

CAPÍTULO 3

IMOBILIZAÇÃO DE PEROXIDASE DE RAIZ FORTE POR APRISIONAMENTO E LIGAÇÃO COVALENTE EM SUPORTE HÍBRIDO DE ALGINATO-PECTINA E ALGINATO-PECTINA-AMIDO

Data de aceite: 21/03/2024

Ani Caroline Weber

Universidade do Vale do Taquari
Lajeado - Rio Grande do Sul
<http://lattes.cnpq.br/8238624023188773>

Bruno Eduardo da Silva

Universidade do Vale do Taquari
Lajeado - Rio Grande do Sul
<http://lattes.cnpq.br/9474409267081328>

Joana Elisa Willrich

Universidade do Vale do Taquari
Lajeado - Rio Grande do Sul
<https://lattes.cnpq.br/3752000520359166>

Bruna Costa

Universidade do Vale do Taquari
Lajeado - Rio Grande do Sul
<http://lattes.cnpq.br/2255574648252180>

Cristiano de Aguiar Pereira

Universidade do Vale do Taquari
Lajeado - Rio Grande do Sul
<http://lattes.cnpq.br/4370455437960177>

Giovana Schneider

Universidade do Vale do Taquari
Lajeado - Rio Grande do Sul
<https://lattes.cnpq.br/4269473693605873>

Sabrina Grando Cordeiro

Universidade do Vale do Taquari
Lajeado - Rio Grande do Sul
<http://lattes.cnpq.br/2337098282279202>

Daniel Augusto Weber

Universidade do Vale do Taquari
Lajeado - Rio Grande do Sul
<http://lattes.cnpq.br/6003642280026432>

Jéssica Samara Herek dos Santos

Universidade do Vale do Taquari
Lajeado - Rio Grande do Sul
<http://lattes.cnpq.br/8038392775385994>

Eduardo Miranda Ethur

Universidade do Vale do Taquari
Lajeado - Rio Grande do Sul
<http://lattes.cnpq.br/0536800052883688>

Elisete Maria de Freitas

Universidade do Vale do Taquari
Lajeado - Rio Grande do Sul
<http://lattes.cnpq.br/7345668866571738>

Filipa Rego Pinto Gomes

Instituto Politécnico de Leiria – IPLeiria
Leiria - Portugal
<https://www.cienciavivtae.pt/6F1C-0BAD-DC72>

Lucélia Hoehne

Universidade do Vale do Taquari
Lajeado – Rio Grande do Sul
<http://lattes.cnpq.br/1088266827926373>

RESUMO: A peroxidase de raiz forte (HRP) é uma enzima com excelente atividade biocatalítica e potencial de aplicação industrial. Visando aplicações em grande escala, a imobilização enzimática surge como uma alternativa para recuperação e reutilização de enzimas, viabilizando a empregabilidade e diminuindo custos. Neste sentido, o emprego de biopolímeros tem se demonstrado interessante, pois são atóxicos, biodegradáveis, renováveis e com elevada disponibilidade. No entanto, ainda se carece de estudos visando a imobilização de HRP em biopolímeros híbridos contendo alginato, pectina e/ou amido. Desta forma, o presente estudo teve por objetivo imobilizar a HRP, por meio de aprisionamento e ligação covalente, em grânulos de alginato-pectina e alginato-pectina-amido, além de um controle (alginato). Para isto, diferentes composições de géis foram preparadas e extrudadas em solução de cloreto de cálcio por meio de uma seringa e agulha ($\varnothing = 1$ mm). Os grânulos foram reticulados por meio da inserção em solução de glutaraldeído 0,02%. Os parâmetros rendimento, eficiência e recuperação da atividade foram avaliados no tempo 0 h (inicial) e após sete dias de armazenamento. A imobilização de HRP nos grânulos de alginato-pectina-amido demonstrou-se superior em relação aos grânulos de alginato-pectina quando avaliado o conjunto de parâmetros, resultando em uma recuperação de atividade de 11,21% no tempo 0 h e 10,51% após sete dias de armazenamento. No entanto, é importante destacar que a formulação controle (alginato), dentre todas, apresentou a melhor recuperação da atividade após o período de armazenamento. Assim, de modo geral, pode-se concluir que a adição de pectina e/ou amido na composição de géis híbridos de alginato apresenta potencial, no entanto, estudos mais aprofundados e otimizações se fazem necessárias.

PALAVRAS-CHAVE: Horseradish peroxidase. *Armoracia rusticana*. Biopolímero. Suporte híbrido.

IMMOBILIZATION OF HORSERADISH PEROXIDASE BY ENTRAPMENT AND COVALENT BONDING ON ALGINATE-PECTIN AND ALGINATE-PECTIN-STARCH HYBRID SUPPORT

ABSTRACT: Horseradish peroxidase (HRP) is an enzyme with excellent biocatalytic activity and potential industrial application. Aiming at large-scale applications, enzymatic immobilization emerges as an alternative for recovery and reuse of enzymes, enabling employability and reducing costs. In this sense, the use of biopolymers has been shown to be interesting, as they are non-toxic, biodegradable, renewable and highly available. However, there is still a lack of studies aimed at immobilizing HRP in hybrid biopolymers containing alginate, pectin and/or starch. Thus, the present study aimed to immobilize HRP, through entrapment and covalent binding, in beads of alginate-pectin and alginate-pectin-starch, in addition to a control (alginate). For this, different gel compositions were prepared and extruded in calcium chloride solution using a syringe and needle ($\varnothing = 1$ mm). The beads were cross-linked by inserting them in a 0.02% glutaraldehyde solution. The yield, efficiency and activity recovery parameters were evaluated at time 0 h (initial) and after seven days of storage. The immobilization of HRP in alginate-pectin-starch beads was superior to alginate-pectin when evaluating the set of parameters, resulting in an activity recovery of 11.21% at time 0 h and 10.51% after seven days of storage. However, it is important to highlight that the control formulation (alginate), among all, presented the best activity recovery after the storage time. Thus, in general, it can be concluded that the addition of pectin and/or starch in the composition of hybrid alginate

gels has potential, however, further studies and optimizations are necessary.

KEYWORDS: Horseradish peroxidase. *Armoracia rusticana*. Biopolymer. Hybrid support.

1 | INTRODUÇÃO

A peroxidase de raiz forte (Horseradish peroxidase - HRP) é uma enzima pertencente à família das peroxidases, obtida a partir das raízes da espécie *Armoracia rusticana*. A HRP possui eficiente atividade biocatalítica, sendo um biocatalisador ecológico amplamente estudado devido ao constante aumento de seu uso em indústrias, uma vez que a disponibilidade enzimática é de baixo custo e a extração e purificação são relativamente fáceis (LENG *et al.*, 2020). No entanto, para aplicações em grande escala, alguns entraves são observados no emprego da enzima em sua forma livre, como impossibilidade de recuperação e reutilização, uma vez que a HRP é solúvel em água, além de observar-se uma baixa estabilidade ao longo do tempo (LI *et al.*, 2019). Buscando solucionar estes problemas, a imobilização enzimática tem-se demonstrado como uma alternativa promissora.

A imobilização enzimática corresponde ao processo de conversão de uma enzima de sua forma solúvel para uma forma insolúvel, comumente realizada por meio da ligação enzimática a um material sólido e que permite, em muitos casos, a obtenção de um biocatalisador estável com atividade catalítica superior à da enzima livre, capaz de ser reutilizado por diversos ciclos subsequentes (PETRONIJEVIĆ *et al.*, 2021). Diversas técnicas de imobilização são conhecidas e utilizadas, como por exemplo, o aprisionamento e a ligação covalente. Quando imobilizada covalentemente, a enzima fica fortemente ligada ao suporte, minimizando a lixiviação e o vazamento enzimático, favorecendo para que não ocorra a contaminação proteica do produto (ZAHIRINEJAD *et al.*, 2021). No método de aprisionamento, a enzima é aprisionada em uma rede polimérica, conferindo-lhe proteção devido a ausência de contato direto com o meio externo, melhorando a estabilidade e diminuindo o risco de desnaturação e lixiviação (RIBEIRO *et al.*, 2021).

Para a imobilização, inúmeros suportes podem ser empregados, como por exemplo, os biopolímeros. A imobilização de enzimas em biopolímeros é bem estabelecida e tem sido objeto de inúmeros estudos, pois os biomateriais são atrativos devido à sua atoxicidade, biodegradabilidade, flexibilidade e disponibilidade. Dentre os materiais mais promissores para a imobilização de enzimas estão aqueles à base de carboidratos, como alginato, celulose, quitosana, quitina e agarose (IMAM; MARR P.; MARR A., 2021). O alginato é um polissacarídeo carregado negativamente, composto por dois resíduos de isômeros (ácido β -D-manurônico e ácido α -L-gulurônico) ligados por ligações glicosídicas (1 \rightarrow 4), que na presença de íons metálicos bivalentes se reticula, formando um gel de biopolímero (CHENG *et al.*, 2020). Para a imobilização enzimática, o alginato pode ser combinado com outros materiais, formando-se os suportes híbridos (IMAM; MARR P.; MARR A., 2021),

com maior resistência mecânica e menor lixiviação enzimática durante a aplicação (BILAL; IQBAL, 2019).

Neste sentido, alguns biopolímeros que surgem como uma alternativa interessante para combinação ao alginato são o amido e a pectina. O amido é um polissacarídeo natural, produzido pelas plantas como armazenamento de energia, sendo extensivamente empregado em indústrias alimentícias e não alimentícias devido à atoxicidade, baixo custo, ampla acessibilidade, biocompatibilidade e biodegradabilidade (SHOKRI *et al.*, 2022). As pectinas são um grupo de polissacarídeos complexos intimamente relacionados, sendo constituintes estruturais das paredes celulares primárias e secundárias e lamelas médias em tecidos vegetais. Devido às suas excelentes propriedades gelificantes e citocompatibilidade, as pectinas têm sido estudadas em aplicações biomédicas e farmacêuticas, bem como na imobilização enzimática, pois são biocompatíveis, biodegradáveis, de baixo custo, atóxicas e renováveis (BILAL; IQBAL, 2019; NEMIWAL; ZHANG; KUMAR, 2021).

Apesar de o alginato, o amido e a pectina demonstrarem-se como potenciais alternativas para a imobilização enzimática, poucos estudos envolvendo a combinação destes biopolímeros para a formação de um suporte híbrido visando a imobilização de HRP foram encontrados. Desta forma, este estudo teve por objetivo avaliar a imobilização da HRP comercial por aprisionamento e ligação covalente em um suporte híbrido de alginato-pectina e alginato-pectina-amido.

2 | MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Materiais/reagentes químicos

A peroxidase de raiz forte (Horseradish peroxidase - HRP, CAS 9003-99-0, 77332, pó liofilizado, 40 kDa, 173 U/mg), a albumina sérica bovina (CAS 9048-46-8, A2153, pó liofilizado, 66 kDa, $\geq 96\%$) e o glutaraldeído foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). O alginato de sódio grau alimentício foi adquirido da GastronomyLab (Distrito Federal, Brasil), o amido de batata P.A. da Cinética (São Paulo, Brasil), a pectina alimentícia da Mago (São Paulo, Brasil), o fosfato de sódio dibásico anidro P.A. (Na_2HPO_4) e o cloreto de cálcio anidro P.A. da Vetec Química (Rio de Janeiro, Brasil), o ácido orto-fosfórico (H_3PO_4) 85% P.A. da Nuclear (SP, Brasil), o hidróxido de sódio (NaOH) P.A. da Êxodo Científica (SP, Brasil), o guaiacol ($\text{C}_7\text{H}_8\text{O}_2$) da Neon (SP, Brasil), o peróxido de hidrogênio 30% (H_2O_2) da Química Moderna (SP, Brasil) e o corante de Bradford da Bio-Rad (CA, EUA).

2.2 Quantificação de proteínas

A quantificação de proteínas foi realizada pelo método de Bradford (1976), utilizando-se como padrão de proteína a albumina de soro bovino (BSA). A curva de calibração foi construída empregando-se concentrações de BSA equivalentes a 0; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 e

1,0 mg/mL. Para isto, adicionou-se à placa de 96 poços 4 µL de solução de BSA de cada concentração (ou de amostra) em quintuplicata e 200 µL do corante de Bradford (azul brilhante de Coomassie G250). Aguardou-se 10 minutos e procedeu-se com a leitura da absorbância em 595 nm, utilizando-se leitor de microplacas Spectramax (Spectramax i3, Molecular Devices, CA, EUA). Por meio da curva de calibração e das absorbâncias das amostras obtidas, calculou-se a concentração de proteínas.

2.3 Atividade enzimática

A atividade enzimática da HRP livre ou imobilizada foi determinada conforme metodologia adaptada de Queiroz *et al.* (2018), utilizando-se o guaiacol como substrato. Assim, em uma cubeta foram adicionados 2700 µL de tampão fosfato de sódio 0,1 M (pH 6,0), 100 µL de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) 0,01 M, 100 µL de guaiacol 0,1 M e 100 µL de solução enzimática ou 0,1 g de derivado (suporte + enzima imobilizada). Após 1 min de reação, realizou-se a leitura da absorbância em Espectrofotômetro de Absorção Molecular na região do Ultravioleta-Visível (UV-Vis) (Genesys 10S, Thermo Scientific, USA), em 470 nm. Para o branco, substituiu-se a solução enzimática por tampão fosfato de sódio (HRP livre) ou por grânulos de suporte sem a presença de enzima (HRP imobilizada). Por meio das absorbâncias obtidas e empregando-se a Equação 1, calculou-se a atividade enzimática. Uma unidade de atividade enzimática (U) corresponde a quantidade de enzima necessária para catalisar a transformação de 1 µmol de guaiacol por minuto.

$$A. E. (U/mL) = \frac{(Abs(t) - Abs(0)) * V_{total} * 1000}{\epsilon * V_{enzima} * t} \quad (\text{Equação 1})$$

Onde $Abs(t)$ é a absorbância verificada após 1 minuto de reação, $Abs(0)$ a absorbância no tempo 0, V_{total} o volume total na cubeta (3 mL), ϵ o coeficiente de absorvidade molar do guaiacol (26600 L.mol⁻¹.cm⁻¹), V_{enzima} o volume (mL) de solução enzimática adicionada à cubeta e t ao tempo (min) transcorrido.

2.4 Imobilização enzimática

A imobilização enzimática foi realizada conforme metodologia adaptada de Bilal *et al.* (2016). Foram preparadas duas formulações de géis híbridos (alginato-pectina e alginato-pectina-amido), além de uma formulação contendo somente alginato (controle) e o branco (sem enzima), conforme a Tabela 1.

Formulação	Alginato de sódio (% m/v)	Amido (% m/v)	Pectina (% m/v)	Glutaraldeído (% v/v)	HRP(U/mL)
Branco	4	-	-	0,02	-
Alginato	4	-	-	0,02	7,5
Alginato-pectina	4	-	1	0,02	7,5
Alginato-pectina-amido	4	1	1	0,02	7,5

Tabela 1 - Composição das diferentes formulações de géis de alginato para imobilização enzimática

Para todos os géis preparou-se um volume total de 25 mL, de modo que todos os reagentes foram adicionados considerando-se este volume final. Todas as etapas foram realizadas em temperatura ambiente ($22 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$), exceto quando descritos valores diferentes deste. Deste modo, adicionou-se em 20 mL de água ultrapura ($18,2 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}^{-1}$, Milli-Q, Millipore, EUA) quantidades apropriadas de alginato de sódio, amido e/ou pectina, e agitou-se em chapa magnética até a completa homogeneização do gel (inobservância de grumos). Em seguida, quantidade adequada de solução enzimática de HRP previamente preparada em tampão fosfato 0,1 M (pH 6,0) (com atividade de 80,2 U/mL) foi inserida. Agitou-se em chapa magnética por 15 minutos, adicionou-se glutaraldeído 50% (v/v), de modo a se obter uma concentração de 0,02% (v/v) no gel, e completou-se o volume total até 25 mL com água ultrapura. Homogeneizou-se por 2 horas em chapa magnética e deixou-se o gel em repouso a $4 \text{ }^\circ\text{C}$ por 15 horas, para eliminação de bolhas.

O gel obtido para cada formulação foi extrudado separadamente, empregando-se uma seringa e agulha (diâmetro igual a 1 mm), em 150 mL de solução de cloreto de cálcio (CaCl_2) 0,2 M sob agitação magnética branda e mantida a $4 \text{ }^\circ\text{C}$ por meio de banho de gelo. Manteve-se os grânulos sob agitação por 30 minutos, e em seguida, filtrou-se, lavou-se com água ultrapura e inseriu-se em 50 mL de solução de glutaraldeído 0,02% (v/v) à $4 \text{ }^\circ\text{C}$ por 30 minutos, para reticulação. Por fim, os grânulos foram lavados extensivamente com água ultrapura até não se verificar a presença de proteínas nas soluções de lavagem (por meio de leitura da absorbância em espectrofotômetro UV-Vis a 280 nm), e então, armazenados em tubos de polipropileno à $4 \text{ }^\circ\text{C}$ e ao abrigo da luz.

2.4.1 *Rendimento, eficiência de imobilização e recuperação da atividade*

O rendimento, a eficiência de imobilização e a recuperação da atividade enzimática foram avaliados conforme metodologia proposta por Sheldon e Van Pelt (2013). Todos estes parâmetros foram avaliados no tempo inicial (logo após o preparo dos grânulos de HRP imobilizada) e após 7 dias de armazenamento. O rendimento foi calculado por meio da relação entre a atividade imobilizada (atividade inicial total disponibilizada para a imobilização subtraída da atividade enzimática total das soluções remanescentes da

imobilização) e atividade inicial total da solução de enzima livre, conforme a Equação 2.

$$\text{Rendimento (\%)} = \frac{\text{Atividade imobilizada}}{\text{Atividade inicial}} * 100 \quad (\text{Equação 2})$$

Para a determinação da eficiência de imobilização empregou-se a relação entre a atividade observada no suporte (correspondendo a atividade enzimática que se manteve após a imobilização) e a atividade imobilizada, conforme a Equação 3.

$$\text{Eficiência (\%)} = \frac{\text{Atividade observada}}{\text{Atividade imobilizada}} * 100 \quad (\text{Equação 3})$$

A recuperação da atividade corresponde ao rendimento de imobilização multiplicado pela eficiência da imobilização. Este parâmetro possibilita que se tenha uma ideia geral do sucesso da imobilização, sendo calculado conforme a Equação 4.

$$\text{Recuperação da atividade (\%)} = \frac{\text{Rendimento (\%)} * \text{Eficiência (\%)}}{100} \quad (\text{Equação 4})$$

2.5 Análise estatística

Todos os resultados obtidos foram submetidos a análise de variância (ANOVA) e Teste de Tukey a 95% de confiança, empregando-se o *software Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis* - PAST 4.3 (HAMMER; HARPER; RYAN, 2001).

3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste trabalho, a HRP foi imobilizada em um suporte híbrido de alginato-pectina e alginato-pectina-amido. Para fins de comparação, realizou-se ainda a imobilização enzimática em grânulos sem a presença de amido e/ou pectina. Os parâmetros rendimento, eficiência e atividade recuperada para o processo de imobilização foram avaliados no tempo inicial (0 h) e após 7 dias, buscando-se avaliar a estabilidade do derivado. Os resultados obtidos estão expostos na Tabela 1.

Formulação	Inicial			7 dias		
	Rendimento (%)	Eficiência (%)	Atividade recuperada (%)	Rendimento (%)	Eficiência (%)	Atividade recuperada (%)
Alginato	61,31 ± 0,64 ^{aA}	15,86 ± 0,17 ^{bB}	9,72 ± 0,01 ^{bB}	61,01 ± 0,16 ^{aA}	19,04 ± 0,05 ^{aA}	11,62 ± 0,01 ^{aA}
Alginato-pectina	82,26 ± 1,74 ^{aA}	6,83 ± 0,14 ^{cB}	5,62 ± 0,01 ^{cB}	70,39 ± 2,18 ^{aB}	14,77 ± 0,45 ^{cA}	10,39 ± 0,01 ^{cA}
Alginato-pectina-amido	61,65 ± 1,15 ^{bA}	18,18 ± 0,34 ^{aA}	11,21 ± 0,01 ^{aA}	61,33 ± 0,66 ^{bA}	17,14 ± 0,19 ^{bB}	10,51 ± 0,01 ^{bB}

Média ± desvio padrão. Diferentes letras minúsculas em uma mesma coluna indicam diferença estatística significativa ($p < 0,05$) para um mesmo parâmetro entre as diferentes formulações. Diferentes letras maiúsculas em uma mesma linha para um mesmo parâmetro indicam diferença estatística significativa ($p < 0,05$) entre os tempos avaliados (inicial e 7 dias) para uma mesma formulação.

Tabela 1 - Rendimento, eficiência e atividade enzimática recuperada após o processo de imobilização da HRP em alginato, alginato-pectina e alginato-pectina-amido (tempo inicial - 0 h e 7 dias)

A partir dos resultados obtidos para o tempo 0 h, observou-se que a formulação que apresentou o maior rendimento de imobilização foi a contendo alginato-pectina (82,26%), indicando que a combinação destes dois biopolímeros contribuiu para uma maior fixação/imobilização da HRP no suporte. Apesar de a formulação alginato-pectina apresentar o maior rendimento, esta formulação, no presente estudo, resultou na menor eficiência de imobilização, ou seja, apesar de haver um considerável percentual enzimático imobilizado, apenas uma pequena quantidade de enzima permaneceu funcional. A recuperação da atividade sofreu grande influência da baixa eficiência, resultando em 5,62%. Matto, Satar e Husain (2009) imobilizaram peroxidase de cabaço amargo (*Momordica charantia*) e concavalina A em grânulos de alginato-pectina (2,5% de alginato e 2,5% de pectina) e observaram uma eficiência de 51%, valor superior ao observado para o presente estudo (6,83%). A maior eficiência observada por Matto, Satar e Husain (2008) pode estar relacionada às diferenças de composição do gel de alginato ou às características da enzima imobilizada.

Os grânulos imobilizados em alginato-pectina-amido apresentaram um rendimento de imobilização de 61,65%, eficiência de 18,18% (superior à composição alginato-pectina) e recuperação da atividade de 11,21%. Assim, quando observados todos os parâmetros em conjunto (rendimento, eficiência e recuperação da atividade) para o tempo 0 h, a melhor composição foi de alginato-pectina-amido, sendo superior ao controle (alginato). Estes resultados indicam que a adição de amido à composição contribuiu para que a HRP imobilizada permanecesse com uma maior atividade catalítica, ou ainda, para que os grânulos formados apresentassem menor resistência à difusão de substrato/produto, maior transferência de massa e afinidade com o substrato (IMAM; MARR C. P; MARR C.

A., 2021).

Após sete dias de armazenamento, os grânulos de HRP imobilizada em alginato-pectina apresentaram redução no rendimento de imobilização em comparação ao tempo 0 h, enquanto para o alginato-pectina-amido e controle (alginato) valores semelhantes foram observados (sem diferença estatística significativa). A redução observada pode ser justificada pelo vazamento enzimático da HRP da matriz de suporte para o meio externo, um problema comumente relatado e observado em imobilizações desta enzima (MATTO; HUSAIN, 2009; URREA *et al.*, 2021). Com relação a eficiência, pode-se verificar um aumento após 7 dias em relação ao tempo 0 h para formulação alginato-pectina e o controle, relacionado às mudanças estruturais internas nos grânulos do derivado, de modo a possibilitar uma maior atividade catalítica. Ainda, os grânulos de alginato-pectina-amido apresentaram redução de cerca de 1% da atividade catalítica após 7 dias, que pode ser justificada por mudanças estruturais nos grânulos de alginato ou desnaturação enzimática. Uma redução da atividade catalítica ao longo do tempo de armazenamento é comumente observada em imobilizações enzimáticas, no entanto, menos pronunciada do que para as enzimas livres (BILAL; ASGHER, 2015; YAPAOZ; ATTAR, 2020; LATIF *et al.*, 2022).

Refletindo os resultados observados para o rendimento e a eficiência, observou-se um aumento na atividade enzimática recuperada para os grânulos de alginato-pectina e controle, e uma redução para alginato-pectina-amido, de modo que após 7 dias a formulação controle tenha apresentado o maior valor de recuperação da atividade (11,62%), seguida dos grânulos de alginato-pectina-amido (10,51%) e alginato-pectina (10,39%). De modo geral, a adição de pectina e amido aos géis de alginato tem se demonstrado uma potencial alternativa para imobilizações enzimáticas. No entanto, é importante destacar que o presente estudo consiste em uma investigação inicial, de modo que mais pesquisas empregando-se amido e pectina na composição de biopolímeros híbridos se fazem necessárias, bem como a avaliação de outros parâmetros (como pH e temperatura ótimos, cinética e termodinâmica, tempo de armazenamento e potenciais aplicações) e/ou outras enzimas para a imobilização, para que assim se possa verificar com maior embasamento a empregabilidade destes materiais em imobilizações enzimáticas.

4 | CONCLUSÃO

A partir dos ensaios realizados no presente estudo pode-se concluir que a adição de pectina ao alginato, formando-se um gel híbrido de alginato-pectina, contribui para um maior rendimento de imobilização. No entanto, problemas como baixa eficiência e vazamento enzimático são observados. Quando adicionado o amido à composição, além da pectina (alginato-pectina-amido), nota-se um rendimento de imobilização inferior ao observado para alginato-pectina, no entanto, uma eficiência de imobilização superior. Após sete dias de armazenamento, os grânulos de alginato-pectina-amido não apresentaram vazamento

enzimático expressivo, enquanto os grânulos de alginato-pectina apresentaram cerca de 11,9% de vazamento. Por outro lado, a eficiência enzimática apresentou-se superior para os grânulos de alginato-pectina após sete dias em relação ao tempo 0 h, e inferior para alginato-pectina-amido, indicando que mudanças estruturais e conformacionais ocorrem durante o tempo de armazenamento, influenciando na atividade catalítica. Por fim, destaca-se que estudos mais aprofundados, bem como a avaliação de outros parâmetros de imobilização e do imobilizado se fazem necessários.

REFERÊNCIAS

- BILAL, M.; ASGHER, M. Dye decolorization and detoxification potential of Ca-alginate beads immobilized manganese peroxidase. **BMC Biotechnology**, v. 15, n. 111, 2015. <https://doi.org/10.1186/s12896-015-0227-8>
- BILAL, M.; IQBAL, H. M. N. Naturally-derived biopolymers: potential platforms for enzyme immobilization. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 130, p. 462-482, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.02.152>
- BILAL, M.; IQBAL, H. M. N.; SHAH, S. Z. H.; HU, H.; WANG, W.; ZHANG, X. Horseradish peroxidase-assisted approach to decolorize and detoxify dye pollutants in a packed bed bioreactor. **Journal of Environmental Management**, v. 183, n. 3, p. 836-842, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2016.09.040>
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- CHENG, D.; JIANG, C.; XU, J.; LIU, Z.; MAO, X. Characteristics and applications of alginate lyases: a review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 164, p. 1304-1320, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.07.199>
- HAMMER, Ø.; HARPER, D. A. T.; RYAN, P. D. PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. **Paleontologia Electronica**, v. 4, n. 1, p. 1-9, 2001. http://palaeo-electronica.org/2001_1/past/issue1_01.htm
- IMAM, H. T.; MARR, P. C.; MARR, A. C. Enzyme entrapment, biocatalyst immobilization without covalent attachment. **Green Chemistry**, v. 23, p. 4980-5005, 2021. <https://doi.org/10.1039/D1GC01852C>
- LATIF, A.; MAQBOOL, A.; SUN, K.; SI, Y. Immobilization of *Trametes versicolor* laccase on Cu-alginate beads for biocatalytic degradation of bisphenol A in water: optimized immobilization degradation and toxicity assessment. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 10, n. 1, 107089, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2021.107089>
- LENG, Y.; BAO, J.; XIAO, H.; SONG, D.; DU, J.; MOHAPATRA, S.; WERNER, D.; WANG, J. Transformation mechanisms of tetracycline by horseradish peroxidase with/without redox mediator ABTS for variable water chemistry. **Chemosphere**, v. 258, n. 127306, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2021.112038>

LI, J.; CHEN, X.; XU, D.; PAN, K. Immobilization of horseradish peroxidase on electrospun magnetic nanofibers for phenol removal. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 170, p. 716-721, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2021.112038>

MATTO, M.; HUSAIN, Q. Calcium alginate-starch hybrid support for both surface immobilization and entrapment of bitter melon (*Momordica charantia*) peroxidase. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 57, n. 1-4, p. 164-170, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2008.08.011>

MATTO, M.; SATAR, R.; HUSAIN, Q. Application of calcium alginate-starch entrapped bitter melon (*Momordica charantia*) peroxidase for the removal of colored compounds from a textile effluent in batch as well as in continuous reactor. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 158, p. 512-523, 2009. <https://doi.org/10.1007/s12010-008-8396-8>

NEMIWAL, M.; ZHANG, T. C.; KUMAR, D. Pectin modified metal nanoparticles and their applications in property modification of biosensors. **Carbohydrate Polymer Technologies and Applications**, v. 2, n. 100164, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.carpta.2021.100164>

PETRONIJEVIĆ, M.; PANIĆ, S.; SAVIĆ, S.; AGBABA, J.; JAZIĆ, J. M.; MILANOVIĆ, M.; ĐURIŠIĆ-MLADENOVIĆ, N. Characterization and application of biochar-immobilized crude horseradish peroxidase for removal of phenol from water. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 208, n. 112038, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2021.112038>

QUEIROZ, M. L. B.; CONCEIÇÃO, K. C.; MELO, M. N.; SÁNCHEZ, O. C.; ALVAREZ, H. M.; SOARES, C. M. F.; FRICKS, A. T. Imobilização de peroxidase de raiz forte em bagaço de cana-de-açúcar. **Química Nova**, v. 41, n. 9, 2018. <https://doi.org/10.21577/0100-4042.20170279>

RIBEIRO, E. S.; FARIAS, B. S.; CADAVAL JUNIOR, T. R. S.; PINTO, L. A. A.; DIAZ, P. S. Chitosan-based nanofibers for enzyme immobilization. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 183, p. 1959-1970, 2021. <https://doi.org/10.1039/D1GC01852C>

SHELDON, R. A.; VAN PELT, S. Enzyme immobilisation in biocatalysis: why, what and how. **Chem. Soc. Rev.**, v. 42, n. 15, p. 6223-6235, 2013. <https://doi.org/10.1039/c3cs60075k>

SHOKRI, Z.; SEIDI, F.; SAEB, M. R.; JIN, Y.; LI, C.; XIAO, H. Elucidating the impact of enzymatic modifications on the structure, properties, and applications of cellulose, chitosan, starch and their derivatives: a review. **Materials Today Chemistry**, v. 24, n. 100780, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.mtchem.2022.100780>

URREA, D. A. M.; GIMENEZ, A. V. F.; RODRIGUEZ, Y. E.; CONTRERAS, E. M. Immobilization of horseradish peroxidase in Ca-alginate beads: Evaluation of the enzyme leakage on the overall removal of an azo-dye and mathematical modeling. **Process Safety and Environmental Protection**, v. 156, p. 134-143, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.psep.2021.10.006>

YAPAOZ, M. A.; ATTAR, A. An accomplished procedure of horseradish peroxidase immobilization for removal of acid yellow 11 in aqueous solutions. **Water Science & Technology**, v. 81, n. 12, p. 2664-2673, 2020. <https://doi.org/10.2166/wst.2020.326>

ZAHIRINEJAD, S.; HEMMATI, R.; HOMAEI, A.; DINARI, A.; HOSSEINKHANI, S.; MOHAMMADI, S.; VIANELLO, F. Nano-organic supports for enzyme immobilization: scopes and perspectives. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 204, n. 111774, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2021.111774>