



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

GILSON DOS SANTOS SOUSA

**NEUTRASE[®] IMOBILIZADA EM SUPORTES DE QUITOSANA
ASSOCIADA A DIFERENTES COPOLÍMEROS ATIVADOS COM
EPICLORIDRINA**

CUITÉ – PB

2014

GILSON DOS SANTOS SOUSA

**NEUTRASE[®] IMOBILIZADA EM SUPORTES DE QUITOSANA
ASSOCIADA A DIFERENTES COPOLÍMEROS ATIVADOS COM
EPICLORIDRINA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à
ao Curso de Bacharelado em Farmácia do
Centro de Educação e Saúde da Universidade
Federal de Campina Grande – *campus* cuité,
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

S725n Sousa, Gilson dos Santos.

Neutrase® imobilizada em suportes de quitosana associada a diferentes copolímeros ativados com epicloridrina. / Gilson dos Santos Sousa. – Cuité: CES, 2014.

39 fl.

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

Orientador: Wellington Sabino Adriano.

1. Neutrase®. 2. Quitosana. 3. Imobilização. I. Título.

CDU 577.1

GILSON DOS SANTOS SOUSA

**NEUTRASE[®] IMOBILIZADA EM SUPORTES DE QUITOSANA
ASSOCIADA A DIFERENTES COPOLÍMEROS ATIVADOS COM
EPICLORIDRINA**

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^a. Dr^a. Maria Emília Silva Menezes
Examinadora

Prof. Dr. Willy Araújo de Oliveira
Examinador

CUITÉ - PB
2014

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho ao meu avô José Martins Sobrinho (in memoriam) que mesmo cego, enxergou e acreditou no meu potencial humano e intelectual, me fazendo acreditar que seria possível conquistar meus objetivos e, a minha avó Raimunda, que nunca mediu esforços para apoiar os meus projetos.

A minha Mãe Joana Gerônimo dos Santos, minha guerreira, pela doação, resistência, coragem e exemplo. A senhora me deu forças para lutar e não desistir dos estudos.

A minha esposa Luana Cavalcante, pela cumplicidade, paciência, compreensão nos momentos que estive ausente. Sem minha mulher tudo seria mais difícil.

A minha amiga e Mãe do meu filho Ana Carla Leite de Oliveira, pela educação impecável que ela proporcionou ao meu filho diante da minha ausência.

As minhas cunhadas Ana e Rejane pelo carinho quase que materno fundamental no decorrer da minha jornada acadêmica.

Ao meu filho Vinicius Gabriel Oliveira Santos, pelo respeito e obediência, mesmo com a distância foi um exemplo de filho, dando-me extremo orgulho.

Aos meus Amigos Philipe Tavares e Vicente de Paulo, pela força que vocês me deram nos momentos de desânimo. Um forte abraço nos nobres amigos.

Aos Amigos Robson Galdino, Victor Medeiros, Aluísio Buriti, Joeudes Queiroz, Adriano Oliveira, Francinildo Macedo e Santiago Cardoso, pelas batalhas que travamos juntos na vivência universitária.

Ao casal Vicente Medeiros e Cardilene, pelo ato nobre de acolher um estranho em sua casa, proporcionando conforto, moradia e alimentação a um jovem estudante aventureiro.

Ao casal Ismael Candido e Vanessa, pela oportunidade de emprego, que foi fundamental para o meu sustento, também por todo carinho e consideração que fui tratado.

A o casal Tarcísio Dantase Cleide, pelo apoio nos momentos de dificuldade, e a fraternidade com que vocês me trataram.

A Gorete Santana e o Clube do Contente, responsáveis diretos pelo desenvolvimento de qualquer qualidade que eu tenha desenvolvido na minha vida até hoje.

AGRADECIMENTOS

Á Deus, pelo infinito amor que tem por mim, pela constante companhia na minha vida, que nos momentos de fraqueza me manteve firme, a Ele a honra a gloria e o louvor.

Ao meu orientador, Profº. Dr. Wellington Sabino Adriano, pela paciência e sabedoria com que transmitiu conhecimento, conduzindo um modesto aluno a atingir seus objetivos de forma digna e honesta. Ele com certeza para mim um exemplo de profissionalismo e amor à profissão.

À colega Larissa Leite, pela monitoria, que de forma voluntaria, auxiliou os experimentos e compartilhou das dificuldades enfrentadas em laboratório. Obrigado.

Ao Centro de Ciências da saúde (CES), da Universidade Federal de Campina Grande (UFCG), pela disponibilização dos laboratórios, bem como toda estrutura do campus, que foram imprescindíveis na minha formação profissional.

Aos professores que contribuíram de forma imensurável na minha formação intelectual e humana, repassando não somente o que está nos livros, mas a capacidade de questionar, criar e sugerir conhecimento.

A todos os funcionários do CES que prestam um bom trabalho da limpeza ao burocrático, proporcionado um ambiente agradável de estudo.

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

Meus sinceros agradecimentos.

RESUMO

As enzimas são estruturas altamente complexas e, geralmente, frágeis em condições adversas, podendo inativar-se, por isso o uso da imobilização, que consiste em confinar, através de métodos químicos e/ou físicos, a enzima em uma porção do espaço, ou seja, a enzima estará física ou quimicamente associada a um suporte ou matriz. O uso da enzima Neutrase® se explica por ser uma protease que hidrolisa proteínas do soro do queijo, um subproduto altamente poluente e descartado nas indústrias de laticínios, visando à obtenção de derivados com melhores propriedades funcionais aptos para a preparação de alimentos para pessoas em dietas especiais ou com falhas congênitas no metabolismo de proteínas. O objetivo geral deste trabalho consistiu na produção e comparação de suportes de quitosana associada a diferentes copolímeros e microrganismo. Os suportes utilizados foram quitosana 2,5% - gelatina 2,5% e quitosana 2,5% - gelatina 2,5% - *Saccharomyces cerevisiae* 5%. Ambos os suportes foram ativados com epícloridrina. A Neutrase® aproximadamente (88U.g⁻¹de suporte) foi adicionada ao suporte ativado e manteve-se sob agitação a 25° C durante 3 h. As atividades de Neutrase® solúvel e imobilizadas foram avaliadas através de análise espectrofotométrica a 700 nm. Os derivados foram analisados quando ao rendimento da imobilização (RI), atividade recuperada (ARec) e tempo de meia-vida (t_{1/2}) e fator de estabilização térmica (FE), comparado com a enzima solúvel. O suporte quitosana 2,5% - gelatina 2,5% apresentou RI de 11% e 64% de ARec, apresentando FE de 41 vezes maior que a enzima Neutrase® solúvel. Já o suporte quitosana 2,5% - gelatina 2,5% - *Saccharomyces cerevisiae* 5% apresentou RI de 71% e 8% de ARec, apresentando FE de 86 maior que a enzima Neutrase® solúvel, sendo escolhido como o suporte mais promissor.

Palavras-Chave: Neutrase, Quitosana, Imobilização, Epícloridrina

ABSTRACT

Enzymes are complex structures, and generally fragile adverse conditions may inactivate itself, so the use of immobilization, which is to confine, by chemical and / or physical enzyme in a portion of space, or that is, the enzyme is physically or chemically associated to a support or matrix. The use of the enzyme Neutrase® is explained to be a protease that hydrolyzes proteins from whey, a by highly polluting and disposed in the dairy industry, in order to obtain derivatives with improved functional properties suitable for the preparation of food for people on diets special or congenital flaws in the protein metabolism. The aim of this work was the production and comparison of media associated with different chitosan copolymers and microorganism. The media used were 2.5% chitosan-gelatin 2.5% and 2.5% chitosan-gelatin 5% *Saccharomyces cerevisiae*. Both supports were activated with epichlorohydrin. The Neutrase® (88ugstand-1) was added to the activated support and kept under stirring at 25 °C for 3 h. The active ties of soluble and immobilized Neutrase® were evaluated by spectrophotometric analysis at 700 nm. The derivatives were analyzed when the yield of immobilization (RI), activity recovered (AREC), half-life ($t_{1/2}$) and thermal stabilization factor (EF), forty-one times greater than the enzyme. The support chitosan 2.5% - 2.5% gelatin IR showed 11% and 64% of arec presenting FE five hundred fourteen times greater than the soluble enzyme Neutrase®. And the support chitosan 2.5% - 2.5% gelatin - *Saccharomyces cerevisiae* IR introduced 5% 71% and 8% of arec presenting FE eighty-six times higher than the soluble enzyme Neutrase®, the support being chosen as more promising.

Keywords: Neutrase, Chitosan, Detention, Epichlorohydrin

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Parâmetros de imobilização de Neutrase® em quitosana 2,5% - gelatina 2,5%(m/v) e quitosana 2,5% - gelatina 2,5% - *Saccharomyces cerevisiae* 5% em pH 10,0 a 25°C durante 3 horas de imobilização. Carga enzimática oferecida aproximadamente 88U/g gel..... 31
- Tabela 2.** Parâmetros de estabilidade térmica da imobilização da Neutrase® em suporte de quitosana 2,5% - gelatina 2,5% - *Saccharomyces cerevisiae*5% ativado por epiclorigrina: ($t_{1/2}$) tempo de meia-vida e (FE) fator de estabilização a 60°C. Valores estimados para as constantes de desnaturação térmica (Kd), em função da temperatura, aplicando modelo de Sadana-Henley (1987)..... 32
- Tabela 3.** Parâmetros cinéticos da Neutrase® livre e imobilizada em quitosana 2,5% - gelatina 2,5%(m/v) e quitosana 2,5% - gelatina 2,5% - *Saccharomyces cerevisiae*5% em pH 10,0 a 25°C durante 3 horas de imobilização. Carga enzimática oferecida aproximadamente 88 U/g gel. Substrato utilizado foi solução de caseína em diferentes concentrações, 40g/L, 30g/L, 20g/L, 10g/L e 2g/L..... 35

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Classificação dos métodos de imobilização reversíveis de enzimas.....	18
Figura 2. Classificação dos métodos de imobilização irreversíveis de enzimas.....	19
Figura 3. Estrutura dos biopolímeros quitosana, quitina e celulose.....	24
Figura 4. Ajuste do modelo de Sadana-Henley (1987) para a estabilidade térmica da imobilização da Neutrase® em suporte de quitosana 2,5% - gelatina 2,5% ativado por epicloridrina: ($t_{1/2}$) tempo de meia-vida, (FE) fator estabilização e aproximadamente 88 U/g a 60°C.....	33
Figura 5. Ajuste do modelo de Sadana-Henley (1987) para a estabilidade térmica da imobilização da Neutrase® em suporte de quitosana 2,5% - gelatina 2,5% - <i>Saccharomyces cerevisiae</i> 5% ativado por epicloridrina: ($t_{1/2}$) tempo de meia-vida, (FE) fator estabilização e aproximadamente 88 U/g a 60°C.....	33
Figura 6. Ajuste do modelo de Michaelis-Menten para a reação de hidrólise da caseína (enzima imobilizada em suporte de quitosana 2,5% - gelatina 2,5% - <i>Saccharomyces cerevisiae</i> 5%) 88 U/g suporte a 50° C pH 10,0.....	36
Figura 7. Ajuste do modelo de Michaelis-Menten para a reação de hidrólise da caseína (enzima livre) aproximadamente 88 U/g suporte a 50° C pH 10,0.....	37

LISTA DE CONVENÇÕES, SIGLAS E ABREVIATURAS

AAP – Atividade Aparente do Derivado

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

GEL – Gelatina

RI – Rendimento de Imobilização

rpm – Rotações por minuto

S – Substrato

Sc – *Saccharomyces cerevisiae*

T $\frac{1}{2}$ - Tempo de meia-vida

TCA – Ácido Tricloroacético

V_{máx} – Velocidade Máxima

SUMÁRIO

RESUMO	
ABSTRACT	
LISTA DE TABELAS	
LISTA DE FIGURAS	
LISTA DE CONVENÇÕES, SIGLAS E ABREVIATURAS	
1. INTRODUÇÃO	14
2. OBJETIVOS	16
2.1. Objetivo Geral	16
2.2. Objetivos Específicos	16
3. REVISÃO DE LITERATURA	17
3.1. Enzimas	17
3.1.1. Neutrase®	17
3.2. Imobilização de Enzimas	18
3.2.1. Métodos de Imobilização	18
3.2.2. Efeitos Difusivos	20
3.3. Cinética Enzimática	20
3.4. Suportes para Imobilização	23
3.4.1. Quitosana	23
3.4.2. Gelatina	24
3.4.3. Utilização de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> na Preparação de Suportes	24
4. MATERIAL E MÉTODOS	25
4.1. Material	25
4.1.1. Suporte	25
4.1.2. Microrganismo	25
4.1.3. Reagentes Usados para Tratamento do Suporte	25
4.1.4. Enzima	25
4.1.5. Agente Ativante	25
4.2. MÉTODOS	26
4.2.1. Preparação das Partículas de Híbridos de Quitosana 2,5% - Gelatina 2,5%	26
4.2.2. Preparação das Partículas de Híbridos de Quitosana 2,5% - Gelatina 2,5% -	

<i>Saccharomyces cerevisiae</i> 5,0%.....	26
4.2.3. Ativação dos Suportes Utilizando Glutaraldeído.....	27
4.2.4. Imobilização da Neutrase®.....	27
4.2.5. Determinação da Atividade da Neutrase®.....	27
4.2.7. Ensaios de Estabilidade Térmica.....	29
4.2.8. Parâmetros Cinéticos.....	18
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
5.1. Caracterização dos Suportes Quitosana 2,5% - Gelatina 2,5% e Quitosana 2,5% - Gelatina 2,5% - <i>Saccharomyces cerevisiae</i> 5%.....	31
5.2. Estudo da Estabilidade Térmica.....	32
5.3. Estudo Cinético.....	34
6. CONCLUSÃO	38
7. REFERÊNCIAS	39

1. INTRODUÇÃO

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

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

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

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

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

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

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

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

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

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

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Produzir suportes de quitosana associada a dois diferentes copolímeros;
- Utilizar o microrganismo *Saccharomyces cerevisiae* para aperfeiçoar o suporte;
- Caracterizar o melhor suporte quanto ao rendimento, atividade recuperada, estabilidade térmica e cinética de reação.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Enzimas

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

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

3.1.1. Neutrase®

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

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

3.2. Imobilização de Enzimas

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

3.2.1. Métodos de Imobilização

Os métodos de imobilização são subdivididos em três grupos principais. A primeira divisão baseada no modo como a imobilização foi alcançada: por confinamento num espaço limitado simples (encapsulação) ou num espaço limitado contendo muitos espaços pequenos (confinamento numa matriz) ou por ligação a um suporte material (ADRIANO, 2008). A ligação das enzimas a um suporte material pode ser por adsorção ou por ligação química, podendo, esta última, ser subdividida de acordo com o tipo de interação entre a enzima e o suporte ou entre as próprias moléculas de enzimas. A imobilização enzimática pode ser dividida em irreversível e reversível, como descritas nas figuras 1 e 2, respectivamente.

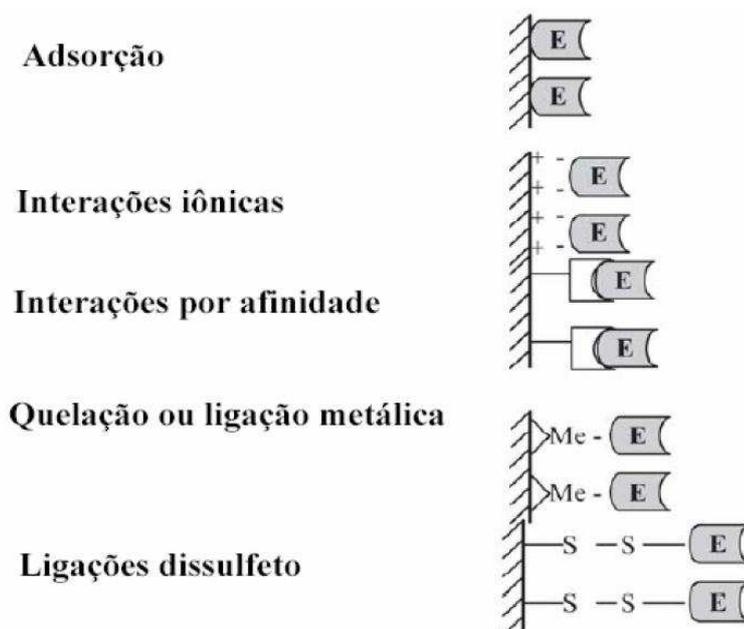


Figura 1. Classificação dos métodos de imobilização reversíveis de enzimas (ADRIANO, 2008).

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

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

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

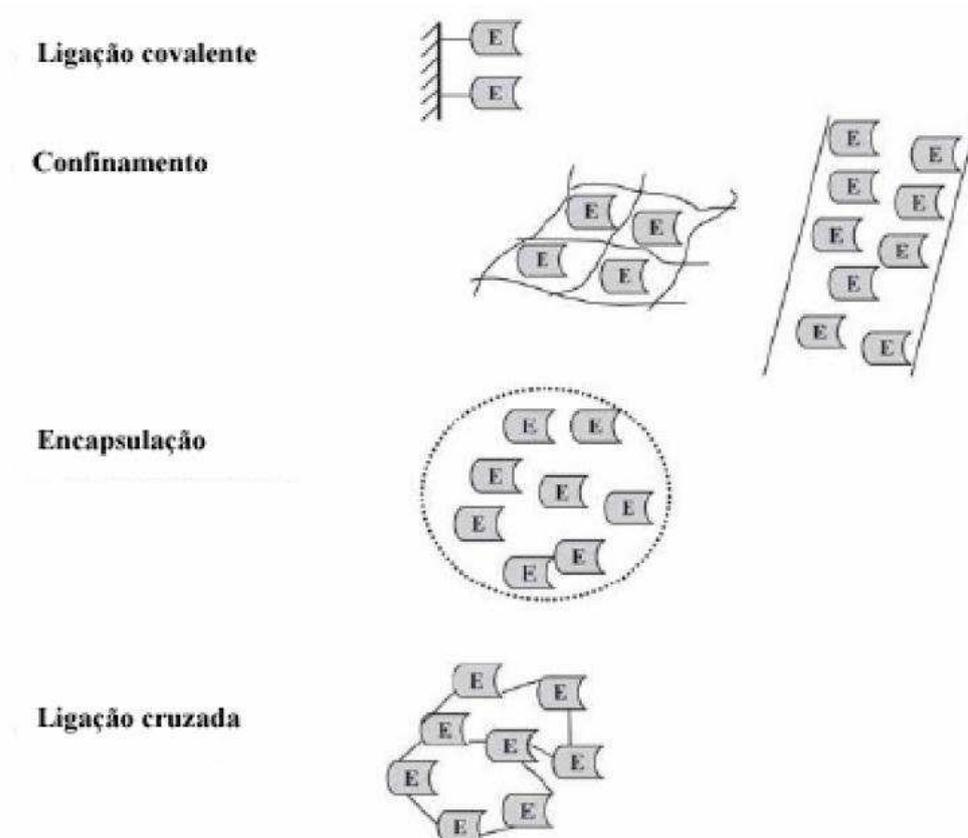


Figura 2. Classificação dos métodos de imobilização irreversíveis de enzimas (ADRIANO, 2008).

3.2.2. Efeitos Difusivos

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

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

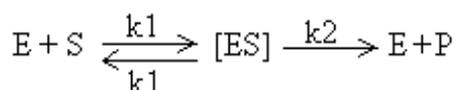
Para minimizar este efeito de maneira a se otimizar a produtividade e evitar a perda de biocatalisadores e produtos, aconselha-se diminuir o tamanho da partícula para minimizar a difusão interna, reduzir a carga enzimática, além de promover a ligação da enzima preferencialmente na superfície do suporte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

Todo o problema difusional ocorre porque há atraso no transporte de substrato para o interior da partícula, fazendo com que a concentração de substrato no interior seja menor que a concentração de substrato na superfície. Quanto menor a concentração do substrato, mais importante se tornam os efeitos difusionais, pois a velocidade da reação se torna muito sensível a variações na concentração do substrato.

3.3. Cinética Enzimática

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

No que se refere ao efeito da concentração do substrato, reações enzimáticas normalmente seguem o modelo de Michaelis-Menten. A cinética da hidrólise de proteínas do soro de queijo já foi estudada por Marques et al., 2005 e mostrou seguir modelo de Michaelis-Menten. O mecanismo no qual se baseou esse modelo foi proposto por Brown e teve sua formulação feita através de um brilhante tratamento matemático dado por Henri, real autor da equação frequentemente atribuída a Michaelis-Menten, que reconheceram que seus propósitos foram apenas fornecer evidência experimental ao modelo matemático formulado por Henri (SCHULZ, 1994). O mecanismo proposto por Brown (uma só enzima e um só substrato) foi:



Equação 1

Sendo: E a concentração de enzima;

S a concentração de substrato;

ES a concentração do complexo de transição;

P representa o produto.

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

$$v = v_{m\acute{a}x} \frac{C_s}{K_m + C_s}$$

Equação 2

Onde: v é a velocidade de consumo de substrato;

C_s é a concentração de substrato;

$v_{m\acute{a}x}$ é a velocidade máxima de consumo do substrato;

K_m constante de Michaelis-Menten.

Os valores de K_m e $v_{m\acute{a}x}$ são dados por:

$$K_m = \frac{[S][E]}{[ES]} \quad \text{Equação 3}$$

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

$$v_{m\acute{a}x} = k_2[E_0] \quad \text{Equação 4}$$

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

Uma forma precisa de estimar os parâmetros cinéticos de uma reação enzimática é o método das velocidades iniciais, onde a velocidade é medida para um curto tempo de reação em que apenas a concentração inicial de substrato que está sendo variada afete a medida. Nesse caso, mesmo que haja inibição pelos produtos da reação, no curto tempo de reação considerado as concentrações dos produtos inibidores são muito pequenas e podem ser desprezadas, podendo-se considerar que o modelo clássico de Michaelis-Menten representa bem a influência da concentração do substrato na velocidade da reação. O aumento da concentração dos produtos (oligopeptídeos gerados pela hidrólise das ligações peptídicas pela protease) em função do tempo, determinado para curto intervalo de tempo, permite a determinação da velocidade inicial da reação para cada concentração inicial de

proteína, obtida como o coeficiente angular da reta ajustada aos pontos de concentração de produto em função do tempo. O modelo de Michaelis Menten pode então ser ajustado aos pontos experimentais de velocidade inicial em função da concentração do substrato. Os valores dos parâmetros $V_{máx}$ e K_m que melhor façam o modelo se ajustar aos pontos experimentais são aceitos como as melhores estimativas (SCHULZ, 1994).

3.4. Suportes para Imobilização

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

3.4.1. Quitosana

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

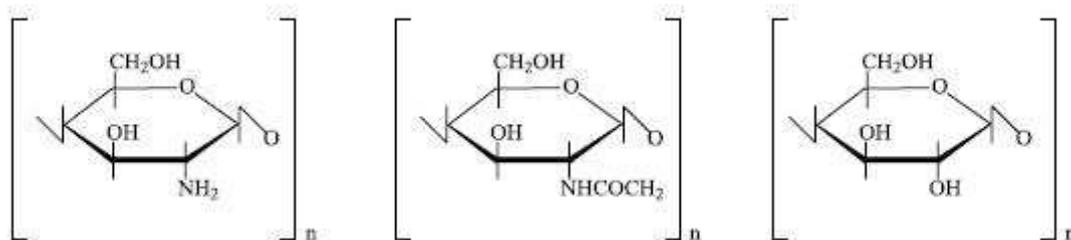


Figura 3. Estrutura dos biopolímeros quitosana, quitina e celulose

3.4.2. Gelatina

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

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

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

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

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

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Material

4.1.1. Suporte

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

4.1.2. Microrganismo

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

4.1.3. Reagentes Usados para Tratamento do Suporte

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

4.1.4. Enzima

Neutrase® com atividade de $40,45 \text{ U.mL}^{-1} \pm 3,5$.

4.1.5. Agente Ativante

Epicloridrina.

4.2. MÉTODOS

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

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

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

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

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

4.2.3. Ativação dos suportes utilizando epicloridrina

A ativação do suporte foi realizada com epicloridrina, a metodologia consisti na adição de 10 mL de NaOH 2 M e 2 mL de epicloridrina por grama de gel, no banho gelo e sob agitação por 18 horas. O passo seguinte consiste em oxidar o suporte, para cada grama de suporte foram adicionados 2 mL de uma solução de periodato de sódio 0,1 M reagindo por 2 horas à temperatura ambiente. Oxidado o suporte, este foi lavado com água destilada e utilizado para posterior imobilização enzimática (ADRIANO, 2008).

4.2.4. Imobilização da Neutrase®

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

4.2.5. Determinação da Atividade da Neutrase®

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

O método escolhido para a quantificação da atividade enzimática da Neutrase® foi o colorimétrico, sendo utilizado 1,0 mL do sobrenadante centrifugado da reação de hidrólise, obtido após centrifugação de 2000 rpm por 3 minutos, junto com 3 mL de carbonato de sódio 2% (m/v) e 1 mL de solução Follin-Cicocalteu's (FC) com diluição de 1:2 (v/v) em água destilada, durante 45 minutos, e logo, realizou-se a leitura em espectrofotômetro a 700 nm, descrito por Ortega (2009), onde o fator de conversão é utilizado para que a unidade da atividade enzimática que hidrolisa a caseína em pH 8,1 a

50°C fique em $\mu\text{mol}/\text{min}.\text{mL}^{-1}$ (U/mL). Sendo 1U correspondente a 1 μmol de tirosina produzida por minuto em 1 mL de extrato pH 8,1 a 50°C.

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

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

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

$$Ativ = \frac{[Tyr] \times V_r \times 5520}{V_{exTr}} \quad \text{Equação 6}$$

Onde: V_r é o volume do reator

V_e é o volume da enzima

T_r é o tempo de reação.

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

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

$$ARec (\%) = \frac{AAP}{ATI} X 100$$

Equação 8

4.2.7. Ensaios de Estabilidade Térmica

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

$$ae^{-kdx t}$$

Equação 9

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

$$t^{1/2} = \frac{\ln(0,5-\alpha)}{kdx(1-\alpha)}$$

Equação 10

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

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

Equação 11

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

4.2.8. Parâmetros cinéticos

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

$$v(S) = \frac{VmaxxS}{Km+S}$$

Equação 12

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

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

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

O suporte quitosana 2,5% - gelatina 2,5% - *Saccharomyces cerevisiae* 5% comparado ao suporte quitosana 2,5% - gelatina 2,5% demonstrou rendimento superior de imobilização (71% e 11%, respectivamente), o inverso ocorreu com a atividade recuperada, que apresentou valor superior para o suporte quitosana 2,5% - gelatina 2,5% quando comparada ao suporte quitosana 2,5% - gelatina 2,5% - *Saccharomyces cerevisiae* 5% (64% e 8%, respectivamente) como pode ser observado na Tabela 1, porém a atividade aparente do suporte com *Saccharomyces cerevisiae* foi melhor devido à produção de poros no suporte, facilitando a difusão do substrato nos interstícios do gel, pois o *S. cerevisiae* quando retirado do suporte pelo tratamento com o sabão, produz aumento do tamanho dos poros e, conseqüentemente, aumento do espaço para imobilização.

Tabela 1. Parâmetros de imobilização de Neutrase® em quitosana 2,5% - gelatina 2,5%(m/v) e quitosana 2,5% - gelatina 2,5% - *Saccharomyces cerevisiae* 5% em pH 10,0 a 25°C durante 3 horas de imobilização. Carga enzimática oferecida aproximadamente 88 U/g gel.

Suporte	RI (%)	At teoricamente imobilizada (U/g)	At recuperada (%)	At aparente (U/g)
Quitosana-Gelatina	11	8,13	64	5,23
*Quitosana-Gelat.-Sc	71	76,68	8	5,76

*Quitosana – Gelatina - *Saccharomyces cerevisiae*

Silva (2014) Ativou com glutaraldeído e imobilizou a enzima Neutrase® concluiu o mesmo no que se referiu ao rendimento de imobilização e atividade recuperada em seus suportes que eram à base de quitosana e alginato. Em que o suporte quitosana 2,5% - alginato

2,5% - *Saccharomyces cerevisiae* 5% apresentou um melhor rendimento de imobilização e o suporte Quitosana 2,5% - alginato 2,5%, uma melhor atividade recuperada. Farias em (2013) observou em suporte de quitosana 2,5% - gelatina 2,5% - *Saccharomyces cerevisiae* 5% ativados com glutaraldeído 25%, melhor resultado para o rendimento de imobilização, provavelmente por conta do *Saccharomyces cerevisiae*, pelas propriedades do mesmo, devido à sua alta porosidade, proporcionando uma elevada área superficial por unidade de área para imobilização da enzima.

5.2. Estudo da Estabilidade Térmica

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

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

Biocatalisadores	Sadana e Henley (1987)	$t_{1/2}$ (h)	FE
	K_d (h^{-1})		
Neutrase solúvel	19,08	0,04	1
Quitosana 2,5% - Gelatina 2,5%	0,46	1,49	41,01
Quitosana 2,5% – Gelatina 2,5% - Sc 5,0%	0,22	3,13	86,38

Esses parâmetros confirmam a influência positiva do método de imobilização na estabilidade térmica Neutrase®, revelando um tempo de meia-vida de 0,04, 1,49 e 3,13 h, respectivamente, para Neutrase® livre, imobilizada quitosana 2,5% - gelatina 2,5% e quitosana 2,5% - gelatina 2,5% - *Saccharomyces cerevisiae* 5% (Tabela 2). Esse valor corresponde a um aumento da estabilidade térmica de aproximadamente 86 vezes da Neutrase® imobilizada em quitosana 2,5% - gelatina 2,5% - *Saccharomyces cerevisiae* 5%, mostrando-se esse mais viável. Silva (2014) observou resultados semelhantes onde o suporte de 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® (figura 4). 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.

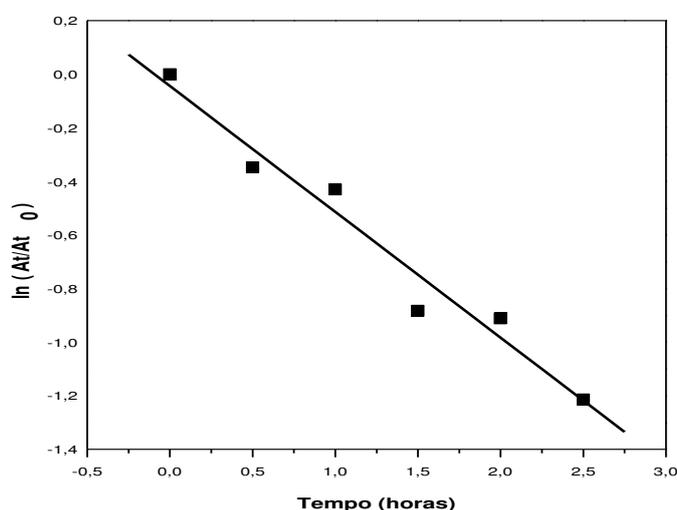


Figura 4. Ajuste do modelo de Sadana-Henley (1987) para a estabilidade térmica da imobilização da Neutrase® em suporte de quitosana 2,5% - gelatina 2,5% ativado por epicloridrina: ($t_{1/2}$) tempo de meia-vida, (FE) fator estabilização e aproximadamente 88 U/g a 60°C.

O tempo de meia vida da enzima ($t_{1/2}$), calculado através da equação 10, está expresso através das figuras 5 e 6 que demonstram graficamente as estabilidades térmicas obtidas a partir da imobilização da Neutrase® nos suportes quitosana 2,5% - gelatina 2,5% e quitosana 2,5% - gelatina 2,5% - *Saccharomyces cerevisiae* 5%, respectivamente. Nota-se através dos gráficos demonstrados, em concordância com a Tabela 2, que o $t_{1/2}$ do suporte associado ao microrganismo demonstra um valor mais elevado do que o outro suporte, mostrando ser esse o suporte mais estável a uma temperatura de 60° C.

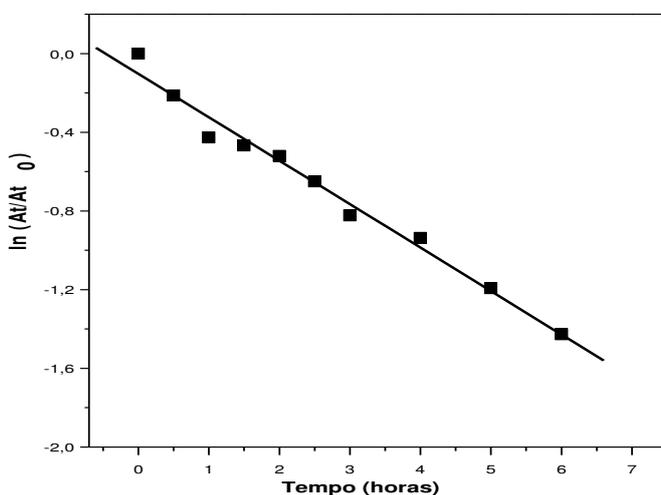


Figura 5. Ajuste do modelo de Sadana-Henley (1987) para a estabilidade térmica da imobilização da Neutrase® em suporte de quitosana 2,5% - gelatina 2,5% - *Saccharomyces cerevisiae* 5% ativado por epícloridrina: ($t_{1/2}$) tempo de meia-vida, (FE) fator estabilização e aproximadamente 88 U/g a 60°C.

5.3. Estudo Cinético

Com o modelo de Michaelis-Menten (equação 8) determinou-se a velocidade máxima da reação e a constante de Michaelis-Menten. Para isso foram usados diferentes

concentrações de substratos e usando-se enzima livre e imobilizada com carga oferecida de 88 U/g de gel, como pode ser observado na Tabela 3.

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

Tabela 3. Parâmetros cinéticos da enzima livre e imobilizada.

Neutrased	Km (g.L ⁻¹)	Vmax (U.mL ⁻¹)
Enzima Livre	30,7	93,4
Enzima Imobilizada quitosana 2,5% - gelatina 2,5%	150	22,6
Enzima Imobilizada quitosana 2,5% - gelatina 2,5% - <i>Saccharomyces cerevisiae</i> 5%	300	50,1

Os valores de Km e Vmax aparentes foram calculados, sendo obtidos os valores de Vmax iguais a 93,4 (U.mL⁻¹) de Neutrased® livre e 50,1 (U.mL⁻¹) de Neutrased® imobilizada. Os valores de Km determinados foram 30,7(g.L⁻¹) de Neutrased® livre, 150 (g.L⁻¹) Neutrased® imobilizada em quitosana 2,5% - gelatina 2,5% e 300 (g.L⁻¹) Neutrased® imobilizada em quitosana 2,5% - gelatina 2,5% - *Saccharomyces cerevisiae*5%, indicando melhor rendimento para o suporte com *Saccharomyces cerevisiae*, entretanto torna-se visível na tabela que a Vmax de enzima livre é superior aos da enzima imobilizada, essa mudança da afinidade da Neutrased pelo substrato, na forma imobilizada se dá por problemas difusionais ocasionados pelos suportes .

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.

Esse comportamento é geralmente observado para enzimas imobilizadas em função dos efeitos de interação enzima e suporte e dependem do processo de imobilização. Segundo Georgio e Hubbell (1993), três formas de interação podem ser distinguidas: a ligação da proteína na matriz pode resultar em mudanças conformacionais que afetam a

função catalítica; o acesso do substrato ao sítio ativo da enzima pode ser afetado por impedimento estérico do suporte e, as propriedades do suporte, como sua natureza hidrofílica ou hidrofóbica, ou a presença de cargas fixas que afetam o modo de ação da enzima.

As figuras 6 e 7 mostram o ajuste que foi dado com a equação 3 para as diferentes concentrações de substratos, tanto para enzima livre como também para a carga oferecida de aproximadamente 88 U/g de gel. Nota-se que a equação de Michaelis- Menten se ajustou bem aos pontos experimentais.

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

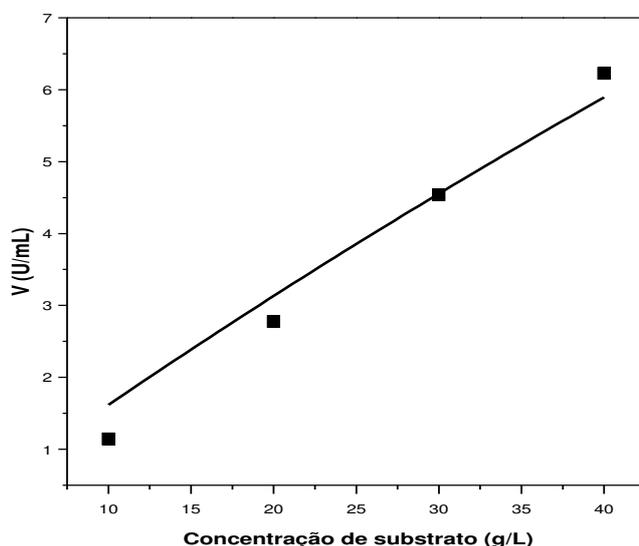


Figura 6. Ajuste do modelo de Michaelis-Menten para a reação de hidrólise da caseína (enzima immobilizada em suporte de quitosana 2,5% - gelatina 2,5% - *Saccharomyces cerevisiae* 5%) 88 U/g suporte a 50° C pH 10,0

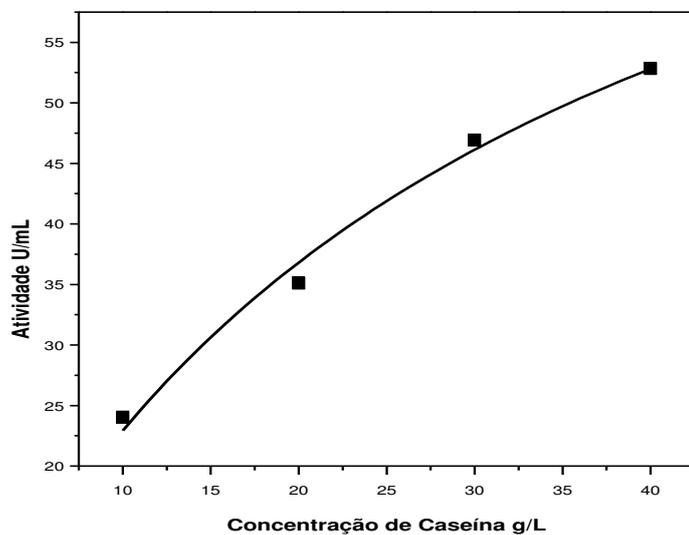


Figura 7. Ajuste do modelo de Michaelis-Menten para a reação de hidrólise da caseína (enzima livre) aproximadamente 88 U/g suporte a 50° C pH 10,0.

6. CONCLUSÃO

A Neutrase® foi imobilizada em quitosana 2,5% - gelatina 2,5% - *Saccharomyces cerevisiae* 5% previamente ativadas por epícloridrina. Os resultados obtidos revelaram um bom desempenho desse suporte, fornecendo derivado imobilizado com características bioquímicas e cinéticas adequadas para emprego na hidrólise das proteínas do leite. As propriedades bioquímicas foram analisadas por meio de um planejamento fatorial e os resultados obtidos revelaram que a atividade da Neutrase® livre foi otimizada para pH 10 e temperatura a 50 °C. O comportamento cinético da enzima livre e imobilizada foi explicado pela Equação de Michaelis-Menten e os valores de Km encontrados mostram uma mudança da afinidade da Neutrase® pelo substrato após o processo de imobilização. A estabilidade térmica apresentou um aumento de aproximadamente 86 vezes da Neutrase imobilizada em quitosana 2,5% - gelatina 2,5% - *Saccharomyces cerevisiae* 5% em relação à enzima livre, tornado esse um promissor suporte para imobilização de Neutrase®.

7. REFERÊNCIAS

ADRIANO, W. S. **Preparação e caracterização de derivados de enzimas industriais em quitosana**. 2008. 161f. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) – 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: Deactivation Kinetics. **Chemical Engineering Transactions**, 14, 329-336, 2008.

BEZERRA, F. B.; Nogueira, J. A. M.; Mammarella, J. E.; Adriano, W. S.; Gonçalves, L. R. B. Caracterização de um Biocatalisador preparado pela imobilização de Neutrase em Quitosana. **XIX Congresso Brasileiro de Engenharia Química**, 2012.

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

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

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

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

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

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

FARIAS, A. S. M. **Imobilização de Neutrase® em Suportes de Quitosana Associada a Diferentes Copolímeros**. 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.

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

GEORGIO, G.; HUBBELL, J. A. Em *Encyclopedia of Chemical Processing and Design*; Mcketta, J. J., ed.; Marcel Dekker, Inc.: New York, 1993, vol. 45, p. 142-176.

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

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

HENLEY J. P., SADANA A. Deactivation theory. **Biotechnol. Bioeng.**, 28, 1277-1285, 1987.

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

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

MARQUES, D. P., CUSTÓDIO, M. F., GOULART, A. J., GIORDANO, R., GIORDANO, R. D. L. C., & MONTI, R. **Alimentos e Nutrição Araraquara**, v. 16, n. 1, p. 17-20, 2008.

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

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

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

SILVA L. L. **Imobilização de Neutrase® em Suportes a Base de Quitosana e alginato ativados com glutaraldeído.** 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.

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

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

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