

Datas: 01 e 08/12/2020

Imobilização de enzimas **NanoBioCatalisadores (NBCs)**

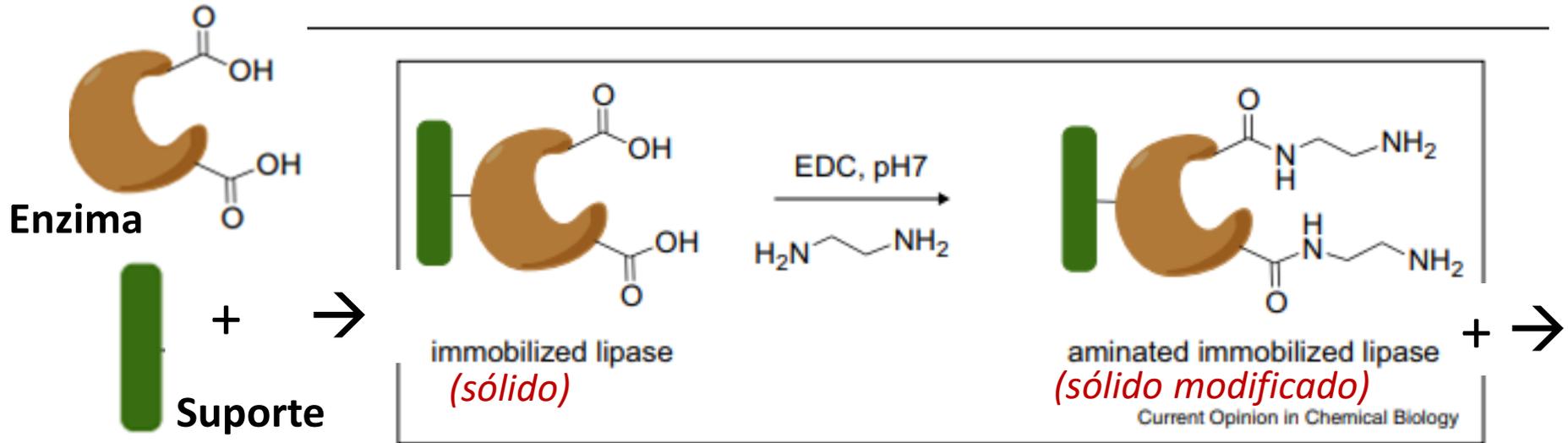
Pontos a considerar:

Estrutura de E

Propriedades de E

Formas de modificação química para criar biocatalisadores com vantagens

Imobilização de enzimas



Chemical amidation of Asp and Glu residues [6].

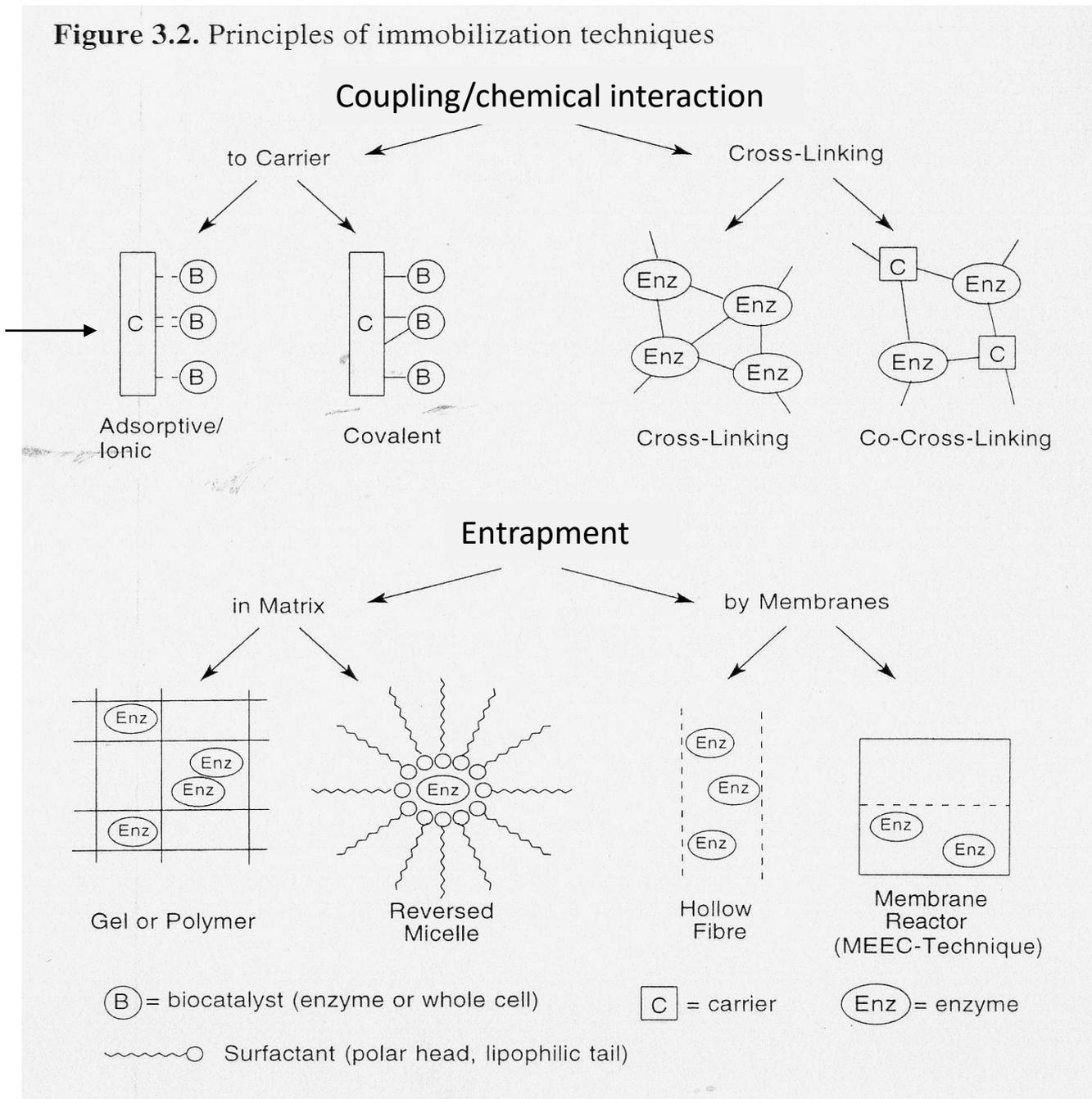
Adaptado de Diaz-Rodriguez & Davis, *Current Opinion in Chemical Biology* 2011, 15:211–219

Imobilização permite:

- Baratear o uso de enzimas em aplicações diversas
- reutilização repetida e em formato contínuo
- uso em reatores
- separação de S que não reagiu e de P solúveis
- pode melhorar E: *propriedades catalíticas, pH de ação, estabilidades*
- pode minimizar a contaminação microbiana de E

Figure 3.2. Principles of immobilization techniques

Enzima
(solúvel)

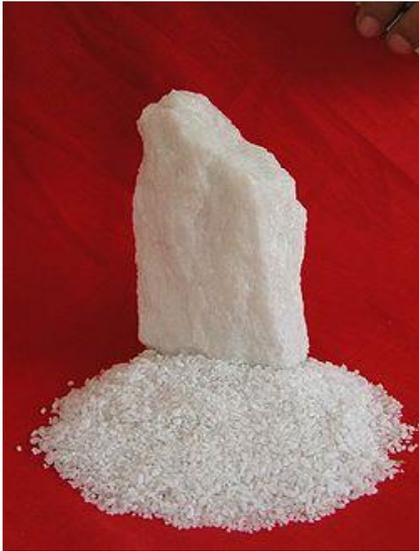


Quando existe o suporte,

Table 6-2. Carrier types.

Organic – synthetic polymer	Organic – biopolymer	Inorganic
Polyamides <ul style="list-style-type: none"> • Nylon Polyalkylene <ul style="list-style-type: none"> • Polystyrene • Polyacrylates • Polyacrylamide • Polyethylene • Polypropylene • Polyvinyl alcohol • Polyvinylacetate • Polyvinylchloride • Polyethylene glycol Polyester <ul style="list-style-type: none"> • Polycarbonate Polyurethane Polysiloxane Phenol-formaldehyde	Polysaccharide <hr/> Cellulose Starch Agarose Dextran Chitin Polyalginate Carrageenan <hr/> Proteinaceous <hr/> Gelatin Collagen Silk Albumin Bone	Minerals <hr/> Sand Pumice Metal oxides Diatomaceous earth Clays <hr/> Synthetic <hr/> Glass, controlled pore glass Zeolites Silica Sol-gel Alumina Metal Oxides Metals

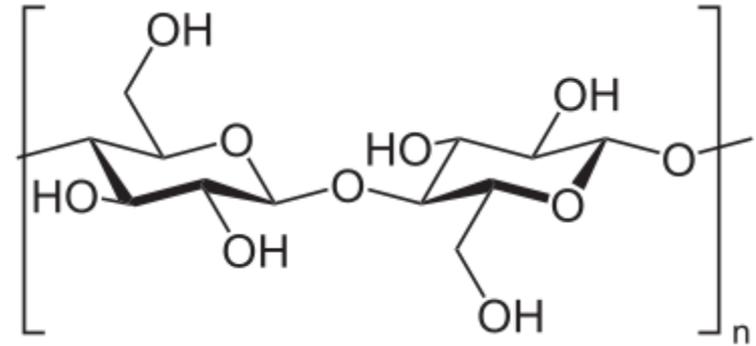
Zeólitas: alumino-silicatos porosos. Ex. $\text{Na}_2\text{Al}_2\text{Si}_3\text{O}_{10} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ = natrolite



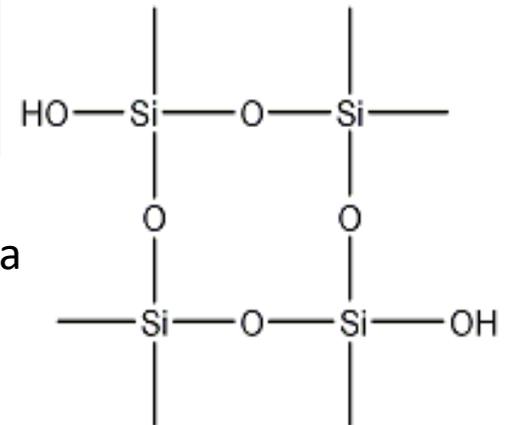
Alumina = óxido de alumínio
(Al_2O_3)



Celite = organismo unicelular
carapaça: sílica



Celulose = polímero de glicose



Imobilização por adsorção

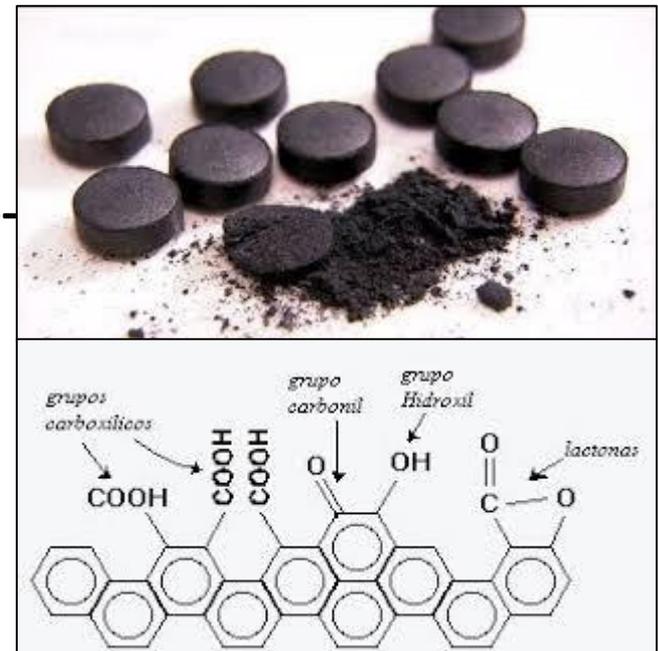
Aplicação: E isolada/ E em células

Forças de interação: fracas London ou Van der Waals
ligações de H
interações hidrofóbicas

Suportes: carvão ativo -----
óxido de alumínio
diatomáceas da terra (celite)
celulose
vidro de porosidade controlada
resinas sintéticas

Perda de atividade de E: baixa (interações fracas)

Desligamento do suporte (*desorção*): alto (variação de [S], solvente, T e pH)

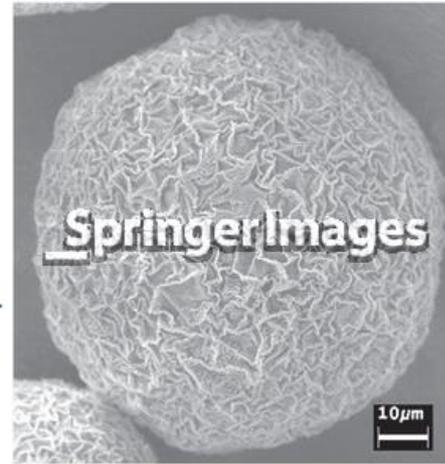
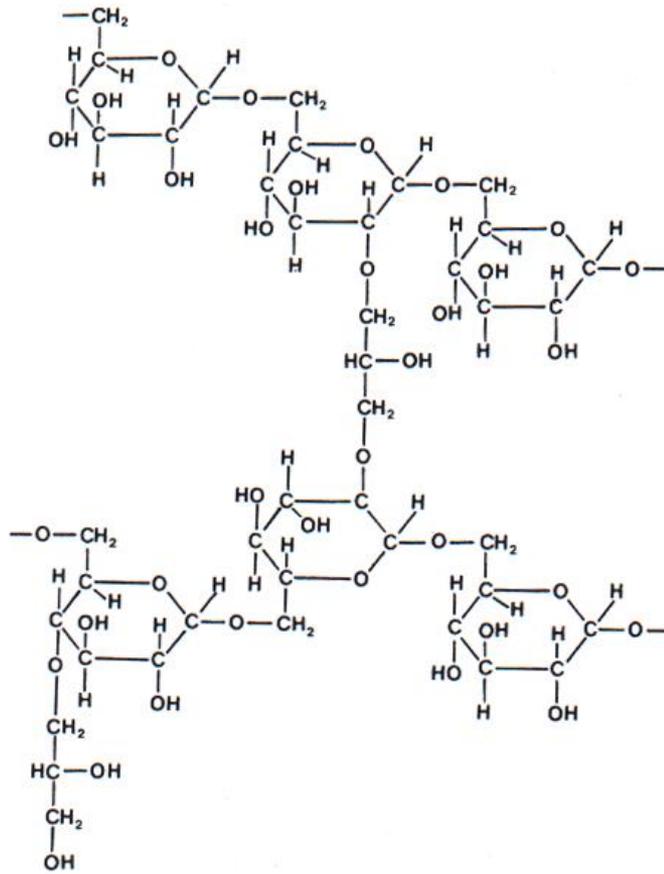


Sephadex

Chemical and physical properties

Sephadex is a bead-formed gel prepared by cross-linking dextran with epichlorohydrin (Fig. 22). Table 5 lists the different G-types of Sephadex and their physical properties.

Grão de Sephadex-G25
(scanning electron micrography)



→ Funcionalizado
com grupo ionizável

carboximetilcelulose

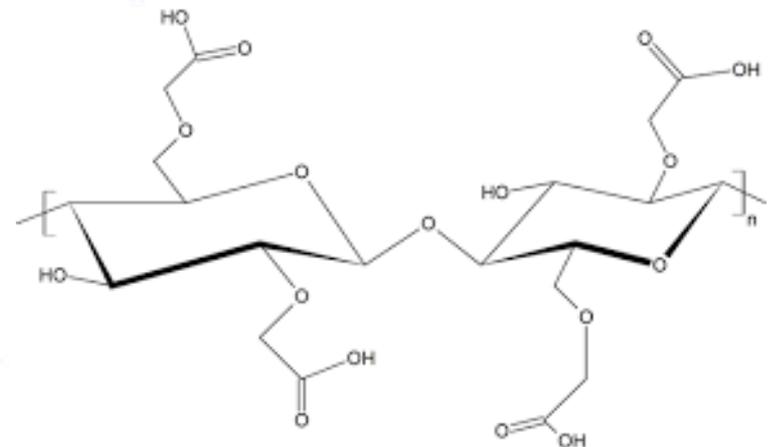
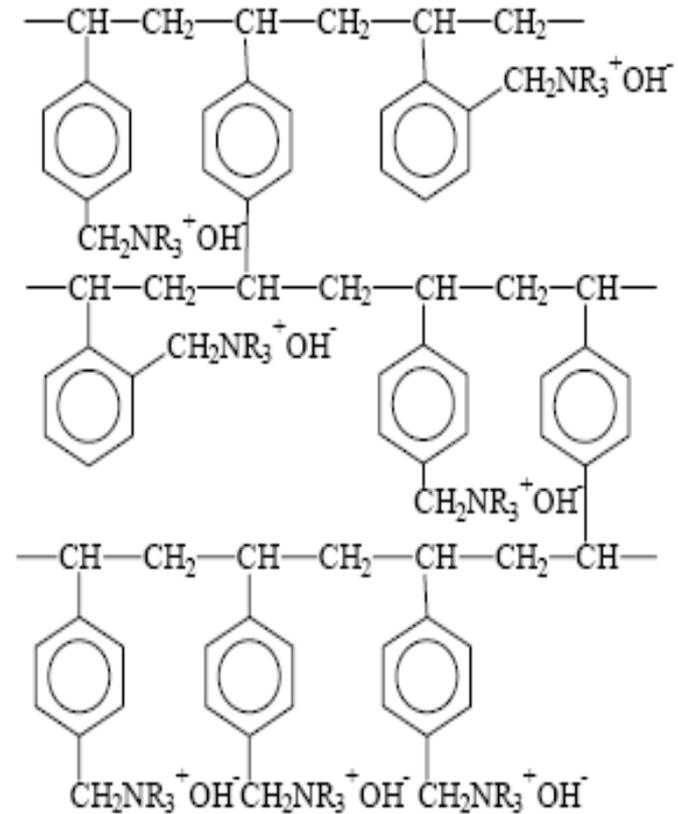
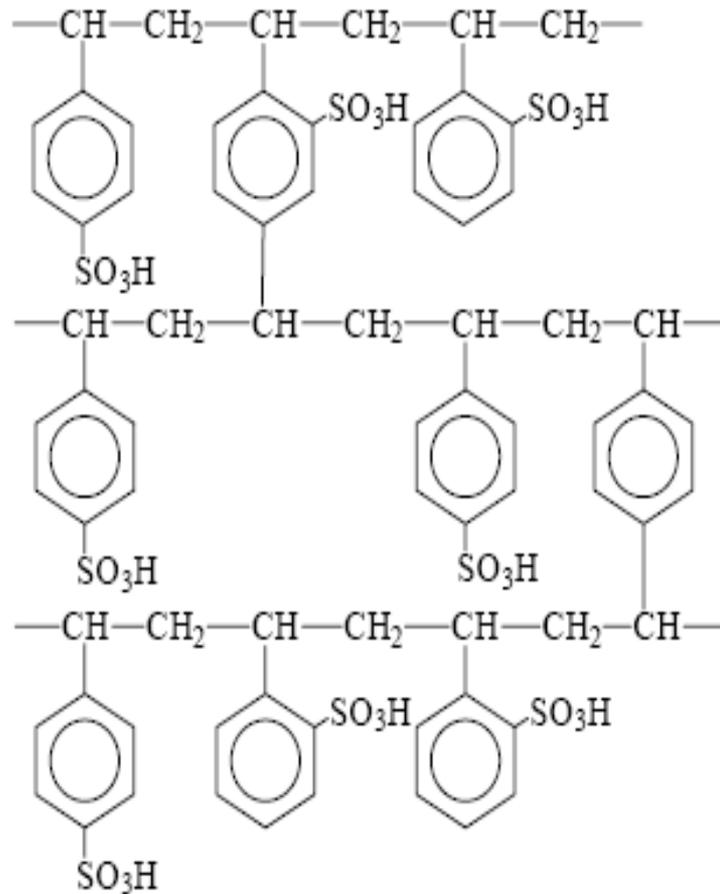


Fig. 22. Partial structure of Sephadex.



resina trocadora de cátions:
poliestireno sulfonado

resina trocadora de ânions:
poliestireno-amônio quaternário

Imobilização por ligação iônica

Aplicação: E isolada/ E em células viáveis

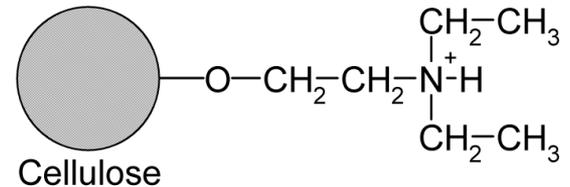
Forças de interação: fracas: interações iônicas

Suportes: resinas poliméricas de troca-iônica
carboximetilcelulose

amberlite

N, N-DiEtilAminoEtilcelulose

Sephadex



Perda de atividade de E: baixa

Desligamento do suporte: médio (depende da presença de sais)

Recomendações:

controle do pH, controle dos íons presentes, recarga de E no suporte

Imobilização por ligação covalente

Aplicação: E isolada

Forças de interação: fortes

Perda de atividade de E:

~alta (< ou ~ 50%)

Suportes:

Vidro poroso

Polissacarídeos: celulose

dextran

amido

quitina

agarose

Copolímeros sintéticos

Resinas de troca-iônica

($COOH \rightarrow COCl \rightarrow p/\text{reação}$)

Desligamento do suporte: baixo

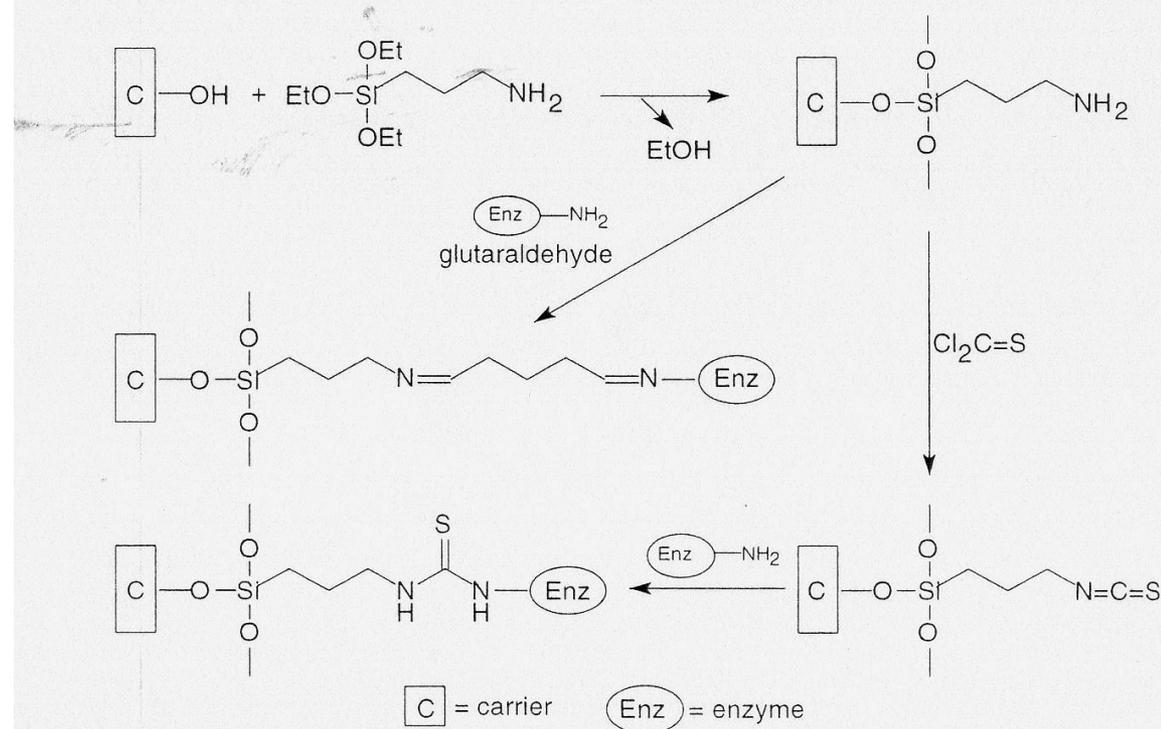
Grupos da enzima envolvidos:

α e ϵ NH_2 (Lys)

SH (Cys)

OH (Ser, Thr, Tyr)

Scheme 3.39. Covalent immobilization of enzymes onto inorganic carriers



Imobilização por formação de ligações cruzadas

formação de agregados de Enzima mantidos por ligações cruzadas (gelatina-like ou CLECs): E + E ou E + Proteína

Aplicação: E isolada

Forças de interação: fortes (ligações covalentes)

Reagentes empregados:

glutaraldeído

Dimetil-adipimidato

Dimetil-submerimidato

hexametilenodiisocianato/isotiocianato

Grupos da Enzima: α e ϵ NH_2 (Lys)

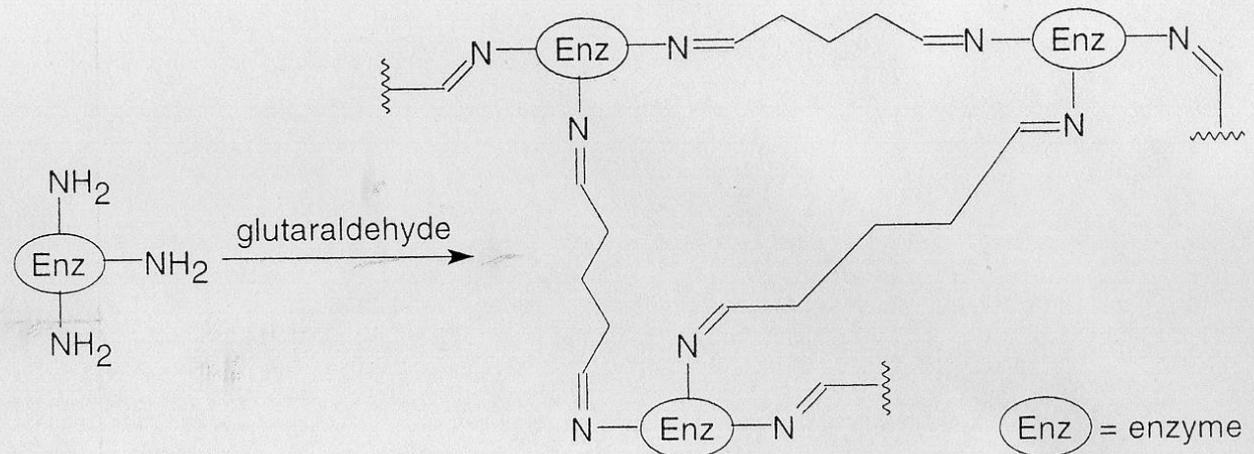
SH (Cys)

OH (Ser, Thr, Tyr)

Perda de atividade:

determinada por
problemas
difusionais

Scheme 3.42. Crosslinking of enzymes by glutaraldehyde



Os materiais de partida podem ser:

- 1) proteínas monoméricas dissolvidas
- 2) forma microcristalina de proteínas monoméricas → CLECS

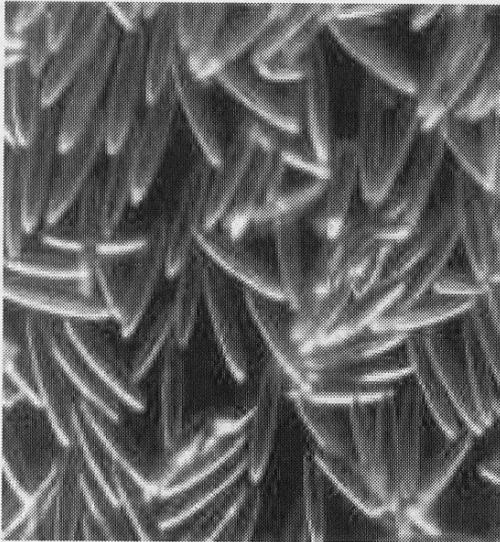


Figure 6-4. Cross-Linked Enzyme Crystals® of Thermolysin, Average Length 40 μm .

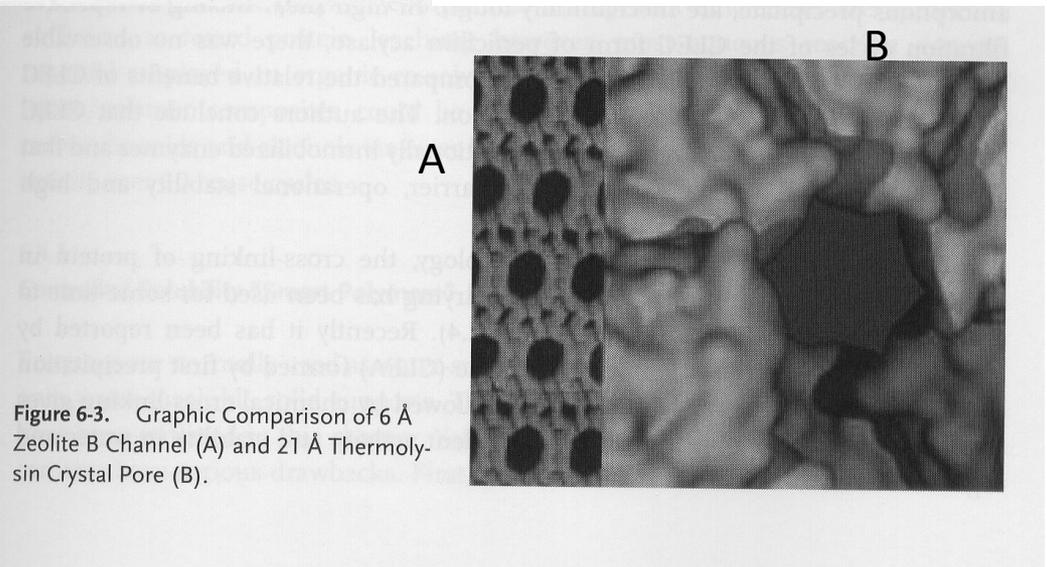


Figure 6-3. Graphic Comparison of 6 Å Zeolite B Channel (A) and 21 Å Thermolysin Crystal Pore (B).

Imobilização por encapsulamento/confinamento em gel

aprisionamento em matriz macroscópica

Aplicação: E isolada/ E em células viáveis

Forças de interação: em princípio, nenhuma

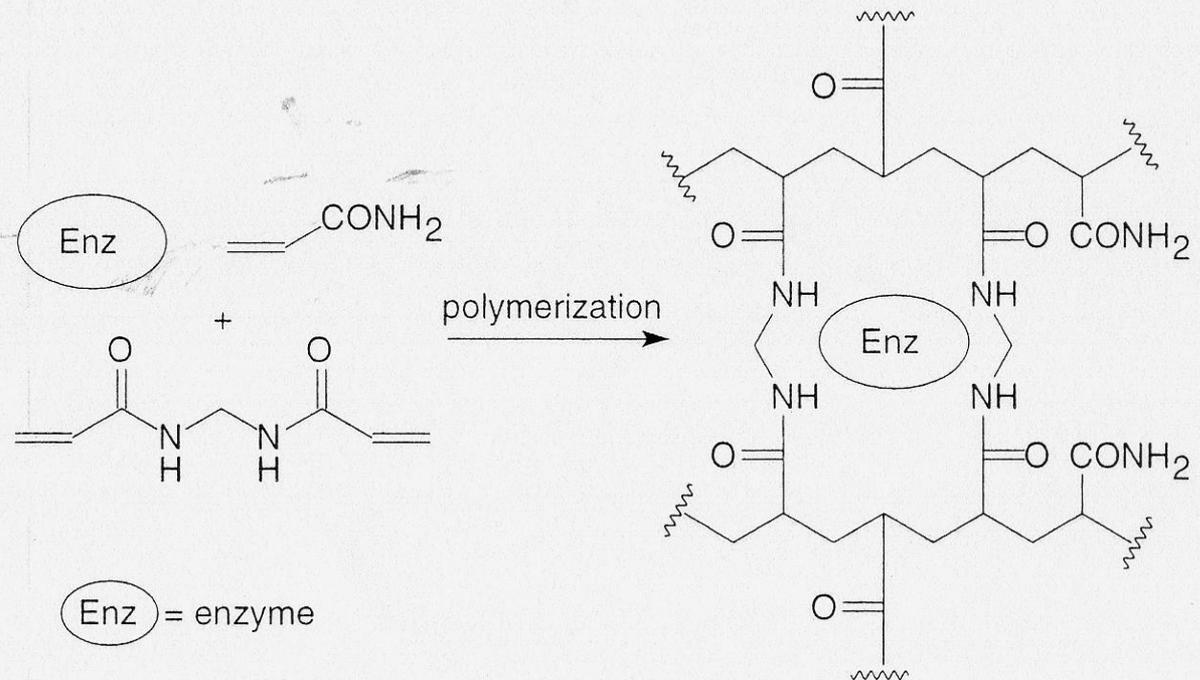
Suportes: forma de grãos/cilindros/"folhas"/fibras
silica-gel após modificação/ gel de agar
géis de alginatos/ K-carragenan

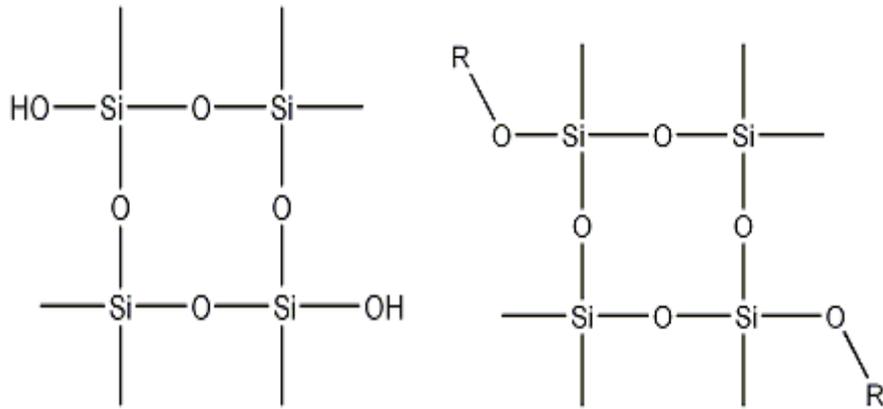
Perda de atividade de E:
baixa

Desligamento do suporte:
limitado a variações de T
e do ambiente iônico

Recomendações:
S e P devem atravessar
a matriz

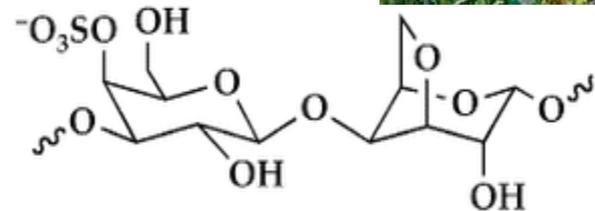
Scheme 3.43. Entrapment of enzymes by polymerization





Sílica-gel natural e modificada

K-carragenanos
(polissacarídeos lineares sulfatados de algas)



β -D-galactose-4-sulphate-3,6-anhydro- α -D-galactose

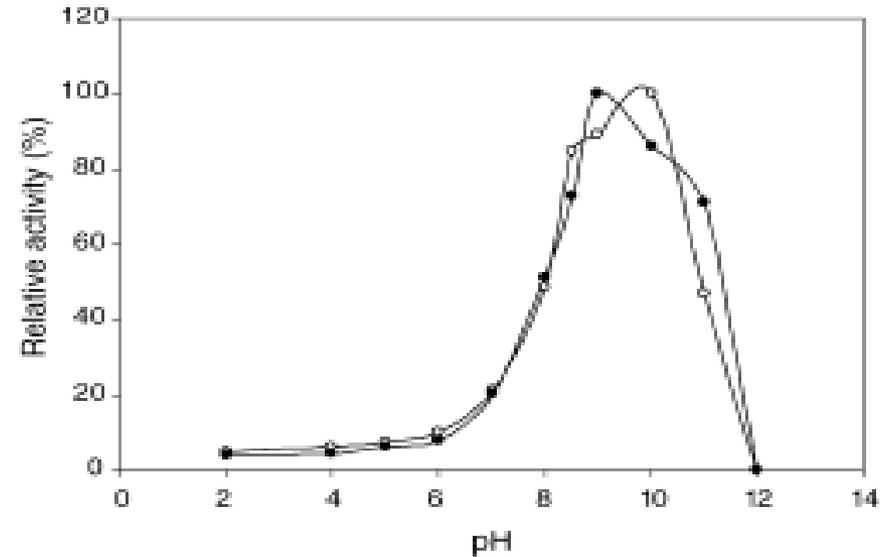
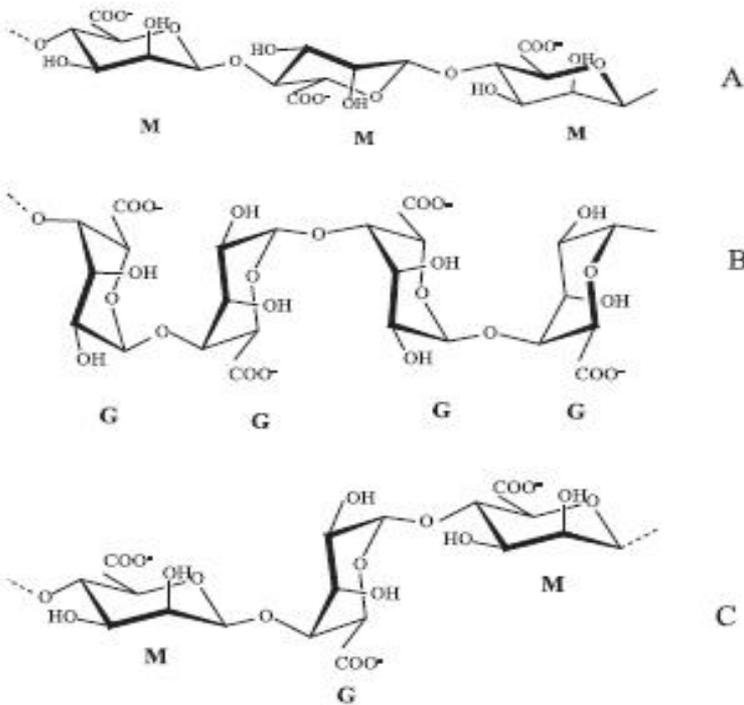


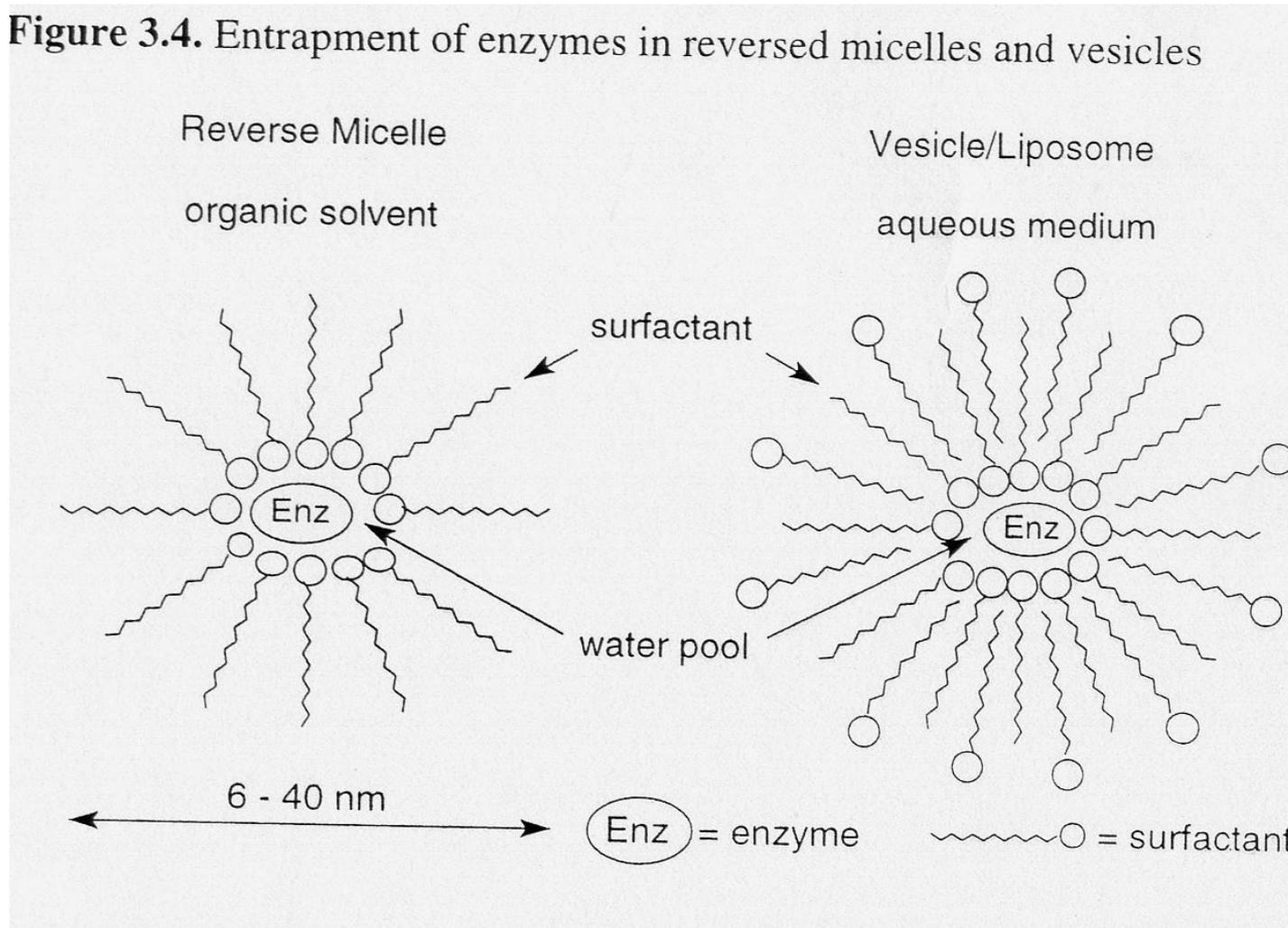
Fig. 2. Effect of pH on the activity of free and immobilized lipase at 35 °C. Free enzyme (○) and immobilized enzyme (●).

Figura 1. Estrutura dos blocos homopoliméricos M- e G- e dos blocos heteropoliméricos MG-, que constituem a molécula de alginato. Em (A) tem-se uma seqüência M—M; em (B) uma seqüência G—G e em (C) uma seqüência M—G—M. Adaptada da ref. 9

Imobilização por encapsulamento em compartimento membranal

*Imitação da “imobilização biológica”; separação de E do meio reacional;
S e P se difundem através da membrana, mas E não!*

Figure 3.4. Entrapment of enzymes in reversed micelles and vesicles



Aplicação: E isolada/ E em células viáveis

Forças de interação: em princípio, nenhuma

Suportes:

**Membranas (folhas e fibras)
sintéticas (tamanho/poro definido)**

- micelas
- vesículas (lipossomos)

Perda de atividade de E: baixa

geralmente E fica mais ativa, mais estável a variações de T, especificidade alterada

→

H₂O interna ≠ H₂O externa (mobilidade restrita, menos ligações de H, maior viscosidade, menor ponto de congelamento)

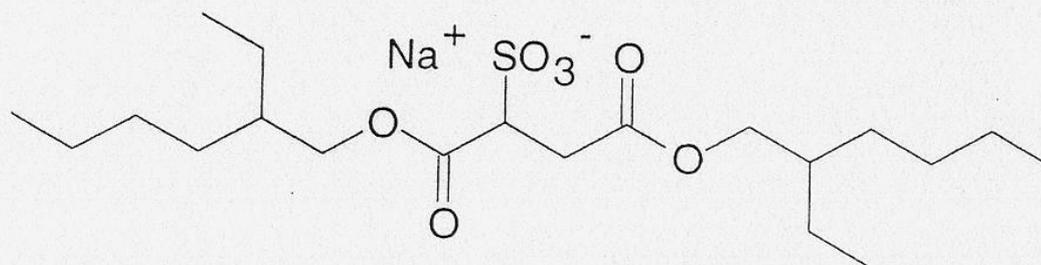
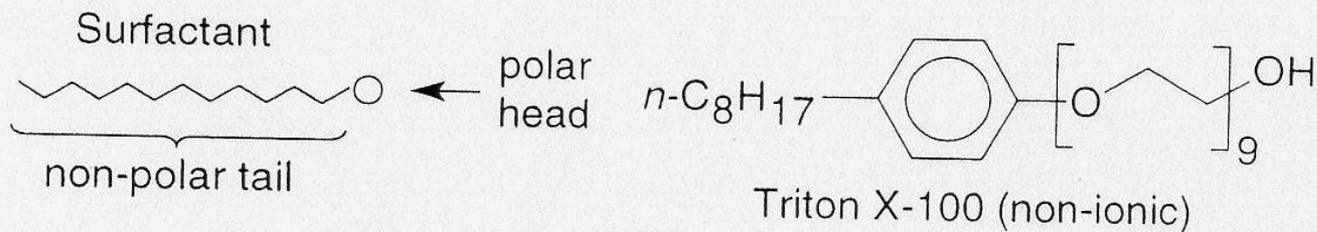
Desligamento do suporte: limitado a variações de T e de ambiente iônico

Recomendações: - S e P devem atravessar a matriz

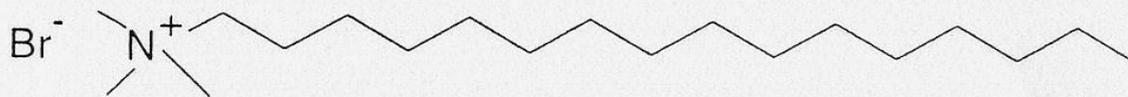
- membranas sintéticas → processos contínuos

(Membrane Enclosed Enzymatic Catalysis)

Scheme 3.44. Commonly employed surfactants



Bis(2-ethylhexyl)sodium sulfosuccinate (AOT, anionic)



Cetyltrimethyl ammonium bromide (CTAB, cationic)

Referências bibliográficas para leitura ou consulta:

Girhlanda, G. Old enzymes, new tricks, *Nature*, 453(8), 164-165, 2008 (leitura)

Diaz-Rodriguez & Davis, *Current Opinion in Chemical Biology* 2011, 15:211–219