



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

**LARISSA LEITE DA SILVA**

**IMOBILIZAÇÃO DE NEUTRASE<sup>®</sup> EM SUPORTES A BASE DE  
QUITOSANA E ALGINATO ATIVADOS COM GLUTARALDEÍDO**

**CUITÉ-PB  
2014**

LARISSA LEITE DA SILVA

**IMOBILIZAÇÃO DE NEUTRASE<sup>®</sup> EM SUPORTES A BASE DE  
QUITOSANA E ALGINATO ATIVADOS COM GLUTARALDEÍDO**

Monografia apresentada ao Curso de Bacharelado em Farmácia da Universidade Federal de Campina Grande – *Campus* Cuité, como requisito parcial 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

S586i Silva, Larissa Leite da.

Imobilização de neutrase® em suportes a base de quitosana e alginato ativados com glutaraldeído. / Larissa Leite da Silva. – Cuité: CES, 2014.

49 fl.

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

Orientador: Wellington Sabino Adriano.

1. Neutrase®. 2. Quitosana. 3. Alginato de sódio. I. Título.

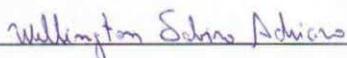
CDU 577.1

LARISSA LEITE DA SILVA

**IMOBILIZAÇÃO DE NEUTRASE® EM SUPORTES A BASE DE  
QUITOSANA E ALGINATO ATIVADOS COM GLUTARALDEÍDO**

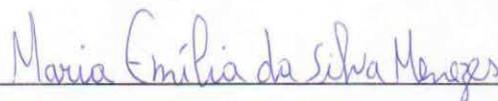
Apresentado e aprovado em: 12 / 03 / 2014

**BANCA EXAMINADORA**



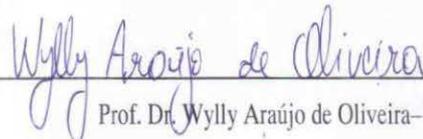
Prof. Dr. Wellington Sabino Adriano- UFCG

(Orientador)



Profª Drª. Maria Emília Silva Menezes – UFCG

(Membro)



Prof. Dr. Wylly Araújo de Oliveira- UFCG

(Membro)

Cuité – PB, 12 de março de 2014

Dedico ao meu amado filho Arthur Henrique, por ser minha maior motivação. Por me ensinar que na vida nosso aprendizado é diário e precisa de constante aprimoramento.  
A você, todo meu amor.

## AGRADECIMENTOS

À **Deus**, em sua infinita bondade, todo reconhecimento e agradecimento por ter me dado a oportunidade de vivenciar esse sonho chamado “vida”; pelos momentos bons e também pelos ruins, que me deram a oportunidade de evolução; pela força e coragem que não me deixaram perder as esperanças e me ajudaram a enxergar Teus melhores planos para mim; pelos benfeitores espirituais que me guiaram sempre em minha jornada acadêmica; por me guiar e me governar diariamente.

**Meu filho, meu amor Arthur Henrique**, por todo amor e carinho dedicados a mim, por mesmo com sua pouca idade compreender minhas ausências, por sua alegria e pureza que torna minha existência mais feliz. Por me tornar uma pessoa melhor e iluminar meus dias. Amo-te sem dimensão.

**Minha mãe Socorro** gostaria de agradecer, espero um dia retribuir. Obrigada por não medir esforços, muitas vezes tendo que abdicar dos próprios sonhos em razão dos meus. Por sua garra, determinação, perseverança, humildade, dignidade, caráter, entre muitos outros princípios que serviram de base para minha formação moral e que serão meu espelho para o resto da vida.

**Meu irmão Adriano**, pelo exemplo de garra e vontade. Por mostrar que se chega aonde quiser nas mais variadas circunstâncias quando se tem uma meta. Você sempre foi meu espelho, minha motivação e meu orgulho durante a jornada acadêmica. Além de irmão, um grande amigo. Obrigada por sempre se preocupar comigo e me aconselhar nas horas mais acertadas.

**Lucas Rafael, meu irmão**. Como agradecer a este ser tão iluminado, que sempre acreditou em mim e me motivou em todos os momentos? Sua bondade, respeito, amizade, confiança e amor sempre me fortaleceram e me fizeram acreditar mais em mim. Minha fraterna gratidão por tudo que representa em minha vida.

**Ao meu saudoso avô Joaquim de Porcina (*in memoriam*)** que por muitos anos foi minha figura de pai, obrigada por todos os ensinamentos que só uma pessoa de coração tão puro quanto o seu foi capaz de me transmitir. Sei que estás muito feliz e orgulhoso por essa etapa por mim cumprida. Minha eterna lembrança e gratidão.

**Ao meu pai de coração Didi**, por todo carinho, atenção e zelo ao longo desses anos, que fizeram de ti meu verdadeiro pai, você não preencheu um vazio e sim ganhou um espaço próprio em minha vida. A você, meu agradecimento sem tamanho.

A **João Henrique**, por anos de compreensão, por aceitar a distância e apoiar as minhas escolhas.

À **Acidália Pessoa e João Bosco**, que me acolheram em sua família de braços e corações abertos e que sempre me apoiaram e me incentivaram a ir à luta, sempre acreditando no meu potencial.

À **Família Freire (Fátima, “Biu”, Jade, Jamily, Jadson, “Vovó Tonha”)** por todo amor e cuidado oferecidos ao meu filho nos momentos de minha ausência, minha eterna gratidão e admiração. Vocês agora são minha família e quero levá-los comigo sempre.

À minha amiga e companheira de jornada em Cuité, **Priscilla Tereza**, obrigada por dividir comigo tantas experiências enriquecedoras e por ser essa pessoa especial na minha vida e na do meu filho. Seu sucesso é o meu orgulho.

À cidade de **Cuité**, minha segunda casa, que me recebeu com uma hospitalidade jamais encontrada em outro local. Pelas pessoas que entraram na minha vida e sempre terão um espaço guardado em minha mente e meu coração.

À **Turma 2008.2**, que iniciou comigo a busca de uma grande realização. Em especial a: **Rafael Eduardo, Rodrigo Dias, Valdicléia Abreu e Wendeberto Soares**, que compartilharam comigo momentos ímpares. Torço muito por cada um de vocês.

À **Turma 2009.1**, que me recebeu de braços abertos e se mostrou companheira. Em especial a **Anderson Angel**, muito obrigada pela amizade, confiança e companheirismo de sempre.

**Alanna Morais**, amiga e companheira de laboratório, que enfrentou comigo os mesmos desafios e incertezas. Obrigada pelo apoio.

À **Karina Perrelli Randau**, que me abriu as portas para a iniciação científica, e sempre esperou de mim: compromisso, responsabilidade, atitude, ética e determinação, o que me engrandeceu intelectualmente. Todo o meu respeito, carinho, admiração e gratidão. Sua contribuição foi ímpar.

**Orientador Wellington Adriano**, não tenho palavras para agradecer todos os ensinamentos, recomendações, disponibilidade, acesso e confiança a mim ofertados durante a realização deste trabalho. Espero ter atendido as expectativas, sou imensamente grata.

Aos **Docentes do Curso de Bacharelado em Farmácia**, que dividiram conosco suas experiências e conhecimentos para nos tornar profissionais competentes, seguros e

éticos. Agradeço a todos em nome de **Júlia Beatriz**, que sempre foi exemplo de uma profissional dedicada.

À Banca Examinadora Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Emília e Prof<sup>o</sup>. Dr<sup>o</sup>. Wylly Araújo por aceitarem avaliar meu trabalho e enriquecê-lo com suas valiosas sugestões e observações.

Enfim, a todos os mencionados e também àqueles que não foram, mas que de alguma forma contribuíram para a concretização dessa etapa tão importante em minha vida, minha sincera e especial gratidão.

“Leve na sua memória para o resto de sua vida, as coisas boas que surgiram no meio das dificuldades. Elas serão uma prova de sua capacidade em vencer as provas e lhe darão confiança na presença divina, que nos auxilia em qualquer situação, em qualquer tempo, diante de qualquer obstáculo.”

**Francisco Cândido Xavier**

## RESUMO

SILVA, L. L. **Imobilização de Neutrase® em suportes a base de quitosana e alginato ativados com glutaraldeído.** Cuité, 2014. 49 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Farmácia) – Unidade Acadêmica de Saúde, Centro de Educação e Saúde, Universidade Federal de Campina Grande, Cuité –PB, 2014.

Neutrase® é uma protease que hidrolisa proteínas do soro do queijo, um subproduto altamente poluente, visando obter derivados com melhores propriedades funcionais. O objetivo deste trabalho foi imobilizar a enzima Neutrase® em suportes a base de quitosana e alginato de sódio e caracterizá-los quanto ao rendimento de imobilização, atividade recuperada, fator de estabilidade e ensaios cinéticos. Para isso, foram preparados os suportes Quitosana 2,5% - Alginato 2,5% e Quitosana 2,5% - Alginato 2,5% - *Saccharomyces cerevisiae* 5%, ativados com glutaraldeído por 1 hora a 25°C e imobilizados a 30 rpm por 3 horas a 25°C, sendo oferecida uma carga de 10 U/g de suporte. A atividade de cada suporte foi medida através de um espectrofotômetro a um comprimento de onda de 700 nm, e através dela, encontrou-se a atividade recuperada e rendimento de imobilização. Ensaios de estabilidade térmica a uma temperatura de 60°C foram realizados com os suportes Quitosana 2,5% - Alginato 2,5% e Quitosana 2,5% - Alginato 2,5% - *Saccharomyces cerevisiae* 5%, por 2,5 horas e 6 horas, respectivamente. E por fim, ensaios cinéticos com diferentes concentrações de substrato foram realizados em ambos os suportes. O suporte Quitosana 2,5% - Alginato 2,5% - *Saccharomyces cerevisiae* 5% apresentou melhores resultados, com rendimento de imobilização 47,57%; quanto à estabilidade térmica, mostrou-se 87,86 vezes mais estável que a enzima solúvel e quanto ao ensaio cinético, foi o suporte que melhor se adequou ao modelo de Michaelis-Menten. Com estes resultados, foi possível concluir que o suporte Quitosana 2,5% - Alginato 2,5% - *Saccharomyces cerevisiae* 5% caracteriza-se como melhor suporte para imobilização da enzima Neutrase® quando comparado ao suporte Quitosana 2,5% - Alginato 2,5%.

Palavras-Chave: Neutrase®, imobilização, quitosana, alginato de sódio, *Saccharomyces cerevisiae*.

## ABSTRACT

SILVA, L. L. **Neutrase® Immobilization on chitosan and alginate basis activated with glutaraldehyde.** Cuité, 2014. 49 pgs. Conclusion of Course Project (Baccalaureate in Pharmacy) – Unidade Acadêmica de Saúde, Centro de Educação e Saúde, Universidade Federal de Campina Grande, Cuité –PB, 2014.

Neutrase® is a protease that hydrolyses the whey proteins, a highly pollutant byproduct, in intend to obtain derivatives with improved functional properties. The aim of this study was to immobilize the Neutrase® enzyme on the Chitosan and Sodium Alginate basis and characterize them in terms of yield of immobilization, recovered activity, stability factor, and kinetic tests. To this end, the basis were prepared Chitosan 2.5% - Alginate 2.5% and Chitosan 2.5% - Alginate 2.5% - *Saccharomyces cerevisiae* 5%, activated with glutaraldehyde for 1 hour at 25 °C and fixed at 30 rpm for 3 hours at 25°C, and offered a load of 10 U/g of basis. The activity of each basis was measured using a spectrophotometer at a wavelength of 700 nm, and through it, we found the activity recovered and yield of immobilization. Thermal stability tests at a temperature of 60 °C were conducted with the basis Chitosan 2.5% - Alginate 2.5% and Chitosan 2.5% - Alginate 2.5% - *Saccharomyces cerevisiae* 5% for 2.5 hours and 6 hours, respectively. Finally, kinetic tests with different concentrations of substrate were performed on both basis. The Chitosan 2.5% - Alginate 2.5% - *Saccharomyces cerevisiae* 5% showed the best results with immobilization yield of 47.57%; related to the thermal stability, it was found to be 87.86 times more stable than the soluble enzyme and about the kinetic test, it was the basis that best fit to the Michaelis-Menten model. With these results, it was concluded that the basis Chitosan 2.5% - Alginate 2.5% - *Saccharomyces cerevisiae* 5% is characterized as a better basis for the Neutrase® enzyme immobilization when compared to Chitosan 2.5% - Alginate 2 5%.

Keywords: Neutrase ®, immobilization, chitosan, sodium alginate, *Saccharomyces cerevisiae*.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Representação esquemática das estruturas primárias de (a) celulose, (b) quitina e (c) quitosana.....	24
Figura 2: Estrutura química do alginato. G é o grupo do ácido gulurônico e M é o grupo do ácido manurônico.....	25
Figura 3: Reação de ativação entre glutaraldeído e quitosana.....	27
Figura 4: Fluxograma mostrando a ativação via glutaraldeído dos géis preparados.....	31
Figura 5: Esquema do processo de obtenção da atividade da enzima livre.....	32
Figura 6: Esquema do processo de obtenção da atividade da enzima imobilizada para $t_0$ e $t_f$ .....	33
Figura 7: Modelo esquemático da medida da atividade do derivado.....	34
Figura 8. Gráficos da estabilidade térmica obtida a partir da imobilização de Neutrase®; (A) em suporte de Quitosana 2,5% - Alginato 2,5% ativado com glutaraldeído a 60°C, por 2,5 horas, pH 10,0, com carga inicial oferecida de 10 U/g de suporte; (B) em suporte de Quitosana 2,5% - Alginato 2,5% - <i>Saccharomyces cerevisiae</i> 5% ativado com glutaraldeído a 60°C, por 6,0 horas, pH 10,0, com carga inicial oferecida de 10 U/g de suporte.....	40
Figura 9. Ajuste do modelo de Michaelis-Menten para a reação de hidrólise da caseína 10 U/g suporte a 60°C pH 10,0; (A) enzima livre; (B) enzima imobilizada no suporte Quitosana 2,5% - Alginato 2,5%; (C) enzima imobilizada no suporte Quitosana 2,5% - Alginato 2,5% - <i>Saccharomyces cerevisiae</i> 5%.....	42

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Parâmetros de imobilização de Neutrase® em Quitosana 2,5% - Alginato 2,5% (m/v) e Quitosana 2,5% - Alginato 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. Cuité, Jan. de 2014.....	37
Tabela 2. Parâmetros de estabilidade térmica a 60°C da imobilização da enzima Neutrase® em suportes de Quitosana 2,5% - Alginato 2,5% e Quitosana 2,5% - Alginato 2,5% - <i>Saccharomyces cerevisiae</i> 5% ativados com glutaraldeído. Cuité, Jan. de 2014.....	39
Tabela 3. Parâmetros cinéticos da enzima livre e imobilizada nos diferentes suportes. Cuité, Jan. de 2014.....	41

## LISTA DE CONVENÇÕES, SIGLAS E ABREVIATURAS

AAP – Atividade Aparente do Derivado

ALG – Alginato

ARec – Atividade Recuperada

AT0 – Atividade no tempo zero

ATI – Atividade Teórica de Imobilização

FC – Follin & Cicocalteu's

FE – Fator de Estabilidade

Km – Constante de Michaelis-Menten

QUI – Quitosana

RI – Rendimento de Imobilização

rpm – Rotações por minuto

S – Substrato

Sc – *Saccharomyces cerevisiae*

T ½ - Tempo de meia-vida

TCA – Ácido Tricloroacético

V<sub>máx</sub> – Velocidade Máxima

# SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

LISTA DE TABELAS

LISTA DE CONVENÇÕES, SIGLAS E ABREVIATURAS

1. Introdução.....	15
2. Objetivos .....	17
2.1 Geral.....	17
2.2 Específico.....	17
3. Revisão da Literatura .....	18
3.1 Enzimas.....	18
3.2 Imobilização de Enzimas .....	20
3.3 Suportes para Imobilização.....	22
3.3.1 Quitosana.....	23
3.3.2 Alginato de Sódio.....	24
3.3.3 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	25
3.4 Modificação Química do Suporte .....	26
4. Material e Métodos.....	28
4.1 Material.....	28
4.1.1 Suportes.....	28
4.1.2 Microrganismo .....	28
4.1.3 Reagentes Usados para Tratamento dos Suportes.....	28
4.1.4 Enzima.....	29
4.1.5 Agente Ativante.....	29
4.1.6 Substrato.....	29
4.2 Métodos .....	29
4.2.1 Preparação das Partículas de Híbridos de Quitosana: Quitosana 2,5% - Alginato de Sódio 2,5% .....	29
4.2.2 Preparação das Partículas de Híbridos de Quitosana Contendo Microrganismo: Quitosana 2,5% - Alginato de Sódio 2,5% - Sc 5% .....	30
4.2.3 Ativação dos Suportes Utilizando Glutaraldeído .....	30
4.2.4 Imobilização da Neutrase® .....	31

4.2.5 Determinação da Atividade Enzimática.....	31
4.2.6 Ensaios de Estabilidade Térmica.....	35
4.2.7 Cinética Enzimática.....	36
5. Resultados e Discussão .....	37
5.1 Caracterização dos Suportes: Quitosana 2,5% - Alginato 2,5% e Quitosana 2,5% - Alginato 2,5% - <i>Saccharomyces cerevisiae</i> 5% .....	37
5.2 Estudo da Estabilidade Térmica .....	38
5.3 Estudo Cinético.....	40
6. Conclusão .....	44
7. Referências .....	45

## 1. Introdução

As enzimas são conhecidas industrialmente como catalisadores biológicos e, em geral, são proteínas formadas de longas cadeias de aminoácidos com ligações peptídicas e que exercem funções vitais nos organismos vivos. Estes catalisadores têm a capacidade de reduzir a barreira energética existente entre reagentes e produtos sem sofrer alterações permanentes em sua estrutura (NELSON; COX, 2000). Quando comparadas aos catalisadores químicos convencionais, as enzimas possuem muitas vantagens que tornam seu uso em aplicações industriais uma alternativa viável (TUMTURK; et al, 2007; YE; et al, 2007; LEI; et al, 2009; MILETIC; et al, 2009).

As enzimas atuam em condições suaves de temperatura, pH e pressão, atingindo velocidades de reação bastante superiores àquelas obtidas por catalisadores químicos convencionais (HASAN; et al, 2006; DE CASTRO; et al, 2004; KRAJEWSKA, 2004). Este comportamento viabiliza uma redução no custo final de um processo e evita a formação de subprodutos indesejáveis. Além disso, maior rendimento do processo pode ser alcançado, devido à sua elevada especificidade, permitindo a obtenção de produtos biodegradáveis e reduzindo a quantidade de produtos gerados (DE CASTRO; et al, 2004).

A Neutrase® é uma protease que hidrolisa proteínas do soro do queijo, um subproduto altamente poluente e descartado nas indústrias de laticínios, visando obter derivados com melhores propriedades funcionais (BEZERRA; et al, 2012).

A tecnologia enzimática apareceu como área de investigação no início da década de 1960, com a imobilização de enzimas para utilização em processos químicos (KRAJEWSKA, 2004). As enzimas têm, intrinsecamente, excelentes propriedades, como: atividade, seletividade e especificidade. Estas características permitem o desenho de processos de síntese de produtos muito complexos em condições ecossustentadas. Porém, apesar do alto potencial de aplicação das enzimas, devido à pressão dos consumidores, elas têm de ser otimizadas, de modo a cumprirem suas funções biológicas com eficácia e eficiência. A catálise de reações em processos metabólicos complexos pode ser regulada em vários níveis e, assim, algumas reações passam a ter as características que possam ser aplicadas em processos industriais (BON; et al, 2008).

A imobilização de enzimas consiste na sua confinamento a uma região restrita, o que assegura a retenção da atividade catalítica, e garante a possibilidade da sua utilização de forma repetida ou contínua (AIRES-BARROS; FERNANDES, 2003). A imobilização é capaz de inibir ou aumentar a atividade e a estabilidade de uma enzima, no entanto, não existe uma regra que prenuencie a manutenção destes parâmetros após o processo de imobilização (VECCHIA; et al, 2004). O principal interesse em imobilizar uma enzima é obter um biocatalisador com atividade e estabilidade inalteradas durante o processo, quando comparada à sua forma livre (MATSUDA; et al, 2008; HUANG; et al, 2009). Idealmente, a enzima imobilizada deverá apresentar uma atividade catalítica superior. Além disso, não deverão ocorrer alterações na estrutura da enzima, bem como modificações no sítio ativo (VECCHIA; et al, 2004).

Ao se obter uma enzima imobilizada ativa e estável, e com uma boa especificidade ao substrato, ela pode ser submetida à utilização nos processos industriais de forma similar a um catalizador químico (ZANIN; MORAES, 2004).

Para o bom desempenho da enzima imobilizada, a escolha criteriosa do suporte é de grande relevância, pois ele tanto tem a capacidade de aumentar o tempo de meia-vida da enzima imobilizada quanto pode afetar adversamente não só a estabilidade térmica, como todo o desempenho global do sistema (MENDES; et al, 2011).

Quando um suporte é selecionado para uma determinada utilização, devem ser analisadas suas propriedades físicas e químicas, bem como as relativas à possibilidade de regeneração (BON; et al, 2008).

Nessa conjuntura, a escolha de um suporte é de grande relevância para o sucesso de uma imobilização, tendo este que apresentar adequado desempenho e eficácia nas atividades a que é submetido.

## **2. Objetivos**

### **2.1 Geral**

Identificar entre dois suportes qual se mostra mais eficaz na imobilização da enzima Neutrase®.

### **2.2 Específico**

Caracterizar os catalisadores quanto:

- rendimento de imobilização,
- atividade recuperada,
- fator de estabilidade,
- ensaios cinéticos.

### 3. Revisão da Literatura

#### 3.1 Enzimas

Enzimas são catalisadores protéicos que apresentam uma série de características que as tornam mais vantajosas em um processo industrial quando comparadas a catalisadores químicos convencionais (YE; et al, 2007; MACARIO; et al, 2009; MILETIC; et al, 2009). Entre essas vantagens, cabe salientar o alto grau de eficiência catalítica de uma enzima, muito superior a catálise química; a alta especificidade de uma enzima na reação, o que permite não somente discriminação entre reações como também entre substratos (especificidade pelo substrato), entre partes semelhantes de uma molécula (régio-especificidade) e entre isômeros ópticos (estéreo-especificidade) (YE; et al, 2007; MACARIO; et al, 2009; MILETIC; et al, 2009). Essas características das enzimas evitam a formação de subprodutos através de reações inespecíficas, o que aumenta o grau de pureza do produto final. Além disso, as enzimas podem operar em condições amenas de temperatura, pressão e pH enquanto os catalisadores químicos requerem condições críticas de operação. Isto proporciona substancial economia de energia em processos industriais, barateando assim o custo de produção (HASAN; et al, 2005; MACARIO; et al, 2009; MILETIC; et al, 2009).

A forma de obtenção de enzimas pode ocorrer a partir de animais, plantas e microrganismos. No entanto, enzimas de microrganismos têm vantagens em sua utilização por apresentarem grande disponibilidade de uma variedade de atividades catalíticas, altos rendimentos, facilidade de manipulação genética, fornecimento regular de enzimas, pois não dependem de flutuações sazonais, sendo que os microrganismos são capazes de apresentar um rápido crescimento em meios de baixo custo (HASAN; et al, 2005).

A Neutrase® é uma protease que hidrolisa proteínas do soro do queijo, que são subprodutos altamente poluentes e descartados na indústria de laticínios, visando à obtenção de derivados com melhores propriedades funcionais (BEZERRA; et al, 2012).

As limitações que existem na obtenção de produtos e intermediários de interesse industrial estão associadas aos tipos de catalisadores químicos empregados, que são pouco versáteis e empregam altas temperaturas para atingir razoável velocidade de

reação. Além disso, estes catalisadores possuem baixa especificidade, geralmente fornecem produtos de composição química mista ou produtos contaminados e requerem nova etapa para realizar uma purificação (HASAN; et al, 2006; DE CASTRO; et al, 2004).

Como já mencionado, as enzimas, quando comparadas aos catalizadores químicos convencionais, possuem muitas vantagens que tornam seu uso em aplicações industriais uma alternativa viável (TUMTURK; et al, 2007; YE; et al, 2007; LEI; et al, 2009; MILETIC; et al, 2009). Todavia, as enzimas não são plenamente utilizadas na escala industrial devido ao seu alto custo, dificuldade de separação do meio reacional e instabilidade de suas estruturas ocasionada principalmente, pela crescente utilização desses biocatalisadores em aplicações que atuam em condições desnaturantes (pH e temperaturas extremas, forte agitação e presença de solventes orgânicos) (TUMTURK; et al, 2007; LEI; et al, 2009; MILETIC; et al, 2009; ZHOU; et al, 2009).

Assim, o desenvolvimento de métodos eficientes de fixação da enzima em matrizes sólidas que proporcionem maior estabilidade, melhor atividade catalítica, proteção em ambientes desnaturantes, diminuição da contaminação do produto, fácil separação e reutilização em aplicações industriais, poderá tornar possível o uso do catalisador biológico em aplicações industriais (LASZLO; EVANS, 2007; MATEO; et al, 2007; OZTURK; et al, 2007; TUMTURK; et al, 2007; SECUNDO; et al, 2008; MILETIC; et al, 2009; ZHOU; et al, 2009).

A tecnologia enzimática surgiu como área de investigação no início da década de 1960, com a imobilização de enzimas para utilização em processos químicos (KRAJEWSKA, 2004). O mercado mundial das enzimas divide-se em três segmentos: enzimas empregadas na indústria de alimentos, enzimas técnicas e, enzimas empregadas na produção de ração animal (MENDES; et al, 2011). No setor industrial as proteases ocupam 40% do mercado das enzimas, sendo assim as mais utilizadas seguidas das carboidrases (amilases e celulasas) e lipases (SHARMA; et al, 2001).

A principal desvantagem da utilização de enzimas na forma solúvel é a sua separação para posterior aplicação, assim como a contaminação do produto desejado, pois enzimas são compostos solúveis em água. Desta forma, técnicas de imobilização têm sido empregadas objetivando reutilizar as enzimas. Esta estratégia também é uma importante ferramenta para estabilizar e reduzir a inativação por distorção da sua estrutura nativa por influência da temperatura, pH e de solventes orgânicos, o que pode

ser atrativo para a aplicação de enzimas no setor industrial (GUISAN, 2006; HANEFELD; et al, 2009; LOPEZ-GALLEGO; et al, 2005).

### **3.2 Imobilização de Enzimas**

A imobilização baseia-se na confinamento da enzima em um suporte sólido para posterior reutilização do biocatalisador, tornando o processo, em termo financeiro, mais econômico (GUISAN, 2006). Em geral, a imobilização oferece uma série de vantagens e as razões para a escolha de um derivado imobilizado variam de aplicação para aplicação, incluindo: utilização da atividade catalítica por um período de tempo mais prolongado; possibilidade de operação contínua do processo, com maior facilidade de controle; facilidade de separação do produto final; em alguns casos, ocorre modificação favorável das propriedades catalíticas da enzima como, por exemplo, maior estabilidade ao pH e à temperatura, entre outros; facilidade de interrupção da reação, em um nível desejado, pela remoção da enzima, caso o processo seja batelada, ou ajuste do tempo de residência se é usado um reator contínuo (GUISAN, 2006; HANEFELD; et al, 2009).

Apesar da grande diversidade de métodos desenvolvidos e aplicáveis na imobilização de enzimas, não há um método que seja aplicado para todas as enzimas. Portanto, para cada aplicação de uma enzima imobilizada é necessário escolher o procedimento mais simples e mais acessível e que possa resultar em um derivado com boa retenção de atividade e alta estabilidade operacional (GUISAN, 2006; HANEFELD; et al, 2009; FREITAS, 2007).

A partir de informações disponíveis sobre as características do suporte e o efeito causado pelos métodos empregados, é possível fazer generalizações que permitam uma primeira seleção do método de imobilização. Enzimas podem ser imobilizadas por diferentes protocolos, isto é, podem ser encapsuladas; adsorvidas em materiais insolúveis como resinas de troca iônica; copolimerizadas com algum monômero ou se ligar a uma matriz insolúvel por ligações covalentes (GUISAN, 2006; HANEFELD; et al, 2009; FREITAS, 2007).

A adsorção física é o método mais simples e também o mais empregado para imobilizar enzimas. Nesse caso, o biocatalisador é estabilizado por interações fracas com o suporte como forças de van der Waals (interações hidrofóbicas), pontes de

hidrogênio e ligações iônicas. As principais vantagens que este processo de imobilização oferece são a facilidade e a simplicidade do processo e, além disso, a estrutura conformacional da enzima é pouco alterada. A grande desvantagem é a dessorção da enzima devido às variações de temperatura, pH e força iônica (HANEFELD; et al, 2009; JEGANNATHAN; et al, 2008; CARDOSO; et al, 2009).

Outro método de imobilização é a encapsulação, que consiste na retenção física da enzima nas cavidades internas de uma matriz porosa constituída geralmente por polímeros entrecruzados como poliacrilamida, gelatina, alginato, carragenana, resinas de poliuretano e silanos. As principais vantagens da encapsulação de enzimas referem-se à grande área superficial para contato do substrato e da enzima no interior de um volume relativamente pequeno, e à possibilidade de imobilização simultânea de diferentes enzimas em uma única etapa. Como principais desvantagens, têm-se: a restrição de que os biocatalisadores podem ser aplicados somente com substratos de baixa massa molecular; a possível inativação da enzima durante o procedimento de imobilização; a alta concentração de enzima necessária para garantir a encapsulação e, os possíveis efeitos de difusão de substratos e/ou produtos no interior da matriz porosa (HANEFELD; et al, 2009; JEGANNATHAN; et al, 2008; CARDOSO; et al, 2009).

A imobilização através de ligação covalente é baseada na ativação de suportes com a inserção de grupos reativos que reagem com os grupos nucleofílicos da enzima. Esta técnica não é tão comum como o método de adsorção física, mas apresenta como vantagem evitar o fenômeno de dessorção. A seleção das condições para a imobilização por ligação covalente apresenta mais dificuldades que em outros métodos de ligação em suportes. É necessário conhecer tanto a densidade dos grupos ativos por unidade de área do suporte quanto a sua geometria para reduzir a formação do complexo enzima-suporte inativo. Este método pode também afetar a estrutura ativa da enzima, devido à alteração do centro ativo. Apresentando como principais vantagens a maior resistência do biocatalisador quanto à variação de pH, temperatura e influência de solventes orgânicos; os derivados preparados podem ser empregados em diversas conformações de reatores, como fluxo contínuo, empacotado, tanque agitado e leito fluidizado e, a carga de enzima permanece constante após a etapa de imobilização (HANEFELD; et al, 2009; FREITAS; et al, 2007).

### 3.3 Suportes para Imobilização

O suporte é responsável pela maior contribuição para o bom desempenho da enzima imobilizada. Se de um lado um suporte criteriosamente selecionado é capaz de aumentar o tempo de meia-vida da enzima imobilizada, de outro uma escolha indevida pode afetar adversamente não só a estabilidade térmica, mas o desempenho global do sistema. (MENDES; et al, 2011).

Para selecionar um suporte para uma determinada aplicação, devem ser analisadas tanto suas propriedades físicas quanto as químicas, bem como a possibilidade de regeneração do material. As principais características que devem ser observadas na seleção de um suporte para utilização são: área superficial, permeabilidade, insolubilidade, capacidade de regeneração, morfologia e composição, natureza hidrofílica ou hidrofóbica, resistência ao ataque microbiano, resistência mecânica e custo, dentre outras. Eles podem ser classificados como orgânicos e inorgânicos, e conforme sua morfologia em materiais porosos, não porosos e de estrutura de gel (JEGANNATHAN; et al, 2008; CARDOSO; et al, 2009; MATEO; et al, 2007).

Suportes inorgânicos são mais adequados para utilização industrial devido as suas propriedades físicas, além disso, apresentam uma série de vantagens em relação aos suportes orgânicos como: elevada resistência mecânica, estabilidade térmica, resistência a solventes orgânicos e ataque de microrganismos e fácil regeneração por processo de pirólise. No mais, materiais inorgânicos não apresentam modificação estrutural em uma larga faixa de pressão, temperatura e pH. No entanto, a maioria das enzimas imobilizadas e comercializadas é obtida com matrizes orgânicas, provavelmente, devido a grande variedade de grupos funcionais reativos que podem ser “introduzidos” em suportes orgânicos (ADRIANO, 2008).

Os suportes porosos, tanto orgânicos quanto inorgânicos, possuem 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, como também o acesso das moléculas de produtos e substratos. Os não porosos eliminam a resistência à transferência de massa interna, no entanto, apresentam uma limitada área superficial disponível para imobilização de enzimas. Para aumentar a carga de enzima imobilizada, utilizam-se partículas finas ou fibras, contudo, estas são dificilmente removidas da

mistura reacional, limitando o uso em reações contínuas, desde que levadas a uma alta pressão em reatores de leito fixo. Além disso, influem no grau de escoamento se utilizadas em reatores de leito fluidizado (ADRIANO, 2008).

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

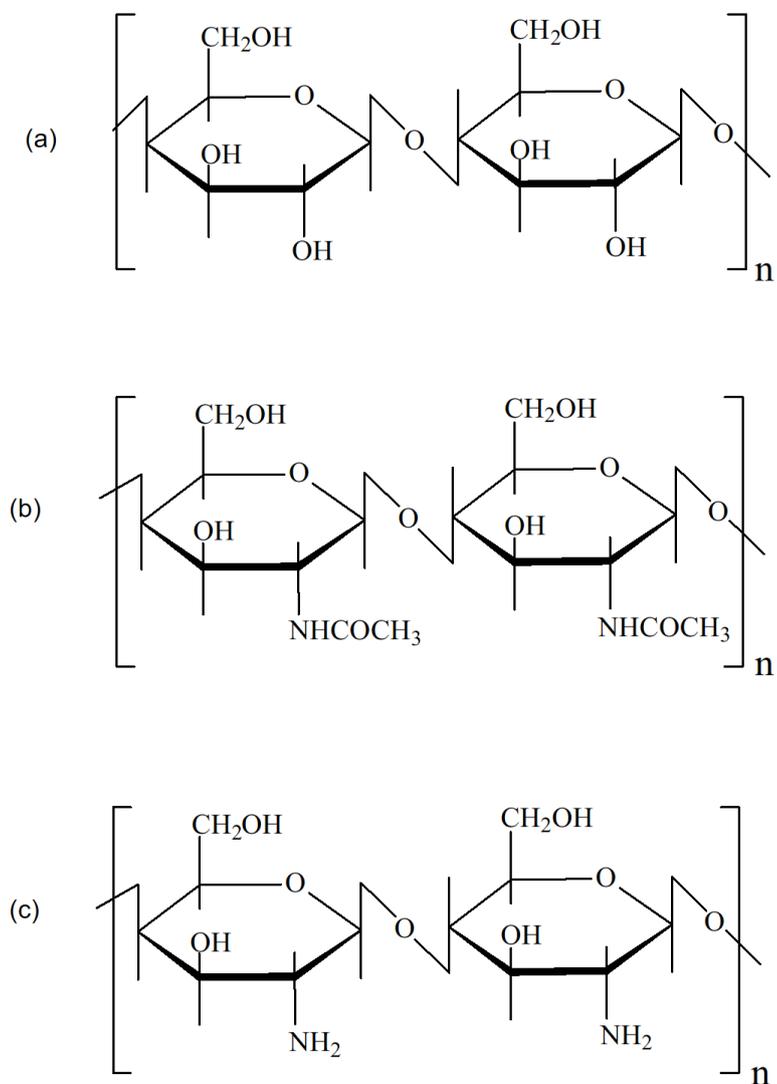
### 3.3.1 Quitosana

Entre os diferentes suportes orgânicos naturais utilizados na imobilização de enzimas, destaca-se a quitosana. Ela 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, sendo assim, de grande importância econômica e ambiental. Este biopolímero apresenta uma estrutura molecular quimicamente similar à da celulose, diferenciando-se apenas nos grupos funcionais (KRAJEWSKA, 2004), como pode ser visualizado na Figura 1.

Grupos hidroxilas (OH) estão presentes na estrutura geral desses biopolímeros, mas a principal diferença entre eles é a presença de grupos amino ( $\text{NH}_2$ ) na estrutura da quitosana. Este biopolímero é solúvel em meio ácido diluído, formando um polímero catiônico, com a protonação do grupo amino gerando o íon  $\text{NH}_3^+$ , que confere propriedades especiais diferenciadas em relação, por exemplo, às fibras vegetais (BERGER; et al, 2004).

A utilização de quitosana como suporte para a imobilização de enzimas é devido às suas diferentes configurações geométricas como pó, escamas, hidrogéis, membranas, fibras e outras, além da presença de diferentes grupos funcionais, como hidroxila e amino, que possibilitam a utilização de diferentes métodos de imobilização (BERGER; et al, 2004; KUMAR, 2000) .

Figura 1: Representação esquemática das estruturas primárias de (a) celulose, (b) quitina e (c) quitosana.



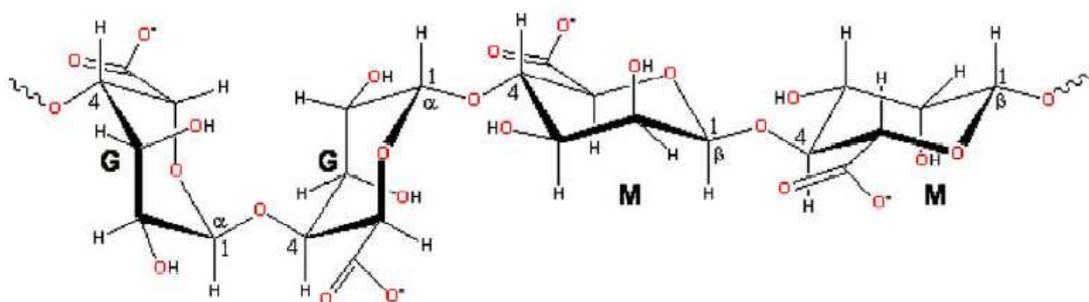
Fonte: ADRIANO, 2008.

### 3.3.2 Alginato de Sódio

Alginato é um polissacarídeo extraído de algas marrons, com estrutura química expressa na Figura 2 formada por um polímero linear constituído por unidades de ácidos

L-gulurônico e D-manurônico (GEORGE; ABRAHAM, 2006; TAPIA, et al; 2004) . Também conhecido por algina, é o carboidrato purificado extraído de vegetais marítimos através de uma solução alcalina, é extraído, sobretudo da alga *Macrocystis pyrifera*. É um polímero amplamente usado para imobilização e tecnologias de microencapsulação. A algina é composta principalmente pelo sal sódico do ácido algínico, polímero linear do ácido L-gulurônico e do ácido D-manurônico. Este último é o principal componente, mas pode haver alguma variação, dependendo da alga de origem. O alginato de sódio caracteriza-se como pó fino ou grosso quase inodoro e insípido, de cor branco-amarelada. É bastante hidrossolúvel, formando uma solução coloidal viscosa. Tem utilidade na indústria alimentícia, para cosméticos em suspensão, como goma e como ligante e espessante em comprimidos. Os sais de vários cátions polivalentes e o ácido algínico têm propriedades úteis para formação de géis, por isso, o alginato de sódio tem aplicação na geleificação para várias finalidades como imobilização enzimática, formação de membranas e encapsulação de drogas (ADRIANO, 2008).

Figura 2: Estrutura química do alginato. G é o grupo do ácido gulurônico e M é o grupo do ácido manurônico.



Fonte: ADRIANO, 2008.

### 3.3.3 *Saccharomyces cerevisiae*

*Saccharomyces cerevisiae* também chamado fermento do “padeiro” ou “cervejeiro” é usado na indústria alimentícia, vinícola e cervejarias. Este fungo trata-se

de um fermento geneticamente tratável e está intimamente relacionado à *Candida albicans*. Como uma consequência, torna-se um fermento modelo que em geral tem seu uso em pesquisa molecular, incluindo sequência de análise de DNA, mecanismo de ação de drogas antifúngicas (ADRIANO, 2008).

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

*Saccharomyces cerevisiae* tem aproximadamente  $40\mu\text{m}^3$  de volume contendo  $\beta(1-3)$ -D-glicana,  $\beta(1-6)$ -D-glicana, quitina e manoproteína(s) (ADRIANO, 2008).

### 3.4 Modificação Química do Suporte

Com a finalidade de prolongar a estabilidade química e física do suporte, têm sido empregadas alternativas como a modificação química, também denominada de reticulação, empregando diferentes agentes de ativação (LI; BAI, 2005; MENDES; et al, 2010; GONÇALVES; et al, 2005; RODRIGUES, et al, 2008). A ativação do suporte tem como objetivo aumentar a resistência mecânica, alterar a hidrofobicidade, biocompatibilidade e estabilidade química tornando-o assim mais resistente. Para ativação de diversos suportes, vários agentes bifuncionais têm sido empregados (VIEIRA, 2004).

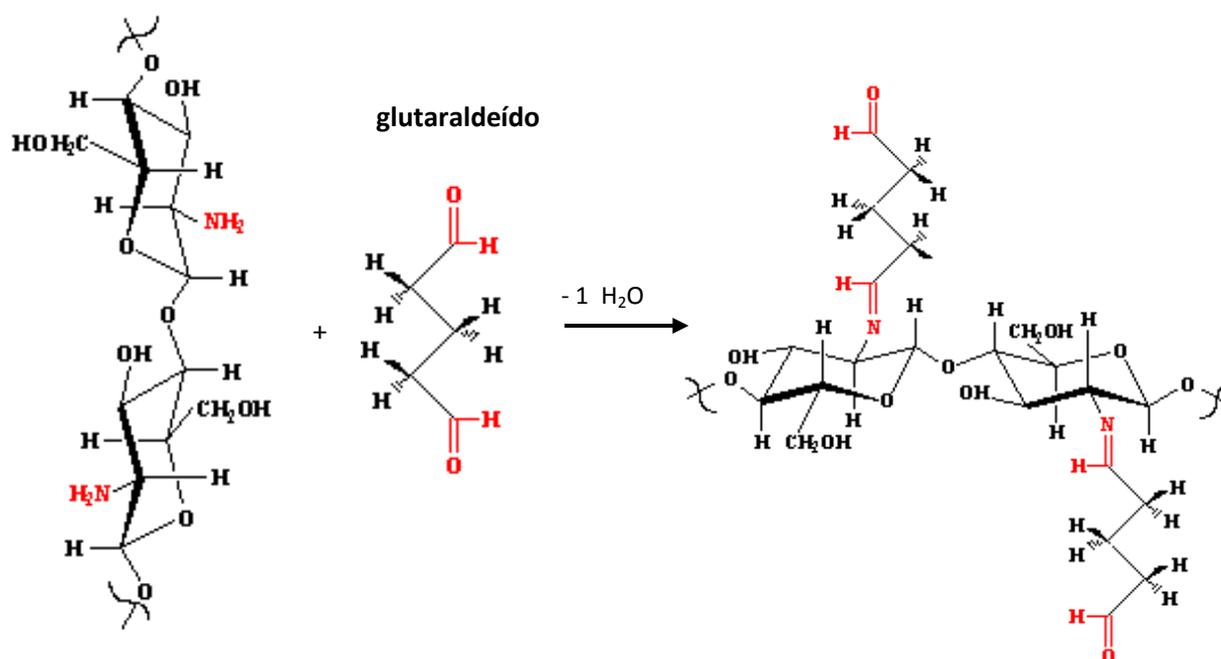
O glutaraldeído é o dialdeído mais utilizado na ativação de suportes para imobilização de enzimas e tem sido extensivamente citado como agente ativador de matrizes para imobilizar enzimas e proteínas. Apesar de sua reação com grupos amino primários para promover reticulação covalente ter sido explorada em várias circunstâncias, o mecanismo preciso dessa reação e a estrutura dos componentes químicos formados não foram ainda bem elucidados. Glutaraldeído reage com aminos da quitosana e conseqüentemente, esses grupos ficam disponibilizados em menor quantidade para a formação de complexos diminuindo sua capacidade de adsorção. A reação de ativação entre glutaraldeído e quitosana está exemplificada na Figura 3.

Grupos amino são polares e estes geralmente ficam 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 parcialmente positiva localizados na superfície do suporte (GOMÉZ; et al, 2006; MATEO; et al, 2006).

Os grupos aminos são capazes de reagir com vários grupos laterais das proteínas, como hidroxila, carbonila, amino e sulfidril. Sua característica é a alta reatividade dos grupos aldeídicos com amins primárias inclusive com pH inferiores a dos grupos aminos da enzima. Estes grupos têm a capacidade de imobilizar proteínas através das bases de Schiff em uma larga faixa de condições (baixas temperaturas e curto tempo de contato enzima-suporte), inclusive utilizando suportes com baixo grau de ativação (CARDIAS; et al, 1999).

O método de ativação do suporte mais viável deve ser aquele que produza grupos aldeídos moderadamente afastados do suporte para evitar que ocorra impedimento estérico. Como principal vantagem na utilização de grupos aldeídos para ativação do suporte tem-se a 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).

Figura 3: Reação de ativação entre glutaraldeído e quitosana.



Fonte: ADRIANO, 2008.

## 4. Material e Métodos

### 4.1 Material

#### 4.1.1 Suportes

Quitosana em pó com grau de desacetilação de 85,2% adquirido junto a POLYMAR IND LTDA, Fortaleza, Ceará, e alginato de sódio distribuído pela Vetec – São Paulo; foram utilizados como suporte no processo de imobilização enzimática.

#### 4.1.2 Microrganismo

*Saccharomyces cerevisiae* (fermento úmido para panificação) da marca Fleischmann®, utilizado para aumentar a capacidade de imobilização pela possibilidade de formação de poros.

#### 4.1.3 Reagentes Usados para Tratamento dos Suportes

- Fosfato de potássio monobásico e fosfato de potássio dibásico (Dinâmica Química Contemporânea LTDA) foram utilizados para preparação do tampão;
- Ácido tricloroacético (SIGMA-ALDRICH BRASIL LTDA) como agente desnaturante enzimático;
- Carbonato de sódio (Dinâmica Química Contemporânea LTDA) e solução de Follin-Cicalteu's (SIGMA-ALDRICH BRASIL LTDA) para determinar proteínas pela reação colorimétrica;
- Sabão em pó da marca OMO® tripla ação para agilizar a lise celular.

#### **4.1.4 Enzima**

Neutrase® com atividade de 40,45 U/mL  $\pm$  3,5 adquirida da Novozymes Latin America Ltda.

#### **4.1.5 Agente Ativante**

Glutaraldeído a 25% (v/v) comercializado pela Vetec – São Paulo, escolhido como agente ativante.

#### **4.1.6 Substrato**

Caseína de leite bovino (SIGMA-ALDRICH BRASIL LTDA).

### **4.2 Métodos**

#### **4.2.1 Preparação das Partículas de Híbridos de Quitosana: Quitosana 2,5% - Alginato de Sódio 2,5%**

A quitosana em pó foi dissolvida em ácido acético 5% v/v e a esta solução adicionou-se o polímero alginato de sódio, ficando em homogeneização por 30 minutos. Após a solubilização, a solução foi adicionada lentamente em uma solução de NaOH 0,1M na razão 1/10 passando por agitação moderada por 4 horas a temperatura ambiente. Passado esse intervalo de tempo, as partículas foram lavadas exaustivamente com água destilada até a neutralidade e secas a vácuo, resultando no gel suporte de quitosana 2,5% - alginato de sódio 2,5%, sendo todas as concentrações percentagem massa/volume (ADRIANO, 2008).

#### **4.2.2 Preparação das Partículas de Híbridos de Quitosana Contendo**

**Microrganismo: Quitosana 2,5% - Alginato de Sódio 2,5% - Sc 5%**

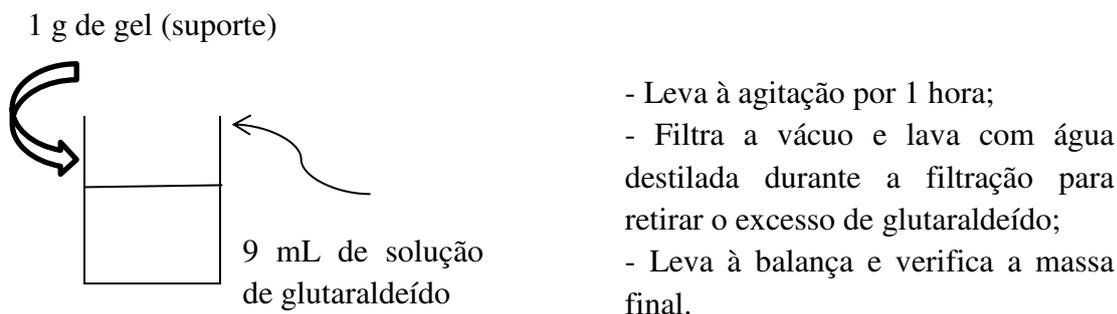
A quitosana em pó foi dissolvida em ácido acético 5% v/v e a esta solução adicionou-se o polímero alginato de sódio e posteriormente o microrganismo *Saccharomyces cerevisiae* (Sc), ficando em homogeneização por 30 minutos. O sistema solubilizado foi lentamente adicionado em NaOH 0,1M na razão 1/10 sobre agitação moderada e deixado em repouso por 4 horas.

Para que ocorresse uma lise celular bem mais rápida, prática e com menos custo, utilizou-se sabão em pó comercial da marca OMO® tripla ação o qual contém proteases, lipases secretadas por *Bacillus subtilis* e *Bacillus licheniformis*. Após a coagulação do gel em NaOH, o pH da solução coagulante foi ajustado em 9,0 e a temperatura de 40°C e adicionou-se sabão em pó numa concentração de 1% m/v e manteve-se o sistema sob agitação por 24 horas, lavou-se o gel com água destilada até a retirada de todo sabão em pó para atingir a neutralidade e as partículas foram secas a vácuo formando o gel suporte de quitosana 2,5% - alginato 2,5% - Sc 5%, sendo todas as concentrações percentagem massa/volume (ADRIANO, 2008).

#### **4.2.3 Ativação dos Suportes Utilizando Glutaraldeído**

Os suportes foram ativados com glutaraldeído 5% v/v em tampão fosfato de potássio 0,1M pH 8,0 por 1h a 25°C (razão  $V_{gel}/V_{total}$  de 1/10), como mostra o esquema da Figura 4. O glutaraldeído atua como agente ativante com a finalidade de facilitar a imobilização da enzima e evitar a dessorção da mesma. Depois de ativados, os suportes foram lavados com água destilada para retirar o excesso de glutaraldeído e suas massas foram verificadas (ADRIANO, 2008).

Figura 4: Fluxograma mostrando a ativação via glutaraldeído dos géis preparados.



Fonte: Própria do trabalho, 2014.

#### 4.2.4 Imobilização da Neutrase®

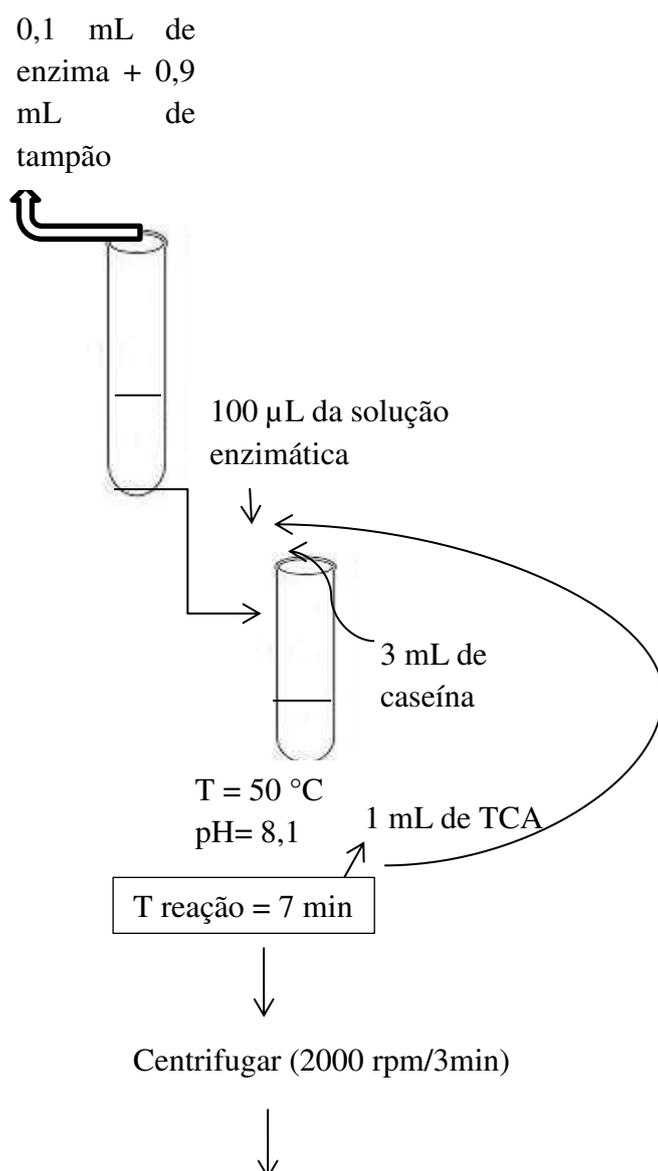
Após a ativação dos suportes e de acordo a massa resultante dos mesmos, foram preparadas soluções enzimáticas em tampão fosfato de potássio 0,1M pH 10,0 e o extrato puro da enzima Neutrase®. As massas dos suportes juntamente com as soluções enzimáticas foram colocadas em tubos fechados e submetidos à rotação de 30 rpm durante 3 horas a uma temperatura de 25°C, sendo a carga oferecida 10 U/g de suporte. Antes de leva-los à agitação, foram retiradas alíquotas para medida das atividades de t<sub>0</sub> (atividade no tempo zero, antes da imobilização) e t<sub>f</sub> (atividade ao final do processo de imobilização). Ao fim desse período, o derivado foi lavado com água destilada (ADRIANO, 2008).

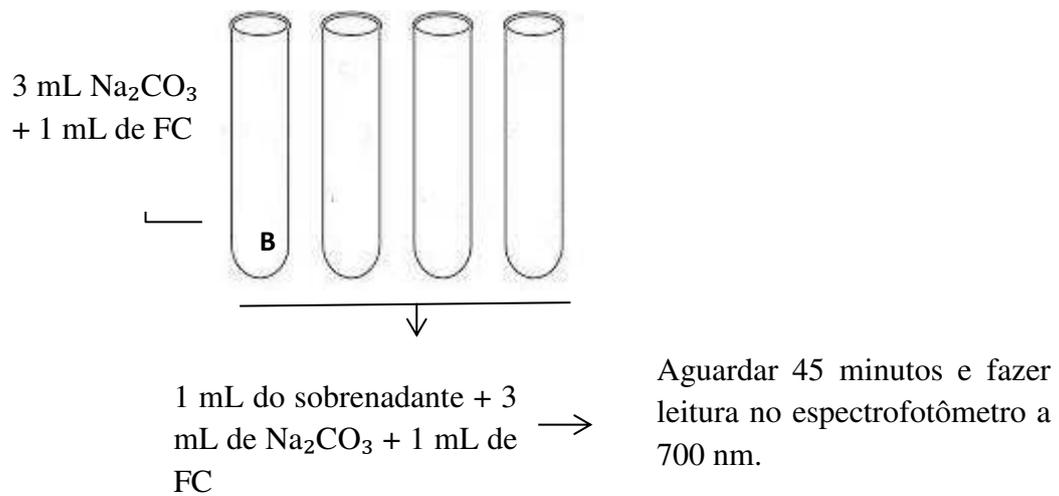
#### 4.2.5 Determinação da Atividade Enzimática

Foram determinadas as atividades da enzima livre e da imobilizada nos diferentes suportes. Para obter a atividade da enzima livre, uma solução de neutrase® (solução enzimática) contendo: neutrase® + tampão fosfato de potássio pH 8,0 foi preparada; em um tubo de ensaio a uma temperatura de 50°C, 100 µL da solução enzimática foram misturados a 3 mL de caseína reagindo por 7 minutos, posteriormente 1 mL de ácido tricloroacético (TCA) foi adicionado no tubo de ensaio parando assim a

reação. De acordo com CHINELATE (2010), a proteína não hidrolisada precipitará na presença do TCA, possibilitando quantificar a massa de proteína que será hidrolisada pela enzima, e com isto, medir a atividade catalítica da Neutrase®. O precipitado foi centrifugado a 3.000 rpm/5 minutos e uma solução de Follin & Cicocalteu's (FC) foi preparada na razão 1:3; tubos de ensaios foram separados, sendo um deles destinado para o branco, e nestes foram adicionados: o sobrenadante resultante da centrifugação, carbonato de sódio ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) e FC, aguardou-se 45 minutos para que houvesse a reação colorimétrica e foi realizada a leitura da absorbância em espectrofotômetro a um comprimento de onda de 700 nm (ADRIANO, 2008). A Figura 5 esquematiza o processo para obtenção da atividade da enzima livre.

Figura 5: Esquema do processo de obtenção da atividade da enzima livre.

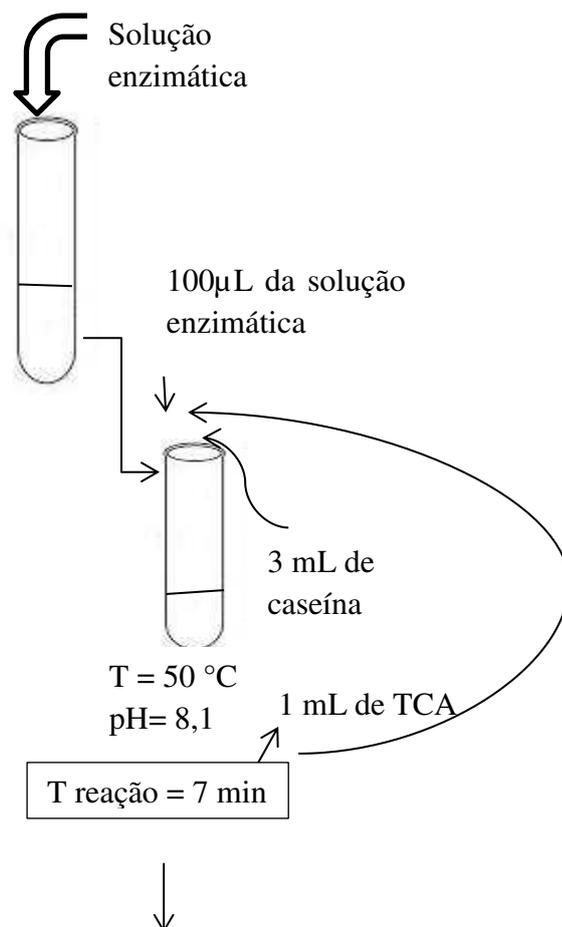


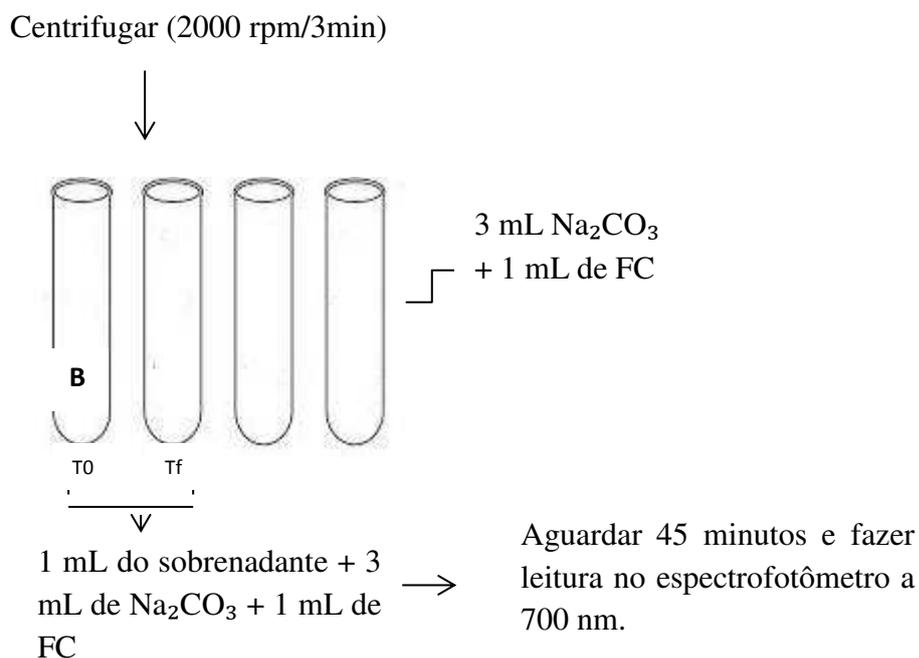


Fonte: Própria do trabalho, 2014.

Procedimento semelhante foi realizado para medir a atividade da enzima imobilizada para  $t_0$  e  $t_f$  como mostra a Figura 6.

Figura 6: Esquema do processo de obtenção da atividade da enzima imobilizada para  $t_0$  e  $t_f$ .

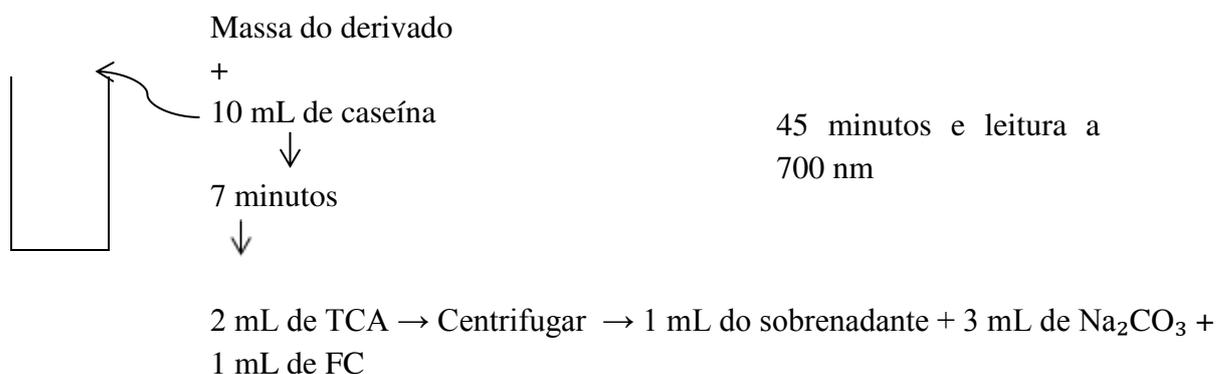




Fonte: Própria do trabalho, 2014.

Para medir a atividade do derivado, 10 mL de caseína foram colocadas em um reator sob agitação a uma temperatura de 50°C, a massa do derivado foi adicionada a esse reator e passados 7 minutos, 2 mL de TCA foram misturados ao sistema, precipitando a reação. O material do reator foi transferido para um tubo de ensaio e centrifugado, o sobrenadante foi transferido para outro tubo juntamente com  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  e FC e aguardou-se o tempo de 45 minutos para realizar a leitura da absorbância em espectrofotômetro a um comprimento de onda de 700 nm (ADRIANO, 2008). A Figura 7 ilustra o procedimento para medida da atividade do derivado.

Figura 7: Modelo esquemático da medida da atividade do derivado.



Fonte: Própria do trabalho, 2014.

Com as medidas das absorbâncias, foi calculada a concentração de tirosina [Tyr] (produto de hidrólise), pela equação 1:

$$[Tyr] = \frac{abs-0,0332}{5,9885} \quad (1)$$

Encontrada a [Tyr], substituiu-se o seu valor na seguinte equação para encontrar a atividade enzimática:

$$Ativ = \frac{[Tyr] \times Vr \times 5520}{Ve \times Tr} \quad (2)$$

O processo de imobilização foi avaliado quantificando a atividade enzimática a partir dos cálculos de Atividade Recuperada (ARec) e do Rendimento de Imobilização (RI), através das seguintes equações:

$$ARec (\%) = \frac{AAP}{ATI} \times 100 \quad (3)$$

ARec = Atividade recuperada

AAP = Atividade Aparente do Derivado

ATI = Atividade Teórica de Imobilização

$$RI = \frac{ATI}{AT0} \times 100 \quad (4)$$

RI = Rendimento da Imobilização

ATI = Atividade Teórica de Imobilização

AT0 = Atividade no Tempo Zero

#### 4.2.6 Ensaio de Estabilidade Térmica

Em forma livre e imobilizada, amostras da enzima Neutrase® foram incubadas em tampão fosfato de potássio 100 mM, pH 8,0 a uma temperatura de 60°C. Em intervalos de tempo pré-definidos as amostras eram retiradas e colocadas em banho de gelo e posteriormente medidas suas atividades. O suporte quitosana 2,5%-alginate 2,5% foi submetido a este ensaio por 2,5 h, sendo as amostras retiradas a cada 0,5 h; enquanto o suporte quitosana 2,5%-alginate 2,5%-Sc 5%, submetido a 6 h, tendo suas amostras

retiradas a cada 0,5 h até completar 3 h de ensaio e a cada 1 h até o tempo restante. A constante de desativação térmica para cada derivado foi calculada de acordo com o modelo proposto por BELVER (2008).

$$a = e^{-k_d x t} \quad (5)$$

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, utilizando o parâmetro  $K_d$ , foi calculado pela equação:

$$t^{1/2} = \frac{\ln(0,5 - \alpha)}{k_d x (1 - \alpha)} \quad (6)$$

Foi calculado ainda o Fator de Estabilização, que é a razão entre os tempos de meia vida do derivado e da enzima solúvel, através da equação:

$$FE = \frac{t^{1/2} \text{ derivado}}{t^{1/2} \text{ enzima solúvel}} \quad (7)$$

#### 4.2.7 Cinética Enzimática

Diferentes concentrações de substrato (2 a 40 g/L) foram usados para medir os parâmetros cinéticos através da medida da atividade.

Para obtenção das velocidades máximas e das constantes cinéticas foi utilizada a equação do modelo cinético de Michaelis-Menten (CHINELATE, 2013).

$$v(S) = \frac{v_{max} \times S}{K_m + S} \quad (8)$$

## 5. Resultados e Discussão

A seguir serão apresentados os resultados da preparação dos derivados obtidos no processo de imobilização da enzima Neutrase® em suportes a base de quitosana e alginato.

### 5.1 Caracterização dos Suportes: Quitosana 2,5% - Alginato 2,5% e Quitosana 2,5% - Alginato 2,5% - *Saccharomyces cerevisiae* 5%

Após ativação dos suportes com glutaraldeído e imobilização dos mesmos, estes foram comparados sob alguns parâmetros apresentados na Tabela 1 para que fosse observado qual apresentou melhores resultados.

Com relação ao rendimento de imobilização, o suporte que apresentou melhor resultado foi o Quitosana 2,5% - Alginato 2,5% - *Saccharomyces cerevisiae* 5% (QUI 2,5% - ALG 2,5% - *Sc* 5%) com um valor de 47,57%, enquanto o suporte Quitosana 2,5% - Alginato 2,5% (QUI 2,5% - ALG 2,5%) apresentou um rendimento de imobilização correspondente a 40,31%. No entanto, a atividade recuperada apresentou um melhor resultado no suporte QUI 2,5% - ALG 2,5% com um valor de 59,93%. A atividade aparente foi melhor no suporte QUI 2,5% - ALG 2,5%, fato este um pouco inesperado, pois a produção e aumento do tamanho de poros no suporte que podem ser proporcionados pela retirada do *S. cerevisiae* do suporte pelo tratamento com sabão, facilitaria a difusão do substrato no gel e aumentaria o espaço para imobilização.

Tabela 1. Parâmetros de imobilização de Neutrase® em Quitosana 2,5% - Alginato 2,5% (m/v) e Quitosana 2,5% - Alginato 2,5% - *Saccharomyces cerevisiae* 5% em pH 10,0 a 25°C durante 3 horas de imobilização. Carga enzimática oferecida 10 U/g. Cuité, Jan. de 2014

<b>Suporte</b>	<b>At oferecida (U/g)</b>	<b>RI (%)</b>	<b>At teoricamente imobilizada (U/g)</b>	<b>At recuperada (%)</b>	<b>At aparente (U/g)</b>
Quitosana-Alginato	29,77	40,31	12	59,93	7,2
Quitosana-Alginato- <i>Sc</i>	54,93	47,57	26,13	25,35	6,6

Fonte: Dados do trabalho, 2014

Faria (2013) que também ativou com glutaraldeído e imobilizou a enzima Neutrase® observou o mesmo no que se referiu ao rendimento de imobilização e atividade recuperada em seus suportes que eram à base de quitosana e gelatina. Em que o suporte Quitosana 2,5% - Gelatina 2,5% - *Saccharomyces cerevisiae* 5% apresentou um melhor rendimento de imobilização (76%) e o suporte Quitosana 2,5% - Gelatina 2,5%, uma melhor atividade recuperada (52%). Sousa (2014) imobilizou a enzima Neutrase® em suportes a base de quitosana e gelatina ativados com epicloridrina utilizando o *Saccharomyces cerevisiae*, obtendo melhor resultado para o suporte Quitosana 2,5% - Gelatina 2,5% - *Saccharomyces cerevisiae* 5%, com rendimento de imobilização equivalente a 71%. O melhor resultado para o rendimento de imobilização já era um tanto esperado para o suporte que continha *Saccharomyces cerevisiae* pela natureza do mesmo, devido à sua alta porosidade, oferecendo assim, uma elevada área superficial por unidade de área para imobilização da enzima.

## 5.2 Estudo da Estabilidade Térmica

Os dois suportes foram submetidos a uma avaliação quanto à sua estabilidade térmica em temperatura correspondente a 60°C, conforme Ortega et al., (2009), determinando o  $t_{1/2}$  (tempo de meia vida) e fator de estabilidade térmica (FE), bem como a constante de desnaturação térmica  $K_d$ , aplicando o modelo de Sadana-Henley (1987), os resultados podem ser visualizados na Tabela 2 e nos gráficos a seguir.

O suporte Quitosana 2,5% - Alginato 2,5% foi avaliado por 2,5 horas, enquanto o suporte Quitosana 2,5% - Alginato 2,5% - *Saccharomyces cerevisiae* 5% foi submetido ao teste de estabilidade térmica por 6 horas.

Tabela 2. Parâmetros de estabilidade térmica a 60°C da imobilização da enzima Neutrase® em suportes de Quitosana 2,5% - Alginato 2,5% e Quitosana 2,5% - Alginato 2,5% - *Saccharomyces cerevisiae* 5% ativados com glutaraldeído. Cuité, Jan. de 2014

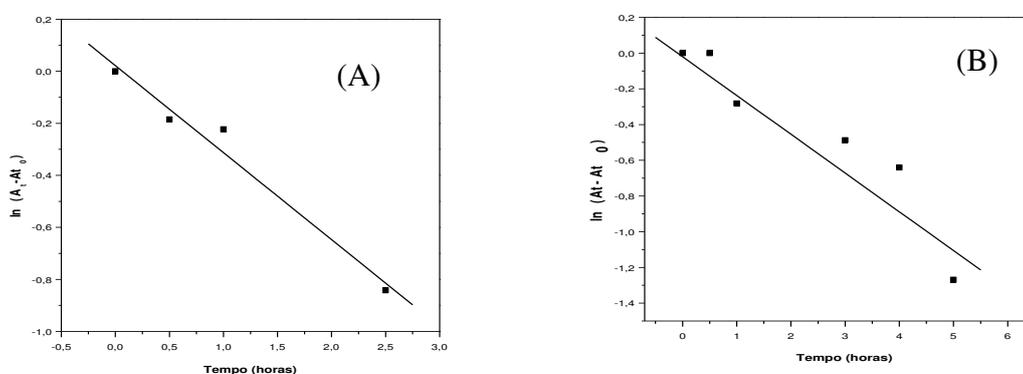
Biocatalisadores	Sadana e Henley (1987)	t <sup>1/2</sup> (h)	FE
	Kd <sup>h<sup>-1</sup></sup>		
Neutrase solúvel	19,08	0,036	1
Quitosana 2,5% - Alginato 2,5%	0,3345	2,072	57,03
Quitosana 2,5% - Alginato 2,5% - Sc 5,0%	0,21712	3,192	87,86

Fonte: Dados do trabalho, 2014.

Conforme pode ser observado na Tabela 2, o suporte Quitosana 2,5% - Alginato 2,5%, apresentou uma maior constante de desnaturação (Kd); o suporte Quitosana 2,5% - Alginato 2,5% - *Saccharomyces cerevisiae* 5% se mostrou mais estável, apresentando tempo de meia vida (t<sup>1/2</sup>) correspondente a 3,2 horas; ambos suportes apresentaram bons valores de fator de estabilidade térmica, contudo o suporte Quitosana 2,5% - Alginato 2,5% - *Saccharomyces cerevisiae* 5% mostrou-se 87,86 vezes mais estável que a enzima solúvel, caracterizando-se como melhor suporte para imobilização da enzima Neutrase®. Faria (2013) obteve uma melhor estabilidade térmica para o suporte Quitosana 2,5% - Gelatina 2,5% com fator de estabilidade 93,95 vezes mais estável que a enzima solúvel. Sousa (2014) obteve uma melhor estabilidade para o suporte Quitosana 2,5% - Gelatina 2,5% - *Saccharomyces cerevisiae* 5%, sendo este 86,38 vezes mais estável que a Neutrase® solúvel. Segundo Rodrigues (2008), os altos valores do fator de estabilidade térmica podem ser explicados pelo fato dos grupos aldeídos do glutaraldeído apresentarem alta reatividade, que o torna versátil, sendo assim utilizado em muitas condições diferentes. O que também pode explicar esse resultado é a utilização da *Saccharomyces cerevisiae* na composição do suporte, Adriano (2008) reporta que os polissacarídeos que compõem a parede celular do microrganismo parecem ter uma função estrutural, considerando que monoproteínas podem agir como protetoras e são importantes para a permeabilidade da parede celular. A lise da parede

celular do fungo se mostrou mais eficiente devido a sua estrutura de parede ser mais rica em macromoléculas o que levou às melhores configurações internas de poros.

Figura 8. Gráficos da estabilidade térmica obtida a partir da imobilização de Neutrase®; (A) em suporte de Quitosana 2,5% - Alginato 2,5% ativado com glutaraldeído a 60°C, por 2,5 horas, pH 10,0, com carga inicial oferecida de 10 U/g de suporte; (B) em suporte de Quitosana 2,5% - Alginato 2,5% - *Saccharomyces cerevisiae* 5% ativado com glutaraldeído a 60°C, por 6,0 horas, pH 10,0, com carga inicial oferecida de 10 U/g de suporte.



Fonte: Dados do trabalho, 2014.

O tempo de meia vida da enzima ( $t_{1/2}$ ), calculado através da equação 6, está expresso através da Figura 8 que ilustra as estabilidades térmicas obtidas a partir da imobilização da Neutrase® nos suportes Quitosana 2,5% - Alginato 2,5% e Quitosana 2,5% - Alginato 2,5% - *Saccharomyces cerevisiae* 5%, respectivamente. Nota-se através da figura citada e também pode ser observado na Tabela 2, que o  $t_{1/2}$  do suporte contendo o microrganismo apresenta um valor superior ao do outro suporte, mostrando ser esse o suporte mais estável a uma temperatura de 60° C.

### 5.3 Estudo Cinético

Diferentes concentrações de caseína e a enzima Neutrase® em sua forma livre e imobilizada, com carga oferecida de 10 U/g de gel, pH 10,0 a 50°C, foram utilizadas

para determinação da velocidade máxima da reação e da constante de Michaelis-Menten através do modelo de Michaelis-Menten, expresso pela equação 8.

A cinética enzimática estuda o efeito das diferentes variáveis que influenciam na velocidade da reação, dentre elas estão: temperatura, pH, concentração de substrato e concentração de inibidores e ativadores enzimáticos.

No que se refere ao efeito da concentração do substrato, seguiu-se o modelo de Michaelis-Menten, ajustando-o 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 fizeram o modelo de Michaelis-Menten se ajustar aos pontos experimentais estão expressos na Tabela 3 e na Figura 9. Ainda analisando a referida tabela, confirma-se o bom ajuste do modelo aos pontos experimentais pelos ótimos valores de  $R^2$  tanto para a enzima livre, quanto para a imobilizada nos diferentes suportes. Ressaltando que o suporte contendo *Saccharomyces cerevisiae* ainda se sobressaiu quanto ao outro suporte.

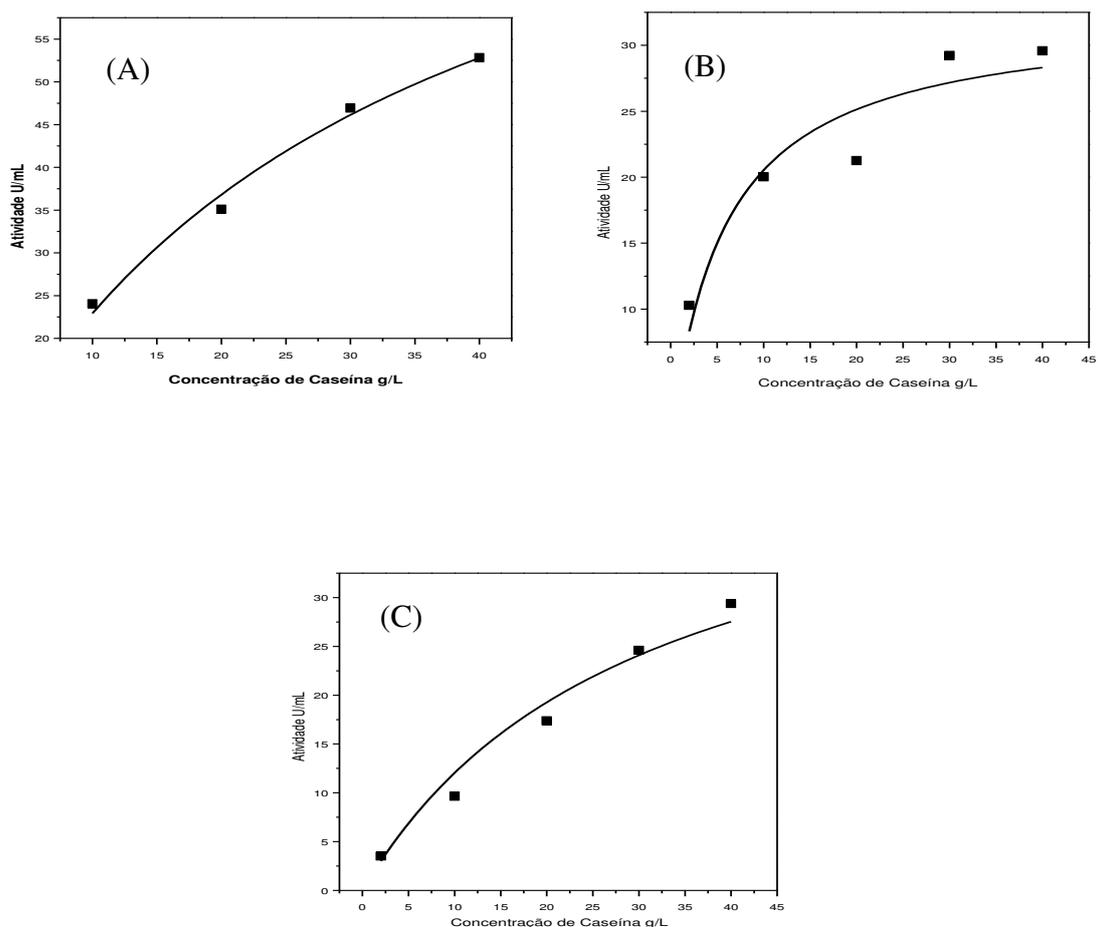
Tabela 3. Parâmetros cinéticos da enzima livre e imobilizada nos diferentes suportes. Cuité, Jan de 2014.

Neutrase	$K_m$ (g.L <sup>-1</sup> )	$V_{m\acute{a}x}$ (U.mL <sup>-1</sup> )	$R^2$
Enzima Livre	30,7	93,4	0,990
QUI 2,5% - ALG 2,5%	5,7	32,4	0,908
QUI 2,5% - ALG 2,5% - <i>Sc</i> 5%	30	48,1	0,994

Fonte: Dados do trabalho, 2014.

Chinellate (2013) diz que a concentração de substrato é um fator relevante na 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.

Figura 9. Ajuste do modelo de Michaelis-Menten para a reação de hidrólise da caseína 10 U/g suporte a 60°C pH 10,0; (A) enzima livre; (B) enzima imobilizada no suporte Quitosana 2,5% - Alginato 2,5%; (C) enzima imobilizada no suporte Quitosana 2,5% - Alginato 2,5% - *Saccharomyces cerevisiae* 5%.



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 biocatalisador. Assim, haverá um decréscimo na velocidade de reação e consequente perda de eficiência catalítica quando comparado à enzima livre.

Tanto para a enzima livre quanto para a imobilizada, foram utilizadas as mesmas quantidades de enzima em todas as reações. Desse modo, qualquer problema usando a enzima imobilizada foi devido a efeitos difusionais.

Acredita-se que a hidrólise foi limitada pela maior dificuldade de difusão do substrato no interior dos poros dos géis preparados, o que fez com que o valor de  $V_{m\acute{a}x}$  diminuísse em relação ao da enzima livre.

Faria (2013) que utilizou o suporte Quitosana 2,5% - Gelatina 2,5% - *Saccharomyces cerevisiae* 5% para realizar o estudo cinético, encontrou um valor de  $K_m$  de  $4,3 \text{ g.L}^{-1}$  e  $V_{m\acute{a}x}$  de  $6,0 \text{ U.mL}^{-1}$ . Nota-se que o valor de  $K_m$  é 15,5 vezes menor que o da enzima livre. Enquanto que o valor de  $V_{m\acute{a}x}$  encontrado neste trabalho no suporte contendo o microrganismo é 1,9 vezes inferior ao da enzima livre. Sousa (2014) encontrou um valor de  $V_{m\acute{a}x}$  correspondente a  $50,1 \text{ U.mL}^{-1}$  para o suporte Quitosana 2,5% - Gelatina 2,5% - *Saccharomyces cerevisiae* 5%. Portanto, pode-se afirmar que os efeitos difusionais foram mais prejudiciais para o suporte utilizado por Faria (2013), talvez porque o suporte dela tenha apresentado uma maior quantidade de poros devido as características da gelatina e da *Sc*, e que estes foram mais afetados pelo efeito de reticulação causada pelo glutaraldeído, que fecha a malha dos poros do suporte.

## 6. Conclusão

Em geral, a enzima Neutrase® immobilizada em suportes a base de Quitosana 2,5% - Alginato 2,5% e de Quitosana 2,5% - Alginato 2,5% - *Saccharomyces cerevisiae* 5% ativados com glutaraldeído mostraram vantagens significantes quando comparadas à enzima livre. Para os géis ativados com glutaraldeído, o suporte Quitosana 2,5% - Alginato 2,5% - *Saccharomyces cerevisiae* 5% apresentou melhores resultados, com rendimento de imobilização 47,57%; quanto à estabilidade térmica, mostrou-se 87,86 vezes mais estável que a enzima solúvel e foi o suporte que melhor se adequou ao modelo cinético de Michaelis-Menten.

As informações adquiridas pelo presente trabalho indicam que foi possível a imobilização da enzima Neutrase® nos dois suportes utilizados, bem como a caracterização dos mesmos quanto ao rendimento de imobilização, atividade recuperada, fator de estabilidade e ensaios cinéticos. Porém quando se compara os dois suportes, fica evidenciado que o suporte Quitosana 2,5% - Alginato 2,5% - *Saccharomyces cerevisiae* 5% caracteriza-se como melhor suporte para imobilização da enzima em estudo.

A obtenção de melhores resultados na imobilização da Neutrase® pelo suporte que continha *Saccharomyces cerevisiae* era um tanto esperada pela natureza do mesmo, devido à alta porosidade que o suporte apresentava, oferecendo assim, uma elevada área superficial por unidade de área para imobilização da enzima.

## 7. Referências

- ADRIANO, W. S. **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.
- AIRES-BARROS, M. R.; FERNANDES, P. **Engenharia Enzimática**. Lidel: Lisboa-Pt. p. 121-130, 2003.
- BELVER, C.; TAMAYO, J. J.; MOLINERO, L.; LADERO, M.; PESSELA, B. C. C.; GUIBAN, J. M.; GARCIA-OCHOA, F. Immobilization-stabilization of *Candida antarctica* Lipase B in Agarose-glyoxyl and agarose-octyl: Deactivation Kinetics. **Chemical Engineering Transactions**. v.14, p. 329-336, 2008.
- BERGER, J.; REIST, M.; MAYER, J. M.; FELT, O.; PEPPAS, N. A.; GURNY, R. Structure and interactions in covalently and ionically crosslinked chitosan hydrogels for biomedical applications. **European Journal Pharmaceutics and Biopharmaceutics**. v. 57, p. 19-34. 2004.
- 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.
- BON, E. P. S.; FERRARA, M. A.; CORVO, M. L. **Enzimas em Biotecnologia**. Interciência: Rio de Janeiro. p. 124-147, 2008.
- CARDIAS, H. C. T.; GRININGER, C. C.; TREVISAN, H. C.; GUIBAN, J. M.; GIORDANO, R. L. C. Influence of activation on the multipoint immobilization of penicillin G acylase on macroporous silica. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**. v. 16, p. 141-148, 1999.
- CARDOSO, C. L.; DE MORAES, M. C.; CASS, Q. B. Immobilization of the enzymes on chromatographic supports: a tool to research of inhibitor compounds. **Química Nova**. v. 32 (1), p. 175-187, 2009.
- CHINELATE, G. C. B. **Estudo da Imobilização das Enzimas Neutrase e L-Arabinose Isomerase em Suportes de Baixo Custo**. 2013. 130 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Rede Nordeste de Biotecnologia - RENORBIO: Programa de Pós-Graduação, Fortaleza, 2013.
- CHINELATE, G. C. B.; SIRO, J.; ADRIANO, W. S.; MAMMARELLA, J. E.; GONÇALVES, L. R. B. Imobilização de neutrase em bagaço de caju e coco ativadas por diferentes metodologias. In: **XVIII Congresso Brasileiro de Engenharia Química**. Foz do Iguaçu, Paraná, 2010.
- DE CASTRO, H. F.; MENDES, A. A.; SANTOS, J. C.; AGUIAR, C. L. Modificação de óleos e gorduras por biotransformação. **Química Nova**. v. 27 (1), p. 146-156, 2004.
- FARIA, A. S. M. **Imobilização de Neutrase® em Suportes de Quitosana Associada a Diferentes Copolímeros**. 2013. 38 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em

Farmácia) – Unidade Acadêmica de Saúde, Centro de Educação e Saúde, Universidade Federal de Campina Grande, Cuité – PB, 2013.

FREITAS, L.; PEREZ, V. H.; SANTOS, J. C.; DE CASTRO, H. F. Enzymatic synthesis of glyceride esters in solvent-free system: influence of the molar ratio, lipase source and functional activating agente of the support. **Journal of the Brazilian Chemical Society**. v. 18 (7), p. 1360-1366, 2007.

GEORGE, M.; ABRAHAM, T. E.; Polyionic hydrocolloids for the intestinal delivery of protein drugs: Alginate and chitosan – a review. **Journal of Controlled Release**. v. 114, p. 1-14, 2006.

GOMÉZ, L.; RAMIREZ, H. L.; VILLALONGA, M. L. Immobilization of chitosan-modified invertase on alginate-coated chitin support via polyelectrolyte complex formation. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 38, p.22-27, 2006.

GONÇALVES, V. L.; LARANJEIRA, M. C. M.; FÁVERE, V. T.; PEDROSA, R. C. Effect of cross-linked agents on chitosan microspheres in controlled release of diclofenac sodium. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**. v.15, p. 6-12, 2005.

GUISAN, J. M. In: **Immobilization of enzymes and cells**. Totowa: Humana Press, 2006.

HANEFELD, U.; GARDOSSI, L.; MAGNER, E. Understanding Enzyme Immobilisation. **Chemical Society Reviews**. v. 38, p. 453-468, 2009.

HASAN, F.; SHAH, A.A.; HAMMED, A. Industrial applications of microbial lipases. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 39, p. 235-251, 2006.

HASAN, S. D. M.; MELO, D. N. C.; FILHO, R. M. Simulation and response surface analysis for the optimization of a three-phase catalytic slurry reactor. **Chemical Engineering and Processing**. Lausanne, v. 44, p. 335-343, 2005.

HUANG, X. J.; YU, A. G.; JIANG, J.; PAN, C.; QIAN, J. W.; XU, Z. K. Surface modification of nanofibrous poly(acrylonitrile-co-acrylic acid) membrane with biomacromolecules for lipase immobilization. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**. v. 57, p. 250-256, 2009.

JEGANNATHAN, K. R.; ABANG, S.; PONCELET, D.; CHAN, E. S.; RAVINDRA, P. Production of biodiesel using immobilized lipase – a critical review. **Critical Review Biotechnology**. v. 28, p. 253, 2008.

KRAJEWSKA, B. Application of chitin – and chitosan based materials for enzyme immobilizations: a review. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 35, p. 126-139, 2004.

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

- LASZLO, J. A.; EVANS, K. O. Influence of self-assembled monolayer surface chemistry on *Candida antarctica* lipase B adsorption and specific activity. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**. v. 48, p. 84-89, 2007.
- LEI, L.; YONG, X. B.; YAN, F. L.; LIU, X. Y.; YONG, Y.; CHUNGU, X. Study on immobilization of lipase onto magnetic microspheres with epoxy groups. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**. v. 321, p. 252-258, 2009.
- LI, N.; BAI, R. B. A novel amine-shielded surface crosslinking of chitosan hydrogel beads for enhanced metal adsorption performance. **Industrial & Engineering Chemistry Research**. v. 44, p. 6692-6700, 2005.
- LOPEZ-GALLEGO, F.; MONTES, T.; FUENTES, M.; ALONSO, N.; GRAZU, V.; BETANCOR, L.; GUI SAN, J. M.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Improved stabilization of chemically aminated enzymes via multipoint covalente attachment on glyoxyl supports. **Biotechnology**. v. 116, p. 1-10, 2005.
- MACARIO, A.; MOLINER, M.; CORMA, A.; GIORDANO, G. Increasing stability and productivity of lipase enzyme by encapsulation in a porous organic-inorganic system. **Microporous and Mesopororous Materials**. v.118, p. 334-340, 2009.
- MATEO, C.; PALOMO, J. M.; FERNANDEZ-LORENTE, G.; GUI SAN, J. M. FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Improvement of enzyme actyvity, stability and selectivity via immobilization techniques. **Enzyme and Microbial Technology** v. 40, p. 1451-1463, 2007.
- MATEO, C.; PALOMO, J. M.; FUENTES, M.; BETANCOR, L.; GRAZÚ, V.; LÓPEZ-GALLEGO, F.; PESSELA, B. C. C.; HIDALGO, A.; FERNANDEZ-LORENTE, G.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; GUI SAN, J. M. Glyoxyl agarose: A fully inert and hydrophilic support for immobilization and high stabilization of proteins. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 39, p. 274-280, 2006.
- MATSUDA, T.; MARUKADO, R.; MUKOUYAMA, M.; HARADA, T.; NAKAMURA, K. Asymmetric reduction of ketones by *Geotrichum candidum*: Immobilization and application to reactions using supercritical carbon dioxide. **Tetrahedron: Asymmetry**. v. 19, p. 2272-2275, 2008.
- MENDES, A. A.; DE CASTRO, H. F.; RODRIGUES, D. S.; ADRIANO, W. S.; TARDIOLI, P. W. MAMMARELLA, E. J.;GIORDANO, R. C. Multipoint covalente immobilization of lipase on chitosan hybrid hydrogels: influence of the polyelectrolyte complex type and chemical modification on the catalytic properties of the biocatalysts **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**. 2010.
- MENDES, A. A.; DE OLIVEIRA, P. C.; DE CASTRO H. F.; GIORDANO, R. L. Aplicação de quitosana como suporte para a imobilização de enzimas de interesse industrial. **Química Nova**. v. 34 (2), p. 831-840, 2011.
- MILETIC, N.; VUKOVI, Z.; NASTASOVI, A.; LOOS, K. Macroporous poly(glycidyl methacrylate-co-ethylene glycol dimethacrylate) resins – Versatile immobilization supports for biocatalysts. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**. v. 56, p. 196-201, 2009.

- NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger: Principles of Biochemistry**. Worth Publishers: New York. 3 ed, 1202 p., 2000.
- 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**. v. 57, p. 109-115, 2009.
- OZTURK, N.; AKGOL, S.; ANSOY, M.; DENIZLI, A. Reversible adsorption of lipase on novel hydrophobic nanospheres. **Separation and Purification Technology**. v. 58, p. 83-90, 2007.
- 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**. v. 51, p. 100-109. 2008.
- SADANA, A.; HENLEY, J. P. Single-step unimolecular non-first-order enzyme deactivation kinetics. **Biotechnology and Bioengineering**. v. 30, p. 717-723. 1987.
- SECUNDO, F.; MIEHE-BRENDLE, J.; CHELARU, C.; FERRANDI, E. E.; DUMITRIU, E. Adsorption and activities of lipases on synthetic beidellite clays with variable composition. **Microporous and Mesoporous Materials**. v. 109, p. 350-361, 2008.
- SHARMA, R.; CHISTI, Y.; BENERJEE, U. C. Production, purification, characterization, and applications of lipases. **Biotechnology Advances**. v. 19, p.627-662, 2001.
- SOUSA, G. S. **Neutrase® imobilizada em suportes de quitosana associada a diferentes copolímeros ativados com epiclorigrina**. 2014. 37 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia) – Unidade Acadêmica de Saúde, Centro de Educação e Saúde, Universidade Federal de Campina Grande, Cuité – PB, 2014.
- TAPIA, C.; ESCOBAR, Z.; COSTA, E.; SAPAG-HAGAR, J.; VALENZUELA, F.; BASUALTO, C.; GAI, M. N.; YAZDANI-PEDRAM, M. Comparative studies on polyelectrolyte complexes and mixtures of chitosan-alginate and chitosan-carrageenan as prolonged diltiazem chloride release systems. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**. v. 57, p. 65-75, 2004.
- TUMTURK, H.; KARACA, N.; DEMIREL, G.; SAHIN, F. Preparation and application of poly(N,N-dimethylacrylamide)/k-Carrageenanhydrogels for immobilization of lipase. **International Journal Biological Macromolecules**. v. 40, p. 281-285, 2007.
- VECCHIA, R. D.; NASCIMENTO, M. G.; SOLDI, V. Aplicações sintéticas de lipases imobilizadas em polímeros. **Jornal Química Nova**. v. 27, p. 623-630, 2004.
- VIEIRA, R. S. **Remoção e recuperação de Hg (II) utilizando quitosana natural e reticulada**. 2004 (Mestrado em Engenharia Química). Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2004.

YE, P.; JIANG, J.; XU, Z-K. Adsorption and activity of lipase from *Candida rugosa* on the chitosan-modified poly(acrylonitrile-co-maleic acid) membrane surface. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**. v. 60, p. 62-67, 2007.

ZANIN, G. M.; MORAES, F. F. Enzimas immobilizadas. In: **Enzimas como agentes biotecnológicos**. Said, S. & Pietro, R. C. L. R., Ed. Legis Summa. 2004.

ZHOU, G.; CHEN, Y.; YANG, S. Comparative studies on catalytic properties of immobilized *Candida rugosa* lipase in ordered mesoporous rod-like silica and vesicle-like silica. **Microporous and Mesoporous Materials**. v. 119, p. 223-229, 2009.