. **Enzyme Research** v. 2012 , 2012.

BUTTLE D. J. Caricain. In: Rawlings I. D.; Salvesen G. (Ed). **Handbook of Proteolytic Enzymes**. 3. ed. Academic Press, 2013.

CAHYANINGRUM, S.E. et al. Preparation and properties of papain immobilized onto metal ions *crosslinked* chitosan beads. **Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences** v. 4, n. 4 , 2013.

CAI, Q. et al. Enhanced activity and stability of industrial lipases immobilized onto spherelike bacterial cellulose. **International journal of biological macromolecules**,

v. 109, p. 1174–1181, 2018.

CALL, H. P.; MÜCKE, I. History, overview and applications of mediated lignolytic systems, especially laccase-mediator-systems (lignozym®-process). *Journal of biotechnology*. **Journal of Biotechnology**, v. 53, n. 2-3, p. 163-202, 1997.

CASTRO, C. et al. Structural characterization of bacterial cellulose produced by *gluconacetobacter swingsii* sp. from colombian agroindustrial wastes. **Carbohydrate polymers**, v. 84, n. 1, p. 96–102, 2011.

CHANALIA, P. et al. Applications of microbial proteases in pharmaceutical industry. **Reviews in Medical Microbiology** v. 22, n. 4, p. 96–101 , 2011.

CHANG, W.-S. W. et al. Lysosomal cysteine proteinase cathepsin s as a potential target for anti-cancer therapy. **Journal of cancer molecules**, v. 3, n. 1, p. 5–14, 2007.

CHARNEY, J.; TOMARELLI, R.M. A colorimetric method for the determination of the proteolytic activity of duodenal juice. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 171, n. 2, p. 501–505, 1947

CHÁVEZ-PACHECO, J. L. et al. Celulosa bacteriana en *gluconacetobacter xylinum*: biosíntesis y aplicaciones. **Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas**, v. 7, n. 1, p.18-25, 2004.

CHAWLA, P. R. et al. Microbial Cellulose: Fermentative Production and Applications. **Food Technol. Biotechnol**, v. 47, n. 2, p. 107–124, 2009.

CHEN, L.; ZOU, M.; HONG F. F. HONG. Evaluation of Fungal Laccase Immobilized on Natural Nanostructured Bacterial Cellulose. v. 6, p. 1–10 , nov. 2015.

CHUKWUEMEKA, O.; ANTHONIA, A. B. Antifungal effects of pawpaw seed extracts and papain on post harvest *Carica papaya* L . fruit rot. **Journal of Agricultural Research** v. 5, n. 12, p. 1531–1535 , 2010.

CLARK, A. C. Caspase allostery and conformational selection. **Chemical reviews**, v. 116, n. 11, p. 6666-6706, 2016.

CLASEN, C. et al. Effects of different drying processes on the material properties of

bacterial cellulose membranes. 2006, [S.l.: s.n.], 2006. p.48–58.

COELHO, Diego F. et al. Azocasein Substrate for Determination of Proteolytic Activity: Reexamining a Traditional Method Using Bromelain Samples. **BioMed Research International** v. 2016, 2016.

COSTA, F. F. et al. Microfluidic chip electrophoresis investigation of major milk proteins: study of buffer effects and quantitative approaching. **Analytical methods**, v. 6, n. 6, p. 1666–1673, 2014.

CUTIÑO-AVILA, B. et al. Computer-aided design of bromelain and papain covalent immobilization. **Revista colombiana de biotecnología**, v. 16, n. 1, p. 19–28, 2014.

CYNTHYA, M; PRABHAWATHI, V; MUKESH, D. Papain Immobilized Polyurethane Film as Antimicrobial Food Package. v. 8, n. 12, p. 1279–1282 , 2014.

DANESI, Eliane Dalva Godoy; WOSIACKI, Gilvan. Otimização da produção de nata (celulose bacteriana) por fermentação em superfície. **Ciência e Tecnologia de Alimentos** v. 18, n. 1, p. 131–139 , jan. 1998.

DICKINSON, D. P. Cysteine peptidases of mammals: their biological roles and potential effects in the oral cavity and other tissues in health and disease. **Critical reviews in oral biology and medicine**, v. 13, n. 3, p. 238-275, 2002.

DING, Liang et al. Study on Papain Immobilization on a Macroporous. **Turkish Journal of Chemistry** v. 27, p. 627–637 , 2003.

DONINI, I. A. N. et al. Biossíntese e recentes avanços na produção de celulose bacteriana. **Eclética Química**, v. 35, n. 4, 2010.

DRENTH, J. et al. Structure of papain. **Nature**, v. 218, n. 5145, p. 929–932, 1968.

DROZD, R. et al. The application of magnetically modified bacterial cellulose for immobilization of laccase. **International journal of biological macromolecules**, v. 108, p. 462–470, 2018.

DUARTE, E. B. **Produção de nanocompósitos de celulose bacteriana e hidroxiapatita como rota para valorização de resíduos agroindustriais**. 2014.

121 f. Tese (Doutorado em Engenharia e Ciências de Materiais) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2014.

DUFOUR, E. et al. Synthesis of amidrazones using an engineered papain nitrile hydratase. **FEBS Letters** v. 433, n. 1–2, p. 78–82 , 1998.

DUTTA, S. et al. Removal of mercury from its aqueous solution using charcoal-immobilized papain (CIP). **Journal of Hazardous Materials** v. 172, n. 2–3, p. 888–896, 2009.

FELTES, M. M. C. et al. An Overview of Enzyme-catalyzed reactions and alternative feedstock for biodiesel production. In: MANZANERA, M. (Ed). **Alternative Fuel**. Intechopen, 2011.

FERNÁNDEZ-LUCAS, J.; CASTAÑEDA, D.; HORMIGO, D.. New trends for a classical enzyme: Papain, a biotechnological success story in the food industry. **Trends in Food Science and Technology** v. 68, p. 91–101 , ago. 2017.

FILSTOP. 2017. Disponível em: < <https://www.filstop.com/aroy-d-nata-de-coco-in-syrup-15oz.html>>. Acesso em: 22 março 2017.

FONTANA, J. D. et al. Acetobacter cellulosic biofilms search for new modulators of cellulogenesis and native membrane treatments. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 63–5, p. 327–338, 1997.

FRAZÃO, C. J. R. et al. Bacterial cellulose as carrier for immobilization of laccase : optimization and characterization. **Engineering in life sciences**, v. 14, p. 500–508, 2014

FREDDI, Giuliano; MOSSOTTI, Raffaella; INNOCENTI, Riccardo. Degumming of silk fabric with several proteases. **Journal of Biotechnology**, v. 106, n. 1, p. 101–112, 2003.

FRIEDMAN, M. Applications of the Ninhydrin Reaction for Analysis of Amino Acids , Peptides , and Proteins to Agricultural and Biomedical. **J. Agric. Food Chem.** n. 52, p. 385–406 , 2004.5105595777.

GEA, S. et al. Investigation into the structural, morphological, mechanical and thermal behaviour of bacterial cellulose after a two-step purification process. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 19, p. 9105–9110 , 2011.

GHOSH, S. Physicochemical and conformational studies of papain/sodium dodecyl sulfate system in aqueous medium. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 264, n. 1–3, p. 6–16 , 2005.

GONZÁLEZ-RÁBADE, N. *et al.* Production of plant proteases in vivo and in vitro — a review. **Biotechnology advances**, v. 29, n. 6, p. 983–996, 2011.

GOUDARZI, G. *et al.* Comparison of surface modification of wool fibres using pronase, trypsin, papain and pepsin. **Fibres and Textiles in Eastern Europe**, v. 16, n. 3, p. 90–92 , 2008.

GUNASEKARAN, B.; AHMAD, S. A.; HALMI, M. I. E. A rapid inhibitive enzyme assay for monitoring heavy metals pollution in a river running through a {unesco} heritage site. **Journal of biochemistry, microbiology and biotechnology**, v. 3, n. 2, p. 21–25, 2015.

GUO, Y. *et al.* Colorimetric detection of mercury, lead and copper ions simultaneously using protein-functionalized gold nanoparticles. **Biosensors and Bioelectronics** v. 26, n. 10, p. 4064–4069 , 2011.

HOMAEI, A. *et al.* Cysteine enhances activity and stability of immobilized papain. **Amino Acids** v. 38, n. 3, p. 937–942 , 2010.

HOMAEI, A. *et al.* Immobilized papain on gold nanorods as heterogeneous biocatalysts. **Amino acids**, v. 46, n. 7, p. 1649–1657, 2014.

HOMAEI, A.; SAMARI, F. Investigation of activity and stability of papain by adsorption on multi-wall carbon nanotubes. **International journal of biological macromolecules**, v. 105, p. 1630–1635, 2017.

HORTON, H. R. *et al.* **Principios de bioquímica**. 4. ed. México: Pearson Educación de México, 2008.

HSU, H. J. *et al.* Factor xa active site substrate specificity with substrate phage display and computational molecular modeling. **Journal of biological chemistry**, v. 283, n. 18, p. 12343–12353, 2008.

HUANG, X. J. *et al.* Immobilization of candida rugosa lipase on electrospun cellulose nanofiber membrane. **Journal of molecular catalysis b: enzymatic**, v. 70, n. 3–4, p. 95–100, 2011.

HUNG, B. et al. Utilization of Enzyme-Immobilized Mesoporous Silica Nanocontainers (IBN-4) in Prodrug-Activated Cancer Theranostics. **Nanomaterials** v. 5, n. 4, p. 2169–2191 , 2015.

IBRAHIM, A. S. S. et al. Enhancement of alkaline protease activity and stability via covalent immobilization onto hollow core-mesoporous shell silica nanospheres. **International journal of molecular sciences**, v. 17, n. 2, 2016.

JAGANNATH, A. et al. The effect of pH, sucrose and ammonium sulphate concentrations on the production of bacterial cellulose (Nata-de-coco) by *Acetobacter xylinum*. **World J Microbiol Biotechnol**, v. 24, p. 2593-2599, 2008.

JARAMILLO, L. R. et al. Efecto de diferentes concentraciones de fructosa sobre la producción de celulosa bacteriana en cultivo estático. **Revista colombiana de ciencia animal**, v. 5, n. 1, p. 116-130, 2013.

JOZALA, A. F. et al. Bacterial cellulose production by *Gluconacetobacter xylinus* by employing alternative culture media. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 99, n. 3, p. 1181–1190, 2014.

JOZALA, A. F. et al. Bacterial nanocellulose production and application: a 10-year overview. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 100, n. 5, p. 2063–2072 , 2016.

JOZALA, A. F.; NOVAES, L. C. de L.; LOPES, A. M. Produção de celulose bacteriana: uma nova tendência. **Microbiologia in foco**, ano 4, 2011.

JUNG, H. II et al. Influence of glycerol on production and structural-physical properties of cellulose from *Acetobacter* sp. V6 cultured in shake flasks. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 10, p. 3602–3608 , 2010.

KATCHALSKI-KATZIR, E. Immobilized enzymes - learning from past successes and failures. **Trends in biotechnology**, v. 11, n. 11, p. 471–478, 1993.

KARIMPIL, J. J.; MELO, J. S.; SOUZA, S. F. D. International journal of biological macromolecules immobilization of lipase on cotton cloth using the layer-by-layer self-assembly technique. **International journal of biological macromolecules**, v. 50, n. 1, p. 300–302, 2012.

KERR, B. J.; DOZIER III, W. A.; BREGENDAHL, K. Nutritional value of crude glycerin for nonruminants. In: Proceedings of 23rd Annual Carolina Swine Nutrition Conference, November 13, 2007, Raleigh, North Carolina. p. 6-18, 2007.

KESHK, S. M. A. S. Bacterial cellulose production and its industrial applications. **Bioprocessing & Biotechniques**, v. 4, n. 2, 2014.

KESHK, S. M.A.S.; SAMESHIMA, K. Evaluation of different carbon sources for bacterial cellulose production. **African Journal of Biotechnology**, v. 4, n. 6, p. 478-482, jun. 2005.

KHAPARDE, S. S.; SINGHAL, R. S. Chemically modified papain for applications in detergent formulations. **Bioresource Technology**, v. 78, n. 1, p. 1–4 , 2001.

KIM, J. H. et al. Alginate/bacterial cellulose nanocomposite beads prepared using *Gluconacetobacter xylinus* and their application in lipase immobilization. **Carbohydrate polymers**, v. 157, p. 137–145, 2017.

KIM, J. W. et al. **Method and apparatus for fractionating lignocellulose-based biomass**: Google Patents 2010. Disponível em: <<https://www.google.com/patents/US20100203605> >. Acesso em: 30 maio 2017.

KLEIN, M. et al. Glycerol metabolism and transport in yeast and fungi : established knowledge and ambiguities. **Environ microbiol**, v. 19, n. 3, p. 878–893, 2017.

KLEMM, Dieter et al. Bacterial synthesized cellulose - Artificial blood vessels for microsurgery. **Progress in Polymer Science (Oxford)** v. 26, n. 9, p. 1561–1603 , 2001.

KONNO, K. et al. Papain protects papaya trees from herbivorous insects: role of cysteine proteases in latex. **Plant journal**, v. 37, n. 3, p. 370–378, 2004.

KOSAKA, P. M. et al. Catalytic activity of lipase immobilized onto ultrathin films of cellulose esters. **Langmuir**,v. 23, p. 12167–12173, 2007.

KOTEL'NIKOVA, N. E.; MIKHAILOVA, S. A.; VLASOVA, E. N. Immobilization of proteolytic enzymes trypsin and α -chymotrypsin to cellulose matrix. **Russian Journal of Applied Chemistry** v. 80, n. 2, p. 322–329 , 2007.

KRUGER, N. J. The Bradford Method for Protein Quantitation. In: WALKER, J. M. (Org.). **The proteins protocols handbook**. 2. ed. New Jersey: Humana Press Inc, 2002.

KUMAR, S. et al. 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.

KUROSUMI, A. et al. Utilization of various fruit juices as carbon source for production of bacterial cellulose by *Acetobacter xylinum* NBRC 13693. **Carbohydrate Polymers**, v. 76, n. 2, p. 333–335, 2009.

LI, G. et al. Laccase-immobilized bacterial cellulose/tio₂functionalized composite membranes: evaluation for photo- and bio-catalytic dye degradation. **Journal of membrane science**, v. 525, n. November 2016, p. 89–98, 2017.

LIRA, T. B. F. et al. Avaliação de variáveis que influenciam a hidrólise enzimática da caseína do leite de cabra moxotó. **Pesquisa agropecuaria brasileira**, v. 45, n. 9, p. 1036–1043, 2010.

LLERENA-SUSTER, C. R. et al. Investigation of the structure and proteolytic activity of papain in aqueous miscible organic media. **Process biochemistry**, v. 47, n. 1, p. 47–56, 2012.

LYND, L. R. et al. Microbial Cellulose Utilization: Fundamentals and Biotechnology. **Microbiology and molecular biology reviews**, v. 66, n. 3, p. 506-577, set. 2002.

MACHADO, R. G. **Potencial de reparo cutâneo de células-tronco**. 2016. 139f. Dissertação. (Mestrado em Biologia Celular) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2016.

MADALOZZO, A. D. et al. Immobilization of lipc12, a new lipase obtained by metagenomics, and its application in the synthesis of biodiesel esters. **Journal of molecular catalysis b: enzymatic**, v. 116, p. 45–51, 2015.

MADKOUR, M. H. et al. Pha recovery from biomass. **Biomacromolecules**, v. 14, n. 9, p. 2963–2972, 2013.

MADRIGAL, L. et al. The dependence of crude papain yields on different collection (“tapping”) procedures for papaya latex. **Journal of the Science of Food and**

Agriculture, v. 31, n. 3, p. 279–285 , 1980.

MARTÍNEZ CUESTA, Sergio et al. The Classification and Evolution of Enzyme Function .**Biophysical Journal**, v. 109, n. 6, p. 1082-1086, 2015.

MASAOKA, S.; OHE, T.; SAKOTA, N. Production of cellulose from glucose by acetobacter xylinum. **Journal of fermentation and bioengineering**, v. 75, n. 1, p. 18–22, 1993.

MATHEWS, C. K.; HOLDE, K. E. V.; AHERN, K. G. **Bioquímica**. 3. ed. Madrid: Pearson Educación, 2002.

MAYORGA, M. A.; NARANJO, W. A. M. Aprovechamiento integral del glicerol residual en la industria del biodiesel: caso 1,3-propanodiol (1,3-pd). **Tecciencia**, v.6, n. 12, 2012.

METIN, A. Ü.; ALVER, E. Fibrous polymer-grafted chitosan/clay composite beads as a carrier for immobilization of papain and its usability for mercury elimination. **Bioprocess and biosystems engineering**, 2016. v. 39, n. 7, p. 1137–1149.

MIKKELSEN, D. et al. Influence of different carbon sources on bacterial cellulose production by *Gluconacetobacter xylinus* strain ATCC 53524. **Journal of Applied Microbiology**, v. 107, n. 2, p. 576–583 , 2009.

MISAS-VILLAMIL, J. C.; HOORN, R. A. L. VAN DER; DOEHLEMANN, G. Papain-like cysteine proteases as hubs in plant immunity. **New phytologist**, v. 212, n. 4, p. 902–907, 2016.

MITCHEL, R. E. J.; CHAIKEN, I. M.; SMITH, E. L. The complete amino acid sequence of papain. **J biol chem**, v. 245, n. 14, p. 3485–3492, 1970.

MIYAGUCHI, Y. et al. Improvement of digestibility of bovine serum albumin by chemical treatment and reduction in the antigenicity of the digests. **Food science and technology research**, 2001. v. 7, n. 2, p. 149–153.

MOHAMAD, N. R. et al. An overview of technologies for immobilization of enzymes and surface analysis techniques for immobilized enzymes. **Biotechnology and biotechnological equipment**, v. 29, n. 2, p. 205-220, 2015.

MOHARRAM, M. A.; MAHMOUD, Osama M. FTIR spectroscopic study of the effect of microwave heating on the transformation of cellulose I into cellulose II during mercerization. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 107, n. 1, p. 30–36, 2008.

MORENO-CORTEZ, Iván E. et al. Encapsulation and immobilization of papain in electrospun nanofibrous membranes of PVA *crosslinked* with glutaraldehyde vapor. **Materials science & engineering. C, Materials for biological applications** v. 52, p. 306–314, 2015.

MOSAFI, Leila; MOGHADAM, Majid; SHAHEDI, Mohammad. Papain enzyme supported on magnetic nanoparticles: Preparation, characterization and application in the fruit juice clarification. **Chinese Journal of Catalysis**, v. 34, n. 10, p. 1897–1904, 2013.

MOTA, C. J. A. E PESTANA, C. F. M. Co-produtos da produção de biodiesel. **Revista virtual de química**, v. 3, n. 5, p. 416–425, 2011.

MURTINHO, D. et al. Cellulose derivatives membranes as supports for immobilisation of enzymes. **Cellulose**, v. 5, n. 4, p. 299–308, 1998.

MÓTYÁN, J. A.; TÓZSÉR, F. T. And J. Research applications of proteolytic enzymes in molecular biology. **Biomolecules**, v. 3, p. 923–942, 2013.

NAJIHAH, Fathin; MOHD, Nor; WAHAB, Roswanira Abdul. Optimization parameters for lipase immobilization: effects of time, temperature and *crosslinker* concentration. **eProceedings Chemistry**, v. 2, p. 70–75, 2017.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. 6. ed. Rio Grande do Sul: Artmed, 2014.

NEVES, A.; MÜLLER, J. Use of enzymes in extraction of polyhydroxyalkanoates produced by *Cupriavidus necator*. **Biotechnology progress**, v. 28, n. 6, p. 1575–1580, 2012.

NIE, H. L.; CHEN, T. X.; ZHU, L. M. Adsorption of papain on dye affinity membranes: Isotherm, kinetic, and thermodynamic analysis. **Separation and Purification Technology**, v. 57, n. 1, p. 121–125, 2007.

NIE, H.L.; ZHU, L. M. Adsorption of papain with Cibacron Blue F3GA carrying chitosan-coated nylon affinity membranes. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 40, p. 261–267, 2007.

NITSAWANG, S.; HATTI-KAUL, R.; KANASAWUD, P.. Purification of papain from *Carica papaya* latex: Aqueous two-phase extraction versus two-step salt precipitation. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, n. 5, p. 1103–1107 , 2006.

OGINO, H.; ISHIKAWA, H. Enzymes which are stable in the presence of organic solvents. **Journal of bioscience and bioengineering**, v. 91, n. 2, p. 109-116, 2001.

ORTIZ, A. et al. The Storage and Drying Characteristics of Papaya (*Carica papaya* L.) Latex. **J. Sci. Food Agric.**, n. 31, p. 510-514, 1980.

OTTO, H.-H.; SCHIRMEISTER, T. Cysteine proteases and their inhibitors. **Chemical reviews**, v. 97, n. 1, p. 133–172, 1997.

PAGLIARO, M. et al. From glycerol to value-added products. **Angewandte chemie - international edition**, v. 46, n. 24, p. 4434–4440, 2007.

PAGLIARO, M.; ROSSI, M.; **The future of glycerol - new usages for a versatile raw material**. Cambridge: RSC Publishing, 2008.

PATRO, T. Umasankar; WAGNER, H. Daniel. Influence of graphene oxide incorporation and chemical *crosslinking* on structure and mechanical properties of layer-by-layer assembled poly(Vinyl alcohol)-Laponite free-standing films. **Journal of Polymer Science, Part B: Polymer Physics** v. 54, n. 22, p. 2377–2387 , 2016.

PEARSON, S. Poland invests in biotech infrastructure will it be enough for the industry to succeed? **Genetic Engineering & Biotechnology News**, abr 2013. Disponível em: <http://www.genengnews.com/gen-exclusives/poland-invests-in-biotech-infrastructure/77899795>>. Acesso em: 08 junho 2017.

PECORARO, E. et al. Bacterial Cellulose from *Glucanacetobacter xylinus*: Preparation, Properties and Applications. In: BELGACEM, Mohamed; GANDINI, Alessandro (Ed). **Monomers, Polymers and Composites from Renewable Resources**. 1. ed. Elsevier Science, 2008.

PERES, Rafael S. et al. Transport and antifouling properties of papain-based antifouling coatings. **Applied Surface Science** v. 341, p. 75–85 , 2015.

PESARAN, M; AMOABEDINY, G.; YAZDIAN, F. Effect of Cultivation Time and Medium Condition in Production of Bacterial Cellulose Nanofiber for Urease Immobilization. **International Journal of Polymer Science**, v. 2015 , 2015.

PETERSEN, N.; GATENHOLM, P. Bacterial cellulose-based materials and medical devices : current state and perspectives. **Appl microbiol biotechnol**, v. 91, n. 5, p. 1277–1286, 2011.

PINEDA, L. D. C.; MESA, L. A. C.; RIASCOS, C. A. M. Técnicas de fermentación y aplicaciones de la celulosa bacteriana: una revisión. **Ingeniería y Ciencia**, v. 8, n.16, p. 307–335, jul.-dez. 2012.

PINTO, C. A. S. O. **Estudo comparativo da estabilidade de formulações cosméticas contendo papaína livre e modificada**. 2005. 145f. (Mestrado em Fármaco e Medicamentos) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

POLAINA, J.; MACCABE, A. P. **Industrial enzymes: Structure, function and applications**. 1. Ed. Valencia: Springer, 2007.

POLETTI, M. et al. Ionic liquid-cellulose film for enzyme immobilization. **Process biochemistry**, v. 46, n. 6, p. 1375–1379, 2011.

RANDALL, Rose J; LEWIS, A. The folin by oliver. **Readings** v. 193, n. 1, p. 265–275, 1951.

RAO, M. B. *et al.* Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. **Microbiology and molecular biology reviews**, v. 62, n. 3, p. 597–635, 1998.

RIASCOS, M. L. C. **Determinación de las condiciones de cultivo para la producción de celulosa por la bacteria nativa *Gluconacetobacter medellinensis***. 2015. 105f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidad Pontificia Bolivariana, Medellín, 2015.

RIVALDI, J. D. et al. Glicerol de biodiesel - Estratégias biotecnológicas para o aproveitamento do glicerol gerado da produção de biodiesel. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, n. 37, p. 44-51, 2007.

RUKA, D. R.; SIMON, G. P.; DEAN, K. M. Altering the growth conditions of *Gluconacetobacter xylinus* to maximize the yield of bacterial cellulose. **Carbohydrate Polymers**, v. 89, n. 2, p. 613–622, 2012.

RZYCHON, Malgorzata; CHMIEL, Dorota; STEC-NIEMCZYK, Justyna. Modes of inhibition of cysteine proteases Circlred white star .**Acta Biochimica Polonica**,v. 51, n. 4, p. 861-873, 2004.

SAMPAIO, L. M. P. et al. Laccase immobilization on bacterial nanocellulose membranes: antimicrobial, kinetic and stability properties. **Carbohydrate polymers**, v. 145, p. 1–12, 2016.

SANGEETHA, K.; ABRAHAM, T. E. Chemical modification of papain for use in alkaline medium. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 38, n. 3–6, p. 171–177, 2006.1381-1177.

SANTOS, S. M; CARBAJO, J. M.; VILLAR, J. C. The effect of carbon and nitrogen sources on bacterial cellulose production and properties from *gluconacetobacter sucrofermentans* cect 7291 focused on its use in degraded paper restoration. **BioResources**, v. 8, n. 3, p. 3630-3645, 2013.

SARAVANABHAVAN, S. et al. Silicate enhanced enzymatic dehairing: A new lime-sulfide-free process for cowhides. **Environmental Science and Technology**, v. 39, n. 10, p. 3776–3783, 2005.

SEABRA, I. J.; GIL, M. H. Cotton gauze bandage: a support for protease immobilization for use in biomedical applications. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas** v. 43, n. 4, p. 535–542, 2007.

SHAH, N. et al. Overview of bacterial cellulose composites: A multipurpose advanced material. **Carbohydrate Polymers**, v. 98, n. 2, p. 1585–1598, 2013.

SHARMA, M. et al. Development of enteric submicron particle formulation of papain for oral delivery. **International journal of nanomedicine** v. 6, p. 2097–2111, 2011.

SHARMA, R.; CHISTI, Y.; CHAND, Production, purification, characterization, and applications of lipases. **Biotechnology Advances**, v. 19, p. 627–662, 2001.

SHUKOR, Y. et al. Development of a heavy metals enzymatic-based assay using papain. **Analytica Chimica Acta**, v. 566, n. 2, p. 283–289, 2006.

SHWETA, A.; SONIA, P. Pharmaceutical relevance of crosslinked chitosan in microparticulate drug delivery. **International research journal of pharmacy**, v. 4, n. 2, p. 45–51, 2013.

Skin Deep® Cosmetics Database. 2018. Disponível em:
<<https://www.ewg.org/skindeep/#.WkuFWVWnHcc>>. Acesso em: 02 janeiro 2018.

SKINNER, P. O.; CANNON, R. E. *Acetobacter xylinum*: An Inquiry into Cellulose Biosynthesis. **The american biology teacher**, v. 62, n. 6, jun. 2000.

SMITH, A M ; AGIZA, A H. The Determination of Amino-Acids Colorimetrically the Ninhydrin Reaction. **Analyst**, v. 76, p. 623–627 , 1951.

SONG, J. E. et al. Bio-coloration of bacterial cellulose assisted by immobilized laccase. **Amb express**, 2018. v. 8, n. 1.

SOUZA et al. Imobilização enzimática: princípios fundamentais e tipos de suporte. In: RESENDE, R. R. (Ed) **Biotecnologia aplicada à agro&indústria - vol. 4**. Editora Edgard Blücher Ltda, 2016.

STORER, A. C.; MÉNARD, R. Papain. **Handbook of Proteolytic Enzymes**, v. 2, p. 1858–1861 , 2013.

SUN, L. et al. Study on a carboxyl-activated carrier and its properties for papain immobilization. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology** v. 87, n. 8, p. 1083–1088 , 2012.

SZABÓ, András et al. Spectroscopic studies of stability of papain in aqueous organic solvents. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 41, n. 1–2, p. 43–48 , 2006.

TABAI, M. J.; EMTIAZI, G. Comparison of Bacterial Cellulose Production among Different Strains and Fermented Media. **Applied Food Biotechnology** v. 3, n. 1, p. 35–41 , 2016.

THOMPSON, D. N.; HAMILTON, M. .A. Production of Bacterial Cellulose from Alternate Feedstocks. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 91-93, n.1, p. 503-513, 2001.

TIBONI, M. **Monitoramento da atividade de enzimas do complexo celulolítico utilizando celulose bacteriana covalentemente tingida com azul brilhante de remazol r**. 2011. 118f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2011.

TSOUKO, E. et al. Bacterial Cellulose Production from Industrial Waste and by-Product Streams. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, n. 7, p. 14832-14849, jul. 2015.

VAZQUEZ, A. et al. Bacterial Cellulose from Simple and Low Cost Production Media by *Gluconacetobacter xylinus*. **Journal of Polymers and the Environment** v. 21, n. 2, p. 545–554 , 2013.

VENEGAS, G. G.; ROMÁN, M. del M. J. B.; SÁNCHEZ, R. O. **Prácticas de bioquímica**. 13. ed. Distrito Federal: D. R. Universidad Nacional Autónoma de México, 2016.

VERMA, S.; DIXIT, R.; PANDEY, K. C. Cysteine proteases: modes of activation and future prospects as pharmacological targets. **Frontiers in pharmacology**, v. 7, n. 107, 2016.

VERNET, T. et al. Processing of the papain precursor. the ionization state of a conserved amino acid motif within the pro region participates in the regulation of intramolecular processing. **Journal of biological chemistry**, v. 270, n. 18, p. 10838–10846, 1995.

WADE, L C. **Química orgánica**. 5. ed. Espanha: PEARSON EDUCACIÓN, S. A, 2004.

WANG, H.; SHAO, D. Study on immobilization of papain with magnetic porous alginate microspheres. **lop conference series: materials science and engineering**, v. 397, p. 12031, 2018.

WANG, S. et al. Catalysis B : Enzymatic Immobilization of cellulase on polyamidoamine dendrimer-grafted silica. “**Journal of Molecular Catalysis. B, Enzymatic**” v. 89, p. 35–40 , 2013.

WATERBORG, J. H. The Lowry Method for Protein Quantitation. In: WALKER, J. M. (Org.). **The proteins protocols handbook**. 2. ed. New Jersey: Humana Press Inc, 2002.

WERTZ, J. L.; BEDUE, O.; MERCIER, J. P. (2010). **Cellulose science and technology**. 1. ed. Lausanne: EPFL Press.

WILLIAMS, W. S.; CANNON, R.T E. Alternative environmental roles for cellulose produced by *Acetobacter xylinum*. **Applied and environmental microbiology**, v. 55, n. 10, p. 2448-2452, out. 1989.

WINKWORTH-SMITH, C. G. **Cellulose composite structures – by design**. 2014. 271f. Tese (PhD em Ciência de Alimentos) – University of Nottingham, Loughborough, 2014.

WU, S.; LIA, Y.; HO, C. Glucoamylase immobilization on bacterial cellulose using periodate oxidation method. **International journal of science and engineering**, v. 3, n. 4, p. 1–4, 2013.

WU, S.; LIA, Y. K. Application of bacterial cellulose pellets in enzyme immobilization. **Journal of molecular catalysis b: enzymatic**, v. 54, n. 3–4, p. 103–108, 2008.

WU, S.; WU, S.; SU, F. Novel process for immobilizing an enzyme on a bacterial cellulose membrane through repeated absorption. **J chem technol biotechnol**, v. 92, n. 1, p. 109–114, 2016.

XU, M.-Q. et al. Combined cross-linked enzyme aggregates as biocatalysts. **Catalysts**, v. 8, n. 10, p. 460, 2018.

YE, P. et al. Nanofibrous poly(acrylonitrile-co-maleic acid) membranes functionalized with gelatin and chitosan for lipase immobilization. **Biomaterials** v. 27, n. 22, p. 4169–4176, 2006.

YIM, S. M.; SONG, J. E.; KIM, H. R. Production and characterization of bacterial cellulose fabrics by nitrogen sources of tea and carbon sources of sugar. **Process Biochemistry**, p. 1–11, 2016.

ZHANG, F. et al. Magnetic cellulose nanocrystals: synthesis by electrostatic self-assembly approach and efficient use for immobilization of papain. **Journal of molecular catalysis b: enzymatic**, v. 134, p. 164–171, 2016.

ZHAO, B.; SHI, B.; MA, R. Immobilization of papain on the mesoporous molecular sieve mcm-48. **Engineering in life sciences**, v. 5, n. 5, p. 436–441, 2005.

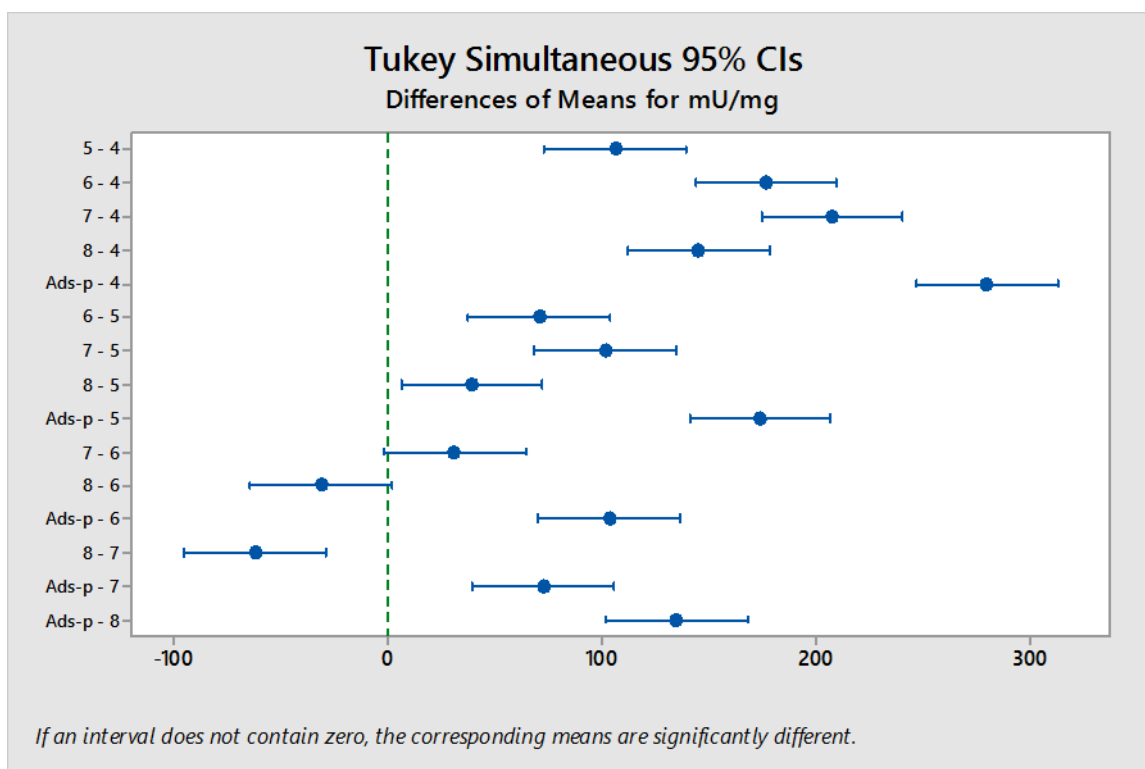
ZHONG, C. et al. Metabolic flux analysis of *Gluconacetobacter xylinus* for bacterial cellulose production. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 97, p. 6189–6199, 2013.

Anexos

ANEXO A – Agitador basculante construído especificamente para a pesquisa.



ANEXO B – Teste de Tukey para as condições dos ensaios de imobilização por Ads: 4,5,6,7 e 8) pH da solução para imobilização; Ads-p) Ads picada.



ANEXO C – Teste de Tukey para as condições dos ensaios de imobilização por CL: 4,5,6,7 e 8) pH da solução para imobilização; CL-p) CL picada.

