



## **Funcionamento da disciplina**

### **0. Introdução à Biotecnologia**

### **1. Produção de Biomassa e Biomoléculas**

#### **1.1. Crescimento microbiano**

#### **1.2. Tecnologia de DNA recombinante**

### **2. Noções gerais de fermentadores**

### **3. Processos de purificação de biomoléculas**

### **4. Estabilização de biomoléculas**

### **5. Sistemas para utilização de enzimas. Noções de biocatálise**

#### **5.1. Introdução à Biocatálise**

#### **5.2. Imobilização de biocatalisadores influência na cinética (11ª/12ª/13ª)**

#### **5.3. biocatálise em meios não convencionais**

#### **5.4. biorreactores**

#### **5.5. Aplicações industriais na catálise**

### **6. Aplicações**

## **5. Biocatálise**

**5.2.1 Métodos de  
imobilização**

**5.2.2. Caracterização  
de um biocatalisador**

**5.1. Introdução**

**5.3. Biocatálise em meios-  
não convencionais**

**5.2 imobilização de  
biocatalisadores e influência na  
cinética**

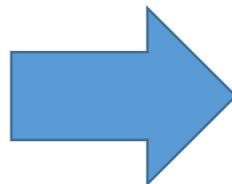
**5.4 Bioreactores**

**5.2.3 Efeitos sobre a  
cinética enzimática**

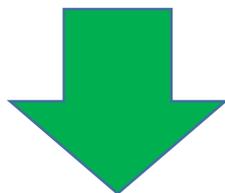
**5.5. Aplicações farmacológicas  
de Biocatalisadores**



**5.2.1. Métodos de  
imobilização  
(Continuação)**

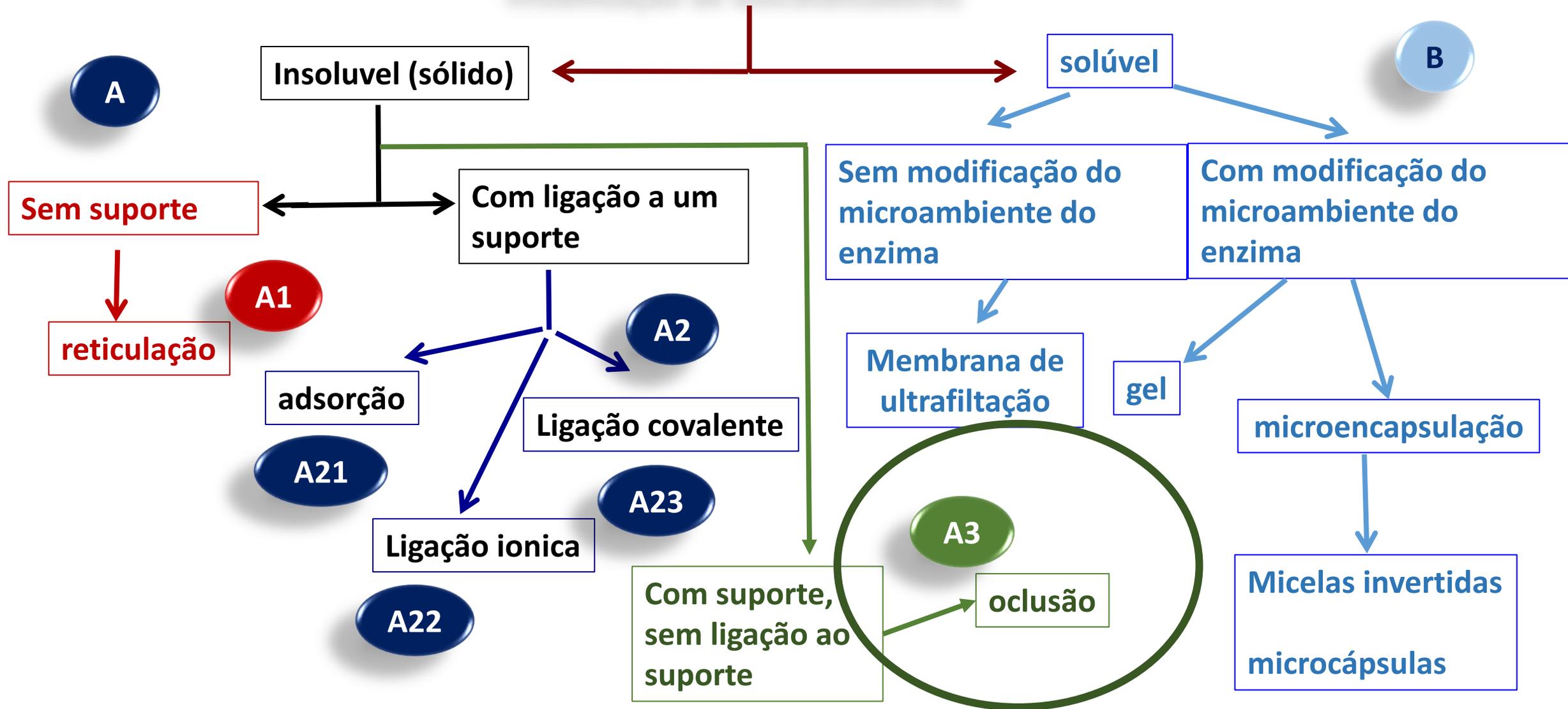


**Solúvel**  
sem modificação do microambiente  
Com modificação do microambiente



**Insolúvel**  
imobilização com suporte  
Sem modificação do microambiente  
(*OCLUSÃO*)

### Imobilização de biocatalisadores



# Matrizes para imobilização sem ligação a suporte

A3

Oclusão

Métodos para sintetizar a matriz



Polimerização  
Troca iónica  
precipitação

## Matrizes

### Sintéticos:

polistireno  
nylon  
Poliacrilatos  
Poliacrilamida  
Poliéster  
Poliuretano  
polistireno

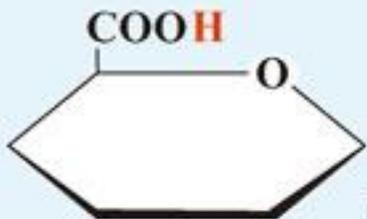
### Naturais:

polissacaridos  
alginatos  
Carrageneos  
Agar e agarose  
Quitina e  
quitosano  
Pectinas  
celulose

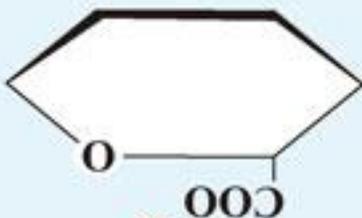
Proteínas  
colagenio  
Gelatina  
albumina

Alginato

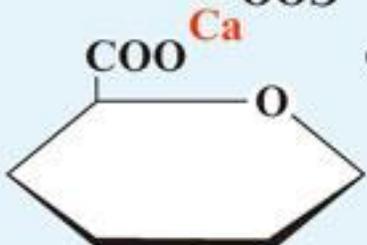
Insoluble to water



Alginic Acid



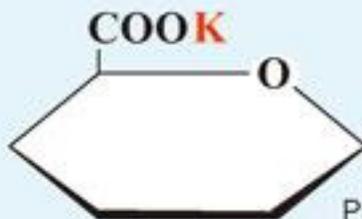
Calcium Alginate



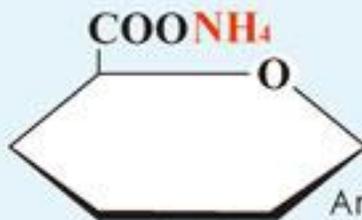
Soluble to water



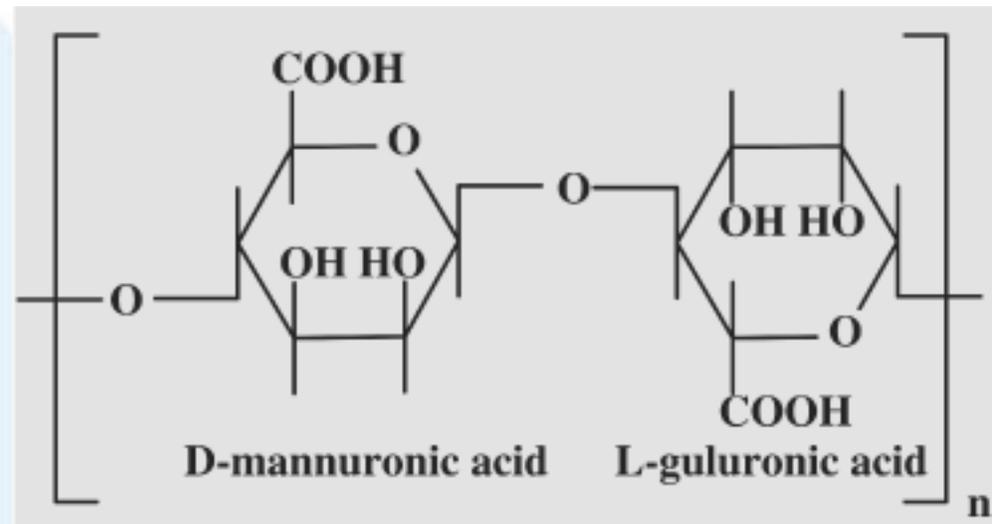
Sodium Alginate



Potassium Alginate



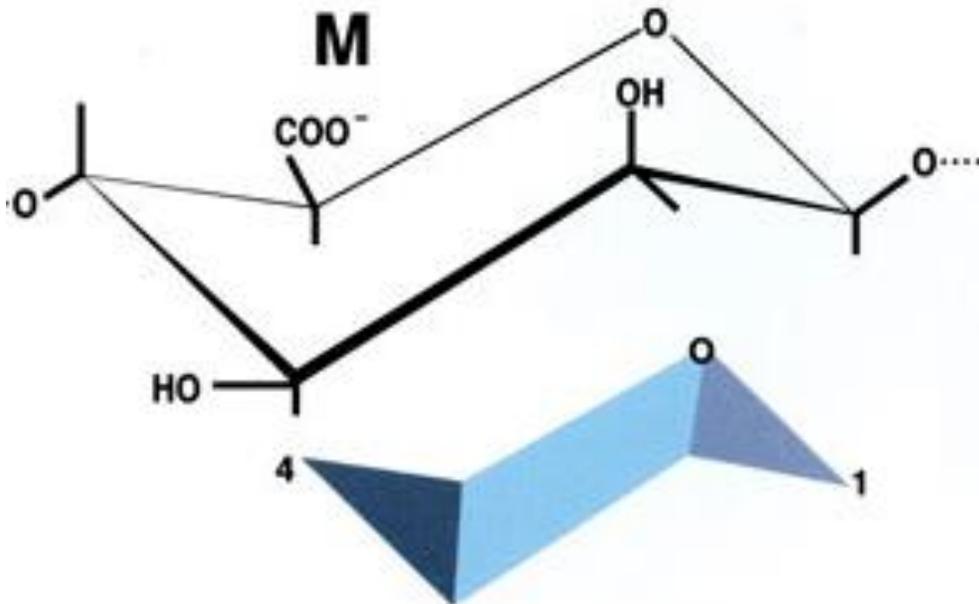
Ammonium Alginate



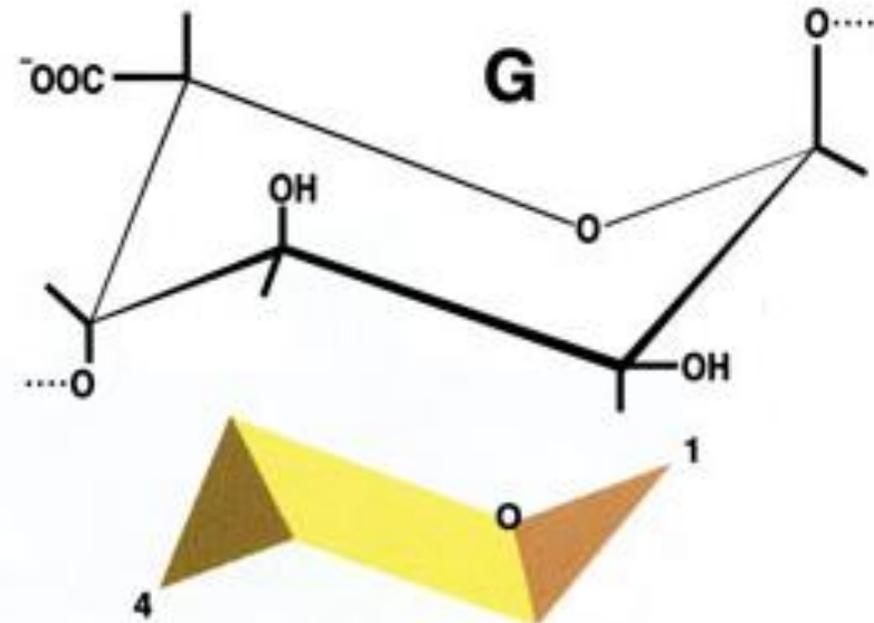
A3

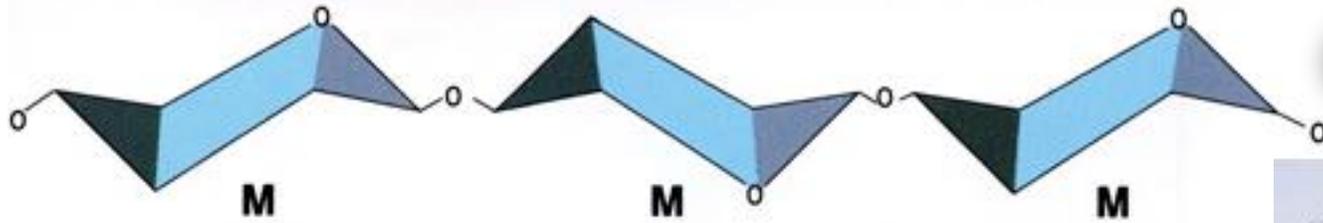
Ácido algínico é formado por 2 tipos de ácidos urónicos, o ácido manurónico (M) e o ácido gulurónico (G)

$\beta$ - (1-4) -D-Mannuronic Acid

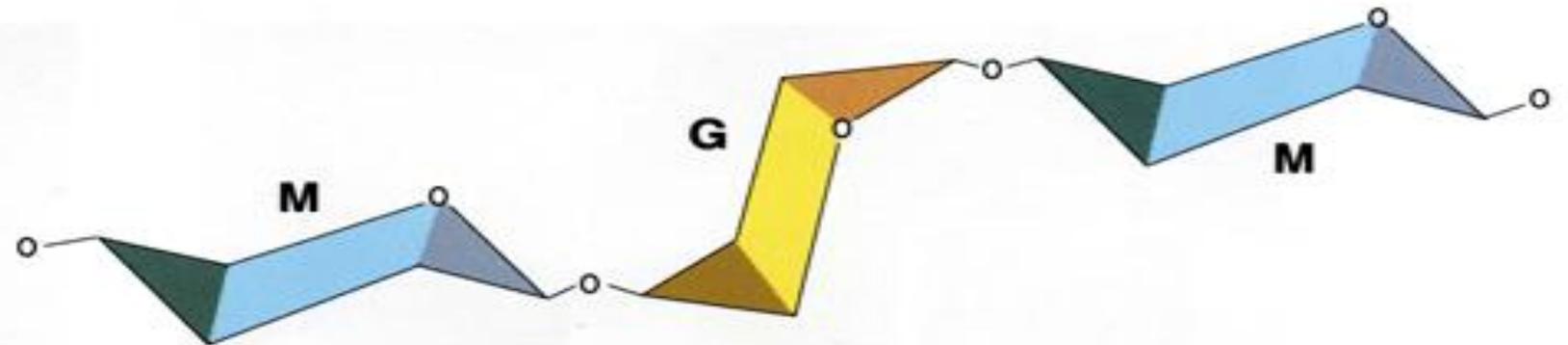
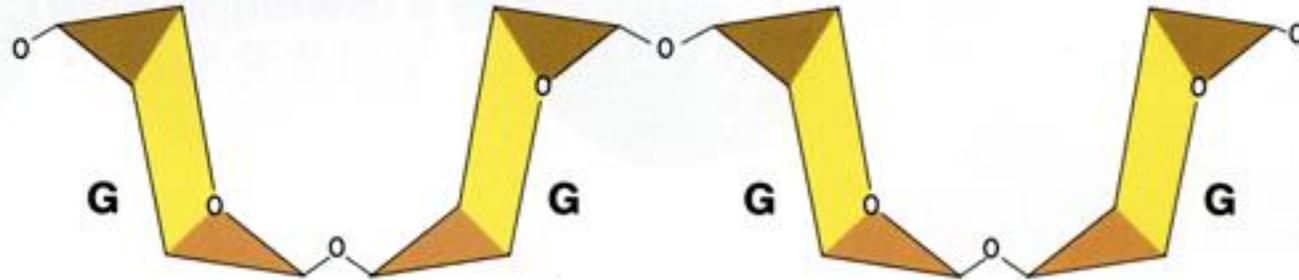


$\alpha$ - (1-4) -L-Guluronic Acid





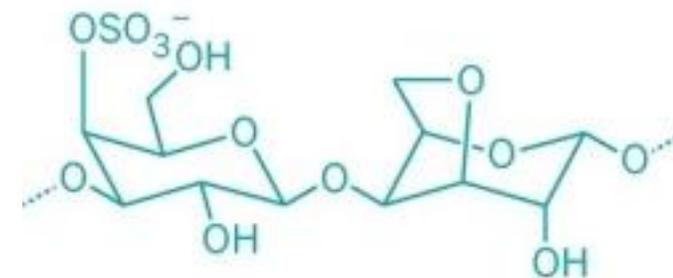
A3



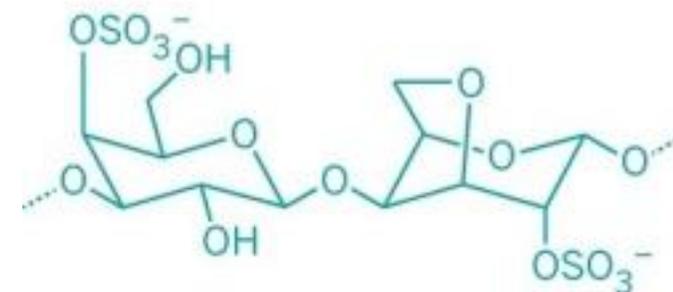


A3

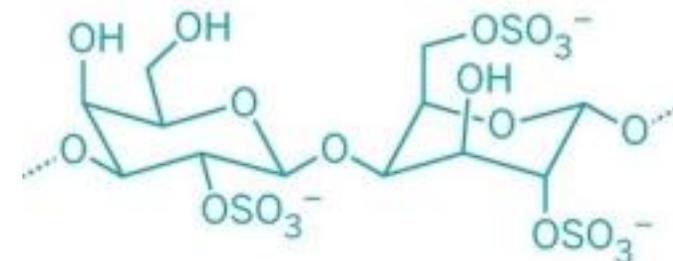
carrageneo



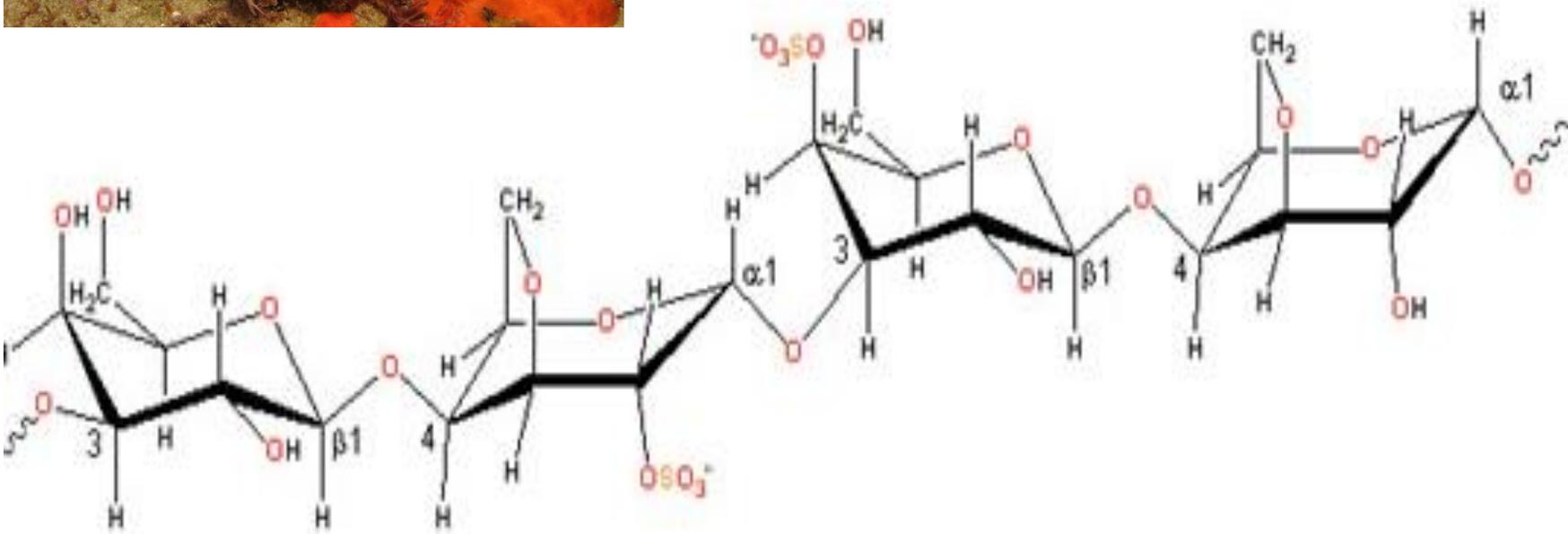
$\kappa$ -Carrageenan



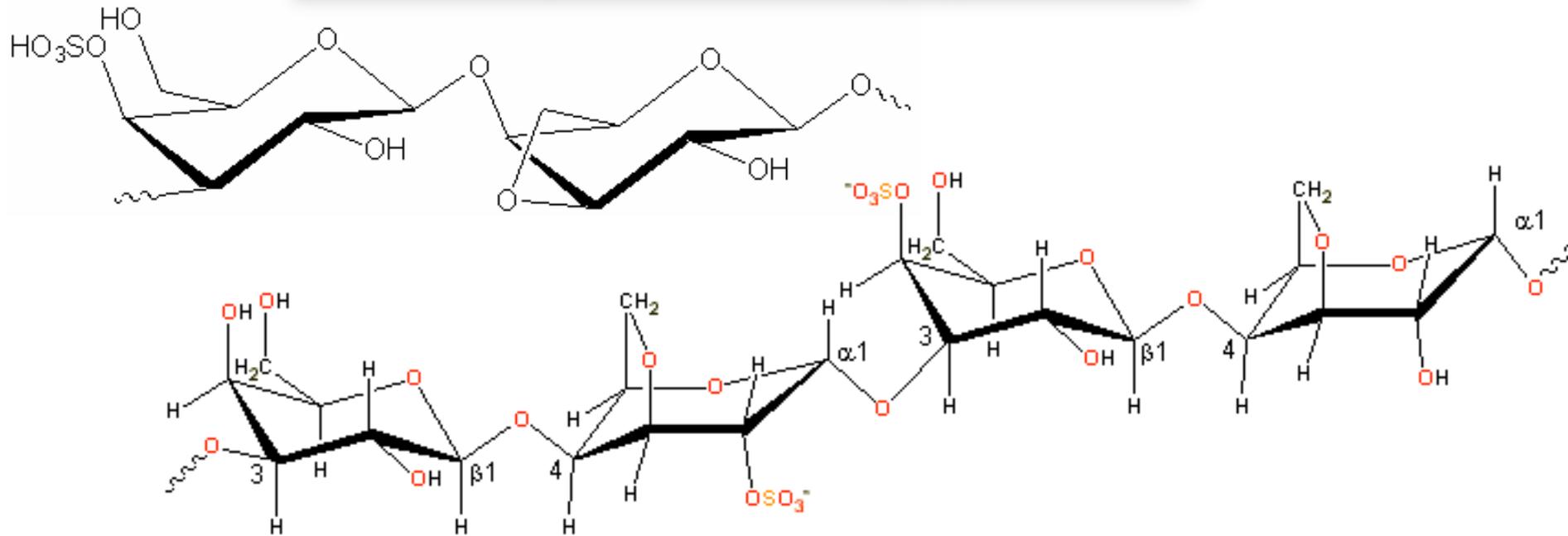
$\iota$ -Carrageenan



$\lambda$ -Carrageenan



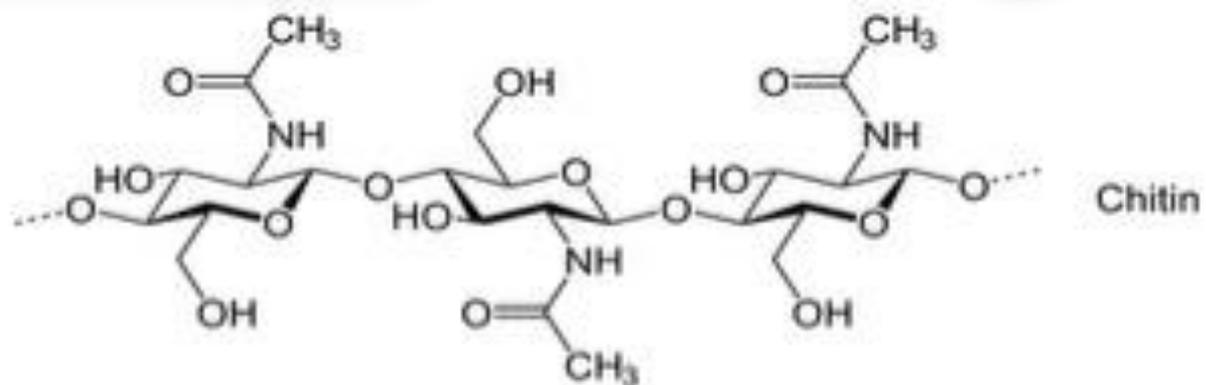
## Polimerização com K-carragénio



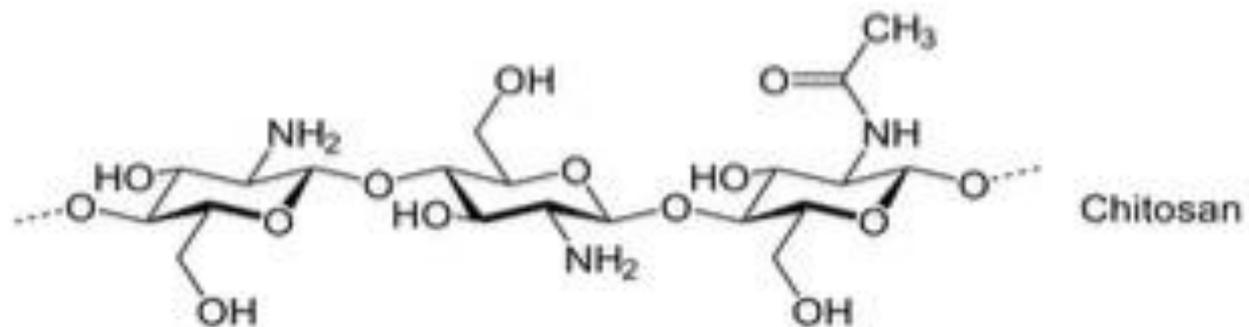
**K-carragenio forma geis com sais de potássio e cálcio. Aquece-se uma solução de k-carragenio a 60°C para que dissolva, adiciona-se o sal, o gel forma-se à medida que a solução arrefece**

## Quitina e Quitosano

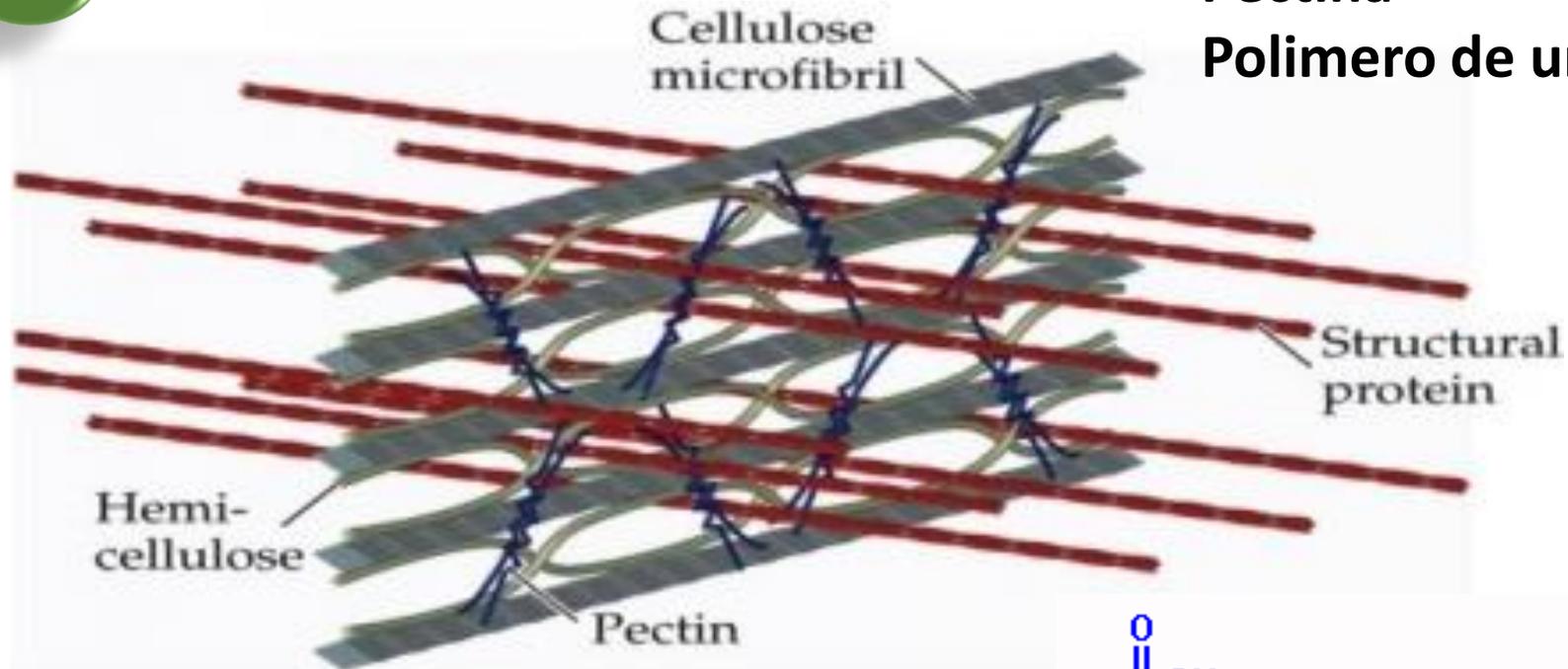
A3



Chitin-Deacetylase

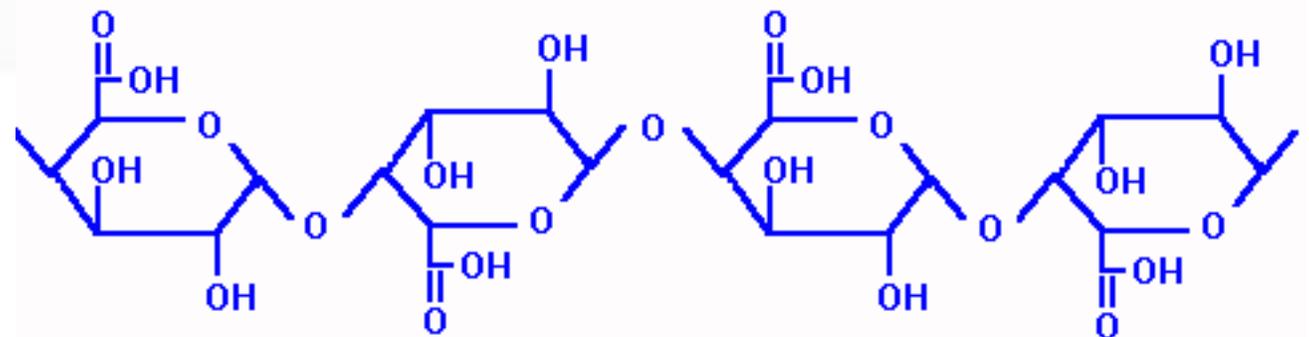


A3



## Pectina

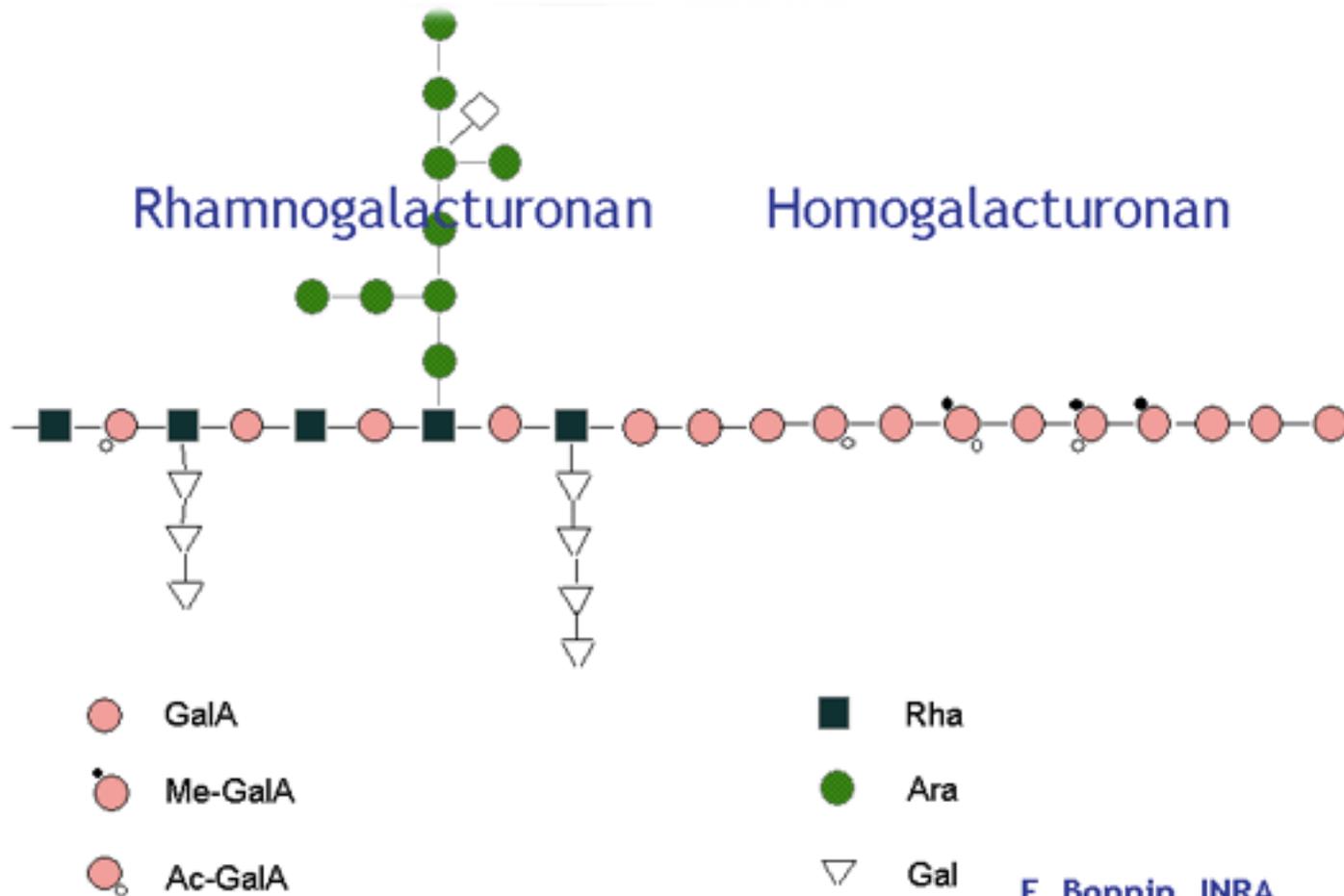
Polimero de unidades glicosídicas acetiladas



Pectin (polygalacturonic acid)

## Pectin structure

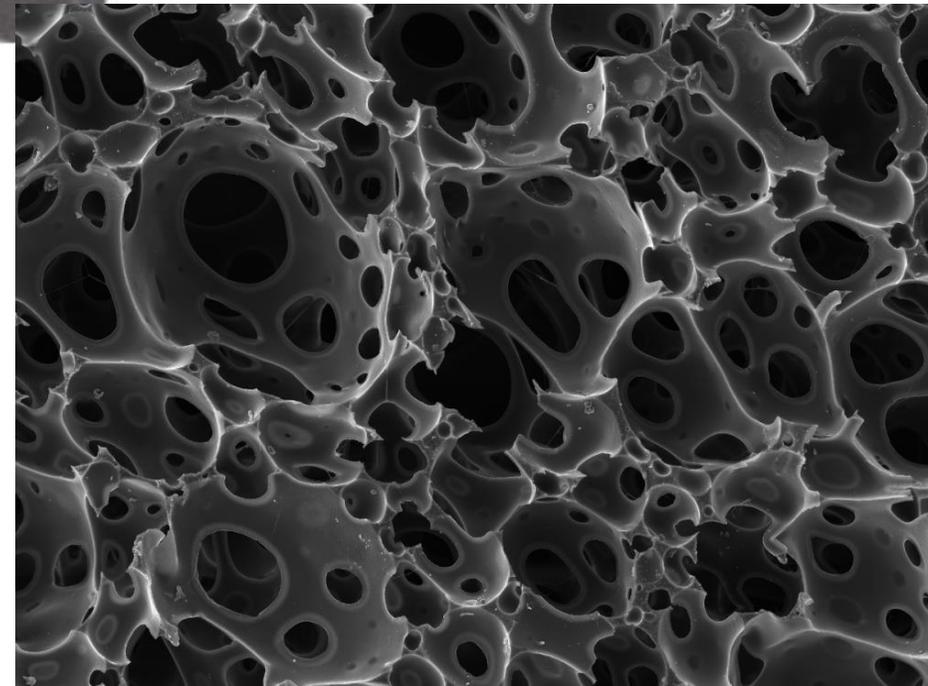
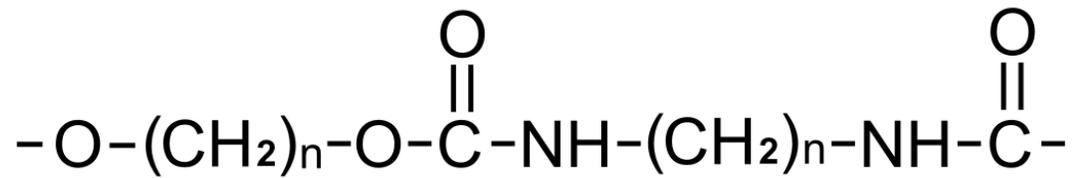
Pectin is composed of two regions : a rhamnogalacturonan region (alternate Rhamnose -Rha- and Galacturonic Acid -GalA- linear chain substituted by Arabinose -Ara- chain) and an homogalacturonan region. Soybean does not contain homogalacturonan regions. Galacturonic acid units might also be substituted by Methyl (Me) or Acetyl (Ac) groups.



<https://www.adisseo.biz/Productguides/RovabioGuide/versatility.aspx>

A3

poliuretano

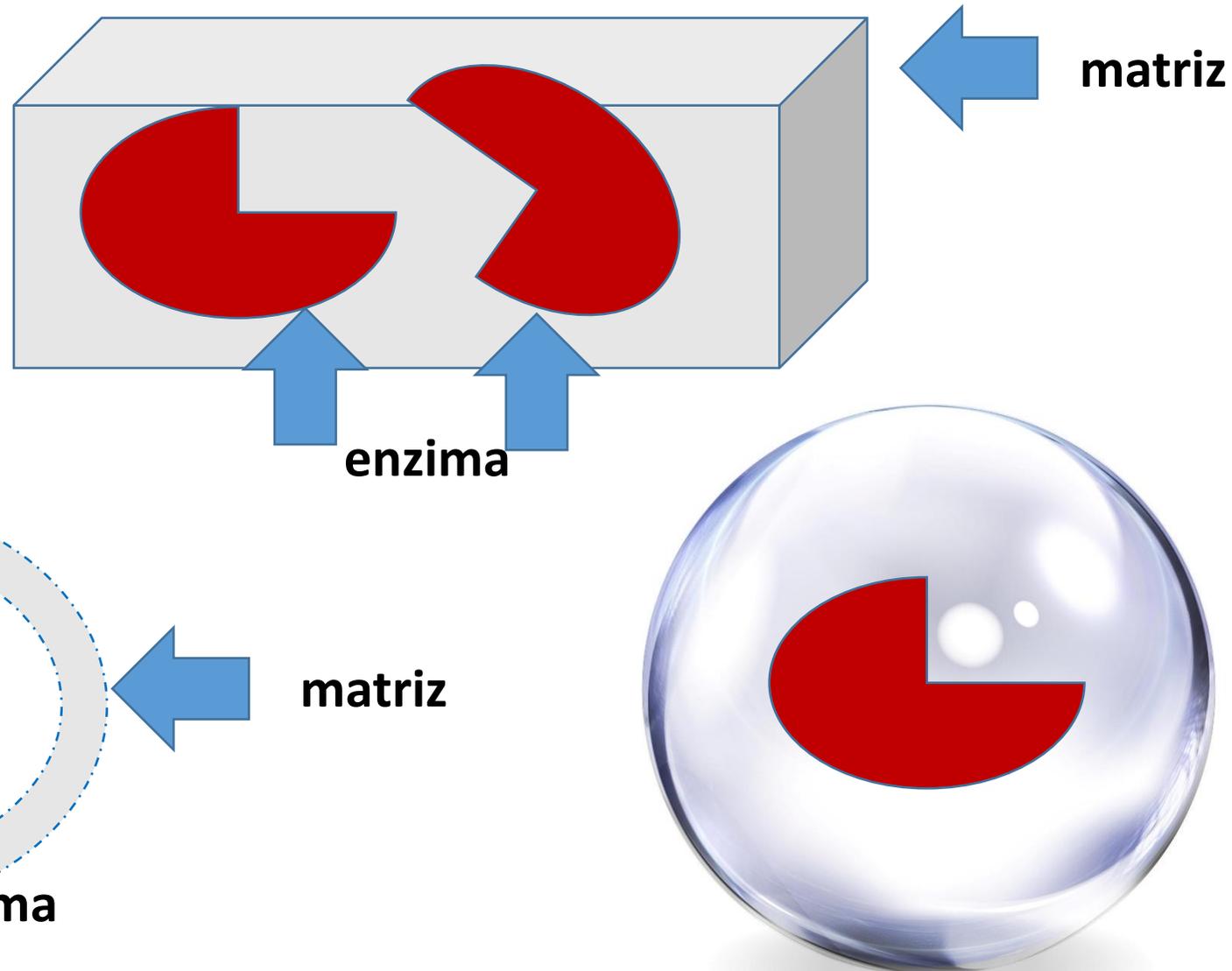


Oclusão

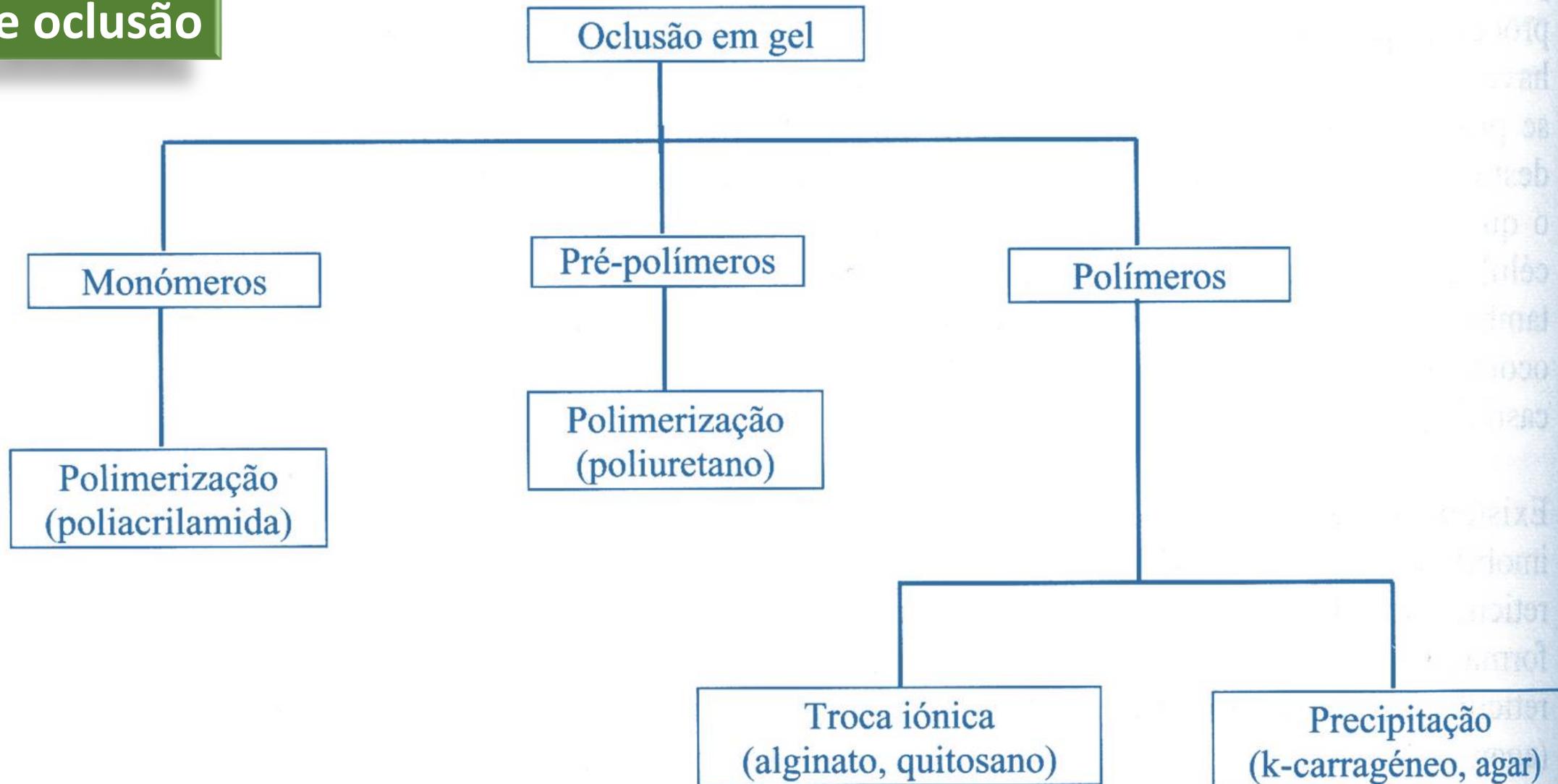
A3

Métodos para sintetizar a matriz

Polimerização  
Troca iónica  
precipitação

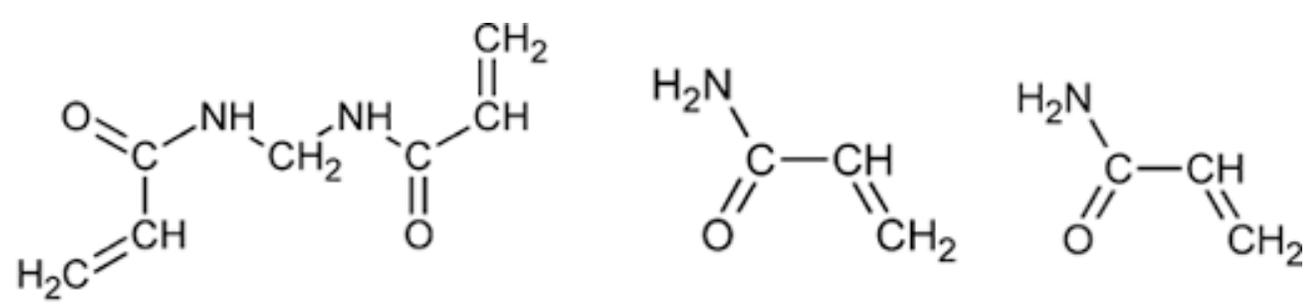


## Métodos de oclusão



A3

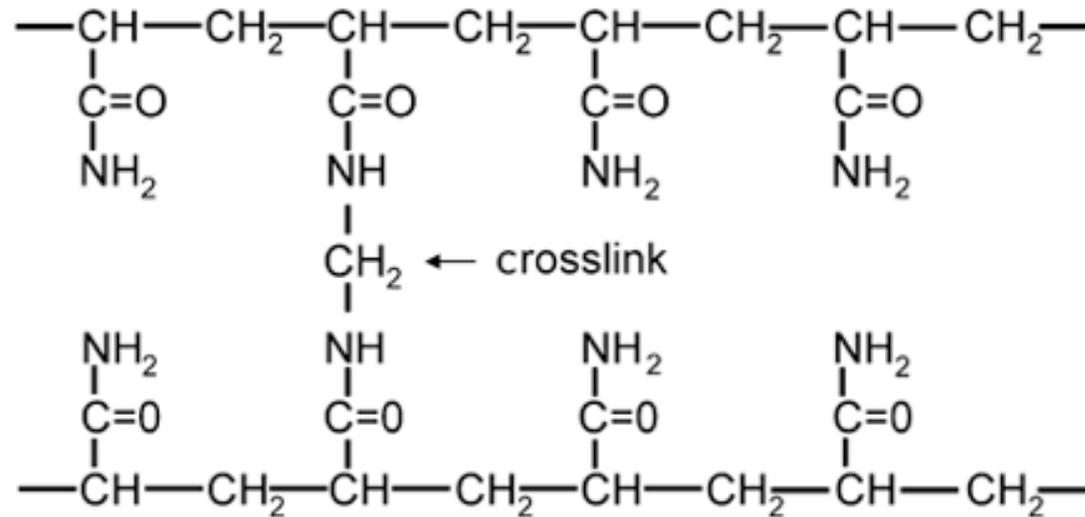
Polimerização  
com  
poliacrilamida



N,N'-methylenebisacrylamide  
crosslinking monomer

acrylamide monomer

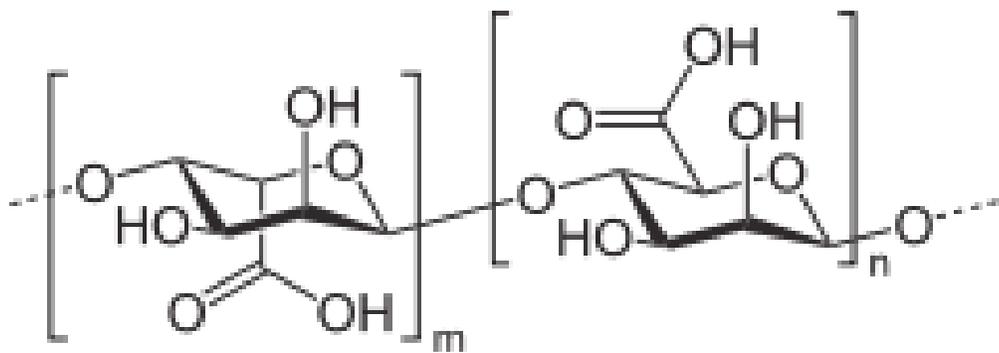
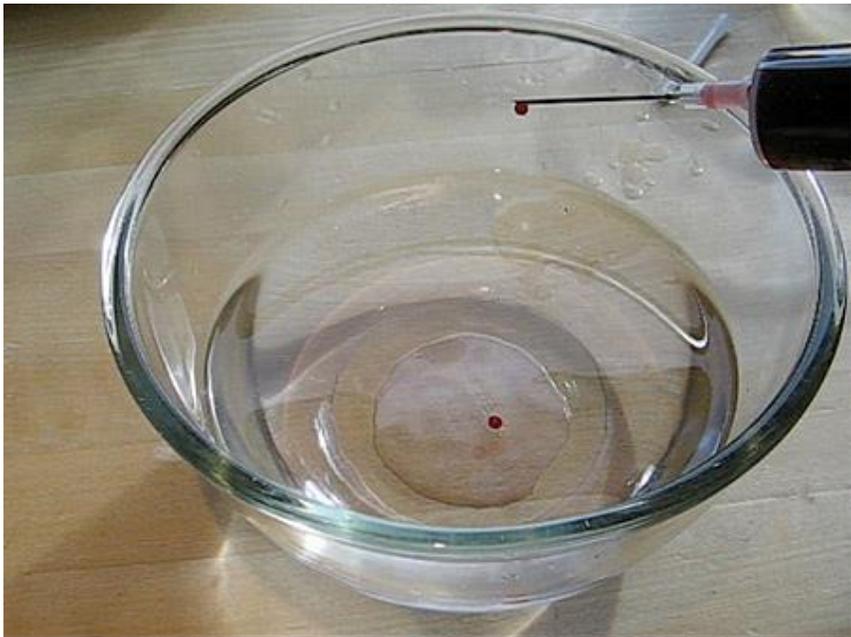
ammonium persulfate  
TEMED



polyacrylamide

A3

# Troca ionica com alginato de Na

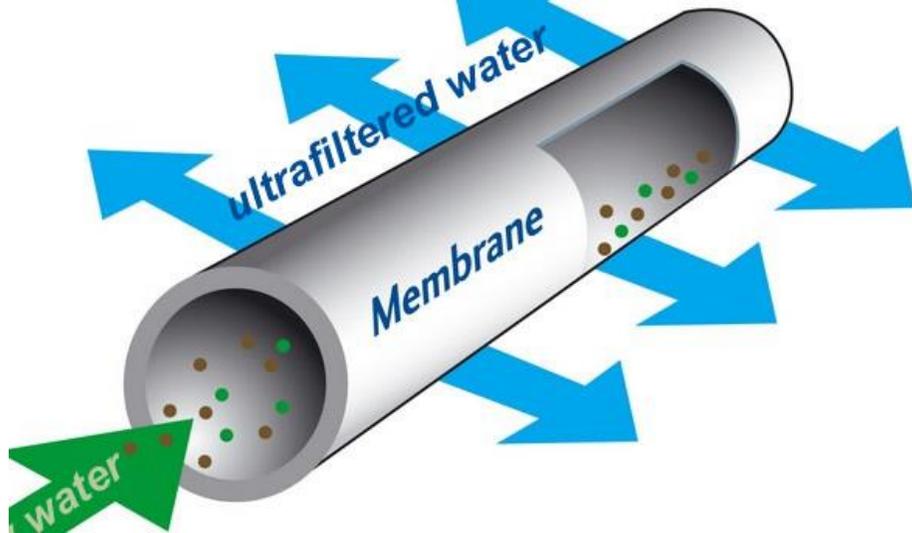


**B**

Enzima solúvel

Sem modificação do microambiente do enzima

Membrana de ultrafiltração



**B1**

Cem modificação do microambiente do enzima

**B2**

Microencapsulação

Micelas invertidas

Microcápsulas

**B21**

**B22**

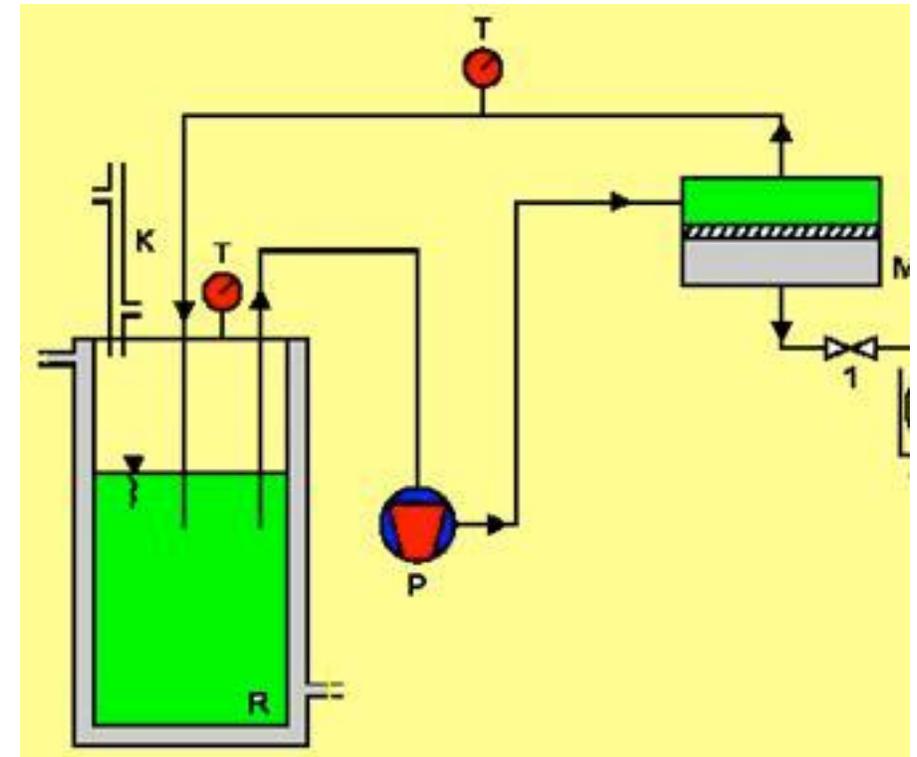
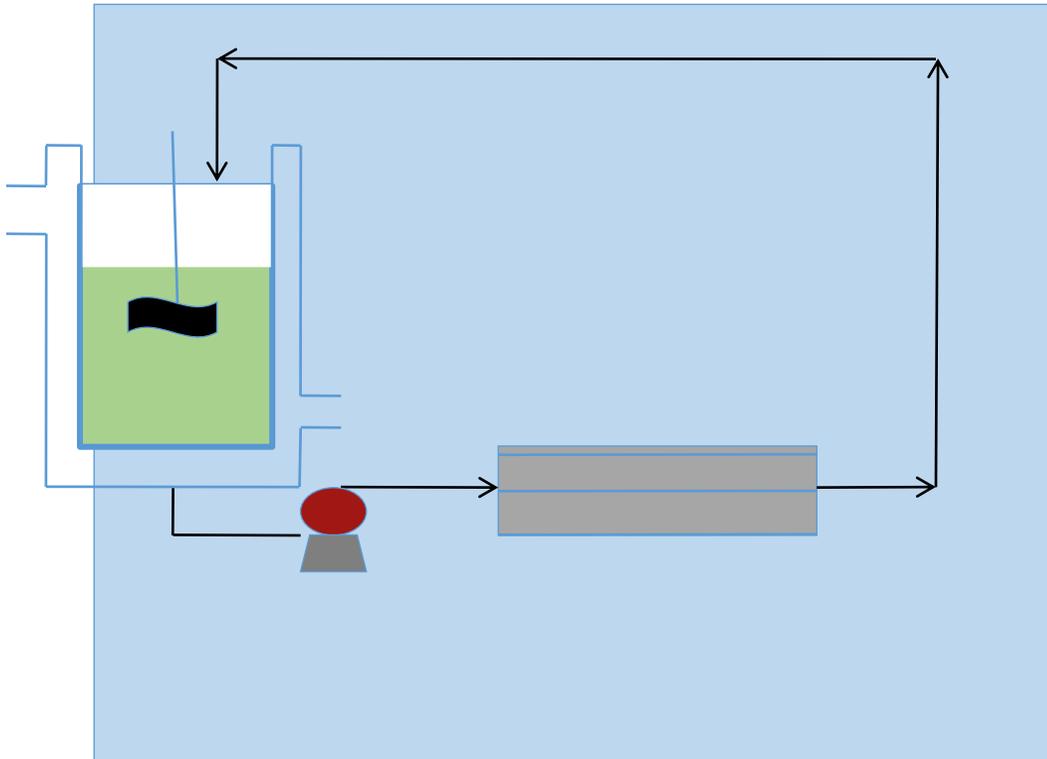


**B1**

**Solúvel: sem modificação do microambiente**

**Membrana de ultrafiltração**

**Imobilização em sistemas de fibras ocas Ou membranas**





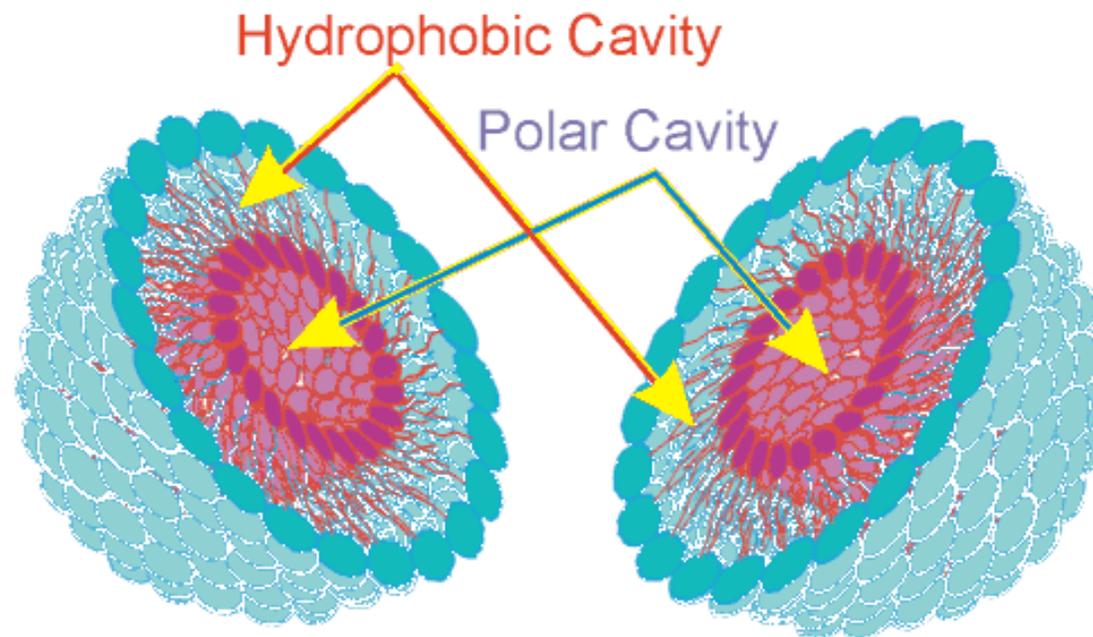
## Métodos de imobilização com enzima solúvel e modificação do microambiente

B22

Microcápsulas

lipossomas

Liposomes can encapsulate and transport water-soluble ingredients in their polar cavity and oil-soluble ingredients in their hydrophobic cavity.



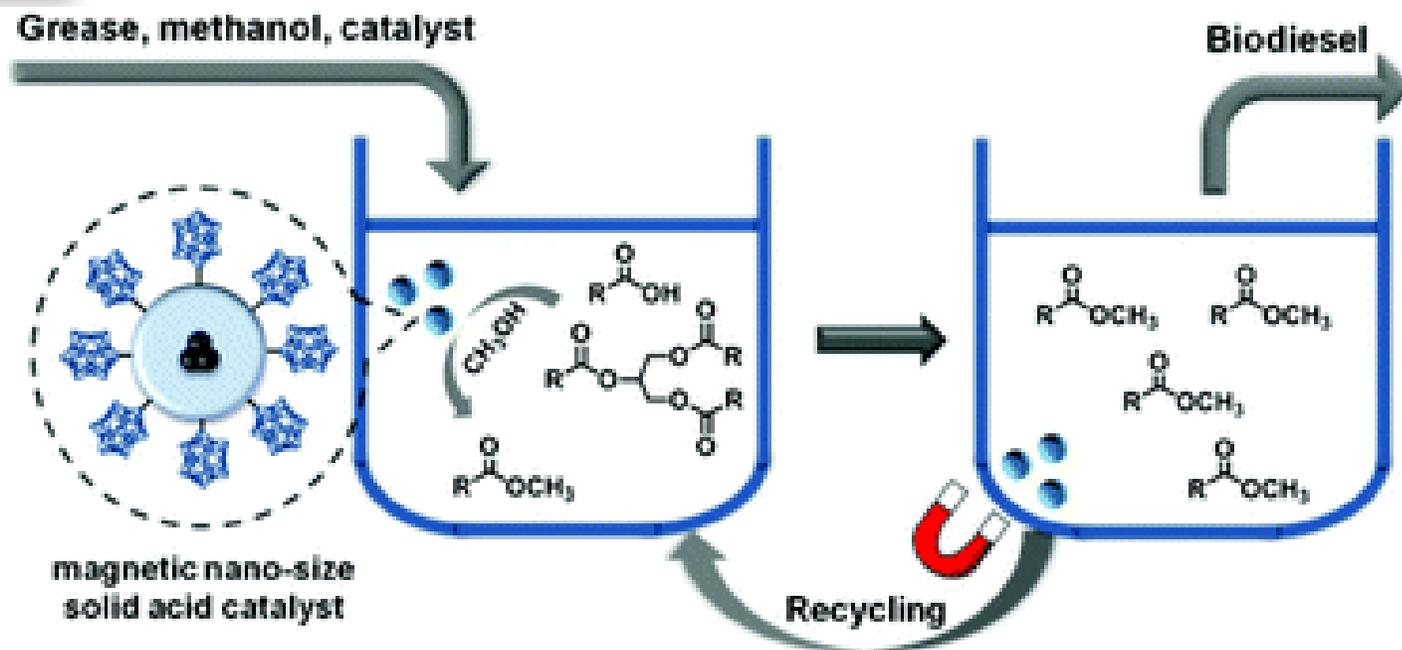


<b>características</b>	<b>Lig cruzadas</b>	<b>adsorção</b>	<b>Troca ionica</b>	<b>Lig covalente</b>	<b>oclusão</b>	<b>Membranas</b>	<b>Microencapsulação</b>
<b>preparação</b>	<b>+/-</b>	<b>simples</b>	<b>simples</b>	<b>difícil</b>	<b>simples</b>	<b>simples</b>	<b>média</b>
<b>Força de ligação</b>	<b>forte</b>	<b>física</b>	<b>media</b>	<b>forte</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>
<b>Actividade do enzima</b>	<b>baixa</b>	<b>Media/elevada</b>	<b>elevada</b>	<b>elevada</b>	<b>media</b>	<b>elevada</b>	<b>media</b>
<b>Regeneração do suporte</b>	<b>impossível</b>	<b>possível</b>	<b>possível</b>	<b>difícil</b>	<b>difícil</b>	<b>possível</b>	<b>difícil</b>
<b>Custo do processo</b>	<b>medio</b>	<b>baixo</b>	<b>baixo</b>	<b>elevado</b>	<b>baixo</b>	<b>elevado</b>	<b>medio</b>
<b>Estabilidade</b>	<b>elevada</b>	<b>baixa</b>	<b>media</b>	<b>elevada</b>	<b>media</b>	<b>elevada</b>	<b>media</b>
<b>Aplicabilidade geral</b>	<b>não</b>	<b>sim</b>	<b>sim</b>	<b>não</b>	<b>não</b>	<b>sim</b>	<b>sim</b>
<b>Protecção do enzima contra contam. Microbi.</b>	<b>não</b>	<b>nao</b>	<b>não</b>	<b>Não/sim</b>	<b>sim</b>	<b>não</b>	<b>sim</b>

## Novas abordagens nos processos de imobilização de enzimas e outras proteínas

### Imobilização em nanopartículas

Partículas magnéticas



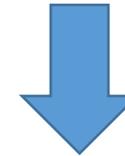


## Nanoestruturas

**Enzimas imobilizados em nanoestruturas**

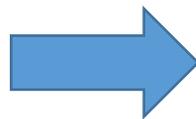
**Esferas  
Fibras  
Tubos**

**vantagens**



**Facilitação de difusão de substratos e produtos  
Área superficial elevada, permitindo gde carregamento de enzima**

**Nanopartículas magnéticas**



**vantagem: facilidade de separação e recuperação do biocatalisador**

**Por vezes aumento da actividade relativamente ao não imobilizado**



## Exemplos de enzimas imobilizados em nanopartículas

Enzima	nanopartícula	Reacção
Colesterol oxidase	Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	Análise de colesterol total no soro
laccase	Part magnéticas com quitosano	Biorremediação de poluentes
queratinase	Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	Síntese de queratina
A-amilase	Part magnéticas com celulose	Hidrólise do amido
Lipase	Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	Hidrólise de pNPP

## Preparação de nanopartículas de Fe

Co-precipitação de  $\text{Fe}^{2+}$  e  $\text{Fe}^{3+}$  numa solução de  $\text{NH}_4\text{OH}$

Centrifuga-se separando a água e depois «lava-se» com etanol centrifuga-se novamente a 2800 rpm

Seca-se sob vácuo a  $70^\circ\text{C}$ . As partículas qdo secas são atraídas por uma barra magnética

$\text{FeCl}_2$  e  $\text{FeCl}_3$  dissolvidos em água ultra pura são misturados de modo a ficar 0,25 M.  $T=25^\circ\text{C}$



Adiciona-se  $\text{NH}_4\text{OH}$  30%, controlando o pH entre 10-10,4



Aquece-se a  $80^\circ\text{C}$  durante 35 min, agitando



# Ligação do colesterol oxidase às partículas magnéticas de Ferro

As estruturas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  têm grupos OH à superfície que se vão ligar aos grupos transformados em amida na proteína

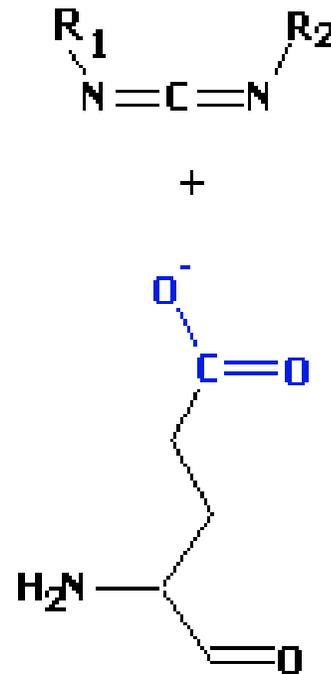
Nanopartículas em 1ml de tampão fosfato +solução de cardodimida (0,02g/mL em tampão fosfato)

Adiciona-se 2 ml de sol de colesterol oxidase (0,25 mg/ml), sonicado a 4°C, 30 min

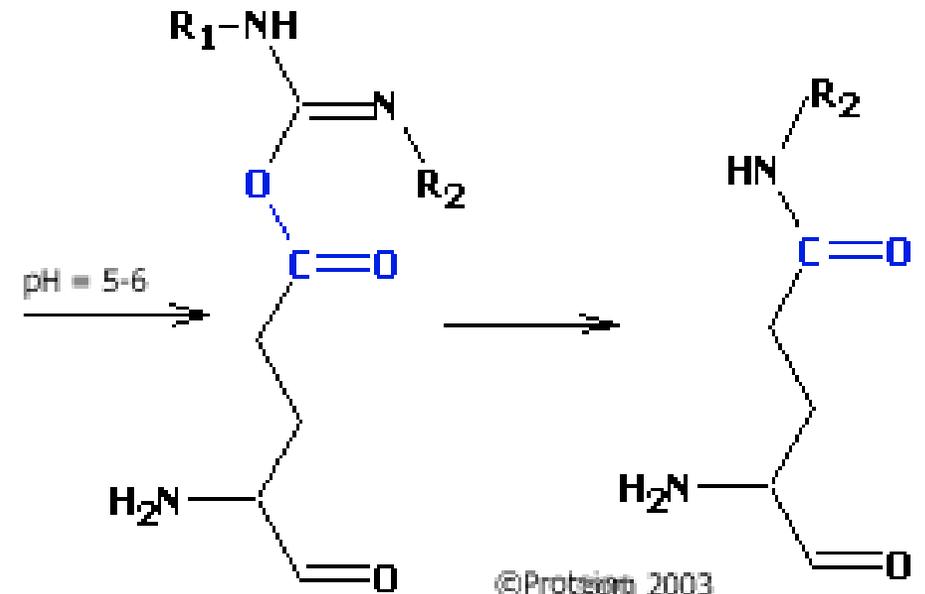
Centrifuga-se 3000 rpm

Lava-se as particuls de Fe com enzima com tampão

*Carbodiimide*



*Protein adduct*



## Imobilização em nanopartículas não magnéticas

$\beta$ -galactosidase

$\text{Al}_2\text{O}_3$  revestido com ConcanavalinaA

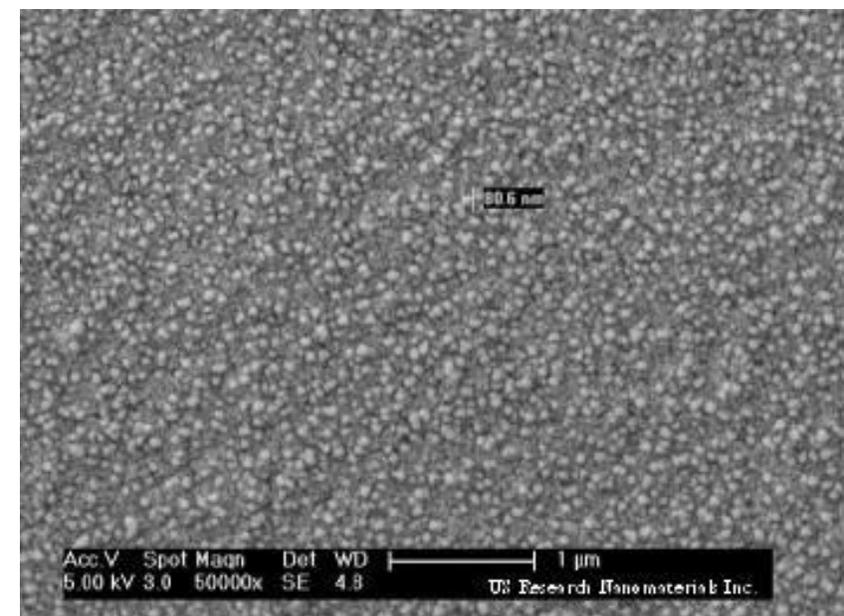
Hidrolise da  $\beta$ -galactose

Nanopartículas de  $\text{Al}_2\text{O}_3$  foram adquiridas à Sigma

Concanavalina A é imobilizada por adsorção nas nanopartículas, colocar em contacto com sol tampão a pH,  $T=30^\circ\text{C}$ , esperar e centrifugar

Enzima,  $\beta$ -galactosidase feita tb por adsorção em sol tampão a pH 7, durante a noite e no final centrifugar

<http://www.us-nano.com/inc/sdetail/208>



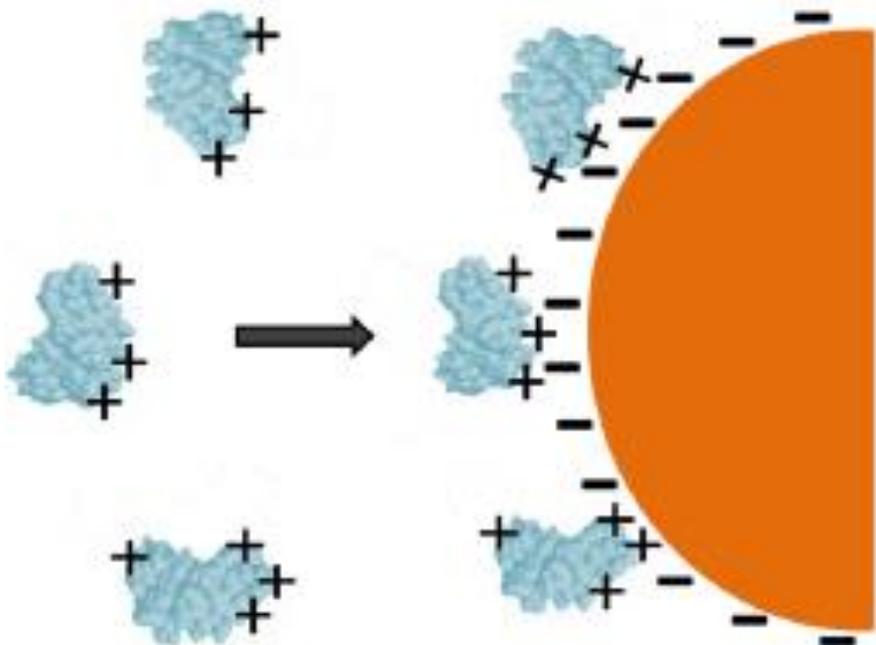


**Nanopartículas de ouro interacção entre grupos amino e cisteína das proteínas  
Imobilização pode ser directa ou através da funcionalização das partículas de Au**

- Zeolitos com partículas de ouro à sup
- Poliuretano com nanopartículas de Au superfície é outro exemplo
- Celulase em nanopartículas de poli-metil-metacrilato
- $\alpha$ -quimotripsina imobilizada em sílica porosa

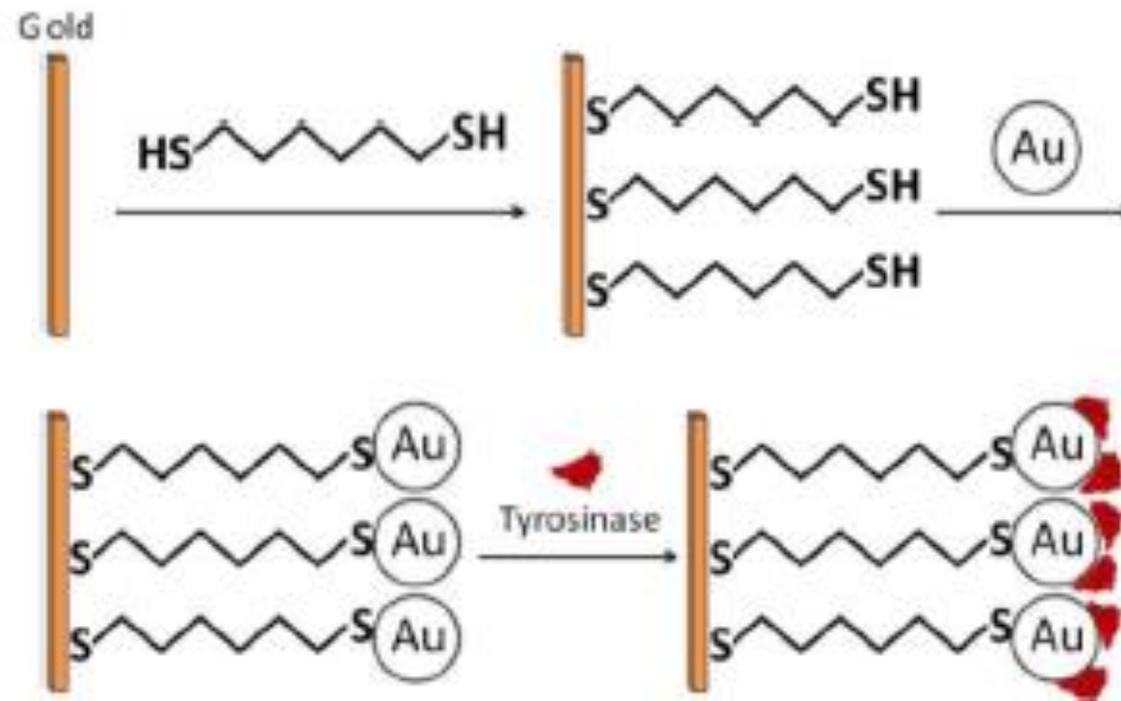
## Adsorção física

Funcionalização de partículas de Au com citrato, dando carga negativa à superfície das partículas. Proteína adsorve



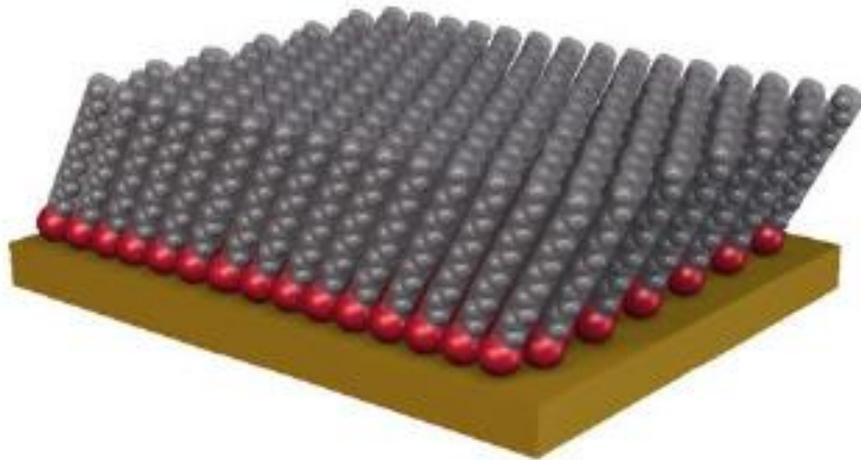
## Ligação química

Ligação covalente entre os grupos SH de resíduos de Cys e Au

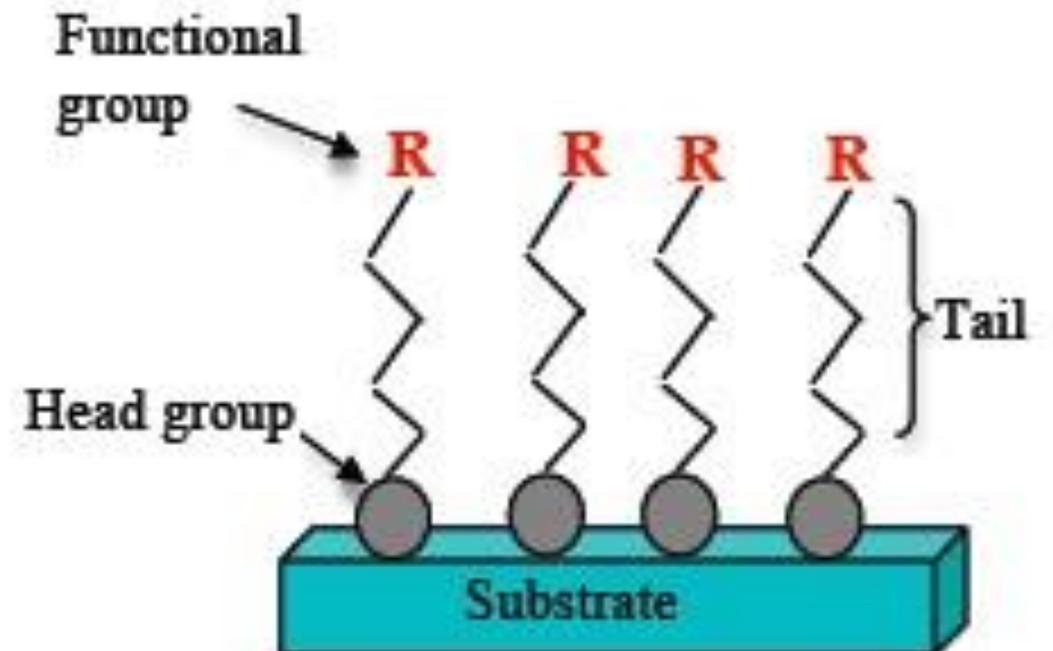


## SAMs self-assembled monolayers

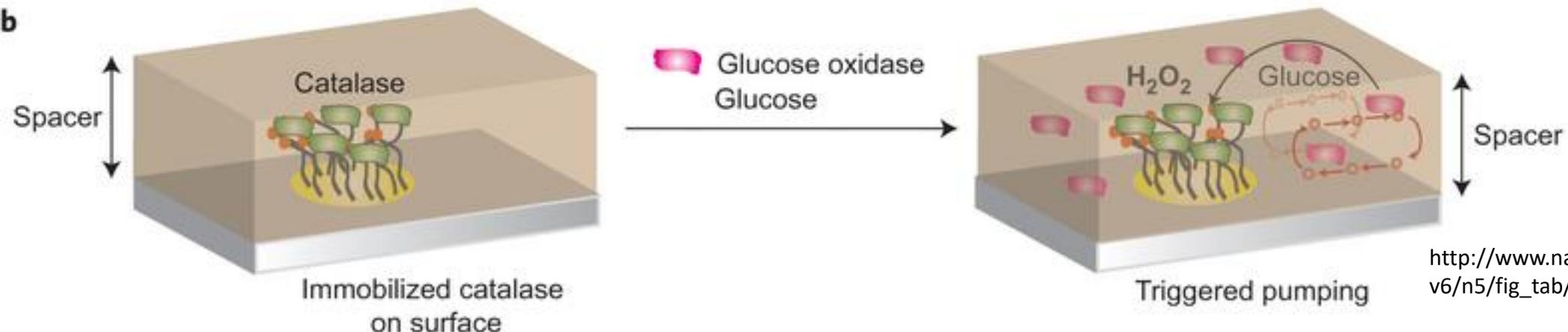
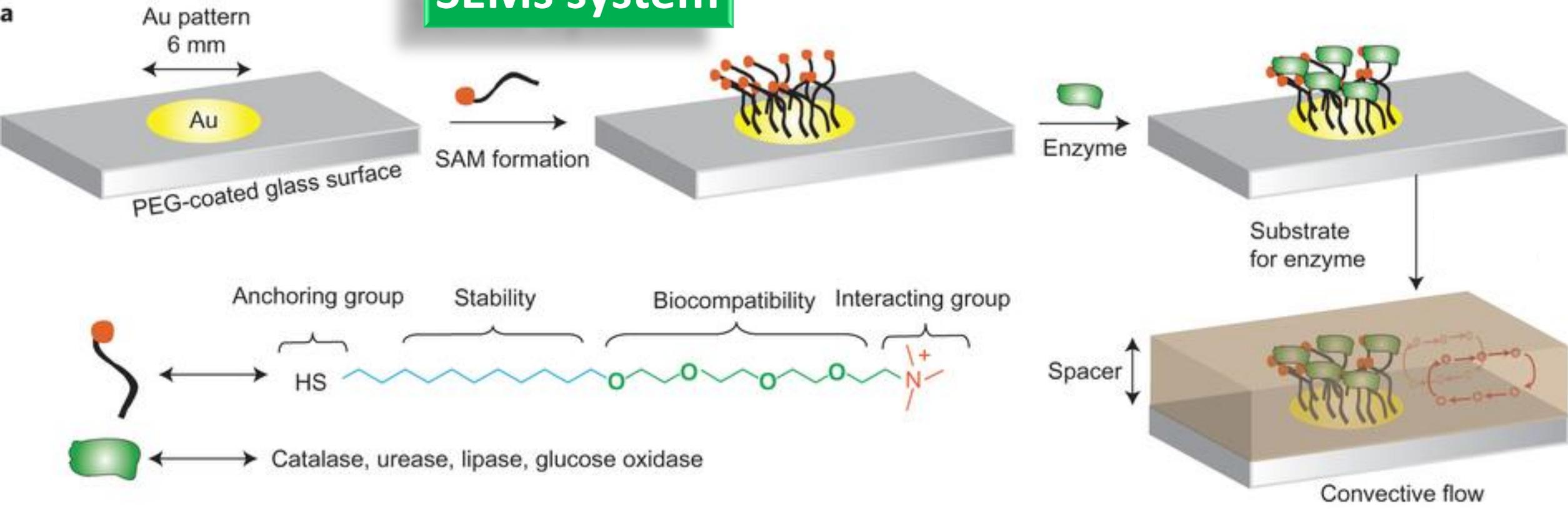
Moléculas pequenas que se auto-organizam em superfícies



Auto-organização de alceno-tiois



# SEMs system



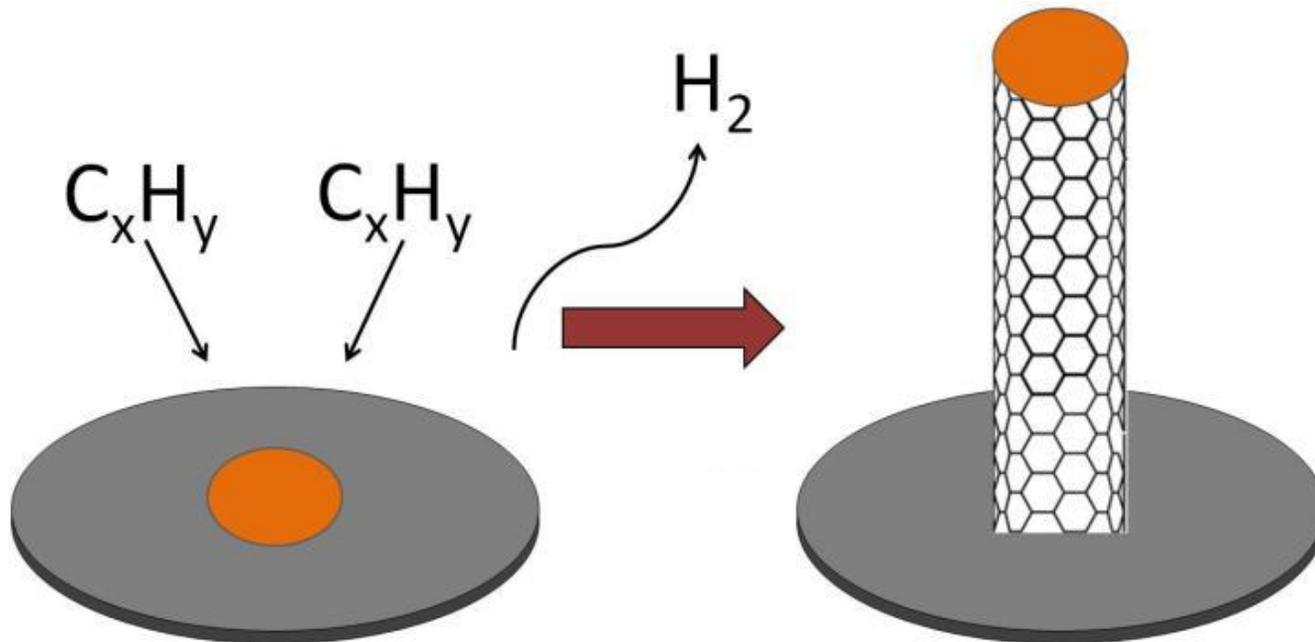
# Nanotubos de carbono

Nanotubos de carbono foram descobertos em 1991 São estruturas de folhas de grafeno enroladas cilindricamente

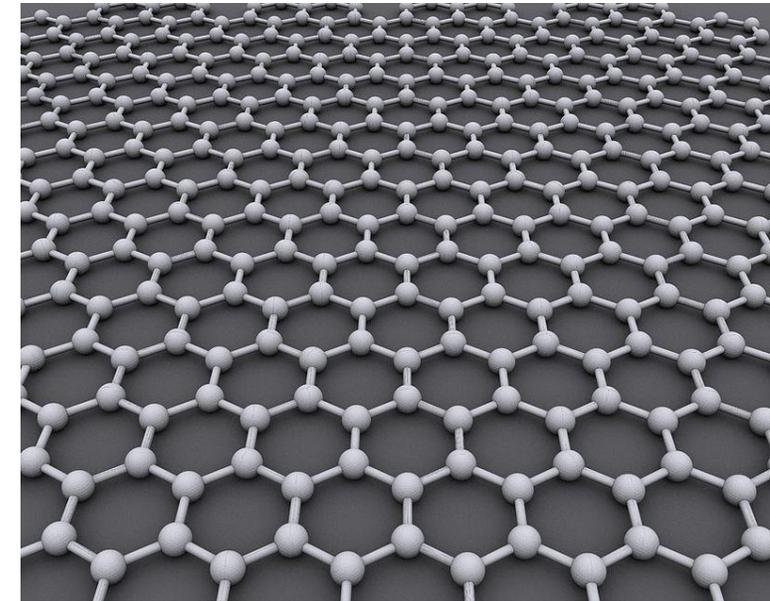
Podem ser fechadas nas extremidades ou não

Têm 1-2 nm de diâmetro

Podem existir na forma de canais múltiplos que terão entre 2-50 nm com intervalos de 0,34 nm



grafeno



# Nanotubo com enzima imobilizado

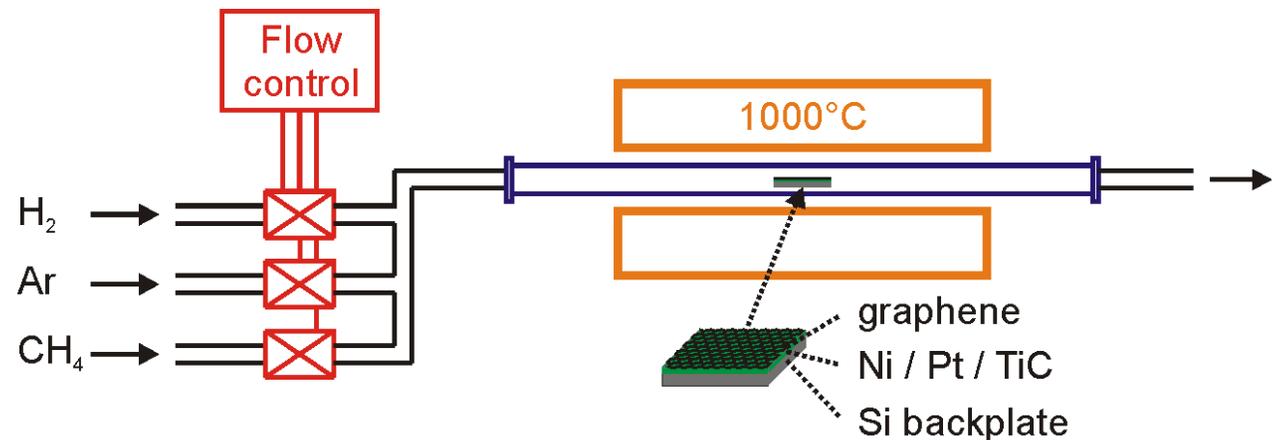
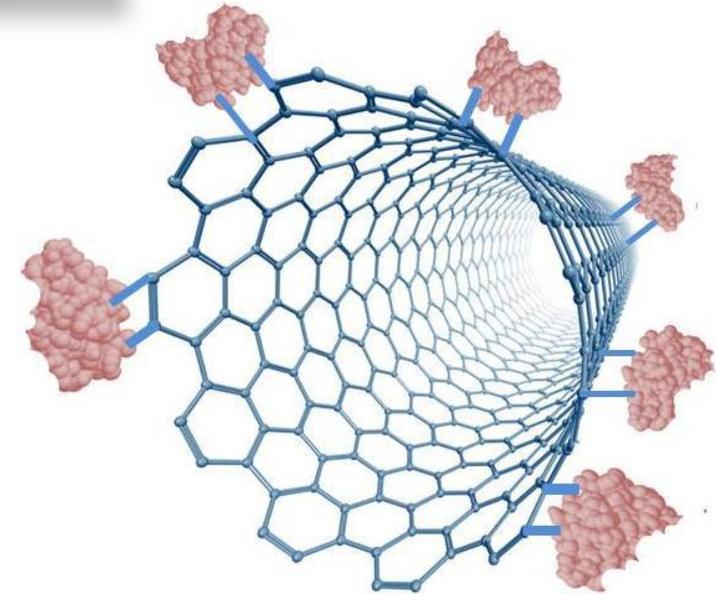
## Imobilização de enzimas em carbonanotubos

Adsorção física através de anéis aromáticos do enzima  
Ligações cruzadas com glutaraldeído

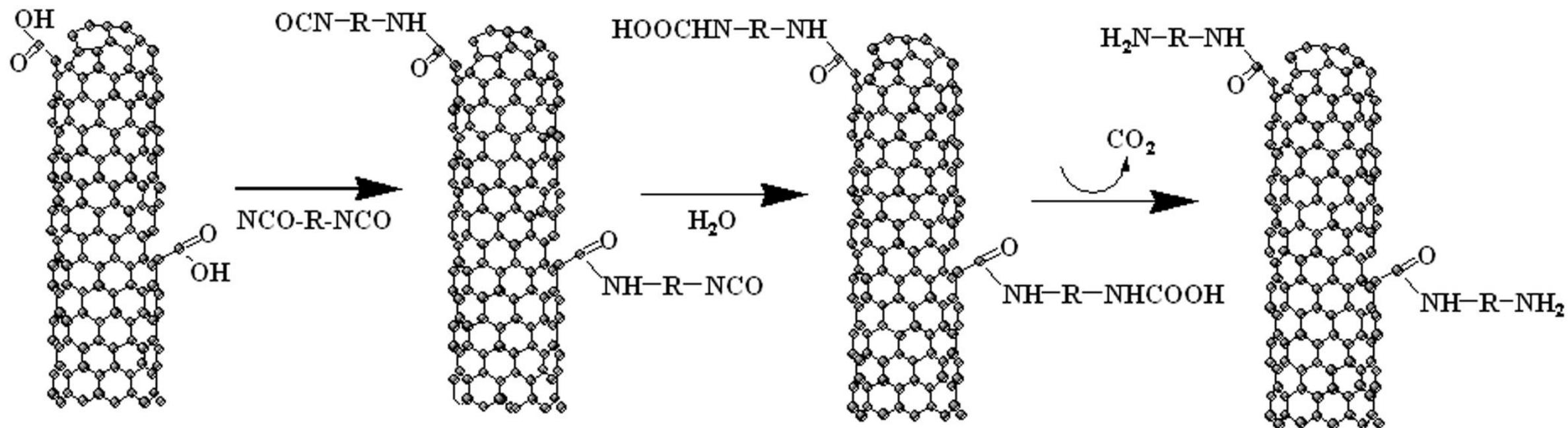
## Imobilização em folhas de grafeno

Grafeno é produzido esfoliando oxido de grafite!  
Com fita adesiva!  
Métodos por deposição química de vapor

<http://www.graphenea.com/pages/cvd-graphene#.VK5usU0qXIU>

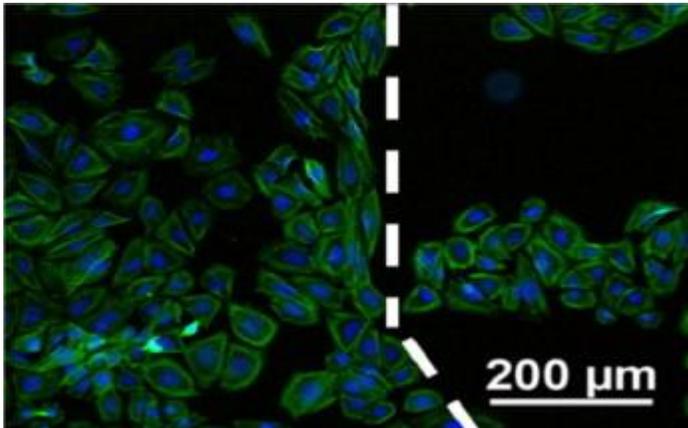


## Ligação de enzimas a nanotubos



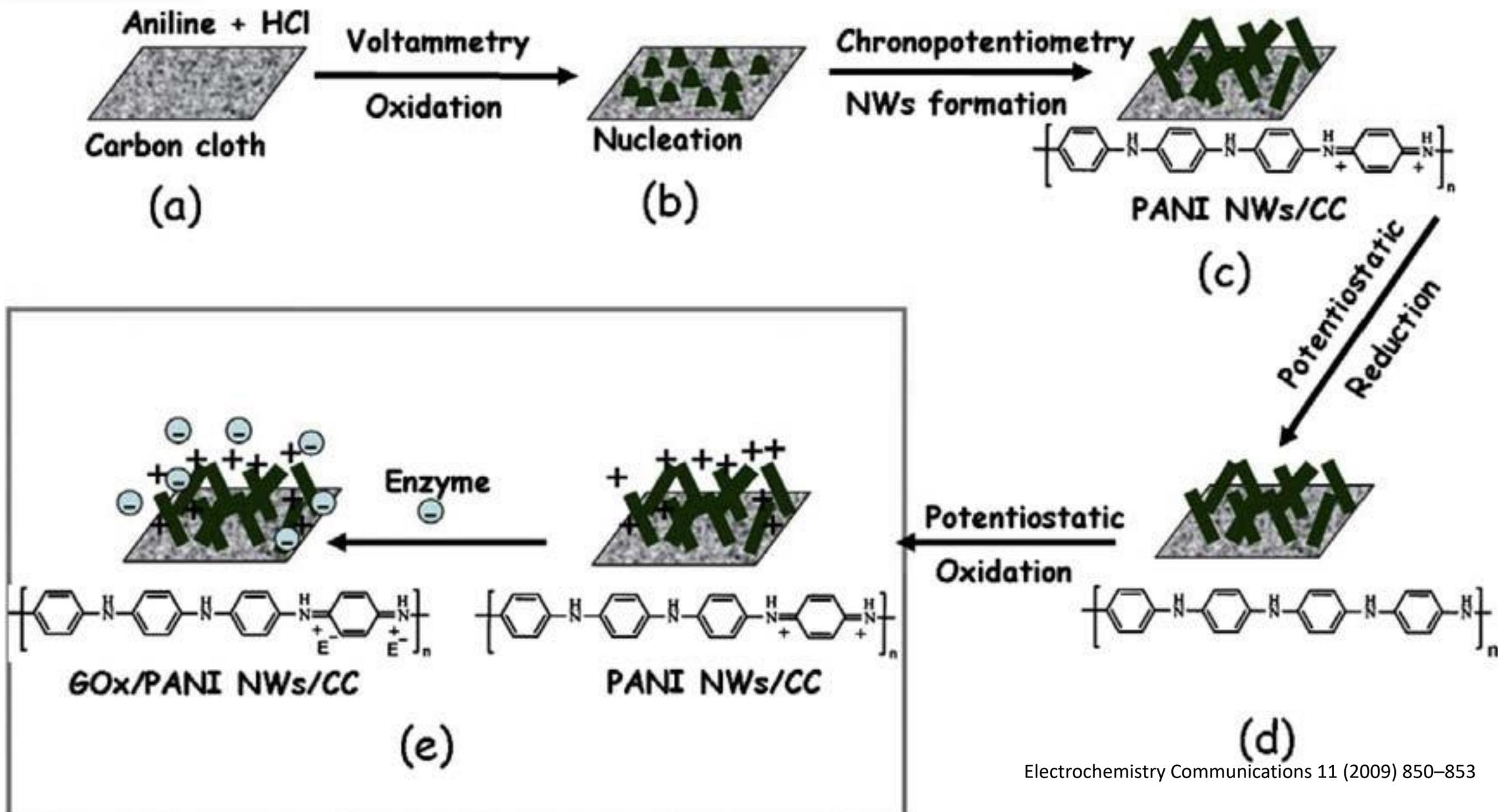
## Imobilização de células

**Imobilização covalente**  
**Imobilização usando espaçadores**  
**Incorporação em compostos**



### Graphene in biological applications

The biocompatibility of large single layer graphene produced by chemical vapour deposition was investigated using human osteoblasts and mesenchymal stromal cells. The study was focused on cellular adhesion, morphology and the ability to proliferate on graphene substrates. It was found that both of the cell types which were tested adhered and proliferated better when cultured on graphene films than on a SiO<sub>2</sub> substrate: "Graphene substrates promote adherence of human osteoblasts and mesenchymal stromal cells".





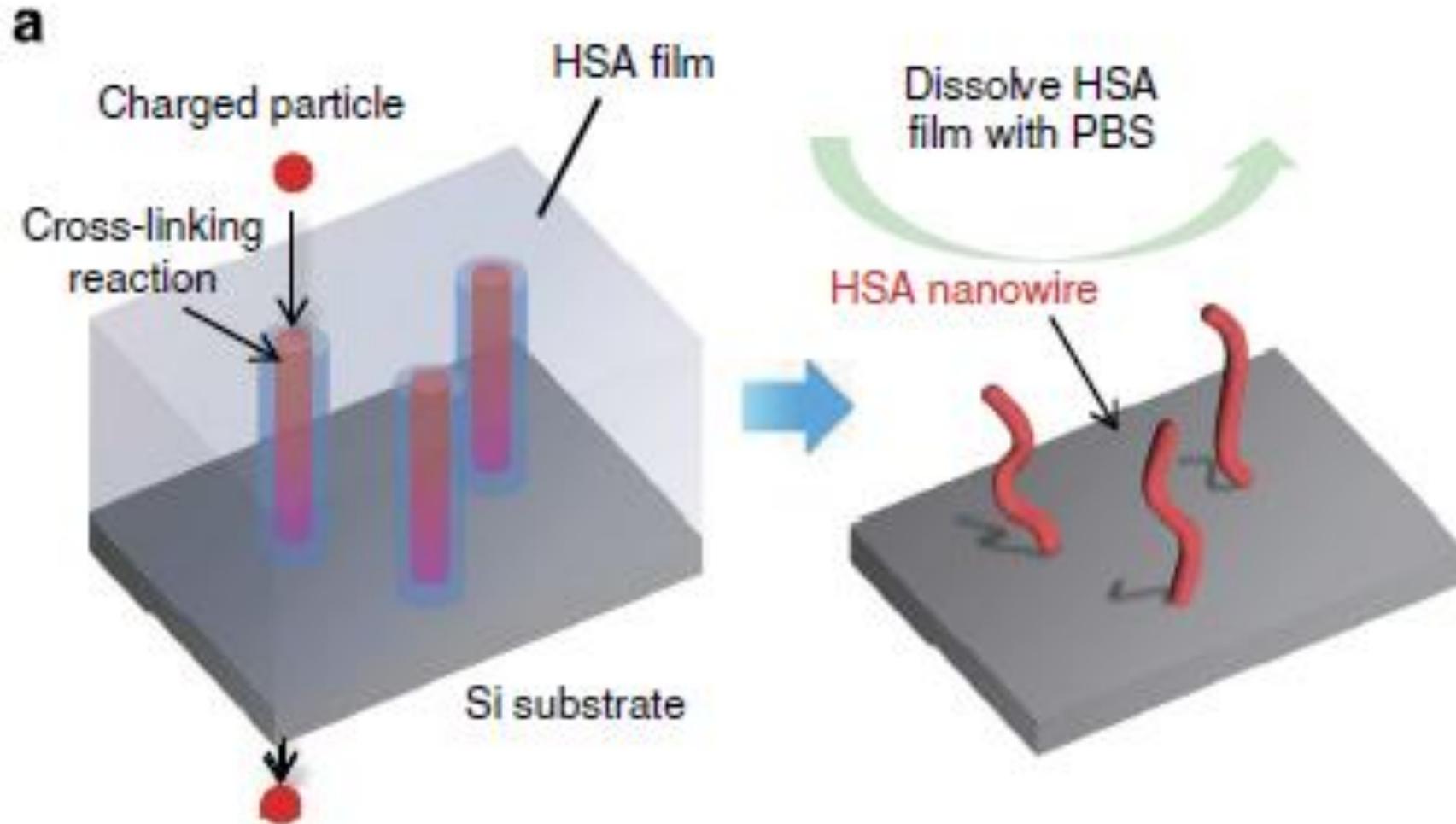
## Nanofios de proteína

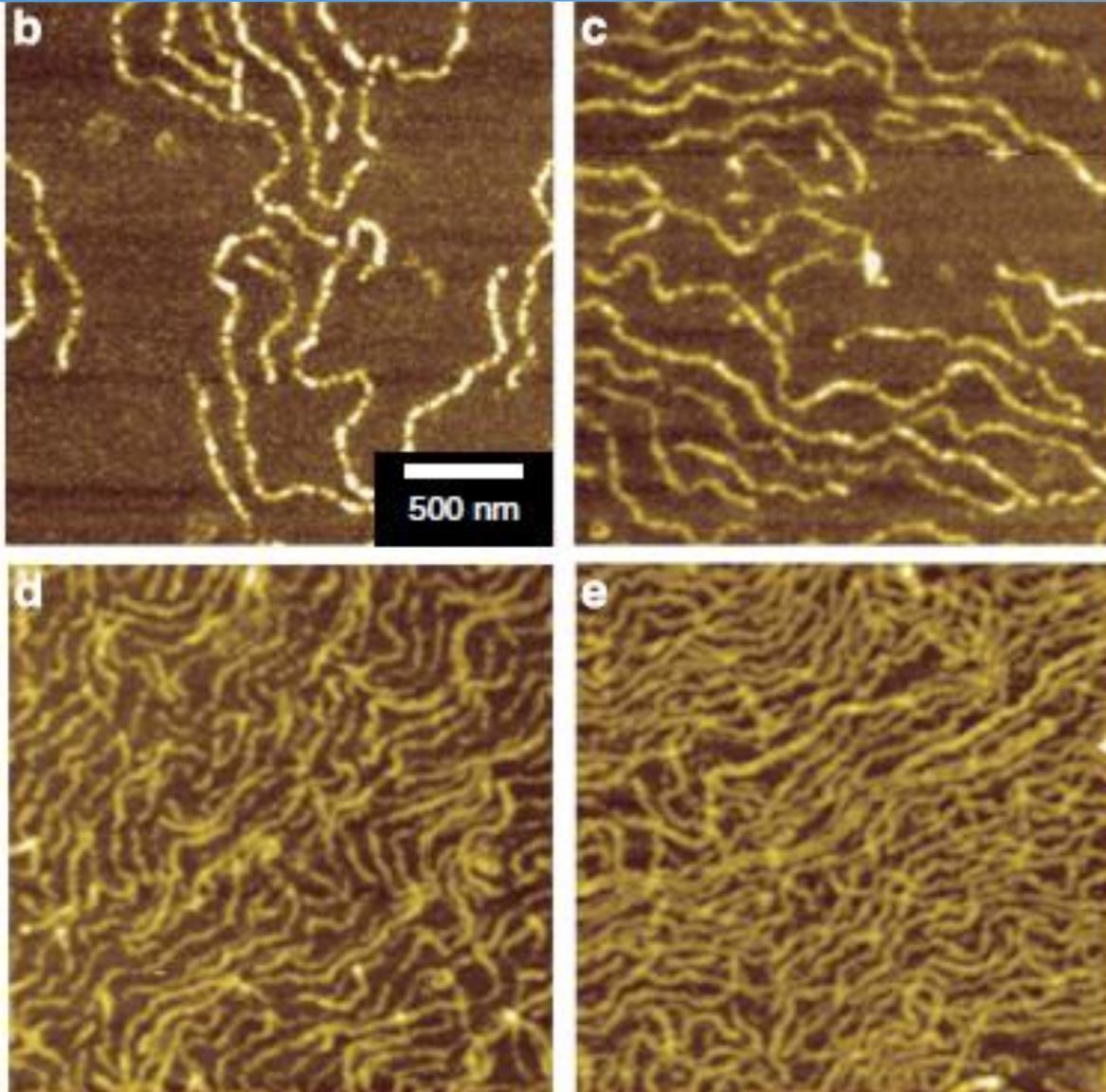
Protein nanowires exhibiting specific biological activities hold promise for interacting with living cells and controlling and predicting biological responses such as apoptosis, endocytosis and cell adhesion.

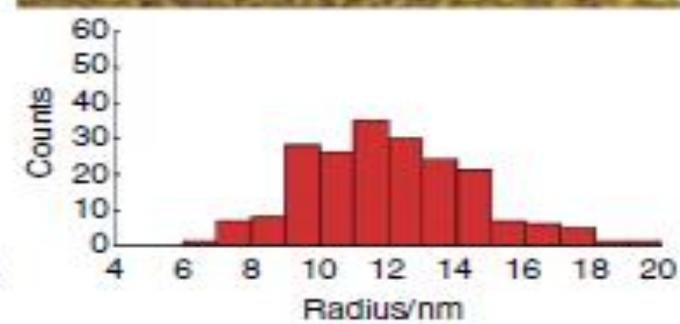
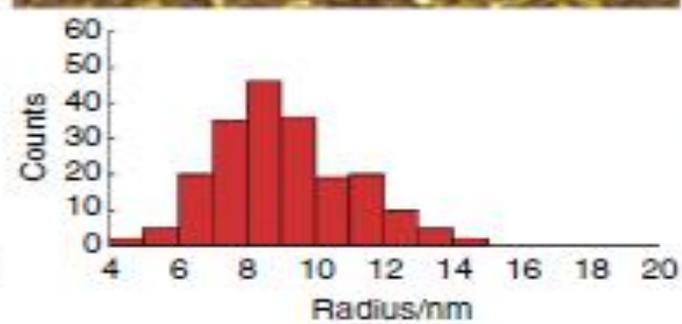
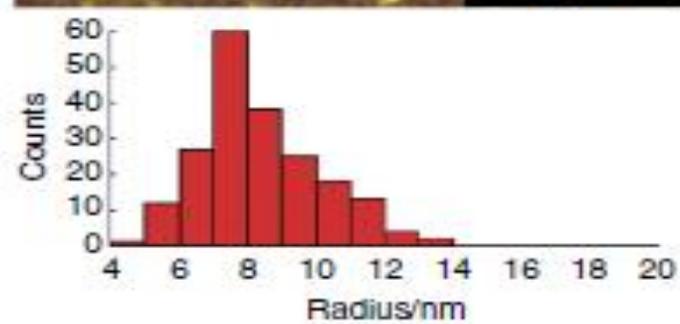
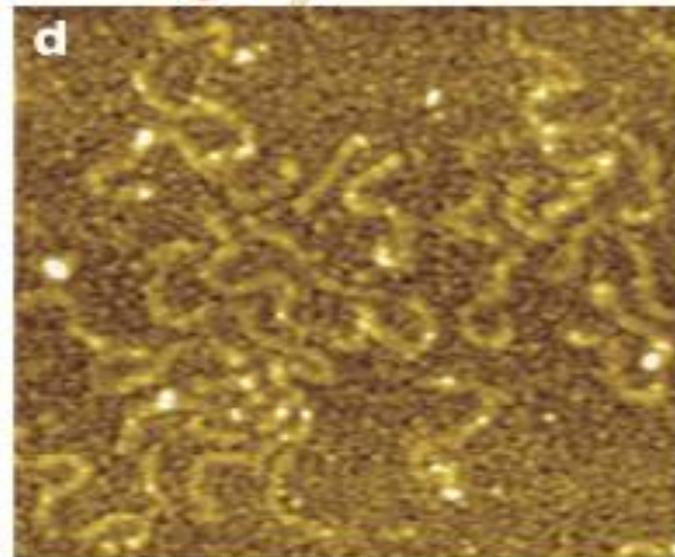
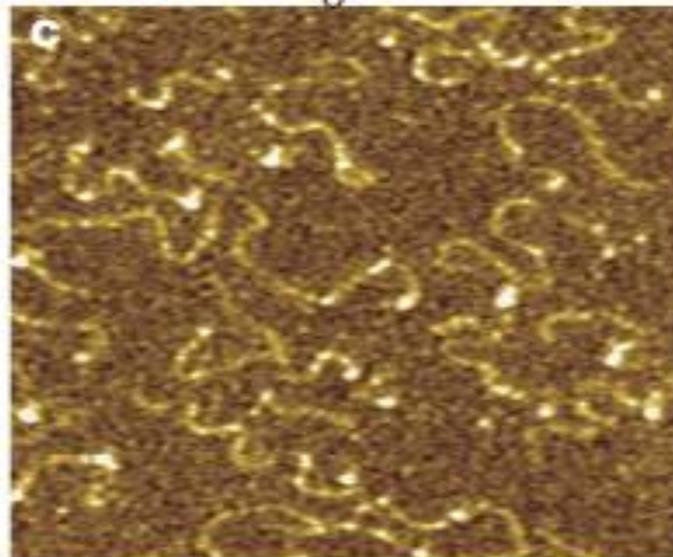
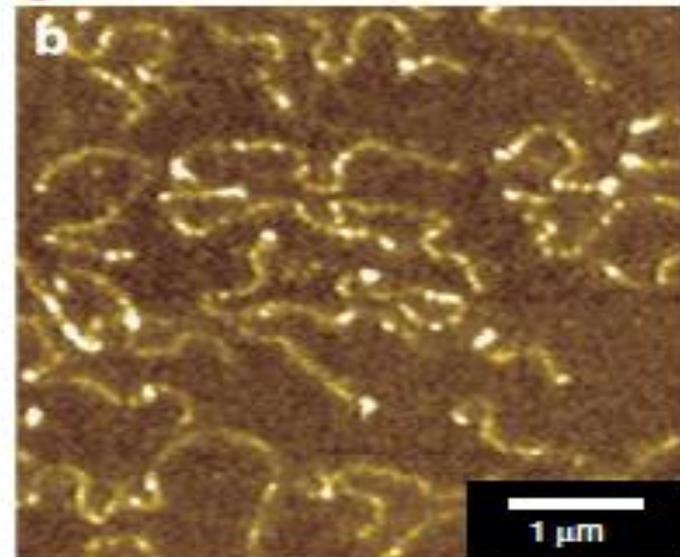
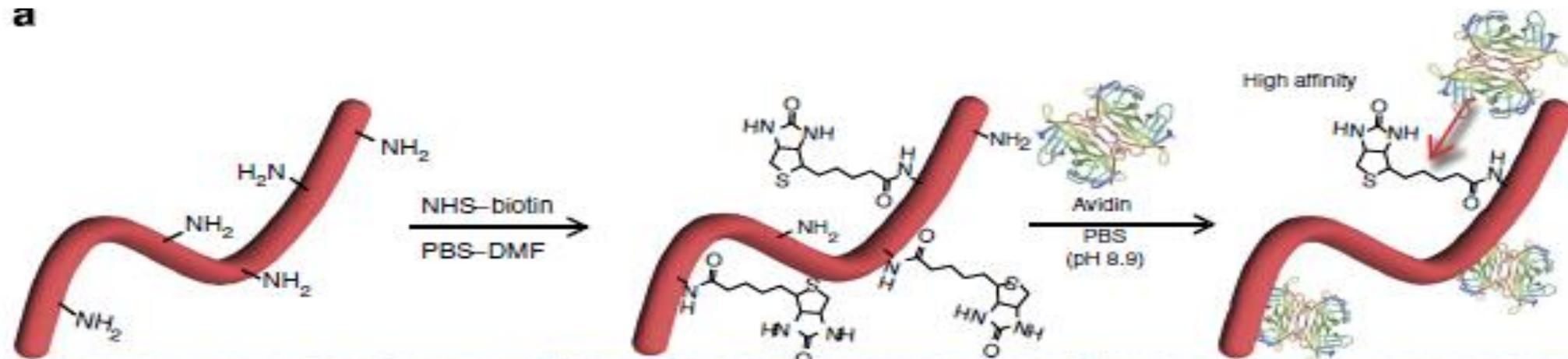
Here we report the result of the interaction of a single high-energy charged particle with protein molecules, giving size-controlled protein nanowires

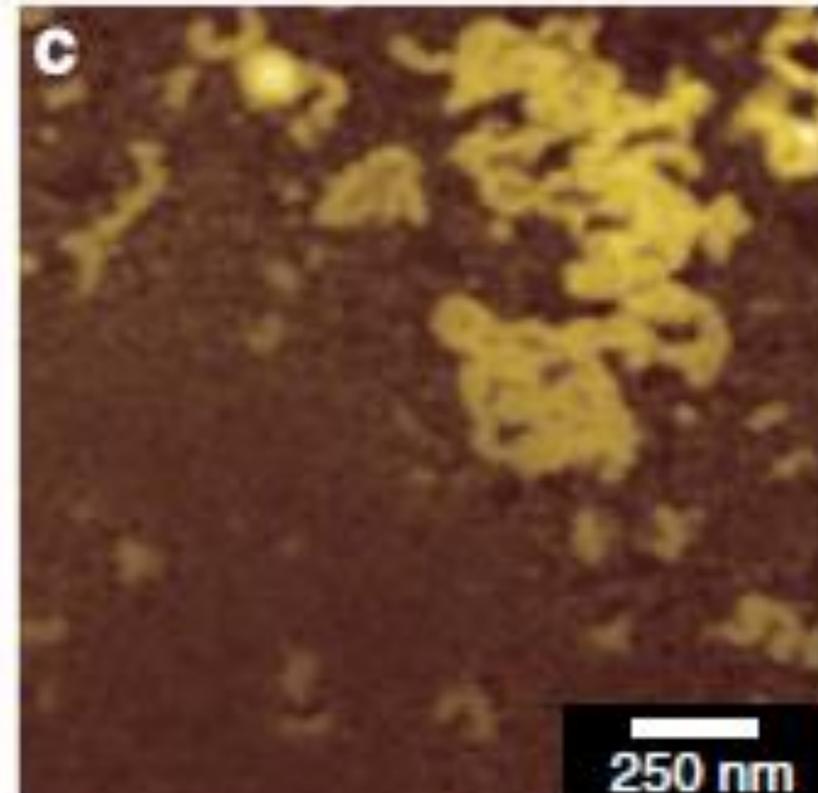
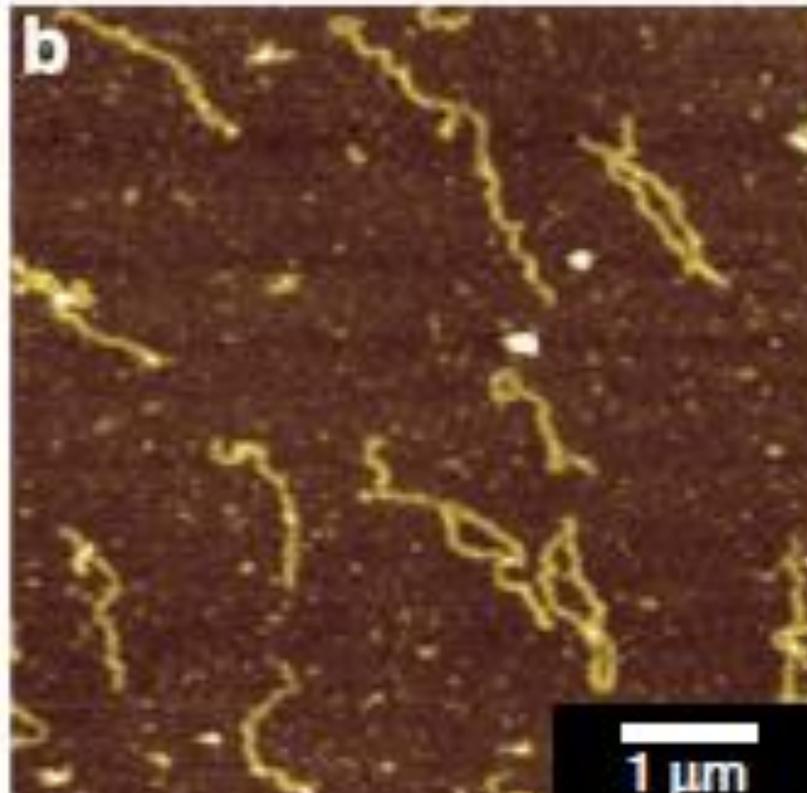
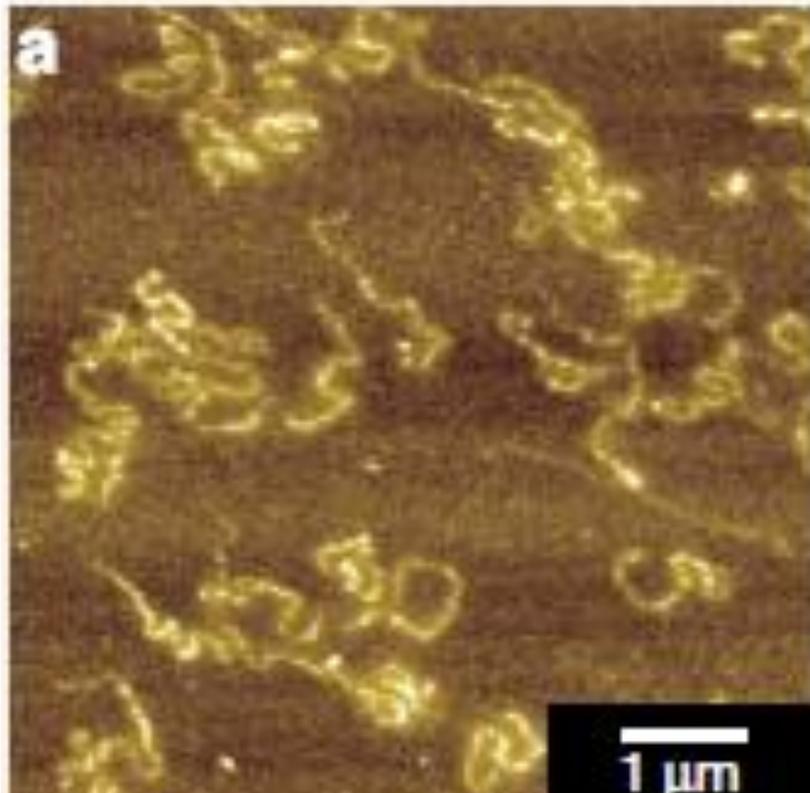
Degradation of the human serum albumin nanowires was examined using trypsin. The biotinylated human serum albumin nanowires bound avidin, demonstrating the high affinity of the nanowires. Human serum albumin–avidin hybrid nanowires were also fabricated from a solid state mixture and exhibited good mechanical strength in phosphate-buffered saline.

The biotinylated human serum albumin nanowires can be transformed into nanowires exhibiting a biological function such as avidin–biotinyl interactions and peroxidase activity. The present technique is a versatile platform for functionalizing the surface of any protein molecule with an extremely large surface area.

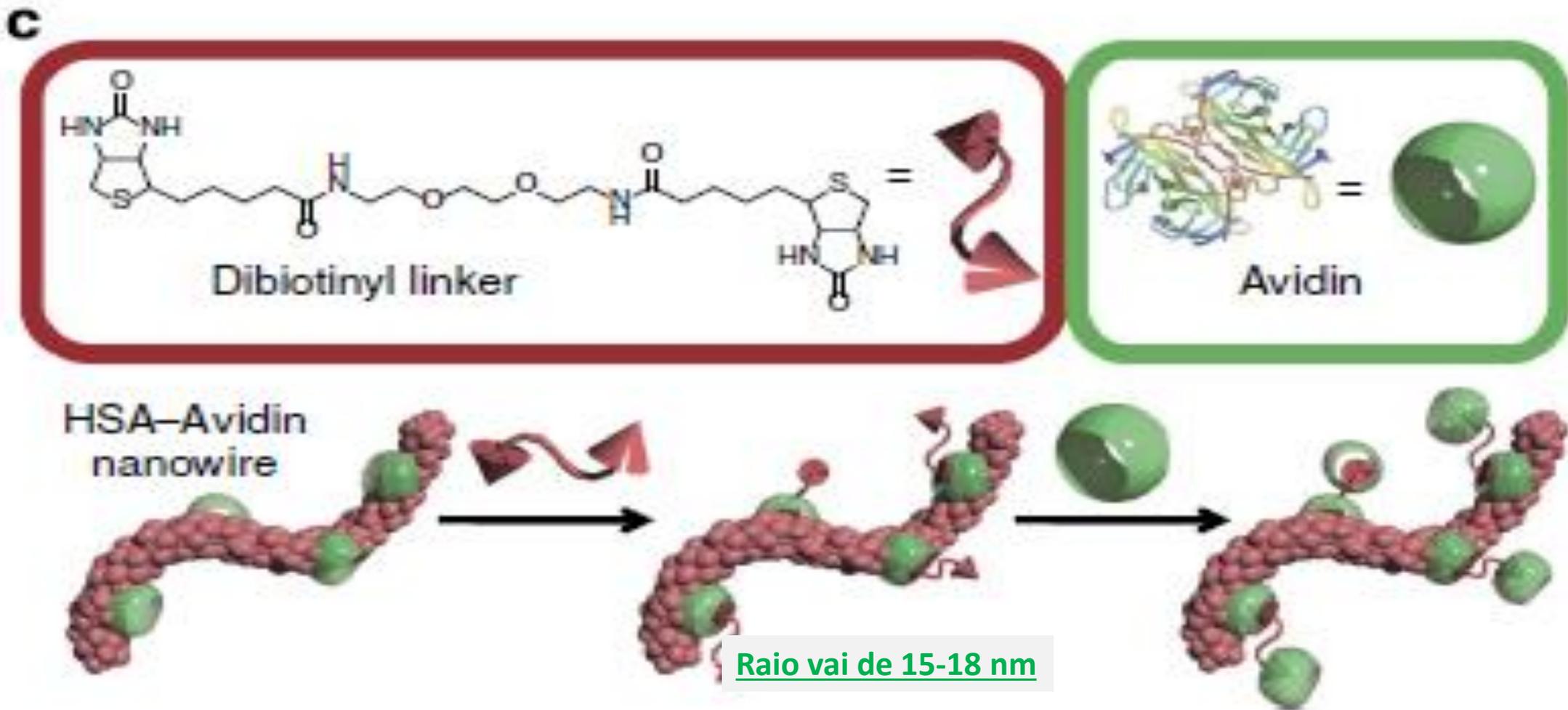




**a**



Nanofios de proteínas: imagens de AFM de (a) BSA; (b) OVA; (c) avidina



Interacção entre albumina human –avidina E BIOTINA

DOI: 10.1038/ncomms4718



### **5.3. Caracterização de um biocatalisador**

**Aqui**

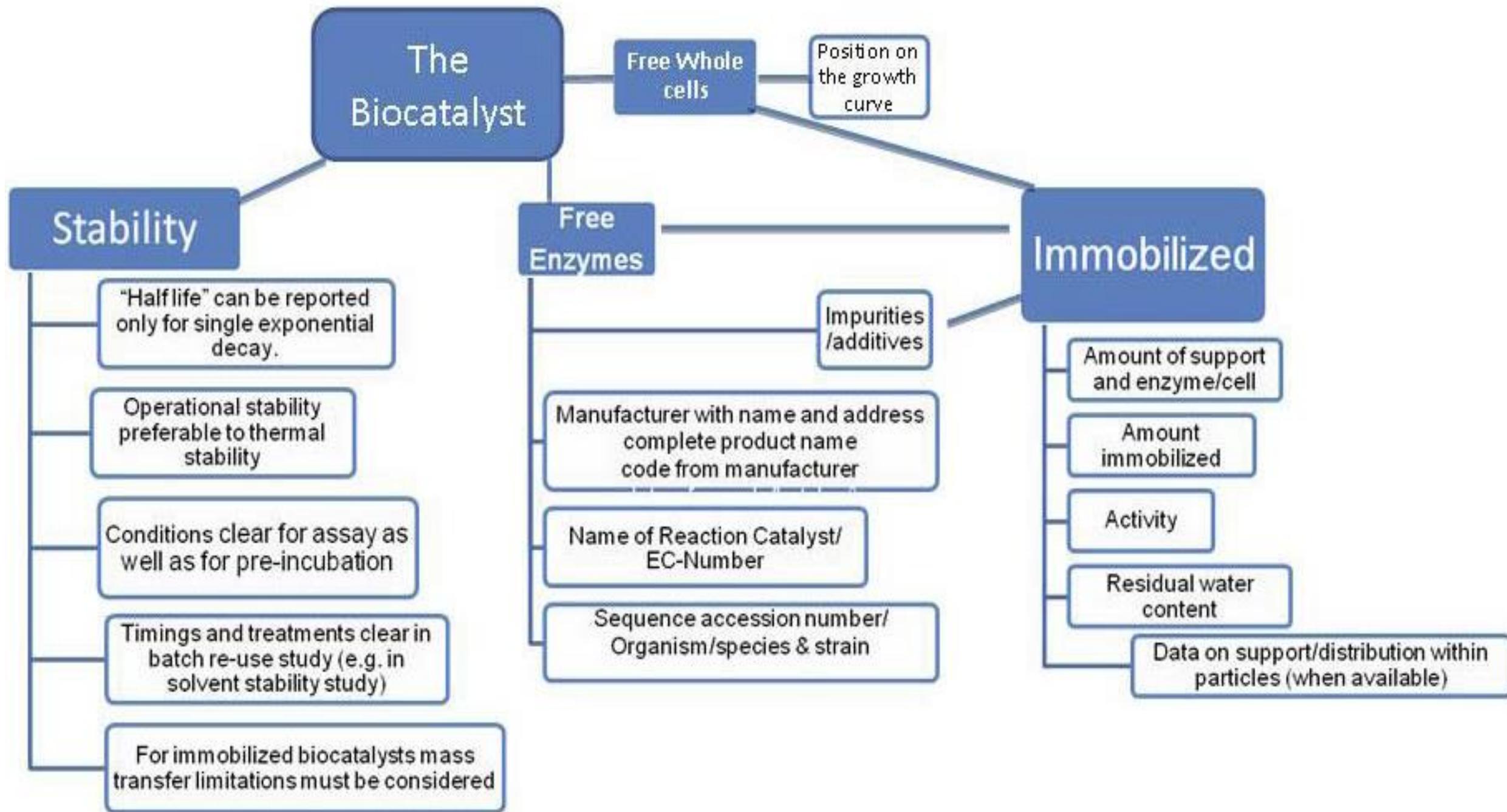
**Biocatalisador imobilizado deverá ser caracterizado por:**

**Identificação clara do enzima (EC numeração; origem do biocatalisador)**  
**Preparação**  
**Determinação de parâmetros cinéticos, actividade específica**  
**Condições reaccionais (T, pH)**  
**Métodos utilizados para determinação de actividade**

*Grupo de Biocatálise da UE*

***GUIDELINES FOR REPORTING OF BIOCATALYTIC REACTIONS***

*DOI: 10.1016/j.tibtech.2010.01.001*





**No final da aula deverá**

**2**

**Definir imobilização por  
oclusão, conhecendo  
matrizes e métodos de  
obtenção de enzimas e  
células imobilizados por  
este processo**

**1**

**Como obter enzimas  
imobilizados por métodos  
de biocatalisador solúvel**

**3**

**Imobilização em  
nanopartículas**

**4**

**Requisitos para descrever  
biocatalisadores  
imobilizados**