



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA**

KÍMBERLE PAIVA DOS SANTOS AMORIM

**IMOBILIZAÇÃO E ESTABILIZAÇÃO DE ALCALASE® EM IMMOBEAD
350 E EM QUITOSANA ATIVADA POR DIFERENTES MÉTODOS
VISANDO APLICAÇÃO EM REAÇÃO MODELO**

FORTALEZA

2018

KÍMBERLE PAIVA DOS SANTOS AMORIM

IMOBILIZAÇÃO E ESTABILIZAÇÃO DE ALCALASE® EM IMMOBEAD 350 E
EM QUITOSANA ATIVADA POR DIFERENTES MÉTODOS VISANDO
APLICAÇÃO EM REAÇÃO MODELO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós -Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Engenharia Química.

Área de concentração: Processos químicos e bioquímicos.

Orientadora: Prof. Dra. Luciana Rocha Barros Gonçalves.

FORTALEZA

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

A543i Amorim, Kímberle Paiva dos Santos.
Imobilização e estabilização de Alcalase® em Immo bead 350 e em Quitosana ativada por diferentes métodos visando aplicação em reação modelo / Kímberle Paiva dos Santos Amorim. – 2018.
98 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Tecnologia, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Fortaleza, 2018.
Orientação: Prof. Dr. Luciana Rocha Barros Gonçalves.

1. Alcalase®. 2. imobilização,. 3. estabilidade. 4. hidrólise da gelatina de tilápia. I. Título.

CDD 660

KÍMBERLE PAIVA DOS SANTOS AMORIM

IMOBILIZAÇÃO E ESTABILIZAÇÃO DE ALCALASE® EM IMMOBEAD 350 E EM
QUITOSANA ATIVADA POR DIFERENTES MÉTODOS VISANDO APLICAÇÃO EM
REAÇÃO MODELO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Engenharia Química. Área de concentração: Processos químicos e bioquímicos.

Aprovada em: 26/02/2018.

BANCA EXAMINADORA

Prof.^a Dr.^a Luciana Rocha Barros Gonçalves (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Ivanildo José da Silva Júnior
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Dr.^a Ana Iraidy Santa Brígida
Embrapa Agroindústria de Alimentos - CTAA - RJ

A Deus.

Aos meus amados pais, Jeter e Érica.

Ao meu esposo, Júnior.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, que me deu a vida, minha rocha e minha salvação, Aquele a quem dei minha vida.

Ao meu amado esposo Júnior por todo amor, cuidado, companheirismo, carinho, fidelidade, amizade, compreensão, por todos os ensinamentos, pelo apoio, por me ajudar a estar mais perto de Deus, por ser um exemplo e inspiração. Aos meus pais, Jeter e Érica, a quem devo amor e honra, por terem me ensinado a Palavra e terem me criado no temor do Senhor, por todo o amor demonstrado em cuidado, afeto, ensinamentos, conselhos e repreensões, pelo apoio espiritual, emocional e financeiro. À minha irmã, Mikaelle, minha melhor amiga, minha companheira, meu exemplo em tudo e ao meu cunhado, Marcelo, por todos os ensinamentos e conselhos.

Aos meus avós, Luzenir e Pereira (*in memoriam*), Zequinha e Luís (*in memoriam*) pelas orações, pelos conselhos, pelas brincadeiras, pelo cuidado e por todo o apoio. Aos meus primos, tios-avós, tias-avós, tios e tias por formarem uma família tão maravilhosa, em especial à tia Quézia, por todo cuidado e apoio. Aos meus sogros pelo amor e cuidado. À minha amiga-irmã Aline por todo o amor, pela amizade e por todos os conselhos.

Agradeço a minha professora e orientadora Dra. Luciana por ser uma inspiração, por todos os ensinamentos, conselhos, pela amizade, e pela grande oportunidade a mim concedida. A todos os professores, em especial àqueles do departamento de Engenharia Química da UFC, por todos os conhecimentos transmitidos e por serem exemplos de profissionais.

Aos meus amigos Bruna, Nathália, Maísa, Rayanne, Eva, Márcia, Guilherme e Magno e a todos os integrantes do grupo GPBio. Agradeço, também, aos meus amigos professores Cris e Cleiton por toda amizade e apoio. Ao Jorjão, ao seu Luis e a todos que estiveram presentes durante a minha formação na UFC.

Agradeço a todos os meus amigos da igreja por todos os momentos de risadas e por sempre me fazerem aprender mais de Deus. Agradeço aos amigos do “Vidas para Cristo”, em especial ao Emanuel e ao Yan por serem tão especiais, por todas as brincadeiras e ensinamentos, por me fazerem crescer e por serem exemplos de cristãos para mim.

Agradeço, também, à FUNCAP, à CAPES pela bolsa de mestrado, e ao CNPq pelo projeto que permitiu a realização dos experimentos envolvendo as reações de hidrólise da gelatina de tilápia.

“Nele (Deus) estão escondidos todos os tesouros da sabedoria e do conhecimento.”

Bíblia Sagrada -Colossenses 2:3.

RESUMO

Neste trabalho, a protease Alcalase® foi imobilizada inicialmente em suporte ativado com grupos epóxi, Immobead 350. O derivado da imobilização (à pH 10, por 24 h) nesse suporte, com atividade de 26,1 U_{BANE}/g , foi aplicado na reação de hidrólise da gelatina de tilápia, visando a obtenção de peptídeos com atividade antioxidante. Após 3 ciclos reacionais, o biocatalisador insolúvel perdeu a capacidade de produzir peptídeos bioativos. Diversas condições de imobilização foram, então, testadas, alterando-se pH, tempo de incubação, carga oferecida, reticulação da enzima imobilizada e presença de inibidor durante o processo, além de uma modificação química no suporte para inserção de grupos aldeídos. Todos os derivados obtidos apresentaram estabilidade térmica inferior à enzima não imobilizada. Utilizou-se, também, quitosana ativada com três agentes diferentes — glutaraldeído, divinilsulfona e glioxil — como suporte para imobilização de Alcalase®. Condições de pH e tempo de imobilização foram avaliadas. Para as imobilizações em suporte ativado com glutaraldeído, o rendimento de imobilização para todos os tempos estudados (15h a 96h) foi de 100% e os biocatalisadores apresentaram atividades em torno de 30 a 45 U_{BANE}/g . Já as imobilizações em suporte ativado com divinilsulfona apresentaram rendimentos inferiores a 60% para todos os tempos estudados (24h a 96h) e valores de atividade catalítica em torno de 5 a 10 U_{BANE}/g para as imobilizações à pH 7, e em torno de 20 a 30 U_{BANE}/g para as imobilizações à pH 10. As imobilizações em quitosana ativada com glioxil apresentaram valores de rendimento inferiores a 35% para todos os tempos estudados (24h a 96h) e valores de atividade catalítica que não ultrapassaram 6 U_{BANE}/g . Ensaio de inativação térmica à 60 °C e pH 8 foram realizados, e os derivados mais estáveis foram os das imobilizações em Glutaraldeído-Quitosana à pH 7 por 72h (FE = 4,4), em DVS-Quitosana à pH 10 por 24h (FE = 3,3) e em Glioxil-Quitosana à pH 10 por 24h (FE = 3,3). Avaliou-se a estabilidade operacional dos derivados através da hidrólise da Azocaseína. Após 6 ciclos consecutivos, os derivados da imobilização Glutaraldeído-Quitosana não apresentaram perda de atividade, enquanto que o derivado da imobilização em DVS-Quitosana à pH 10 por 24 horas reteve 75,5% de sua atividade e o derivado da imobilização em Glioxil-Quitosana à pH 10 por 24 horas reteve apenas 10% de sua atividade. Assim, os derivados de Glutaraldeído-Quitosana apresentaram os melhores resultados de atividade catalítica, estabilidade térmica e estabilidade operacional.

Palavras-chave: Alcalase®, imobilização, estabilidade, hidrólise da gelatina de tilápia.

ABSTRACT

In this work, the protease Alcalase® was immobilized initially on an epoxy-activated support — Immobead 350. The derivative (immobilization at pH 10, for 24 hours), which showed activity of 26,1 U_{BANE}/g , was applied in the tilapia gelatin hydrolysis, aiming to obtain peptides with antioxidant activity. After 3 reactional cycles, the insoluble biocatalyst lost the ability to produce bioactive peptides. Several immobilization conditions were then tested by altering pH medium, incubation time, loading offered, immobilized enzyme crosslinking and presence of inhibitor during the process, and also a chemical modification of the support for aldehyde groups insertion was tested. All the derivatives obtained showed lower thermal stability than the non-immobilized enzyme. Also chitosan activated with three different agents — glutaraldehyde, divinylsulfone and glyoxyl — was used as support for Alcalase® immobilization. Immobilization conditions such as time and pH medium were evaluated. For immobilizations in support activated with glutaraldehyde, the immobilization yield for every studied times (15h to 96h) was 100%, and the biocatalysts showed activities around 30 to 45 U_{BANE}/g . The immobilizations in divinylsulfone-activated support showed yields of less than 60% for every studied times (24h to 96h) and values of catalytic activity around 5 to 10 U_{BANE}/g for immobilizations at pH 7, and around 20 to 30 U_{BANE}/g for immobilizations at pH 10. The immobilizations on chitosan activated with glyoxyl showed values of yield lower than 35% for every studied times (24h to 96h) and values of catalytic activity which did not exceed 6 U_{BANE}/g . Thermal inactivation assays at 60 ° C and pH 8 were performed, and the most stable biocatalysts were those of immobilization on Glutaraldehyde-Chitosan at pH 7 for 72h (SF = 4,4) on DVS-Chitosan at pH 10 for 24h (SF = 3,3) and on Glyoxyl-Chitosan at pH 10 for 24h (SF = 3,3). The operational stability of the derivatives was evaluated by the hydrolysis of Azocasein. After 6 consecutive cycles, the derivatives of Glutaraldehyde-Chitosan immobilization showed no loss of activity, whereas the derivative of DVS-Chitosan immobilization at pH 10 for 24 hours retained 75,5% of its activity and the derivative of Glioxil- Chitosan immobilization at pH 10 for 24 hours retained only 10% of its activity. Thus, the Glutaraldehyde-Chitosan derivatives presented the best results of catalytic activity, thermal stability and operational stability.

Keywords: Alcalase®, immobilization, stability, tilapia gelatin hydrolysis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	– Representação esquemática de possíveis clivagens de ligações peptídicas de uma proteína por hidrólises catalisadas por proteases	21
Figura 2	– Classificação de enzimas proteolíticas de acordo com a localização da clivagem hidrolítica realizada pela enzima. ○ Resíduos de aminoácidos que permaneceram na cadeia polipeptídica após a hidrólise; ● Resíduos de aminoácidos liberados após a hidrólise (adaptado de GIANOTTI, 2008).....	22
Figura 3	– Representação esquemática do mecanismo catalítico de uma serino-protease.....	25
Figura 4	– Estrutura cristalina da protease Carlsberg. Sítio catalítico formado por Asp 32, His 64 e Ser 22.....	26
Figura 5	– Classificação dos diferentes métodos de imobilização de enzimas pela IUPAC, 1995.....	29
Figura 6	– Limitações difusionais em suportes com poros de diferentes diâmetros.....	30
Figura 7	– Imobilização da enzima em Immobead por ligação covalente entre o grupo amina do resíduo Lis da enzima e o grupo epóxi do suporte.....	32
Figura 8	– Representação esquemática de imobilização em duas etapas: adsorção em pH 7 seguida de ligação covalente em pH 10.....	33
Figura 9	– Representação esquemática da ativação de quitosana com glutaraldeído.....	35
Figura 10	– Representação esquemática da ativação de quitosana com divinilsulfona.....	36
Figura 11	– Representação esquemática da ativação de quitosana com glioxil.....	37
Figura 12	– Fluxograma dos procedimentos utilizados para imobilização da enzima Alcalase® em suporte Immobead 350 a partir do suporte comercial e da enzima solúvel até à obtenção do biocatalisador insolúvel.....	45
Figura 13	– Fluxograma dos procedimentos utilizados para imobilização da enzima Alcalase® em suporte Quitosana, ativada por diferentes agentes, a partir do suporte comercial e da enzima solúvel até à obtenção do biocatalisador insolúvel.....	47

Figura 14 – Cromatograma peptídico obtido por RP-HPLC do produto da reação de hidrólise da gelatina de tilápia ao longo de 5 horas utilizando Alcalase® imobilizada em Immobead 350 como catalisador.....	55
Figura 15 – Parâmetros da imobilização de Alcalase® em Immobead 350. Imobilizações realizadas à pH 10 ou à pH 7 (adsorção) com posterior incubação à pH 10. Tempos de imobilização/ incubação à pH 10 variaram entre 15, 24 e 43 horas.....	57
Figura 16 – Rendimento de imobilização de Alcalase® em Immobead 350 por adsorção à pH 7, ao longo de 1 hora, à 25 °C, utilizando tampões de diferentes forças iônicas.....	58
Figura 17 – Inativação térmica (60 °C, pH 8) da enzima solúvel dialisada e não dialisada. A atividade inicial da enzima foi considerada igual a 100%.....	59
Figura 18 – Inativação térmica (60 °C, pH 8) de Alcalase® imobilizada em Immobead 350. Imobilização realizada à pH 10 durante 96 horas ou à pH 7 (adsorção) seguida de incubação à pH 10 por 96 horas. A atividade inicial da enzima foi considerada igual a 100%.....	60
Figura 19 – Inativação térmica (60 °C, pH 8) de Alcalase® imobilizada em Immobead 350. (A) Imobilização realizada à pH 10 durante 162 horas, com diferentes cargas oferecidas. (B) Imobilização realizada por adsorção à pH 7 seguida de incubação à pH 10 por 162 horas, com diferentes cargas oferecidas. A atividade inicial da enzima foi considerada igual a 100%.....	61
Figura 20 – Inativação térmica (60 °C, pH 8) de Alcalase® imobilizada em Immobead 350. Imobilização conduzida à pH 10, por 162 horas, com carga oferecida de 60 mgproteína/gsuporte. A enzima imobilizada foi reticulada com glutaraldeído 1%. A atividade inicial da enzima foi considerada igual a 100 %.....	63
Figura 21 – Eletroforese da enzima Alcalase® livre e imobilizada em Immobead 350 sob diversas condições. (A) <u>Poço 1</u> : Padrões de massa molecular em kDa; <u>Poço 2</u> : Branco de Imobilização (10 mg/g); <u>Poço 3</u> : Derivado de imobilização (pH 10, 10mg/g, 162 h); <u>Poço 4</u> : Derivado de Imobilização (pH 7 e 10, 10 mg/g, 162 h); <u>Poço 5</u> : Branco de Imobilização (30 mg/g);	

Poço 6: Derivado de imobilização (pH 10, 30mg/g, 162 h); Poço 7: Branco de Imobilização (60 mg/g); Poço 8: Derivado de imobilização (pH 10, 60mg/g, 162 h); Poço 9: Derivado de imobilização (pH 7 e 10, 30mg/g, 162 h). **(B)** Poço 1: Padrões de massa molecular em kDa; Poço 2: Branco de Imobilização (80 mg/g); Poço 3: Derivado de Imobilização (pH 10, 80mg/g, 162 h); Poço 4: Derivado de Imobilização (pH 7 e 10, 80 mg/g, 162 h); Poço 5: Branco de Imobilização (100 mg/g); Poço 6: Derivado de imobilização recoberto com Glutaraldeído (pH 10, 60mg/g, 162 h); Poço 7: Derivado de Imobilização (pH 7 e 10, 100 mg/g, 162 h); Poço 8: Derivado de imobilização (pH 10, 100mg/g, 162 h)..... 64

Figura 22 – Inativação térmica (60 °C, pH 8) de Alcalse imobilizada em Immobead 350 modificado quimicamente. Imobilização conduzida à pH 10, por 120 horas, com carga oferecida de 30 mg_{proteína}/g_{suporte}. A atividade inicial da enzima foi considerada igual a 100 %..... 66

Figura 23 – Inativação térmica (60 °C, pH 8) de Alcalse imobilizada em Immobead 350 modificado quimicamente. Imobilização conduzida à pH 10, por 120 horas, com carga oferecida de 30 mg_{proteína}/g_{suporte}. A enzima imobilizada foi reticulada com glutaraldeído de diferentes concentrações. A atividade inicial da enzima foi considerada igual a 100 %..... 66

Figura 24 – Inativação térmica (60 °C, pH 8) de Alcalse imobilizada em Immobead 350. Imobilização conduzida à pH 10, por 120 horas, com carga oferecida de 30 mg_{proteína}/g_{suporte}, na presença de inibidor competitivo Azocaseína. A atividade inicial da enzima foi considerada igual a 100 %..... 67

Figura 25 – Parâmetros da imobilização de Alcalase® em quitosana ativada com glutaraldeído. (A) Rendimento de Imobilização (%). (B) Atividade do derivado de imobilização (U_{BANE}/g). Imobilizações realizadas à pH 7 ou pH 10 com tempos variaram entre 15 e 96 horas. Reticulação de alguns derivados com glutaraldeído 1%..... 69

Figura 26 – Parâmetros da imobilização de Alcalase® em quitosana ativada com divinilsulfona. (A) Rendimento de Imobilização (%). (B) Atividade do derivado de imobilização (U_{BANE}/g). Imobilizações realizadas à pH 7 ou pH10 com tempos que variaram entre 24 e 96 horas. Reticulação de alguns

derivados com glutaraldeído 1%.....	70
Figura 27 – Parâmetros da imobilização de Alcalase® em quitosana ativada com glioxil. (A) Rendimento de Imobilização (%). (B) Atividade do derivado de imobilização (U_{BANE}/g). Imobilizações realizadas à pH 10 com tempos que variaram entre 24 e 96 horas. Reticulação de alguns derivados com glutaraldeído 1%.....	72
Figura 28 – Inativação térmica (60 °C, pH 8) da enzima solúvel dialisada e não dialisada. A atividade inicial da enzima foi considerada igual a 100%.....	74
Figura 29 – Estabilidade operacional dos derivados com maior estabilidade térmica. 6 ciclos catalíticos consecutivos da reação de hidrólise da Azocaseína (32 °C, 120 rpm, 40 min). (A) Derivado de GLU-Qui (pH 7, 48h). (B) Derivado de GLU-Qui (pH 10, 24h). (C) Derivado de DVS-Qui (pH 7, 24h) (D) Derivado de DVS-Qui (pH 10, 24h). (E) Derivado de GLI-Qui (pH 10, 24h). A atividade da enzima no primeiro ciclo foi considerada igual a 100 %.....	80
Figura 30 – Inativação térmica (60 °C, pH 8) de Alcalase® imobilizada em quitosana ativada com Glutaraldeído. Imobilização conduzida à pH 7 com tempos que variaram de 15 a 96 horas. (A) 15 horas. (B) 24 horas. (C) 48 horas. (D) 72 horas. (E) 96 horas. Reticulação de alguns derivados com glutaraldeído 1%. A atividade inicial da enzima foi considerada igual a 100 %.....	91
Figura 31 – Inativação térmica (60 °C, pH 8) de Alcalase® imobilizada em quitosana ativada com Glutaraldeído. Imobilização conduzida à pH 10 com tempos que variaram de 15 a 96 horas. (A) 15 horas. (B) 24 horas. (C) 72 horas. (D) 96 horas. Reticulação de alguns derivados com glutaraldeído 1%. A atividade inicial da enzima foi considerada igual a 100 %.....	92
Figura 32 – Inativação térmica (60 °C, pH 8) de Alcalase® imobilizada em quitosana ativada com divinilsulfona. Imobilização conduzida à pH 7 com tempos que variaram de 24 a 96 horas. (A) 24 horas. (B) 48 horas. (C) 72 horas. (D) 96 horas. Reticulação de alguns derivados com glutaraldeído 1%. A atividade inicial da enzima foi considerada igual a 100 %.....	93

Figura 33 – Inativação térmica (60 °C, pH 8) de Alcalase® immobilizada em quitosana ativada com divinilsulfona. Imobilização conduzida à pH 10 com tempos que variaram de 15 a 72 horas. (A) 15 horas. (B) 24 horas. (C) 48 horas. (D) 72 horas. Reticulação de alguns derivados com glutaraldeído 1%. A atividade inicial da enzima foi considerada igual a 100 %..... 94

Figura 34 – Inativação térmica (60 °C, pH 8) de Alcalase® immobilizada em quitosana ativada com glioxil. Imobilização conduzida à pH 10 com tempos que variaram de 24 a 96 horas. (A) 24 horas. (B) 48 horas. (C) 72 horas. (D) 96 horas. Reticulação de alguns derivados com glutaraldeído 1%. A atividade inicial da enzima foi considerada igual a 100 %..... 95

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Resultados de tempo de meia-vida ($t_{1/2}$), fator de estabilização (FE) e parâmetros do modelo de Sadana e Henley (k e c) utilizado para ajuste aos dados de inativação térmica à 60 °C e pH 8 dos derivados das imobilizações em quitosana ativada por três agentes diferentes	75
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BANE	Éster p-nitrofenílico de N-butiloxicarbonil-L-alanina (Boc-Ala- ONp)
DVS	Divinilsufona
DVS - Qui	Quitosana ativada com Divinilsulfona
IMB 350	Immobead 350
GLI	Glioxil
GLI - Qui	Quitosana ativada com Glioxil
GLU	Glutaraldeído
GLU - Qui	Quitosana ativada com Glutaraldeído

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
2.1	Enzimas	19
2.2	Proteases	21
2.3	Alcalase®	23
2.4	Imobilização de Enzimas	27
2.5	Suportes para Imobilização	29
2.5.1	<i>Immobead 350</i>	31
2.5.2	<i>Quitosana</i>	34
2.5.2.1	<i>Quitosana ativada com glutaraldeído</i>	34
2.5.2.2	<i>Quitosana ativada com divinilsulfona</i>	36
2.5.2.3	<i>Quitosana ativada com glioxil</i>	37
2.6	Reações de hidrólise catalisadas por proteases livres e imobilizadas	38
2.6.1	<i>Hidrólise da gelatina de tilápia</i>	39
3	OBJETIVOS	41
3.1	Objetivo geral	41
3.2	Objetivos específicos	41
4	MATERIAIS E MÉTODOS	42
4.1	Materiais	42
4.2	Métodos	42
4.2.1	<i>Preparação do Immobead 350</i>	42
4.2.2	<i>Modificação química do suporte Immobead 350</i>	42
4.2.3	<i>Preparação do gel quitosana</i>	43
4.2.4	<i>Ativação do suporte quitosana com glutaraldeído</i>	43
4.2.5	<i>Ativação do suporte quitosana com divinilsulfona</i>	43
4.2.6	<i>Ativação do suporte quitosana com glioxil</i>	43

4.2.7	<i>Imobilização de Alcalase® em Immobead 350</i>	44
4.2.8	<i>Imobilização de Alcalase® em Quitosana ativada por diferentes agentes</i>	46
4.2.9	<i>Bloqueio dos grupos ativos do suporte remanescentes após a imobilização</i>	48
4.2.10	<i>Recobrimento do derivado com glutaraldeído</i>	48
4.2.11	<i>Determinação da atividade enzimática e cálculo de Rendimento de Imobilização</i>	48
4.2.12	<i>Eletroforese SDS-PAGE</i>	50
4.2.13	<i>Diálise da enzima comercial Alcalase®</i>	50
4.2.14	<i>Estabilidade térmica</i>	50
4.2.15	<i>Reação de hidrólise da gelatina de tilápia</i>	51
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	54
5.1	Imobilização de Alcalase® em Immobead 350	54
5.1.1	<i>Imobilização à pH 10</i>	54
5.1.1.1	<i>Funcionalidade do derivado de imobilização na hidrólise da gelatina de peixe</i>	54
5.1.1.2	<i>Reciclos da reação de hidrólise da gelatina de peixe</i>	56
5.1.2	<i>Imobilização à pH 7 seguida de incubação à pH 10</i>	56
5.1.2.1	<i>Influência da força iônica do tampão na etapa de adsorção</i>	57
5.1.2.2	<i>Estabilidade térmica</i>	59
5.1.2.3	<i>Ensaio de SDS-PAGE</i>	63
5.1.3	<i>Imobilização no suporte modificado quimicamente</i>	65
5.1.4	<i>Imobilização na presença de inibidor competitivo</i>	67
5.2	Imobilização de Alcalse em Quitosana ativada por diferentes métodos	68
5.2.1	<i>Imobilização em suporte Glutaraldeído-Quitosana</i>	68
5.2.2	<i>Imobilização em suporte Divinilsulfona-Quitosana</i>	70
5.2.3	<i>Imobilização em suporte Glioxil-Quitosana</i>	71
5.2.4	<i>Estabilidade térmica de Alcalase® solúvel e imobilizada nos diferentes suportes</i>	73
5.2.4.1	<i>Estabilidade térmica da enzima livre</i>	74

5.2.4.2	<i>Estabilidade térmica da Alcalase® immobilizada nos diferentes suportes</i>	75
5.2.5	<i>Estabilidade operacional dos biocatalisadores na reação modelo</i>	79
6	CONCLUSÕES	82
	REFERÊNCIAS	83
	ANEXO A - INATIVAÇÃO TÉRMICA DOS DERIVADOS	91

1 INTRODUÇÃO

O emprego de catalisadores químicos nos diversos processos de obtenção de produtos e intermediários de interesse industrial apresenta algumas limitações referentes a diferentes aspectos como, por exemplo, a alta demanda energética requerida por esses processos químicos e a baixa versatilidade e especificidade desses catalisadores, a qual promove a formação de subprodutos, ou até produtos contaminados, requerendo, assim, etapas e custos adicionais ligados a processos de purificação (MENDES et al., 2011). Diante disto, vários processos biotecnológicos, como os fermentativos e enzimáticos, vêm sendo constantemente estudados para implementação de novas tecnologias que atendam às necessidades econômicas e ambientais dos processos de produção, abrangendo os diversos setores industriais (SANTOS et al., 2015a; TEIXEIRA et al., 2014).

As enzimas se apresentam como biocatalisadores com propriedades de grande interesse industrial: atuam em condições mais brandas de temperatura e pressão, possuem elevada especificidade e ainda apresentam alta enantio e regioseletividade (MATEO; GRAZ; FERN, 2007; RIOS et al., 2016). Além disso, as enzimas proporcionam velocidades de reação bem superiores aos catalisadores químicos convencionais (MENDES et al., 2011).

Enzimas proteolíticas, conhecidas como proteases, possuem grande atuação na indústria, abrangendo setores como o farmacêutico, de laticínios, formulação de detergentes, indústria de couro, síntese de proteínas e tratamento de resíduos (ANWAR; SALEEMUDDIN, 1998; SOUZA, 2016). A Alcalase® é uma protease comercial obtida a partir de uma cepa selecionada do micro-organismo *Bacillus licheniformis* (CHEN; CHEN; WANG, 1992). A utilização da Alcalase® está envolvida, principalmente, em processos de formulação de detergentes, devido à sua alta tolerância a pHs alcalinos, e na produção de hidrolisados proteicos (CORÍCI et al., 2011; TARDIOLI et al., 2003; YUST et al., 2003).

Para que a aplicação de uma enzima na indústria tenha êxito, é necessário que esse biocatalisador apresente atividade e estabilidade sob diversas condições de processo, o que é muitas vezes improvável, já que essas condições geralmente diferem do ambiente natural dessas biomoléculas (LIESE; HILTERHAUS, 2013). Além do mais, a solubilidade das enzimas em meio aquoso representa um problema para a indústria, pois o reuso desse biocatalisador se torna complexo, trazendo custos ainda maiores, já que a obtenção dessas moléculas, bem como o processo de recuperação delas do meio, são de elevado custo (SANTOS et al., 2015b).

A imobilização de enzimas é uma técnica que possibilita a fácil recuperação dessas biomoléculas após um ciclo reacional para seu posterior reuso e permite a simplificação do *design* do reator (RODRIGUES et al., 2008; SANTOS et al., 2015c; ZHOU; WANG, 2009). Além disso, a imobilização objetiva o aumento da estabilidade da enzima contra agentes desnaturantes como temperatura, pH e solventes químicos (BEZERRA et al., 2015; POPPE et al., 2013). Dessa forma, essa técnica é usualmente requerida para a maioria das aplicações industriais de enzimas e um dos pontos mais críticos no desenvolvimento dessa técnica com uma enzima específica é a escolha do suporte onde essa biomolécula ficará fixada (SANTOS, et al., 2015a; MATEO; GRAZ; FERN, 2007).

Diversos materiais poliméricos podem ser utilizados como suporte de imobilização. Alguns desses suporte são comercializados em sua forma já funcionalizada, não sendo necessário a utilização de agentes ativantes para modificação química de sua superfície, como é o caso do Immobead (MATTE, 2015). Já outros materiais necessitam de uma modificação química em sua superfície através de diversos agentes ativantes, como é o caso de alguns biopolímeros naturais, que podem ser ativadas com Glutaraldeído, Glicidol, Epicloridina, Divinilsulfona, Formaldeído e outros agentes (ALBUQUERQUE et al., 2016; SANTOS et al., 2015c; TARDIOLI et al., 2003; VIEIRA, 2009).

Diante disto, o presente trabalho avaliou a imobilização da protease Alcalase® em Immobead 350 e em Quitosana ativada por 3 agentes diferentes — Glutaraldeído, Divinilsulfona e Glioxil — objetivando a insolubilização e estabilização da enzima a fim de aplicá-la em reação modelo.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Enzimas

Nos últimos anos, o interesse das indústrias por processos biotecnológicos que substituam os processos químicos convencionais tem aumentado e, por conseguinte, os estudos e pesquisas com bioprocessos aplicáveis industrialmente é também crescente. Parte desse interesse deve-se ao efeitos econômico e ambientalmente benéficos causados pela utilização de tecnologias de uma menor demanda energética, com grande possibilidade de utilização de matérias-primas de fontes renováveis ou até mesmo de resíduos industriais (COELHO; LEITE; ROSA, 2001). Nessa busca por processos mais "verdes", os biocatalisadores surgiram com um papel muito importante para um grande conjunto de reações de interesse industrial.

Enzimas são proteínas que atuam como catalisadores de alta especificidade e grande eficiência, reduzindo a energia de ativação, acelerando, assim, a reação química sem interferir no equilíbrio da mesma. Essas moléculas podem elevar a velocidade de reações em até 20 ordens de magnitude (ARANTES, 2008; VIEIRA, 2009).

Como proteínas, as enzimas são constituídas por subunidades de aminoácidos com diferentes resíduos que se ligam para formar uma cadeia polipeptídica. Assim, a estrutura primária dessas enzimas é a própria sequência formada por esses aminoácidos. Essa cadeia pode localmente se arranjar no espaço de duas formas diferentes, α -hélice e folha β , ou uma mesclagem das duas, formando, assim, uma estrutura secundária. Por meio de interações entre os grupos presentes nos resíduos dos aminoácidos, a cadeia polipeptídica se enovela, dobrando sua estrutura secundária e formando uma estrutura tridimensional terciária, na qual existe uma região de maior interesse: o sítio catalítico. A alta especificidade das enzimas deve-se a esse arranjo tridimensional, que permite que apenas determinados substratos posicionados adequadamente alcancem o sítio ativo dessa enzima. Algumas delas possuem ainda uma estrutura quaternária, que é formada quando há união de duas ou mais cadeias polipeptídicas (BRÍGIDA, 2010; TARDIOLI, 2003)

Do ponto de vista biológico, enzimas são catalisadores de natureza orgânica que atuam em inúmeras reações bioquímicas dos processos mais diversos do metabolismo de seres vivos (COELHO; LEITE; ROSA, 2001). Quimicamente, enzimas são macromoléculas que possuem funções catalíticas e são solúveis em água, podendo essa solubilidade ser de

grau mínimo, que são as enzimas quase completamente insolúveis, ou até mesmo chegar a centenas de miligramas por mililitro (LIESE; HILTERHAUS, 2013).

São diversas as vantagens ligadas à utilização de enzimas como substitutas dos catalisadores químicos. Além do aumento do rendimento devido à alta eficiência e especificidade desses biocatalisadores, o que também diminui a formação de subprodutos e reduz, assim, os custos ligados às etapas de separação e purificação, as condições mais brandas nas quais esses biocatalisadores atuam são também de grande interesse para a indústria. Essas moléculas são capazes de catalisar reações atuando em temperaturas, pH e pressões mais suaves (MENDES et al., 2011). Esses biocatalisadores são empregados em diversos setores industriais como de limpeza doméstica, bioenergia, alimentos e bebidas, cosméticos, têxtil e ração animal (HASAN; SHAH; HAMEED, 2006; KIRK; BORCHERT; FUGLSANG, 2002; SOUZA, 2013).

Para que uma enzima seja adequada para utilização industrial, é necessário que a molécula seja estável e mantenha suas funções catalíticas sob as condições do processo de interesse. Esse é um dos fatores limitantes da utilização de muitas enzimas industrialmente, já que o ambiente natural dessas proteínas difere, muitas das vezes, do ambiente reacional da indústria, tanto em termos de solventes, como de temperatura e pH (LIESE; HILTERHAUS, 2013). As condições reacionais da indústria causam frequentemente uma instabilidade na enzima e a sua atividade catalítica pode ser afetada não só pela exposição a fatores já citados, mas inclusive pelo próprio substrato não natural utilizado (LITTLECHILD, 2015).

A nível mundial, o mercado de enzimas gira em torno de bilhões de dólares por ano (SILVA, 2016). Assim, a busca por novas moléculas com funções catalíticas e suas condições ótimas de estabilização e utilização, bem como sua aplicabilidade industrial, é de elevado interesse econômico. A Engenharia Enzimática têm relevante papel na busca pela estabilização dessas enzimas com técnicas que não se restringem aos campos de pesquisas, mas que são bastante empregadas na indústria em geral (LITTLECHILD, 2015; MIGUEL et al., 2013).

Dentre as enzimas utilizadas industrialmente, as proteases apresentam grande destaque, sendo utilizadas em inúmeras aplicações, predominantemente catalisando a hidrólise de ligações peptídicas de proteínas (ŽUŽA et al., 2017). Assim, essas enzimas têm atuação em diversos setores industriais como o farmacêutico, em formulação de detergentes, na indústria de couro, fotografia, e na indústria de alimentos e agricultura (DAS; PRASAD, 2010).

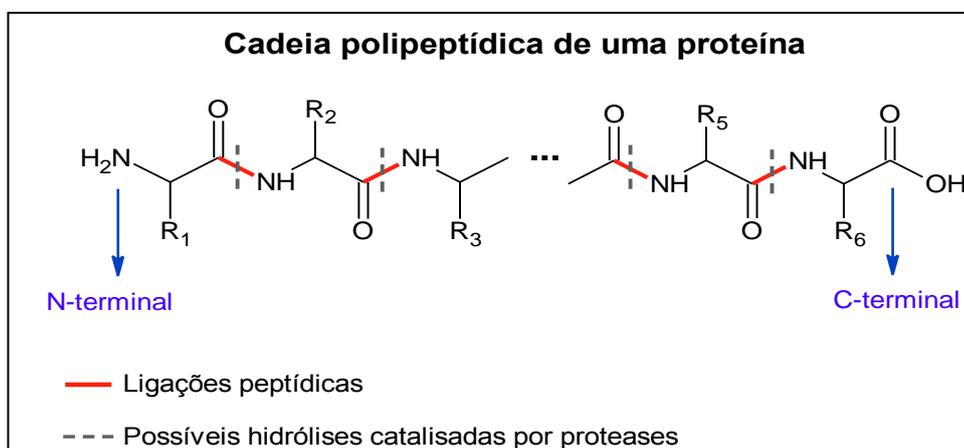
2.2 Proteases

De acordo com a classificação internacional estabelecida pela Comissão Enzimática da IUBMB (Enzyme Commission of International Union of Biochemistry and Molecular Biology), as enzimas proteolíticas, conhecidas como proteases, pertencem à categoria das hidrolases (grupo 3) e estão incluídas no subgrupo 4, sendo, assim, intituladas como EC 3.4 (Peptídeo hidrolases). Essas enzimas são, portanto, moléculas de proteínas que hidrolisam outras proteínas (GAMBÔA, 2010; GIANOTTI, 2008; TARDIOLI, 2003).

Além de categorizadas como enzimas hidrolíticas, as proteases podem ser especificadas de acordo com o sítio ativo, o mecanismo catalítico, o peso molecular e a especificidade ao substrato. De acordo com os resíduos de aminoácidos presentes no sítio catalítico e encarregados de realizarem a hidrólise, essas enzimas podem ser divididas em glutamyl proteases, serino proteases, cisteíno proteases, metalo proteases, treonino proteases e aspartil proteases (GIANOTTI, 2008; GIONGO, 2006; TARDIOLI, 2003).

As proteases são enzimas com atividade proteolítica e promovem a quebra, por hidrólise, de ligações peptídicas das cadeias que formam as moléculas de proteínas, como mostra a Figura 1 (GAMBÔA, 2010). Essas quebras podem ocorrer em áreas diferentes do substrato e, de acordo com a localização em que essa quebra é realizada, a enzima responsável por esse processo pode ser denominada de endopeptidase ou exopeptidase. Quando a divisão da ligação peptídica é feita nos grupos amino ou carboxilas terminais, a protease é chamada de exopeptidase, já quando a quebra é realizada em ligações afastadas dos grupos terminais a protease é denominada de endopeptidase (MIGUEL et al., 2013).

Figura 1 - Representação esquemática de possíveis clivagens de ligações peptídicas de uma proteína por hidrólises catalisadas por proteases.

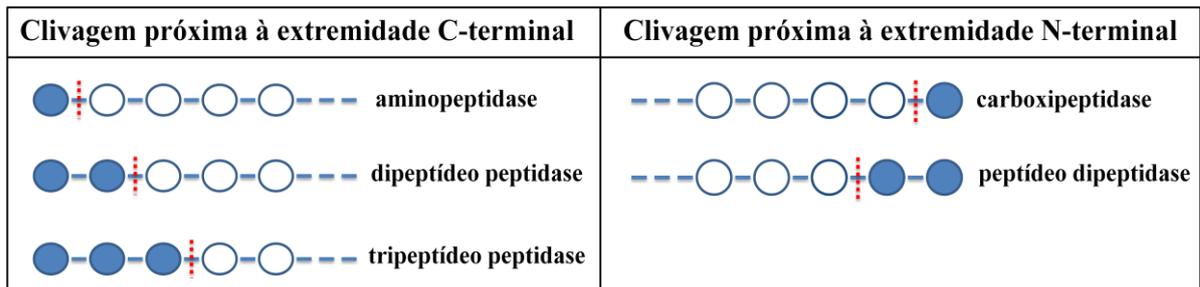


Fonte: Elaborado pelo autor.

Por clivarem ligações próximas à extremidade da molécula, após a catálise, as exopeptidases podem liberar tanto um resíduo único de aminoácido, quanto um dipeptídeo ou até mesmo um tripeptídeo (Figura 2). As exopeptidases que hidrolisam próximo à uma extremidade N-terminal de uma proteína e liberam um resíduo único são nominadas de aminopeptidases, as que liberam um dipeptídeo são chamadas de dipeptidil peptidases e as que liberam um tripeptídeo são denominadas de tripeptidil peptidases. As exopeptidases que quebram ligações peptídicas próximo à extremidade C-terminal e liberam um único resíduo são chamadas de carboxipeptidases, já as que liberam um dipeptídeo são denominadas de peptidil dipeptidases (GIANOTTI, 2008).

Figura 2 - Classificação de enzimas proteolíticas de acordo com a localização da clivagem hidrolítica realizada pela enzima. ○ Resíduos de aminoácidos que permaneceram na cadeia polipeptídica após a hidrólise; ● Resíduos de aminoácidos liberados após a hidrólise (adaptado de GIANOTTI, 2008).

EXOPEPTIDASES



ENDOPEPTIDASES



Fonte: Adaptado de (GIANOTTI, 2008).

Devido à indispensabilidade das proteases nas diferentes atividades metabólicas dos seres vivos, essas enzimas podem ser produzidas tanto por animais e plantas, como por micro-organismos, podendo a produção por estes últimos ser realizada tanto por fermentação submersa como por fermentação em estado sólido. Os micro-organismos são a fonte mais requerida de proteases pois, além de proporcionarem crescimento rápido e possuírem uma produção mais simples, eles fornecem enzimas geralmente mais estáveis (GIONGO, 2006).

Dentre as fontes microbianas, as bactérias são preferíveis frente aos fungos. Proteases bacterianas acidófilas, com pH ótimo entre 2,0 e 4,0, têm sua maior aplicação na fabricação de queijos, já as neutras, com pH ideal na faixa entre 5,0 e 8,0, têm grande aplicação na indústria de alimentos em processos de hidrólise de proteínas com maior teor de aminoácidos hidrofóbicos, e as alcalófilas, com pH ótimo entre 6,0 e 13,0, têm sua maior aplicação na produção de detergentes, indústria do couro e na resolução de misturas racêmicas de aminoácidos. Dentre as bactérias produtoras, as do gênero *Bacillus* têm grande aplicação tanto na indústria química como na de alimentos, tendo alta eficiência na produção de enzimas alcalófilas, sendo os *Bacillus spp* os que mais produzem enzimas de forma extracelular (ANWAR; SALEEMUDDIN, 1998; GIONGO, 2006).

O conjunto de aplicações industriais das proteases é amplo e diversificado. Essas enzimas estão presentes em setores como de alimentos e bebidas, papel e celulose, em formulação de detergentes, na indústria de couro, indústria farmacêutica e agroindústria. Em produtos detergentes, as proteases atuam como removedores de manchas de proteínas em tecidos. Na indústria de laticínios, elas são empregadas nos processos de coagulação do leite e em formulações para lactantes e sabores, e na indústria de panificação elas estão presentes na produção de biscoitos e cookies. No setor de papel e celulose, as proteases agem na remoção do biofilme formado durante a fabricação desses produtos. Na indústria de couro, essas enzimas atuam, ainda que de forma não tão ampla, no processo de depilação de pele animal, substituindo o processo químico convencional que gera efluentes altamente poluentes (ANWAR; SALEEMUDDIN, 1998; DAS; PRASAD, 2010; GIONGO, 2006; KIRK; BORCHERT; FUGLSANG, 2002; NEVES; PORTO; TEIXEIRA, 2006).

2.3 Alcalase®

Em 1960 foi descoberta, acidentalmente, uma enzima que detinha propriedades de grande relevância para os produtores de detergentes da época, tais como a retirada de manchas de suor e sangue de difícil remoção e que mantinha sua atividade mesmo na presença de outras substâncias contidas nos detergentes. Essa enzima começou, então, a ser produzida por fermentação e comercialmente distribuída pela Novo Nordisk A/S com o nome de Alcalase® (NORDISK, 2011).

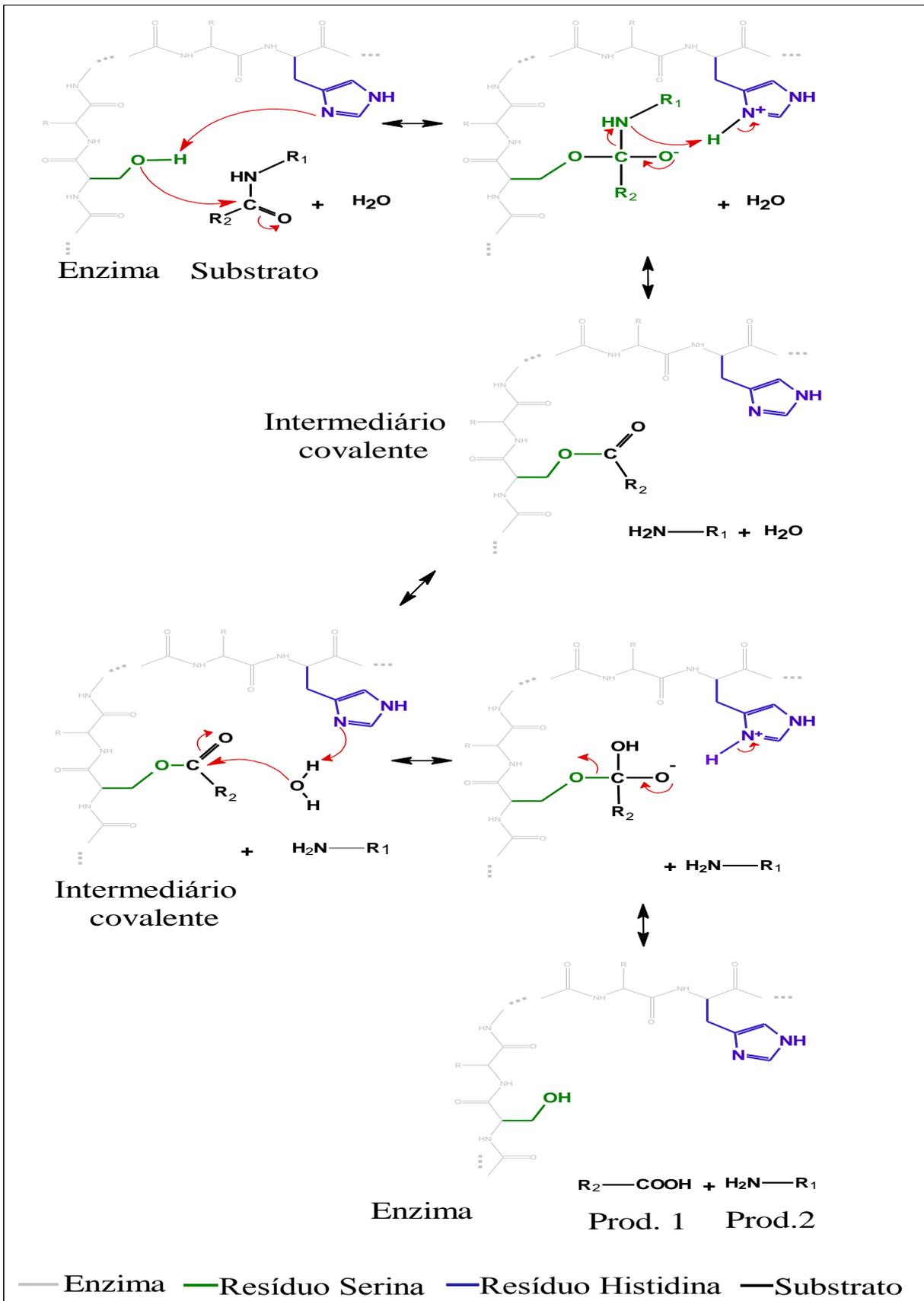
A Alcalase® é classificada como uma serino-protease e pode ser produzida por células de micro-organismos não patogênicos do gênero *Bacillus* (*Bacillus licheniformis* ou *B. pumilu*, por exemplo) de forma extracelular (MABROUK et al., 1999). Comercialmente a

Alcalase® é fornecida como uma subtilisina (EC 3.4.21.62), ou seja, uma serino-protease produzida por células de *Bacillus subtilis* ou alguma bactéria correlata. A pHs muito ácidos (entre 1 e 2) as subtilisinas são desnaturadas, e em pH 4 ocorre autólise devido à formação de uma mistura de enzimas ativas e inativas (TARDIOLI, 2003).

O sítio catalítico de proteases que, assim como a Alcalase®, são classificadas como serino-proteases têm resíduos fortemente nucleofílicos, que se alinham mais facilmente aos resíduos eletrofílicos doadores de prótons da molécula de proteína do substrato. Assim, durante a catálise, forma-se uma ligação covalente da enzima com uma parte do substrato, dando origem, portanto, a um intermediário covalente. Em geral, a tríade catalítica das serino-proteases é formada por um resíduo nucleofílico (serina), um resíduo doador de prótons (histidina) e um resíduo responsável pela orientação da histidina (ácido aspártico) (GIANOTTI, 2008).

Em seu trabalho, TARDIOLI (2003) esquematizou o mecanismo catalítico da quimotripsina, que é uma serino-protease. O grupo hidroxila da serina doa um próton para a histidina e forma ligação com um carbono da cadeia polipeptídica do substrato. Um fragmento do substrato é, então, liberado e o grupo amino-terminal captura o próton anteriormente doado ao resíduo de histidina. Nesse ponto a histidina está em sua forma original, enquanto a serina está ligada covalentemente ao outro fragmento do substrato formando, assim, um intermediário covalente. Novamente a histidina captura um próton, dessa vez da molécula de água, enquanto que a hidroxila restante se liga ao carbono da ligação peptídica do substrato. O resíduo de serina libera, então, o outro fragmento de substrato e o de histidina libera o próton que está, então, disponível para se ligar com o grupo carboxila-terminal do segundo fragmento do substrato. Na reação há, portanto, o consumo de uma molécula de água e a formação de dois produtos a partir de um substrato, como mostra a Figura 3.

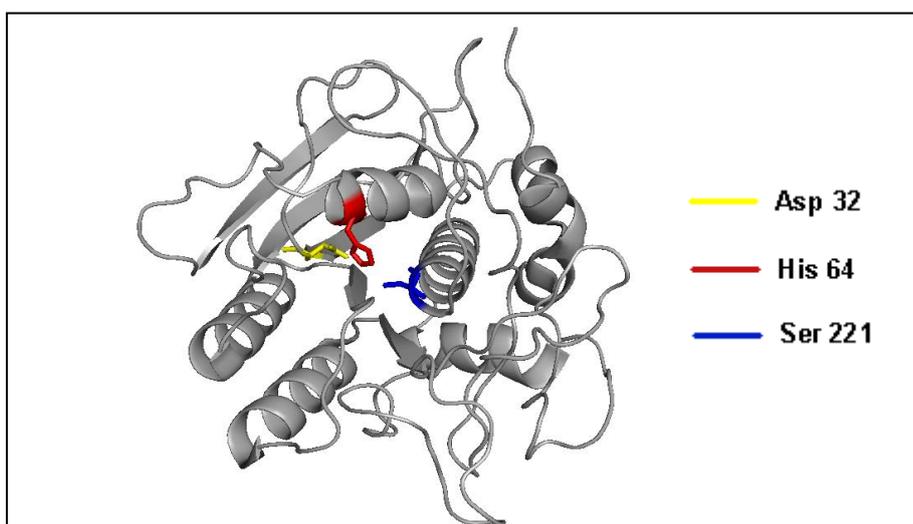
Figura 3 - Representação esquemática do mecanismo catalítico de uma serino-protease.



Fonte: Elaborado pelo autor.

O principal componente da preparação enzimática Alcalase® é a subtilisina alcalina Carlsberg, que possui uma ampla especificidade. Essa proteína é constituída por 274 resíduos de aminoácidos em uma única cadeia polipeptídica, com peso molecular próximo a 27 KDa e pH ótimo entre 8 e 9 (CHEN; CHEN; WANG, 1992; TARDIOLI, 2003; TARDIOLI et al., 2003). Em seu trabalho, NEIDHART e PETSKO (1988) apresentaram a estrutura cristalina da Carlsberg, tendo dimensões de 76.67Å, 55.65 Å e 53.08 Å, e identificaram que a sua tríade catalítica é composta pelos resíduos Asp 32, His 64 e Ser 221, como mostrado na Figura 4.

Figura 4 - Estrutura cristalina da protease Carlsberg. Sítio catalítico formado por Asp 32, His 64 e Ser 221.



Fonte: Elaborado pelo autor. Código PDB: 1SBC.

A Alcalase® possui uma extensa especificidade, hidrolisando substratos como a Caseína, ácidos de α -L-aminoácidos, substratos fluorogênicos, proteínas da soja e proteínas de origem animal, como do plasma de sangue bovino e de peixes como o albacora (*Thunnus albacares*), o salmão (*Salmo salar*) e a tilápia (*Oreochromis niloticus*) (BALLERINI; ORTEGA; GIORDANENGO, 2016; BRÍGIDA *et al.*, 2016; GUÉRARD *et al.*, 2011; HYUN; SHIN, 2000; SEE; HOO; BABJI, 2011). Essa enzima cliva sobretudo ligações peptídicas de aminoácidos de resíduos hidrofóbicos no lado carboxílico, liberando cadeias peptídicas com resíduos carboxi-terminais hidrofóbicos como Ser, His, Tyr, Gly, Val, Phe e Leu. A gama de utilizações dessa enzima em processos industriais e biotecnológicos é ampla (TARDIOLI, 2003). Essa protease têm sido utilizada como aditivos em detergentes comerciais, na

resolução de misturas racêmicas de aminoácidos e também na síntese de hidrolisados proteicos com atividades biológicas (ANWAR; SALEEMUDDIN, 1998; CHEN; CHEN; WANG, 1992; LICEAGA-GESUALDO; LI-CHAN, 1999).

2.4 Imobilização de Enzimas

É crescente o interesse por enzimas no âmbito industrial e, para que o uso desses biocatalisadores seja feito em larga escala, a tecnologia enzimática é de grande relevância no estudo e desenvolvimento de novos recursos que potencializem as vantagens e reduzam as desvantagens ligadas ao uso de enzimas (GAMBÔA, 2010). O mercado mundial de enzimas é comandado por enzimas não imobilizadas, sobretudo hidrolases, sendo essas comercializadas na forma líquida ou granular, que é solubilizada posteriormente no meio reacional (DICOSIMO et al., 2013).

Enzimas imobilizadas, no entanto, oferecem, por muitas vezes, inúmeras vantagens frente às enzimas solúveis. Entre elas estão o aumento de estabilidade contra agentes desnaturantes como pH, temperatura e alguns solventes, maior controle operacional, redução de etapas de purificação, reutilização do biocatalisador, possibilidade de atuar em processos contínuos e fácil interrupção da reação pela retirada das enzimas imobilizadas do meio reacional (LIESE; HILTERHAUS, 2013; MENDES et al., 2011; TARDIOLI et al., 2003). Além disso, a imobilização em suportes sólidos impossibilita a autólise de enzimas (BEZERRA et al., 2015). As enzimas imobilizadas possuem, também, diversas vantagens sobre vários catalisadores químicos heterogêneos, como as condições mais suaves de operação e alta seletividade estrutural e estereoquímica (DICOSIMO et al., 2013).

Existem, porém, algumas desvantagens, por vezes inevitáveis, do processo de imobilização, tais como a redução da atividade catalítica devido a interações aleatórias entre enzima e suporte e, também, a problemas com transferência de massa por efeitos difusionais no microambiente catalítico, possibilidade do desprendimento da molécula de enzima durante os ciclos reacionais, além do custo adicional envolvido com o processo de imobilização enzimática (SILVA et al., 2008).

A imobilização enzimática é um processo no qual moléculas de enzimas são confinadas na superfície, interna ou externa, de um suporte sólido, e é, portanto, uma técnica para retenção dessas biomoléculas, após um ciclo catalítico, alternativa à ultrafiltração muitas vezes inviável em processos industriais. No grupo de enzimas imobilizadas se encontram,

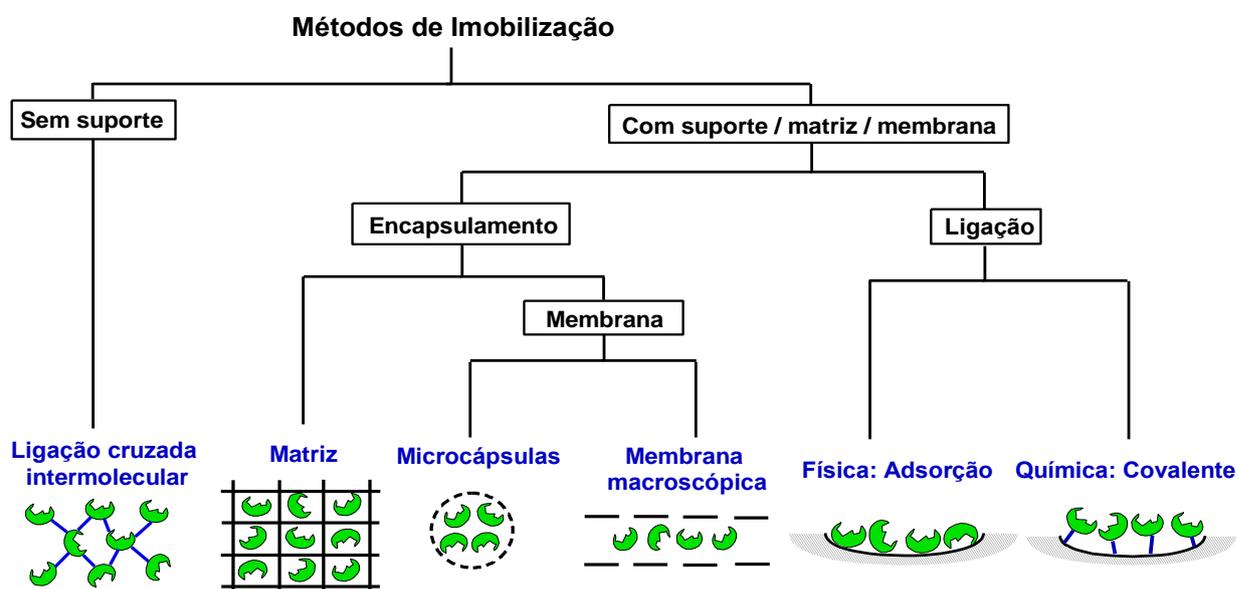
também, aquelas que passaram por modificações para se tornarem insolúveis em água (LIESE; HILTERHAUS, 2013; MENDES et al., 2011; TARDIOLI, 2003).

O processo de imobilização de uma proteína sobre uma superfície sólida envolve interações físico-químicas particulares a cada sistema. Visto que a variedade dessas biomoléculas é muito grande, assim como a quantidade de materiais que podem ser utilizados como suporte também é, são inúmeras as possibilidades de metodologias de imobilização. Essas técnicas devem se basear, portanto, em características particulares a cada enzima, como dimensões da molécula, sua carga elétrica e natureza hidrofílica-hidrofóbica dos resíduos localizados na superfície externa da enzima. As características do suporte são igualmente importantes e serão analisadas nos próximos tópicos (GAMBÔA, 2010).

A imobilização de enzimas pode ser feita tanto pela formação de ligações químicas e outras interações, como pelo aprisionamento físico dessas moléculas em matrizes ou membranas. A classificação feita por IUPAC (1995) divide os processos de imobilização em 4 tipos principais: imobilização por adsorção da enzima em um suporte sólido, imobilização por ligação covalente entre enzima e suporte, encapsulamento da enzima em uma matriz polimérica ou em membrana, sendo todos esses suportes insolúveis em água e, por último, o processo de insolubilização de enzimas por formação de ligações cruzadas covalentes entre suas moléculas promovidas por reagentes multi-funcionais (Figura 5).

Existe, portanto, uma variedade de métodos de imobilização que podem ser usados na preparação de biocatalisadores para aplicação em diversas reações. A metodologia mais apropriada depende de características bioquímicas da proteína, das características físicas e químicas do suporte e da aplicação desejável para esse biocatalisador, bem como do reator a ser utilizado (BRÍGIDA, 2010).

Figura 5 - Classificação dos diferentes métodos de imobilização de enzimas pela IUPAC, 1995.



Fonte: Elaborado pelo autor.

2.5 Suportes para Imobilização

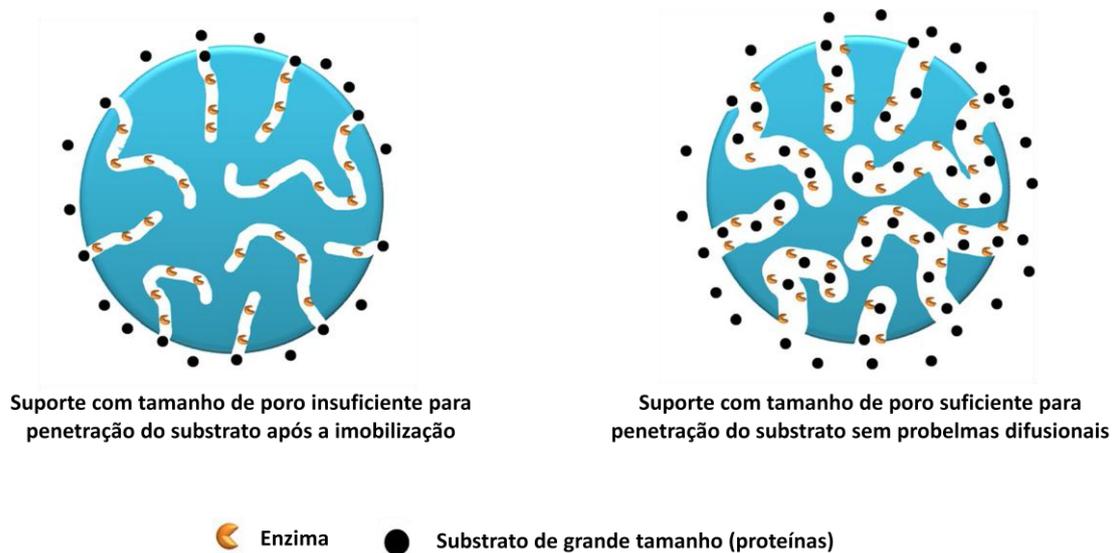
A escolha do suporte para a imobilização da enzima de interesse é de grande importância. Essa seleção deve ser feita observando-se propriedades físicas e químicas do suporte como insolubilidade, tamanho e formato da partícula, permeabilidade, natureza química, resistência mecânica e resistência ao ataque microbiano, densidade, porosidade da partícula e custo (LIESE; HILTERHAUS, 2013; MENDES et al., 2011).

Suportes de imobilização podem ser de natureza orgânica ou inorgânica, naturais ou sintetizados. Suportes orgânicos são os mais utilizados, sendo os naturais os de menor custo e de mais fácil degradação. Morfologicamente, esses materiais podem ser porosos, não porosos ou mesmo géis (BEZERRA et al., 2015; MENDES et al., 2011).

Com relação ao tamanho e estrutura das partículas, as de menor tamanho e porosas disponibilizam uma maior área, por grama de suporte, para a imobilização. Além disso, suportes porosos oferecem uma maior estabilidade à enzima frente a agentes desnaturantes. Sabe-se, porém, que nesse tipo de material, apesar da afinidade entre enzima e suporte, as moléculas do biocatalisador alcançam superfícies de profundidade limitada devido às interações, por vezes até repulsivas, entre moléculas de enzimas solúveis e moléculas imobilizadas. Além do mais, para que os efeitos difusionais sejam minimizados, é necessário observar se o diâmetro do poro é suficiente para a penetração das moléculas de enzima e do

substrato no momento da reação, sobretudo quando se imobiliza proteases, que têm substratos de grande tamanho como as proteínas (Figura 6). Quando se deseja um maior recobrimento em um tempo não tão longo, é aconselhável que esse poro seja de 4 a 5 vezes maior que o diâmetro da enzima a ser imobilizada. É preciso notar, também, que a utilização de partículas muito pequenas pode levar a uma maior dificuldade de recuperação do biocatalisador após uma reação, quando em processos batelada, ou provocar um aumento da perda de carga, quando utilizadas em leitos contínuos (BEZERRA et al., 2015; LIESE; HILTERHAUS, 2013; SANTOS et al., 2015a).

Figura 6 - Limitações difusionais em suportes com poros de diferentes diâmetros



Fonte: Adaptado de (SANTOS et al., 2015a).

Dois técnicas bem empregadas para imobilização de enzimas são adsorção e ligação covalente. A adsorção é a metodologia mais simples e de menor custo, e ocorre com a ligação da enzima ao suporte por interações fracas, como iônicas, hidrofóbicas e forças de van der Waals. Tais ligações podem ser facilmente desfeitas com pequenas alterações em condições do meio como pH, força iônica, temperatura e até com a aproximação do substrato. Vários suportes podem ser utilizados para esse tipo de imobilização e a seleção do mesmo deve levar em conta, em muitos casos, a natureza hidrofílica/hidrofóbica e a capacidade de adsorção da proteína (BRÍGIDA, 2010).

Um dos fatores mais importantes na escolha do suporte é o tipo de interação que este pode estabelecer com a enzima. Às vezes a estabilização da enzima só se é alcançada com a formação de multiligações. Além do mais, após a imobilização, é possível que interações da enzima com o suporte continuem modificando a superfície ou estrutura da

mesma. Outro ponto importante é a presença e a natureza dos grupos ativos na superfície do suporte, o grau de ativação, sobretudo quando se deseja construir multiligações, e o tamanho do braço espaçador desse grupo, principalmente em microambientes com possíveis problemas difusionais como em suportes porosos. (SANTOS et al., 2015a)

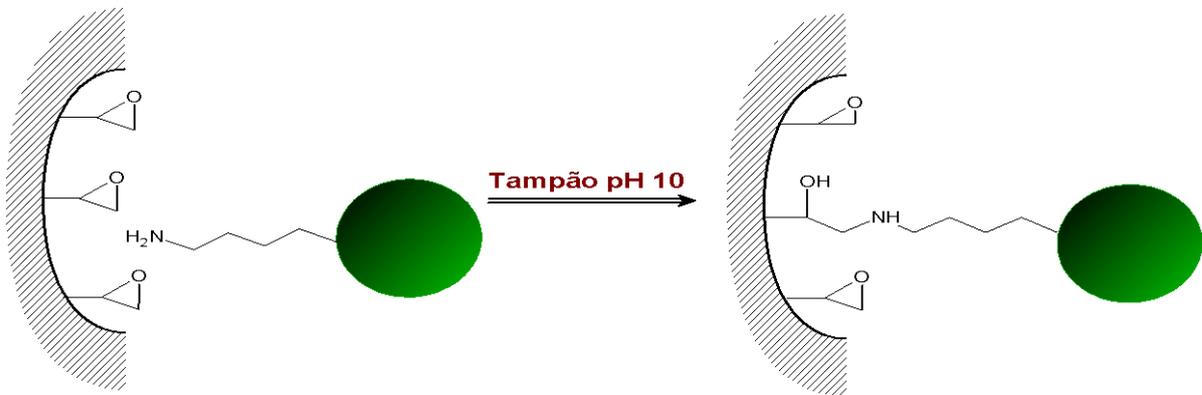
Imobilização de enzimas por ligação covalente é uma das metodologias mais usadas devido à estabilidade da ligação entre enzima e suporte que previne o desprendimento da enzima para o meio reacional. Assim, biocatalisadores mais resistentes podem ser produzidos e utilizados em diferentes meios aquosos, multifásicos ou viscosos. Para uma maior estabilização da enzima, ligações covalentes multipontuais podem ser formadas e suportes com grupos epóxi, grupos amino ativados com glutaraldeído ou divinilsulfona ou suportes glioxil são alguns exemplos de materiais que podem ser aplicados nesse tipo de imobilização (BEZERRA et al., 2015; CORÍCI et al., 2011).

2.5.1 *Immobead 350*

A resina acrílica Immobead é um copolímero reticulado de metacrilato com grupos oxirano (epóxi), também chamado de epóxi-PMMA (epóxi-polimetilmetacrilato). As partículas têm tamanhos de 300 a 700 μm , com poros de 100nm e a especificação 350 corresponde a uma área superficial de 100 à 300 m^2/g (ABREU et al., 2014; DHAKE et al., 2012a; MATOS, 2014; RODRÍGUEZ-ALONSO et al., 2015). Suportes ativados com esses grupo são bem populares, sendo comercializados por diversos fornecedores para fins de imobilização e já adotados na preparação de alguns biocatalisadores industriais (LIMA et al., 2015; SANTOS et al., 2015a).

A estabilidade que os grupos epóxi oferecem às enzimas imobilizadas em sua superfície é devida à alta estabilidade desses grupos, diferentemente dos suportes ativados com grupos aldeídos, como o glioxil agarose, em que os grupos são altamente reativos (MATOS, 2014; POPPE et al., 2013). Esses materiais possibilitam imobilizações por longos períodos permitindo, assim, um maior recobrimento da superfície do suporte. Esses grupos funcionais têm um curto braço espaçador e não oferecem impedimentos estéricos para a reação. Vários desses suportes estão disponíveis no mercado, tais como Eupergit®, Sepabeads e Immobead (MATEO; GRAZ; FERN, 2007; MATTE et al., 2014; SANTOS et al., 2015a).

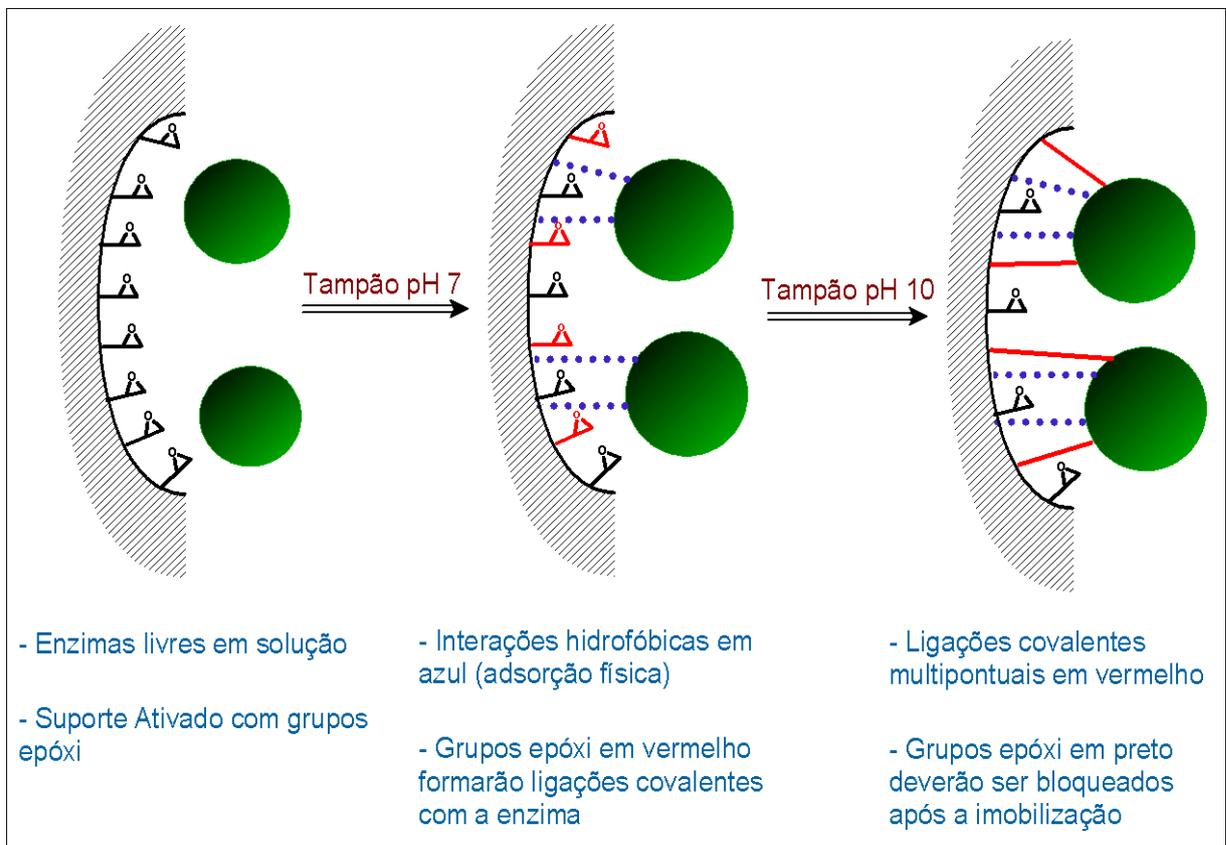
Figura 7 - Imobilização da enzima em Immobead por ligação covalente entre o grupo amina do resíduo Lis da enzima e o grupo epóxi do suporte.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Os grupos epóxi presentes nesse tipo de suporte reagem principalmente com grupos amino dos resíduos lisina da enzima (Figura 7) (POPPE et al., 2013). Esses grupos epóxi são, no entanto, pouco reativos, principalmente à pH neutro e tampão de baixa força iônica. Para que uma interação forte entre enzima e suporte seja estabelecida, é necessário uma imobilização em duas etapas: uma rápida adsorção física, em pH neutro, seguida de uma reação com formação de ligação covalente, em pH alcalino, entre a enzima adsorvida e os grupos epóxi presentes nas vizinhanças (Figura 8). Para que essa primeira adsorção ocorra, é preciso estabelecer interações hidrofóbicas sob condições de alta força iônica, sendo necessário que o suporte seja, portanto, de natureza hidrofóbica. Nesse caso, a adsorção é causada pela hidrofobicidade da superfície do suporte, e não pela atuação dos grupos epóxi presentes no mesmo. Para facilitar a permeabilização da solução aquosa de enzima e a difusão da mesma pelos poros do suporte, pode-se utilizar etanol como pré-umedecedor desse material (MATEO; GRAZ; FERN, 2007; MATOS, 2014).

Figura 8 - Representação esquemática de imobilização em duas etapas: adsorção em pH 7 seguida de ligação covalente em pH 10.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Esses suportes são chamados de multifuncionais pois possibilitam tanto interações hidrofóbicas para adsorção, como ligações covalentes pelo grupo epóxi presente em sua superfície (MATOS, 2014). Suportes ativados com grupos epóxi possibilitam a formação de ligação covalentes multipontuais. As ligações covalentes formadas entre grupos epóxi e a enzima tem um curto braço espaçador, deixando as enzimas mais fixas em suas posições. Além do grupo amino do resíduo lisina, esses suportes são capazes de formar ligações extremamente fortes com diversos grupos presentes em outros resíduos, como os grupamentos tiol, fenol, hidroxil, imidazol e até ácido carboxílico. Ademais, a formação de ligações entre enzima e suporte pode ser rapidamente interrompida com a adição de diferentes reagentes, como mercaptoetanol, etanolamina, glicina e outros (MATEO et al., 2000; MATEO; GRAZ; FERN, 2007; SANTOS et al., 2015a).

A literatura relata vários estudos de imobilização de algumas enzimas, sobretudo lipases, em suportes ativados com grupos epóxi, como o Immobead 350 (DHAKE *et al.*, 2012b; KAHAR *et al.*, 2016; MATOS, 2014; MATTE, 2015; MATTE *et al.*, 2014). Estudos

de imobilização de algumas enzimas, dentre elas proteases, amilases e lipases, em suporte Immobead são relatados na literatura (DHAKE et al., 2012a; ESPOSITO et al., 2016; KAHAR et al., 2016). No entanto, não foram encontrados estudos de imobilização da protease Alcalase® nesse tipo de suporte.

2.5.2 Quitosana

A quitosana é um polímero orgânico natural, renovável, biodegradável e de baixo custo. Devido ao seu custo reduzido, às suas diferentes configurações geométricas (pó, escamas, hidrogéis, membranas e outras) e à disponibilidade de grupos funcionais em sua superfície (hidroxila e amino), esse material tem sido bastante usado como suporte de imobilização de enzimas (MENDES et al., 2011; VIEIRA, 2009). Diversas enzimas, como hidrolases, liases, oxidoredutases e isomerases têm sido imobilizadas em quitosana através de diferentes processos de imobilização, como adsorção, encapsulação e ligação covalente, para diferentes aplicações de interesse industrial (MENDES et al., 2011).

A quitosana é um derivado parcialmente desacetilado da quitina, o segundo polímero mais abundante da natureza, a qual pode ser extraída a partir de cascas e esqueletos de animais marinhos (ADRIANO, 2008). Esse polímero é insolúvel em solução aquosa neutra mas é solúvel em solução ácida devido à presença dos grupamentos amino ($-NH_2$) em sua superfície que se comportam como base (ALMEIDA et al., 2007). Os grupamentos reativos presentes em sua superfície ($-NH_2$ e $-OH$) podem ser quimicamente modificados para formarem ligações covalentes com os grupos reativos presentes nos resíduos de aminoácidos das enzimas (RODRIGUES et al., 2008).

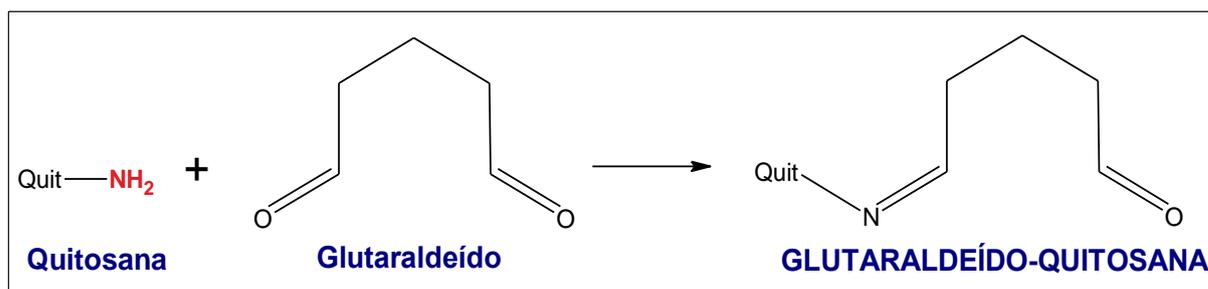
Diversos agentes químicos têm sido utilizados para modificação química da quitosana, como glicidol, epícloridrina, glutaraldeído, genipina e glioxal. Essas modificações, que envolvem os grupamentos reativos da sua superfície, além de ativarem o material para formação de ligações covalentes entre a enzima e o suporte, oferecem uma maior estabilidade química e física à quitosana (MENDES et al., 2011).

2.5.2.1 Quitosana ativada com glutaraldeído

A ativação de suporte com glutaraldeído para imobilização de enzimas é um método comumente utilizado para proporcionar a formação de ligações intermoleculares entre a biomolécula e o polímero e é, talvez o método mais utilizado para formação de ligações

covalentes usado na literatura. Essa ativação com glutaraldeído ocorre com a modificação do grupo amino presente na superfície da quitosana, transformando-o em um grupamento aldeído (Figura 9). Assim, as ligações covalentes se dão entre grupos amino da enzima e grupos aldeídos do suporte modificado, as quais são também conhecidas como bases de Schiff. (RODRIGUES et al., 2008; SANTOS et al., 2015a; SILVA et al., 2012).

Figura 9 - Representação esquemática da ativação de quitosana com glutaraldeído.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Além de ser irreversível, a ligação formada entre os grupos amino da quitosana e o grupo aldeído desse agente ativante é resistente à temperatura e pHs extremos (MENDES et al., 2011). Ademais, devido à presença de grupos hidrofóbicos, grupos iônicos e regiões capazes de interagir covalentemente com a enzima, os suportes ativados com glutaraldeído são bastante versáteis (RIOS et al., 2016).

A alta reatividade desse reagente requer que a utilização do suporte ativado seja feita logo após sua modificação química, o que impossibilita a estocagem desse material em sua forma ativa. Após a imobilização, os grupos aldeídos ativos remanescentes na superfície do suporte podem, no entanto, ser bloqueados através da redução com borohidreto de sódio (MATTE, 2015; SANTOS et al., 2015a).

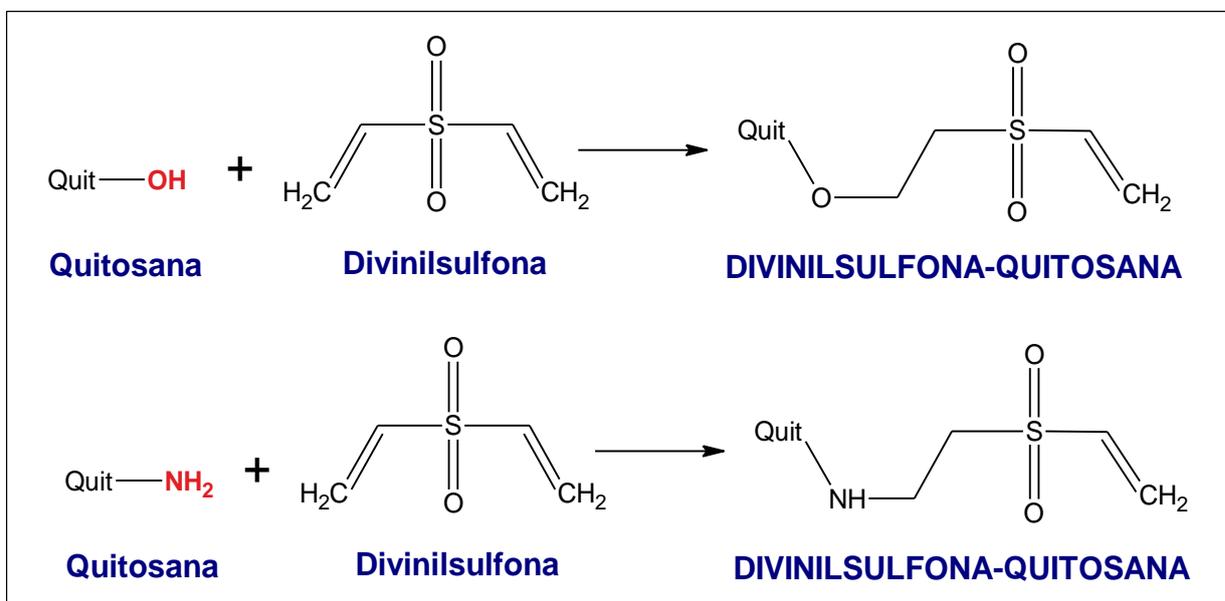
A literatura relata a utilização do glutaraldeído para ativação de suporte para imobilização de diversas proteases. FERREIRA *et al.* (2003) imobilizaram e estabilizaram Alcalase® em sílica modificada com glutaraldeído para formação de ligações multipontuais. ADRIANO (2008) imobilizou Quimotripsina e Carboxipeptidase A em géis de quitosana pura e híbridos ativada com glutaraldeído, obtendo derivados mais estáveis termicamente que a enzima solúvel. TARDIOLI *et al.* (2003) imobilizaram Alcalase® em agarose ativada com glutaraldeído e obtiveram derivados, também, mais estáveis que a enzima solúvel dialisada. A literatura relata, também, estudos de imobilização de Alcalase® em quitosana utilizando glutaraldeído como agente reticulante, no entanto com metodologia que difere bastante da metodologia aqui utilizada.

2.5.2.2 Quitosana ativada com divinilsulfona

Suportes ativados com divinilsulfona vem sendo utilizados para imobilização de diversas proteínas. Esses grupos vinílicos podem reagir com diferentes grupos dos resíduos de enzimas sem necessidade de ativação prévia dessa biomolécula. Suportes ativados com divinilsulfona podem reagir com a mesma gama de resíduos que os suportes ativados com grupos epóxi, por exemplo, sendo que a imobilização é, nesse caso, mais rápida, devido à maior reatividade da divinilsulfona, e sem a necessidade de uma etapa inicial de adsorção (SANTOS et al., 2015d).

A divinilsulfona é capaz de modificar quimicamente a quitosana reagindo tanto com os grupamentos amino quanto com os grupamento hidroxila presentes na superfície desse suporte, como mostra a Figura 10. A ligação covalente formada pela ativação dos grupos amino da quitosana é resistente a diferentes pHs e temperaturas. Devido à alta reatividade dos grupos DVS, pode haver a formação de crosslink entre uma molécula de DVS e dois grupos amino da quitosana, ou até mesmo a polimerização da própria divinilsulfona (PINHEIRO, 2017).

Figura 10 - Representação esquemática da ativação de quitosana com divinilsulfona.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Sob condições específicas, os grupos vinílicos são capazes de imobilizar enzimas pela formação de fortes ligações covalentes multipontuais (RIOS et al., 2016). Essas ligações são formadas entre o grupos vinílico e grupos presentes na enzima, como aminas primárias e secundárias, hidroxil, fenil, tiol e imidazol. Um dos fatores que mais influenciam na

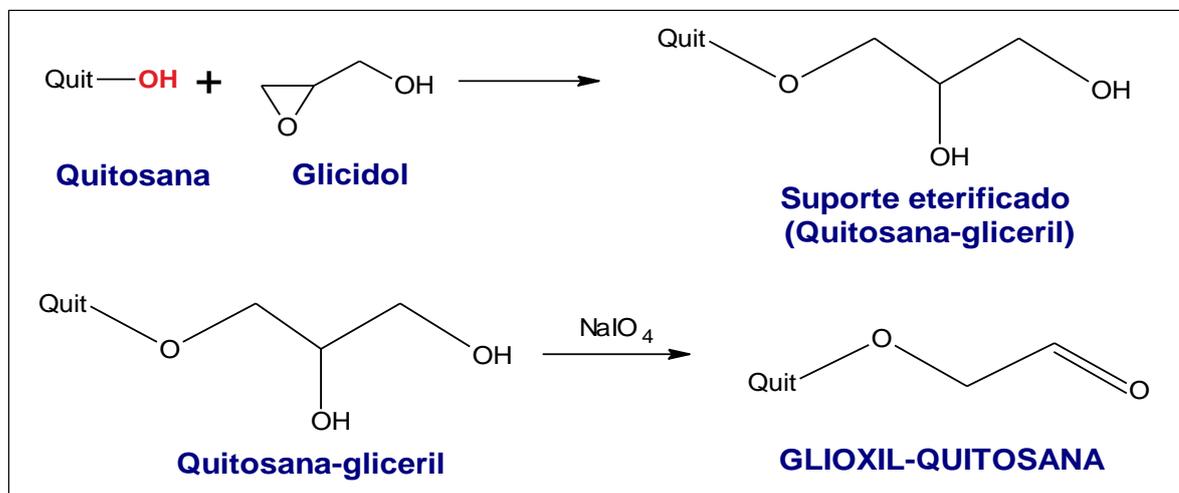
reatividade de cada um desses grupos é o pH do meio. Assim, ao se alterar o pH de incubação, é possível imobilizar a enzima por diferentes orientações, utilizando diferentes grupos da biomolécula, o que pode influenciar, também, no número de ligações multipontuais formadas e, assim, na estabilização da enzima imobilizada (SANTOS *et al.*, 2015b).

Apesar da utilização de divinilsulfona como agente ativantes ser mais recente que com glutaraldeído, a literatura relata alguns estudos de imobilização de proteases em suportes ativados com DVS. SANTOS *et al.* (2015b) imobilizaram quimotripsina em agarose ativada com DVS e PRYKRYL *et al.* (2012) imobilizaram α -quimotripsina em partículas de celulose magnéticas ativadas com DVS, por exemplo. Não foram encontrados, no entanto, relatos de estudos de imobilização de nenhuma protease em quitosana ativada com DVS.

2.5.2.3 Quitosana ativada com glioxil

Suportes ativados com grupos glioxil vêm sendo bastante empregados para imobilização de enzimas por meio de formação de ligações covalentes multipontuais, obtendo-se resultados satisfatórios de estabilização de diversas enzimas (ADRIANO, 2008). Essa ativação envolve os grupamentos hidroxila presentes na superfície da quitosana e gera aldeídos alifáticos altamente estáveis, o que permite sua estocagem por longos períodos (TARDIOLI, 2003). A ativação com glioxil é realizada em duas etapas: uma inicial eterificação do suporte usando o reagente glicidol, gerando o suporte quitosana-gliceril, com posterior oxidação desse grupo gliceril por periodato de sódio para formação do suporte glioxil-quitosana (GUISÁN, 1988), como mostra a Figura 11.

Figura 11 - Representação esquemática da ativação de quitosana com glioxil.



Fonte: Elaborado pelo autor.

São diversas as vantagens ligadas à utilização de suportes ativadas com glioxil. O seu curto braço espaçador, além de apresentar poucos impedimentos estéricos para reação entre os grupos amino da proteína e os grupos glioxil do suporte, fazem com que a formação de ligações multipontuais entre a enzima e o suporte aumente a rigidez da biomolécula, podendo proporcionar uma maior estabilização à mesma. As ligações formadas entre enzima e suporte (bases de Schiff) são muito fracas para causarem uma distorção na estrutura da enzima, mantendo a funcionalidade da biomolécula. Ademais, para que a imobilização nesses suportes ocorra, é necessário haver uma alta concentração de grupos amino na enzima, o que faz com que a imobilização estabeleça-se pela formação de intensas ligações covalentes multipontuais (RODRIGUES et al., 2008; VIEIRA, 2009).

A imobilização em suportes glioxil deve ocorrer à pH 10, devido à alta concentração de resíduos lisinas não ionizadas na enzima nessas condições capazes de formarem as bases de Schiff com o suporte. Após esse processo, os grupos que não reagiram devem ser bloqueados usando borohidreto de sódio, que vai converter os grupos aldeídos em hidroxilas inertes, e, também, as ligações reversíveis formadas com a enzima em ligações mais estáveis (ADRIANO, 2008; SANTOS et al., 2015a)

A literatura relata alguns estudos de imobilização e estabilização de proteases utilizando suportes ativadas com glioxil. TARDIOLI (2003) imobilizou Carboxipeptidase e Alcalase® em glioxil-agarose, obtendo derivados mais estáveis que a enzima solúvel. Adriano (2008) imobilizou quimotripsina em glioxil-quitosana e obteve um derivado 33 vezes mais estável que a enzima livre. YUST *et al.* (2007) imobilizaram e estabilizaram diversos componentes da preparação comercial de proteases e aminopeptidases Flavourzyme em agarose ativada com glioxil. Não foram encontrados, no entanto, estudos de imobilização de Alcalase® em quitosana ativada com glioxil.

2.6 Reações de hidrólise catalisadas por proteases livres e imobilizadas

Diversas proteases, livres e imobilizadas, são utilizadas como catalisadores em reações de hidrólise de proteínas de diferentes fontes. A literatura relata muitos estudos de hidrólise de proteínas, principalmente de origem animal, catalisadas pela Alcalase® em sua forma livre ou imobilizada em suporte sólido. Alguns estudos envolvem proteínas do leite, como a Caseína, proteínas de soro de queijo bovino e de carne de frango, por exemplo (BERNSTEIN, ROSSINI, BRANDELLI, 2007; CRUZ et. al., 2016; CRUZ, 2017; ROSSINI, 2008; SCHIMIDT, 2009). A literatura também relata alguns estudos da utilização de

Alcalase® na hidrólise de proteínas de origem de animais marinhos, como os peixes corvina e tilápia (BRÍGIDA et. al., 2016; CENTENARO, MELLADO, 2008; MARTINS, COSTA, HERNANDEZ, 2009).

2.6.1 Hidrólise da gelatina de tilápia

Resíduos do processamento de animais de origem marinha, como peixes e camarões, são considerados uma fonte segura de proteínas com elevadas propriedades nutricionais e grande presença de aminoácidos essenciais. Esses materiais, normalmente aproveitados na alimentação de animais, podem ser usados para a produção de hidrolisados proteicos sob condições controladas, tendo, assim, um maior valor agregado (GUÉRARD et al., 2001).

A quebra dessas proteínas por hidrólise é, portanto, um processo que agrega valor a esses materiais, já que podem gerar peptídeos funcionais. Os hidrolisados proteicos possuem diversas aplicações, como na formulação de suplementos proteicos, de substitutos do leite, de realçadores de sabores e outros (GIONGO, 2006; MARTINS; COSTA; PRENTICE-HERNÁNDEZ, 2009). Essas reações de hidrólise podem ser catalisadas por enzimas proteolíticas, o que já vem sendo bastante utilizado na indústria devido à maior especificidade desses catalisadores, à sua não toxicidade e à não redução do valor nutricional das proteínas hidrolisadas. A hidrólise enzimática pode melhorar, também, as propriedades químicas, físicas e organolépticas desses alimentos (GIONGO, 2006; TARDIOLI et al., 2003).

A protease Alcalase® têm sido explorada como biocatalisador em reações de hidrólise de proteínas para formação de peptídeos bioativos utilizados na produção de alimentos proteicos nutricional e funcionalmente melhorados (TARDIOLI et al., 2003; YUST et al., 2003). Além da hidrólise das proteínas de alimentos como as proteínas do leite, a Alcalase® vem sendo estudada, também, como catalisador na hidrólise de resíduos da indústria de alimentos, como rejeitos de camarão, de subprodutos como o gérmen de trigo, e de coprodutos como o soro de leite (TARDIOLI, 2003; TEIXEIRA et al., 2014; ZHU; ZHOU; QIAN, 2006).

A Alcalase® já foi estudada como catalisador na hidrólise de proteínas de peixes como o Arenque, um peixe encontrado em alguns mares do hemisfério norte, e o pescado, que possui baixo valor comercial e, por muitas vezes, não atinge a filetagem exigida para comercialização (LICEAGA-GESUALDO; LI-CHAN, 1999; MARTINS; COSTA; PRENTICE-HERNÁNDEZ, 2009). Alguns estudos relatam a utilização de Alcalase®, livre e

imobilizada em DEAE Sepharose, na reação de hidrólise da gelatina de tilápia para formação de peptídeos bioativos (FARIA; MESQUITA; BRÍGIDA, 2016; SANTOS et al., 2017).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

O principal objetivo desse trabalho foi estudar a imobilização da enzima Alcalase® em Immobead 350 e em Quitosana ativada por diferentes agentes e posterior aplicação dos derivados obtidos em reações modelo.

3.2 Objetivos específicos

- Estudar a imobilização de Alcalase® em suporte Immobead 350 com e sem modificação química da superfície do mesmo, analisando a influência das condições de imobilização e de procedimentos pós imobilização, como a reticulação com glutaraldeído, na estabilidade da enzima imobilizada;
- Estudo da imobilização de Alcalase® em Quitosana ativada por diferentes agentes – Glutaraldeído, Divinilsulfona e Glioxil – e avaliação da influência das condições de imobilização – tempo e pH – na atividade e nas estabilidades térmica e operacional da enzima imobilizada;
- Aplicar os derivados de imobilização obtidos em reação modelo;

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Materiais

A enzima Alcalase® (Protease de *Bacillus licheniformis*, concentração $\geq 2.4\text{U/g}$) foi adquirida pela Sigma-Aldrich (St. Louis, USA). Nesse trabalho, utilizou-se extrato de dois lotes diferentes. Immobead 350 foi fornecido pela empresa Chiral Vision® e Quitosana de baixo peso molecular em pó, o substrato BANE (Éster *p*-nitrofenílico de N-butiloxicarbonil-L-alanina, Boc-Ala-ONp), Glicidol, Divinilsulfona, Glutaraldeído, DPPH (2,2- difenil-1-picrilhidrazila) e Azocaseína foram adquiridos pela Sigma-Aldrich. Todos os outros reagentes químicos utilizados são de grau analítico e de marcas diversas.

4.2 Métodos

4.2.1 Preparação do Immobead 350

A fim de se retirar o ar acumulado dentro dos poros das esferas de Immobead e facilitar, assim, a permeabilização da solução enzimática e a difusão dessas biomoléculas pelos poros, realizou-se uma preparação do suporte, segundo a metodologia apresentada por DHAKE *et. al.* (2012), com algumas modificações. O procedimento consistiu na lavagem do suporte com álcool 95% na proporção de $12,5 \text{ mL}_{\text{álcool}} / \text{g}_{\text{Immobead 350}}$, por 4 horas, à 25 °C. Em seguida, o suporte foi lavado com água destilada abundante, seco à vácuo e armazenado à 4 °C.

4.2.2 Modificação química do suporte Immobead 350

Algumas imobilizações foram feitas utilizando o Immobead 350 modificado quimicamente, conforme a metodologia apresentada por ALAGÖZ *et al.* (2016) para adição de grupos aldeídos ao suporte, com algumas modificações. Primeiramente, 100 mL de ácido sulfúrico 0,5M foram adicionados a 10 g de Immobead 350 e submetidos à agitação, à temperatura ambiente, por 15 horas. O material foi lavado e ressuspendido em água destilada na proporção de 1:10 e uma solução de periodato de sódio 0,1M foi adicionada na proporção de 1 mL/g e colocados sob agitação suave por 2 horas. Após isso, o material foi lavado com água destilada em abundância e seco à vácuo. O suporte foi armazenado à 4 °C.

4.2.3 Preparação do gel quitosana

Gel de quitosana foi preparado conforme a metodologia utilizada por ADRIANO *et al.*, 2005 e RODRIGUES *et al.* (2008), com algumas modificações. Inicialmente 10g de quitosana foram colocados em contato com 240 mL de ácido acético 5% e homogeneizados ao máximo possível. A solução foi, então, adicionada a 250 mL de NaOH 1M e colocada sob agitação suave, à 25 °C, por 24 horas. Após isso, o material foi lavado com água destilada abundante e seco em bomba à vácuo.

4.2.4 Ativação do suporte quitosana com glutaraldeído

Gel de quitosana foi ativado com glutaraldeído segundo a metodologia apresentada por RODRIGUES *et al.* (2008), com algumas modificações. Na proporção de $1g_{\text{gel}}/9mL_{\text{solução}}$, o gel foi colocado em contato com solução de glutaraldeído 5% preparada em tampão fosfato de sódio 0.1M, pH 7 e colocados sob agitação durante 1 hora, à 25 °C. O material foi, então, lavado com água destilada em abundância e seco à vácuo. Assim, tinha-se o suporte nomeado de GLU-Qui no presente trabalho. Esse suporte não poderia ser armazenado, devido à alta reatividade do grupamento inserido pelo glutaraldeído, e a sua utilização foi, então, imediata.

4.2.5 Ativação do suporte quitosana com divinilsulfona

O procedimento de ativação de gel de quitosana com divinilsulfona foi adaptado de metodologias descritas na literatura para ativação de agarose (SANTOS *et al.*, 2015c) e octil-agarose (ALBUQUERQUE *et al.*, 2016). 10 gramas de gel de quitosana foram colocados em contato com 200mL de solução carbonato de sódio 333mM. Ajustou-se o pH da solução para 10 e 7,5 mL de divinilsulfona foram adicionados e a nova solução foi colocada sob agitação constante por 35 minutos, à 25 °C. O material foi, então, lavado com água destilada em abundância e seco à vácuo. Tinha-se, com isso, o suporte denominado DVS-Qui. O material foi armazenado à 4 °C.

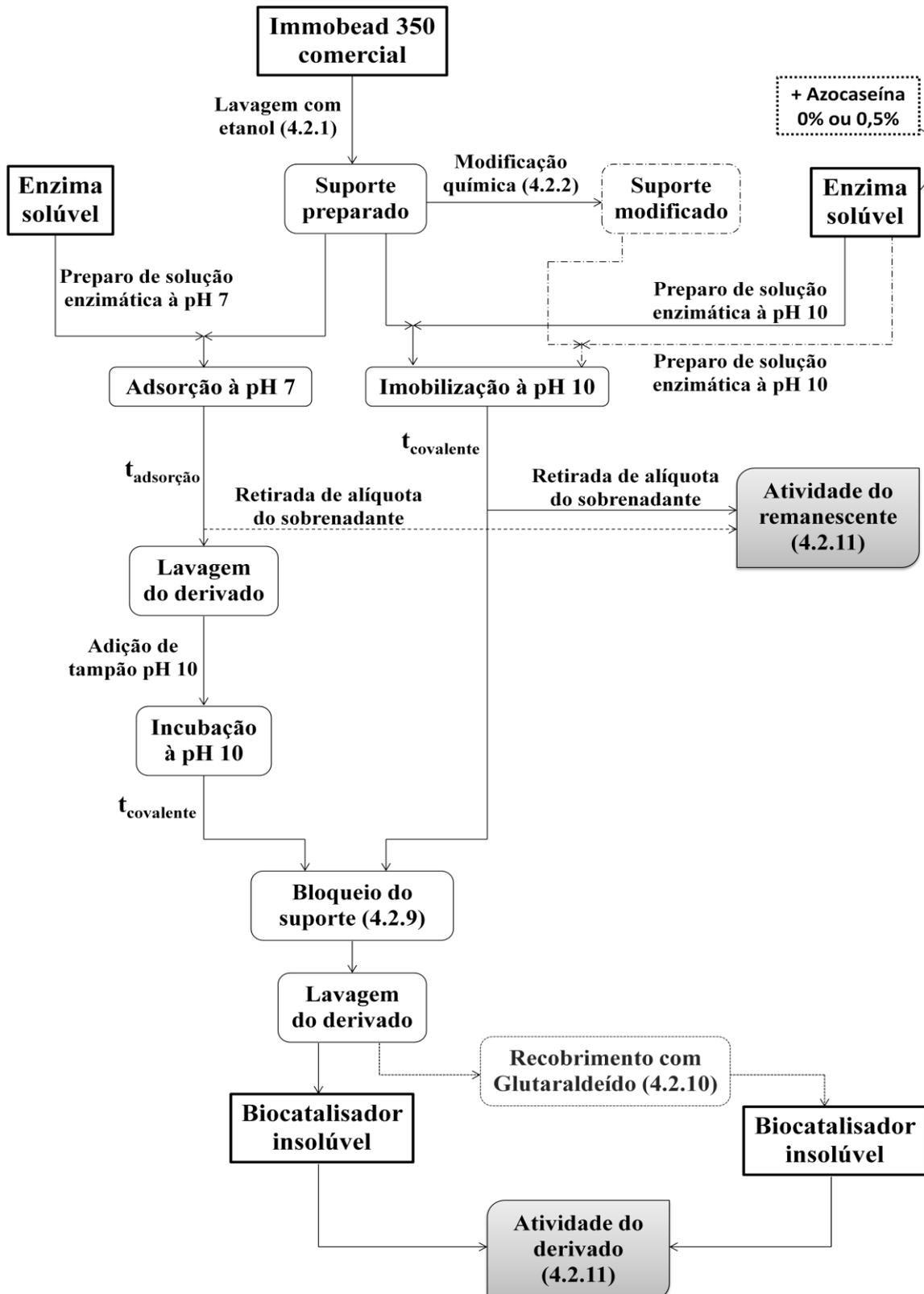
4.2.6 Ativação do suporte quitosana com glioxil

A ativação da quitosana com grupos glioxil foi realizada em duas etapas: uma eterificação do suporte utilizando glicidol, seguida de uma oxidação com periodato de sódio (GUISÁN, 1988). O procedimento foi executado segundo a metodologia utilizada por ADRIANO (2008), com algumas modificações. Para cada grama de gel de quitosana, adicionou-se, à frio, 3 mL de uma solução aquosa contendo NaOH (1,7M) e NaBH₄ (0,75M) e em seguida adicionou-se 0,48 mL glicidol. A solução foi colocada sob agitação suave por 18 horas e em seguida o suporte foi lavado e seco. À esse material foi adicionada uma solução de NaIO₄ 0,1M na proporção de 2 mL/g e colocados sob agitação por 2 horas. Após esse procedimento, o suporte foi lavado em água destilada abundante e seco à vácuo. Tinha-se, então, o suporte denominado nesse trabalho de GLI-Qui. O material foi, então, armazenado à 4 °C.

4.2.7 Imobilização de Alcalase® em Immobead 350

A imobilização de Alcalase® em Immobead 350 foi realizada por diferentes processos, os quais estão esquematizados na Figura 12. Utilizou-se dois tipos de suporte: o comercial apenas tratado com etanol, e o comercial modificado quimicamente para inserção de grupos aldeídos (seção 4.2.2). Como se observa no esquema, as imobilizações ocorreram tanto em tampão pH 7 (Tampão Fosfato de Sódio com força iônica variando de acordo com o ensaio, como descrito na sessão de resultados) para adsorção das moléculas de enzima ao suporte, seguido de incubação à pH 10 (Tampão Carbonato-bicarbonato de Sódio 100mM), quanto de forma direta em tampão pH 10. O tampão pH 10 deveria proporcionar a formação de ligações covalentes entre a enzima e o suporte, tanto na imobilização diretamente à pH 10, como na imobilização onde as enzimas eram primeiramente adsorvidas à pH 7. A adição de solução enzimática ao suporte foi feita na proporção de $1g_{\text{suporte}} / 10mL_{\text{suspensão}}$ contendo uma carga protéica que variou de 10 a 100 $mg_{\text{proteína}} / g_{\text{suporte}}$ de acordo com o ensaio realizado. Os tempos de adsorção à pH 7 ($t_{\text{adsorção}}$) e de incubação à pH 10 ($t_{\text{covalente}}$) também variaram para cada imobilização.

Figura 12 - Fluxograma dos procedimentos utilizados para imobilização da enzima Alcalase® em suporte Immobead 350 a partir do suporte comercial e da enzima solúvel até à obtenção do biocatalisador insolúvel.



Fonte: Elaborado pelo autor.

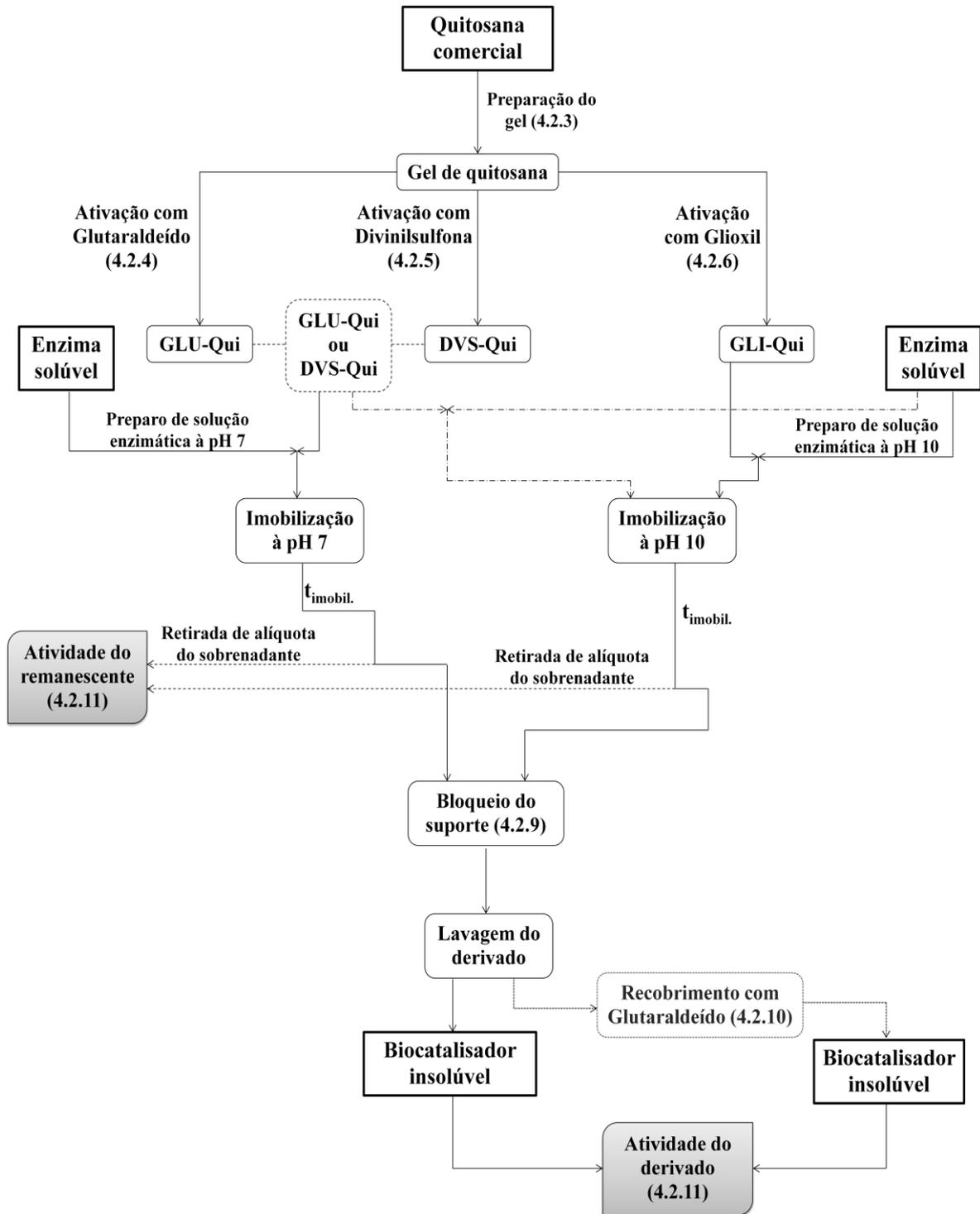
Algumas imobilizações conduzidas diretamente em pH 10 foram realizadas na presença de um inibidor competitivo da enzima Alcalase®. O inibidor utilizado foi a Azocaseína, um substrato cuja hidrólise é mais lenta que a do substrato utilizado no presente trabalho como padrão para medidas de atividade (BANE) e é amplamente utilizado na literatura para medidas de atividade proteolítica (BRÍGIDA, 2010; GIONGO, 2006; NEVES; PORTO; TEIXEIRA, 2006; SOUZA, 2016).

Em todas as imobilizações, após o tempo de incubação à pH 10 ($t_{\text{covalente}}$), o derivado era submetido à uma reação para bloqueio dos grupos ativos do suporte que não reagiram durante a imobilização (seção 4.2.9 que será abordada adiante) e, após isso, o derivado era lavado e media-se, então, a atividade proteolítica do biocatalisador insolúvel. Realizou-se a reticulação com glutaraldeído de alguns derivados, a qual era feita logo após o bloqueio do suporte, como descrito na seção 4.2.10, abordada mais adiante. Em todas as etapas demonstradas no fluxograma, a temperatura de processo foi 25 °C.

4.2.8 Imobilização de Alcalase® em Quitosana ativada por diferentes agentes

A imobilização de Alcalase® em quitosana ativada por diferentes agentes foi realizada pelos processos demonstrados no fluxograma da Figura 13. Para os suportes GLU-Qui e DVS-Qui, as imobilizações foram conduzidas à pH 7 (em tampão Fosfato de Sódio, 100mM) ou à pH 10 (em tampão Carbonato-bicarbonato de Sódio, 100mM). Para o suporte GLI-Qui, as imobilizações foram realizadas à pH 10 (tampão Carbonato-bicarbonato de Sódio, 100mM) somente. A carga enzimática oferecida a todas as imobilizações em quitosana foi de 160 U/g, na proporção de $1g_{\text{suporte}}/8mL_{\text{suspensão}}$. O tempo de imobilização ($t_{\text{imobil.}}$) variou de acordo o ensaio realizado, conforme descrito na seção 5.2, abordada adiante. Ao final deste tempo, os derivados eram submetidos à reação de bloqueio do suporte (seção 4.2.9) e, após isso, o derivado era lavado e media-se, então, a atividade proteolítica do mesmo. Em todas as etapas demonstradas no fluxograma, a temperatura de processo foi 25 °C.

Figura 13 - Fluxograma dos procedimentos utilizados para imobilização da enzima Alcalase® em suporte Quitosana, ativada por diferentes agentes, a partir do suporte comercial e da enzima solúvel até à obtenção do biocatalisador insolúvel.



Fonte: Elaborado pelo autor.

4.2.9 Bloqueio dos grupos ativos do suporte remanescentes após a imobilização

Após a imobilização, realizou-se o bloqueio dos grupos ativos do suporte que não reagiram durante a imobilização a fim de prevenir reações indesejadas entre a biomolécula e o suporte (SANTOS *et al.*, 2015d). Esse processo foi realizado tanto para o Immobead 350, como para Quitosana ativada pelos três agentes utilizados. O bloqueio foi realizado segundo a metodologia utilizada por (SANTOS *et al.*, 2015b), com algumas modificações. Adicionou-se à mistura de imobilização, contendo o derivado, o reagente hidreto de boro e sódio (NaBH_4) na proporção de $1\text{mg}_{\text{reagente}}/\text{mL}_{\text{suspensão}}$, para as imobilizações em Immobead 350, e na proporção de $0,5\text{ mg}_{\text{reagente}}/\text{mL}_{\text{suspensão}}$, para as imobilizações em Quitosana. A mistura foi colocada sob agitação suave por 30 minutos, à 25 °C, e o derivado foi lavado e seco à vácuo.

4.2.10 Recobrimento do derivado com glutaraldeído

O reagente glutaraldeído foi utilizado como agente reticulante da enzima imobilizada, conforme a metodologia apresentada por MATTE *et al.* (2014), com algumas modificações. Para isso, uma solução de glutaraldeído foi preparada em tampão fosfato de sódio pH 7 200mM e colocada para agitar juntamente com o derivado, na proporção de $1\text{g}_{\text{derivado}}/10\text{mL}_{\text{suspensão}}$ por 1 hora, a 25 °C. A concentração de glutaraldeído na solução foi de 1% para os derivados de quitosana, e de 0,5 a 5% para os derivados de Immobead 350. Após o período de 1 hora, o derivado foi lavado com água destilada abundante e seco à vácuo.

4.2.11 Determinação da atividade enzimática e cálculo de Rendimento de Imobilização

A atividade hidrolítica da enzima Alcalase® foi medida segundo a metodologia apresentada por TARDIOLI (2003) com algumas alterações. O substrato utilizado foi o reagente Boc-Ala-ONp (BANE), com concentração de 100 mM, preparado em acetonitrila. A reação aconteceu em tampão Fosfato de Sódio 50 mM, pH 7, contendo 20 % de etanol, à 25 °C.

A quantificação do produto formado era feita por espectrofotometria, com medida de absorbância em 405 nm, utilizando-se cubeta de vidro com caminho óptico de 1 cm. Para a medida de atividade da enzima solúvel, a reação acontecia na própria cubeta, que continha um agitador magnético, colocando-se 1,98 mL de tampão, 20 μL de solução enzimática e 50 μL de solução de BANE para reagir durante 2 minutos, sendo a absorbância medida

automaticamente pelo espectrofotômetro a cada 2 segundos. Para a enzima imobilizada em Immobead 350, a reação ocorreu em um reator de 30 mL, sob agitação mecânica, onde se colocou 20,3 mL do tampão, 200 µL de solução de BANE e a massa do derivado (valores próximos a 10mg e que variavam de acordo com o ensaio), tendo uma duração de 9 a 12 minutos. Nesse caso, alíquotas foram retiradas da reação periodicamente, e colocadas em cubeta de vidro para medida de absorbância pelo espectrofotômetro. Para a enzima imobilizada em Quitosana, a medida de atividade era semelhante à medida da enzima livre, substituindo-se apenas o volume de solução enzimática pela massa de derivado desejada (que variava de 3 a 20 mg, dependendo do ensaio).

A partir dos dados de absorbância e inclinação da curva formada de absorbância x tempo obtidos com a reação de hidrólise do BANE, calculou-se a atividade enzimática da enzima livre e imobilizada e o rendimento de imobilização segundo TARDIOLI (2003) e SILVA *et al.* (2012).

Para o cálculo da atividade da enzima livre, utilizou-se a equação 1:

$$Atividade \left(U_{BANE}/mL \right) = \frac{1000 * inclinação * V_{reação} * Diluição}{f * L * V_{solução\ enzimática}} \quad (1)$$

Em que f é o coeficiente de extinção molar, 7840 L/(mol*cm), e L é o caminho óptico da cubeta utilizada, 1 cm.

O cálculo de atividade da enzima imobilizada (derivado) foi feito utilizando-se a equação 2:

$$Atividade \left(U_{BANE}/g \right) = \frac{1000 * inclinação * V_{reação}}{f * L * M_{derivado}} \quad (2)$$

Uma unidade (1 U_{BANE}) corresponde à quantidade de enzima necessária para hidrolisar 1 µmol de BANE por minuto, nas condições descritas.

O cálculo do rendimento de imobilização foi feito segundo a equação 3:

$$R (\%) = \frac{Atv_i - Atv_f}{Atv_i} * 100 \quad (3)$$

Em que Atv_i é a atividade da solução enzimática no início da imobilização e Atv_f é a atividade da solução enzimática ao final da imobilização.

4.2.12 Eletroforese SDS-PAGE

A análise qualitativa de proteínas foi realizada por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) segundo a metodologia de LAEMMLI (1970). O tampão de ruptura para desnaturação da enzima foi preparado de acordo com a metodologia utilizada por GARCIA-GALAN *et al.* (2014). Para a análise de enzimas imobilizadas, 10 mg de derivado foram suspensos em 100 μ L de tampão de ruptura à 100 °C durante 10 minutos. Após esse período, uma alíquota de 12 μ L foi colocada pra correr no gel de eletroforese (12 %), à uma tensão constante de 150 V em uma célula tetra-Miniprotean (Biorad). Um marcador de baixo peso molecular (14,4 - 97 kDa) foi utilizado. Após o período de corrida, o gel foi corado com Azul de Coomassie e analisado utilizando-se o programa Gel Analyzer.

4.2.13 Diálise da enzima comercial Alcalase®

A diálise da enzima comercial Alcalase® foi realizada com o propósito de eliminar conservantes e estabilizantes do extrato para melhor comparação entre a enzima solúvel e a enzima imobilizada (livre de conservantes e estabilizantes) em termos de estabilidade e obter, assim, a real estabilização da biomolécula promovida pela sua imobilização (TARDIOLI, 2003). Uma solução enzimática preparada a partir do extrato comercial com uma diluição de 1:50 foi submetida à diálise contra água por um período de aproximadamente 7 dias à 4 °C utilizando membrana semipermeável com poros de 12 a 16 kDa. Após esse período realizou-se a estabilidade térmica da enzima dialisada.

4.2.14 Estabilidade térmica

Os ensaios de estabilidade térmica foram realizados à 60 °C em tampão fosfato de sódio pH 8 e 100 mM. Inicialmente colocou-se o tampão em banho à temperatura desejada. Após atingir a temperatura desejada, adicionou-se ao tampão uma amostra de enzima livre ou enzima imobilizada. Periodicamente, amostras eram retiradas e medida sua atividade através da metodologia descrita nas seções 4.2.11. A atividade inicial ($t=0$) foi considerada como 100% e, assim, os resultados são apresentados em termos de Atividade Relativa (%). O tempo

de meia-vida foi obtido através do modelo de desativação de SADANA e HENLEY (1987). A estabilização conferida pela imobilização à cada derivado obtido foi quantificada através do Fator de Estabilização (FE), calculado por meio da equação 4:

$$FE = \frac{t_{1/2_{Enzima\ Imobilizada}}}{t_{1/2_{Enzima\ Livre\ Dialisada}}} \quad (4)$$

4.2.15 Reação de hidrólise da gelatina de tilápia

A hidrólise da gelatina de tilápia foi inicialmente selecionada como reação modelo para aplicação dos derivados obtidos da imobilização de Alcalase® em Immobead 350. A hidrólise da gelatina obtida a partir da pele de tilápia foi realizada sob condições estudadas e otimizadas pelos autores FARIA *et al.* (2015), com algumas alterações. Os experimentos ocorreram no Laboratório de Bioquímica da Embrapa Agroindústria de Alimentos (Rio de Janeiro - RJ). A reação foi conduzida sob agitação constante, à 55 °C e pH 6. Como catalisador, uma massa de derivado equivalente à 50 U_{BANE} foi utilizada para 50 mL de solução aquosa 1% (p/p) de gelatina. O branco da reação foi considerado como uma amostra da solução reacional retirada após 1 minuto de reação. Para obtenção do perfil peptídico cinético, alíquotas da reação eram tomadas periodicamente e colocadas em banho-maria à 100 °C por 15 minutos para inativação da enzima. A análise das amostras foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (RP-HPLC). O equipamento utilizado foi HPLC da marca Jasco, com detector ultravioleta (UV) e software Jasco ChromNAV. As análises foram feitas em coluna Hypersil BDS C18 (Thermo), com corridas de 40 minutos, com fluxo de 1mL/min, à temperatura de 30 °C, com pressão média de trabalho de 12,6 MPa. O comprimento de onda para detecção foi de 216 nm. A fase móvel utilizada foi acetonitrila em água programada em gradiente (5 - 95%, v/v), contendo ácido trifluoroacético (TFA) 0,1% (MELLINGER-SILVA *et al.*, 2015). Para a análise da estabilidade operacional do derivado, ciclos de 2 horas foram realizados e, ao final de cada ciclo, o derivado foi filtrado, lavado e seco para ser reutilizado no ciclo posterior.

A atividade antioxidante dos peptídeos formados na reação de hidrólise foi determinada pela habilidade dos mesmos em sequestrar o radical estável DPPH•, conforme a metodologia apresentada por YANG *et al.* (2009). Inicialmente, uma solução 0,1 mM desse reagente foi preparada em etanol. A medida de atividade foi realizada misturando-se 1,5 mL da amostra de produto da reação de hidrólise contendo os peptídeos e 1,5 mL da solução de

DPPH. A mistura foi colocada em tubo de ensaio e agitada em vortex por 10 segundos. Após um período de 30 minutos de repouso à temperatura de 25 °C, leu-se a absorbância da mistura em espectrofotômetro à 517 nm. Os cálculos de atividade foram feitos conforme a equação 6.

$$\text{Atividade DPPH (\%)} = \frac{Abs_{Branco} - Abs_{Amostra}}{Abs_{Branco}} * 100 \quad (6)$$

Em que Abs_{Branco} representa a absorbância obtida quando se realizava todo o procedimento descrito com uma mistura de 1.5mL de água destilada e 1.5 mL de solução de DPPH.

4.2.16 Reação de hidrólise da Azocaseína

A realização da hidrólise inicialmente selecionada como reação modelo (seção 4.2.15) tornou-se inviável para os derivados de imobilização em Quitosana. Assim, selecionou-se a hidrólise da Azocaseína como reação modelo para aplicação dos derivados de Quitosana. A Azocaseína é uma proteína (caseína) conjugada a um corante Azo (SIGMA-ALDRICH, 1947) e, portanto, uma molécula mais complexa que o BANE (um éster de cadeia média que possui uma ligação peptídica), o substrato utilizado nas medidas de atividade descritas na seção 4.2.11. A fim de analisar a estabilidade operacional dos derivados de Quitosana, realizou-se ciclos consecutivos da reação de hidrólise da Azocaseína. Essa reação foi conduzida utilizando-se a metodologia apresentada por CHARNEY e TOMARELLI (1947), com algumas modificações. Uma solução 0,5% (p/v) de azocaseína foi preparada em tampão acetato de sódio pH 5, 50 mM. Em tubos falcons de 15 mL, misturou-se 2 mL de substrato (azocaseína 0,5%), 2 mL de tampão acetato e a massa de derivado. A reação foi conduzida em agitador orbital à 32 °C e 120 rpm, por 40 minutos. Após esse período, o derivado foi separado, lavado com água abundante, seco à vácuo e pesado para ser utilizado no ciclo seguinte. À solução sobrenadante, foram adicionados 2 mL de ácido tricloroacético 15% (p/v) para precipitação das moléculas de proteínas não hidrolisadas pela enzima. Centrifugou-se à 3000 rpm, por 15 minutos. Em seguida, 2 mL do sobrenadante foram colocados em tubo falcon juntamente com 2 mL de KOH 5N. Foi feita, então, a leitura da absorbância da amostra em espectrofotômetro à 428 nm. Para "zerar" o espectrofotômetro, uma solução de ácido tricloroacético e substrato, sem a presença da enzima imobilizada, era

preparada e submetida ao mesmo procedimento descrito acima. Para o cálculo de atividade, a equação 5 foi utilizada:

$$\text{Atividade} \left(\frac{U}{g} \right) = \frac{\text{Absorbância}_{\text{amostra}} - \text{Absorbância}_{\text{zero}}}{0,01 * \Delta t * \text{massa}_{\text{derivado}}} \quad (5)$$

Em que Δt é o tempo de reação (40 minutos) e $\text{massa}_{\text{derivado}}$ é massa do derivado que era medida antes de cada ciclo (em g).

O valor de atividade foi dado em U, onde 1 U é equivalente ao aumento de 0,01 de absorbância que a amostra apresentou em relação ao "zero", por minutos, nas condições de reacionais citadas.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Imobilização de Alcalase® em Immobead 350

Diversas características do Immobead 350 tornam esse material atrativo para utilização como suporte de imobilização. Sua alta porosidade permite que as biomoléculas fiquem totalmente dispersas no interior da partícula sem interagirem diretamente com o ambiente externo aos poros (MATEO *et al.*, 2007). Os grupos epóxi presentes na superfície desse material podem formar ligações com diferentes grupamentos — como tiol, fenol, e amino — presentes nos mais diversos resíduos da molécula de enzima (MATTE *et al.*, 2014). Ademais, esses grupamentos epóxi possuem um curto braço espaçador, proporcionando, assim, uma maior rigidez à enzima imobilizada, além de não oferecerem impedimentos estéricos desfavoráveis à reação (SANTOS *et al.*, 2015a)

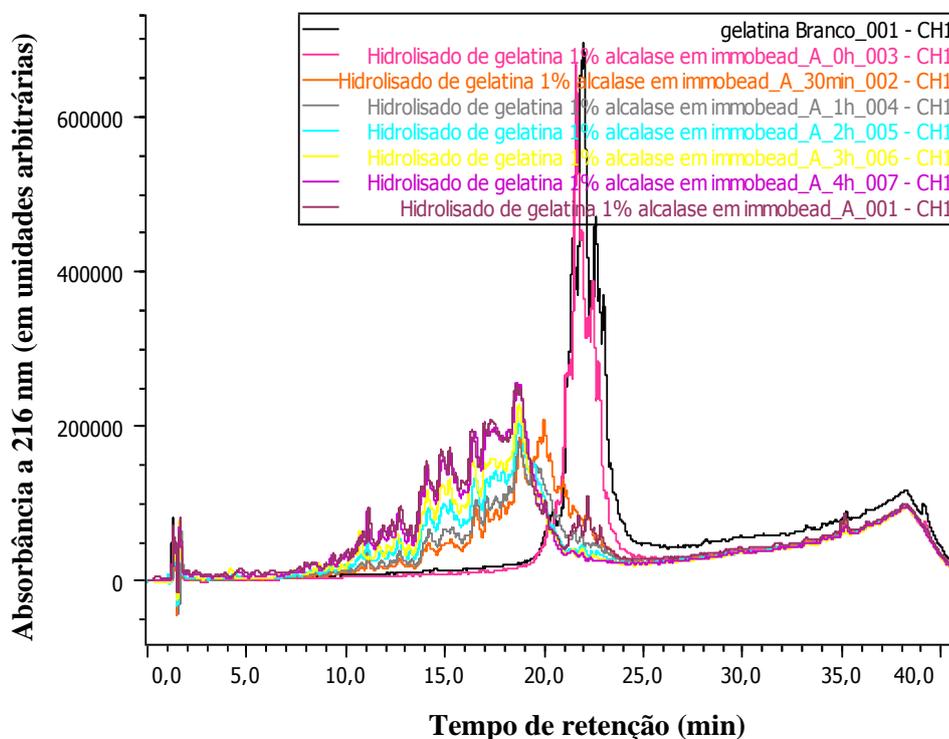
5.1.1 Imobilização à pH 10

Immobead 350 foi, então, testado como suporte para a imobilização de Alcalase®. Primeiramente realizou-se a imobilização, incubando-se a enzima juntamente com o suporte em pH 10 (condição que deveria proporcionar a formação de ligações covalentes entre enzima e suporte, devido à reatividade dos grupos epóxi do Immobead nesse pH), com uma carga inicial de $17 \text{ mg}_{\text{proteína}} / \text{g}_{\text{suporte}}$ (correspondente à $1150 \text{ U}_{\text{BANE}} / \text{g}_{\text{suporte}}$). Com 24 horas, o rendimento de imobilização foi de 98,35% e o derivado obtido mostrou uma atividade catalítica de aproximadamente $26,1 \text{ U}_{\text{BANE}} / \text{g}$.

5.1.1.1 Funcionalidade do derivado de imobilização na hidrólise da gelatina de peixe

A fim de avaliar a funcionalidade do biocatalisador insolúvel obtido a partir da imobilização de Alcalase® em Immobead 350 na reação de hidrólise da gelatina de tilápia, aplicou-se o derivado, com atividade catalítica correspondente a $26,1 \text{ U}_{\text{BANE}} / \text{g}$, nessa reação modelo, conforme a metodologia descrita na seção 4.2.15. A Figura 14 apresenta os cromatogramas de amostras do meio reacional em diferentes tempos, ao longo de 5 horas, em que pode-se observar a mudança do perfil peptídico com o decorrer da hidrólise catalisada pelo derivado da imobilização em Immobead 350.

Figura 14 - Cromatograma do perfil proteico e peptídico obtido por RP-HPLC durante a reação de hidrólise da gelatina de tilápia ao longo de 5 horas utilizando Alcalase® imobilizada em Immobead 350 como catalisador.



Fonte: Elaborado pelo autor

Para todos os tempos de reação em que o produto foi analisado, observa-se que os perfis proteicos e peptídicos obtidos possuem uma intensidade não tão baixa, evidenciando uma concentração adequada de proteínas e peptídeos detectados em um tempo de retenção entre 10 e 25 minutos. Pelos cromatogramas obtidos nota-se, porém, uma grande diferença entre o perfil peptídico da gelatina íntegra (em preto) e o do produto da reação após 30 minutos (em laranja), indicando que o biocatalisador hidrolisou, na primeira meia-hora da reação, boa parte da proteína inicialmente contida na gelatina, gerando peptídeos que são detectados em um menor tempo de retenção que as proteínas da gelatina íntegra, sugerindo que houve, portanto, uma hidrólise eficiente nesses primeiros 30 minutos que desconstruiu boa parte da proteína íntegra. Em 0,5 e 1h, ainda observa-se picos referente a proteína íntegra na faixa de 20 a 25 min no tempo de retenção. E 2 horas de reação, a intensidade desses picos são praticamente nulas, indicando que neste tempo estão presente apenas polipeptídeos. A partir desse tempo a mudança no perfil é pequena, não observando-se diferença entre 4 e 5h de reação.

Utilizando a enzima Alcalase® solúvel como catalisador dessa hidrólise, nas mesmas condições de reação, os autores SANTOS *et al.*, (2017) obtiveram um rico perfil peptídico, formado por vários picos de baixa intensidade em uma faixa mais ampla de tempo de retenção, sugerindo uma hidrólise mais intensa e uma formação mais heterogênea de peptídeos. Essa diferença de resultados entre a enzima imobilizada e a livre deve-se, provavelmente, a um aumento dos efeitos difusionais causados pela presença do suporte de imobilização, dificultando o acesso do substrato ao sítio ativo da enzima. CORÍCI *et al.* (2011), ao utilizarem Alcalase® livre e imobilizada na síntese de peptídeos, também observaram a mesma diferença de resultados devido a efeitos difusionais.

5.1.1.2 Reciclos da reação de hidrólise da gelatina de peixe

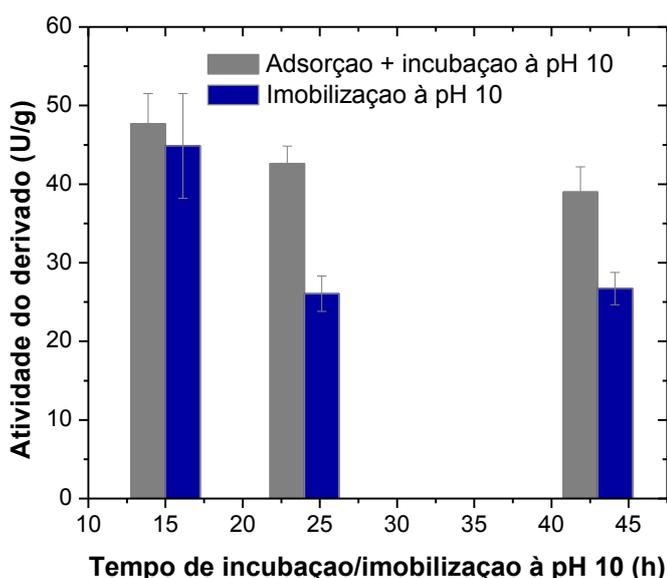
A fim de analisar a estabilidade operacional da enzima imobilizada na hidrólise da gelatina de peixe, aplicou-se o mesmo derivado de imobilização em ciclos reacionais consecutivos de 2 horas. Os produtos formados ao final de cada ciclo foram submetidos à análise de atividade antioxidante para verificar se os hidrolisados proteicos possuíam esta atividade biológica. Essa análise foi feita avaliando-se a capacidade dos peptídeos em sequestrar o radical estável DPPH•, segundo a metodologia apresentada na seção 4.2.15. Ao final do primeiro ciclo, o hidrolisado mostrou capacidade sequestrante de aproximadamente 7% e, ao final do terceiro ciclo, essa capacidade já era nula, indicando que não houve formação de peptídeos bioativos nesse ciclo, sugerindo que a enzima tinha perdido boa parte de sua atividade catalítica para obtenção de hidrolisados bioativos em apenas 3 ciclos reacionais. O derivado obtido da imobilização de Alcalase em Immobead 350 à pH 10 por 24 horas possuía, portanto, baixa estabilidade nas condições da reação da hidrólise de gelatina.

5.1.2 Imobilização à pH 7 seguida de incubação à pH 10

Considerando o caráter hidrofóbico do suporte e a possibilidade de imobilização da enzima inicialmente por adsorção à pH neutro, decidiu-se conduzir o processo em duas etapas: uma rápida adsorção física em pH 7 seguida de incubação em pH 10 da enzima já adsorvida para formação de ligações covalentes entre a biomolécula e os grupos epóxi presentes no suporte. Para isso, realizou-se a adsorção da enzima em tampão Fosfato de Sódio pH 7, 100 mM, por 5 horas, à 25 °C, com posterior incubação à pH 10 (Tampão Carbonato-Bicarbonato de Sódio, 100mM) por três diferentes tempos, com carga inicial de 17

$\text{mg}_{\text{proteína}}/\text{g}_{\text{suporte}}$. A fim de avaliar a influência da etapa de adsorção à pH 7 antes da incubação, imobilizações sem essa etapa também foram realizadas, colocando-se a enzima em contato com o suporte diretamente à pH 10, como mostra a Figura 15.

Figura 15 - Parâmetros da imobilização de Alcalase® em Immobead 350. Imobilizações realizadas à pH 10 ou à pH 7 (adsorção) com posterior incubação à pH 10. Tempos de imobilização/ incubação à pH 10 variaram entre 15, 24 e 43 horas.



Fonte: Elaborado pelo autor.

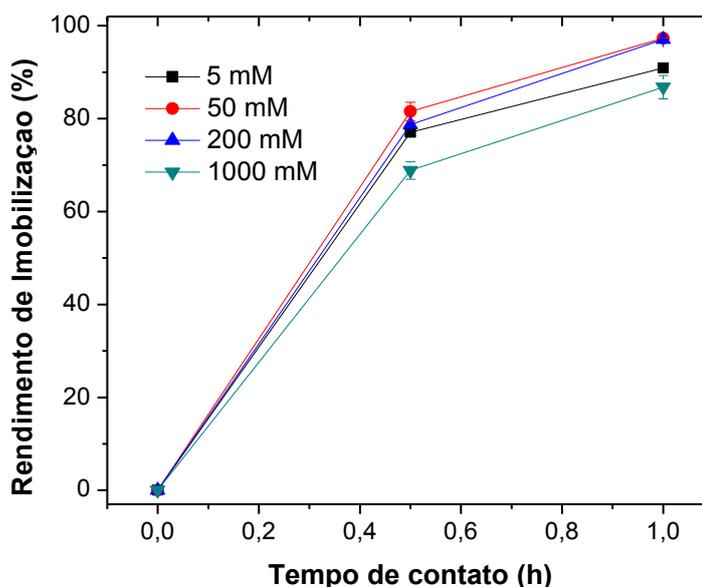
Observa-se que a etapa de adsorção influenciou positivamente na atividade dos derivados formados. O pH do meio de imobilização interfere na orientação da enzima imobilizada e, portanto, na sua especificidade (SANTOS et al., 2015b). Assim, quando a enzima se imobiliza ao suporte em pH 7, mesmo após a incubação à pH 10, o seu sítio ativo fica mais disponível para atuar na reação que quando essa imobilização ocorre diretamente em pH básico.

5.1.2.1 Influência da força iônica do tampão na etapa de adsorção

Para otimizar a etapa de adsorção do processo de imobilização, estudou-se a influência da força iônica do tampão neutro utilizado nessa primeira etapa da imobilização da enzima. Para isso, foram realizados ensaios de adsorção com $17 \text{ mg}_{\text{proteína}} / \text{g}_{\text{suporte}}$ variando-se de 5 mM a 1000 mM a concentração do tampão Fosfato de Sódio pH 7. Os resultados de

rendimento de imobilização variando com o tempo de contato estão apresentados na Figura 16.

Figura 16 - Rendimento de imobilização de Alcalase® em Immobead 350 por adsorção à pH 7, ao longo de 1 hora, à 25 °C, utilizando tampões de diferentes forças iônicas.



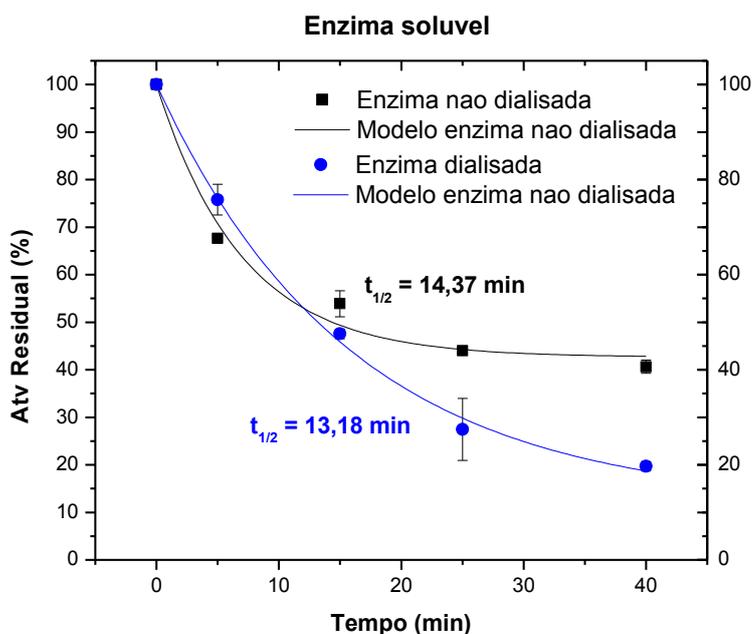
Fonte: Elaborado pelo autor.

Os dados acima mostram que, para o sistema Alcalase® - Immobead 350, a força iônica do tampão neutro, dentro da faixa estudada (5 a 1000 mM), possui uma leve influência na velocidade de adsorção da enzima, sendo os tampões de concentração intermediária (50 e 200 mM) os que proporcionaram maiores valores de rendimento. Na teoria, o protocolo de imobilização de enzimas em suporte ativado com grupos epóxi exige que a etapa inicial de adsorção seja feita em tampão de alta força iônica (1M), a fim de forçar a adsorção hidrofóbica da enzima (VIEIRA, 2009), o que não ocorreu no estudo realizado com Alcalase® e IM 350, onde o tampão 1M apresentou resultado de rendimento de imobilização inferior aos demais. Para todas as forças iônicas testadas, observou-se rápida adsorção, sendo alcançado valores superiores a 90 % de rendimento em apenas 1 hora para os três tampões de menor força iônica (5, 50 e 200 mM). Assim, foi dado prosseguimento às imobilizações, realizando-se essa primeira etapa com um dos tampões que proporcionaram mais rápida adsorção, o de 200mM.

5.1.2.2 Estabilidade térmica

Para avaliar a força das ligações formadas entre enzima e suporte, realizou-se ensaios de inativação térmica da enzima imobilizada. A Alcalase® é uma protease levemente alcalina e tem um pH ótimo de estabilidade em torno de 8,2 (ANWAR; SALEEMUDDIN, 1998). Com isso, os ensaios de inativação térmica foram realizados em Tampão Fosfato de Sódio pH 8, 100mM e a uma temperatura de 60 °C. Para fins de comparação, inicialmente a enzima livre, dialisada (livre de estabilizantes e conservantes) e não dialisada, foi submetida à inativação térmica nessas mesmas condições, como mostra a Figura 17.

Figura 17 - Inativação térmica (60 °C, pH 8) da enzima solúvel dialisada e não dialisada. A atividade inicial da enzima foi considerada igual a 100%.



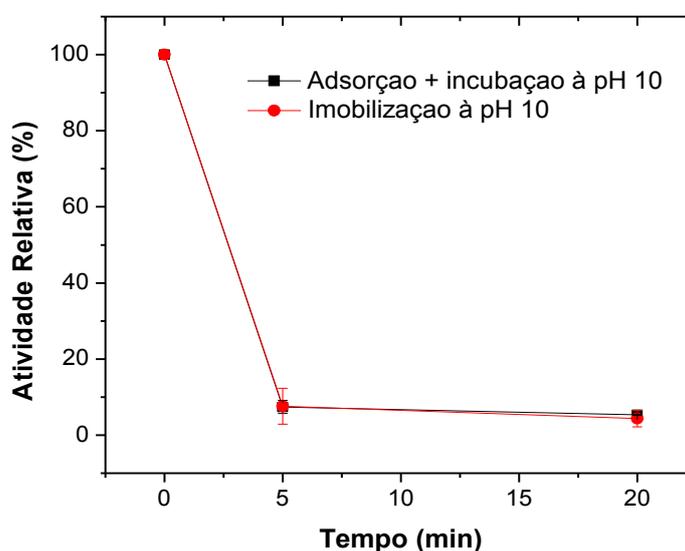
Fonte: Elaborado pelo autor.

Apesar dos perfis de inativação térmica das duas amostras terem sido bem diferentes a partir de 10 minutos de ensaio de estabilidade, os tempos de meia-vida de inativação térmica da enzima livre dialisada e não dialisada foram bem próximos. No entanto, a comparação entre a estabilidade de uma enzima imobilizada e da enzima livre deve ser feita considerando-se a enzima dialisada, que é livre de estabilizantes, e o tempo de meia-vida de 13,18 minutos foi tomado para fins de comparação. O processo de imobilização de enzima constitui-se na formação de ligações, a partir de interações físicas ou químicas, entre a enzima

e o suporte, as quais, se forem estabelecidas de forma multipontual, devem oferecer à biomolécula uma maior rigidez, impedindo, assim, a degradação da sua estrutura tridimensional diante de condições de inativação (RODRIGUES et al., 2008). Dessa maneira, a imobilização deve conferir à enzima imobilizada uma maior estabilidade que a enzima livre dialisada e, nas mesmas condições de inativação térmica, o derivado deve reter mais que 50% de sua atividade com, neste caso, 13,18 minutos de ensaio de desativação.

Preparou-se dois derivados para serem submetidos à inativação térmica nas mesmas condições da enzima solúvel. A imobilização teve $17 \text{ mg}_{\text{proteína}} / \text{g}_{\text{suporte}}$ de carga oferecida e foi, agora, realizada com período de incubação à pH 10 de 96 horas, a fim de proporcionar ao sistema Alcalase®-Immobeard 350 o tempo necessário para formação de ligações covalentes multipontuais. Derivados com e sem a etapa de adsorção foram preparados e os resultados são mostrados na Figura 18.

Figura 18 - Inativação térmica (60 °C, pH 8) de Alcalase® imobilizada em Immobeard 350. Imobilização realizada à pH 10 durante 96 horas ou à pH 7 (adsorção) seguida de incubação à pH 10 por 96 horas. A atividade inicial da enzima foi considerada igual a 100%.



Fonte: Elaborado pelo autor.

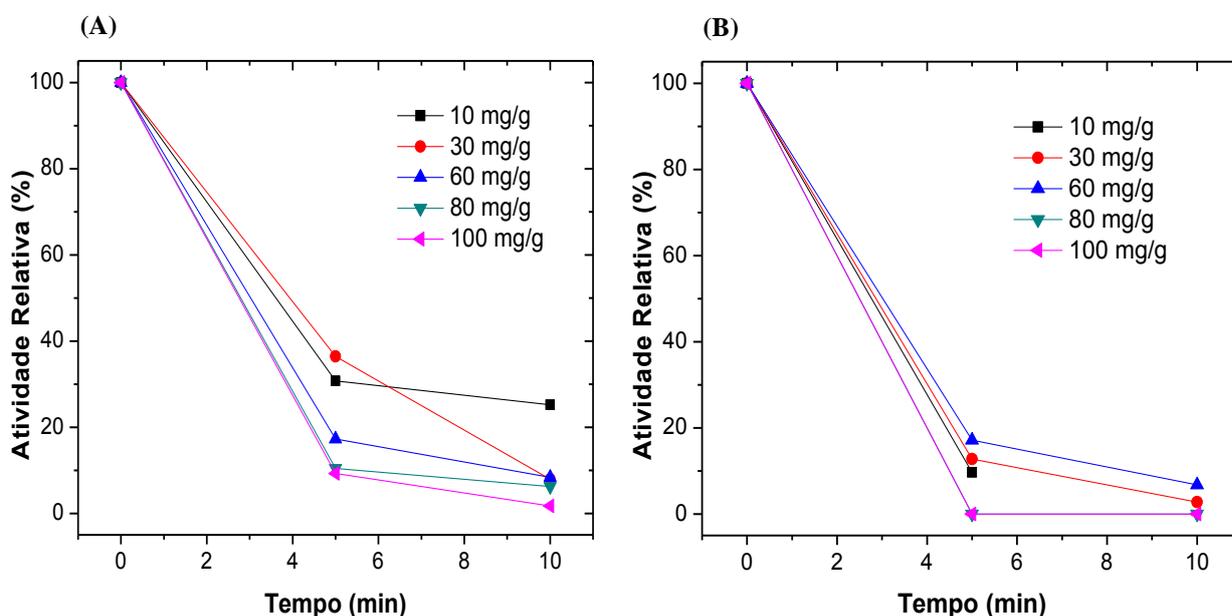
Mesmo com o aumento do tempo de imobilização/incubação à pH 10 para 96 horas, o derivado obtido perdeu mais de 90% de sua atividade inicial com apenas 5 minutos de inativação térmica sendo, portanto, menos estável à inativação térmica que a própria enzima livre mesmo dialisada.

O suporte IMB 350 é um material macroporoso e, com isso, quando a

imobilização acontece com baixa carga proteica, a maioria das moléculas não penetra para o interior dos poros e ficam predominantemente imobilizadas na parte mais externa do suporte (ADRIANO, 2008). A fim de avaliar a estabilidade térmica de enzimas imobilizadas no interior do suporte IMB 350, realizou-se, então, imobilizações com variadas cargas protéicas, verificando-se a estabilidade térmica das enzimas imobilizadas.

Para isso, novos derivados foram preparados, aumentando-se o tempo de imobilização/ incubação à pH 10 para 162 horas e variando-se de 10 a 100 mg_{proteína}/ g_{suporte} a carga oferecida para a imobilização. Novamente derivados com a sem a etapa de adsorção foram preparados para serem submetidos à inativação térmica à 60 °C e pH 8. Os dados são apresentados na Figura 19.

Figura 19 - Inativação térmica (60 °C, pH 8) de Alcalase® imobilizada em Immobead 350. (A) Imobilização realizada à pH 10 durante 162 horas, com diferentes cargas oferecidas. (B) Imobilização realizada por adsorção à pH 7 seguida de incubação à pH 10 por 162 horas, com diferentes cargas oferecidas. A atividade inicial da enzima foi considerada igual a 100%.



Fonte: Elaborado pelo autor.

A etapa inicial de adsorção dura em torno de 1 hora, e após esse período o suporte que contém enzimas adsorvidas é lavado e colocado em contato com tampão pH 10 e, então, passa-se o período de 162 horas até o final da incubação. A carga inicial é, nesse caso, oferecida à imobilização somente no período de adsorção e, portanto, a enzima pode não ter tido tempo suficiente para penetrar nos poros com somente 1 hora de adsorção, ficando

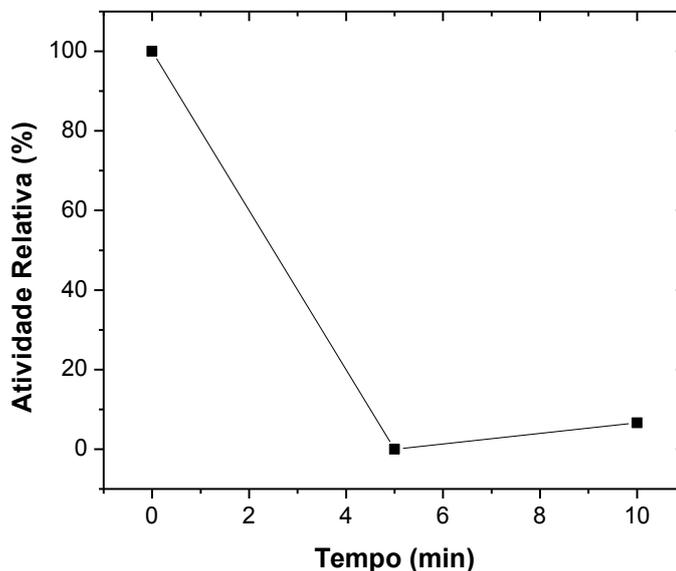
imobilizadas principalmente na parte externa do suporte. A incubação à pH 10 por 162 horas não tem por objetivo o deslocamento das enzimas para dentro do suporte mas proporciona, somente, o ambiente para formação de ligações covalentes no local onde elas estão adsorvidas. Provavelmente devido à esse fato, os derivados das imobilizações com a etapa inicial de adsorção, em geral, apresentaram uma estabilidade ligeiramente inferior aos derivados preparados sem a etapa inicial de adsorção. No entanto, todos os derivados estudados perderam mais que 60% de sua atividade inicial em apenas 5 minutos de incubação à 60 °C e pH 8, mostrando-se menos estáveis que a própria enzima livre.

A baixa estabilidade térmica dos derivados obtidos pode indicar a não formação de ligações covalentes entre a enzima e o suporte, sugerindo que haja a formação de ligações por interações mais fracas, como adsorção hidrofóbica, as quais são vulneráveis a condições de desnaturação como as utilizadas nos ensaios de inativação térmica. A reticulação da enzima imobilizada com agentes bifuncionais é uma estratégia utilizada para aumentar a estabilidade da enzima imobilizada e evitar a liberação dessa molécula (ADRIANO, 2008). Alguns dos agentes bifuncionais empregados como reticulantes são o glutaraldeído, a epícloridrina e a etilenodiamina, sendo o glutaraldeído um dos mais utilizados, devido a sua alta reatividade, baixo custo, versatilidade e disponibilidade de grupamentos aldeídos capazes de reagir com os grupos aminos da enzima (MATTE, 2015; VIEIRA, 2009).

Decidiu-se, então, recobrir o derivado obtido da imobilização realizada diretamente à pH 10 e com carga inicial de $60 \text{ mg}_{\text{proteína}}/\text{g}_{\text{suporte}}$ com glutaraldeído 1% a fim de promover a reticulação intermolecular das enzimas já imobilizadas ao suporte e, assim, aumentar sua estabilidade (SANTOS, 2015).

Esse derivado foi submetido à inativação nas mesmas condições anteriores, como mostra a Figura 20. O biocatalisador reticulado com glutaraldeído perdeu aproximadamente 100% de sua atividade inicial após 5 minutos de inativação térmica. Comparando-se com o mesmo derivado não reticulado (Figura 19 - A, derivado 60 mg/g), o qual perdeu 82,3% de sua atividade com 5 minutos de inativação térmica, verifica-se que a reticulação provocou uma diminuição na estabilidade da enzima imobilizada. A reticulação com glutaraldeído pode, além de aumentar a rigidez da biomolécula imobilizada, alterar propriedades globais da superfície da enzima, afetando tanto sua atividade como estabilidade, o que nesse caso ocorreu de forma negativa (SANTOS, 2015).

Figura 20 - Inativação térmica (60 °C, pH 8) de Alcalase® immobilizada em Immobead 350. Imobilização conduzida à pH 10, por 162 horas, com carga oferecida de 60 mg_{proteína}/g_{suporte}. A enzima immobilizada foi reticulada com glutaraldeído 1%. A atividade inicial da enzima foi considerada igual a 100 %.



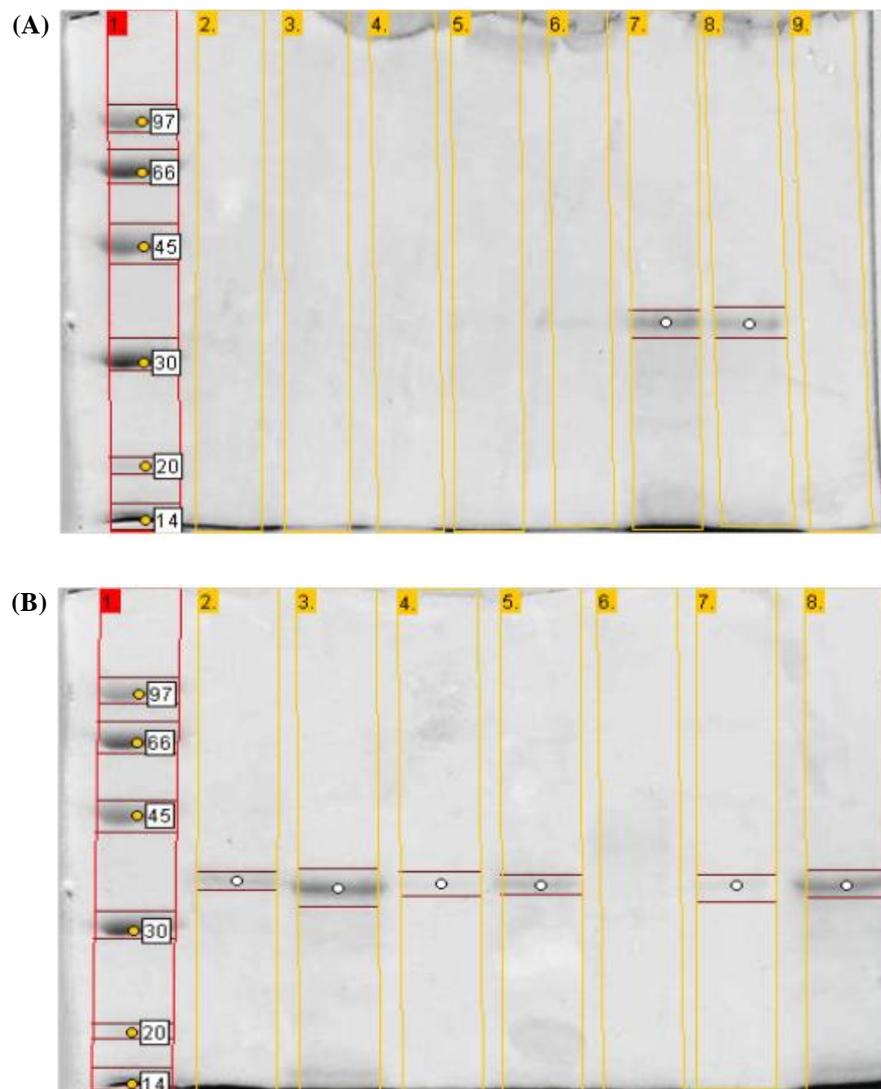
Fonte: Elaborado pelo autor.

5.1.2.3 Ensaio de SDS-PAGE

A fim de identificar o tipo de ligação formada entre a enzima e o suporte durante a imobilização, realizou-se um ensaio de eletroforese com alguns dos derivados apresentados anteriormente, os quais foram inativados à 100 °C na presença de tampão de ruptura. Nessas condições, todas as enzimas que não estão ligadas covalentemente ao suporte devem ser liberadas e suas bandas apresentadas nos respectivos poços onde foram colocadas as amostras (ALBUQUERQUE et al., 2016). Os géis obtidos após o ensaio são mostrados na Figura 21.

Segundo resultados obtidos por TARDIOLI (2003) o principal componente da preparação comercial da Alcalase® possui massa em torno de 30 KDa. Considerando-se até mesmo o branco da imobilização (solução enzimática preparada para ser colocada em contato com o suporte durante a imobilização), só foi possível observar as bandas a partir das imobilizações com carga igual ou superior a 60 mg_{proteína}/g_{suporte} (Poços 2, 5 e 7 da Figura 21 A e poços 2 e 5 da Figura 21 B), pois provavelmente abaixo disso a concentração de enzimas foi muito pequena para ser revelada nas bandas do gel de eletroforese.

Figura 21 - Eletroforese da enzima Alcalase® livre e imobilizada em Immobead 350 sob diversas condições. **(A)** Poço 1: Padrões de massa molecular em kDa; Poço 2: Branco de Imobilização (10 mg/g); Poço 3: Derivado de imobilização (pH 10, 10mg/g, 162 h); Poço 4: Derivado de imobilização (pH 7 e 10, 10 mg/g, 162 h); Poço 5: Branco de Imobilização (30 mg/g); Poço 6: Derivado de imobilização (pH 10, 30mg/g, 162 h); Poço 7: Branco de Imobilização (60 mg/g); Poço 8: Derivado de imobilização (pH 10, 60mg/g, 162 h); Poço 9: Derivado de imobilização (pH 7 e 10, 30mg/g, 162 h). **(B)** Poço 1: Padrões de massa molecular em kDa; Poço 2: Branco de Imobilização (80 mg/g); Poço 3: Derivado de imobilização (pH 10, 80mg/g, 162 h); Poço 4: Derivado de imobilização (pH 7 e 10, 80 mg/g, 162 h); Poço 5: Branco de Imobilização (100 mg/g); Poço 6: Derivado de imobilização recoberto com Glutaraldeído (pH 10, 60mg/g, 162 h); Poço 7: Derivado de imobilização (pH 7 e 10, 100 mg/g, 162 h); Poço 8: Derivado de imobilização (pH 10, 100mg/g, 162 h).



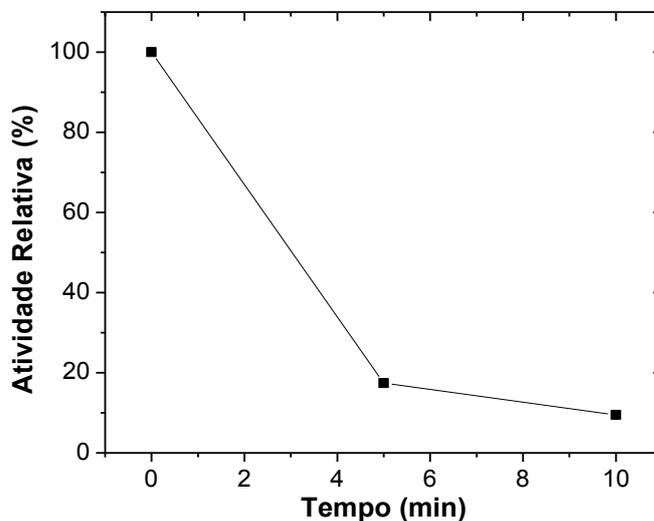
Fonte: Elaborado pelo autor.

Analisando-se, no entanto, os derivados das imobilizações com carga igual ou superior a $60 \text{ mg}_{\text{proteína}}/\text{g}_{\text{suporte}}$ (poço 8 da Figura A, e poços 3, 4, 7 e 8 da Figura B), tanto as que ocorreram à pH 10, como as que ocorreram à pH 7 (adsorção) seguida de incubação à pH 10, observou-se que os poços apresentaram a banda da enzima Alcalase®, mostrando que em nenhum dos casos houve imobilização covalente de fato. Entretanto, o poço 6 da Figura 21 B, correspondente ao derivado que foi recoberto com glutaraldeído, não apresentou a banda da enzima Alcalase®, mostrando que a reticulação da enzima foi efetiva e fixou a biomolécula ao suporte, porém essa reticulação não foi suficiente para estabilizar a enzima como mostrado na Figura 20.

5.1.3 Imobilização no suporte modificado quimicamente

Após todos os resultados insatisfatórios obtidos a partir da imobilização de Alcalase em Immobead 350, resolveu-se modificar o suporte quimicamente. Uma característica atrativa no suporte Immobead é o seu curto braço espaçador que, além de diminuir os efeitos difusionais, deve proporcionar maior rigidez à molécula imobilizada. Com o intuito de avaliar a interação da Alcalase® com outro tipo de grupo ligante, mas usufruir, simultaneamente, do curto braço espaçador dos grupos epóxi do IMB 350, realizou-se a hidrólise desses grupos para formação de grupamentos hidroxila e posterior ativação desses grupos com periodato de sódio para formação de grupos aldeídos (MATTE et al., 2014). Foi realizada, então, uma nova imobilização da Alcalase® no suporte modificado, com carga de $30 \text{ mg}_{\text{proteína}}/\text{g}_{\text{suporte}}$, com 120 horas de imobilização à pH 10. O derivado foi submetido à inativação térmica como mostra a Figura 22.

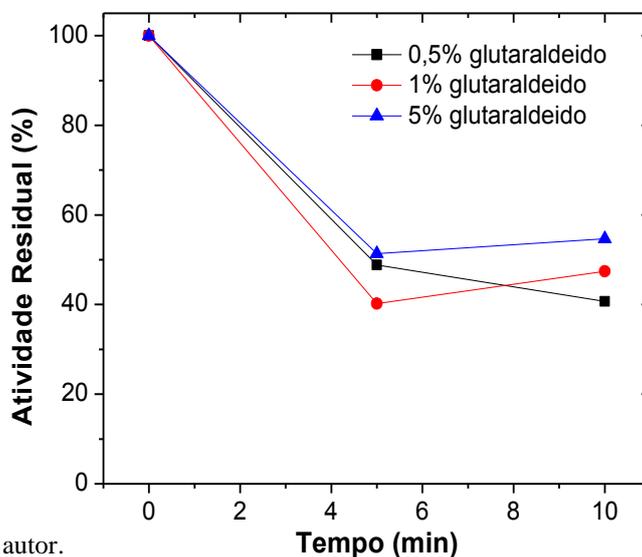
Figura 22 - Inativação térmica (60 °C, pH 8) de Alcalse immobilizada em Immobead 350 modificado quimicamente. Imobilização conduzida à pH 10, por 120 horas, com carga oferecida de 30 mg_{proteína}/g_{suporte}. A atividade inicial da enzima foi considerada igual a 100 %.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Novamente o derivado obtido mostrou-se menos estável que a enzima solúvel, perdendo mais de 80 % de sua atividade em 5 minutos de inativação térmica. Decidiu-se, então, reticular o derivado com glutaraldeído em diferentes concentrações e submetê-los a inativação térmica nas mesmas condições anteriores, como mostra a Figura 23.

Figura 23 - Inativação térmica (60 °C, pH 8) de Alcalse immobilizada em Immobead 350 modificado quimicamente. Imobilização conduzida à pH 10, por 120 horas, com carga oferecida de 30 mg_{proteína}/g_{suporte}. A enzima immobilizada foi reticulada com glutaraldeído de diferentes concentrações. A atividade inicial da enzima foi considerada igual a 100 %.



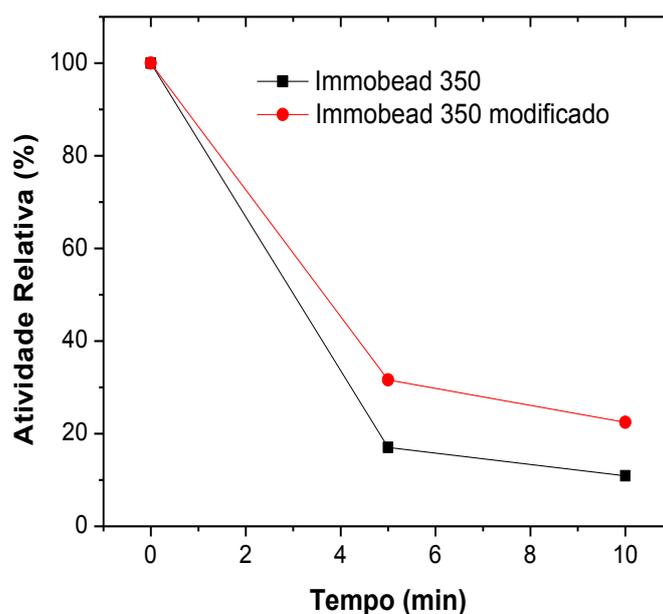
Fonte: Elaborado pelo autor.

Diferentemente do que ocorreu com o suporte não modificado, a reticulação com glutaraldeído aumentou a estabilidade da enzima imobilizada em todas as concentrações testadas. No entanto, esse derivado ainda foi menos estável que a enzima livre, apresentando uma redução de 40 a 60 % de sua atividade inicial com 5 minutos de inativação térmica.

5.1.4 Imobilização na presença de inibidor competitivo

Uma estratégia que pode ser utilizada para manter a integridade do sítio ativo da enzima durante a técnica de imobilização é realizar esse processo na presença de um inibidor da enzima (BLANCO; GUIÓSÁN, 1989; TARDIOLI, 2003). Com isso, realizou-se a imobilização de Alcalase® em Immobead 350, com e sem modificação química do suporte, na presença de Azocaseína, com posterior reticulação utilizando glutaraldeído. A imobilização foi realizada com $30 \text{ mg}_{\text{proteína}}/\text{g}_{\text{suporte}}$, diretamente à pH 10, por 120 horas. Os derivados foram submetidos, então, à inativação térmica a $60 \text{ }^\circ\text{C}$ e pH 8, como mostra a Figura 24.

Figura 24 - Inativação térmica ($60 \text{ }^\circ\text{C}$, pH 8) de Alcalase imobilizada em Immobead 350. Imobilização conduzida à pH 10, por 120 horas, com carga oferecida de $30 \text{ mg}_{\text{proteína}}/\text{g}_{\text{suporte}}$, na presença de inibidor competitivo Azocaseína. A atividade inicial da enzima foi considerada igual a 100 %.



Fonte: Elaborado pelo autor.

A presença de um inibidor competitivo no processo de imobilização não conferiu à enzima imobilizada maior estabilidade, já que os derivados obtidos perderam mais de 60 % de sua atividade em 5 minutos de inativação térmica e enzima imobilizada apresentou, portanto, menor estabilidade que a enzima livre.

Todas as estratégias estudadas de imobilização da Alcalase® em IMB 350, alterando-se tanto a natureza química da superfície do suporte, como as condições de imobilização e etapas posteriores à esse processo, não mostraram resultados satisfatórios de estabilização da enzima. Os resultados apresentados nessa seção revelaram, portanto, que o suporte Immobead 350 não é apropriado para estabilização da enzima Alcalase® por meio de imobilização.

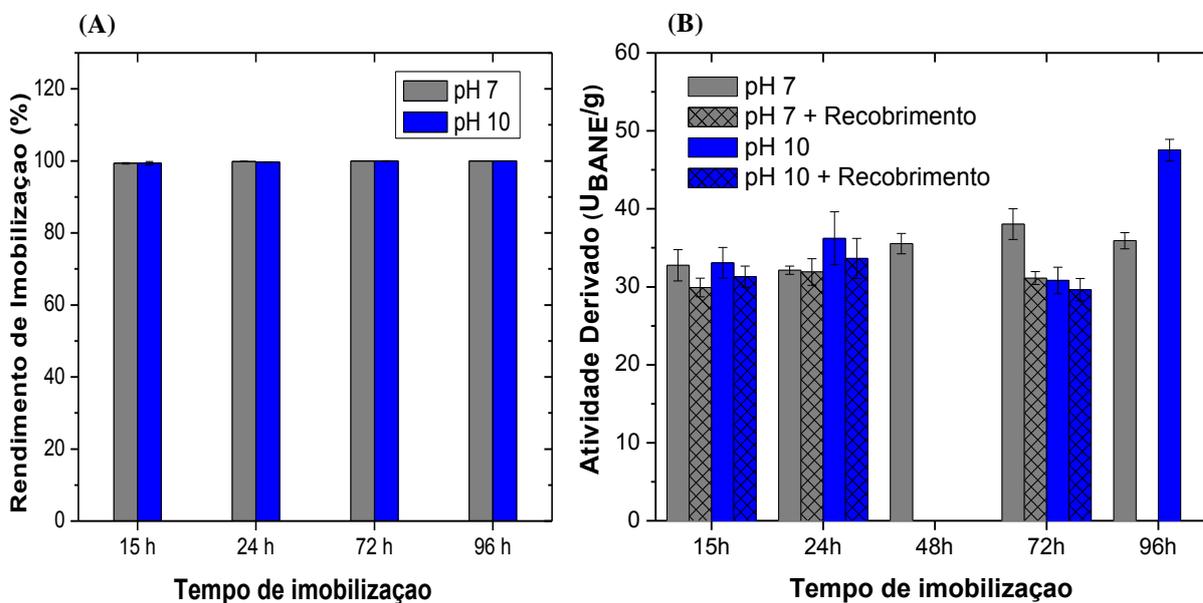
5.2 Imobilização de Alcase em Quitosana ativada por diferentes métodos

A enzima Alcalase® foi imobilizada em suporte quitosana modificada por 3 agentes ativantes: glutaraldeído, glioxil e divinilsulfona. Além das 3 diferentes ativações, variou-se as condições de pH e tempo de contato entre enzima e suporte nos ensaios de imobilização. Os pHs de imobilização analisados foram 7 e 10, e os tempos estudados variaram de 15h a 96h. A carga enzimática oferecida a todos os ensaios de imobilização em quitosana foi de $160 U_{\text{BANE}}/\text{g}_{\text{suporte}}$ (correspondente a $2\text{mg}_{\text{proteína}}/\text{g}_{\text{suporte}}$).

5.2.1 Imobilização em suporte Glutaraldeído-Quitosana

Com relação aos suportes ativados com glutaraldeído, a literatura reporta estudos de imobilizações de proteases e outras enzimas tanto à pH 7 (TARDIOLI, 2003; TARDIOLI *et al.*, 2003; VIEIRA, 2009) como à pH 10 (SOUZA, 2013) e realizou-se, portanto, imobilização nesses dois pHs, variando-se, também, o tempo. O menor tempo de imobilização estudado — 15 horas — já foi o suficiente para imobilizar praticamente todas as enzimas disponíveis, tanto nas imobilizações à pH 7 como nas imobilizações à pH 10. Portanto, todas as imobilizações da protease em suporte ativado com Glutaraldeído apresentaram valores de rendimento em torno de 100%, como mostra a Figura 25 (A). A maior parte dos derivados apresentou atividades em torno de 30 a $40 U_{\text{BANE}}/\text{g}$, com exceção do valor obtido com 96 h de incubação à $(47,53 U_{\text{BANE}}/\text{g})$.

Figura 25 - Parâmetros da imobilização de Alcalase® em quitosana ativada com glutaraldeído. (A) Rendimento de Imobilização (%). (B) Atividade do derivado de imobilização (U_{BANE}/g). Imobilizações realizadas à pH 7 ou pH 10 com tempos variaram entre 15 e 96 horas. Reticulação de alguns derivados com glutaraldeído 1%.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Como mostra a Figura 25 (B), em geral, o recobrimento com glutaraldeído após a imobilização diminuiu, mesmo que sutilmente, os valores de atividade do derivado. O tratamento pós-imobilização com glutaraldeído pode trazer mais estabilidade para a enzima em certos sistemas, sendo até recomendado em alguns casos de imobilização por adsorção, em que as ligações formadas são mais fracas que as covalentes (SANTOS et al., 2015e). Porém, até mesmo em alguns casos de estudos de imobilização por adsorção, esse recobrimento pode diminuir a atividade catalítica da biomolécula.

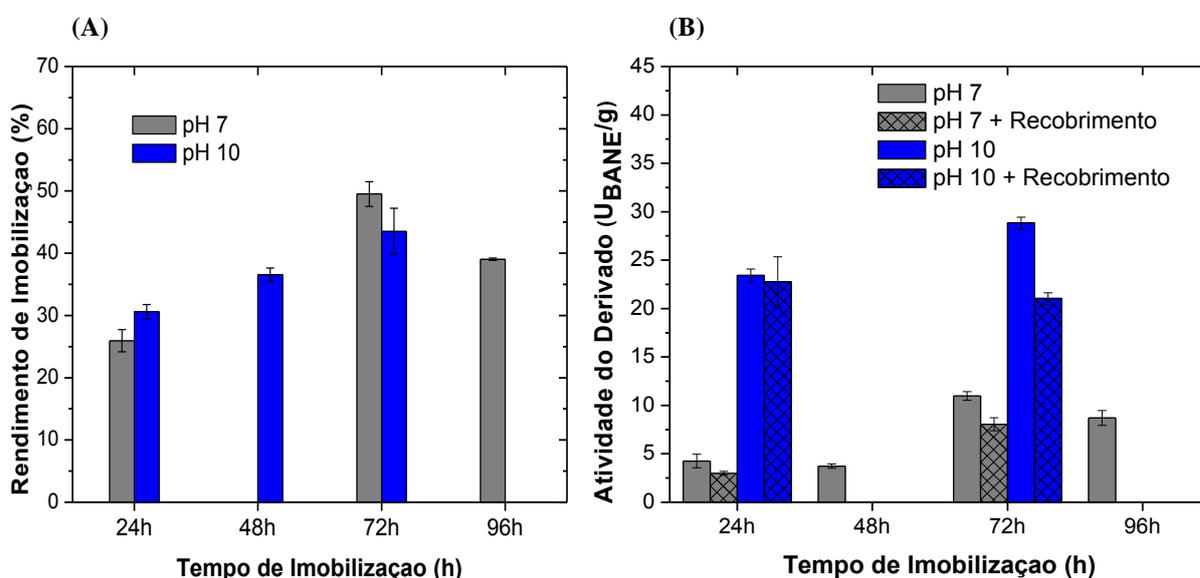
Em seus estudos, VIEIRA (2009) verificou uma drástica redução da atividade hidrolítica da β -galactosidase imobilizada em MANAE por adsorção quando o derivado era submetido ao processo de reticulação com glutaraldeído. O mesmo autor observou diminuição na atividade da enzima imobilizada em gel de quitosana e submetida ao processo de reticulação, sendo possível que a enzima tenha sofrido dessorção, já que o glutaraldeído pode ter reagido covalentemente com os grupos amino do suporte, facilitando o processo de dessorção. No presente estudo, é provável que essa dessorção não tenha ocorrido, já que a enzima deve ter sido imobilizada covalentemente no suporte (o que será avaliado posteriormente). A diminuição da atividade catalítica deve-se, provavelmente, à distorção

causada pela reticulação intermolecular e à existência de uma maior barreira difusional, causada pela inserção do glutaraldeído, o qual devido à sua alta reatividade pode ter se polimerizado, prejudicando a difusão do substrato e dificultando, assim, a reação (VIEIRA, 2009).

5.2.2 Imobilização em suporte Divinilsulfona-Quitosana

Suportes que possuem grupos vinilsulfona podem imobilizar enzimas a diversos pHs (5 a 10) e envolver grupos de diferentes resíduos, dependendo do pH do meio. No entanto, as imobilizações a pHs mais ácidos são muito mais lentas que a pHs alcalinos e neutro (ALBUQUERQUE et al., 2016). Com isso, os ensaio de imobilização no presente estudo foram realizados em pH 7 e pH 10, em diferentes tempos, e os resultados são apresentados na Figura 26.

Figura 26 - Parâmetros da imobilização de Alcalase® em quitosana ativada com divinilsulfona. (A) Rendimento de Imobilização (%). (B) Atividade do derivado de imobilização (U_{BANE}/g). Imobilizações realizadas à pH 7 ou pH 10 com tempos que variaram entre 24 e 96 horas. Reticulação de alguns derivados com glutaraldeído 1%.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Observando-se os valores de rendimento de imobilização, que não ultrapassaram 50%, e comparando-se com os valores obtidos nas imobilizações em GLU-Qui, onde utilizou-se os mesmos pHs (7 e 10) e tempos de incubação o obteve-se aproximadamente 100% de

rendimento. Em todos os casos, observa-se uma drástica diminuição do percentual de enzimas que foram imobilizadas. Diferentemente da ativação de quitosana com glutaraldeído, que ocorre preferencialmente com os grupos amino da superfície do suporte (MENDES et al., 2011; RODRIGUES et al., 2008; SILVA et al., 2012), a divinilsulfona pode reagir tanto com grupos hidroxila, quanto com grupos amino que estão presentes na superfície da quitosana (SANTOS et al., 2015c). Assim, a ativação com DVS deveria proporcionar a inserção de mais grupos capazes de se ligarem com a enzima que a ativação com glutaraldeído e o rendimento de imobilização em DVS-Qui deveria ser, portanto, maior que em GLU-Qui. No entanto, a alta reatividade do reagente DVS pode provocar um crosslink com algumas de suas moléculas, que ocorre entre dois grupos amino da quitosana e uma molécula de DVS, impedindo a formação de um maior número de ligações covalentes entre a enzima e a quitosana (PINHEIRO, 2017).

A diminuição do percentual de enzimas que formaram ligações covalentes com o suporte resultou na diminuição dos valores de atividade catalítica dos derivados produzidos. Assim, para cada pH estudado, os maiores valores de atividade do derivado (10,96 U_{BANE}/g e 28,84 U_{BANE}/g) foram obtidos no tempo em que houve os maiores rendimentos de imobilização (49,5% e 43,5%), 72 h para ambos os pHs.

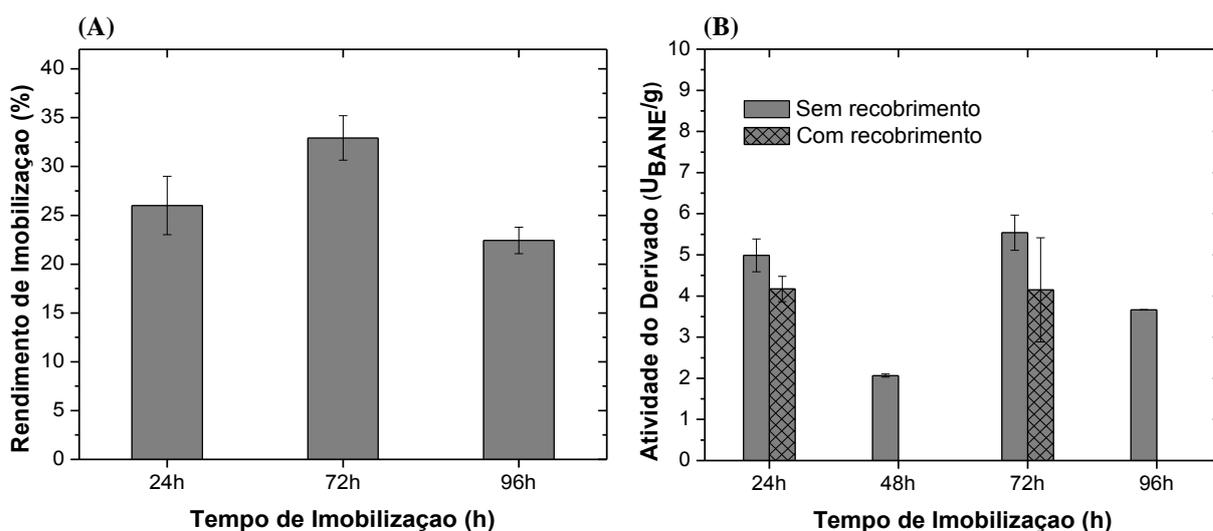
Observa-se também que a atividade da enzima imobilizada à pH 10 foi superior que à pH 7, chegando até aproximadamente 5 vezes maior na imobilização de 24 h (Figura 26). Isso deve-se ao fato de que as reações entre os grupos vinil-sulfona e alguns grupos das enzimas são favorecidas quando a incubação ocorre em pH alcalino. SANTOS *et al.* (2015b) estudaram a reatividade, à pH 7 e pH 10, de alguns dos grupos localizados frequentemente na superfície da enzima e constataram que a reatividade desses grupos era bem superior à pH 10. Novamente, o recobrimento com glutaraldeído diminuiu a atividade catalítica dos derivados, provavelmente pelo mesmo motivo já discutido anteriormente.

5.2.3 Imobilização em suporte Glioxil-Quitosana

A ativação da quitosana com glioxil insere, na superfície do suporte, aldeídos alifáticos de alta estabilidade que reagem, em pHs alcalinos, com os grupamentos aminos desprotonados dos resíduos de lisina da enzima (TARDIOLI, 2003). Para que haja o estabelecimento simultâneo de várias ligações covalentes entre a enzima e o suporte, é necessário que o pH de incubação seja em torno de 10 e, assim, após o processo de imobilização, a enzima terá uma maior fixação no suporte (SANTOS et al., 2015a). No caso

das imobilizações com suporte GLI-Qui, os ensaios foram, portanto, conduzidos somente à pH 10, variando-se o tempo de imobilização. Os resultados são apresentados na Figura 27.

Figura 27 - Parâmetros da imobilização de Alcalase® em quitosana ativada com glioxil. (A) Rendimento de Imobilização (%). (B) Atividade do derivado de imobilização (U_{BANE}/g). Imobilizações realizadas à pH 10 com tempos que variaram entre 24 e 96 horas. Reticulação de alguns derivados com glutaraldeído 1%.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Essas imobilizações apresentaram, em geral, os menores valores de rendimento de imobilização dentre todos os suportes estudados, sendo superiores somente aos valores obtidos na imobilização à pH 7 por 24h em DVS-Qui. Com relação à atividade catalítica, os derivados obtidos nessas imobilizações apresentaram valores em torno de 4 U_{BANE}/g , o que representa apenas 12% da maioria dos valores de atividade obtidos nas imobilizações à pH 7 e pH 10 utilizando suporte GLU-Qui. Os grupos aldeídos inseridos no suporte na ativação com glioxil são menos reativos que os grupos aldeídos inseridos na ativação com glutaraldeído (VIEIRA, 2009). O resultado disso é que a imobilização em suporte ativado com glutaraldeído proporciona um maior número de ligações entre enzima e suporte, resultando na grande diferença entre valores de rendimento de imobilização e atividade do derivado citada anteriormente.

Ao se comparar os três suportes estudados em termos de rendimento de imobilização, observa-se uma grande diferença de afinidade entre a enzima e cada suporte estudado. Os valores de rendimento de imobilização para os suportes ativados com glioxil

foram em torno de 4 vezes menores que aqueles para os suportes ativados com glutaraldeído, por exemplo. Já quando se compara a atividade dos derivados entre esses dois suportes, observa-se que os valores para o glioxil estão em torno de 7 a 9 vezes menores. Sabendo-se que a quantidade de enzimas que ficam imobilizadas em cada suporte é, portanto, diferente, esse resultado mostra que as enzimas que já estão imobilizadas em suporte glioxil são aproximadamente 50% menos ativas que as que estão imobilizadas em suporte ativado com glutaraldeído.

Se a comparação para rendimento de imobilização for feita entre o suporte ativado com divinilsulfona e o ativado com glutaraldeído, observa-se que os valores para imobilização em DVS-Qui são em torno de 2 a 4 vezes menores que os valores para GLU-Qui. Com relação a atividade do derivado, os valores obtidos à pH 7 em DVS-Qui são em torno de 3 a 7 vezes menores, mostrando que as enzimas já imobilizadas em suporte DVS-Qui a pH 7 são menos ativas que as imobilizadas em GLU-Qui. Já os valores de atividade do derivado obtidos à pH 10 são em torno de 1,3 a 1,5 vezes menores que os das imobilizações em suporte GLU-Qui, o que mostra que as enzimas já imobilizadas em DVS-Qui à pH 10 são mais ativas que as já imobilizadas em suporte ativado com glutaraldeído. Apesar desse fato, a atividade dos derivados obtidos com GLU-Qui em qualquer pH permanece maior que a atividade dos derivados obtidos com DVS-Qui a pH 10, pois o valor de atividade do derivado, dado em U_{BANE}/g_{gel} , não considera o percentual de enzimas que foram imobilizadas, que, nesse caso, é 2 a 4 vezes maior para o GLU-Qui.

A intensidade das interações enzima-suporte e a orientação da biomolécula sobre cada superfície depende tanto do suporte como do protocolo de imobilização. Com isso, a variação dos grupos inseridos na quitosana e das condições de imobilização faz com que cada um desses processos gerem sistemas enzima-suporte com diferentes especificidades e estabilidades (MATTE, 2015). Os valores apresentados acima revelaram um pouco das características de cada sistema enzima-suporte obtido nas imobilizações. Os resultados que serão mostrados na seção seguinte permitirão uma melhor análise da quantidade e intensidade das interações estabelecidas entre cada biomolécula e o suporte.

5.2.4 Estabilidade térmica de Alcalase® solúvel e imobilizada nos diferentes suportes

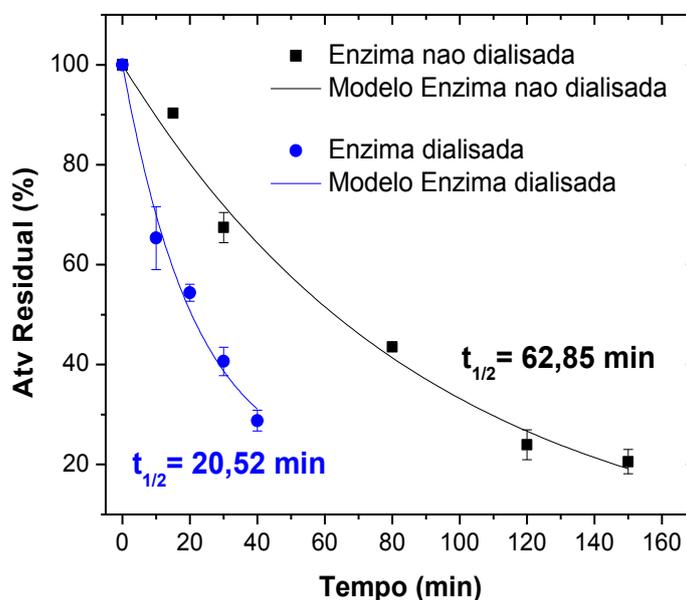
A enzima Alcalase em sua forma solúvel e imobilizada nos diferentes suportes foi submetida ao estudo de estabilidade à 60 °C (pH 8). A atividade inicial foi considerada igual a

100%. Utilizou-se o modelo de desativação térmica proposto por Sadana e Henley para o ajuste aos dados experimentais e cálculo de tempo de meia-vida.

5.2.4.1 Estabilidade térmica da enzima livre

Para as imobilizações realizadas em Quitosana ativada, foi utilizado um extrato de Alcalase® de um outro lote comercializado. Assim, foi necessário a realização de um novo ensaio de estabilidade térmica da enzima solúvel e os dados experimentais, bem como o modelo ajustado a esses dados, são apresentados na Figura 28. A inativação térmica da enzima dialisada também foi realizada já que a influência de agentes estabilizantes presentes no extrato comercial pode prejudicar a interpretação dos resultados e análise da verdadeira estabilização da enzima causada por sua imobilização em suporte insolúvel (BRÍGIDA, 2010; TARDIOLI, 2003). A diálise foi realizada conforme a metodologia descrita na seção 4.2.13.

Figura 28 - Inativação térmica (60 °C, pH 8) da enzima solúvel dialisada e não dialisada. A atividade inicial da enzima foi considerada igual a 100%.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Como se observa, devido à presença de estabilizantes na composição dessa solução, a enzima não dialisada é aproximadamente 3 vezes mais estável que a enzima que sofreu diálise. Para fins de comparação com a enzima imobilizada (livre da ação de agentes

estabilizantes), tomou-se, portanto, o valor de $t_{1/2}$ da enzima dialisada para o cálculo do fator de estabilização (FE) e, assim, essa comparação ocorrerá entre enzima solúvel livre de estabilizantes e enzima imobilizada.

5.2.4.2 Estabilidade térmica da Alcalase® imobilizada nos diferentes suportes

Derivados das imobilizações de Alcalase® nos três suportes diferentes (GLU-QUI, DVD-QUI e GLI-QUI) à pH 7 ou 10, com diferentes tempos de incubação, sendo alguns desses derivados reticulados com Glutaraldeído 1% após a imobilização, foram submetidos a ensaios de inativação térmica à 60 °C e pH 8. Os resultados dos parâmetros da equação de Sadana e Henley, bem como o tempo de meia-vida para cada ensaio de inativação, e o fator de estabilidade (FE) de cada derivado são mostrados na Tabela 1. Os gráficos contidos nas Figuras 30 a 34 do anexo A mostram o decaimento de atividade de cada um dos derivados citados na Tabela 1.

O modelo de Sadana e Henley ajustou-se bem aos dados experimentais e a maior parte dos valores de R^2 foram superiores a 0,98. Em todos os ensaios de imobilização onde o derivado foi posteriormente reticulado com Glutaraldeído, observou-se não somente uma diminuição na atividade (como mostrado nas seções 5.2.1 a 5.2.3) como, também, redução da estabilidade térmica desses biocatalisadores. A alta reatividade do agente reticulante Glutaraldeído pode ter provocado uma distorção na estrutura da proteína, diminuindo tanto a atividade do derivado como sua estabilidade (VIEIRA, 2009).

Tabela 1 - Resultados de tempo de meia-vida ($t_{1/2}$), fator de estabilização (FE) e parâmetros do modelo de Sadana e Henley (k e c) utilizado para ajuste aos dados de inativação térmica à 60 °C e pH 8 dos derivados das imobilizações em quitosana ativada por três agentes diferentes.

Entrada	Ativação Agente ativante	Condições de imobilização			Estabilidade térmica				
		pH	Tempo	Pós- imobilização	k	c	$t_{1/2}$ (min)	FE	
1	Glutaraldeído	pH 7	15h	-	0,0214	0,2288	48,86	2,4	
2				Reticulado	0,0315	0,1472	28,02	1,4	
3			24h	-	0,0198	0,3405	71,62	3,5	
4				Reticulado	0,0241	0,2277	43,22	2,1	
5			48h	-	0,0152	0,3122	85,62	4,2	
6				-	0,0135	0,2852	89,38	4,4	
7			72h	Reticulado	0,0248	0,2626	45,66	2,2	
8			96h	-	0,0184	0,2563	60,56	3,0	
9				-	0,0382	0,1368	22,66	1,1	
10			pH 10	15h	Reticulado	0,0621	0,1478	14,23	0,7
11					-	0,0308	0,3731	51,83	2,5
12				24h	Reticulado	0,0411	0,3236	32,69	1,6
13					-	0,0243	0,2517	45,38	2,2
14				72h	Reticulado	0,0402	0,1916	23,97	1,2
15			96h	-	0,0264	0,2367	40,39	2,0	
16	Divinilsulfona	pH 7	24h	-	0,0136	0,1084	60,49	3,0	
17				Reticulado	0,0425	0,2210	24,15	1,2	
18			48h	-	0,0316	0,1464	27,9	1,4	
19				72h	-	0,0329	0,1501	26,99	1,3
20			Reticulado	0,0373	0,2124	27,02	1,3		
21		96h	-	0,0252	0,0764	30,96	1,5		
22			-	0,0237	0,1044	34,45	1,7		
23		pH 10	24h	-	0,0130	0,1413	67,2	3,3	
24				Reticulado	0,1150	0,2537	9,64	0,5	
25			48h	-	0,0166	0,1520	53,59	2,6	
26	72h			-	0,0680	0,2138	14,87	0,7	
27	Reticulado		0,1215	0,2033	8,13	0,4			
28	Glioxil	pH 10	24h	-	0,014	0,1769	66,79	3,3	
29				Reticulado	0,0416	0,1296	20,54	1,0	
30			48h	-	0,0173	0,0555	43,59	2,1	
31				72h	-	0,0288	0,1671	31,86	1,6
32			Reticulado	0,0401	0,2067	24,83	1,2		
33			96h	-	0,0232	0,1536	38,59	1,9	

Fonte: Elaborado pelo autor.

Para os derivados GLU-Qui obtidos à pH 7 sem recobrimento com glutaraldeído, observa-se que o tempo de meia vida cresce à medida que o tempo de imobilização aumenta de 15h até 72h e, a partir daí, tem-se uma queda com o tempo de 96h. Um maior tempo de incubação proporciona ao sistema enzima-suporte a formação de um maior número de

ligações covalentes e a biomolécula fica, então, ligada ao suporte multipontualmente (SANTOS et al., 2015c). Com 48h de contato, têm-se formado a quantidade de ligações covalentes ideais para esse sistema, já que de 48h a 72h não houve um aumento significativo da estabilização da enzima e os $t_{1/2}$ foram bem próximos: 85,6 min e 89,4, respectivamente. Com o aumento do tempo de incubação para 96h, pode ter havido formação de mais ligações entre a enzima e o suporte que acabaram distorcendo seu sítio ativo ou até mesmo enrijecendo a enzima ao ponto de prejudicar sua estabilidade térmica e o FE passou de 4,4 para 3,0 (ADRIANO, 2008; SANTOS, 2015; TARDIOLI et al., 2003). O derivado da imobilização com 48h de incubação, sem recobrimento com glutaraldeído, o qual manteve aproximadamente 60% da sua atividade com 1 hora de inativação térmica, foi escolhido para o posterior ensaio de estabilidade operacional.

Os derivados da imobilização em GLU-QUI à pH 10 também foram submetidos a ensaios de inativação térmica e os resultados estão apresentados na Tabela 1. O derivado com maior $t_{1/2}$ foi obtido na imobilização com 24 h de contato, sem recobrimento com glutaraldeído. Como aconteceu com os derivados da imobilização em GLU-QUI à pH 7, o $t_{1/2}$ dos derivados aumenta com o tempo de incubação até um certo ponto, onde há a formação de ligações multipontuais suficientes para a máxima estabilização da enzima. Após esse ponto, o aumento do tempo de imobilização diminuiu o $t_{1/2}$ do derivado obtido. Comparando-se com o resultado das imobilizações em GLU-QUI à pH 7, observa-se que houve uma diminuição de mais de 40% da máxima estabilidade obtida pela imobilização à pH 7 ($t_{1/2} = 89,38$) para a máxima estabilidade obtida pela imobilização à pH 10 ($t_{1/2} = 51,83$). A diferença de estabilidade obtida em cada pH deve estar relacionada ao fato de que o pH do meio influencia na reatividade de diferentes regiões da molécula enzimática, as quais possuem variadas relevâncias para a estabilidade da enzima (SANTOS et al., 2015a). Dentre os derivados obtidos na imobilização à pH 10, o derivado de 24 horas, sem recobrimento com glutaraldeído, que apresentou o maior $t_{1/2}$ (51,83 min), foi escolhido para o posterior ensaio de estabilidade operacional.

Para as imobilizações em DVS-QUI à pH 7, o derivado mais estável (24 horas, sem recobrimento com glutaraldeído) apresentou um $t_{1/2}$ de 60,49 min sendo 3 vezes mais estável que a enzima livre. Para essa imobilização, o tempo de 24 horas foi suficiente para proporcionar a formação de ligações covalentes suficientes para estabilizar a enzima. Como aconteceu com o suporte GLU-QUI (imobilização à pH 10), o aumento do tempo de imobilização de 24h para 48h não trouxe resultados positivos e prejudicou a estabilidade da

enzima imobilizada fazendo com que seu $t_{1/2}$ reduzisse pela metade (derivado sem recobrimento com glutaraldeído), aproximadamente. Considerando-se os valores de $t_{1/2}$ correspondentes às entradas 18, 19 e 21 da tabela, observa-se, ainda, que o prolongamento do tempo de contato de 48 h para 72 h e 96 h não alterou significativamente o tempo de meia-vida dos derivados, mantendo o valor de $t_{1/2}$ desses 3 biocatalisadores em torno de 29 min, mostrando que nesse intervalo a formação de novas ligações covalentes não altera a estabilidade da enzima já imobilizada.

Com os derivados de DVS-Qui obtidos à pH 10 observa-se que a máxima estabilização foi alcançada, também, em 24 horas de imobilização. Com 15 horas, a quantidade de ligações formadas não foram suficientes para trazer uma estabilização satisfatória à enzima. Já com o aumento do tempo de imobilização para além das 24 horas, observou-se um decréscimo contínuo do tempo de meia-vida dos derivados. Ao imobilizar, à pH 10, uma lipase em quitosana ativada com divinilsulfona, PINHEIRO (2017) também relatou que, a partir de um certo ponto, o aumento do tempo de imobilização não apresentou efeitos positivos sobre a estabilidade do seu derivado.

A reatividade do grupo vinilsulfona com cada um dos resíduos da enzima é diferente em cada pH. Esse fato representa uma vantagem pois possibilita o controle da orientação da enzima imobilizada ao se manipular o pH do meio, favorecendo a reatividade de um grupo específico e envolvendo os aminoácidos desejados na imobilização da enzima. Além do mais, existem áreas na molécula de enzima que possuem uma maior importância na estabilidade da enzima ou possuem uma maior concentração de certos grupos pertencentes a alguns resíduos de aminoácidos. Assim, a manipulação da reatividade de DVS com esses grupos da enzima através do pH do meio influencia, também, na quantidade de ligações que podem ser formadas entre uma molécula de enzima e o suporte e, portanto, na estabilização da biomolécula (SANTOS et al., 2015c). Essa relação entre pH do meio e reatividade do grupos vinilsulfona explica a diferença dos derivados obtidos nas imobilizações em DVS-Qui à pH 7 e pH 10, tanto em termos de atividade do derivado (Figura 26) como de estabilidade térmica dos mesmos (Tabela 1). Os derivados obtidos com 24 horas de imobilização, tanto à pH 7 como à pH 10, sem reticulação com glutaraldeído, foram escolhidos para o posterior ensaio de estabilidade operacional.

Os derivados da imobilização em GLI-Qui (à pH 10) também foram submetidos a ensaio de inativação térmica nas mesmas condições dos outros derivados. Novamente o tempo de 24 horas foi suficiente para formar a quantidade de ligações que proporcionassem a máxima estabilização da enzima nesse suporte e o mesmo efeito de diminuição do $t_{1/2}$ com o

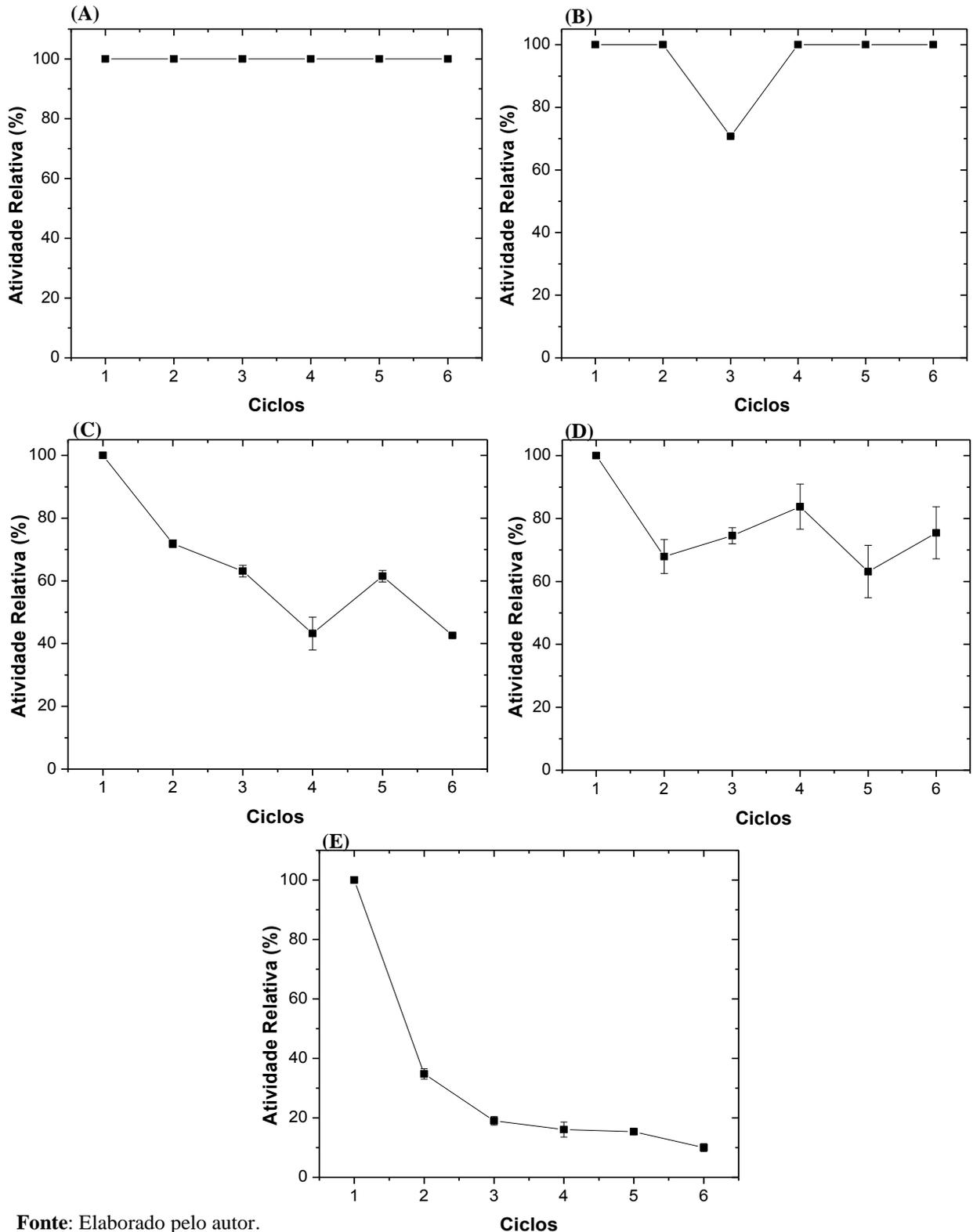
prolongamento do tempo foi observado. A ativação com grupos glioxil é relatada como muito apropriada na geração de suportes capazes de imobilizar e estabilizar enzimas com a formação de intensas ligações multipontuais (CORÍCI et al., 2011; SANTOS et al., 2015b). Esse derivado de GLI-Qui com tempo de imobilização de 24 horas foi escolhido para o posterior ensaio de estabilidade operacional.

5.2.5 Estabilidade operacional dos biocatalisadores na reação modelo

A realização da reação modelo selecionada como aplicação para os derivados da imobilização em Immobead — hidrólise da gelatina de peixe — tornou-se inviável para os derivados de Quitosana. A hidrólise da Azocaseína foi, então, escolhida como nova reação modelo.

Para uma melhor caracterização dos derivados produzidos por cada imobilização, realizou-se a estabilidade operacional dos biocatalisadores obtidos. Cada derivado foi utilizado como catalisador na reação de hidrólise da Azocaseína, conforme a metodologia descrita na seção 4.2.16, baseada em CHARNEY e TOMARELLI (1947). Ao todo 6 ciclos consecutivos foram realizados. Ao final de cada ciclo o derivado era lavado com excesso de água para retirar todo resquício de meio reacional, seco e pesado antes do ciclo posterior. Os resultados são apresentados na Figura 29.

Figura 29 - Estabilidade operacional dos derivados com maior estabilidade térmica. 6 ciclos catalíticos consecutivos da reação de hidrólise da Azocaseína (32 °C, 120 rpm, 40 min). (A) Derivado de GLU-Qui (pH 7, 48h). (B) Derivado de GLU-Qui (pH 10, 24h). (C) Derivado de DVS-Qui (pH 7, 24h) (D) Derivado de DVS-Qui (pH 10, 24h). (E) Derivado de GLI-Qui (pH 10, 24h). A atividade da enzima no primeiro ciclo foi considerada igual a 100 %.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Os derivados das imobilizações em Quitosana ativada com Glutaraldeído, tanto à pH 7 como a pH 10, mantiveram 100% de sua atividade ao final dos ciclos reacionais realizados, mostrando a alta estabilidade operacional desses biocatalisadores na reação de hidrólise da Azocaseína

As imobilizações em DVS-Qui, tanto à pH 7 como à pH 10, produziram derivados que reteram menos atividade catalítica ao longo dos ciclos que os derivados de GLU-Qui. Enquanto que o derivado obtido à pH 7 perdeu mais de 50% da sua atividade ao final dos 6 ciclos, o derivado da imobilização à pH 10 perdeu de 20 a 30 % da sua atividade inicial em 6 ciclos. A imobilização em DVS-Qui com pH mais básico produziu, portanto, derivados não só com maior atividade catalítica (Figura 26, seção 5.2.2), como também com melhor estabilidade térmica (entradas 16 a 21 e 22 a 27 da Tabela 1) e operacional (Figura 34 C e D, anexo A). Resultados semelhantes de estabilização de enzima em diferentes pHs de imobilização foram encontrados pelos autores SANTOS *et al.* (2015e) ao estudarem diversos protocolos utilizando pH ácido, neutro e básico para imobilização de uma protease em suporte ativado com divinilsulfona e analisaram, também, a influência da incubação pós-imobilização da enzima à pH 10 para aumentar a interação entre enzima e suporte. Os protocolos que utilizavam pH 10 para imobilização da enzima, ou para incubação após a imobilização, produziram derivados que apresentaram os melhores resultados na maioria dos ensaios de estabilidade conduzidos pelos autores, mostrando que o pH influencia tanto na orientação das moléculas ao se imobilizarem, como na quantidade de ligações formadas entre a enzima e o suporte.

O derivado da imobilização em GLI-Qui perdeu mais de 60% de sua atividade já no segundo ciclo de hidrólise, e aproximadamente 90% ao longo de 6 ciclos. A literatura relata que suportes ativados com grupos glioxil podem proporcionar menor estabilização da enzima por formação de ligações multipontuais que suportes ativados com divinilsulfona, por exemplo, já que o primeiro possui um menor braço espaçador, o que dificulta a formação de multiligação com uma mesma molécula de enzima (SANTOS *et al.*, 2015a). Assim, dentre todos os derivados estudados das imobilizações em quitosana, esse último apresentou a pior estabilidade operacional, além dos menores valores de rendimento de imobilização e atividade do derivado mostrados na seção 5.2.3.

6 CONCLUSÕES

A partir dos resultados da imobilização de Alcalase® em Immobead 350 conclui-se que esse suporte não é apropriado para a estabilização da enzima através de imobilização, pois todos os resultados de inativação térmica mostraram que a enzima imobilizada era menos estável que a enzima solúvel dialisada. Esse derivado foi aplicado como catalisador na reação modelo inicialmente selecionada, a hidrólise da gelatina de peixe para formação de peptídeos com bioatividade funcional e, no terceiro ciclo consecutivo de reação reutilizando a enzima, a biomolécula já se mostrou ineficiente para a aplicação desejada, revelando a instabilidade operacional desse biocatalisador nessa reação modelo selecionada. Ensaios de eletroforese revelaram que a imobilização de Alcalase® em Immobead 350 não estava sendo feita por meio de ligações covalentes.

A imobilizações de Alcalase® em Quitosana ativada com diferentes agentes, mostraram que a ativação com Glutaraldeído 5% gerou um suporte com maior capacidade de imobilizar (rendimentos de imobilização em torno de 100% para todos os casos, e máxima atividade de derivado igual a 47,52 U_{BANE}/g) e estabilizar a Alcalase®, sendo o derivado da imobilização à pH 7, por 72 horas, 4,4 vezes mais estável termicamente que a enzima solúvel dialisada. Devido à inviabilidade de realizar a reação modelo inicialmente selecionada — a hidrólise da gelatina de peixe — uma nova reação modelo foi escolhida para aplicação dos derivados de imobilização em Quitosana, a hidrólise da Azocaseína. Os derivados da imobilização em Glutaraldeído-Quitosana apresentaram, também, a maior estabilidade operacional em ciclos consecutivos da reação de hidrólise da Azocaseína, e mantiveram 100% de sua atividade inicial após os 6 ciclos. Constatou-se, também, que, dentre os pHs de imobilização estudados para os suportes Glutaraldeído-Quitosana e DVS-Quitosana, o que proporciona a formação de derivados mais ativos e estáveis para a imobilização de Alcalase® em Glutaraldeído-Quitosana é o pH 7, já para o suporte DVS-Quitosana é o pH 10.

Dentre as imobilizações realizadas em Quitosana modificada por diferentes agentes ativantes, a que ocorreu em Quitosana ativada com Glutaraldeído proporcionou os resultados mais satisfatórios de atividade do derivado, estabilidade térmica e estabilidade operacional na hidrólise de Azocaseína sendo esse suporte, portanto, o mais adequado para insolubilização e estabilização da enzima Alcalase®.

REFERÊNCIAS

- ABREU, L. DE; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; RODRIGUES, R. C.; VOLPATO, G.; AYUB, M. A. Z. Efficient purification-immobilization of an organic solvent-tolerant lipase from *Staphylococcus warneri* EX17 on porous styrene-divinylbenzene beads. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 99, p. 51–55, 2014.
- ADRIANO, W. S.; VEREDAS, V.; SANTANA, C. C.; GONÇALVES, L. R. B. Adsorption of amoxicillin on chitosan beads : Kinetics , equilibrium and validation of finite bath models. **Biochemical Engineering Journal**, v. 27, p. 132–137, 2005.
- ADRIANO, W. S. **Preparação e caracterização de derivados de enzimas industriais em quitosana**. 185 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química), Centro de Ciências Exatas e Tecnologia. Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2008.
- ALAGÖZ, D.; AYHAN, C.; YILDIRIM, D.; TÜKEL, S. S.; BINAY, B. Covalent immobilization of *Candida methylica* formate dehydrogenase on short spacer arm aldehyde group containing supports. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 130, p. 40–47, 2016.
- ALBUQUERQUE, T. L. DE; RUEDA, N.; JOSE, C. S.; BARBOSA, O.; ORTIZ, C.; BINAY, B.; ÖZDEMİR, E.; GONÇALVES, L. R. B.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Easy stabilization of interfacially activated lipases using heterofunctional divinyl sulfone activated-octyl agarose beads . Modulation of the immobilized enzymes by altering their nanoenvironment. **Process Biochemistry**, v. 51, p. 865–874, 2016.
- ALMEIDA, E. V. R.; FROLLINI, E.; GRELIER, S.; COMA, V. Biofilmes preparados a partir de quitosana e e celulose de sisal. **9º Congresso Brasileiro de Polímeros**, Campina Grande, Paraíba - Brasil, 2007.
- ANWAR, A.; SALEEMUDDIN, M. Alkaline Proteases : a Review. **Bioresource Technology**, v. 64, p. 175–183, 1998.
- ARANTES, G. M. Uma perspectiva computacional sobre catálise enzimática. **Química Nova**, v. 31, n. 2, p. 377–383, 2008.
- BALLERINI, G.; ORTEGA, M.; GIORDANENGO, V. Effects of Enzymatic Hydrolysis on the Foaming Properties of Whey Proteins. **International Research Journal of Agricultural and Food Sciences**, v. 1, n. 4, p. 64–78, 2016.
- BERNSTEIN, A.; ROSSINI, K.; BRANDELLI, A. Produção e caracterização de um hidrolisado de caseína com propriedades antioxidantes e avaliação de seus efeitos em produtos cárneos. **Salão de Iniciação Científica UFRGS**, Porto Alegre, Rio Grande do Sul - Brasil, 2007.
- BEZERRA, C. S.; LEMOS, C. M. G. DE F.; DE SOUSA, M.; GONÇALVES, L. R. B.; Enzyme immobilization onto renewable polymeric matrixes: Past, present, and future trends. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 132, n. 26, p. 1–15, 2015.
- BLANCO, R. M.; GUISÁN, J. M. Stabilization of enzymes by multipoint covalent attachment to agarose-aldehyde gels . Borohydride reduction of trypsin-agarose derivatives.

Enzyme and Microbial Technology, v. 11, p. 360–366, 1989.

BRÍGIDA, A. I. S. **Imobilização de lipases utilizando fibra da casca de coco verde como suporte para aplicações industriais**. 220f. Tese (Doutorado em Tecnologia de Processo Químicos e Bioquímicos), Escola de Química. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2010.

BRÍGIDA, A. I. S.; MELLINGER-SILVA, C.; ANTONIASSI, R.; FARIA, L.R.F.; GOMES, F.S.; FONSECA, T.F. Influência do tamanho molecular das frações peptídicas na capacidade antioxidante de hidrolisado de gelatina de tilápia. **XXI Congresso Brasileiro de Engenharia Química**, Fortaleza, Ceará - Brasil, 2016.

CENTENARO, G. S.; MELLADO, M. S. Influência das concentrações de enzima e de substrato no grau de hidrólise e no conteúdo protéico de hidrolisados enzimáticos de corvina (*Micropogonias furnieri*). **B CPPA**, v. 26, n. 1, p. 61-70, 2008.

CHARNEY, J.; TOMARELLI, R.M. A colorimetric method for the determination of the proteolytic activity of duodenal juice. **Journal of Biological Chemistry**, v. 171, 501- 505, 1947.

CHEN, S. T.; CHEN, S. Y.; WANG, K.-T. Kinetically controlled peptide bond formation in anhydrous alcohol catalyzed by the industrial protease alcalase. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 57, n. 25, p. 6960–6965, 1992.

COELHO, M. A. Z.; LEITE, S.; ROSA, M. D. F. Aproveitamento De Resíduos Agroindustriais: Produção De Enzimas a Partir Da Casca De Coco Verde. **Research Gate**, v. 19, n. 1, p. 33–42, 2001.

CORÍCI, L. N.; FRISSEN, A. E.; VAN ZOELLEN, D. J.; EGGEN, I. F.; PETER, F.; DAVIDESCU, C. M.; BOERIU, C. G.; Sol-gel immobilization of Alcalase from *Bacillus licheniformis* for application in the synthesis of C-terminal peptide amides. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 73, n. 1–4, p. 90–97, 2011.

CRUZ, C. Z. P. Imobilização de Alcalase em pó de sabugo de milho: hidrólise das proteínas do soro de queijo bovino e obtenção de peptídeos bioativos. Tese (Doutorado em Biotecnologia), Instituto de Química. Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Araraquara, São Paulo, 2017.

CRUZ, C. Z. P.; DOS SANTOS VAZ, A. B.; TANIGUCHI, E. T.; BASSAN, J. C.; BASSAN, N.; GARRIDO, S. S.; MONTI, R. Hidrólise das proteínas do soro de queijo utilizando alcalase imobilizada em pó de sabugo de milho. **XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática**, Caxias do Sul, Rio Grande do Sul - Brasil, 2016.

DAS, G.; PRASAD, M. P. Isolation, purification and mass production of protease enzyme from *Bacillus subtilis*. **International Research Journals of microbiology**, v. 1, n. 12, p. 026–031, 2010.

DHAKE, K. P.; BHATTE, K. D.; WAGH, Y. S.; SINGHAL, R. S.; BHANAGE, B. M. Immobilization of Steapsin Lipase on Macroporous Immobead-350 for Biodiesel Production in Solvent Free System. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 17, p. 959–965, 2012.

DICOSIMO, R.; MCAULIFFE, J.; POULOSE, A. J.; BOHLMANN, G. Industrial use of immobilized enzymes. **Chemical Society Reviews**, v. 42, n. 15, p. 6437–6474, 2013.

ESPOSITO, M.; DI PIERRO, P.; DEJONGHE, W.; MARINIELLO, L.; PORTA, R. Enzymatic milk clotting activity in artichoke (*Cynara scolymus*) leaves and alpine thistle (*Carduus defloratus*) flowers. Immobilization of alpine thistle aspartic protease. **Food chemistry**, v. 204, p. 115-121, 2016.

FARIA, F.; MESQUITA, M.; BRÍGIDA, A. I. S. Imobilização de alcalase em DEAE Sepharose e aplicação na hidrólise de gelatina. **XXV Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Gramado, Rio Grande do Sul - Brasil, 2016.

FARIA, L. R. F.; FONSECA, T. F.; BRÍGIDA, A. I. S.; SILVA, C. M.; SANTOS, A. A.; AZEVEDO, T. DE L. Efeito das condições de reação na obtenção de hidrolisado de gelatina de tilápia com atividade antioxidante. **XX Simpósio Nacional de Bioprocessos**. Fortaleza, Ceará - Brasil, 2015.

FERREIRA, L.; RAMOS, M. A.; DORDICK, J. S.; GIL, M. H. Influence of different silica derivatives in the immobilization and stabilization of a *Bacillus licheniformis* protease (Subtilisin Carlsberg). **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 21, n. 4-6, p. 189-199, 2003.

GAMBÔA, A. G. **Utilização do inibidor de papaína extraído de sementes de *Adenantha pavonina* L. na purificação de proteases cisteínicas**. 61f. Dissertação (Mestrado em Biologia), Instituto de Ciências Biológicas. Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2010.

GARCIA-GALAN, C.; JOSÉ, C. S.; BARBOSA, O.; TORRES, R.; PEREIRA, E. B.; CORTES, V.; GONÇALVES, L. R. B.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Tuning of Lecitase features via solid-phase chemical modification: Effect of the immobilization protocol. **Process Biochemistry**, v. 49, p. 604–616, 2014.

GIANOTTI, A. **Produção recombinante e estudos funcionais de três novas cistatinas da cana-de-açúcar e sua utilização em estudos de inibição da adesão, proliferação, migração e invasão celular**. 138f. tese (Doutorado em Genética e Evolução), Centro de Ciências Biológicas e da Saúde. Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2008.

GIONGO, J. L. **Caracterização e aplicação de proteases produzidas por linhagens de *Bacillus sp.* . Caracterização e aplicação de proteases produzidas por linhagens de *Bacillus sp.*** 95f. Dissertação (Mestrado Microbiologia Agrícola e do Ambiente), Faculdade de Agronomia. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006.

GUÉRARD, F.; DUFOSSÉ, L.; DE LA BROISE, D.; BINET, A. Enzymatic hydrolysis of proteins from yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) wastes using Alcalase. **Journal of Molecular Catalysis - B Enzymatic**, v. 11, n. 4–6, p. 1051–1059, 2001.

GUISÁN, J. M. Aldehyde-agarose gels as activated supports for immobilization-stabilization of enzymes. **Enzyme Microbiology Technology**, v. 10, p. 375–382, 1988.

HASAN, F.; SHAH, A. A.; HAMEED, A. Industrial applications of microbial lipases. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, n. 2, p. 235–251, 2006.

HYUN, C. K.; SHIN, H. K. Utilization of bovine blood plasma proteins for the production of angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides. **Process Biochemistry**, v. 36, n. 1-2, p. 65-71, 2000.

IUPAC. Classification and chemical characteristics of immobilized enzymes (Technical Report). **Pure and Applied Chemistry**, v. 67, n. 4, p. 597–600, 1995.

KAHAR, U. M.; SANI, M. H.; CHAN, K.; GOH, K. M. Immobilization of α -Amylase from *Anoxybacillus* sp. SK3-4 on ReliZyme and Immobead Supports. **Molecules**, v. 13, p. 1–17, 2016.

KIRK, O.; BORCHERT, T. V.; FUGLSANG, C. C. Industrial enzyme applications. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 13, n. 4, p. 345–351, 2002.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680–685, 1970.

LICEAGA-GESUALDO, A. M.; LI-CHAN, E. C. Y. Functional properties of fish protein hydrolysate from herring (*Clupea harengus*). **Journal of Food Science**, v. 64, n. 6, p. 1000–1004, 1999.

LIESE, A.; HILTERHAUS, L. Evaluation of immobilized enzymes for industrial applications. **Chemical Society reviews**, v. 42, n. 15, p. 6236–49, 2013.

LIMA, L. N.; OLIVEIRA, G. C.; ROJAS, M. J.; CASTRO, H. F.; RÓS, P. C. M. DA; MENDES, A. A.; GIORDANO, R. L. C.; TARDIOLI, P. W. Immobilization of *Pseudomonas fluorescens* lipase on hydrophobic supports and application in biodiesel synthesis by transesterification of vegetable oils in solvent free systems. **Journal of industrial microbiology & biotechnology**, v. 42, n. 4, p. 523–535, 2015.

LITTLECHILD, J. A. Enzymes from Extreme Environments and Their Industrial Applications. **Frontiers in bioengineering and biotechnology**, v. 3, n. 161, 2015.

MABROUK, S. S.; HASHEM, A. M.; EL-SHAYEB, N. M. A.; ISMAIL, A. M. S.; ABDEL-FATTAH, A. F. Optimization of alkaline protease productivity by *Bacillus licheniformis* ATCC 21415. **Bioresource Technology**, v. 69, n. 2, p. 155–159, 1999.

MARTINS, V. G.; COSTA, J. A. V.; PRENTICE-HERNÁNDEZ, C. Hidrolizado protéico de pescado obtido por vias química e enzimática a partir de corvina (*Micropogonias furnieri*). **Quimica Nova**, v. 32, n. 1, p. 61–66, 2009.

MATEO, C.; FERNÁNDEZ-LORENTE, G.; ABIAN, O.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R.; GUISÁN, J. M. Multifunctional epoxy supports: a new tool to improve the covalent immobilization of proteins. The promotion of physical adsorptions of proteins on the supports before their covalent linkage. **Biomacromolecules**, v. 1, n. 4, p. 739–745, 2000.

MATEO, C.; PALOMO, J. M.; FERNANDEZ-LORENTE, G.; GUISAN, J. M.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, n. 6, p. 1451–1463, 2007.

MATEO, C.; GRAZ, V.; FERN, R. Advances in the design of new epoxy supports for enzyme immobilization – stabilization. **7th International Conference on Protein**

Stabilization 2007, p. 1593–1601. Exter, Reino Unido, 2007.

MATOS, L. J. B. L. DE. **Imobilização da lipase tipo b de *Candida antarctica* em sílica macroporosa e polimetilmetacrilato visando a síntese do oleato de etila**. 162f. Tese (Doutorado em Engenharia Química), Departamento de Engenharia Química. Universidade Federal do Ceará, 2014.

MATTE, C. R.; BUSSAMARA, R.; DUPONT, J.; RODRIGUES, R. C.; HERTZ, P. F.; AYUB, M. A. Z. Immobilization of *Thermomyces lanuginosus* lipase by different techniques on Immobead 150 support: Characterization and applications. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 172, n. 5, p. 2507–2520, 2014.

MATTE, C. R. **Estudos de imobilização de lipase de *Thermomyces lanuginosus* em Immobead 150, caracterização dos derivados e suas aplicações em reatores contínuos e em batelada para a síntese de butirato de butila e biodiesel**. 163f. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Molecular), Centro de Biotecnologia. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2015.

MELLINGER-SILVA, C.; ROSA, L. O. L.; STEPHAN, M. P.; BRIGIDA, A. I. S.; CABRAL, L. M. C.; SILVA, G.O.; GUARIDO, K. L.; GOMES, D. M.; SILVA-SANTOS, J. E. Dual function peptides from pepsin hydrolysates of whey protein isolate. **International Dairy Journal**, v. 48, p. 73-79, 2015.

MENDES, A. A.; OLIVEIRA, P. C. DE.; CASTRO, H. F. DE.; GIORDANO, R. DE L. C.; Aplicação de quitosana como suporte para a imobilização de enzimas de interesse industrial. **Química Nova**, v. 34, n. 5, p. 831–840, 2011.

MESSING, R. A. Immobilized enzymes for industrial reactors. **Corning, NY: Academic Press**, 1975.

MIGUEL, A. S. M.; MARTINS-MEYER, T. S.; FIGUEIREDO, E. V. DA C.; LOBO, B. W. P.; DELLAMORA-ORTIZ, G. M. Enzymes in Bakery: Current and Future Trends. **Food Industry**, p. 287–231, 2013.

NEIDHART, D. J.; PETSKO, G. A. The refined crystal structure of subtilisin Carlsberg at 2 . 5 Å resolution. **Protein Engineering**, v. 2, n. 4, p. 271–276, 1988.

NEVES, K. C. S.; PORTO, A. L. F.; TEIXEIRA, M. F. S. Seleção de leveduras da Região Amazônica para produção de protease extracelular. **Acta Amazonica**, v. 36, n. 3, p. 299–306, 2006.

NORDISK S/A. **Novo Nordisk History**. (Disponível em: <http://www.novonordisk.com/images/about_us/history/HistoryBook_UK.pdf>).[S.I], 2011.

PINHEIRO, B. B. **Quitosana ativada com divinilssulfona como um novo suporte para imobilizar e estabilizar enzimas**. 54f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química), Departamento de Engenharia Química. Universidade Federal Do Ceará, Fortaleza, 2017.

POPPE, J. K.; COSTA, A. P. O.; BRASIL, M. C.; RODRIGUES, R. C.; AYUB, M. A. Z.; Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic Multipoint covalent immobilization of lipases on aldehyde-activated support: Characterization and application in transesterification reaction. **Journal of Molecular Catalysis. B, Enzymatic**, v. 94, p. 57–62, 2013.

PRIKRYL, P.; LENFELD, J.; HORAK, D.; TICHA, M.; KUCEROVA, Z. Magnetic bead cellulose as a suitable support for immobilization of α -chymotrypsin. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 168, n. 2, p. 295-305, 2012.

RIOS, N. S.; PINHEIRO, M. P.; DOS SANTOS, J. C. S.; FONSECA, T. DE S.; LIMA, L. D.; DE MATTOS, M. C.; FREIRE, D. M. G.; SILVA JR, I. J.; RODRÍGUEZ-AGUADO, E.; GONÇALVES, L. R. B. Enzymatic Strategies of covalent immobilization of a recombinant *Candida antarctica* lipase B on pore-expanded SBA-15 and its application in the kinetic resolution of (R , S) -Phenylethyl acetate. **Journal of Molecular Catalysis B** :, v. 133, p. 246–258, 2016.

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**, v. 51, n. 3–4, p. 100–109, 2008.

RODRÍGUEZ-ALONSO, M. J.; RODRÍGUEZ-VICO, F.; HERAS-VÁZQUEZ, F. J. L.; CLEMENTE-JIMÉNEZ, J. M. Immobilization of a multi-enzyme system for L-amino acids production. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 91, n. 7, p. 1972–1981, 2015.

ROSSINI, K. **Avaliação de hidrolisados de caseína como antioxidantes em produtos cárneos e chocolate branco**. 76f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Instituto de Ciências e Tecnologia de Alimentos. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008.

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

SANTOS, J. C. S. D. **Otimização de biocatalisadores: desenvolvimento de estratégias para modulação de propriedades de enzimas por técnicas físicas e químicas**. 255f. Tese (Doutorado em Engenharia Química), Departamento de Engenharia Química. Universidade Federal Do Ceará, Fortaleza, 2015.

SANTOS, J. C. S. DOS; RUEDA, N.; TORRES, R.; BARBOSA, O.; GONÇALVES, L. R. B. FERNANDEZ-LAFUENTE, R.. Evaluation of divinylsulfone activated agarose to immobilize lipases and to tune their catalytic properties. **Process Biochemistry**, v. 50, p. 918–927, 2015a.

SANTOS, J. C. S. DOS; RUEDA, N.; BARBOSA, O.; FERNÁNDEZ-SANCHÉZ, J. F.; MEDINA-CASTILLO, A. L.; RAMÓN-MÁRQUEZ, T.; ARIAS-MARTOS, M. C.; MILLÁN-LINARES, M. C.; PEDROCHE, J.; YUST, M. DEL M.; GONÇALVES, L. R. B.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Characterization of supports activated with divinyl sulfone as a tool to immobilize and stabilize enzymes via multipoint covalent attachment . Application to chymotrypsin. **RSC Advances**, v. 5, p. 20639–20649, 2015b.

SANTOS, J. C. S. DOS; BARBOSA, O.; ORTIZ, C.; BERENGUER-MURCIA, A.; RODRIGUES, R. C.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Importance of the Support Properties for Immobilization or Purification of Enzymes. **CHEM CAT CHEM**, v. 7, n. 16, p. 2413–2432, 2015c.

SANTOS, J. C. DOS; RUEDA, N.; BARBOSA, O.; MILLÁN-LINARES, C.; PEDROCHE, J.; YUSTE, M. DEL M.; GONÇALVES, L. R. B.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Bovine

trypsin immobilization on agarose activated with divinylsulfone: Improved activity and stability via multipoint covalent attachment. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 117, p. 38–44, 2015d.

SANTOS, J. C. S. DOS; RUEDA, N.; SANCHEZ, A.; VILLALONGA, R.; GONÇALVES, L. R. B.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Versatility of divinylsulfone supports permits the tuning of CALB properties during its immobilization. **RSC Advances**, v. 5, p. 35801–35810, 2015e.

SANTOS, K. P. DOS; FARIA, L. R.; BRÍGIDA, A. I. S.; GONÇALVES, L. R. B.; MELLINGER-SILVA, C.; AZEVEDO, T. L. Alcalase immobilization for tilapia skin gelatin hydrolysis. **XXI Simpósio Nacional de Bioprocessos**, Aracajú, Sergipe - Brasil, 2017.

SCHMIDT, C. G.; SALAS-MELLADO, M. Influence of Alcalase and Flavourzyme performance on the degree of hydrolysis of the proteins of chicken meat. **Química Nova**, v. 32, n. 5, p. 1144-1150, 2009.

SIGMA-ALDRICH. **Product Information - Azocasein**, 1947.

SILVA, J. A.; MACEDO, G. P.; RODRIGUES, D. S.; GIORDANO, R. L. C.; GONÇALVES, L. R. B. Immobilization of *Candida antarctica* lipase B by covalent attachment on chitosan-based hydrogels using different support activation strategies. **Biochemical Engineering Journal**, v. 60, p. 16–24, 2012.

SILVA, R. L. DE F. O. B.; SOUZA, R. R. DE; SANTANA, J. C. C.; TAMBOURGI, E. B. Imobilização de enzimas de milho maltado em gel. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, n. 3, p. 642–648, 2008.

SILVA, R. N. Perspectives in Genomics The Future of Fungi in “ omics ” era. **Current Genomics**, v. 17, n. 2, p. 82–84, 2016.

SOUZA, K. P. D. S. **Produção e extração das proteases de *mucor subtilissimus* ucp 1262 cultivado em fermentação sólida e submersa**. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas), Centro de Ciências Biológicas. Universidade Federal De Pernambuco, Recife, 2016.

SOUZA, M. C. M. DE. **Imobilização de lipase de *Candida Antarctica* do tipo B em nanopartículas magnéticas visando a aplicação na síntese de ésteres**. [s.l.] Universidade Federal do Ceará, 2013.

SEE, S. F.; HOO, L. L.; BABJI, A. S. Optimization of enzymatic hydrolysis of Salmon (*Salmo salar*) skin by Alcalase. **International Food Research Journal**, v. 18, n. 4, 2011.

TARDIOLI, P. W.; PEDROCHE, J.; GIORDANO, R. L. C.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R.; GUISÁN, J. M. Hydrolysis of Proteins by Immobilized-Stabilized Alcalase-Glyoxyl Agarose. **Biotechnology progress**, v. 19, n. 2, p. 352–360, 2003.

TARDIOLI, P. W. **Hidrólise controlada de proteínas do soro de queijo usando Carboxipeptidase e Alcalase® imobilizadas multipontualmente em Agarose**. Tese (Doutorado em Engenharia Química, Centro de Ciências Exatas e Tecnologia. Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2003.

TEIXEIRA, J. S.; SOARES, T. L. D.; SANTOS, M. S.; STEPHAN, M. P.; TONON, R. V.; BRÍGIDA, A. I. S.; MELLINGER-SILVA, C. Influência do tipo de enzima nas propriedades funcionais de hidrolisados obtidos a partir de concentrado proteico de soro de leite. **XX Congresso Brasileiro de Engenharia Química**, Florianópolis, santa Catarina - Brasil, 2014.

VIEIRA, D. C. **Imobilização da enzima β -galactosidase de *Kluyveromyces fragilis* em agarose e quitosana utilizando diferentes protocolos de ativação**. 115f. Tese (Mestrado em Engenharia Química), Departamento de Engenharia Química. Universidade de São Carlos, São Carlos, 2009.

YANG, J. I.; LIANG, W. S.; CHOW, C. J.; SIEBERT, K. J. Process for the production of tilapia retorted skin gelatin hydrolysates with optimized antioxidative properties. **Process Biochemistry**, v. 44, p. 1152–1157, 2009.

YUST, M. M.; PEDROCHE, J.; GIRÓN-CALLE, J.; ALAIZ, M.; MILLÁN, F.; VIOQUE, J. Production of ace inhibitory peptides by digestion of chickpea legumin with alcalase. **Food Chemistry**, v. 81, n. 3, p. 363–369, 2003.

YUST, M. DEL M.; ; PEDROCHE, J. ALAIZ, M.; GIRÓN-CALLE, J.; VIOQUE, C J.; MATEO, C.; GUIŚÁN, J. M.; MILLÁN, F.; FERNANDEZ-LAFUENTE R. Partial purification and immobilization/stabilization on highly activated glyoxyl-agarose supports of different proteases from flavourzyme. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 55, n. 16, p. 6503-6508, 2007.

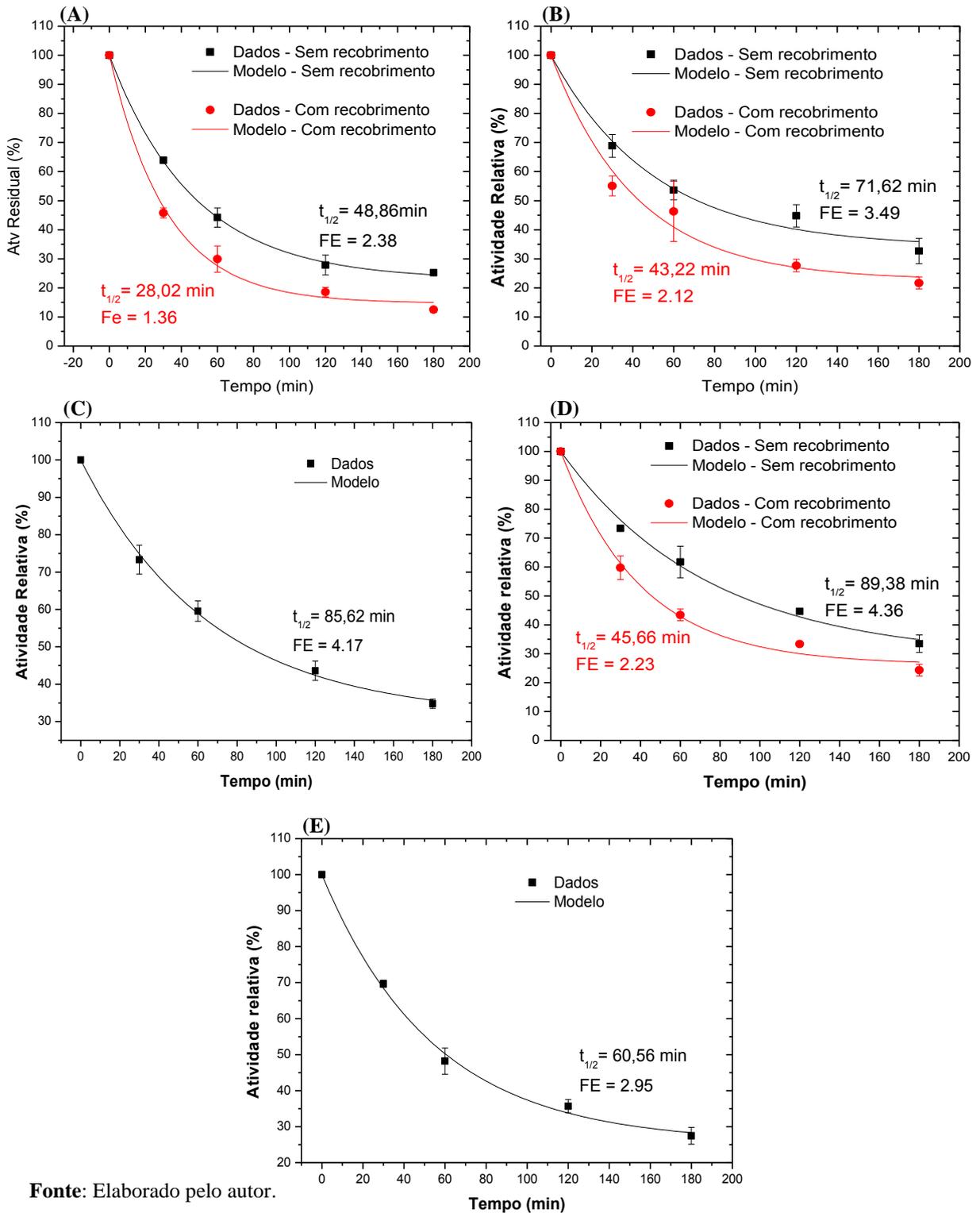
ZHOU, J. Q.; WANG, J. W. Immobilization of alliinase with a water soluble – insoluble reversible N -succinyl-chitosan for allicin production. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 45, p. 299–304, 2009.

ZHU, K.; ZHOU, H.; QIAN, H. Antioxidant and free radical-scavenging activities of wheat germ protein hydrolysates (WGPH) prepared with alcalase. **Process Biochemistry**, v. 41, n. 6, p. 1296–1302, 2006.

ŽUŽA, M. G.; MILAŠINOVIĆ, N. Z.; JONOVIĆ, M. M.; JOVANOVIĆ, J. R.; KRUŠIĆ, M. T. K.; BUGARSKI, B. M.; KNEŽEVIĆ-JUGOVIĆ, Z. D. Design and characterization of alcalase–chitosan conjugates as potential biocatalysts. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 40, n. 11, p. 1713-1723, 2017.

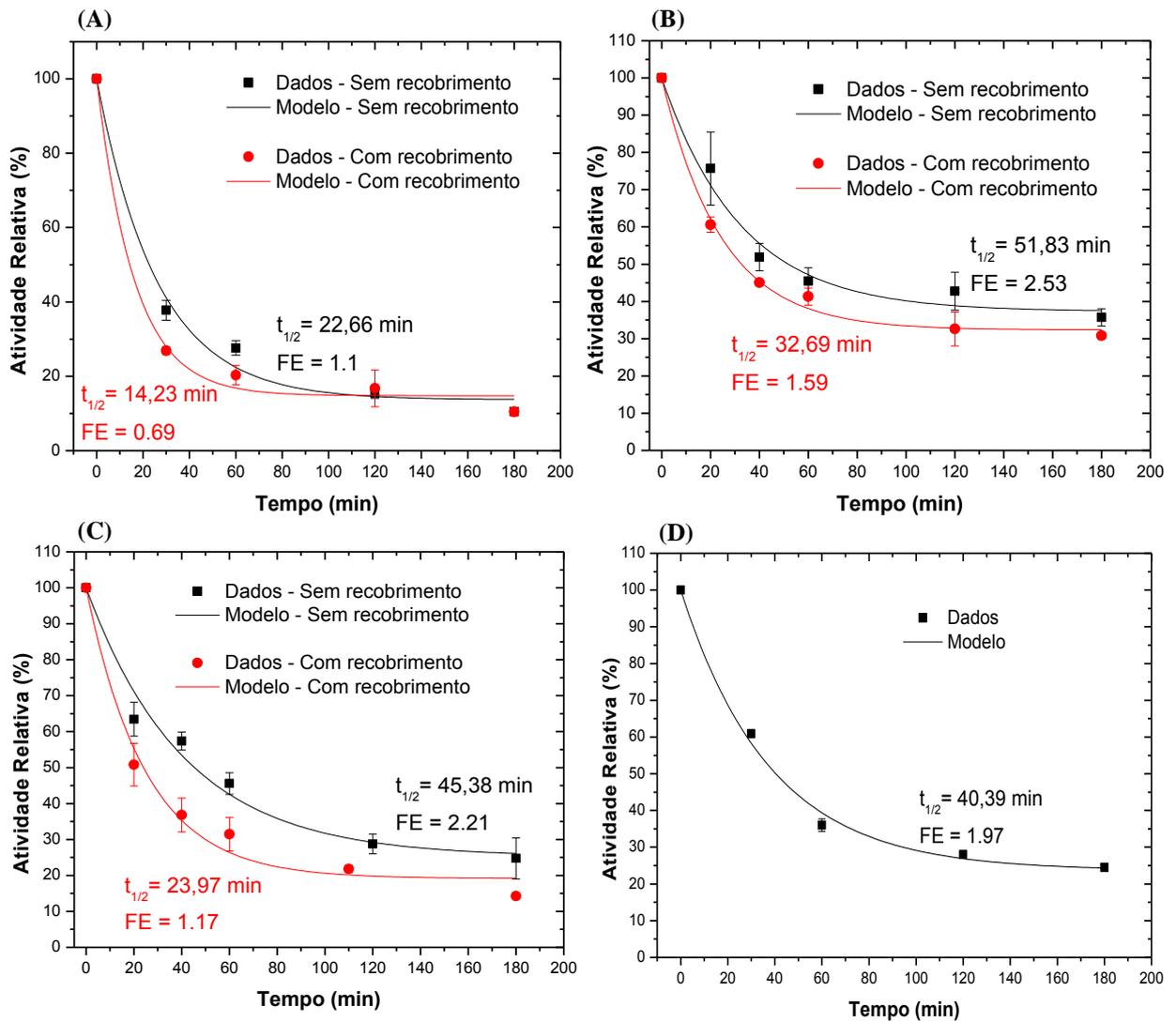
ANEXO A - INATIVAÇÃO TÉRMICA DOS DERIVADOS

Figura 30 - Inativação térmica (60 °C, pH 8) de Alcalase® imobilizada em quitosana ativada com Glutaraldeído. Imobilização à pH 7 com tempos que variaram de 15 a 96 horas. (A) 15 horas. (B) 24 horas. (C) 48 horas. (D) 72 horas. (E) 96 horas. Reticulação de alguns derivados com glutaraldeído 1%. A atividade inicial da enzima foi considerada igual a 100 %.



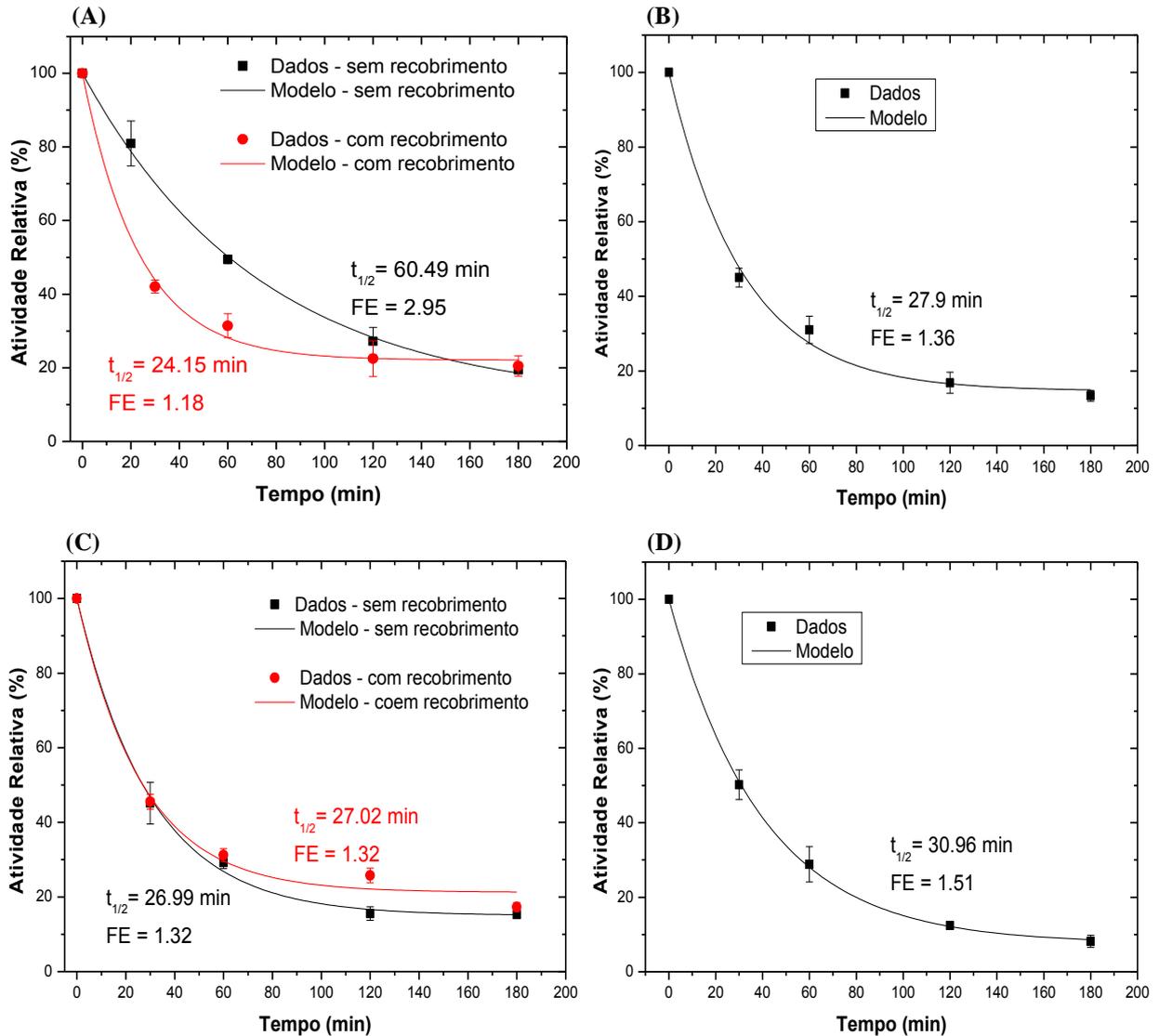
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 31 - Inativação térmica (60 °C, pH 8) de Alcalase® imobilizada em quitosana ativada com Glutaraldeído. Imobilização à pH 10 com tempos que variaram de 15 a 96 horas. (A) 15 horas. (B) 24 horas. (C) 72 horas. (D) 96 horas. Reticulação de alguns derivados com glutaraldeído 1%. A atividade inicial da enzima foi considerada igual a 100 %.



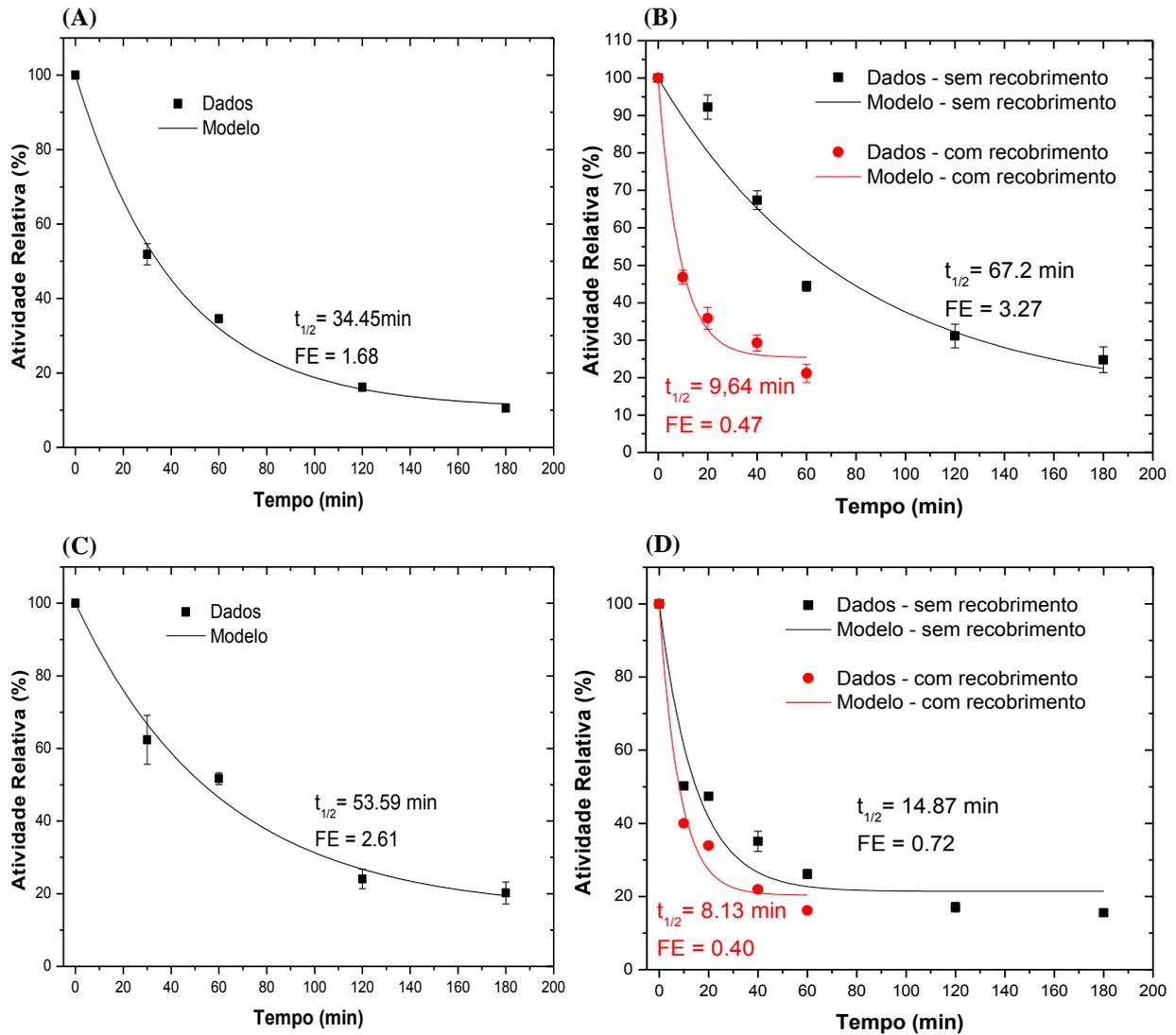
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 32 - Inativação térmica (60 °C, pH 8) de Alcalase® imobilizada em quitosana ativada com divinilsulfona. Imobilização à pH 7 com tempos que variaram de 24 a 96 horas. (A) 24 horas. (B) 48 horas. (C) 72 horas. (D) 96 horas. Reticulação de alguns derivados com glutaraldeído 1%. A atividade inicial da enzima foi considerada igual a 100 %.



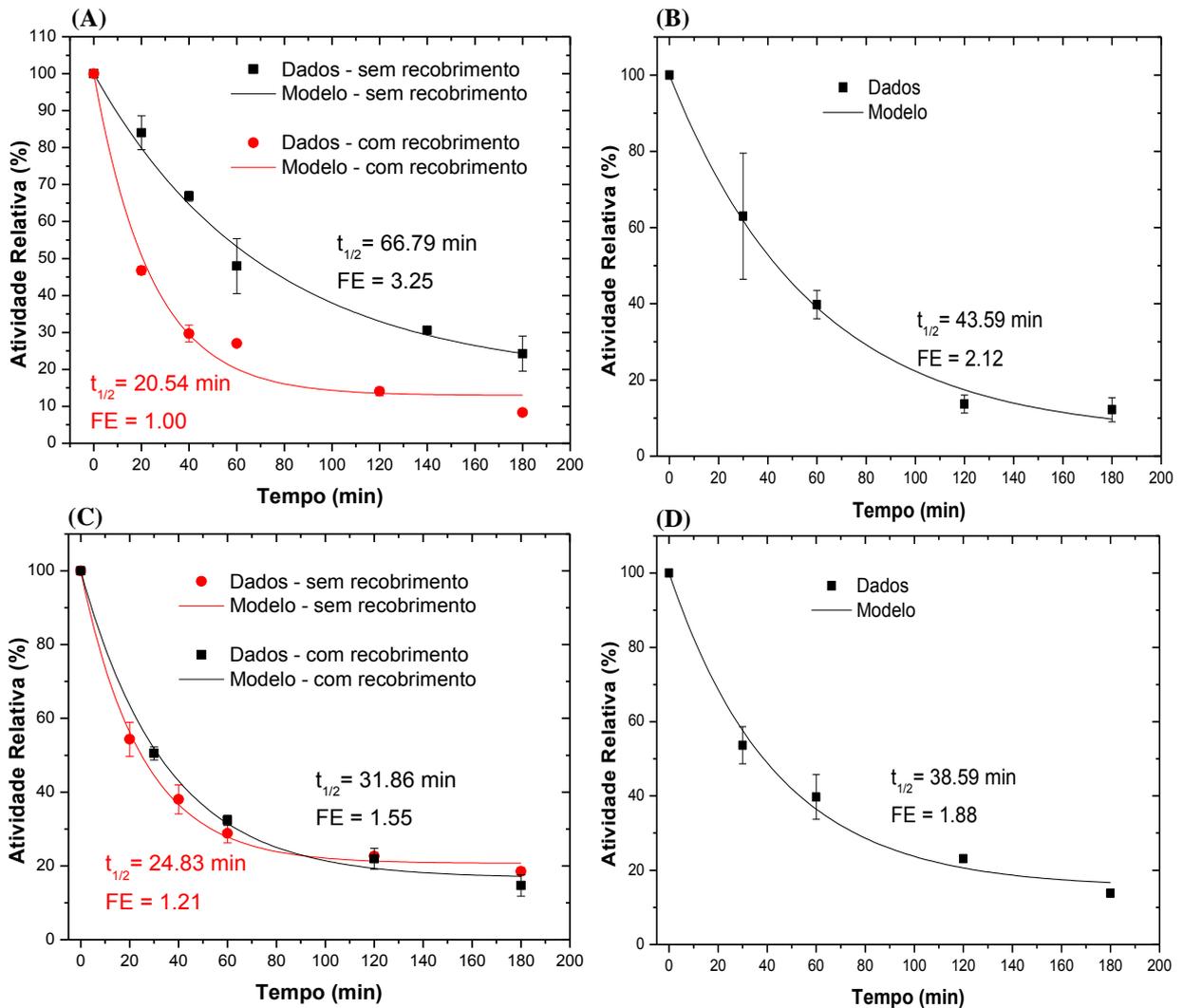
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 33 - Inativação térmica (60 °C, pH 8) de Alcalase® imobilizada em quitosana ativada com divinilsulfona. Imobilização à pH 10 com tempos que variaram de 15 a 72 horas. (A) 15 horas. (B) 24 horas. (C) 48 horas. (D) 72 horas. Reticulação de alguns derivados com glutaraldeído 1%. A atividade inicial da enzima foi considerada igual a 100 %.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 34 - Inativação térmica (60 °C, pH 8) de Alcalase® imobilizada em quitosana ativada com glioxil. Imobilização à pH 10 com tempos que variaram de 24 a 96 horas. (A) 24 horas. (B) 48 horas. (C) 72 horas. (D) 96 horas. Reticulação de alguns derivados com glutaraldeído 1%. A atividade inicial da enzima foi considerada igual a 100 %.



Fonte: Elaborado pelo autor.