

Teresa Raquel Ferreira da Silva

Imobilização covalente de tripsina em membranas de nanofibras poliméricas obtidas por electrofiação

Dissertação de Mestrado na área da Engenharia Química, orientada pelo Professor Doutor Jorge Rocha e pelo Doutor António Jorge Guiomar e submetida ao Departamento de Engenharia Química da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra

Setembro de 2014



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Teresa Raquel Ferreira da Silva

Imobilização covalente de tripsina em membranas de nanofibras poliméricas obtidas por electrofiação

Dissertação de Mestrado na área da Engenharia Química, orientada pelo Professor Doutor Jorge Rocha e pelo Doutor António Jorge Guiomar e submetida ao Departamento de Engenharia Química da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra

Supervisores:

Prof. Doutor Jorge Rocha

Doutor António Jorge Guiomar

Instituições:

Departamento de Engenharia Química

Faculdade de Ciências e Tecnologia

Universidade de Coimbra

Financiamento:

FCT — Fundação Portuguesa para a Ciência e a Tecnologia

Coimbra

2014



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Agradecimentos

Este trabalho de dissertação não poderia ter sido realizado sem o importante contributo, apoio e disponibilidade de diversas pessoas e instituições, às quais quero transmitir o meu sincero agradecimento.

Este trabalho foi realizado no âmbito do Projecto NanoBioCats – Novos materiais poliméricos nanofibrosos para biocatálise e separação em simultâneo (PTDC/CTMPOL/112289/2009), financiado pela Fundação para a Ciência e a Tecnologia (FCT, Portugal) e co-financiado pela União Europeia através das plataformas QREN, POFC – COMPETE e FEDER. Agradeço também à FCT a bolsa de iniciação à investigação que recebi no âmbito deste projecto.

Ao Professor Doutor Jorge Rocha, por me ter aceitado orientar nesta fase final do curso, obrigada por toda a disponibilidade, paciência e por todos os conselhos que se mostraram muito úteis.

Um muito obrigada ao Doutor António Jorge Guiomar, que acompanhou todo o trabalho de mais de perto e que me guiou e orientou de forma incansável, por todos os esclarecimentos prestados e por toda a disponibilidade que teve em me ajudar.

À Susana Pinto e ao Professor Lopes da Silva, da Universidade da Aveiro, pela preparação das membranas usadas neste trabalho e pelas fotomicrografias SEM.

À Mariana Café, aluna da licenciatura em Bioquímica do Departamento de Ciências da Vida da Universidade de Coimbra, pela quantificação da tripsina imobilizada.

À Daniela Rodrigues, pela cedência dos estudos que realizou de enzima livre, de espectros FTIR e termogramas referentes à caracterização das membranas. Não posso deixar de agradecer também a sua ajuda, que foi crucial, principalmente nos primeiros meses quando parecia que tinha caído de “pára-quebras” neste projecto e a sua ajuda foi fundamental. Obrigada também por toda a paciência e pela força nos momentos de desespero.

Aos meus amigos, que me apoiaram e sempre me deram força para continuar, obrigada, nomeadamente à Joana e à Laura, pela paciência e pela troca de ideias. Uma palavra de agradecimento também à Cátia Mendes por toda a ajuda e amizade e outra à Cátia Costa.

Por último, mas não menos importante, agradeço aos meus pais: pela compreensão, pelo incentivo e principalmente por sempre acreditarem que seria capaz de ultrapassar todos os obstáculos inerentes a esta etapa final. À minha irmã, que também me apoiou e me ajudou em tudo o que foi necessário.

A todos, obrigada por tudo!

Resumo

Anualmente, são produzidas em Portugal entre 500 000 a 560 000 toneladas de soro de leite como subproduto da indústria dos lacticínios. Este resíduo é muito rico em proteínas e a sua valorização torna-se vantajosa a nível económico e ambiental. Da hidrólise destas proteínas originam-se peptídeos bioactivos com características muito proveitosas quando aplicados em cosméticos ou fármacos.

Neste trabalho, pretendeu-se contribuir para a criação de um sistema integrado de biocatálise e separação para hidrolisar as proteínas de soro de leite e, ao mesmo tempo, manter a enzima separada dos produtos de reacção. Para o efeito, imobilizou-se a enzima tripsina em membranas de nanofibras constituídas por poli(tereftalato de etileno) e poli(ácido láctico) (PET/PLA), tendo sido testadas três metodologias de imobilização covalente: i) imobilização por ligação covalente (activação do suporte com uma carbodiimida), ii) imobilização por adsorção e reticulação (via glutaraldeído) e iii) imobilização por ligação covalente de agregados de tripsina reticulada com glutaraldeído a membranas modificadas com um braço extensor de hexametilenodiamina. Os melhores resultados de actividade enzimática imobilizada foram alcançados com o último método, tendo sido este o escolhido para os estudos subsequentes.

A actividade da tripsina imobilizada foi estudada a diferentes valores de temperatura, pH e velocidade de fluxo. Foi ainda avaliada a estabilidade ao armazenamento em água destilada para três temperaturas (temperatura ambiente, 4 °C e -20 °C), assim como a estabilidade operacional. Ao fim de um mês de armazenamento a 4 °C e em água destilada, o sistema biocatalítico não apresentou perda de actividade enzimática nem perda de enzima. Verificou-se também que, ao fim de 11 utilizações sucessivas, restava 80% da actividade enzimática inicial, não ocorrendo libertação da enzima. Os resultados obtidos indicam que o método de imobilização seleccionado permite a preparação de um sistema estável e reutilizável.

O suporte de imobilização utilizado, membranas de nanofibras de PET/PLA obtidas por electrofiação, foi caracterizado a nível de molhabilidade da superfície, absorção de água, composição química, morfologia da superfície e estabilidade térmica, por comparação com uma membrana de PET obtida pela mesma técnica. A caracterização mostrou que a utilização de PLA nas membranas aumentou a capacidade de absorção de água. O estudo por espectroscopia de infravermelho e calorimetria indicou não existir interacção significativa entre as moléculas de PET e PLA. As membranas preparadas continham nanofibras com algumas centenas de nanómetros de diâmetro, predominantemente alinhadas segundo uma direcção.

Abstract

Every year, in Portugal, are produced from 500 000 to 560 000 tons of whey as a by-product of the dairy industry. This residue is very rich in proteins and their valorization becomes advantageous at an economic and environmental level. Hydrolysis of these proteins originate bioactive peptides with very useful characteristics when applied in cosmetics or pharmaceuticals.

In this work, it was intended to contribute for the development of an integrated separation and catalysis system to hydrolyze whey proteins and, at the same time, maintaining the reaction products separated from the enzyme. For this purpose, trypsin, an enzyme, was immobilized onto nanofibrous membranes consisting of poly(ethylene terephthalate) and poly(lactic acid) (PET/PLA) by three covalent immobilization methods: i) immobilization by covalent binding (activation of the support with a carbodiimide), ii) immobilized by adsorption and crosslinking (via glutaraldehyde) and iii) covalent immobilization of trypsin aggregates, crosslinked with glutaraldehyde, onto membranes modified with a spacer arm of hexamethylenediamine. The chosen method was the last, as it was with this that the best results of immobilized enzyme activity were achieved.

The activity of immobilized trypsin was studied at different temperatures, pH and flow rate. It was also assessed the storage stability in distilled water for three temperatures (room temperature, 4 °C and -20 °C) and also the operational stability. After one month, at 4 °C, in distilled water, the biocatalytic system presents no loss of enzymatic activity or enzyme. It was also found that after 11 consecutive uses, there was yet 80% of the initial enzymatic activity and without enzyme release. The results indicate that the selected immobilization method allows the preparation of a stable and reusable biocatalytic system.

The immobilization support used, nanofibrous PET/PLA membranes, obtained by electrospinning, was characterized in terms of surface wettability, water absorption, chemical composition, surface morphology and thermal stability, in comparison with a PET membrane obtained by the same technique. The characterization showed that the use of PLA in the membrane increased the water absorption capacity. The study by infrared spectroscopy and calorimetry showed no significant interaction between the molecules of PET and PLA. The prepared membranes contained nanofibers with a few hundred nanometers in diameter, predominantly aligned in one direction.

Abreviaturas e símbolos

- ATR – Reflectância total atenuada
- BCA – Ácido bicinconínico
- BAPNA – *N*-benzoil-*L*-arginina *p*-nitroanilida
- CaCl₂ – Cloreto de cálcio
- CBBR250 – Coomassie[®] Brilliant Blue R-250
- CSTR – Reactor contínuo perfeitamente agitado
- CV – Coeficiente de variação
- DCM – Diclorometano
- DMSO – Dimetilsulfóxido
- DSC – Calorimetria diferencial de varrimento
- EDAC – 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida
- FTIR – Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier
- GA – Glutaraldeído
- GMA – Metacrilato de glicidilo
- HCl – Ácido clorídrico
- HMD – Hexametenodiamina
- K_M – Constante de Michaelis Menten
- MA – Anidrido maleico
- MAA – Ácido metacrílico
- MES – 2- (*N* – ácido morfolinoetanosulfônico) hidratado
- MMA – Metacrilato de metilo
- NaBH₄ – Borohidreto de sódio
- NaCl – Cloreto de sódio
- NaCNBH₃ – Cianoborohidreto de sódio
- NaOH – Hidróxido de sódio
- PET – Poli(tereftalato de etileno)
- P_f – Massa das membranas saturadas com água
- PGMA – Poli(metacrilato de glicidilo)
- PHEMA – Poli(metacrilato de 2-hidroxietilo)
- P_i – Massa das membranas secas
- PLA – Poli(ácido láctico)
- pNA – *p*-nitroanilina

PNIPAM – Poli(N-isopropilacrilamida)

PS – Poliestireno

PSMA – Poli[estireno-co-(anidrido maleico)]

PVC – Poli(cloreto de vinilo)

SEM – Microscopia electrónica de varrimento

TCA – Ácido tricloroacético

T_d – Temperatura de decomposição

TFA – Ácido trifluoroacético

TGA – Análise Termogravimétrica

TRIS – Tris(hidroximetil)aminometano

UF – Ultra-filtração

θ – Ângulo de contacto

θ^* – Ângulo de contacto aparente

f – Fracção de área da superfície molhada pelo líquido

r_f – Fracção de rugosidade da área molhada

Índice

Índice de Figuras.....	XI
Índice de Tabelas.....	XVII
Âmbito, objectivos e organização do trabalho	1
1 Introdução.....	5
1.1 Enzimas.....	5
1.1.1 Imobilização de enzimas	6
1.1.2 Métodos de imobilização.....	7
1.1.3 Métodos de quantificação de proteínas imobilizadas	14
1.1.4 Tripsina.....	15
1.2 Suportes de imobilização	18
1.2.1 Membranas de nanofibras.....	20
1.3 Reactores de membrana biocatalíticos.....	23
1.4 Técnicas de caracterização.....	25
2 Materiais e métodos	29
2.1 Reagentes e materiais.....	29
2.2 Equipamentos.....	30
2.3 Procedimentos experimentais	31
2.3.1 Preparação das membranas de nanofibras de PET/PLA	32
2.3.2 Imobilização da tripsina em membranas de nanofibras de PET/PLA por ligação covalente.....	33
2.3.3 Imobilização da tripsina em membranas de nanofibras de PET/PLA por adsorção e reticulação	34
2.3.4 Imobilização da tripsina em membranas de nanofibras de PET/PLA por ligação covalente de agregados de tripsina reticulada	35
2.3.5 Ensaio de actividade enzimática	37
2.3.6 Quantificação da massa de tripsina imobilizada.....	39
2.3.7 Estabilidade ao armazenamento da tripsina livre e imobilizada.....	40
2.3.8 Estabilidade operacional da tripsina imobilizada	41
2.3.9 Caracterização das membranas de nanofibras de PET/PLA	41
2.3.10 Análise estatística	43
3 Resultados e discussão	45
3.1 Caracterização das membranas de nanofibras de PET/PLA.....	45

3.2	Imobilização da tripsina em membranas de nanofibras de PET/PLA	54
3.3	Quantidade de tripsina imobilizada	60
3.4	Actividade enzimática da tripsina imobilizada	61
3.4.1	Varição da actividade enzimática com a temperatura	62
3.4.2	Varição da actividade enzimática com o pH	63
3.4.3	Varição da actividade enzimática com as condições hidrodinâmicas	64
3.5	Estabilidade da tripsina ao armazenamento	66
3.6	Estabilidade operacional da tripsina	71
4	Conclusões	73
5	Sugestões de trabalho futuro	75
	Bibliografia.....	77
	Anexo.....	83

Índice de Figuras

Figura 1.1. Classificação dos métodos de imobilização de enzimas (baseada em Tischer e Wedekind (1999)).	7
Figura 1.2. Representação esquemática de alguns métodos de imobilização. a) imobilização por adsorção física. b) imobilização por ligação covalente. c) imobilização por reticulação.	8
Figura 1.3. Esquema global da reacção de uma carbodiimida com um suporte com grupos carboxílicos e com os grupos amina da enzima.	9
Figura 1.4. Principais reacções possíveis durante a formação de uma amida a partir de grupos carboxílicos e grupos amina, em meio aquoso, na presença de uma carbodiimida (Nakajima e Ikada, 1995).	10
Figura 1.5. Reticulação de moléculas de enzima por reacção entre o glutaraldeído e os grupos amina das moléculas de enzima (adaptado de Migneault <i>et al.</i> (2004)).	11
Figura 1.6. Redução das ligações imina de uma enzima reticulada com glutaraldeído, usando como agente redutor NaCNBH ₃ .	12
Figura 1.7. Reacções entre o glutaraldeído na forma polimérica (a) e os grupos amina das enzimas, sob condições alcalinas: formação de uma base de Schiff (b), formação de um produto de adição de Michael (c) e formação de um produto misto (d) (Adaptado de Migneault <i>et al.</i> (2004)).	13
Figura 1.8. Reacção de hidrólise do BAPNA catalisada pela tripsina, originando benzoil- <i>L</i> -arginina e <i>p</i> -nitroanilina (Marten <i>et al.</i> , 2010).	16
Figura 1.9. Efeito da temperatura na actividade da tripsina entre os 22 °C e os 70 °C. O tampão usado foi o TRIS-HCl 0,05 M pH 8,0 contendo 0,01 M CaCl ₂ e a concentração de BAPNA usada foi de 2,98 mM (Rodrigues <i>et al.</i> , 2013).	16
Figura 1.10. Efeito do pH na actividade da tripsina. Ensaio realizado entre pH 4 e pH 11, usando o tampão TRIS/acetato/glicina 0,05 M contendo 0,01 M CaCl ₂ , ajustado a cada pH a 37 °C, usando uma concentração de BAPNA de 2,98 mM (Rodrigues <i>et al.</i> , 2013).	17
Figura 1.11. Representação esquemática de a) processo clássico de reacção e separação b) processo integrado de reacção/separação.	23
Figura 1.12. A - Molhabilidade homogénea numa superfície rugosa hidrofóbica (Modelo de Wenzel); B - Molhabilidade heterogénea numa superfície rugosa hidrofóbica (Modelo de Cassie-Baxter).	26

Figura 2.1. Diagrama esquemático da configuração dos aparelhos utilizados no processo de electrofiação. 1 – seringa. 2 – solução polimérica. 3 – agulha. 4 – jacto líquido. 5 – colector. 6 – fonte de alimentação de alta tensão.	33
Figura 2.2. Representação esquemática do procedimento experimental usado na imobilização da tripsina por ligação covalente, utilizando EDAC como agente de activação. ...	34
Figura 2.3. Representação esquemática do procedimento experimental usado na imobilização da tripsina por adsorção e reticulação.....	35
Figura 2.4. Representação esquemática do procedimento experimental usado na imobilização de agregados de tripsina por ligação covalente.	36
Figura 2.5. Imagens do arranjo experimental utilizado no ensaio da tripsina imobilizada. 1 – Vial contendo solução de substrato e membrana com enzima imobilizada, agitado magneticamente. 2 – Banho termoestático agitado magneticamente. 3 – Tubagem com isolamento térmico.....	38
Figura 2.6. Configuração experimental dos ensaios de actividade da tripsina imobilizada; 1 - Controlador de temperatura do suporte da célula de fluxo. 2 – Fonte de luz UV/visível. 3 – Bomba peristáltica para recirculação da solução contendo BAPNA. 4 – Termopar regulador do banho termoestático no qual se encontra o mini-reactor (vial). 5 – Computador com o programa SpectraScan 1.0. 6 – Espectrofotómetro ScanSpec UV/visível. 7 – Banho termoestático do mini-reactor. 8 – Isolamento térmico da tubagem de recirculação. 9 – Suporte termostaticado da célula de fluxo.	39
Figura 3.1. Exemplo da variação do ângulo de contacto ao longo do tempo de uma gota de água colocada sobre uma membrana de PET e de outra colocada sobre uma membrana de PET/PLA.....	46
Figura 3.2. Valores dos ângulos de contacto das membranas de PET e de PET/PLA. As barras de erro representam os desvios-padrão das medições efectuadas em 6 pontos diferentes em cada amostra. *** Diferença extremamente significativa ($p < 0,001$; teste t de Student).....	47
Figura 3.3. Capacidade de absorção de água das membranas de PET e de PET/PLA. As barras de erro representam os desvios-padrão das medições efectuadas ($n = 3$). *** Diferença extremamente significativa ($p < 0,001$; teste t de Student).....	47
Figura 3.4. Espectros de ATR-FTIR de PLA em pó e de membranas de nanofibras de PET e de PET/PLA. Cada espectro representa 64 aquisições com uma resolução de $0,9 \text{ cm}^{-1}$. Os espectros foram normalizados (usando a banda do PET centrada a 1410 cm^{-1}) e foram deslocados verticalmente para uma visualização mais clara.	49

Figura 3.5. Fotomicrografias de SEM da superfície de uma membrana de nanofibras de PET/PLA (A; amplificação: 5000x) e de uma membrana de nanofibras de PET (B; amplificação: 2000x).	50
Figura 3.6. Termogramas de TGA das membranas de PET e de PET/PLA e dos materiais de partida (PET em pó e PLA em pó).	51
Figura 3.7. Termogramas de DSC das membranas de PET e de PET/PLA e dos materiais de partida (PET em pó e PLA em pó).	53
Figura 3.8. Exemplo de um ensaio de determinação da actividade enzimática da tripsina imobilizada por ligação covalente. Ensaio de actividade realizado a 37 °C, a pH 8,0 e usou-se como substrato BAPNA, com uma concentração de 1 mM	56
Figura 3.9. Exemplo de um ensaio de determinação da actividade enzimática da tripsina imobilizada por adsorção e reticulação com uma concentração de glutaraldeído de 0,05 % (v/v). Ensaio de actividade realizado a 37 °C, a pH 8,0 e usou-se como substrato BAPNA, com uma concentração de 1 mM A paragem da recirculação da solução de substrato aos ~200 s destina-se a verificar se há ou não saída da enzima imobilizada para a solução.....	56
Figura 3.10. Efeito da concentração de glutaraldeído na actividade da enzima imobilizada por adsorção e reticulação. Ensaio de actividade realizados a 37 °C, a pH 8,0 e usou-se como substrato BAPNA, com uma concentração de 1 mM A linha apresentada pretende somente facilitar a visualização da tendência.	57
Figura 3.11. Imagens da imobilização da tripsina por adsorção e reticulação. A –Mini-reactores após a reacção de imobilização. B - Membrana após a reacção de imobilização mas antes da lavagem. C - Membranas após a lavagem.....	58
Figura 3.12. Exemplo de um ensaio de determinação da actividade enzimática através da ligação covalente de agregados de tripsina reticulada. Ensaio de actividade realizado a 37 °C, a pH 8,0 e usou-se como substrato BAPNA, com uma concentração de 1 mM A recirculação da solução de substrato foi parada aos ~250 s e retomada aos ~ 350 s de modo a verificar se houve ou não saída de enzima imobilizada para a solução.....	59
Figura 3.13. Imagens de membranas de nanofibras de PET/PLA com tripsina imobilizada por ligação covalente de agregados de tripsina reticulados.	59
Figura 3.14. Efeito da temperatura na actividade da tripsina imobilizada a 37 °C e a 50 °C, a pH 8,0 (actividade expressa em relação à actividade a 37 °C). Ensaio de actividade usando como substrato BAPNA, concentração de 1 mM. As barras de erro	

representam desvios-padrão das médias ($n = 9$ para ensaio a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ e $n = 3$ para ensaio a $50\text{ }^{\circ}\text{C}$). ** Diferença muito significativa ($p < 0,01$; teste t de Student). .62

Figura 3.15. Efeito do pH na actividade da tripsina imobilizada a pH 4, pH 6 e pH 8, realizado a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ (actividade expressa em relação à actividade a pH 8). Ensaios de actividade usando como substrato BAPNA, concentração de 1 mM. As barras de erro representam os desvios-padrão das medições efectuadas ($n = 3$ para ensaio a pH 4, $n = 3$ para ensaio a pH 6 e $n = 9$ para ensaio a pH 8). ** - Diferença muito significativa ($p < 0,01$; ANOVA + Tukey's HSD)..... 64

Figura 3.16. Efeito da velocidade do fluxo (60 e 100 rpm) na recirculação da solução de substrato (BAPNA, concentração de 1 mM) no ensaio de actividade da tripsina imobilizada, realizados a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, pH 8,0 (actividade expressa em relação à actividade a 60 rpm). As barras de erro representam os desvios-padrão das medições efectuadas ($n = 9$ para o ensaio a 60 rpm; $n = 3$ para o ensaio a 100 rpm). * - Diferença significativa ($p < 0,05$; teste t de Student).65

Figura 3.17. Exemplo da determinação da actividade enzimática da tripsina imobilizada por ligação covalente e reticulação dos agregados com uma velocidade de fluxo de 100 rpm. Ensaio de actividade realizado a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, a pH 8,0 e usou-se como substrato BAPNA, com uma concentração de 1 mM. A recirculação da solução de substrato foi parada aos ~210 s de modo a verificar se houve ou não saída de enzima imobilizada para a solução. 65

Figura 3.18. Estabilidade ao armazenamento em água destilada da tripsina livre para diferentes temperaturas de armazenamento. Ensaios de actividade realizados a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, a pH 8,0 e usou-se como substrato BAPNA, com uma concentração de 1 mM. A actividade relativa foi calculada em relação à actividade inicial. As barras de erro representam os desvios-padrão das medições efectuadas ($n = 3$). As linhas apresentadas pretendem somente facilitar a visualização da tendência..... 66

Figura 3.19. Estabilidade ao armazenamento em água destilada da tripsina imobilizada para diferentes temperaturas de armazenamento. Ensaios de actividade realizados a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, a pH 8,0 e usou-se como substrato BAPNA, com uma concentração de 1 mM. A actividade relativa foi calculada em relação à actividade inicial. As barras de erro representam os desvios-padrão das medições efectuadas ($n = 9$ para a actividade inicial e $n = 3$ para as restantes). As linhas apresentadas pretendem somente facilitar a visualização da tendência. 67

Figura 3.20. Estabilidade ao armazenamento em água destilada da tripsina livre e imobilizada à temperatura ambiente. Ensaios de actividade realizados a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, a pH 8,0 e usou-

se como substrato BAPNA, com uma concentração de 1 mM. A actividade relativa foi calculada em relação à actividade inicial. As barras de erro representam os desvios-padrão das medições efectuadas ($n = 9$ para a actividade inicial da tripsina imobilizada e $n = 3$ para as restantes). As linhas apresentadas pretendem somente facilitar a visualização da tendência.68

Figura 3.21. Estabilidade ao armazenamento em água destilada da tripsina livre e imobilizada a 4 °C. Ensaio de actividade realizados a 37 °C, a pH 8,0 e usou-se como substrato BAPNA, com uma concentração de 1 mM. A actividade relativa foi calculada em relação à actividade inicial. As barras de erro representam os desvios-padrão das medições efectuadas ($n = 9$ para a actividade inicial da tripsina imobilizada e $n = 3$ para as restantes). As linhas apresentadas pretendem somente facilitar a visualização da tendência.69

Figura 3.22. Estabilidade ao armazenamento em água destilada da tripsina livre e imobilizada a - 20 °C. Ensaio de actividade realizados a 37 °C, a pH 8,0 e usou-se como substrato BAPNA, com uma concentração de 1 mM. A actividade relativa foi calculada em relação à actividade inicial. As barras de erro representam os desvios-padrão das medições efectuadas ($n = 9$ para o actividade inicial da tripsina imobilizada e $n = 3$ para as restantes). As linhas apresentadas pretendem somente facilitar a visualização da tendência.70

Figura 3.23. Estabilidade operacional da tripsina imobilizada, obtida por repetição sucessiva do ensaio enzimático com a mesma amostra de tripsina imobilizada numa membrana de nanofibras de PET/PLA. Ensaio de actividade realizados a 37 °C, a pH 8,0 e usou-se como substrato BAPNA, com uma concentração de 1 mM. A actividade relativa foi calculada em relação à actividade inicial. A linha apresentada pretende somente facilitar a visualização da tendência.71

Figura 3.24. Primeiro (A) e último (B) ensaio de actividade enzimática do estudo de estabilidade operacional da tripsina imobilizada por ligação covalente e reticulação de agregados. Ensaio de actividade realizados a 37 °C, a pH 8,0 e usou-se como substrato BAPNA, com uma concentração de 1 mM. A recirculação da solução de substrato foi parada aos ~250 s e retomada aos ~350 s, de modo a verificar se houve ou não saída de enzima imobilizada para a solução.....72

Índice de Tabelas

Tabela I. Exemplos de alguns métodos e suportes usados na imobilização da tripsina.	18
Tabela II. Exemplos de alguns resultados da imobilização de tripsina em suportes de nanofibrosos.	21
Tabela III. Exemplos de aplicações de reactores de membrana biocatalíticos na indústria alimentar (adaptado de Giorno and Drioli, 2000).	24
Tabela IV. Lista dos reagentes e materiais utilizados.	29
Tabela V. Lista das soluções tampão usadas no trabalho experimental, concentração, pH e função.	30
Tabela VI. Soluções usadas nos ensaios de actividade de enzima livre.	37
Tabela VII. Soluções usadas nos ensaios de actividade da enzima imobilizada.	38
Tabela VIII. Tabela de atribuições de PET em filmes (Zhu e Kelley, 2005; Djebara <i>et al.</i> , 2012) e PLA em nanofibras (Oliveira <i>et al.</i> , 2013).	48
Tabela IX. Diâmetro das fibras das membranas de PET e PET/PLA da Figura 3.5 ($n = 50$ fibras). *** Diferença extremamente significativa ($p < 0,001$; teste t de Student).	50
Tabela X. Temperaturas de decomposição significativa das membranas de PET, PET/PLA e dos materiais de partida (PET em pó e PLA em pó).	51
Tabela XI. Temperaturas detectadas após análise DSC das membranas de PET, PET/PLA e para os materiais de partida (PET em pó e PLA em pó).	53
Tabela XII. Actividade da tripsina imobilizada através dos diferentes métodos de imobilização testados.	55
Tabela XIII. Quantidade de tripsina imobilizada sobre as membranas de nanofibras de PET/PLA por ligação covalente de agregados de tripsina reticulada, calculada através do método de adsorção e eluição do Coomassie Brilliant Blue R-250 ($n = 3$) ** Diferença muito significativa ($p < 0,01$; teste t de Student).	60

Âmbito, objectivos e organização do trabalho

O soro de leite proveniente da indústria de lacticínios é um resíduo agro-industrial que se produz em grandes quantidades e, normalmente, é descartado sem tratamento prévio, constituindo uma fonte de poluição devido ao seu elevado teor orgânico. Deste modo, a valorização deste subproduto é de elevado interesse, tanto a nível económico, como a nível ambiental. Estima-se que, em Portugal, a produção global de soro de leite passível de recolha e posterior valorização, se situa entre 500 000 e 560 000 t/ano, cerca de 60% da produção de queijo (Frazão, 2001).

Tem vindo a ser demonstrado que, da hidrólise das proteínas do soro do leite, se obtêm peptídeos bioactivos que apresentam um papel benéfico para a saúde. De entre os peptídeos resultantes, alguns possuem elevado poder terapêutico e têm sido alvo de grande atenção por parte da indústria farmacêutica e cosmética. Esses peptídeos podem apresentar propriedades antimicrobianas, anticancerígenas ou antioxidantes, auxiliarem na prevenção de hipertensão, aumentarem a resistência a doenças infecciosas, apresentando um elevado potencial para serem usados em produtos farmacêuticos e cosméticos (Danquah e Agyei, 2012; Sharma *et al.*, 2012).

A hidrólise da ligação peptídica existente nas proteínas pode ser catalisada por proteases de modo altamente específico e eficiente, sendo usadas em diversas áreas industriais, tais como, alimentar, farmacêutica, curtumes e detergentes (Nisha *et al.*, 2012). De modo a ser economicamente viável a utilização de enzimas, torna-se necessária a sua reutilização e a sua fácil separação dos produtos. A imobilização de enzimas – operação que tem por finalidade alojar enzimas num determinado espaço, sem que haja perda da actividade catalítica e para que possam ser reutilizadas de forma contínua – possibilita uma fácil reutilização da enzima, assim como a sua separação dos produtos, e melhora a sua estabilidade operacional e ao armazenamento (Kennedy e Cabral, 1983; Datta *et al.*, 2013).

A utilização de nanofibras como suportes para a imobilização de enzimas tem suscitado interesse devido à elevada área de superfície que as nanofibras apresentam e às suas dimensões reduzidas, características que possibilitam a imobilização de uma maior quantidade de enzima e uma menor resistência à transferência de massa. Este facto leva a uma maior actividade enzimática por unidade de massa ou volume do suporte quando comparada com sistemas de imobilização de enzimas em materiais de morfologia convencional (Kim *et al.*,

2008). Para além disso, este processo apresenta também uma menor resistência à difusão dos substratos e produtos.

A electrofiação é uma técnica utilizada para produzir nanofibras de forma contínua, sujeitando uma solução de polímero (ou um polímero fundido) a uma diferença de potencial eléctrico elevado quando esta é forçada a passar pelo orifício de uma agulha. As membranas assim produzidas apresentam características muito atractivas, como elevada porosidade, diâmetro de fibra reduzido, excelente interconectividade entre poros e elevada razão entre a área de superfície e o volume (Park, 2010). As nanofibras electrofiadas – que podem ser sintetizadas usando polímeros sintéticos, naturais ou misturas de polímeros – devido às suas características, têm tido aplicação em diversas áreas como, por exemplo, em engenharia de tecidos (*scaffolds*), em biossensores, na filtração (utilização como meio filtrante), em tratamentos médico-cirúrgicos, na libertação controlada de fármacos e na imobilização de enzimas (Park, 2010).

No âmbito do projecto NanoBioCats (Novos materiais poliméricos nanofibrosos para biocatálise e separação em simultâneo; PTDC/CTM-POL/112289/2009), foram desenvolvidas membranas de nanofibras de poli(tereftalato de etileno) e de poli(ácido láctico) (PET/PLA), com estrutura e propriedades mecânicas adequadas, para funcionarem como suporte para a imobilização de uma protease, a tripsina. O objectivo é apresentarem simultaneamente uma acção de biocatálise e de separação, devido à sua estrutura muito porosa, para aplicação nas áreas agro-alimentar e farmacêutica.

Embora o PET seja um polímero barato, com o qual facilmente se produzem nanofibras, exibindo boas propriedades estruturais, térmicas e mecânicas, a sua hidrofobicidade e ausência de grupos reactivos são características que dificultam o seu uso como suporte para a imobilização de enzimas. Desta forma, de modo a introduzir grupos reactivos e diminuir a hidrofobicidade das membranas, misturou-se o PET com PLA e electrofiou-se uma mistura destes dois polímeros. As membranas resultantes foram utilizadas para imobilizar a tripsina.

O objectivo deste trabalho foi imobilizar tripsina sobre membranas de nanofibras obtidas a partir de uma mistura de PET e PLA (PET/PLA). Para isso, avaliaram-se três métodos de imobilização covalente: (i) imobilização por ligação covalente a grupos carboxílicos, utilizando uma carbodiimida, (ii) imobilização por reticulação e adsorção, utilizando glutaraldeído e (iii) imobilização por ligação covalente de agregados de tripsina reticulada por glutaraldeído a grupos amínicos introduzidos na membrana. Seleccionado o método com o qual se obteve melhores resultados de actividade enzimática – imobilização por ligação covalente de agregados de tripsina reticulada – avaliou-se a estabilidade da tripsina imobilizada e comparou-se com a estabilidade da tripsina livre.

O presente trabalho encontra-se dividido em cinco capítulos:

- No primeiro, é feita uma introdução onde são abordados os aspectos mais relevantes na imobilização de enzimas. São alvo de estudo os métodos de imobilização, os tipos de suporte (estrutura e morfologia), enfatizando as membranas de nanofibras poliméricas obtidas por electrofiação. É realizada uma revisão sobre a imobilização da tripsina, destacando a efectuada em nanofibras. Também são apresentados os reactores de membrana biocatalíticos, o tipo de reactor em que estas membranas com tripsina imobilizada seriam aplicadas.

- No segundo capítulo são apresentados os métodos e procedimentos empregues na produção das nanofibras de PET e de PET/PLA, na imobilização da tripsina em nanofibras de PET/PLA, nos ensaios de actividade enzimática, na quantificação de proteína imobilizada e na caracterização das membranas de nanofibras de PET/PLA.

- O terceiro capítulo inclui a apresentação e discussão dos resultados obtidos.

- No quarto capítulo são descritas as principais conclusões do trabalho e no quinto capítulo tecem-se algumas considerações no que se refere a sugestões de trabalho futuro.

1 Introdução

O principal objectivo do presente trabalho foi escolher o melhor método de imobilização da tripsina em membranas de nanofibras de PET/PLA e avaliar a estabilidade da tripsina imobilizada, comparativamente à obtida com a tripsina livre.

Nesta secção fez-se a revisão bibliográfica dos métodos de imobilização de enzimas, sobretudo dos métodos utilizados neste trabalho, e dos tipos de suportes usados e das suas características, tanto morfológicas como estruturais. Procedeu-se também a uma análise de outros trabalhos onde se estudou a imobilização da tripsina em diversos suportes e a uma análise mais detalhada da sua imobilização em nanofibras. São, igualmente, apresentados os reactores de membrana biocatalíticos, a forma em que o sistema desenvolvido neste trabalho poderá ser utilizado em ambiente industrial, indicando alguns exemplos das suas aplicações na indústria alimentar.

Por último são apresentadas as técnicas que foram utilizadas para caracterizar as membranas de nanofibras.

1.1 Enzimas

As enzimas são catalisadores biológicos de natureza proteica que aceleram determinadas reacções químicas e biológicas de modo altamente específico. Nas últimas décadas tem-se verificado a utilização de biocatalisadores em detrimento dos catalisadores químicos convencionais em diversos tipos de indústria. As enzimas, quando usadas como catalisadores, apresentam elevada eficiência catalítica, especificidade e selectividade sob condições reaccionais suaves e com baixos requisitos de energia. Devido à especificidade que apresentam, as múltiplas etapas que constituem um processo podem ser reduzidas para apenas uma, resultando numa menor formação de produtos secundários e menor consumo energético e de matérias-primas (Jegannathan e Nielsen, 2013). Um outro aspecto positivo da utilização de enzimas é de não serem prejudiciais para o meio ambiente, sendo consideradas como catalisadores “verdes”. Devido ao elevado grau de especificidade, aliado à elevada eficiência que os biocatalisadores apresentam, estes são muito utilizados na síntese de fármacos (química fina), processamento de alimentos, fabrico de biossensores, biorremediação e na digestão de proteínas para análise proteómica (Wang *et al.*, 2009). Embora apresentem estas vantagens, o uso de enzimas em aplicações industriais é limitado: a maior parte das enzimas

são relativamente instáveis, o custo do seu isolamento e purificação é elevado e tecnicamente difícil e é dispendioso recuperar enzimas activas da mistura reaccional depois do processo catalítico (Kennedy e Cabral, 1983). Para além destes factores, também é frequente haver problemas associados à sua utilização com determinados solventes e/ou condições de pH e temperatura.

1.1.1 Imobilização de enzimas

O termo “enzimas imobilizadas” foi definido pela primeira vez pela Enzyme Engineering Conference como “enzimas que estão fisicamente confinadas ou localizadas num espaço definido, com retenção das suas actividades catalíticas e que possam ser usadas repetidamente e de forma contínua” (Mishra, 2009). A imobilização de enzimas surgiu no início do século 20 como uma alternativa para ultrapassar os inconvenientes associados ao uso da enzima na sua forma livre (Rios *et al.*, 2004). Desde então, têm-se utilizado diferentes métodos e suportes para levar a cabo a imobilização de diversas enzimas. Através da imobilização, é possível reter ou recuperar as enzimas, consegue-se tornar a enzima mais estável, preservando a sua actividade global, reutilizá-la (tornando o processo mais económico) ou usá-la num processo contínuo. A purificação do produto também se realiza mais facilmente, uma vez que a enzima fica separada dos produtos de reacção (Fang *et al.*, 2011). Este método permite também que haja uma maior variedade de escolha em relação ao tipo de reactor usado no processo (Brena *et al.*, 2006).

Tem vindo a ser demonstrado que a imobilização melhora também a estabilidade (ao armazenamento e operacional) e o tempo de meia-vida da enzima, permitindo que as enzimas operem numa maior gama de ambientes e possibilitando que permaneçam activas a valores de temperatura ou pH a que não seria possível utilizá-las se não se encontrassem imobilizadas (Spahn e Minter, 2008). Contudo, ainda existem problemas associados à imobilização, nomeadamente, a possibilidade de ocorrerem alterações conformacionais ou mesmo desnaturação irreversível da enzima, diminuindo significativamente a sua actividade catalítica e a sua estabilidade (Kennedy e Cabral, 1983).

Enzimas imobilizadas têm sido usadas em diversas áreas, designadamente, na medicina (em sistemas de libertação controlada de fármacos, identificação de tumores e biossensores), indústria farmacêutica, indústria alimentar, produção de biodiesel e biorremediação, entre outros (Khan e Alzohairy, 2010).

1.1.2 Métodos de imobilização

Existem diversos métodos de imobilização de enzimas que têm sido exaustivamente estudados e revistos. Mosbach (1976), Powell (1984), Sheldon (2007), Hanefeld *et al.* (2009), Khan e Alzohairy, (2010), Nisha *et al.* (2012), são exemplos de autores que têm estudado a imobilização de enzimas, encontrando-se disponíveis diferentes sistemas de classificação dos métodos de imobilização. Na Figura 1.1, é apresentado um deles, baseado nos princípios físico-químicos envolvidos na imobilização.

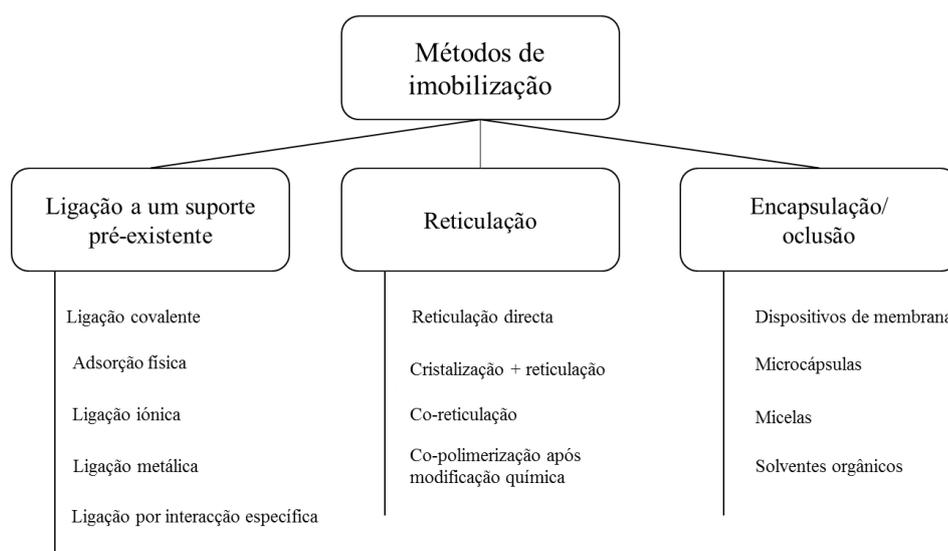


Figura 1.1. Classificação dos métodos de imobilização de enzimas (baseada em Tischer e Wedekind (1999)).

Os métodos de imobilização podem subdividir-se em três categorias: ligação a um suporte, reticulação e encapsulação/occlusão (Figura 1.1). A imobilização por ligação a um material baseia-se, como o nome indica, na ligação da enzima a um suporte através de interações entre enzima e esse material. A selecção de um método adequado depende principalmente das propriedades físico-químicas da superfície do suporte e da enzima que se pretende imobilizar. No entanto, este deve permitir que a enzima mantenha a sua conformação de modo a não comprometer a sua capacidade catalítica. A imobilização por reticulação consiste na formação de ligações covalentes entre moléculas de enzima, levando à formação de aglomerados que, em geral, são mais estáveis do que a enzima livre. A imobilização por encapsulação/occlusão tem por objectivo a incorporação das enzimas num determinado material. Por vezes, procede-se à combinação de métodos de imobilização, de forma a maximizar o seu rendimento.

De seguida são referidas características de alguns dos métodos apresentados na Figura 1.1, nomeadamente, a imobilização por ligação covalente, por reticulação e por adsorção física, os métodos utilizados no presente trabalho. Estes métodos encontram-se representados esquematicamente na Figura 1.2.

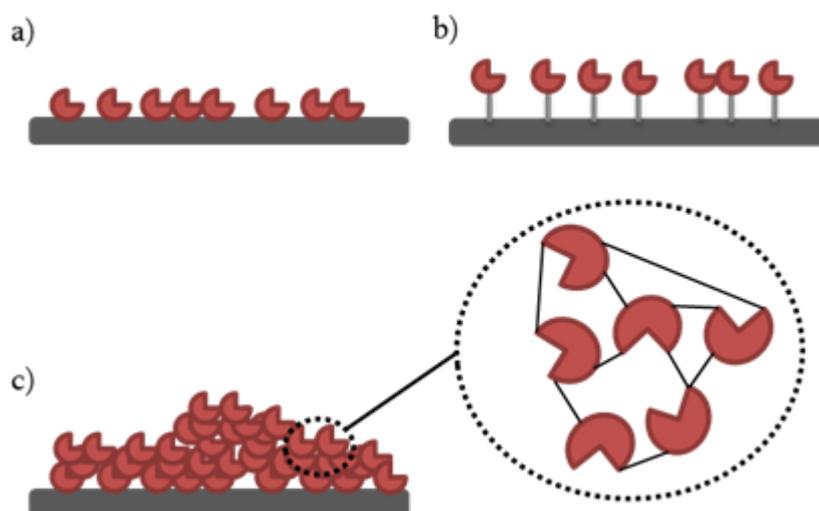


Figura 1.2. Representação esquemática de alguns métodos de imobilização. a) imobilização por adsorção física. b) imobilização por ligação covalente. c) imobilização por reticulação.

Ligação covalente

A formação de ligações covalentes entre enzima e suporte é um dos métodos mais estudados na área da imobilização de enzimas. Este método consiste na formação de ligações covalentes entre as cadeias laterais dos aminoácidos das enzimas e os grupos funcionais reactivos do material do suporte. Como a ligação covalente é forte, obtém-se uma fixação duradoura da enzima, não havendo libertação da enzima para uma vasta gama de condições operacionais. A formação da ligação covalente apenas deve envolver os grupos funcionais da enzima que não são essenciais para a sua acção catalítica e não deve haver alteração significativa quer da conformação nativa da proteína, quer da sua flexibilidade (Kennedy e Cabral, 1983; Cabral *et al.*, 2003).

Na maior parte dos suportes, para que ocorra a ligação entre a enzima e o suporte, primeiro é necessário proceder à activação dos grupos funcionais do suporte, recorrendo-se a um composto reactivo – agente activador - para que o suporte assim activado possa reagir com as moléculas da enzima. Diversos métodos de activação têm sido usados, variando de acordo com os grupos funcionais dos suportes e da enzima. Suportes que contêm grupos carboxílicos são normalmente activados com carbodiimidas. A 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDAC), é uma carbodiimida que, por ser solúvel em água,

tem sido muito utilizada na imobilização de enzimas. Uma carbodiimida reage com grupos carboxílicos, como é apresentado de uma forma simplificada na Figura 1.3. A reacção entre o grupo carboxílico e a carbodiimida resulta numa ureia que pode ser atacada por uma amina primária, resultando a formação de uma ligação amida.

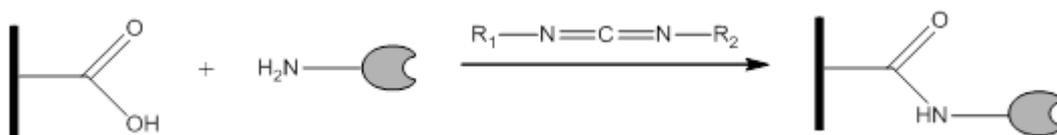


Figura 1.3. Esquema global da reacção de uma carbodiimida com um suporte com grupos carboxílicos e com os grupos amina da enzima.

A reacção de activação com carbodiimidas é bem mais complexa e complicada do que o descrito acima. De uma forma mais detalhada (Figura 1.4; Nakajima e Ikada (1995)), o primeiro passo é a protonação da carbodiimida, originando o intermediário **(1)** que, na ausência de grupos carboxílicos ionizados, sofre hidrólise, convertendo-se numa ureia dissubstituída **(2)**, (Figura 1.4, A). Na presença de carboxilatos, a carbodiimida na forma protonada **(1)** reage com o grupo carboxílico, originando *O*-acilisoureia **(3)** (Figura 1.4, B). A partir deste passo existem diferentes cenários possíveis dependendo das condições reaccionais (Nakajima e Ikada, 1995). Segundo os mesmos autores, existem duas vias possíveis para a formação da ligação amida. Numa delas, um nucleófilo não dissociado, como uma amina primária **(5)**, ataca a *O*-acilisoureia **(3)**, originando a amida **(6)** e uma ureia dissubstituída **(2)** (Figura 1.4, C). Por outro lado, os carboxilatos, que são nucleófilos fortes, podem atacar a *O*-acilisoureia **(3)** originando um anidrido **(7)** que, por sua vez, pode ser atacado por uma amina primária não dissociada **(5)**, originando a amida desejada **(6)** (Figura 1.4, D). Nakajima e Ikada (1995) referem ainda que esta via só ocorre na presença de ácidos carboxílicos na forma cíclica (se conseguir formar um anel). Caso não haja nenhum nucleófilo presente, a água pode hidrolisar a *O*-acilisoureia **(3)**, formando-se uma ureia dissubstituída **(2)**. Como a quantidade de água é muito superior à quantidade de amina primária, esta hidrólise também ocorre. Para além disso, a *O*-acilisoureia **(3)** não é estável em solução e pode rearranjar-se, formando uma *N*-acilureia **(4)**.

O favorecimento da ocorrência da reacção de formação da ligação amida em detrimento das outras reacções pode conseguir-se fazendo uso da dependência das várias reacções relativamente ao valor de pH do meio. A gama de valores de pH a que se forma o composto intermediário *O*-acilisoureira (**3**) situa-se entre 3,5 e 4,5, para que se ionize o grupo carboxílico e seja possível a formação do composto (**3**) (Nakajima e Ikada, 1995). Por outro lado, a formação da amida via *O*-acilisoureira (Figura 1.4, C) é preferida a valores de pH mais elevados de forma a suprimir a ionização da amina (Nakajima e Ikada, 1995). Tipicamente, é usado um valor de pH de 5,5, empregando tampões que não contenham grupos amina ou carboxílicos, tais como fosfato ou de preferência, o tampão MES, devido à sua capacidade tampão ser mais elevada a este valor de pH (Gao e Kyratzis, 2008).

Reticulação

Este método apresenta duas vertentes: i) a formação de ligações covalentes entre as moléculas de enzima, resultando numa rede tri-dimensional de agregados de enzima reticulada (Figura 1.5); e ii) a formação de ligações covalentes entre as moléculas de enzima e um suporte. Para o efeito, são usados reagentes reticulantes bifuncionais ou multifuncionais. O principal reagente utilizado na imobilização por reticulação é o glutaraldeído, um dialdeído. Este reage principalmente com os grupos amina dos resíduos de lisina das enzimas, formando uma ligação imina, como ilustrado na Figura 1.5.

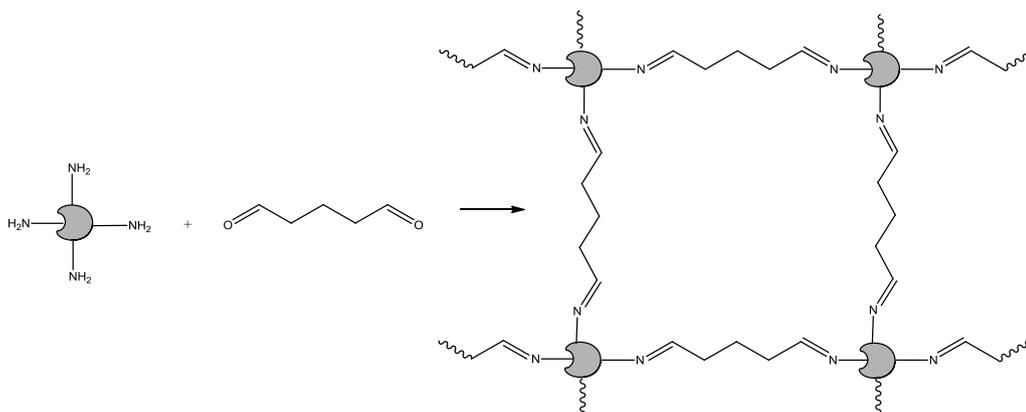


Figura 1.5. Reticulação de moléculas de enzima por reacção entre o glutaraldeído e os grupos amina das moléculas de enzima (adaptado de Migneault *et al.* (2004)).

Apesar da ligação que resulta da reacção entre o glutaraldeído e os grupos amina das enzimas ser uma imina (também designada base de Schiff), a utilização de glutaraldeído resulta numa imobilização da enzima irreversível e tem-se verificado que os agregados de enzimas assim reticuladas se mantêm estáveis a valores extremos de pH e temperatura (Cabral

et al., 2003). No entanto, de modo a evitar uma possível reversibilidade da ligação imina, e para assegurar maior estabilidade ao sistema enzima imobilizada, utiliza-se borohidreto de sódio (NaBH_4) ou cianoborohidreto de sódio (NaCNBH_3) para reduzir a ligação imina (Migneault *et al.*, 2004), como apresentado na Figura 1.6.

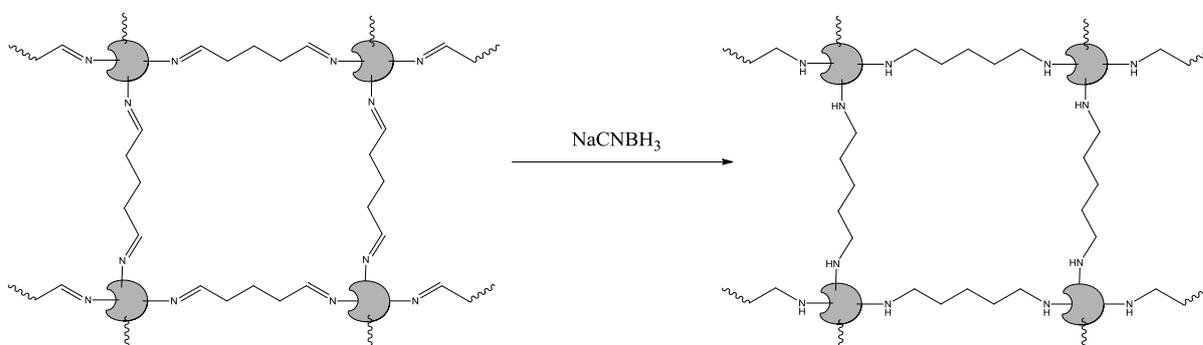


Figura 1.6. Redução das ligações imina de uma enzima reticulada com glutaraldeído, usando como agente redutor NaCNBH_3 .

Todavia, quando se utiliza um método de imobilização por reticulação, há a possibilidade do centro activo da enzima poder ser afectado e ficar sem acesso ao substrato, além da possibilidade de formação de um grande aglomerado, tornando difícil as moléculas de substrato atingirem as moléculas de enzima mais interiores. Para alcançar as condições óptimas de imobilização usando o glutaraldeído, ou seja, de forma a criar um complexo de enzima insolúvel e ao mesmo tempo reter a actividade enzimática, estas condições têm de ser determinadas por tentativa e erro. Isto deve-se, principalmente, ao facto da insolubilização ser fortemente dependente de um balanço de factores como a natureza da enzima, a concentração de enzima e de glutaraldeído, pH, força iónica da solução, temperatura e tempo de reacção (Kennedy e Cabral, 1983; Migneault *et al.* 2004).

De acordo com Migneault *et al.* (2004), a imobilização de enzimas usando o glutaraldeído deve efectuar-se entre um pH neutro a ligeiramente alcalino, a temperaturas baixas ($4\text{ }^\circ\text{C}$) e são necessários tempos de reacção longos (6 - 18 h). Embora seja um método simples, de fácil execução e, muitas vezes, combinado com outros métodos, o mecanismo de reacção do glutaraldeído apresentado na Figura 1.5 é uma simplificação, uma vez que a reacção com os grupos amina das proteínas ainda não é claramente compreendida. Vários estudos demonstraram que a estrutura do glutaraldeído em solução aquosa não se limita à forma monomérica. Podem existir também dímeros, trímeros e polímeros, que dão origem a uma variedade de reacções possíveis, que pode ser de difícil reprodutibilidade (Migneault *et al.* 2004). Na Figura 1.7 está representada a reacção do glutaraldeído na forma polimérica (a) com os grupos amina das enzimas.

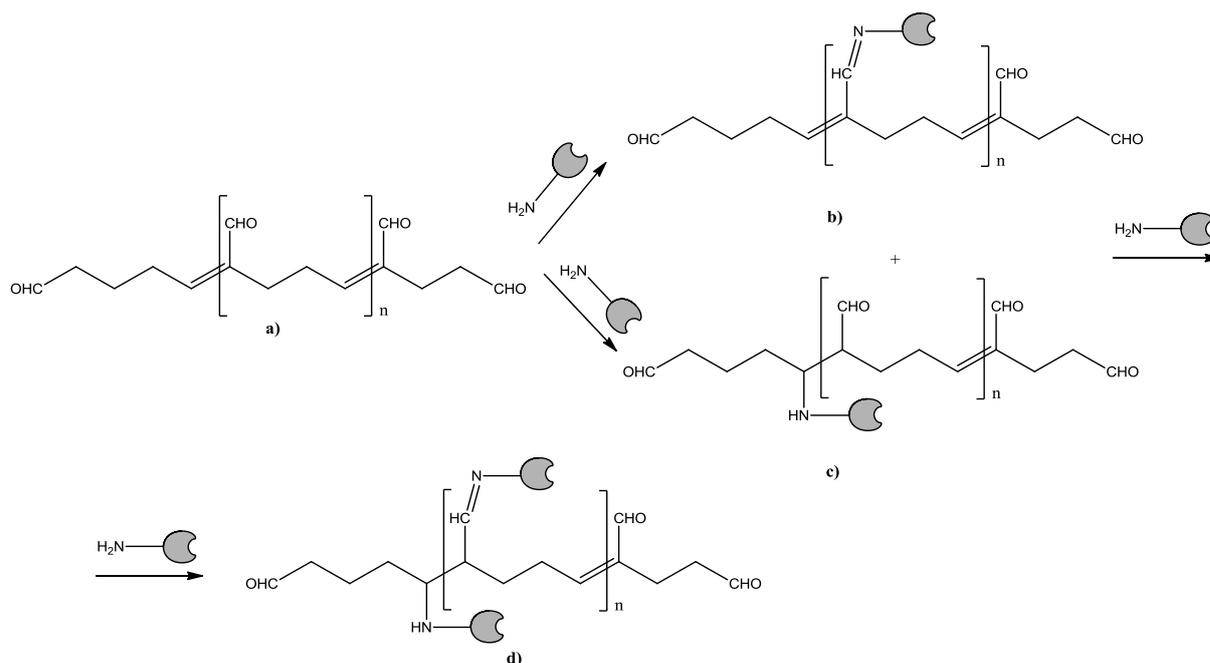


Figura 1.7. Reacções entre o glutaraldeído na forma polimérica (a) e os grupos amina das enzimas, sob condições alcalinas: formação de uma base de Schiff (b), formação de um produto de adição de Michael (c) e formação de um produto misto (d) (Adaptado de Migneault *et al.* (2004)).

Esta reacção pode resultar em dois produtos: uma base Schiff próxima de uma ligação dupla carbono-carbono (b), que é mais estável do que uma base de Schiff isolada, devido à conjugação do grupo aldeído interno com a ligação dupla carbono-carbono, e um produto de adição de Michael (c). No entanto, na presença de amina em excesso, pode aparecer um produto misto, (d). A maior parte destas ligações que se formam entre o glutaraldeído polimérico e as enzimas são mais estáveis do que uma base de Schiff.

Adsorção física

A imobilização por adsorção física é a técnica mais antiga e mais simples usada na imobilização de enzimas. Consiste em colocar o suporte, com características adequadas para a adsorção, em contacto com uma solução de enzima, sendo que a sua retenção se consegue devido ao estabelecimento de interacções fracas do tipo forças de van der Waals, interacções hidrofóbicas, electrostáticas ou ligações de hidrogénio entre a superfície das moléculas de enzima e a superfície do suporte (Cabral *et al.*, 2003). Após a imobilização, o suporte é recolhido e lavado exaustivamente. Alguns exemplos de suportes usados são o carvão activado, celite, nylon, materiais cerâmicos e vidro (Cabral *et al.*, 2003). A adsorção depende de variáveis como o pH, a natureza do solvente, a força iónica, a quantidade de enzima e de suporte, o tempo e a temperatura. Estas devem ser controladas, devido à natureza do tipo de

ligação que se forma (ligação fraca). Como não há espécies reactivas envolvidas, há poucas alterações conformacionais na enzima devido à interacção entre a enzima e o suporte ser através de forças fracas, pelo que há uma boa retenção da actividade da enzima. No entanto, a aplicabilidade de biocatalisadores imobilizados através desta técnica é reduzida devido à natureza reversível e fraca da interacção entre a enzima e o suporte, podendo haver dessorção da enzima sob condições operacionais (Kennedy e Cabral, 1983). Estes aspectos traduzem-se numa subsequente perda de actividade catalítica e contaminação dos produtos de reacção. Para evitar esta dessorção, a enzima pode ser reticulada, posteriormente à adsorção, usando um agente bifuncional (geralmente o glutaraldeído) (Cabral *et al.*, 2003).

1.1.3 Métodos de quantificação de proteínas imobilizadas

Apesar dos benefícios que a imobilização de enzimas apresenta, normalmente resulta na perda de quantidades de enzima significativas e, como tal, uma estimativa da quantidade de proteína imobilizada é um aspecto essencial na caracterização de enzimas imobilizadas (Ahmad e Saleemuddin, 1985). A quantificação da proteína imobilizada em suportes sólidos pode ser levada a cabo por métodos directos ou indirectos. Os métodos indirectos são os mais utilizados e baseiam-se na medição da proteína solúvel antes e depois do processo de imobilização. Tipicamente são usados os métodos clássicos de quantificação de proteínas em solução como os métodos de Lowry (Lowry *et al.*, 1951), Bradford (Bradford, 1976), Smith (Smith *et al.*, 1985) ou a medição da absorvância a 280 nm. Embora estes métodos sejam rápidos e bem estabelecidos, a determinação é pouco exacta devido a, em geral, não ser possível quantificar a enzima que sai nas lavagens, devido à sua baixa concentração (Bonde *et al.*, 1992). Outro problema inerente a estes métodos é o facto de alguns tampões e reagentes usados não serem compatíveis com os ensaios de proteína (Bradford, 1976). Os métodos directos consistem na quantificação da proteína imobilizada, por interacções com a enzima imobilizada. Segundo Bonde *et al.* (1992), o método directo mais utilizado é o acoplamento de proteínas marcadas com, p. ex., I^{125} , seguido pela determinação da quantidade de radioactividade retida no suporte depois da lavagem. Outros métodos de quantificação directa incluem a medição da quantidade de aminoácidos libertados após hidrólise ácida, descrito por Fowell e Chase (1986) e a ligação e eluição de corantes à proteína imobilizada, como exposto por Lewis e Schuster (1990).

Método de Bradford

O método de Bradford utiliza o corante *Coomassie Brilliant Blue G-250* ou o *Coomassie Brilliant Blue R-250* para a determinação de proteínas. Baseia-se na interacção entre o corante e os aminoácidos de cadeias laterais básicas ou aromáticas das proteínas. A um pH ácido, a interacção entre a proteína e o corante provoca o deslocamento do equilíbrio do corante para a forma aniónica, que absorve fortemente a 595 nm (Bradford, 1976; Zaia *et al.*, 1998).

Adsorção e eluição do corante Coomassie Brilliant Blue

O método de adsorção e eluição do corante Coomassie Brilliant Blue é um método de quantificação directa que tem por base a propriedade do corante se conseguir ligar de uma forma forte mas reversível às proteínas. Consiste em incubar a proteína imobilizada em corante e, após lavagem para retirar corante não ligado à proteína, na eluição do corante que se ligou à proteína imobilizada, quantificando-se a 605 nm o corante eluído (Ahmad e Saleemuddin, 1985).

1.1.4 Tripsina

A tripsina (EC 3.4.21.4), a enzima utilizada neste trabalho, é uma protease serínica responsável pela quebra de ligações peptídicas de proteínas, através de uma reacção de hidrólise. Trata-se de uma endopeptidase, que hidrolisa especificamente ligações peptídicas entre o grupo carbonilo de uma arginina ou lisina e o grupo amina de um outro aminoácido. No entanto, se existir prolina no lado do grupo carbonilo, a hidrólise não ocorre e, se existir um aminoácido ácido, quer no lado carbonílico, quer no lado amínico, ocorre mais lentamente (Rodríguez, *et al.*, 2008). Também catalisa a hidrólise de ligações éster e amida de diversos substratos sintéticos (Markwardt *et al.*, 1968).

O *N*-benzoil-L-arginina *p*-nitroanilida (BAPNA) é um exemplo de um substrato sintético usado nos ensaios de actividade da tripsina. Trata-se de um substrato cromogénico, que liberta um produto corado após a acção da enzima (Erlanger *et al.*, 1961). O BAPNA é constituído por um corante sintético, *p*-nitroanilina (pNA), ligado covalentemente a um aminoácido. Em solução é incolor, mas, quando hidrolisado, a solução torna-se amarela (devido à *p*-nitroanilina que se liberta), indicando a quebra da ligação entre o corante e o aminoácido, como ilustrado na Figura 1.8. A formação da *p*-nitroanilina é geralmente monitorizada a 410 nm (Erlanger *et al.*, 1961).

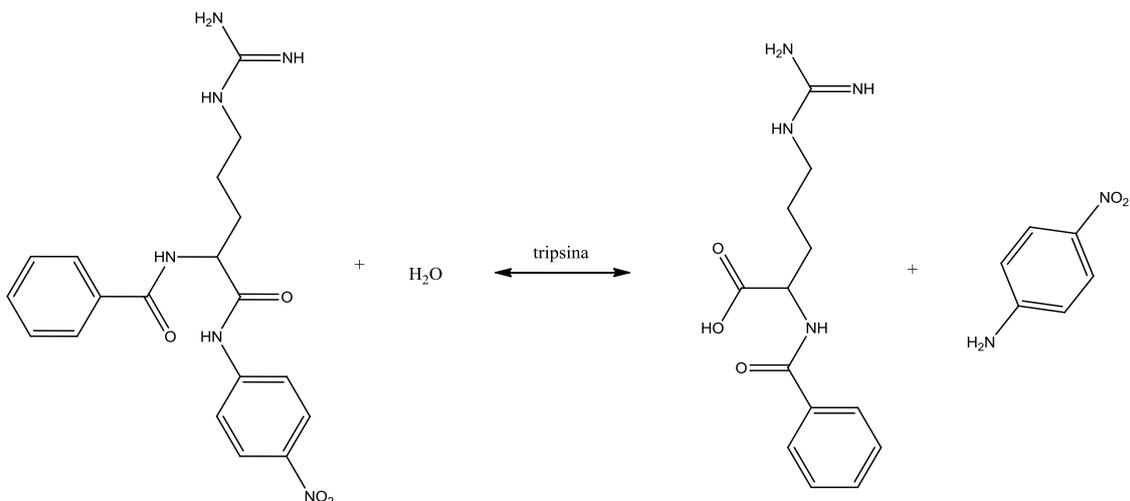


Figura 1.8. Reacção de hidrólise do BAPNA catalisada pela tripsina, originando benzóil-*L*-arginina e *p*-nitroanilina (Marten *et al.*, 2010).

O pH óptimo da tripsina de origem bovina encontra-se entre 7 e 9,5 e a temperatura óptima situa-se entre os 33 e os 38 °C (Sipos e Merkel, 1970; Wu e Jiang, 2008).

Rodrigues *et al.* (2013) realizaram um estudo onde compararam a actividade da tripsina bovina a diferentes valores de temperatura (Figura 1.9) e a diferentes valores de pH (Figura 1.10), utilizando o mesmo ensaio de actividade utilizado neste trabalho. Nesse estudo apuraram que a temperatura óptima da tripsina se situa nos 50 °C e que o pH óptimo é de 8.

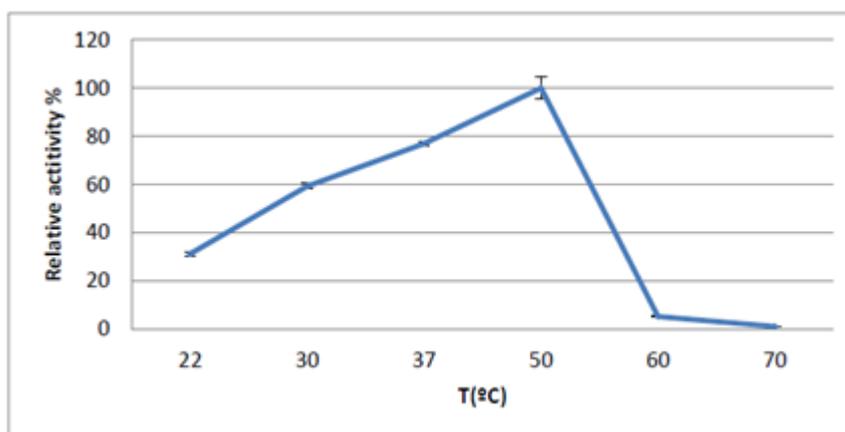


Figura 1.9. Efeito da temperatura na actividade da tripsina entre os 22 °C e os 70 °C. O tampão usado foi o TRIS-HCl 0,05 M pH 8,0 contendo 0,01 M CaCl₂ e a concentração de BAPNA usada foi de 2,98 mM (Rodrigues *et al.*, 2013).

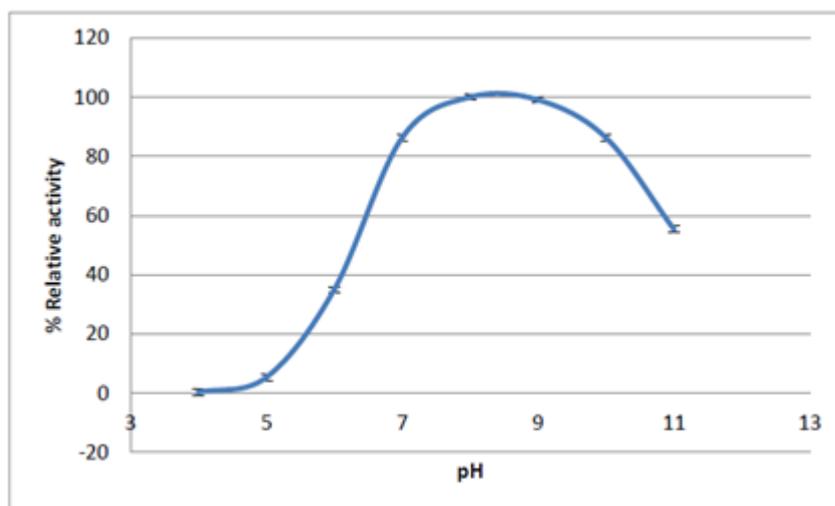


Figura 1.10. Efeito do pH na actividade da tripsina. Ensaio realizado entre pH 4 e pH 11, usando o tampão TRIS/acetato/glicina 0,05 M contendo 0,01 M CaCl_2 , ajustado a cada pH a 37 °C, usando uma concentração de BAPNA de 2,98 mM (Rodrigues et al., 2013).

Seabra e Gil (2007) também realizaram um estudo idêntico ao descrito acima, usando o mesmo substrato - BAPNA. Apuraram que o pH ótimo da tripsina livre se situa a pH 7, exibindo uma temperatura ótima de 45°C.

A tripsina é um exemplo de uma protease cuja imobilização tem sido bastante estudada. De acordo com Freije *et al.* (2005) e Migneault *et al.* (2004b), quando se usa a tripsina livre, a hidrólise requer tempos muito longos (tipicamente superiores a 5 h), a temperaturas elevadas, e há uma perda muito rápida da actividade enzimática. Para além destes factores, como a tripsina é uma protease, tem a capacidade de se auto-hidrolisar, impossibilitando a sua utilização em concentrações elevadas, de modo a evitar que se gerem fragmentos da auto-proteólise no meio reaccional. Sipos e Merkel (1970) afirmaram que a presença de iões de cálcio no meio reaccional estabiliza a tripsina contra a auto-proteólise. Bode e Schwager (1975) demonstraram depois que os iões de cálcio não só protegem a tripsina contra a auto-hidrólise como aumentam também ligeiramente a sua actividade proteolítica.

Têm sido usados diversos materiais de suporte na imobilização da tripsina que incluem sílica porosa, vidro poroso, derivados de celulose, algodão, poliésteres, *nylon*, poliestireno (PS), poli(cloreto de vinilo) (PVC), entre outros (Massolini e Calleri, 2005; Nouaimi *et al.*, 2001; Seabra e Gil, 2007; Vicente, 2007; Li *et al.*, 2013). Na Tabela I apresentam-se alguns exemplos de suportes e métodos usados na imobilização desta enzima.

Tabela I. Exemplos de alguns métodos e suportes usados na imobilização da tripsina.

Referência	Suporte	Método de imobilização
Arasaratnam <i>et al.</i> (2000)	Eudragit S-100 P(MAA-co-MMA)	Oclusão; Ligação covalente com EDAC; Ligação covalente com EDAC, na presença de um inibidor competitivo da enzima.
Migneault <i>et al.</i> (2004b)	Vidro aminopropilado	Ligação covalente com glutaraldeído 1% e tratamento com NaCNBH ₃ .
Migneault <i>et al.</i> (2004b)	–	Reticulação da enzima com glutaraldeído a 2,5%, na ausência de suporte.
Amaral <i>et al.</i> (2006)	Dracon ferromagnético (PET)	Derivatização com hidrazina seguida por ligação covalente com glutaraldeído 2% (m/v).
Hamerska-Dudra <i>et al.</i> (2007)	Copolímeros de PNIPAM-PHEMA e PNIPAM-PGMA	Derivatização com etilenodiamina seguida por adsorção, incorporação da enzima e reticulação com glutaraldeído a 2,5%.
Johnson e Makame (2012)	Criogéis macroporosos de poli(acrilamida com funcionalidade epóxido	Derivatização do suporte com etilenodiamina seguida por ligação covalente com glutaraldeído a 5% (v/v) e tratamento com NaBH ₄ .
Kulik, <i>et al.</i> (1993)	Fibras de PET	Enxertos de cadeias de poli(ácido acrílico) nas fibras de PET ozonizadas seguida de adsorção física e ligação covalente com EDAC, na presença de um inibidor competitivo da enzima.

EDAC – 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida; MAA – ácido metacrílico; MMA – metacrilato de metilo; NaBH₄ – Borohidreto de sódio NaCNBH₃ – Cianoborohidreto de sódio; PET - Poli(tereftalato de etileno); PGMA – Poli(metacrilato de glicidilo); PHEMA – Poli(metacrilato de 2-hidroxietilo); PNIPAM – Poli(*N*-isopropilacrilamida).

1.2 Suportes de imobilização

Para além do método de imobilização empregue e da escolha da enzima a imobilizar, a selecção do suporte adequado é um parâmetro crucial na obtenção de um sistema catalítico eficaz. O material usado como suporte deve obedecer a uma série de critérios. Este deve apresentar estabilidade química, física e biológica durante o seu processo de síntese e nas condições de reacção. Para além disso, deve apresentar resistência mecânica suficiente (especialmente para aplicações industriais), ter grupos funcionais adequados para possibilitar a ligação covalente de enzimas e uma estrutura que permita uma elevada capacidade de carga de enzima. A hidrofiliabilidade e a toxicidade do suporte também são aspectos a ter em conta, de

forma a não afectar a actividade da enzima, nem a comprometer os produtos de reacção gerados (Brena *et al.*, 2006; Górecka e Jastrzebska, 2011).

Os suportes utilizados na imobilização de enzimas podem classificar-se em orgânicos e inorgânicos, de acordo com a sua composição química. Os suportes orgânicos podem ainda dizer respeito a polímeros naturais ou sintéticos (Datta *et al.*, 2013). Por norma, os suportes orgânicos são elegidos por já possuírem ou por ser relativamente fácil colocar grupos funcionais reactivos à sua superfície. Porém, estes suportes apresentam resistência mecânica e química reduzida, condicionando a sua aplicação em condições operacionais mais agressivas, o que influencia a possibilidade da sua regeneração (Cabral *et al.*, 2003). Algumas das vantagens da utilização de polímeros sintéticos em relação aos naturais é o facto de serem inertes ao ataque microbiano e permitem a variação do grau de porosidade e da composição química, através da co-polimerização de monómeros diferentes. Os suportes inorgânicos apresentam a vantagem de serem quimicamente inertes e de terem boa estabilidade mecânica e térmica quando comparados com os suportes orgânicos. Porém, quando escolhidos, o tipo de ligação enzima-suporte é condicionado, porque os seus grupos funcionais são quase sempre grupos hidroxilo e, para se estabelecerem ligações covalentes, estes têm de ser modificados por activação do suporte, existindo poucas técnicas eficientes para o efeito (Cabral *et al.*, 2003).

Estrutura do suporte

A estrutura do suporte também é um factor determinante na imobilização de enzimas, uma vez que determina a quantidade de enzima que se consegue ligar ao suporte, de acordo com a área disponível para a ligação. Desta forma, os suportes podem ser classificados em porosos e não porosos. Suportes não porosos apresentam poucas limitações difusionais mas, por outro lado, têm pouca capacidade de carga de enzima. Os materiais nanoestruturados, devido à sua elevada área de superfície, têm-se apresentado muito promissores como suportes de imobilização, e dentro desta gama, têm sido alvo de estudo os materiais nanoporosos, nanofibras, nanotubos e nanopartículas (Wang, 2006; Kim *et al.*, 2008). A elevada área de superfície deste tipo de materiais resulta numa melhoria em termos de quantidade de enzima imobilizada, o que leva a um aumento da actividade enzimática por unidade de massa ou volume, assim como a um aumento de estabilidade quando comparados com sistemas de imobilização de enzimas em materiais convencionais (Wang *et al.*, 2009). Adicionalmente, a enzima imobilizada nestes materiais recebe maior protecção do meio ambiente em que se encontra (Brena *et al.*, 2006). Por outro lado, estes sistemas podem levantar dificuldades na sua dispersão e reutilização (Wang, 2006).

1.2.1 Membranas de nanofibras

O progresso da nanotecnologia na década de 90 foi seguido pelo rápido desenvolvimento da nanobiotecnologia, o que originou avanços inovadores na área, tal como a imobilização de enzimas em membranas de nanofibras poliméricas (Kim *et al.*, 2008). A electrofiação é uma técnica simples e económica que tem sido explorada para produzir membranas de nanofibras poliméricas com potenciais aplicações em diversas áreas (Park, 2010). A solução polimérica a usar pode ser constituída por polímeros naturais, sintéticos e até misturas de polímeros e às membranas obtidas podem fazer-se modificações de superfície de modo a beneficiar a actividade da enzima (Fang *et al.*, 2011).

Como foi mencionado anteriormente, embora os materiais nanoestruturados ofereçam boas características de imobilização, os problemas de dispersão e a difícil recuperação para posterior reutilização são entraves à sua utilização. No entanto, tem vindo a ser demonstrado que a utilização de membranas de nanofibras ultrapassa estas limitações apresentando as mesmas vantagens dos materiais à nano-escala como elevada área de superfície para ligação ou oclusão das enzimas (Kim *et al.*, 2006). As membranas de nanofibras obtidas por electrofiação são duradouras, facilmente separadas e podem ser produzidas com elevada porosidade de forma a diminuir o caminho difusional do substrato até à enzima (Kim *et al.*, 2006).

Na Tabela II são apresentados alguns exemplos de imobilização da tripsina em nanofibras, onde são referidos o tipo de nanofibra, os correspondentes métodos de imobilização, a quantidade de enzima imobilizada (e método de quantificação utilizado), a actividade enzimática conseguida e as respectivas estabilidades. A actividade da enzima imobilizada é variável, registando-se valores entre 0,006 e 6,13 $\mu\text{M pNA min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ de suporte, destacando-se a imobilização em nanofibras de poliestireno-poli[estireno-co-(anidrido maleico)] (PS-PSMA) por ligação covalente ao anidrido maleico (MA) e reticulação com glutaraldeído (Lee *et al.*, 2010). Kim *et al.* (2009) apresentam valores de actividade enzimática entre 2,79 M e 825 M $\text{pNA min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ de suporte (este último valor parece ser demasiado elevado). Em termos de estabilidade, os valores alcançados são um pouco discrepantes, mas o sistema que se apresentou mais estável foi o levado a cabo por Kim *et al.* (2009), em que imobilizaram a tripsina por ligação covalente ao MA e reticulação com glutaraldeído (0,5%, m/v) em nanofibras de PS-PSMA (na proporção 2:1). Concluíram que ao fim de 1 ano de armazenamento não há perda significativa da actividade. Não se encontraram estudos na literatura sobre imobilização de tripsina em membranas de nanofibras de PET, de PLA ou de misturas de ambos.

Tabela II. Exemplos de alguns resultados da imobilização de tripsina em suportes de nanofibrosos.

Suporte	Método de imobilização	Quantidade de enzima imobilizada	Actividade	Estabilidade	Referência
Nanofibras de PS-PSMA (diferentes proporções testadas)	Ligação covalente ao MA	Diferença entre a quantidade de enzima antes e depois da imobilização (método BCA); resultado não indicado	Substrato: BAPNA; pH 7,6; T_{amb} ; Actividade imobilizada: 0,006-0,020 $\mu\text{M pNA min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ suporte	Armazenamento/operacional (meio não indicado; T_{amb}): ^b perda de 60% de actividade ao fim de 1 dia; perda total de actividade aos 14 dias.	Lee <i>et al.</i> , (2010)
	Ligação covalente ao MA e reticulação com GA (0,5%, m/v)	— ^a	Substrato: BAPNA; pH 7,6; T_{amb} Actividade imobilizada: 1,03-6,13 $\mu\text{M pNA min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ suporte	Armazenamento/operacional (meio não indicado; T_{amb}): ^b perda de 10 – 25% de actividade ao fim de 30 dias.	Lee <i>et al.</i> , (2010)
Nanofibras de PS-PSMA, na proporção 2:1	Ligação covalente	— ^a	Substrato: BAPNA; pH 7,9; T_{amb} Actividade imobilizada: 2,79 M pNA $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ suporte (<i>sic</i>)	Armazenamento/ operacional (meio não indicado; T_{amb}): ^b perda total de actividade ao fim de 12-14 dias.	Kim <i>et al.</i> , (2009)

^a Não conseguiram quantificar. ^b Estudo de armazenamento feito por repetição do ensaio com a mesma amostra.

BAPNA – *N*-benzoil-L-arginina *p*-nitroanilida; BCA – ácido bicinconínico; GA – glutaraldeído; GMA – metacrilato de glicidilo; MA – anidrido maleico; MAA – ácido metacrílico; MMA – metacrilato de metilo; pNA – *p*-nitroanilina; PS – poli(estireno); PSMA – poli[estireno-co-(anidrido maleico)].

Tabela II (continuação). Alguns exemplos de resultados da imobilização de tripsina em suportes de nanofibrosos.

Suporte	Método de imobilização	Quantidade de enzima imobilizada	Actividade	Estabilidade	Referência
Nanofibras de PS-PSMA, na proporção 2:1	Ligação covalente ao MA e reticulação com GA (0,5%, m/v)	– ^a	Substrato: BAPNA; pH 7,9; T _{amb} Actividade imobilizada: 825 M pNA min ⁻¹ mg ⁻¹ suporte (sic)	Armazenamento/ operacional (meio não indicado; T _{amb}): ^b perda não significativa de actividade ao fim de 1 ano.	Kim <i>et al.</i> , (2009)
Esferas magnéticas de nanofibras de P(GMA-MMA)-g-MAA	Adsorção via interacções iónicas	Diferença entre a quantidade de enzima antes e depois da imobilização (280 nm); 123,2 mg tripsina/g de suporte	Substrato: BAPNA; pH 7,5; T = 25 °C; actividade imobilizada não indicada.	Armazenamento (tampão fosfato a pH 4, 4 °C): perda de 39% de actividade ao fim de 8 semanas. Operacional: perda de 23% de actividade ao fim de 7 reutilizações.	Bayramoğlu <i>et al.</i> , (2008)

^a Não conseguiram quantificar. ^b Estudo de armazenamento feito por repetição do ensaio com a mesma amostra.

BAPNA – *N*-benzoil-L-arginina *p*-nitroanilida; BCA – ácido bicinconínico; GA – glutaraldeído; GMA – metacrilato de glicidilo; MA – anidrido maleico; MAA – ácido metacrílico; MMA – metacrilato de metilo; pNA – *p*-nitroanilina; PS – poli(estireno); PSMA – poli[estireno-co-(anidrido maleico)].

1.3 Reactores de membrana biocatalíticos

A utilização de reactores de membrana constitui uma tentativa de integração de processos (conversão biocatalítica, separação de produtos e enriquecimento dos produtos) em apenas um passo, de forma a aumentar a sua produtividade. A remoção contínua dos produtos de reacção pode aumentar o rendimento de enzimas que sofrem de inibição por parte dos produtos. Além disso, pode também alterar o equilíbrio da reacção para o lado dos produtos e assim aumentar a produtividade de todo o processo, contribuindo também para uma redução de custos (Paiva e Malcata, 1997, Jochems *et al.*, 2011).

Na Figura 1.11 apresentam-se esquematizados o sistema convencional de reacção e separação e o sistema com essas operações unitárias integradas.

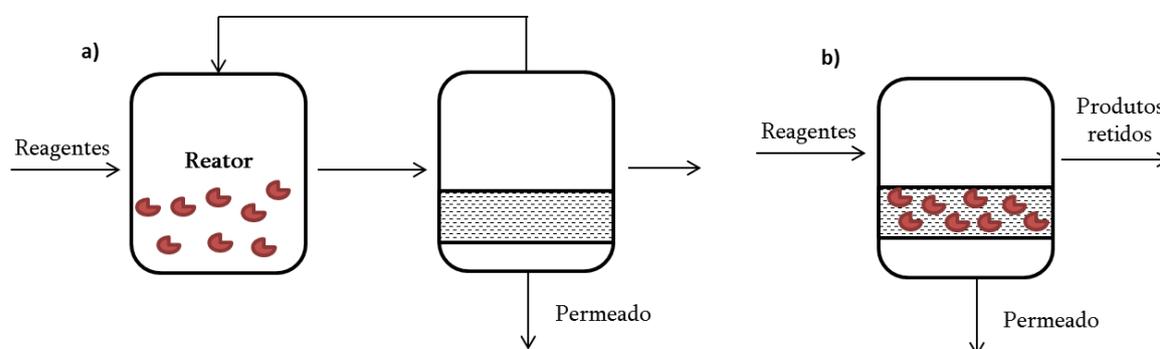


Figura 1.11. Representação esquemática de a) processo clássico de reacção e separação b) processo integrado de reacção/separação.

De acordo com a literatura, já foram investigados vários materiais de membrana para este tipo de reactores como a celulose, sílica porosa e outros materiais cerâmicos porosos, polietersulfona, poliacrilonitrilo, entre outros (Rios *et al.*, 2004a; Agustian *et al.*, 2011; Lyagin *et al.*, 2011). Actualmente, já existe uma grande variedade de membranas no mercado com as especificações adequadas para utilização em reactores de membrana, na forma de folha, tubulares e fibras ocas (Paiva e Malcata, 1997).

Para além do tipo de imobilização usado neste tipo de membrana, outro aspecto que as distingue é o tipo de operação usado. Os reactores de membrana de ultrafiltração são usados quando o substrato apresenta maior peso molecular do que o produto e quando ambos são solúveis nos mesmos solventes. Usando uma membrana com um tamanho de poro adequado, o substrato é transportado até à enzima imobilizada, no interior ou sobre a membrana, mas não consegue atravessar, ao contrário dos produtos que conseguem passar e ser recuperados do outro lado. No entanto, caso o substrato e o produto apresentem o mesmo

peso molecular, ambos atravessam a membrana, mas torna-se necessário combinar a velocidade de transporte com a velocidade de reacção, de modo a assegurar que o substrato que atinge a enzima é convertido e o produto transportado para o outro lado da membrana (Giorno e Drioli, 2000). Caso o substrato apresente solubilidade diferente do produto, podem ser usados reactores de membrana bifásicos. Neste tipo de sistema, a membrana biocatalítica é colocada entre dois líquidos imiscíveis, uma fase orgânica e uma aquosa. A fase orgânica contém o substrato e é conduzida de um dos lados da membrana; o substrato é transportado (por difusão) até à enzima, onde a reacção ocorre, sendo o produto da reacção extraído na fase aquosa e lançado do outro lado da membrana (Giorno e Drioli, 2000).

Estudos recentes descrevem a preparação de reactores biocatalíticos de membrana e a sua optimização para aplicações nas áreas agro-alimentar, farmacêutica, biomédica e no tratamento de águas residuais (Giorno e Drioli, 2000; Fang *et al.*, 2011). Na Tabela III estão apresentados alguns exemplos de aplicações de reactores de membrana biocatalíticos na indústria alimentar.

Tabela III. Exemplos de aplicações de reactores de membrana biocatalíticos na indústria alimentar (adaptado de Giorno and Drioli, 2000).

Reacção	Enzima	Bioreactor de membrana	Objectivo
Hidrólise da lactose a glucose e β -galactose	β -galactosidade	Reactor pistão	Remoção da lactose do leite ou do soro de leite para consumo humano
Hidrólise de proteínas do leite com elevado peso molecular	tripsina e quimotripsina	Fibras ocas assimétricas com enzima gelificada	Produção de comida para bebés
Hidrólise da pectina	pectinase	CSTR com membrana UF	Clarificação de sumos de fruta e de vinho
Hidrólise de óleo de soja	lipase	Reactores de membrana com fibras ocas hidrofílicas	Tratamento de óleos
Conversão da glicose a ácido glucónico	glicose oxidase ou catalase	Reactor de leito fixo	Prevenção de descoloração e de perda de sabor de produtos à base de ovos durante o armazenamento

CSTR – Reactor contínuo perfeitamente agitado; UF – Ultra-filtração.

1.4 Técnicas de caracterização

Ângulos de contacto

O ângulo de contacto – ângulo formado pela base de uma gota de água adicionada à superfície de um material e uma tangente ao contorno da gota no ponto em que as três fases (sólida, líquida e gasosa) se encontram – mede a molhabilidade da superfície. Ainda que não haja consenso quanto ao valor do ângulo de contacto que separa o carácter hidrofóbico do hidrofílico, uma das propostas mais aceites propõe que a linha divisória hidrofílico/hidrofóbico coincide com o chamado limite de Berg ($\Theta = 65^\circ$; Vogler (2001)). As superfícies que apresentam ângulos de contacto superiores ao limite de Berg podem ser definidas como hidrofóbicas, enquanto as que apresentam valores inferiores ao limite de Berg podem ser classificadas de hidrofílicas. Esta atribuição é aplicada quando se trata de superfícies que não apresentam rugosidade (Navarro *et al.*, 2008). Quando se lida com superfícies com rugosidade é necessário usar um modelo que avalie como o ângulo de contacto aparente muda com a rugosidade da superfície. O efeito da rugosidade sobre o ângulo de contacto foi já descrito por Wenzel e por Cassie e Baxter (Wenzel, 1936; Cassie e Baxter, 1944). A Figura 1.12, A descreve um regime de molhabilidade homogéneo, ou seja, em que a gota de água penetra todos os espaços da superfície, que caracterizam a rugosidade, e é definido pela Equação 1.1, onde Θ^* é o ângulo de contacto aparente, i.e., aquele que é medido, r (≥ 1) é o factor de rugosidade, ou seja, a razão entre a área real e a área projectada, e Θ é o ângulo de contacto da mesma superfície não-rugosa ($r = 1$) (Wenzel, 1936).

$$\cos \theta^* = r \cos \theta \quad (1.1)$$

No caso de um regime de molhabilidade heterogéneo, em que a gota fica suspensa nas irregularidades da superfície, o modelo que descreve este regime é o modelo de Cassie-Baxter (Figura 1.12, B), descrito pela Equação 1.2:

$$\cos \theta^* = f_1 \cos \theta - f_2 \quad (1.2)$$

Nesta equação f_1 é a fracção da área da superfície que foi molhada pelo líquido e f_2 é a fracção da área de superfície que não foi molhada pelo líquido ($f_1 + f_2 = 1$). Neste caso o ângulo de contacto aparente é o resultado dos diferentes tipos de contacto que o líquido exhibe: com o material e com o ar que se encontra aprisionado entre a gota e a superfície.

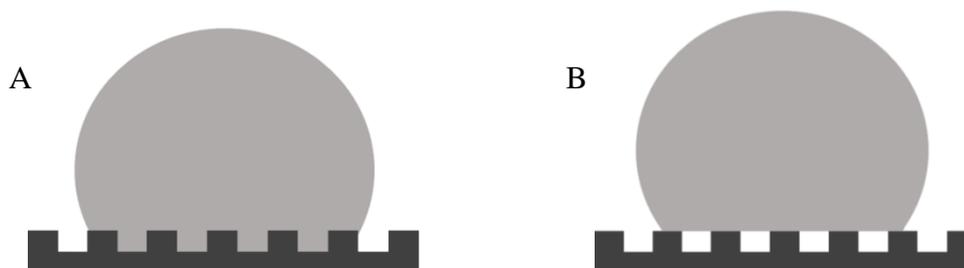


Figura 1.12. A - Molhabilidade homogénea numa superfície rugosa hidrofóbica (Modelo de Wenzel); B - Molhabilidade heterogénea numa superfície rugosa hidrofóbica (Modelo de Cassie-Baxter).

Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

A Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de *Fourier* (FTIR) é uma técnica analítica que permite identificar e caracterizar os grupos funcionais existentes em amostras líquidas, sólidas, gasosas ou em solução. Baseia-se na vibração de conjuntos de átomos de uma molécula quando sujeita a radiação na gama do infravermelho. O espectro de infravermelho é geralmente obtido pela passagem de radiação infravermelha através de uma amostra, determinando-se qual a fracção de radiação incidente que é absorvida num determinado nível de energia (Stuart, 2004).

Microscopia electrónica de varrimento (SEM)

A SEM é uma técnica que permite tirar algumas conclusões relativamente à morfologia de superfície de diversos materiais. Esta utiliza um feixe de electrões que incide sobre a amostra e a percorre. Além dos electrões reflectidos, são emitidos electrões a partir de zonas muito próximas da superfície (electrões secundários), sendo estes os analisados. A sua intensidade depende da composição e morfologia da superfície da amostra. As amostras para poderem ser caracterizadas por esta técnica têm de apresentar boa condutividade eléctrica superficial. Se não apresentarem, procede-se à metalização, que consiste na aplicação de um revestimento fino de ouro ou de cobre (Goodhew *et al.*, 2001).

Calorimetria diferencial de varrimento (DSC)

A DSC é uma técnica de análise térmica que mede o fluxo de calor associado às transições nos materiais em função do tempo e temperatura. As mudanças de energia permitem localizar e medir as transições que ocorrem na amostra e saber a que temperaturas correspondem. Deste modo, é possível caracterizar o material no que diz respeito a temperaturas de fusão, de cristalização e de transição vítrea, entre outros aspectos. Uma

grande vantagem desta técnica é o fácil encapsulamento das amostras, sem ser requerida preparação das amostras, o que torna o método rápido e fácil de utilizar (Gabbott, 2008).

Análise Termogravimétrica (TGA)

A TGA é uma técnica que permite avaliar a estabilidade térmica de uma amostra quando submetida a uma alteração de temperatura, através do estudo da variação de massa em função da temperatura e/ou tempo. As alterações da massa representam os mecanismos de degradação do polímero ou remoção de solventes residuais (Gabbott, 2008). Como vantagens desta técnica apresentam-se a capacidade de estudo numa vasta gama de temperaturas, sendo apenas necessária uma pequena quantidade de amostra, e a possibilidade de mudança de atmosfera circundante (Gabbott, 2008).

2 Materiais e métodos

Nesta secção são listados os reagentes usados nos métodos de imobilização e nos posteriores ensaios de actividade, assim como o material e equipamento utilizados. De seguida, são descritos os procedimentos efectuados para a preparação das membranas por electrofiação, para a imobilização da tripsina, assim como os métodos de determinação da quantidade de tripsina imobilizada e da sua actividade e os estudos de estabilidade. Por fim, procede-se à exposição dos métodos de caracterização das membranas de nanofibras de PET e de PET/PLA de forma a caracterizar o suporte de imobilização e compará-lo com membranas de PET.

2.1 Reagentes e materiais

Na Tabela IV são listados os reagentes e materiais usados ao longo do trabalho experimental, as suas características mais relevantes e o fornecedor.

Todas as soluções usadas neste trabalho, à excepção da solução de BAPNA, foram preparadas com água destilada.

Tabela IV. Lista dos reagentes e materiais utilizados.

Categoria	Descrição	Características	Fabricante/Fornecedor
Suporte	Membranas de nanofibras de PET/PLA	-----	-----
	PET	<i>pellets</i>	Flexitex
	PLA	Ingeo 2002 D	NatureWorks LLC
Enzima	Tripsina (EC 3.4.21.4) de pâncreas bovino	~9000 U/mg ^a	Sigma-Aldrich

^a U: Unidade de actividade enzimática. Definição de unidade de actividade enzimática do fabricante: 1 U é a quantidade de enzima que provoca uma variação na absorvância a 253 nm de 0,001 por minuto, a pH 7,6 e a 25 °C, usando BAEE – hidrocloreto do éster etílico da *N*_α-benzoil-L-arginina – como substrato.

BAPNA - *N* - benzoil - L - arginina p-nitroanilida; DMSO - Dimetilsulfóxido; EDAC - 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida; HMD - hexametenodiamina; MES - 2- (*N* - ácido morfolinoetanossulfónico) hidratado; NaCNBH₃ - Cianoborohidreto de sódio; PET - Poli(tereftalato de etileno); PLA - Poli(ácido láctico); TRIS - Tris(hidroximetil)aminometano.

Tabela IV (continuação). Lista dos reagentes e materiais utilizados.

Categoria	Descrição	Características	Fabricante/Fornecedor
Substrato	BAPNA	≥ 98 %	Sigma-Aldrich
Agentes reticulantes	EDAC	≥ 98 %	Sigma-Aldrich
	Solução de glutaraldeído	~ 25%	Fluka
Braço Extensor	HMD	98%	Sigma-Aldrich
Soluções-tampão	MES		Sigma-Aldrich
	TRIS (Trizma [®] base)		Sigma-Aldrich
	Fosfato de sódio dibásico		Sigma-Aldrich
	Fosfato de sódio monobásico		Sigma-Aldrich
	Cloreto de sódio	99%	Panreac
	Ácido clorídrico	99%	Fischer Chemicals
	Glicina	99,5%	Sigma-Aldrich
	Acetato de sódio anidro	~ 37 %	May & Baker LTD
	Cloreto de cálcio di-hidratado		Sigma-Aldrich
Solventes	DMSO		Sigma-Aldrich
Outros	p- nitroanilina		Sigma-Aldrich
	NaCNBH ₃	90%	Sigma-Aldrich
	Reagente de Bradford		Sigma-Aldrich
	Corante Coomassie [®] Brilliant Blue R-250		Merck

^a U: Unidade de actividade enzimática. Definição de unidade de actividade enzimática do fabricante: 1 U é a quantidade de enzima que provoca uma variação na absorvância a 253 nm de 0,001 por minuto, a pH 7,6 e a 25 °C, usando BAEE – hidrocloreto do éster etílico da *N*_α-benzoiL-L-arginina – como substrato.

BAPNA - *N* - benzoiL - L - arginina p-nitroanilida; DMSO - Dimetilsulfóxido; EDAC - 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida; HMD - hexametenodiamina; MES - 2- (*N* - ácido morfolinoetanossulfónico) hidratado; NaCNBH₃ - Cianoborohidreto de sódio; PET - Poli(tereftalato de etileno); PLA - Poli(ácido láctico); TRIS - Tris(hidroximetil)aminometano.

2.2 Equipamentos

As medições de pH foram realizadas recorrendo a um medidor de pH com uma sonda de temperatura acoplada (CRISON GLP 21, Crison Instruments, S.A., Espanha).

A temperatura do banho termostático foi avaliada através de um termómetro de contacto electrónico (SENSOTERM II, J.P. SELECTA s.a., Espanha).

A actividade enzimática foi determinada em contínuo com o auxílio de um espectrofotómetro modular de ultra-violeta/visível adquirido à SCANSCI (Scansci, Lda.,

Portugal). Este é constituído por um suporte de *cuvettes* (qpod[®], Quantum Northwest, EUA) com um controlador de temperatura acoplado (TC 125, Quantum Northwest, Estados Unidos); uma bomba peristáltica (BT100-2J, Longerpump, China); uma fonte de luz Deutério-Halogénio (DH 2000, Ocean Optics GmbH, Alemanha) e uma unidade espectrofotométrica (ScanSpec UV, Scansci, Lda., Portugal) com um detector Sony ILX511 Linear CCD. O *software* utilizado foi o *SpectraScan 1.0* (Scansci, Lda., Portugal).

Os ângulos de contacto das membranas de nanofibras foram determinados através do goniómetro automático Dataphysics Contact Angle System (OCA 20, DataPhysics Instruments GmbH, Alemanha). Os ângulos de contacto foram calculados depois do ajuste ao contorno da gota pelo método Young Laplace, usando o *software* SCA (DataPhysics Instruments GmbH, Alemanha).

Os espectros ATR-FTIR das membranas de PET e PET/PLA foram recolhidos usando o espectrofotómetro JASCO FT/IR – 4100 em sistema ATR (*Attenuated total reflectance*) de reflexão única (MK II Golden GateTM, Specac Limited, Inglaterra). O *software* usado foi o Spectra Manager FT/IR – 4000-6000.

As medições da análise térmica gravimétrica foram feitas usando o analisador termogravimétrico TGA 2920 (TA Instruments, USA).

A análise de calorimetria foi efectuada usando um calorímetro de varrimento diferencial DSC Q100 instrument (TA Instruments, USA).

As membranas de nanofibras foram analisadas usando os microscópios de varrimento Hitachi SU-70 (Bruker, Alemanha) e Hitachi SU 4100 (Bruker, Alemanha) e revestidas com um filme de ouro empregando um pulverizador catódico em magnetão (SEM Coating System SC502, Biorad, USA).

2.3 Procedimentos experimentais

É apresentada na Tabela V, uma lista onde estão sumariadas as soluções tampão usadas ao longo do trabalho experimental, acompanhadas das respectivas concentrações, pH e funções.

Tabela V. Lista das soluções tampão usadas no trabalho experimental, concentração, pH e função.

Tampão	Concentração	pH	Função
MES	0,1 M	5,5	Activação do suporte com EDAC
TRIS – NaCl	TRIS 0,1M NaCl 0,5M	7,6	Desactivação dos grupos carboxílicos e aldeídos activos
Fosfato de sódio	10 mM	8,0	Reticulação da enzima com glutaraldeído
TRIS – HCl + CaCl₂	TRIS 0,05M CaCl ₂ 0,01M	8,0 a 37°C 8,0 a 50°C	Ensaio de actividade
TRIS/Acetato de sódio/Glicina + CaCl₂	TRIS 0,05 M Acetato de sódio 0,05 M Glicina 0,05 M CaCl ₂ 0,01M	4,0 6,0	Ensaio de actividade

CaCl₂ – Cloreto de cálcio; EDAC - 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida; HCl – Ácido clorídrico; MES - 2- (N – ácido morfolinoetanosulfónico) hidratado; NaCl – Cloreto de sódio; TRIS - Tris(hidroxi metil)aminometano.

2.3.1 Preparação das membranas de nanofibras de PET/PLA

As membranas de nanofibras de PET/PLA usadas no trabalho experimental foram preparadas na Universidade de Aveiro, como descrito por Veleirinho *et al.* (2007). O princípio fundamental da electrofiação baseia-se na aplicação de um campo eléctrico a uma solução polimérica à saída/pendurada na ponta de uma seringa. Jactos da solução electricamente carregada são emitidos quando a força electrostática aplicada excede a tensão superficial da solução. Estes jactos emergem da ponta da agulha e são lançados para um colector eléctrico, como ilustrado na Figura 2.1 (adaptado de Park, 2010).

Prepararam-se soluções contendo PET e PLA (PET/PLA) na proporção mássica de 4:1, respectivamente. Estas soluções continham 30% (m/v) de polímero total dissolvido numa mistura de ácido trifluoroacético (TFA) e diclorometano (DCM) na proporção de 4:1. O processo de electrofiação foi conduzido com uma voltagem de 26 kV e com um fluxo de 0,2 mL/min. As fibras foram recolhidas num tambor rotativo (900 rpm) revestido com folha de alumínio, na forma de uma membrana. A distância mantida entre a ponta da agulha e o colector foi de 12 cm. O processo foi conduzido à temperatura ambiente. Depois de electrofiadas, as membranas foram lavadas com acetona e secas a 35 °C.

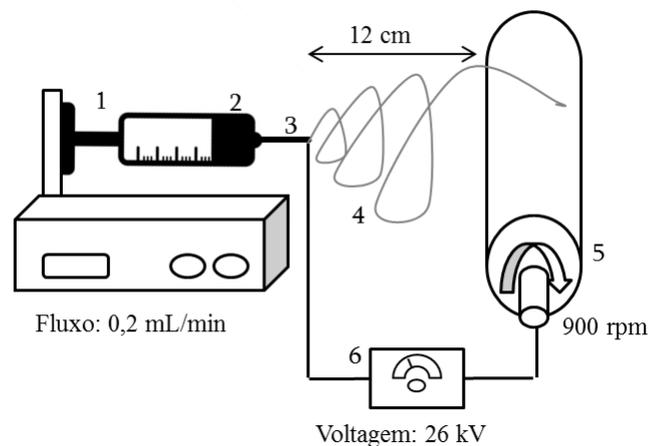


Figura 2.1. Diagrama esquemático da configuração dos aparelhos utilizados no processo de electrofiação. 1 – seringa. 2 – solução polimérica. 3 – agulha. 4 – jacto líquido. 5 – colector. 6 – fonte de alimentação de alta tensão.

Da membrana de PET/PLA obtida do processo de electrofiação, foram cortados quadrados de $1,5 \times 1,5$ cm para utilização no trabalho experimental. Na fase final do trabalho, foram ainda testados quadrados de 3×3 cm e discos de 4,9 cm de diâmetro.

Foram também preparadas membranas de nanofibras de PET, na Universidade de Aveiro, como descrito por Veleirinho *et al.* (2007).

2.3.2 Imobilização da tripsina em membranas de nanofibras de PET/PLA por ligação covalente

Começou por preparar-se uma solução tampão de MES 0,1 M, a pH 5,5, contendo 1 mg/mL de tripsina. As membranas (quadrados de $1,5 \times 1,5$ cm) foram pesadas secas e foram adicionadas, individualmente, a pequenos recipientes de vidro (*vials*) contendo 4 mL da solução de tripsina preparada, deixando-se sob agitação magnética durante 5 min, à temperatura ambiente.

Para activar os grupos carboxílicos do suporte, adicionaram-se 10 mg de EDAC e deixou-se reagir por 2 h à temperatura ambiente, com agitação magnética. Após este tempo, lavaram-se abundantemente as membranas com o tampão MES 0,1 M, pH 5,5 e os grupos carboxílicos activados que não reagiram foram desactivados por tratamento com o tampão TRIS-NaCl (TRIS 0,1 M contendo NaCl 0,5 M), a pH 7,6, sob agitação magnética, durante 10 min e à temperatura ambiente. Por fim, as membranas foram lavadas com o tampão usado no ensaio de actividade (TRIS-HCl; TRIS 0,05M + CaCl_2 0,01 M, pH = 8,0) e guardadas, no

mesmo meio, a 4 °C. Os ensaios de actividade foram realizados ou no próprio dia ou no seguinte. Na Figura 2.2 apresenta-se, de uma forma simplificada, um esquema do procedimento utilizado.

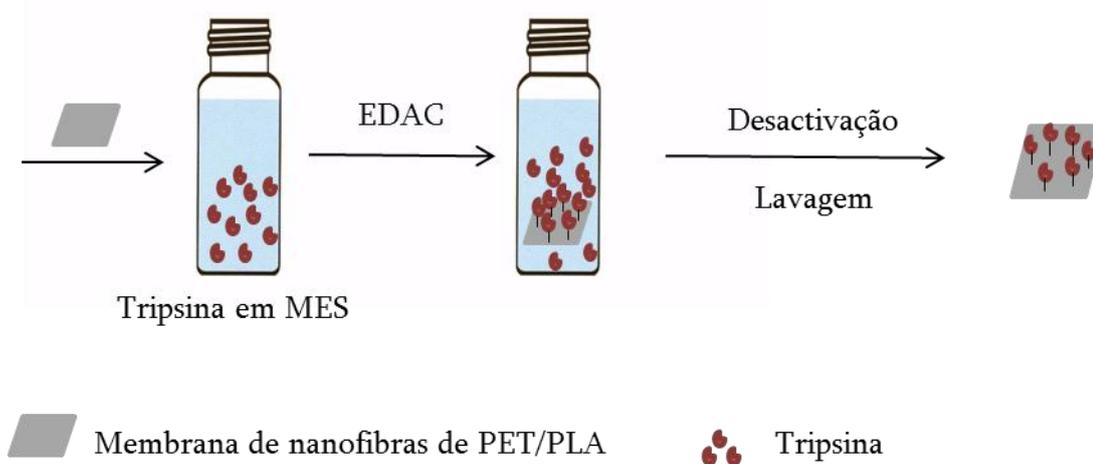


Figura 2.2. Representação esquemática do procedimento experimental usado na imobilização da tripsina por ligação covalente, utilizando EDAC como agente de activação.

2.3.3 Imobilização da tripsina em membranas de nanofibras de PET/PLA por adsorção e reticulação

Outro tipo de imobilização testado baseou-se na adsorção da tripsina à membrana e subsequente reticulação covalente, com recurso ao glutaraldeído, resultando na formação de agregados tridimensionais adsorvidos à superfície do suporte.

Começou por dissolver-se, em *vials*, 16 mg de tripsina em 4 mL de tampão fosfato de sódio 10 mM, pH 8,0 (resultando uma concentração de tripsina de, aproximadamente, 4 mg/mL). Depois de pesadas secas, adicionaram-se as membranas a cada *vial* de solução de tripsina e deixou-se sob agitação magnética durante 10 min, à temperatura ambiente. Adicionou-se glutaraldeído (testaram-se diferentes concentrações finais de glutaraldeído: 0,01%, 0,05%, 0,1%, 0,25% e 0,5% em volume) e deixou-se reagir durante a noite, a 4 °C e sob agitação magnética. Seguidamente lavou-se cada membrana abundantemente com o tampão fosfato de sódio 10 mM, pH 8,0. Os grupos aldeído não reagidos foram desactivados incubando cada membrana em 4 mL de TRIS-NaCl (TRIS 0,1M, NaCl 0,5 M) pH 7,6, com agitação magnética, durante 30 min, à temperatura ambiente. Posteriormente procedeu-se à lavagem das membranas de modo a tentar detectar uma eventual saída de enzima não

adsorvida e reticulada. Para isso, colocaram-se as membranas em *vials* com 4 mL de tampão fosfato de sódio 10 mM, pH 8,0 e, após 15 min de agitação à temperatura ambiente, determinou-se a absorvância a 280 nm desta solução (usando este tampão fosfato como branco). Em casos de absorvância positiva, o processo foi repetido até que a absorvância fosse nula. Após este procedimento, as membranas foram tratadas com NaCNBH_3 40 mM (dissolvido em NaOH 1M) em tampão fosfato, por 5 min, com agitação, à temperatura ambiente, de modo a reduzir a ligação imina que se formou, formando uma ligação covalente C–N. Por fim, as membranas foram lavadas exaustivamente com o tampão fosfato e, por último, com o tampão usado no ensaio de actividade da enzima, TRIS-HCl (TRIS 0,05M + CaCl_2 0,01 M, pH = 8,0), tendo sido guardadas neste último, a 4°C, até serem ensaiadas. Os ensaios de actividade foram realizados ou no próprio dia ou no seguinte. Na Figura 2.3 encontra-se esquematizado o procedimento seguido.

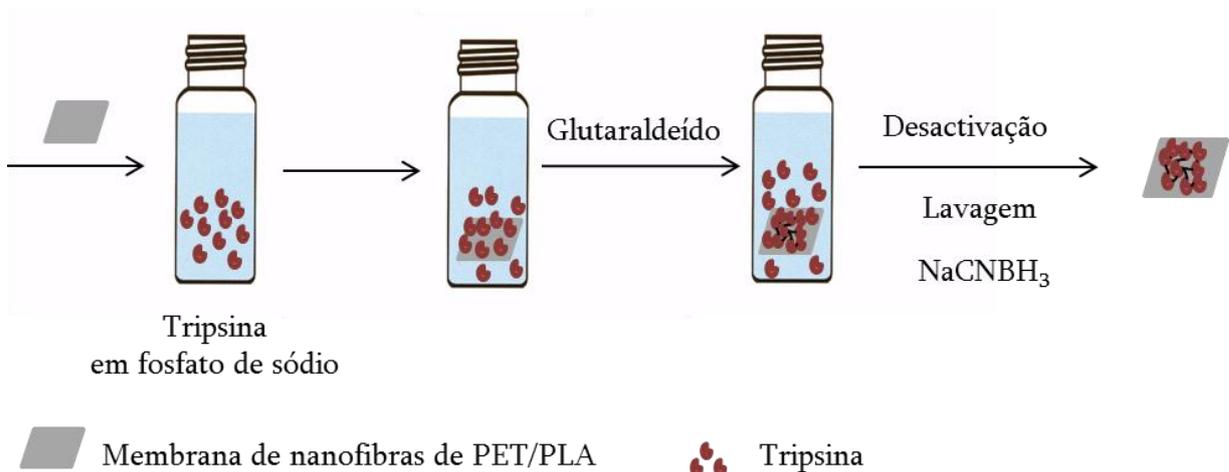


Figura 2.3. Representação esquemática do procedimento experimental usado na imobilização da tripsina por adsorção e reticulação.

2.3.4 Imobilização da tripsina em membranas de nanofibras de PET/PLA por ligação covalente de agregados de tripsina reticulada

A terceira abordagem de imobilização testada – imobilização covalente de agregados de tripsina a membranas derivatizadas com hexametilendiamina (HMD) – consistiu na:

- Activação dos grupos do suporte com EDAC (segundo um procedimento semelhante ao descrito em 2.3.2) e ligação de um braço extensor (hexametilendiamina) ao suporte;

- Adição da enzima e reticulação dos grupos amina do braço extensor e da enzima com glutaraldeído;
- Redução da ligação imina com NaCNBH_3 .

As membranas, após serem pesadas secas, foram adicionadas a 4 mL de solução de HMD, aos quais se adicionaram 10 mg de EDAC. Testaram-se duas condições para a ligação de HMD: (i) HMD a 0,09 M em MES 0,1 M, a pH 5,5, com reacção durante a noite, a 4°C e (ii) HMD a 1 M, em MES 0,1 M, a pH 5,5, com reacção durante 2h, à temperatura ambiente. Após a reacção, lavaram-se abundantemente as membranas com MES 0,1 M a pH 5,5 e procedeu-se à desactivação de grupos carboxílicos activados e não reagidos colocando a membrana num *vial* contendo 5 mL de TRIS-NaCl (TRIS 0,1M, NaCl 0,5 M, a pH 7,6), durante 10 min sob agitação magnética, e lavou-se a membrana abundantemente com o tampão fosfato de sódio 10 mM, pH 8,0. Para o acoplamento e reticulação da enzima, dissolveram-se num *vial* 16 mg de tripsina em 4 mL de tampão fosfato de sódio 10 mM, pH 8,0 (resultando uma concentração de tripsina, de aproximadamente, 4 mg/mL) e colocou-se nele uma membrana. Na Figura 2.4 é apresentado um esquema do procedimento experimental utilizado. Após agitação magnética durante 10 min, à temperatura ambiente, adicionou-se glutaraldeído (com uma concentração final de 0,05% em volume) e deixou-se reagir, sob agitação magnética, durante a noite, a 4 °C. A desactivação de grupos aldeído não reagidos foi feita com o tampão TRIS-NaCl (TRIS 0,1M, NaCl 0,5 M), a pH 7,6), seguida por lavagem e tratamento com NaCNBH_3 , tal como mencionado em 2.3.3.

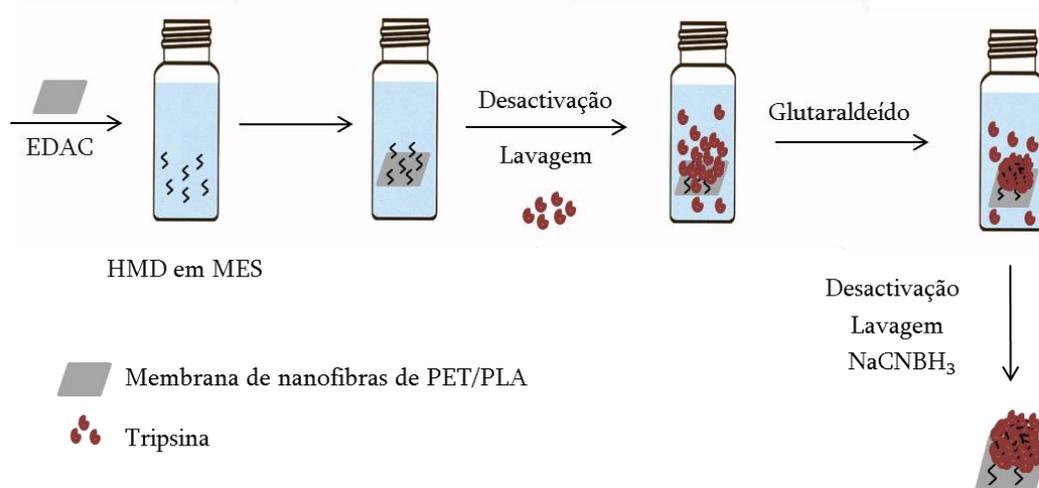


Figura 2.4. Representação esquemática do procedimento experimental usado na imobilização de agregados de tripsina por ligação covalente.

2.3.5 Ensaios de actividade enzimática

Enzima livre

Os ensaios de actividade da tripsina em solução (tripsina livre) foram realizados em triplicado. Foram ensaios feitos directamente numa *cuvette*, seguindo o procedimento que se descreve. Assim, a uma *cuvette* contendo BAPNA dissolvido na solução tampão (Tabela VI) e equilibrada a 37 °C no compartimento termostaticado do espectrofotómetro adicionou-se a solução de tripsina (Tabela VI) e rapidamente misturou-se por inversão e registou-se a variação da absorvância a 410 nm em função do tempo. Foi também ensaiado um branco, em que o volume de solução de enzima foi substituído por igual volume do tampão em que se encontrava dissolvida (Tabela VI). Ao declive (variação de absorvância por unidade de tempo) do ensaio foi subtraído o declive do branco.

A actividade enzimática foi calculada através do declive inicial da curva resultante (absorvância vs. tempo), fazendo uma regressão linear. A absorvância foi convertida em moles de *p*-nitroanilina usando uma curva de calibração de *p*-nitroanilina (Figura A1, Anexo). Uma unidade de actividade de tripsina foi definida como a quantidade de tripsina que hidrolisa 1 μmole de BAPNA por minuto, a 37 °C, a pH 8,0, na presença de CaCl₂ a 10 mM.

Tabela VI: Soluções usadas nos ensaios de actividade de enzima livre.

	Branco (volume; mL)	Ensaio (volume; mL)
Tampão: TRIS-HCl (TRIS 0,05M + CaCl ₂ 0,01 M, a pH 8)	1,35	1,35
Solução (0,029 M) de BAPNA em DMSO (concentração no ensaio: 1 mM)	0,05	0,05
Solução de tripsina 1 mg/mL em HCl 1 mM	–	0,05
HCl 1 mM	0,05	–
Volume total (mL)	1,45	1,45

Enzima imobilizada

As membranas de nanofibras de PET/PLA com tripsina imobilizada foram ensaiadas em triplicado. Cada membrana foi adicionada a um *vial* termostaticado (Figura 2.5) contendo solução tampão (Tabela VII) que se encontrava ligado a uma bomba peristáltica com uma velocidade de rotação de 60 rpm, e a uma *cuvette* de fluxo, de forma a permitir a recirculação da mistura reagente ao longo do ensaio e possibilitar um registo contínuo da absorvância (Figura 2.6). Depois de alcançada a temperatura requerida para o ensaio, 37 °C, procedeu-se à

adição de solução de BAPNA (Tabela VII) directamente no tampão presente no *vial*. A partir deste instante, começou a quantificar-se continuamente o BAPNA hidrolisado (através da produção de *p*-nitroanilina), registando-se a absorvância a 410 nm em função do tempo, durante aproximadamente 7 min, num espectrofotómetro termostaticado (isto é, com controlo de temperatura da *cuvette* de fluxo). Antes de se realizarem os ensaios de actividade de cada triplicado, foi feito o ensaio de um branco, i.e., o ensaio foi feito na ausência de uma membrana com enzima imobilizada, nas mesmas condições, de forma a ser possível descontar a hidrólise espontânea do BAPNA.



Figura 2.5. Imagens do arranjo experimental utilizado no ensaio da tripsina imobilizada. 1 – Vial contendo solução de substrato e membrana com enzima imobilizada, agitado magneticamente. 2 – Banho termoestático agitado magneticamente. 3 – Tubagem com isolamento térmico.

Tabela VII. Soluções usadas nos ensaios de actividade da enzima imobilizada.

	Branco (volume; mL)	Ensaio (volume; mL)
Tampão: TRIS-HCl (TRIS 0,05M + CaCl ₂ 0,01 M; pH = 8,0)	7	7
Solução (0,029 M) de BAPNA em DMSO (concentração no ensaio: 1 mM)	0,25	0,25
Membrana com tripsina imobilizada	Não	Sim
Volume total (mL)	7,25 mL	7,25 mL

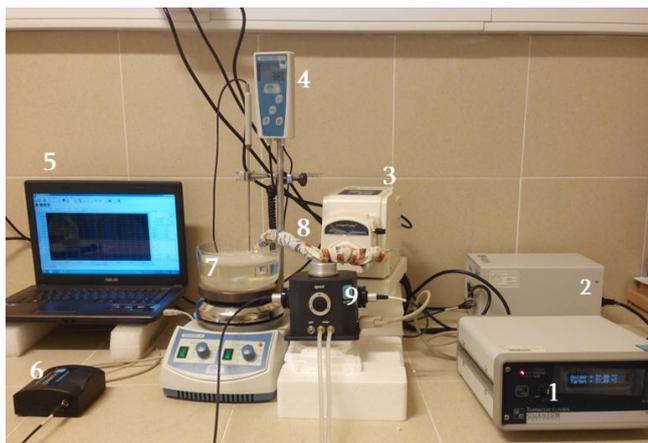


Figura 2.6. Configuração experimental dos ensaios de actividade da tripsina imobilizada; 1 - Controlador de temperatura do suporte da célula de fluxo. 2 - Fonte de luz UV/visível. 3 - Bomba peristáltica para recirculação da solução contendo BAPNA. 4 - Termopar regulador do banho termoeletrónico no qual se encontra o mini-reactor (vial). 5 - Computador com o programa SpectraScan 1.0. 6 - Espectrofotómetro ScanSpec UV/visível. 7 - Banho termoeletrónico do mini-reactor. 8 - Isolamento térmico da tubagem de recirculação. 9 - Suporte termostático da célula de fluxo.

2.3.6 Quantificação da massa de tripsina imobilizada

Método de quantificação pelo Reagente de Bradford

Quantificou-se a tripsina imobilizada através da diferença entre a quantidade de proteína adicionada para a imobilização e a quantidade de proteína restante após a imobilização, utilizando o reagente de Bradford (Bradford, 1976). Os ensaios foram realizados em duplicado. Numa *cuvette*, adicionou-se 50 μL das soluções a quantificar (antes ou após a imobilização) e 1,5 mL de Reagente de Bradford. Misturou-se por inversão (3 vezes) e aguardou-se 10 min, à temperatura ambiente. O ensaio em branco foi efectuado nas mesmas condições mas, em vez de se adicionar a solução de enzima a quantificar, adicionou-se 50 μL de tampão MES 0,1 M, a pH 5,5. Posto isto, leram-se as absorvâncias a 595 nm. Foi construída uma curva de calibração como descrito acima, usando uma solução *stock* de tripsina com uma concentração de 1 mg/mL em tampão MES 0.1M pH 5.5 e foram-se efectuando diluições sucessivas obtendo-se concentrações de 0,2, 0,4, 0,6 e 0,8 mg/mL (Figura B1, Anexo).

Método de quantificação por adsorção e eluição do Corante Coomassie® Brilliant Blue R-250

O segundo método foi efectuado no Departamento de Ciências da Vida da FCTUC. Este consistiu na adsorção do corante Coomassie® Brilliant Blue R-250 (CBBR250) à proteína imobilizada nas membranas, seguida pela eluição do corante adsorvido e sua quantificação,

método proposto por Ahmad e Saleemuddin (1985). Este método sofreu algumas modificações de modo a poder ser usado com a amostra em causa. As membranas foram adicionadas a uma solução do corante CBBR250 em ácido acético/isopropanol/água. Esta solução de corante foi preparada por dissolução de 100 mg de CBBR250 em 100 mL de uma solução contendo 10% (v/v) de ácido acético glacial, 25% (v/v) de isopropanol e 65% de água destilada, sob agitação magnética, durante 1h e posteriormente foi filtrada usando papel de filtro Whatman N.º 1. O excesso de corante adsorvido às membranas foi retirado efectuando-se 8 lavagens com 5 mL da solução de ácido acético/isopropanol/água. Colocaram-se as membranas em tubos de ensaio contendo 5 mL de uma solução de NaOH 0,1 M em 20% de água destilada e 80% de metanol, acidificada com 100µL de HCl 4 M (solução de eluição), e agitou-se manualmente. Após 60 minutos, mediu-se a absorvância a 605 nm num espectrofotómetro, utilizando água como branco. Prepararam-se brancos de forma a descontar a adsorção do corante às membranas, usando-se para o efeito quadrados com as mesmas dimensões sem enzima imobilizada, tendo sido sujeitos a todo o procedimento descrito acima. O valor da absorvância usado foi o que resultou da subtracção do valor de absorvância média obtida com os brancos ao valor de absorvância média obtido com os quadrados com tripsina imobilizada. Antes da leitura de absorvância, foi necessário efectuar uma diluição de 1:20 com a solução de eluição. A curva de calibração foi feita usando quantidades conhecidas de ovalbumina imobilizada em papel de filtro por precipitação. Colocaram-se porções de 10 µL de soluções de ovalbumina a 0,5, 1, 2 e 4 mg/mL em água destilada, em duplicado. A proteína foi precipitada nos quadrados de papel de filtro através da adição aos quadrados de 10 mL de uma solução de ácido tricloroacético (TCA) a 20%, durante 15 minutos. Posto isto, o procedimento foi executado como descrito para os ensaios.

2.3.7 Estabilidade ao armazenamento da tripsina livre e imobilizada

A estabilidade ao armazenamento da tripsina livre e imobilizada foi avaliada pela medição da actividade de soluções de tripsina em água destilada (em triplicado) e de um conjunto de três membranas para cada condição de armazenamento (temperatura/tempo): 4 °C, temperatura ambiente e – 20 °C; 1 semana, 2 semanas e 1 mês, em água destilada. Foram ensaiados também uma solução de tripsina em água destilada e um conjunto de 3 membranas com tripsina imobilizada, que foram ensaiados imediatamente após terem sido preparadas (actividade inicial). Os ensaios de actividade enzimática foram realizados como descritos em

2.3.5. A actividade de cada conjunto de membranas para cada temperatura/tempo foi expressa como percentagem desta actividade inicial.

2.3.8 Estabilidade operacional da tripsina imobilizada

A estabilidade operacional da enzima imobilizada foi determinada através de repetições sucessivas do ensaio de actividade com a mesma amostra, após uma lavagem exaustiva entre ensaios com o tampão utilizado no ensaio de actividade, TRIS-HCl (TRIS 0,05M + CaCl₂ 0,01 M) a pH 8. Os ensaios de actividade enzimática foram realizados como descritos em 2.3.5. A actividade remanescente foi expressa como percentagem da actividade inicial.

2.3.9 Caracterização das membranas de nanofibras de PET/PLA

Informação sobre a hidrofiliicidade das membranas de nanofibras de PET e PET/PLA foi avaliada a partir da determinação do ângulo de contacto exibido por gotas de água colocadas sobre as suas superfícies e através da quantificação gravimétrica da sua capacidade de absorção de água. Foi ainda feita uma caracterização por espectroscopia no infra-vermelho, uma caracterização térmica e foi visualizada a morfologia das membranas de PET/PLA.

Determinação dos ângulos de contacto

Os ângulos de contacto foram determinados recorrendo a um goniómetro automático. Os ângulos de contacto medidos foram ângulos de contacto estáticos (gota séssil) e utilizou-se a equação de Young-Laplace para definir o contorno da gota e calcular o ângulo de contacto. Este método consiste em adicionar uma gota de água destilada à superfície da membrana, formando uma gota (10 µL) e na medição dos ângulos de contacto da gota (esquerdo e direito) ao longo do tempo, após definida a sua linha de base. Através da análise de imagem efectuada pelo *software*, o contorno da gota é detectado e os ângulos calculados, utilizando a equação de Young-Laplace (média do ângulo de contacto esquerdo e direito). As medidas foram feitas em 6 pontos diferentes de uma amostra (membranas de PET e de PET/PLA), tendo sido determinado o ângulo de contacto médio. A imagem das gotas foi capturada com uma câmara CCD e foram capturadas 5 imagens/segundo durante aproximadamente 1 min. O valor do ângulo de contacto utilizado foi a média dos valores dos ângulos de contacto medidos num

intervalo de tempo no qual o ângulo de contacto permanecia constante. O intervalo de tempo escolhido foi comum a todas as membranas.

Determinação da capacidade de absorção de água

Para determinar a capacidade de absorção de água pelas membranas de nanofibras de PET e de PET/PLA estas foram pesadas (depois de atingido um peso constante numa estufa a 40°C) e imersas em água destilada. Após se extrair o excesso de água das membranas, as amostras foram pesadas até atingirem o estado de equilíbrio – a capacidade máxima de absorção – que surgiu após aproximadamente 40 h. Os ensaios foram realizados em triplicado. A percentagem de capacidade de absorção de água foi obtida pela Equação 2.1:

$$\% \text{ Capacidade de absorção} = \left(\frac{P_f - P_i}{P_i} \right) \times 100 \quad (2.1)$$

Onde P_f é a massa das membranas saturadas com água e P_i é a massa das membranas secas.

FTIR

Cada espectro ATR-FTIR recolhido, das membranas de PET, PLA e PET/PLA, resultou da acumulação de 64 espectros, adquiridos com uma resolução de $0,9 \text{ cm}^{-1}$, utilizando o cristal sem amostra como branco. Os espectros foram normalizados utilizando a banda do PET a 1410 cm^{-1} (Zhu e Kelley, 2005).

DSC

Amostras de membranas de PET, PET/PLA e dos materiais de partida em pó, com aproximadamente 4 mg, foram aquecidas no calorímetro até alcançada a temperatura de 240 °C, para amostras de PET/PLA, 340 °C, para amostras de PLA, ou 360 °C, para amostras de PET. Foram aquecidas com uma rampa de aquecimento de 10 °C/min, num recipiente hermético, sob atmosfera de azoto (100 mL/min).

TGA

Porções de, aproximadamente, 6 a 7 mg de membranas de PET/PLA e dos respectivos materiais de partida (PET e PLA em pó) foram aquecidos desde a temperatura ambiente até 600 °C, com uma rampa de aquecimento de 10 °C/min. Os dados de TGA obtidos foram

traçados em percentagem de peso vs temperatura, a partir do qual foram obtidas as temperaturas de decomposição inicial e final.

SEM

A morfologia, o diâmetro e a orientação das nanofibras de PET e PET/PLA foram analisados por microscopia electrónica de varrimento (SEM), realizado na Universidade de Aveiro. Para o efeito, foram recolhidas imagens das superfícies das membranas de PET usando o microscópio electrónico de varrimento Hitachi SU-70 e as de PET/PLA usando o microscópio electrónico de varrimento Hitachi SU 4100. As porções de membrana a visualizar foram montadas num porta-amostras metálico, utilizando fita-cola de dupla face, e revestidas com um filme de ouro, por pulverização catódica por magnetron (*magnetron sputtering*).

2.3.10 Análise estatística

A análise estatística foi levada a cabo usando os testes *t* de Student e ANOVA. O teste *t* de Student foi usado para tentar determinar se as médias entre duas amostras seriam ou não significativamente diferentes. Para casos onde se pretendia comparar mais que duas amostras entre si, utilizou-se o teste ANOVA, método usado para testar a igualdade de três ou mais médias, baseado na análise de variâncias das amostras. Com este último, utilizou-se o teste pós-ANOVA Tukey's HSD⁽¹⁾ (Tukey, 1977), que permite estabelecer a diferença mínima com significado estatístico, ou seja, a menor diferença de médias de amostras que deve ser tomada como estatisticamente significativa, tendo-se utilizado um nível de confiança de 95%.

¹ De *Honestly Significant Difference*.

3 Resultados e discussão

3.1 Caracterização das membranas de nanofibras de PET/PLA

Como já foi referido anteriormente, a actividade e o desempenho das enzimas imobilizadas não depende apenas do método de imobilização adoptado, mas também das características do suporte. Desta forma, caracterizaram-se as membranas de PET e PET/PLA no que respeita à hidrofiliidade, composição, morfologia e propriedades térmicas.

Hidrofiliidade

Foram medidos ângulos de contacto estáticos de membranas de PET e PET/PLA de modo a obter informação sobre a molhabilidade da superfície de cada membrana e a compará-las, utilizando gotas de água. Para o efeito, registou-se a variação do ângulo de contacto médio (para cada gota) ao longo do tempo. Como as gotas penetravam e se espalhavam sobre a membrana ao fim de algum tempo, nas curvas de variação do ângulo de contacto com o tempo de contacto entre a gota e a membrana, foi necessário escolher um intervalo de tempo no qual o ângulo de contacto permanecesse constante e que fosse comum a todas as membranas. O intervalo de tempo escolhido para todas as membranas foi entre os 30 e os 40 s após a adição da gota à superfície (Figura 3.1). Posto isto, calculou-se a média dos ângulos de contacto registados nesse intervalo de tempo e tomou-se essa média como o valor do ângulo de contacto desse local da amostra. Exemplos de curvas obtidas encontram-se na Figura 3.1. Tanto as membranas de PET como as de PET/PLA podem ser classificadas como hidrofóbicas, à luz do limite de Berg, uma vez que apresentam um ângulo de contacto superior a 65° (Figura 3.2) (Vogler, 2001). As membranas de PET apresentam um ângulo de contacto significativamente menor do que as de PET/PLA (PET: $131,5 \pm 8,5^\circ$; PET/PLA: $157,8 \pm 6,0^\circ$), i.e., são menos hidrofóbicas. Este resultado não seria de esperar, uma vez que o PLA tem uma natureza mais hidrofílica que o PET (embora seja também hidrofóbico) e pretendia-se que, misturado com o PET, diminuísse a hidrofobicidade da membrana, tornando-a mais propícia quer para a imobilização da enzima, quer para a aplicação a que se destina (hidrólise de proteínas do soro de leite).

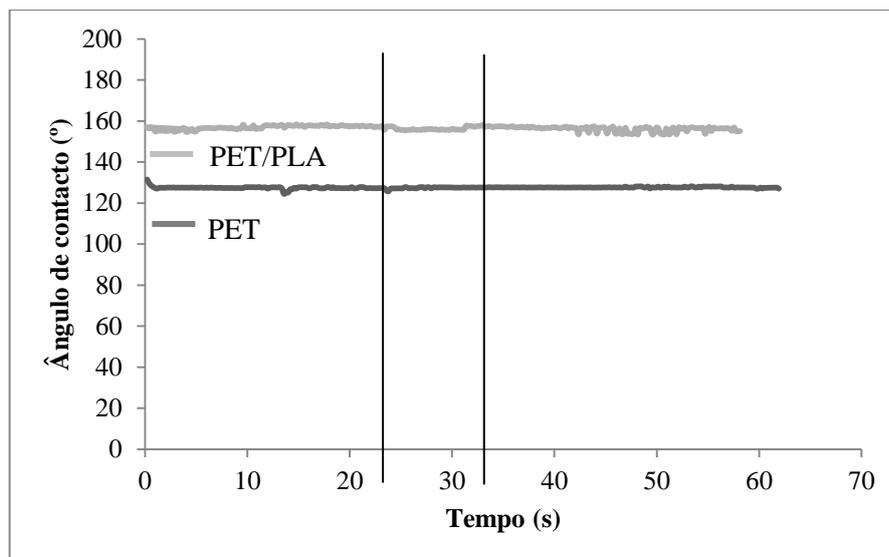


Figura 3.1. Exemplo da variação do ângulo de contacto ao longo do tempo de uma gota de água colocada sobre uma membrana de PET e de outra colocada sobre uma membrana de PET/PLA.

Como possíveis explicações para este resultado podem avançar-se as seguintes:

- (i) Sendo a proporção PET/PLA nestas membranas de 4:1, a quantidade de PLA empregue poderá não ter sido suficiente para diminuir significativamente a hidrofobicidade;
- (ii) Como na electrofiação há dificuldades na reprodutibilidade da morfologia superficial da membrana obtida e uma vez que o valor do ângulo de contacto depende da rugosidade das superfícies (equações de Wenzel e de Cassie-Baxter, Equações 1.1 e 1.2), o valor do ângulo de contacto da superfície de amostras de um mesmo material será diferente se não apresentarem o mesmo nível de rugosidade. Como o valor do ângulo de contacto observado nas membranas de PET foi inferior ao das de PET/PLA, e como o valor do ângulo de contacto de ambas é superior a 90°, pelas equações de Wenzel e de Cassie-Baxter isso implicaria que as membranas de PET/PLA teriam maior rugosidade do que as de PET.²

Já os resultados da capacidade de absorção de água por estas membranas estão de acordo com o esperado (Figura 3.3): as membranas de PET/PLA apresentam quase o dobro da capacidade de absorção de água das membranas de PET. Este resultado sugere que as membranas de PET/PLA, no seu todo, são mais hidrofílicas do que as de PET e que o resultado obtido com a goniometria de ângulos de contacto, ao avaliar somente a superfície das membranas, poderá ter sido afectado pelos aspectos atrás referidos. Este resultado é bastante relevante para a imobilização de enzimas, porque pretende-se não só imobilizar a

² A rugosidade e a porosidade destas membranas não foram estudadas.

enzima à superfície, mas também nas nanofibras do interior da malha da membrana, sendo necessário que soluções aquosas cheguem ao interior da membrana.

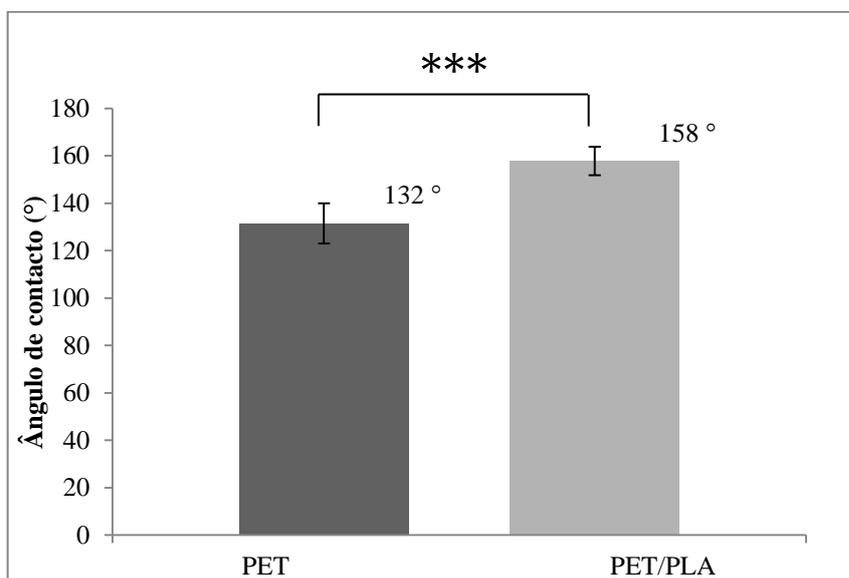


Figura 3.2. Valores dos ângulos de contacto das membranas de PET e de PET/PLA. As barras de erro representam os desvios-padrão das medições efectuadas em 6 pontos diferentes em cada amostra. *** Diferença extremamente significativa ($p < 0,001$; teste t de Student).

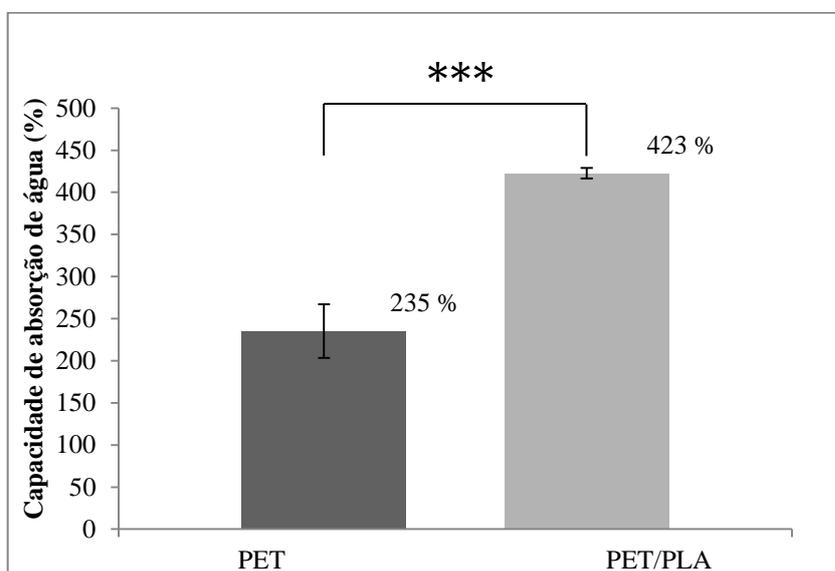


Figura 3.3. Capacidade de absorção de água das membranas de PET e de PET/PLA. As barras de erro representam os desvios-padrão das medições efectuadas ($n = 3$). *** Diferença extremamente significativa ($p < 0,001$; teste t de Student).

FTIR

A análise por espectroscopia de infravermelho foi efectuada de modo a comprovar a presença dos dois polímeros electrofiados nas membranas de PET/PLA preparadas e, eventualmente, obter informação sobre a existência de interacção entre eles. Na Figura 3.4 estão representados os espectros ATR-FTIR de PLA em pó (não electrofiável) e de membranas de PET e de PET/PLA, após normalização (usando a banda a 1410 cm^{-1} do PET) (Zhu e Kelley, 2005). Apresentam-se também, na Tabela VIII, as vibrações típicas e os respectivos números de onda de membranas de fibras de PET e do PLA.

Tabela VIII. Tabela de atribuições de PET em filmes (Zhu e Kelley, 2005; Djebara *et al.*, 2012) e PLA em nanofibras (Oliveira *et al.*, 2013).

Membrana	(cm^{-1})	Grupo/Vibração	Referência
PET	1720	$\nu(\text{C}=\text{O})$	Zhu e Kelley (2005)
	1505	Vibração do anel no plano	
	1410	Deformação do anel no plano	Djebara <i>et al.</i> (2012)
	1370	$-\text{CH}_2-$ (<i>wagging</i>)	
	1340	$-\text{CH}_2-$ (<i>wagging</i>)	
	1300 - 1000	Vibrações do anel e da ligação éster	
PLA	1755	$\nu(\text{C}=\text{O})$	Oliveira <i>et al.</i> (2013)
	1182	$\nu(\text{C}-\text{O}-\text{C})$	
	1086	$\nu(\text{C}-\text{O}-\text{C})$	
	1045	$\nu(\text{C}-\text{CH}_3)$	
	868	$\nu(\text{C}-\text{COO})$	

Observando a Figura 3.4, verifica-se que as posições das bandas relativas ao PLA e às membranas de PET são concordantes com as obtidas na literatura (Tabela VIII). Pode concluir-se que na membrana de PET/PLA, a presença de PET é muito mais significativa do que a de PLA (Figura 3.4, $1700 - 1750\text{ cm}^{-1}$). As vibrações típicas do PET (1716 cm^{-1} , 1505 cm^{-1} , 1410 cm^{-1} , 1370 cm^{-1} , 1341 cm^{-1} , 1243 cm^{-1} e 1016 cm^{-1}) destacam-se no espectro da membrana de PET/PLA e as bandas a 1749 cm^{-1} , 1181 cm^{-1} e 755 cm^{-1} , que aparecem no espectro do PLA mas não no espectro do PET, indicam a presença de PLA na membrana de PET/PLA (Figura 3.4, setas). Pode afirmar-se que, embora se consiga detectar a presença do PLA na mistura de PET/PLA, este parece existir em quantidades muito reduzidas. No entanto, uma vez que a proporção de PET:PLA usada na preparação da membrana foi de 4:1, seria de esperar alguma dificuldade na detecção do PLA.

Não se detectou a existência de interações entre as moléculas de PET e as de PLA, uma vez que nem se observaram desvios significativos nas posições das bandas do espectro das membranas de PET/PLA, nem o seu alargamento, quando comparadas com as posições das bandas nos espectros quer do PET, quer do PLA.

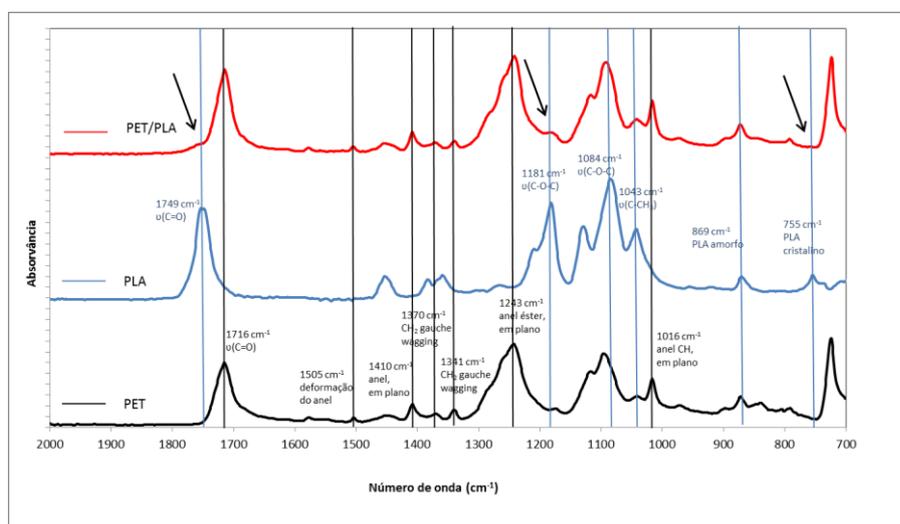


Figura 3.4. Espectros de ATR-FTIR de PLA em pó e de membranas de nanofibras de PET e de PET/PLA. Cada espectro representa 64 aquisições com uma resolução de $0,9 \text{ cm}^{-1}$. Os espectros foram normalizados (usando a banda do PET centrada a 1410 cm^{-1}) e foram deslocados verticalmente para uma visualização mais clara.

Morfologia de superfície – SEM

Foi analisada a morfologia de superfície das membranas de nanofibras de PET e PET/PLA a partir de fotomicrografias de SEM. Na Figura 3.5 estão apresentadas as fotomicrografias das superfícies das membranas e, na Tabela IX, estão resumidas os resultados obtidos após a análise das imagens.

Verifica-se que se conseguiu preparar nanofibras com diâmetros entre a centena de nanómetros e o milhar de nanómetros, que se apresentam predominantemente alinhadas segundo uma direcção (que deverá ser correspondente à direcção de rotação do colector das fibras). As nanofibras da membrana de PET apresentam um diâmetro médio cerca de três vezes superior ao das nanofibras da membrana de PET/PLA ($p < 0,0001$; teste t de Student), sendo a distribuição de diâmetros na membrana de PET muito mais larga do que na membrana de PET/PLA.

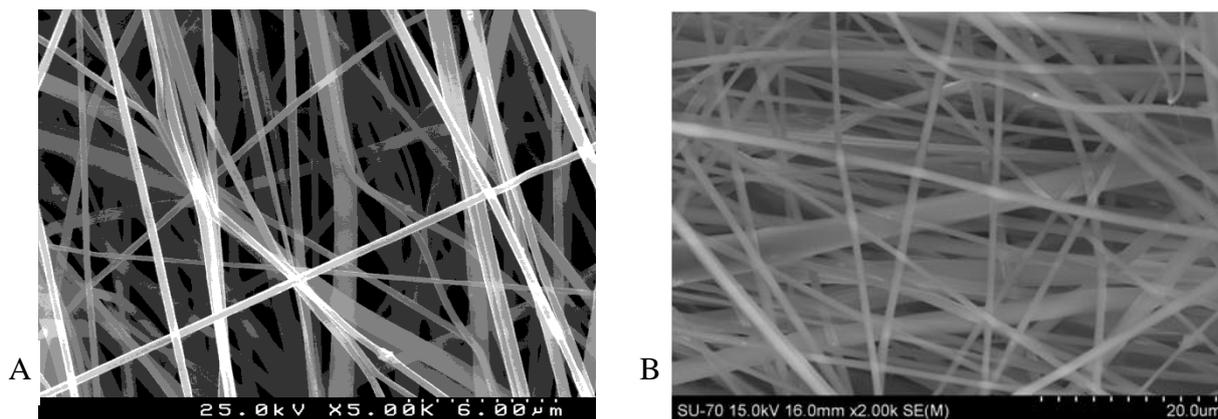


Figura 3.5. Fotomicrografias de SEM da superfície de uma membrana de nanofibras de PET/PLA (A; amplificação: 5000x) e de uma membrana de nanofibras de PET (B; amplificação: 2000x).

Tabela IX. Diâmetro das fibras das membranas de PET e PET/PLA da Figura 3.5 ($n = 50$ fibras). *** Diferença extremamente significativa ($p < 0,001$; teste t de Student).

Membrana	Diâmetro médio (nm)	Desvio-padrão (nm)
PET	925***	490
PET/PLA	327***	150

TGA

As membranas de nanofibras de PET/PLA e os materiais de partida (PET e PLA), bem como uma membrana de PET, foram caracterizados por TGA. Os termogramas obtidos encontram-se na Figura 3.6 e, na Tabela X, são indicados os valores da T_d , temperatura à qual a amostra se começa a decompor significativamente.

Pela análise da Figura 3.6 é possível verificar a grande semelhança existente entre os termogramas de PET em pó e em membrana, o que sugere que apresentam uma estabilidade térmica semelhante. Tal seria de esperar, uma vez que estas amostras são constituídas pelo mesmo polímero, variando apenas a forma em que ele se encontra. No entanto, o PET na forma de membrana, após a temperatura para a qual há decomposição significativa, apresenta menor percentagem de perda de massa do que o PET em pó, o que sugere que o PET na forma de membrana seja mais resistente à decomposição térmica. Verifica-se, também, que estas amostras são estáveis até cerca de 400 °C, temperatura a partir da qual se inicia a perda de massa. Estas amostras apresentam uma única decomposição térmica. A decomposição do PLA também ocorre num só passo e começa a uma temperatura mais baixa, por volta dos 350°C, ocorrendo de uma forma rápida e havendo uma decomposição praticamente total da amostra.

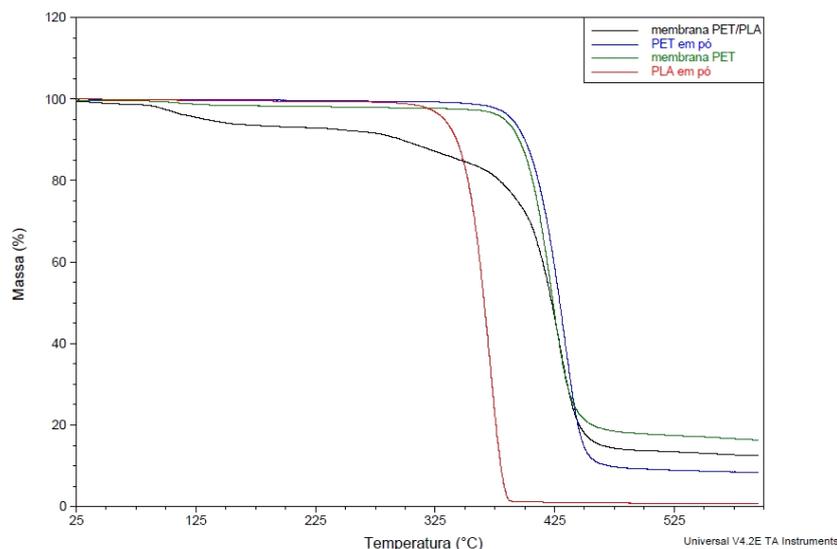


Figura 3.6. Termogramas de TGA das membranas de PET e de PET/PLA e dos materiais de partida (PET em pó e PLA em pó).

Tabela X. Temperaturas de decomposição significativa das membranas de PET, PET/PLA e dos materiais de partida (PET em pó e PLA em pó).

Amostra	T_d (°C)
PET em pó	406
Membrana PET	399
PLA em pó	350
Membrana PET/PLA	404

Por outro lado, a curva correspondente à membrana de PET/PLA apresenta vários passos de decomposição. Começa por haver alguma perda de massa (~ 6%) por volta dos 100 °C, que deverá corresponder a perda de água (a membrana poderia não se encontrar completamente seca). Verifica-se, também, um passo de decomposição para a temperatura de 297 °C, com uma perda de massa correspondente a aproximadamente a 16 %, e a decomposição quase total (~ 65 %) aos 404 °C. Estes dois passos de decomposição deverão dizer respeito à decomposição do PLA e do PET, respectivamente. O facto de se conseguirem distinguir as duas temperaturas indica que os dois polímeros não interagem quimicamente, não se encontrando misturados a nível molecular. Com base na percentagem de perda em cada passo, calculou-se a proporção PET/PLA na membrana, tendo-se obtido um valor de 4,1:1. Esta proporção é concordante com a presente na mistura PET/PLA usada para electrofiar (4:1), o que leva a crer que não há perda de nenhum dos polímeros durante o processo de electrofiação. No entanto, este resultado diz respeito à análise de uma única amostra, sendo de esperar que haja variabilidade quer de amostra para amostra, quer na identificação dos limites

da transição de decomposição do PLA no termograma, uma vez que esta transição não é bem definida.

DSC

Realizou-se também uma caracterização por DSC das membranas de PET/PLA, de PET e dos materiais de partida (PET em pó e PLA em pó). Na Figura 3.7 estão representados os termogramas das amostras e na Tabela XI as temperaturas correspondentes às transições detectadas. A amostra de PLA em pó apresenta uma temperatura de transição vítrea aos 61 °C, sendo detectado um pico de fusão aos 152 °C (Figura 3.7). Estes valores vão de encontro aos encontrados na literatura, que são de 61 °C e entre 140 °C e 151 °C, respectivamente (Acar *et al.*, 2007; Byrne *et al.*, 2007). Dos dados referidos na literatura, a temperatura de transição vítrea do PET situa-se entre os 77 e os 82 °C e a temperatura de fusão entre os 240 e os 252 °C (Bandyopadhyay *et al.*, 2007; Byrne *et al.*, 2007; Benosman, 2013). Com a análise DSC realizada neste trabalho verificou-se que o PET em pó apresenta a transição vítrea aos 76 °C e um pico de fusão aos 254 °C, como esperado. No entanto, embora a amostra da membrana de PET apresente temperaturas de transição vítrea e de fusão muito semelhantes às do PET em pó (Tabela XI), esta exhibe um pico exotérmico aos 126 °C, correspondente à cristalização. No que diz respeito à membrana de PET/PLA, a transição vítrea ocorre aos 56 °C e a fusão aos 254 °C; apresenta, ainda, um pico exotérmico aos 113 °C, correspondente à cristalização. Verifica-se que, das amostras analisadas, a membrana de PET/PLA apresenta a temperatura de transição vítrea mais baixa. Poderá concluir-se que as cadeias da membrana de PET/PLA se começam a movimentar a temperaturas mais baixas do que as cadeias dos compostos isolados. Ou seja, as moléculas presentes na membrana de PET/PLA adquirem a energia suficiente para dominar as forças intermoleculares e terem liberdade de movimento, a uma temperatura mais baixa.

A temperatura de fusão da membrana de PET/PLA é aproximadamente igual à de PET em membrana e em pó, o que indica a presença predominante de PET. Verificou-se também que o PET na forma de membrana apresenta cerca de 33 % de cristalinidade enquanto que a membrana de PET/PLA apresenta um valor ligeiramente inferior, ~ 28,8% ⁽³⁾. Assim, a presença de PLA nas membranas mistas afecta a percentagem de cristalinidade da membrana, diminuindo-a de forma ligeira. Isto deve-se ao facto de as moléculas de PLA apresentarem maior mobilidade do que as de PET à temperatura de cristalização, devido à relativamente

³ Percentagem de cristalinidade determinada com base no valor de 140 J g⁻¹ relativo a PET 100 % cristalino.

baixa temperatura de transição vítrea do PLA. Sugere-se que a diminuição da temperatura de cristalização seja então devida à maior mobilidade das moléculas de PLA (Acar *et al.*, 2007).

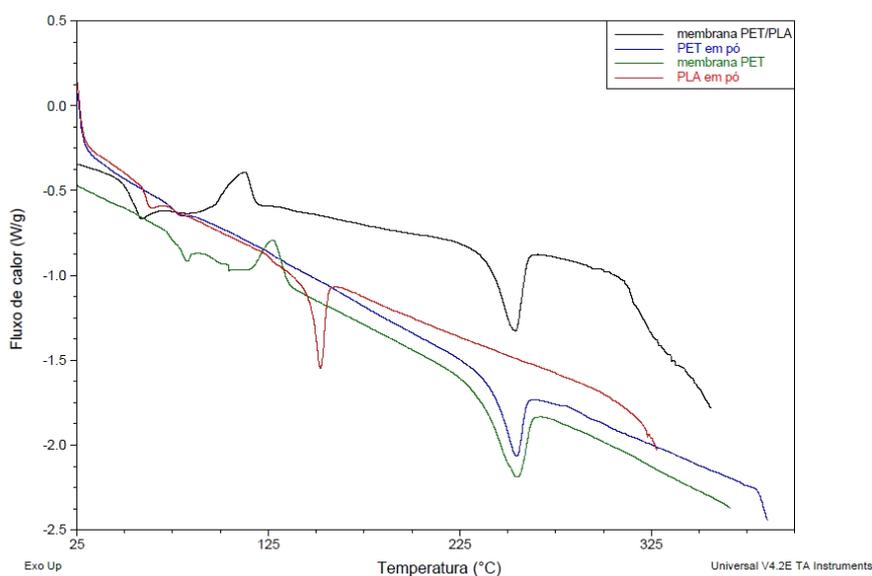


Figura 3.7. Termogramas de DSC das membranas de PET e de PET/PLA e dos materiais de partida (PET em pó e PLA em pó).

Tabela XI. Temperaturas detectadas após análise DSC das membranas de PET, PET/PLA e para os materiais de partida (PET em pó e PLA em pó).

Amostra	Temperatura de transição vítrea (°C)	Temperatura de cristalização (°C)	Temperatura de fusão (°C)
PET em pó	76	— nd	254
PLA em pó	61	— nd	152
Membrana PET	76	126	254
Membrana PET/PLA	56	113	254

nd – Não detectada.

3.2 Imobilização da tripsina em membranas de nanofibras de PET/PLA

Começou por imobilizar-se a tripsina nas membranas de nanofibras de PET/PLA por ligação covalente aos grupos carboxílicos do PLA. Para isso utilizou-se uma carbodiimida (EDAC) como activador dos grupos carboxílicos, de modo a ser possível ligá-los a grupos amínicos da enzima, através de uma ligação amida (Figura 1.3). Quando se procurou quantificar a enzima imobilizada, através da diferença entre a quantidade de enzima inicial em solução e a quantidade de enzima restante após a imobilização (usando o método de Bradford), a quantidade de proteína obtida após a imobilização era superior à quantidade de proteína inicial. Tentou-se, ainda, incluir os reagentes de activação no branco, mas obteve-se o mesmo resultado, devendo existir alguma incompatibilidade entre o reagente de Bradford e os reagentes utilizados na imobilização. Assim, não foi possível determinar a quantidade de tripsina imobilizada. Quando se ensaiou a actividade das membranas com tripsina imobilizada, praticamente não se conseguiu detectar actividade enzimática imobilizada (Tabela XII e Figura 3.8). Em face deste resultado, pensa-se que o não se ter conseguido quantificar a quantidade de proteína imobilizada se possa, também, ficar a dever ao reduzido rendimento de imobilização. Uma vez que o número de grupos carboxílicos disponíveis no suporte deverá ser baixo⁴ e este encontra-se, ainda, em menor proporção em relação ao PET, este resultado é compreensível.

De forma a se conseguir imobilizar uma maior quantidade de tripsina, recorreu-se ao glutaraldeído para reticular as moléculas de enzima, na presença das membranas. É de esperar que, com a formação de agregados reticulados de moléculas de tripsina adsorvidos às membranas, se consiga imobilizar sobre a superfície uma maior quantidade de enzima, superando assim o esperado *deficit* de grupos reactivos na superfície do suporte. A reticulação de enzimas tem ainda a vantagem de, em geral, originar um aumento da estabilidade das enzimas: com a reticulação, diminui-se a flexibilidade das moléculas de enzima (devido às ligações covalentes inter- e intramoleculares formadas), tornando-as mais resistentes a alterações conformacionais (Migneault *et al.*, 2004)

⁴ Apenas o PLA os possui e, se não for ramificado, somente num dos terminais da cadeia.

Tabela XII. Actividade da tripsina imobilizada através dos diferentes métodos de imobilização testados.

Método de imobilização	Actividade ($\mu\text{mol pNA min}^{-1} \text{g}^{-1}$ de membrana) ^a
Ligação covalente	
– EDAC	Residual
Adsorção e reticulação	
– Glutaraldeído 0,01% (v/v)	0,41
– Glutaraldeído 0,05% (v/v)	5,60
– Glutaraldeído 0,1% (v/v)	5,30
– Glutaraldeído 0,25% (v/v)	2,95
– Glutaraldeído 0,5% (v/v)	3,35
– Glutaraldeído (0,05% (v/v)), NaCNBH ₃ (em simultâneo)	0,61
– Glutaraldeído (0,05% (v/v)) + NaCNBH ₃ (após tratamento com glutaraldeído)	4,80
Ligação covalente de agregados de tripsina reticulada	
– HMD 0,09 M (reacção durante a noite) + glutaraldeído (0,05% (v/v)) + NaCNBH ₃ (após tratamento com glutaraldeído)	5,00
– HMD 1M (2 h de reacção) + glutaraldeído (0,05% (v/v)) + NaCNBH ₃ (após tratamento com glutaraldeído)	5,68

^a – Actividade de enzima imobilizada expressa em μmol de *p*-nitroanilina (pNA) por min e por g de membrana seca.

EDAC – 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida; NaCNBH₃ – Cianoborohidreto de sódio; HMD – hexametenodiamina

Seguindo esta metodologia de imobilização, conseguiu-se obter actividade enzimática imobilizada significativa (Tabela XII e Figura 3.9) e verificou-se que a actividade da enzima imobilizada era dependente da concentração de glutaraldeído usada (Figura 3.10).

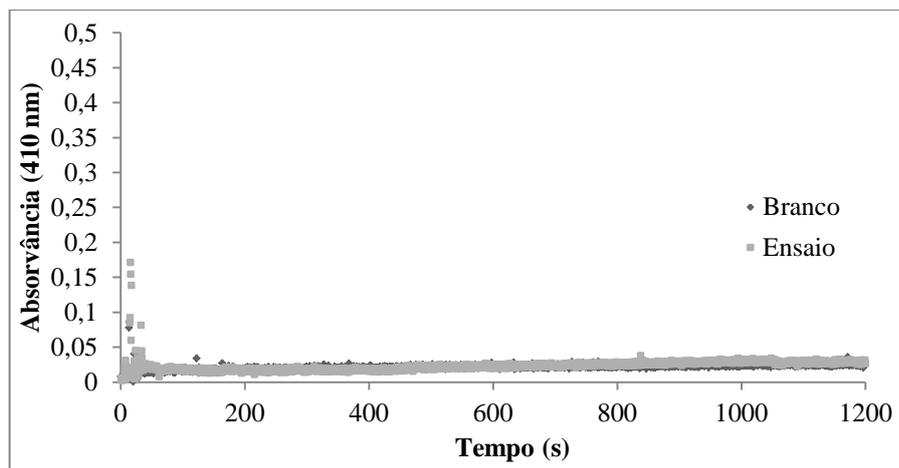


Figura 3.8. Exemplo de um ensaio de determinação da actividade enzimática da tripsina imobilizada por ligação covalente. Ensaio de actividade realizado a 37 °C, a pH 8,0 e usou-se como substrato BAPNA, com uma concentração de 1 mM

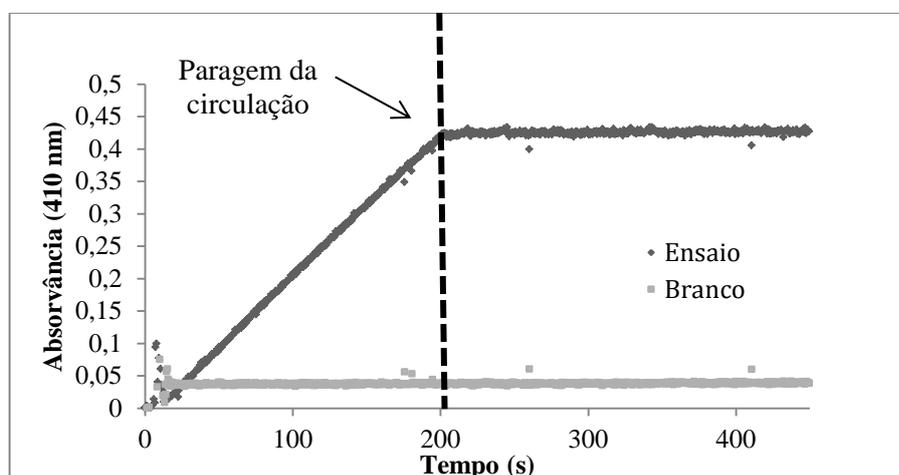


Figura 3.9. Exemplo de um ensaio de determinação da actividade enzimática da tripsina imobilizada por adsorção e reticulação com uma concentração de glutaraldeído de 0,05 % (v/v). Ensaio de actividade realizado a 37 °C, a pH 8,0 e usou-se como substrato BAPNA, com uma concentração de 1 mM A paragem da recirculação da solução de substrato aos ~200 s destina-se a verificar se há ou não saída da enzima imobilizada para a solução.

Das concentrações de glutaraldeído testadas, é possível apurar que as concentrações 0,05% (v/v) e 0,1% (v/v) foram as que apresentaram os melhores resultados de actividade enzimática (Figura 3.10 e Tabela XII). Durante a realização dos ensaios de actividade verificou-se que não houve libertação da enzima imobilizada já que, parando a recirculação da solução de substrato, se houvesse enzima livre em recirculação, a absorvância continuaria a aumentar, o que não se verificou (Figura 3.9). A Figura 3.11 mostra os mini-reactores (*vials*) onde foi feita a imobilização da tripsina, após a reacção com o glutaraldeído (Figura 3.11, A), o aspecto da membrana antes da lavagem (Figura 3.11, B) e após a lavagem (Figura 3.11, C). Verificou-se que também se formaram agregados de tripsina insolúveis mas não ligados à

membrana (Figura 3.11, A, onde se nota que a solução que, à partida, era límpida, apresenta-se turva após a imobilização), para além da esperada ligação de moléculas de enzima entre si e adsorção à membrana. A presença destes agregados insolúveis impossibilitou a quantificação da proteína imobilizada pelo método de Bradford, pelo que não foi possível determinar a quantidade de enzima imobilizada.

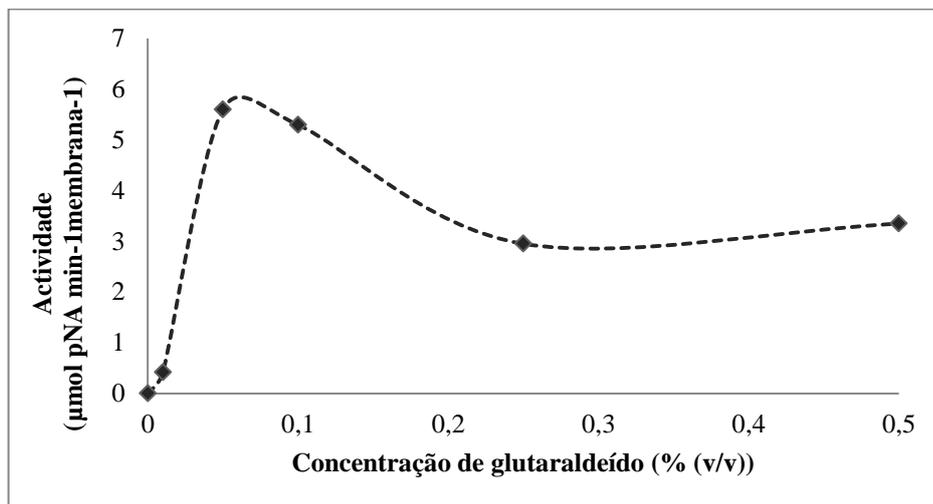


Figura 3.10. Efeito da concentração de glutaraldeído na actividade da enzima imobilizada por adsorção e reticulação. Ensaios de actividade realizados a 37 °C, a pH 8,0 e usou-se como substrato BAPNA, com uma concentração de 1 mM. A linha apresentada pretende somente facilitar a visualização da tendência.

Escolhida a concentração de glutaraldeído com a qual se obteve melhores resultados de actividade enzimática (Figura 3.10) – 0,05 % (v/v) – optou-se por tratar as membranas com NaCNBH_3 de modo a reduzir a ligação imina formada entre o glutaraldeído e a enzima, transformando uma ligação dupla carbono–azoto numa ligação simples carbono–azoto, mais estável. Esta estabilização, embora possa causar alguma diminuição na actividade enzimática, contribuiu para o aumento da estabilidade operacional (Blanco e Guisán, 1989). Foram testadas duas abordagens: adição do agente redutor pouco depois da adição do glutaraldeído (decorrendo a reticulação em simultâneo com a redução) e adição somente após a reticulação com o glutaraldeído. Obtiveram-se resultados de actividade enzimática ligeiramente superiores quando a adição ocorreu após a reticulação (Tabela XII). Este resultado deve-se ao menor período de contacto entre o NaCNBH_3 e a enzima, que também sofre redução pelo NaCNBH_3 .

Apesar de se terem alcançado resultados de actividade enzimática satisfatórios através da imobilização por adsorção e reticulação para uma concentração de glutaraldeído de 0,05% (v/v), procurou encontrar-se uma alternativa que desse garantias de estabilidade operacional da preparação com tripsina imobilizada, isto é, que desse garantias da não libertação de tripsina

quando utilizada, uma vez que, neste método, os agregados de tripsina não ficam covalentemente ligados à membrana. Embora nos ensaios de actividade realizados não tenha havido perda da enzima imobilizada (*leaching*) (Figura 3.9), utilizações sucessivas poderiam levar a que isso acontecesse. Para isso, tentou ligar-se covalentemente à membrana os agregados de tripsina reticulada.

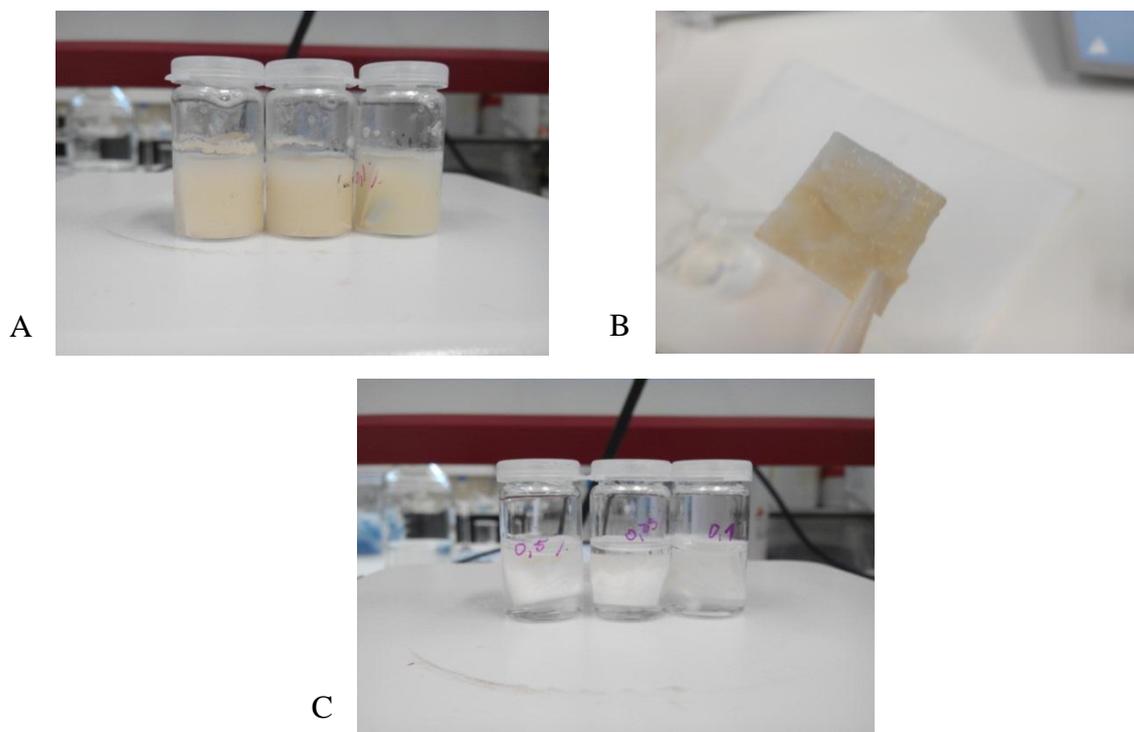


Figura 3.11. Imagens da imobilização da tripsina por adsorção e reticulação. A –Mini-reactores após a reacção de imobilização. B - Membrana após a reacção de imobilização mas antes da lavagem. C - Membranas após a lavagem.

Para que fosse possível ligar covalentemente esses agregados de tripsina, introduziram-se grupos amínicos na membrana, derivatizando-a com HMD, utilizando a EDAC para a ligar covalentemente aos grupos carboxílicos das membranas. Desta forma, o glutaraldeído reage com os grupos amínicos da membrana e da tripsina reticulada, ligando covalentemente à membrana moléculas de tripsina pertencentes a agregados reticulados. Para além disso, a HMD afasta a enzima da superfície da membrana (tem o papel de espaçador), possibilitando uma melhor exposição do sítio activo da enzima ao substrato e uma maior mobilidade, que se espera resultarem num aumento da actividade da enzima imobilizada. Com este método testaram-se duas concentrações de HMD (0,09 M e 1 M), correspondentes a tempos de reacção diferentes. Começou-se por testar HMD 0,09 M e obtiveram-se bons resultados (Tabela XII). No entanto, como com esta concentração de HMD eram requeridos tempos de

reacção demasiado longos (durante a noite), de forma a rentabilizar o tempo, testou-se a utilização de uma solução de HMD mais concentrada (1 M) mas durante um menor tempo de reacção (2 h), tendo-se obtido uma maior actividade enzimática imobilizada. Durante os ensaios de actividade verificou-se que com este método não houve perda da enzima (*leaching*), como evidenciado na Figura 3.12.

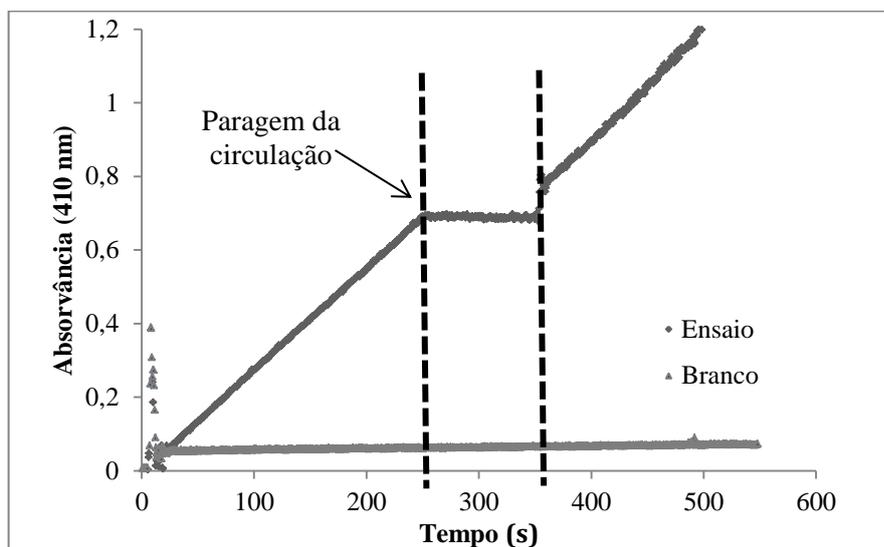


Figura 3.12. Exemplo de um ensaio de determinação da actividade enzimática através da ligação covalente de agregados de tripsina reticulada. Ensaio de actividade realizado a 37 °C, a pH 8,0 e usou-se como substrato BAPNA, com uma concentração de 1 mM. A recirculação da solução de substrato foi parada aos ~250 s e retomada aos ~350 s de modo a verificar se houve ou não saída de enzima imobilizada para a solução.

Na Figura 3.13 mostram-se as membranas com tripsina imobilizada por este método. Assim, a metodologia de imobilização que levou a melhores resultados e que foi seleccionada para realizar os estudos subsequentes foi a imobilização através da ligação covalente de agregados de tripsina reticulada com glutaraldeído a membranas de PET/PLA derivatizadas com HMD 1M, durante 2h, e adicionando NaCNBH_3 após a reacção com o glutaraldeído.

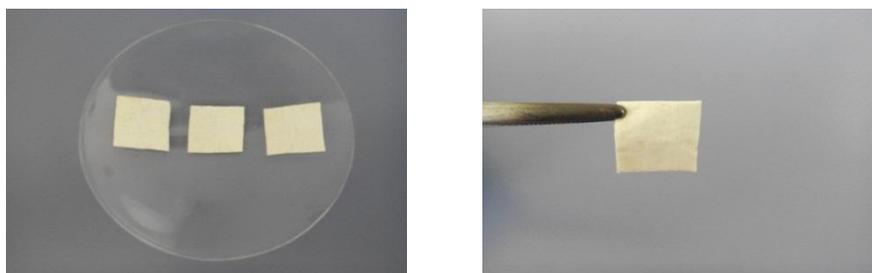


Figura 3.13. Imagens de membranas de nanofibras de PET/PLA com tripsina imobilizada por ligação covalente de agregados de tripsina reticulados.

3.3 Quantidade de tripsina imobilizada

Como já foi referido, apesar de se ter tentado quantificar a tripsina imobilizada aquando da imobilização, isso não foi possível. Com o método de imobilização por ligação covalente utilizando EDAC, tentou quantificar-se a tripsina pelo método de Bradford (Bradford, 1976) e verificou-se que poderá ter havido alguma interferência de produtos ou subprodutos gerados com o reagente de Bradford, impossibilitando a sua quantificação. Com a tripsina imobilizada por adsorção e reticulação, também não foi possível quantificar a enzima imobilizada pelo mesmo método, por se formarem agregados insolúveis de tripsina. Assim, na tentativa de obter informação sobre a quantidade de tripsina imobilizada, testou-se um método de quantificação de proteína ligada a superfícies que, embora utilize um corante semelhante ao utilizado no método de Bradford, baseia-se num princípio diferente: adsorção do corante (Coomassie Brilliant Blue R-250) à proteína imobilizada, seguida da eluição do corante adsorvido e sua quantificação (Ahmad e Saleemuddin, 1985).

Estudaram-se 2 lotes de 3 membranas de nanofibras de PET/PLA contendo tripsina imobilizada, em que a tripsina foi imobilizada sobre membranas derivatizadas com HMD por ligação covalente de agregados reticulados com glutaraldeído. Os resultados obtidos encontram-se na Tabela XIII.

Tabela XIII. Quantidade de tripsina imobilizada sobre as membranas de nanofibras de PET/PLA por ligação covalente de agregados de tripsina reticulada, calculada através do método de adsorção e eluição do Coomassie Brilliant Blue R-250 ($n=3$) ** Diferença muito significativa ($p < 0,01$; teste t de Student).

	Proteína imobilizada (mg tripsina g ⁻¹ membrana)	Desvio-padrão (mg tripsina g ⁻¹ membrana)	Coefficiente de variação (CV) (%)
Lote 1	13,2**	1,2	9
Lote 2	17,1**	0,2	10

Como após o passo de eluição do corante as membranas ainda se apresentavam ligeiramente azuladas, indicando que não se conseguiu eluir todo o corante adsorvido à proteína imobilizada⁵ os valores apresentados são valores por defeito. Verificou-se que, ainda que a quantidade de enzima imobilizada nos dois lotes de membranas seja semelhante, existe alguma diferença entre eles ($13,2 \pm 1,2$ versus $17,1 \pm 0,1$ mg de tripsina g⁻¹ de membrana; $p <$

⁵ No entanto, todo o corante adsorvido aos brancos (membranas sem tripsina) foi eluído, já que estas ficaram brancas.

0,01, teste *t* de Student). Esta diferença parece estar relacionada com as já referidas pouca reprodutibilidade do método de imobilização usado e pouca uniformidade das membranas, já que a reprodutibilidade entre as três réplicas pertencentes a cada lote de imobilização é aceitável ($CV \leq 10\%$), ainda que seja diferente nestes dois lotes.

Atendendo à quantidade de enzima adicionada aquando da imobilização (16 mg), a quantidade máxima de tripsina imobilizada possível seria de $538,3 \pm 10,3$ e $576,5 \pm 46,4$ mg de tripsina g^{-1} de membrana para cada um dos lotes. Comparando os valores obtidos com os valores máximos possíveis, obteve-se uma percentagem de imobilização de cerca de 2,5 e de 3,2 %, respectivamente, ainda que este resultado seja por defeito. Observando estes valores, conclui-se que o rendimento de imobilização é muito reduzido.

3.4 Actividade enzimática da tripsina imobilizada

Como referido na secção 2.3.5, a concentração de BAPNA nos ensaios foi de 1 mM. Idealmente dever-se-ia ter trabalhado com uma concentração de BAPNA acima do K_M da tripsina para aquele substrato – $2,08 \pm 0,12$ mM, Rodrigues *et al.* (2013) – pois só assim se garantiria que todos os locais activos das moléculas de tripsina presentes se encontrariam saturados com substrato, sendo a velocidade da reacção menos dependente da concentração de substrato. Como com concentrações de BAPNA de 3 mM e 2 mM no ensaio ocorria precipitação durante os ensaios de actividade, teve de se usar uma concentração de BAPNA inferior ao K_M da enzima.

A actividade enzimática média obtida para a tripsina imobilizada em agregados reticulados covalentemente ligados às nanofibras de PET/PLA neste trabalho foi de $0,78 \pm 0,14$ μM pNA min^{-1} mg suporte $^{-1}$ ($n = 9$). Lee *et al.* (2010) reportou valores de actividade enzimática entre 0,006 e 0,020 μM pNA min^{-1} mg suporte $^{-1}$ para a tripsina imobilizada em nanofibras de PS-PSMA por ligação covalente directa e entre 1,03 e 6,13 μM pNA min^{-1} mg suporte $^{-1}$ para a tripsina imobilizada por ligação covalente a nanofibras de PS-PSMA e reticulação com glutaraldeído 0,5 % (m/v). Este autor realizou estes ensaios a pH 7,6 e à temperatura ambiente, enquanto que, neste trabalho, se trabalhou a pH 8.0 e a 37 °C. Embora estes resultados não sejam directamente comparáveis, pode concluir-se que a actividade obtida está ligeiramente abaixo do limite inferior da gama de valores apresentados por Lee *et al.* (2010) para o mesmo tipo de imobilização.

É importante referir que houve alguma variabilidade em termos de resultados de actividade enzimática. Pensa-se que as principais causas estejam relacionadas com a reprodutibilidade da metodologia de imobilização e da preparação do suporte. Como já foi referido, a utilização do glutaraldeído na reticulação de enzimas apresenta problemas de reprodutibilidade. Além disso, embora tenham sido utilizadas membranas obtidas do mesmo lote (*batch*) de electrofiação, as membranas apresentam sempre alguma falta de uniformidade, apresentando zonas irregulares (que foram descartadas).

3.4.1 Variação da actividade enzimática com a temperatura

O efeito da temperatura na actividade da enzima imobilizada foi determinado realizando ensaios de actividade para dois valores de temperatura – 37 °C e 50 °C –, como é apresentado na Figura 3.14.

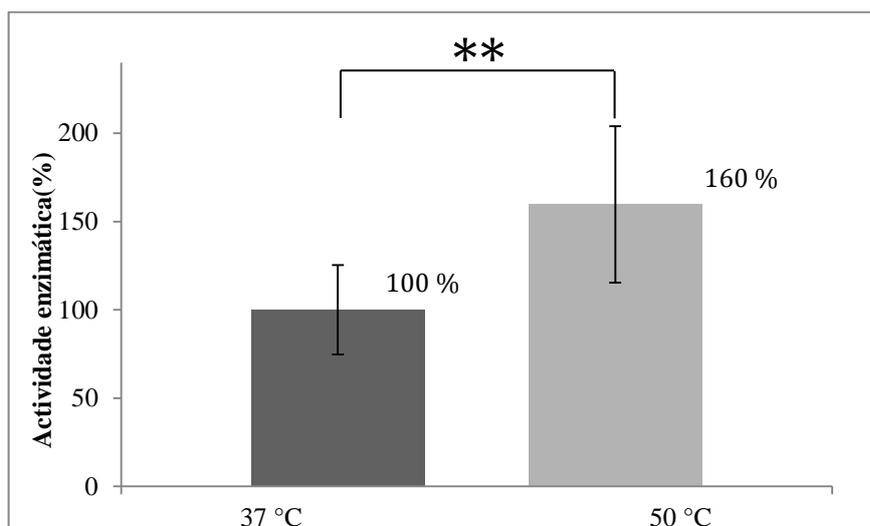


Figura 3.14. Efeito da temperatura na actividade da tripsina imobilizada a 37 °C e a 50 °C, a pH 8,0 (actividade expressa em relação à actividade a 37 °C). Ensaio de actividade usando como substrato BAPNA, concentração de 1 mM. As barras de erro representam desvios-padrão das médias ($n = 9$ para ensaio a 37 °C e $n = 3$ para ensaio a 50 °C). ** Diferença muito significativa ($p < 0,01$; teste t de Student).

Verifica-se que há um aumento da actividade catalítica de cerca de 60% operando a 50 °C. Do estudo realizado por Rodrigues *et al.* (2013) representado na Figura 1.9, onde foi avaliado o efeito da temperatura sobre a enzima livre para as mesmas temperaturas, houve um aumento de cerca de 20 %. De forma análoga, no estudo desenvolvido por Seabra e Gil (2007) onde avaliaram os mesmos parâmetros, também se registou um aumento de, aproximadamente 20 % operando a 50 °C. Pode concluir-se que com a imobilização se

consegue um aumento significativo da actividade a 50 °C em relação à enzima livre, resultado que se encontra de acordo com o esperado de um processo de imobilização, em que é conferido ao sistema uma maior resistência aos processos de auto-proteólise da tripsina. Para além disso, a estrutura estabilizada provocada pela reticulação com o glutaraldeído e o facto de as moléculas de enzima estarem retidas, deve resultar numa contribuição para a estabilização da molécula contra a desnaturação, potenciada a temperaturas mais elevadas.

3.4.2 Variação da actividade enzimática com o pH

O efeito do pH na actividade da enzima imobilizada foi avaliado realizando ensaios de actividade, a 37 °C, para um conjunto de três valores de pH – 4, 6 e 8 –, como é apresentado na Figura 3.15. Foram seleccionados os valores de pH de 4 e 6 devido à aplicação final desejada: a hidrólise de proteínas de soro de leite. Como existem dois tipos de soro de leite, ácido e doce, cujos valores de pH se situam entre os 3,57 e 4,34 e entre 6,02 e 6,58, respectivamente, escolheram-se dois valores de pH dentro dessas gamas (Alsaed *et al.*, 2013). Estes ensaios de actividade foram realizados em tampão TRIS/Acetato de sódio/Glicina, na presença de CaCl₂. O valor de pH 8 foi escolhido por ser considerado o pH óptimo da tripsina livre utilizada (Rodrigues *et al.*, 2013) e o ensaio foi realizado em tampão TRIS-HCl, na presença de CaCl₂, como descrito em 2.3.5.

Verificou-se que a actividade da tripsina imobilizada é praticamente nula para pH 4 e que, para pH 6, é cerca de metade da obtida a pH 8. Pode concluir-se que, dos valores de pH testados, o pH de actividade máxima a 37 °C da tripsina imobilizada é pH 8. Os resultados obtidos para a enzima livre por Rodrigues *et al.* (2013), apresentados na Figura 1.10, evidenciam o pH 8 como pH óptimo, existindo actividade residual a pH 4 e cerca de 35 % de actividade para pH 6.

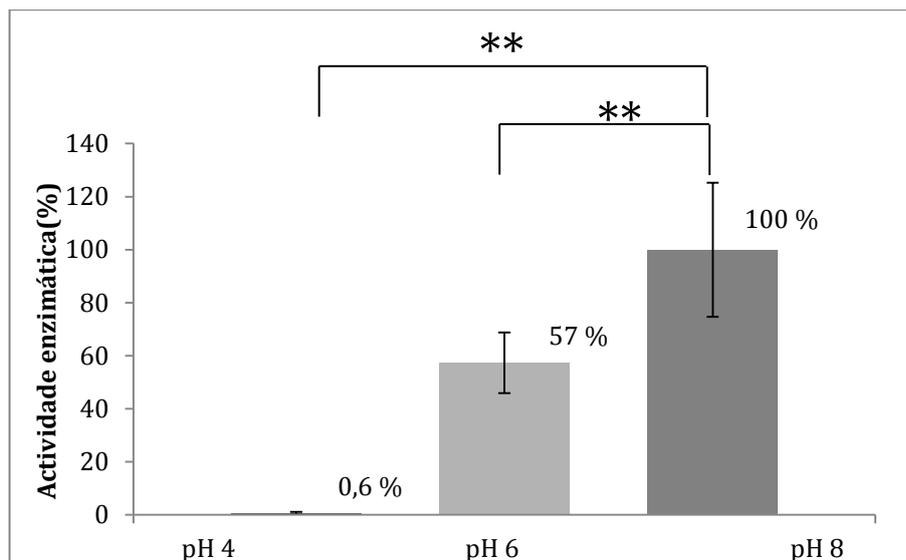


Figura 3.15. Efeito do pH na actividade da tripsina imobilizada a pH 4, pH 6 e pH 8, realizado a 37 °C (actividade expressa em relação à actividade a pH 8). Ensaio de actividade usando como substrato BAPNA, concentração de 1 mM. As barras de erro representam os desvios-padrão das medições efectuadas ($n = 3$ para ensaio a pH 4, $n = 3$ para ensaio a pH 6 e $n = 9$ para ensaio a pH 8). ** - Diferença muito significativa ($p < 0,01$; ANOVA + Tukey's HSD).

Seabra e Gil (2007) no estudo de enzima livre que desenvolveram, concluíram que o pH óptimo da tripsina livre é o pH 7. Para pH 4 não se regista actividade da enzima, para pH 6 é cerca de 50 % da actividade máxima (obtida para pH 7) e para pH 8 registaram cerca de 80 % de actividade. Pode concluir-se que com a imobilização a actividade a pH 4 mantém-se residual embora para o pH 6 tenha havido uma melhoria considerável.

3.4.3 Variação da actividade enzimática com as condições hidrodinâmicas

Um outro efeito que também foi alvo de estudo foi a variação da actividade da enzima imobilizada com as condições hidrodinâmicas, avaliadas através da variação da velocidade de fluxo do sistema de recirculação da mistura reaccional (contendo o substrato) durante os ensaios de actividade da tripsina imobilizada. Foram testadas duas velocidades, 60 e 100 rpm, e os ensaios de actividade foram conduzidos como descrito em 2.3.5. Na Figura 3.16 estão apresentados os resultados.

Verificou-se que um aumento da velocidade de fluxo de 60 para 100 rpm favorece a actividade enzimática detectada, registando-se um aumento de 29 % na actividade enzimática. Isto deve-se a uma passagem mais frequente da solução de BAPNA pela membrana com tripsina imobilizada, originando uma maior oportunidade de contactos enzima-substrato. Verifica-se, também, que há estabilidade dos agregados da enzima na superfície da

membrana, mesmo em situações de maior turbulência, não tendo sido detectada libertação de tripsina imobilizada (Figura 3.17).

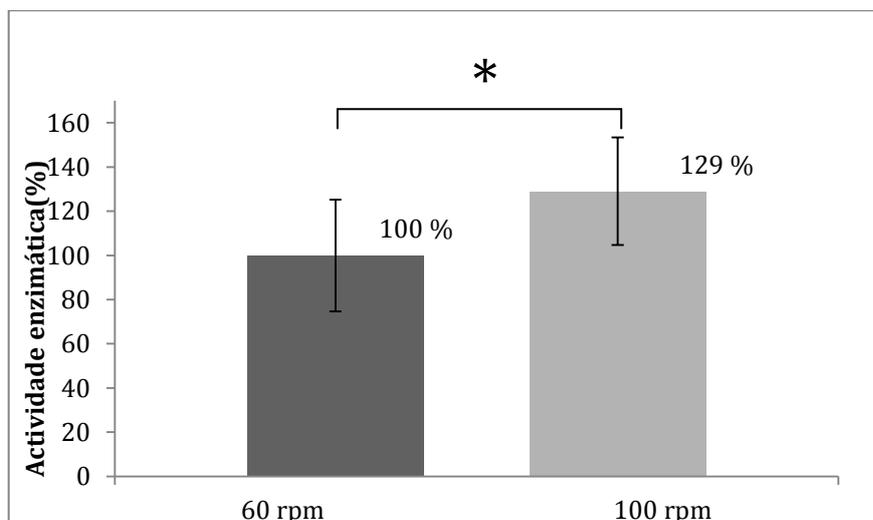


Figura 3.16. Efeito da velocidade do fluxo (60 e 100 rpm) na recirculação da solução de substrato (BAPNA, concentração de 1 mM) no ensaio de actividade da tripsina imobilizada, realizados a 37 °C, pH 8,0 (actividade expressa em relação à actividade a 60 rpm). As barras de erro representam os desvios-padrão das medições efectuadas ($n = 9$ para o ensaio a 60 rpm; $n = 3$ para o ensaio a 100 rpm). * - Diferença significativa ($p < 0,05$; teste t de Student).

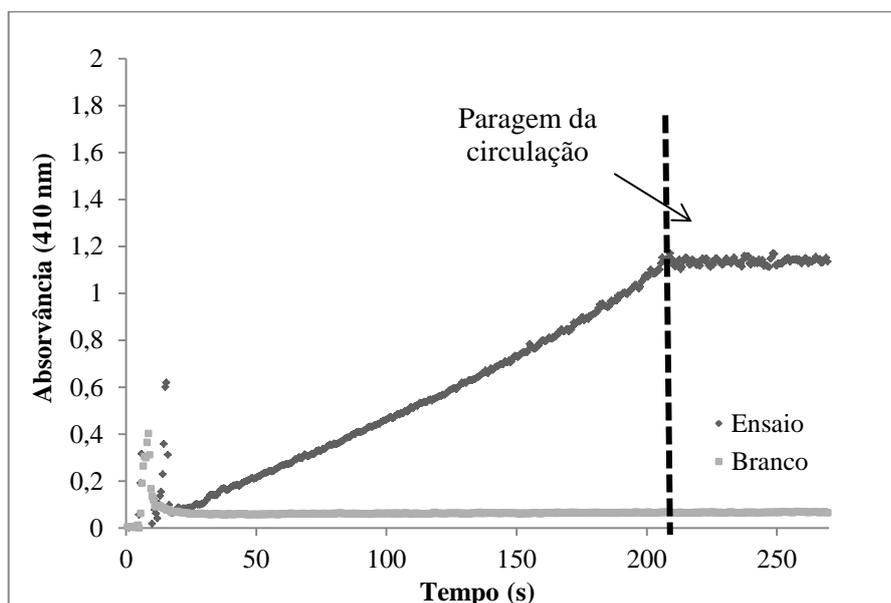


Figura 3.17. Exemplo da determinação da actividade enzimática da tripsina imobilizada por ligação covalente e reticulação dos agregados com uma velocidade de fluxo de 100 rpm. Ensaio de actividade realizado a 37 °C, a pH 8,0 e usou-se como substrato BAPNA, com uma concentração de 1 mM. A recirculação da solução de substrato foi parada aos ~210 s de modo a verificar se houve ou não saída de enzima imobilizada para a solução.

3.5 Estabilidade da tripsina ao armazenamento

Foi estudado o efeito do armazenamento em água destilada na actividade da tripsina livre e da tripsina imobilizada, para diferentes temperaturas de armazenamento: à temperatura ambiente, a 4 °C e a - 20 °C. Na Figura 3.18 encontra-se representado o efeito do armazenamento em água destilada na actividade da tripsina livre, durante um período de 30 dias, para as três temperaturas de armazenamento testadas. Para a tripsina livre, verificou-se que a condição de armazenamento em água destilada, para a qual não há perda de actividade enzimática ao fim de 30 dias, é a de - 20 °C.

Quando armazenada à temperatura ambiente durante 30 dias, a sua actividade decaiu cerca de 60 % em relação à actividade de partida, apresentando-se estatisticamente como uma diferença muito significativa ($p < 0,01$) quando comparada com a actividade inicial (ANOVA + Tukey's HSD para a curva à temperatura ambiente). Ainda para as mesmas condições, a diferença entre a actividade restante na primeira e na segunda semana de armazenamento, não apresenta uma diferença estatisticamente significativa quando comparada com a actividade inicial.

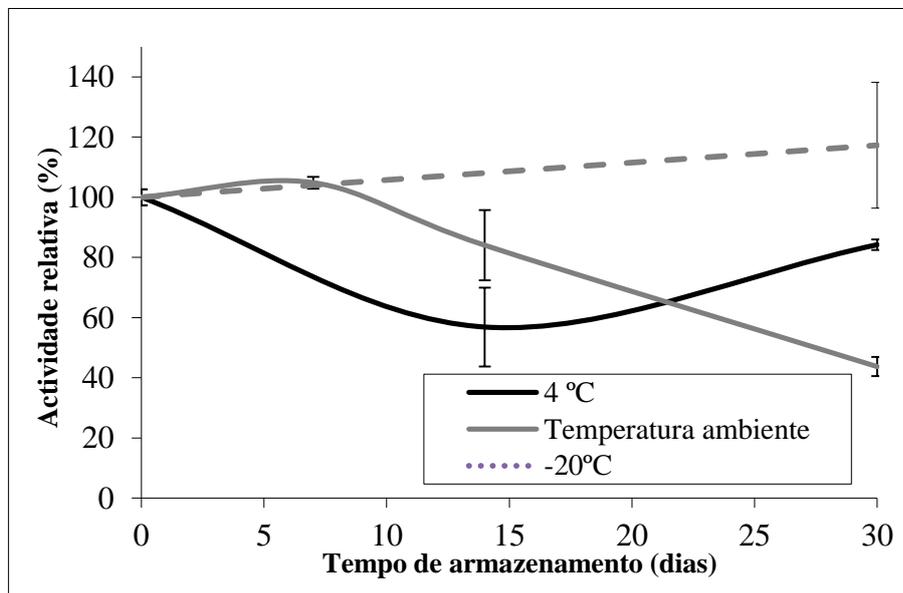


Figura 3.18. Estabilidade ao armazenamento em água destilada da tripsina livre para diferentes temperaturas de armazenamento. Ensaio de actividade realizado a 37 °C, a pH 8,0 e usou-se como substrato BAPNA, com uma concentração de 1 mM. A actividade relativa foi calculada em relação à actividade inicial. As barras de erro representam os desvios-padrão das medições efectuadas ($n = 3$). As linhas apresentadas pretendem somente facilitar a visualização da tendência.

Já quando armazenada a 4 °C, os valores médios de actividade indicam um decréscimo da actividade enzimática ao fim de 14 dias de armazenamento (decréscimo de cerca de 57 %),

e um aumento de actividade aos 30 dias. O aumento de actividade registado após 30 dias não apresenta significado estatístico (comparando com a actividade de partida ou com a alcançada ao fim de duas semanas), devendo este facto estar relacionado com dificuldades de reprodutibilidade.

Na Figura 3.19 está representado o efeito ao armazenamento em água destilada na actividade da tripsina imobilizada, para as mesmas temperaturas e no mesmo intervalo de tempo. Verifica-se que, ao fim de 14 dias, a temperatura para a qual ocorre menor perda de actividade é a temperatura ambiente, mantendo-se praticamente constante durante os 30 dias. No entanto, ao fim de um mês de armazenamento, os melhores resultados são para o armazenamento a 4 °C, sugerindo que, a longo prazo, esta condição deverá ser preferida. Quando armazenada a -20 °C, ao fim de 30 dias há um decréscimo de ~ 20%, ainda que não apresente uma diferença estatisticamente significativa em relação à actividade inicial, dada a variabilidade dos resultados obtidos. Neste estudo, tendo-se verificado a existência de desvios-padrão elevados, as diferenças não apresentam significado estatístico. Seria necessário melhorar a reprodutibilidade do estudo para se poderem retirar conclusões mais assertivas.

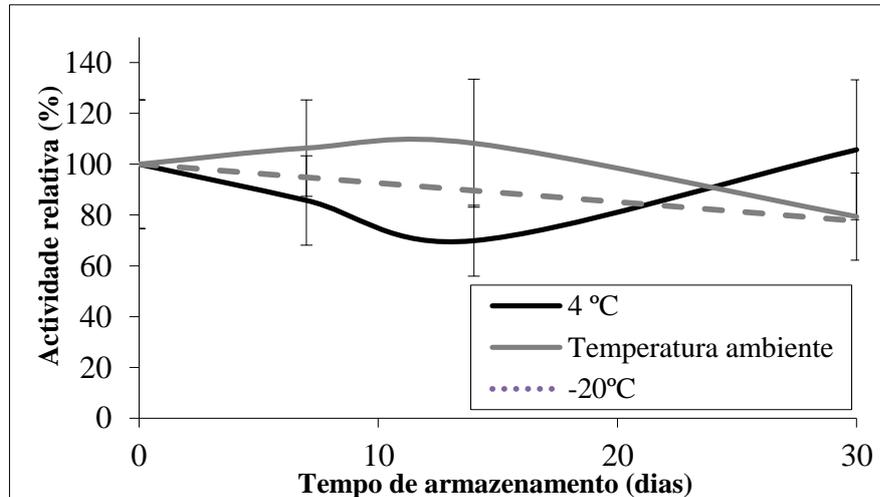


Figura 3.19. Estabilidade ao armazenamento em água destilada da tripsina imobilizada para diferentes temperaturas de armazenamento. Ensaio de actividade realizados a 37 °C, a pH 8,0 e usou-se como substrato BAPNA, com uma concentração de 1 mM. A actividade relativa foi calculada em relação à actividade inicial. As barras de erro representam os desvios-padrão das medições efectuadas ($n = 9$ para a actividade inicial e $n = 3$ para as restantes). As linhas apresentadas pretendem somente facilitar a visualização da tendência.

No trabalho reportado por Lee *et al.* (2010), relativo ao estudo de armazenamento realizado para avaliar a estabilidade da tripsina imobilizada por ligação covalente e reticulação em membranas de PS-PSMA, é indicado que, ao fim de 30 dias, houve uma perda

entre 10 e 25 % da actividade da enzima imobilizada, quando armazenada à temperatura ambiente, num meio não indicado (Tabela II). Neste trabalho, para as mesmas condições de armazenamento (exceptuando o meio de armazenamento), registou-se uma perda de 21 ± 17 %. No trabalho realizado por Bayramoğlu *et al.*, (2008), que teve por objecto a imobilização da tripsina em esferas magnéticas de nanofibras de P(GMA-MMA)-g-MAA, também foi estudada a estabilidade ao armazenamento da enzima imobilizada. Bayramoğlu *et al.* (2008) apuraram que, ao fim de 8 semanas de armazenamento a 4 °C (em tampão fosfato, a pH 4) houve perda de 39 % de actividade enzimática. Como se pode verificar na Figura 3.19, a tripsina imobilizada em membranas de nanofibras e armazenada a 4 °C, não apresenta perda significativa da actividade ao fim de 30 dias (106 ± 17 %).

De uma forma geral estes resultados são positivos, verificando-se uma boa estabilidade dos agregados de tripsina ligados covalentemente às membranas de nanofibras de PET/PLA ao fim de um mês de armazenamento.

Na Figura 3.20 compara-se a estabilidade da tripsina livre e da tripsina imobilizada quando armazenadas à temperatura ambiente.

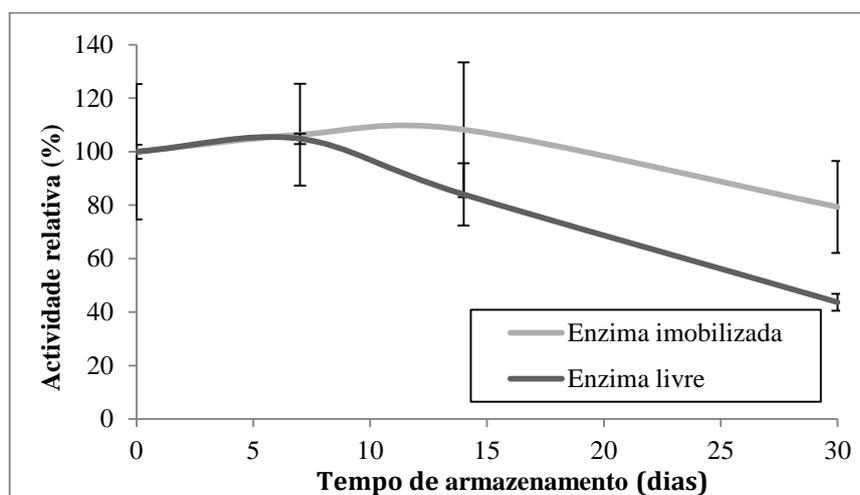


Figura 3.20. Estabilidade ao armazenamento em água destilada da tripsina livre e imobilizada à temperatura ambiente. Ensaio de actividade realizados a 37 °C, a pH 8,0 e usou-se como substrato BAPNA, com uma concentração de 1 mM. A actividade relativa foi calculada em relação à actividade inicial. As barras de erro representam os desvios-padrão das medições efectuadas ($n = 9$ para a actividade inicial da tripsina imobilizada e $n = 3$ para as restantes). As linhas apresentadas pretendem somente facilitar a visualização da tendência.

Verifica-se que, até aos primeiros 7 dias, não há perda considerável da actividade para os dois sistemas em estudo. No entanto, verifica-se uma divergência das duas curvas a partir desse momento. Regista-se um decréscimo mais acentuado da tripsina livre, havendo uma perda de 56 ± 3 % ao fim de 30 dias. Esta rápida inactivação é possivelmente devida à auto-

proteólise e desnaturação da enzima livre. Por outro lado, a enzima imobilizada exibe maior estabilidade, exibindo uma perda de actividade de $21 \pm 17 \%$ ao fim dos 30 dias. Em termos estatísticos, a diferença apresentada ao fim dos 30 dias de armazenamento entre as duas curvas assinala-se como uma diferença significativa ($p < 0,05$, teste t de Student). Pode concluir-se que, à temperatura ambiente, a enzima imobilizada apresenta maior estabilidade do que a enzima livre.

Na Figura 3.21 comparam-se a estabilidade ao armazenamento a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ da enzima livre e da enzima imobilizada. Verifica-se que tanto as curvas da enzima livre, como da enzima imobilizada, apresentam um comportamento inesperado. Apresentam um decréscimo de actividade até aos 14 dias de armazenamento, correspondendo a uma perda de actividade de $30 \pm 14 \%$ para a enzima imobilizada e de $43 \pm 13 \%$ para enzima livre, seguido de um aumento até aos 30 dias de armazenamento. Este aumento não vem de encontro ao esperado.

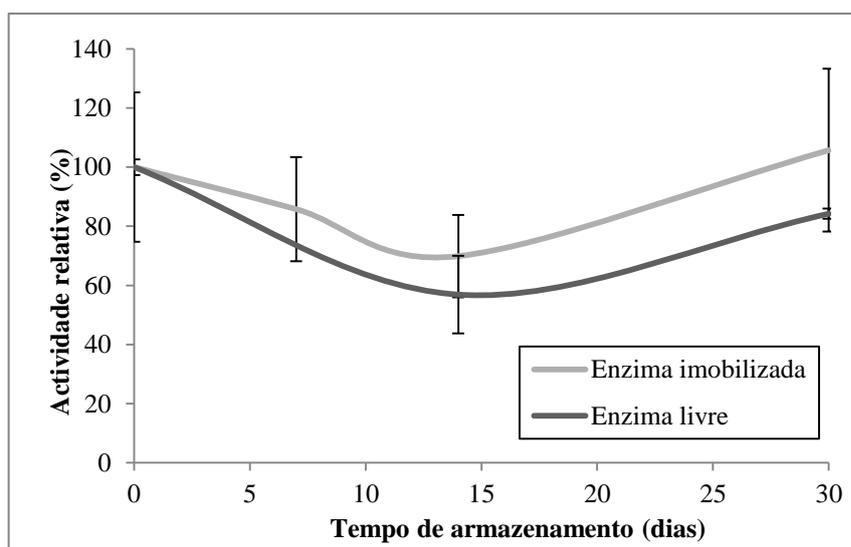


Figura 3.21. Estabilidade ao armazenamento em água destilada da tripsina livre e imobilizada a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Ensaio de actividade realizados a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, a pH 8,0 e usou-se como substrato BAPNA, com uma concentração de 1 mM. A actividade relativa foi calculada em relação à actividade inicial. As barras de erro representam os desvios-padrão das medições efectuadas ($n = 9$ para a actividade inicial da tripsina imobilizada e $n = 3$ para as restantes). As linhas apresentadas pretendem somente facilitar a visualização da tendência.

Confirma-se que a enzima imobilizada se apresenta mais estável a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ do que a enzima livre, registando-se actividades de $106 \pm 28 \%$ e $84 \pm 2 \%$, respectivamente, ao fim dos 30 dias de armazenamento. No entanto, quando se comparou a actividade ao fim de 30 dias com a actividade inicial (teste t de Student), não se encontrou significado estatístico na diferença observada entre as médias. Também, quando se comparou a actividade ao fim dos 30 dias da

enzima livre com a da enzima imobilizada, não se encontrou significado estatístico para a diferença entre as médias.

Na Figura 3.22 encontram-se representadas as curvas que traduzem a estabilidade da tripsina livre e imobilizada após armazenamento durante 1 mês a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Contrariamente ao verificado anteriormente, observa-se que a enzima livre apresenta maior estabilidade do que a enzima imobilizada para esta condição de armazenamento. No entanto, os resultados obtidos apresentam desvios-padrão elevados, associados a dificuldades de reprodutibilidade. Em termos estatísticos, a diferença registada entre a actividade da enzima livre e imobilizada, ao fim dos 30 dias de armazenamento, não apresenta significado estatístico (teste t de Student).

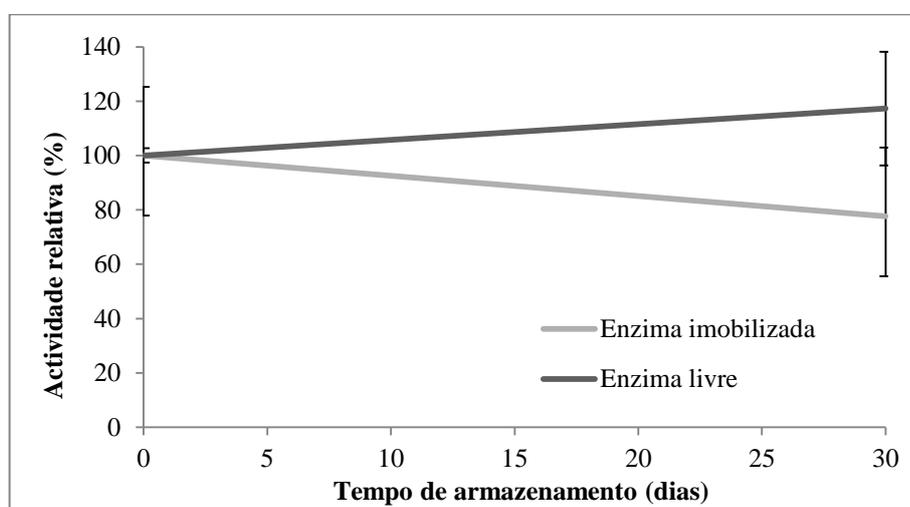


Figura 3.22. Estabilidade ao armazenamento em água destilada da tripsina livre e imobilizada a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Ensaio de actividade realizado a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, a pH 8,0 e usou-se como substrato BAPNA, com uma concentração de 1 mM. A actividade relativa foi calculada em relação à actividade inicial. As barras de erro representam os desvios-padrão das medições efectuadas ($n = 9$ para o actividade inicial da tripsina imobilizada e $n = 3$ para as restantes). As linhas apresentadas pretendem somente facilitar a visualização da tendência.

De uma forma geral, comparando as estabilidades da enzima livre com as da imobilizada, há a indicação de que a imobilização estabilizou a tripsina. Provavelmente, a imobilização por ligação covalente de agregados de tripsina confere resistência à auto-proteólise da tripsina, criando um sistema mais estável. No entanto, dada a grandeza dos desvios-padrão obtidos, as diferenças registadas nem sempre apresentam significado estatístico, sendo necessário melhorar a reprodutibilidade deste estudo de modo a poder obter-se conclusões definitivas.

3.6 Estabilidade operacional da tripsina

A estabilidade operacional, da tripsina imobilizada, evidenciada na Figura 3.23, foi avaliada pela repetição de ensaios de actividade com a mesma membrana.⁶ A boa estabilidade da enzima reticulada e covalentemente ligada às membranas pode ser atribuída a ligações em múltiplos pontos na superfície das moléculas de enzima, o que previne a autólise e a desnaturação da enzima.

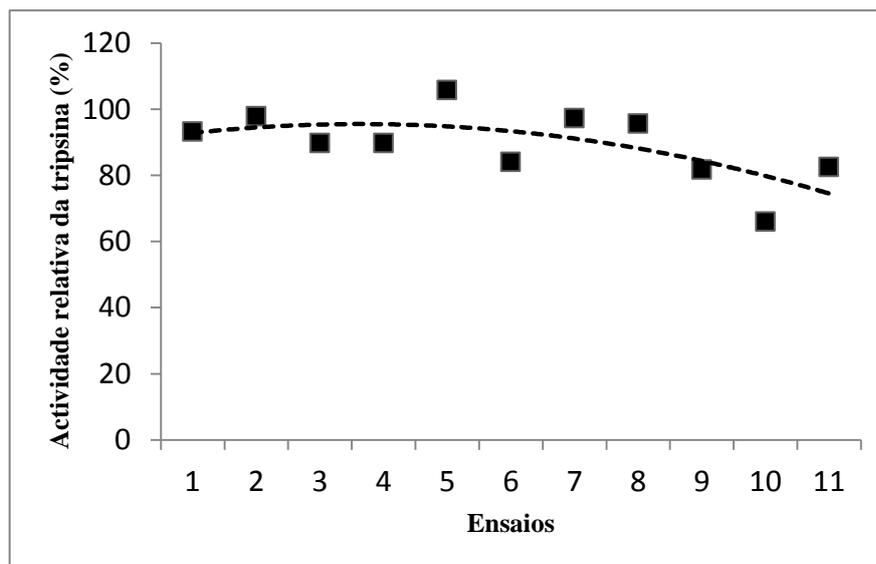


Figura 3.23. Estabilidade operacional da tripsina imobilizada, obtida por repetição sucessiva do ensaio enzimático com a mesma amostra de tripsina imobilizada numa membrana de nanofibras de PET/PLA. Ensaio de actividade realizados a 37 °C, a pH 8,0 e usou-se como substrato BAPNA, com uma concentração de 1 mM. A actividade relativa foi calculada em relação à actividade inicial. A linha apresentada pretende somente facilitar a visualização da tendência.

Também foi verificado que, ao longo deste estudo, nunca houve perda da enzima das membranas para a solução de substrato (Figura 3.24), o que reforça o que foi anteriormente dito relativamente à estabilidade operacional destes sistemas.

⁶ Este estudo não pode ser realizado com a tripsina livre, uma vez que ela é solúvel no meio de reacção e, como tal, não pode ser recuperada.

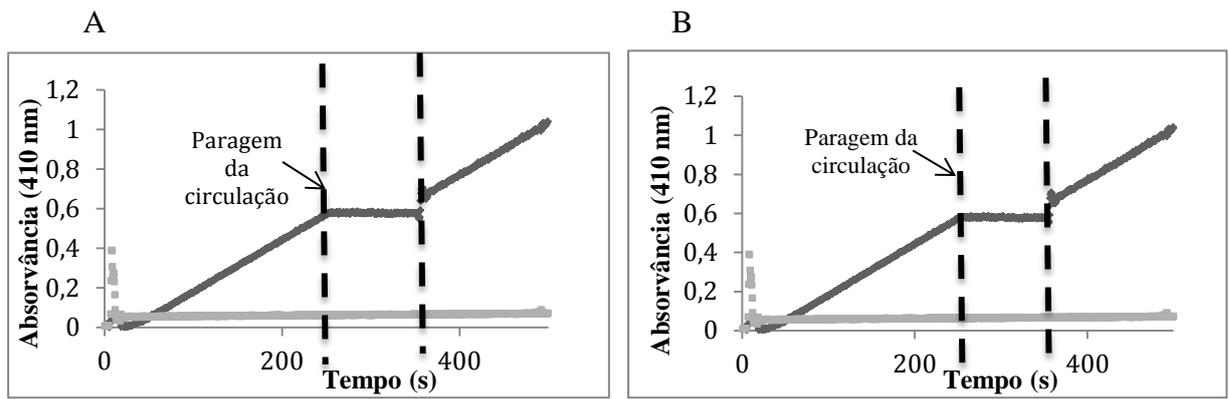


Figura 3.24. Primeiro (A) e último (B) ensaio de actividade enzimática do estudo de estabilidade operacional da tripsina imobilizada por ligação covalente e reticulação de agregados. Ensaio de actividade realizados a 37 °C, a pH 8,0 e usou-se como substrato BAPNA, com uma concentração de 1 mM. A recirculação da solução de substrato foi parada aos ~250 s e retomada aos ~350 s, de modo a verificar se houve ou não saída de enzima imobilizada para a solução.

4 Conclusões

A presente dissertação teve como principal objectivo a imobilização covalente da tripsina em membranas de nanofibras de PET/PLA obtidas por electrofiação. Nesse sentido, foram desenvolvidas três metodologias de imobilização de forma a escolher a que oferecia melhores resultados. Com o método seleccionado, foi avaliada a actividade da tripsina a vários valores de pH, temperatura e velocidade de fluxo, a estabilidade ao armazenamento e a estabilidade operacional. Foram também caracterizadas as membranas de nanofibras utilizadas como suporte de imobilização, uma vez que o sucesso da imobilização depende fortemente das características do suporte usado.

A imobilização da tripsina por ligação covalente a grupos carboxílicos do PLA, através da EDAC, não foi bem-sucedida (actividade da enzima residual). Presume-se que tal tenha acontecido devido à existência de um número reduzido de grupos carboxílicos na membrana, aos quais a enzima se pudesse ligar. A segunda metodologia consistiu em adsorver a tripsina às membranas e reticulá-la usando o glutaraldeído. Neste caso já se obtiveram resultados mais satisfatórios e apurou-se que o êxito da imobilização era dependente da concentração de glutaraldeído usada, sendo a concentração de 0,05 % (v/v) de glutaraldeído a elegida. Verificou-se que, com este método, embora a enzima não se encontre covalentemente ligada ao suporte (está apenas adsorvida) não houve libertação da enzima aquando do seu ensaio de actividade. No entanto, de forma a assegurar uma maior actividade e estabilidade da enzima, testou-se um método que consistiu em ligar agregados de tripsina reticulados a membranas de PET/PLA derivatizadas com HMD. Com este método alcançaram-se os melhores resultados e, durante os ensaios de actividade enzimática, também não se registou perda da enzima. Determinou-se a variação da actividade da enzima imobilizada a diferentes valores de pH, temperatura e velocidade de recirculação da solução de substrato. Comparando com as condições padrão do ensaio de actividade da tripsina (pH 8, temperatura de 37 °C e uma velocidade de fluxo de 60 rpm), verificou-se um aumento de cerca de 60% quando se opera a 50 °C. Observou-se que para um valor de pH 4 não havia actividade da enzima imobilizada e que a pH 6 a actividade era de aproximadamente 57 % em relação às condições padrão. De igual modo, para uma velocidade de 100 rpm, registou-se um aumento de 29% na actividade enzimática.

Verificou-se que a enzima imobilizada apresenta boa estabilidade ao armazenamento em água destilada durante 30 dias (à temperatura ambiente, a 4 °C ou a -20 °C) e boa

estabilidade operacional, tendo sido utilizada em onze ensaios consecutivos com uma perda de actividade de aproximadamente 20 %, não ocorrendo libertação de enzima. Estes resultados revelam que o método de imobilização confere estabilidade ao sistema enzimático, permitindo a sua reutilização e armazenamento sem comprometer de forma significativa a actividade da enzima.

Da caracterização efectuada às membranas de nanofibras verificou-se que se consegue preparar membranas de nanofibras por electrofiação com diâmetros de algumas centenas de nanómetros e que estas membranas de PET/PLA apresentam maior capacidade de absorção de água do que membranas de PET. O estudo por FTIR e por calorimetria revelou que os dois polímeros (PET e PLA) se encontram nas membranas, que não interagem significativamente entre si e que as membranas de PET/PLA apresentam um grau de cristalinidade inferior ao das membranas de PET.

5 Sugestões de trabalho futuro

No futuro seria importante melhorar a uniformidade de produção das membranas de nanofibras, de forma a que a imobilização seja mais reprodutível. Seria também importante estudar se a proporção de PET/PLA usada na preparação da nanofibras é a que oferece melhores resultados, ou se não seria preferível usar um polímero que apresente mais grupos reactivos, o que se poderá traduzir numa ligação de enzima mais favorável. Seria necessário também testar se, para o efeito final (hidrólise de proteínas do soro de leite), as membranas obtidas apresentam a porosidade adequada, uma vez que se passa para um substrato de maior peso molecular.

Como agente reticulante usou-se o glutaraldeído. Seria interessante analisar o comportamento da imobilização usando outro agente reticulante, não só por este apresentar problemas de reprodutibilidade, mas também por apresentar uma toxicidade não compatível com a indústria alimentar. Este estudo forneceria informações importantes tais como: se o glutaraldeído é de facto o melhor agente para reticular a tripsina, ou se bloqueia ou inibe a actividade da enzima. Também se poderia testar a utilização de outro braço extensor (maior ou menor) para verificar se a distância entre os agregados de tripsina e a membrana é determinante na actividade da enzima. A optimização da quantidade de tripsina adicionada no processo de imobilização seria igualmente um estudo interessante.

Seguindo os ensaios de actividade, faria sentido determinar os parâmetros cinéticos da tripsina imobilizada, isto é, avaliar o efeito da concentração de enzima e de substrato na actividade da enzima, de forma a compará-los com os da enzima livre. Um substrato de maior peso molecular poderia ser igualmente testado, de modo a verificar se consegue atingir a enzima imobilizada no interior das membranas.

Num trabalho futuro, o estudo da estabilidade ao armazenamento da tripsina imobilizada poderá ser realizado durante um período de tempo mais longo e em condições de armazenamento diferentes.

Bibliografia

- Acar, I., Durmu, A., e Ozgumu, S. (2007). Nonisothermal Crystallization Kinetics and Morphology of Poly (ethylene terephthalate) Modified with Poly(lactic acid). *Journal of Applied Polymer Science*, 106, 4180–4191.
- Agustian, J., Kamaruddin, A. H., e Bhatia, S. (2011). Enzymatic membrane reactors: the determining factors in two separate phase operations. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 86, 1032–1048.
- Ahmad, H., e Saleemuddin, M. (1985). A coomassie blue-binding assay for the microquantitation of immobilized proteins. *Analytical Biochemistry*, 148, 533–541.
- Alsaed, A. K., Ahmad, R., Aldoomy, H., e El-Qader, S. A. (2013). Characterization , Concentration and Utilization of Sweet and Acid Whey. *Pakistan Journal of Nutrition*, 12, 172–177.
- Amaral, I. P. G., Carneiro-da-Cunha, M. G., Carvalho, L. B., e Bezerra, R. S. (2006). Fish trypsin immobilized on ferromagnetic Dacron. *Process Biochemistry*, 41, 1213–1216.
- Arasaratnam, V., Galaev, I., e Mattiasson, B. (2000). Reversibly soluble biocatalyst: optimization of trypsin coupling to Eudragit S-100 and biocatalyst activity in soluble and precipitated forms. *Enzyme and Microbial Technology*, 27, 254–263.
- Bandyopadhyay, J., Ray, S. S., e Bousmina, M. (2007). Thermal and Thermo-mechanical Properties of Poly(ethylene terephthalate) Nanocomposites. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 13, 614–623.
- Bayramoğlu, G., Yılmaz, M., Şenel, A. Ü., e Arıca, M. Y. (2008). Preparation of nanofibrous polymer grafted magnetic poly(GMA-MMA)-g-MAA beads for immobilization of trypsin via adsorption. *Biochemical Engineering Journal*, 40, 262–274.
- Benosman, A. S., Mouli, M., Taibi, H., e Belbachir, M. (2013). Studies on Chemical Resistance of PET-Mortar Composites: Microstructure and Phase Composition Changes. *Scientific Research*, 5, 359–378.
- Blanco, R. M., e Guisán, J. M. (1989). Stabilization of enzymes by multipoint covalent attachment to agarose-aldehyde gels. Borohydride reduction of trypsin-agarose derivatives. *Enzyme and Microbial Technology*, 11, 360-366.
- Bode, W., e Schwager, P. (1975). Refined crystal-structure of bovine beta-trypsin at 1.8 Å resolution. II. Crystallographic refinement, calcium binding site, benzamidine binding site and active site at pH 7.0. *Journal of Molecular Biology*, 98, 693–717.
- Bonde, M., Pontoppidan, H., e Pepper, D. S. (1992). Direct Dye Binding - A Quantitative Assay for Solid-Phase Immobilized Protein. *Analytical Biochemistry*, 200, 195–198.

- Bradford, M. M. (1976). A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248–54.
- Brena, B., González-Pombo, P., e Batista-Viera, F. (2009). Immobilization of enzymes: A literature survey. *Methods in Biotechnology*, 1051, 15–31.
- Byrne, F., Ward, P. G., Hughes, D., Cullen, J., e Dowling, D. P. (2007). Comparative study of the processing conditions required for PLA and PET polymers. Em Proceedings of the IMF Conference. Waterford Institute of Technology.
- Cabral, J. M. S., Aires-Barros, M. R., e Gama, M. (2003). *Engenharia Enzimática*. Lisboa. Lidel - Edições Técnicas. Coleção Biotec.
- Cassie, A. B. D., e Baxter, S. (1944). Wettability of porous surfaces. *Transactions of the Faraday Society*, 40, 546–551.
- Danquah, M., e Agyei, D. (2012). Pharmaceutical applications of bioactive peptides. *OA Biotechnology*, 1, 1–7.
- Datta, S., Christena, L. R., e Rajaram, Y. R. S. (2013). Enzyme immobilization: an overview on techniques and support materials. *3 Biotech*, 3, 1–9.
- Djebara, M., Stoquert, J. P., Abdesselam, M., Muller, D., e Chami, A. C. (2012). FTIR analysis of polyethylene terephthalate irradiated by MeV He⁺. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B*, 274, 70–77.
- Erlanger, B., Kokowsky, N., e Cohen, W. (1961). The Preparation and Properties of Two New Chromogenic Substrates of Trypsin. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 95, 271–278.
- Fang, Y., Huang, X.-J., Chen, P.-C., & Xu, Z.-K. (2011). Polymer materials for enzyme immobilization and their application in bioreactors. *BMB Reports*, 44, 87–95.
- Fowell, S. L., e Chase, H. A. (1986). Variation of immunosorbent performance with the amount of immobilised antibody. *Journal of Biotechnology*, 4, 1–13.
- Frazão, N. (2001). Estudo de mercado do soro lácteo em Portugal. *Tecninvest*. Retirado a 12 de Julho, 2014, de http://www.tecninvest.com/_research/Mercado_Soro_Lacteo_Resumo2001.pdf
- Freije, J. R., Mulder, P. P., Werkman, W., Rieux, L., Niederlander, H., Verpoort, E., e Bischoff, R. (2005). Chemically Modified, Immobilized Trypsin Reactor with Improved Digestion Efficiency. *Journal of Proteome Research*, 4, 1805–1813.
- Gabbott, P. (2008). *Principles and applications of thermal analysis*. Reino Unido. Blackwell Publishing.
- Gao, Y., e Kyratzis, I. (2008). Covalent Immobilization of Proteins on Carbon Nanotubes Using the Cross-Linker 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide - a Critical Assessment. *Bioconjugate Chemistry*, 19, 1945-1950.

- Giorno, L., e Drioli, E. (2000). Biocatalytic membrane reactors: applications and perspectives. *Trends in Biotechnology*, 18, 339–349.
- Goodhew, P. J., Humphreys, J., e Beanland, R. (2001). *Electron Microscopy and Analysis*. Londres: Taylor & Francis.
- Górecka, E., e Jastrzebska, M. (2011). Immobilization techniques and biopolymer carriers. *Biotechnology and Food Science*, 75, 65–85.
- Hamerska-Dudra, A., Bryjak, J., e Trochimczuk, A. W. (2007). Immobilization of glucoamylase and trypsin on crosslinked thermosensitive carriers. *Enzyme and Microbial Technology*, 41, 197–204.
- Hanefeld, U., Gardossi, L., e Magner, E. (2009). Understanding enzyme immobilisation. *Chemical Society Reviews*, 38, 453–468.
- Jochems, P., Satyawali, Y., Diels, L., e Dejonghe, W. (2011). Enzyme immobilization on/in polymeric membranes: status, challenges and perspectives in biocatalytic membrane reactors (BMRs). *Green Chemistry*, 13, 1609–1623.
- Johnson, W., e Makame, Y. (2012). Activity of enzyme trypsin immobilized onto macroporous poly(epoxy-acrylamide) cryogel. *Tanzania Journal of Science.*, 38, 54–64.
- Kamei, S., Okubo, M., Matsudal, T., e Matsumoto, T. (1986). Adsorption of trypsin onto styrene-2-hydroxyethyl methacrylate copolymer microspheres and its enzymatic activity. *Colloid and Polymer Science*, 264, 743–747.
- Kennedy, J. F., e Cabral, J. M. S. (1983). Immobilized enzymes. Em W. H. Scouten, *Solid Phase Biochemistry: Analytical Synthetic Aspects*. Nova Iorque. John Wiley & Sons, Inc., 253–391.
- Khan, A., e Alzohairy, M. (2010). Recent Advances and Applications of Immobilized Enzyme Technologies: A Review. *Research Journal of Biological Sciences*, 5, 565–575.
- Kim, B. C., Lopez-Ferrer, D., Lee, S.-M., Ahn, H.-K., Nair, S., Kim, S. H., ... Kim, J. (2009). Highly stable trypsin-aggregate coatings on polymer nanofibers for repeated protein digestion. *Proteomics*, 9, 1893–1900.
- Kim, J., Grate, J. W., e Wang, P. (2006). Nanostructures for enzyme stabilization. *Chemical Engineering Science*, 61, 1017–1026.
- Kim, J., Grate, J. W., e Wang, P. (2008). Nanobiocatalysis and its potential applications. *Trends in Biotechnology*, 26, 639–646.
- Kulik, E. A., Kato, K., Ivanchenko, M. I., e Ikada, Y. (1993). Trypsin immobilization on to polymer surface through grafted layer and its reactio with inhibitors. *Biomaterials*, 14, 763–769.
- Lee, S.-M., Nair, S., Ahn, H.-K., Kim, B. S., Jun, S.-H., An, H. J., ... Kim, J. (2010). Property control of enzyme coatings on polymer nanofibers by varying the conjugation site concentration. *Enzyme and Microbial Technology*, 47, 216–221.

- Lewis, W. S., e Schuster, S. M. (1990). Quantitation of immobilized proteins. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 21, 129–144.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, L. A., E Rose, R. J. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry*, 193, 265–275.
- Lyagin, E., Drews, A., Bhattacharya, S., E Kraume, M. (2011). Continuous Membrane-Based Screening System for Biocatalysis. *Membranes*, 1, 70–79.
- Markwardt, F., Landmann, H., e Walsmann, P. (1968). Comparative Studies on the Inhibition of Trypsin, Plasmin, and Thrombin by Dervatives of Benzylamine and Benzamidine. *European Journal of Biochemistry*, 6, 502–506.
- Massolini, G., e Calleri, E. (2005). Immobilized trypsin systems coupled on-line to separation methods: recent developments and analytical applications. *Journal of Separation Science*, 28, 7–21.
- Migneault, I., Dartiguenave, C., Bertrand, M. J., e Waldron, K. C. (2004). Glutaraldehyde: behavior in aqueous solution, reaction with proteins, and application to enzyme crosslinking. *BioTechniques*, 37, 790–802.
- Migneault, I., Dartiguenave, C., Vinh, J., Bertrand, M. J., e Waldron, K. C. (2004). Comparison of two glutaraldehyde immobilization techniques for solid-phase tryptic peptide mapping of human hemoglobin by capillary zone electrophoresis and mass spectrometry. *Electrophoresis*, 25, 1367–78.
- Mosbach, K. (1976). Immobilized Enzymes. *Methods in Enzymology* (Vol. 44). Nova Iorque, Academic Press, Inc.
- Nakajima, N., e Ikada, Y. (1995). Mechanism of Amide Formation by Carbodiimide for Bioconjugation in Aqueous Media. *Bioconjugate Chemistry*, 6, 123–130.
- Navarro, M., Engel, E., Planell, J., Amaral, I., Barbosa, M., e Ginebra, M. P. (2008). Surface characterization and cell response of a PLA/CaP glass biodegradable composite material. *Journal of Biomedical Materials Research. Part A*, 85, 477–86.
- Nisha, S., Karthick S, A., e Gobi, N. (2012). A Review on Methods , Application and Properties of Immobilized Enzyme. *Chemical Science Review and Letters*, 1, 148–155.
- Nouaimi, M., Mo, K., e Bisswanger, H. (2001). Immobilization of trypsin on polyester fleece via different spacers. *Enzyme and Microbial Technology*, 29, 567–574.
- Oliveira, J. E., Mattoso, L. H. C., Orts, W. J., e Medeiros, E. S. (2013). Structural and Morphological Characterization of Micro and Nanofibers Produced by Electrospinning and Solution Blow Spinning: A Comparative Study. *Advances in Materials Science and Engineering*, 2013, 1–14.
- Paiva, A. L., e Malcata, F. X. (1997). Integration of reaction and separation with lipases: An overview. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 3, 99–109.

- Park, J.-S. (2010). Electrospinning and its applications. *Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology*, 1, 1–5.
- Rios, G. M., Belleville, M. P., Paolucci, D., e Sanchez, J. (2004). Progress in enzymatic membrane reactors - a review. *Journal of Membrane Science*, 242, 189–196.
- Rodrigues, D. M. P., Guiomar, A. J., Rocha, J. M. S., e Gil, M. H. (2013). *Activity report of the project NanoBioCats*. Universidade de Coimbra.
- Rodriguez, J., Gupta, N., Smith, R. D., e Pevzner, P. (2008). Does trypsin cut before proline? *Journal of Proteome Research*, 7, 300–305.
- Seabra, I., e Gil, M. H. (2007). Cotton gauze bandage: a support for protease immobilization for use in biomedical applications. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 43, 535–542.
- Sharma, S., Singh, R., e Rana, S. (2012). Bioactive Peptides: A Review. *International Journal Bioautomation*, 15, 223–250.
- Sheldon, R. A. (2007). Enzyme Immobilization: The Quest for Optimum Performance. *Advanced Synthesis & Catalysis*, 349, 1289–1307.
- Sipos, T., e Merkel, J. R. (1970). Effect of calcium ions on the activity, heat stability, and structure of trypsin. *Biochemistry*, 9, 2766–2775.
- Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermansson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., ... Klenk, D. C. (1985). Measurement of Protein Using Bicinchoninic Acid. *Analytical Biochemistry*, 150, 76–85.
- Stuart, B. (2004). *Infrared Spectroscopy: Fundamentals and applications*. Reino Unido. John Wiley & Sons, Ltd.
- Tukey, J. W. (1977). *Exploratory data analysis*. Addison-Wesley Pub. Co.
- Veleirinho, B., Rei, M. F., e Lopes da Silva, J. A. (2007). Solvent and Concentration Effects on the Properties of Electrospun Poly(ethylene terephthalate) Nanofiber Mats. *Journal of Polymer Science: Part B: Polymer Physics*, 46, 460–471.
- Vicente, C. (2007). *Valorisation of the Peptidic Fraction of Cheese Whey*. Universidade do Minho. Tese de Doutoramento.
- Vogler, E. A. (2001). On the origins of Water Wetting Terminology. Em M. Morra (Ed.), *Water in Biomaterials Surface Science*. John Wiley & Sons, Inc., 149–182.
- Wang, P. (2006). Nanoscale biocatalyst systems. *Current Opinion in Biotechnology*, 17, 574–579.
- Wang, Z.-G., Wan, L.-S., Liu, Z.-M., Huang, X.-J., & Xu, Z.-K. (2009). Enzyme immobilization on electrospun polymer nanofibers: An overview. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 56, 189–195.

- Wenzel, R. N. (1936). Resistance of solid surfaces to wetting by water. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 28, 988–994.
- Wu, Z., e Jiang, G. (2008). Purification and Characterization of Trypsin-like Enzymes from *Neomysis japonica* Using BApNA as Substrate. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, 14, 75–80.
- Zaia, D. A. M., Zaia, C. T. B. V., e Lichtig, J. (1998). Determination of total protein by spectrophotometry: advantages and disadvantages of proposed methods. *Química Nova*, 21, 787–793.
- Zhu, Z., e Kelley, M. J. (2005). IR spectroscopic investigation of the effect of deep UV irradiation on PET films. *Polymer*, 46, 8883–8891.

ANEXO

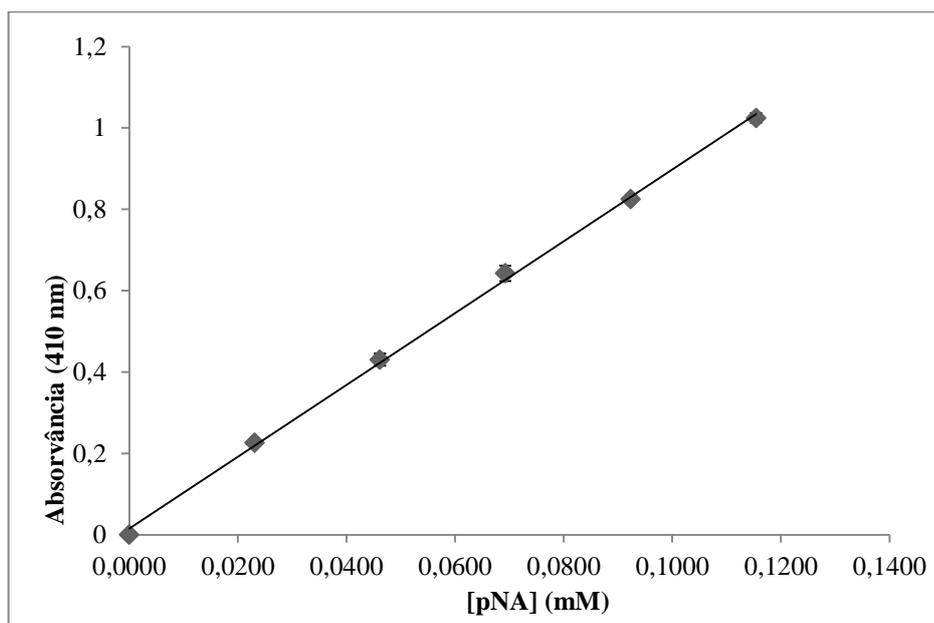


Figura A1. Curva de calibração utilizada para quantificar a pNA. Equação da linha de regressão: $y = 8,83x + 0,015$. $R^2 = 0,999$. Condições: solução *stock* de pNA em DMSO, a partir da qual se efectuaram diluições sucessivas em tampão TRIS-HCl 0,05 M pH 8,0, a 37 °C. $n = 2$; barras de erro representam o desvio padrão.

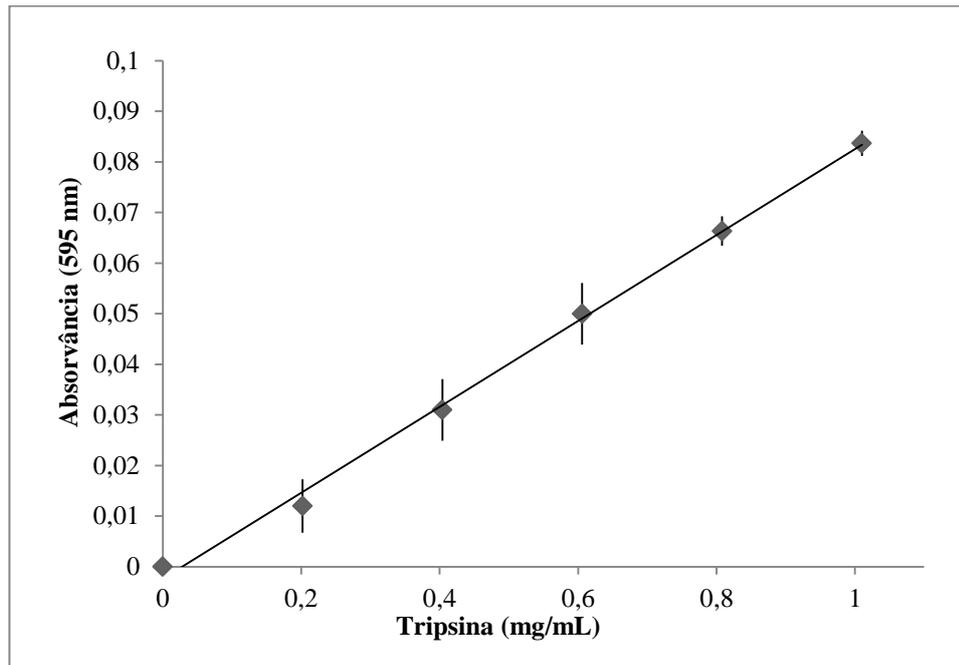


Figura B1. Exemplo de uma curva de calibração obtida pelo método de Bradford. Equação da linha de regressão: $y = 0,08 x + 0,002$. $R^2 = 0,997$. Condições: solução *stock* de tripsina em tampão MES 0,1 pH 5,5, a partir da qual se efectuaram diluições sucessivas no mesmo tampão. $n = 3$; barras de erro representam o desvio padrão.

