

## Imobilização enzimática em matrizes poliméricas

## Enzymatic immobilizations in polymeric matrixes

Martha Vitória Norberto Mesquita, Laércio da Silva Gomes, Luis Felipe Lima Matos, Aylla Beatriz Melo de Oliveira, Daniel Barbosa Nunes, Anallyne Nayara Carvalho Oliveira Cambrussi, Alesssandra Ribeiro Freitas, Alessandra Braga Ribeiro<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal do Piauí– UFPI  
Correspondência: e-mail: alessandra.bragaribeiro@gmail.com

### RESUMO

A imobilização enzimática é uma técnica de retenção de um biocatalisador na aplicação de vários processos envolvidos na produção industrial de alimentos, processamento de materiais, indústrias bioquímicas e químicas, biotecnologia e usos farmacêuticos. Nesse processo a enzima é retida em um suporte ou matriz de material orgânico ou inorgânico, na qual, a matriz orgânica (naturais e sintéticas) é a classe que compõe os polímeros. Os métodos de imobilização mais reportados na literatura são adsorção física, ligação iônica, ligação covalente, reticulação e encapsulação. Desse modo, este trabalho tem como objetivo mapear as pesquisas já desenvolvidas na imobilização enzimática utilizando matrizes poliméricas, destacando as técnicas de imobilização, as matrizes mais utilizadas, as principais enzimas, bem como a fonte enzimática e sua aplicabilidade industrial. O método de imobilização relatado com maior frequência ocorre por meio de ligação covalente, e a matriz polimérica mais utilizada foi a quitosana, por possuir melhor acesso e baixo custo, devido a sua origem orgânica, em comparação às outras. Já a enzima de maior destaque foi a lipase, por possuir grande aplicação em processos biotecnológicos.

**Palavras-chave:** enzimas; quitosana; polímeros.

### ABSTRACT

Enzyme immobilization is a technique for retaining a biocatalyst in the implementation of various processes involved in industrial production of food, materials processing, biochemical and chemical industries, biotechnology and pharmaceutical uses. The enzyme is retained on a frame or array of organic or inorganic material, highlighting the organic matrix (natural and synthetic) which the polymers are one of the main compounds. The immobilization methods are physical adsorption, ionic bond, covalent bond, crosslinking and encapsulation. Thus, this work aims to map the research about enzyme immobilization in polymeric matrixes, highlighting the immobilization techniques, the most commonly polymeric matrix used in the process, the main enzymes, as well as the enzyme source and their industrial applicability. Thus, the immobilization method most cited in the protocols was throughout covalent bond, polymeric matrix highlighted was chitosan, since presents easier access and low cost, due to your organic origin, compared to the others matrix. Finally, the most prominent enzyme was lipase, for possessing great application in biotechnological processes.

**Keywords:** enzymes; chitosan; polymers.

## INTRODUÇÃO

As enzimas são proteínas especializadas que funcionam na aceleração de reações químicas. Essas proteínas são catalisadores versáteis, existindo, em geral, um processo enzimático equivalente para cada tipo de reação orgânica (DALLA-VECCHIA, et al., 2004). O interesse por técnicas que envolvem processos de imobilização enzimática está presente na comunidade acadêmica, científica e industrial desde o século XX, almejando diminuir situações adversas como má solubilidade, variações de pH e altas temperaturas que conseqüentemente degradavam as enzimas (KOCHANE, et al., 2017; SEBRÃO, et al., 2007.). De modo geral, as enzimas livres e imobilizadas diferem quanto às suas características bioquímicas e cinéticas. As alterações verificadas estão relacionadas às mudanças conformacionais na estrutura tridimensional da enzima, na maior estabilidade em condições adversas como altas temperaturas, aumento da solubilidade no meio de reação, maior rapidez na recuperação enzimática, além do custo/benefício (DING et al., 2016; FERNANDEZ-LOPEZ et al., 2016; GILANI et al., 2016).

Imobilização é um termo genérico empregado para descrever a retenção de uma biomolécula e é aplicado na produção industrial de alimentos, processamento de materiais, têxteis, detergentes, indústrias bioquímicas, de cosméticos, químicas e biotecnologia para usos farmacêuticos (DING, et al., 2016). Em alguns processos industriais, as células microbianas inteiras contendo uma enzima desejada são imobilizadas e utilizadas como catalisadores (BARBOSA, et al., 2012). Durante a imobilização é indispensável averiguar as diferentes condições necessárias para o bom desempenho da enzima, levando em consideração as propriedades do processo, a extensão da reutilização da enzima, à escolha da enzima e do suporte ou matriz a serem utilizados (KHOSHNEVISAN et al., 2017).

As vantagens dessa técnica incluem o uso mais eficiente do catalisador por meio de reutilização, possibilidade de processo contínuo, facilidade de separação do produto final, estabilidade ao pH e à temperatura em processos biocatalíticos, remoção de enzima caso o processo seja em batelada, além de tornar o processo menos oneroso (MENDES, et al., 2011). Entretanto, são elencadas desvantagens tais como: dificuldade de encontrar matrizes adequadas para a enzima, possíveis exigências adicionais de purificação do catalisador, técnica pouco adequada a substratos insolúveis ou de alto peso molecular, restrições difusionais e

impedimento estérico, além de custo adicional de suportes, baixa estabilidade em altas temperaturas, reagentes e da operação de imobilização (DAI et al., 2017; BRENA, et al., 2006).

Enzimas imobilizadas física ou quimicamente são associadas a um suporte ou matriz, os quais, geralmente são de materiais sólidos porosos, não porosos ou de estrutura de gel, insolúvel em água e inerte (COELHO, et al., 2008), que afetam criticamente a capacidade de ligação das enzimas. Os materiais porosos apresentam uma elevada área superficial interna disponível para a imobilização de enzimas, porém o diâmetro dos poros do suporte deve ser satisfatoriamente grande para acomodar a enzima e permitir o acesso do substrato. Por outro lado, nos não porosos a acomodação das moléculas de enzima ocorre apenas na sua superfície externa, o que facilita a interação do catalisador com moléculas de substrato (RESENDE, et al., 2016).

As matrizes podem ser de composição orgânica ou inorgânica, sendo as primeiras subdivididas em materiais naturais ou sintéticos (NISHA, et al., 2012). Apesar dos sintéticos possibilitarem combinações variadas para um suporte ideal, os naturais apresentam vantagens como baixo custo, fácil degradação, além de evitar danos ao meio ambiente (LIMA, et al., 2013). Dentre os diferentes suportes empregados na imobilização de enzimas destacam-se os orgânicos poliméricos naturais e sintéticos, conforme descrito na Tabela 1 (ANDREANI, et al.; 2016).

**Tabela 1 – Matrizes poliméricas orgânicas naturais e sintéticas utilizadas na imobilização de enzimas.**

Polímeros naturais	Polímeros sintéticos
Polissacarídeos: Celulose, dextranas, ágar, agarose, quitina, alginato.	Poliestireno
Proteínas: colágeno, albumina.	Outros polímeros: polimetacrilatos de poliácrlato, poliácrlamida, poliamidas, vinilo e alil-polímeros.
Carbono	-

Fonte: Próprio autor, 2017.

Polímeros biodegradáveis utilizados como suporte podem fazer com que células e tecidos se fixem no mesmo, além de conseguirem orientar e regular a proliferação de células aderidas. No entanto, as propriedades hidrófobas intrínsecas de alguns destes polímeros restringe suas aplicações como colonização de materiais, pois o caráter hidrofílico é um dos fatores mais importantes na determinação do nível de atividade de uma enzima imobilizada (BRENA, et. al., 2006).

Considerando o exposto acima, acerca de imobilização enzimática em matrizes poliméricas, o presente trabalho teve como objetivo analisar as principais técnicas de imobilização, as matrizes poliméricas mais utilizadas, principais enzimas imobilizadas, bem como sua origem, além de apresentar sua aplicabilidade em indústrias alimentícias e farmacêuticas.

## MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi realizado utilizando os bancos de dados eletrônicos de publicações sobre o tema: “imobilização enzimática em matrizes poliméricas”, delimitando um período de tempo de dezessete anos (2000 – 2017). A pesquisa foi realizada nas bases de dados Scielo, PubMed, Bireme e Lilacs. Foram utilizadas como descritores as palavras “imobilização”, “enzima”, “matrizes-poliméricas” (bancos de dados nacionais) e “immobilization”, “enzyme”, “polymer matrix” (bases de dados internacionais).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO:

### 3.1. Técnicas de imobilização

As técnicas de imobilização podem ser divididas em diferentes categorias: física, química, enzimática, e métodos de engenharia genética. A relação entre o complexo suporte-enzima, nos quais as enzimas são aprisionadas por meio de interações vão desde adsorção física reversível e ligações iônicas a ligações covalentes estáveis (BRENA, et. al., 2006). Assim, as técnicas de imobilização estão associadas, além dos citados, aos métodos de encapsulamento e reticulação (TWALA, et. al., 2012).

#### 3.1.1 Adsorção física

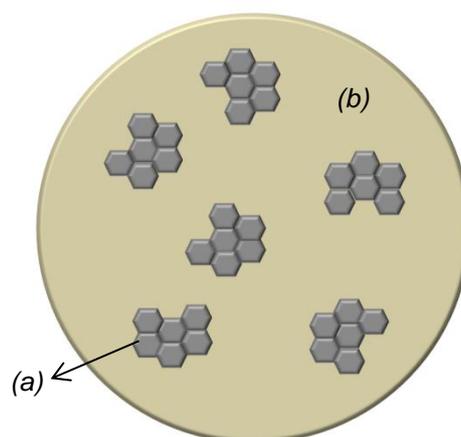
A adsorção física é o método mais simples e o mais empregado para imobilização de enzimas. É possível estabilizar a enzima por interações fracas com o suporte como forças de Van der Waals, pontes de hidrogênio e ligações iônicas (Figura 1). Os principais benefícios deste

processo de imobilização são a facilidade e a simplicidade do processo, o qual pouco modifica a estrutura conformacional da enzima, pois esta é prontamente imobilizada em uma orientação que lhe é preferencial e energeticamente favorável. Ademais, a reutilização do suporte após vários ciclos e a não necessidade de ativação do suporte são vantagens a serem destacadas. A grande desvantagem dessa técnica constitui-se na possibilidade de dessorção da enzima devido às variações de temperatura, pH e força iônica, além da relação pouco conhecida da interação enzima-suporte (RESENDE, et. al., 2016).

O sucesso e a eficácia da adsorção de uma enzima em um suporte dependem de vários parâmetros, tais como dimensão da proteína a ser adsorvida, área superficial do adsorvente e, sobretudo, da porosidade e tamanho dos poros. A concentração enzimática também é um fator primordial: a quantidade de enzima adsorvida por quantidade de suporte aumenta com a concentração do biocatalisador, alcançando um patamar de saturação. Este procedimento, em geral, é realizado a temperaturas constantes (DALLA-VECCHIA, et. al., 2004).

Os principais suportes orgânicos naturais utilizados nesse método são quitosana, dextrano, gelatina, celulose e amido, porém o uso de materiais inorgânicos ou sintéticos também acontece (CARVALHO, et. al., 2015; CETINUS, et. al. 2003). O método consiste basicamente em misturar uma solução aquosa de enzima com o material de suporte durante um período de tempo, logo após, o excesso de enzima é lavado do suporte. O procedimento exige um controle rigoroso do pH e da força iônica, uma vez que estes podem alterar as condições ideais e afetar o nível de adsorção esperado (BOSIO, et. al., 2015).

**Figura 1 - Biocatalisadores ligados a um veículo por adsorção.**



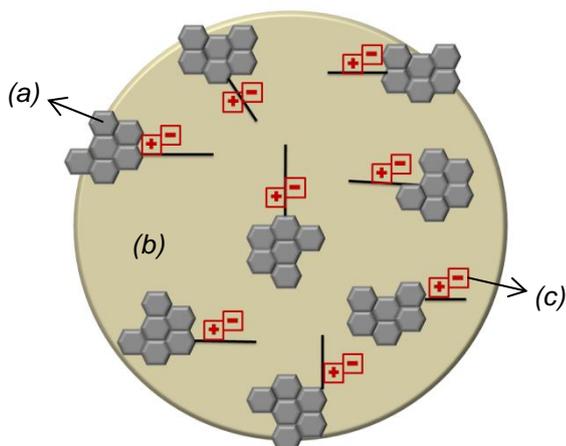
Legenda: (a) enzima imobilizada; (b) suporte de imobilização.

### 3.1.2 Ligação iônica

A imobilização por meio de ligação iônica baseia-se, principalmente, na ligação eletrostática entre moléculas de enzima e moléculas de suportes sólidos contendo cargas iônicas opostas (Figura 2). Neste método, a natureza do suporte define a quantidade de enzima ligada à ele e a atividade dessa enzima após imobilização. Muito semelhante ao procedimento de adsorção física, pois também há inicialmente a preparação enzimática e a natureza iônica das forças de ligação depende de variações de pH, carga de suporte, concentrações de enzima e temperatura. Porém, a força é muito mais forte na ligação iônica que na adsorção física, embora menos forte que a ligação covalente (COSTA, et. al., 2004).

Alguns suportes orgânicos utilizados para ligação iônica são derivados polissacarídicos como dietilaminoetilcelulose, dextrano, quitosana e carboximetilcelulose (PACHECO, et.al., 2014; REHMAN, et. al., 2013). A imobilização por este método tem como vantagem poucas alterações na conformação enzimática, que só ocorrem em pequena extensão, isso resulta em enzimas imobilizadas com alta atividade. A principal desvantagem é a possível interferência de outros íons e o desprendimento fácil quando não há uma manutenção correta das condições de pH (COSTA, et. al., 2004).

**Figura 2 - Biocatalisadores ligados a um suporte por ligação iônica.**



Legenda: (a) enzima imobilizada; (b) suporte de imobilização; (c) ligação iônica.

Fonte: Elaborada pelo autor

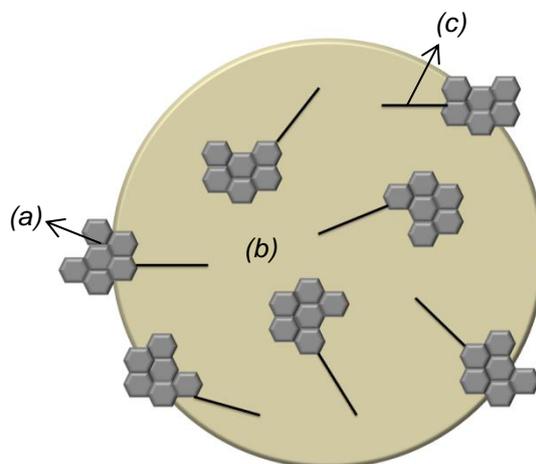
### 3.1.3 Ligação covalente

A imobilização por ligação covalente consiste na interação da enzima com o suporte por ligações covalentes (Figura 3), a qual essa

ligação é considerada bastante forte e normalmente retêm vários resíduos de enzimas, viabilizando uma grande firmeza na sua estrutura, a qual mantém essa proteína estabilizada em condições de altas temperaturas, em meio orgânico, pH extremos e outros (RESENDE, et. al., 2016).

Os métodos covalentes de imobilização são aplicados quando o produto final não possa, de forma alguma, conter resíduos da enzima. Portanto, o biocatalisador necessita apresentar forte estabilidade com a matriz, dependendo da sua natureza, para gerar as reações necessárias na obtenção do produto de interesse. Logo, esse procedimento requer a ativação da matriz, por adição de uma função reativa a um polímero e modificação estrutural do mesmo para fornecer um processo ativo. Contudo, o rendimento dessa imobilização é relativamente baixo quando associado ao custo produtivo, pois a ligação enzima-suporte é irreversível (BRENA, et. al., 2006).

**Figura 3 - Ligação covalente entre os biocatalisadores e um suporte.**



Legenda: (a) enzima imobilizada; (b) suporte de imobilização; (c) espaçador da ligação covalente.

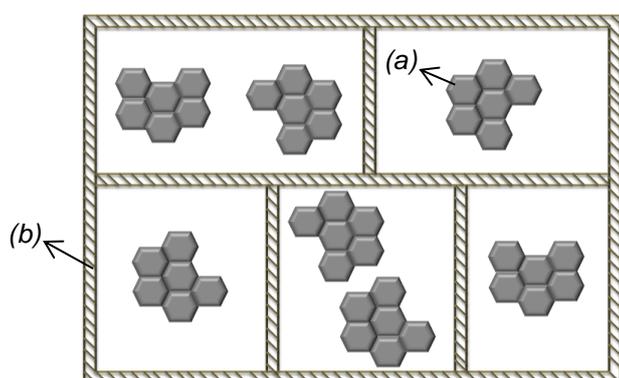
Fonte: Elaborada pelo autor

### 3.1.4 Encapsulação

A encapsulação consiste na retenção física da enzima em cavidades internas de uma matriz sólida porosa formada comumente por polímeros entrecruzados como poliácridamida, gelatina, alginato de cálcio, agarose, carragenana, resinas de poliuretano e amido (MENDES, et. al., 2011). Neste método, a rede polimérica formada aprisiona a enzima em microporos (Figura 4), isso proporciona proteção e preservação da enzima encapsulada, pois impede o contato direto com o meio reacional, minimizando, assim, os efeitos de inativação (BUTZKE, et. al., 2009).

Outras vantagens observadas resumem-se na possibilidade da imobilização simultânea de um ou mais tipos de proteínas com qualquer grau de purificação, sem que haja alterações estruturais destas; e a área superficial extremamente grande entre o substrato e a enzima, dentro de um volume relativamente pequeno. Por outro lado, as principais desvantagens relacionam-se a alta concentração de enzima necessária para garantir a encapsulação, o controle do tamanho dos poros, os possíveis efeitos de difusão de substratos e/ou produtos no interior da matriz porosa e a dessorção da enzima na presença de diferentes tamanhos de poros (RESENDE, et. al., 2016, MENDES, et. al., 2011, COSTA, et. al., 2004)

**Figura 4 - Encapsulamento enzimático numa matriz.**



Legenda: (a) enzima imobilizada; (b) encapsulamento em matriz

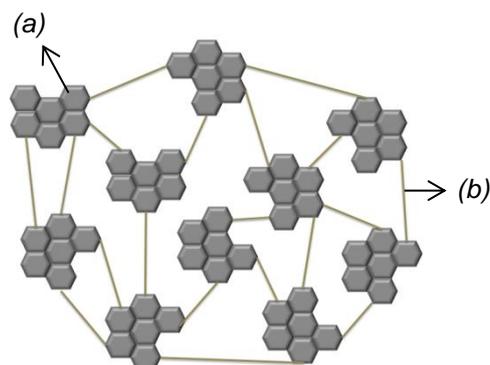
Fonte: Elaborada pelo autor

### 3.1.5 Reticulação

A reticulação é um método que envolve a formação de ligações covalentes entre os biocatalisadores, por meio de reagentes bi ou multifuncionais quando se necessitam utilizar duas ou mais enzimas associadas (PRABHAWATHI, et. al., 2014). Logo, os derivados imobilizados são inteiramente organizados a partir dessa técnica entre um agente reticulante e distintas preparações enzimáticas, tais como a enzima solubilizada. (RESENDE, et. al., 2016)

A vantagem dessa técnica é a simplicidade, porém as desvantagens relacionam-se com a produção de partículas frágeis e difusão limitada. Como na reticulação, as enzimas se envolvem por ligações covalentes (Figura 5), as mesmas quando imobilizadas sofrem alterações na sua conformação morfológica, acarretando uma possível perda de atividade catalítica (COSTA, et. al., 2004).

**Figura 5 - Biocatalisadores imobilizados por meio de reticulação.**



Legenda: (a) enzima imobilizada; (b) ligação covalente entre enzimas.

Fonte: Elaborada pelo autor

### 3.2. Suportes para imobilização

O bom desempenho da enzima a ser imobilizada depende, em maior parte, da contribuição do suporte, e a escolha deste ser diretamente relacionada às características da enzima e de suas condições de uso (MILETIC, et. al. 2009; GAIO, et. al. 2016). O suporte deve ser biocompatível com a proteína catalisadora a fim de torná-la conciliável aos seus substratos e cofatores. Destacam-se como suportes para imobilização enzimática os polímeros naturais como alginato, quitosana, agarose, carragenina, por suas características não tóxicas e biodegradáveis (SANTOS, et. al., 2015). A facilidade e a abundância em obter-se o suporte devem ser consideradas visando menores custos e produção em larga escala (CANILHA, CARVALHO e SILVA, 2006).

Diversos tipos de materiais são utilizados como suporte (Tabela 2), dentre com destaque para a quitosana. Esse polímero é uma forma desacetilada da quitina, sendo o segundo polímero mais abundante na natureza depois da celulose, diferenciando-se somente nos grupos funcionais (GEORGE e ABRAHAM, 2006). A quitina é obtida a partir da carapaça de crustáceos como caranguejo e camarão, considerados resíduos da indústria pesqueira (KRAJEWSKA, 2004). A maior produção do biopolímero em escala comercial encontra-se no Japão (TSIGOS, et. al., 2000). A larga aplicação da quitosana como suporte está relacionada às suas diferentes configurações como pó, escamas, hidrogéis, membranas, fibras, cápsulas e esponjas (KUMAR, 2000) isso confere ao suporte sua utilização em vários procedimentos, como hidrólise da caseína, amido

e lactose, quando empregado as enzimas corretas, além de produção de etanol e quantificação de creatinina (MENDES, 2011; REHMAN, 2013; GRAEBIN, 2017; GILANI, 2016).

### 3.3 Principais enzimas imobilizadas

As enzimas são escolhidas de acordo com alguns fatores, os quais são indispensáveis para a manutenção da sua atividade catalítica, além de evitar a desnaturação da mesma. Com isso, é necessário avaliar a estabilidade de fixação ao suporte, para serem imobilizadas, e a estabilidade enzimática (COELHO, et. al., 2008). Ademais, a seleção da enzima depende da facilidade de obtenção, visando evitar custos excessivos, bem como a sua aplicabilidade em processos produtivos. Na Tabela 2 foram destacadas algumas enzimas, sua origem de extração, dispondo as cinco mais observadas: lipase, alfa-amilase, peroxidase, pectinase e a enzima glutationa oxidase (GOx) (HSU, et. al., 2016; MANOJ, et. al. 2017).

Dentre as enzimas utilizadas na imobilização em matrizes poliméricas, a mais citada na literatura é a lipase (BARBOSA, et. al. 2014; DALLA-VECCHIA, et. al. 2004). A lipase é uma enzima que catalisa reações de hidrólise parcial ou total de triacilgliceróis em ácidos graxos livres, mono e diacilgliceróis, agindo também em reações de esterificação, interesterificação e transesterificação, quando em ambiente com limitações de água (WANG, XU, e TIANYU, 2008). A sua origem é predominantemente microbiológica, sendo de derivação fúngica, como produto da *Candida rugosa*, *Penicillium verrucosum*, *Rhizomucor miehei*, *Aspergillus oryzae* e *Penicillium notatum*, e de origem bacteriana produzida por *Burkholderia cepacia*. Adicionalmente essa enzima pode ser extraída de pâncreas suínos (GILANI, et. al., 2016; SCHERER, et. al. 2012).

A alfa-amilase é aplicada para a hidrólise do amido, sobretudo na indústria de panificação, para a produção de álcool e bebidas alcoólicas, para a fabricação de xaropes de glicose, para o acabamento de papéis e tecidos, dentre outras (BIAZUS, et. al. 2006; ALMEIDA, et. al. 2017). Assim como muitas outras enzimas sua origem é bacteriana, produzida por *Bacillus stearothermophilus* e *Bacillus subtilis* (STRAKSYS, et. al., 2016). Pode ser obtida também através de sua extração de pâncreas suínos (GONG, et. al., 2017).

A peroxidase é utilizada na biorremediação de compostos aromáticos, incluindo pesticidas, hidrocarbonetos aromáticos policíclicos e dioxinas,

como antioxidantes, como indutores para processamento de alimentos, em bioeletrodos e na síntese de materiais condutores (METIN, et. al., 2016). A enzima é originada da extração do látex de *Euphorbia tirucalli*, uma planta usada como antihelmíntico, antissifilítico e antitumoral na medicina tradicional (SHUKLA. et. al., 2017)

A pectinase é um grupo heterogêneo de enzimas responsáveis pela hidrólise do polímero pectina, existente na parede celular de plantas. Originada como produto da bactéria *Bacillus licheniformis*, e também do fungo *Aspergillus aculeatus*, pode ser aplicada nas indústrias de para clarificação e redução da viscosidade sucos de frutas como também, para tratamento de resíduos vegetais, degomagem de fibras nas indústrias têxteis e de papel. (REHMAN, et. al., 2014; UENOJO, et. al. 2007).

A enzima glutationa oxidase (GOx) é atribuída como protetor de proteína que impede o dinucleotídeo de flavina e adenina (FAD) de transferir elétrons sem esforço para o eletrodo também utilizada para detecção de glicose. A enzima é de origem fúngica, sendo o *Aspergillus niger* tipo II utilizada na produção da enzima (HSU, et. al., 2016; MANOJ, et. al. 2017).

Segundo Nagarajan (2012) essa amplitude de utilização de enzimas microbianas se dá devido à necessidade de um menor tempo para sua produção, uma maior facilidade de manipulações genéticas, e o aumento de escala e purificação, e sua boa especificidade e estabilidade. Além disso, destacam-se as enzimas de origem fúngica, uma vez que essas possuem baixo custo para a produção e para a obtenção dos seus meios de cultivo, o que facilita o seu isolamento (SHUKLA e CHERYAN, 2002).

### CONCLUSÕES:

Para a ampliação do uso da imobilização de enzimas em matrizes poliméricas, em larga escala, é necessária uma intensa e contínua busca por novos suportes e protocolos de imobilização, os quais preservem a atividade catalítica da enzima após o processo de imobilização, anulem ou minimizem as interações prejudiciais entre as enzimas e os suportes, que sejam de baixo custo de aquisição e com elevado potencial para aplicações comerciais diretas. O uso majoritário de matrizes orgânicas poliméricas nessa área é resultado da atual necessidade de processos industriais sustentáveis com menores custos e maior eficiência, além de ser biodegradáveis e apresentarem menor ou até mesmo nenhuma toxicidade. Logo um conhecimento consolidado desse tipo de matriz

juntamente com o uso simultâneo da enzima imobilizada possibilita o desenvolvimento de novos produtos de interesse biotecnológico.

## REFERÊNCIAS:

- ALMEIDA, C. M. S. et al. Immobilization of amylase using chitosan beads as support. **Scientia Plena**, v. 13, n. 11, 2017.
- ANDREANI, E. S. et. al. Coating polypropylene surfaces with protease weakens the adhesion and increases the dispersion of *Candida albicans* cells. **Rev. CrossMark.**, 2016.
- ASGHER, M. et. al. Enhancement of catalytic, reusability, and long-term stability features of *Trametes versicolor* IBL-04 laccase immobilized on different polymers. **International Journal of Biological Macromolecules**. v. 95, p. 54-62, 2017.
- BARBOSA, A.S. et. al. Imobilização de lipase por encapsulação em sílica aerogel. **Rev. Quím. Nova**, v. 37, n. 6, p. 969-976, 2014.
- BIAZUS, J. P. M. et al. Otimização da secagem do malte de *Zea mays*. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 4, p.787-792, 2006
- BRENA, B. M. et. al. **Immobilization of Enzymes**. Methods in Biotechnology: Immobilization of Enzymes and Cells, Second Edition, Totowa, NJ, p. 15-26, 2006.
- BLUSHAN, I. et. al. Heparin depolymerization by immobilized heparinase: A review. **Rev. Biological Macromolecules**, v. 99, p. 721-730, 2017.
- BOSIO, V. E. et. al. Nanodevices for the immobilization of therapeutic enzymes. **Crit Rev Biotechnol**, 2015.
- BUTZKE, D.; SILVA, D. A. K. Aplicação de redes poliméricas semiinterpenetrantes (semi-rpi) na imobilização do bti: estudo da incorporação e da atividade do biocida encapsulado. **Congresso Brasileiro de Polímeros**, Foz do Iguaçu, Brasil. 2009.
- CANILHA, L. et. al. Uso de células e enzimas imobilizadas em processos biotecnológicos. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, v. 36, p.48-57, 2006.
- CARVALHO, N. B. et. al. Uso de sílicas modificadas para imobilização de lipases. **Quím. Nova**, São Paulo, v. 38, n. 3, p. 399-409, 2015.
- CETINUS, S.A. et. al. Immobilization of catalase into chemically crosslinked chitosan beads. **Enzyme Microb. Technol.**, v. 32, p. 889, 2003.
- COELHO, M. A. Z. et. al. **Enzimas Imobilizadas**. Enzimologia Industrial, Rio de Janeiro: editora EPUB, 2008.
- COSTA, S. A. et. al. Enzyme Immobilization in Biodegradable Polymers for Biomedical Applications. **Biodegradable Systems in Tissue Engineering and Regenerative Medicine**, p. 301-318, 2004.
- DALLA-VECCHIA, R. et. al. Aplicações Sintéticas de Lipases Imobilizadas em Polímeros. **Química Nova**, v. 27, n. 4, p. 623-630, 2004.
- DAI, H. et. al. Pineapple peel carboxymethyl cellulose/polyvinylalcohol/mesoporous silica SBA-15 hydrogel composites for papain immobilization. **Carbohydrate Polymers** v. 169, p. 504-514, 2017.
- DENG, H. et. al. An Interference free Glucose Biosensor Based on an Anionic Redox polymery Mediated Enzymatic Oxidation of Glucose. **Rev. Chemphyschen articles**, 2013.
- DING, C. et. al. Immobilization of enzyme on chiral polyelectrolyte surface. **Analytica Chimica Acta**, v. 952, p. 88-95, 2017.
- FERNANDEZ-LOPEZ, L. et. al. Physical crosslinking of lipase from *Rhizomucor miehei* immobilized on octyl agarose via coating with ionic polymers Avoiding enzyme release from the support. **Process Biochemistry** v. 54, p. 81-88, 2017.
- GAIO, I. et. al. Rendimento de Imobilização de Pectinases Imobilizadas em Matriz Polimérica Inorgânica. XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática, **ENZITEC**, Jul 17–20, Caxias do Sul, Brasil. 2016.

- GEORGE, M.; ABRAHAM T.E. Polyionic hydrocolloids for the intestinal delivery of protein drugs: Alginate and chitosan - A review. **J Control Release.**; v. 114, n.1, p. 1-14, 2006.
- GILANI, S. L. et. al. Stability of immobilized porcine pancreas lipase on mesoporous chitosan beads: A comparative study. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 133, p. 144-153, 2016.
- GONG, W. et. al. Lignin from bamboo shoot shells as an activator and novel immobilizing support for  $\alpha$ -amylase. **Food Chemistry**, v. 228, p. 455-462, 2017.
- GOULART, A.J. et. al. Glucose and Fructose Production by *Saccharomyces cerevisiae* Invertase Immobilized on MANAE-Agarose Support. **Rev. Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, p. 169-175, 2013.
- GRAEBIN, N. G. et. al. Dextranase immobilized on activated-chitosan particles as a novel biocatalyst. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, 2017.
- HSU, C. Y. et. al. A Co(II)-based metallo-supramolecular polymer as a novel enzyme immobilization matrix for electrochemical glucose biosensing. **European Polymer Journal**, v. 83, p. 499-506, 2016.
- IDRIS, S. et. al. Influence of gamma irradiation on polymerization of pyrrole and glucose oxidase immobilization onto poly (pyrrole)/poly (vinyl alcohol) matrix. **Applied Surface Science**, v. 400, p. 118-128, 2017.
- JASNI, M. J. F. et. al. Fabrication, characterization and application of laccase-nylon G, G/Fe<sup>3+</sup> composite nanofibrous membrane for 3,3'-dimethylbenzidine detoxification. **Rev. Cross Mark**, 2016.
- JIANG, J. F. et. al. Fabrication of enzyme reactor utilizing magnetic porous polymer membrane for screening D-Amino acid oxidase inhibitors. **Talanta**, v. 165, p. 251-257, 2017.
- KHOSHNEVISAN, K., et al. Immobilization of cellulase enzyme onto magnetic nanoparticles: Applications and recent advances. **Molecular Catalysis**, v.442, p. 66-73, 2017.
- KIM, H.J. et. al. Bacterial Cellulase- chitosan Composite Hydrogel Beads for Enzyme Immobilization. **Rev. Biotechnology and Bioprocess Engineering**. p. 89-94, 2016.
- KOCHANE, T. et. al. Polyurethane-gold and polyurethane-silver nanoparticles conjugates for efficient immobilization of maltogenase. **Colloids and Surfaces A**, 2017.
- KRAJEWSKA, B. Application of chitin- and chitosan-based materials for enzyme immobilizations: a review. **Enzyme Microb Technol**, v. 35, n 2-3, p.126-39, 2004.
- KUMAR, M. N. V. R. A review of chitin and chitosan applications. **React Funct Polym**, v. 46, n. 1, p. 1-27, 2000.
- LI, P. et. al. Lipase immobilized on rosin-based functional polymers as a biocatalyst for the synthesis of ethyl dodecanoate. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, 2016.
- LIMA, A. F. et. al. Comparative biochemical characterization of soluble and chitosan immobilized -galactosidase from *Kluyveromyces lactis* NRRL Y1564. **Process Biochemistry**. v. 48, p. 443-452, 2013.
- MANOJ, D. et. al. Aldehyde functionalized ionic liquid on electrochemically reduced graphene oxide as a versatile platform for covalent immobilization of biomolecules and biosensing. **Rev. Biosensors and Bioelectronics**, v. 103, p. 04-112, 2017.
- MENDES, A. A. et. al. Aplicação de Quitosana como suporte para a imobilização de enzimas de interesse industrial. **Química Nova**, v. 34, n. 5, p. 831-840, 2011.
- MENONCIN, S. et. al. Imobilização de lipases produzidas por fermentação em estado sólido utilizando *Penicillium verrucosum* em suportes hidrofóbicos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 29, n. 2, p. 440-443, 2009.
- METIN, A.U. et. al. Fibrous polymer-grafted chitosan/clay composite beads as a carrier for immobilization of papain and its usability for mercury elimination. **Rev. Cross Mark**, 2016.

- MILETIC, N. et al. Macroporous poly (glycidyl methacrylate-co-ethylene glycol dimethacrylate) resins- Versatile immobilization supports for biocatalysts. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 56, p. 196-201, 2009.
- MOHAMED, S. A. et. al. Immobilization of horseradish peroxidase on amidoximated acrylic polymer activated by cyanuric chloride. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 91, p. 663-670, 2016.
- MOREIRA, M. A. et. al. Imobilização de lipases em filme de caseinato de sódio/glicerol: aplicação na síntese de ésteres. **Química Nova**, v. 30, n. 5, p. 1182-1187, 2007.
- NAGARAJAN, S. **Application. Biochemistry. Biotechnol.** v. 168, p. 1163, 2012.
- NISHA S. et. al. A review on methods, application and properties of immobilized enzyme. **Che Sci Rev Lett**, v. 1, n. 3, p. 148-155, 2012.
- ORTIZ, J. J.V. et. al. Desorption of lipases immobilized on octyl- agarose beads and coated with ionic polymer after thermal inactivation. **Res. Molecules**, 2017.
- PAULA, A. V. et. al. Comparação do desempenho da lipase de *Candida rugosa* Imobilizada em suporte de polissiloxano-polivinilálcool empregando diferentes metodologias. **Química Nova**, v. 31, n. 1, p. 35-10, 2008.
- PACHECO, T. F. et al. Aplicação de celulases imobilizadas na hidrólise de *Brachiaria brizantha*. **Congresso Brasileiro de Engenharia Química**, Out 19–23. Florianópolis, Brasil. 2014.
- PERVEZ, S. et al. Role of two polysaccharide matrices on activity, stability and recycling efficiency of immobilized fungal amyloglucosidase of GH15 family. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 96, p. 70-77, 2017.
- PRABHAWATHI et. al. Antibiofilm properties of interfacially active lipase immobilized *Porous Polycaprolactone* prepared by lb technique. **PLoS ONE**, v. 9, n. 5, 2014.
- RAJDEO, K. et. al. Immobilization of pectinase on reusable polymersupport for clarification of apple juice. **Food and Bioproducts Processing**, v. 99, p. 12-19, 2016.
- REHMAN, U. H. et. al. Immobilization of pectinase from *Bacillus licheniformis* KIBGE-IB21 on chitosan beads for continuous degradation of pectin polymers. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, n. 3, p. 282-287, 2014.
- REHMAN, U. H. et. al. Immobilization of pectin degrading enzyme from *Bacillus Licheniformis* KIBGE IB-21 Using agar-agar as a support. **Rev.Carbohydrate Polymers**, v. 102, p. 622-626, 2014.
- REHMAN, H. U. et. al. Immobilization of pectin depolymerising polygalacturonase using different polymers. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 82, p. 127-133, 2016.
- REHMAN, S. et. al. Improved catalytic properties of *Penicillium notatum* lipase immobilized in nanoscale silicone polymeric films. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 97, p. 279-286, 2017.
- RESENDE, R. R. et. al. Imobilização Enzimática: Princípios Fundamentais e Tipos de Suporte. **Biotechnologia aplicada à Agro&Indústria: Fundamentos e Aplicações**, São Paulo: v. 4, p. 529-556, 2016.
- SANCHES, S. R. et. al. Immobilization of commercial cellulase and xylanase by different methods using two polymeric supports. **Rev. Scientific Reseach**, v. 5, p. 517-526, 2014.
- SANTOS, F. M. S.; SANTOS, R. M. C. DOS; MELO, M. N.; LIMA, Á. S.; ALVAREZ, H. M.; SOARES, C. M. F.; FRICKS, A. T.; Imobilização de peroxidase de raiz forte por encapsulamento em microesferas de alginato na presença de líquidos iônicos imidazólicos. **Blucher Chemical Engineering Proceedings**, v.1, n. 2., 2015.
- SANDU, T. et. al. Functionalized bicomponent polymer membranes as supports for covalent immobilization of enzymes. **Reactive and Functional Polymers**, v. 96, p. 5-13, 2015.

- SCHERER, R. P. et al. Influence of process parameters on the immobilization of commercial porcine pancreatic lipase using three low-cost supports. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v.1, n. 4, p. 290-294, 2012.
- SHEN, L. et. al. Immobilization of enzyme on a polymer surface. **Surface Science**, v. 648, p. 53-59, 2016.
- SHUKLA. A. et. al. Immobilization of *Euphorbia tirucalli* peroxidase onto chitosan-cobalt oxide magnetic nanoparticles and optimization using response surface methodology. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 102, p. 384-395, 2017.
- SILVA, D. F. et. al. Immobilization of papain on chitin and chitosan and recycling of soluble enzyme for deflocculation of *Saccharomyces cerevisiae* from bioethanol distilleries. **Hindawi Publishing Corporation**, 2015.
- SILVA, R. L. F. O. B. et. al. Imobilização de enzimas de milho maltado em gel. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, p. 642-648, 2008.
- SRIVASTAVA, G. et. al. Immobilisation of fenugreek  $\alpha$ -amylase on chitosan/pvp blend and chitosan coated PVC beads: A comparative study. **Food Chemistry**, v. 172, p. 844-851, 2015.
- SHUKLA, R.; CHERYAN, M. Performance of ultrafiltration membranes in ethanol-water solutions: effect of membrane conditioning. **Journal of Membrane Science**, v. 198, p. 75-85, 2002.
- STRAKSYS, A. et. al. Catalytic properties of maltogenic  $\alpha$ -amylase from *Bacillus stearothermophilus* immobilized onto poly(urethane urea) microparticles. **Food Chemistry**, v. 211, p. 294-299, 2016.
- TSIGOS I, et. al. Chitin deacetylases: New, versatile tools in biotechnology. **Trends Biotechnol.**, v. 18, n. 7, p. 305-312, 2000.
- TWALA, B. S. et. al. Immobilisation and characterisation of biocatalytic co-factor recycling enzymes, glucose dehydrogenase and NADH oxidase, on aldehyde functional ReSyn<sup>TM</sup> polymer microspheres. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 50, p. 331-336, 2012.
- UENOJO, M., PASTORE, G. M. Pectinolytic enzymes: Industrial applications and future perspectives. **Rev. Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 388-394, 2007.
- WANG, D.; XU, Y.; TIANYU, S.; **Biochem. Eng. J.** 2008.
- WONG, D. E. et. al. Immobilization of chymotrypsin on hierarchical nylon 6,6 nanofiber improves enzyme performance. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 154, p. 270-278, 2017.
- YANG, L. et. al. Synthesis of the light/pH responsive polymer for immobilization of  $\alpha$ -amylase. **Materials Science and Engineering C**, v. 71, p. 75-83, 2016.
- YING, H. et. al. Ionic strength-response hyperbranched polyglycerol/polyacrylic acid hydrogel for the reversible immobilization of enzyme and the synthesis of biodiesel. **Energy Conversion and Management**, v. 144, p. 303-311, 2017.
- YUCE-DURSUN, B. et. al. Preparation and characterization of sol-gel hybrid coating films for covalent immobilization of lipase enzyme. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 127, p. 18-25, 2016.
- ZHANG, Y. et. al. Bioinspired immobilization of Glycerol Dehydrogenase by Metal Ion-Chelated polyethyleneimines as Artificial polypeptides. **Rev. scientific reports.**, 2016.
- ZHOU, Y. et. al. Optimal immobilization of  $\beta$ -glucosidase into chitosan beads using response surface methodology. **Rev. Electronic Journal of Biotechnology**, 2013.

**Tabela 2 – Métodos de imobilização enzimática em suportes de matrizes poliméricas.**

Técnica de Imobilização	Enzima Imobilizada	Origem da enzima	Suporte de Imobilização	Referência
Adsorção física	Amilase	Malte de milho	Alginato de sódio	SILVA, et. al., 2008.
	Lipase	<i>Candida rugosa</i> tipo VII (Sigma-Aldrich Chemical)	Polissiloxano-polivinil álcool	PAULA, et. al., 2008.
	Lipase	<i>Penicillium verrucosum</i>	Resina polimérica	MENONCIN, et. al., 2009.
	Pectinase	<i>Bacillus licheniformis</i>	Quitosana	REHMAN, et. al., 2014.
	Cellulase	Novozymes	Alginate-chitin	SANCHES, et. al., 2014.
	Glicerol desidrogenase	<i>Klebsiella pneumonia</i>	Polietilenoiminas	ZHANG, et. al., 2016.
	Papaina	Látex do mamão	Quitosana	METIN, et. al., 2016.
	Invertase	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (Sigma Aldrich)	MANAE-Agarose suporte	GOULART, et. al., 2013.
	Pectinase	<i>Bacillus licheniformis</i>	Agar-ágar	REHMAN, et. al., 2014.
Ligação iônica	Pectinase	<i>Bacillus licheniformis</i>	Quitosana	REHMAN, et. al., 2013.
Ligação covalente	Lipase	<i>Candida rugosa</i> tipo VII (Sigma-Aldrich Chemical)	Polissiloxano-polivinil álcool	PAULA, et. al., 2008.
	Gox	<i>Aspergillus niger</i> tipo II	Co(II)-based metallo supramolecular	HSU, et. al., 2016.
	Tyrosinase	-	Poly (acrylonitrile-co-vinyl acetate)	SANDU, et. al., 2015.
	Alfa-amilase	<i>Bacillus stearothermophilus</i> e <i>Bacillus subtilis</i> (Novozymes)	Poly (urethane urea)	STRAKSYS, et. al., 2016.
	Alfa-amilase	Sigma-Aldrich Chemical	Methoxy poly	YANG, et. al., 2016.
	Dextranucrase	Novozymes A/S	Quitosana	GRAEBIN, et. al., 2017.
	Nitroreductase	Deposição polimerização química de vapor	-	SHEN, et. al., 2016.

	Lipase	Pâncreas de Suínos	Quitosana	GILANI, S. L. et. al., 2016
	Lipase	<i>Candida rugosa</i>	UV-curable hybrid epoxy-silica polymer films	YUCE-DURSUN, et. al., 2016.
	D-Amino acid oxidase	Rim de porco (Sigma-Aldrich)	Membrana polimérica magnética	JIANG, et. al., 2017.
	Lipase	<i>Penicillium notatum</i>	Silicone	REHMAN, et. al., 2017.
	Chymotrypsin	Pâncreas bovino	Nylon 6,6 nanofiber	ANDREANI, et. al., 2016.
	Heparinase	<i>Flavobacterium heparinum</i>	Agarose	BLUSHAN, et. al., 2017.
	Amiloglucosidase	<i>Aspergillus fumigatus</i>	Quitosana-alginato	PERVEZ, et al., 2017.
	Laccase	<i>Trametes versicolor</i> (Sigma-Aldrich)	Nylon 6,6	JASNI, et. al., 2014.
	Lipase	<i>C. rugosa</i> (Sigma-Aldrich)	Quitosana	KIM, et. al., 2017.
Encapsulação	Amilase	Malte de milho	Alginato de sódio	SILVA, et. al., 2008.
	Lipase	<i>Candida rugosa</i> tipo VII (Sigma-Aldrich Chemical)	Polissiloxano-polivinil álcool	PAULA, et. al., 2008.
	Pectinase	<i>Bacillus licheniformis</i>	Quitosana	REHMAN, et. al., 2014.
	Alfa-amilase	Pâncreas de suíno (Sigma-Aldrich Chemical), <i>Bacillus subtilis</i> (Beijing Aoboxing Biotechnology Co., Ltd)	Lignina	GONG, et. al., 2017.
	Peroxidase	Horseradish cv, Yuan Jiang International Co., Ltd	Polímero acrílico amidoximado	MOHAMED, et. al., 2016.
	Lipase	<i>Burkholderia cepacia</i> (Sigma Co, St. Louis)	Sílica	BARBOSA, et. al., 2014.
	Polygalacturona	<i>Bacillus licheniformis</i>	Gel de poliacrilamida de grânulos de alginato de cálcio e agar-agar	REHMAN, et. al., 2014.

	Lacase fungic	Lignina do <i>Trametes versicolor</i>	Agar-agar, poliacrilamida e gelatina.	ASGHER, et. al., 2014.
	Peroxidase	<i>Euphorbia tirucalli</i>	Quitosana	SHUKLA, et. al., 2017.
	Lipase	<i>Penicillium notatum</i>	Silicone polymeric filmes	REHMAN, et. al., 2017.
	GOX	-	Anionic Redox Polymer-Mediated	DENG, et. al., 2013.
Reticulação	Peroxidase	Horseradish cv, Yuan Jiang International Co., Ltd.	Polímero acrílico amidoximado	MOHAMED, et. al., 2016.
	Beta-amilase	Feno-grego ( <i>Trigonella foenum-graecum</i> )	Quitosana	SRIVASTAVA, et. al., 2015.
	Lipase	<i>Rhizomucor miehei</i>	Octil agarose em polímeros iônicos	ORTIZ, et. al., 2017.
	GOx	Sigma-Aldrich Chemical	Polipirrol e poliálcool vinil)	IDRIS, et. al., 2017.
	Lipase	<i>Aspergillus oryzae</i>	Hyperbranched polyglycerol and acrylic acid	YING, et. al., 2017.
	Pectinase	<i>Aspergillus aculeatus</i>	Polyethyleneimine	RAJDEO, et. al., 2014.
	B-glucosidase	(Sigma-Aldrich)	Quitosana	ZHOU, et. al., 2013.
	Lipase	<i>Rhizomucor miehei</i>	Octyl-agarose	FERNANDEZ-LOPEZ, et. al., 2017.