

APLICAÇÃO DE QUITOSANA COMO SUPORTE PARA A IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS DE INTERESSE INDUSTRIAL

Adriano A. Mendes*

Universidade Federal de São João Del-Rei, CP 56, 35701-970 Sete Lagoas – MG, Brasil

Pedro C. de Oliveira e Heizir F. de Castro

Departamento de Engenharia Química, Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, CP 116, 12602-810 Lorena – SP, Brasil

Raquel de L. C. Giordano

Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal de São Carlos, CP 676, 13560-970 São Carlos – SP, Brasil

Recebido em 14/6/10; aceito em 15/12/10; publicado na web em 25/3/11

APPLICATION OF CHITOSAN AS SUPPORT FOR IMMOBILIZATION OF ENZYMES OF INDUSTRIAL INTEREST. Chitosan, poly[β -(1-4)-linked-2-amino-2-deoxy-D-glucose], is the N-deacetylated product of chitin which is a major component of arthropod and crustacean shells such as lobsters, crabs, shrimps, and cuttlefishes. In addition, chitosan has many significant biological and chemical properties such as biodegradability, biocompatibility and bioactivity as well as polycationic properties. Thus, it has been widely used in many industrial and biomedical applications including wastewater treatment, chromatographic support, carriers for controlled drug delivery and enzyme immobilization. This review is an insight into the exploitation of utilization of chitosan based-supports in different geometrical configurations on the immobilization of enzymes by different protocols for further application in biotransformation reactions.

Keywords: chitosan; immobilization; enzymes.

ENZIMAS COMO BIOCATALISADORES E SUAS APLICAÇÕES

As limitações existentes na obtenção de produtos e intermediários de interesse industrial estão associadas aos tipos de catalisadores químicos empregados, que são pouco versáteis e exigem altas temperaturas para atingir razoável velocidade de reação. Além disso, estes catalisadores possuem baixa especificidade, geralmente fornecem produtos de composição química mista ou produtos contaminados e requerem uma etapa posterior de purificação.^{1,2} As enzimas atuam em condições suaves de temperatura, pH e pressão, atingindo velocidades de reação bastante superiores àquelas obtidas em presença de catalisadores químicos convencionais.¹⁻³ Este comportamento permite uma redução no custo final do processo e evita a formação de subprodutos indesejáveis. Além disso, devido à sua elevada especificidade, maior rendimento do processo pode ser atingido, permite a obtenção de produtos biodegradáveis e reduz a quantidade de resíduos gerados.² Nesse contexto, o enfoque biotecnológico vem se apresentando como uma opção promissora para sua exploração em diversos tipos de reações.¹⁻¹⁰

A tecnologia enzimática despontou como área de investigação no início da década de 1960, com a imobilização de enzimas para utilização em processos químicos.³ Desde então esses biocatalisadores têm sido empregados em diversos segmentos, incluindo a síntese de compostos bioativos e de novos biopolímeros, metodologias analíticas por meio de construção de biossensores, terapia enzimática e processos em indústrias tradicionais como óleos e gorduras, curtumes, papel e celulose, têxtil e cosméticos.¹⁻¹⁰

Com o avanço da tecnologia enzimática, a seleção de novas enzi-

mas, a produção de enzimas por tecnologia do DNA recombinante e a engenharia de proteínas permitiram a modificação das propriedades cinéticas e da estabilidade que contribuiram para o desenvolvimento de novas soluções ao nível da tecnologia de reatores enzimáticos e das técnicas de imobilização.^{11,12}

De acordo com *Freedonia Group*,¹³ o mercado global de enzimas industriais foi de US\$ 5,1 bilhões de dólares em 2008 e a projeção é de que o crescimento anual será de aproximadamente 6,3%, com estimativa de movimentação de US\$ 7,0 bilhões de dólares para 2013.

O mercado mundial das enzimas divide-se em três segmentos: enzimas empregadas na indústria de alimentos; enzimas técnicas e, enzimas empregadas na produção de ração animal. Destes três grupos, destacam-se as enzimas destinadas aos setores de alimentos, que são empregadas basicamente na produção de xarope de açúcar invertido e de compostos aromatizantes,⁶ e as enzimas técnicas, que são utilizadas na formulação de detergentes, produção de papel e celulose, manufatura de couros e produção de fármacos. Este é o principal mercado consumidor de enzimas, detendo aproximadamente 50% do total das enzimas comercializadas.

No setor industrial as mais utilizadas são as proteases, que ocupam 40% do mercado de enzimas, seguidas das carboidrases (amilases e celulasas) e lipases.⁴ No entanto, o crescimento acima da média de algumas enzimas como as polimerases e as nucleases, juntamente com outras enzimas como fitases e celulasas, poderá levar esse grupo de enzimas a ultrapassar o grupo das mais empregadas industrialmente nos dias de hoje, formado pelas lipases, carboidrases e proteases.¹³

A grande desvantagem da utilização de enzimas na forma solúvel é a sua separação para posterior aplicação, assim como a contaminação do produto desejado, pois enzimas são compostos solúveis em água. Desta forma, técnicas de imobilização têm sido empregadas com o objetivo de reutilizar as enzimas. Esta estratégia também é

*e-mail: mendes@ufsj.edu.br

uma importante ferramenta para estabilizar e reduzir a inativação por distorção da sua estrutura nativa por influência da temperatura, pH e de solventes orgânicos, o que pode ser atrativo para a aplicação de enzimas no setor industrial.^{11,12,14-17}

IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS

A imobilização consiste no confinamento da enzima em um suporte sólido para posterior reutilização do biocatalisador, tornando o processo menos oneroso.¹¹ Em geral, a imobilização oferece uma série de vantagens e as razões para a escolha de um derivado imobilizado variam de aplicação para aplicação, incluindo: utilização da atividade catalítica por um maior período de tempo; possibilidade de operação contínua do processo, com maior facilidade de controle; facilidade de separação do produto final; em alguns casos, ocorre modificação favorável das propriedades catalíticas da enzima como, por exemplo, maior estabilidade ao pH e à temperatura, entre outros; facilidade de interrupção da reação, em um nível desejado, pela remoção da enzima, caso o processo seja batelada, ou ajuste do tempo de residência se é usado um reator contínuo.^{11,12,14-17}

Apesar da grande diversidade de métodos desenvolvidos e aplicados na imobilização de enzimas, não há um método aplicável para todas as enzimas. Portanto, para cada aplicação de uma enzima imobilizada é necessário escolher o procedimento mais simples e mais barato e que resulte em um derivado com boa retenção de atividade e alta estabilidade operacional.

A partir das informações disponíveis sobre as características do suporte e o efeito dos métodos empregados, é possível fazer generalizações que permitam uma primeira seleção do método de imobilização. Enzimas podem ser imobilizadas por diferentes protocolos, isto é, podem ser encapsuladas; adsorvidas em materiais insolúveis ou resinas de troca iônica; copolimerizadas com algum monômero ou se ligar a uma matriz insolúvel por ligações covalentes.^{11,12,14,16-21} Estes métodos são bem revisados e discutidos na literatura.^{11,12,14,16-21}

A adsorção física é o método mais simples e o mais empregado para imobilização de enzimas. Nesse caso, o biocatalisador é estabilizado por interações fracas com o suporte como forças de van der Waals (interações hidrofóbicas), pontes de hidrogênio e ligações iônicas. As principais vantagens deste processo de imobilização são a facilidade e a simplicidade do processo e, além disso, a estrutura conformacional da enzima é pouco alterada. A grande desvantagem é a dessorção da enzima devido às variações de temperatura, pH e força iônica.^{12,14,16,18,19}

A encapsulação consiste na retenção física da enzima nas cavidades internas de uma matriz sólida porosa constituída geralmente por polímeros entrecruzados como poliacrilamida, gelatina, alginato, carragenana, resinas de poliuretano e silanos. As principais vantagens da encapsulação de enzimas referem-se à grande área superficial para contato do substrato e da enzima no interior de um volume relativamente pequeno, e à possibilidade de imobilização simultânea de diferentes enzimas em uma única etapa. Como principais desvantagens, têm-se: a restrição de que os biocatalisadores podem ser aplicados somente com substratos de baixa massa molecular; a possível inativação da enzima durante o procedimento de imobilização; a alta concentração de enzima necessária para garantir a encapsulação e, os possíveis efeitos de difusão de substratos e/ou produtos no interior da matriz porosa.^{12,14,16-19}

A imobilização por ligação covalente baseia-se na ativação de suportes com a inserção de grupos reativos que reagem com os grupos nucleofílicos da enzima. Esta técnica não é comum como o método de adsorção física, mas apresenta a vantagem de evitar o fenômeno de dessorção. A seleção das condições para a imobilização por ligação covalente é mais difícil que em outros métodos de ligação em

suportes. É necessário conhecer a densidade dos grupos ativos por unidade de área do suporte e a sua geometria para reduzir a formação do complexo enzima-suporte inativo. Este método pode também afetar a estrutura ativa da enzima, devido à alteração do centro ativo. Suas principais vantagens são a maior resistência do biocatalisador quanto à variação de pH, temperatura e influência de solventes orgânicos; os derivados preparados podem ser empregados em diversas conformações de reatores, como fluxo contínuo, empacotado, tanque agitado e leito fluidizado e, a carga de enzima permanece constante após a etapa de imobilização.^{12,14-21}

A maior contribuição para o bom desempenho da enzima imobilizada é dada pelo suporte. Se de um lado um suporte criteriosamente selecionado pode aumentar o tempo de meia-vida da enzima imobilizada, de outro uma escolha imprudente pode afetar adversamente não só a estabilidade térmica, mas o desempenho global do sistema.

Na seleção de um suporte para uma determinada aplicação, devem ser analisadas suas propriedades físicas e químicas, bem como a possibilidade de regeneração do material. As principais características a serem observadas na seleção de um suporte para uma determinada aplicação são: área superficial, permeabilidade, insolubilidade, capacidade de regeneração, morfologia e composição, natureza hidrofílica ou hidrofóbica, resistência ao ataque microbiano, resistência mecânica e custo, dentre outras. Eles podem ser classificados como orgânicos e inorgânicos, e conforme sua morfologia em materiais porosos, não porosos e de estrutura de gel.¹⁶⁻²¹

Os materiais orgânicos, notadamente os polímeros que podem ser naturais ou sintéticos, são uma classe de suportes amplamente empregados na imobilização de enzimas.^{12,15,17} Os sintéticos exibem variedades de formas físicas e estruturas químicas que podem ser combinadas para formar um suporte ideal, porém os naturais apresentam algumas vantagens quando comparados aos sintéticos, pois geralmente apresentam baixo custo e são facilmente degradados, não causando danos ao meio ambiente.¹⁷ Dentre os diferentes suportes orgânicos naturais empregados na imobilização de enzimas, destaca-se a quitosana.³ A aplicação de quitosana como suporte para a imobilização de enzimas se deve às suas diferentes configurações geométricas como pó, escamas, hidrogeis, membranas, fibras e outras, além da presença de diferentes grupos funcionais, como hidroxila e amino, que permitem a utilização de diferentes métodos de imobilização.^{22,23}

QUITOSANA

A quitosana (Figura 1a) é a forma desacetilada da quitina (Figura 1b), o segundo polímero mais abundante na natureza, depois da celulose (Figura 1c).²³⁻²⁶ É um produto natural, de baixo custo, renovável e biodegradável e de grande importância econômica e ambiental. As carapaças de crustáceos são resíduos abundantes e rejeitados pela indústria pesqueira que, em muitos casos, as consideram poluentes. Sua utilização reduz o impacto ambiental causado pelo acúmulo nos locais onde é gerado ou estocado. Este biopolímero possui uma estrutura molecular quimicamente similar à da celulose, diferenciando-se somente nos grupos funcionais.³ Grupos hidroxilas (OH) estão presentes na estrutura geral desses biopolímeros, mas a principal diferença entre eles é a presença de grupos amino (NH₂) na estrutura da quitosana. Este biopolímero é solúvel em meio ácido diluído, formando um polímero catiônico, com a protonação do grupo amino gerando o íon NH₃⁺, que confere propriedades especiais diferenciadas em relação, por exemplo, às fibras vegetais.²²

A maioria das indústrias que produzem quitina e quitosana em escala comercial está localizada no Japão, onde mais de 100 bilhões de t de quitosana são manufaturadas por ano, a partir de carapaças de caranguejo e camarão.²⁶ Nessas indústrias, a quitosana é produzida

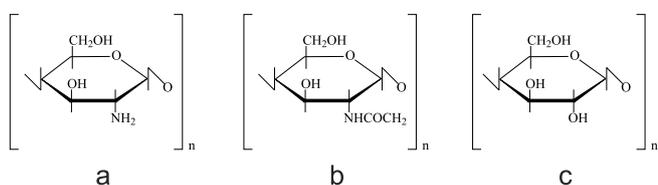


Figura 1. Estrutura dos biopolímeros quitosana (a), quitina (b) e celulose (c)

a partir da quitina por hidrólise alcalina via processo termoquímico, que promove a desacetilação da quitina, normalmente com NaOH (40-50% m/m) a 110-115 °C. Os principais fatores que afetam o grau de desacetilação e, conseqüentemente, as características da quitosana obtida são temperatura e tempo de reação, concentração da solução do álcali, razão quitina/álcali, tamanho das partículas da quitina e presença de agentes que evitam a despolimerização.²⁷ Para produzir 1 kg de quitosana 70% desacetilada a partir de carapaças de caranguejo, são necessários 6,3 kg de HCl, 1,8 kg de NaOH, 0,5 t de água para o processo e 0,9 t de água de resfriamento.²³

Diferentes configurações de quitosana podem ser obtidas no processo de desacetilação da quitina e estas configurações podem ser empregadas no processo de imobilização de enzimas.³ Entretanto, as formas de hidrogéis e membranas são as mais empregadas devido às alterações físicas obtidas, como o aumento do diâmetro de poros do suporte, ideal para o processo de imobilização de enzimas.²²

Hidrogéis e polieletrólitos de quitosana

Hidrogéis são estruturas poliméricas tridimensionais capazes de adsorverem grandes quantidades de água ou fluidos biológicos. Estas matrizes são insolúveis em água devido à presença de pontos de reticulação química ou física.²² Este fato se deve aos grupos ionizáveis presentes na estrutura dos biopolímeros como os grupos amino, carboxilatos, sulfatos e hidroxilas que possuem afinidade com a molécula de água. De acordo com a literatura, a quitosana é um dos principais compostos empregados na síntese de hidrogéis, juntamente com outros polímeros como alginato, carragenana, álcool polivinílico, gelatina e outros.^{28,29}

Os complexos polieletrólitos de quitosana são formados com o objetivo de obter hidrogéis mais versáteis, com diferentes estruturas química e física, o que pode melhorar sua atuação em uma determinada aplicação, como na imobilização de enzimas para diversas aplicações, principalmente no desenvolvimento de biossensores.^{30,31} Sua estrutura é mantida por interações iônicas ou ligações covalentes. As ligações iônicas são fortemente influenciadas pelo pH do meio reacional, influenciando também na capacidade de retenção de água no hidrogel.²²

Se o pH do meio decresce, ocorre a protonação dos grupos amino da quitosana, resultando na repulsão eletrostática e enfraquecimento da resistência mecânica e química do hidrogel, além de favorecer consideravelmente o grau de inchamento. Com a elevação do pH, a protonação da quitosana decresce, o que reduz o grau de inchamento dos hidrogéis. Entretanto, nestes meios também ocorre desprotonação de grupos reativos como os grupos aniônicos de biopolímeros como sulfatos e carboxilatos, o que reduz também a interação iônica entre os biopolímeros. Em pH próximo da neutralidade, há equilíbrio entre as cargas do hidrogel que promove máxima interação entre os grupos ionizáveis, proporcionando maior estabilidade ao gel.

Os eletrólitos mais empregados, juntamente com a quitosana, para a formação de hidrogéis de complexos polieletrólitos são alginato, carragenana e gelatina.³²⁻³⁴

Alginato é um polissacarídeo extraído de algas marrons, com estrutura química constituída por um polímero linear formado por

unidades de ácidos L-gulurônico e D-manurônico.^{32,33} Carragenana é outro polissacarídeo extraído de algas vermelhas e possui em sua estrutura grupos sulfato. Dentre as formas de carragenana existentes, a κ-carragenana é a mais abundante e possui um grupo sulfato para cada duas unidades de galactose. Este grupo sulfato é responsável pela elevada capacidade de retenção de água, empregada na indústria de alimentos como emulsificante e na proteção de alimentos contra o processo de desidratação.³³

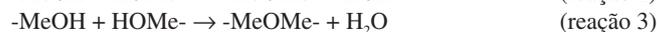
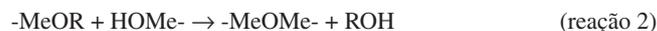
A gelatina é um produto obtido da hidrólise parcial do colágeno, extraído geralmente da pele e dos ossos de certos animais. A gelatina é formada por três moléculas polipeptídicas, arranjadas em forma de hélice. Possui uma grande habilidade de ligação com água e suas cadeias de configuração helicoidal são importantes para a formação do gel.³⁴ Estes eletrólitos têm sido empregados como veículos para a liberação de fármacos e proteínas, juntamente com a quitosana, sob a forma de complexos polieletrólitos.^{22,32-34} Tais complexos são formados por interações iônicas entre os grupos aniônicos dos referidos polieletrólitos e os grupos amino da quitosana.³⁴

Suportes híbridos de quitosana preparados pela técnica sol-gel

Os materiais orgânicos-inorgânicos obtidos pela técnica sol-gel têm recebido especial atenção dos pesquisadores por conta da possibilidade de incorporação de polímeros orgânicos em matrizes inorgânicas, com formação de materiais compósitos que preservam as propriedades de cada componente.³⁵⁻⁴⁵ A química do processo sol-gel baseia-se em reações de “polimerização” inorgânica por meio de uma reação que envolve duas etapas.³⁵ Na primeira, a hidrólise do precursor alcóxido de um metal ou de um semimetal leva à formação de um produto hidroxilado e o álcool correspondente:



Em seguida, ocorre uma condensação entre um grupamento não hidrolisado do alcóxido e uma hidroxila (reação 2) ou entre duas hidroxilas (reação 3) com formação de uma mistura coloidal chamada de “sol”:



Os precursores mais comumente empregados são os alcóxidos metálicos, entre os quais, o mais estudado é o tetraetilortossilicato (TEOS).^{21,36-44} Sua compatibilidade com diferentes biopolímeros como celulose,⁴¹ álcool polivinílico,^{21,37-39} carragenana⁴² e quitosana^{36,40,43,44} é amplamente reportada na literatura.

TEOS/quitosana tem se destacado como um material híbrido de promissora aplicação.^{36,40,43,44} Esses compósitos, sintetizados pela técnica sol-gel, apresentam excelentes propriedades térmicas, mecânicas, óticas e de adsorção.⁴⁰⁻⁴⁴

As hidroxilas e as amins presentes na quitosana são as responsáveis pela sua facilidade em formar ligações com os grupos silanois (-Si-OH) dos precursores. Na estrutura do híbrido TEOS/quitosana são encontradas pontes de hidrogênio entre os grupos silanois da rede tridimensional do TEOS e os oxí-grupos e os aminos da estrutura da quitosana, interações iônicas entre os grupamentos amino da quitosana e os grupos silanois do TEOS, bem como ligações covalentes como resultado da esterificação das hidroxilas da quitosana e os grupos silanois da rede do TEOS.^{43,44}

Na Figura 2 (adaptada da literatura)^{43,44} está ilustrado um esquema hipotético para o mecanismo de preparação da matriz híbrida SiO₂-quitosana empregando TEOS (tetraetilortossilicato) como precursor silano.

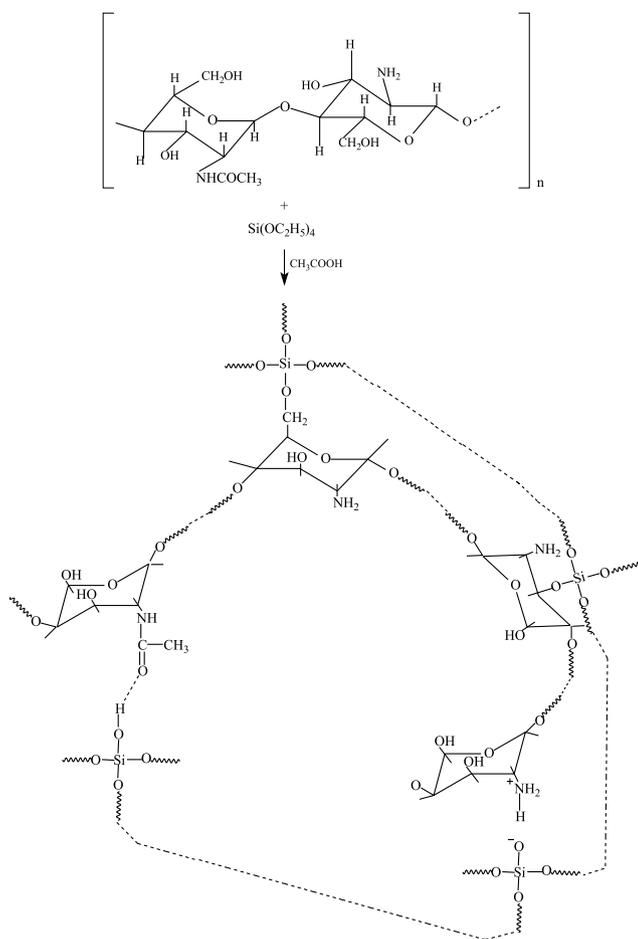


Figura 2. Esquema hipotético de formação da matriz híbrida SiO₂-quitosana empregando TEOS como precursor. Adaptado das refs. 43 e 44

Modificação química da estrutura da quitosana

No intuito de aumentar a estabilidade química e física da quitosana e seus derivados (complexos polieletrólíticos e matrizes híbridas), têm sido empregadas alternativas como a modificação química, também denominada de reticulação, empregando diferentes agentes de ativação.^{25,29,46-50} No caso específico da quitosana, a modificação de sua estrutura química é necessária para a obtenção de um suporte quimicamente mais resistente ao meio ácido e redução da sua capacidade de retenção de água. As reações envolvidas na reticulação por agentes bifuncionais ocorrem entre os grupos amino e hidroxilas da quitosana. Estas reações podem ser realizadas de maneira homogênea pela adição do agente bifuncional à solução de quitosana, ou de maneira heterogênea com a adição do agente à quitosana nas formas de membranas e esferas.^{22,25,28,29,47,48}

Esta modificação pode ser realizada com diferentes agentes químicos como glicidol,²⁹ epícloridrina,^{28,29,46,48,49} glutaraldeído,^{24,46,48} glioxal,⁴⁸ formaldeído²⁵ e genipina.⁵⁰ Formando estruturas complexas, amplamente reportadas na literatura especializada. A Figura 3 mostra uma representação esquemática da quitosana reticulada com glutaraldeído (a), genipina (b) e epícloridrina (c).

Na reação da quitosana com glutaraldeído, ocorre ataque nucleofílico dos grupos amino da quitosana aos grupos carbonilas do glutaraldeído, também observado quando se utiliza glioxal e formaldeído. A ligação covalente entre os grupos amino do biopolímero e aldeído terminal do glutaraldeído é irreversível e resiste a valores extremos de pH e temperatura. Diferentes mecanismos são propostos para explicar a reação de glutaraldeído com quitosana. Monteiro e

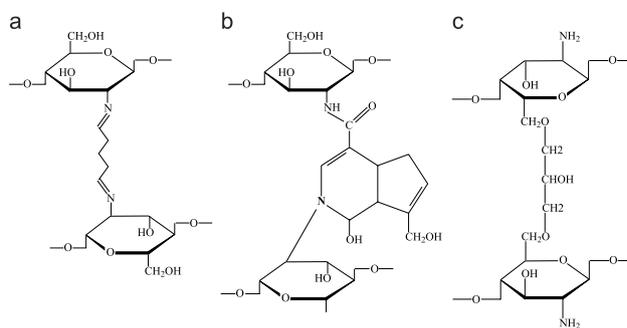


Figura 3. Estrutura química de quitosana reticulada com glutaraldeído (a), genipina (b) e epícloridrina (c)

Airoldi⁴⁷ propuseram o mecanismo como sendo uma interação dos grupos amino livres da quitosana com o grupo aldeído do glutaraldeído formando uma base de Schiff (ligação imina). Para interpretar este comportamento, três hipóteses são consideradas: (i) formação de uma base de Schiff entre o grupo aldeído com o grupo amino da quitosana. O outro grupo aldeído livre seria utilizado para a uma determinada reação de interesse; (ii) a reticulação é formada entre uma molécula de glutaraldeído e duas unidades de grupo amino, resultando na formação de duas bases de Schiff (Figura 3a) e (iii) a reticulação é formada também por mais de uma molécula de glutaraldeído, devido à sua polimerização em determinadas condições, por exemplo, em altos valores de pH. Após a polimerização, ocorre a reticulação dos grupos amino da quitosana.

Genipina é outro agente bifuncional extraído do jenipapo, bastante empregado na medicina chinesa e também como corante de alimentos. Na reticulação de quitosana com genipina, bases de Schiff não são formadas.⁵⁰ Conforme mostrado na Figura 3b, ocorre ataque nucleofílico de um grupo amino da quitosana à carbonila da genipina com a formação de uma ligação amida estável e um átomo de oxigênio da estrutura cíclica da genipina é substituído por um átomo de nitrogênio da quitosana.

O mecanismo de reação da epícloridrina com quitosana é bastante similar ao do glutaraldeído, no entanto, este agente de reticulação reage preferencialmente com os grupos hidroxilas da quitosana (Figura 3c). Estas reações podem ser efetuadas entre grupos hidroxilas de duas moléculas de quitosana (reticulação intermolecular) ou reagir somente com um grupo hidroxila.

É importante caracterizar as condições de reticulação, pois sua eficiência é diretamente proporcional à concentração e tipo de agente de reticulação, tempo de contato, temperatura, pH, massa molecular e grau de desacetilação da quitosana.²² O tempo de contato e a concentração de agente de reticulação são importantes para a determinação da natureza da estrutura produzida, porque o aumento do tempo de reação e o uso de altas concentrações geram extensas reticulações. O grau de desacetilação e a massa molecular da quitosana são importantes parâmetros, porque o aumento da massa molecular e do grau de desacetilação também resulta em um maior rendimento de reticulação. Este efeito também pode prejudicar a difusão de macromoléculas como as proteínas nos interstícios do hidrogel, devido à formação de poros de pequenos diâmetros.²⁴

O processo de reticulação reduz a ocorrência de reações paralelas na estrutura da quitosana como, por exemplo, a reação de ruptura do anel glicosídico por ação de agentes oxidantes como o íon periodato, conforme mostrada na Figura 4.⁵¹

O íon periodato reage com os grupos dióis vicinais clivando a ligação carbono-carbono por oxidação na formação de um dialdeído, com a liberação de uma molécula de íon amônio. Esta técnica é empregada para aumentar a flexibilidade da quitosana e redução da sua extensa cadeia para aumentar a sua solubilidade, ou seja, permite

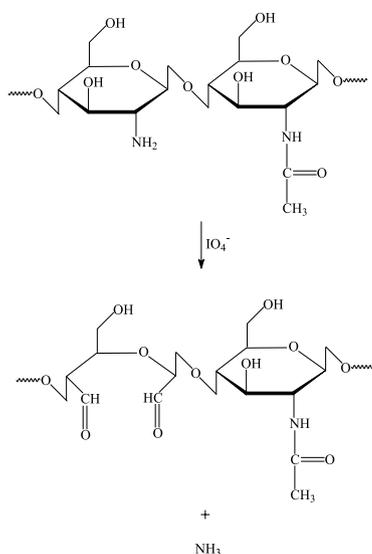


Figura 4. Mecanismo de oxidação por periodato dos grupos amino da quitosana

controlar a sua massa molecular, bem como a obtenção de novos grupos reativos, aumentando a possibilidade para novas aplicações.^{29,51} De acordo com Vold e Christensen,⁵¹ diversas macromoléculas podem ser funcionalizadas por esta técnica como amido, alginato e a própria quitosana. Um dos principais parâmetros de controle de reação de oxidação da quitosana é o grau de desacetilação. De acordo com a Figura 4, os grupos amino acetilados ou reticulados impedem a reação de clivagem do biopolímero, reduzindo a sua solubilidade.

Imobilização de enzimas em diferentes conformações de quitosana

Diferentes protocolos podem ser empregados na imobilização de enzimas em quitosana, tais como adsorção, encapsulação e ligação covalente.^{28,29,36,48,52-85} Na Tabela 1, alguns exemplos da aplicação de quitosana na imobilização de enzimas de interesse industrial são listados, dando ênfase à metodologia de imobilização empregada, tipo de agente de reticulação, ativação e aplicação. Como enzimas, são citadas as hidrolases, com maior aplicação industrial como lipases, peptidases (papaína, bromelina, subtilisina Carlsberg, tripsina, quimotripsina, tior protease), urease, α -amilase, pululanase, β -galactosidase, β -xilosidase, xilanase, β -glicosidase, celulase, catalase, penicilina G acilase, dentre outras. Outras classes, incluem as oxidorreduzantes (cloroperoxidase, colesterol oxidase, lacase, peroxidase, oxalato oxidase, glutamato desidrogenase e álcool desidrogenase), liases (aliinase) e isomerases (L-arabinose isomerase).

Dentre os diferentes métodos, a imobilização covalente em quitosana ativada por glutaraldeído é o método mais empregado em função dos grupos amino existentes na estrutura da quitosana que reagem com este agente em condições brandas, próximas à neutralidade. Utilizando essa metodologia, Guerfali *et al.*⁸⁴ imobilizaram β -xilosidase de *Talaromyces thermophilus* em quitosana ativada com glutaraldeído para posterior aplicação na síntese de xarope de xilose e xilo-oligossacarídeos. Em comparação aos outros protocolos testados como adsorção iônica e encapsulação, o método de ligação covalente ao suporte previamente ativado por glutaraldeído foi selecionado por fornecer um derivado com elevado rendimento de imobilização e atividade recuperada. Além disso, o derivado imobilizado apresentou uma elevada estabilidade operacional retendo 94% de sua atividade inicial após 25 reutilizações na reação de hidrólise. A máxima atividade hidrolítica foi verificada em pH 8,0 e 53 °C e em pH 7,0 e 50 °C,

respectivamente, para a enzima imobilizada e livre. A enzima imobilizada foi eficiente na síntese de xilo-oligossacarídeos na presença de elevada concentração de xilose. O efeito sinérgico de xilanase e β -xilosidase foi ainda avaliado por meio da coimobilização das enzimas em gel de quitosana. O biocatalisador preparado foi testado na hidrólise contínua de xilana de aveia a 50 °C e a hidrólise da xilose foi favorecida empregando a enzima coimobilizada.

Quitosana foi grafítizada eletroquimicamente com polianilina e o hidrogel preparado foi testado na imobilização de creatina amidino-hidrolase para a construção de biossensor na quantificação de creatinina.³¹ A enzima foi covalentemente imobilizada no suporte grafítizado ativado com glutaraldeído, avaliando a influência de diversos parâmetros tais como pH, temperatura e tempo de imobilização.

Partículas de hidrogel N-succinil-quitosana foram preparadas pela modificação química da quitosana com anidrido succínico, seguido de ativação via glutaraldeído e empregadas como suporte para a imobilização de aliinase.⁵³ Em condições otimizadas, o rendimento de imobilização da enzima foi de 75,6%. A atividade máxima do biocatalisador imobilizado foi alcançada a 40 °C, pH 7, enquanto a enzima livre exibiu atividade máxima a 30 °C e pH 6. O derivado reteve 85% de sua atividade inicial após 5 ciclos de hidrólise da aliina.

β -galactosidase de *Kluyveromyces fragilis* foi imobilizada em suportes orgânicos por diferentes protocolos.⁶² O derivado com maior atividade catalítica foi preparado pela imobilização da enzima em hidrogel de quitosana coagulado com KOH e ativado com glutaraldeído. O carregamento máximo de proteína imobilizada neste suporte foi da ordem de 247 mg por grama de suporte. A imobilização não alterou os valores de pH e temperatura. A estabilidade operacional da enzima imobilizada foi superior à enzima solúvel, pois após quatro ciclos de hidrólise de lactose a 40 °C e pH 7 a enzima imobilizada manteve 83% de sua atividade inicial.

Zhang *et al.*⁶⁰ imobilizaram covalentemente cloroperoxidase (CPO) de *Caldariomyces fumago* em membranas de quitosana ativadas com 0,8 mol/L de glutaraldeído em pH 3,5 e o máximo carregamento de proteína imobilizada foi de 3,18 mg g⁻¹ de suporte. Na conversão de mono-organoclorado em diorganoclorados a 50 °C por 40 min, o derivado reteve 40% da atividade inicial enquanto a enzima livre reteve apenas 0,02%. Após 20 h, a atividade residual do derivado imobilizado foi superior ao da CPO livre, 99 e 58%, respectivamente.

Pululanase foi covalentemente imobilizada em esferas magnetizadas de quitosana preparadas via polimerização fotoquímica com magnetita (Fe₃O₄) em suspensão aquosa, seguida de ativação com glutaraldeído.⁷⁶ O suporte preparado imobilizou 180 μ g de pululanase por grama de gel, quando foi oferecido um carregamento de 1,0 mg da enzima. O processo de imobilização deslocou o pH ótimo da enzima livre em 0,5 unidades para a região mais ácida (pH 5,0). A estabilidade térmica e operacional do derivado de pululanase foi superior à enzima livre.

Outros dialdeídos têm sido empregados na ativação de quitosana para a imobilização covalente de enzimas. Dialdeído de amido (amido funcionalizado) foi empregado como agente de ativação de partículas de hidrogéis de quitosana na imobilização de xilanase de *Aspergillus niger* A-25, visando a síntese de xilo-oligossacarídeos.⁸² Comparado com quitosana ativada via glutaraldeído e esferas não ativadas, o derivado preparado por ativação com dialdeído de amido apresentou maior atividade catalítica. As condições que maximizaram a atividade xilanolítica do biocatalisador foram 6,7% m/v de dialdeído de amido e tempo de reticulação de 16 h. A temperatura ótima de atuação dos derivados preparados por ativação com dialdeídos (de amido e glutaraldeído) foi 5 °C mais elevada que a enzima livre (50 °C). Xilanase imobilizada em suporte ativado com dialdeído de amido também apresentou maior estabilidade térmica e de armazenamento

Tabela 1. Aplicação de quitosana como suporte de imobilização de diferentes enzimas

Enzima (classe)	Fonte	Suporte	Ativação	Métodos de imobilização	Aplicação	Ref.
Acetilcolinesterase (hidrolase)	Peixe poraquê	Membrana modificada com poliacrilonitrila	GLU	Ligação covalente	Quantificação de acetilcolina	30
Álcool desidrogenase (oxidoreductase)	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Nanobiocompósito de quitosana e nanotubos de carbono	-	Encapsulação	Deteção amperométrica de etanol	52
Aliinase (liase)	Alho	Hidrogel modificado com anidrido succínico	GLU	Ligação covalente	Produção de alicina (composto com atividade antimicrobiana e antiviral)	53
α -Amilase (hidrolase)	<i>Bacillus subtilis</i>	Flocos modificados com ácidos L-glutâmico e 4-aminobutírico	GLU	Ligação covalente	Hidrólise do amido	54
L-Arabinose isomerase (isomerase)	<i>Bacillus licheniformis</i>	Partículas de hidrogel	-	Encapsulação	Produção semicontínua de L-ribulose	55
Bromelina (hidrolase)	Abacaxi	Nanopartículas de hidrogel de carboximetil-quitosana modificado com ácido linoleico	-	Adsorção	Hidrólise de caseína	56
Catalase (hidrolase)	Fígado de boi	Hidrogel reticulado com GLU contendo íons Cu^{2+} (resina de afinidade por ligações coordenadas entre a cauda de histidina da enzima e íons Cu^{2+})	GLU	Adsorção iônica e ligação covalente	Hidrólise de peróxido de hidrogênio	57
Células íntegras contendo anidrase carbônica e enzima purificada (hidrolase)	<i>Bacillus pumilus</i>	Hidrogéis de quitosana e alginato e hidrogéis híbridos de quitosana-PVA, alginato, argila e alumina	- GLU	Adsorção Ligação covalente	Conversão de CO_2 presente em combustíveis em bicarbonato	58
Celulase (hidrolase)	<i>Trichoderma reesei</i>	Polieletrólito de quitosana-alginato	GLU/ GLI	Ligação covalente	Produção de etanol	59
Cloroperoxidase (oxidoreductase)	<i>Caldariomyces fumago</i>	Membrana	GLU	Ligação covalente	Cloração de organoclorados	60
Colesterol oxidase (oxidoreductase)	-	Hidrogel híbrido com ácido algínico	-	Encapsulação	Diagnósticos de doenças cardíacas e trombose cerebral	61
Creatina amidinohidrolase (hidrolase)	<i>Actinobacillus</i> sp.	Partículas híbridas de quitosana-sílica e nanotubos de carbono	GLU	Ligação covalente	Quantificação de creatinina (biossensores)	31
β -Galactosidase (hidrolase)	<i>Kluyveromyces fragilis</i>	Hidrogel	GLU	Ligação covalente	Hidrólise da lactose	62
	<i>Aspergillus oryzae</i>	Membrana de quitosana- κ -carragenana	GLU	Ligação covalente		63
β -Glicosidase (hidrolase)	-	Hidrogel híbrido com argilas ativadas	GLU	Ligação covalente	Produção de glicose a partir de materiais lignocelulósicos	64
D-Hidantoinase e D-Carbamoilase (hidrolases)	<i>Agrobacterium radiobacter</i>	Polieletrólito de quitosana-alginato	-	Encapsulação	Síntese de D-p-hidróxifenilglicina	65
Glutamato desidrogenase (oxidoreductase)	-	Filme de quitosana	-	Encapsulação via <i>spin-coating</i>	Quantificação de íons amônio em água (biossensor óptico)	66
Lacase (oxidoreductase)	Cogumelo shimeji-preto	Membranas	-	Adsorção	Remoção do corante azo-ácido Black 10 BX de efluentes	67
	<i>Coriolus versicolor</i>	Hidrogel	GLU	Ligação covalente	Remoção de 2,4-diclorofenol em efluentes	68

em comparação ao derivado ativado via glutaraldeído e a enzima livre. Este derivado produziu xilo-oligossacarídeos de alta qualidade a partir da xilana de vidoeiro, árvore nativa na China.

A utilização de polieletrólitos de quitosana reticulados como suporte de imobilização de lipases é uma alternativa que tem sido aplicada com sucesso para utilização dos derivados imobilizados na

biotransformação de óleos e gorduras.^{29,69,71} Lipase de *Thermomyces lanuginosus* foi imobilizada em polieletrólitos de quitosana ativados com diferentes agentes, como glicidol, epicloridrina e glutaraldeído.²⁹ Neste estudo, foram avaliadas as influências do tipo de polieletrólito e da modificação química dos polieletrólitos com ácido 2,4,6 trinitrobenzenossulfônico (TNBS) na atividade catalítica e estabilidade

Tabela 1. continuação

Enzima (classe)	Fonte	Suporte	Ativação	Métodos de imobilização	Aplicação	Ref.
Lipase (hidrolase)	<i>Candida antarctica</i>	Hidrogel	GLU EPI GLU	Ligação covalente	Hidrólise de ésteres	48
	<i>Candida rugosa</i>	Matriz híbrida quitosana-SiO ₂	EPI	Ligação covalente	Hidrólise do azeite de oliva	36
		Quitosana em pó funcionalizada com HEMDA	GLU	Ligação covalente	Hidrólise do azeite de oliva e síntese de ésteres aromatizantes	69
		Partículas de hidrogel reticulado com TPP	-	Encapsulação	Hidrólise de ésteres	70
	<i>Thermomyces lanuginosus</i>	Polieletrólitos de quitosana reticulados por TNBS	GLU EPI GLU	Ligação covalente	Síntese de biodiesel	29
	<i>Rhizopus oryzae</i>	Membranas de quitosana e alginato	EPI GLU	Ligação covalente	Síntese de emulsificantes	71
Oxalato oxidase (oxidorreductase)	-	Polieletrólito de quitosana-mucina	GLU	Ligação covalente	Quantificação de oxalato (biossensor)	72
Papaína (hidrolase)	Mamão	Membranas de afinidade contendo ligantes azo	-	Adsorção (afinidade)	Purificação da papaína do extrato do mamão	73
Penicilina G acilase (hidrolase)	<i>Bacillus megatherium</i>	Partículas de quitosana-poliestireno	GLU	Ligação covalente	Produção de antibióticos semissintéticos	74
Peroxidase (oxidorreductase)	Rabanete	Hidrogel depositado em nanotubos de carbono	-	Encapsulação	Detecção de óxido nítrico (biossensor)	75
Pululanase (hidrolase)	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Partículas magnéticas de quitosana-Fe ₃ O ₄	GLU	Ligação covalente	Hidrólise de pululana	76
Quimotripsina (hidrolase)	Pâncreas bovino	Polieletrólitos híbridos de quitosana-alginato, gelatina e carragenana empregando agente porogênico <i>S. cerevisiae</i>	GLI EPI GLU	Ligação covalente	Síntese de peptídeos	28
Subtilisina Carlsberg (hidrolase)	-	Hidrogéis, fibras e filmes	GLU TPP	Encapsulação e ligação covalente	Síntese de peptídeos em meio orgânico	77
α -Transglicosidade (hidrolase)	<i>Aspergillus niger</i>	Polieletrólito híbrido de quitosana-alginato reticulado com fosfato de cálcio	-	Encapsulação	Conversão de maltose em isomalto-oligosacarídeos	78
Tripsina (hidrolase)	Pâncreas bovino	Hidrogel	GLI GLU	Ligação covalente	Hidrólise de proteínas	79
Tiol protease (hidrolase)	Feijão mungo	Hidrogel	GLU	Ligação covalente	Hidrólise de proteínas	80
Urease (hidrolase)	Soja	Hidrogel	GLU	Ligação covalente	Quantificação de ureia no sangue	81
Xilanase (hidrolase)	<i>Aspergillus niger</i> A-25	Hidrogel	GLU DAA	Ligação covalente	Produção de xilo-oligosacarídeos	82
	-	Hidrogel	GLI	Ligação covalente	Hidrólise de xilana	83
β -xilosidase (hidrolase)	<i>Bacillus halodurans</i> C-125	Quitosana em pó e hidrogel	GLU	Ligação covalente	Produção de xarope de xilose em biorrefinarias	84
	<i>Talaromyces thermophilus</i>	Quitosana em pó e hidrogel	GLU	Ligação covalente	Produção de xilo-oligosacarídeos e xilose	85

GLU: glutaraldeído; GLI: glicidol; EPI: epiclorigrina; DAA: dialdeído de amido; TPP: tripolifosfato de sódio; PVA: álcool polivinílico; HEMDA: hexametilenodiamina; TNBS: ácido 2,4,6 trinitrobenzenossulfônico.

térmica dos derivados imobilizados. A reticulação dos polieletrólitos com TNBS teve como objetivo aumentar a hidrofobicidade destes suportes. TNBS reage com os grupos amino da quitosana, reduzindo o caráter hidrofílico das matrizes e, conseqüentemente, aumentando a hidrofobicidade dos suportes.

A modificação química dos polieletrólitos com TNBS aumen-

tou a atividade catalítica e a estabilização térmica da lipase de *Thermomyces lanuginosus* imobilizada, decorrente da formação de microambiente que favoreceu a interação da enzima com o suporte. Na estabilização de enzimas por imobilização, é necessário um alinhamento entre os grupos reativos do suporte com os grupos da enzima para que ocorram multi-interações e na hidrofobização das matrizes

híbridas ocorreu uma maior proximidade entre os biopolímeros que constituíam estas matrizes, o que resultou na formação de um suporte com boa congruência geométrica, favorendo as multi-interações entre enzima e os grupos reativos do suporte. Para as lipases, a hidrofobicidade da matriz é um parâmetro muito importante para que o acesso do substrato (óleo) aos interstícios da matriz seja favorecido. Dentre os polieletrólitos testados, quitosana-alginato modificado quimicamente com TNBS forneceu derivados com maior atividade catalítica e estabilização térmica.²⁹

Lipase de *Candida rugosa* foi imobilizada por ligação covalente em matriz híbrida SiO₂-quitosana obtida pela técnica sol-gel e ativada com epicloridrina.³⁶ A atividade do derivado foi avaliada em meio aquoso na hidrólise do azeite de oliva emulsificado com goma arábica. Um estudo comparativo entre a lipase livre e imobilizada foi realizado em termos de pH, temperatura, parâmetros cinéticos e estabilidade térmica. A atividade catalítica máxima da lipase solúvel foi em pH 7,0 e 45 °C e do derivado imobilizado foi em pH 7,5 e na faixa de temperatura de 40-50 °C. O derivado imobilizado resultante foi 9 vezes mais estável que a lipase solúvel a 50 °C.

Outros procedimentos são empregados no processo de imobilização de enzimas em quitosana, como adsorção e encapsulação em membranas e hidrogeis sem o uso de agentes de reticulação. Estes métodos de imobilização são mais simples que a imobilização por ligação covalente porque não requerem a ativação do suporte.¹⁶⁻¹⁹ Alguns destes estudos empregam agentes de reticulação de caráter iônico, como tripolifosfato de sódio (TPP) e fosfato de cálcio, para melhorar o aprisionamento de enzimas encapsuladas em geis de quitosana e polieletrólitos.^{70,78,86}

Isomalto-oligossacarídeos (IMO) são empregados como alimentos funcionais devido às suas baixas calorias, não cariogenicidade e segurança para diabéticos.⁷⁸ Para converter maltose em IMO, α -transglicosidase foi encapsulada em polieletrólito quitosana-alginato reticulado ionicamente com fosfato de cálcio. Devido à presença de uma superfície externa inorgânica, o polieletrólito reticulado ionicamente reteve maior atividade catalítica se comparado com o polieletrólito não reticulado. As condições de máxima atividade catalítica para a enzima imobilizada foram similares às da enzima livre (pH 6,0 e 60 °C). α -transglicosidase encapsulada em suporte reticulado foi mais estável que a enzima livre em uma ampla faixa de temperatura e pH.

Tripolifosfato de sódio (TPP) é um composto polianiônico não tóxico empregado na síntese de hidrogeis de quitosana reticulados por interações iônicas, como alternativa às reticulações covalentes realizadas por agentes bifuncionais como glutaraldeído.^{70,86,87} Este agente de reticulação é empregado na preparação de esferas de quitosana devido à sua rápida capacidade de gelificação.^{86,87} Estudos descritos na literatura mostram a aplicação deste agente na reticulação iônica de quitosana para a obtenção de geis para a imobilização de enzimas por encapsulação.⁷⁰ A utilização de TPP reduz os tamanhos dos poros do gel, aprisionando eficientemente a enzima nos interstícios do suporte. Este método de reticulação é promissor, pois os biocatalisadores preparados não são tóxicos e, portanto, ideais para aplicação na liberação de fármacos e em alimentos.

Alsarra et al.⁷⁰ avaliaram as influências do pH, concentração de TPP e força iônica do meio de gelificação na preparação de biocatalisadores de lipase de *Candida rugosa* encapsulada em partículas de quitosana. O biocatalisador foi preparado pela adição da enzima em solução de quitosana em ácido acético. A encapsulação foi realizada pela adição da solução lipase-quitosana em solução de TPP. Neste estudo, foi testada a capacidade de aprisionamento da enzima nos interstícios do suporte por incubação do biocatalisador preparado em tampão Tris-HCl pH 7,2 por 36 h e a enzima liberada foi quantificada em termos de proteína presente no tampão. Foi empregado delinea-

mento experimental para avaliar a influência do pH e da concentração de TPP no aprisionamento da enzima. De acordo com os resultados apresentados, a concentração de TPP e o pH de encapsulação foram parâmetros significativos para a obtenção de derivados com elevada atividade catalítica.

Tan et al.⁵⁶ prepararam nanopartículas de hidrogel de carboximetil-quitosana modificada por sonicação com ácido linoleico. Estas partículas foram empregadas na imobilização por adsorção de bromelina de abacaxi (*Ananas comosus*). Os derivados preparados foram mais estáveis termicamente que a enzima livre. Esses resultados indicam que o processo de imobilização promoveu a estabilidade da enzima e aumentou a afinidade da enzima pela caseína, substrato empregado neste estudo.

Biossensor óptico foi preparado por encapsulação de glutamato desidrogenase em filme de quitosana para a quantificação de íons amônio em água.⁶⁶ A solução enzima/quitosana foi depositada em lâminas de vidro e o filme contendo a enzima encapsulada foi obtido pela técnica *spin-coating* que consiste na evaporação de solventes de uma solução por movimento de rotação do aparato na qual a solução foi gotejada. O biossensor preparado apresentou atividade ótima em pH 8,0. As concentrações ótimas de quitosana e carregamento da enzima foram de 2% (m/v) e 0,08 mg, respectivamente. A resposta linear do biossensor foi obtida no intervalo de concentração de íons amônio de 0,005 a 0,5 mmol/L com um limite de detecção de 0,005 mmol/L. O biossensor mostrou ser estável por um período de 1 mês, quando armazenado seco a 4 °C.

Quitosana também tem sido empregada como suporte de afinidade para a purificação de enzimas de grande interesse industrial. Este interesse crescente pelos processos de purificação de biomoléculas se deve ao desenvolvimento da biotecnologia e à demanda das indústrias farmacêutica e química por produtos com alto grau de pureza. Diferentes estratégias têm sido empregadas em processos de purificação de biomoléculas e a imobilização de enzimas por afinidade com ligantes inseridos em um suporte é uma técnica amplamente relatada na literatura.^{57,73,88-92} Nessa técnica, os ligantes (grupos de afinidade) inseridos em uma matriz se ligam à molécula de interesse por interações seletivas e reversíveis como adsorção iônica e forças de van der Waals, com elevado grau de seletividade.^{57,73,88-92} Em seguida, a enzima adsorvida aos ligantes inseridos no suporte pode ser eluída empregando soluções ou tampões apropriados.

Chen et al.⁷³ prepararam membranas de afinidade de quitosana-nylon para a purificação de papaína presente no extrato em pó de mamão com a inserção de grupos de afinidade ou ligantes oriundos de corantes antraquinônicos Reactive Red 120 e Reactive Brown 10. Papaína, uma protease presente no látex do mamão, é amplamente empregada na indústria do couro, cosméticos, têxtil, detergentes, alimentos e farmacêutica. A capacidade de adsorção da enzima nas membranas contendo ligantes oriundos dos corantes Reactive Red 120 e Brown 10 foi de 143,6 e 107,3 mg/g de membrana, respectivamente. A adsorção da proteína foi demonstrada pelas isotermas de Freundlich. A enzima foi eluída das membranas empregando solução de NaCl 1 mol/L a pH 6,0 e o rendimento de purificação foi superior a 80% para a membrana quitosana-nylon-Reactive Red 120 e de apenas 50% para a membrana quitosana-nylon-Reactive Brown 10. Neste estudo, membrana quitosana-nylon-Reactive Red 120 foi selecionada para o processo de purificação da papaína presente no extrato em pó do látex de mamão.

CONCLUSÃO

Nos últimos anos, o grande desafio da tecnologia enzimática tem sido o desenvolvimento de produtos e processos menos agressivos em termos ambientais. A imobilização de enzimas em suportes sólidos é

uma ferramenta importante para a estabilização da enzima, permite a reutilização e reduz a inativação por influência da temperatura e solventes, o que pode ser atrativo para o setor industrial. Diferentes suportes comerciais têm sido estudados para a imobilização de enzimas. No entanto, muitos destes suportes possuem custo elevado, o que permite a substituição por outros de baixo custo e que possam estabilizar as enzimas, como a quitosana.

Os biocatalisadores preparados por imobilização em quitosana têm sido empregados na biotransformação de proteínas, modificação de óleos e gorduras e materiais lignocelulósicos, remoção de contaminantes em águas residuárias, síntese de compostos de alto valor agregado empregados nas indústrias farmacêutica e alimentícia e geração de energia, purificação de enzimas, preparação de sofisticados biossensores para medições *in situ* em águas residuárias e quantificação de metabólitos produzidos pelo organismo humano no controle de enfermidades. Os exemplos descritos nesta revisão mostram que a imobilização de enzimas em quitosana é bastante promissora na preparação de biocatalisadores ativos e de grande interesse industrial.

AGRADECIMENTOS

À FAPESP (Processo 04/14593-4), CAPES e ao CNPq pelo suporte financeiro.

REFERÊNCIAS

- Hasan, F.; Shah, A. A.; Hameed, A.; *Enzyme Microb. Technol.* **2006**, *39*, 235.
- de Castro, H. F.; Mendes, A. A.; Santos, J. C.; Aguiar, C. L.; *Quim. Nova* **2004**, *27*, 146.
- Krajewska, B.; *Enzyme Microb. Technol.* **2004**, *35*, 126.
- Sharma, R.; Chisti, Y.; Banerjee, U. C.; *Biotechnol. Adv.* **2001**, *19*, 627.
- Bon, E. P. S.; Pereira Jr., N.; Gottschalk, L. M. F.; Sá-Pereira, P.; Roseiro, J. C.; Ferrara, M. A. Em *Enzimas em biotecnologia: Produção, aplicação e mercado*; Bon, E. P. S.; Ferrara, M. A.; Corvo, M. L.; Vermelho, A. B.; Paiva, C. L. A.; Alencastro, R. B.; Coelho, R. R. R., eds.; Interciência: Rio de Janeiro, 2008, cap. 5.
- Couri, S.; Park, Y.; Pastore, G.; Domingos, A. Em ref. 5, cap. 7.
- Andreus, J.; Cavaco-Paulo, A. Em ref. 5, 2008, cap. 8.
- Duran, N.; Marques, S.; Salles, B. C.; Medeiros, R. G.; Filho E. X. F. Em ref. 5, cap. 9.
- Cruz, M. E. M.; Martins, M. B.; Corvo, M. L.; Gaspar, M. M.; Oliveira, E. M. M.; Ferrara, M. A. Em ref. 5, cap. 13.
- Schmid, A.; Dordick, J. S.; Hauer, B.; Kiener, A.; Wubbolts, M.; Witholt, B.; *Nature* **2001**, *409*, 258.
- Guisan, J. M. Em *Immobilization of Enzymes and Cells*; Guisan J. M., ed.; Humana Press: Totowa, 2006, cap. 1.
- de Castro, H. F.; Zanin, G. M.; de Moraes, F. F.; Sá-Pereira, P. Em ref. 5, cap. 6.
- <http://www.freedoniagroup.com/brochure/25xx/2506smwe.pdf>, acessada em Abril 2010 e Março 2011.
- Hanefeld, U.; Gardossi, L.; Magner, E.; *Chem. Soc. Rev.* **2009**, *38*, 453.
- Lopez-Gallego, F.; Montes, T.; Fuentes, M.; Alonso, N.; Grazu, V.; Betancor, L.; Guisan, J. M.; Fernandez-Lafuente, R.; *J. Biotechnol.* **2005**, *116*, 1.
- Villeneuve, P.; Muderhwa, J. M.; Graille, J.; Haas, M. J.; *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2000**, *9*, 113.
- Dalla-Vecchia, R.; Nascimento, M. G.; Soldi, V.; *Quim. Nova* **2004**, *27*, 623.
- Jegannathan, K. R.; Abang, S.; Poncelet, D.; Chan, E. S.; Ravindra, P.; *Crit. Rev. Biotechnol.* **2008**, *28*, 253.
- Cardoso, C. L.; de Moraes, M. C.; Cass, Q. B.; *Quim. Nova* **2009**, *32*, 175.
- Mateo, C.; Palomo, J. M.; Fernandez-Lorente, G.; Guisan, J. M.; Fernandez-Lafuente-Fernandez, R.; *Enzyme Microb. Technol.* **2007**, *40*, 1451.
- Freitas, L.; Perez, V. H.; Santos, J. C.; de Castro, H. F.; *J. Braz. Chem. Soc.* **2007**, *18*, 1360.
- Berger, J.; Reist, M.; Mayer, J. M.; Felt, O.; Peppas, N. A.; Gurny, R.; *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2004**, *57*, 19.
- Kumar, M. N. V. R.; *React. Funct. Polym.* **2000**, *46*, 1.
- Gupta, K. C.; Jabrail, F. H.; *Carbohydr. Polym.* **2006**, *66*, 43.
- Li, N.; Bai, R.; *Ind. Eng. Chem. Res.* **2005**, *44*, 6692.
- Tsigos, I.; Martinou, A.; Kafetzopoulos, D.; Bouriotis, V.; *Trends Biotechnol.* **2000**, *18*, 305.
- Campagna-Filho, S. P.; Signini, R.; *Polímeros: Ciência e Tecnologia* **2001**, *11*, 169.
- Adriano, W. S.; Mendonça, D. B.; Rodrigues, D. S.; Mammarella, E. J.; Giordano, R. L. C.; *Biomacromolecules* **2008**, *9*, 2170.
- Mendes, A. A.; de Castro, H. F.; Rodrigues, D. S.; Adriano, W. S.; Tardioli, P. W.; Mammarella, E. J.; Giordano, R. C.; Giordano, R. L. C.; *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* (2010), doi:10.1007/s10295-010-0880-9.
- Gabrovská, K.; Marinov, I.; Godjevargova, T.; Portaccio, M.; Lepore, M.; Grano, V.; Diano, N.; Mita, D. G.; *Int. J. Biol. Macromol.* **2008**, *43*, 339.
- Tiwari, A.; Shukla, S. K.; *Express Polym. Lett.* **2009**, *3*, 553.
- George, M.; Abraham, T. E.; *J. Controlled Release* **2006**, *114*, 1.
- Tapia, C.; Escobar, Z.; Costa, E.; Sapag-Hagar, J.; Valenzuela, F.; Basualto, C.; Gai, M. N.; Yazdani-Pedram, M.; *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2004**, *57*, 65.
- Rivero, S.; García, M. A.; Pinotti, A.; *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* **2010**, *11*, 369.
- Airoldi, C.; de Farias, R. F.; *Quim. Nova* **2004**, *27*, 84.
- Simões, A. S.; Mori, R. Y.; Faria, R.; de Castro, H. F.; Mendes, A. A.; *Quim. Nova* **2011**, *34*, 33.
- Paula, A. V.; Moreira, A. B. R.; Braga, L. P.; Bruno, L. M.; de Castro, H. F.; *Quim. Nova* **2008**, *31*, 35.
- Santos, J. C.; Paula, A. V.; Nunes, G. F. M.; de Castro, H. F.; *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2008**, *61*, 229.
- Freitas, L.; Da Rós, P. C. M.; Santos, J. C.; de Castro, H. F.; *Process Biochem.* **2009**, *44*, 1068.
- Smitha, S.; Shajesh, P.; Mukundan, P.; Warriar, K. G. K.; *J. Mater. Res.* **2008**, *23*, 2053.
- Xie, K.; Yu, Y.; Shi, Y.; *Carbohydr. Polym.* **2009**, *78*, 799.
- Shchipunov, Y. A.; *J. Colloid Interface Sci.* **2003**, *268*, 68.
- Al-Sagheer, F.; Muslim, S.; *J. Nanomat.* **2010**, Article ID 490679.
- Rashidova, S. Sh.; Shakarova, D. Sh.; Ruzimuradov, O. N.; Satubaldieva, D. T.; Zalyalieva, S. V.; Shpigun, O. A.; Varlamov, V. P.; Kabulov, B. D.; *J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **2004**, *800*, 49.
- Reetz, M. T.; Zonta, A.; Simpelkamp, J.; *Biotechnol. Bioeng.* **1996**, *49*, 527.
- Gonçalves, V. L.; Laranjeira, M. C. M.; Fávère, V. T.; Pedrosa, R. C.; *Polímeros: Ciência e Tecnologia* **2005**, *15*, 6.
- Monteiro Jr., O. A. C.; Airoldi, C.; *Int. J. Biol. Macromol.* **1999**, *26*, 119.
- Rodrigues, D. S.; Mendes, A. A.; Adriano, W. S.; Gonçalves, L. R. B.; Giordano, R. L. C.; *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2008**, *51*, 100.
- Fangkwangwong, J.; Yoksan, R.; Chirachanchai, S.; *Polymer* **2006**, *47*, 6438.
- Muzzarelli, R. A. A.; *Carbohydr. Polym.* **2009**, *77*, 1.
- Vold, I. M. N.; Christensen, B. E.; *Carbohydr. Res.* **2005**, *340*, 679.
- Lee, C. A.; Tsai, Y. C.; *Sens. Actuators, B* **2009**, *138*, 518.
- Zhou, J. Q.; Wang, J. W.; *Enzyme Microb. Technol.* **2009**, *45*, 299.
- Abd El-Ghaffar, M. A.; Hashem, M. S.; *J. Appl. Polym. Sci.* **2009**, *112*, 805.
- Zhang, Y. W.; Prabhu, P.; Lee, J. K.; *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2009**, *73*, 2234.

56. Tan, Y. L.; Liu, C. G.; Yu, L. J.; Chen, X. G.; *Front. Mater. Sci. China* **2008**, *2*, 209.
57. Çetinus, S. A.; Sahin, E.; Saraydin, D.; *Food Chem.* **2009**, *114*, 962.
58. Prabhu, C.; Wanjari, S.; Gawande, S.; Das, S.; Labhsetwar, N.; Kotwal, S.; Puri, A. K.; Satyanarayana, T.; Rayalu, S.; *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2009**, *60*, 13.
59. Adriano, W. S.; *Tese de Doutorado*, Universidade Federal de São Carlos, Brasil, 2008.
60. Zhang, L. H.; Bai, C. H.; Wang, Y. S.; Jiang, Y. C.; Hu, M. C.; Li, S. N.; Zhai, Q. G.; *Biotechnol. Lett.* **2009**, *31*, 1269.
61. Yapar, E.; Kayahan, S. K.; Bozkurt, A.; Toppare, L.; *Carbohydr. Polym.* **2009**, *76*, 430.
62. Vieira, D. C.; *Dissertação de Mestrado*, Universidade Federal de São Carlos, Brasil, 2009.
63. Elnashar, M. M. M.; Yassin, M. A.; *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2009**, *159*, 426.
64. Chang, M. Y.; Kao, H. C.; Juang, R. S.; *Int. J. Biol. Macromol.* **2008**, *43*, 48.
65. Aranaz, I.; Acosta, N.; Heras, A.; *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2009**, *58*, 54.
66. Azmi, N. E.; Ahmad, M.; Abdullah, J.; Sidek, H.; Heng, L. Y.; Karupiah, N.; *Anal. Biochem.* **2009**, *388*, 28.
67. Katuri, K. P.; Mohan, S. V.; Sridhar, S.; Pati, B. R.; Sarma, P. N.; *Water Res.* **2009**, *43*, 3647.
68. Zhang, J.; Xu, Z.; Chen, H.; Zong, Y.; *Biochem. Eng. J.* **2009**, *45*, 54.
69. Pereira, E. B.; Zanin, G. M.; de Castro, H. F.; *Braz. J. Chem. Eng.* **2003**, *20*, 343.
70. Alsarra, I. A.; Neau, S. H.; Howard, M. A.; *Biomaterials* **2004**, *25*, 2645.
71. Tan, T.; Wang, F.; Zhang, H.; *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2002**, *18*, 325.
72. Benavidez, T. E.; Capra, R. H.; Alvarez, C. I.; Baruzzi, A. M.; *Electroanalysis* **2009**, *21*, 837.
73. Chen, T. X.; Nie, H. L.; Li, S. B.; Branford-White, C.; Su, S. N.; Zhu, L. M.; *Colloids Surf., B* **2009**, *72*, 25.
74. Jin, X.; Wu, Q.; Chen, Q.; Chen, C. X.; Lin, X. F.; *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **2008**, *83*, 1710.
75. Jiang, H.; Du, C.; Zou, Z.; Li, X.; Akins, D. L.; Yang, H.; *J. Solid State Electrochem.* **2009**, *13*, 791.
76. Zhang, L.; Zhu, X.; Zheng, S.; Sun, H.; *Biochem. Eng. J.* **2009**, *46*, 83.
77. Macquarrie, D. J.; Bacheva, A.; *Green Chem.* **2008**, *10*, 692.
78. Zhang, L.; Jiang, Y.; Jiang, Z.; Sun, X.; Shi, X.; Cheng, W.; Sun, Q.; *Biochem. Eng. J.* **2009**, *46*, 186.
79. Manrich, A.; Galvão, C. M. A.; Jesus, C. D. F.; Giordano, R. C.; Giordano, R. L. C.; *Int. J. Biol. Macromol.* **2008**, *43*, 54.
80. Bhandari, S.; Gupta, V. K.; Singh, H.; *Biocatal. Biotransform.* **2009**, *27*, 71.
81. Kumar, S.; Dwevedi, A.; Kayastha, A. M.; *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2009**, *58*, 138.
82. Chen, H.; Liu, L.; Lv, S.; Liu, X.; Wang, M.; Song, A.; Jia, X.; *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2010**, *162*, 24.
83. Manrich, A.; Komesu, A.; Adriano, W. S.; Tardioli, P. W.; Giordano, R. L. C.; *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2010**, *161*, 455.
84. Smaali, I.; Rémond, C.; Skhiri, Y.; O'Donohue, M. J.; *Bioresour. Technol.* **2009**, *100*, 338.
85. Guerfali, M.; Maalej, I.; Gargouri, A.; Belghith, H.; *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2009**, *57*, 242.
86. Mi, F. L.; Shyu, S. S.; Lee, S. T.; Wong, T. B.; *J. Polym. Sci., Part B: Polym. Phys.* **1999**, *37*, 1551.
87. Laus, R.; Laranjeira, M. C. M.; Martins, A. O.; Fávère, V. T.; Pedrosa, R. C.; Benassi, J. C.; Geremias, R.; *Quim. Nova* **2006**, *29*, 34.
88. Roy, I.; Gupta, M. N. Em ref. 11, cap. 8.
89. Andreescu, S.; Bucur, B.; Marty, J. L. Em ref. 11, cap. 9.
90. Ounis, W. B.; Gauthier, S. F.; Turgeon, S. L.; Roufik, S.; Pouliot, Y.; *Int. Dairy J.* **2008**, *18*, 1043.
91. Kobayashi, Y.; Ishizaki, S.; Nagashima, Y.; Shiomi, K.; *Parasitol. Int.* **2008**, *57*, 314.
92. Sousa, F.; Prazeres, D. M. F.; Queiroz, J. A.; *Trends Biotechnol.* **2008**, *26*, 518.