



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

**IMOBILIZAÇÃO ENZIMÁTICA DE NEUTRASE® EM SUPORTES  
HÍBRIDOS DE QUITOSANA - ALGINATO DE SÓDIO - *Saccharomyces  
cerevisiae***

IGO LIBERATO DA SILVA OLIVEIRA

CUITÉ – PB

2014

IGO LIBERATO DA SILVA OLIVEIRA

**IMOBILIZAÇÃO ENZIMÁTICA DE NEUTRASE® EM SUPORTE  
HÍBRIDO DE QUITOSANA - ALGINATO DE SÓDIO - *Saccharomyces  
cerevisiae***

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

Orientador: Prof. Dr. Wellington Sabino  
Adriano

CUITÉ – PB  
2014

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

O48i Oliveira, Igo Liberato da Silva.

Imobilização enzimática de neutrase® em suportes híbridos de quitosana – alginato de sódio – *Saccharomyces cerevisiae*. / Igo Liberato da Silva Oliveira. – Cuité: CES, 2014.

43 fl.

Monografia (Curso de Graduação em Farmácia) – Centro de Educação e Saúde / UFCG, 2014.

Orientador: Wellington Sabino Adriano.

1. Atividade enzimática. 2. Imobilização. 3. Neutrase®. I.  
Título.

CDU 577.1

IGO LIBERATO DA SILVA OLIVEIRA

**IMOBILIZAÇÃO ENZIMÁTICA DE NEUTRASE® EM SUPORTE HÍBRIDO DE  
QUITOSANA - ALGINATO DE SÓDIO - *Saccharomyces cerevisiae***

Comissão Examinadora

Trabalho de Conclusão de Curso para a obtenção do grau de Bacharel em Farmácia

Aprovado em, \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

---

Prof. Dr. Wellington Sabino Adriano  
Orientador/Presidente

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Emília da Silva Menezes  
Membro da Comissão

---

Prof. Dr. Wylly Araújo de Oliveira  
Membro da Comissão

CUITÉ – PB  
2014

Dedico este trabalho aos meus pais Francisco Genário e Maria Nonata e aos meus irmãos José Dihego e Luana Ísis. Juntos muito aprendemos e crescemos sempre orientados com base no respeito, honestidade e verdade e vendo a determinação de nossos pais tivemos coragem para caminhar até onde chegamos.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, pela vida, pela família, pelas oportunidades e pelos dons concedidos.

Ao professor Dr. Wellington Sabino Adriano, pela orientação fornecida e pela disponibilização de tempo para discussão sobre o andamento da pesquisa e a obtenção dos resultados.

A Gilson dos Santos pela passagem de experiências sobre experimentos de laboratório, que contribuíram para um melhor desempenho na pesquisa.

Ao Centro de Educação e Saúde da Universidade Federal de Campina Grande pela oportunidade de formação de boa qualidade e pela disponibilização dos laboratórios para realização de pesquisa.

Aos professores que contribuíram decisivamente para minha formação e pela atenção e acessibilidade prestada.

A todos os funcionários que compõem o campus de Cuité.

A cidade de Cuité pelo acolhimento e pelo respeito que a cidade tem para com a universidade.

E a todos amigos que contribuíram nessa jornada e demais pessoas que aqui tenha deixado de mencionar.

Meus sinceros agradecimentos.

## RESUMO

A imobilização enzimática constitui-se uma alternativa para ampliação do emprego industrial de enzimas. A imobilização consiste em confinar através de métodos químicos e/ou físicos, a enzima em uma porção do espaço, tornando-a física ou quimicamente associada a um suporte ou matriz, sendo uma das vantagens do processo, a maior conservação da capacidade catalítica da enzima por um maior período de tempo. A enzima Neutrase® é uma protease e tem seu emprego na hidrólise de proteínas do soro do queijo, levando a obtenção de derivados com propriedades funcionais atrativas para preparação de alimentos destinados a dietas especiais, em especial para pessoas com falhas congênitas no metabolismo de proteínas. Este trabalho teve como objetivo base, a caracterização da imobilização de Neutrase® em termos de parâmetros de imobilização, estabilidade térmica e cinética enzimática, nos suportes quitosana 2,5% - alginato de sódio 2,5% e quitosana 2,5% - alginato de sódio 2,5% - *Saccharomyces cerevisiae* 5%, ambos ativados com epicloridrina. A imobilização foi conduzida a temperatura de 25°C, pH 10 e sob agitação por 3 horas. Os ensaios para catálise foram realizados a 50°C. A estabilidade térmica foi analisada a temperatura de 60°C. A medição da atividade foi baseada na formação do aminoácido tirosina que teve sua quantificação por método espectrofotométrico a 700nm. A imobilização em quitosana 2,5% - alginato de sódio 2,5% apresentou rendimento de imobilização (RI%) de 84%, atividade recuperada (Arec%) de 23%, fator de estabilização (FE) de 29,4 e velocidade máxima (V<sub>máx</sub>) de 3,8 U/mL. O suporte quitosana 2,5% - alginato de sódio 2,5% - *Saccharomyces cerevisiae* 5%, teve RI% de 44%, Arec% de 86%, FE de 394,6 e V<sub>máx</sub> de 23,8 U/mL, mostrando ser o suporte com maiores benefícios para enzima após imobilização.

**Palavras-Chave:** Imobilização, Neutrase®, Suporte, Atividade Enzimática.

## ABSTRACT

The enzyme immobilization constitutes an alternative to increase the use of enzymes in the industry. The immobilization consists in the confinement, by chemical and/or physical methods, of a enzyme in a portion of space, making it physically or chemically associated to a support or matrix. A major advantage of this process is the retainment of the enzyme's catalytic ability for a longer period of time. The Neutrase® enzyme is a protease, which is used in the cheese's protein hydrolysis to obtain certain derivatives whose functional properties are attractive in the production of supplements for special diets, especially for individuals with congenital deficiencies in protein metabolism. The main goal of this work is to characterize the immobilization of Neutrase® in terms of parameters of immobilization, thermal stability and enzyme kinetics, in the supports of chitosan 2,5% - sodium alginate 2,5% and chitosan 2,5% - alginate sodium 2,5% - *Saccharomyces cerevisiae* 5%, both activated with epichlorohydrin. Immobilization was performed at 25 ° C, pH 10 and stirring for three hours. The catalysis assays were performed at the temperature of 50 ° C. The thermal stability was evaluated at 60 ° C. The measurement of the activity was based on the formation of the amino acid tyrosine, which had its quantification assessed by spectrophotometric method at 700nm. The immobilization on chitosan 2,5% - sodium alginate 2,5%, had a immobilization rate (RI%) of 84%, the recovered activity (Arec%) of 23%, the stabilization factor (EF) of 29,4 and the maximum speed (Vmax) of 3,8 U/mL. The support chitosan 2,5% - sodium alginate 2,5% - *Saccharomyces cerevisiae* 5%, had RI% 44%, Arec% 86%, EF 394,6 and Vmax of 23,8 U/mL, resulting in the substrate with the greater benefits for the enzyme application after immobilization.

**Keywords:** Immobilization, Neutrase®, Support, Enzyme Activity.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Representação esquemática da hidrólise de uma ligação peptídica catalisada por uma protease .....	16
<b>Figura 2.</b> Classificação dos métodos de imobilização reversíveis de enzimas .....	18
<b>Figura 3.</b> Classificação dos métodos de imobilização irreversíveis de enzimas .....	18
<b>Figura 4.</b> Estrutura dos biopolímeros quitosana, quitina e celulose, respectivamente .....	22
<b>Figura 5.</b> Estrutura química do alginato. G é o grupo do ácido gulurônico e M é o grupo do ácido manurônico.....	23
<b>Figura 6.</b> Sistema de imobilização/estabilização por ligação covalente multipontual com ativação via epícloridrina .....	25
<b>Figura 7.</b> Ativação via epóxidos .....	26
<b>Figura 8.</b> Gráfico de ajuste do modelo de Sadana-Henley (1987) para estabilidade térmica de Neutrase® imobilizada em suporte de quitosana 2,5% - alginato de sódio 2,5% .....	34
<b>Figura 9.</b> Gráfico de ajuste do modelo de Sadana-Henley (1987) para estabilidade térmica de Neutrase® imobilizada em suporte de quitosana 2,5% - alginato de sódio 2,5% - <i>Saccharomyces cerevisiae</i> 5%.....	35
<b>Figura 10.</b> Ajuste do modelo de Michaelis-Menten para reação de hidrólise da caseína. Enzima livre.....	37
<b>Figura 11.</b> Ajuste do modelo de Michaelis-Menten para reação de hidrólise da caseína. Enzima imobilizada em quitosana 2,5% - alginato de sódio 2,5%.....	37
<b>Figura 12.</b> Ajuste do modelo de Michaelis-Menten para reação de hidrólise da caseína. Enzima imobilizada em quitosana 2,5% - alginato de sódio 2,5% - <i>Saccharomyces cerevisiae</i> 5%.....	37

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Classificação dos suportes quanto à composição .....	20
<b>Tabela 2.</b> Aspectos a serem considerados na seleção de um suporte para imobilização tendo em conta a sua morfologia.....	21
<b>Tabela 3.</b> Parâmetros de avaliação da imobilização de Neutrase® .....	32
<b>Tabela 4.</b> Parâmetros de estabilidade térmica obtidos a temperatura de 60°C .....	33
<b>Tabela 5.</b> Parâmetros cinéticos da enzima livre e imobilizada .....	36

# SUMÁRIO

## RESUMO

## ABSTRACT

## LISTA DE FIGURAS

## LISTA DE TABELAS

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	11
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	13
2.1 Geral .....	13
2.2 Específicos .....	13
<b>3. REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	14
3.1 Imobilização de Enzimas .....	14
3.2 Usos Industriais das Enzimas .....	15
3.3 Proteases/Neutrase® .....	16
3.4 Métodos de Imobilização .....	17
3.5 Suportes para Imobilização .....	19
3.5.1 Quitosana .....	21
3.5.2 Alginato de Sódio .....	23
3.5.3 Utilização de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> na Preparação dos Suportes .....	23
3.6 Ativação do Suporte .....	24
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	27
4.1 Materiais .....	27
4.1.1 Suporte .....	27
4.1.2 Enzima , Substrato e Agente Ativante .....	27
4.1.3 Reagentes Empregados no Tratamento dos Suportes e na Realização de Ensaios .....	27
4.2 Métodos .....	27
4.2.1 Preparação de Partículas Híbridas de Quitosana 2,5% ( m/v) - Alginato de Sódio 2,5% (m/v) .....	27
4.2.2 Preparação de Partículas Híbridas de Quitosana 2,5% ( m/v) - Alginato de Sódio 2,5% ( m/v) - <i>Saccharomyces cerevisiae</i> 5,0% ( m/v) .....	28

4.2.3 Ativação dos Suportes .....	28
4.2.4 Imobilização .....	29
4.2.5 Determinação da Atividade da Neutrase® .....	29
4.2.6 Avaliação do Processo de Imobilização.....	30
4.2.7 Ensaios de Estabilidade Térmica .....	30
4.2.8 Cinética Enzimática .....	31
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>32</b>
5.1 Avaliação do Processo de Imobilização dos Suportes Quitosana 2,5% - Alginato de Sódio 2,5% e Quitosana 2,5% - Alginato de Sódio 2,5% - <i>Saccharomyces cerevisiae</i> 5% .....	32
5.2 Estabilidade Térmica .....	33
5.3 Cinética Enzimática.....	35
<b>6. CONCLUSÃO .....</b>	<b>39</b>
<b>7. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>40</b>

## 1. INTRODUÇÃO

As enzimas são catalisadores biológicos, de natureza principalmente protéica, 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 biológicos (COELHO et al., 2008).

A especificidade enzimática baseia-se nas interações entre a molécula do substrato/inibidor e o sítio ativo da enzima, como, por exemplo, as ligações de hidrogênio, as interações de Van der Waals e as interações eletrostáticas. Isto ocorre somente quando várias dessas interações acontecem simultaneamente entre as duas moléculas (enzima e substrato/inibidor) em uma estrutura tridimensional (DIXON, 1979).

Do ponto de vista industrial, as enzimas apresentam características notáveis, em relação aos catalisadores químicos, devido à sua especificidade tanto por dado substrato, quanto na promoção de apenas uma reação bioquímica, permitindo a síntese de um produto específico, sem a contaminante formação de co-produtos. Dentre as vantagens existentes na utilização de enzimas, destacam-se a sua alta especificidade, as condições suaves de reação e a redução de problemas ambientais e toxicológicos (COELHO et al., 2008).

Com relação às vantagens do emprego de enzimas na indústria de alimentos, destacam-se a rapidez de ação, a inexistência de toxidez, a baixa concentração, a atuação sobre um substrato específico e o desenvolvimento de reações em temperaturas e pH's brandos, que são necessários à manutenção da estrutura desejada e outras propriedades dos alimentos (COELHO et al., 2008).

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). Por isso, a necessidade da imobilização, pois esta possibilita a utilização da atividade catalítica por um maior período de tempo, aumenta a facilidade de separação do produto final e, em alguns casos, ocorre modificação favorável das propriedades catalíticas da enzima como, por exemplo, maior estabilidade ao pH e à temperatura, entre outros (MENDES et al., 2011).

O aumento da estabilidade pode se dar em função da estabilização da estrutura da proteína ou simplesmente porque enzimas imobilizadas estão menos acessíveis a agentes desnaturantes (MARCONI, 1989).

Imobilização significa confinar ou localizar através de métodos químicos e/ou físicos, a enzima em uma porção do espaço, visando manter (de forma a maximizar) sua atividade catalítica. Portanto, entende-se por enzima imobilizada, aquela 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).

Os suportes utilizados para a imobilização de enzimas são em sua maioria, insolúveis em água e possuem alta massa molecular, sendo a maioria dos casos polímeros hidrofílicos, dentre estes se destaca a quitosana, um amino polissacarídeo formado por unidades repetidas de D-glucosamina derivado da quitina, um polímero natural encontrado nas paredes celulares de fungos, leveduras, insetos e principalmente nas carapaças dos crustáceos (ADRIANO, 2008).

Um exemplo de estudo sobre imobilização enzimática é o caso da enzima Neutrase®. A Neutrase® é uma protease que hidrolisa proteínas do soro de queijo, um subproduto poluente e descartado pelas indústrias de laticínios. A utilização desta enzima visa à obtenção de derivados com melhores propriedades nutricionais e 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 de queijo por Neutrase® leva a formação de peptídeos e aminoácidos livres que podem ser utilizados na preparação de fórmulas alimentícias infantis, produtos farmacêuticos e para nutrição esportiva (BOUDRANT e CHEFTEL, 1996).

Este trabalho propõe estudo de imobilização enzimática de Neutrase® em suporte híbrido de quitosana-alginato de sódio com o intuito verificar se esse processo é capaz de otimizar a utilização dessa enzima. Portanto justifica-se esse trabalho pela possibilidade de desenvolvimento de um suporte com características que permitam utilizar a enzima Neutrase® na hidrólise de proteínas do soro de queijo com um melhor custo-benefício.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Geral

- Caracterizar em termos de rendimento, atividade recuperada, estabilidade térmica e cinética de reação a imobilização de Neutrase® em híbridos de quitosana (quitosana - alginato de sódio e quitosana - alginato de sódio - *Saccharomyces cerevisiae*).

### 2.2 Específicos

- Produzir suportes híbridos de quitosana, utilizando alginato de sódio e *Saccharomyces cerevisiae*;
- Obter dados de rendimento de imobilização, atividade recuperada, cinética e estabilidade térmica;
- Avaliar a influência da utilização da levedura *Saccharomyces cerevisiae* no tamanho de poro e conseqüentemente no rendimento e atividade recuperada.

### 3. REFERENCIAL TEÓRICO

#### 3.1 Imobilização de Enzimas

Enzimas são biocatalisadores com excelentes propriedades tais como elevadas seletividade e especificidade, que lhes permite realizar uma grande variedade de processos químicos sob diversas condições reacionais (DIXON, 1979).

Apesar de milhares de enzimas conhecidas e de seus múltiplos usos, somente algumas se converteram em catalisadores de um processo industrial. Esta escassez de processos enzimáticos em escala industrial é o resultado da ausência de estudos integrais que solucionem os problemas existentes quando se propõe o projeto de uma reação enzimática. A modulação das propriedades de enzimas, através da imobilização em diferentes suportes, com diferentes métodos de ativação, e em diferentes condições de imobilização constitui uma alternativa tecnológica que contribui para solucionar ou atenuar os efeitos negativos das propriedades enzimáticas, possibilitando a sua utilização em um maior número de processos (CARDIAS et al., 1999).

Imobilização significa confinar ou localizar através de métodos químicos e/ou físicos, a enzima em uma porção do espaço, visando manter (de forma a maximizar) sua atividade catalítica. Portanto, entende-se por enzima imobilizada, aquela 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).

As principais vantagens obtidas pelo processo de imobilização de enzimas são: o aumento da estabilidade térmica do biocatalizador, aplicação em reatores com maior controle do processo, podendo ser usadas elevadas concentrações de enzimas, permitindo a sua reutilização sem perda significativa da sua atividade catalítica. As principais desvantagens deste processo são: alteração da conformação nativa da enzima, custo do suporte e perda de atividade durante o processo de imobilização, interação suporte enzima e a redução da atividade devido aos efeitos difusionais, de microambiente e estéricos-conformacionais (VITOLLO, 2001).

A possibilidade de reutilização ou uso contínuo, insolubilidade e estabilidade são características desejadas comercialmente, oferecidas por uma enzima quando esta se encontra imobilizada em um suporte inerte adequado (BICHERSTAFF, 1995).

As propriedades das enzimas imobilizadas são determinadas pelas características da enzima e do suporte utilizados. A interação entre os dois resulta em um biocatalizador com propriedades químicas, bioquímicas, mecânicas e cinéticas (GONÇALVES, 2001). Alguns critérios são importantes na avaliação de um sistema enzima suporte, dentre estes a estabilidade de fixação, estabilidade enzimática, resistência mecânica e capacidade de carga (COELHO et al., 2008).

Para um eficiente processo de imobilização, alguns fatores devem ser destacados, tais como: as propriedades bioquímicas da enzima, propriedades químicas do suporte, método de imobilização empregado, as características do agente bifuncional, efeitos de transporte de massa e a estabilidade do derivado obtido (ADRIANO, 2008).

Após a imobilização, as propriedades físicas e químicas da enzima podem sofrer modificações. Devem ser considerados os efeitos da imobilização sobre a estabilidade, as propriedades cinéticas e especificidade além da produtividade da enzima (MARKGLOU, 1976).

As diferenças no comportamento da enzima imobilizada, quando comparada à sua forma em solução, devem-se aos seguintes fatores: efeitos conformacionais - modificação conformacional da molécula de enzima devido à alteração na estrutura terciária do sítio ativo; efeitos estereoquímicos - uma parte da molécula da enzima é imobilizada numa posição tal que o sítio ativo é relativamente inacessível; efeitos difusionais ou de transferência de massa - têm origem na resistência de difusão do substrato até o sítio catalítico da enzima, e do produto da reação; efeitos microambientais - resultantes do método de imobilização utilizado ou da presença e natureza (hidrofóbica ou hidrofílica) do suporte na vizinhança da enzima. Todos esses fatores podem influenciar as propriedades da enzima imobilizada que adquirem novas propriedades cinéticas, modificações em seus valores de  $K_m$  (constante de Michaelis-Menten) e  $V_{máx}$  (velocidade máxima de reação enzimática), deslocamento dos valores de pH e comportamento diferente, em relação à temperatura (MARKGLOU, 2003).

### **3.2 Usos Industriais das Enzimas**

A enzimologia industrial estuda o uso de diferentes preparações enzimáticas em processos industriais e outras atividades econômicas. Com o conhecimento da natureza das enzimas e do seu poder catalítico, seu uso tem gradualmente se estendido a vários campos, tais como na produção de alimentos, na fabricação de detergentes e nas indústrias têxtil e

médico-farmacêutica, sendo que a maioria utilizada, aproximadamente 90%, é extracelular de origem microbiana. Proteases constituem 50% do mercado de enzimas microbianas (COELHO et al., 2008).

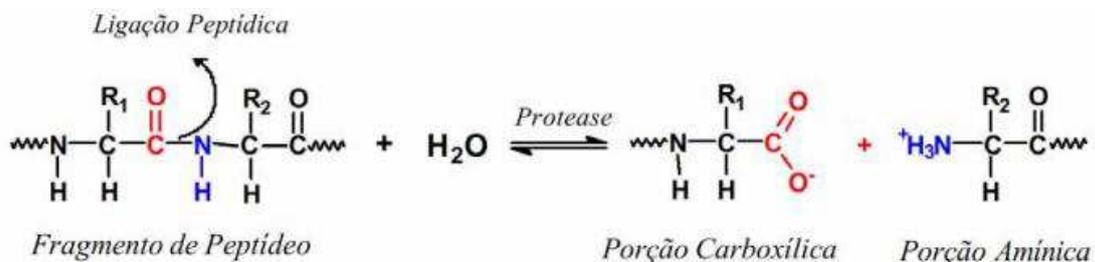
A tecnologia de enzimas é um campo multidisciplinar, e reconhecido pela Organização para a Cooperação Econômica e Desenvolvimento (OCED) como importante componente do desenvolvimento industrial sustentável. Além do campo industrial, o rápido desenvolvimento da engenharia genética, high-throughput screening entre outros, abriu novos campos de aplicação (VAN, 2002). Esse desenvolvimento tem estimulado as indústrias química e farmacêutica a utilizarem a tecnologia de enzimas com interesse concentrado nas áreas da saúde (LIANG et al., 2000).

A indústria tem expandido as possibilidades de uso de enzimas e hoje já são utilizadas nas análises de alimentos, indústria de cosméticos e síntese orgânica de enantiômeros puros. Na enzimologia clínica o incremento de novas técnicas também é crescente (COELHO et al., 2008).

### 3.3 Proteases/Neutrase®

As proteases são enzimas específicas cuja principal atividade é catalisar reações de hidrólise de proteínas. Diferem entre si principalmente por sua especificidade, sítio ativo e mecanismo catalítico (ADRIANO, 2008).

Na proteólise de uma ligação peptídica, uma molécula de água reage com um grupo carbonil peptídico e a ligação com o grupo amino do aminoácido seguinte é rompida (ADRIANO, 2008). A figura 1 abaixo ilustra este processo.



**Figura 1.** Representação esquemática da hidrólise de uma ligação peptídica catalisada por uma protease.

Fonte: TARDIOLI, 2003.

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 protéicos com propriedades nutricionais e funcionais amplamente melhoradas (VIOQUE, 2000).

Neutrase® é uma endopeptidase produzida pelo *Bacillus amyloliquefaciens* que apresenta atividade ótima na temperatura entre 45 e 55°C e entre pH 5,5 e 7,5 (DAMRONGSAKKUL et al., 2008).

A Neutrase® faz parte do grupo das proteases sendo empregada na hidrólise de proteínas do soro de queijo, um subproduto poluente e descartado pelas indústrias de laticínios. A utilização dessa enzima visa à obtenção de derivados com melhores propriedades nutricionais e 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).

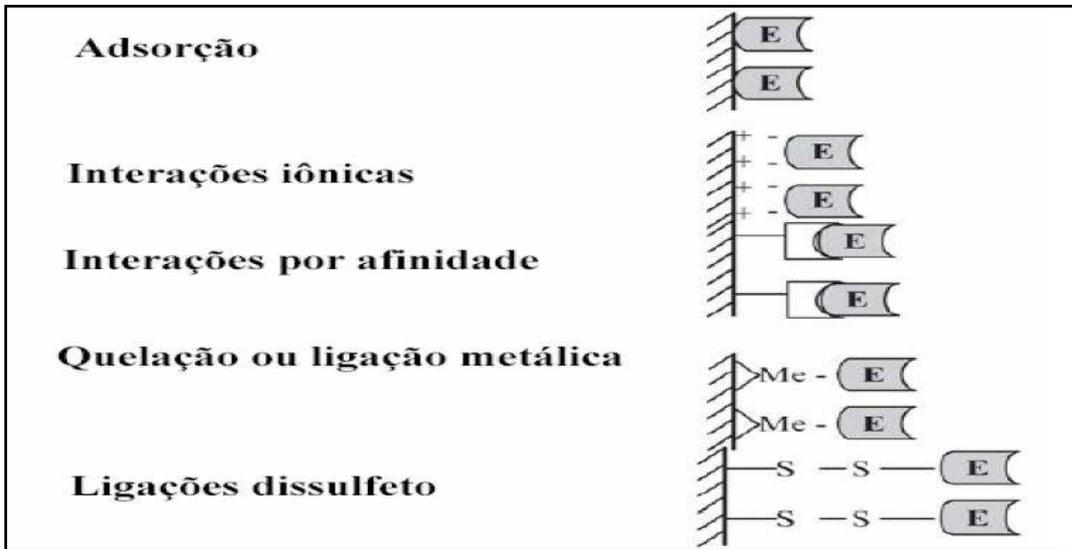
A hidrólise do soro de queijo por Neutrase® leva a formação de peptídeos e aminoácidos livres que podem ser utilizados na preparação de fórmulas alimentícias infantis, produtos farmacêuticos e para nutrição esportiva (BOUDRANT e CHEFTEL, 1996).

### **3.4 Métodos de Imobilização**

Devido à grande especificidade das reações enzimáticas, não existe uma técnica de imobilização ou suporte ideal para todos os processos de imobilização. Para uma escolha econômica do método de imobilização é necessário o conhecimento da reação desejada, o processo de aplicação da enzima imobilizada, condições do meio, modificações causadas na estabilidade, atividade, pH e demais fatores. O binômio suporte-método, mais adequado será aquele que propiciar uma maior atividade após imobilização (COELHO et al., 2008).

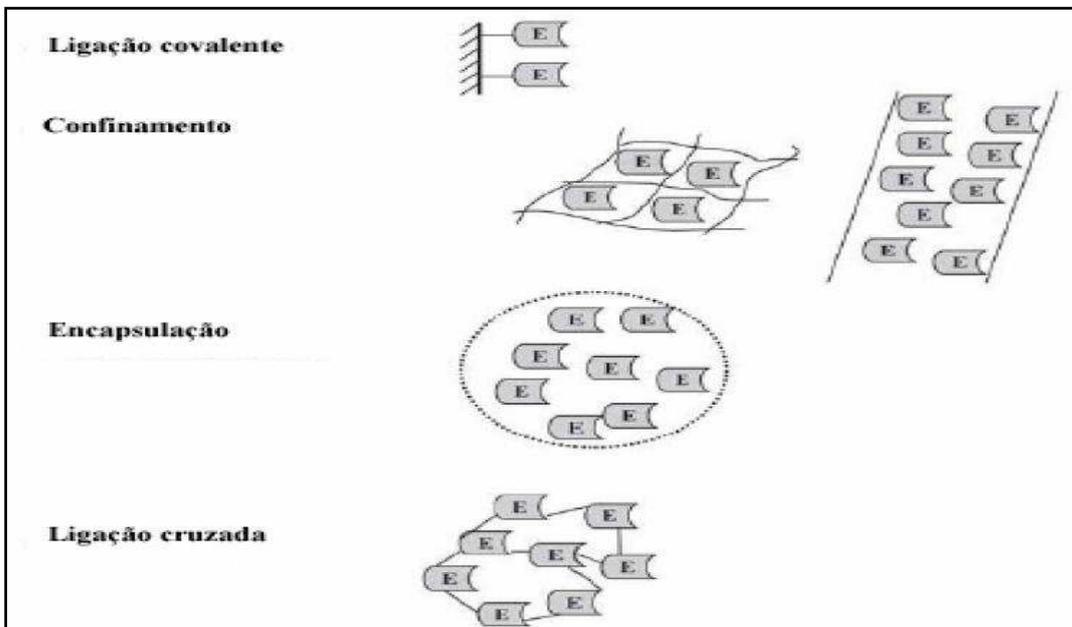
Os métodos de imobilização são subdivididos em três grupos principais. A primeira divisão baseada no modo como a imobilização foi alcançada: por confinamento num espaço limitado simples (encapsulação) ou num espaço limitado contendo muitos espaços pequenos (confinamento numa matriz) ou por ligação a um suporte material. A ligação de 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 por ligação química pode ser dividida em reversível e irreversível (ADRIANO, 2008). As figura 2 e 3 abaixo mostram os métodos reversíveis e irreversíveis respectivamente.



**Figura 2.** Classificação dos métodos de imobilização reversíveis de enzimas.

Fonte: ADRIANO, 2008.



**Figura 3.** Classificação dos métodos de imobilização irreversíveis de enzimas.

Fonte: 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 (ADRIANO, 2008).

A formação de ligações covalentes entre a enzima e o suporte envolve o estabelecimento de ligações entre os resíduos de aminoácidos da enzima e grupos reativos do suporte. Este método de imobilização origina biocatalisadores muito estáveis. Para a formação de ligações covalentes sem comprometer o sítio ativo, a maioria dos métodos privilegia ligações com grupos amina (Tyr e Arg), carboxílico (Asp e Glu), hidroxila (Ser e Thr), tiol (Cys) e fenol (Tyr) (CABRAL et al., 2003).

Dentre os métodos de imobilização, a união covalente multipontual é a mais eficiente (ADRIANO, 2008). Na imobilização covalente multipontual, a imobilização e estabilização da enzima, ocorrem através da formação de várias ligações covalentes entre grupos amina 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).

Desenvolveram-se novas estratégias racionais de imobilização/estabilização de enzimas por ligação covalente multipontual a suportes sólidos ao assumirem que, se projetada cuidadosamente, uma ligação multipontual muito intensa entre uma pequena área da enzima e o suporte pode ter ótimos efeitos estabilizantes (GUISÁN, 1987; GUIAN, 1988; KLIBANOV, 1983). Há uma inter-relação muito forte entre todas as partes da molécula de proteína e a “rigidificação” de uma área que pode transladar esta estabilização para toda a estrutura da enzima. Deve-se, evidentemente assumir que o desempenho prático desta hipótese aparentemente simples é, na verdade, muito complexa (ADRIANO, 2008).

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.

### **3.5 Suportes para Imobilização**

Os suportes podem ser classificados quanto à composição e estrutura. Quanto à composição os suportes para imobilização podem ser classificados em orgânicos e inorgânicos (MESSING, 1975). A tabela 1 a seguir traz a classificação quanto à composição.

**Tabela 1.** Classificação dos suportes quanto à composição.

<b>Orgânico</b>
Polímeros naturais
<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Polissacarídeos: celulose, dextranas, ágar, agarose, quitina, quitosana, alginato, carragenana</li> <li>▪ Proteínas: colágeno, albumina</li> <li>▪ Carbono</li> </ul>
Polímeros sintéticos
<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Poliestireno</li> <li>▪ Poliacrilato, polimetacrilato, poliamidas, poliacrilamida</li> </ul>
<b>Inorgânicos</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Minerais naturais: bentonita, sílica</li> <li>▪ Materiais processados: vidro (não poroso e poro controlado), metais, óxidos.</li> </ul>

Fonte: GUISÁN, 2006.

Suportes inorgânicos do ponto de vista físico são mais adequados para o uso industrial devido as suas propriedades físicas que permitem menores alterações sob condições variáveis de temperatura, pressão e pH. No entanto suportes orgânicos são mais utilizados devido uma maior possibilidade de “introdução” de grupos funcionais reativos capazes de interagirem com as enzimas (KENNEDY, 1987).

A preferência por suportes orgânicos deriva da sua adaptabilidade a diferentes métodos de imobilização por ligação a um suporte ou por oclusão. É relativamente fácil introduzir a superfície do suporte grupos funcionais reativos para ligação do biocatalizador. A principal desvantagem está na relativa reduzida resistência química e mecânica (CABRAL et al., 2003).

Quanto à morfologia, os suportes podem ser: porosos, não porosos e estrutura gel. Os suportes porosos, tanto orgânicos quanto os inorgânicos, apresentam como vantagem grande área superficial interna disponível para imobilização da enzima, que neste caso fica protegida de turbulência externa. Observa-se que a morfologia interna dos suportes porosos permite não

só a imobilização da enzima, com também o acesso das moléculas de produtos e substratos. Os não-porosos eliminam a resistência à transferência de massa interna, contudo apresentam uma limitada área superficial disponível para a imobilização de enzimas (PEREIRA, 1996).

Os géis, embora de uso simples, são úteis apenas nos casos em que a grade formada seja de malha suficiente para reter a enzima sem implicar em restrições difusionais sérias para o substrato (ADRIANO, 2008).

Suportes porosos com uma área superficial muito maior que a enzima, serão os mais adequados, pois permitirão interações proteína-superfície planas ideais para estabelecer ligações em vários pontos com a enzima sem impedimento estérico (ROELL, 1993). A tabela 2 abaixo traz os aspectos a serem considerados na seleção de suportes porosos.

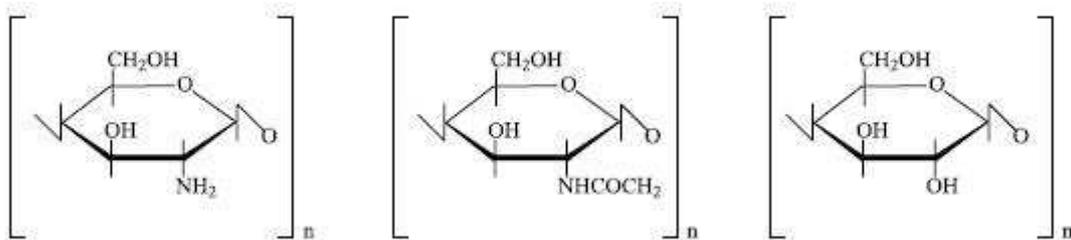
**Tabela 2.** Aspectos a serem considerados na seleção de um suporte para imobilização tendo em conta a sua morfologia.

Aspectos	Suporte poroso	Suporte não poroso
Área superficial por unidade de massa	Elevada	Reduzida
Restrições difusionais	Muito significativas	Pouco significativas
Carga máxima do biocatalizador	Elevada	Reduzida
Proteção do biocatalizador frente a um ambiente hostil	Razoável	Reduzido
Compatibilidade com substratos macromoleculares	Reduzida	Elevada
Custo	Elevado (poro controlado), Reduzido (poro não controlado)	Reduzido

Fonte: CABRAL et al., 2003.

### 3.5.1 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 et al., 2011). As estruturas da quitosana, quitina e celulose são apresentadas na figura 4 abaixo.



**Figura 4.** Estrutura dos biopolímeros quitosana, quitina e celulose, respectivamente.

Fonte: ADRIANO, 2008.

A quitosana apresenta um grande interesse industrial devido a sua alta porcentagem de nitrogênio (6,89%) comparado à celulose sintética substituída (1,25%). Isto faz da quitosana um potente agente geleificante (MUZZARELLI, 1973).

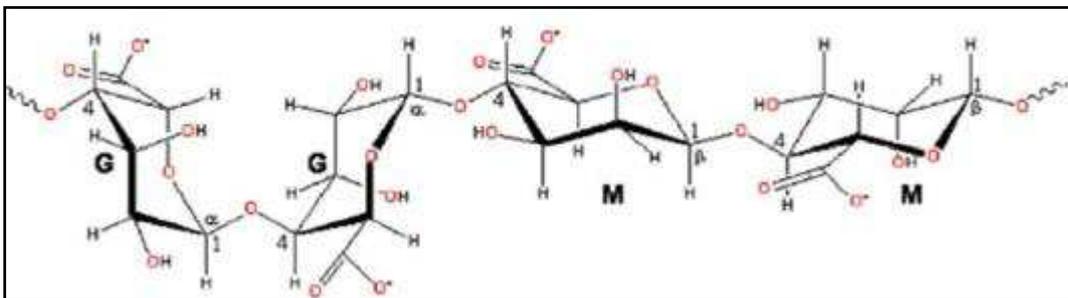
Este polímero é interessante devido ao alto conteúdo de grupos amino primário, que permitem a quitosana ser homogeneamente modificada em meio aquoso, enquanto a nucleofilicidade destes grupos permitem modificações químicas na molécula visando a um melhor desempenho funcional (KUMAR, 1999).

Os grupos aminos livres presentes no polímero podem adquirir uma carga positiva em presença de soluções ácidas diluídas formando um sal solúvel que confere à quitosana importantes propriedades. Destas, destaca-se a quelação podendo se ligar a compostos específicos como as enzimas, gorduras, íons metálicos. Em pH ácido, ela se comporta como um polieletrólito, apresentando alta densidade de carga (carga positiva por unidade de glicosamina). Isto favorece as enzimas que possuem cargas negativas apresentando forte interação devido à carga positiva da quitosana (CRAVEIRO, 1999).

### 3.5.2 Alginato de Sódio

O alginato de sódio, ou algina é o carboidrato purificado extraído de vegetais marítimos pelo uso de uma solução alcalina. É extraído, sobretudo da alga *macrocystispyrifera*, sendo um polímero amplamente usado para imobilização e tecnologias de microencapsulação (FUNDUENANU, 1999). Alginato é um extrato de alga composta de cadeiras alternadas de  $\alpha$ -L-gulurônico e resíduos ácidos de  $\beta$ -D-manurônico (SRIAMORNSAK, 1998). Suportes de alginato normalmente são feitos por entrecruzamento do grupo carboxyl do ácido  $\alpha$ -L-gulurônico com uma solução catiônica geleificante como cloreto de cálcio, cloreto de bário (DRAGET, 1997).

O alginato de sódio ocorre como pó fino ou grosso quase inodoro e insípido, de cor branco-amarelada. É bastante hidrossolúvel, formando uma solução coloidal viscosa. Os sais de vários cátions polivalentes e o ácido algínico têm propriedades úteis para formação de géis. O alginato de sódio tem aplicação na geleificação para vários fins, como imobilização enzimática, formação de membranas e encapsulação de drogas (ADRIANO, 2008). A figura 5 abaixo mostra a estrutura do alginato.



**Figura 5.** Estrutura química do alginato. G é o grupo do ácido gulurônico e M é o grupo do ácido manurônico.

Fonte: ADRIANO, 2008.

### 3.5.3 Utilização de *Saccharomyces cerevisiae* na Preparação dos 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 seqüência 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 (ADRIANO, 2008).

Sua utilização visa modificar o tamanho de poro e sua distribuição no suporte e conseqüentemente alterar características de rendimento de imobilização e também características difusionais.

### 3.6 Ativação do Suporte

O suporte para imobilização de enzimas deve apresentar numerosos grupos de fácil ativação para participar de múltiplas ligações entre os grupos reacionais (GONÇALVES, 2001). Para se conseguir uma imobilização com múltiplas ligações, necessita-se uma elevada densidade de grupos funcionais no suporte e uma congruência geométrica entre suporte e enzima. Esta imobilização multipontual da enzima ao suporte aumenta a estabilidade enzimática (ROSELL, 1993).

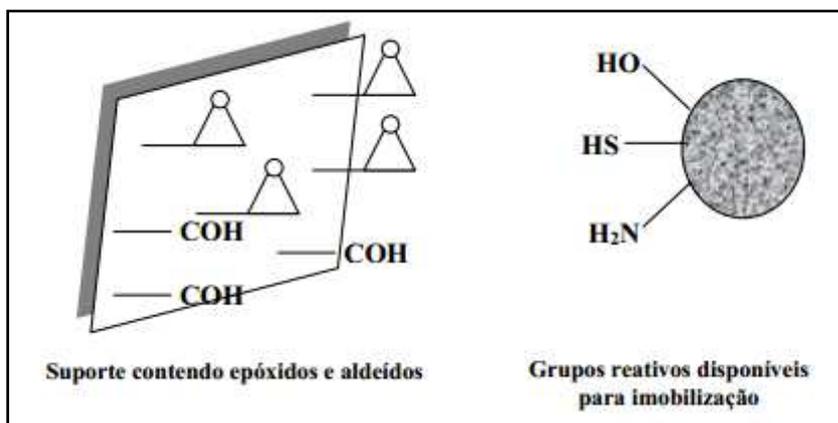
O método de ativação do suporte mais adequado deve ser aquele que produza grupos aldeídos moderadamente afastados do suporte para evitar impedimento estérico. A principal vantagem de se utilizar grupos aldeídos deve-se à reversibilidade da ligação amino-aldeído, que facilita a imobilização da enzima sem causar importantes distorções na estrutura protéica enquanto reagem reversivelmente com grupos amino da enzima (PEREIRA, 1996).

Dado que o desejado é a multinteração enzima-suporte, a escolha dos grupos reativos na enzima deve recair sobre os grupos amino terminais ou grupos lisina residual dada sua reatividade. A maioria das proteínas apresenta alguns resíduos de lisina os quais geralmente não estão envolvidos no sítio ativo da enzima. Grupos amino são polares, estes ficam geralmente expostos para o meio na superfície da proteína e, quando desprotonados, são muito reativos e, mesmo sem prévia ativação, atuam como agente nucleofílico contra os átomos com carga parcial positiva localizado na superfície do suporte (ADRIANO, 2008).

Esta modificação química, ou seja, ativação objetiva aumentar a resistência mecânica, alterar a hidrofobicidade da quitosana, biocompatibilidade e estabilidade química tornando-a mais resistente (VIEIRA, 2004).

Glioxil-suportes têm se mostrado bastante eficazes para imobilizações covalentes multipontuais. Diversas enzimas vêm sendo estabilizadas por este método de ativação. Há

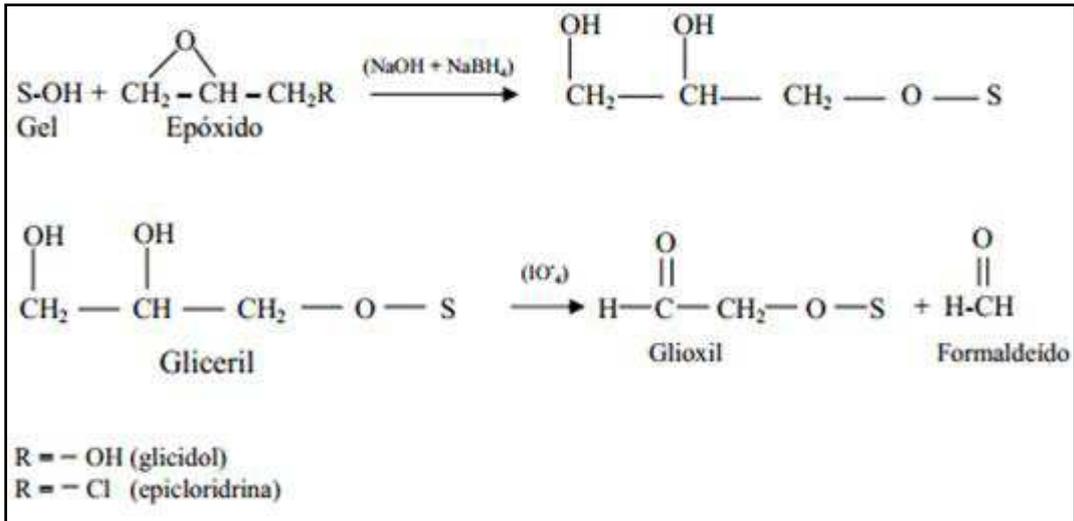
formação de grupos aldeídicos lineares que possibilitam a imobilização enzimática através da formação de bases de Schiff (FANGKANGWANWONG, 2006). Suportes ativados com glicidol e epícloridrina não são capazes de promover imobilização de proteínas multipontualmente a pH 7,0 sendo necessário um pH alcalino cerca de 10,0. A pH alcalino, a imobilização acontece mais rapidamente devido à forte concentração de aminoácidos lisina não ionizados (ADRIANO, 2008). A figura 6 abaixo mostra um sistema de imobilização/estabilização com ativação via epícloridrina.



**Figura 6.** Sistema de imobilização/estabilização por ligação covalente multipontual com ativação via epícloridrina.

Fonte: ADRIANO, 2008.

A ativação de suportes via epóxidos (glicidol e epícloridrina) de um modo geral se dá em duas etapas: na primeira ocorre a eterificação do suporte com epóxido, resultando em grupos gliceril, e na segunda a oxidação com periodato de sódio, de onde resultam grupos aldeído, entretanto com epícloridrina, são formados também grupos oxirano (ADRIANO, 2008). A figura 7 a seguir mostra a ativação via epóxidos.



**Figura 7.** Ativação via epóxidos.

Fonte: ADRIANO, 2008.

## **4. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1 Materiais**

#### **4.1.1 Suporte**

Para preparação dos suportes foram utilizados, quitosana em pó com grau de desacetilação de 85,2% adquirida junto a POLYMAR IND LTDA, Fortaleza, Ceará; alginato de sódio distribuído pela Vetec-São Paulo. Para formação de poros em um dos suportes foi utilizado o microrganismo *Saccharomyces cerevisiae* (fermento para panificação) da marca Saf-instant® e sabão em pó da marca OMO® tripla ação como agente lisante do microrganismo.

#### **4.1.2 Enzima , Substrato e Agente Ativante**

A enzima utilizada foi a Neutrase® adquirida da Novozymes Latin America Ltda. O substrato utilizado foi a caseína da marca SIGMA-ALDRICH BRASIL LTDA. O agente ativante empregado foi epicloridrina.

#### **4.1.3 Reagentes Empregados no Tratamento dos Suportes e na Realização de Ensaio**

No tratamento do suporte foram utilizados, ácido acético, hidróxido de sódio, periodato de sódio, sendo estes da marca Dinâmica Química Contemporânea LTDA. Para os ensaios foram empregados, carbonato de cálcio, fosfato de potássio monobásico, fosfato de potássio dibásico, os três da marca Dinâmica Química Contemporânea LTDA; ácido tricloroacético e Follin-Cicalteu's estes dois últimos da marca SIGMA-ALDRICH BRASIL LTDA.

### **4.2 Métodos**

#### **4.2.1 Preparação de Partículas Híbridas de Quitosana 2,5% ( m/v) - Alginato de Sódio 2,5% (m/v)**

A quitosana foi dissolvida em ácido acético 5% v/v e em seguida foi adicionado o alginato de sódio. A solução resultante foi homogeneizada por 30 minutos. Realizada a

homogeneização adicionou-se solução de NaOH 0,1M em uma razão de 1/10, agitou-se moderadamente e foi deixado em repouso por 4 horas. Ao se passar o período de repouso as partículas foram lavadas com água destilada até a neutralidade e em seguida secas por filtração a vácuo (ADRIANO, 2008).

#### **4.2.2 Preparação de Partículas Híbridas de Quitosana 2,5% ( m/v) - Alginato de Sódio 2,5% ( m/v) - *Saccharomyces cerevisiae* 5,0% ( m/v)**

A quitosana foi dissolvida em ácido acético 5% v/v e em seguida adicionado o alginato de sódio e logo após o microrganismo *Saccharomyces cerevisiae*. A preparação resultante foi homogeneizada por 30 minutos. Realizada a homogeneização adicionou-se solução de NaOH 0,1M em uma razão de 1/10 e agitou-se moderadamente e deixado em repouso por 4 horas (ADRIANO, 2008).

Foi utilizado sabão em pó comercial da marca OMO® tripla ação como agente lisante, o qual contém proteases e lipases. Este tratamento teve a finalidade de provocar a lise da *Saccharomyces cerevisiae* e possivelmente levar a formação de poros e aumento da capacidade de imobilização dos suportes. Com a coagulação do gel em NaOH após o repouso, o pH da solução coagulante foi ajustado a 9,0 e a temperatura a 40°C e adicionada o sabão em pó numa concentração de 1% m/v . Após a adição do sabão o sistema foi submetido a agitação por 24 horas. Terminada essa etapa o gel foi lavado com água destilada para retirada do sabão em pó e chegar a neutralidade e em seguida foi seco por filtração a vácuo (ADRIANO, 2008).

#### **4.2.3 Ativação dos Suportes**

Como agente ativante utilizou-se epicloridrina. A metodologia consistiu em adicionar a cada grama de gel, 10mL de NaOH 2M e 0,5mL de epicloridrina, na qual foi mantido sob agitação em banho de gelo por 18 a 24horas. Após a ativação, o suporte foi filtrado a vácuo e oxidado com periodato de sódio 0,1M, de forma que para cada grama de suporte foram utilizados 2mL do agente oxidante. O tempo de oxidação foi de 2 horas e realizada a temperatura ambiente. Concluída esta etapa o suporte foi lavado com água destilada e filtrado a vácuo tornando-se pronto para imobilização (ADRIANO, 2008).

#### 4.2.4 Imobilização

Para imobilizar cada grama de suporte foram utilizados 9mL de tampão fosfato (0,1M e pH 10) e 114µL de enzima Neutrase®. A solução tampão foi adicionado o suporte e a enzima e em seguida submeteu-se a agitação por três horas a 25°C.

#### 4.2.5 Determinação da Atividade da Neutrase®

A determinação da atividade da Neutrase® foi baseada na hidrólise de caseína, proteína do leite. A técnica consistiu em adicionar 100µL de solução enzimática a 3mL de solução de caseína 4% (m/v) em tampão fosfato de potássio 0,1M de pH 8,1 durante 7 minutos a 50°C, a reação foi interrompida com a adição de 1,0mL de ácido tricloroacético (TCA) 17% (m/v), que provoca a precipitação da proteína. (CHINELATE, 2013). Este procedimento será utilizado para determinar a atividade da enzima livre. A determinação da atividade da enzima imobilizada seguirá procedimento semelhante porém utilizando a massa do suporte após imobilização ao invés da solução enzimática.

O método utilizado para quantificação da atividade enzimática da Neutrase® foi o espectrofotométrico que determina a atividade com base na quantidade do aminoácido tirosina gerado pela hidrólise. Após a reação de hidrólise, o material foi centrifugado a 2000 rpm por 3 minutos, na qual retirou-se 1mL do sobrenadante e foi adicionado 3ml de carbonato de sódio 2% (m/v) e 1mL de solução de Follin-Cicalteu's (FC) com diluição de 1:2 em água destilada. Após 45 minutos a leitura foi realizada em espectrofotômetro a 700nm (ORTEGA, 2009).

Com a obtenção da absorbância (*abs*) pelo espectrofotômetro foi possível calcular a concentração de tirosina [Tyr] (produto da hidrólise), pela equação 1 abaixo.

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

**Equação 1**

Utilizando o valor encontrado pela equação acima se obteve a atividade enzimática (Ativ) de acordo com a equação a seguir.

$$\text{Ativ} = \frac{[\text{Tyr}] \times V_r \times 5520}{V_e \times T_r}$$

**Equação 2**

Onde,  $V_r$  é o volume do reator,  $V_e$  é o volume da enzima e  $T_r$  é o tempo de reação.

#### 4.2.6 Avaliação do Processo de Imobilização

Para análise do processo de imobilização foram avaliados o rendimento de imobilização e atividade recuperada, dados que foram obtidos através da quantificação da carga oferecida (enzima), atividade do sobrenadante (ao final do processo de imobilização) e atividade do derivado.

Rendimento de imobilização (RI%) pode ser considerada a parte da carga oferecida que teoricamente foi imobilizada de acordo com a equação 3 abaixo.

$$\text{RI}\% = \frac{\text{ATI} - \text{ATF}}{\text{ATI}} \times 100$$

**Equação 3**

Onde, ATI é a carga oferecida, ATF é atividade final do sobrenadante.

Atividade recuperada (Arec%) é a parte da carga teoricamente imobilizada que possui atividade, de acordo com a equação 4 abaixo.

$$\text{Arec}\% = \frac{\text{ATderivado}}{\text{ATteórica imobilizada}} \times 100$$

**Equação 4**

#### 4.2.7 Ensaios de Estabilidade Térmica

Amostras imobilizadas dos dois suportes foram incubadas em tampão fosfato de potássio 0,1M em pH 8,1 a 60°C. A estabilidade da enzima em suporte de quitosana -alginato de sódio foi analisada por 2 horas, medindo-se a atividade remanescente em intervalos de tempo de 30 minutos, já a estabilidade da enzima em suporte quitosana - alginato de sódio - *Saccharomyces cerevisiae* foi analisada por 12 horas, sendo as três primeiras horas medidas as atividades em intervalos de 30 minutos e o restante do tempo a cada 1 hora. A constante de

desativação térmica para cada derivado foi calculada de acordo com o modelo de ordem 1 (Belver et al., 2008). A equação 5 abaixo traz a equação do modelo.

$$a = e^{-kd \times t} \quad \text{Equação 5}$$

Foi calculado também o tempo de meia vida ( $t^{1/2}$ ) da enzima nos dois suportes através da equação 6 abaixo.

$$t^{1/2} = \frac{\ln(0,5-\alpha)}{kd \times (1-\alpha)} \quad \text{Equação 6}$$

Através dos valores de tempo de meia vida do derivado e da enzima livre, foi calculado o fator de estabilização (FE) pela equação 7 abaixo.

$$FE = \frac{t^{1/2} \text{ derivado}}{t^{1/2} \text{ enzima livre}} \quad \text{Equação 7}$$

#### 4.2.8 Cinética Enzimática

O modelo adotado para o estudo cinético foi o de Michaelis-menten. Com esse modelo foi calculado a velocidade máxima de reação e a constante de Michaelis-Menten (CHINELATE, 2013).

$$\text{Equação do modelo: } v(S) = \frac{V_{\text{máx}} \times S}{K_m + S} \quad \text{Equação 8}$$

Para obtenção desses dados foram utilizadas diferentes concentrações de substrato (caseína: 40g/L; 30g/L; 20g/L; 10g/L; 2g/L).

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Avaliação do Processo de Imobilização dos Suportes Quitosana 2,5% - Alginato de Sódio 2,5% e Quitosana 2,5% - Alginato de Sódio 2,5% - *Saccharomyces cerevisiae* 5%

A tabela 3 abaixo mostra os parâmetros de avaliação da imobilização de Neutrase® em quitosana 2,5% - alginato de sódio 2,5% e quitosana 2,5% - alginato de sódio 2,5% - *Saccharomyces cerevisiae* 5%.

**Tabela 3.** Parâmetros de avaliação da imobilização de Neutrase® (dados da pesquisa).

Suporte	RI (%)	Ativ teoricamente imobilizada (U/g)	Arec (%)	Ativ derivado (U/g)
Quitosana – Alginato de sódio	84	12,10	23	2,78
Quitosana – Alginato de sódio - <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	44	5,32	86	4,57

Na tabela acima **RI** é o rendimento de imobilização, **Ativ** é a atividade enzimática e **Arec** é a atividade recuperada.

Analisando os dados da tabela acima é possível dizer que o suporte quitosana 2,5% - alginato de sódio 2,5% - *Saccharomyces cerevisiae* 5% (suporte poroso) em termos de eficiência de imobilização se mostrou melhor que o suporte quitosana 2,5% - alginato de sódio 2,5% (suporte não poroso), apesar de ter apresentando rendimento de imobilização menor, mas que por uma atividade recuperada bem maior pôde ter uma eficiência superior. O fato do suporte contendo *Saccharomyces cerevisiae* ter apresentado uma atividade recuperada maior pode ser explicada pela porosidade conferida ao suporte pela levedura e isso conseqüentemente favoreceu a um maior espaço disponível para arranjo das enzimas e ligação com o suporte de forma que não fosse comprometida sua atividade consideravelmente por efeitos estéricos-conformacionais e por estabelecimento de ligações do suporte com o sítio ativo da enzima. Quanto ao maior rendimento de imobilização de enzimas no suporte não

contendo *Saccharomyces cerevisiae*, pode ser atribuído ao fato dos grupos ativos do suporte terem possivelmente se concentrado na superfície do suporte devido a não porosidade, possibilitando um fácil acesso das enzimas a grupos ativados do suporte, permitindo assim a imobilização, porém essa maior concentração de enzimas imobilizadas na superfície podem ter favorecido a mudanças conformacionais e comprometimento maior do centro ativo com ligações ao suporte, motivos esses que podem explicar uma menor atividade recuperada em decorrência da perda de atividade enzimática durante o processo.

## 5.2 Estabilidade Térmica

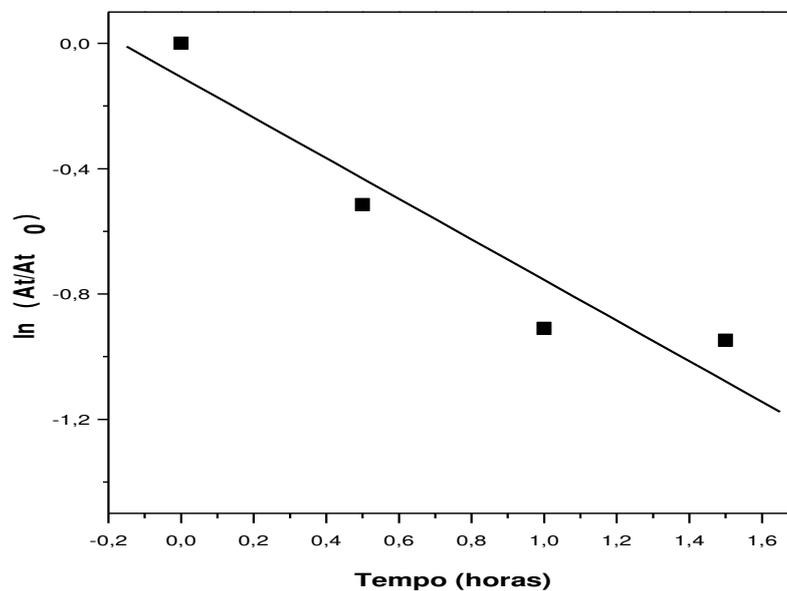
Os parâmetros de estabilidade térmica obtidos foram o tempo de meia vida ( $t^{1/2}$ ), fator de estabilização (FE) e constante de desativação térmica (Kd), aplicando o modelo de Sadana-Henley (1987). A tabela 4 abaixo mostra os resultados obtidos.

**Tabela 4.** Parâmetros de estabilidade térmica obtidos a temperatura de 60°C (dados da pesquisa).

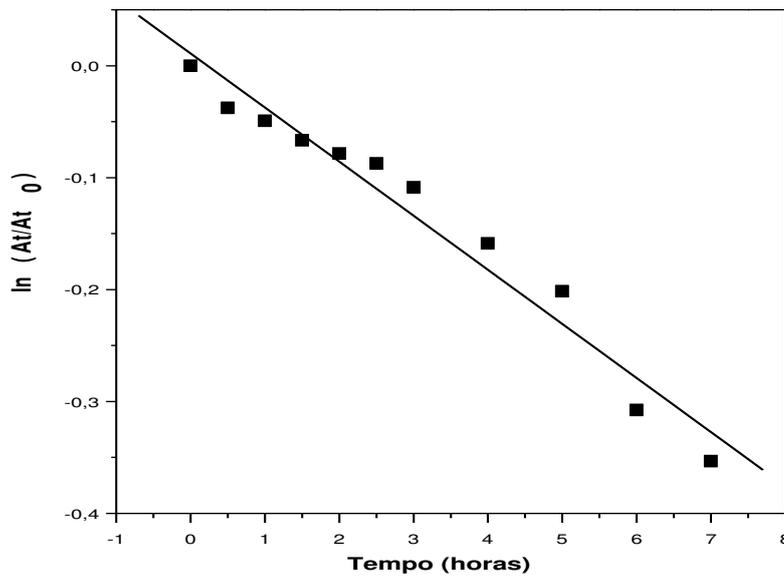
Biocatalizadores	Sadana e Henley (1987)	$t^{1/2}$ (h)	FE
	Kd <sup>h<sup>-1</sup></sup>		
Neutrase® solúvel	19,0758	0,0363	1,0000
Quitosana 2,5% - Alginato de sódio 2,5%	0,6478	1,0697	29,4456
Quitosana 2,5% – Alginato de sódio 2,5% - <i>Saccharomyces cerevisiae</i> 5,0%	0,0483	14,3360	394,6173

Com base nos dados obtidos é possível dizer que ambos os suportes aumentaram a estabilidade térmica da enzima, em comparação com a enzima livre, sendo esta uma das propriedades desejadas e intencionais da imobilização. Em particular o suporte quitosana 2,5% - alginato de sódio 2,5% - *Saccharomyces cerevisiae* 5% apresentou maior estabilidade térmica (menor constante de desativação térmica e maior tempo de meia vida), mostrando levar a um aumento de 394,6173 vezes a estabilidade da enzima imobilizada em relação a enzima livre, um aumento considerável para uma enzima de tempo de meia vida

relativamente curto. O fato da estabilização em quitosana 2,5% - alginato de sódio 2,5% - *Saccharomyces cerevisiae* 5% ter sido maior em relação quitosana 2,5% - alginato de sódio 2,5% pode ser explicado pela maior proteção conferida pelo suporte poroso, uma vez que as enzimas encontram-se imobilizadas predominantemente no interior do suporte e estão menos vulneráveis a mudanças na sua conformação, não permitindo que o sítio ativo da enzima seja modificado facilmente, diferentemente do suporte sem *Saccharomyces cerevisiae* onde as enzimas estão imobilizadas na superfície do gel em contato direto com o calor e com poções de sua estrutura não estabilizadas pelo suporte. As figuras 8 e 9 a seguir representam o estudo de estabilidade térmica.



**Figura 8.** Gráfico de ajuste do modelo de Sadana-Henley (1987) para estabilidade térmica de Neutrase® imobilizada em suporte de quitosana 2,5% - alginato de sódio 2,5% (dados da pesquisa).



**Figura 9.** Gráfico de ajuste do modelo de Sadana-Henley (1987) para estabilidade térmica de Neutrase® immobilizada em suporte de quitosana 2,5% - alginato de sódio 2,5% - *Saccharomyces cerevisiae* 5% (dados da pesquisa).

Analisando os gráficos é possível observar o que a tabela 4 revela, uma maior estabilidade térmica da enzima immobilizada em suporte de quitosana 2,5% - alginato de sódio 2,5% - *Saccharomyces cerevisiae* 5%, na qual é visto uma queda de atividade bem mais lenta e gradual ao longo do tempo.

### 5.3 Cinética Enzimática

Utilizando o modelo de Michaelis-Menten (equação 8) determinou-se a velocidade máxima de reação ( $V_{m\acute{a}x}$ ) e constante de Michaelis-Menten ( $K_m$ ) para a enzima livre e para a enzima immobilizada. Os resultados encontram-se na tabela 5 a seguir.

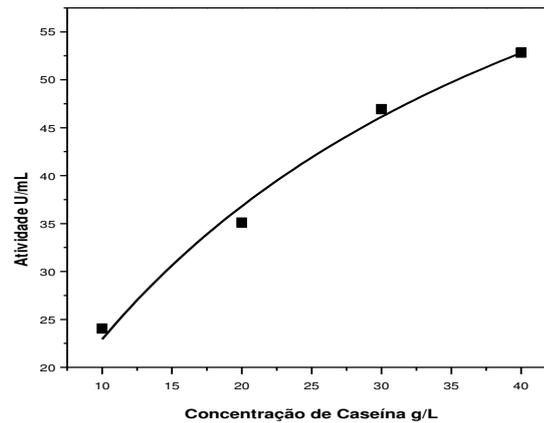
**Tabela 5.** Parâmetros cinéticos da enzima livre e imobilizada (dados da pesquisa).

Neutrase®	Km (g.L <sup>-1</sup> )	V <sub>máx</sub> (U.mL <sup>-1</sup> )
Enzima livre	30,7	93,4
Enzima imobilizada em quitosana 2,5%-alginate de sódio 2,5%	32,2	3,4
Enzima imobilizada em quitosana 2,5% - alginate de sódio 2,5% - <i>Saccharomyces cerevisiae</i> 5%	156,1	23,8

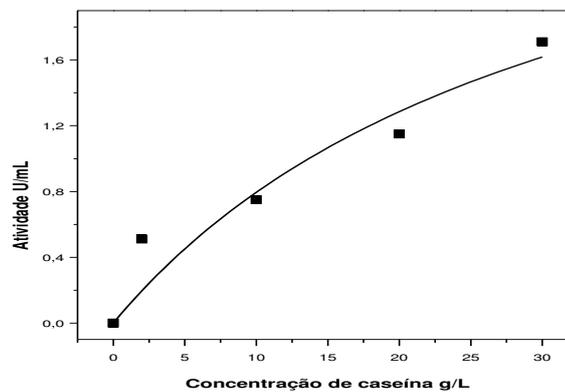
A tabela acima mostra que a velocidade máxima da enzima livre é superior as velocidades máximas observadas para enzima imobilizada em ambos os suportes. A explicação para velocidades menores para enzimas imobilizadas, parte da limitação difusional gerada pelo suporte, alterações conformacionais, impedimento estérico e efeitos microambientais.

Adriano (2008) afirma que através da imobilização enzimática, há uma restrição na mobilidade da enzima afetando também o fluxo de substratos em direção aos poros do biocatalizador. Assim, haverá um decréscimo na velocidade de reação e conseqüentemente perda de eficiência catalítica quando comparado a enzima livre.

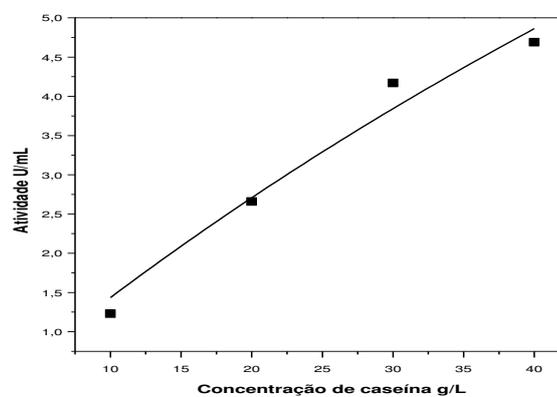
As figuras 10, 11 e 12 a seguir, trazem os gráficos da cinética enzimática da enzima livre, enzima imobilizada em quitosana 2,5%-alginate de sódio 2,5% e enzima imobilizada em quitosana 2,5% - alginate de sódio 2,5% - *Saccharomyces cerevisiae* 5% respectivamente.



**Figura 10.** Ajuste do modelo de Michaelis-Menten para reação de hidrólise da caseína. Enzima livre (dados da pesquisa).



**Figura 11.** Ajuste do modelo de Michaelis-Menten para reação de hidrólise da caseína. Enzima immobilizada em quitosana 2,5% - alginato de sódio 2,5% (dados da pesquisa).



**Figura 12.** Ajuste do modelo de Michaelis-Menten para reação de hidrólise da caseína. Enzima immobilizada em quitosana 2,5% - alginato de sódio 2,5% - *Saccharomyces cerevisiae* 5% (dados da pesquisa).

Com esses resultados é possível ver que a velocidade máxima da enzima imobilizada em quitosana 2,5% - alginato de sódio 2,5% - *Saccharomyces cerevisiae* 5%, é superior a velocidade máxima da enzima imobilizada em quitosana 2,5% - alginato de sódio 2,5%. Se fosse levada em conta apenas a influência dos efeitos difusionais sobre a velocidade de reação seria esperado que o suporte não poroso apresentasse maior velocidade, pois as enzimas estariam imobilizadas predominantemente na superfície, facilitando o encontro com o substrato, porém levando em conta os efeitos estéricos- conformacionais e de microambiente, fatores que podem também afetar a velocidade de reação é possível entender o fato de o suporte poroso ter apresentado maior velocidade de reação em relação ao não poroso. Possivelmente o suporte não poroso tenha sofrido maiores problemas com alterações conformacionais, e com comprometimento do sítio ativo com ligações ao suporte, algo que também pode ser utilizado na explicação da menor atividade recuperada. No geral a soma da influência dos quatro fatores, limitação difusional gerada pelo suporte, alterações conformacionais, impedimento estérico e efeitos microambientais, foram menores para o suporte poroso do que para o suporte não poroso. Os valores de  $K_m$  que refletem a afinidade da enzima ao substrato e conseqüentemente a formação de complexo enzima-substrato, reforça o fato de que a baixa velocidade da enzima imobilizada no suporte não poroso não se deve a problemas difusionais e sim a porção de enzimas inativas em decorrência do processo de imobilização, e como pode ser visto o valor de  $K_m$  é bem próximo ao da enzima livre. O valor de  $K_m$  maior para o suporte poroso indica uma menor afinidade enzima-substrato, não em decorrência predominante de perda de atividade, mas de problemas difusionais que dificulta o encontro do substrato com a enzima.

## 6. CONCLUSÃO

A Neutrase® immobilizada em suporte quitosana 2,5% - alginato de sódio 2,5% - *Saccharomyces cerevisiae* 5% apresentou os melhores resultados em termos de parâmetros de imobilização, estabilidade térmica e cinética enzimática, demonstrando este suporte ser uma opção mais racional em termos de benefícios proporcionados, em relação ao suporte quitosana 2,5% - alginato de sódio 2,5%. Essa diferença observada entre os dois suportes advém da estrutura do suporte (porosidade). O uso da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, levou a formação de poros que permitiu um arranjo das enzimas de forma que as mesmas puderam expressar sua atividade após a imobilização com reduzida perda de atividade catalítica, e no caso da estabilidade térmica, a estabilização foi muito superior em relação à enzima livre e a enzima imobilizada em suporte não poroso. Quanto à cinética enzimática, em ambos os suportes a atividade enzimática se mostrou reduzida em relação à enzima livre, algo já esperado, sendo a redução maior no suporte não poroso.

## 7. REFERÊNCIAS

- ADRIANO, W. S. **Preparação e caracterização de derivados de enzimas industriais em quitosana**. 2008. 161f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Universidade Federal de São Carlos. São Carlos – SP, 2008.
- BELVER, C.; TAMAYO, J. J.; MOLINERO, L.; LADERO, M.; PESSELA, B. C. C.; GUIÓSÁN, J. M.; GARCIA-OCHOA, F. Immobilization-stabilization of Candida Antarctica lipase B in agarose-glyoxyl and agarose-octyl; deactivador knectics. **Chemical engineering transactions**, 2008.
- BEZERRA, F. B.; NOGUEIRA, J. A. M.; MAMMARELLA, J. E.; ADRIANO, W. S.; GONÇALVES, L. R. B. Caracterização de um biocatalizador preparado pela imobilização de Neutrase em quitosana. **XIX Congresso Brasileiro de Engenharia Química**, 2012.
- BICHERSTAFF, G. Immobilization of enzymes and cells – some practical considerations. **Methods in Biotechnology**, p. 1-9. 1995.
- BOUTRANT, J.; CHEFTEL, C. Continuous proteolysis with a stabilized protease, II. Continuous experiments. **Biotechnology and bioengineering**, v.18, p. 1735-1749, 1996.
- CABRAL, J. M. S.; AIRES, B. M. R.; GAMA, M. **Engenharia Enzimática** – Lisboa: Lidel, 2003.
- CARDIAS, H. C. T.; GRININGER, C.C.; TREVISAN, H. C.; GUIÓSÁN, J. M.; GIORDANO, R. L. C. Influence of activation on the multipoint immobilization of penicillin G acylase on macroporous silica. **Brasilian Journal of Chemical Engineering**, v.16, p.141-148. 1999.
- CHINELATE, G. C. B. **Estudo da imobilização das enzimas neutrase e L-arabinose isomerase em suportes de baixo custo** (Doutorado)- Fortaleza: RENORBO: programa de pós-graduação, 2013. 130p.
- COELHO, M. A. Z.; SALGADO, A. M.; RIBEIRO, B. D. **Tecnologia Enzimática** – Rio de Janeiro: FAPERJ: EPUB, 2008.
- CRAVEIRO, A. A.; CRAVEIRO, A. C.; QUEIROZ, D. C. Quitosana – a fibra do futuro. Fortaleza: **PADETEC**, v.1. 1999. 122p.

DAMRONGSAKKUL, S. et al. Enzymatic hydrolysis of rawhide using papain and Neutrase®. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, Washington, v. 14, n. 2, p. 202-206, 2008.

DIXON, M.; WEBB, E. C. **Enzymes**, Academic Press: New York, 1979.

DRAGET, K. I.; SKJAK-BRAEK, G.; SMIDSRØD, O. Alginate based new materials. **International Journal Biological Macromolecules**, v.21, p.47-55. 1997.

FANGKANGWANWONG, J.; YOKSAN, R.; CHIRACHANCHAI, S. Chitosan gel formation via the chitosan-epichlorohydrin adduct and its subsequent mineralization with hydroxyapatite. **Polymer**, v.47, p.6438-6445. 2006.

FUNDUENANU, G.; NASTRUZZI, C.; CARPOV, A.; DESBRIERES, J.; RINAUDO, M. Physico-chemical characterization of Ca-alginate microparticles produced by different methods. **Biomaterials**, v.20, p.1427-1435. 1999.

GONÇALVES, L. R. B. **Estudo cinético da síntese de amoxicilina catalisada por penicilina G acilase imobilizada em glioxil-agarose**. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Universidade federal de São Carlos. São Carlos – SP, 2001.

GUISÁN, J. M. Immobilization and stabilization of  $\alpha$ -chymotrypsin by covalent attachment to aldehyde-agarose gels. **Enzyme and Microbial Technology**, v.10, p. 375-382. 1987.

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

GUISÁN, J. M. **Immobilization of enzymes and cells**. New Jersey: Humana Press Inc. 2006.

KENNEDY, J. F. Enzyme technology. Alemanha: **biotechnology**, 1987.

KLIBANOV, A. M. Stabilization of enzymes against thermal inactivation. **Advances in Applied Microbiology**, v.29, p.1-28. 1983.

KUMAR, G.; BRISTOW, J. F.; SMITH, P. J. and PAYNE, G. F. **Enzymatic gelation of the natural polymer chitosan**. *Polymer*, 41. 2157-2168, 1999.

LIANG, J. F.; LI, Y. T.; YANG, V. C. Biomedical application of immobilized enzymes. **J. Pharma. Sci.** 2000.

MARCONI, W. Engineering aspects of carries for immobilized biocatalysts. **Reactive Polymers**, 1989.

MARKGLOU, N.; WAINER, I. W. **Methods em enzymology immobilized enzymes**, Academic Press: New York, vol. XLIV, 1976.

MARKGLOU, N.; WAINER, I. W. **Bioanalytical separations**. Elsevier Science: New York, 2003.

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.

MESSING, R. A. Immobilised enzymes for industrial reactors. London: **Academic press**, inc. 1975.

MUZZARELLI, R. A. A. Natural chelating polymers. New York: **Pergamon Press**. 1973.

ORTEGA, N.; PEREZ-MATEOS, M.; PILAR, M. C. and BUSTO, M. D. Neutrase immobilization on alginato-glutaraldehyde beads by covalente attachment journal of. **Agricultural and food chemistry**. 57, pp. 109-115, 2009.

PEREIRA, G. H. A. **Estudo da imobilização multipontual da penicilina G acilase em sílica ativada com grupos glioxil**. (Mestrado). Engenharia Química, UFSCar, São Carlos, 1996. 100p.

ROSELL, C. M. **Reacciones de quimica fina catalizadas por derivados estabilizados de penicilina G acilase**. (Doutorado). Instituto de Catalisis y Petroleoquímica-C.S.I.C, UAM, Madri-Espanha, 1993.

SADANA, A.; HENLEY, J. P. Single-step unimolecular non-first-order enzyme deactivation kinetics. **Biotechnology and Bioengineering**, v.30, p. 717-723. 1987.

SRIAMORNSAK, P. Preliminary investigation of some polysaccharides as a carrier for cell entrapment. **European Journal Pharmacology and Biopharmacy**, v.46, p.233-226. 1998.

TARDIOLI, P.; FERNANDES, L. R.; GUISÁN, J. M.; GIORDANO, R. L. C. Hydrolysis of proteins by immobilized-stabilized. Alcalase-glyoxyl agarose, **biotechnology** 19, pp. 565-574, 2003.

VAN BEILEN, J. B.; LI, Z. Enzyme technology: an overview. **Current Opinion Biotechnonology**, v.13, p. 338-344. 2002.

VIEIRA, R. S. **Remoção e recuperação de Hg (II) utilizando quitosana natural reticulada**. (Mestrado). Engenharia Química, Unicamp, Campinas, 2004. 150p.

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

VITOLLO, M. Biotecnologia industrial: processos fermentativos e enzimáticos. São Paulo: **Edgard Blücher**, v.3. 2001.