



UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CENTRO DE EDUCAÇÃO E SAÚDE
CURSO DE BACHARELADO EM FARMÁCIA

**IMOBILIZAÇÃO DE NEUTRASE® EM SUPORTES DE QUITOSANA
ASSOCIADA A DIFERENTES COPOLÍMEROS**

ALANNA SHIRLEY MORAIS DE FARIA

CUITÉ – PB

2013

ALANNA SHIRLEY MORAIS DE FARIA

**IMOBILIZAÇÃO DE NEUTRASE® EM SUPORTES DE QUITOSANA
ASSOCIADA A DIFERENTES COPOLÍMEROS**

Trabalho de Conclusão do Curso apresentado à
Coordenação do Curso de Bacharelado em
Farmácia do Centro de Educação e Saúde da
Universidade Federal de Campina Grande,
como requisito legal para a obtenção do título
de Bacharel em Farmácia.

ORIENTADOR: Prof^o Dr. WELLINGTON SABINO ADRIANO

CUITÉ – PB

2013

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA NA FONTE
Responsabilidade Jesiel Ferreira Gomes – CRB 15 – 256

F224i Faria, Alanna Shirley Morais de.

Imobilização de Neutrase® em suportes de quitosana associada a diferentes copolímeros. / Alanna Shirley Morais de Faria – Cuité: CES, 2013.

38 fl.

Monografia (Curso de Graduação em Farmácia) – Centro de Educação e Saúde / UFCG, 2013.

Orientador: Dr. Wellington Sabino Adriano.

1. Neutrase®. 2. Soro. 3. Enzima. I. Título.

CDU 615.1

ALANNA SHIRLEY MORAIS DE FARIA

**IMOBILIZAÇÃO DE NEUTRASE® EM SUPORTES DE QUITOSANA
ASSOCIADA A DIFERENTES COPOLÍMEROS**

Trabalho de Conclusão do Curso apresentado à
Coordenação do Curso de Bacharelado em Farmácia do
Centro de Educação e Saúde da Universidade Federal de
Campina Grande, como requisito legal para a obtenção
do título de Bacharel em Farmácia.

Aprovado em, ____/____/____

Profº Dr. Wellington Sabino Adriano
Orientador/Presidente

Profª Dra. Maria Emília da Silva Menezes
Membro da Comissão

Profº Dr. Wylly Araújo de Oliveira
Membro da Comissão

CUITÉ - PB
2013

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho ao meu avô Ademar José de Moraes (*in memoriam*) que me ensinou o valor do respeito e, do qual, sinto e sempre sentirei saudades e, a minha avó Neli, que sempre acreditou em mim, mesmo quando eu não o fazia.

Ao meu pai Arlan de Araújo Faria, meu amor maior, pelo amor, dedicação, compreensão, incentivo e conhecimentos morais transmitidos. Com certeza o Senhor foi o maior motivo de minha dedicação aos estudos.

A minha mãe Maria Francisca, que sempre me apoiou nas minhas escolhas, amo-te
mainha.

Aos meus tios que tanto amo Rosário Moraes, Maria de Fátima de Moraes (Preta) e
Francisco Alcir.

Ao meu namorado, Francisco Cesino, pela amizade, companheirismo, compreensão nos momentos de estudo, pelos momentos alegres e por ter pacientemente me ajudado nas correções, mesmo com minha impaciência.

As minhas amigas de curso que, ao longo desses anos, estiveram ao meu lado e, dividiram inúmeros momentos ímpares que vivemos: Alaíde Regina, Claudicely Sabino, Cassianne Lins e Kaliany Adja, sem vocês a jornada teria sido bem mais difícil.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida, saúde, e por não me desamparar, mesmo quando minha fé não correspondia a sua magnitude.

Ao meu orientador, Prof^o. Dr. Wellington Sabino Adriano, pelos ensinamentos, orientações, reflexões, estímulo e principalmente paciência, itens de fundamental importância para a minha formação e crescimento profissional.

À amiga Larissa Leite, pelo apoio e auxílio na jornada laboratorial que não foi fácil e, teria sido ainda pior sem sua presença. Obrigada!

Ao Centro de Ciências da saúde (CES), da Universidade Federal de Campina Grande (UFCG), pela oportunidade de cursar gratuitamente um curso de graduação, proporcionando crescimento intelectual.

Aos professores que atuaram diretamente no Curso de Bacharelado em Farmácia, transmitindo conhecimentos e ensinamentos que foram de fundamental importância para a minha formação profissional.

A todos os funcionários do CES que direta ou indiretamente contribuíram para a minha formação.

E a todos que, contribuíram de forma direta ou indireta na minha formação pessoal e profissional, que neste momento, eu possa ter deixado de mencionar.

Meus sinceros agradecimentos.

RESUMO

As enzimas são estruturas altamente complexas e, geralmente, frágeis em condições adversas, podendo inativar-se, por isso o uso da imobilização, que consiste em confinar, através de métodos químicos e/ou físicos, a enzima em uma porção do espaço, ou seja, a enzima estará física ou quimicamente associada a um suporte ou matriz. O uso da enzima Neutrase® se explica por ser uma protease que hidrolisa proteínas do soro de leite, um subproduto altamente poluente e descartado nas indústrias de laticínios, visando à obtenção de derivados com melhores propriedades funcionais aptos para a preparação de alimentos para pessoas em dietas especiais ou com falhas congênitas no metabolismo de proteínas. O objetivo geral deste trabalho consistiu na produção e comparação de suportes de quitosana associada a diferentes copolímeros e microrganismo. Os suportes utilizados foram quitosana 2,5% - gelatina 2,5% e quitosana 2,5% - gelatina 2,5% - *Saccharomyces cerevisiae* 5%. Ambos os suportes foram ativados com glutaraldeído. A Neutrase® (10 U/g de suporte) foi adicionada ao suporte ativado e manteve-se sob agitação a 25° C durante 3 h. As atividades de Neutrase® solúvel e imobilizadas foram avaliadas através de análise espectrofotométrica a 700 nm. Os derivados foram analisados quando ao rendimento da imobilização (RI), atividade recuperada (ARec), tempo de meia-vida ($t_{1/2}$) e fator de estabilização térmica (FE), comparado com a enzima solúvel. O suporte quitosana 2,5% - gelatina 2,5% apresentou RI de 36% e 52% de ARec, apresentando FE quinhentos e quatorze vezes maior que a enzima Neutrase® solúvel. Já o suporte quitosana 2,5% - gelatina 2,5% - *Saccharomyces cerevisiae* 5% apresentou RI de 76% e 13% de ARec, apresentando FE quinhentos e treze vezes maior que a enzima Neutrase® solúvel, sendo escolhido como o suporte mais promissor.

Palavras-Chave: Soro, Enzima, Neutrase.

ABSTRACT

Enzymes are complex structures, and generally fragile adverse conditions may inactivate itself, so the use of immobilization, which is to confine, by chemical and / or physical enzyme in a portion of space, or that is, the enzyme is physically or chemically associated to a support or matrix. The use of the enzyme Neutrase ® is explained to be a protease that hydrolyzes proteins from whey, a by highly polluting and disposed in the dairy industry, in order to obtain derivatives with improved functional properties suitable for the preparation of food for people on diets special or congenital flaws in the protein metabolism. The aim of this work was the production and comparison of media associated with different chitosan copolymers and microorganism. The media used were 2.5% chitosan - gelatin 2.5% and 2.5% chitosan - gelatin 2.5% - 5% *Saccharomyces cerevisiae*. Both supports were activated with glutaraldehyde. The Neutrase ® (10 U/g stand) was added to the activated support and kept under stirring at 25 ° C for 3 h. The activities of soluble and immobilized Neutrase ® were evaluated by spectrophotometric analysis at 700 nm. The derivatives were analyzed when the yield of immobilization (RI), activity recovered (AREC), half-life ($t_{1/2}$) and thermal stabilization factor (EF), compared with the soluble enzyme. The support chitosan 2.5% - 2.5% gelatin IR showed 36% and 52% of arec presenting FE five hundred fourteen times greater than the soluble enzyme Neutrase ®. And the support chitosan 2.5% - 2.5% gelatin - *Saccharomyces cerevisiae* IR introduced 5% 76% and 13% of arec presenting FE five hundred thirteen times greater than the soluble enzyme Neutrase ®, the support being chosen as more promising.

Keywords: Serum, Enzyme, Neutrase.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Parâmetros de imobilização de Neutrase® em quitosana 2,5% - gelatina 2,5% (m/v) e quitosana 2,5% - gelatina 2,5% - <i>Saccharomyces cerevisiae</i> 5% em pH 10,0 a 25°C durante 3 horas de imobilização. Carga enzimática oferecida 10,7 U/g gel e 22,6 U/g gel.....	30
Tabela 2. Parâmetros de estabilidade térmica da imobilização da Neutrase® em suporte de quitosana 2,5% - gelatina 2,5% - <i>Saccharomyces cerevisiae</i> 5% ativado por glutaraldeído: ($t^{1/2}$) tempo de meia-vida e (FE) fator de estabilização a 60°C. Valores estimados para as constantes de desnaturação térmica (Kd), em função da temperatura, aplicando modelo de Sadana-Henley (1987).....	31
Tabela 3. Parâmetros cinéticos da enzima livre e imobilizada.....	32

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Classificação dos métodos de imobilização reversíveis de enzimas.....	16
Figura 2. Classificação dos métodos de imobilização irreversíveis de enzimas.....	17
Figura 3. Estrutura dos biopolímeros quitosana, quitina e celulose.....	22
Figura 4. Neutrase® teoricamente imobilizada (U/g de gel) em função da carga de enzima oferecida.....	32
Figura 5. Ajuste do modelo de Michaelis-Menten para a reação de hidrólise da caseína (enzima imobilizada) 10 U/g suporte a 60°C pH 10,0.....	34
Figura 6. Ajuste do modelo de Michaelis-Menten para a reação de hidrólise da caseína (enzima livre) 10 U/g suporte a 60°C pH 10,0.....	34

SUMÁRIO

RESUMO.....	06
ABSTRACT.....	07
LISTA DE TABELAS.....	08
LISTA DE FIGURAS.....	09
1. INTRODUÇÃO.....	12
2. OBJETIVOS.....	14
2.1. OBJETIVO GERAL.....	14
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	14
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	14
3.1. ENZIMAS.....	15
3.1.1. Neutrase®.....	15
3.2. Imobilização de Enzimas.....	16
3.2.1. Métodos de imobilização.....	16
3.2.2. Efeitos difusivos.....	18
3.3. Cinética Enzimática.....	19
3.4. Suportes para imobilização.....	22
3.4.1. Quitosana.....	22
3.4.2. Gelatina.....	23
3.4.3. Utilização de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> na preparação de suportes.....	23
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	24
4.1. MATERIAL.....	24
4.1.1. Suporte.....	24
4.1.2. Microrganismo.....	24
4.1.3. Reagentes usados para tratamento do suporte.....	24
4.1.4. Enzima.....	24
4.1.5. Agente ativante.....	24
4.2. MÉTODOS.....	25
4.2.1. Preparação das partículas de híbridos de quitosana 2,5% - gelatina 2,5%.....	25
4.2.2. Preparação das partículas de híbridos de quitosana 2,5% - gelatina 2,5% - <i>Saccharomyces cerevisiae</i> 5,0%.....	25

4.2.3. Ativação dos suportes utilizando glutaraldeído.....	26
4.2.4. Imobilização da Neutrase®.....	26
4.2.5. Determinação da Atividade da Neutrase®.....	26
4.2.7. Ensaio de Estabilidade Térmica.....	28
4.2.8. Ensaio de Carga Máxima.....	29
4.2.9. Parâmetros cinéticos.....	29
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	30
5.1. Caracterização dos suportes quitosana 2,5% - gelatina 2,5% e quitosana 2,5% - gelatina 2,5% - <i>Saccharomyces cerevisiae</i> 5%.....	30
5.2. Estudo da Estabilidade Térmica.....	31
5.3. Parâmetros de Carga máxima.....	32
5.4. Estudo Cinético.....	33
6. CONCLUSÃO.....	35
7. REFERÊNCIAS.....	36

1. INTRODUÇÃO

As primeiras reportagens sobre o uso das enzimas podem ser encontradas numa época datada de 3000 anos a.C. , quando sumérios bebiam cerveja e comiam pães nos banquetes (FLANDRIN & MONTANANI, 1996). Porém, o entendimento desses biocatalisadores veio no início do século XVIII evoluindo lentamente com a descoberta e separação de enzimas, passando pela cinética de reação e finalmente no século XX, a imobilização de enzimas.

Atualmente usa-se a engenharia de proteínas para se alcançar propriedades específicas como termoestabilidade e surgem cada vez mais campos novos de aplicação de enzimas. Estratégias capazes de promover estabilização estrutural e funcional via imobilização deverão aumentar a aplicabilidade das enzimas (LAMAS *et al.*, 2001).

Outra grande motivação para o uso das enzimas deriva da chamada tecnologia limpa. Nos processos industriais, enzimas podem substituir reagentes químicos prejudiciais à saúde e ao meio ambiente e reduzir o consumo de água e energia além de aumentar a qualidade e pureza do produto e diminuir resíduos (GIORNO *et al.*, 2000).

Devido às enzimas atuarem sob condições suaves, elas são estruturas altamente complexas e, geralmente, frágeis em condições adversas, podendo inativar-se, ou seja, perderem sua capacidade de catalisar reações (TARDIOLI, 2003 *apud* BEZERRA *et al.*, 2012). Por isso, a necessidade da imobilização, por possibilitar a utilização da atividade catalítica por um maior período de tempo; aumentando a facilidade de separação do produto final e, podendo em alguns casos, ocorre modificação favorável das propriedades catalíticas da enzima como, por exemplo, maior estabilidade ao pH e à temperatura (MENDES *et al.*, 2011).

Portanto, a imobilização consiste em confinar, através de métodos químicos e/ou físicos, a enzima em uma porção do espaço, ou seja, a enzima estará física ou quimicamente associada a um suporte ou matriz, usualmente sólida, insolúvel em água e inerte, que não seja essencial a sua atividade (COELHO *et al.*, 2008). Por não existir um método aplicável para todas as enzimas, é necessário escolher um procedimento mais simples e mais barato para cada aplicação de uma enzima imobilizada, resultando em um derivado com boa retenção de atividade e alta estabilidade operacional (MENDES *et al.*, 2011).

A Neutrase® é uma protease que hidrolisa proteínas do soro de queijo, um subproduto altamente poluente e descartado nas indústrias de laticínios, visando à obtenção de derivados com melhores propriedades funcionais. Estes derivados estão aptos para a preparação de alimentos para pessoas em dietas especiais ou com falhas congênitas no metabolismo de proteínas (BEZERRA *et al.*, 2012).

A hidrólise do soro do leite por proteases possui vantagens a serem empregadas para fins alimentícios, no qual há um melhoramento nutricional e funcional, podendo sua mistura composta de peptídeos e aminoácidos livres, ser utilizada na preparação de fórmulas alimentícias infantis, produtos farmacêuticos e para nutrição esportiva (BOUDRANT & CHEFTEL 1996 *apud* BEZERRA *et al.*, 2012). Existe, ainda, outro benefício trazido pela hidrólise das proteínas do soro do leite por proteases, que é a redução das propriedades alergênicas, obtido pela hidrólise das proteínas α -lactoalbumina e β -lactoglobulina (SCHMIDT & POLL 1991 *apud* BEZERRA *et al.*, 2012).

Pretende-se, neste trabalho, caracterizar a imobilização da enzima Neutrase® em suportes híbridos de quitosana com outros polímeros de baixo custo testando o melhor derivado obtido, visto que esta enzima tem importância na indústria alimentícia e farmacêutica, pelos produtos hidrolisados produzidos.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Produção e comparação de suportes de quitosana associada a diferentes copolímeros e microrganismo.

2.2. Objetivos Específicos

- Produzir suportes de quitosana associada a dois diferentes copolímeros;
- Caracterizar o melhor suporte quanto ao rendimento, atividade recuperada e estabilidade;
- Realizar, com o suporte mais viável, ensaios de carga máxima e ensaio cinético.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Enzimas

As Enzimas são catalisadores biológicos, de natureza principalmente proteica, que participam de várias reações bioquímicas, tendo como papel fundamental o controle metabólico. Estas moléculas aceleram reações termodinamicamente favorecidas, sendo extremamente versáteis, estereoespecíficas, e de elevada importância nos processos biotecnológicos (COELHO *et al.*, 2008).

Atuam em condições suaves de temperatura, pH e pressão, atingindo velocidades de reação bastante superiores àquelas obtidas em presença de catalisadores químicos convencionais, permitindo uma redução no custo final do processo e evitando a formação de subprodutos indesejáveis. Além disso, devido à sua elevada especificidade, maior rendimento do processo pode ser atingido, permitindo a obtenção de produtos biodegradáveis e reduzindo a quantidade de resíduos gerados (MENDES *et al.*, 2011).

3.1.1. Neutrase®

Proteases representam um dos maiores grupos de enzimas industriais com demanda crescente do mercado, não só devido a suas aplicações na indústria, na biotecnologia e na medicina como também em outras áreas de pesquisa. Atualmente, as proteases brutas são comercialmente disponíveis e amplamente utilizadas na indústria de alimentos para preparar hidrolisados proteicos com propriedades nutricionais e funcionais amplamente melhoradas (VIOQUE, 2000).

Neutrase® uma endoprotease bacteriana produzida pelo *Bacillus subtilis*, apresenta um interesse considerável devido a sua grande variedade de aplicações possíveis, por exemplo, na produção de proteínas para alimentos funcionais e para a melhoria da textura e sensorial propriedades de laticínios (KUMAR, 2000). Além disso, a Neutrase® pode ser utilizada como uma fonte potencial de antioxidantes de origem natural (DRYÁKOVÁ, 2010).

3.2. Imobilização de Enzimas

A imobilização de enzimas consiste no seu confinamento em uma região restrita (suporte), garantindo a retenção da atividade catalítica e, assegurando sua utilização de forma repetida ou contínua (CABRAL *et al.*, 2003), podendo aumentar a estabilidade da mesma (COELHO *et al.*, 2008).

3.2.1. Métodos de Imobilização

Os métodos de imobilização são subdivididos em três grupos principais. A primeira divisão baseada no modo como a imobilização foi alcançada: por confinamento num espaço limitado simples (encapsulação) ou num espaço limitado contendo muitos espaços pequenos (confinamento numa matriz) ou por ligação a um suporte material (ADRIANO, 2008). A ligação das enzimas a um suporte material pode ser por adsorção ou por ligação química, podendo, esta última, ser subdividida de acordo com o tipo de interação entre a enzima e o suporte ou entre as próprias moléculas de enzimas. A imobilização enzimática pode ser dividida em irreversível e reversível.

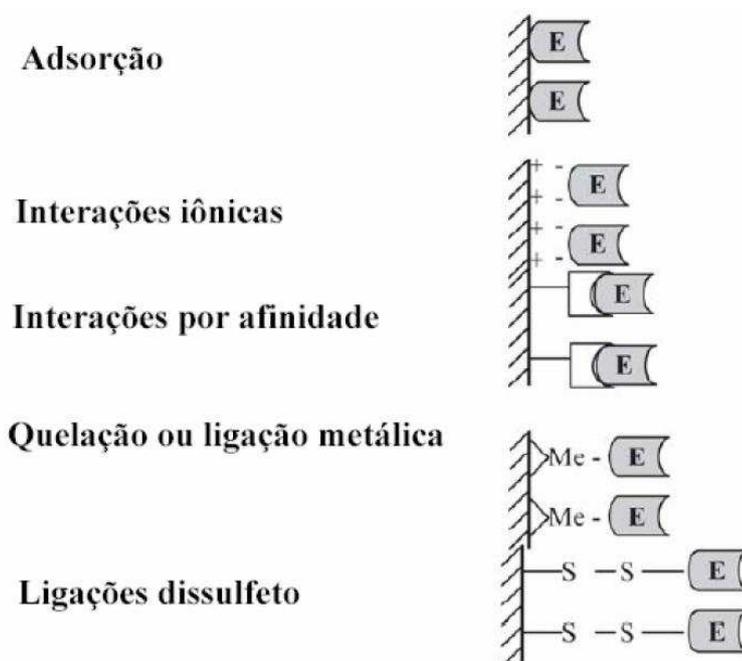


Figura 1. Classificação dos métodos de imobilização reversíveis de enzimas (ADRIANO, 2008)

A imobilização enzimática é o método mais estudado e aplicado para melhorar a estabilidade do biocatalisador, melhorar o controle de operação, aumentar a flexibilidade do modelo de reator e recuperação facilitada sem contaminação do derivado e, dentre os métodos de imobilização, a união covalente multipontual é o mais eficiente (ADRIANO, 2008).

Na imobilização covalente multipontual a imobilização e estabilização da enzima através da formação de várias ligações covalentes se formam entre grupos amino de uma mesma molécula de enzima com grupos aldeído do suporte. Esses grupos aldeído que se encontram ligeiramente afastados da superfície do suporte são introduzidos através da ativação, tornando o suporte altamente reativo (GUISÁN, 1988).

Para que se estabeleçam as ligações multipontuais entre a enzima e o suporte é necessário um longo tempo de reação de imobilização, o que também pode causar distorções na estrutura da enzima prejudicando assim a atividade desta.

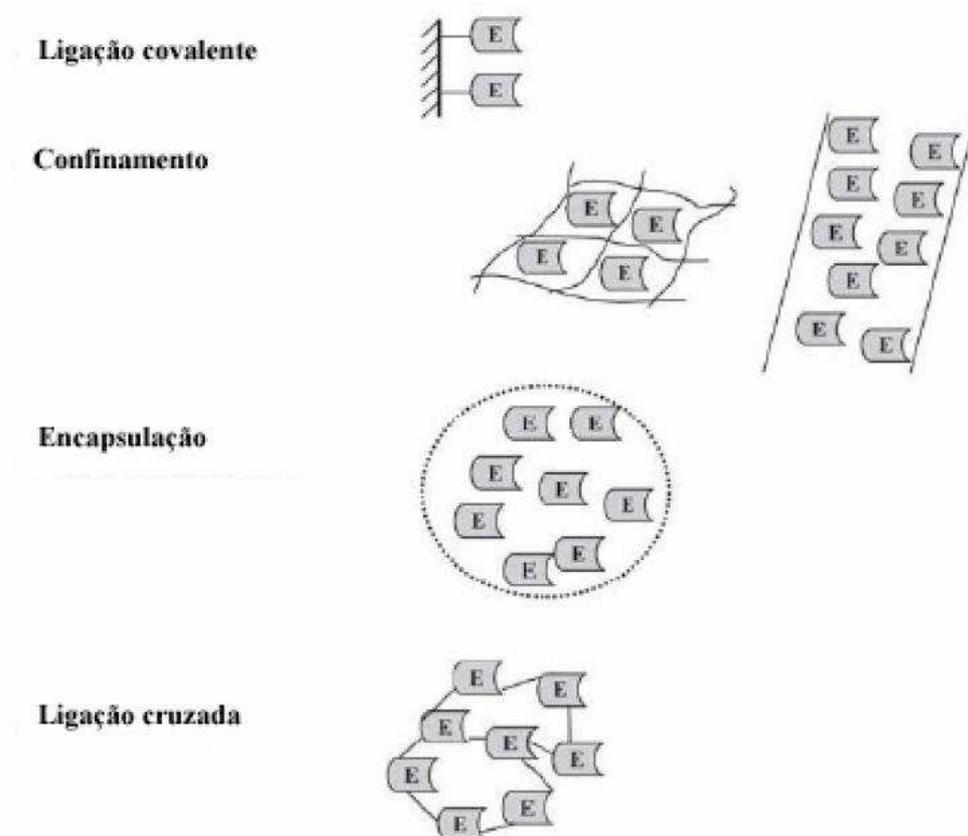


Figura 2. Classificação dos métodos de imobilização irreversíveis de enzimas (ADRIANO, 2008)

3.2.2. Efeitos Difusivos

Quando a enzima é imobilizada, o substrato tem que difundir na solução através de um filme líquido estacionário presente nas superfícies do suporte e, se este é poroso, através dos poros até alcançar o sítio ativo das enzimas (COELHO, 2008). Com isso, haverá um decréscimo na velocidade de reação e consequente perda de eficiência catalítica quando comparado à enzima livre (ADRIANO, 2008).

Assim, quando a velocidade de difusão do substrato é menor do que a velocidade de transformação do mesmo pela enzima, a velocidade observada é mais baixa do que a esperada para uma determinada enzima em solução, visto que nem todas as moléculas de enzima estarão em contato com o substrato, isto é, não se atinge a saturação (COELHO, 2008).

Para minimizar este efeito de maneira a se otimizar a produtividade e evitar a perda de biocatalisadores e produtos, aconselha-se diminuir o tamanho da partícula para minimizar a difusão interna, reduzir a carga enzimática, além de promover a ligação da enzima preferencialmente na superfície do suporte (ADRIANO, 2008).

Na difusão externa, difusão e reação são fenômenos em série; no interior da partícula vão ocorrendo difusão e reação ao mesmo tempo, com a velocidade de reação sendo função do diâmetro da partícula. Assim, a velocidade global aparente é uma velocidade média obtida pela integração dessa velocidade ao longo do raio do suporte.

A velocidade real no poro depende da concentração do substrato de fato existente no poro. Para que se possa avaliar se o processo enzimático é regido ou não por efeitos difusivos intrapartículas, pode-se calcular a efetividade interna (η_i), que relaciona a velocidade da reação real (com a enzima imobilizada) com a que deveria ser obtida na ausência de efeitos difusivos (como se a enzima estivesse livre).

Assim:

para $\eta_i \ll 1$; tem-se que a velocidade real \ll velocidade teórica; logo há resistência difusional limitando o consumo do substrato (parâmetros cinéticos aparentes).

para $\eta_i = 1$; ausência de efeitos difusivos limitando a reação (parâmetros cinéticos inerentes).

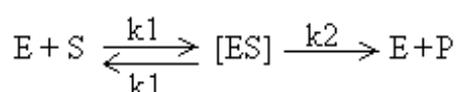
Todo o problema difusional ocorre porque há atraso no transporte de substrato para o interior da partícula, fazendo com que a concentração de substrato no interior seja menor que a concentração de substrato na superfície.

Quanto menor a concentração do substrato, mais importante se tornam os efeitos difusionais, pois a velocidade da reação se torna muito sensível a variações na concentração do substrato.

3.3. Cinética Enzimática

A cinética enzimática estuda o efeito de diferentes variáveis na velocidade da reação. Os fatores que influenciam na velocidade de uma reação enzimática são a temperatura, pH, concentração de substrato e concentração de inibidores. Quanto maior a temperatura, maior será a velocidade da reação, até se atingir a temperatura ótima, e a partir dela, a atividade volta a diminuir por desnaturação da molécula. Assim como ocorre com a temperatura, existe também um pH ótimo onde a distribuição das cargas elétricas no sítio ativo é ideal para a catálise (SCHULZ, 1994).

No que se refere ao efeito da concentração do substrato, reações enzimáticas normalmente seguem o modelo de Michaelis-Menten. A cinética da hidrólise de proteínas do soro de queijo já foi estudada por Franqui, 2002 e mostrou seguir modelo de Michaelis-Menten. O mecanismo no qual se baseou esse modelo foi proposto por Brown e teve sua formulação feita através de um brilhante tratamento matemático dado por Henri, real autor da equação freqüentemente atribuída a Michaelis Menten, que reconheceram que seus propósitos foram apenas fornecer evidência experimental ao modelo matemático formulado por Henri (SCHULZ, 1994). O mecanismo proposto por Brown (uma só enzima e um só substrato) foi:



Equação 1

sendo: E a concentração de enzima;

S a concentração de substrato;

ES a concentração do complexo de transição;

P representa o produto.

O tratamento matemático que se apresenta a seguir foi dado por Briggs & Haldane (SCHULZ, 1994), que ao formular a hipótese de estado pseudo-estacionário, permitiu que fosse obtida uma formulação mais geral da equação. A formulação de Henri, que utiliza a hipótese de equilíbrio rápido para justificar que a concentração do complexo ES permanece constante ao longo da reação só torna a equação aplicável a sistemas onde a velocidade de decomposição do produto seja muito mais lenta que a decomposição do complexo para regenerar E + S. Outras hipóteses são $S \gg E$ e decomposição do complexo em E+P irreversível (ou tomada de velocidade iniciais, situação onde a concentração de produto é muito baixa e assim também a velocidade da reação reversa também o é). Obtém-se assim a seguinte expressão matemática para a variação da velocidade da reação com a concentração de substrato:

$$v = v_{\text{máx}} \frac{C_s}{K_m + C_s}$$

Equação 2

onde: v é a velocidade de consumo de substrato;

C_s é a concentração de substrato;

$v_{\text{máx}}$ é a velocidade máxima de consumo do substrato;

K_m constante de Michaelis-Menten.

Os valores de K_m e $v_{\text{máx}}$ são dados por:

$$K_m = \frac{[S][E]}{[ES]}$$

Equação 3

onde: $[E_0]$ é a concentração inicial da enzima;

$$v_{m\acute{a}x} = k_2[E_0]$$

Equação 4

O valor da constante K_m de um substrato para uma enzima específica é característico e nos fornece um parâmetro da especificidade deste substrato em relação à enzima.

Uma forma precisa de estimar os parâmetros cinéticos de uma reação enzimática é o método das velocidades iniciais, onde a velocidade é medida para um curto tempo de reação em que apenas a concentração inicial de substrato que está sendo variada afete a medida. Nesse caso, mesmo que haja inibição pelos produtos da reação, no curto tempo de reação considerado as concentrações dos produtos inibidores são muito pequenas e podem ser desprezadas, podendo-se considerar que o modelo clássico de Michaelis-Menten representa bem a influência da concentração do substrato na velocidade da reação. O aumento da concentração dos produtos (oligopeptídeos gerados pela hidrólise das ligações peptídicas pela protease) em função do tempo, determinado para curto intervalo de tempo, permite a determinação da velocidade inicial da reação para cada concentração inicial de proteína, obtida como o coeficiente angular da reta ajustada aos pontos de concentração de produto em função do tempo. O modelo de Michaelis-Menten pode então ser ajustado aos pontos experimentais de velocidade inicial em função da concentração do substrato. Os valores dos parâmetros $v_{m\acute{a}x}$ e K_m que melhor façam o modelo se ajustar aos pontos experimentais são aceitos como as melhores estimativas (SCHULZ, 1994).

3.4. Suportes para Imobilização

Os suportes podem ser orgânicos ou inorgânicos, sintéticos ou naturais (COELHO, 2008). Quanto à morfologia, os suportes podem ser: porosos, não porosos e estrutura gel.

Existem suportes que necessitam de mudanças ou inclusão de grupos reativos para que a enzima possa ser imobilizada neste. Este processo é chamado de ativação do suporte (COELHO, 2008). O método de ativação do suporte mais adequado deve ser aquele que produza grupos aldeídos moderadamente afastados do suporte para evitar impedimento estérico. A principal vantagem de se utilizar grupos aldeídos deve-se à reversibilidade da ligação amino-aldeído, que facilita a imobilização da enzima sem causar importantes distorções na estrutura proteica enquanto reagem reversivelmente com grupos amino da enzima (ADRIANO, 2008).

3.4.1. Quitosana

A quitosana é a forma desacetilada da quitina, o segundo polímero mais abundante na natureza, depois da celulose. É um produto natural, de baixo custo, renovável e biodegradável e de grande importância econômica e ambiental. As carapaças de crustáceos são resíduos abundantes e rejeitados pela indústria pesqueira que, em muitos casos, as consideram poluentes. Sua utilização reduz o impacto ambiental causado pelo acúmulo nos locais onde é gerado ou estocado. Este biopolímero possui uma estrutura molecular quimicamente similar à da celulose, diferenciando-se somente nos grupos funcionais (MENDES, 2011). As estruturas da quitosana, quitina e celulose são apresentadas na figura 3.

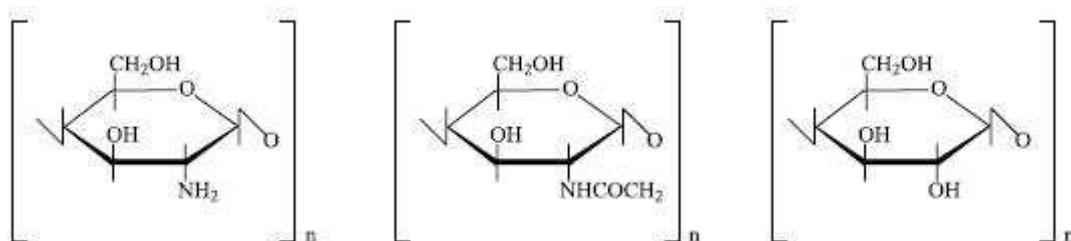


Figura 3. Estrutura dos biopolímeros quitosana, quitina e celulose (MENDES, 2011)

3.4.2. Gelatina

Gelatina é preparada pela desnaturação térmica do colágeno isolado de pele animal e ossos com ácidos diluídos. Também pode ser extraída de pele de peixes.

É uma mistura heterogênea de um ou vários polipeptídeos, entre 300-4000 aminoácidos. Há dois tipos de gelatina dependente da preparação que envolve ou não um pré-tratamento alcalino que converte asparagina e resíduos de glutamina aos seus respectivos ácidos e resultam em viscosidades mais altas (ADRIANO, 2008).

3.4.3. Utilização de *Saccharomyces cerevisiae* na Preparação de Suportes

Saccharomyces cerevisiae também conhecido como o fermento do “padeiro” ou “cervejeiro” é usado na indústria alimentícia, vinícola e cervejarias. Este fungo é um fermento geneticamente tratável e está intimamente relacionado à *Candida albicans*. Como uma consequência, torna-se um fermento modelo geralmente usado em pesquisa molecular, incluindo sequência de análise de DNA e mecanismo de ação de drogas antifúngicas (ADRIANO, 2008).

O gênero *Saccharomyces* inclui várias espécies sendo *Saccharomyces cerevisiae* a mais conhecida. Suas colônias crescem rapidamente e amadurecem em três dias. Eles são planos, lisos e úmidos. São unicelulares e gram positivos (ADRIANO, 2008).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Material

4.1.1. Suporte

Foi utilizada como suporte Quitosana em pó com grau de desacetilação de 85,2% adquirida junto a POLYMAR IND LTDA, Fortaleza, Ceará; gelatina comercial da marca Oetker®.

4.1.2. Microrganismo

Para a formação de possíveis poros e aumento da capacidade de imobilização dos suportes *Saccharomyces cerevisiae* (fermento úmido para panificação) da marca Fleischmann®.

4.1.3. Reagentes Usados para Tratamento do Suporte

Sabão em pó da marca OMO® tripla ação; Fosfato de potássio monobásico e fosfato de potássio dibásico da marca Dinâmica Química Contemporânea LTDA, utilizados como tampão; Caseína da marca SIGMA-ALDRICH BRASIL LTDA utilizada como substrato da enzima; Ácido tricloroacético para desnaturar a enzima e dar fim à reação, da marca SIGMA-ALDRICH BRASIL LTDA; Carbonato de sódio da marca Dinâmica Química Contemporânea LTDA e solução de Follin-Cicocalteu's (FC) da marca SIGMA-ALDRICH BRASIL LTDA utilizado como reagente para determinar proteínas.

4.1.4. Enzima

Neutrase® com atividade de 40,45 U/mL \pm 3,5.

4.1.5. Agente Ativante

Glutaraldeído a 25% (v/v) da marca VETEC QUÍMICA FINA LTDA.

4.2. MÉTODOS

4.2.1. Preparação das Partículas de Híbridos de Quitosana 2,5% - Gelatina 2,5%

Para a dissolução da quitosana foi utilizado ácido acético 5% (v/v) sendo adicionada, em seguida, a gelatina comercial. A solução resultante foi homogeneizada por 30 minutos. Ao sistema solubilizado foi adicionado solução de NaOH 0,1M em uma razão de 1/10 sob agitação moderada e deixado em repouso por 4 horas. Após este repouso as partículas foram lavadas com água destilada até sua neutralidade, sendo em seguida, o gel seco por filtração a vácuo (ADRIANO, 2008). Como resultado do processo foi obtido o suporte quitosana 2,5% - gelatina 2,5% sendo todas as concentrações em porcentagem massa/volume.

4.2.2. Preparação das Partículas de Híbridos de Quitosana 2,5% - Gelatina 2,5% - *Saccharomyces cerevisiae* 5,0%

A quitosana em pó foi dissolvida em ácido acético 5% v/v e a esta solução foi adicionado o seguinte polímero: gelatina comercial e posteriormente o microrganismo *Saccharomyces cerevisiae* (Sc). A solução resultante foi homogeneizada por 30 minutos.

A última etapa consistiu num tratamento com o agente lisante, sendo utilizado o sabão em pó OMO® tripla ação, o qual contém proteases e lipases secretadas por *Bacillus subtilis* e *Bacillus licheniformis*. Esse tratamento é utilizado visando à lise e retirada das células para formação de possíveis poros e aumento da capacidade de imobilização dos suportes. Após coagulação do gel em NaOH, o pH da solução coagulante foi ajustado em 9,0 e a temperatura a 40°C. Adicionou-se o sabão em pó de maneira a se alcançar uma concentração de 1% m/v e o sistema mantido sob agitação por 24 horas, sendo depois, o gel lavado com água destilada até sua neutralidade, em seguida, o gel seco por filtração a vácuo (ADRIANO, 2008). Como resultado do processo, foi obtido o suporte quitosana 2,5% - gelatina 2,5% - *Saccharomyces cerevisiae* 5% sendo todas as concentrações em porcentagem massa/volume.

4.2.3. Ativação dos Suportes Utilizando Glutaraldeído

A ativação dos suportes foi realizada com glutaraldeído 5% v/v em tampão fosfato de potássio 0,1M, pH 8,0 por 1 h a 25°C (razão Vgel/Vtotal de 1/10). O glutaraldeído funciona como agente ativante para facilitar a imobilização da enzima e para evitar a dessorção da mesma. Depois de ativadas as partículas são lavadas com excesso de água destilada para retirar o excesso de glutaraldeído e filtração a vácuo (ADRIANO, 2008).

4.2.4. Imobilização da Neutrase®

Uma vez ativados os suportes, foram medidas as massas e adicionados 10 mL de uma solução tampão fosfato de potássio 100mM e 0,1mL de enzima Neutrase® e submetidos à agitação por 3 h a 25°C, de modo que a carga oferecida de enzima fosse 10 U/g de suporte.

4.2.5. Determinação da Atividade da Neutrase®

Para simular as condições da hidrólise das proteínas do leite, o procedimento de obtenção de atividade da Neutrase® consistiu em adicionar 0,1mL de solução enzimática a 3mL de solução de caseína 4% (m/v) em tampão fosfato de potássio 100mM de pH 8,1, durante 7 minutos a 50°C; a reação foi interrompida com a adição de 1,0 mL de ácido tricloroacético (TCA) 17% (m/v). A proteína não hidrolisada precipitou na presença do TCA, podendo assim, ser quantificada a massa de proteína que foi hidrolisada pela enzima, e com isto, a medição da atividade catalítica da Neutrase® (CHINELATE, 2013).

O método escolhido para a quantificação da atividade enzimática da Neutrase® foi o colorimétrico, sendo utilizado 1,0mL do sobrenadante centrifugado da reação de hidrólise, obtido após centrifugação de 2000 rpm por 3 minutos, junto com 3mL de carbonato de sódio 2% (m/v) e 1,0mL de solução Follin-Cicalteu's (FC) com diluição de 1:2 (v/v) em água destilada, durante 45 minutos, e logo, realizou-se a leitura em espectrofotômetro a 700nm, descrito por Ortega (2009), onde o fator de conversão é utilizado para que a unidade da atividade enzimática que hidrolisa a caseína em pH 8,1 a 50°C fique em $\mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{mL}^{-1}$ (U/mL). Sendo 1U correspondente a 1 μmol de tirosina produzida por minuto em 1 mL de extrato pH 8,1 a 50°C.

Com o valor da absorvância medido pelo espectrofotômetro foi obtida a concentração de tirosina [Tyr] (produto da hidrólise), pela Equação 5:

$$[Tyr] = \frac{abs - 0,0332}{5,9885} \quad \text{Equação 5}$$

Substituindo o valor encontrado pela Equação 5 na Equação 6, tem-se a atividade enzimática (Ativ).

$$Ativ = \frac{[Tyr] \times Vr \times 5520}{Ve \times Tr} \quad \text{Equação 6}$$

Onde, Vr é o volume do reator.

Ve é o volume da enzima.

Tr é o tempo de reação.

Com o intuito de avaliar o processo de imobilização, quantificou-se a atividade hidrolítica da solução de enzima oferecida ao suporte (ATO = atividade no tempo zero), do sobrenadante ao final do processo (ATI = atividade teórica de imobilização) e do derivado obtido (AAP = atividade aparente do derivado). A partir destes dados foi possível calcular a atividade recuperada (ARec) e o rendimento da imobilização (RI), sendo calculados segundo as equações a seguir. RI é definida como o percentual de atividade enzimática que desapareceu no sobrenadante e imobilizada no suporte (Equação 7). ARec é a relação entre a atividade da enzima aparente, obtida pela medida direta da atividade do derivado e a diferença entre atividade no sobrenadante antes e depois da imobilização (Equação 8), que pode ser considerada como atividade teórica derivada (RODRIGUES, 2008).

$$RI = \frac{ATI}{ATO} \times 100 \quad \text{Equação 7}$$

$$ARec (\%) = \frac{AAP}{ATI} \times 100 \quad \text{Equação 8}$$

4.2.7. Ensaios de Estabilidade Térmica

Amostras de Neutrase livre e imobilizadas foram incubadas em tampão fosfato de potássio 100 mM em pH 8,1 a 60°C. Periodicamente, alíquotas foram retiradas e as suas atividades residuais analisadas. A constante de desativação térmica para cada derivado foi calculada de acordo com o modelo de ordem 1 proposto por Belver (2008) (Equação 9). Medindo-se, enfim, a atividade da enzima imobilizada através de método colorimétrico.

$$a = e^{-kdx} \quad \text{Equação 9}$$

Calculou-se o tempo de meia vida da enzima ($t_{1/2}$) que é definido como o tempo necessário para que ocorra uma redução de 50% da atividade inicial, expresso em unidade de tempo, a partir da Equação 6, utilizando o parâmetro Kd estimado a partir da Equação 10:

$$t_{1/2} = \frac{\ln(0,5 - \alpha)}{kd \times (1 - \alpha)} \quad \text{Equação 10}$$

Calculou-se, também, o Fator de Estabilização (FE), tendo os valores do tempo de meia vida da enzima solúvel e do derivado é possível calcular o fator de estabilização da enzima imobilizada. O fator de estabilidade é definido como a razão entre os tempos de meia vida do derivado e da enzima solúvel conforme Equação 11:

$$FE = \frac{t_{1/2} \text{ derivado}}{t_{1/2} \text{ enzima solúvel}} \quad \text{Equação 11}$$

Em que, FE é o fator de estabilidade, $t_{1/2}$ derivado é o tempo de meia-vida do derivado e $t_{1/2}$ enzima solúvel é o tempo de meia-vida da enzima solúvel.

4.2.8. Ensaios de Carga Máxima

Após a avaliação do melhor biocatalizador, diferentes cargas de enzima foram imobilizadas, numa faixa de 10 a 200 (U/g de suporte). As soluções de enzimas foram preparadas em tampão fosfato de potássio 100mM a pH 10.

Uma massa de quitosana foi adicionada a 10mL da solução de enzima, no qual o sistema era submetido a uma agitação de 30 rpm durante 3 horas a uma temperatura de

25°C. Ao fim desse período o biocatalizador foi lavado com água destilada e filtrado a vácuo.

4.2.9. Parâmetros Cinéticos

A Equação 12 utilizada para a obtenção das velocidades máximas e das constantes cinéticas é a do modelo cinético de Michaelis-Menten (CHINELATE, 2013).

$$v (S) = \frac{V_{max} \times S}{K_m + S}$$

Equação 12

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Caracterização dos Suportes Quitosana 2,5% - Gelatina 2,5% e Quitosana 2,5% - gelatina 2,5% - *Saccharomyces cerevisiae* 5%

Os suportes de quitosana 2,5% - gelatina 2,5% (Q 2,5% - G 2,5%) e quitosana 2,5% - gelatina 2,5% - *Saccharomyces cerevisiae* 5% (Q 2,5% - G 2,5% - Sc 5,0%) foram preparados e ativados com glutaraldeído, em seguida imobilizados de acordo com o descrito no item 4.2 .

O suporte quitosana 2,5% - gelatina 2,5% - *Saccharomyces cerevisiae* 5% comparado ao suporte quitosana 2,5% - gelatina 2,5% apresentou melhor rendimento de imobilização (76% e 36%, respectivamente), o inverso ocorreu com a atividade recuperada, que apresentou valor superior para o suporte quitosana 2,5% - gelatina 2,5% quando comparada ao suporte quitosana 2,5% - gelatina 2,5% - *Saccharomyces cerevisiae* 5% (52% e 13%, respectivamente) como pode ser observado na Tabela 1, porém a atividade aparente do suporte com *Saccharomyces cerevisiae* foi melhor devido à produção de poros no suporte, facilitando a difusão do substrato nos interstícios do gel, pois o *S. cerevisiae* quando retirado do suporte pelo tratamento com o sabão, produz aumento do tamanho dos poros e, conseqüentemente, aumento do espaço para imobilização.

Outro parâmetro expresso na tabela 1 é o fator de estabilidade (FE). Observa-se que os dois suportes apresentaram resultados significativos, o que demonstra, o quão benéfica é a imobilização.

Tabela 1. Parâmetros de imobilização de Neutrase® em quitosana 2,5% - gelatina 2,5% (m/v) e quitosana 2,5% - gelatina 2,5% - *Saccharomyces cerevisiae* 5% em pH 10,0 a 25°C durante 3 horas de imobilização. Carga enzimática oferecida 10,7 U/g gel e 22,6 U/g gel

Suporte	RI (%)	At teoricamente imobilizada (U/g)	At recuperada (%)	At aparente (U/g)
Quitosana-Gelatina	36	3,85	52	1,87
Quitosana-Gelatina-Sc	76	17,18	13	2,23

O mesmo foi observado por Adriano (2008), que justifica o fato pela alta reatividade do glutaraldeído, visto que o autor fez uso de diferentes agentes ativadores.

5.2. Estudo da Estabilidade Térmica

Após a escolha do melhor biocatalisador, o mesmo foi avaliado quanto a sua estabilidade térmica em temperatura de 60°C, conforme estimaram Ortega *et al.*, (2009), determinando o $t_{1/2}$ (tempo de meia via), fator de estabilidade térmica (FE), bem como a constante de desnaturação térmica K_d , aplicando o modelo de Sadana-Henley (1987), indicados por meio da Tabela 2.

Tabela 2. Parâmetros de estabilidade térmica da imobilização da Neutrase® em suporte de quitosana 2,5% - gelatina 2,5% - *Saccharomyces cerevisiae* 5% ativado por glutaraldeído: ($t_{1/2}$) tempo de meia-vida e (FE) fator de estabilização a 60°C. Valores estimados para as constantes de desnaturação térmica (K_d), em função da temperatura, aplicando modelo de Sadana-Henley (1987)

Biocatalizadores	Sadana e Henley (1987)	$t_{1/2}$ (h)	FE
	$K_d^{h^{-1}}$		
Neutrase solúvel	0	0,006	1
Quitosana 2,5% - Gelatina 2,5%	0,20	3,38	514
Quitosana 2,5% – Gelatina 2,5% - Sc 5,0%	0,20	3,37	513

Os derivados apresentaram altos fatores de estabilidade térmica. Esses resultados podem ser explicados pela interação entre os polímeros na formação do suporte, como também pela alta reatividade dos grupos aldeído do glutaraldeído, que o torna muito versátil, sendo utilizado em condições muito diferentes (RODRIGUES, 2008).

5.3. Parâmetros de Carga Máxima

A capacidade máxima de imobilização é uma propriedade importante de um suporte, pois visa à saturação do mesmo com a maior quantidade de enzima possível, para diminuir a quantidade de derivado no reator. Na tabela 1, observa-se que o derivado com maior quantidade de enzima imobilizada foi quitosana 2,5% - gelatina 2,5% - Sc 5,0%, sendo este suporte escolhido para a realização de ensaios de estabilidade térmica, carga máxima e estudo cinético por apresentar maior atividade aparente e rendimento de imobilização.

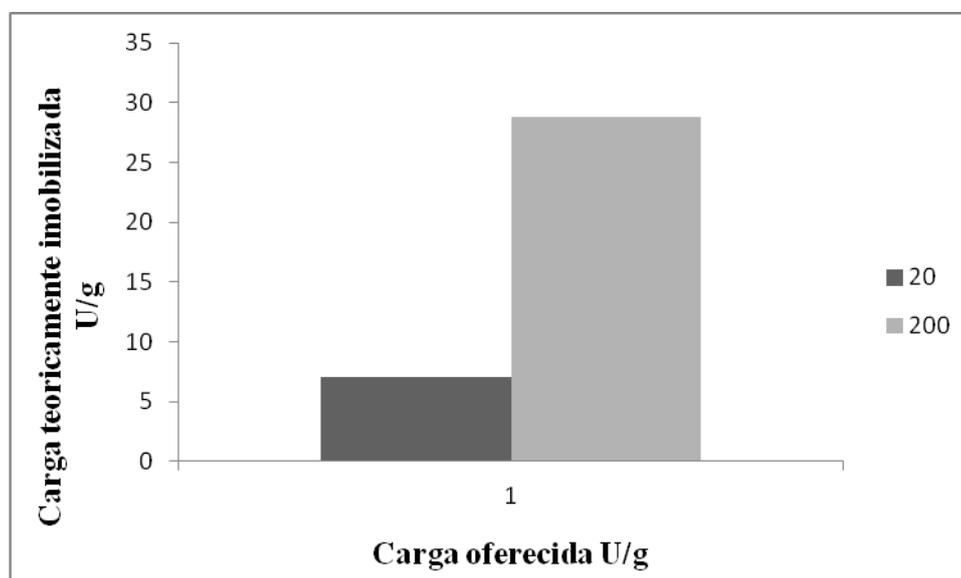


Figura 4. Neutrase® teoricamente imobilizada (U/g de gel) em função da carga de enzima oferecida

Na Figura 4 são apresentados os resultados, onde observa-se que, mesmo oferecendo 200 U/g de gel, o suporte não chegou ao seu ponto de saturação, tendo uma imobilização de 28,8 U/g de gel. A explicação está possivelmente relacionada à natureza porosa do suporte, que com sua grande área superficial, possibilita que grande quantidade de enzima seja imobilizada. Sendo, portanto a quitosana um suporte bastante eficaz para imobilização e viável pelo baixo custo e grande disponibilidade no país (CHINELATE, 2013).

5.4. Estudo Cinético

Com o modelo de Michaelis-Menten (equação 8) determinou-se a velocidade máxima da reação e a constante de Michaelis-Menten. Para isso foram usados diferentes concentrações de substratos e usando-se enzima livre e imobilizada com carga oferecida de 10 U/g de gel, como pode ser observado na Tabela 3.

Segundo Carvalho (2011) citado por Chinelate (2013), a concentração de substrato é um fator de grande influência sobre a velocidade de hidrólise, não só por razões cinéticas, mas também porque altas concentrações de sólidos agem sobre a eficácia de mistura e sobre as resistências ao transporte de massa.

Tabela 3. Parâmetros cinéticos da enzima livre e imobilizada

Neutrase	Km (g.L ⁻¹)	Vmax (U.mL ⁻¹)	R ²
Enzima Livre	30,7	93,4	0,990
Enzima Imobilizada	4,3	6,0	0,980

As figuras 5 e 6 mostram o ajuste que foi dado com a equação 3 para as diferentes concentrações de substratos, tanto para enzima livre como também para a carga oferecida de 10 U/g de gel. Nota-se que a equação de Michaelis- Menten se ajustou bem aos pontos experimentais. Com R² de 0,990 e 0,980 para enzima livre e enzima imobilizada respectivamente (Tabela 3).

Ortega *et al.*, (2009) citado por Chinelate (2013) realizou o estudo cinético com Neutrase® imobilizada em alginato e observou que a protease imobilizada teve uma constante de Michaelis maior que a enzima solúvel. Segundo o autor o aumento no Km na enzima imobilizada indica que essa tem uma afinidade aparentemente mais baixa que a enzima livre, o que pode ser causado pelo impedimento estérico do sítio ativo pelo suporte ou uma perda de flexibilidade de enzima necessária para a ligação do substrato. O mesmo não foi observado no trabalho realizado.

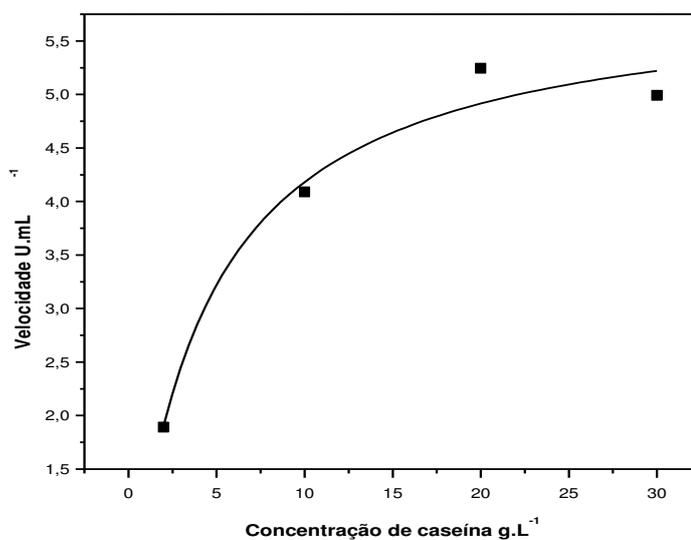


Figura 5. Ajuste do modelo de Michaelis-Menten para a reação de hidrólise da caseína (enzima imobilizada) 10 U/g suporte a 60° C pH 10,0

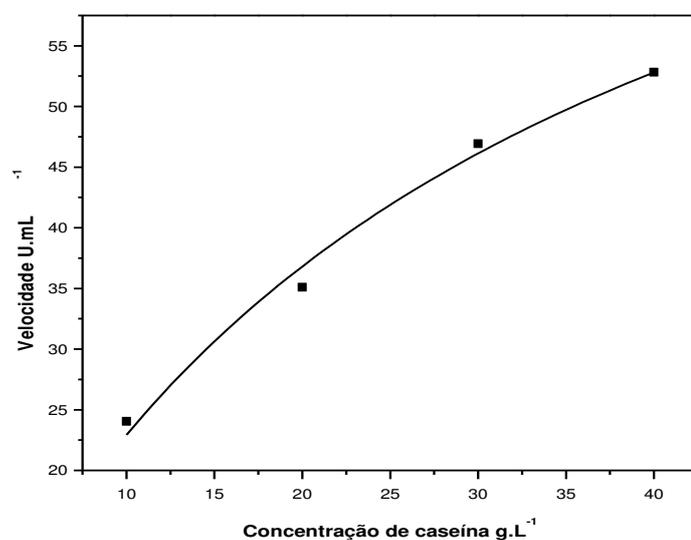


Figura 6. Ajuste do modelo de Michaelis-Menten para a reação de hidrólise da caseína (enzima livre) 10 U/g suporte a 60° C pH 10,0

6. CONCLUSÃO

O suporte quitosana 2,5% - gelatina 2,5% - *Saccharomyces cerevisiae* 5% mostrou ser um promissor suporte para imobilização da Neutrase®, no qual não se chegou ao ponto de saturação mesmo tendo oferecido uma carga de 200 U/g suporte. Sendo um resultado esperado pela natureza de alta porosidade do suporte, oferecendo uma elevada área superficial por unidade de área para imobilização da enzima.

Como o substrato tem uma grande massa molar esperava-se, devido a isso, grandes efeitos estéricos que causariam à caseína grandes restrições difusionais, impossibilitando que esta pudesse reagir com a enzima imobilizada no interior do suporte. Isso não foi confirmado pelos dados experimentais.

Os estudos cinéticos vêm a confirmar os efeitos estérico no qual a restrição difusional ao substrato está diretamente relacionada à velocidade da reação. Já que nem todas as moléculas de enzimas estarão disponíveis para reagir com o substrato.

7. REFERÊNCIAS

ADRIANO, Wellington Sabino. **Preparação e caracterização de derivados de enzimas industriais em quitosana**. 2008. 162 f. Tese – (Doutorado em Engenharia Química) – Centro de Ciências Exatas e Tecnologia, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2008.

BELVER C.; TAMAYO J. J.; MOLINERO, L.; LADERO, M.; PESSELA, B. C. C.; GUISÁN, J. M.; GARCIA-OCHOA, F., 2008, Immobilization-stabilization of Candida Antarctica Lipase B in Agarose-glyoxyl and Agarose-octyl: Deactivation Kinetics. **Chemical Engineering Transactions**, 14, 329-336.

BEZERRA, F. B.; NOGUEIRA, J. A. M.; MAMMARELLA, J. E.; ADRIANO, W. S.; GONÇALVES, L. R. B. Caracterização de um Biocatalisador preparado pela imobilização de Neutrase em Quitosana. In: **XIX Congresso Brasileiro de Engenharia Química**, 2012.

BEZERRA, F. B.; NOGUEIRA, J. A. M.; MAMMARELLA, J. E.; ADRIANO, W. S.; GONÇALVES, L. R. B. Imobilização de Neutrase em Quitosana: caracterização do biocatalisador. In: **VI Workshop de Biocatálise e Biotransformação**. 2012.

BOUDRANT, J.; CHEFTEL, C. Continuous proteolysis with a stabilized protease. II. Continuous experiments. **Biotechnology and Bioengineering**, v.18, p. 1735-1749, 1979.

CABRAL, J. M. S.; AIRES-BARROS, M. R.; GAMA, M. **Engenharia Enzimática – Lidel**, 2003. 272p.

CARVALHO, M. L. **Estudo cinético da hidrólise enzimática de celulose de bagaço de cana-de-açúcar**. 2011. 102 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Centro de Ciências Exatas e Tecnológicas, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2011.

CHINELATE, G. C. B. **Estudo da Imobilização das Enzimas Neutrase e L-Arabinose Isomerase em Suportes de Baixo Custo - (DOUTORADO) - Fortaleza: RENORBIO: Programa de Pós-Graduação**, 2013. 130p.

COELHO, M. A. Z.; SALGADO, A. M.; RIBEIRO, B. D. **Tecnologia Enzimática – Rio de Janeiro: FAPERJ: EPUB**, 2008. 288p.

DRYÁKOVÁ, A.; PIHLANTO, A.; MARNILA, P.; CURDA, L.; KORHONEN, H.J.T. Antioxidant properties of whey protein hydrolysates as measured by three methods. **Eur Food Res Technol.** 230:865–874, 2010.

FLANDRIN, J.L. & MONTANARI, M.; **História da Alimentação**; 1ª Edição, 1996; Editora Estação Liberdade

GIORNO, L. & DRIOLI, E.; **Biocatalytic membrane reactors: applications and perspectives**, TBTech 18, pp. 339-349, 2000.

GUISÁN, J. M.; Aldehyde-agarose gels as activated supports for immobilization-stabilization of enzymes, **Enzyme and Microbial Technology.** 10, pp.375-382, 1988.

KUMAR, G.; BRISTOW, J.F.; SMITH, P.J. and PAYNE, G. F. **Enzymatic gelation of the natural polymer chitosan.** Polymer 41: 2157–2168, 2000.

LAMAS, E.; BARROS, R.M.; BALCÃO, V.M.; MALCATA, F. X.; Hydrolysis of whey proteins by proteases extracted from *Cynara cardunculus* and immobilized onto highly activated supports, **Enzyme and Microbial Technology.** 28, pp. 642-652, 2001.

MENDES, A. A.; OLIVEIRA, P. C.; CASTRO, H. F.; GIORDANO, R. L. C. Aplicação de Quitosana como suporte para a imobilização de enzimas de interesse industrial. **Química Nova**, Vol. 34, No. 5, 831-840, 2011.

ORTEGA, N.; PEREZ-MATEOS, M.; PILAR, M.C.; BUSTO M.D., 2009, Neutrase immobilization on alginate-glutaraldehyde beads by covalent attachment. **Journal of Agricultural and Food Chemistry.** 57, 109-115.

RODRIGUES D. S.; MENDES A. A.; ADRIANO W. S.; GONÇALVES L. R. B.; GIORDANO R. L.C., 2008, Multipoint covalent immobilization of microbial lipase on chitosan and agarose activated by different methods. **Journal of Molecular Catalysis. B, Enzymatic**, 51, 100-109.

TARDIOLI, P.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; GUISÁN, J.M.; GIORDANO, R.L.C.; Design of New Immobilized-Stabilized Carboxipeptidase A Derivative for Production of Aromatic Free Hydrolysates of Proteins; **Biotechnology** 19; pp.565-574, 2003.

TARDIOLI, P.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; GUISÁN, J.M.; GIORDANO, R.L.C.; Hydrolysis of Proteins by Immobilized-Stabilized Alcalase-Glyoxyl Agarose; **Biotechnology** 19, pp.352-360, 2003.

SCHMIDT, D.G.; POLL, J.K. 1991. Enzymatic hydrolysis of whey proteins. Hydrolysis of α -lactoalbumin and beta-lactoglobulin in buffer solutions by proteolytic enzymes. **Netherlands Milk and Dairy Journal**. 45: 225-240.

SCHULZ, A.R. **Enzyme Kinetics from diastase to multi-enzyme system**. Cambridge University Press, 1994.

VIOQUE, J.; SANCHEZ-VIOQUE, R.; CLEMENTE, A.; PEDROCHE, J.; MILLAÑ, F. Partially hydrolyzed rapeseed protein isolates with improved functional properties. **Journal. American Oil Chemistry. Soc.**, 77, 447–450, 2000.