



Universidade Federal de São Carlos
Centro de Ciências Exatas e Tecnologia
Departamento de Engenharia Química
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química

Hidrólise Controlada de Proteínas do Soro Lático
Usando Tripsina e Quimotripsina
Imobilizadas em Diferentes Suportes

Célia Maria Araújo Galvão

São Carlos – SP
Novembro de 2004.

**Universidade Federal de São Carlos
Centro de Ciências Exatas e Tecnologia
Departamento de Engenharia Química
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química**

***Hidrólise Controlada de Proteínas do Soro Láctico
Usando Tripsina e Quimotripsina
Imobilizadas em Diferentes Suportes***

Doutoranda: Célia Maria Araújo Galvão

Orientadora: Prof^a. Dra. Raquel de Lima Camargo Giordano

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de São Carlos como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Engenharia Química, área de concentração em Pesquisa e Desenvolvimento de Processos Químicos.

São Carlos - SP

Novembro de 2004.

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária/UFSCar**

G182hc

Galvão, Célia Maria Araújo.

Hidrólise controlada de proteínas de soro láctico usando tripsina e quimotripsina imobilizadas em diferentes suportes / Célia Maria Araújo Galvão. -- São Carlos : UFSCar, 2005. 192 p.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2004.

1. Tecnologia de enzimas. 2. Hidrólise de proteínas. 3. Soro de queijo. 4. Proteínas. 5. Tripsina. 6. Quimotripsina. 7. Imobilização de enzimas. 8. Cinética enzimática. I. Título.

CDD: 660.634 (20^a)

*"Há homens que lutam um dia e são bons.
Há outros que lutam um ano e são melhores.
Há os que lutam muitos anos e são muito bons.
Porém, há os que lutam toda a vida.
Esses são os imprescindíveis."*

Bertold Brecht (1898 - 1956)

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho ao meu esposo Charles Dayan, aos meus pais Galvão e Celestina, ao meu irmão Célio, à Sandra e à Família 'de Jesus' por todo carinho, apoio e incentivo durante todos esses anos, mas principalmente por ensinarem que é possível conquistar.

AGRADECIMENTOS

A Deus por tudo o que é e representa para mim.

À Profa. Dra. Raquel Giordano pela orientação, solicitude, amizade e paciência, o meu muito obrigada.

Aos Drs. José Manuel Guisán e Roberto Fernández-Lafuente, do Instituto de Catálisis e Petroleoquímica de Madrid – ICP/CSIC, pelas valiosas contribuições a este trabalho, pela orientação no estágio realizado na instituição citada e pelo carinho a mim dispensado durante toda a estada em Madri.

Ao Prof. Dr. Roberto de Campos Giordano pelas importantes discussões e dicas sempre pertinentes e oportunas.

Ao meu esposo Charles Dayan por toda dedicação, carinho e amor, mas, principalmente, pelas valiosas discussões e contribuições a este trabalho. Não há palavras que consigam expressar toda a minha gratidão.

À amiga e colega de trabalho Andrea Lopes por ter sempre se posto à disposição para "coletar amostras" quando eu precisava me ausentar.

Às amigas Cris e Sania, vocês foram minha família durante todo o período que moramos juntas. Obrigada por tudo!

Ao casal amigo Rosi e Antonio, pela grande amizade construída ao longo desses últimos cinco anos.

Aos amigos Marcelo e Angélica, pelo companheirismo e pelos indescritíveis momentos de descontração que partilhamos durante todo o doutorado.

Aos amigos Renata e Patrick pela agradável convivência e consolidação de nossa amizade.

Aos amigos da Espanha, sobretudo à Mari Carmem, por terem tornado aqueles três meses muito mais fáceis.

Ao casal amigo Benevides e Carmem, por me terem acolhido de forma muito especial e por se preocuparem comigo durante toda a estada em Madri. Muito obrigada!

Aos amigos Paulo Waldir, Miriam, Laura, Ruy, Álvaro, Anny, Edson, Marcelo Ribeiro, Gilson, Wellington, Vanessa e Juliana por conseguirmos juntos criar um ótimo ambiente de trabalho e também pelos momentos de descontração no laboratório.

À Cooperativa de Laticínios São Carlos, pela doação do soro de queijo.

À FAPESP pela concessão da bolsa de doutoramento.

RESUMO

Este trabalho está inserido em um projeto global que visa a produção de um hidrolisado de proteínas do soro de queijo com composição controlada. O processo prevê ação seqüencial de tripsina, quimotripsina e carboxipeptidase A (CPA), remoção de fenilalanina (Phe) e demais aminoácidos aromáticos liberados após ação da CPA e hidrólise final com Alcalase[®], para obtenção de di e tripeptídeos. A mistura de pequenos peptídeos resultante possui propriedades melhores do que as de uma mistura de aminoácidos livres. A remoção da Phe e demais aminoácidos hidrofóbicos desses hidrolisados viabiliza sua utilização por pacientes portadores de fenilcetonúria, além de proporcionar sabor mais agradável ao produto final, pois estes têm sabor amargo. O uso de enzimas em processos industriais requer, contudo, a imobilização e a estabilização destas. Neste trabalho foram enfocadas as duas primeiras etapas de hidrólise visando cumprimento dos seguintes objetivos gerais: preparação de derivados de tripsina (sobre sepabeads, quitosana e agarose) e quimotripsina (apenas sobre agarose), estudo da hidrólise seqüencial das proteínas do soro com tripsina e quimotripsina imobilizadas sobre gel glioxil-agarose e investigação da cinética da hidrólise dessas proteínas com quimotripsina imobilizada sobre agarose.

Derivados tripsina-sepabeads foram preparados usando-se resina modificada apenas com ácido iminodiacético (IDA) ou modificada com IDA e posteriormente reagida com cobre. Foram obtidos rendimentos de imobilização de aproximadamente 100% e completa recuperação da enzima nos suportes utilizados, com fatores de estabilização em relação à enzima solúvel variando de 90 (derivados *Sepabeads-IDA-Cu²⁺*) a 138 vezes (derivados *Sepabeads-IDA*), a 55°C. Estudo do desempenho do derivado *tripsina-(Sepabeads-IDA)* no fracionamento da caseína mostrou sua maior eficiência frente ao derivado tripsina-glioxil-agarose.

Derivados estabilizados tripsina-quitosana foram preparados sobre matrizes coaguladas em solução de NaOH (0,1 ou 1N) e ativadas com glutaraldeído (pH 7 ou 10) ou glicidol. Para todos os derivados tripsina-quitosana ativados com glutaraldeído obteve-se 100% de rendimento de imobilização, enquanto que o alcançado pelo derivado cuja matriz foi ativada com glicidol foi de apenas 60%. Recuperação da enzima nos géis de 100% foi obtida para todos os suportes estudados até carga de 20mgEnz./gGel. Derivados preparados sobre matrizes ativadas a pH 7, independentemente da concentração da solução coagulante (NaOH 0,1 ou 1N), resultaram em 100% de rendimento e total recuperação da enzima no gel até carga enzimática de 40mgEnz./gGel. Fatores de estabilização em torno de 460 vezes foram obtidos para derivados tripsina-quitosana-glutaraldeído em relação à enzima solúvel, a 40°C. A 70°C, o derivado tripsina-quitosana-glioxil mostrou-se aproximadamente 13 vezes mais estável que derivados tripsina-quitosana-glutaraldeído. Temperatura de 50°C e pH 9 foram condições nas quais derivados tripsina-quitosana apresentaram maior atividade de hidrólise (para a enzima solúvel 40°C e também pH 9). O melhor derivado tripsina-quitosana preparado (coagulação em NaOH 0,1N e ativação a pH 7) mostrou desempenho similar ao da enzima solúvel na hidrólise das proteínas do soro (grau de hidrólise (GH) de 12%).

Derivados de tripsina e quimotripsina sobre gel glioxil-agarose foram preparados utilizando-se protocolo disponível na literatura (agarose ativada com glicidol e oxidada com NaIO₄ para obtenção de 75µmoles de aldeído/mL de gel, a 25°C e pH 10,05). Os fatores de estabilização aqui obtidos para tripsina (3920 vezes) e quimotripsina (14535 vezes) estão em concordância com resultados já publicados. Estes

altos índices de estabilização se devem à formação de ligações multipontuais entre as enzimas e o suporte, o que pôde ser confirmado pelos resultados obtidos através de hidrólises ácidas das enzimas solúveis e derivados estabilizados. Esses experimentos mostraram que 64,76% e 72,15% do total de lisinas presentes na tripsina e na quimotripsina, respectivamente, estavam envolvidas nas multiligações enzima-suporte. Em consequência disso, os derivados de tripsina e quimotripsina expressaram máxima atividade de hidrólise dos substratos sintéticos em temperaturas e pHs mais elevados que os observados para as enzimas solúveis (85°C e pH 11 para tripsina e 70°C e pH 10,5 para quimotripsina).

Estudo da hidrólise seqüencial das proteínas do soro foi realizado variando-se o grau de hidrólise com tripsina de 0 a 12% e submetendo-se em seguida estes hidrolisados à ação seqüencial de quimotripsina e CPA, empregando-se nessas duas últimas etapas tempo reacional prolongado e alta concentração enzimática. Os resultados obtidos mostraram que conversão em Phe próxima de 100% foi obtida quando as proteínas do soro foram diretamente hidrolisadas pela quimotripsina, atingindo-se grau de hidrólise de 12,4% com esta protease (concentração enzimática de 3,05mgEnz./mL de solução - 10 horas) e utilizando-se 200U_{H-PHE}/gProteína nas 10 horas de reação com CPA, o que conduziu à formação de 15,5% de peptídeos com massa molecular (MM) inferior a 1046Da.

O estudo das velocidades iniciais da hidrólise das proteínas do soro catalisada pela quimotripsina (derivado com alta carga enzimática - 40mgEnz./gGel) forneceu os parâmetros cinéticos aparentes $V_{máx}^{ap}$, K_m^{ap} e K_S^{ap} do modelo de Michaelis-Menten com inibição pelo substrato, representado em termos de ligações peptídicas hidrolisáveis por esta enzima. O fator de efetividade determinado para reações na presença de efeitos difusionais (ensaios realizados com derivado contendo 40mgEnz./gGel) foi de 0,78 e os dados experimentais de bateladas de longa duração (10 horas) foram perfeitamente ajustados por um modelo composto onde os cinco primeiros minutos de reação foram descritos por uma cinética de primeira ordem (equação do tipo $V = kN$), uma vez que neste período as proteínas ainda apresentavam elevada massa molecular e o sistema estava possivelmente sendo controlado pela difusão externa, e tempos superiores a 5 minutos por uma função de P/N_o , ou seja, uma equação do tipo $V = f(P/N_o)$. Esta última abordagem resultou em excelentes ajustes aos dados experimentais para todo o período reacional ensaiado, o que é bastante relevante dada a complexidade do sistema em questão.

ABSTRACT

This work is part of a global project whose aim is the production of a cheese whey proteins hydrolysate with controlled composition. The process is composed by sequential hydrolysis of the whey proteins using trypsin, chymotrypsin and carboxipeptidase A (CPA). The phenylalanine (Phe) and the other aromatic amino acids released after action of CPA may be removed from the product, providing an adequate source of proteins for phenylketonurics patients and a final product with more pleasant flavor. After its separation, a final step of hydrolysis using the non-specific protease Alcalase[®] produces a mixture of small peptides with better properties than a mixture of free amino acids. However, the use of enzymes in industrial processes requests its immobilization and stabilization. We have studied in this work the first two hydrolysis stages aiming to reach the following general objectives: to prepare derivatives of trypsin (on sepabeads, chitosan and agarose) and chymotrypsin (just on agarose), to study the sequential hydrolysis of the cheese whey proteins with trypsin and chymotrypsin immobilized on glyoxyl-agarose gel and to investigate the kinetic of the hydrolysis of these proteins with immobilized chymotrypsin.

Trypsin-sepabeads derivatives were prepared on resins modified with iminodiacetic acid (IDA) or modified with IDA and copper. Yield of immobilization of approximately 100% and complete recovery of the enzyme on supports were obtained. Factors of stabilization in relation to the soluble enzyme from 90 times (Sepabeads-IDA-Cu²⁺) to 138 times (Sepabeads-IDA), at 55°C, were reached and the trypsin-(Sepabeads-IDA) derivative showed to be more efficient in the casein hydrolysis than the trypsin-glyoxyl-agarose one.

Trypsin-chitosan derivatives were prepared on coagulated matrices in NaOH solution (0.1 or 1N) and activated with glutaraldehyde (pH 7 or 10) or glycydol. Chitosan derivatives whose matrices were activated with glutaraldehyde reached 100% of yield of immobilization, while the ones activated with glycydol reached just 60%. In all the studied cases it was possible to recover completely the enzyme on supports until the enzymatic load of 20mgEnz./gGel. Derivatives prepared on coagulated matrices in NaOH 0.1 or 1N and activated at pH 7 resulted in 100% of yield of immobilization and complete recovery of the enzyme on gel until the enzymatic load of 40mgEnz./gGel. At 40°C, the glutaraldehyde-chitosan derivatives were approximately 460 times more stable than the soluble enzyme; at 70°C, the glyoxyl-chitosan derivative showed to be approximately 13 times more stable than the glutaraldehyde-chitosan derivative. The trypsin-chitosan derivatives presented the highest hydrolysis activity at 50°C and pH 9 (40°C and pH 9 for the soluble enzyme). The best trypsin-chitosan derivative (coagulated in NaOH 0.1M and activated at pH 7) showed similar performance to the soluble enzyme in the hydrolysis of the cheese whey proteins (hydrolysis degree (DH) of 12%).

Trypsin and chymotrypsin derivatives immobilized on glyoxyl-agarose gel were prepared following a protocol available in the literature (agarose activated with glycydol and oxidized with NaIO₄ to obtain 75µmoles of aldehyde/mL of gel, at 25°C and pH 10.05). The factors of stabilization obtained for trypsin (3920 times) and chymotrypsin (14535 times) are according with results already published and were confirmed through acid hydrolysis of the soluble enzymes and stabilized derivatives. These experiments showed that 64.76% and 72.15% of the lysines present in the trypsin and chymotrypsin, respectively, were involved in the enzyme-support attachment. In consequence of this stabilization, the derivatives showed maximum hydrolysis activity

of synthetic substrates in temperatures and pH higher than the obtained for the soluble enzymes (trypsin - 85°C and pH 11; chymotrypsin - 70°C and pH 10.5).

Hydrolysis of the cheese whey proteins assays using trypsin were developed varying the DH from 0 to 12%. After that, the obtained mixtures were hydrolysates with chymotrypsin and carboxipeptidase A, sequentially, using long times and high enzymes concentrations. The results showed that removal of Phe of approximately 100% was obtained in the following conditions: DH_{trypsin} of 0%, $DH_{\text{chymotrypsin}}$ of 12.4% (3.05mgEnz./mL of solution - 10 hours) and 10 hours of reaction with CPA (200U_{H-PHE}/gProtein), producing 15.5% of peptides with molecular mass (MM) lower than 1046Da.

The kinetic of the hydrolysis of the whey proteins was studied and the apparent kinetic parameters of the Michaelis-Menten model taking into account competitive inhibition by the substrate (V_{max}^{app} , K_m^{app} and K_S^{app}) were calculated by initial rates method using a derivative with high enzymatic load - 40mgEnz./gGel. In this work, the substrate concentration was defined in terms of peptides bonds that could be cleaved by chymotrypsin. The effectiveness factor found for reactions developed in presence of difusional effects was 0.78. The long-term assays (10 hours) were perfectly fitted by a model where the first five minutes were described by the first order kinetic ($V=kN$) and times higher than five minutes were represented by a function of P/N_o ($V=f(P/N_o)$).

SUMÁRIO

	Pág.
Lista de Tabelas.....	vi
Lista de Figuras.....	x
Capítulo I: Introdução.....	1
1. Introdução.....	2
Capítulo II: Revisão Bibliográfica.....	6
2. Revisão Bibliográfica.....	7
2.1. O Leite e Suas Proteínas.....	7
2.2. O Soro de Queijo.....	8
2.2.1. As Proteínas do Soro.....	10
2.2.1.1. A α -Lactalbumina (α -La).....	12
2.2.1.2. A β -Lactoglobulina (β -Lg).....	13
2.2.1.3. A Soroalbumina Bovina (BSA).....	13
2.2.1.4. As Imunoglobulinas (Ig).....	13
2.2.2. A Lactose.....	14
2.3. Enzimas.....	14
2.3.1. Enzimas Proteolíticas.....	16
2.3.1.1. Quimotripsina.....	17
2.3.1.2. Tripsina.....	20
2.3.1.3. Carboxipeptidase A.....	21
2.4. Modificações Enzimáticas em Proteínas.....	23
2.4.1. O Grau de Hidrólise (GH).....	26
2.5. Imobilização de Enzimas.....	27
2.5.1. Suportes para Imobilização de Enzimas.....	29
2.5.1.1. Gel de Agarose.....	31
2.5.1.2. Quitina e Quitosana.....	32
2.5.1.3. Sepabeads (Mitsubishi Chemical - www.diaion.com).....	34
2.5.2. Imobilização Multipontual de Enzimas.....	37
2.6. Técnicas de Separação.....	39
2.6.1. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC).....	39
2.6.1.1. Cromatografia de Exclusão por Tamanho (Análise de Peptídeos).....	40
2.6.1.2. Cromatografia de Troca Iônica (Análise de Aminoácidos).....	41

2.7. Redes Neurais.....	42
2.8. Cinética da Hidrólise das Proteínas do Soro.....	45
2.8.1. Presença de Inibidores no Meio Reacional.....	48
2.8.2. Efeitos Difusivos.....	50
2.8.3. Modelos Cinéticos.....	53
Capítulo III: Materiais e Métodos.....	57
3. Materiais e Métodos.....	58
3.1. Materiais.....	58
3.1.1. Enzimas.....	58
3.1.2. Substratos.....	58
3.1.3. Suportes.....	59
3.1.4. Padrões de Aminoácidos, Peptídeos e Proteínas.....	59
3.1.5. Reagentes.....	59
3.2. Metodologia Experimental.....	60
3.2.1. Dosagem de Atividade Enzimática.....	60
3.2.1.1. Tripsina.....	60
3.2.1.2. Quimotripsina.....	60
3.2.2. Preparação de Suportes para Imobilização de Enzimas.....	61
3.2.2.1. Suportes Epóxidos.....	61
3.2.2.1.1. Modificação Parcial dos Grupos Epóxidos do Suporte.....	61
3.2.2.2. Matrizes de Quitosana.....	61
3.2.2.2.1. Ativação das Matrizes de Quitosana.....	62
3.2.2.3. Gel Glioxil-Agarose.....	63
3.2.2.3.1. Preparação de Gel de Agarose com Alta Densidade de Grupos Aldeído.....	63
3.2.2.3.1.1. Ativação do Gel de Agarose: Gel Gliceril-Agarose.....	63
3.2.2.3.1.2. Oxidação do Suporte: Gel Glioxil-Agarose.....	63
3.2.2.3.2. Preparação de Gel de Agarose com Baixa Densidade de Grupos Aldeídos.....	64
3.2.2.3.3. Quantificação de Grupos Aldeídos no Gel Glioxil-Agarose.....	64
3.2.3. Preparação e Caracterização de Derivados.....	65
3.2.3.1. Imobilização de Tripsina sobre Resinas Epóxidas.....	65

3.2.3.1.1. Bloqueio dos Grupos Epóxidos Remanescentes nos Suportes.....	65
3.2.3.1.2. Avaliação do Enlace Tripsina-Sepabeads.....	66
3.2.3.1.3. Estabilidade Térmica dos Derivados Tripsina-Sepabeads.....	66
3.2.3.1.4. Atividade Caseinolítica de Tripsina Solúvel e Tripsina-Sepabeads: Método das Velocidades Iniciais.....	67
3.2.3.1.5. Atividade Caseinolítica de Tripsina Solúvel e Tripsina-Sepabeads: Grau Máximo de Hidrólise e Análise da Distribuição de Peptídeos.....	67
3.2.3.2. Imobilização de Tripsina sobre Matrizes de Quitosana.....	67
3.2.3.2.1. Rendimento de Imobilização e Atividade Recuperada no Suporte.....	68
3.2.3.2.2. Avaliação do Enlace Tripsina-Quitosana.....	68
3.2.3.2.3. Estabilidade Térmica e a pH Alcalino de Derivados Tripsina-Quitosana.....	68
3.2.3.2.4. Influência da Temperatura e do pH na Atividade de Tripsina Solúvel e Imobilizada sobre Quitosana....	69
3.2.3.2.5. Desempenho de Tripsina Solúvel e Tripsina-Quitosana na Hidrólise das Proteínas do Soro.....	69
3.2.3.3. Imobilização de Tripsina e Quimotripsina sobre Gel Glioxil-Agarose.....	70
3.2.3.3.1. Imobilização Multipontual.....	70
3.2.3.3.2. Imobilização sobre Glioxil-Agarose com Baixa Ativação.....	70
3.2.3.3.3. Inativação Térmica de Tripsina e Quimotripsina Solúveis e Imobilizadas sobre Glioxil-Agarose.....	71
3.2.3.3.4. Inativação de Tripsina e Quimotripsina a pH Alcalino.....	72
3.2.3.3.5. Influência da Temperatura e do pH na Atividade de Hidrólise para Tripsina e Quimotripsina.....	72
3.2.3.3.6. Hidrólises das Proteínas do Soro Catalisadas por Tripsina e Quimotripsina Livres e Imobilizadas.....	73
3.2.4. Hidrólise Ácida.....	75
3.2.5. Análise de Aminoácidos e Peptídeos por HPLC.....	75
3.2.6. Dosagem de Proteínas – Método de Kjeldahl.....	77
3.2.6.1. Digestão das Amostras.....	77
3.2.6.2. Destilação das Amostras.....	77

3.2.6.3. Titulação das Amostras.....	77
3.2.7. Eletroforese SDS-PAGE Não-Desnaturante.....	78
3.2.8. Estudo Cinético.....	80
3.2.8.1. Hidrólise das Proteínas do Soro Catalisadas por Quimotripsina para Levantamento da Cinética.....	80
Capítulo IV: Resultados e Discussão.....	81
4. Resultados e Discussão.....	82
4.1. Produção e Caracterização de Derivados Preparados sobre Suportes Epóxidos.....	82
4.1.1. Imobilização de Tripsina sobre Sepabeads.....	82
4.1.2. Estabilidade Térmica dos Derivados Tripsina-Sepabeads.....	85
4.1.3. Atividade Caseinolítica (Substrato Macromolecular) de Derivados Tripsina-Sepabeads e Tripsina-Glioxil.....	87
4.2. Produção e Caracterização de Derivados Preparados sobre Matrizes de Quitosana.....	91
4.2.1. Imobilização de Tripsina sobre Diferentes Matrizes de Quitosana.....	91
4.2.2. Inativação Térmica e a pH Alcalino.....	95
4.2.3. Influência da Temperatura e do pH na Atividade de Hidrólise de Substratos Sintéticos.....	98
4.2.4. Hidrólise Ácida da Tripsina Solúvel e Imobilizada sobre Matrizes de Quitosana.....	99
4.2.5. Desempenho de Derivados Tripsina-Quitosana na Hidrólise das Proteínas do Soro de Queijo.....	101
4.3. Preparação e Caracterização de Derivados de Tripsina e Quimotripsina sobre Glioxil-Agarose.....	105
4.3.1. Imobilização de Tripsina e Quimotripsina sobre Glioxil-Agarose com Alta Ativação.....	105
4.3.2. Imobilização de Tripsina e Quimotripsina sobre Glioxil-Agarose com Tempo de Contato Reduzido entre Enzima-Suporte Ativado.....	108
4.3.3. Inativação Térmica de Tripsina e Quimotripsina Solúveis e Imobilizadas sobre Glioxil-Agarose.....	109
4.3.4. Inativação a pH Alcalino para Tripsina e Quimotripsina Solúveis e Imobilizadas sobre Glioxil-Agarose.....	118
4.3.5. Hidrólise Ácida de Tripsina e Quimotripsina Solúveis e Imobilizadas sobre Glioxil-Agarose.....	119
4.3.6. Influência da Temperatura e do pH na Hidrólise dos Substratos Sintéticos Catalisada por Derivados Preparados sobre Glioxil- Agarose.....	120
4.4. Hidrólise das Proteínas do Soro Lático.....	123

4.4.1. Ensaio Iniciais de Hidrólise.....	123
4.4.1.1. Tripsina e Quimotripsina Livres e Imobilizadas, Diferentes Temperaturas e Relações E/S.....	123
4.4.2. Hidrólises Seqüenciais com Tripsina e Quimotripsina Imobilizadas.....	126
4.4.2.1. Primeira Batelada de Hidrólises Seqüenciais.....	127
4.4.2.2. Segunda Batelada de Hidrólises Seqüenciais.....	129
4.4.2.3. Terceira Batelada de Hidrólises Seqüenciais: Uso de Enzimas com Alto Teor de Pureza.....	134
4.4.2.4. Quarta Batelada de Hidrólises Seqüenciais.....	142
4.4.2.5. Quinta Batelada de Hidrólises Seqüenciais.....	144
4.5. Estudo Cinético da Hidrólise das Proteínas do Soro Catalisada pela Quimotripsina Imobilizada em Glioxil-Agarose 6%.....	145
4.5.1. Determinação da Efetividade da Reação (η).....	147
4.5.2. Determinação dos Parâmetros Cinéticos Aparentes $V_{máx}^{ap}$, K_m^{ap} e K_S^{ap}	148
4.5.3. Determinação do Parâmetro Cinético K_I	150
Capítulo V: Conclusões.....	164
5. Conclusões.....	165
5.1. Preparação e Caracterização de Derivados Tripsina-Sepabeads.....	165
5.2. Preparação e Caracterização de Derivados Tripsina-Quitossana.....	166
5.3. Preparação e Caracterização de Derivados Tripsina e Quimotripsina sobre Gel Glioxil-Agarose.....	167
5.4. Hidrólises Seqüenciais das Proteínas do Soro.....	168
5.5. Estudo Cinético da Hidrólise das Proteínas do Soro Catalisada pela Quimotripsina.....	168
Capítulo VI: Sugestões.....	171
6. Sugestões para Trabalhos Futuros.....	172
Referências Bibliográficas.....	174
Anexos.....	182
Anexo I – Terceira Batelada de Hidrólises Seqüenciais: Uso de Enzimas com Alto Teor de Pureza.....	183
Anexo II – Quarta Batelada de Hidrólises Seqüenciais.....	191

LISTA DE TABELAS

	Pág.
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	
Tabela 2.1: Composição do leite de várias espécies (% p/v).....	8
Tabela 2.2: Produção nacional anual de queijo, soro e seus principais componentes..	9
Tabela 2.3: Diferentes estruturas associadas aos adsorventes sintéticos.....	35
Tabela 2.4: Propriedades típicas de alguns adsorventes sintéticos.....	35
 RESULTADOS E DISCUSSÃO	
Tabela 4.1: Imobilização de tripsina (2,5mgEnz./g suporte) sobre diferentes suportes preparados. Condições experimentais: 25°C, pH 8, 24 horas de reação e agitação suave.....	84
Tabela 4.2: Avaliação do enlace enzima-suporte estabelecido. Incubação dos derivados em NaCl 400mM por 12 horas.....	85
Tabela 4.3: Parâmetros do modelo matemático utilizado [$Y=Y_0+A_1*\exp(-X/t_1)$] e tempos de meia-vida ($\tau_{1/2}$) obtidos a 55°C e pH 8 para tripsina solúvel e imobilizada sobre sepabeads.....	87
Tabela 4.4: Medida da atividade da enzima solúvel e dos derivados tripsina-sepabeads (atividade aparente) na hidrólise de caseína. Ensaio de velocidades iniciais a 40°C; pH 8; 0,088mgEnz./mL de solução e 15 minutos de reação.....	88
Tabela 4.5: Atividade recuperada no gel após 24 horas de imobilização de duas cargas de tripsina em cinco diferentes suportes a 25°C, pH 10 e na presença de benzamidina.....	93
Tabela 4.6: Investigação da quantidade máxima de enzima (carga enzimática) capaz de ser imobilizada sobre diferentes géis de quitosana. Condições: 25°C, pH 10, presença de benzamidina e 24 horas de reação.....	94
Tabela 4.7: Influência da temperatura e do pH alcalino na estabilidade dos derivados preparados. Tempos de meia-vida determinados nas seguintes condições experimentais: 40°C, 70°C e pH 11.....	96
Tabela 4.8: Determinação dos tempos de meia-vida de derivados preparados em matrizes coaguladas em NaOH 0,1N. Condições experimentais: 55 e 70°C - pH 8.....	97
Tabela 4.9: Concentrações ($\mu\text{mol/mL}$) de alguns aminoácidos após hidrólise ácida da tripsina solúvel e dos diferentes derivados desta enzima preparados sobre quitosana.....	100

Tabela 4.10: Comparação do desempenho de tripsina solúvel e derivados preparados sobre quitosana coagulada em NaOH 0,1N na hidrólise das proteínas do soro de queijo (10g/L): tempo reacional de 2 horas, 50°C, E/S _{mássico} de 1/20 (derivado 10mgEnz./gGel) ou 1/10 (derivado 20mgEnz./gGel) e pH 8 e NaOH 0,1M	101
Tabela 4.11: Graus de hidrólise obtidos após incremento de 5°C na temperatura do meio reacional. Soro 10g/L, tempo de hidrólise de 2 horas, 55°C, E/S _{mássico} de 1/20 (0,1N - derivado 10mgEnz./gGel) ou 1/10 (0,1N - derivado 20mgEnz./gGel) e pH 8. Matrizes coaguladas em NaOH 0,1N.....	102
Tabela 4.12: Hidrólises desenvolvidas a 55°C (pH 8) e tempo reacional suficiente para se obter grau de hidrólise de 9% em todas as situações. Soro 10g/L, E/S _{mássico} de 1/20 (derivado 10mgEnz./gGel) ou 1/10 (derivado 20mgEnz./gGel) e pH 8. Matrizes coaguladas em NaOH 0,1N.....	103
Tabela 4.13: Imobilização de diferentes cargas enzimáticas de tripsina e quimotripsina sobre gel glioxil-agarose (25°C, pH 10,05).....	106
Tabela 4.14: Derivados de tripsina e quimotripsina preparados sobre glioxil-agarose com baixa ativação (20µmoles de aldeídos/mL de Gel) e tempo de contato reduzido de 1 hora – pH 10,05 e 25°C.....	109
Tabela 4.15: Parâmetros do modelo matemático utilizado e tempos de meia-vida ($t_{1/2}$) obtidos a 55°C e pH 8 para tripsina e quimotripsina solúveis e insolubilizadas...	115
Tabela 4.16: Parâmetros do modelo matemático utilizado para ajuste dos dados experimentais e tempos de meia-vida ($t_{1/2}$) a 75°C e pH 8 para tripsina e quimotripsina imobilizadas sobre suportes com baixa e alta densidade de grupos aldeído em sua superfície.....	117
Tabela 4.17: Parâmetros do modelo matemático utilizado e tempos de meia-vida ($t_{1/2}$) a 25°C e pH 11 para tripsina e quimotripsina solúveis e insolubilizadas.....	119
Tabela 4.18: Concentrações obtidas de alguns aminoácidos após hidrólise ácida de tripsina e quimotripsina solúveis e imobilizadas. Condições experimentais: HCl 6,8N, 105°C e 24horas; análise de aminoácidos por troca iônica (HPLC) com derivatização pós-coluna com OPA.....	119
Tabela 4.19: Graus de hidrólise obtidos ao longo de 4 horas de reação usando tripsina e quimotripsina solúveis e imobilizadas: soro 10g/L, 55°C, E/S _{mássico} de 1/100 e pH 8.....	124
Tabela 4.20: Graus de hidrólise obtidos ao longo de reações catalisadas por tripsina e quimotripsina após aumento da carga enzimática no meio reacional (E/S _{mássico} de 1/100 para 1/50): soro 10g/L, 55°C e pH 8.....	125
Tabela 4.21: Graus de hidrólise obtidos com tripsina nas seguintes condições de operação: 55°C e E/S _{mássico} de 1/50; 55°C e E/S _{mássico} de 1/20 (aumento da concentração enzimática) e 65°C e E/S _{mássico} de 1/20 (aumento simultâneo da concentração enzimática e da temperatura do sistema).....	125
Tabela 4.22: Graus de hidrólise obtidos após cada etapa realizada e grau de hidrólise total após ação sequencial de tripsina e quimotripsina imobilizadas. Condições operacionais: soro 10g/L, 55°C, pH 8 e E/S _{mássico} de 1/50.....	128

Tabela 4.23: Porcentagem de Phe liberada após ação seqüencial de tripsina (Novo Nordisk), quimotripsina (Sigma) e CPA. Condições operacionais nas etapas com tripsina e quimotripsina: soro 10g/L, 55°C, pH 8 e E/S _{mássico} de 1/50. Condições operacionais na etapa com CPA: 45°C, pH 7 e carga enzimática de 50U _{H-PHE} /g Proteína.....	128
Tabela 4.24: Graus de hidrólises propostos e atingidos após ação da tripsina sobre as proteínas intactas do soro de queijo (10g/L, pH 8, 55°C, E/S _{mássico} de 1/25 e NaOH 0,1M).....	130
Tabela 4.25: Graus de hidrólise obtidos após ação seqüencial de tripsina (GH _T - Condições: 55°C, pH 8, E/S _{mássico} de 1/25 e NaOH 0,1M), quimotripsina (GH _Q - Condições: 55°C, pH 8, E/S _{mássico} de 1/20 e NaOH 0,1M) e CPA (45°C, pH 7, 50U _{H-PHE} /gProteína e 8 horas de reação) e concentração final dos hidrolisados resultantes. Conteúdo de aminoácidos liberados após ação seqüencial das três enzimas utilizadas.....	131
Tabela 4.26: Porcentagem de Phe liberada ao longo das sete horas de hidrólise com CPA. 45°C, pH 7 e 50U _{H-PHE} /gProteína.....	136
Tabela 4.27: Porcentagem de peptídeos com MM < 1046Da gerada ao longo de sete horas de hidrólise com CPA.....	137
Tabela 4.28: Conteúdo (g aminoácido/100gProteína) de alguns aminoácidos determinado após hidrólise ácida de soro de queijo utilizado como substrato. HCl 6,8N, 105°C e 24 horas de incubação. Comparação com os valores teóricos previstos por Adler-Nissen (1986).....	138
Tabela 4.29: Porcentagem de liberação de Phe e de peptídeos com MM < 1046Da para a hidrólise seqüencial das proteínas do soro de queijo com tripsina, quimotripsina e CPA, usando altas concentrações de enzima e tempos prolongados de reação nas etapas desenvolvidas com quimotripsina e CPA.....	143
Tabela 4.30: Porcentagem de liberação de Phe e distribuição de peptídeos com MM < 1046Da obtidas após ação seqüencial de quimotripsina e CPA ou após ação das três enzimas aqui estudadas na hidrólise das proteínas do soro. Ensaio realizado em duplicata.....	144
Tabela 4.31: Velocidades iniciais de hidrólise das proteínas do soro para diferentes concentrações iniciais de substrato, mas C _{Enz.} fixa e igual a 3gEnz./L _{reator.} Condições: 55°C, pH 8 e três minutos de reação. Experimentos realizados em duplicata.....	149
Tabela 4.32: Concentrações iniciais de substrato utilizadas nos experimentos de longa duração – 10 horas.....	151

ANEXOS I E II

Tabela A1-1: Conteúdo liberado de aminoácidos após hidrólise com tripsina nos seis ensaios realizados. Cromatografia de troca iônica com derivatização pós-coluna com OPA - 72 minutos de análise.....	183
---	-----

Tabela A1-2: Distribuição da massa molecular dos polipeptídeos gerados após ação individual da tripsina sobre proteínas intactas do soro de queijo. Fracionamento desenvolvido por cromatografia de exclusão por tamanho (SE-HPLC).....	184
Tabela A1-3: Graus de hidrólise obtidos após ação sequencial da quimotripsina sobre os polipeptídeos gerados nas hidrólises prévias com tripsina.....	185
Tabela A1-4: Conteúdo liberado de aminoácidos após ação sequencial de quimotripsina. Cromatografia de troca iônica com derivatização pós-coluna com OPA - 72 minutos de análise.....	186
Tabela A1-5: Distribuição da massa molecular dos polipeptídeos gerados após ação sequencial de tripsina e quimotripsina (7 horas de reação).....	187
Tabela A1-6: Porcentagem de aminoácidos liberados após ação sequencial de tripsina, quimotripsina e carboxipeptidase A (45oC, pH 7, 50U _{H-PHE} /gProteína e 7 horas de reação).....	188
Tabela A1-7: Distribuição da massa molecular dos polipeptídeos gerados após ação sequencial de tripsina, quimotripsina (7 horas de reação) e CPA (7 horas de reação e 50U _{H-PHE} /gProteína).....	190
Tabela A2-1: Porcentagem de Phe liberada ao longo das dez horas de hidrólise com CPA (aproximadamente 138U _{H-PHE} /gProteína) para seqüências com GH _T de 1 e 5%.....	192

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	
Figura 2.1: Representação esquemática da formação de uma ligação peptídica.....	15
Figura 2.2: Representação esquemática da hidrólise de uma ligação peptídica catalisada por uma protease (Tardioli, 2003).....	16
Figura 2.3: Estrutura tridimensional da quimotripsina com destaque para o substrato posicionado no sítio ativo da enzima e dois dos resíduos (Ser-195 e His-57) que compõem sua tríade catalítica (Lehninger & Cox, 2000).....	17
Figura 2.4: Mecanismo para a catálise do passo de acilação pela quimotripsina. A His-57 age como uma base geral retirando um próton do grupo hidroxil da Ser-195, enquanto esta ataca o grupo acil do substrato; a His-57 protonada age como doador de próton para o grupo amino de saída; a ligação C-N pode ser rompida e o catalisador regenerado.....	19
Figura 2.5: Representação de uma molécula de tripsina com moléculas de benzamidina, seu inibidor competitivo, devidamente posicionadas nos sítios ativos desta enzima (Lehninger & Cox, 2000).....	20
Figura 2.6: Hidrólise de uma ligação peptídica catalisada pela enzima tripsina.....	21
Figura 2.7: Estrutura tridimensional da carboxipeptidase A com destaque para o íon zinco e resíduos que participam do processo catalítico desta enzima (Lehninger & Cox, 2000)	22
Figura 2.8: Mecanismo de ação simplificado da carboxipeptidase A.....	22
Figura 2.9: Representação esquemática da ligação de uma enzima a um suporte sólido ativado.....	29
Figura 2.10: Classificação dos suportes de acordo com a composição (Zanin, 1989).	29
Figura 2.11: Estrutura química da agarose.....	31
Figura 2.12: Esquema para obtenção de quitina, quitosana e seus monômeros e oligômeros a partir de carapaças de crustáceos (Shahidi <i>et al.</i> , 1999).....	33
Figura 2.13: Estrutura química da quitina (A) e da quitosana (B).....	34
Figura 2.14: Sistema de imobilização/estabilização proposto por Guisán <i>et al.</i> , 1992. Ligação da enzima via seus grupos amino a grupos aldeídos alifáticos moderadamente separados da superfície do suporte.....	39
Figura 2.15: Representação esquemática de um processo cromatográfico (Bidlingmeyer, 1992).....	40
Figura 2.16: Esquema do mecanismo de troca iônica. A ⁺ e B ²⁺ são materiais a serem separados. X ⁺ , Y ⁺ e Z ⁺ são íons contidos nos eluentes 1, 2 e 3, respectivamente.....	41

Figura 2.17: Estrutura organizacional de uma rede neural em camadas.....	43
Figura 2.18: Representação esquemática do mecanismo de inibição competitiva (Lehninger & Cox, 2000).....	49
Figura 2.19: Representação esquemática do mecanismo de inibição não-competitiva ((Lehninger & Cox, 2000).....	50
Figura 2.20: Representação esquemática do mecanismo de inibição acompetitiva ((Lehninger & Cox, 2000).....	50
Figura 2.21: Fator de efetividade interno em função do módulo de Thiele, para diversos valores de concentração de substrato adimensional $\beta_s=C_s/K_m$	53
MATERIAIS E MÉTODOS	38
Figura 3.1: Representação esquemática da preparação do gel de quitosana - sistema de dispersão da solução de quitosana sobre solução coagulante de NaOH (Sistema adaptado de Arruda, 1999).....	62
RESULTADOS E DISCUSSÃO	
Figura 4.1: Desaparecimento de atividade enzimática dos sobrenadantes das suspensões de imobilização de tripsina sobre sepabeads (25°C e pH 8) e gel glioxil-agarose (25°C e pH 10,05). Acompanhamento da atividade da tripsina solúvel.....	84
Figura 4.2: Perfis de atividade da tripsina solúvel e derivados tripsina-glioxil e tripsina-sepabeads durante incubação a 55°C, em tampão borato 25mM e pH 8 por 24 horas.....	86
Figura 4.3: Distribuição dos peptídeos obtida após hidrólise longa de caseína 10g/L, 40°C, pH 8; 0,088mgEnz./mL de solução com (A) <i>tripsina solúvel</i> , (B) <i>tripsina-(Sepabeads-IDA-Glicina)</i> e (C) <i>tripsina-glioxil</i>	89
Figura 4.4: Acompanhamento da velocidade de imobilização da tripsina nas diferentes matrizes de quitosana preparadas: (■) quitosana coagulada em NaOH 1N e ativada em pH 10 – derivado com 10mgEnz./gGel, (♦) quitosana coagulada em NaOH 1N e ativada em pH 10 – derivado com 20mgEnz./gGel, (?) quitosana coagulada em NaOH 1N e ativada em pH 7 – derivado com 10mgEnz./gGel, (?) quitosana coagulada em NaOH 1N e ativada em pH 7 – derivado com 20mgEnz./gGel e (◆) quitosana coagulada em NaOH 0,1N e ativada em pH 7 – derivado com 10mgEnz./gGel. Condições de imobilização: 25°C, pH 10 e suave agitação.....	92
Figura 4.5: Influência da temperatura (A) e do pH (B) na atividade de hidrólise do soro de queijo para tripsina solúvel e derivados imobilizados sobre quitosana (NaOH 1N).....	98
Figura 4.6: Hidrólises máximas das proteínas do soro a 55°C – tripsina solúvel e derivado (matriz coagulada em NaOH 0,1N e ativada a pH 7) contendo 20mgEnz./gGel. E/S _{mássico} de 1/10 e pH 8.....	104

Figura 4.7: Imobilização de diferentes cargas de tripsina em gel glioxil-agarose. Desaparecimento da atividade do sobrenadante da suspensão, surgimento de atividade no gel e acompanhamento do branco ao longo das 24 horas de imobilização.....	107
Figura 4.8: Imobilização de diferentes cargas de quimotripsina em gel glioxil-agarose. Desaparecimento da atividade do sobrenadante da suspensão, surgimento de atividade no gel e acompanhamento do branco ao longo das 24 horas de imobilização.....	107
Figura 4.9: Curvas de inativação térmica para tripsina e quimotripsina solúveis. Incubação em tampão borato sódico 25mM, pH 8 e 50°C.....	111
Figura 4.10: Curvas de inativação térmica para derivados unipontuais de tripsina e quimotripsina. Incubação em tampão borato sódico 25mM, pH 8 e 50°C.....	111
Figura 4.11: Curvas de inativação térmica obtidas a 85°C e pH 8 para derivados de tripsina preparados sobre géis glioxil-agarose com baixa e alta ativação.....	112
Figura 4.12: Curvas de inativação térmica obtidas a 85°C e pH 8 para derivados de tripsina preparados sobre géis glioxil-agarose com baixa e alta ativação.....	113
Figura 4.13: Curvas de inativação térmica a 55°C e pH 8 (tampão borato 25mM) para tripsina e quimotripsina solúveis. Ajuste de modelo matemático (—) aos dados experimentais.....	114
Figura 4.14: Curvas de inativação térmica a 55°C e pH 8 (tampão borato 25mM) para derivados uni e multipontual de tripsina. Ajuste de modelo matemático (—) aos dados experimentais.....	114
Figura 4.15: Curvas de inativação térmica a 55°C e pH 8 (tampão borato 25mM) para derivados uni e multipontual de quimotripsina. Ajuste de modelo matemático (—) aos dados experimentais.....	115
Figura 4.16: Curvas de inativação térmica a 75°C e pH 8 (tampão borato 25mM) para derivados uni e multipontual de tripsina. Ajuste de modelo matemático (—) aos dados experimentais.....	116
Figura 4.17: Curvas de inativação térmica a 75°C e pH 8 (tampão borato 25mM) para derivados uni e multipontual de quimotripsina. Ajuste de modelo matemático (—) aos dados experimentais.....	117
Figura 4.18: Perfis de inativação a pH alcalino (pH 11) para tripsina e quimotripsina solúveis. Ajuste de modelo matemático (—) aos dados experimentais. Condições experimentais: tampão bicarbonato sódico 50mM e 25°C.....	118
Figura 4.19: Perfis de inativação a pH alcalino (pH 11) para derivados multipontuais de tripsina e quimotripsina. Ajuste de modelo matemático (—) aos dados experimentais. Condições experimentais: tampão bicarbonato sódico 50mM e 25°C.....	118
Figura 4.20: Influência da temperatura na determinação da maior atividade de hidrólise do substrato sintético N-Benzoil-L-Arginina-p-Nitroanilida. Reações catalisadas por tripsina solúvel e imobilizada. Experimentos realizados por colorimetria em espectrofotômetro a 405nm e pH 8.....	121

- Figura 4.21:** Influência da temperatura na determinação da maior atividade de hidrólise do substrato sintético N-Benzoil-L-Tirosina-Etil-Éster. Reações catalisadas por quimotripsina solúvel e imobilizada. Experimentos realizados por colorimetria em espectrofotômetro a 258nm e pH 8..... 121
- Figura 4.22:** Influência do pH na determinação da maior atividade de hidrólise do substrato sintético N-Benzoil-L-Arginina-p-Nitroanilida. Reações catalisadas por tripsina solúvel e imobilizada. Experimentos realizados por colorimetria em espectrofotômetro a 405nm e 25°C..... 122
- Figura 4.23:** Influência do pH na determinação da maior atividade de hidrólise do substrato sintético N-Benzoil-L-Tirosina-Etil-Éster. Reações catalisadas por quimotripsina solúvel e imobilizada. Experimentos realizados por colorimetria em espectrofotômetro a 258nm e 25°C..... 122
- Figura 4.24:** Eletroforese SDS-PAGE desnaturante de tripsina, quimotripsina e CPA usando gel de poliacrilamida 15%. *Vials* 1 e 6: padrões de massa molecular Pharmacia (fosforilase b - MM 97.000Da; Soro albumina bovina - MM 66.000Da; Ovoalbumina - MM 45.000Da; Anidrase carbônica - MM 30.000Da; Inibidor de tripsina - MM 20.100Da e α -lactalbumina - MM 14.400Da); *Vials* 2 e 3: CPA Sigma; *Vial* 4: tripsina Sigma e *Vial* 5: quimotripsina Sigma. Em cada *vial* foi aplicado 0,004-0,0115mg de proteína. Tempo de operação: 1h e 50min a 20 mA por placa..... 133
- Figura 4.25:** Representação gráfica do avanço da hidrólise sequencial com quimotripsina após ação prévia de tripsina. Condições: 55°C, pH 8, E/S_{mássico} de 1/18, NaOH 0,2M e 7 horas de reação..... 135
- Figura 4.26:** Superfície-resposta obtida do treinamento da rede neural para liberação de Phe ao longo das 7 horas de reação com CPA..... 139
- Figura 4.27:** Superfície-resposta obtida do treinamento da rede para porcentagem de peptídeos com MM inferior a 1046Da ao longo das 7 horas de reação com a CPA..... 140
- Figura 4.28:** Erros percentuais obtidos da comparação entre pontos experimentais e pontos gerados pela rede para porcentagem de Phe liberada com CPA..... 140
- Figura 4.29:** Erros percentuais obtidos da comparação entre pontos experimentais e pontos gerados pela rede para porcentagem de peptídeos com MM inferior a 1046Da nas 7 horas de reação com a CPA..... 141
- Figura 4.30:** Variação da velocidade inicial de reação (V_i) com a concentração de enzima ($C_{Enz.}$) no reator. Condições de operação: Soro 15g/L, 55°C, pH 8 e 3 minutos de reação..... 146
- Figura 4.31:** Efetividade (razão entre as velocidades aparente, medida na presença de efeitos difusivos, e real, medida na ausência de efeitos difusionais) em função da carga enzimática do derivado utilizado. Condições: Soro 50g/l, V_{soro} de 25mL, NaOH 0,5N e concentração de enzima no reator de 1,5gEnz./L_{reator}..... 148

- Figura 4.32:** Ajuste do modelo de Michaelis-Menten com inibição pelo substrato aos dados experimentais de velocidade inicial de hidrólise de ligações peptídicas hidrolisáveis pela quimotripsina. Condições: 55°C, pH 8 e 3gEnz./L_{reator}. (■) Dados experimentais e (—) Modelo ajustado por busca direta dos parâmetros..... 150
- Figura 4.33:** (A) Representação das hidrólises em bateladas de longa duração para as quatro concentrações de soro utilizadas: (?) $N_o = 6,86$ mmol Lig./L_{reator}; (?) $N_o = 20,85$ mmol Lig./L_{reator}; (?) $N_o = 51,48$ mmol Lig./L_{reator} e (O) $N_o = 85,8$ mmol Lig./L_{reator} e (B) ajuste do modelo de Michaelis-Menten com inibição pelo substrato aos dados experimentais obtidos no ensaio com C_{soro} de 50g/L e N_o de 85,8 mmol Lig./L_{reator}. Condições: 55°C, pH 8 e $C_{Enz.}$ de 4gEnz./L_{reator}..... 151
- Figura 4.34:** Ajuste do modelo de Michaelis-Menten com inibição pelo substrato e pelo produto aos dados experimentais obtidos no ensaio com C_{soro} de 4g/L. Condições: N_o de 6,86 mmol Lig./L_{reator}, 55°C, pH 8 e $C_{Enz.}$ de 4gEnz./L_{reator}..... 152
- Figura 4.35:** Hidrólises em batelada de longa duração das proteínas do soro de queijo catalisadas pela quimotripsina (derivado contendo 40mgEnz./gGel) a 55°C, pH 8 e $C_{Enz.}$ de 4gEnz./L_{reator}. (o) $N_o = 6,86$ mmol Lig./L_{reator}; (∇) $N_o = 20,85$ mmol Lig./L_{reator}; (?) $N_o = 51,48$ mmol Lig./L_{reator} e (☆) $N_o = 85,8$ mmol Lig./L_{reator}; (-) Ajuste do modelo de Michaelis-Menten com inibição pelo substrato e pelo produto com $K_I^{ap} = 0,039$ mmol Lig./L_{reator}..... 153
- Figura 4.36:** Dados experimentais expressos em termos de conversão para as quatro bateladas de longa duração realizadas..... 154
- Figura 4.37:** (A) Ajuste do modelo matemático representado pela Eq. 4.7 aos dados experimentais obtidos nas quatro bateladas de longa duração e (B) ajuste do modelo aos dados expressos em termos de conversão. (o) $N_o = 6,86$ mmol Lig./L_{reator}; (∇) $N_o = 20,85$ mmol Lig./L_{reator}; (?) $N_o = 51,48$ mmol Lig./L_{reator} e (☆) $N_o = 85,8$ mmol Lig./L_{reator}..... 156
- Figura 4.38:** (A) Ajuste do modelo matemático representado pela Eq. 4.8 aos dados experimentais obtidos nas quatro bateladas de longa duração e (B) ajuste do modelo aos dados expressos em termos de conversão. (o) $N_o = 6,86$ mmol Lig./L_{reator}; (∇) $N_o = 20,85$ mmol Lig./L_{reator}; (?) $N_o = 51,48$ mmol Lig./L_{reator} e (☆) $N_o = 85,8$ mmol Lig./L_{reator}..... 157
- Figura 4.39:** Comportamento de um sistema com ordem variável caracterizado pela mudança de alta ordem para baixa ordem quando a concentração de substrato diminui. Teste feito para $N_o = 20,85$ mmol Lig./L_{reator}..... 158
- Figura 4.40:** (A) Investigação da ordem 3 e (B) ordem 4. $N_o = 20,85$ mmol Lig./L_{reator}..... 159
- Figura 4.41:** (A) Ajuste do modelo matemático representado pela Eq. 4.14 aos dados experimentais obtidos nas quatro bateladas de longa duração e (B) ajuste aos dados expressos em termos de conversão. (o) $N_o = 6,86$ mmol Lig./L_{reator}; (∇) $N_o = 20,85$ mmol Lig./L_{reator}; (?) $N_o = 51,48$ mmol Lig./L_{reator} e (☆) $N_o = 85,8$ mmol Lig./L_{reator}..... 160

Figura 4.42: Determinação do valor n (Eq. 4.17) através dos coeficientes angulares das retas de $\ln(P)$ versus $\ln(t)$, para as quatro bateladas de longa duração realizadas: (o) $N_o = 6,86$ mmol Lig./ L_{reator} ; (Δ) $N_o = 20,85$ mmol Lig./ L_{reator} ; (?) $N_o = 51,48$ mmol Lig./ L_{reator} e (\star) $N_o = 85,8$ mmol Lig./ L_{reator} 161

Figura 4.43: (A) Ajuste do modelo matemático representado pela Eq. 4.20, para tempos reacionais superiores a 5 minutos, aos dados experimentais nas quatro bateladas de longa duração e (B) ajuste aos dados expressos em termos de conversão. (o) $N_o = 6,86$ mmol Lig./ L_{reator} ; (∇) $N_o = 20,85$ mmol Lig./ L_{reator} ; (?) $N_o = 51,48$ mmol Lig./ L_{reator} e (\star) $N_o = 85,8$ mmol Lig./ L_{reator} 162

Figura 4.44: (A) Ajuste do modelo matemático representado pelas Eqs. 4.20 e 4.21 aos dados experimentais nas quatro bateladas de longa duração e (B) ajuste aos dados expressos em termos de conversão. (o) $N_o = 6,86$ mmol Lig./ L_{reator} ; (∇) $N_o = 20,85$ mmol Lig./ L_{reator} ; (?) $N_o = 51,48$ mmol Lig./ L_{reator} e (\star) $N_o = 85,8$ mmol Lig./ L_{reator} 163

ANEXOS I E II

Figura A1-1: Fracionamento do soro de queijo após ser submetido a diferentes graus de hidrólise com a endopeptidase tripsina. Cromatografia de exclusão por tamanho..... 184

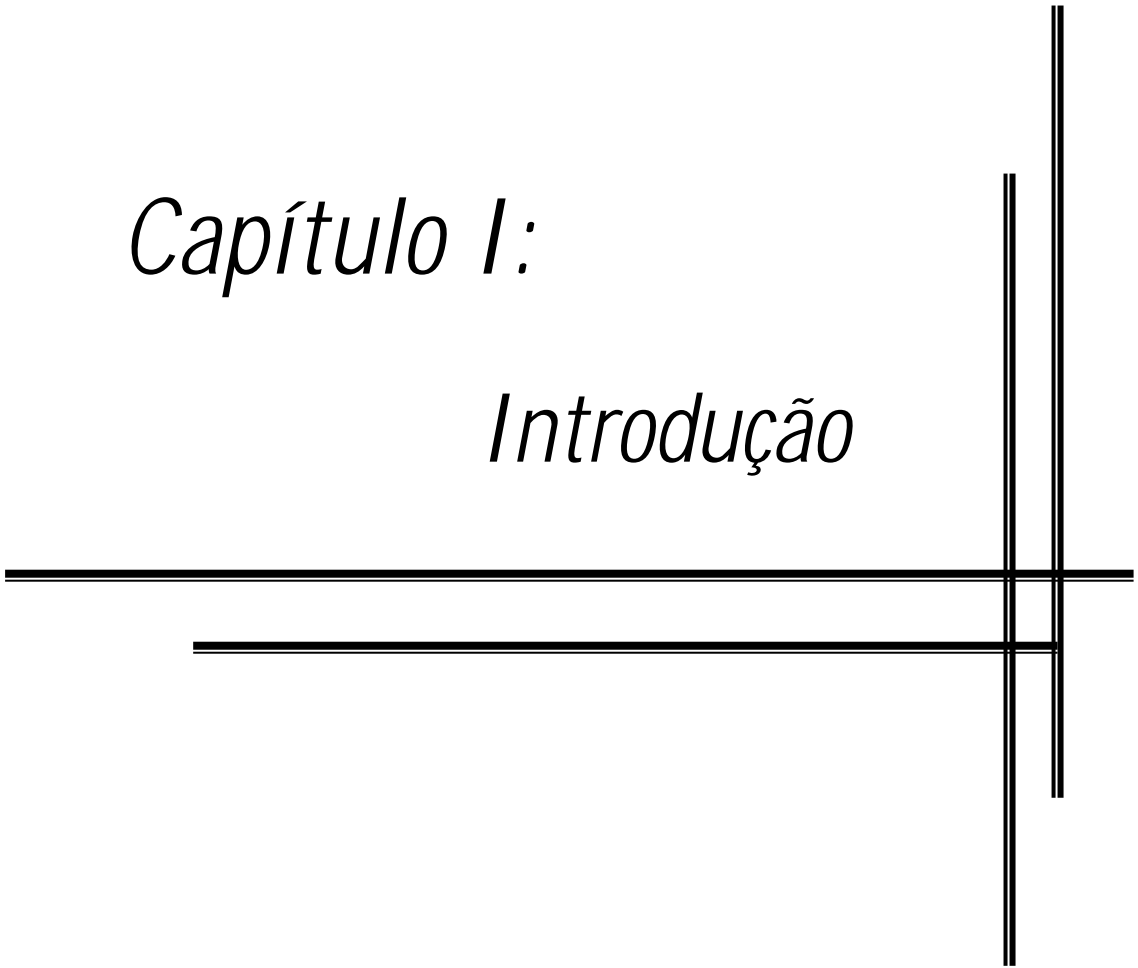
Figura A1-2: Fracionamento dos hidrolisados obtidos após ação seqüencial de tripsina e quimotripsina: (A) GHT de 2% e GHQ de 8,22%; (B) GHT de 4% e GHQ de 7,91%; (C) GHT de 6% e GHQ de 6,78%; (D) GHT de 8% e GHQ de 5,22%; (E) GHT de 10% e GHQ de 4,04% e (F) GHT de 12% e GHQ de 3,99%. Cromatografia de exclusão por tamanho..... 187

Figura A1-3: Fracionamento dos hidrolisados obtidos após ação seqüencial de tripsina, quimotripsina e carboxipeptidase A: (A) GHT de 2%, GHQ de 8,22% e 7hCPA; (B) GHT de 4%, GHQ de 7,91% e 7hCPA; (C) GHT de 6%, GHQ de 6,78% e 7hCPA; (D) GHT de 8%, GHQ de 5,22% e 7hCPA; (E) GHT de 10%, GHQ de 4,04% e 7hCPA e (F) GHT de 12%, GHQ de 3,99% e 7hCPA. Cromatografia de exclusão por tamanho (SE-HPLC)..... 190

Figura A2-1: Comparação do conteúdo liberado de Phe nos experimentos com mesmos graus de hidrólise iniciais com tripsina (2, 4, 6, 8, 10 e 12%) e diferentes tempos (7 e 10 horas) e concentrações de enzima nas etapas desenvolvidas com quimotripsina (0,67 e 1,73mgEnz./mL de solução) e carboxipeptidase A (50 e 138UH-PHE/gProteína)..... 191

Capítulo I:

Introdução



1. INTRODUÇÃO

O soro de queijo é um subproduto de grande relevância na indústria queijeira, tendo em vista sua composição nutricional (alto teor de lactose e aproximadamente 7,0g/L de proteína) e o elevado volume produzido. Segundo dados da Associação Brasileira de Manufatura de Queijo (Abiq), o Brasil possui 500 indústrias produzindo um total de 516 mil toneladas de queijo por ano, e, conseqüentemente, 4,7 milhões de toneladas de soro, pois com 100 litros de leite são produzidos em média 10 quilos de queijo e aproximadamente 90 litros de soro - Kosikowski, 1979; http://www.portaldovoluntario.org.br/sala/exibe_art.asp?id=5834, matéria publicada em 17/06/2004. Responsável por quase metade desta produção, o estado de Minas Gerais gera aproximadamente dois bilhões de litros de soro.

Segundo Neves (1993), o soro de queijo pode ser analisado sob dois diferentes aspectos: 1- como agente poluidor, se descartado diretamente nos efluentes, pois a descarga de soro em cursos d'água pode provocar a destruição da flora e da fauna devido à sua alta demanda bioquímica de oxigênio (DBO), que varia de 30.000 a 40.000 mg de O₂ por litro de soro; e 2- como produto nobre, pelo seu teor de proteínas solúveis (ricas em aminoácidos essenciais), vitaminas do grupo B e elevado teor de lactose e sais.

O custo do tratamento de efluentes por pequenas e médias empresas (curtumes, abatedouros, indústrias de laticínios, de pescados, de extração de óleos vegetais, dentre outras), em muitos casos, não é assimilável e a preocupação com o controle ambiental por si só, muitas vezes, não é suficiente para justificar investimentos nesta área - Resende, 2002.

O valor nutricional do soro de leite e os elevados recursos financeiros necessários ao seu adequado tratamento, caso seja considerado efluente, fazem com que as técnicas que viabilizam sua transformação em um produto comercialmente valioso se tornem cada vez mais atraentes; particularmente, em função do expressivo volume gerado deste resíduo. Assim, este subproduto começa a ser visto como uma fonte potencial de matéria-prima para as indústrias de alimentos, farmacêutica e química.

O soro de queijo *in natura* pode ser utilizado sem ser submetido a nenhuma espécie de tratamento prévio na suplementação alimentar de animais, na irrigação do solo, enriquecimento de pastagens, etc. No entanto, quando destinado à produção de bebidas lácteas fermentadas, enriquecimento de sucos de frutas e refrigerantes,

processos fermentativos, preparação de hidrolisados protéicos para fins alimentícios, dentre outros, este deve passar por algum tratamento preliminar - Gonsález Siso, 1996.

Inúmeras aplicações para os hidrolisados protéicos são amplamente conhecidas, dentre elas pode-se citar: utilização como complemento nutricional para atletas, pessoas que não conseguem digerir satisfatoriamente proteínas intactas e idosos (sendo, nestes casos, utilizados concentrados de aminoácidos livres ou de hidrolisados parciais), como aromatizantes, cosméticos, substrato para cultivo de microrganismos e etc. A remoção de aminoácidos hidrofóbicos desses preparados protéicos, como por exemplo a fenilalanina (Phe), apresenta duas vantagens principais: 1- elimina o inconveniente sabor amargo associado a estes aminoácidos, de grande importância quando estes são utilizados como complemento nutricional ou na indústria alimentícia de modo geral e 2- são de utilização imediata no tratamento de portadores de fenilcetonúria, doença genética na qual ocorre uma deficiência do sistema fenilalanina hidroxilase hepático, que converte a fenilalanina em tirosina (Tyr), devido a um erro inato do metabolismo. O mecanismo de danos causados por esta doença parece estar relacionado ao acúmulo de metabólitos tóxicos no cérebro, além do alto nível plasmático de fenilalanina gerar competição de transporte entre outros aminoácidos hidrofóbicos para o cérebro - Oldendorf & Szabo, 1976; Kaufman, 1989.

A grande diferença entre a produção de hidrolisados protéicos contendo pequenos peptídeos daqueles contendo apenas aminoácidos livres está na necessidade de se utilizar enzimas para controlar a composição do hidrolisado. Porém, ao se empregar enzimas em processos industriais faz-se necessário imobilizá-las e estabilizá-las, pois são solúveis e em sua grande maioria, frágeis operacionalmente, o que requer, portanto, uso de tecnologia para viabilizar comercialmente seu uso.

É facilmente justificável, assim, a mobilização de esforços no sentido de desenvolver processos que permitam agregar valor a resíduos protéicos, transformando-os em produtos comercializáveis.

O presente trabalho de doutoramento está inserido em um amplo projeto de pesquisa atualmente em fase de conclusão no DEQ-UFSCar que tem demonstrado ser de grande interesse da Cooperativa de Laticínios São Carlos, integrante da Cooperativa Paulista de Laticínios. O projeto visa a obtenção de hidrolisado de proteínas do soro de queijo com teor reduzido de aminoácidos aromáticos, a partir da hidrólise das proteínas presentes nesta matéria-prima. Para isso, o soro de queijo *in natura* seria inicialmente concentrado e, em seguida, submetido à hidrólise sequencial com quatro diferentes

proteases. A primeira delas, tripsina (endoprotease específica para resíduos de lisina e arginina na porção carboxílica da ligação), a seguir quimotripsina (endoprotease específica para resíduos hidrofóbicos - fenilalanina, tirosina e triptofano - na porção carboxílica da ligação) e a terceira carboxipeptidase A (exoprotease específica para resíduos hidrofóbicos carboxílico-terminais). Assim, a primeira etapa de hidrólise teria como objetivo promover o desdobramento das moléculas de proteína (que são globulares) e expor os resíduos hidrofóbicos (dentre eles também os aromáticos) para ação posterior da quimotripsina. Na segunda etapa do processo, a quimotripsina produziria polipeptídeos com resíduos hidrofóbicos (entre eles os aromáticos) nas terminações carboxílicas. Na terceira etapa, os aminoácidos aromáticos, como a fenilalanina, seriam preferencialmente removidos das cadeias polipeptídicas pela ação da carboxipeptidase A. Após esta etapa, os aminoácidos livres seriam removidos do meio reacional por diafiltração e os oligopeptídeos resultantes submetidos à quarta e última etapa de hidrólise com Alcalase[®], uma endopeptidase de baixa especificidade. Nesta etapa, o produto final seria obtido, ou seja, um hidrolisado composto por pequenos peptídeos e com baixo teor de aminoácidos aromáticos.

É conveniente ressaltar que na produção de um hidrolisado desta natureza, a utilização de enzimas imobilizadas em suportes insolúveis é de fundamental importância, pois como os biocatalisadores imobilizados são facilmente recuperáveis e estáveis termicamente, seriam evitados problemas como perda das enzimas ao final do processo bem como contaminação do meio pelo uso de temperaturas mais altas que as biológicas. Essas vantagens apontam na direção da utilização de enzimas imobilizadas/estabilizadas para produção industrial de hidrolisados protéicos.

A técnica de imobilização multipontual das enzimas de interesse em gel de agarose vem sendo aperfeiçoada há vários anos pelo grupo do Dr. Guisán (Instituto de Catálisis y Petroleoquímica de Madrid - Espanha) e, desde 1993, também no DEQ/UFSCar com a colaboração deste pesquisador. Este mesmo grupo também vem, mais recentemente, desenvolvendo estudos sobre imobilização de enzimas em suportes epóxidos (Sepabeads, Eupergit C e outros - Mateo, 2000; Mateo *et al.*, 2002; Pessela *et al.*, 2003). Estudos sobre imobilização de enzimas sobre quitosana também têm sido aqui desenvolvidos e este suporte tem se mostrado adequado para esta finalidade - Manrich *et al.*, 2003; Galvão & Giordano, 2003.

Este trabalho de doutorado visou, portanto, auxiliar no cumprimento do projeto multidisciplinar anteriormente exposto, estudando as duas primeiras hidrólises com

tripsina e quimotripsina imobilizadas e estabilizadas, tendo os seguintes objetivos específicos:

- 1) Obtenção de derivados estáveis de tripsina em três diferentes suportes: sepabeads, quitosana e agarose;
 - 2) Obtenção de derivados estáveis de quimotripsina em gel glioxil-agarose;
 - 3) Comparação do desempenho dos derivados de tripsina preparados sobre sepabeads, quitosana e agarose e derivados de quimotripsina preparados sobre gel de agarose com o das correspondentes enzimas na forma solúvel na hidrólise de substratos macromoleculares;
 - 4) Estudo da hidrólise seqüencial das proteínas do soro de queijo com derivados de tripsina e quimotripsina preparados sobre gel glioxil-agarose;
 - 5) Estudo cinético da hidrólise das proteínas do soro catalisada por quimotripsina imobilizada em gel de agarose ativado com grupos glioxil.
-

Capítulo II:

Revisão Bibliográfica



2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Neste item serão abordados temas pertinentes a este trabalho, sendo os mais relevantes: o leite; o soro de queijo e suas proteínas; enzimas, como tripsina, quimotripsina e carboxipeptidase A; imobilização e estabilização de enzimas; hidrólise enzimática de proteínas e cinética da hidrólise das proteínas do soro catalisada por quimotripsina.

2.1. O LEITE E SUAS PROTEÍNAS

O leite é um produto secretado pelas glândulas mamárias dos mamíferos e pode ser definido como sendo uma emulsão de coloração branca, aroma suave e gosto ligeiramente adocicado. Este líquido é uma suspensão de matérias protéicas num soro, sendo constituído por uma solução neutra que contém, principalmente, lactose, gordura e sais minerais - Alais, 1985.

É uma relevante fonte de proteínas de origem animal e tem grande importância na alimentação de animais jovens e adultos de todas as idades. As proteínas lácteas são de todas as existentes as mais completas e as que possuem todos os elementos indispensáveis à primeira fase da vida de todos os mamíferos. Sua composição varia grandemente em espécies diferentes, principalmente no que diz respeito aos teores de proteína, gordura e lactose - Sgarbieri, 1996. Na Tabela 2.1 são apresentadas proporções relativas dos macrocomponentes do leite de algumas espécies.

As proteínas do leite podem ser classificadas em quatro grupos: caseínas (α _{S1}-caseínas, β -caseínas, κ -caseínas e quantidades variáveis de γ -caseínas), proteínas do soro (α -lactalbumina (16%), β -lactoglobulina (49%), soroalbumina bovina (5%) e imunoglobulinas (10%)), proteínas de membrana e outras.

Tabela 2.1: Composição do leite de várias espécies (% p/v).

Espécie	Água	Proteínas	Gordura	Lactose	Cinzas
Homem	87,6	1,4	4,0	6,8	0,22
Cabra	84,7	3,9	5,0	4,2	0,81
Búfala	80,8	5,2	9,2	4,3	0,81
Elefanta	67,8	3,1	19,6	8,8	0,65
Coelha	71,3	11,5	12,9	1,9	2,39
Vaca	87,3	3,3	3,8	4,9	0,72

Fonte: Tabela modificada de Sgarbieri, 1996.

Além da grande importância na alimentação (boa composição em aminoácidos essenciais e elevada digestibilidade) as proteínas do leite encontram inúmeras aplicações industriais em consequência de suas propriedades funcionais (espumantes, emulsificantes, gelificantes, formação de fibras de proteínas e etc). A caseína, por exemplo, pode ser utilizada na fabricação de papel, colas, adesivos, tintas e vernizes, na indústria têxtil e de couro, dentre outras.

A produção de leite no Brasil evoluiu nos últimos anos e em 2003 superou a casa dos 23 bilhões de litros produzidos. No entanto, este montante ainda é considerado baixo quando comparado ao dos EUA, que neste mesmo ano ultrapassou o limite dos 78 bilhões de litros produzidos - Dados do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2003 - <http://www.cnpqgl.embrapa.br/producao/producao.php>.

2.2. O SORO DE QUEIJO

O soro é a porção aquosa que se separa do coalho durante o processo convencional de fabricação de queijo. É um fluido opaco, de coloração amarelo-esverdeada, sabor salgado e, como a maioria dos produtos derivados do leite, perecível. Representa de 85 a 95% do volume inicial do leite e retém cerca de 55% dos seus nutrientes, sendo a lactose (4,5-5% p/v), as proteínas solúveis (0,6-0,8% p/v) os lipídios (0,4-0,5% p/v) e os sais minerais (8-10% de extrato seco) os mais abundantes. Além desses, também apresenta quantidades apreciáveis de outros compostos, tais como ácidos láctico e cítrico, compostos nitrogenados não protéicos (uréia e ácido úrico), vitaminas do grupo B, etc - González-Siso, 1996; Ponsano *et al.*, 1992; Richards, 1997.

O tipo de soro produzido nas indústrias de laticínios e sua composição dependem do tipo de queijo fabricado e dos processos tecnológicos utilizados na sua

produção - Marwaha & Kennedy, 1988. Se a remoção da caseína é feita pela adição de ácido (pH 4,6) o soro é denominado *soro ácido*; se feita pela ação da enzima renina tem-se o *soro doce*, que contém, em geral, maior quantidade de peptídeos e aminoácidos livres resultantes da ação da renina sobre as caseínas, o que o torna substância de interesse para a indústria alimentícia. A partir dessas classes, variantes como o soro desmineralizado, o soro deslactosado, desproteínizado, enriquecido com gordura, dentre outros, podem ser encontradas.

Segundo Neves (1993), o soro de queijo pode ser analisado sob dois diferentes aspectos: 1- como agente poluidor, se descartado diretamente nos efluentes, pois a descarga de soro em cursos d'água pode provocar a destruição da flora e fauna devido à sua alta demanda bioquímica de oxigênio (DBO), que varia de 30.000 a 40.000 mg de O₂ por litro de soro; e 2- como produto nobre, pelo seu teor de proteínas solúveis (ricas em aminoácidos essenciais), vitaminas do grupo B e elevado teor de lactose e sais.

No Brasil, o consumo de queijo tem atingido níveis recordes de consumo nos últimos anos e continua em ascensão. Aliada a estes dados está a necessidade de criar alternativas para a utilização do soro, pois o tratamento de efluentes dessa natureza é dispendioso e este subproduto é rico em diversos nutrientes, podendo ser empregado diretamente ou ter seus componentes utilizados na formulação de vários alimentos: bebidas lácteas, leites fermentados, mistura em sucos, entre outros. A Tabela 2.2, ilustrada a seguir, apresenta alguns dados referentes à produção nacional de queijo e de soro.

Tabela 2.2: Produção nacional anual de queijo, soro e seus principais componentes.

Produto	Produção anual em toneladas
Queijo	516.000
Soro de Queijo	4.644.000
Lactose	232.200
Proteínas	41.796
Sais Minerais	27.864
Gordura	13.932

Fonte: http://www.portaldovoluntario.org.br/sala/exibe_art.asp?id=5834, matéria publicada em 17/06/2004.

Diante dos dados apresentados na Tabela 2.2, percebe-se que descartar soro sem um tratamento preliminar eficiente não é só um crime previsto por lei, mas constitui prática antieconômica e até mesmo anti-social, não só devido à carência mundial de alimentos, mas também pelo caráter sazonal e inconstante da produção de leite - Juliano *et al.*, 1987; Richards, 1997; Santos & Ferreira, 2001.

Diversos métodos podem ser aplicados para o aproveitamento do soro. Dentre eles, as técnicas de filtração com membranas permitem a separação de frações de componentes de diversos tamanhos moleculares e cargas químicas presentes em alimentos líquidos como leite ou soro. Estas técnicas são satisfatoriamente empregadas, por exemplo, na obtenção de produtos funcionais como os peptídeos bioativos, que são baseados na modificação enzimática ou microbiológica dos componentes lácteos tradicionais. A concentração das proteínas do soro pode ser eficientemente realizada utilizando-se a técnica de ultrafiltração, onde o soro é separado em duas partes: permeado e retentado. O permeado é composto basicamente por lactose e o retentado é formado por aproximadamente 85% de proteína (p/p) e 15% de lactose (p/p), além de quantidades vestigiais de minerais e vitaminas - Revista Ciência Hoje, Ciência em Dia, matéria publicada em 07/11/2002.

Analisando a situação e as tendências da indústria de laticínios nacional, pode-se notar o interesse do setor em continuar investindo e expandindo seus negócios. Este é, portanto, o momento oportuno para analisar o impacto econômico que a industrialização e a comercialização otimizadas do soro e seus derivados podem ter para a indústria. Assim, uma iniciativa inteligente seria centrar esforços no sentido de otimizar o uso de soro resultante da fabricação de queijos, uma vez que este é um promissor campo de estudo, importante social, ecológica e economicamente - Revista Food Ingredients, Seção Pesquisas & Inovações, Jan/Fev, 2003.

2.2.1. AS PROTEÍNAS DO SORO

As proteínas do soro são um conjunto heterogêneo de proteínas que representa aproximadamente 20% do total da proteína láctea, possui várias proteínas muito diferentes entre si e muitas delas têm funcionalidade fisiológica. As duas principais proteínas do soro, α -lactalbumina e β -lactoglobulina, perfazem aproximadamente 70% das proteínas totais do soro. Além dessas, também são encontradas a soroalbumina,

imunoglobulinas, proteose-peptonas, lactoferrina, transferrina e enzimas, como a lactoperoxidase - Sgarbieri, 1996.

A importância funcional, nutricional e a grande diversidade de proteínas presentes no soro explicam o elevado interesse no estudo da composição desta fração. Desse interesse, tem resultado um acentuado desenvolvimento de métodos analíticos que incluem técnicas para identificação, separação e quantificação dessas proteínas. Em relação aos métodos de dosagem de proteínas, esses podem ser conduzidos através da degradação dessas espécies por diferentes rotas. No entanto, nem todas são aplicáveis de forma eficaz a produtos alimentícios. O método de Kjeldahl é um dos mais empregados para determinação de proteínas em produtos lácteos. Este método foi publicado pela primeira vez em 1883 por Kjeldahl, continuando, hoje em dia, a ser considerado um método de referência para determinação de proteínas e material não-protéico (azoto) em alimentos - Grappin & Ribadeau-Dumas, 1992.

Proteínas do soro são brandas quanto ao sabor e, comparadas às caseínas, têm menos *flavour* de leite e menor tendência a mascarar sabores adicionados a iogurtes e bebidas lácteas, por exemplo. Melhorias adicionais no sabor resultam quando as proteínas do soro substituem o amido ou outro emulsificante adicionado a estes produtos. Com relação ao aspecto calórico, alimentos com alto teor protéico produzem maior sensação de saciedade nos consumidores diminuindo, conseqüentemente, o apetite. Tradicionalmente, derivados do soro têm sido utilizados por motivo de redução de custos, mas também se deve levar em conta o real benefício da adição dos derivados do soro em certos alimentos: enriquecimento do valor nutricional e melhorias na textura, *flavour*, viscosidade e propriedades nutracêuticas - Revista Food Ingredients, Seção Pesquisas & Inovações, Jan/Fev, 2003.

As proteínas do soro possuem um dos mais altos índices de valor biológico em comparação a outras fontes de proteínas, tais como ovos, leite, carne bovina, soja e caseína. O uso dessas proteínas como ingredientes em alimentos funcionais lácteos e não-lácteos está aumentando progressivamente conforme tem aumentado a capacidade tecnológica das indústrias de produzir concentrados de proteínas do soro (CPS), isolados de proteínas séricas totais ou, mais recentemente, concentrados ricos em frações específicas de proteínas de soro - The US Dairy Export Council, 2000. Essas proteínas vêm sendo usadas em larga escala em países desenvolvidos. No Brasil, isso ainda não ocorre em razão da falta de sofisticação dos laticínios. Para produzir o queijo, as fábricas promovem a coagulação do leite por intermédio de um tratamento térmico,

que também tem a função de combater as bactérias. Após a coagulação, obtém-se a caseína e o soro. No entanto, esse aquecimento praticamente elimina as propriedades funcionais das proteínas do soro, situação agravada pela adição de sal no início do processo. Nos países desenvolvidos a coagulação do leite é feita sem aquecimento e, deste modo, toda a funcionalidade das propriedades fisiológicas das proteínas nativas é preservada - *Jornal da Unicamp*, vol. 194, outubro/2002.

Estudos desenvolvidos por pesquisadores da Universidade Estadual de Campinas (Unicamp) e do Instituto de Tecnologia de Alimentos (Ital) têm demonstrado que as proteínas do soro do leite bovino melhoram o funcionamento do sistema imunológico. Este estudo, apesar de ainda não estar completamente concluído, já obteve bons resultados em crianças portadoras do vírus HIV, às quais foi ministrado um suplemento protéico feito a partir do soro do leite. Resultados similares também foram observados através da realização de estudos baseados em dietas que priorizam as proteínas do soro; comprovou-se um forte efeito estimulante do sistema imunológico, especialmente em combinação com os fosfolipídios do soro; um efeito de diminuição do colesterol LDL e um aumento na produção de colecistoquinina, substância implicada na supressão do apetite - Bounous *et al.*, 1991.

2.2.1.1. A α -LACTALBUMINA (α -La)

A designação α desta proteína deriva do fato de ser a primeira banda do perfil de ultracentrifugação. Sua propriedade mais característica é a tendência a formar associações em pHs abaixo de seu ponto isoelétrico. No pH natural do leite (6,6) e acima dele, a α -lactalbumina aparece como monômero - Sgarbieri, 1996. Desempenha papel importante como proteína modificadora da síntese de lactose pelas glândulas mamárias, sendo, assim, a principal proteína do leite humano.

Duas variantes da α -lactalbumina (A e B) já foram identificadas, mas somente a variante B tem sido observada em leites de raças bovinas ocidentais. Esta variante contém 123 resíduos de aminoácidos, massa molecular (MM) de 14.176Da e está presente no soro de queijo em concentrações que variam de 0,6 a 1,7g/L. Esta proteína apresenta-se na forma esférica e tem estrutura globular bastante compacta - Morr & Ha, 1993.

2.2.1.2. A β -LACTOGLOBULINA (β -Lg)

A β -lactoglobulina foi a primeira proteína do leite a ser cristalizada e a designação β refere-se ao fato de aparecer como segunda banda no perfil de ultracentrifugação do soro de leite. Da mesma forma que as caseínas, a β -Lg também apresenta polimorfismo genético (variantes A, B e C). É constituída por 162 aminoácidos, tem massa molecular em torno de 18.000Da e está presente no soro de queijo em concentrações que variam de 2 a 4g/L - Morr & Ha, 1993.

Nos pHs 5,1 e 6,7 a β -Lg se apresenta como um dímero estável, constituído por duas unidades esféricas. Em pH menor que 3,0 ou maior que 8,0, os dímeros se dissociam em monômeros. Na faixa de pH entre 5,1 e 3,8 (abaixo do pI) esta proteína tende a formar octâmeros a baixas temperaturas e elevadas concentrações de proteína - Sgarbieri, 1996.

2.2.1.3. A SOROALBUMINA BOVINA (BSA)

Esta proteína tem sido isolada na forma cristalina a partir do soro de leite e parece ser idêntica à proteína encontrada no soro sanguíneo. Apresenta um grupo sulfidrilo (-SH) livre na posição 34 (N-terminal) e 17 pontes dissulfeto intramoleculares. Em pHs baixos ocorrem associações intermoleculares que são aparentes na eletroforese - Sgarbieri, 1996.

A soroalbumina bovina é constituída por 582 resíduos de aminoácidos, tem massa molecular de aproximadamente 66.000Da e está presente no soro em concentrações que variam de 0,1 a 0,4g/L - Morr & Ha, 1993.

2.2.1.4. AS IMUNOGLOBULINAS (Ig)

As imunoglobulinas referem-se a uma família de proteínas de elevado peso molecular, com propriedades físicas, químicas e imunológicas semelhantes. Todas as imunoglobulinas são monômeros ou oligômeros de moléculas constituídas por quatro cadeias polipeptídicas: duas leves (MM 20.000Da) e duas pesadas (MM 50.000-70.000Da), que estão ligadas por pontes dissulfeto. A estrutura contém ainda um número variável de pontes dissulfeto intramolecular. Existem três classes gerais de

imunoglobulinas: IgG (G₁ e G₂); IgA e IgM - Sgarbieri, 1996. Esta proteína está presente no soro em concentrações que variam de 0,4 a 1,0g/L - Morr & Ha, 1993.

2.2.2. A LACTOSE

Os glicídios ou açúcares do leite são essencialmente constituídos por lactose, cujo teor médio é de 4,5 a 5,0g/L. Está inteiramente em dissolução no leite e mesmo sem nenhum tratamento térmico prévio cerca de 11% do açúcar encontra-se naturalmente ligado às proteínas.

A lactose refinada, obtida do permeado da ultrafiltração do soro de queijo, pode ser utilizada na indústria farmacêutica (conferindo compressibilidade, lubrificação e firmeza na confecção de comprimidos, no revestimento de pílulas, produção de penicilina, cosméticos, entre outros), na indústria química (produção de ácidos láctico e cítrico, corantes e espumas de poliuretano) e na indústria alimentícia - Ponsano *et al.*, 1992; Richards, 1997.

A lactose alimentícia (pureza superior a 98%) é utilizada em bebidas (especialmente as achocolatadas e de frutas, porque realça o seu sabor aumentando a aceitação dos produtos), em confeitarias, na fabricação de biscoitos, bolachas, pães, alimentos dietéticos e na charcutaria, com a função de absorver os aromas e os corantes.

Um dos grandes problemas fisiológicos associados à lactose é a deficiência em lactase (enzima responsável pela degradação da lactose) em certos indivíduos, que os torna intolerantes a este açúcar, sendo tal deficiência mais comum em negros americanos e africanos, japoneses, filipinos e índios da América do Sul - Valsechi, 2001.

2.3. ENZIMAS

Com exceção de um pequeno grupo de moléculas catalíticas de RNA todas as enzimas são proteínas. Conhecendo-se este fato, pode-se definir a grande maioria das enzimas como sendo proteínas globulares formadas por resíduos de aminoácidos unidos por ligações peptídicas. Os aminoácidos que constituem as enzimas ou proteínas são aminoácidos essenciais do tipo α (com exceção da prolina) e se apresentam na configuração L. No total, são vinte aminoácidos que, de acordo com sua estrutura química, podem ser divididos em não-polares, polares, carregados e não-carregados. As

propriedades funcionais das enzimas dependem essencialmente do número e distribuição de tais resíduos ao longo da cadeia protéica - Illanes, 1994. A Figura 2.1 mostra esquematicamente uma ligação peptídica.

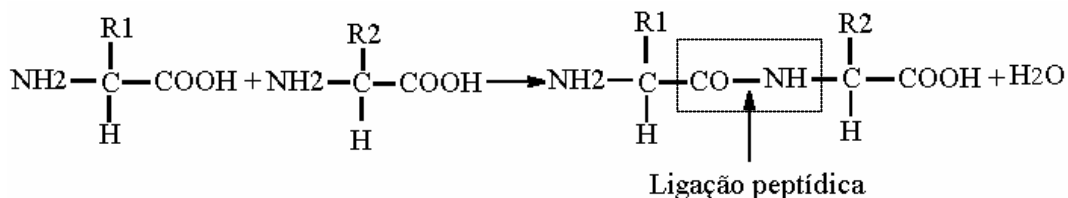


Figura 2.1: Representação esquemática de uma ligação peptídica.

Essencialmente, as enzimas apresentam três propriedades principais: estabilidade, atividade e especificidade.

Estabilidade: a capacidade catalítica de uma enzima depende da manutenção da sua estrutura nativa, que, por sua vez, é dependente de muitas forças de interação (pontes de hidrogênio e pontes dissulfeto, forças de van de Waals, interações apolares e iônicas). Alterações no ambiente reacional, inclusive as mais suaves, podem debilitar essas interações, alterando a estrutura tridimensional nativa e ocasionando perda parcial ou total de sua funcionalidade biológica. Assim, variações na temperatura, pH força iônica e presença de solventes apolares podem afetar a estabilidade das enzimas.

Atividade: esta propriedade essencial das enzimas atua diminuindo a energia de ativação requerida para a transformação de um substrato em produto e, conseqüentemente, aumentando a velocidade do sistema reacional em questão. A capacidade catalítica da enzima reside no seu sítio ativo e este, por sua vez, compreende um número muito reduzido de aminoácidos. O sítio ativo de uma enzima é uma estrutura complexa cuja configuração permite alojar a molécula de substrato na posição correta para que os grupos funcionais da enzima efetuem sua transformação química.

Especificidade: a especificidade define a afinidade de uma enzima por grupos específicos em um determinado substrato. Esta é uma propriedade imprescindível das enzimas enquanto catalisadores. Duas características estruturais são determinantes na especificidade da enzima: o substrato possui ligações químicas que podem ser atacadas pelos grupos funcionais do sítio ativo da enzima e o substrato possui grupos funcionais que se unem à enzima permitindo seu correto alinhamento no sítio ativo para que a reação possa, de fato, ocorrer.

O perfeito funcionamento das enzimas requer certas condições específicas, pois estas moléculas demonstram sua mais expressiva atividade em faixas bastante estreitas de pH e temperatura. As extremozimas constituem uma exceção a essa regra, já que essas enzimas, produzidas por bactérias extremófilas, são ativas sob circunstâncias extremas presentes em ambientes extremos. Os extremófilos são microrganismos que suportam facilmente altas temperaturas (termófilos), frio extremo, como a Antártica, geleiras dos Alpes e mares polares frios (organismos psicofílicos), lagos de elevada salinidade (halófilos) e ambientes extremamente ácidos (acidófilos) ou alcalinos (alcalinófilos), altas pressões ou ambientes ricos em metais tóxicos (metalófilos).

A descoberta de organismos extremófilos abre novas oportunidades para o desenvolvimento de enzimas que apresentam atividade sob circunstâncias extremas (as extremozimas), encontradas com frequência em processos industriais. As enzimas próprias de microrganismos comuns se mostram muitas vezes delicadas demais para a aplicação na maioria dos processos industriais. Os extremófilos podem, portanto, vir a preencher o vão entre processos biológicos e químicos.

2.3.1. ENZIMAS PROTEOLÍTICAS

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

Na proteólise de uma ligação peptídica, uma molécula de água reage com um grupo carbonil peptídico e a ligação com o grupo amino do aminoácido seguinte é rompida - Figura 2.2.

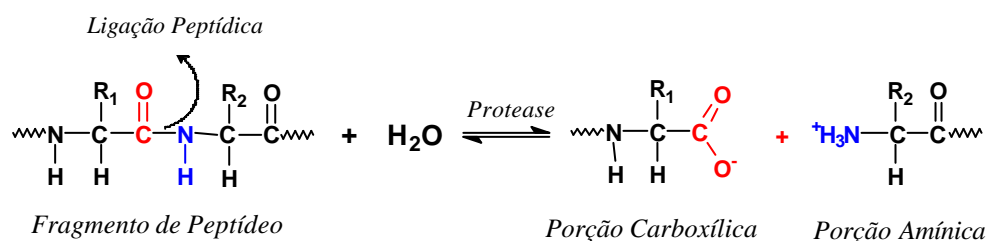


Figura 2.2: Representação esquemática da hidrólise de uma ligação peptídica catalisada por uma protease (Tardioli, 2003).

As duas enzimas estudadas neste trabalho, tripsina e quimotripsina, pertencem à classe das *serina proteases* e são produzidas no pâncreas de animais. As enzimas dessa classe diferem entre si na seqüência de aminoácidos e estrutura tridimensional, porém apresentam em comum o mecanismo catalítico e a geometria do sítio ativo, sendo a tríade catalítica representada pelos aminoácidos serina (Ser), histidina (His) e aspartato (Asp). São endopeptidases que atacam a ligação peptídica de certos aminoácidos no interior da cadeia polipeptídica, clivando-a em segmentos menores por hidrólise. Embora aqui também se tenha utilizado a enzima carboxipeptidase A, que é uma exopeptidase e, portanto, remove aminoácidos do final das cadeias peptídicas, o estudo específico desta enzima não se situa dentro dos objetivos deste trabalho.

2.3.1.1. QUIMOTRIPSINA

A quimotripsina (EC 3.4.21.1) é uma protease sintetizada no pâncreas de todas as espécies superiores na forma inativa de quimotripsinogênio e apresenta massa molecular de aproximadamente 25.000Da. Esta enzima catalisa, preferencialmente e com maior velocidade, a ruptura de proteínas em enlaces peptídicos específicos das cadeias laterais hidrofóbicas e volumosas de fenilalanina, tirosina e triptofano (Blow *et al.*, 1971 *apud* Sanchez, 1995), embora também catalise a síntese de peptídeos (Bizzozero *et al.*, 1988 *apud* Sanchez, 1995), esterificação de aminoácidos e síntese de hidrazidas - Ono *et al.*, 1978 *apud* Sanchez, 1995. A estrutura tridimensional da quimotripsina está mostrada na Figura 2.3.

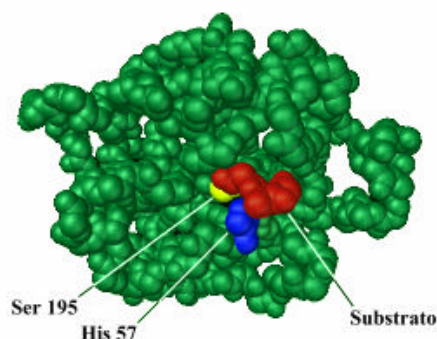


Figura 2.3: Estrutura tridimensional da quimotripsina com destaque para o substrato posicionado no sítio ativo da enzima e dois dos resíduos (Ser-195 e His-57) que compõem sua tríade catalítica (Lehninger & Cox, 2000).

Esta protease possui ótimos característicos de pH e temperatura (8,0 e 40°C) onde sua atividade é máxima, sem sofrer, contudo, inativação por mudanças conformacionais na estrutura terciária do seu sítio ativo.

O mecanismo catalítico da quimotripsina é representativo para todas as enzimas classificadas como serina proteases e está esquematicamente ilustrado na Figura 2.4.

Inicialmente, o substrato é adequadamente alojado no bolsão hidrofóbico do sítio ativo da enzima e a ligação peptídica a ser rompida posicionada próximo à hidroxila da Ser-195. O oxigênio da hidroxila da Ser-195 efetua um ataque nucleofílico ao carbono carbonila do substrato, formando o complexo intermediário acil-enzima. A His-57 atua como base geral removendo o hidrogênio da Ser-195 e o Asp-102, carregado negativamente, estabiliza a carga positiva que se forma na His-57. A seguir, a ligação peptídica é clivada e a His-57 age como doador de prótons, estabilizando a porção amínica do substrato que é liberada como primeiro produto da reação. Posteriormente, o oxigênio de uma molécula de água efetua novo ataque nucleofílico ao carbono da porção do substrato ligada a Ser-195, sendo um de seus hidrogênios capturado pela His-57, que volta a agir como base geral, adquirindo carga positiva que mais uma vez é estabilizada pela carga negativa do Asp-102. Finalmente, a Ser-195 regenera sua hidroxila através da captura do hidrogênio presente na His-57. A molécula de enzima volta à sua conformação inicial e o segundo produto da reação é liberado.

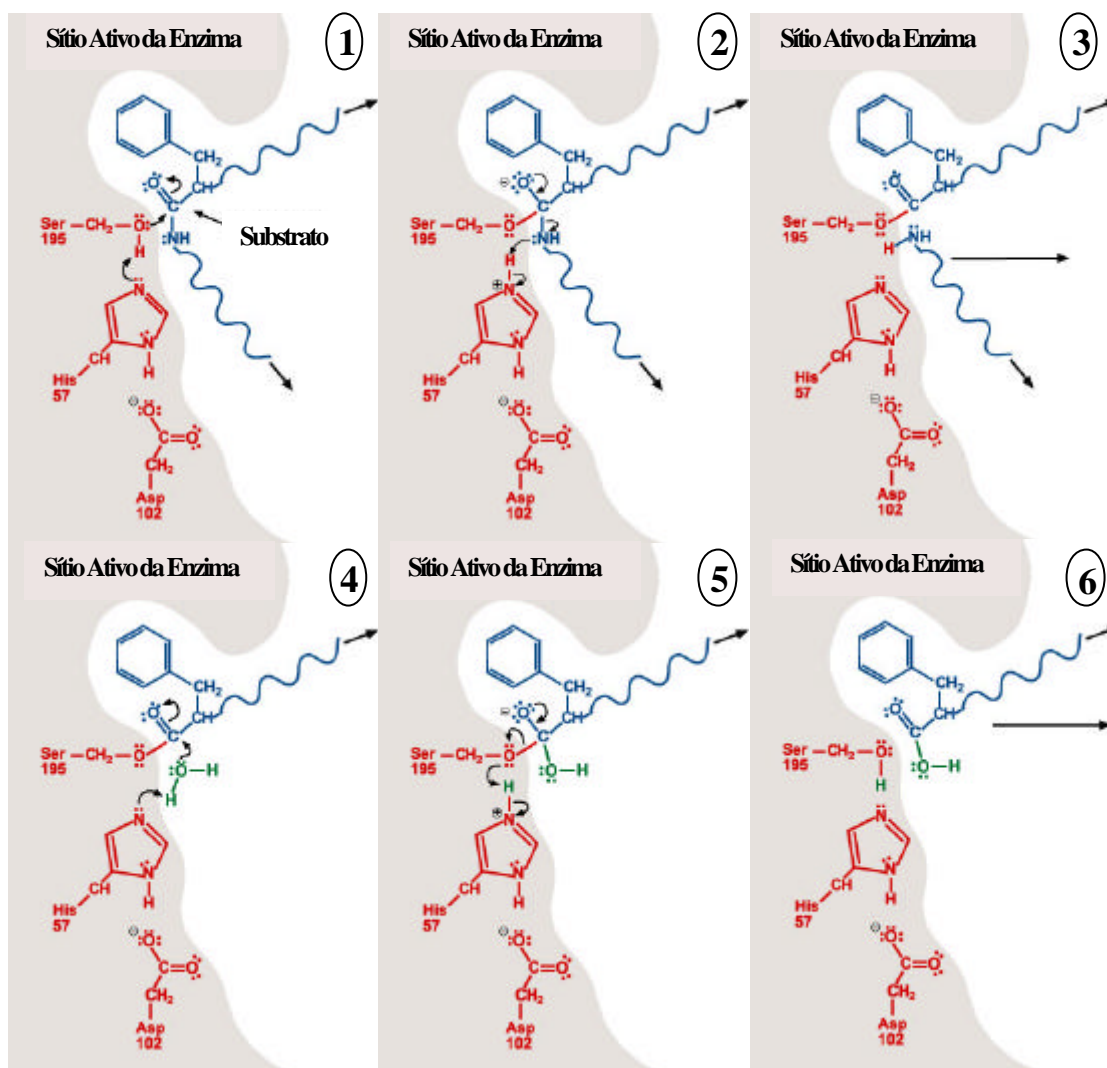


Figura 2.4: Mecanismo para a catálise do passo de acilação pela quimotripsina. A His-57 age como uma base geral retirando um próton do grupo hidroxil da Ser-195, enquanto esta ataca o grupo acil do substrato; a His-57 protonada age como doador de próton para o grupo amino de saída; a ligação C-N pode ser rompida e o catalisador regenerado (http://www.mpcfaculty.net/mark_bishop/chymotrypsin.htm).

Resumidamente, pode-se dizer que a quimotripsina não catalisa um ataque direto da água à ligação peptídica, ao invés disso, um intermediário transiente covalente acil-enzima é formado. A reação tem, então, duas etapas principais: acilação e deacilação. Na fase de acilação, a ligação peptídica é rompida e uma ligação éster é formada entre o carbono carbonil do peptídeo e a enzima, sendo o oxigênio da Ser-195 o nucleófilo desta etapa. Na fase de deacilação, a ligação éster é hidrolisada e a enzima regenerada.

2.3.1.2. TRIPSINA

A tripsina (EC 3.4.21.4) é uma serina protease com massa molecular de aproximadamente 24.000Da muito similar a quimotripsina em estrutura, mas seus substratos específicos para clivagem na cadeia peptídica são resíduos de lisina (Lys) e arginina (Arg). Isto significa que a tripsina catalisa a hidrólise de ligações peptídicas nas quais o grupo carbonila é fornecido por resíduos de lisina ou arginina, desde que um dos aminoácidos formadores do enlace peptídico não seja a prolina (Pro) - Galvão, 2000. A Figura 2.5 apresenta uma molécula de tripsina com moléculas de benzamidina (inibidor desta enzima) ligadas.

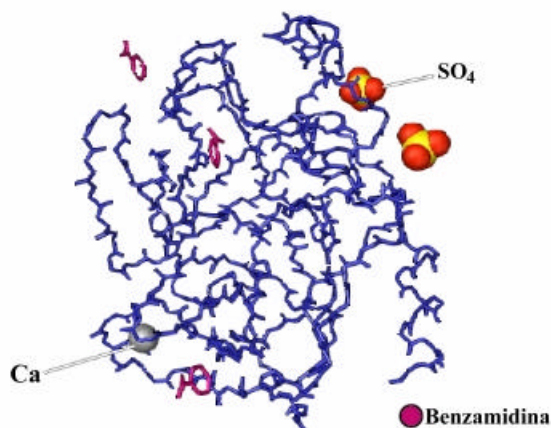


Figura 2.5: Representação de uma molécula de tripsina com moléculas de benzamidina, seu inibidor competitivo, devidamente posicionadas nos sítios ativos desta enzima (Lehninger & Cox, 2000).

O mecanismo de ação desta endopeptidase é similar ao da quimotripsina (Figura 2.4), diferenciando-se apenas em função da sua especificidade. A Figura 2.6 mostra esquematicamente a hidrólise de uma ligação peptídica catalisada pela tripsina.

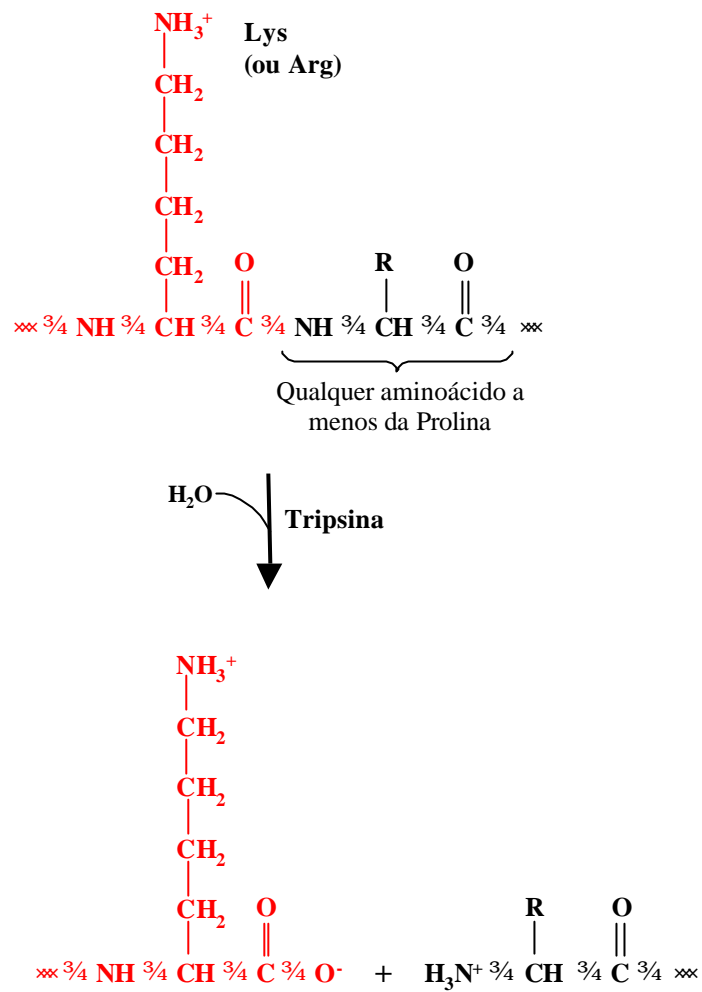


Figura 2.6: Hidrólise de uma ligação peptídica catalisada pela enzima tripsina.

2.3.1.3. CARBOXIPEPTIDASE A

A carboxipeptidase A (EC 3.4.17.1) é uma exopeptidase com massa molecular de aproximadamente 34.500Da pertencente à classe das metaloproteases, pois possui um íon zinco fortemente ligado cujo papel é de fundamental relevância na sua atividade catalítica. Formada por uma única cadeia polipeptídica contendo 307 aminoácidos, esta protease catalisa a hidrólise de ligações peptídicas nas quais não estejam presentes como resíduos carboxi-terminais a arginina, lisina ou prolina - Whitaker, 1994. A Figura 2.7 mostra a estrutura tridimensional da carboxipeptidase A.

2.4. MODIFICAÇÕES ENZIMÁTICAS EM PROTEÍNAS

A hidrólise enzimática tem sido utilizada há séculos para promover modificações nas propriedades funcionais e nutricionais de proteínas alimentícias, na produção de alimentos tradicionais como queijo e fermentados. A proteólise enzimática tem mostrado aumentar a solubilidade, a capacidade espumante, as propriedades emulsificantes e gelificantes, além de liberar peptídeos biologicamente ativos de certas proteínas - Spellman, 2003.

Enzimas proteolíticas são comumente usadas como agentes modificadores de proteínas, através da hidrólise total (visando determinação da composição de aminoácidos das proteínas) ou parcial (empregada em estudos de seqüenciamento da estrutura primária de polipeptídeos ou visando melhorar as propriedades funcionais e/ou nutricionais de proteínas, ou ainda com o objetivo de identificar e isolar peptídeos fisiologicamente ativos).

A hidrólise enzimática apresenta vantagens indiscutíveis frente a hidrólises tradicionais como a química, ácida ou básica, entre as quais cabe mencionar:

▶▶ Seletividade → as enzimas são específicas para um tipo específico de enlace e, portanto, não é freqüente o aparecimento de produtos de degradação. Contrariamente, a pouca seletividade dos ataques ácido e básico e seu difícil controle, conduzem inevitavelmente ao aparecimento de produtos de degradação que, inclusive, podem ser tóxicos;

▶▶ Operação em condições moderadas de temperatura (40-60°C) e pH (4-8);

▶▶ Não há adição de substâncias no meio reacional, fato não observado nas hidrólises ácidas ou básicas, que requerem uma etapa final de neutralização do meio que eleva consideravelmente o conteúdo de sais;

▶▶ Conservação do valor nutritivo → na hidrólise enzimática não se observa degradação de aminoácidos em função da ação da enzima sobre o substrato. Na hidrólise ácida, pode-se constatar a completa degradação do triptofano e desaminação dos aminoácidos serina e treonina; na hidrólise alcalina, ocorre destruição total dos aminoácidos arginina e cisteína.

A matéria-prima para a produção de hidrolisados pode ser subprodutos ou resíduos protéicos de indústrias alimentícias e agroindústrias (abatedouros, indústrias de extração de óleos vegetais, laticínios, dentre outras). Porém, a nível mundial, e particularmente nos países em desenvolvimento, pequenas e médias indústrias não

conseguem viabilizar economicamente a utilização dessas fontes de proteínas - Shay & Wegner (1986) *apud* Arruda, 1999.

A escolha da fonte protéica a ser utilizada no processo de hidrólise normalmente relaciona-se à aplicação do produto final obtido e também ao valor agregado atingido com relação ao substrato original. Quando a finalidade do hidrolisado é sua utilização como fonte de nitrogênio, costuma-se empregar proteínas de peixe - Mackie, 1982; proteínas microbianas são geralmente empregadas na alimentação animal; proteínas da soja e lácteas são largamente utilizadas em alimentação humana, sendo estas últimas, especialmente, as proteínas do soro, matéria-prima ideal para a preparação de alimentos infantis e dietas enterais - Nakamura *et al.*, 1993.

As proteínas nativas do soro de queijo não são facilmente hidrolisadas por enzimas digestivas, como por exemplo a pepsina e a tripsina, devido às ligações dissulfeto presentes nas moléculas de proteína. A β -lactoglobulina tem se mostrado resistente à digestão gástrica e, aparentemente, permanece intacta após passar pelo estômago, tornando-se indisponível nutricionalmente. Reddy *et al.* (1988) observaram que nas temperaturas de 80 a 90°C, a resistência dessa proteína à digestão era significativamente diminuída devido à ruptura das ligações dissulfeto, causando extensas mudanças na sua conformação estrutural e expondo ligações peptídicas susceptíveis ao ataque proteolítico. Schmidt e Poll (1991) estudaram a hidrólise enzimática de β -Lg e α -La utilizando diversas proteases (serina-, cisteína-, aspártico- e metaloproteases) em pH 8 e 30°C, e, nessas condições, já observavam hidrólise da β -Lg pela quimotripsina, diferentemente dos resultados obtidos por Reddy *et al.* (1988). Monti e Jost (1978) hidrolisaram α -lactoalbumina com tripsina a 50°C e pH 8, observando total digestão desta proteína após 2 horas de reação. Enquanto menos de 20% da α -lactoalbumina intacta se dissolvia em água (pH 7), o hidrolisado resultante da ação da tripsina sobre esta proteína se dissolvia totalmente. A pobre digestibilidade das proteínas do soro é considerada ser a razão para sua alergenicidade - Kananen *et al.*, 2000.

Hidrolisados protéicos têm grande importância no tratamento de pacientes com distúrbios estomacais ou problemas na mucosa intestinal, bem como em lactentes desnutridos, com quadro alergênico na maioria dos casos. Nesses casos, deve-se ressaltar que as dietas não devem ser constituídas apenas por aminoácidos livres, pois, assim, estas se tornariam hiperosmóticas, provocando secreção intestinal e diarreia.

Conhecimentos atuais do mecanismo de absorção intestinal indicam que os di e tripeptídeos são mais facilmente absorvidos que os aminoácidos livres. Outros fatos já amplamente conhecidos relacionam-se a problemas de alergenicidade, devido à presença no hidrolisado protéico de proteínas e peptídeos de massa molecular elevada, e sabor amargo produzido durante a hidrólise (Saha & Hayashi, 2001), associado a hidrofobicidade das cadeias laterais e à fonte de proteína utilizada.

Uma das mais nobres aplicações dos hidrolisados das proteínas do soro consiste na produção de concentrados de aminoácidos ou pequenos peptídeos com baixo teor ou completa isenção de fenilalanina. Esses hidrolisados são de utilização imediata no tratamento de portadores de fenilcetonúria.

A fenilcetonúria é uma doença genética causada por um erro inato do metabolismo e está relacionada à deficiência na atividade da enzima fenilalanina hidroxilase (PAH), que converte fenilalanina em tirosina. A fenilcetonúria clássica (PKU), primeira hiperfenilalaninemia identificada e caracterizada como uma doença transmitida geneticamente, acarreta ausência total da atividade da fenilalanina hidroxilase ou atividade residual de até 5%, associada a altas concentrações plasmáticas de fenilalanina ($\geq 1.200\text{mmol/L}$). O alto nível plasmático de Phe causa a inibição do transporte de tirosina e triptofano para o cérebro e inibe a atividade das enzimas tirosina e triptofano hidroxilases, diminuindo a síntese de neurotransmissores no sistema nervoso central e periférico e aumentando a excreção de metabólitos como fenilpiruvato e fenil-acetato na urina. A incidência de PKU é, em média, de um caso para cada 10.000 recém-nascidos, podendo atingir, em certos grupos étnicos, uma criança em cada 4.400 nascimentos - Mira & Márquez, 2000. O tratamento dietoterápico evita o retardo cerebral, se introduzido até o terceiro mês de vida do recém-nascido (Trefz *et al.*, 1993), e previne o estabelecimento do retardo em fetos de mães portadoras de hiperfenilalaninemias. Este tipo de tratamento foi proposto por Bickel e colaboradores (1953), que utilizaram hidrolisado ácido de caseína com baixo teor de Phe como dietoterapia para os portadores desta doença. A metodologia para rastreamento em grande escala foi desenvolvida e aperfeiçoada, possibilitando que atualmente no Brasil o "teste do pezinho" seja obrigatório para a prevenção da fenilcetonúria e outras aminoacidopatias - Revista Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento, nº 29, 2002.

Um ponto importante a ser ressaltado refere-se ao fato de que a Phe é um aminoácido essencial e, como tal, deve estar presente na dieta, porém em quantidades controladas. Para uma criança normal (de 2 meses a 1 ano) as quantidades necessárias

de Phe giram em torno de 120mg/Kg/dia. Para crianças portadoras de fenilcetonúria, estes valores decrescem para 40-70mg/Kg/dia aos 2 meses de vida até 10-40mg/Kg/dia dos 7 anos até a idade adulta. Uma dieta com baixo teor de Phe (de 1 a 6 mgPhe/gProteína) pode efetivamente ser usada para controlar a ingestão desse aminoácido, proporcionando bom crescimento e desenvolvimento nas crianças e evitando os problemas neurológicos - Lara, 1997. O tratamento dietético é caro e atualmente são poucos os produtos disponíveis no mercado. Foram encontrados dois produtos da Mead & Johnson Ltda., importados, mas com representantes no Brasil: Lofenac e Phenylfree, custando respectivamente, US\$ 293,00/Kg e 312,00/Kg - www.meadjohnson.com.

2.4.1. O GRAU DE HIDRÓLISE (GH)

Em alguns trabalhos quantitativos de hidrólise de proteínas é necessário ter uma medida da extensão da degradação hidrolítica, pois uma grandeza que traduz bem a ação catalítica de uma protease é o número de ligações peptídicas rompidas durante a reação.

Um das primeiras aplicações do número de ligações peptídicas rompidas como medida da eficiência do grau de hidrólise foi citada por Calvery, 1933. Desde então, esta técnica tem se tornado padrão para muitos trabalhos sobre hidrólise de proteínas.

Muitos autores têm mostrado que a extensão na qual as propriedades funcionais de uma proteína podem ser alteradas por hidrólise é muito dependente do grau de hidrólise ao qual as proteínas foram submetidas. Define-se grau de hidrólise, portanto, como a porcentagem do número total de ligações peptídicas em uma proteína que foi rompida durante o processo de hidrólise, levando-se em consideração a especificidade da enzima utilizada e a quantidade de resíduos que representa substrato para esta enzima - Adler-Nissen, 1986.

A partir do conhecimento da seqüência primária de proteínas puras e da especificidade das proteases utilizadas é possível chegar a valores teóricos para o grau máximo de hidrólise com essas enzimas. Para o soro, entretanto, a determinação do valor exato dessa grandeza não é possível, pois: 1- a composição percentual das proteínas presentes no soro de queijo varia com a procedência do mesmo e; 2- as seqüências primárias das imunoglobulinas, fragmentos de caseína e proteínas de

membrana, que também estão presentes no soro em pequenas quantidades, não estão disponíveis na literatura.

Muitos métodos podem ser empregados para estimar o grau de hidrólise. A quantificação pode ser feita determinando-se o teor de nitrogênio liberado durante a hidrólise; determinando-se grupos aminos livres liberados durante a hidrólise, titulando-os com formol, TNBS, OPA, ninidrina, dentre outros, ou, alternativamente, utilizando-se o método do pHstato, onde os prótons liberados durante o processo hidrolítico são titulados e, então, relacionados ao grau de hidrólise.

O princípio da técnica do pHstato vale-se do fato de que quando a hidrólise é desenvolvida em pH neutro ou alcalino, a dissociação de prótons de grupos aminos livres é favorecida. A liberação de prótons conduz à redução do pH do meio. Assim, o número de ligações peptídicas clivadas pode ser estimado pela quantidade de base requerida para manter o pH constante durante a reação - Adler-Nissen, 1986.

2.5. IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS

A técnica de imobilização de enzimas é amplamente conhecida e pode ser definida como sendo o confinamento físico dessas estruturas ou sua localização em certa região definida do espaço com manutenção de sua atividade catalítica - Kennedy, 1987.

A utilização de enzimas a temperaturas maiores que as biológicas é importante para acelerar a velocidade de reação enzimática e reduzir riscos de contaminação do meio reacional por bactérias. Contudo, pode implicar desnaturação da enzima, o que também ocorre por variação do pH. Neste contexto, inúmeras técnicas de imobilização vêm sendo desenvolvidas com o intuito de aumentar a estabilidade térmica das enzimas.

Vários protocolos para imobilização reversível de proteínas têm sido descritos na literatura até o momento. Dentre eles, o mais geral, fácil e antigo para este fim é a adsorção de enzimas em resinas de troca iônica (principalmente resinas de troca aniônica). A imobilização de enzimas em tais resinas é geralmente fraca e muitas proteínas podem ser completamente desorvidas das matrizes quando submetidas a força iônica de baixa a moderada e também em resposta a alterações no pH durante a reação. No entanto, atualmente, a imobilização via adsorção reversível em suportes porosos rígidos contendo alta densidade de trocadores iônicos tem sido proposta como método bastante adequado para imobilização reversível, em consequência do

surgimento de interações muito fortes. Deste modo, se a imobilização covalente não é possível ou necessária, a imobilização reversível torna-se uma possibilidade muito atraente quando a estabilidade da enzima já é adequada para o processo em questão. Estas técnicas de imobilização poderiam, então, possibilitar a utilização de enzimas imobilizadas e, assim, combinar redução de tempo e custos - Pessela *et al.*, 2003.

Uma técnica de imobilização amplamente conhecida e estudada na literatura é a imobilização em suportes sólidos insolúveis. Esta estratégia permite a insolubilização da enzima através de sua fixação a um suporte sólido insolúvel sendo possível, assim, reutilizá-la e manter o meio reacional com altas concentrações do catalisador. Essas vantagens tornam a tecnologia de imobilização de enzimas muito atrativa para fins industriais.

A utilização de enzimas imobilizadas sobre suportes insolúveis amplia a opção de reatores para o processo, facilita sua operação e controle, permite utilização do catalisador por períodos prolongados de tempo, soluciona a questão da recuperação e aumenta a estabilidade operacional das enzimas. Contudo, a imobilização também pode implicar perda ou redução da atividade por unidade de volume, limitação difusional e custo adicional de preparação do catalisador - Kennedy *et al.*, 1988.

A imobilização de enzimas pode ocorrer através de três principais métodos: a) confinamento ou simplesmente aprisionamento físico; b) ligação cruzada, onde se observa o estabelecimento de ligações químicas entre duas moléculas de enzima e c) ligação da enzima a um suporte sólido, que pode se dar via adsorção física ou ligação química (iônica, metálica ou covalente). Na ligação covalente, o suporte ativado se combina quimicamente a grupos funcionais da enzima (grupos aminos terminais ou de resíduos de lisinas; carboxílicos de ácido aspártico e ácido glutâmico; fenólicos de tirosina; tióis de cisteína; hidroxilas de serina, tirosina e treonina; imidazóis de histidina; e indóis de triptofano) não essenciais para a atividade catalítica, dependendo dos grupos reativos disponíveis no suporte - Figura 2.9.

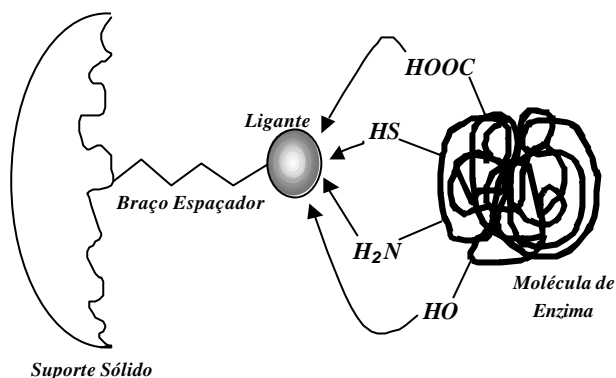


Figura 2.9: Representação esquemática da ligação de uma enzima a um suporte sólido ativado.

2.5.1. SUPORTES PARA IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS

As principais características a serem observadas na escolha de um suporte adequado para determinada aplicação são: área superficial, permeabilidade, insolubilidade, regenerabilidade, morfologia, composição, resistência ao ataque microbiano, resistência mecânica, dentre outras.

Fundamentalmente, os suportes para imobilização de enzimas podem ser classificados de acordo com sua composição e morfologia. Na Figura 2.10, encontram-se ilustrados diferentes tipos de suportes classificados de acordo com a composição que apresentam.

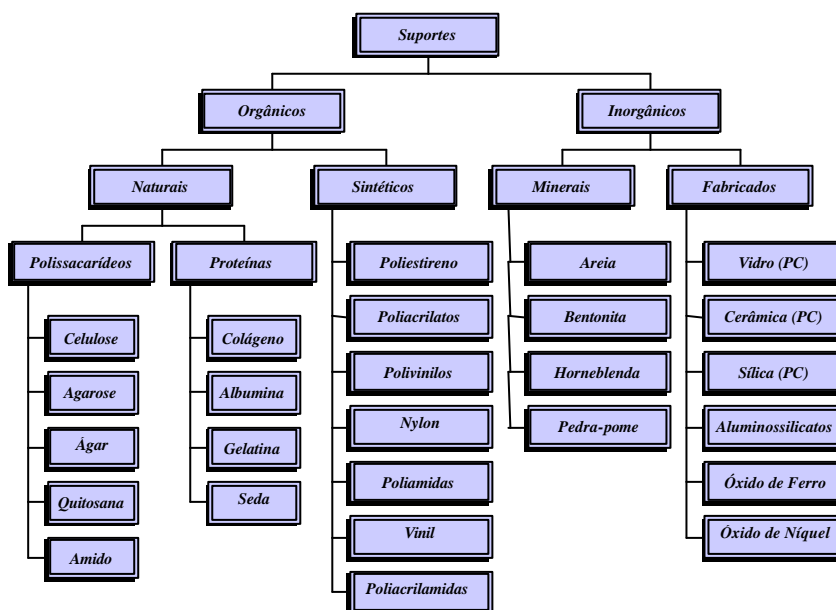


Figura 2.10: Classificação dos suportes de acordo com a composição (Zanin, 1989).

Os suportes podem, ainda, ser classificados conforme sua morfologia: os *porosos* têm grande área superficial interna disponível para a imobilização da enzima, que neste caso fica protegida de turbulência externa; os *não-porosos* eliminam a resistência à transferência de massa interna, mas apresentam baixa área superficial disponível para a ligação da enzima, e os com *estrutura de gel*, que são de uso simples, mas com utilização direta (sem etapa prévia de ativação) apenas nos casos em que a grade formada é de malha suficiente para reter a proteína sem implicar restrições difusionais sérias para o substrato - Cardias, 1996.

No processo de imobilização sobre suportes porosos a morfologia do poro é de fundamental importância, pois ele deve ser suficientemente grande para permitir tanto a acomodação da enzima quanto o livre acesso do substrato. Todavia, quanto maior o poro menor a área superficial do suporte. A imobilização feita na área interna dos poros de um suporte insolúvel (gel, sílica, etc.) resulta em grande área superficial disponível, mas também implica possíveis restrições difusionais para entrada de reagentes e saída de produtos. No caso da hidrólise de proteínas, este é um problema particularmente importante, pois os substratos são macromoléculas, ou seja, proteínas com massa molecular elevada.

Poucos suportes contêm grupos reativos que permitem acoplamento direto da enzima, necessitando, na maioria das vezes, de uma etapa inicial de ativação. Os reagentes mais comumente utilizados como agente ativante de suportes são o brometo de cianogênio e reagentes bifuncionais contendo grupos epóxidos ou aldeídos.

Suportes ativados com grupos epóxidos, embora sejam capazes de reagir com distintos grupos da enzima, possuem baixa reatividade. Este inconveniente pode ser superado através da modificação parcial dos grupos epóxidos com etilenodiamina, ácido iminodiacético (IDA), etc. Esses grupos favorecem a adsorção prévia da enzima, facilitando a etapa final de ligação covalente com os grupos epóxidos não modificados do suporte - Mateo *et al.*, 2000.

O glutaraldeído é um reagente bifuncional largamente empregado como agente ativante de suportes para imobilização de enzimas. Seus dois grupos aldeído podem reagir com vários grupos laterais da enzima, como hidroxilas, carbonilas, sulfidrilas e aminos - Arruda, 1999. Apesar de sua reação com grupos aminos primários para promover reticulação covalente (*crosslinking*) do suporte ter sido explorada em várias circunstâncias, o mecanismo preciso dessa reação e a estrutura dos componentes químicos formados ainda não estão completamente elucidados - Monteiro & Airoidi,

1999. Alguns problemas advindos da utilização do glutaraldeído como agente ativante são: possível orientação desfavorável do sítio ativo da enzima após imobilização, o que o torna inacessível para substratos macromoleculares (Tardioli *et al.*, 2003 a e b); formação de múltiplas camadas de enzima e/ou aglomerações de moléculas no interior dos poros, dificultando o acesso ao sítio ativo (Sobral *et al.*, 2002 e 2003); produção de derivados poucas vezes mais estáveis que a enzima solúvel e geração de suportes ativados que não devem ser estocados por períodos prolongados de tempo em virtude da alta instabilidade e reatividade de seus grupos reativos.

Outro reagente utilizado para ativação de suportes com grupos aldeído é o glicidol (2,3-epoxi-propanol). Esse reagente produz grupos aldeídos alifáticos bastante estáveis, reativos e disponíveis para o estabelecimento de enlaces com grupos aminos desprotonados dos resíduos de lisinas da molécula de enzima, possibilitando a formação de várias ligações covalentes enzima-suporte em pH alcalino. As ligações da enzima imobilizada com os grupos aldeídos gerados na superfície do suporte ativado tornam a molécula de enzima imobilizada muito mais rígida e, conseqüentemente, muito mais resistente à inativação induzida por altas temperaturas, solventes orgânicos e outros agentes desnaturantes - Guisán, 1988.

2.5.1.1. GEL DE AGAROSE

O ágar é um polímero natural obtido a partir de algas vermelhas constituído por duas frações: a agarose e a agarpectina. Suas características não dependem unicamente das algas utilizadas, mas também da época da coleta, do local e do método de extração - Painter, 1985 *apud* Fernandez-Sanchez, 2000. A agarose é formada pela repetição de aproximadamente 400 unidades de agarobiose, atingindo massa molecular em torno de 120KDa. A Figura 2.11 apresenta a estrutura química da agarose.

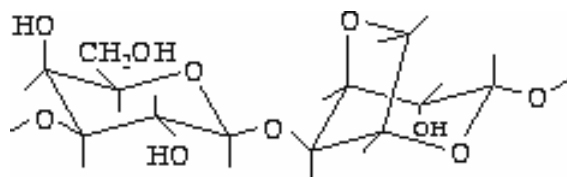


Figura 2.11: Estrutura química da agarose.
(<http://www-ang.kfunigraz.ac.at/~binder/thesis/node41.html>)

Dentre as principais vantagens de se utilizar os géis de agarose pode-se destacar: 1- estabilidade mecânica; 2- grande área superficial (agarose 6B-CL: 25 m²/mL de gel); 3- dimensão dos poros superior a de outros géis (entre 100 e 300nm de diâmetro); 4- resistência à degradação microbiana; 5- transparência ótica tanto no UV quanto no visível (o que viabiliza sua quantificação por espectrofotometria); 6- fácil ativação e manuseio e 7- atoxicidade. Porém, algumas desvantagens também podem ser associadas a este gel: não podem ser esterilizados; desintegram-se em soluções fortemente alcalinas e solventes orgânicos; necessitam ser estocados na forma úmida por encolherem irreversivelmente quando secos e, principalmente, são de elevado custo.

2.5.1.2. QUITINA E QUITOSANA

A quitina e a quitosana foram descritas no século XIX, mas ainda não são tão bem conhecidas como a celulose (composto mais abundante na natureza). Há indicações de que a quitina foi primeiramente utilizada por Bradconnot em 1811 (Skaugrud & Sargent, 1990), mas a exploração quanto às aplicações desse polímero natural e seus derivados tem se intensificado apenas nos últimos anos. A quitina é um polissacarídeo natural aminado obtido principalmente a partir de crustáceos, insetos e paredes celulares de fungos, insolúvel em água e solventes orgânicos - Beszedicts & Netzer, 1982 *apud* Arruda, 1999. A quitina e seus derivados, em particular a quitosana, são correntemente utilizados em pequenas quantidades como coagulantes para tratamento de águas, aditivos para xampus e cosméticos, materiais médicos como, por exemplo, pele artificial e fibras para suturas, tecidos anti-fúngicos, dentre outros - Kurita, 1998.

A quitosana é o nome usado para as formas pouco acetiladas da quitina (até aproximadamente 25%) e, dependendo da origem e do método de preparação, pode atingir massa molecular na faixa de 300 a 1000 KDa - Madihally & Matthew, 1999. É solúvel em meio aquoso na presença de pequenas quantidades de ácido, como por exemplo ácido acético, ácido láctico, ácido clorídrico, dentre outros. Embora ocorra dissolução da quitosana em pH inferior a 6,5, ela precipita acima deste pH pela adição de soluções alcalinas como NaOH_(aq) - Sashiwa & Shigemasa, 1999.

Atualmente, a principal fonte de quitosana é a carapaça externa (exoesqueleto) de crustáceos como, por exemplo, caranguejo e camarão. A Figura 2.12 (Shahidi *et al.*,

1999) mostra um esquema para obtenção de quitina, quitosana e seus monômeros e oligômeros a partir de carapaças de crustáceos.

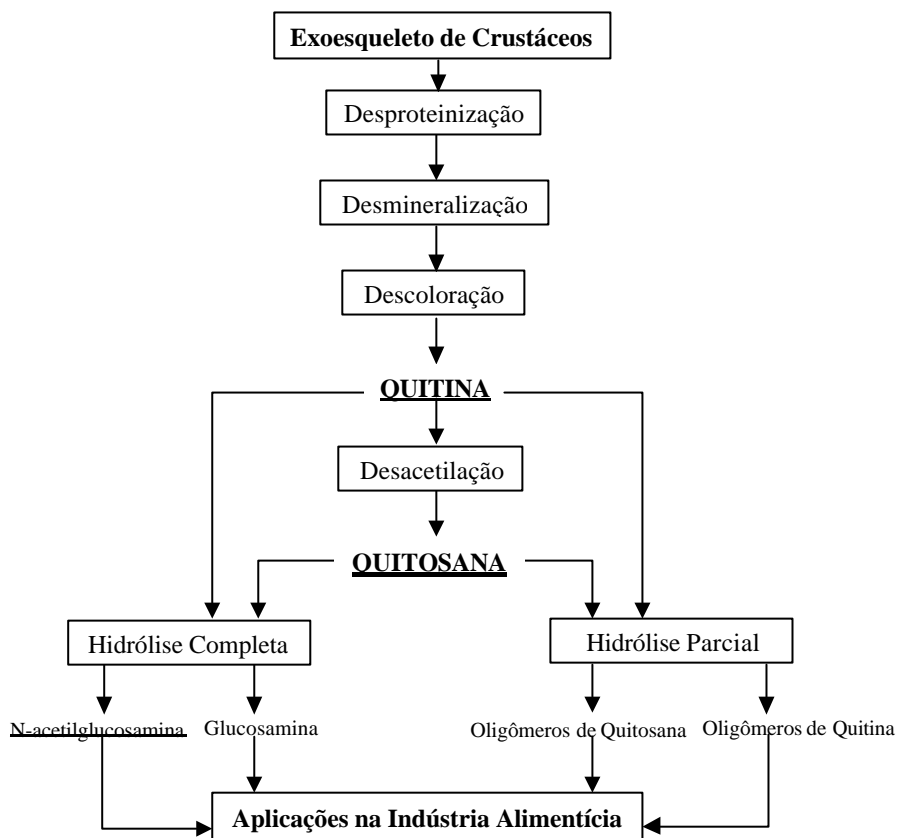


Figura 2.12: Esquema para obtenção de quitina, quitosana e seus monômeros e oligômeros a partir de carapaças de crustáceos (Shahidi *et al.*, 1999).

A quitosana é um copolímero de 2-amino-2-deoxi- β -D-glicopirranose e 2-acetamida-2-deoxi- β -D-glicopirranose conectados por ligações $\beta(1-4)$ (Varum *et al.*, 1996) com composição variável e solubilidade dependente do grau de desacetilação da quitina (quitosanas com grau de desacetilação menor que 40% são solúveis na faixa de pH de 4 a 9, enquanto que aquelas com grau de desacetilação superior a este, precipitam em pHs de 6,5 a 7,5). A conformação e as propriedades físico-químicas da quitosana dependem da estrutura química, do grau de N-acetilação, da distribuição dos grupos N-acetil e amino ao longo das cadeias poliméricas, do pH e da força iônica - Varum *et al.*, 1994; Anthonsen & Smidsrod, 1995. As Figuras 2.13 (a e b), ilustradas a seguir, apresentam as estruturas da quitina e da quitosana, respectivamente.

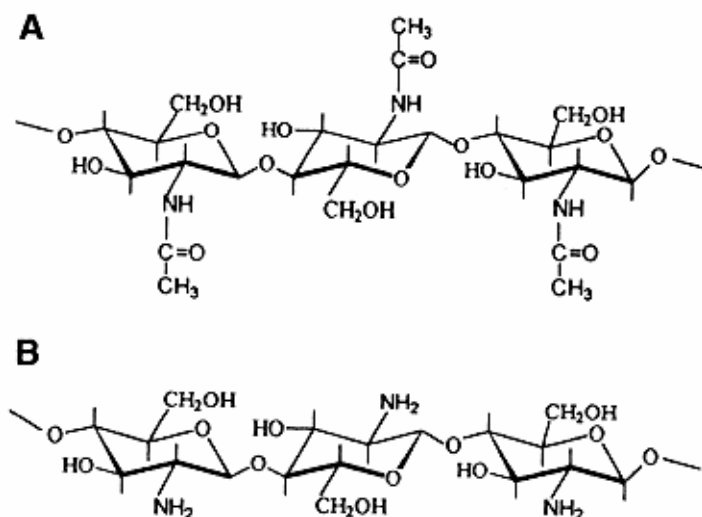


Figura 2.13: Estrutura química da quitina (A) e da quitosana (B).

A quitosana tem dois tipos de grupos funcionais reativos: amino e hidroxila, ambos podem ser utilizados como sítios de reação e coordenação. As modificações químicas destes grupos têm gerado inúmeros e úteis materiais para as mais diversas aplicações: indústria de alimentos, biotecnologia e ciências biomédicas - Shahidi *et al.*, 1999 *apud* Arruda, 1999.

Diversos autores têm investigado a utilização de matrizes de quitosana para imobilização de diferentes enzimas (β -galactosidase, α -L-arabinofuranosidase, catalase e Penicilina G Acilase). No entanto, até o presente momento ainda não foram obtidos resultados extremamente significativos empregando-se esta matriz para imobilização. Apesar disso, é de fundamental importância que novas pesquisas sejam realizadas visando-se maior conhecimento deste material bem como o aperfeiçoamento dos métodos de imobilização de enzimas sobre esta matriz, dada sua grande disponibilidade e viabilidade econômica - Martino *et al.*, 1996; Spagna *et al.*, 1998; Çetinus & Öztop, 2000; Abdel-Nabis *et al.*, 1999; Adriano *et al.*, 2003.

2.5.1.3. SEPABEADS (MITSUBISHI CHEMICAL - www.diaion.com)

Características Gerais: a resina sepabeads enquadra-se na classe dos adsorventes sintéticos, ou seja, está incluída em uma família de produtos baseados na tecnologia de fabricação de resinas de troca iônica, projetados para uso como extratores sólidos. Estes adsorventes apresentam grande área superficial e fina estrutura de poros,

semelhante a do carbono ativado, onde ocorre o efeito do "peneiramento molecular" - apenas as moléculas pequenas podem difundir para o interior da partícula através dos poros. Devido a esta característica porosa, podem adsorver efetivamente compostos orgânicos de soluções aquosas.

Estabilidade: adsorventes sintéticos são estáveis em soluções ácidas, alcalinas e de solventes orgânicos, podendo ser facilmente regeneradas sob condições suaves para uso repetitivo.

Estrutura Química: os adsorventes sintéticos podem apresentar três diferentes estruturas - aromática, aromática modificada e série metacrílica - Tabela 2.3. A estrutura química dita o grau de hidrofobicidade do adsorvente sintético, sendo esta uma importante característica na seleção adequada do tipo de adsorvente de acordo com a natureza química do composto alvo.

Tabela 2.3: Diferentes estruturas associadas aos adsorventes sintéticos.

Aromática	Os adsorventes aromáticos são os mais utilizados e são baseados em uma matriz poliestirênica entrelaçada. Seu campo de aplicação é bastante vasto: extração de antibióticos intermediários de caldo de fermentação, separação de peptídeos ou aditivos de alimentos e etc. DIAION ^(R) HP20 HP21 / SEPABEADS ^(R) SP825 SP850 SP70 SP700
Aromática Modificada	Este tipo de adsorvente apresenta maior hidrofobicidade, sendo adequado para adsorção de substâncias orgânicas com baixa concentração ou de substâncias altamente hidrofílicas. SEPABEADS ^(R) SP207
Metacrílica	Adsorvente baseado no copolímero éster metacrílico que apresenta relativa natureza hidrofílica, sendo utilizado na adsorção de polifenóis e surfactantes. DIAION ^(R) HP2MG

A Tabela 2.4 apresenta algumas propriedades importantes de alguns adsorventes sintéticos.

Tabela 2.4: Propriedades típicas de alguns adsorventes sintéticos.

Tipo	Sepabeads® SP825	Sepabeads® SP850	Sepabeads® SP207
Densidade aparente (g/L-R)	690	670	780
Conteúdo de água (%)	52-62	46-52	43-53
Tamanho de partícula (>250µm)	>90%		
Tamanho efetivo (mm)	>0,25		
Porosidade:			
Volume de poro (ml/g)	1,4	1,2	1,3
Área superficial (m ² /g)	1000	1000	600
Raio do poro (Å)	57	38	110

Os suportes epóxi-ativados são considerados matrizes quase ideais para o desenvolvimento de imobilização de enzimas e proteínas tanto em escala de laboratório quanto a nível industrial - Mateo *et al.*, 2002. Algumas vantagens de se utilizar suportes ativados com grupos epóxidos são descritas a seguir:

▶▶ Os grupos epóxidos são muito estáveis e, portanto, a obtenção de suportes com elevada densidade superficial de tais grupos é absolutamente factível; são relativamente estáveis a valores de pH neutro e em meio aquoso, o que possibilita a estocagem do suporte comercial por longos períodos de tempo;

▶▶ Quando os suportes são resinas sintéticas epóxi-acrílicas, os grupos epóxidos já fazem parte da estrutura da superfície do suporte e, assim, não há necessidade de proceder com nenhum tipo de ativação;

▶▶ As interações entre os grupos epóxidos do suporte e os grupos nucleofílicos da proteína não são facilmente afetadas por efeitos estéricos;

▶▶ A reação de interação enzima-suporte pode ser facilmente interrompida mediante o bloqueio dos grupos ativos remanescentes do suporte, utilizando-se diferentes agentes como, por exemplo, β -mercaptoetanol, glicina, etanolamina e etc, sem a necessidade de realização de uma etapa final de redução; este procedimento previne reações adicionais indesejadas entre o suporte e a enzima, o que poderia causar diminuição da estabilidade e, conseqüentemente, da atividade enzimática;

▶▶ Enquanto outros protocolos populares de imobilização podem promover grandes alterações na superfície da proteína, como é o caso do suporte ativado com brometo de cianogênio (-BrCN), os suportes epóxidos são capazes de formar ligações extremamente fortes (amino secundário, éter, tioéter) com mínima modificação química da proteína;

▶▶ Os grupos epóxidos do suporte podem reagir com numerosos grupos da enzima: amino, tiol, hidroxila, fenólicos, etc. Esta é uma vantagem que favorece claramente as interações entre proteína e suporte.

Desta forma, os suportes ativados com grupos epóxidos parecem bastante adequados para a preparação de resinas cromatográficas e como suportes para a imobilização e estabilização de enzimas a nível industrial. No entanto, o principal inconveniente desses suportes é sua reatividade extremamente baixa, uma característica possivelmente associada a sua alta estabilidade.

O processo de imobilização sobre tais suportes segue um mecanismo baseado em duas etapas: inicialmente, uma adsorção física suave e rápida entre a proteína e o

suporte sólido é produzida e, posteriormente, a reação covalente entre a proteína adsorvida e os grupos epóxidos do suporte ocorre. Para isto, o suporte comercial utilizado deve ser de natureza hidrofóbica, visando adsorver a proteína quando esta é incubada sob alta força iônica na presença do suporte. Suportes hidrofílicos, como a agarose, não são recomendados para este tipo de procedimento porque a etapa inicial de adsorção não é possível. Os grupos epóxidos remanescentes no suporte podem ser facilmente bloqueados depois da imobilização da proteína, com o objetivo de impedir qualquer tipo de interação indesejada entre enzima e suporte sólido.

Sepabeads-EP tem excelentes propriedades que conduzem à estabilização de proteínas imobilizadas e adequadas propriedades mecânicas para o biocatalisador final. Essas características transformam esta resina em um suporte bastante rígido e capaz de ser utilizado em tanques agitados ou reatores de leito fixo. Outra importante característica desses suportes é que eles têm uma densa monocamada de grupos epóxidos reativos e estáveis, em torno de $100\mu\text{mol/g}$ de suporte úmido - Mateo *et al.*, 2002. Assim, ligações intramoleculares muito intensas podem ser efetuadas entre a enzima já imobilizada e este suporte ativado.

2.5.2. IMOBILIZAÇÃO MULTIPONTUAL DE ENZIMAS

Guisán (1988) propôs a estabilização de enzimas através do estabelecimento de várias ligações covalentes entre uma mesma molécula de enzima e o suporte sólido, a partir do controle rigoroso da intensidade do processo de multiinteração entre essas duas estruturas rígidas. Desta forma, é possível encontrar uma solução de compromisso que resulte em ligações multipontuais intensas o suficiente para promover uma estabilização muito alta e, ao mesmo tempo, suaves para não promover distorções significativas na estrutura tridimensional da enzima e, portanto, preservar seu centro ativo. É igualmente importante conhecer todas as variáveis que controlam a intensidade dessas ligações, a saber: densidade superficial dos grupos reativos - quanto maior a densidade de grupos aldeídos maior a possibilidade de formação de novas ligações amino-aldeído; pH - determina a quantidade de grupos aminos livres na superfície da enzima, quanto maior o pH maior a densidade desses grupos; tempo de contato enzima-suporte - deve ser longo para favorecer a formação de ligações adicionais entre as duas estruturas envolvidas e temperatura - promove aumento nos movimentos vibracionais da enzima, tornando-a mais flexível e, assim, possibilitando novos alinhamentos corretos amino-aldeído, após

formação das primeiras ligações. Nesse sentido, sempre que se seleciona soluções de compromisso para o binômio atividade/estabilidade, obtêm-se enzimas altamente estabilizadas e com baixa perda de atividade catalítica.

A utilização de suportes porosos como sílica, alumina e agarose têm permitido superar um dos maiores inconvenientes do passado com relação à imobilização covalente multipontual: a ausência de congruência geométrica entre a enzima e o suporte. Neste caso, o enrijecimento de uma pequena parte da molécula de enzima (de 10 a 20%) seria trasladado para toda a sua estrutura tridimensional devido a fortes interações entre todas as partes da molécula - Guisán, 1988.

A imobilização multipontual de enzimas sobre suportes ativadas com grupos glioxil resulta na geração de várias ligações entre os grupos aminos das lisinas da enzima e os grupos aldeído gerados na superfície do suporte por ativação deste - Guisán *et al.*, 1992.

A escolha dos grupos aminos das enzimas para o processo de ligação multipontual se deve, basicamente, a três fatores: a maioria das proteínas apresenta muitos resíduos de lisina que, geralmente, não estão envolvidos no sítio catalítico; os grupos aminos são polares e estão geralmente expostos ao meio aquoso na superfície da proteína e, finalmente, quando estão desprotonados são muito reativos - Guisán, 1988. Os grupos aldeídos do suporte parecem ser uma boa opção para o processo de multiinteração com os grupos aminos da enzima, pois não possuem grandes substituintes no átomo de carbono que promovam impedimentos estéricos na reação com aminas; são muito estáveis e conferem ao suporte alto grau de ativação, permitindo, quando necessário, que o processo de multiinteração enzima-suporte ocorra por longos períodos. As bases de Schiff (-CH=N-), ligações instáveis e reversíveis, inicialmente formadas entre os grupos amino da enzima e os aldeídos do suporte podem ser reduzidas a aminas secundárias estáveis e os grupos aldeídos remanescentes podem ser convertidos em hidroxilas inertes, por meio de redução com borohidreto de sódio. O boridreto tem se mostrado bastante apropriado como agente redutor, pois sendo uma molécula pequena, difunde facilmente para dentro da estrutura fechada formada pelas bases de Schiff entre cada molécula de enzima e o suporte. Além disso, Blanco & Guisán (1989) demonstraram que a redução feita em condições ótimas não exercia efeitos deletérios à estrutura da enzima. A Figura 2.14 mostra o sistema de imobilização/estabilização proposto por Guisán *et al.*, 1992.

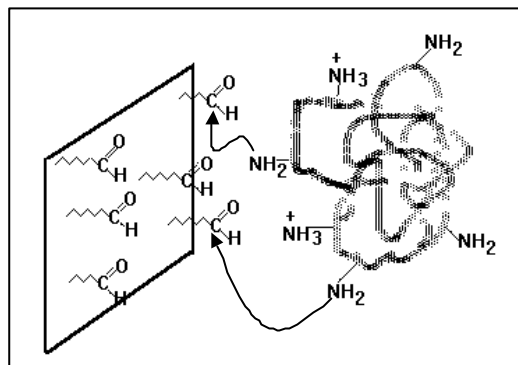


Figura 2.14: Sistema de imobilização/estabilização proposto por Guisán *et al.*, 1992. Ligação da enzima via seus grupos aminos a grupos aldeídos alifáticos moderadamente separados da superfície do suporte.

2.6. TÉCNICAS DE SEPARAÇÃO

2.6.1. CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (HPLC)

A cromatografia líquida de alta eficiência é uma técnica desenvolvida para produzir separações precisas de misturas complexas e oferecer separação de alta resolução. Esta técnica nasceu essencialmente como uma técnica de separação, mas com os recursos que ela apresenta atualmente, passou a ocupar um lugar de grande destaque como técnica analítica qualitativa e quantitativa. Apesar de ser relativamente nova, a técnica de HPLC pode ser empregada para determinação de substâncias cujas análises por outras técnicas são muito difíceis, demoradas ou mesmo impossíveis, ou seja, é capaz de realizar detecções tão pequenas quanto 200pg de material - Bidlingmeyer, 1992. Baseia-se na distribuição diferenciada dos componentes da amostra entre as fases móvel e estacionária, já que cada componente apresenta uma habilidade distinta em se difundir através delas. A separação de proteínas, peptídeos e aminoácidos emprega, comumente, técnicas cromatográficas onde predominam processos de interação hidrofóbica, formação de par iônico, exclusão por tamanho e troca iônica. A cromatografia de fase reversa é uma modalidade que se baseia em mecanismos de interação hidrofóbica e utiliza como fase móvel uma mistura água/solvente orgânico com polaridade maior que a da fase estacionária. O processo cromatográfico pode ser representado como ilustrado na Figura 2.15.

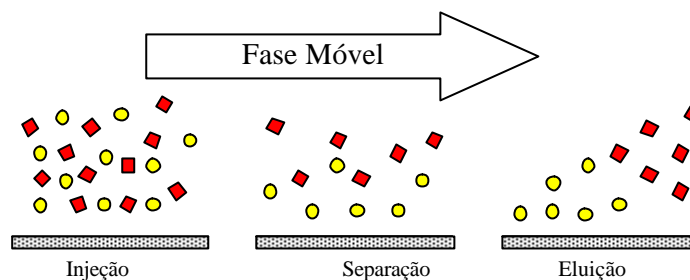


Figura 2.15: Representação esquemática de um processo cromatográfico (Bidlingmeyer, 1992).

2.6.1.1. CROMATOGRAFIA DE EXCLUSÃO POR TAMANHO (ANÁLISE DE PEPTÍDEOS)

A cromatografia em gel é baseada na penetração de moléculas do soluto dentro de pequenos poros de partículas empacotadas com base no tamanho molecular e tipo de moléculas de soluto.

O empacotamento para cromatografia de exclusão por tamanho consiste de pequenas partículas poliméricas ou de sílica ($\approx 10\mu\text{m}$), contendo uma rede de poros uniformes para os quais as moléculas de soluto e solvente podem difundir, enquanto nos poros as moléculas são efetivamente aprisionadas e removidas do fluxo da fase móvel. O tempo médio de residência depende do seu tamanho efetivo. Moléculas que são significativamente maiores que o tamanho médio dos poros de empacotamento são excluídas e então, não sofrem retenção, ou seja, passam através da coluna numa taxa igual a da fase móvel. Moléculas menores que os poros podem penetrar através do labirinto de poros e, então, serem aprisionadas por mais tempo, sendo as últimas a serem eluídas. Entre estes dois extremos estão as moléculas de tamanho intermediário, cuja penetração média nos poros depende dos diferentes diâmetros.

As colunas poliméricas e de sílica são normalmente utilizadas em cromatografia de exclusão por tamanho. As colunas poliméricas são usadas nas análises de polímeros sintéticos e plásticos onde solventes orgânicos são requeridos. Colunas baseadas em sílica com fases ligadas hidrofílicas são usadas para separar soluções aquosas de macromoléculas. Estas colunas também estão disponíveis para separação de polissacarídeos e proteínas.

2.6.1.2. CROMATOGRAFIA DE TROCA IÔNICA (ANÁLISE DE AMINOÁCIDOS)

Na cromatografia de troca iônica a fase estacionária é altamente carregada. Os solutos presentes na fase móvel (da própria fase móvel ou de amostras injetadas) e com cargas contrárias a ela são seletivamente adsorvidos. Os solutos adsorvidos podem ser subsequentemente eluídos por deslocamento com outros íons, com mesmo tipo de carga, porém com maior força de interação com a fase estacionária.

A força motriz deste tipo de cromatografia consiste nos diferentes graus de afinidade eletrostática entre o trocador e os íons da fase móvel. De acordo com este método, a separação de materiais se baseia na adsorção reversível e diferenciada dos íons da fase móvel pelo grupo trocador da matriz.

O mecanismo da ação de um trocador iônico está ilustrado na Figura 2.16. Em (a), A^+ e B^{2+} são os materiais a serem separados e o trocador catiônico está em equilíbrio com o eluente inicial contendo os íons X^+ . Quando determinada quantidade de tais amostras é colocada em contato com o trocador, ocorre adsorção destas e liberação de uma quantidade equivalente de íons X^+ , anteriormente ligados à matriz (b). Após a adsorção, aplica-se um segundo eluente contendo íons Y^+ com maior afinidade pelos grupos trocadores da matriz. Estes íons provocarão a liberação da substância A^+ , mais fracamente ligada à matriz que a substância B^{2+} (c). Passando-se a seguir o terceiro eluente, contendo íons Z^+ com afinidade ainda superior pela matriz, ocorrerá a liberação da substância B^{2+} e, assim, a separação dos materiais A^+ e B^{2+} (d). O efeito dos íons de maior afinidade com relação a X^+ , ou seja, Y^+ e Z^+ , pode também ser conseguido via aumento da concentração deste, alterando-se assim, o equilíbrio entre as fases móvel e estacionária - Spadaro, 1995.

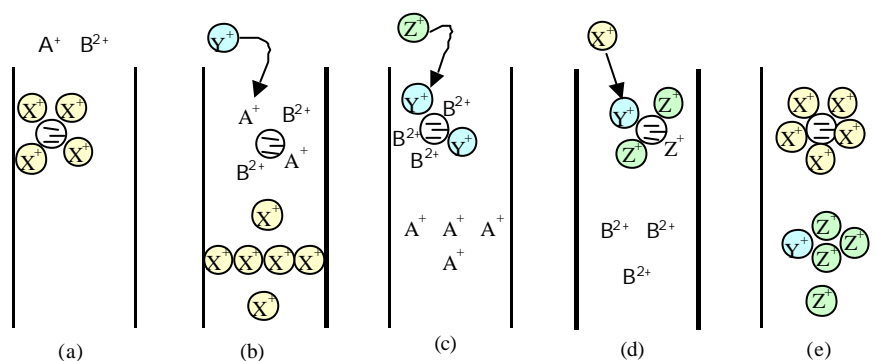


Figura 2.16: Esquema do mecanismo de troca iônica. A^+ e B^{2+} são materiais a serem separados. X^+ , Y^+ e Z^+ são íons contidos nos eluentes 1, 2 e 3, respectivamente.

Para que a coluna possa ser novamente utilizada ela precisa ser regenerada, ou seja, ser equilibrada com o eluente inicial. Neste caso, os íons do eluente têm uma menor afinidade pelo trocador da matriz, mas a condição de equilíbrio é alcançada fazendo-se passar pela coluna um volume de eluente de 5-10 vezes maior que sua capacidade. Assim, é possível ocorrer a troca de íons, eliminando aqueles contidos nos eluentes anteriormente utilizados. Desta forma, o grau de afinidade é superado pela maior concentração de íons (e).

A análise de aminoácidos requer, além da separação destes através de uma coluna cromatográfica apropriada, derivatização das substâncias, pois apenas fenilalanina e triptofano absorvem luz significativamente. Dessa forma, são realizadas reações dos aminoácidos com reagentes com alta capacidade de absorção (geralmente ninidrina e OPA) de modo a se fazer a detecção dessas substâncias antes ou após sua separação na coluna (derivatização pré ou pós-coluna).

2.7. REDES NEURAIIS

As redes neurais serão apresentadas de maneira geral, já que foram aqui utilizadas apenas como uma ferramenta genérica para interpolação de dados.

Em meados da década de quarenta surgiram os primeiros estudos no campo das redes neurais artificiais (RNAs). No ano de 1943 o neurobiologista McCulloch e o estatístico Pitts publicaram as primeiras informações sobre a neuro computação, sugerindo a construção de uma máquina baseada ou inspirada no cérebro humano. A idéia inicial era simular a atividade neural humana, definindo componentes lógicos similares aos neurônios naturais. Estes pesquisadores foram os primeiros a propor o conceito de um neurônio como sendo uma unidade de processamento que recebia vários estímulos de entrada e gerava um sinal baseado no resultado do somatório de tais estímulos.

Um modelo baseado em Redes Neurais é, essencialmente, empírico, diferindo de modelos construídos a partir de princípios básicos (equações de balanço em processos químicos ou físicos). Por isso, as redes neurais necessitam de muitos dados para resolver problemas complexos.

Em linhas gerais, uma rede neural é uma estrutura de processamento de informação composta de nós ou elementos de processamento, associados a pesos. Os nós são conectados uns aos outros através de arestas que funcionam como caminhos de

condução instantânea de sinais em uma única direção, de forma que seus elementos de processamento podem receber qualquer número de conexões de entrada e qualquer sinal se propaga por todos eles de forma a alterá-los os pesos.

A maioria dos modelos de redes neurais possui alguma regra de treinamento onde os pesos de suas conexões são ajustados de acordo com os padrões apresentados, ou seja, elas aprendem através de exemplos. Arquiteturas neurais são tipicamente organizadas em camadas, com unidades que podem estar conectadas às unidades da camada posterior - Figura 2.17.

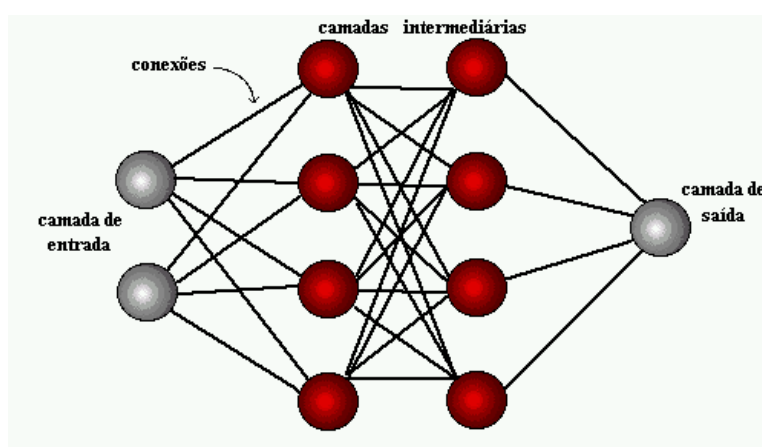


Figura 2.17: Estrutura organizacional de uma rede neural em camadas.
<http://www.din.uem.br/ia/neurais/#indice>

Em teoria, a rede terá tantos nós quanto mais precisa for a resposta desejada a um estímulo externo. Ela deve ser treinada sobre o problema em questão e para isso lhe serão fornecidos dados de entrada e implementadas propagações de forma que a alteração dos pesos ao longo da rede forneça uma saída compatível com a resposta conhecida àquele estímulo pré-determinado. Desta forma, os pesos são balanceados, ou otimizados, até obter um padrão de respostas aos estímulos, compatível com aquele que se conhece.

Os passos necessários para o desenvolvimento de aplicações utilizando redes neurais artificiais podem ser resumidos como segue:

1 e 2. Coleta de Dados e Separação em Conjuntos

Os dois primeiros passos do processo de desenvolvimento de redes neurais artificiais são a coleta de dados relativos ao problema e a sua separação em um conjunto

de treinamento e um conjunto de testes. Esta tarefa requer uma análise cuidadosa sobre o problema para minimizar ambigüidades e erros nos dados.

Normalmente, os dados coletados são separados em duas categorias: dados de treinamento, que serão utilizados para o treinamento da rede e dados de teste, que serão utilizados para verificar seu desempenho sob condições reais de utilização. Além dessa divisão, pode-se usar também uma subdivisão do conjunto de treinamento, criando um conjunto de validação, utilizado para verificar a eficiência da rede quanto à sua capacidade de generalização durante o treinamento, e podendo ser empregado como critério de parada do treinamento.

Determinados estes conjuntos, eles são geralmente colocados em ordem aleatória para prevenção de tendências associadas à ordem de apresentação dos dados. Além disso, pode ser necessário pré-processar estes dados, através de normalizações, escalonamentos e conversões de formato para torná-los mais apropriados à sua utilização pela rede.

3. Configuração da Rede

O terceiro passo é a definição da configuração da rede, que pode ser dividida em três etapas:

- a) Seleção o tipo de rede neural apropriada à aplicação;
- b) Determinação da topologia da rede a ser utilizada - número de camadas, número de unidades em cada camada, etc;
- c) Determinação de parâmetros do algoritmo de treinamento e funções de ativação. Este passo tem um grande impacto no desempenho do sistema resultante.

A definição da configuração de redes neurais ainda pode ser considerada uma "arte", pois requer grande experiência do usuário.

4. Treinamento

O quarto passo é o treinamento da rede. Nesta fase, seguindo o algoritmo de treinamento escolhido, serão ajustados os pesos das conexões. É importante considerar, nesta fase, alguns aspectos tais como a inicialização da rede, o modo de treinamento e o tempo de treinamento.

Quanto ao tempo de treinamento, vários fatores podem influenciar a sua duração, porém sempre será necessário utilizar algum critério de parada. O critério de parada do algoritmo *backpropagation* não é bem definido, e geralmente é utilizado um

número máximo de ciclos. Mas, devem ser consideradas a taxa de decréscimo do erro médio por ciclo e a capacidade de generalização da rede.

O treinamento deve ser interrompido quando a rede apresentar uma boa capacidade de generalização, quando a taxa de erro for pequena e este for suficientemente menor que um erro admissível. Assim, deve-se encontrar um ponto ótimo de parada com erro mínimo e capacidade de generalização máxima.

5. Teste

O quinto passo é o teste da rede. Durante esta fase o conjunto de teste é utilizado para determinar o desempenho da rede com dados que não foram previamente utilizados. O desempenho da rede, medido nesta fase, é uma boa indicação de seu desempenho real.

6. Implementação

Finalmente, com a rede treinada e avaliada, ela pode ser integrada em um sistema do ambiente operacional da aplicação.

Pelo que foi exposto, uma das características mais importantes das redes neurais é sua capacidade de aprendizado, ou seja, a possibilidade de estabelecer, de forma precisa, relações complexas entre diversas variáveis numéricas, sem que seja imposto qualquer modelo preconcebido. Desta forma, no ritmo em que se faz intensa pesquisa sobre o assunto, as aplicações das redes neurais vêm se disseminando amplamente em um prazo relativamente curto.

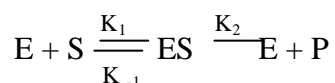
2.8. CINÉTICA DA HIDRÓLISE DAS PROTEÍNAS DO SORO

O termo *cinética* pode ser definido como sendo o estudo da velocidade da reação e como ela sofre alterações em resposta a mudanças nas condições experimentais. Esta é a maneira mais antiga de estudar os mecanismos enzimáticos e ainda hoje permanece muito importante.

Os fatores que influenciam a velocidade de uma reação enzimática são a temperatura, o pH, a concentração de substrato e a concentração de inibidores. Quanto maior a temperatura maior será a velocidade da reação, até que seja atingida a temperatura ótima de ação da enzima. A partir dessa temperatura, a enzima sofre desnaturação e, portanto, a velocidade da reação volta a diminuir. Assim como ocorre

com a temperatura, existe também um pH ótimo onde a distribuição das cargas elétricas no sítio ativo é ideal para a catálise. Para valores de pH acima ou abaixo do ótimo, também é possível observar redução na velocidade da reação. Com relação ao efeito da concentração do substrato é geralmente aceito que as reações enzimáticas normalmente seguem o modelo de Michaelis-Menten.

A cinética da hidrólise das proteínas do soro de queijo catalisada por tripsina solúvel já foi estudada por Custódio (2001) e mostrou seguir modelo de Michaelis-Menten. Este fato, porém, não foi observado quando esta mesma reação hidrolítica foi catalisada pela enzima quimotripsina - Vorob'ev *et al.*, 1994. O mecanismo no qual se baseou o modelo de Michaelis-Menten foi proposto por Brown e teve sua formulação feita através de um brilhante tratamento matemático dado por Henri, real autor da equação freqüentemente atribuída a Michaelis e Menten, que reconheceram que seus propósitos foram apenas fornecer evidência experimental ao modelo matemático formulado por Henri - Schulz, 1994. O mecanismo proposto por Brown (uma só enzima e um só substrato) foi:



Onde: E é a concentração de enzima; S a concentração de substrato; ES a concentração do complexo de transição enzima-substrato e P o produto da reação.

O tratamento matemático que se apresenta a seguir foi dado por Briggs e Haldane (Schulz, 1994), que ao formular a hipótese de estado pseudo-estacionário, permitiu que fosse obtida uma formulação mais geral da equação. A formulação de Henri, que utiliza a hipótese de equilíbrio rápido para justificar que a concentração do complexo ES permanece constante ao longo da reação, só torna a equação aplicável a sistemas onde a velocidade de decomposição do produto seja muito menor que a decomposição do complexo para regenerar $E + S$. Outras hipóteses são $S \gg E$ e decomposição do complexo em $E + P$ irreversível (ou tomada de velocidades iniciais, situação onde a concentração de produto é muito baixa e assim também a velocidade da reação reversa também o é). Obtém-se, assim, uma expressão matemática para a variação da velocidade da reação com a concentração de substrato. A curva que representa esta equação tem a mesma forma geral para a grande maioria das enzimas (hipérbole retangular) e pode ser expressa algebricamente pela Equação de Michaelis-Menten (Eq. 2.1):

$$V = V_{m\acute{a}x} \frac{S}{K_m + S} \quad (\text{Eq. 2.1})$$

Onde: V é a velocidade de consumo de substrato; $V_{m\acute{a}x}$ é a velocidade máxima de consumo do substrato; S é a concentração de substrato e K_m a constante de Michaelis-Menten.

$$\text{Os valores de } K_m \text{ e } V_{m\acute{a}x} \text{ são dados por: } K_m = \frac{[S][E]}{[ES]} \quad (\text{Eq. 2.2})$$

$$V_{m\acute{a}x} = K_2 [E] \quad (\text{Eq. 2.3})$$

O valor da constante K_m é característico e nos fornece um parâmetro da especificidade de uma determinada enzima em relação a um substrato específico. O parâmetro $V_{m\acute{a}x}$ indica a velocidade limitante de uma reação catalisada por uma enzima nas condições de saturação. O parâmetro K_2 , também chamado número de *turnover*, indica o número de moléculas de substrato que são convertidas em produto por uma única molécula de enzima em uma dada unidade de tempo, quando a enzima está saturada com o substrato - Lehninger & Cox, 2000.

Uma forma precisa de se obter as velocidades de reação para diferentes concentrações de substrato é através do método das velocidades iniciais. Nesta abordagem, as velocidades iniciais são medidas para tempos reacionais curtos (aproximadamente cinco minutos de reação), ou seja, neste período apenas a concentração inicial de substrato estará influenciando a medida da velocidade. Nesse caso, mesmo que haja inibição pelos produtos da reação ou que esta seja reversível, no curto tempo de reação considerado as concentrações dos produtos serão muito pequenas e poderão ser desprezadas, assim como a velocidade da reação reversa, podendo-se considerar que o modelo clássico de Michaelis-Menten representa bem a influência da concentração do substrato na velocidade da reação. O aumento da concentração dos produtos (oligopeptídeos gerados pela hidrólise de ligações peptídicas catalisadas por proteases, por exemplo) em função do tempo, determinado para curto intervalo de tempo, permite a determinação da velocidade inicial da reação para cada concentração inicial de substrato, obtida a partir do coeficiente angular da reta ajustada aos pontos de concentração de produto em função do tempo. Conhecido o modelo cinético da reação, os parâmetros cinéticos podem ser obtidos ajustando-se esse modelo, Michaelis-Menten, por exemplo, aos pontos experimentais de velocidade inicial em função da concentração do substrato. Os valores dos parâmetros $V_{m\acute{a}x}$ e K_m que conduzirem ao

melhor ajuste do modelo aos pontos experimentais serão aceitos como as melhores estimativas.

Cada sistema enzima-substrato apresenta valores característicos de velocidade de reação (expressa em termos dos parâmetros cinéticos $V_{m\acute{a}x}$ e K_m) para condições específicas de pH, temperatura e concentração de substrato. No caso de sistemas operando com enzimas imobilizadas, a concentração real de substrato no interior dos poros, em torno da enzima imobilizada, pode ser menor que a observada em torno da enzima livre em sistemas homogêneos, devido a atrasos difusionais no transporte do substrato através da camada estagnada que circunda o suporte e/ou através do poro deste. Além disso, esses valores característicos obtidos para a enzima livre podem ainda mudar com a imobilização devido a alterações na estabilidade da enzima por mudanças conformacionais desta, efeitos eletrostáticos ou de partição, etc.

2.8.1. PRESENÇA DE INIBIDORES NO MEIO REACIONAL

Como já anteriormente comentado, a determinação da cinética enzimática através do modelo de Michaelis-Menten, feitas as devidas suposições, é plenamente possível e relativamente simples. No entanto, à medida que os sistemas vão se tornando um pouco mais complexos, a determinação da cinética irá requerer um tratamento mais detalhado e rigoroso. Este é o caso típico de sistemas nos quais são observados efeitos inibitórios, ou seja, sistemas onde estão presentes agentes que interferem na reação, reduzindo sua velocidade. Exemplos típicos da cinética de Michaelis-Menten com inibição pelo produto, pelo substrato e pelo produto e substrato simultaneamente são representados pelas equações 2.4, 2.5 e 2.6, respectivamente.

$$V = \frac{V_{m\acute{a}x} * S}{K_m \left(1 + \frac{I}{K_I} \right) + S} \quad (\text{Eq. 2.4})$$

$$V = \frac{V_{m\acute{a}x} * S}{K_m + S \left(1 + \frac{S}{K_S} \right)} \quad (\text{Eq. 2.5})$$

$$V = \frac{V_{m\acute{a}x} * S}{K_m \left(1 + \frac{I}{K_I} \right) + S \left(1 + \frac{S}{K_S} \right)} \quad (\text{Eq. 2.6})$$

Os inibidores podem ser irreversíveis ou reversíveis. Estes últimos podem ser classificados como competitivos, não-competitivos e acompetitivos, de acordo com influência que exercem na velocidade inicial da reação.

A inibição competitiva caracteriza-se pela competição entre o inibidor e o substrato pelo sítio ativo da enzima. Enquanto este agente se mantém ligado à enzima não ocorre reação, pois ele impede a formação do complexo enzima-substrato. Neste tipo de inibição o valor de K_m aumenta e $V_{m\acute{a}x}$ permanece constante, embora a concentração de substrato necessária para se atingir qualquer fração de $V_{m\acute{a}x}$ seja maior comparada àquela da reação na ausência de inibidor. A Figura 2.18 ilustra esquematicamente o mecanismo de inibição competitiva.

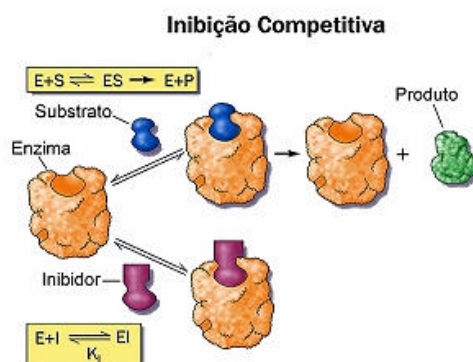


Figura 2.18: Representação esquemática do mecanismo de inibição competitiva (Lehninger & Cox, 2000).

Na inibição não-competitiva o inibidor se liga a um sítio diferente daquele ao qual o substrato irá se ligar. Neste processo, pode ocorrer deformação da estrutura da enzima, impedindo que o substrato se aloje perfeitamente em seu sítio ativo, ou mesmo ocorrendo, impede que a formação de produtos ocorra na velocidade normal. Esta inibição irá produzir redução em $V_{m\acute{a}x}$, mas a afinidade da enzima pelo substrato não sofrerá alteração, ou seja, não haverá alteração no parâmetro K_m . A Figura 2.19 ilustra esquematicamente o mecanismo de inibição não-competitiva.

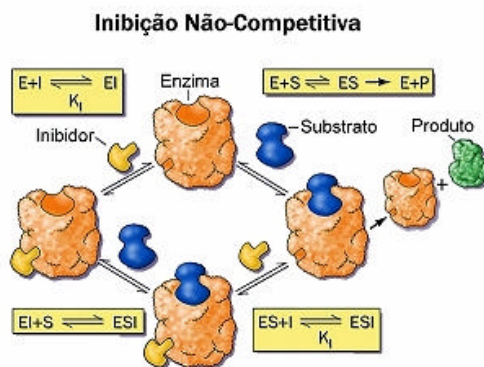


Figura 2.19: Representação esquemática do mecanismo de inibição não-competitiva (Lehninger & Cox, 2000).

A inibição acompetitiva caracteriza-se pela formação de um complexo *ESI*, ou seja, pela ligação do inibidor ao complexo *ES* inicialmente formado. Neste processo, qualquer que seja a concentração de substrato haverá sempre uma forma improdutivo (complexo *ESI*), reduzindo-se assim a velocidade máxima da reação. O valor do parâmetro K_m também diminui, pois parte do complexo produtivo *ES* é consumido na formação do complexo improdutivo. A Figura 2.20 ilustra esquematicamente o mecanismo de inibição acompetitiva.

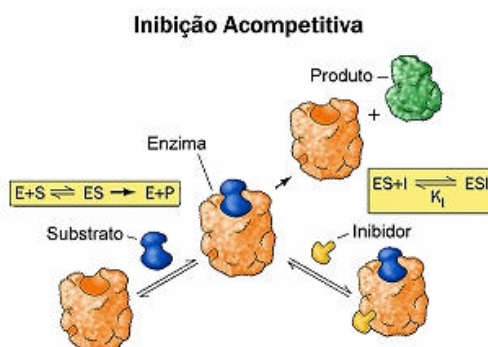


Figura 2.20: Representação esquemática do mecanismo de inibição acompetitiva (Lehninger & Cox, 2000).

2.8.2. EFEITOS DIFUSIVOS

A cinética observada da enzima imobilizada pode não estar sendo governada apenas por interações entre a enzima e o substrato, mas pode também estar sendo limitada pela taxa de difusão do substrato à superfície do suporte ou, internamente, por

entre os poros do suporte. Nesse caso, a concentração real de substrato que está em equilíbrio com a enzima imobilizada (sistema heterogêneo) é menor que a que haveria caso reagente e catalisador fossem solúveis (sistema homogêneo), conseqüentemente, a velocidade de reação do sistema contendo enzima imobilizada (velocidade real) é menor do que a velocidade do sistema livre.

Efeitos difusivos externos surgem quando a velocidade de difusão do substrato na camada estagnada que envolve a partícula porosa onde está imobilizada a enzima é comparável à velocidade intrínseca da reação. Esse efeito pode ser minimizado aumentando-se a velocidade do fluido de modo a diminuir a espessura dessa camada, e, conseqüentemente, o tempo de difusão. Quando o catalisador está imobilizado na área interna de uma partícula porosa, podem surgir também efeitos difusionais intrapartícula, em função da necessidade do substrato de se difundir no interior desses poros para encontrar a enzima imobilizada e só então reagir.

Na difusão interna apenas a fração do catalisador ocupada pelo fluido que preenche os poros está disponível para difusão, fração quantificada pela porosidade do suporte; a geometria do poro é complexa e não uniforme, aumentando o caminho a ser percorrido; as moléculas de substrato e o poro do catalisador podem ter tamanhos similares, o que causa restrição da difusão, diminuindo a velocidade de difusão em relação à molecular, que ocorre na camada estagnada. Tais efeitos são incorporados na difusividade efetiva (D_{eff} - Eq. 2.7).

$$D_{eff} = D_A \cdot \frac{\epsilon_p \cdot S}{t} \quad (\text{Eq. 2.7})$$

onde:

- D_A é o diâmetro da partícula;
- ϵ_p é a porosidade do suporte;
- S é o fator de constricção: depende da razão entre a maior e a menor área do poro;
- t é a tortuosidade: razão entre o caminho real que uma molécula percorre entre dois pontos no interior do poro e o menor caminho entre esses dois pontos.

Na difusão externa, difusão no filme e reação na superfície da partícula são fenômenos que ocorrem em série; na difusão interna, difusão e reação ocorrem simultaneamente no interior da partícula, com a velocidade de reação sendo função do

diâmetro da partícula. Assim, a velocidade global aparente é uma velocidade média obtida pela integração da velocidade ao longo do raio do suporte.

Uma forma de se avaliar se o processo enzimático é regido ou não por efeitos difusivos intrapartícula refere-se ao cálculo da efetividade interna (η_i), que relaciona a velocidade real da reação (com a enzima imobilizada) com aquela que deveria ser obtida na ausência de efeitos difusivos (como se a enzima estivesse livre). Assim, para $\eta_i \ll 1$, tem-se que a velocidade real do sistema é muito menor que a velocidade teórica; logo, há resistência difusional limitando o consumo do substrato (parâmetros cinéticos aparentes). Para $\eta_i = 1$ não são observados efeitos difusivos limitando a reação (parâmetros cinéticos inerentes).

A estimativa de η_i pode ser feita usando correlações experimentais entre η_i e o adimensional ϕ (módulo de Thiele), visto que $h = f(\phi)$ - Figura 2.21. Dependendo da cinética da reação, diferentes combinações de variáveis podem ser usadas para o módulo de Thiele, como mostram as equações 2.8 e 2.9 - Blanch & Clark, 1997.

- Para reação de ordem n:

$$f_n = R_p \cdot \left(\frac{S_p \cdot r_p \cdot k_n \cdot (C_s)^{n-1}}{D_{eff}} \right)^{1/2} \quad (\text{Eq. 2.8})$$

- Para cinética de Michaelis-Menten (esfera):

$$\phi = \frac{R_p}{3} \left[\frac{v_{m\acute{a}x}}{k_m \cdot D_{eff}} \right]^{1/2} \quad \text{ou} \quad \phi^2 = \frac{R_p^2}{9} \cdot \frac{v_{m\acute{a}x}}{k_m \cdot D_{eff}} \quad (\text{Eq. 2.9})$$

Problemas difusionais ocorrem em conseqüência de atrasos no transporte de substrato para o interior da partícula, fazendo com que a concentração de substrato no interior seja menor que a concentração de substrato na superfície. Assim, quando a velocidade intrínseca não depende da concentração de substrato (ordem zero) é porque este está em grande excesso e, neste caso, $\beta_s \gg 1$ ($\beta_s = C_s/K_m$). A não ser que ϕ seja muito grande, ou seja, $V_{m\acute{a}x}$ muito maior que D_{eff} (reação extremamente rápida), mesmo que a concentração do substrato seja menor no interior da partícula pode ser que ele ainda esteja em excesso relativamente à K_m , fazendo com que a efetividade se mantenha próxima de 1.

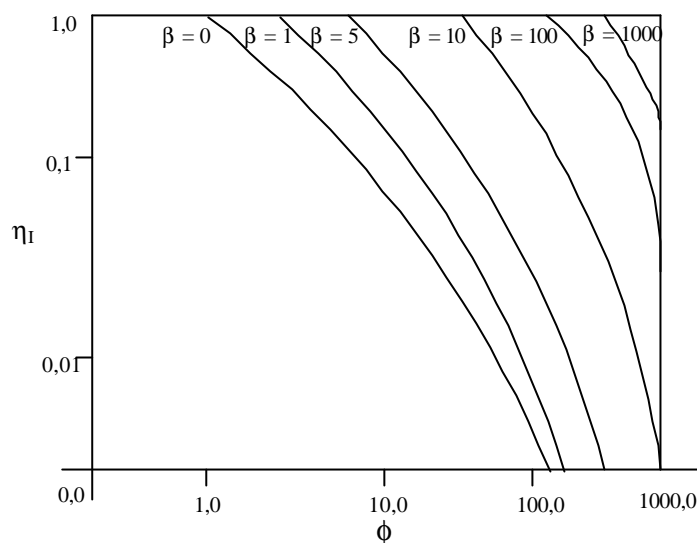


Figura 2.21: Fator de efetividade interno (η_I) em função do módulo de Thiele (ϕ), para diversos valores de concentração de substrato adimensional $\beta_s = C_s/K_m$.

Quanto menor a concentração do substrato, mais importantes se tornam os efeitos difusionais, pois a velocidade da reação se torna muito sensível a variações na concentração do substrato. A Figura 2.21 mostra como esse fato implica que para mesmos valores de módulo de Thiele a efetividade diminui com a diminuição de β . Deste modo, altos valores de ϕ significam reação rápida e/ou difusão lenta e diminuição da efetividade com a diminuição de β ; baixos valores de ϕ significam reação lenta e/ou difusão rápida, com $\eta \approx 1$ para qualquer β .

2.8.3. MODELOS CINÉTICOS

A grande maioria dos trabalhos publicados relacionados à hidrólise enzimática de proteínas limita-se a buscar condições operacionais ótimas para a produção industrial de hidrolisados. No entanto, poucas publicações abordam o estudo cinético da reação com o intuito de obter uma equação de velocidade em função das variáveis do processo que permita dimensionar o reator correspondente e também um maior entendimento e controle do processo hidrolítico. Isto pode ser devido fundamentalmente a duas razões: complexidade da reação (ruptura simultânea de enlaces de distinta reatividade, produtos que ainda representam substrato para o processo, inibição e desativação da enzima, etc) e sua importância econômica, que determina um maior interesse pelo desenvolvimento e patenteamento de processos comerciais - González-Tello *et al.*, 1994.

Mihalyi & Harrington (1959) e Mihalyi & Godfrey (1963) - citados em Margot *et al.*, 1997 - estudaram, respectivamente, a extensão das reações de hidrólise da miosina e do fibrinogênio catalisadas por tripsina, em termos do consumo de base obtido utilizando o método do pHstato. Estudos similares também foram desenvolvidos por Archer *et al.* (1973) - citação feita em Margot *et al.*, 1997 - para a hidrólise de proteínas de peixe parcialmente solúveis e mais recentemente, Galvão e colaboradores (2001) também estudaram a hidrólise de proteínas do soro de queijo com tripsina solúvel utilizando esta mesma técnica.

Márquez & Vázquez (1999) citam que o grande número de ligações peptídicas rompidas, tanto em série quanto em paralelo, durante a hidrólise enzimática da maioria das moléculas poliméricas representa uma limitação natural à possibilidade de estimativa de parâmetros cinéticos básicos. Este é um problema geral no estabelecimento de modelos cinéticos para a hidrólise de substratos macromoleculares.

A hidrólise de peptídeos de cadeia curta pode seguir uma cinética enzimática simples, mas a proteólise de proteínas ou misturas protéicas que ocorrem naturalmente recai em modelos complexos de velocidade - Margot *et al.*, 1997. Deste modo, se o modelo cinético é muito simples, sua representação inadequada do mecanismo real limitará sua aplicabilidade geral, enquanto que um modelo muito complexo não pode ser analisado estatisticamente com precisão suficiente a partir de simples ensaios cinéticos - Márquez & Vázquez, 1999. Para superar estes inconvenientes, equações de velocidade empíricas simples podem ser aplicadas para expressar curvas de hidrólise, obtendo-se daí, muitas informações.

Márquez & Vázquez (1999) também mostraram que curvas de hidrólise de proteínas catalisadas por enzimas em solução podem ser modeladas por uma equação empírica relativamente simples da qual os parâmetros cinéticos podem ser deduzidos:

$$\frac{d(GH)}{dt} = a * \exp[-b * (GH)] \quad (\text{Eq. 2.10})$$

onde GH representa o grau de hidrólise, definido segundo Adler-Nissen, 1986. A influência da concentração de substrato e da concentração de enzima nos parâmetros *a* e *b* foi investigada: o parâmetro *a* mostrou clara dependência tanto com a concentração inicial do substrato quanto com a concentração inicial de enzima, enquanto que o parâmetro *b* praticamente não sofreu alteração, sendo considerado constante e independente dessas variáveis. Esta equação cinética pode ser assumida se a hidrólise é modelada como uma reação de ordem zero com simultânea inativação de segunda

ordem da enzima. Este modelo cinético concorda com dados publicados em trabalhos anteriores sobre cinética da hidrólise enzimática para outras proteínas animais e vegetais. Isto sugere que a mesma equação cinética é aplicável para diferentes substratos e condições operacionais.

A principal característica da cinética da hidrólise catalisada por proteases parece ser a inibição pelos peptídeos formados bem como a inativação da enzima por autólise. Alguns modelos propostos por Margot *et al.* (1997) são capazes de fornecer uma boa descrição dos dados sob condições experimentais diversas. A conversão de substratos heterogêneos como, por exemplo, proteínas, requer preferencialmente a utilização de proteases solúveis, pois assim, evita-se severos problemas de transferência de massa intra-partícula. No entanto, o binômio custo/inativação da enzima ao longo do tempo deve ser levado em consideração. Esses autores utilizaram dados de hidrólise das proteínas do soro a 55°C, concentração inicial de substrato constante, pH 7,3 e diferentes relações enzima-substrato para pesquisar modelos matemáticos capazes de descrever a cinética desta reação. A seguir, estão listados alguns dos modelos pesquisados:

$$\frac{dX}{dt} = \frac{a_1 a_2}{(a_2 + t)^2} + a_3 \quad (\text{Eq. 2.11})$$

$$\frac{dX}{dt} = a_1 a_2 \exp(-a_2 t) + a_3 a_4 \exp(-a_4 t) \quad (\text{Eq. 2.12})$$

$$\frac{dX}{dt} = a_1 \left\{ a_2 + \frac{[a_3 + a_3 a_4 + (a_4 a_5 - a_3 a_4) \exp(-a_5 t)] \exp(-a_3 t)}{[1 + a_4 - a_4 \exp(-a_5 t)]^2} \right\} \quad (\text{Eq. 2.13})$$

$$\frac{S_0}{E_0} \frac{dX}{dt} = \frac{a_1 S_0 (a_4 - X)}{a_2 + S_0 (a_4 - X) + 2 a_3 S_0^2 (X - X_0) (a_4 - X)} \quad (\text{Eq. 2.14a})$$

$$a_4 = I \quad (\text{Eq. 2.14b})$$

$$\frac{dX}{dt} = a_1 \frac{E_0}{S_0^2} \exp(-a_2 X) \quad (\text{Eq. 2.15})$$

onde,

→ X é a conversão de proteínas solúveis;

→ $a_1 = k_2' = k_2 \frac{k_{ic}}{k_{ic} - k_m} = \text{Constante aparente de velocidade};$

→ $a_2 = k_m' = k_m \frac{k_{ic} + S_0}{k_{ic} - k_m} = \text{Constante aparente de Michaelis-Menten};$

→ $a_3 = k'; a_4 = X_{eq}; X \rightarrow \text{Fração de proteína solúvel};$

→ E_0 → *Concentração de enzima*; S_0 → *Concentração inicial de substrato*;

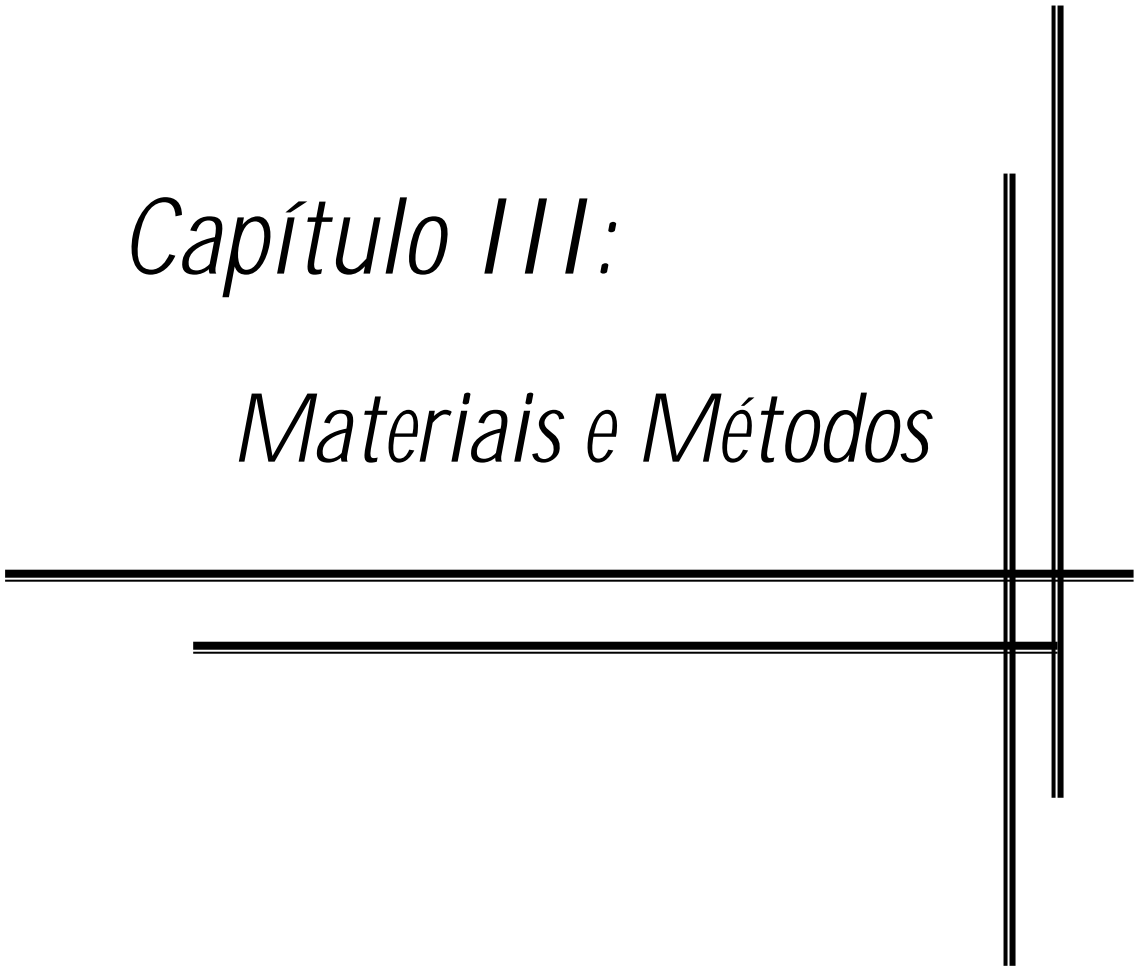
→ t → *Tempo (min)*.

O modelo representado pela Eq. 2.15 mostrou-se facilmente adaptável para sistemas com forte inibição pelo produto e baixas velocidades de desativação do catalisador, sendo uma de suas principais características a presença de apenas dois parâmetros.

Com base no que foi exposto no decorrer deste item (2.8.3), pode-se inferir que a complexidade do sistema em questão indicará o tipo de modelo que melhor representará a cinética da reação estudada, se empírico ou fenomenológico.

Capítulo III:

Materiais e Métodos



3. MATERIAIS E MÉTODOS

Neste item serão apresentados os materiais utilizados no desenvolvimento experimental deste trabalho, bem como a metodologia empregada para tal.

3.1. MATERIAIS

O **soro de queijo** foi o principal material utilizado neste trabalho, mas enzimas, substratos, suportes, padrões de aminoácidos, peptídeos e proteínas, além de diferentes reagentes também foram materiais aqui utilizados.

3.1.1. ENZIMAS

Tripsina (*EC 3.4.21.4*) do pâncreas bovino, tipo II, dialisada, liofilizada e livre de sais foi adquirida da Sigma Chemical Co. Tripsina livre de sais foi gentilmente doada pela Novo Nordisk BioIndustrial do Brasil.

Quimotripsina (*EC 3.4.21.1*) do pâncreas bovino, tipo II, três vezes cristalizada a partir do quimotripsinogênio quatro vezes cristalizado, liofilizada e livre de sais foi adquirida da Sigma Chemical Co.

Carboxipeptidase A (*EC 3.4.17.1*) do pâncreas bovino, tipo II e suspensa em solução aquosa de tolueno foi adquirida da Sigma Chemical Co.

3.1.2. SUBSTRATOS

Na dosagem da atividade das proteases solúveis e imobilizadas sobre glioxil-agarose ou quitosana foram utilizados os seguintes substratos sintéticos: N-benzoil-L-arginina-p-nitroanilida (BAPNA) para tripsina, adquirido da Bachem Feinchemikalien, e N-benzoil-L-tirosina-etil-éter (BTEE) para quimotripsina, adquirido de Sigma Chemical Co. Na determinação da atividade da tripsina imobilizada sobre sepabeads foram utilizados BAPNA e caseína adquirida da Sigma Chemical Co.

A atividade proteolítica das enzimas tripsina e quimotripsina solúveis ou imobilizadas em glioxil-agarose, quitosana ou sepabeads foi medida utilizando-se soro de queijo, gentilmente doado pela Cooperativa de Laticínios São Carlos, ou caseína comercial.

3.1.3. SUPORTES

Os suportes empregados na imobilização das proteases foram:

- Sepabeads (FP - Series (SS 1P 0207/70)) - gentilmente doado por Resindion SRL, Mitsubishi Chemical Corp.;

Quitosana - gentilmente doada pela Universidade Federal do Ceará (UFC) na forma de pó, devidamente solubilizada com ácido acético 5% e coagulada em solução de NaOH 0,1 ou 1N;

Gel de agarose 6B-CL (6% de ligações cruzadas) adquirido da Amersham Pharmacia Biotech AG foi previamente ativado com glicidol (2,3-epoxi-1-propanol) e, a seguir, oxidado com periodato de sódio (NaIO_4).

3.1.4. PADRÕES DE AMINOÁCIDOS, PEPTÍDEOS E PROTEÍNAS

Padrões de aminoácidos (Asp, Thr, Asn, Ser, Glu, Gly, Ala, Cys, Val, Met, Ileu, Leu, Tyr, Phe, His, Trp, Lys e Arg) e solução padrão de aminoácidos (com norleucina, taurina, ácido cistéico e cloreto de amônio incluídos) foram adquiridos da Sigma Chem. Co. e utilizados na calibração da coluna de troca iônica (Shim-pack Amino-Na, Shimadzu) empregada na análise de aminoácidos dos hidrolisados de proteínas do soro de queijo por HPLC (Shimadzu - Kyoto, Japão).

Padrões de proteínas e peptídeos (soro albumina - MM 67.000Da; β -lactoglobulina -MM 18.000Da; α -lactoalbumina - MM 14.400Da; $[\text{Gln}^4]$ -Neurotensin - MM 1.672Da; Angiotensin II - MM 1.046,2Da; $[\text{Sar}]$ -Angiotensin II - MM 1.002,2Da e Leucine Enkephalin - MM 555,6Da) foram adquiridos da Sigma Chem. Co. Insulina regular humana (BioHulin®) - MM 5.000Da - foi adquirida da Biobrás (Brasil). Todos esses padrões foram utilizados na calibração da coluna de exclusão por tamanho (Superdex Peptide HR 10/30, Amersham Pharmacia Biotech AB) empregada na análise de peptídeos por cromatografia líquida.

3.1.5. REAGENTES

Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico P.A. de diferentes marcas comerciais.

3.2. METODOLOGIA EXPERIMENTAL

3.2.1. DOSAGEM DE ATIVIDADE ENZIMÁTICA

3.2.1.1. TRIPSINA

A atividade da tripsina solúvel ou imobilizada foi dosada acompanhando-se o aumento da absorbância que ocorre durante a hidrólise do substrato sintético N-benzoil-L-arginina-p-nitroanilida em espectrofotômetro a 405nm e 25°C. Esta metodologia foi desenvolvida pela pesquisadora durante realização de estágio de três meses no CSIC-ICP-Madri e apresenta vantagens frente ao método descrito por Blanco e colaboradores (1989) por possibilitar leitura espectrofotométrica na região do visível, conduzindo a uma minimização das oscilações características quando da determinação da atividade da protease imobilizada sobre glioxil-agarose nesta faixa do espectro eletromagnético (253nm), e também por esta reação se processar de forma mais lenta, permitindo assim, o acompanhamento da hidrólise do substrato sintético e a determinação da tangente da região linear da curva *Absorbância (405nm) versus Tempo (min)* de forma mais precisa. Nestes experimentos, adicionava-se à cubeta de vidro, contendo um agitador magnético, 3mL do substrato sintético 0,4mM dissolvido em solução tampão fosfato sódico 50mM pH 8 contendo 30,7% de etanol e 150µL da solução ou suspensão enzimática.

3.2.1.2. QUIMOTRIPSINA

A dosagem da atividade da quimotripsina solúvel e imobilizada foi acompanhada em espectrofotômetro a 258nm e 25°C, através do aumento da absorbância que ocorre durante a hidrólise do substrato sintético BTEE. Nestes ensaios, adicionava-se à cubeta de quartzo munida de um agitador magnético 2,8mL de solução tampão fosfato sódico 100mM pH 7, 140µL do substrato sintético 8mM dissolvido em etanol e 140µL da solução ou suspensão enzimática. A tangente da região linear do gráfico *Absorbância (258nm) versus Tempo (min)* era acompanhada por um período de aproximadamente cinco minutos e a atividade então determinada.

3.2.2. PREPARAÇÃO DE SUPORTES PARA IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS

3.2.2.1. SUPORTES EPÓXIDOS

3.2.2.1.1. MODIFICAÇÃO PARCIAL DOS GRUPOS EPÓXIDOS DO SUPORTE

Os grupos epóxidos da resina comercial sepabeads foram parcialmente modificados mediante ação de dois diferentes agentes:

(a) Ácido Iminodiacético (IDA): uma massa conhecida da resina epóxida foi pesada e misturada a uma solução de ácido iminodiacético (IDA) 1M pH 9, por 15 minutos, sob agitação suave. Após este tempo, a reação foi interrompida via adição de solução tampão fosfato sódico 2M pH 5. Em seguida, o suporte foi lavado com excesso de água destilada sob vácuo e estocado a 4°C. Esta metodologia promove a modificação de 10-15% de grupos epóxidos do suporte - Mateo *et al.*, 2000;

(b) Sulfato de Cobre: este suporte foi preparado a partir da resina obtida no item (a), incubando-se uma massa determinada deste suporte à temperatura ambiente e sob agitação suave. Para cada grama de suporte foram adicionados 5,71mL de água contendo 0,248g de CuSO₄. Após 2 horas, o suporte foi lavado com excesso de água destilada. Este procedimento permitiu a modificação de 100% dos grupos IDA do suporte.

Após as modificações efetuadas na resina comercial foram obtidos dois diferentes suportes: *Sepabeads-IDA* e *Sepabeads-IDA-Cu²⁺*.

3.2.2.2. MATRIZES DE QUITOSANA

Inicialmente, uma solução de quitosana 2,5% em massa foi preparada em uma solução 5% de ácido acético (relação mássica). Após dissolução, procedeu-se com uma filtração utilizando-se filtro com placa sinterizada para remoção de pequenas impurezas provenientes do processo de obtenção da quitosana (a partir da quitina). Filtrada a solução, iniciava-se a etapa de coagulação em solução alcalina, cujo objetivo era a obtenção das partículas de quitosana propriamente ditas. O filtrado foi, então, aspergido, através de um sistema dotado de um bico *spray* sobre uma solução coagulante de NaOH 0,1 ou 1N. Os tempos de coagulação das matrizes de NaOH 0,1 e 1N foram 24 horas e 20 minutos, respectivamente. A matriz coagulada em NaOH 1N foi lavada com água

destilada em peneiras de aço de abertura 0,177mm até sua completa neutralização e, em seguida, filtrada à vácuo. A matriz coagulada em NaOH 0,1N antes de ser lavada com água destilada em peneiras de aço e filtrada à vácuo foi neutralizada com solução diluída de HCl. A Figura 3.1 mostra esquematicamente a metodologia experimental utilizada para obtenção das matrizes de quitosana.

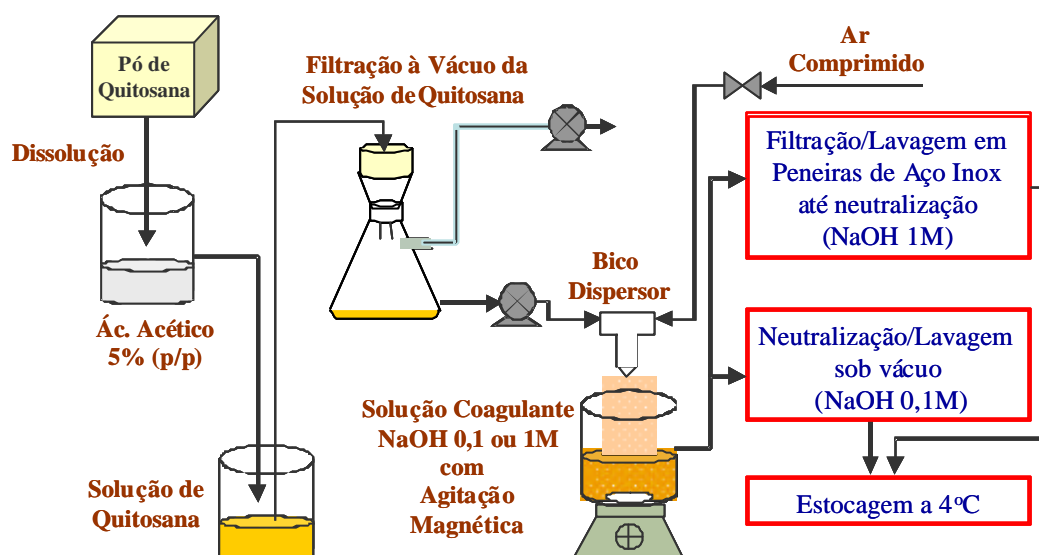


Figura 3.1: Representação esquemática da preparação do gel de quitosana - sistema de dispersão da solução de quitosana sobre solução coagulante de NaOH (Sistema adaptado de Arruda, 1999).

3.2.2.2.1. ATIVAÇÃO DAS MATRIZES DE QUITOSANA

Preparados os géis de quitosana, a etapa seguinte consistia na ativação do gel úmido obtido com glutaraldeído ou glicidol. Na ativação com glutaraldeído, utilizava-se a seguinte relação: 1g de gel úmido + 10mL de solução tampão + 0,7mL de glutaraldeído (5% em massa). Este procedimento foi realizado nos pHs 7 (solução tampão fosfato sódico 50mM pH 7) e 10 (solução tampão bicarbonato de sódio 100mM pH 10), sob gitação em *Shaker* por 1 hora e 25°C. Concluída esta etapa, o gel ativado era lavado com água destilada em abundância e estocado a 4°C. Na ativação com glicidol, o procedimento empregado foi similar àquele realizado para ativação do gel de agarose, descrito a seguir nos itens 3.2.2.3.1 e 3.2.2.3.2.

3.2.2.3. GEL GLIOXIL-AGAROSE

3.2.2.3.1. PREPARAÇÃO DE GEL DE AGAROSE COM ALTA DENSIDADE DE GRUPOS ALDEÍDO

3.2.2.3.1.1. ATIVAÇÃO DO GEL DE AGAROSE: GEL GLICERIL-AGAROSE

A etapa de ativação do suporte consistiu na eterificação do gel de agarose com glicidol (2,3-epóxi-1-propanol), na presença de NaOH e NaBH₄. Inicialmente, uma determinada massa de gel foi abundantemente lavada com água destilada e, em seguida, filtrada sob vácuo, de modo a se pesar a quantidade desejada do suporte inerte seco. A esta massa (1g) se adicionou água (286µL), solução de NaOH 1,7N (476µL), previamente preparada a frio e contendo NaBH₄ (28,5mg/mL de solução) e, finalmente, glicidol (343µL). Esta etapa foi realizada sob rigoroso controle de temperatura ($T < 4^{\circ}\text{C}$). O glicidol, agente ativante do suporte, foi adicionado ao gel gota a gota, controlando-se a temperatura para que esta não ultrapassasse os 25°C . Posteriormente, a mistura reacional foi submetida à agitação mecânica por um período de 15-18 horas à temperatura ambiente (25°C). Concluído este período, o gel ativado foi exaustivamente lavado com água destilada até que o pH do filtrado atingisse a neutralidade.

3.2.2.3.1.2. OXIDAÇÃO DO SUPORTE: GEL GLIOXIL-AGAROSE

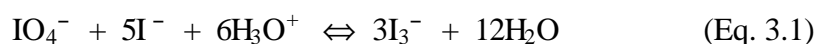
Após a etapa de ativação, o gel foi suspenso em água destilada na relação de 1:10 ($V_{\text{gel}}/V_{\text{total da suspensão}}$). A esta suspensão era adicionada uma massa de NaIO₄ suficiente para resultar em uma densidade superficial de grupos aldeídos de aproximadamente 70 a 80µ.moles de periodato por mililitro de gel empacotado, ativação máxima da agarose 6%. A reação de oxidação ocorreu por um período de 2 horas, utilizando-se agitação mecânica. Em seguida, o gel foi repetidamente lavado com água destilada até pH próximo da neutralidade, seco à vácuo e estocado a 4°C .

3.2.2.3.2. PREPARAÇÃO DE GEL DE AGAROSE COM BAIXA DENSIDADE DE GRUPOS ALDEÍDOS

A preparação de géis contendo baixa densidade de grupos aldeídos em sua superfície foi realizada através de oxidação direta com NaIO_4 , sem etapa prévia de ativação do suporte. Para isso, o gel foi suspenso em água destilada na relação de 1:10 ($V_{\text{gel}}/V_{\text{total da suspensão}}$) e à suspensão era adicionada uma massa de NaIO_4 suficiente para resultar em uma densidade superficial de grupos aldeídos de aproximadamente $20\mu\text{moles}$ de periodato por mililitro de gel empacotado. A reação de oxidação ocorreu por um período de 2 horas, utilizando-se agitação mecânica, após o que o gel foi repetidamente lavado com água destilada até pH próximo da neutralidade, seco à vácuo e estocado a 4°C .

3.2.2.3.3. QUANTIFICAÇÃO DE GRUPOS ALDEÍDOS NO GEL GLIOXIL-AGAROSE

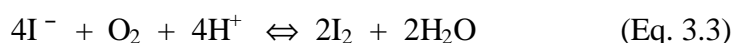
A quantificação dos grupos aldeídos presentes na superfície do gel de agarose ativado foi feita medindo-se o periodato de sódio não consumido na reação de oxidação dos grupos gliceril. Nesta reação, o periodato não consumido (IO_4^-) reage com o iodeto (I^-) em excesso, gerando o íon tri-iodeto (I_3^-), que é quantificado por colorimetria:



A formação do íon tri-iodeto é de fundamental importância, pois o iodo na forma I_2 é muito volátil:



Em meio ácido, ocorre perda de iodo por volatilização em consequência da oxidação de iodeto pela ação de oxigênio atmosférico (Eq. 3.3). Já em ambientes neutros, a oxidação do iodeto é desprezível - Vogel, 1981. Daí, esta etapa ser desenvolvida na presença de bicarbonato de sódio.



Experimentalmente, preparava-se uma solução aquosa de periodato, nas mesmas condições da suspensão do gel gliceril-agarose (substituindo o gel por água) e uma mistura 1:1 de iodeto de potássio 10% e bicarbonato de sódio saturado. A uma cubeta de vidro, adicionava-se 3mL da mistura 1:1 e 75µL da solução de periodato. A seguir, procurava-se um comprimento de onda (em torno de 423nm) que oferecesse como resposta uma absorvância de 0,7; este valor representava o branco.

Durante a oxidação do gel, alíquotas eram retiradas do sobrenadante em tempos determinados (zero - imediatamente após a adição do periodato à suspensão; 30 minutos; 1 hora; 1,5 horas e 2 horas de reação), para se mensurar o consumo de periodato ao longo deste período. A equação a seguir era utilizada (Eq. 3.4):

$$\frac{\text{mmoles}(IO_4^-)_{\text{Consumidos}}}{\text{mL de Gel}} = \frac{\text{mmoles}(IO_4^-)_{\text{Totais}} - (12,8 * Abs_{=423nm} * Vol_{\text{Suspensão}})}{\text{Volume}_{\text{Gel}}} \quad (\text{Eq. 3.4})$$

onde o valor 12,8 representa a razão concentração/absorvância. Concluída a oxidação, a suspensão era filtrada e o gel abundantemente lavado com água destilada.

3.2.3. PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE DERIVADOS

3.2.3.1. IMOBILIZAÇÃO DE TRIPSINA SOBRE RESINAS EPÓXIDAS

Frações dos suportes epóxidos (*Sepabeads-IDA* e *Sepabeads-IDA-Cu²⁺*) foram suspensas em solução enzimática (0,4mgEnz./mL solução), preparada em tampão fosfato de sódio 5mM pH 8, por 24 horas à temperatura ambiente e sob agitação suave. O decaimento da atividade enzimática no sobrenadante era acompanhado mediante retirada de alíquotas ao longo do período reacional. Concluído o tempo de contato enzima-suporte os derivados eram abundantemente lavados com água destilada e estocados a 4°C.

3.2.3.1.1. BLOQUEIO DOS GRUPOS EPÓXIDOS REMANESCENTES NOS SUPORTES

O procedimento de incubação em glicina 3M pH 8 visou tornar inertes todos os grupos epóxidos remanescentes no suporte que não efetuaram enlaces com os grupos

ativos da enzima. Este procedimento durou 24 horas à temperatura ambiente e agitação suave. Após este período, as atividades enzimáticas da suspensão e do sobrenadante foram dosadas, os derivados lavados com água destilada e estocados a 4°C.

Uma fração do derivado preparado sobre *Sepabeads-IDA-Cu²⁺* foi diretamente incubada em glicina 3M e outra foi incubada em tampão bicarbonato sódico 100mM pH 9,5 antes do procedimento de bloqueio dos grupos epóxidos remanescentes no suporte. Esta etapa objetivou protonar grupos reativos da enzima (histidinas, cisteínas e etc) cujos valores de pK são próximos a este pH e, assim, possibilitar novas interações enzima-suporte.

3.2.3.1.2. AVALIAÇÃO DO ENLACE TRIPSINA-SEPABEADS

O enlace estabelecido entre a enzima e os suportes epóxidos foi avaliado incubando-se, sob suave agitação, 2g de cada derivado obtido em concentrações crescentes de cloreto de sódio (50-400mM) por 12 horas à temperatura ambiente e dosando-se a atividade enzimática dos sobrenadantes e suspensões ao longo do tempo.

3.2.3.1.3. ESTABILIDADE TÉRMICA DOS DERIVADOS TRIPSINA-SEPABEADS

Os derivados tripsina-sepabeads foram suspensos em tampão borato 25mM pH 8 e incubados nas temperaturas de 40 e 55°C por 24 horas. Ao longo deste período, alíquotas foram retiradas e analisadas quanto à sua atividade enzimática.

Um modelo de decaimento exponencial de primeira ordem (Eq. 3.5) foi ajustado aos dados experimentais utilizando-se o *ORIGIN*[®] 6, método iterativo com intervalo de confiança de 0,95:

$$Y = Y_0 + A_1 * \exp(-X/t_1) \quad (\text{Eq. 3.5})$$

onde Y é o tempo e X a atividade residual.

Os tempos de meia-vida foram calculados a partir do modelo ajustado aos dados experimentais e os fatores de estabilização da enzima calculados como a razão entre a meia-vida da enzima imobilizada e a meia-vida da enzima solúvel.

3.2.3.1.4. ATIVIDADE CASEINOLÍTICA DE TRIPSINA SOLÚVEL E TRIPSINA-SEPABEADS: MÉTODO DAS VELOCIDADES INICIAIS

A atividade caseinolítica da tripsina solúvel e imobilizada sobre gel glioxil-agarose e sepabeads (*Sepabeads-IDA-Glicina*; *Sepabeds-IDA-Cu²⁺-Glicina* e *Sepabeads-IDA-Cu²⁺-pH=9,5-Glicina*) foi determinada hidrolisando-se caseína, um substrato macromolecular, em pHstato (modelo 718 STAT Titrino – Metrohm), nas concentrações de 10 e 40g/L, por 15 minutos. Nestes ensaios, volumes de 10mL de caseína (10 ou 40g/L) eram adicionados ao reator de vidro encamisado a 40°C e o pH da solução ajustado em 8. Em seguida, enzima solúvel ou imobilizada era adicionada ao reator e o grau de hidrólise determinado em termos de mEqv/min.

3.2.3.1.5. ATIVIDADE CASEINOLÍTICA DE TRIPSINA SOLÚVEL E TRIPSINA-SEPABEADS: GRAU MÁXIMO DE HIDRÓLISE E ANÁLISE DA DISTRIBUIÇÃO DE PEPTÍDEOS

Foram realizados experimentos de hidrólise da caseína em pHstato a 40°C, pH 8 e tempos prolongados (6 horas de reação), utilizando-se tripsina solúvel e imobilizada sobre glioxil-agarose e sepabeads para a relação de E/S_{mássico} de 0,875mgEnz./0,1gProteína. Nesses ensaios, alíquotas foram retiradas e a distribuição de massa molecular dos peptídeos gerados nas hidrólises estudada. A metodologia experimental utilizada na análise em HPLC dos peptídeos obtidos seguiu procedimento detalhadamente descrito em Sousa Jr. *et al.*, 2001.

3.2.3.2. IMOBILIZAÇÃO DE TRIPSINA SOBRE MATRIZES DE QUITOSANA

No processo de imobilização da tripsina sobre quitosana uma solução tampão bicarbonato sódico 100mM pH 10 foi preparada e uma determinada massa de benzamidina (inibidor competitivo da tripsina) foi adicionada de modo a resultar em uma concentração final no meio reacional de 3mM. Posteriormente, a tripsina em pó era adicionada à solução e esta era, então, homogeneizada. 1mL desta solução era retirado para acompanhamento do comportamento da enzima livre nestas condições. A seguir, o volume de gel desejado era também adicionado à solução, obedecendo a relação V_{gel}/V_{total} de 1/10. Esta suspensão era mantida sob agitação em *Shaker* por 24 horas a 25°C e o desaparecimento de atividade do sobrenadante da suspensão acompanhando ao

longo do tempo. O processo era finalizado, após as 24 horas de reação, pela adição de NaBH_4 na concentração de 1mg/mL de solução, o qual agia por 30 minutos. O derivado era então lavado com água destilada em excesso e armazenado sob refrigeração.

3.2.3.2.1. RENDIMENTO DE IMOBILIZAÇÃO E ATIVIDADE RECUPERADA NO SUPORTE

O rendimento de imobilização é definido como sendo a razão entre a atividade enzimática desaparecida do sobrenadante após imobilização e a atividade inicial oferecida.

$$\text{Rendimento} = \frac{\text{Atividade Desaparecida do Sobrenadante}}{\text{Atividade Inicial Oferecida}} \quad (\text{Eq. 3.6})$$

A atividade recuperada é definida como sendo a razão entre a atividade enzimática medida no suporte após imobilização e a atividade desaparecida do sobrenadante durante a imobilização.

$$\text{Atividade Recuperada} = \frac{\text{Atividade Medida no Suporte após Imobilização}}{\text{Atividade Desaparecida do Sobrenadante}} \quad (\text{Eq. 3.7})$$

3.2.3.2.2. AVALIAÇÃO DO ENLACE TRIPSINA-QUITOSANA

Os derivados preparados foram suspensos em soluções de NaCl ($V_{\text{gel}}/V_{\text{total}}$ de $1/5$) até concentração de 400mM , *overnight*, sob suave agitação e temperatura ambiente. Posteriormente, alíquotas do sobrenadante foram retiradas e ensaiadas com relação a sua atividade enzimática. Em seguida, o derivado foi lavado com excesso de água destilada e sua atividade medida como já anteriormente descrito.

3.2.3.2.3. ESTABILIDADE TÉRMICA E A pH ALCALINO DE DERIVADOS TRIPSINA-QUITOSANA

Os derivados tripsina-quitosana foram suspensos em tampão borato 25mM pH 8 e incubados em diferentes temperaturas, dependendo da concentração da solução coagulante utilizada: derivados preparados sobre matrizes coaguladas em NaOH 1N foram ensaiados a 40 e 70°C ; derivados preparados sobre matrizes coaguladas em NaOH $0,1\text{N}$ foram ensaiados a 55 e 70°C . Os derivados preparados sobre matrizes coaguladas em NaOH 1N também foram analisados quanto a sua estabilidade a pH

alcalino (pH 11). Ao longo dos ensaios alíquotas foram retiradas e analisadas quanto à sua atividade enzimática. O tempo de ensaio foi suficiente para que se pudesse determinar o tempo de meia-vida dos derivados diretamente das curvas de inativação em todas as situações investigadas.

3.2.3.2.4. INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA E DO pH NA ATIVIDADE DE TRIPSINA SOLÚVEL E IMOBILIZADA SOBRE QUITOSANA

A influência da temperatura e do pH na atividade de hidrólise foi investigada preparando-se solução/suspensões de tripsina em tampão fosfato sódico 20mM pH 8 e procedendo-se com a hidrólise do substrato sintético em espectrofotômetro a 405nm em condições específicas para cada ensaio. Na investigação da influência da temperatura o substrato sintético foi preparado em tampão fosfato sódico 50mM pH 8 e hidrolisado na faixa de temperatura de 30 a 70°C. A influência do pH foi estudada preparando-se soluções do substrato sintético em pHs de 6 a 10 e procedendo-se com sua hidrólise em espectrofotômetro a 25°C e 405nm.

3.2.3.2.5. DESEMPENHO DE TRIPSINA SOLÚVEL E TRIPSINA-QUITOSANA NA HIDRÓLISE DAS PROTEÍNAS DO SORO

Hidrólises das proteínas do soro de queijo com tripsina solúvel e imobilizada sobre quitosana foram desenvolvidas utilizando-se a técnica do pHstato, na qual o consumo de base durante a reação resulta diretamente no grau de hidrólise através da seguinte equação (Adler-Nissen, 1986):

$$GH = V_{Base} * C_{Base} * \frac{1}{a} * \frac{1}{MP} * \frac{1}{h_{tot}} * 100\% \quad (\text{Eq. 3.8})$$

Onde: V_{base} = volume de base consumido na reação (mL); C_{base} = concentração da base (N); a = grau de dissociação médio dos grupos α -NH; MP = massa de proteína (g); h_{tot} = número total de ligações peptídicas no substrato protéico em mmol/gProteína (8,8 para proteínas do soro).

As condições experimentais utilizadas foram: soro 10g/L, pH 8, NaOH 0,1N, temperaturas de 50 e 55°C, relações E/S_{mássico} de 1/10 ou 1/20, tempo de hidrólise de 2 horas ou períodos prolongados.

3.2.3.3. IMOBILIZAÇÃO DE TRIPSINA E QUIMOTRIPSINA SOBRE GEL GLIOXIL-AGAROSE

3.2.3.3.1. IMOBILIZAÇÃO MULTIPONTUAL

Inicialmente, preparou-se uma solução tampão bicarbonato de sódio 100mM e seu pH foi rigorosamente ajustado em 10,05. A seguir, no caso da tripsina, uma massa de benzamidina foi pesada e misturada à solução tampão, de modo a se obter uma concentração final na mistura reacional de 3mM; no caso da quimotripsina, nenhum inibidor foi utilizado. A massa de enzima necessária para se atingir a carga desejada (mgEnz./gGel ou mgEnz./mL Gel) foi igualmente pesada e adicionada à mesma solução anteriormente citada. O pH foi novamente checado para se garantir que o valor requerido de 10,05 não sofrera alteração. 1mL desta mistura foi retirado para acompanhamento da atividade enzimática (branco) livre de possíveis mudanças conformacionais induzidas pelas multiinterações com o suporte. Neste ponto, a quantidade desejada de gel ativado/oxidado foi adicionada ao frasco contendo a solução tampão bicarbonato de sódio + enzima (+ benzamidina, se tripsina) e esta mistura reacional final foi submetida a suave agitação em *shaker* por 24 horas a 25°C. Ao longo do tempo, o desaparecimento da enzima do sobrenadante e a atividade do branco foram acompanhados. Após 24 horas de contato enzima-suporte, o volume da mistura reacional foi dobrado e boridreto de sódio (NaBH₄) foi adicionado, obedecendo a relação de 1mg NaBH₄/mL de solução. O tempo reacional foi de 30 minutos, sob agitação mecânica. O derivado obtido foi lavado primeiramente com tampão fosfato 200mM pH 7,5 e posteriormente com excesso de água destilada.

3.2.3.3.2. IMOBILIZAÇÃO SOBRE GLIOXIL-AGAROSE COM BAIXA ATIVAÇÃO

A imobilização de tripsina e quimotripsina sobre glioxil-agarose pouco ativado (20µmoles de aldeídos/mL Gel) seguiu metodologia semelhante àquela empregada na obtenção de derivados multipontuais. No entanto, neste procedimento foi adicionada uma quantidade de enzima significativamente superior àquela requerida e após uma hora de contato entre a enzima e o suporte, o derivado foi submetido ao processo de redução com NaBH₄. O tempo de contato reduzido e a baixa densidade superficial de grupos aldeídos no suporte impediram que muitas ligações enzima-suporte fossem

estabelecidas, caracterizando, assim, um derivado com no máximo duas ligações entre uma mesma molécula de enzima e o suporte. O suporte empregado nestes ensaios não foi previamente ativado com glicidol, mas diretamente oxidado com periodato de sódio sob agitação por duas horas e, a seguir, lavado com água destilada até pH neutro. A oxidação do gel inerte teve por objetivo a geração de baixa densidade de grupos glioxil/mL de Gel empacotado.

3.2.3.3.3. INATIVAÇÃO TÉRMICA DE TRIPSINA E QUIMOTRIPSINA SOLÚVEIS E IMOBILIZADAS SOBRE GLIOXIL-AGAROSE

Tripsina e quimotripsina solúveis e imobilizadas sobre gel glioxil-agarose com alta e baixa ativação foram suspensas em solução tampão borato 25mM pH 8; suas atividades iniciais foram medidas, como descrito nos itens 3.2.1.1 e 3.2.1.2, e, a seguir, as diferentes formas das enzimas foram, então, armazenadas em frascos plásticos resistentes a elevadas temperaturas. As soluções/suspensões foram incubadas nas temperaturas de 50, 55, 75 e 85°C em banho-seco, equipamento que possibilita a incubação de amostras em altas temperaturas por períodos prolongados de tempo, sem os inconvenientes associados aos de banhos da água geralmente utilizados nestes ensaios. Em tempos previamente determinados, alíquotas foram retiradas e resfriadas a 25°C para dosagem da atividade residual. Este procedimento permitiu a determinação do tempo de meia-vida (necessário para que metade da atividade inicial fosse atingida) das enzimas solúveis e dos diferentes derivados preparados, tendo sido, em alguns casos, acompanhado o decaimento da atividade até total inativação pela temperatura.

Um modelo de três parâmetros foi ajustado aos dados experimentais. Este modelo considera que a etapa inicial de inativação segue uma tendência exponencial e que a etapa final segue uma tendência linear. A expressão atividade-tempo é dada pela seguinte equação:

$$Y = 100 * (Y_0 + ((1 - Y_0) * \exp(-X/t_1))) - L_1 * X \quad (\text{Eq. 3.9})$$

onde Y é a atividade específica adimensional (A/A_0); Y_0 é a razão entre a atividade específica do estado final e a atividade específica do estado inicial; X é a constante da taxa de desativação de primeira ordem (tempo^{-1}); e L_1 descreve a etapa final linear de inativação da molécula de enzima.

O ajuste do modelo foi feito utilizando-se o *ORIGIN*^â 6, método iterativo com intervalo de confiança de 0,95. As meias-vidas foram calculadas a partir do modelo (Eq. 3.9) ajustado aos dados experimentais e os fatores de estabilização da enzima calculados como a razão entre a meia-vida da enzima imobilizada e a meia-vida da enzima solúvel.

3.2.3.3.4. INATIVAÇÃO DE TRIPSINA E QUIMOTRIPSINA A pH ALCALINO

A estabilidade a pH alcalino (pH 11) de tripsina e quimotripsina solúveis e imobilizadas sobre glioxil-agarose foi investigada incubando-se as soluções e suspensões em tampão bicarbonato sódico 50mM, pH 11 e 25°C, até que completa inativação das enzimas solúveis ou até que os derivados apresentassem atividade residual inferior a 20%. O decaimento da atividade dessas espécies foi acompanhado através da retirada de alíquotas durante o período de incubação e posterior dosagem da atividade enzimática. Nesses ensaios o modelo de inativação representado pela Eq. 3.9 também foi ajustado aos dados experimentais para determinação dos tempos de meia-vida das enzimas em suas diferentes formas.

3.2.3.3.5. INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA E DO pH NA ATIVIDADE DE HIDRÓLISE PARA TRIPSINA E QUIMOTRIPSINA

Inicialmente foram preparadas soluções/suspensões das duas proteases em tampão fosfato sódico 20mM pH 8. A seguir, a hidrólise dos substratos sintéticos foi acompanhada em espectrofotômetro, como descrito nos itens 3.2.1.1 e 3.2.1.2, para tripsina e quimotripsina, respectivamente, em temperaturas que variaram de 25 a 90°C.

A influência do pH na atividade de hidrólise foi investigada preparando-se soluções dos substratos sintéticos específicos para estas enzimas (BApNA e BTEE) em diferentes pHs (6,0-11,5) e acompanhando-se a hidrólise desses substratos a 25°C em espectrofotômetro a 405 e 258nm, respectivamente, para tripsina e quimotripsina.

3.2.3.3.6. HIDRÓLISES DAS PROTEÍNAS DO SORO CATALISADAS POR TRIPSINA E QUIMOTRIPSINA LIVRES E IMOBILIZADAS

De modo geral, as hidrólises das proteínas de soro de queijo realizadas neste trabalho foram desenvolvidas após etapas de microfiltração em membrana de 0,2 μ m (A/G Technology Co.), para esterilização da matéria-prima, e posterior concentração da mesma por ultrafiltração em membrana com corte de 10kDa (Amicon®). Todos os experimentos de hidrólise foram desenvolvidos utilizando-se a técnica do pHstato, como já anteriormente descrito no item 3.2.3.2.5.

Ensaio Iniciais de Hidrólise

Esses ensaios foram desenvolvidos utilizando-se tripsina e quimotripsina nas formas livre e imobilizada, soro de queijo na concentração de 10g/L, temperaturas de 55 e 65°C, pH 8, três diferentes relações enzima/substrato - E/S_{mássico} - (1/100, 1/50 e 1/20) e tempo máximo de reação de 4 horas. A concentração de NaOH era determinada em função da relação E/S_{mássico} empregada, de modo que o pH do meio não atingisse valor superior àquele estabelecido como *set-point* (pH 8). Objetivava-se aqui, comparar o desempenho das proteases imobilizadas em relação às suas correspondentes na forma solúvel nas hidrólises das proteínas do soro de queijo.

Primeira Batelada de Hidrólises Seqüenciais

As hidrólises iniciais com tripsina foram desenvolvidas partindo-se de soro de queijo 10g/L, pH 8, temperatura de 55°C, relação E/S_{mássico} de 1/50 e tempos de reação suficientes para se atingir os seguintes graus de hidrólise com esta enzima: 0,5; 1; 2; 3 e 5%. Seqüencialmente, estes novos substratos foram submetidos a hidrólises longas com quimotripsina (4 horas) em idênticas condições operacionais. Finalmente, os hidrolisados obtidos após ação seqüencial de tripsina e quimotripsina foram submetidos à ação da CPA (50U_{H-PHE}/g Proteína) por 1 ou 3 horas, a 45°C e pH 7.

Segunda Batelada de Hidrólises Seqüenciais

Esta segunda batelada de ensaios teve por objetivo cobrir uma ampla faixa de graus de hidrólise com tripsina, partindo-se de grau de hidrólise máximo e, em seguida, conduzindo as reações de modo a fornecerem porcentagens determinadas do grau de hidrólise máximo inicialmente determinado. Assim, os graus de hidrólise atingidos com

esta protease a 55°C, pH 8, soro 12,15g/L, E/S_{mássico} de 1/25 e NaOH 100mM foram: 100%; 70%; 65%; 50%; 30%; 20%; 15%; 10% e 6%. A etapa posterior de hidrólise com quimotripsina foi desenvolvida a 55°C, pH 8, E/S_{mássico} de 1/20, NaOH 100mM e tempo reacional suficiente para não se observar qualquer adição de NaOH pelo pHstato para manutenção do pH no valor previamente programado (*set point* - pH 8). A etapa final com carboxipeptidase A foi realizada em pH 7, 45°C, 8 horas e concentração enzimática de 50U_{H-PHE}/gProteína.

Terceira Batelada de Hidrólises Seqüenciais

Nesta batelada foram realizadas hidrólises seqüenciais (soro 12,15g/L, 55°C, pH 8, E/S_{mássico} de 1/25 e NaOH 0,2M) com tripsina imobilizada em glioxil-agarose visando-se atingir graus de hidrólise (GH) correspondentes a: 2%, 4%, 6%, 8%, 10% e grau máximo de hidrólise (aproximadamente 12%) com esta protease. As etapas subseqüentes com quimotripsina (E/S_{mássico} de 1/18 e demais condições operacionais similares às empregadas nas hidrólises com tripsina) e CPA (45°C, pH 7 e 50U_{H-PHE}/g Proteína) tiveram duração de sete horas.

Quarta Batelada de Hidrólises Seqüenciais

Novos experimentos foram realizados em condições operacionais similares às empregadas na terceira batelada de hidrólises seqüenciais, mas aumentando-se o tempo e a concentração de enzima no meio tanto na etapa de hidrólise com quimotripsina quanto com carboxipeptidase A. O tempo de reação foi estendido de 7 para 10 horas; a concentração de quimotripsina passou de 0,7 para 1,73mgEnz./mL de solução e a concentração de CPA passou de 50 para aproximadamente 138U_{H-PHE}/g Proteína. Além desses, também foram realizados ensaios seqüenciais nas mesmas condições operacionais, partindo-se de graus iniciais de hidrólise com tripsina de 1, 3 e 5%.

Quinta Batelada de Hidrólises Seqüenciais

Hidrólises seqüenciais com GH inicial com tripsina de 1% e 5% foram desenvolvidas, em condições operacionais similares às empregadas na quarta batelada, mas aumentando-se as concentrações de quimotripsina (de 1,73 para 3,05mgEnz./mL de solução - 10 horas) e CPA (de 138 para 200U_{H-PHE}/gProteína - 10 horas) no meio reacional. Além desses, novo ensaio de hidrólise das proteínas do soro de queijo diretamente com alta concentração de quimotripsina (3,05mgEnz./mL de solução - 10

horas) e com CPA na seqüência (200U_{H-PHE}/gProteína - 10 horas) também foi desenvolvido.

3.2.4. HIDRÓLISE ÁCIDA

Amostras de a) tripsina solúvel e imobilizada sobre quitosana contendo aproximadamente 1mg de proteína; b) tripsina e quimotripsina solúveis e imobilizadas sobre glioxil-agarose contendo aproximadamente 1,5mg de proteína e c) soro de queijo contendo aproximadamente 1,5mg de proteína foram preparadas em HCl 6,8M, desaeradas à vácuo e hidrolisadas em estufa a 105°C por 24 horas. Após este período a mistura final foi filtrada e o ácido evaporado em capela, utilizando-se banho seco a 70°C. O extrato seco de aminoácidos foi redissolvido em tampão citrato de sódio 0,2 N (pH 2,2) para posterior análise de aminoácidos por HPLC.

3.2.5. ANÁLISE DE AMINOÁCIDOS E PEPTÍDEOS POR HPLC

Os hidrolisados gerados após hidrólise seqüencial do substrato real pela ação da tripsina, quimotripsina e carboxipeptidase A foram analisados quanto à presença de aminoácidos livres e distribuição de massa molecular dos peptídeos resultantes. Já os hidrolisados gerados após hidrólise ácida foram analisados somente com relação ao seu conteúdo de aminoácidos.

Os aminoácidos foram analisados por cromatografia de troca iônica, em HPLC Shimadzu, utilizando-se pré-coluna Shim Pack ISC-30/S0504 NA (SHIMADZU) e coluna Shim Pack Amino-NA (SHIMADZU). As fases móveis utilizadas foram: solução A – Citrato de sódio 0,2N pH 3,2; solução B – Citrato de sódio 0,6N contendo H₃BO₃ 0,2N e NaOH 0,2N como solução de lavagem. O método de análise previa um gradiente apropriado a uma vazão constante de 0,5mL/min. São usados para derivatização (pós-coluna) dos aminoácidos os reagentes RA (solução de ácido bórico-ácido carbônico, pH 10, contendo 0,04% (p/v) de hipoclorito de sódio comercial) e RB (solução 0,8mg/mL de O-phtaldialdeído (OPA), adquirido da Sigma Chem. Co., contendo 0,4mg/mL de Bry-35, adquirido da Amersham Pharmacia Biotech, e 0,2% (v/v) de 2-mercaptoetanol, também adquirido da Sigma Chem. Co.) a uma vazão total de 0,4mL/min. A temperatura de análise era de 60°C e os aminoácidos detectados, após derivatização, por fluorescência a 350nm (λ de excitação) e 450nm (λ de emissão).

Antes da injeção das amostras, estas foram devidamente preparadas de acordo com o seguinte protocolo: proteínas e peptídeos presentes nas amostras de hidrolisados foram precipitados pela adição de ácido tricloroacético 2,4M, na razão final amostra/ácido de 1:1 (v/v). Após centrifugação, o sobrenadante foi diluído com tampão citrato de sódio 0,2N (pH 2,2) e filtrado em membranas de 0,45 μ m. 10 μ L das amostras eram automaticamente injetados na coluna e um gradiente é devidamente aplicado por 72 minutos.

O fracionamento dos hidrolisados de proteínas do soro de queijo foi realizado por cromatografia de exclusão por tamanho (SE-HPLC), utilizando-se uma coluna Superdex Peptide HR 10/30 (Amersham Pharmacia Biotech AB) e como fase móvel, tampão fosfato sódico 20mM pH 7,2, contendo 250mM de NaCl, a uma vazão de 0,25mL/min. O volume de hidrolisado injetado na coluna de peptídeos era de 25 μ L, sendo a detecção feita no UV a 214nm. A distribuição de massa molecular obtida do fracionamento dos peptídeos era determinada de acordo com a metodologia descrita por Souza Jr. e colaboradores, 2001. Cinco padrões adquiridos da Sigma (Soro albumina, β -lactoglobulina, insulina, Angiotensin II (MM 1046,2) e Leucine Enkephalin (MM 555,6) foram injetados na coluna e uma curva de concentração mássica (g/L) *versus* área do pico (μ V x min) foi construída para cada padrão. O coeficiente linear das curvas foi assumido constante e igual a 0,03g/L, ou seja, aproximadamente zero. Dessa forma, as tangentes puderam ser ajustadas como uma função da massa molecular (em Da), e estes, como uma função do tempo de retenção na coluna (em min), como mostram as equações a seguir:

$$\text{Tangente} = -9,13685e-9 + 5,02764e-9*\text{Log}(\text{MM}) \quad (\text{Eq. 3.10})$$

$$\text{Log}(\text{MM}) = 5,39954 - 0,03634*\text{tempo} \quad (\text{Eq. 3.11})$$

Combinando-se as duas equações anteriores, obtém-se uma equação geral que relaciona a concentração mássica (g/L) com a área cromatográfica dos picos (μ V x min), como uma função do tempo de retenção t (min), como mostrado adiante:

$$C = 0,02965 + (-9,13685e-9 + 5,02764e-9*(5,39954-0,03634*\text{tempo}))*\text{área} \quad (\text{Eq. 3.12})$$

3.2.6. DOSAGEM DE PROTEÍNAS – MÉTODO DE KJELDAHL

A concentração de proteínas presente no soro de queijo (*in natura*, microfiltrado ou concentrado) aqui utilizado como substrato nas reações de hidrólise foi determinada pelo método de Kjeldahl, seguindo-se procedimento descrito no boletim técnico da MICRONAL, 1985. Nestes ensaios, utilizava-se uma unidade digestora (B-435) e uma unidade de destilação de amônia (Büchi, modelo B-231, Suíça), onde todo o nitrogênio presente na amostra previamente digerida era quantificado.

3.2.6.1. DIGESTÃO DAS AMOSTRAS

Aos tubos de digestão adicionava-se 7mL (soro *in natura*) ou 1mL (soro concentrado) de amostra, 10mL de ácido sulfúrico concentrado, 1g de catalisador misto (preparado com uma parte de CuSO_4 para três partes de K_2SO_4) e esferas de ebulição. Em seguida, esta mistura de coloração marrom escuro era posta para ser digerida até que atingisse uma tonalidade verde claro. Em seguida, as amostras eram destiladas.

3.2.6.2. DESTILAÇÃO DAS AMOSTRAS

Para a destilação das amostras foram preparadas soluções de ácido bórico 2% e NaOH 32%. *Erlenmeyers* contendo 100mL da solução de ácido bórico 2% e 3 gotas de indicador misto cada foram, juntamente com os tubos contendo as amostra já digeridas, devidamente posicionados na unidade de destilação. 30mL de água destilada e solução de NaOH 32% eram adicionadas aos tubos até que estes atingissem novamente coloração marrom escuro. A partir daí, as amostras eram destiladas por um período de sete minutos. Posteriormente, o destilado coletado no *erlenmeyer* era, então, submetido à etapa de titulação.

3.2.6.3. TITULAÇÃO DAS AMOSTRAS

O conteúdo dos *erlenmeyers* era titulado com HCl padronizado na concentração de aproximadamente 0,1N. A concentração de proteínas presente nas amostras era determinada utilizando-se as equações abaixo:

$$C_N(\text{ g / L}) = \frac{V_{HCl} * C_{HCl} * 14}{V_{amostra}} \quad (\text{Eq. 3.13})$$

$$C_P(\text{ g / L}) = C_N(\text{ g / L}) * 6,38 \quad (\text{Eq. 3.14})$$

onde:

- C_N = Concentração de nitrogênio total (g/L);
- V_{HCl} = Volume de ácido gasto na titulação (mL);
- C_{HCl} = Concentração do ácido usado na titulação (N);
- 14 = Peso molecular do nitrogênio (g/mol);
- $V_{amostra}$ = Volume da amostra (mL);
- C_P = Concentração de nitrogênio protéico (g/L);
- 6,38 = Fator de conversão de nitrogênio total para nitrogênio protéico para proteínas do leite.

3.2.7. ELETROFORESE SDS-PAGE NÃO-DESNATURANTE

Análise de eletroforese SDS-PAGE das enzimas tripsina, quimotripsina e carboxipeptidase A foi realizada em unidade Hoefer (modelo mini VE – Amersham Pharmacia Biotech Inc.) preparando-se gel de poliácridamida 15%, na presença de dodecil sulfato de sódio 0,1%. As principais soluções utilizadas estão descritas a seguir:

- Tampão de separação (pH 8,8): 18,17g de tris básico era dissolvido em água destilada e o pH ajustado em 8,8 com HCl diluído. 400mg de SDS era adicionado e o volume final completado com água destilada para 100mL;

- Solução de acrilamida (30%) e bis-acrilamida (0,8%): 30g de acrilamida e 800mg de bis acrilamida eram dissolvidos em água destilada e o volume completado para 100mL;

- Persulfato de amônio 10% (p/v): 50mg de persulfato de amônio era dissolvido 50μL de água destilada;

- Tampão de concentração (pH 6,8): 6,06g de tris básico era dissolvido em água destilada e o pH ajustado em 6,8. 400mg de SDS era adicionado e o volume final completado com água destilada para 100mL;

- Solução de bis acrilamida 2%: 2g de bis acrilamida eram dissolvidos em 100mL de água destilada;

- Tampão de ruptura: 378mg de tris básico era dissolvido em 15mL de água destilada e o pH ajustado em 6,8. A seguir, adicionava-se 2,5mL de mercaptoetanol, 1g

de SDS, 5mL de glicerina e 3mg de azul de bromofenol. Volume final completado com água destilada para 25mL;

- Eletrólito: 30,29g de tris básico eram dissolvidos em 800mL de água destilada e 144,4g de glicina e 10g de SDS adicionados, após o que o volume final era completado com água destilada para 1L. Esta solução era diluída dez vezes para uso;

- Corante Coomassie Brilliant Blue: 1,25g do corante eram dissolvidos em 454mL de metanol 50% (v/v) e 46mL de ácido acético. A solução era filtrada utilizando papel de filtro;

- Descorante: 370mL de metanol e 11,3mL de ácido acético glacial eram misturados e o volume final completado para 1L.

O gel de poliacrilamida 15% (contendo SDS 0,1%) era preparado misturando-se 1,25mL de tampão de separação; 2,5mL de solução acril-bis; 1,22mL de água destilada; 7 μ L de TEMED e 25 μ L de persulfato de amônio 10%. Esta solução era distribuída entre as placas de eletroforese, deixando-se aproximadamente 1cm para que o nivelamento do gel com butanol pudesse ser feito. Após uma hora de polimerização, o gel de concentração 5% era preparado, misturando-se 750 μ L de tampão de concentração, 300 μ L de acril-bis, 1,55mL de água destilada, 200 μ L de bis acrilamida 2%, 5 μ L de TEMED e, finalmente, 15 μ L de persulfato de amônio 10%. Retirado o butanol, o tampão de concentração 5% era adicionado e o pente de eletroforese usado para formação das pistas de aplicação das amostras devidamente posicionado. Após uma hora de polimerização, aplicava-se 8 μ L de amostra, diluída 1:1 com tampão de ruptura, em cada pista. As placas contendo o gel eram transferidas para a cuba onde estava o eletrólito (800mL no compartimento positivo e 100mL no negativo). O tempo de corrida era de uma hora e cinquenta minutos, com uma corrente aplicada de 20mA por placa. Posteriormente, o gel era retirado da célula e transferido para um reservatório contendo o corante coomassie. Após coloração (1h), o gel era revelado utilizando-se solução descorante e, por fim, seco à temperatura ambiente entre folhas de papel celofane.

3.2.8. ESTUDO CINÉTICO

3.2.8.1. HIDRÓLISE DAS PROTEÍNAS DO SORO CATALISADA POR QUIMOTRIPSINA PARA LEVANTAMENTO DA CINÉTICA

Hidrólises das proteínas do soro 15g/L utilizando o método das velocidades iniciais foram desenvolvidas em pHstato por três minutos para determinação da concentração de enzima a ser utilizada nos demais ensaios cinéticos. A concentração de enzima mais indicada seria aquela localizada na metade da região linear do gráfico de V_i versus $C_{Enz.}$.

A determinação dos parâmetros cinéticos $V_{máx}^{ap}$, K_m^{ap} e K_s^{ap} também foi feita mediante ensaios de velocidades iniciais (hidrólises com duração de 3 minutos), nas seguintes condições de operação: Concentrações de substrato: 2; 5; 12,15; 20; 30; 40; 50 e 56,33g/L; Concentração enzimática fixa e igual a 3mgEnz./mL de solução (derivado com alta carga - 40mgEnz./gGel); pH 8 e 55°C.

A determinação dos demais parâmetros cinéticos de cada modelo em particular foi feita mediante bateladas de longa duração (10 horas). As concentrações de substrato utilizadas foram 4; 12,15; 30 e 50g/L, concentração enzimática de 4mgEnz./mL de solução (derivado com alta carga - 40mgEnz./gGel), pH 8 e 55°C. Obtidas as curvas de geração de produto em função do tempo, diferentes modelos matemáticos foram testados e os seus respectivos parâmetros determinados.

Para determinação da efetividade foram inicialmente imobilizadas cinco diferentes cargas enzimáticas de quimotripsina (5, 10, 20, 30 e 40mgEnz./gGel) sobre gel glioxil-agarose. A seguir, hidrólises de curta duração do soro 50g/L foram desenvolvidas utilizando-se os diferentes derivados preparados na concentração de 1,5gEnz./L_{reator}. Assim, a efetividade foi calculada como sendo a razão entre as velocidades medidas utilizando-se cada derivado individualmente e a velocidade real do sistema, determinada para a situação onde não eram observados efeitos difusionais (derivado contendo baixa carga enzimática - 5mgEnz./gGel).

Capítulo IV:

Resultados e Discussão



4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram estudadas neste trabalho as duas primeiras etapas de hidrólise das proteínas do soro de queijo catalisadas pelas endoproteases tripsina e quimotripsina imobilizadas. A tripsina foi imobilizada em três diferentes suportes, sepabeads, quitosana e agarose, e quimotripsina apenas em agarose. Os resultados obtidos serão divididos em cinco itens: produção e caracterização de derivados tripsina-sepabeads, produção e caracterização de derivados tripsina-quitosana, produção e caracterização de derivados de tripsina e quimotripsina preparados sobre gel de agarose, hidrólise seqüencial das proteínas do soro de queijo com as duas proteases e estudo cinético da hidrólise catalisada por quimotripsina, incluindo estudo da efetividade da reação. Os diferentes derivados obtidos com as duas proteases foram caracterizados quanto à velocidade de imobilização, recuperação de atividade das enzimas imobilizadas, grau de estabilização e desempenho na hidrólise de substratos macromoleculares (como proteínas do soro de queijo ou caseína) em relação às correspondentes enzimas solúveis. O estudo da hidrólise seqüencial visou determinar quais graus de hidrólise seqüencial com tripsina e quimotripsina eram necessários para disponibilizar todos os resíduos aromáticos presentes nas proteínas, em especial a fenilalanina (Phe), como carboxiterminais, para permitir a remoção desses pela ação subsequente da carboxipeptidase A (CPA). Uma vez que os aminoácidos aromáticos liberados deveriam em seguida ser separados dos polipeptídeos remanescentes por ultrafiltração, era de interesse produzir redução mínima no tamanho das cadeias protéicas para facilitar essa separação. Na última etapa, realizou-se o estudo cinético da hidrólise das proteínas do soro catalisada pela quimotripsina.

4.1. PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE DERIVADOS PREPARADOS SOBRE SUPORTES EPÓXIDOS

4.1.1. IMOBILIZAÇÃO DE TRIPSINA SOBRE SEPABEADS

O primeiro suporte utilizado neste trabalho foi sepabeads, um suporte epóxido multifuncional que vem sendo bastante estudado no grupo de pesquisa do Dr. Guisán (ICP - Instituto de Catálisis e Petroleoquímica de Madrid - Espanha), razão pela qual esta etapa do trabalho foi desenvolvida no referido instituto em parceria com esse grupo. A técnica foi avaliada para a imobilização de tripsina.

Ao se utilizar diferentes suportes para imobilização de enzimas deve-se recordar que cada suporte tem uma estratégia própria de ativação, que depende dos grupos reativos nele presentes e daqueles que serão utilizados pela enzima para ligação com o suporte. Os grupos epóxidos presentes na resina sepabeads reagem com diferentes grupos reativos na enzima, mas devido ao caráter hidrofóbico do suporte foram efetuadas modificações neste para atrair os grupos reativos da enzima. Três diferentes suportes foram preparados: *Sepabeads-IDA-Glicina*, *Sepabeads-IDA-Cu²⁺-Glicina* e *Sepabeads-Ida-Cu²⁺-pH=9,5-Glicina*. Obtidos os suportes, derivados com baixa carga enzimática de tripsina (2,5mgEnz./g suporte) foram então produzidos: *tripsina-(Sepabeads-IDA-Glicina)*; *tripsina-(Sepabeads-IDA-Cu²⁺-Glicina)*, *tripsina-(Sepabeads-Ida-Cu²⁺-pH=9,5-Glicina)* e *tripsina-glioxil*. O derivado tripsina-glioxil, aqui utilizado como parâmetro de comparação de desempenho, foi produzido sob condições padrão utilizando-se técnica descrita por Guisán e colaboradores, 1988. O estudo pormenorizado da produção e caracterização dos derivados preparados sobre gel glioxil-agarose será posteriormente apresentado (item 4.3).

O procedimento de incubação em glicina 3M pH 8, realizado para todos os derivados tripsina-sepabeads, visou tornar inertes todos os grupos epóxidos reativos do suporte que não efetuaram enlaces com os grupos reativos da enzima. Desta forma, durante o período de estocagem, possíveis interações enzima-suporte capazes de promover efeitos prejudiciais aos derivados (por exemplo, distorção do sítio ativo da enzima que poderia causar diminuição da sua estabilidade ou até mesmo sua inativação total) seriam evitadas. A etapa de incubação em pH 9,5, à qual foi submetido o derivado *tripsina-(Sepabeads-Ida-Cu²⁺-pH=9,5-Glicina)*, objetivou protonar outros grupos da enzima (histidinas, cisteínas e etc), os quais possuem valores de pK próximos desse pH. A Figura 4.1 mostra as curvas de desaparecimento da atividade enzimática dos sobrenadantes das suspensões preparadas, bem como a atividade do branco (enzima solúvel), e a Tabela 4.1 mostra os resultados da imobilização de tripsina sobre os diferentes suportes utilizados.

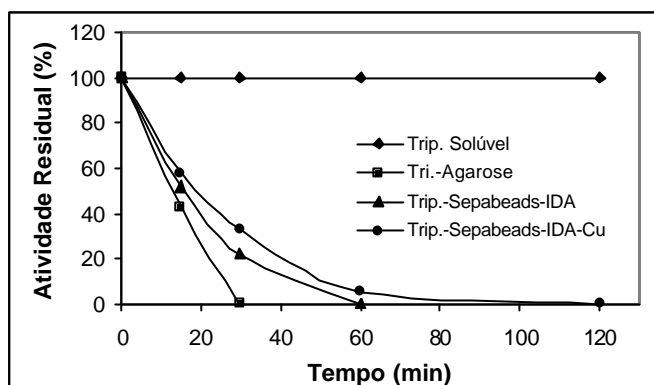


Figura 4.1: Desaparecimento de atividade enzimática dos sobrenadantes das suspensões de imobilização de tripsina sobre sepabeads (25°C e pH 8) e gel glioxil-agarose (25°C e pH 10,05). Acompanhamento da atividade da tripsina solúvel.

Tabela 4.1: Imobilização de tripsina (2,5mgEnz./g suporte) sobre diferentes suportes preparados. Condições experimentais: 25°C e 24 horas de reação sob agitação suave.

Derivados	Atividade Enzimática (Abs/min)			
	Sobrenadante		Suspensão ⁴ T=24h	⁵ Atividade recuperada no gel (%)
	³ T=0	⁴ T=24h		
¹ Tripsina-Glioxil	0,1106	0	0,1104	~ 100
Tripsina-(Sepabeads-IDA-Glicina)	0,0425	0	0,0422	~ 100
² Tripsina-(Sepabeads-IDA-Cu ²⁺ -Glicina)	0,0568	0	0,0555	~ 100
² Tripsina-(Sepabeads-IDA-Cu ²⁺ -pH=9,5-Glicina)	0,0568	0	0,0555	~ 100

¹ Derivado tripsina-glioxil preparado em pH 10,05.

² Nesta etapa, trata-se do mesmo derivado. As etapas de incubação foram posteriores ao processo de imobilização.

³ Tempo inicial (zero) de reação.

⁴ Tempo de reação de 24 horas.

⁵ Razão entre a atividade medida no gel e a atividade desaparecida do sobrenadante.

A Figura 4.1 mostra que a imobilização de tripsina sobre gel glioxil-agarose foi a mais rápida, pois em 30 minutos de reação, nenhuma atividade residual foi detectada no sobrenadante, enquanto que para os derivados preparados sobre resinas epóxicas o tempo requerido foi de aproximadamente 1 hora. O tempo excedente de reação visou favorecer a formação de enlaces adicionais entre a enzima e o suporte, etapa sabidamente mais lenta. Os dados apresentados na Tabela 4.1 mostram que em todos os experimentos a imobilização ocorreu de forma completa e que as imobilizações feitas sobre suportes epóxicos alcançaram tanto rendimento quanto recuperação da enzima nos suportes de 100%, ou seja, o processo de imobilização constituído pelas etapas de

adsorção física (auxiliada pela modificação parcial dos grupos epóxidos do suporte com IDA ou quelato metálico) e posterior imobilização covalente (efetuada através dos grupos epóxidos remanescentes no suporte) foi satisfatório. Resultados semelhantes também foram obtidos para o derivado tripsina-glioxil, como esperado. O rendimento de imobilização foi definido como sendo a razão entre a atividade desaparecida do sobrenadante e a atividade inicial oferecida. A atividade recuperada, como sendo a razão entre a atividade medida no gel após imobilização e a atividade desaparecida do sobrenadante (item 3.2.3.2.1).

Visando verificar se ocorreu imobilização covalente ou simplesmente adsorção física os derivados foram incubados em diferentes concentrações de NaCl (50, 100, 125, 150, 200 e 400mM), sob suave agitação e temperatura ambiente. A Tabela 4.2 apresenta os resultados obtidos para a maior concentração de sal utilizada, 400mM.

Tabela 4.2: Avaliação do enlace enzima-suporte estabelecido. Incubação dos derivados em NaCl 400mM por 12 horas.

Derivados	Atividade inicial no gel (Abs/min)	Atividade no sobrenadante após 12 horas de incubação (Abs/min)	Atividade na suspensão após 12 horas de incubação (Abs/min)
<i>Tripsina-Glioxil</i>	0,0285	0	0,0283
<i>Tripsina-(Sepabeads-IDA-Glicina)</i>	0,0131	0	0,0126
<i>Tripsina-(Sepabeads-IDA-Cu²⁺-Glicina)</i>	0,0172	0	0,0169
<i>Tripsina-(Sepabeads-IDA-Cu²⁺-pH=9,5-Glicina)</i>	0,0178	0	0,0171

De acordo com a Tabela 4.2 pode-se observar que em nenhuma situação investigada houve desorção da enzima, indicando o estabelecimento de ligação química entre a enzima e o suporte sólido.

4.1.2. ESTABILIDADE TÉRMICA DOS DERIVADOS TRIPSINA-SEPABEADS

A influência da temperatura na estabilidade da tripsina imobilizada sobre resinas epóxidas e glioxil-agarose foi investigada incubando-se os derivados preparados em duas diferentes temperaturas - 40 e 55°C, por um período de apenas 24 horas. A 40°C não foi observada qualquer perda de atividade enzimática por nenhum dos derivados preparados. Porém, a 55°C, já foi possível detectar perdas de atividade por parte dos

derivados tripsina-sepabeads, fato não observado para o derivado tripsina-glioxil, que manteve 100% de sua atividade ao longo de todo o período ensaiado. A Figura 4.2 mostra o perfil de atividade a 55°C dos derivados preparados, bem como da enzima solúvel.

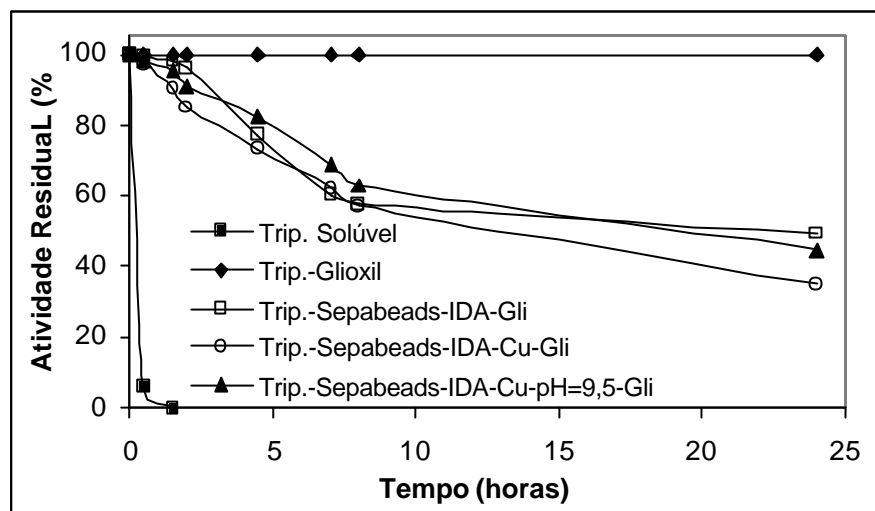


Figura 4.2: Perfis de atividade da tripsina solúvel e derivados tripsina-glioxil e tripsina-sepabeads durante incubação a 55°C, em tampão borato 25mM e pH 8 por 24 horas.

De acordo com o gráfico da Figura 4.2 observa-se que os derivados tripsina-sepabeads apresentaram comportamento similar, ou seja, ao término das 24 horas de incubação todos os derivados apresentavam entre 35 e 49% da atividade inicial. Não se observou ganho, portanto, com a incubação a pH 9,5. Apesar da menor estabilidade térmica dos derivados tripsina-sepabeads em relação ao derivado tripsina-glioxil, estes se mostraram consideravelmente mais resistentes à ação da temperatura que a enzima solúvel, que sofreu completa inativação em apenas uma hora e meia de incubação.

Um modelo exponencial de primeira ordem (Eq. 3.5) foi ajustado aos dados experimentais visando-se determinar os tempos de meia-vida da enzima solúvel e dos derivados preparados e, assim, determinar o fator de estabilização dos derivados em relação à enzima solúvel. Esses dados estão apresentados na Tabela 4.3.

Os resultados obtidos mostraram que todos os derivados tripsina-sepabeads alcançaram estabilização bastante razoável frente à enzima solúvel. O derivado *tripsina*-(*Sepabeads-IDA-Cu²⁺-Glicina*) (aproximadamente 90 vezes mais estável que a enzima solúvel) mostrou que a formação de um quelato metálico com o suporte não promoveu

enrijecimento da molécula de enzima semelhante aos observados para os derivados *tripsina-(Sepabeads-IDA-Glicina)* e *tripsina-(Sepabeads-IDA-Cu²⁺-pH=9,5-Glicina)*, que se mostraram mais de 133 vezes mais estáveis que a enzima solúvel.

Tabela 4.3: Parâmetros do modelo matemático utilizado [$Y=Y_0+A_1*\exp(-X/t_1)$] e tempos de meia-vida ($\tau_{1/2}$) obtidos a 55°C e pH 8 para tripsina solúvel e imobilizada sobre sepabeads.

Enzima	$Y_0 \pm \sigma$	$A_1 \pm \sigma$	$t_1 \pm \sigma$	$\tau_{1/2}$ (horas)	Fator de Estabilização
<i>Tripsina Solúvel</i>	0	100,00 ± 0,0216	0,1777 ± 2,28 x 10 ⁻⁴	0,123	1
<i>Tripsina-(Sepabeads-IDA-Glicina)</i>	46,94 ± 2,87	53,95 ± 3,06	5,72 ± 0,79	16,41	133,41
<i>Tripsina-(Sepabeads-IDA-Cu²⁺-Glicina)</i>	30,56 ± 1,45	69,95 ± 1,42	8,6 ± 0,41	11,01	89,51
<i>Tripsina-(Sepabeads-IDA-Cu²⁺-pH=9,5-Glicina)</i>	38,97 ± 4,62	63,00 ± 4,42	9,7 ± 1,58	16,9	137,40

Assim, o uso de sepabeads mostra-se uma alternativa promissora sempre que agarose-glioxil não puder ser aplicável, seja por razões de custo, resistência mecânica do suporte ou inativação da enzima no alto pH de imobilização requerido pelo grupo glioxil.

4.1.3. ATIVIDADE CASEINOLÍTICA (SUBSTRATO MACROMOLECULAR) DE DERIVADOS TRIPSINA-SEPABEADS E TRIPSINA-GLIOXIL

Diferentes suportes possuem diferentes geometrias internas e métodos de imobilização diferentes conduzem a enzima imobilizada a diversas configurações finais. Agarose ativada com grupos glioxil, por exemplo, promove a imobilização através da região rica em resíduos de lisina; suportes hidrofóbicos ativados com grupos epóxidos, através de bolsões externos hidrofóbicos; suportes heterofuncionais quelato-epóxido, na região mais rica em resíduos de histidina. Além disso, agarose e sepabeads possuem áreas superficiais internas, distribuição e diâmetro médio de poro diferentes. Isso implica que, mesmo se utilizando baixa carga de enzima por grama de suporte, a ausência de efeitos difusivos que se observou na medida de atividade do substrato sintético de baixa massa molecular pode não ocorrer para caseína, cuja massa molecular

é de aproximadamente 20KDa. Além disso, o substrato de massa molecular elevada está sujeito a efeitos estéricos, devido a possível orientação desfavorável do sítio ativo da enzima durante imobilização. Assim, era importante comparar o desempenho dos derivados em situação real (hidrólise de proteínas) e, para isso, caseína foi utilizada como modelo. Foram assim realizados ensaios de velocidades iniciais da hidrólise da caseína nas concentrações de 10 e 40g/L, concentração de enzima de 0,088mgEnz./mL de solução, temperatura de 40°C (condição onde os derivados apresentaram alta estabilidade térmica) e pH 8, utilizando a técnica do pHstato. Os resultados obtidos são mostrados na Tabela 4.4.

Tabela 4.4: Medida da atividade da enzima solúvel e dos derivados tripsina-sepabeads (atividade aparente) na hidrólise de caseína. Ensaio de velocidades iniciais a 40°C; pH 8; 0,088mgEnz./mL de solução e 15 minutos de reação.

Derivados	Grau de Hidrólise (mEqv/min) x 10 ⁻³	
	Caseína 10g/L	Caseína 40g/L
<i>Tripsina Solúvel</i>	2,64 (100%)	6,11 (100%)
<i>Tripsina-Glioxil</i>	1,35 (51,04%)	3,32 (54,34%)
<i>Tripsina-(Sepabeads-IDA-Glicina)</i>	0,54 (20,30%)	0,78 (12,82%)
<i>Tripsina-(Sepabeads-IDA-Cu²⁺-Glicina)</i>	0,34 (12,71%)	0,54 (8,84%)
<i>Tripsina-(Sepabeads-Ida-Cu²⁺-pH=9,5-Glicina)</i>	0,32 (11,95%)	0,51 (8,35%)

Pode-se observar que efetividade da reação em torno de 50% foi obtida para o derivado tripsina-glioxil, para as duas concentrações de substrato e uma concentração de enzima ensaiadas. Para os derivados tripsina-sepabeads as atividades aparentes além de bem menores que as observadas para o derivado tripsina-glioxil, variaram com a concentração inicial de substrato. Esses resultados indicam que no caso do derivado tripsina-glioxil deve estar ocorrendo apenas efeitos estéricos, que impedem o acesso das moléculas de substrato ao sítio ativo de 50% das moléculas de enzimas imobilizadas, já que a efetividade da reação catalisada por derivados tripsina-glioxil não variou nas duas condições testadas. Assim sendo, a enzima pode ter sido imobilizada muito próximo à superfície do suporte, tornando seu centro catalítico de difícil acesso para o substrato macromolecular. No caso dos derivados tripsina-sepabeads, também devem estar ocorrendo efeitos difusionais, pois a efetividade da reação varia alterando-se a concentração de substrato. Como os derivados *tripsina-(Sepabeads-IDA-Cu²⁺-Glicina)* e *tripsina-(Sepabeads-Ida-Cu²⁺-pH=9,5-Glicina)* tiveram desempenho muito abaixo do derivado referência (*tripsina-glioxil*), selecionou-se apenas o derivado *tripsina-*

(*Sepabeads-IDA-Glicina*) para dar continuidade aos testes comparativos. Com os dois derivados selecionados e a enzima solúvel foram desenvolvidos novos ensaios de hidrólise de caseína 10g/L. Nestes experimentos buscou-se investigar se mediante tempos prolongados de reação era possível atingir graus de hidrólise com os derivados imobilizados comparáveis àquele obtido com a enzima em solução. Ao longo de 6 horas de reação, alíquotas foram retiradas e analisadas quanto à distribuição dos peptídeos gerados por cromatografia de exclusão por tamanho em HPLC. A Figura 4.3, apresentada a seguir, mostra a distribuição de peptídeos formados nas hidrólises da caseína com tripsina solúvel e imobilizada, para as quatro últimas horas de reação.

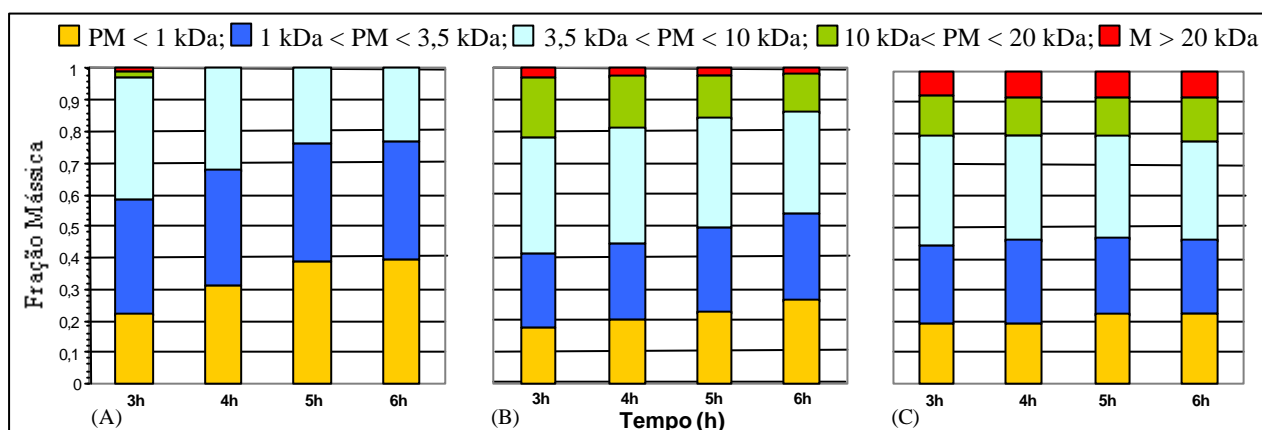


Figura 4.3: Distribuição dos peptídeos obtida após hidrólise longa de caseína 10g/L, 40°C, pH 8; 0,088mgEnz./mL de solução com (A) *tripsina solúvel*, (B) *tripsina-(Sepabeads-IDA-Glicina)* e (C) *tripsina-glioxil*.

Analisando-se a Figura 4.3 (A), observa-se que com 4 horas de reação não havia mais caseína remanescente, ou seja, esta proteína já havia sido completamente convertida em peptídeos de tamanhos variados pela ação da tripsina solúvel. Com o passar do tempo, a fração de peptídeos menor que 1kDa aumentava, atingindo-se em 6 horas, aproximadamente 40% do total de peptídeos formados. Contudo, nota-se apenas uma leve diferença no perfil dos peptídeos entre 5 e 6 horas, indicando que em 5 horas a hidrólise já havia sido praticamente completada e a capacidade máxima de hidrólise da tripsina solúvel sido atingida. Para as hidrólises desenvolvidas utilizando-se enzimas imobilizadas, Figuras 4.3 (B) e (C), percebe-se que uma fração de substrato com massa molecular maior que 20kDa permaneceu intacta nas quatro últimas horas de reação. Caseína é poliforme, constituída por diferentes frações com massas moleculares diferentes. Os dados obtidos com os derivados indicam que deve haver impedimento

estérico ao ataque de alguma fração ainda intacta ou com perda de poucos resíduos. Essa fração remanescente foi mais significativa quando a hidrólise foi catalisada pelo derivado *tripsina-glioxil*, indicando que esse impedimento foi mais crítico quando este derivado foi utilizado. Em concordância com isso, a fração de peptídeos pequenos foi maior quando a hidrólise foi desenvolvida utilizando-se o derivado *tripsina-(Sepabeads-IDA-Glicina)*. Curiosamente, embora os resultados mostrem que um maior fracionamento dos peptídeos foi obtido com sepabeads, o volume de soda adicionado pelo pHstato quando se usou glioxil foi maior, o que em princípio indicaria que maior grau de hidrólise foi obtido com este derivado. Evidentemente, os parâmetros utilizados para o cálculo do grau de hidrólise deverão ser modificados quando se usa o derivado sepabeads, pois a presença dos grupos glicina, utilizada para bloquear grupos epóxidos remanescentes no suporte, deve estar afetando os parâmetros da hidrólise. Uma possível explicação para este fato seria que o próprio conjugado enzima-suporte [*tripsina-(Sepabeads-IDA-Glicina)*] estaria capturando prótons liberados como resultado do rompimento das ligações peptídicas. Dessa forma, o volume final de base consumida para manter o pH do sistema seria correspondentemente menor e o grau de hidrólise calculado com base na indicação do equipamento não retrataria o avanço da reação de forma quantitativa. A análise de distribuição de massa molecular, contudo, é conclusiva e mostra que o suporte epóxido conduz à preparação de um derivado bastante eficiente na hidrólise de proteínas.

Uma vez que com o derivado sepabeads ainda se notava pequenos aumentos nas frações menores, necessitava-se confirmar se tempos mais longos de reação conduziram a graus de hidrólise superiores para os ensaios desenvolvidos com as enzimas imobilizadas. Assim, foram feitos novos experimentos de hidrólise enzimática a 40°C e 24 horas de reação. Nestes ensaios, foram atingidos graus de hidrólise semelhantes aos anteriores evidenciando que, de fato, a capacidade máxima de hidrólise desse substrato macromolecular pela ação dos derivados imobilizados já havia sido atingida. Os resultados aqui obtidos indicam que a utilização desses derivados na hidrólise de macromoléculas parece depender do tipo e da constituição do substrato a ser hidrolisado, e não apenas de sua massa molecular. Esta indicação é reforçada pelo fato de derivados *tripsina-glioxil* (posteriormente apresentados) terem sido satisfatoriamente empregados na hidrólise das proteínas do soro, atingindo-se em tais ensaios mesmos graus de hidrólise com enzima solúvel e imobilizada. Na hidrólise da caseína, observa-se nitidamente que uma de suas frações não consegue ser hidrolisada

pela enzima imobilizada. Assim, o emprego do derivado tripsina-sepabeads deve ser estudado caso a caso, considerando-se as características específicas de cada sistema.

Não se tentou neste trabalho comparar os graus de hidrólise atingidos experimentalmente com os teóricos, pois como já anteriormente comentado, a caseína é um substrato complexo constituído por quatro frações distintas (α -s1, α -s2, β e κ -caseína). Estudo semelhante realizado por Galvão (2000), enfocou a hidrólise das proteínas do soro láctico com tripsina e quimotripsina livres e pôde comprovar experimentalmente que o grau máximo de hidrólise teoricamente previsto com tripsina solúvel era atingido, pois como as estruturas primárias das principais proteínas presentes e suas respectivas concentrações eram conhecidas foi possível efetuar o cálculo dos valores teóricos.

4.2. PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE DERIVADOS PREPARADOS SOBRE MATRIZES DE QUITOSANA

4.2.1. IMOBILIZAÇÃO DE TRIPSINA SOBRE DIFERENTES MATRIZES DE QUITOSANA

O segundo suporte aqui estudado foi a quitosana. Como já comentado em seções anteriores deste trabalho, a quitosana deriva da quitina, que é um polímero natural abundantemente disponível na natureza e encontrado em carapaças de crustáceos, alguns insetos e algas. A obtenção da quitosana a partir da quitina não apresenta um protocolo específico podendo-se, de tal procedimento, gerar diferentes polímeros de quitosana, cuja propriedade de maior variação é o seu grau de desacetilação. Neste trabalho, utilizou-se quitosana com grau de desacetilação de 85%, obtida a partir do mesmo lote de preparação.

Foram, inicialmente, preparadas diferentes matrizes de quitosana: matriz coagulada em solução de NaOH 1N e ativada com glutaraldeído nos pHs 7 e 10; matriz coagulada em solução de NaOH 0,1N e ativada com glutaraldeído nos pHs 7 e 10 e, finalmente, matriz de quitosana coagulada em solução de NaOH 0,1N, ativada com glicidol e oxidada com NaIO₄. O protocolo de preparação da última matriz citada, quitosana-glioxil, foi idêntico àquele utilizado na preparação de gel glioxil-agarose, pois este era apenas um ensaio exploratório. A matriz gerada pela coagulação em NaOH 1N apresentava densidade igual a 1,05g/mL e porosidade 0,95. Já a matriz obtida via coagulação em NaOH 0,1N apresentava densidade de 1,10g/mL e porosidade 0,92.

O processo de imobilização de tripsina sobre as diferentes matrizes de quitosana preparadas foi desenvolvido na presença de benzamidina, inibidor competitivo da tripsina, a 25°C e pH 10. A atividade dos sobrenadantes das suspensões foi acompanhada ao longo do tempo (24 horas de reação) em espectrofotômetro a 405nm e 25°C, o que possibilitou a avaliação da velocidade de imobilização da enzima nas matrizes diferentemente ativadas - Figura 4.4.

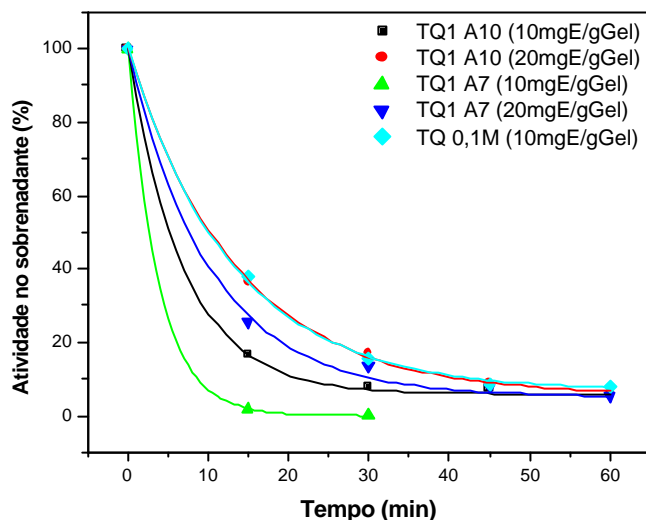


Figura 4.4: Acompanhamento da velocidade de imobilização da tripsina nas diferentes matrizes de quitosana: (■) quitosana coagulada em NaOH 1N e ativada em pH 10 – derivado com 10mgEnz./gGel, (●) quitosana coagulada em NaOH 1N e ativada em pH 10 – derivado com 20mgEnz./gGel, (▲) quitosana coagulada em NaOH 1N e ativada em pH 7 – derivado com 10mgEnz./gGel, (▼) quitosana coagulada em NaOH 1N e ativada em pH 7 – derivado com 20mgEnz./gGel e (◆) quitosana coagulada em NaOH 0,1N e ativada em pH 7 – derivado com 10mgEnz./gGel. Condições de imobilização: 25°C, pH 10 e suave agitação.

Em todos os casos, após 90 minutos de interação enzima-suporte praticamente não era observada nenhuma atividade nos sobrenadantes de imobilização. Para carga enzimática de 10mgEnz./gGel (coagulação em NaOH 1N), observa-se que a velocidade de imobilização do derivado preparado sobre matriz ativada a pH 7 (completo desaparecimento da enzima do sobrenadante em 15 minutos de reação) foi seis vezes mais rápida que a correspondente para o derivado preparado sobre matriz ativada a pH 10 (desaparecimento da enzima do sobrenadante em aproximadamente 90 minutos). Uma possível explicação para este fato consiste na polimerização superficial do glutaraldeído (Monsan, 1977/78), ocorrida em função do aumento do pH de ativação do gel (de 7 para 10). Este aumento no pH estaria tornando indisponíveis grupos

reativos na superfície do suporte capazes de estabelecer ligações com grupos reativos da enzima. Para cargas enzimáticas mais elevadas (20mgEnz./gGel), limitações difusionais já podiam ser observadas, não sendo possível se detectar diferenças nas velocidades de imobilização com o aumento do pH. A reação de imobilização da tripsina sobre matriz de quitosana coagulada em solução de NaOH 0,1N, ativada com glicidol e oxidada com NaIO₄ foi nitidamente mais lenta que as demais, e, assim, por incompatibilidade de escala, o acompanhamento desse processo não foi ilustrado na Figura 4.4. A Tabela 4.5 explicita quantitativamente o comportamento de cada derivado preparado.

Tabela 4.5: Atividade recuperada no gel após 24 horas de imobilização de duas cargas de tripsina em cinco diferentes suportes a 25°C, pH 10 e na presença de benzamidina.

Derivado Tripsina-Quitosana	Atividade oferecida (Abs/min)	Atividade no sobrenadante após 24h (Abs/min)	Rendimento de imobilização (%)	Atividade medida no gel (Abs/min)	² Atividade recuperada no gel (%)
10mgEnz./gGel (1N - pH=7)	0,0442	0	100	0,0445	100
20mgEnz./gGel (1N - pH=7)	0,0711	0	100	0,0721	100
10mgEnz./gGel (1N - pH=10)	0,0442	0	100	0,0443	100
20mgEnz./gGel (1N - pH=10)	0,0711	0	100	0,0715	100
10mgEnz./gGel (0,1N - pH=7)	0,0405	0	100	0,0410	100
Quitosana-Glioxil 10mgEnz./gGel Ativação glicidol Oxidação NaIO ₄	0,1290	0,0516	60	0,0772	100

¹ Calculado como sendo a razão entre a atividade desaparecida do sobrenadante e a atividade oferecida.

² Calculado como sendo a razão entre a atividade medida no gel e a atividade desaparecida do sobrenadante.

De acordo com os dados acima tabelados, pode-se notar que todos os derivados preparados sobre matrizes ativadas com glutaraldeído resultaram em 100% de rendimento de imobilização. Este fato, porém, não foi observado quando a tripsina foi imobilizada no suporte quitosana-glioxil, que resultou em apenas 60% de rendimento. Uma provável explicação para este resultado é a ocorrência de entrecruzamento excessivo entre grupos aminos não reagidos da matriz de quitosana e os grupos aldeídos gerados pela reação do glicidol com o suporte, com conseqüente diminuição da área interna acessível à proteína. Uma alternativa para se superar este inconveniente seria a

utilização de quitosana com graus de desacetilação inferiores ao aqui empregado, ou seja, matrizes com teor reduzido de grupamentos aminos disponíveis para reticulação.

Uma avaliação do tipo de enlace estabelecido entre a enzima e o suporte foi feita de forma similar àquela descrita para derivados tripsina-sepabeads. Concentrações crescentes de solução salina (até 400mM de NaCl) foram utilizadas para realização de testes de dessorção e a atividade enzimática dos sobrenadantes das suspensões foi acompanhada ao longo das 18 horas de incubação. Os resultados obtidos evidenciaram o estabelecimento de ligação química entre a enzima e o suporte, pois a enzima se manteve ligada mesmo em condições favoráveis à sua dessorção.

A máxima carga enzimática capaz de ser imobilizada nas matrizes de quitosana foi investigada oferecendo-se quantidades crescentes de enzima ao suporte e dosando-se a atividade enzimática recuperada no gel. Assim, seria possível determinar o limite de saturação do gel através da obtenção de medidas constantes de atividade com o aumento da carga enzimática oferecida. Os experimentos foram então realizados e os resultados estão apresentados na Tabela 4.6.

Tabela 4.6: Investigação da quantidade máxima de enzima (carga enzimática) capaz de ser imobilizada sobre diferentes géis de quitosana. Condições: 25°C, pH 10, presença de benzamidina e 24 horas de reação.

Carga oferecida (mgEnz./gGel)	40	50	60	70
Medidas	a) Atividade inicial oferecida (Abs/min) b) Atividade desaparecida do sobrenadante (Abs/min) c) Atividade medida no gel (Abs/min) d) ¹ Rendimento de imobilização (%) e) ² Atividade recuperada no gel (%)			
Quitosana Coagulação 1N Ativação pH 7	a) 0,0386 b) 0,0386 c) 0,0390 d) 100% e) 100%	- / -	a) 0,0795 b) 0,0795 c) 0,0556 d) 100% e) 70%	a) 0,0998 b) 0,0998 c) 0,0598 d) 100% e) 60%
Quitosana Coagulação 1N Ativação pH 10	a) 0,0271 b) 0,0254 c) 0,0225 d) 93,7% e) 88,6%	a) 0,0375 b) 0,0341 c) 0,0305 d) 90,9% e) 89,4%	a) 0,0631 b) 0,0545 c) 0,0431 d) 86,4% e) 79,1%	- / -
Quitosana Coagulação 0,1N Ativação pH 7	a) 0,0695 b) 0,0695 c) 0,0692 d) 100% e) 100%	a) 0,0848 b) 0,0800 c) 0,0766 d) 94,3% e) 95,7%	- / -	a) 0,1184 b) 0,1115 c) 0,0915 d) 94,2% e) 82,1%

¹ Calculado como sendo a razão entre a atividade desaparecida do sobrenadante e a atividade oferecida.

² Calculado como sendo a razão entre a atividade medida no gel e a atividade desaparecida do sobrenadante.

Os dados apresentados na Tabela 4.6 mostram que de todas as cargas enzimáticas iniciais oferecidas a única capaz ser totalmente recuperada no gel foi a de 40mgEnz./gGel, quando foram utilizadas matrizes ativadas a pH 7, independentemente da concentração da solução coagulante. As demais cargas investigadas resultaram em recuperação sempre inferior a oferecida. Há que se recordar, porém, que a reação entre o glutaraldeído, predominantemente polimerizado, e os grupos aminos do suporte é favorecida à medida que o pH do meio aumenta (pH > 9) - Monsan, 1977/78; Arruda, 1999. Segundo Monsan (1977/78), em meios fortemente alcalinos (pH 10,5) a polimerização torna-se muito intensa, podendo diminuir a área específica do suporte, devido a ligações estabelecidas entre os grupos reativos da matriz e as terminações das longas cadeias poliméricas do agente reticulante. Com a possível diminuição do tamanho dos poros, em consequência da reticulação da matriz, a imobilização da enzima no caso da matriz ativada a pH 10 deve ter ocorrido apenas superficialmente e não no interior dos poros, como no caso da matriz ativada a pH 7. Isso explicaria a considerável diferença entre as cargas máximas encontradas para cada um dos suportes preparados (pHs 7 e 10). A diferente geometria interna dos suportes deve estar implicando diferentes graus de limitações difusionais. Também devem estar presentes efeitos estéricos ou mesmo inativação da enzima em consequência de distorções do sítio ativo durante o processo de imobilização nos diferentes suportes ativados e, assim, a atividade recuperada no suporte dependeria fortemente das condições de preparação da matriz.

4.2.2. INATIVAÇÃO TÉRMICA E A pH ALCALINO

As estabilidades térmica e a pH alcalino dos derivados tripsina-quitosana foram aqui estudadas como parte da caracterização dos derivados. Tripsina imobilizada sobre matriz coagulada em NaOH 1N e ativada nos pHs 7 e 10 foi incubada nas temperaturas de 40 e 70°C e em pH 11; tripsina imobilizada sobre matriz coagulada em NaOH 0,1N e ativada nos pHs 7 e 10 foi incubada nas temperaturas de 55 e 70°C. Os resultados obtidos de tais ensaios foram comparados com aqueles obtidos para a enzima solúvel e para o derivado tripsina-glioxil-agarose, já amplamente estudado, e se encontram sumarizados nas Tabelas 4.7 e 4.8.

Tabela 4.7: Influência da temperatura e do pH alcalino na estabilidade dos derivados preparados. Tempos de meia-vida determinados nas seguintes condições experimentais: 40°C, 70°C e pH 11.

Derivado	$\tau_{1/2}$	Estabi- lização	$\tau_{1/2}$	Estabi- lização	$\tau_{1/2}$
	40°C	40°C	70°C	70°C	pH 11
¹ Tripsina solúvel	20 min	1	-	-	5 horas
² Tripsina-quitosana (1N - Ativação a pH 10)	147 horas	445,5	6 min	1	40 horas
Tripsina-quitosana (1N - Ativação a pH 7)	155 horas	469,7	9 min	1,5	68 horas
Tripsina-glioxil- quitosana	-	-	1,5 horas	15	147 horas
Tripsina-glioxil-agarose	217 horas	657,6	6,25 horas	62,5	168 horas

¹Referência para estabilização a 40°C.

²Referência para estabilização a 70°C.

Analisando-se os dados apresentados na Tabela 4.7, percebe-se que os derivados de tripsina imobilizados sobre matrizes ativadas com glutaraldeído perdem sua atividade enzimática muito mais rapidamente que os derivados tripsina-glioxil-agarose e tripsina-glioxil-quitosana. Esses resultados atestam a superioridade do método de ativação com glicidol e oxidação com periodato de sódio frente às metodologias que envolvem o uso de glutaraldeído.

A grande estabilidade do derivado tripsina-glioxil-agarose nas temperaturas e pH de incubação empregados ficou evidenciada mediante os dados apresentados na Tabela 4.7, tanto em relação à enzima solúvel quanto aos derivados tripsina-quitosana. Os níveis de estabilização obtidos por tais derivados sugerem a possível formação de multiligações enzima-suporte.

Como discutido anteriormente, a polimerização intensa do glutaraldeído pode ter sido responsável pela diminuição do número de terminações aldeídicas disponíveis na superfície da matriz ativada a pH 10, às quais se ligariam aos grupos aminos da enzima. Como conseqüência, o número de ligações efetivadas entre suporte e enzima (ligações multipontuais) seria menor no caso do derivado cuja matriz foi ativada a pH 10, o que resultaria em menor estabilidade térmica e alcalina em relação ao derivado ativado a pH 7.

Tabela 4.8: Determinação dos tempos de meia-vida de derivados preparados em matrizes coaguladas em NaOH 0,1N. Condições experimentais: 55 e 70°C - pH 8.

Derivado	Tempo de meia-vida ($\tau_{1/2}$)	
	55°C	70°C
Tripsina-quitosana (0,1N - Ativação a pH 7)	540 min	18 minutos
Tripsina-quitosana (0,1N - Ativação a pH 10)	540 min	10 minutos
Tripsina solúvel	4 min	-

Mediante os dados apresentados na Tabela 4.8, vê-se que não foi possível detectar diferenças significativas a 55°C entre os derivados preparados sobre matrizes coaguladas em NaOH 0,1N e ativadas com glutaraldeído nos pHs 7 e 10. Nesta temperatura, eles possuem o mesmo tempo de meia-vida, mas a 70°C, o derivado que teve sua matriz ativada em pH 7 (derivado-pH 7) foi cerca de duas vezes mais estável que aquele cuja matriz foi ativada em pH 10 (derivado-pH 10), indicando que devem possuir características distintas. A diferença existente entre eles pode estar associada a uma maior estabilização de determinada parcela da enzima existente no derivado-pH 7, em consequência de um maior enrijecimento da sua estrutura. A parcela de enzima aparentemente mais estabilizada só teria ação perceptível em um ensaio realizado a alta temperatura, pois a baixas temperaturas a enzima parcialmente estabilizada consegue reter sua atividade nos dois derivados por períodos prolongados. De todo modo, o efeito do maior enrijecimento da estrutura do derivado-pH 7 só seria detectado se o ensaio fosse prolongado até perda total de atividade enzimática dos derivados. De qualquer maneira, sendo o derivado-pH 7 aproximadamente duas vezes mais estável que o derivado-pH 10 não deve haver muita diferença com relação ao número de ligações estabelecidas entre a enzima e o suporte em ambos os casos.

Estudo mais aprofundado sobre o derivado tripsina-glioxil-quitosana, possivelmente imobilizado no suporte por mais de duas ligações, devido a sua alta estabilidade, faz-se necessário, pois a ativação da quitosana com glicidol e posterior oxidação com NaIO₄ revelou-se uma metodologia bastante promissora e, sendo otimizada, certamente será uma ótima alternativa principalmente pela redução nos custos do processo de imobilização, dado que este suporte é amplamente disponível em território nacional.

4.2.3. INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA E DO pH NA ATIVIDADE DE HIDRÓLISE DE SUBSTRATOS SINTÉTICOS

A influência da temperatura e do pH na determinação da maior atividade enzimática de hidrólise foi estudada hidrolisando-se soro de queijo 10g/L com tripsina solúvel e derivados preparados sobre quitosana. A faixa de temperatura investigada variou de 30 a 60°C e, nessas condições, foram ensaiados derivados com carga enzimática de 10 e 20mgEnz./gGel. A faixa de pH variou de 6 a 10 e apenas derivados com carga de 10mgEnz./gGel foram ensaiados. As Figuras 4.5 (a) e (b), ilustradas a seguir, permitem comparação do desempenho dos diferentes derivados tripsina-quitosana (coagulação NaOH 1M) obtidos com a da protease solúvel.

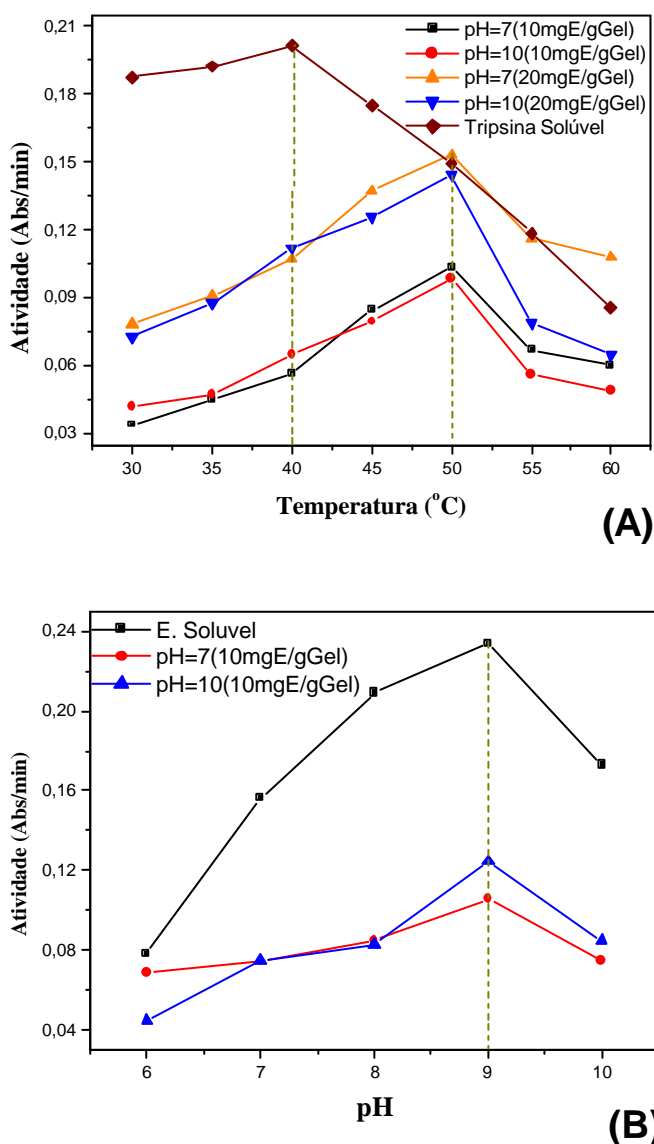


Figura 4.5: Influência da temperatura (A) e do pH (B) na atividade de hidrólise do soro de queijo para tripsina solúvel e derivados imobilizados sobre quitosana (NaOH 1N).

A Figura 4.5 (A) mostra que todos os derivados aqui preparados apresentaram maior atividade de hidrólise a 50°C, enquanto que para a enzima solúvel esta temperatura foi de 40°C. No entanto, empregou-se temperatura de 55°C nas reações de hidrólise das proteínas do soro catalisadas por estes derivados. Nesta temperatura, após cada ensaio, a atividade enzimática dos derivados foi avaliada, não tendo sido detectadas quaisquer perdas na atividade dos derivados utilizados. Esses resultados em conjunto com os obtidos para tripsina-glioxil-agarose (resultados posteriormente apresentados) nos permitem afirmar que, de fato, a temperatura e o pH influenciam de forma significativa na maior atividade de hidrólise, mas um terceiro fator que não pode ser negligenciado é a natureza do substrato a ser hidrolisado. Na hidrólise do substrato sintético usando tripsina solúvel, a maior atividade foi observada à temperatura de 60°C (resultado ainda não apresentado); Já na hidrólise do soro de queijo, a maior atividade foi observada a 40°C.

Com base na Figura 4.5 (B), pode-se observar que a enzima solúvel e os derivados preparados sobre matrizes ativadas com glutaraldeído nos pHs 7 e 10 apresentaram maior atividade de hidrólise em pH 9. No entanto, optou-se aqui por se trabalhar em pH 8, pois, nesta condição, o importante critério de estabilidade, necessário ao perfeito desempenho da enzima por períodos prolongados de tempo, é completamente obedecido. Estes dados reforçam as vantagens de se trabalhar com enzimas imobilizadas, uma vez que o uso de condições operacionais drásticas, não recomendável para enzimas livres, é possível, reduzindo-se assim custos de operação.

4.2.4. HIDRÓLISE ÁCIDA DA TRIPSINA SOLÚVEL E IMOBILIZADA SOBRE MATRIZES DE QUITOSANA

Hidrólises ácidas dos derivados preparados sobre quitosana e também da tripsina solúvel foram realizadas visando-se investigar que tipo de imobilização havia decorrido da interação enzima-suporte. Os hidrolisados obtidos foram analisados através de cromatografia de troca iônica em HPLC para quantificação de aminoácidos. Em outras palavras, significa dizer que se desejava determinar a concentração total de resíduos de lisina na enzima solúvel e comparar este valor àqueles obtidos pós-hidrólise para os derivados em questão. Esperava-se que os aminoácidos não envolvidos no processo de imobilização apresentassem concentrações similares tanto na enzima solúvel quanto nos derivados imobilizados. Quanto ao resíduo de lisina, era de se

esperar que a concentração deste aminoácido detectada pós hidrólise ácida dos derivados fosse inferior àquela determinada para a enzima em solução, evidenciando que realmente havia resíduos covalentemente ligados ao suporte e que, deste modo, não seriam quantificados por tal procedimento, uma vez que as ligações covalentes estabelecidas entre enzima e suporte não são hidrolisadas por este procedimento. A Tabela 4.9. apresenta as concentrações de alguns aminoácidos após realização de hidrólise ácida da tripsina solúvel e derivados tripsina-quitosana, em $\mu\text{mol/mL}$.

Tabela 4.9: Concentrações ($\mu\text{mol/mL}$) de alguns aminoácidos após hidrólise ácida da tripsina solúvel e dos diferentes derivados desta enzima preparados sobre quitosana.

Aminoácidos	Derivados de tripsina preparados sobre diferentes suportes sólidos		
	Tripsina Solúvel	Tripsina-Glioxil-Quitosana	Tripsina-Glutaraldeído-Quitosana
Ácido Aspártico	0,40	0,40	0,21
Treonina / Asparagina	0,19	0,18	0,12
Serina	0,31	0,30	0,17
Ácido Glutâmico	0,32	0,35	0,14
Glicina	0,40	0,43	0,20
Lisina	0,12	0,10	0,06

Analisando-se a tabela acima, observa-se que os resultados obtidos para a enzima solúvel e derivado tripsina-glioxil-quitosana foram pouco conclusivos, dada a estreita semelhança obtida para o conteúdo de todos os aminoácidos apresentados. No caso do derivado tripsina-glutaraldeído-quitosana, um grande desvio na concentração de todos os aminoácidos acima tabelados pôde ser observado. Todos apresentaram concentração significativamente inferior àquela obtida para o hidrolisado da tripsina solúvel. Uma possível explicação para este fato seria o envolvimento de aminoácidos diferentes da lisina no processo de imobilização da enzima, devido à alta reatividade do glutaraldeído. Este agente ativante pode reagir com grupos hidroxila, carbonila, amino, sulfidril e outros, ou seja, pode reagir com diferentes aminoácidos e não apenas com a lisina. Estando ligados ao suporte pela ligação com o glutaraldeído esses aminoácidos não sofreram hidrólise, resultando em concentrações menores que as esperadas.

4.2.5. DESEMPENHO DE DERIVADOS TRIPSINA-QUITOSANA NA HIDRÓLISE DAS PROTEÍNAS DO SORO DE QUEIJO

Hidrólises das proteínas do soro de queijo (10g/L) foram desenvolvidas utilizando-se o método do pHstato com o objetivo de se comparar o desempenho dos derivados preparados sobre quitosana (coagulação em NaOH 0,1N e ativação nos pHs 7 e 10) com o da tripsina solúvel no fracionamento de um substrato macromolecular. Relação E/S_{mássico} de 1/10 e 1/20, pH 8 e NaOH 0,1N foram condições experimentais fixas em todos os ensaios. Tempo reacional (2h ou tempos prolongados) e temperatura (50 ou 55°C) foram condições variáveis de acordo com o objetivo do experimento. Na Tabela 4.10 estão apresentados os resultados obtidos.

Tabela 4.10: Comparação do desempenho de tripsina solúvel e derivados preparados sobre quitosana coagulada em NaOH 0,1N na hidrólise das proteínas do soro de queijo (10g/L): tempo reacional de 2 horas, 50°C, E/S_{mássico} de 1/20 (derivado 10mgEnz./gGel) ou 1/10 (derivado 20mgEnz./gGel), pH 8 e NaOH 0,1M.

Tempo (horas)	Enzima Solúvel	Ativação a pH 7		Ativação a pH 10	
		10mgEnz./gGel	20mgEnz./gGel	10mgEnz./gGel	20mgEnz./gGel
Grau de Hidrólise (%)					
0	0	0	0	0	0
0,5	7,72	2,85	3,05	2,78	2,75
1	8,33	3,67	4,20	3,63	3,66
1,5	8,71	4,29	4,88	4,19	4,26
2	9,02 (100%)	4,72 (52,33%)	5,41 (59,98%)	4,60 (51%)	4,69 (52%)

Com base nos dados acima tabelados, pode-se observar a ocorrência de atrasos em relação à ação da protease solúvel. Estes atrasos estão possivelmente associados a limitações difusionais devido à alta massa molecular do substrato, sobretudo no período inicial da reação e/ou à forma como ocorreu a polimerização do suporte após ativação com glutaraldeído - Arruda, 1999. Utilizando-se derivados com carga enzimática de 20mgEnz./gGel pode-se observar presença de sérias limitações difusionais, pois os graus de hidrólise atingidos utilizando-se esses derivados, com o dobro da concentração enzimática no meio reacional, foram similares aos atingidos quando se empregou derivados com 10mgEnz./gGel. No entanto, quando o derivado 20mgEnz./gGel preparado sobre matriz ativada a pH 10 foi utilizado, parece que essas limitações foram mais pronunciadas, pois não se observou qualquer aumento no grau de hidrólise desse sistema comparado ao que utilizou derivado 10mgEnz./gGel (ativação a pH 10) para mesmos tempos de reação. Buscando-se atingir mesmo grau de hidrólise obtido com a

tripsina livre (9%), optou-se por aumentar a temperatura do sistema reacional em 5°C, e, assim, promover aumentos nas velocidades de reação. A Tabela 4.11 ilustra os novos resultados obtidos.

Tabela 4.11: Graus de hidrólise obtidos após incremento de 5°C na temperatura do meio reacional. Soro 10g/L, tempo de hidrólise de 2 horas, 55°C, E/S_{mássico} de 1/20 (0,1N - derivado 10mgEnz./gGel) ou 1/10 (0,1N - derivado 20mgEnz./gGel) e pH 8. Matrizes coaguladas em NaOH 0,1N.

Tempo (horas)	Enzima Solúvel	Ativação a pH 7		Ativação a pH 10	
		10mgEnz./gGel	20mgEnz./gGel	10mgEnz./gGel	20mgEnz./gGel
Grau de Hidrólise (%)					
0	0	0	0	0	0
0,5	7,90	3,39	4,24	4,24	4,13
1	8,50	4,29	5,57	5,21	5,36
1,5	8,75	4,98	6,48	5,76	5,94
2	8,93 (100%)	5,63 (63,05%)	7,20 (80,63%)	6,14 (68,76%)	6,40 (71,67%)

Como pode ser observado na Tabela 4.11, o aumento de 5°C na temperatura promoveu aumento nas velocidades de reação, reduzindo os atrasos constatados para mesmos tempos reacionais a 50°C em todos os ensaios desenvolvidos a 55°C. Porém, em nenhuma situação investigada foi alcançado o grau de hidrólise desejado (9%). É possível que em tais experimentos esteja ocorrendo uma combinação de efeitos difusivos e estéricos, com orientação desfavorável do sítio ativo da enzima após imobilização. Assim, haveria trechos de proteínas inacessíveis a um grande número de moléculas de enzima imobilizada, o que atrasaria ainda mais o sistema imobilizado, pois a concentração real de enzima imobilizada disponível seria menor que a existente no sistema livre. Utilizando-se derivados ativados a pH 10 estes efeitos foram ainda mais drásticos, pois impediram que o efeito do aumento da temperatura se sobrepusesse aos efeitos combinados de limitação difusional/massa molecular elevada. Para os géis ativados a pH 7, aumentando-se temperatura e concentração de enzima observou-se considerável aumento no grau de hidrólise (27,8%). No entanto, este aumento não foi suficiente para se atingir o grau de hidrólise desejado (9%). Visando-se superar os inconvenientes detectados (efeitos difusionais e elevada massa molecular inicial do substrato real) foram realizadas hidrólises a 55°C e tempo reacional suficiente para se atingir 9% de grau de hidrólise com todos os derivados aqui preparados. Os resultados encontram-se sumarizados na Tabela 4.12.

Tabela 4.12: Hidrólises desenvolvidas a 55°C (pH 8) e tempo reacional suficiente para se obter grau de hidrólise de 9% em todas as situações. Soro 10g/L, E/S_{mássico} de 1/20 (derivado 10mgEnz./gGel) ou 1/10 (derivado 20mgEnz./gGel) e pH 8. Matrizes coaguladas em NaOH 0,1N.

Tempo (horas)	Grau de Hidrólise (%)			
	Ativação a pH 7		Ativação a pH 10	
	10mgEnz./gGel	20mgEnz./gGel	10mgEnz./gGel	20mgEnz./gGel
0	0	0	0	0
1	5,05	5,57	3,76	4,64
2	6,525	7,19	5,15	6,38
3	7,615	8,36	6,09	7,74
3,67	8,23	9,00	6,58	8,62
4	8,49	--	6,82	9,01
4,75	9,01	--	7,37	--
5	--	--	7,62	--
6	--	--	8,07	--
7	--	--	8,82	--
7,17	--	--	9,00	--

Com base nos dados apresentados na Tabela 4.12 vê-se que 55°C e tempos prolongados de reação são suficientes para se atingir o grau de hidrólise desejado (9%) com todos os derivados utilizados e que maiores concentrações de enzima no meio resultam, de fato, em maiores velocidades de reação. No entanto, o derivado ativado a pH 7, contendo 20mgEnz./gGel, atingiu o grau de hidrólise desejado no menor tempo reacional – 3,67 horas. Desta forma, selecionou-se apenas este derivado e a enzima livre para se desenvolver hidrólises longas a 55°C, pois, neste ponto, era conveniente saber se grau de hidrólise mais próximo do máximo teórico (Galvão *et al.*, 2001) atingido com a enzima solúvel também seria atingido com o derivado selecionado. A Figura 4.6 mostra os resultados obtidos em tais experimentos.

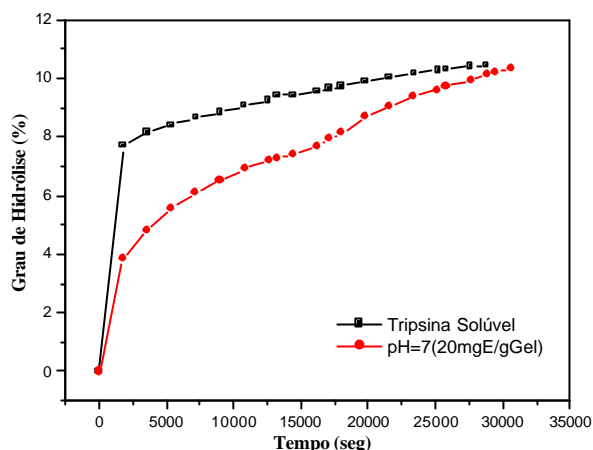


Figura 4.6: Hidrólises máximas das proteínas do soro a 55°C – tripsina solúvel e derivado (matriz coagulada em NaOH 0,1N e ativada a pH 7) contendo 20mgEnz./gGel. $E/S_{\text{mássico}}$ de 1/10 e pH 8.

Analisando-se a Figura 4.6 pode-se confirmar a presença de atrasos associados a efeitos difusionais causados pela alta massa molecular inicial do substrato real utilizado. No entanto, com o avanço da reação catalisada pela enzima imobilizada o atraso vai sendo superado pela estabilidade da enzima imobilizada nesta temperatura e também pela diminuição da massa molecular do substrato, permitindo, assim, que ao final de 8,5 horas de reação, o grau de hidrólise obtido com a protease em solução seja atingido com a enzima imobilizada. De acordo com estes resultados, espera-se que se aumentando a carga enzimática o sistema imobilizado se torne mais rápido que o livre, pois aumentos na temperatura de operação e/ou na concentração de enzima são ações economicamente viáveis para se atingir conversões do sistema imobilizado semelhantes ou até mesmo superiores ao da enzima livre.

Os experimentos realizados com quitosana mostraram que os derivados de tripsina produzidos conseguem ter desempenho na hidrólise de proteínas similar ao da enzima em solução. Esses resultados sugerem que este suporte seja uma alternativa bastante promissora tanto na obtenção de derivados estabilizados a partir de um suporte economicamente viável e com grande disponibilidade em território nacional quanto na catálise de reações de hidrólise de proteínas.

4.3. PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE DERIVADOS DE TRIPSINA E QUIMOTRIPSINA SOBRE GLIOXIL-AGAROSE

4.3.1. IMOBILIZAÇÃO DE TRIPSINA E QUIMOTRIPSINA SOBRE GLIOXIL-AGAROSE COM ALTA ATIVAÇÃO

Tripsina e quimotripsina foram multipontualmente imobilizadas sobre gel glioxil-agarose com alta densidade superficial de grupos aldeídos (75 μ moles de aldeídos/mL de gel), a 25°C e pH 10,05, segundo protocolo detalhadamente descrito no item 3.2.3.3.1. A imobilização da tripsina foi realizada na presença de benzamidina - inibidor competitivo desta enzima, pois segundo Blanco e Guisán (1989) um inibidor competitivo fortemente adsorvido no sítio ativo da enzima pode atuar tanto na minimização de mudanças conformacionais distorsivas na molécula de proteína, durante a etapa de multiinteração enzima-suporte, quanto na proteção da enzima de possíveis efeitos deletérios do boridreto de sódio durante a etapa de redução ou encerramento da reação. No entanto, a quimotripsina tem se mostrado uma enzima bastante robusta e seu processo de imobilização sobre este suporte vem sendo desenvolvido na ausência de inibidores desde 1991 por Guisán e colaboradores sem quaisquer observações de efeitos prejudiciais para a enzima em consequência deste fato. Em todas as situações aqui estudadas ótimos rendimentos de imobilização foram observados, de modo que após aproximadamente uma hora e meia de reação não mais era detectada qualquer atividade nos sobrenadantes das suspensões de imobilização. Tempo de contato prolongado (24 horas) entre enzima insolubilizada e suporte ativado possibilitou a formação de ligações adicionais, tornando a molécula de enzima imobilizada mais rígida e, portanto, mais resistente a mudanças conformacionais. As perdas de atividade da enzima solúvel nas condições de imobilização (25°C e pH 10,05) foram inferiores a 6% após 24 horas de reação, em todos os casos. Os resultados da imobilização de tripsina e quimotripsina estão apresentados na Tabela 4.13.

Tabela 4.13: Imobilização de diferentes cargas enzimáticas de tripsina e quimotripsina sobre gel glioxil-agarose (25°C, pH 10,05).

Carga Oferecida (mgEnz./gGel)	Atividade oferecida (Abs/min)	Atividade no sobrenadante após 30min de reação (Abs/min)	Atividade medida no gel (Abs/min)	¹ Atividade recuperada no gel (%)
TRIPSINA				
3	0,0120	0	0,0118	98,33
6	0,0242	0	0,0237	97,93
10	0,0393	0	0,0391	99,49
20	0,0791	0,0142	0,0785	99,24
QUIMOTRIPSINA				
3	0,0126	0	0,0122	96,83
8	0,0261	0	0,0262	100
10	0,0405	0	0,0382	94,32
20	0,0855	0,0179	0,0851	99,53

¹Medida como sendo a razão entre a atividade medida no gel e a atividade oferecida.

Pode-se observar, analisando-se os dados apresentados na Tabela 4.13, que para cargas enzimáticas inferiores a 10mgEnz./gGel altas velocidades de imobilização foram atingidas, pois em 30 minutos de reação toda a enzima inicialmente presente no sobrenadante já havia desaparecido. Para carga de 20mgEnz./gGel, só foi possível observar completo desaparecimento da enzima do sobrenadante em tempos mais longos. Altos rendimentos de imobilização e fixação das proteases no suporte ativado foram alcançados em todas as situações investigadas, resultando em recuperação de atividade enzimática nos géis superior a 94% em todos os casos. Esses resultados mostram que a etapa de redução com NaBH₄ não provocou efeitos deletérios possíveis e conhecidos nas enzimas, mesmo no caso da quimotripsina, cujo processo de imobilização foi desenvolvido na ausência de inibidor. As Figuras 4.7 (para tripsina) e 4.8 (para quimotripsina), ilustradas a seguir, permitem o acompanhamento da velocidade de desaparecimento da atividade nos sobrenadantes das suspensões e respectivo surgimento de atividade enzimática nos suportes ao longo do processo de multiinteração.

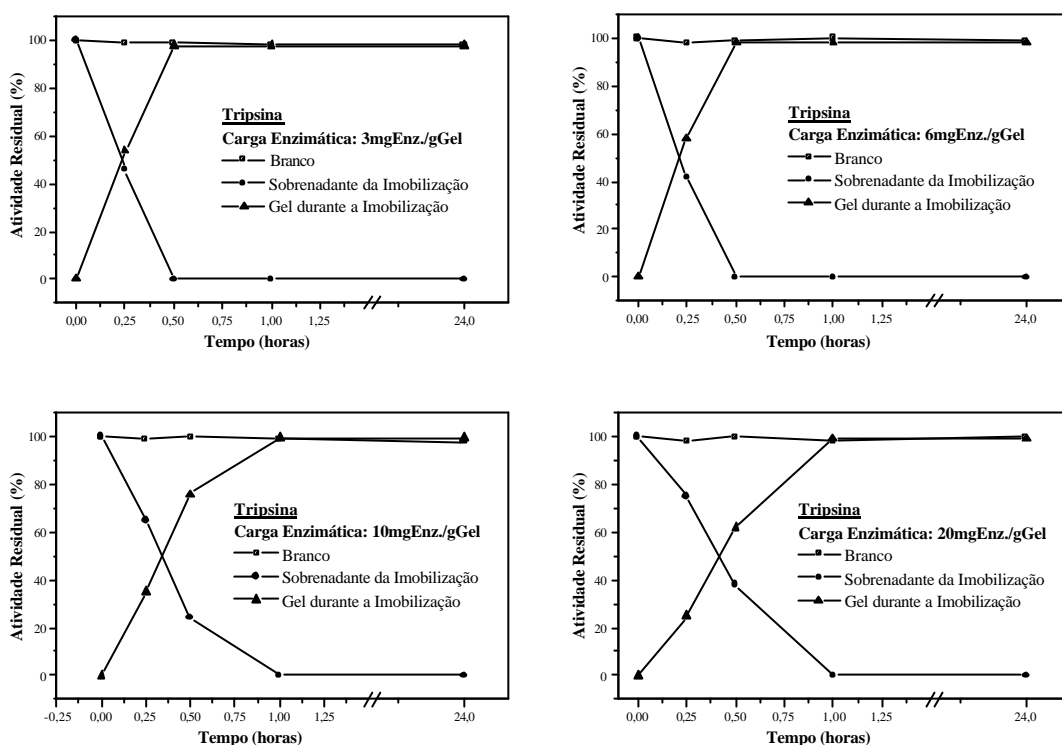


Figura 4.7: Imobilização de diferentes cargas de tripsina em gel glioxil-agarose. Desaparecimento da atividade do sobrenadante da suspensão, surgimento de atividade no gel e acompanhamento do branco ao longo das 24 horas de imobilização.

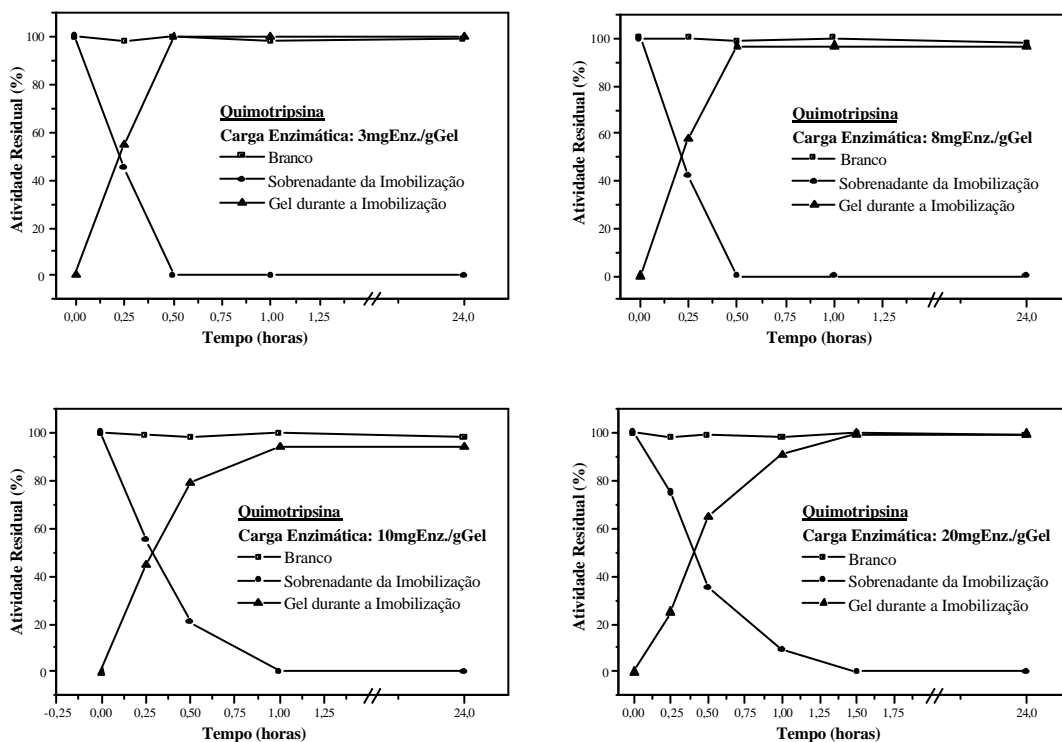


Figura 4.8: Imobilização de diferentes cargas de quimotripsina em gel glioxil-agarose. Desaparecimento da atividade do sobrenadante da suspensão, surgimento de atividade no gel e acompanhamento do branco ao longo das 24 horas de imobilização.

Analisando-se as Figuras 4.7 e 4.8, observa-se que para carga enzimática de 20mgEnz./gGel a velocidade de imobilização é mais lenta que a observada para derivados com cargas inferiores a 10mgEnz./gGel, pois o completo desaparecimento da enzima do sobrenadante só se deu em tempo de reação igual ou superior a uma hora. Para géis com baixa carga não se observa a presença de efeitos difusivos, ou seja, as moléculas de enzima rapidamente encontram e reagem com os grupos aldeídos localizados na superfície do gel. Para carga enzimática já considerada elevada, as moléculas de enzima terão que se difundir até o interior do gel para encontrar grupos ativos ainda disponíveis no suporte. Uma vez que a camada superficial do gel já contém moléculas de enzima ligadas, deve haver considerável aumento da resistência ao transporte de massa para o seu interior, justificando a menor velocidade de imobilização nesta condição.

Concluído o período de 24 horas de imobilização, os géis contendo as enzimas imobilizadas foram lavados com tampão fosfato sódico 200mM, pH 7. Com este procedimento foi possível comprovar que as enzimas haviam estabelecido ligação química com o suporte, pois em nenhuma das situações estudadas se constatou qualquer atividade nos filtrados.

4.3.2. IMOBILIZAÇÃO DE TRIPSINA E QUIMOTRIPSINA SOBRE GLIOXIL-AGAROSE COM TEMPO DE CONTATO REDUZIDO ENTRE ENZIMA-SUPORTE ATIVADO

Tripsina e quimotripsina foram imobilizadas sobre gel glioxil-agarose com baixa densidade de grupos aldeídos reativos (20 μ moles de aldeídos/mL de Gel) e tempo de contato entre enzima e suporte ativado reduzido (1 hora). Em consequência do número reduzido de grupos ativos no suporte, baixas velocidades de imobilização e efetivação de um número bastante limitado de ligações entre estas duas estruturas rígidas eram esperados. Na Tabela 4.14 são mostrados os dados obtidos durante o processo de imobilização bem como as porcentagens de recuperação de atividade enzimática nos derivados preparados nestas condições.

Tabela 4.14: Derivados de tripsina e quimotripsina preparados sobre glioxil-agarose com baixa ativação (20µmoles de aldeídos/mL de Gel) e tempo de contato reduzido de 1 hora – pH 10,05 e 25°C.

Enzima	Atividade oferecida (Abs/min)	Atividade no sobrenadante após 1 hora de reação (Abs/min)	¹ Rendimento de imobilização (%)	Atividade medida no gel (Abs/min)	² Atividade recuperada no gel (%)
Tripsina	1,2280	1,1890	3,18	0,0390	100
	1,2540	1,1409	9,02	0,1131	100
Quimotripsina	1,3270	1,2760	3,84	0,0510	100
	1,3680	1,2487	8,72	0,1193	100

¹Calculado como sendo a razão entre a atividade desaparecida do sobrenadante e a atividade oferecida.

²Calculada como sendo a razão entre a atividade medida no gel e a atividade desaparecida do sobrenadante.

Segundo Guisán, 1988, baixas velocidades de imobilização sobre suportes pouco ativadas eram realmente esperadas, pois o número de grupos aldeídos sobre o suporte determina a possibilidade total que a superfície do suporte tem de interagir com a enzima. Embora as ligações enzima-suporte sejam bastante restritas, toda a enzima imobilizada permaneceria ativa, pois a formação de múltiplas ligações covalentes seria muito limitada, diminuindo assim, as chances de ocorrência de distorções na molécula de proteína. Os rendimentos de imobilização foram inferiores a 10% em todos os casos, ou seja, a utilização de suporte com baixa ativação associada a níveis mínimos de rendimentos de imobilização sugerem estabelecimento de uma ou, no máximo, duas ligações entre uma molécula de enzima e o suporte. A preparação desses derivados permitirá estimar a estabilidade da enzima imobilizada em virtude desse processo minimizar/eliminar efeitos como autólise e/ou presença de quaisquer agentes que possam interferir na determinação da estabilidade real da protease comercial.

4.3.3. INATIVAÇÃO TÉRMICA DE TRIPSINA E QUIMOTRIPSINA SOLÚVEIS E IMOBILIZADAS SOBRE GLIOXIL-AGAROSE

O estudo da estabilidade térmica das enzimas tripsina e quimotripsina foi desenvolvido seguindo-se uma metodologia que vem sendo há anos reportada na literatura (Guisán, 1988; Guisán *et al.*, 1991). Este método consiste basicamente em duas etapas: primeiramente, a estabilidade das enzimas solúvel e imobilizada sobre suporte com baixa ativação (que por conveniência aqui chamaremos de unipontual) é ensaiada em uma temperatura baixa, visto que nessa condição o acompanhamento da inativação irreversível dessas espécies é perfeitamente possível; a seguir, a estabilidade

dos derivados uni e multipontual é ensaiada em uma temperatura elevada, situação onde não se conseguiria acompanhar de forma confiável o decaimento da atividade da enzima em solução, mas onde este pode ser acompanhado com segurança para as enzimas imobilizadas. Deste modo, o primeiro fator de estabilização parcial (FEP) pode ser determinado através da razão entre os tempos de meia-vida ($\tau_{1/2}$) do derivado unipontual em relação à enzima solúvel (incubação em baixa temperatura) e o segundo, dividindo-se o $\tau_{1/2}$ do derivado multipontual em relação ao unipontual (incubação em temperaturas elevada). O produto desses dois fatores parciais resulta no fator de estabilização total (FET) e nos permite determinar quantas vezes o derivado multipontual é mais estável que a enzima solúvel. Resumidamente, pode-se dizer que este método consegue conjugar duas situações extremas: 1) inconveniência de ensaiar a estabilidade de enzimas imobilizadas de forma multipontual em baixas temperaturas, uma vez que este procedimento requer tempo extremamente prolongado de ensaio e 2) estimar a estabilidade de enzimas solúveis em temperaturas elevadas, condições nas quais o processo de inativação ocorre de forma muito rápida. Ou seja, seria possível, então, estimar tanto o $\tau_{1/2}$ do derivado multipontual em uma temperatura baixa quanto o $\tau_{1/2}$ da enzima solúvel em uma temperatura elevada. Vale enfatizar, porém, que este procedimento considera que o FET determinado pode ser utilizado independentemente do intervalo de temperatura no qual os ensaios para sua determinação foram realizados, ou seja, considera-se, por exemplo, que a energia vibracional das moléculas de enzima é afetada da mesma forma, independentemente da temperatura na qual esta foi incubada. Utilizando-se a metodologia aqui descrita, buscou-se determinar a estabilização alcançada pelas enzimas tripsina e quimotripsina multipontualmente imobilizadas mediante ensaios de inativação térmica a pH 8, utilizando como referência as temperaturas de 50 e 85°C. As Figuras 4.9 e 4.10 mostram os perfis de inativação térmica a 50°C, obtidos para as enzimas solúveis e derivados unipontuais, respectivamente.

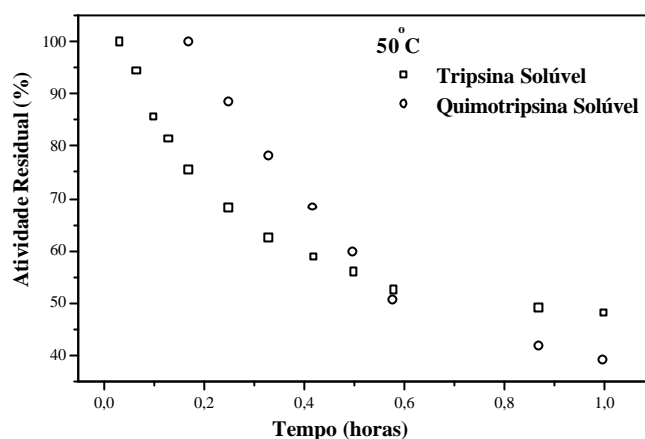


Figura 4.9: Curvas de inativação térmica para tripsina e quimotripsina solúveis. Incubação em tampão borato sódico 25mM, pH 8 e 50°C.

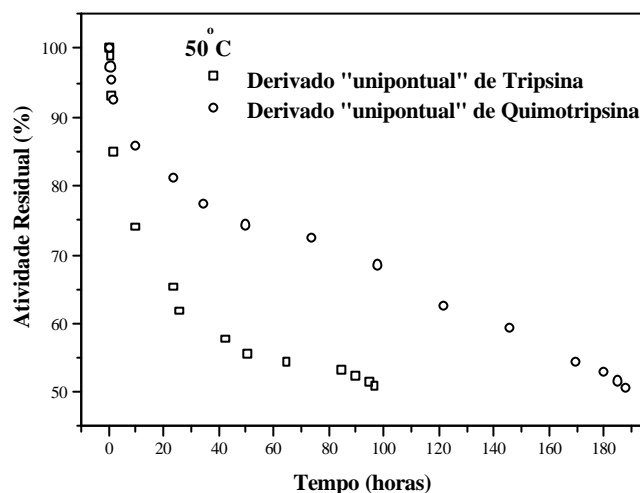


Figura 4.10: Curvas de inativação térmica para derivados unipontuais de tripsina e quimotripsina. Incubação em tampão borato sódico 25mM, pH 8 e 50°C.

A 50°C foi possível determinar o efeito estabilizador que a imobilização através de uma ou no máximo duas ligações ao suporte promoveu na estrutura da enzima imobilizada em relação à enzima solúvel. Os tempos de meia-vida determinados foram de 52 e 5820 minutos para a tripsina e 35 e 11288 minutos para a quimotripsina, espécies solúveis e derivados unipontuais, respectivamente. Ou seja, os derivados unipontuais foram 112 (tripsina) e 323 (quimotripsina) vezes mais estáveis que as enzimas em solução.

Analisando-se as Figuras 4.9 e 4.10, pode-se observar ainda que o perfil de inativação de ambas as enzimas aqui estudadas parece ser descrito por duas etapas

distintas: a primeira delas caracterizada por um decaimento exponencial e a segunda, por um decaimento linear. Este comportamento difere, por exemplo, daquele observado para a carboxipeptidase A, onde se observa que uma simples etapa de inativação (decaimento unicamente exponencial) conduz a molécula de enzima a um estado final com alguma atividade residual (Tardioli, 2003), ou ainda, daquele observado para a tripsina imobilizada sobre sepabeads, que segue puramente um decaimento exponencial de primeira ordem. Assim, o comportamento de uma enzima no processo de inativação irreversível parece depender diretamente da extensão e da intensidade do enrijecimento sofrido por esta molécula em função do protocolo de imobilização empregado.

A 85°C foram ensaiados apenas os derivados imobilizados. Neste caso, foi possível observar os efeitos produzidos pelas multiligações estabelecidas entre a enzima e suporte frente àqueles já observados quando a imobilização se deu por uma ou duas ligações covalentes ao suporte sólido. As Figuras 4.11 e 4.12 mostram os perfis de inativação térmica a 85°C, obtidos para tripsina e quimotripsina diferentemente imobilizadas, respectivamente.

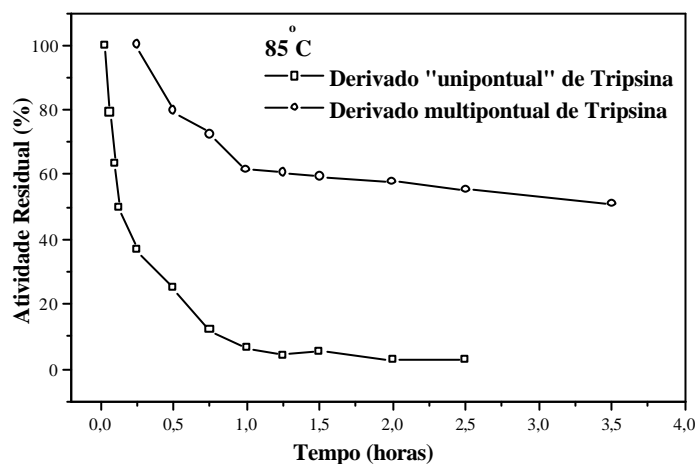


Figura 4.11: Curvas de inativação térmica obtidas a 85°C e pH 8 para derivados de tripsina preparados sobre géis glioxil-agarose com baixa e alta ativação.

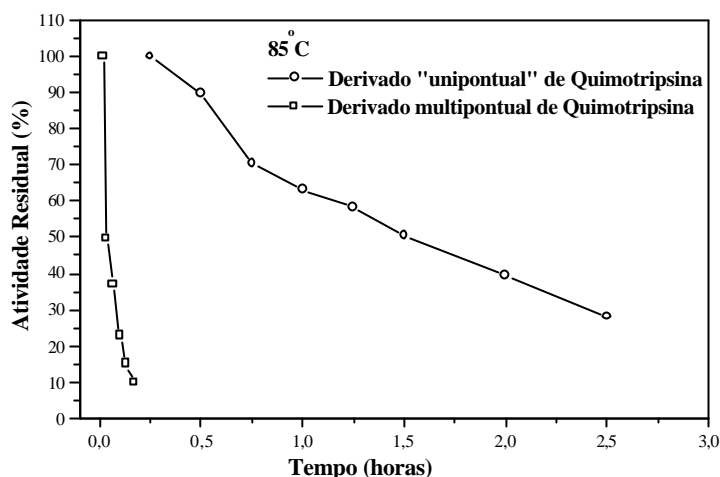


Figura 4.12: Curvas de inativação térmica obtidas a 85°C e pH 8 para derivados de quimotripsina preparados sobre géis glioxil-agarose com baixa e alta ativação.

Os tempos de meia-vida dos derivados uni e multipontuais, determinados diretamente das curvas, foram de 6 e 210 minutos para a tripsina e 2 e 90 minutos para a quimotripsina. Esses resultados mostraram que os derivados multipontuais de tripsina e quimotripsina foram 35 e 45 vezes, respectivamente, mais estáveis que os unipontuais nesta temperatura. O produto dos fatores de estabilização obtidos para cada enzima permitiu determinar quantas vezes os derivados multipontuais eram mais estáveis que as enzimas solúveis: tripsina - 3920 vezes; quimotripsina - 14535 vezes. Estes altos fatores de estabilização obtidos devem-se às multiligações estabelecidas entre os grupos ativos da enzima e do suporte em decorrência do longo período de interação a que foram submetidos. Tempos de contato prolongados foram necessários para o favorecimento de ligações adicionais entre a enzima e o suporte, pois embora as primeiras ligações ocorram de forma bastante rápida, as demais necessitam de um realinhamento adequado entre a enzima já insolubilizada e o suporte sólido, o que ocorre de forma lenta. Fatores de estabilização dessa mesma magnitude para estas duas proteases, mas em diferentes condições de imobilização, já foram anteriormente obtidos por Guisán (1988) e Guisán e colaboradores (1991).

Dois novos ensaios de estabilidade térmica foram realizados nas temperaturas de 55 e 75°C, pois aqui era de interesse avaliar o comportamento dessas enzimas em temperaturas que permitissem combinar velocidades consideráveis de reação com

elevada estabilidade enzimática, visto que tais derivados seriam posteriormente utilizados como catalisadores nas hidrólises das proteínas do soro de queijo.

As Figuras 4.13 (tripsina e quimotripsina solúveis) e 4.14 (derivados uni e multipontual de tripsina) e 4.15 (derivados uni e multipontual de quimotripsina) mostram os perfis de inativação térmica obtidos a 55°C. Para cada situação em particular, o modelo matemático representado pela Eq. 3.9 [$Y=100*(Y_0+((1-Y_0)*\exp(-X/t_1))-L_1*X)$] foi ajustado aos dados experimentais.

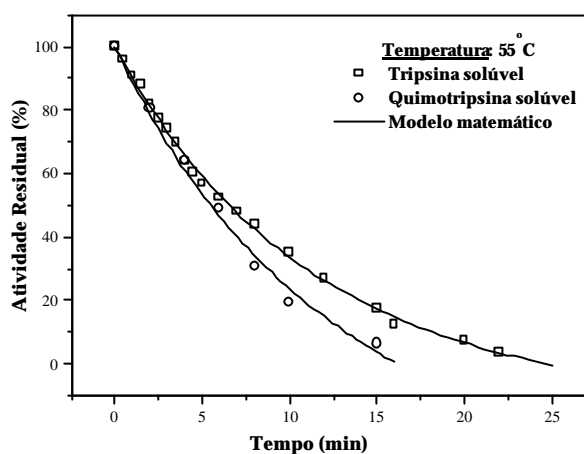


Figura 4.13: Curvas de inativação térmica a 55°C e pH 8 (tampão borato 25mM) para tripsina e quimotripsina solúveis. Ajuste de modelo matemático (—) aos dados experimentais.

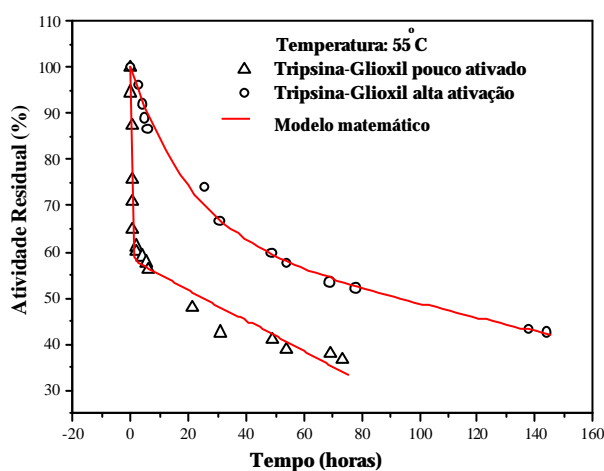


Figura 4.14: Curvas de inativação térmica a 55°C e pH 8 (tampão borato 25mM) para derivados uni e multipontual de tripsina. Ajuste de modelo matemático (—) aos dados experimentais.

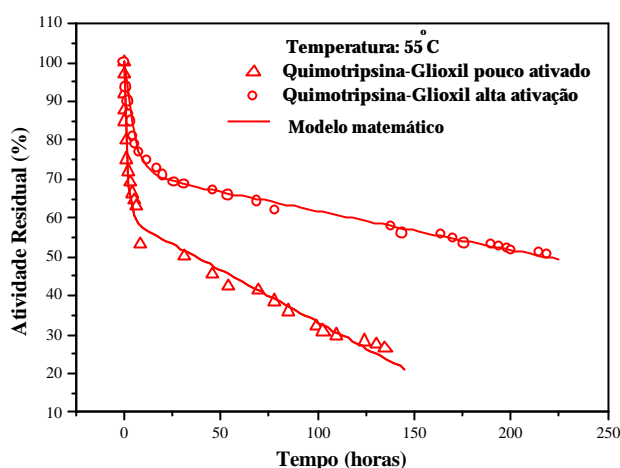


Figura 4.15: Curvas de inativação térmica a 55°C e pH 8 (tampão borato 25mM) para derivados uni e multipontual de quimotripsina. Ajuste de modelo matemático (—) aos dados experimentais.

Os parâmetros do modelo (Y_0 , t_1 e L_1) e os tempos de meia-vida obtidos da modelagem são mostrados na Tabela 4.15.

Tabela 4.15: Parâmetros do modelo matemático utilizado e tempos de meia-vida ($\tau_{1/2}$) obtidos a 55°C e pH 8 para tripsina e quimotripsina solúveis e insolubilizadas.

Enzima	$Y_0 \pm \sigma$	$t_1 \pm \sigma$	$L_1 \pm \sigma$	$\tau_{1/2}$ (horas)	Fator de Estabilização
¹ Tripsina Solúvel	0	10,0654 ± 0,2202	0,0035 ± 0,0006	0,109 (6,53min)	1
² T-G-A baixa ativação	0,5841 ± 0,0131	0,3356 ± 0,0391	0,00335 ± 0,33 x 10 ⁻³	25,09	230,2
³ T-G-A alta ativação	0,6303 ± 0,0393	20,8173 ± 3,9378	0,00146 ± 0,33 x 10 ⁻³	92,28	846,6
¹ Quimotripsina Solúvel	0	9,4893 ± 1,0809	0,0112 ± 0,0041	0,091 (5,48min)	1
⁴ Q-G-A baixa ativação	0,5999 ± 0,0164	1,6276 ± 0,2171	0,00268 ± 0,0002	37,29	409,8
⁵ Q-G-A alta ativação	0,7172 ± 0,0041	5,0373 ± 0,2264	0,001 ± 0,3 x 10 ⁻⁴	217,18	2386,6

¹Parâmetros ajustados para fornecer $\tau_{1/2}$ em minutos.

²T-G-A: derivado de tripsina preparado sobre gel glioxil-agarose com baixa ativação.

³T-G-A: derivado de tripsina preparado sobre gel glioxil-agarose com alta ativação.

⁴Q-G-A: derivado de quimotripsina preparado sobre gel glioxil-agarose com baixa ativação.

⁵Q-G-A: derivado de quimotripsina preparado sobre gel glioxil-agarose com alta ativação.

Como as enzimas, em suas três diferentes formas, foram incubadas exatamente nas mesmas condições, os fatores de estabilização apresentados na tabela acima podem ser diretamente calculados como sendo a razão entre os tempos de meia-vida dos

derivados preparados e o tempo de meia-vida da enzima solúvel. No caso dos derivados multipontualmente imobilizados também é possível se chegar exatamente aos mesmos valores multiplicando-se os fatores de estabilização parciais obtidos. Como comentado no início desta seção, a influência da temperatura na determinação dos tempos de meia-vida não pode ser negligenciada, pois mediante os dados da Tabela 4.15, incubando-se as três formas da enzima nas mesmas condições, os níveis de estabilização obtidos foram inferiores aos anteriormente determinados (3920 e 14535 vezes para tripsina e quimotripsina, respectivamente). Isso corrobora com a tese de que esta metodologia não fornece um valor absoluto para a estabilização, embora permita uma avaliação qualitativa do efeito estabilizante proporcionado pelo método de imobilização empregado.

As curvas de inativação térmica obtidas incubando-se os derivados de ambas as enzimas aqui estudadas a 75°C são mostradas nas Figuras 4.16 e 4.17 e os parâmetros do modelo (Y_0 , t_1 e L_1) e os tempos de meia-vida obtidos da modelagem apresentados na Tabela 4.16.

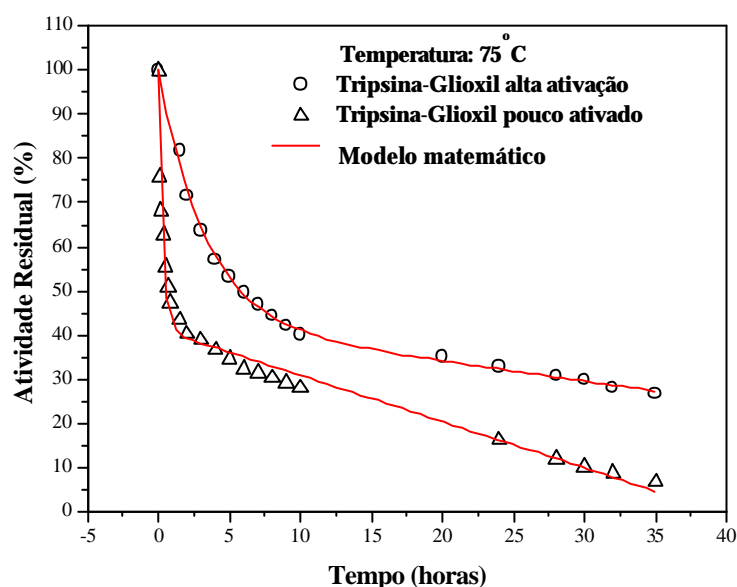


Figura 4.16: Curvas de inativação térmica a 75°C e pH 8 (tampão borato 25mM) para derivados uni e multipontual de tripsina. Ajuste de modelo matemático (—) aos dados experimentais.

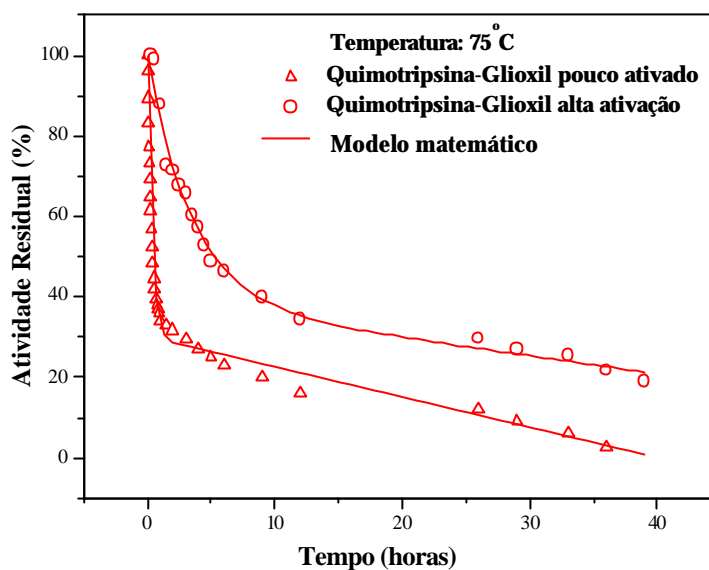


Figura 4.17: Curvas de inativação térmica a 75°C e pH 8 (tampão borato 25mM) para derivados uni e multipontual de quimotripsina. Ajuste de modelo matemático (—) aos dados experimentais.

Tabela 4.16: Parâmetros do modelo matemático utilizado para ajuste dos dados experimentais e tempos de meia-vida ($t_{1/2}$) a 75°C e pH 8 para tripsina e quimotripsina imobilizadas sobre suportes com baixa e alta densidade de grupos aldeído em sua superfície.

Enzima	$Y_0 \pm \sigma$	$t_1 \pm \sigma$	$L_1 \pm \sigma$	$\tau_{1/2}$ (horas)	Fator de Estabilização
Tripsina-Glioxil baixa ativação	$0,4129 \pm$ $0,0135$	$0,2908 \pm$ $0,0303$	$0,0105 \pm$ $0,076 \times 10^{-3}$	0,54	1
Tripsina-Glioxil alta ativação	$0,4286 \pm$ $0,0151$	$3,2660 \pm$ $0,1740$	$0,0044 \pm$ $0,57 \times 10^{-3}$	5,79	10,7
Quimotripsina- Glioxil baixa ativação	$0,3008 \pm$ $0,0073$	$0,3390 \pm$ $0,0105$	$0,0075 \pm$ $0,41 \times 10^{-3}$	0,42	1
Quimotripsina- Glioxil alta ativação	$0,3866 \pm$ $0,0437$	$3,5135 \pm$ $0,4202$	$0,0044 \pm$ $0,0014$	5,27	12,6

Os derivados multipontuais preparados mostraram-se bastante estáveis mesmo em uma temperatura que já não pode ser classificada como branda, 75°C. A enzima solúvel não foi aqui ensaiada em virtude de sua rápida desativação nessa condição. Analisando-se os dados de inativação térmica obtidos, pode-se concluir que a forma mais adequada de se determinar a estabilização de um derivado multipontual em relação à enzima solúvel é incubando-se, sempre que possível, todas as espécies exatamente nas

mesmas condições. Assim, garante-se que efeitos similares serão sofridos tanto pela enzima solúvel como pela imobilizada.

4.3.4. INATIVAÇÃO A pH ALCALINO PARA TRIPSINA E QUIMOTRIPSINA SOLÚVEIS E IMOBILIZADAS SOBRE GLIOXIL-AGAROSE

A estabilidade a pH alcalino (pH 11) das enzimas solúveis e imobilizadas foi investigada incubando-se as soluções e suspensões em tampão bicarbonato sódico 50mM, pH 11 e 25°C. Os perfis de inativação obtidos estão apresentados nas Figuras 4.18 e 4.19 para as enzimas solúveis e derivados imobilizados, respectivamente. Os parâmetros do modelo (Y_0 , t_1 e L_1) e os tempos de meia-vida obtidos da modelagem são mostrados na Tabela 4.17.

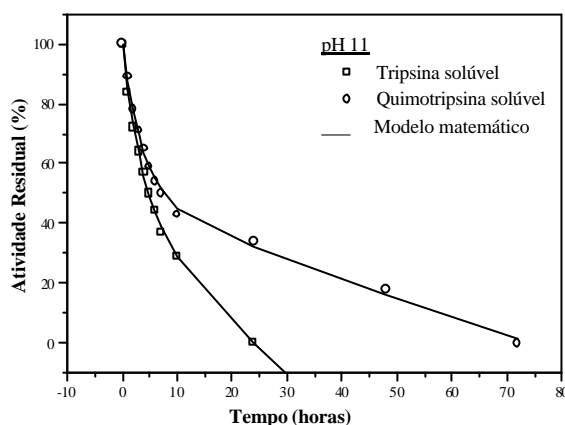


Figura 4.18: Perfis de inativação a pH alcalino (pH 11) para tripsina e quimotripsina solúveis. Ajuste de modelo matemático (—) aos dados experimentais. Condições experimentais: tampão bicarbonato sódico 50mM e 25°C.

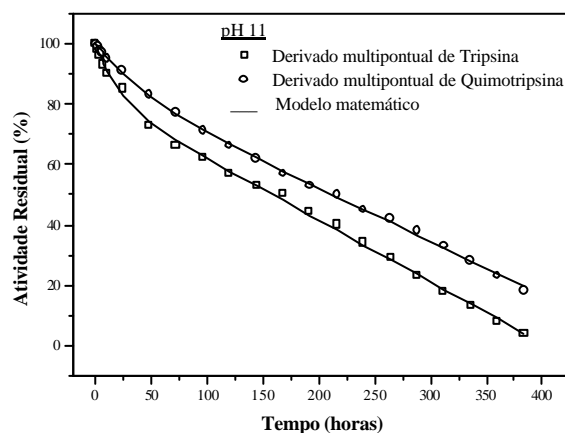


Figura 4.19: Perfis de inativação a pH alcalino (pH 11) para derivados multipontuais de tripsina e quimotripsina. Ajuste de modelo matemático (—) aos dados experimentais. Condições experimentais: tampão bicarbonato sódico 50mM e 25°C.

Tabela 4.17: Parâmetros do modelo matemático utilizado e tempos de meia-vida ($t_{1/2}$) a 25°C e pH 11 para tripsina e quimotripsina solúveis e insolubilizadas.

Enzima	$Y_0 \pm \sigma$	$t_1 \pm \sigma$	$L_1 \pm \sigma$	$\tau_{1/2}$ (horas)	Fator de Estabilização
Tripsina Solúvel	0,4115 ± 0,0396	3,9449 ± 0,3755	0,0154 ± 0,0018	5	1
Tripsina-Glioxil alta ativação	0,8224 ± 0,0084	19,4824 ± 2,7529	0,00192 ± 3 x 10 ⁻⁵	168	33,6
Quimotripsina Solúvel	0,4719 ± 0,0183	3,9501 ± 0,2742	0,00881 ± 0,0004	7	1
Quimotripsina- Glioxil alta ativação	0,8730 ± 0,0095	40,9264 ± 6,5858	0,00173 ± 3 x 10 ⁻⁵	216	30,9

Os resultados apresentados na Tabela 4.17 mostram que os derivados preparados também são bastante estáveis em meio fortemente alcalino (pH 11). Esses dados confirmam os excelentes níveis de estabilização dos derivados preparados anteriormente alcançados nos ensaios de inativação térmica e sugerem a possibilidade de utilização de tais espécies em condições drásticas de reação.

4.3.5. HIDRÓLISE ÁCIDA DE TRIPSINA E QUIMOTRIPSINA SOLÚVEIS E IMOBILIZADAS SOBRE GLIOXIL-AGAROSE

Os elevados níveis de estabilização (térmica e alcalina) alcançados pelos derivados de tripsina e quimotripsina sugerem o estabelecimento de múltiplas ligações entre as enzimas e o suporte. Visando-se confirmar esta indicação, hidrólises ácidas das enzimas solúveis e dos derivados foram realizadas e o conteúdo de resíduos de lisina dessas espécies, após este procedimento, determinado através de análise de aminoácidos. Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 4.18.

Tabela 4.18: Concentrações obtidas de alguns aminoácidos após hidrólise ácida de tripsina e quimotripsina solúveis e imobilizadas. Condições experimentais: HCl 6,8N, 105°C e 24horas; análise de aminoácidos por troca iônica (HPLC) com derivatização pós-coluna com OPA.

Aminoácido	Concentração (g/mL) (Valores médios de experimentos realizados em duplicata)			
	Tripsina Solúvel	Tripsina Imobilizada	Quimotripsina Solúvel	Quimotripsina Imobilizada
Glicina (Gly)	7,30 x 10 ⁻⁵	7,29 x 10 ⁻⁵	6,22 x 10 ⁻⁵	6,16 x 10 ⁻⁵
Alanina (Ala)	4,18 x 10 ⁻⁵	4,18 x 10 ⁻⁵	5,83 x 10 ⁻⁵	5,64 x 10 ⁻⁵
Valina (Val)	6,69 x 10 ⁻⁵	6,71 x 10 ⁻⁵	8,57 x 10 ⁻⁶	8,38 x 10 ⁻⁶
Fenilalanina (Phe)	1,99 x 10 ⁻⁵	1,97 x 10 ⁻⁵	3,80 x 10 ⁻⁵	3,76 x 10 ⁻⁵
Lisina (Lys)	5,08 x 10⁻⁵	1,79 x 10⁻⁵	4,92 x 10⁻⁵	1,37 x 10⁻⁵

Os resultados apresentados na tabela acima mostraram que o conteúdo de resíduos de lisina nos derivados imobilizados, após hidrólise ácida, era, como esperado, inferior àquele obtido após hidrólise das enzimas solúveis. Esta diferença se deve ao fato das ligações covalentes estabelecidas entre resíduos de lisina da enzima e os aldeídos do suporte sólido não serem hidrolisadas nestas condições. Daí os resíduos que se encontram ligados ao suporte não serem quantificados nesta análise. 64,76% do total de lisinas presente na tripsina e 72,15% do total presente na quimotripsina estão, de fato, envolvidas nas multiligações enzima-suporte. Quanto aos demais aminoácidos, para ambos os casos, pôde-se observar que praticamente não houve variação da concentração nas enzimas livres e imobilizadas, o que também já era esperado. Ensaio similares foram anteriormente desenvolvidos para a carboxipeptidase A (Tardioli, 2003) e, em tais experimentos, verificou-se o comprometimento de apenas 30% do conteúdo de lisinas nas multiligações enzima-suporte. Este valor concorda com o nível restrito de estabilização desta protease frente aos obtidos neste trabalho para tripsina e quimotripsina.

4.3.6. INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA E DO pH NA HIDRÓLISE DOS SUBSTRATOS SINTÉTICOS CATALISADA POR DERIVADOS PREPARADOS SOBRE GLIOXIL-AGAROSE

A influência da temperatura e do pH na atividade de hidrólise foi investigada hidrolisando-se os substratos sintéticos BApNA e BTEE, específicos para as proteases tripsina e quimotripsina, respectivamente, em espectrofotômetro (λ de 405nm para tripsina e 258nm para quimotripsina), para enzimas solúveis e imobilizadas. A faixa de temperatura investigada foi de 25 a 90°C para a tripsina e de 30 a 90°C para a quimotripsina. As Figuras 4.20 e 4.21 mostram os perfis temperatura/atividade obtidos para ambas as enzimas aqui estudadas.

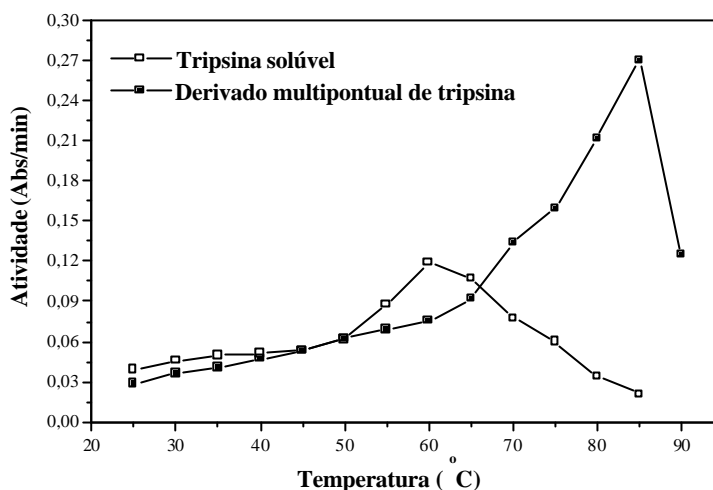


Figura 4.20: Influência da temperatura na determinação da maior atividade de hidrólise do substrato sintético N-Benzoil-L-Arginina-p-Nitroanilida. Reações catalisadas por tripsina solúvel e imobilizada. Experimentos realizados por colorimetria em espectrofotômetro a 405nm e pH 8.

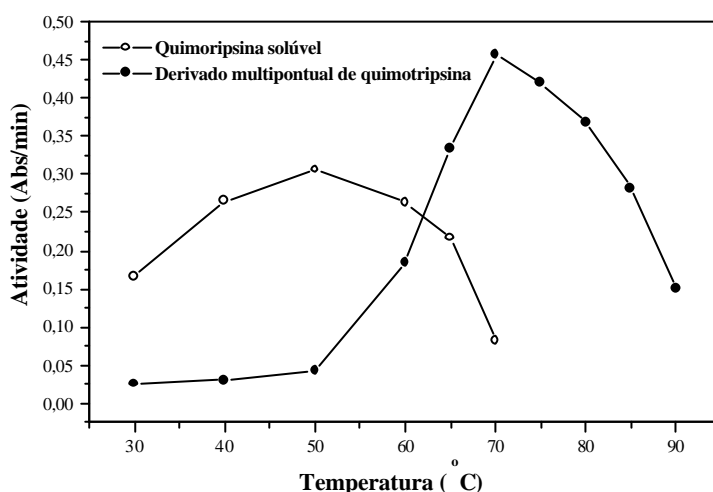


Figura 4.21: Influência da temperatura na determinação da maior atividade de hidrólise do substrato sintético N-Benzoil-L-Tirosina-Etil-Éster. Reações catalisadas por quimotripsina solúvel e imobilizada. Experimentos realizados por colorimetria em espectrofotômetro a 258nm e pH 8.

Como pode ser observado analisando-se as Figuras 4.20 e 4.21, as temperaturas que conduziram à maior atividade de hidrólise foram 60 e 85°C para tripsina solúvel e imobilizada, respectivamente, e 50 e 70°C para quimotripsina solúvel e imobilizada, respectivamente. Apesar de se ter obtido temperaturas consideravelmente altas para as maiores atividades de hidrólise utilizando-se proteases imobilizadas, deve-se ter em

mente que uma solução de compromisso entre atividade máxima e estabilidade enzimática a altas temperaturas deve ser estabelecida.

A determinação do pH no qual se obtém maior atividade de hidrólise para as enzimas tripsina e quimotripsina solúveis e imobilizadas foi realizada seguindo-se metodologia similar àquela empregada para determinação da influência da temperatura. Nesses ensaios, variou-se o pH de 6 a 11,5, mantendo-se temperatura constante de 25°C. As Figuras 4.22 e 4.23 mostram os perfis pH/atividade obtidos para tripsina e quimotripsina solúveis e imobilizadas.

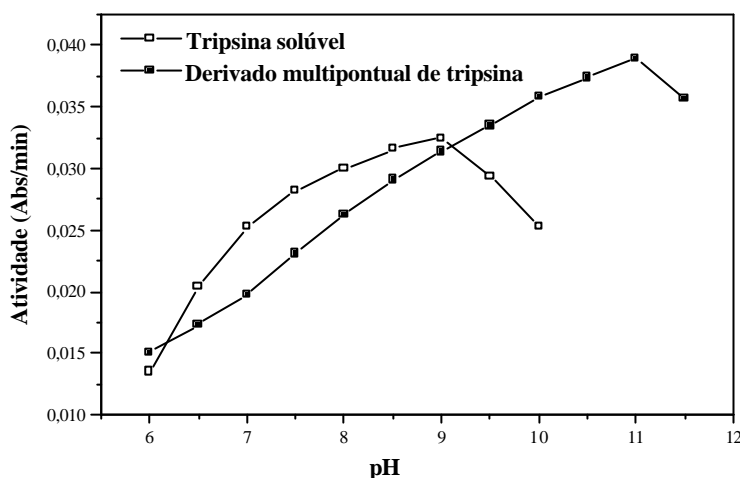


Figura 4.22: Influência do pH na determinação da maior atividade de hidrólise do substrato sintético N-Benzoil-L-Arginina-p-Nitroanilida. Reações catalisadas por tripsina solúvel e imobilizada. Experimentos realizados por colorimetria em espectrofotômetro a 405nm e 25°C.

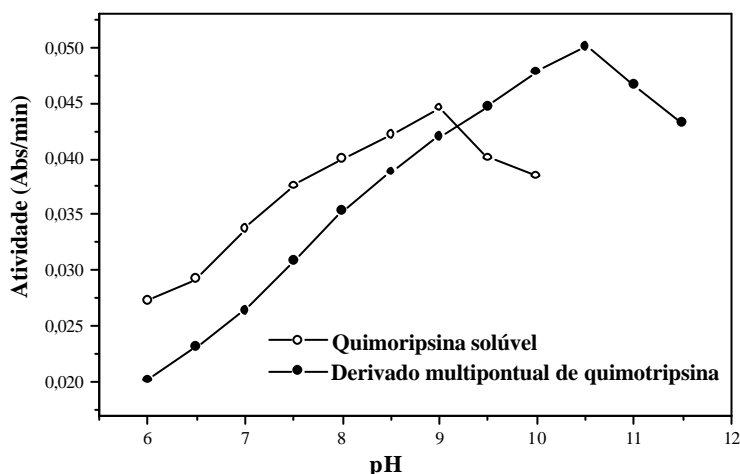


Figura 4.23: Influência do pH na determinação da maior atividade de hidrólise do substrato sintético N-Benzoil-L-Tirosina-Etil-Éster. Reações catalisadas por quimotripsina solúvel e imobilizada. Experimentos realizados por colorimetria em espectrofotômetro a 258nm e 25°C.

Com base nas Figuras 4.22 e 4.23, observa-se que o pH 9 foi aquele que conduziu à maior atividade enzimática utilizando-se proteases solúveis. Estes resultados estão em concordância com os obtidos por Custódio (2001) que trabalhou com hidrólise das proteínas do soro de leite catalisada por tripsina e quimotripsina exclusivamente na forma livre. No caso das enzimas imobilizadas, os pHs que resultaram em maior atividade de hidrólise foram 11 e 10,5, para tripsina e quimotripsina, respectivamente. Embora estes valores também tenham sido maiores do que os observados para as proteases solúveis, similarmente ao que ocorreu com a temperatura, optou-se por se trabalhar em condições mais suaves de reação, temperatura de 55°C e pH 8, pois, nestas condições, obedece-se convenientemente aos critérios de velocidade de reação e estabilidade, necessários ao perfeito desempenho das enzimas por períodos prolongados de tempo, requeridos em condições reais de processo. Estes dados reforçam as vantagens de se trabalhar com enzimas imobilizadas, uma vez que o uso de altas temperaturas é permitido, evitando-se contaminações no meio reacional e reduzindo-se custos de operação.

4.4. HIDRÓLISE DAS PROTEÍNAS DO SORO LÁTICO

4.4.1. ENSAIOS INICIAIS DE HIDRÓLISE

4.4.1.1. TRIPSINA E QUIMOTRIPSINA LIVRES E IMOBILIZADAS, DIFERENTES TEMPERATURAS E RELAÇÕES E/S

Após preparação de derivados imobilizados/estabilizados de tripsina e quimotripsina era conveniente avaliar o desempenho desses derivados na hidrólise das proteínas do soro de queijo e compará-lo ao das proteases solúveis. Estes ensaios foram desenvolvidos em pHstato e os graus de hidrólise calculados segundo Adler-Nissen, 1986 - Eq. 3.8. Três diferentes relações enzima-substrato ($E/S_{\text{mássico}}$ de 1/20, 1/50 e 1/100), duas temperaturas (55 e 65°C) e diferentes tempos de reação foram empregados.

Inicialmente, soro de queijo 10g/L foi hidrolisado nas seguintes condições: 55°C, pH 8, $E/S_{\text{mássico}}$ de 1/100 e 4 horas de reação. Os resultados obtidos encontram-se na Tabela 4.19, apresentada a seguir.

Tabela 4.19: Graus de hidrólise obtidos ao longo de 4 horas de reação usando tripsina e quimotripsina solúveis e imobilizadas: soro 10g/L, 55°C, E/S_{mássico} de 1/100 e pH 8.

Tempo (horas)	¹ Tripsina Solúvel	Tripsina Imobilizada	¹ Quimotripsina Solúvel	Quimotripsina Imobilizada
	Grau de Hidrólise (%)			
1	7,51	2,12 (28,23%)	5,53	4,08 (73,78%)
2	7,91	3,08 (38,94%)	6,51	5,85 (89,86%)
3	8,18	3,81 (46,58%)	7,15	7,00 (97,90%)
4	8,43	4,39 (52,07%)	7,65	7,83 (~100%)

¹Os graus de hidrólise obtidos com as enzimas solúveis foram tomados como referência para efeito de comparação.

Analisando-se os dados apresentados na Tabela 4.19, percebe-se que no decorrer das hidrólises catalisadas pelas enzimas imobilizadas ocorrem atrasos em relação ao desempenho das enzimas na forma solúvel, sendo este efeito mais significativo no período inicial da reação, quando o substrato ainda está com massa molecular elevada. Na medida em que a reação avança diminui a massa molecular do substrato, com o sistema sendo controlado cineticamente. A velocidade de hidrólise catalisada por tripsina solúvel é maior do que a catalisada pela quimotripsina (maior grau de hidrólise no mesmo tempo de reação), sendo, portanto, mais afetada pelo transporte de massa, com menores relações entre as velocidades no sistema imobilizado e no sistema livre. Dessa forma, observa-se, para a quimotripsina, que o efeito difusional é superado atingindo-se graus de hidrólise similares a partir da terceira hora de reação. Já para tripsina, embora a diferença entre o desempenho da enzima imobilizada em relação ao da enzima livre diminua com o avanço da reação, ele ainda permanece bem inferior ao da enzima livre. É possível que no caso da tripsina também estejam ocorrendo efeitos estéricos, com orientação desfavorável do sítio ativo da enzima após imobilização. Haveria assim, trechos de proteína inacessíveis a um grande número de moléculas de enzima imobilizada, o que atrasaria ainda mais o sistema imobilizado, pois a concentração real de enzima imobilizada disponível seria menor que a existente no sistema livre. Como esses experimentos mostraram que as condições empregadas não conduziram a graus de hidrólise similares aos obtidos com a enzima livre empregando-se tempo de reação igual ou inferior a quatro horas, optou-se, aqui, por se promover um aumento na concentração enzimática no meio reacional. Com isso, eram esperados aumentos nas velocidades de reação e obtenção de graus de hidrólise semelhantes para sistemas livre e imobilizado. Os resultados encontram-se na Tabela 4.20.

Tabela 4.20: Graus de hidrólise obtidos ao longo de reações catalisadas por tripsina e quimotripsina após aumento da carga enzimática no meio reacional ($E/S_{\text{mássico}}$ de 1/100 para 1/50): soro 10g/L, 55°C e pH 8.

Tempo (horas)	Tripsina Solúvel	Tripsina Imobilizada	Quimotripsina Solúvel	Quimotripsina Imobilizada
	Grau de Hidrólise (%)			
1	9,41	3,27 (34,75%)	7,08	5,02 (70,90%)
2	10,68	4,50 (42,13%)	7,90	6,82 (86,33%)
3	11,56	5,38 (46,54%)	8,43	7,94 (94,19%)
4	12,18	6,13 (50,33%)	8,84	8,72 (98,64%)

¹Os graus de hidrólise obtidos com as enzimas solúveis foram tomados como referência para efeito de comparação.

Os resultados obtidos para a quimotripsina após aumento da concentração enzimática (dobro de enzima), confirmaram os resultados anteriores mostrando que o sistema deixou de ser limitado pelo transporte de massa à medida que ocorreu diminuição da massa molecular do substrato e, como consequência, o sistema imobilizado atingiu conversões semelhantes ao sistema livre. Para tripsina, pode-se observar que o sistema livre alcançou grau máximo de hidrólise (GH_T em torno de 12% - Galvão *et al.*, 2001) nas novas condições empregadas. Contudo, para o sistema imobilizado, um significativo atraso ainda podia ser observado. Buscando-se atingir o mesmo grau de hidrólise com ambas as formas de tripsina, aumentou-se simultaneamente a concentração de enzima no sistema imobilizado e a temperatura do meio. Combinando-se estes dois efeitos, esperava-se que o grau de hidrólise desejado (~12%) fosse atingido. Os resultados obtidos são mostrados na Tabela 4.21.

Tabela 4.21: Graus de hidrólise obtidos com tripsina nas seguintes condições de operação: 55°C e $E/S_{\text{mássico}}$ de 1/50; 55°C e $E/S_{\text{mássico}}$ de 1/20 (aumento da concentração enzimática) e 65°C e $E/S_{\text{mássico}}$ de 1/20 (aumento simultâneo da concentração enzimática e da temperatura do sistema).

Tempo (horas)	Tripsina Solúvel	Tripsina Imobilizada		
	T=55°C $E/S_{\text{mássico}}=1/50$	T=55°C $E/S_{\text{mássico}}=1/50$	T=55°C $E/S_{\text{mássico}}=1/20$	T=65°C $E/S_{\text{mássico}}=1/20$
	Grau de Hidrólise (%)			
1	9,41	3,27	5,39	8,50
1,5	-	3,94	6,77	10,60
2	10,68	4,50	8,14	12,14
3	11,56	5,38	10,95	-
3,42	-	5,71	12,11	-
4	12,18	6,13	-	-

Obs: Experimentos realizados com soro de queijo 10g/L.

Os resultados apresentados na Tabela 4.21 mostraram que se utilizando relação enzima/substrato de 1/20, o grau de hidrólise atingido com a enzima livre é igualmente obtido após aproximadamente 3,5 horas de reação com a enzima imobilizada. Um aumento de 10°C na temperatura, mantendo-se a relação E/S_{mássico} de 1/20, tornou finalmente o sistema imobilizado mais rápido que o livre. Uma vez que a enzima imobilizada é reutilizável e altamente estável operacionalmente, tanto o aumento da temperatura de operação quanto da concentração de enzima são ações economicamente viáveis para se atingir conversões do sistema imobilizado semelhantes ou até mesmo superiores ao do sistema livre.

4.4.2. HIDRÓLISES SEQÜENCIAIS COM TRIPSINA E QUIMOTRIPSINA IMOBILIZADAS

Neste item serão apresentados e discutidos os resultados obtidos nos ensaios de hidrólise seqüencial das proteínas do soro de queijo catalisada pelas enzimas tripsina e quimotripsina imobilizadas sobre gel glioxil-agarose, visando-se investigar quais condições operacionais forneceriam o melhor substrato para a ação subsequente da carboxipeptidase A, ou seja, uma mistura de oligopeptídeos com o maior número possível de resíduos hidrofóbicos na posição carboxi-terminal. Assim, a hidrólise inicial com tripsina deveria ser suficiente para promover a abertura da estrutura das proteínas de interesse (que são globulares) de modo a disponibilizar todas as ligações peptídicas contendo aminoácidos hidrofóbicos, principalmente a fenilalanina (Phe), no lado carboxílico da ligação. A hidrólise posterior com quimotripsina disponibilizaria fenilalanina e demais aminoácidos hidrofóbicos também como carboxílicos terminais, que são os substratos específicos para a terceira etapa de hidrólise com CPA. Há que se recordar, porém, que a tripsina e a quimotripsina são endopeptidases, enquanto a carboxipeptidase A é uma exopeptidase. O grau de hidrólise ideal com uma e outra protease deverá, portanto, ser uma solução de compromisso entre a disponibilização do máximo número possível de resíduos hidrofóbicos, em especial a fenilalanina, para posterior ação da carboxipeptidase A, com menor redução possível no tamanho dos oligopeptídeos gerados. Essa última condição é importante para facilitar a posterior separação da fenilalanina por ultrafiltração, após o que os oligopeptídeos serão submetidos à hidrólise final com uma endopeptidase de baixa especificidade (Alcalase[®]) visando obtenção do hidrolisado protéico constituído de pequenos peptídeos

e livre de fenilalanina. Vale ressaltar que, neste trabalho, a etapa de hidrólise com a carboxipeptidase A representou apenas um método analítico, utilizado como parâmetro para avaliação da eficiência das hidrólises seqüenciais com tripsina e quimotripsina.

Um cálculo teórico do número de resíduos de fenilalanina e demais aminoácidos presentes nas proteínas do soro de queijo pode ser obtido a partir do conhecimento das estruturas primárias das principais proteínas do soro. São valores aproximados, contudo, pois a composição do soro varia com sua procedência e, aqui, não estão sendo consideradas todas as proteínas presentes, tais como imunoglobulinas e peptonas. Apesar disso, esses dados são interessantes parâmetros para acompanhamento da eficiência da hidrólise. Após cada etapa de hidrólise, os hidrolisados obtidos eram submetidos à análise de peptídeos (para determinação da distribuição de massa molecular dos oligopeptídeos resultantes) e aminoácidos (para se determinar a possível presença de aminoácidos livres (indesejados) após ação individual de cada protease). Embora a presença de aminoácidos não fosse esperada, uma vez que o substrato estava sendo submetido à ação de endoproteases específicas, era importante se controlar essa variável. O conteúdo de aminoácidos liberado foi calculado como porcentagem em relação ao valor teórico de cada aminoácido existente no soro de queijo, segundo Adler-Nissen (1986).

4.4.2.1. PRIMEIRA BATELADA DE HIDRÓLISES SEQÜENCIAIS

Inicialmente foram realizados ensaios de hidrólise seqüencial de soro 10g/L com tripsina (55°C, pH 8, relação E/S_{mássico} de 1/50 e tempos de reação para se atingir graus de hidrólise de 0,5; 1; 2; 3 e 5%), quimotripsina (55°C, pH 8, relação E/S_{mássico} de 1/50 e 4 horas de reação) e carboxipeptidase A (45°C, pH 7, 50U_{H-PHE}/gProteína e 1 ou 3 horas de reação). A Tabela 4.22 mostra os graus de hidrólise atingidos nas etapas desenvolvidas com tripsina e quimotripsina, bem como o grau de hidrólise total após ação seqüencial dessas duas enzimas. Amostras de todos os hidrolisados seqüenciais obtidos foram analisadas quanto ao conteúdo de aminoácidos liberados no meio reacional. A Tabela 4.23 mostra os dados de liberação de Phe, nosso aminoácido de interesse, após cada etapa de hidrólise realizada.

Tabela 4.22: Graus de hidrólise obtidos após cada etapa realizada e grau de hidrólise total após ação seqüencial de tripsina e quimotripsina imobilizadas. Condições operacionais: soro 10g/L, 55°C, pH 8 e E/S_{mássico} de 1/50.

Hidrólise inicial com tripsina	Hidrólise seqüencial com quimotripsina	³ GH _{Total} (%)
¹ GH _T (%)	² GH _Q (%)	
0,57	8,24	8,81
1,25	4,22	5,47
2,09	5,02	7,11
3,21	5,55	8,76
5,06	4,13	9,19

^{1,2}Graus de hidrólise atingidos com tripsina e quimotripsina, respectivamente.

³Grau de hidrólise atingido após ação seqüencial de tripsina e quimotripsina (GH_T + GH_Q).

Tabela 4.23: Porcentagem de Phe liberada após ação seqüencial de tripsina (Novo Nordisk), quimotripsina (Sigma) e CPA. Condições operacionais nas etapas com tripsina e quimotripsina: soro 10g/L, 55°C, pH 8 e E/S_{mássico} de 1/50. Condições operacionais na etapa com CPA: 45°C, pH 7 e carga enzimática de 50U_{H-PHE}/gProteína.

	Ensaio	[*] GH _{Total} (%)	T _{Reação} com CPA	Liberação de Phe (%)
Ação Seqüencial: Tripsina (T) + Quimotripsina (Q) + CPA	1	8,81	1 hora	(T) - 0,39 (Q) - 43,06 CPA - 46,07
	2	5,47		(T) - 0 (Q) - 28,8 CPA - 40,36
	3	7,11		(T) - 0 (Q) - 2 CPA - 39,01
	4	8,76		(T) - 2,2 (Q) - 12,34 CPA - 64,01
	5	9,19	3 horas	(T) - 22,61 (Q) - 43,42 CPA - 85,93

*Grau de hidrólise atingido após ação seqüencial de tripsina e quimotripsina.

Os resultados obtidos mostraram que a ação da tripsina surpreendentemente já conduzia a grande liberação de aminoácidos hidrofóbicos, inesperados já que se trata de uma endoprotease e com especificidade para resíduos altamente polares (lisina e arginina). Porém, a enzima doada pela Novo Nordisk, segundo manual informativo fornecido juntamente com o produto, contém traços de outras enzimas, inclusive quimotripsina e exoproteases. Assim, além dos objetivos anteriormente colocados, a hidrólise seqüencial deverá também minimizar, se possível, essa ação indesejada da

tripsina utilizada, pois a separação da Phe de um meio rico em aminoácidos livres é difícil e implica perda significativa de substrato.

Os dados obtidos da análise de aminoácidos mostraram, principalmente, liberação de leucina, tirosina, fenilalanina, histidina e arginina e, independentemente do grau de hidrólise final atingido, o aminoácido mais liberado foi histidina. Para a Phe, a maior porcentagem de liberação foi atingida no ensaio 5 (85,93%). No entanto, este resultado não parece adequado, pois embora se tenha alcançado uma liberação significativa do aminoácido de interesse nestas condições, aproximadamente 43% do valor final alcançado já havia sido obtido após hidrólise com quimotripsina, o que representa um problema visto que esta enzima está executando uma tarefa que não lhe é devida e que juntamente com a liberação da Phe outros aminoácidos são igualmente liberados após sua ação.

4.4.2.2. SEGUNDA BATELADA DE HIDRÓLISES SEQUENCIAIS

Com base nos dados anteriormente obtidos, nova estratégia experimental foi montada. Nesses ensaios, visava-se ampliar a faixa de graus de hidrólise com tripsina, submetendo-se, a seguir, os hidrolisados resultantes a hidrólises máximas com quimotripsina e, finalmente, a 8 horas de reação com CPA. Ressalte-se que hidrólise máxima com quimotripsina significa não se observar qualquer adição de NaOH pelo pHstato para manutenção do pH no valor previamente programado (*set point* - pH 8). Assim, o primeiro experimento realizado teve por objetivo determinar o máximo grau de hidrólise possível de se alcançar com tripsina; os demais, de atingir porcentagens deste valor máximo determinado. A Tabela 4.24 mostra os graus de hidrólise atingidos com tripsina.

Tabela 4.24: Graus de hidrólises propostos e atingidos após ação da tripsina sobre as proteínas intactas do soro de queijo (10g/L, pH 8, 55°C, E/S_{mássico} de 1/25 e NaOH 0,1M).

Hidrólises com tripsina		
Ensaio	GH _{Proposto} (%)	GH _{Atingido} (%)
1	Máximo (máx)	13,6
2	70% do máx	9,52
3	65% do máx	8,84
4	50% do máx	6,80
5	30% do máx	4,08
6	20% do máx	2,72
7	15% do máx	2,04
8	10% do máx	1,36
9	6% do máx	0,82

Após cada experimento, uma alíquota do hidrolisado obtido foi coletada e analisada quanto ao conteúdo de aminoácidos liberados. Já nesta etapa inicial de hidrólise se observou presença de tirosina (Tyr), fenilalanina (Phe), histidina (His) e triptofano (Trp) como aminoácidos livres.

A etapa seqüencial de hidrólise com quimotripsina foi desenvolvida a 55°C, pH 8, E/S_{mássico} de 1/20, NaOH 100mM e tempo reacional suficiente para que não houvesse mais adição de NaOH pelo pHstato, evidenciando que o processo hidrolítico havia cessado. Obtido os hidrolisados seqüenciais, amostras foram igualmente analisadas para determinação/quantificação do teor de aminoácidos. Após esta etapa também foi possível detectar presença de aminoácidos livres.

A etapa final de hidrólise com CPA foi realizada a 45°C, pH 7, 8 horas e carga enzimática de 50U_{H-PHE}/gProteína. A Tabela 4.25 mostra o conteúdo de aminoácidos liberados após ação seqüencial das três enzimas aqui utilizadas.

Tabela 4.25: Graus de hidrólise obtidos após ação seqüencial de tripsina (GH_T - Condições: 55°C, pH 8, E/S_{mássico} de 1/25 e NaOH 0,1M), quimotripsina (GH_Q - Condições: 55°C, pH 8, E/S_{mássico} de 1/20 e NaOH 0,1M) e CPA (45°C, pH 7, 50U/gProteína e 8 horas de reação) e concentração final dos hidrolisados resultantes. Conteúdo de aminoácidos liberados após ação seqüencial das três enzimas utilizadas.

Ensaio	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Condição Experimental	GH _T =0,82% GH _Q =9,92% CPA=8h	GH _T =1,36% GH _Q =9,05% CPA=8h	GH _T =2,4% GH _Q =8,27% CPA=8h	GH _T =2,72% GH _Q =8,16% CPA=8h	GH _T =4,08% GH _Q =7,97% CPA=8h	GH _T =6,80% GH _Q =6,10% CPA=8h	GH _T =8,84% GH _Q =5,03% CPA=8h	GH _T =9,52% GH _Q =4,69% CPA=8h	GH _T =13,60% GH _Q =4,07% CPA=8h
C _{final substrato} (g/l)	7,27	7,41	7,89	7,14	7,21	7,69	8,01	7,48	7,82
Aminoácido Liberado	Porcentagem de Liberação de Aminoácidos (%)								
Asp	7,06	5,2	5,73	6,9	6,1	7,3	9,1	11,3	14,3
Asn/Thr	6,69	4,31	6,2	4,2	3,8	7,7	8	10,2	6
Ser	3,36	3,8	4,72	4,02	4	5	14,4	3,4	1,6
Glu	3,87	5,45	5,94	3,6	4	3,7	4,2	32,2	44,6
Gly	18,54	22,9	46,17	18	18,3	20,5	34,2	49,2	56,6
Ala	7,1	4,19	16,98	-	-	-	-	70,6	87,6
Val	20,89	22,9	21,2	13,9	13,3	-	-	44,1	65,6
Met	20,97	24,93	26,5	19,7	17,1	30,2	35,4	42,2	58,2
Ileu	9,51	14,54	16,7	9,3	7,7	16,1	15,2	37,6	60,1
Leu	29,68	29	27,4	28,3	25,7	25,6	25,5	39,6	64,5
Tyr	71,67	52,32	58,6	55	59,2	55,5	56,8	42,4	68,1
Phe	40,56	35,3	40,1	40,7	43,7	51,2	48,1	38,7	57,1
His	23,84	18,96	19,3	13,3	18,8	43,7	49,5	27,4	54,4
Trp	15,54	18,61	14,2	23,8	28	84	102	22,1	27,5
Lys	4,35	19,71	19,7	3	6,5	3,9	4,82	28,6	50,1
Arg	7,78	-	15,6	12	3,3	-	-	12,7	14,5

Analisando-se os dados da Tabela 4.25 pode-se observar que à medida que se aumenta o grau de hidrólise com tripsina (Novo Nordisk), o grau de hidrólise com quimotripsina diminui. Este é um efeito totalmente indesejado, pois é exatamente a ação da quimotripsina que fornece o substrato ideal para a CPA. É possível que a ação prévia da tripsina esteja conduzindo as moléculas de proteína a uma conformação na qual os resíduos que representam substrato para a quimotripsina se tornam inacessíveis. Outra possibilidade seria que a tripsina estaria hidrolisando ligações peptídicas pelas quais, teoricamente, não tem afinidade, em consequência dos contaminantes presentes na preparação fornecida pela Novo Nordisk e, assim, indisponibilizando ligações potencialmente hidrolisáveis pela quimotripsina.

Os dados tabelados também permitem observar liberação já bastante significativa de praticamente todos os aminoácidos, em todas as situações investigadas. Isso não parece de todo surpreendente, pois segundo Barber & Fisher (1992) e Abeles e colaboradores (1992) a CPA remove Tyr, Phe, Trp, Leu, Ileu, Met, Thr, Gln, His, Ala, Val, além de Asn, Ser, Lys, gly Asp e Glu, dado tempo reacional suficiente. Ainda assim, a maior porcentagem de liberação de fenilalanina foi de apenas 57,1%, no ensaio onde tempo de reação longo com cada protease foi empregado. O valor médio de aproximadamente 40% de liberação de fenilalanina, apesar de muito aquém do desejado, está em concordância com o obtido por Tardioli (2003), cujo objetivo era estudar as etapas de hidrólise das proteínas do soro catalisadas por CPA e Alcalase® nesse mesmo projeto global no qual se insere esta tese de doutoramento. Como nenhuma das condições ensaiadas até o momento conduziu à obtenção de hidrolisados com teor reduzido ou íntos de aminoácidos livres, resolveu-se utilizar a partir deste ponto tripsina adquirida da Sigma Chemical Co., com grau de pureza declarado de 99%. No entanto, antes de serem testadas novas condições experimentais, uma análise eletroforética das três enzimas de interesse foi realizada e o resultado obtido encontra-se apresentado na Figura 4.24.

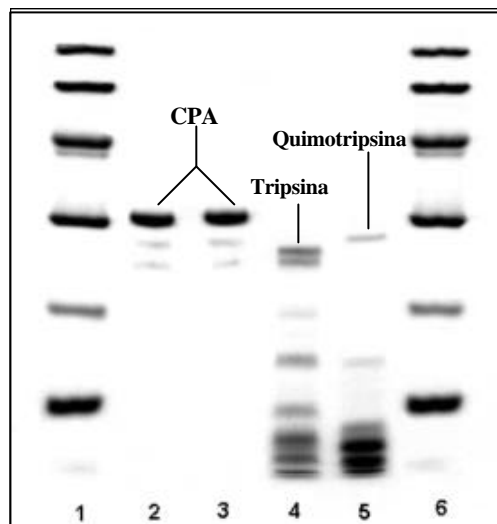


Figura 4.24: Eletroforese SDS-PAGE desnatuante de tripsina, quimotripsina e CPA usando gel de poliacrilamida 15%. Vials 1 e 6: padrões de massa molecular Pharmacia (fosforilase b - MM 97.000Da; Soro albumina bovina - MM 66.000Da; Ovoalbumina - MM 45.000Da; Anidrase carbônica - MM 30.000Da; Inibidor de tripsina - MM 20.100Da e α -lactalbumina - MM 14.400Da); Vials 2 e 3: CPA Sigma; Vial 4: tripsina Sigma e Vial 5: quimotripsina Sigma. Em cada vial foi aplicado 0,004-0,0115mg de proteína. Tempo de operação: 1h e 50min a 20 mA por placa.

O resultado obtido desta análise mostrou que as enzimas tripsina e quimotripsina adquiridas da Sigma apresentam bandas comuns. Isto não parece totalmente inesperado, pois estas preparações são muito similares e extraídas da mesma fonte (pâncreas bovino). É possível, assim, que traços de tripsina possam ser encontrados na preparação de quimotripsina e vice-versa, ainda que essas enzimas apresentem alto grau declarado de pureza. As bandas comuns presentes nas preparações de tripsina e quimotripsina podem estar associadas à presença de traços de exoproteases com baixa massa molecular, em consequência dos resultados que vêm sendo gerados. No caso da CPA, a análise eletroforética mostrou que esta enzima apresenta massa molecular acima de 30KDa, valor muito próximo ao reportado na literatura (32 a 34,5KDa - Tardioli, 2002), e que, de fato, traços das proteases tripsina e quimotripsina podem ser detectados nesta preparação, indicando concordância com a descrição de rótulo desta enzima.

4.4.2.3. TERCEIRA BATELADA DE HIDRÓLISES SEQÜENCIAIS: USO DE ENZIMAS COM ALTO TEOR DE PUREZA

Esta batelada de ensaios previa a utilização de tripsina Sigma para obtenção dos seguintes graus de hidrólise: 2%, 4%, 6%, 8%, 10% e 12%. E/S_{mássico} de 1/25, V_{soro} de 50mL, NaOH 0,2M, 55°C e pH 8 foram condições operacionais empregadas nesses ensaios. Com este procedimento, esperava-se que a liberação de aminoácidos após esta etapa fosse eliminada ou, pelo menos, significativamente reduzida e que custos advindos da utilização de enzima com maior grau de pureza fossem compensados pela minimização da perda de substrato (aminoácidos livres e pequenos peptídeos) na etapa de separação da Phe por ultrafiltração. Após esta etapa inicial, amostras de todos os hidrolisados foram submetidas à análise de aminoácidos e distribuição de massa molecular dos peptídeos resultantes. Esses resultados estão detalhadamente apresentados no Anexo A-1.

As análises de aminoácidos realizadas confirmaram que mesmo tendo-se utilizado tripsina com alto grau declarado de pureza não foi possível evitar liberação de aminoácidos livres. Em todas as situações investigadas a histidina continuou sendo o aminoácido mais liberado. No entanto, os níveis de liberação atingidos situaram-se em patamares bem mais razoáveis que nos obtidos em bateladas anteriores. As análises de distribuição de massa molecular mostraram que a porcentagem de polipeptídeos com MM < 1046Da foi igual ou inferior a 8% para todas as situações investigadas, inclusive em condições de hidrólise máxima com tripsina (GH_T de 12%).

A etapa posterior de hidrólise, efetuada com quimotripsina, foi desenvolvida a 55°C, pH 8, E/S_{mássico} de 1/18, NaOH 0,2M e tempo reacional fixo de sete horas. A Figura 4.25 mostra graficamente o avanço da reação catalisada pela quimotripsina após ação prévia da tripsina e apresenta os graus de hidrólise obtidos em cada ensaio.

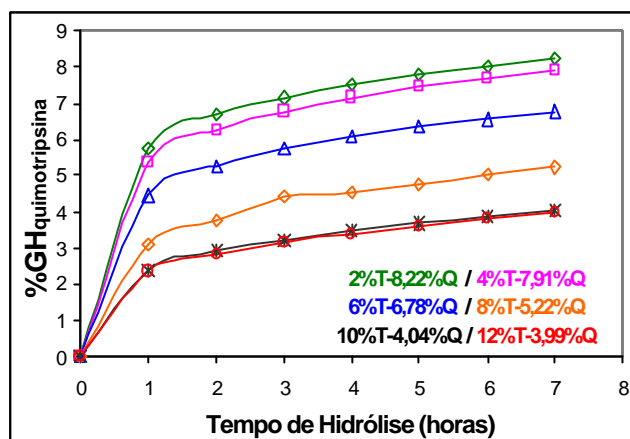


Figura 4.25: Representação gráfica do avanço da hidrólise sequencial com quimotripsina após ação prévia de tripsina. Condições experimentais: 55°C, pH 8, E/S_{mássico} de 1/18, NaOH 0,2M e 7 horas de reação.

Analisando-se a Figura 4.25, percebe-se que na sétima hora de reação com a quimotripsina ainda não se havia atingido grau de hidrólise constante com esta protease, ou seja, tempos reacionais mais longos e/ou maiores concentrações de enzima no meio reacional deverão conduzir a graus de hidrólise superiores aos aqui obtidos. Esta hipótese é reforçada pelo fato de não se ter alcançado grau de hidrólise teórico máximo para ação sequencial de tripsina e quimotripsina (16,5% - determinado por Galvão *et al.*, 2001) em nenhum dos experimentos realizados, embora a condição de 12% de hidrólise com tripsina e 3,99% com quimotripsina tenha conduzido a um valor muito próximo do máximo teórico. Os dados apresentados na Figura 4.25 também confirmam o já discutido fato de que à medida que o grau de hidrólise com tripsina aumenta, o grau de hidrólise final com quimotripsina diminui, para mesmos tempos de reação. Seguindo procedimento padrão, no decorrer do período reacional com quimotripsina alíquotas foram coletadas e submetidas a análises de aminoácidos e peptídeos. Os resultados destas análises mostraram liberação de praticamente todos os aminoácidos, sendo os liberados em maior quantidade foram Tyr (~ 13%), His (~ 50%), Trp (~ 11%) e Arg (~ 13,5%), e porcentagem de polipeptídeos com massa molecular inferior a 1046Da na faixa de 12 a 17%. Os resultados completos dessas análises estão apresentados no Anexo A-1.

A terceira etapa do processo foi desenvolvida submetendo-se os hidrolisados sequenciais previamente obtidos à ação da CPA nas seguintes condições experimentais: 45°C, pH 7, concentração enzimática de 50U_{H-PHE}/gProteína e sete horas de reação. As

Tabelas 4.26 e 4.27 mostram o conteúdo de Phe liberada e o conteúdo de peptídeos com massa molecular menor que 1046Da ao longo das sete horas de hidrólise com CPA, respectivamente. Os dados de liberação de todos os aminoácidos e a distribuição de peptídeos em faixas determinadas de massa molecular estão mostrados no Anexo A-1.

Tabela 4.26: Porcentagem de Phe liberada ao longo das sete horas de hidrólise com CPA. 45°C, pH 7 e 50U_{H-PHE}/gProteína.

Condição do Substrato	% de Liberação de Fenilalanina						
	Tempo de Reação com CPA (horas)						
(Tripsina + Quimotripsina)	1	2	3	4	5	6	7
¹ GH _T = 2% + ² GH _Q = 8,22%	38,50	39,67	43,78	-	48,32	50,05	50,78
GH _T = 4% + GH _Q = 7,91%	42,28	44,15	45,54	47,00	48,25	56,14	62,45
GH _T = 6% + GH _Q = 6,78%	34,25	38,59	42,03	43,84	44,83	45,45	48,74
GH _T = 8% + GH _Q = 5,22%	35,96	41,21	41,48	42,89	44,78	45,84	47,24
GH _T = 10% + GH _Q = 4,04%	24,17	27,03	33,02	35,10	36,39	44,80	45,36
GH _T = 12% + GH _Q = 3,99%	19,57	36,56	38,43	41,54	43,65	46,40	48,91

¹Grau de hidrólise atingido com tripsina;

²Grau de hidrólise atingido com quimotripsina após ação prévia da tripsina.

Analisando-se os dados da Tabela 4.26 observa-se que a maior liberação (62,45%) de Phe pela ação da CPA, ocorreu quando foram previamente atingidos GH_T de 4% e GH_Q de 7,91%. Até este ponto, este valor representa o melhor resultado obtido, tanto se comparado aos demais ensaios mostrados nesta própria tabela quanto se comparado aos ensaios apresentados na Tabela 4.25. Em todos os ensaios realizados o teor de Phe ainda não havia atingido um patamar, pois a cada hora de reação aumentos ainda que pequenos na variável de interesse podiam ser observados.

Tabela 4.27: Porcentagem de peptídeos com MM < 1046Da gerada ao longo de sete horas de hidrólise com CPA.

Condição do Substrato	% de Peptídeos com MM < 1046Da						
	Tempo de Reação com CPA (horas)						
(Trip. + Quimo)	1	2	3	4	5	6	7
¹ GH _T = 2% +	13,98	14,76	14,76	14,83	14,88	15,92	19,40
² GH _Q =8,22%							
GH _T = 4% +	16,95	20,33	20,36	21,16	21,19	21,23	21,39
GH _Q =7,91%							
GH _T = 6% +	16,56	16,65	17,61	17,91	18,33	18,48	19,12
GH _Q =6,78%							
GH _T = 8% +	14,64	14,70	14,77	14,99	15,11	15,63	15,74
GH _Q =5,22%							
GH _T = 10% +	12,03	13,08	13,60	13,68	13,93	14,22	14,42
GH _Q =4,04%							
GH _T = 12% +	15,85	16,61	17,31	17,94	18,82	18,97	19,40
GH _Q =3,99%							

¹Grau de hidrólise atingido com tripsina.

²Grau de hidrólise atingido com quimotripsina após ação prévia da tripsina.

Os resultados apresentados na Tabela 4.27 mostram que o conteúdo de peptídeos com MM < 1046Da variou de 14,5 a 21,5%. Este valor não difere muito daquele encontrado após hidrólise seqüencial com tripsina e quimotripsina, que variou de 12 a 17%. É provável que este processo seqüencial de hidrólise (três enzimas) esteja sendo regido pela tripsina, o que quer dizer que é a forma como esta protease age sobre o substrato inicial (quais ligações peptídicas são primeiramente hidrolisadas e que configuração os polipeptídeos adquirem depois deste processo) que determina como as enzimas subseqüentes agirão. Uma vez que prever ou determinar como ocorre a ação desta enzima é uma tarefa extremamente complexa não há como relacionar diretamente o grau de hidrólise atingido na etapa inicial com tripsina e a porcentagem final de peptídeos pequenos após ação da CPA. Outro ponto que ainda pode ser observado dos dados desta tabela é que o conjunto de hidrólises seqüenciais que forneceu a maior liberação de fenilalanina (62,45% de Phe com GH_T de 4%, GH_Q de 7,91% e sete horas de reação com CPA) também foi aquele que resultou na maior porcentagem de peptídeos pequenos (21,39%). Uma vez que a liberação de Phe deverá ser priorizada, se necessário, a perda de reagente na etapa de separação deverá ser tratada como um problema secundário. Espera-se, contudo, que novas estratégias experimentais ainda

possam conduzir a máximas liberações de Phe com menor quebra de peptídeos, pois o máximo obtido até o momento ainda não se equiparou ao máximo teórico possível.

Como neste ponto do trabalho uma ampla faixa de condições de operação já havia sido investigada e ainda não se havia obtido os resultados desejados, resolveu-se realizar uma hidrólise ácida do soro de queijo para quantificação do conteúdo máximo de fenilalanina que se conseguiria determinar neste substrato e, assim, compará-lo com o máximo teórico previsto por Adler-Nissen (1986), que neste trabalho vem sendo utilizado como referência. Desta forma, seria possível confirmar se os 50% que vêm sendo obtidos na média dos ensaios realizados correspondiam, de fato, a metade do conteúdo capaz de ser determinado ou se esta porcentagem já representava a quantidade máxima deste aminoácido no substrato aqui utilizado. Os resultados obtidos estão mostrados na Tabela 4.28.

Tabela 4.28: Conteúdo (g aminoácido/100gProteína) de alguns aminoácidos determinado após hidrólise ácida de soro de queijo utilizado como substrato. HCl 6,8N, 105°C e 24 horas de incubação. Comparação com os valores teóricos previstos por Adler-Nissen (1986).

Aminoácido	% de aminoácidos no soro (valor médio de dois ensaios)	Referência: Adler-Nissen, 1986.
Serina (Ser)	4,69	4,76
Glicina (Gly)	1,93	1,92
Valina (Val)	6,22	6,42
Isoleucina (Ileu)	7,02	6,92
Fenilalanina (Phe)	3,84	3,82
Histidina (His)	2,01	2,05
Arginina (Arg)	2,96	3,01

Os dados apresentados na tabela acima mostram estreita concordância com os valores teóricos previstos por Adler-Nissen (1986). Estes resultados evidenciam que a porcentagem de liberação de Phe obtida até então ainda estava longe do máximo teórico possível (100%), indicando que novas condições operacionais (maior concentração enzimática no meio ou tempos reacionais prolongados) deveriam resultar em maiores níveis de liberação de Phe.

Em consequência da relevância do resultado obtido para liberação de Phe empregando-se GH_T de 4% e $\text{GH}_Q=7,91\%$, dois novos ensaios (replicatas) foram realizados e estes confirmaram que, de fato, nas condições de operação ensaiadas chegasse a aproximadamente 62,5% de liberação deste aminoácido.

Utilizando-se os dados de liberação de Phe e porcentagem de peptídeos com $MM < 1046Da$, apresentados nas Tabelas 4.26 e 4.27, respectivamente, realizou-se um estudo exploratório utilizando-se redes neurais com o intuito de se estimar as duas variáveis de interesse deste trabalho em condições não ensaiadas experimentalmente. Para isso, foi feita uma interpolação cúbica desses dados. Este procedimento foi realizado dividindo-se as faixas de GH_T (de 2 a 12%) e tempo de hidrólise com CPA (de 1 a 7 horas) em intervalos de 0,5% e 0,5 hora, respectivamente, tendo sido daí gerados 273 pontos (13 x 21). Na etapa de treinamento das redes foram utilizados 232 pontos (273 pontos obtidos da interpolação - 41 pontos experimentais = 232 pontos) e na etapa de validação foram utilizados os 41 pontos obtidos experimentalmente, tendo-se fixado o tempo de hidrólise com quimotripsina em sete horas. A topologia das duas redes aqui utilizadas para treinamento/validação dos dados era constituída de duas entradas (% GH_T e tempo de reação com CPA, já que antes das hidrólises com CPA os substratos foram invariavelmente hidrolisados com quimotripsina por sete horas), 18 neurônios na camada oculta e uma saída (porcentagem de liberação de Phe ou porcentagem de peptídeos com $MM < 1046Da$). As Figuras 4.26 e 4.27 mostram, respectivamente, os resultados gerados pelas redes neurais para porcentagem de liberação de fenilalanina e porcentagem de peptídeos com $MM < 1046Da$.

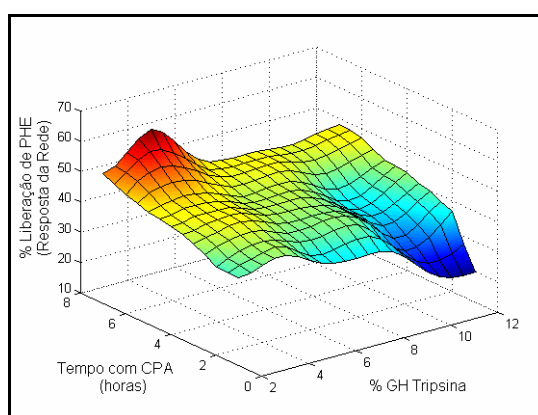


Figura 4.26: Superfície-resposta obtida do treinamento da rede neural para liberação de Phe ao longo das 7 horas de reação com CPA.

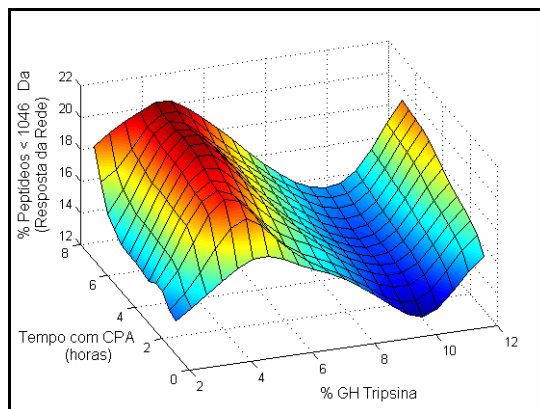


Figura 4.27: Superfície-resposta obtida do treinamento da rede para porcentagem de peptídeos com MM inferior a 1046Da ao longo das 7 horas de reação com a CPA.

Após treinamento das redes neurais, era de interesse conhecer a diferença (erro) entre a predição feita pela rede e os pontos experimentais, para ambas as variáveis-resposta. As Figuras 4.28 e 4.29, apresentadas a seguir, ilustram as diferenças percentuais detectadas.

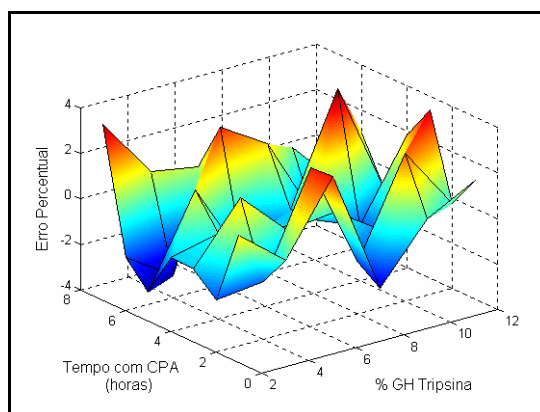


Figura 4.28: Erros percentuais obtidos da comparação entre pontos experimentais e pontos gerados pela rede para porcentagem de Phe liberada com CPA.

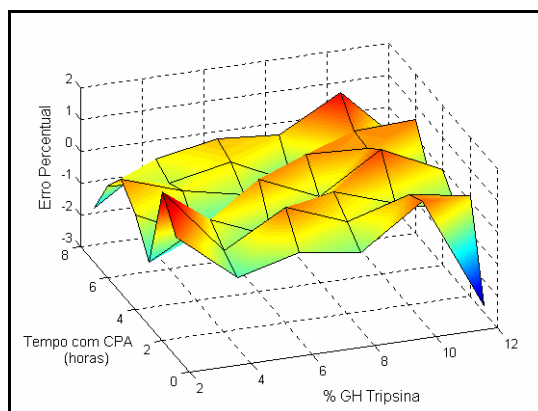


Figura 4.29: Erros percentuais obtidos da comparação entre pontos experimentais e pontos gerados pela rede para porcentagem de peptídeos com MM inferior a 1046Da nas 7 horas de reação com a CPA.

Analisando-se as Figuras 4.28 e 4.29, pode-se observar que os erros advindos do uso das redes neurais foram, em média, menores que 2%, o que justifica plenamente sua utilização.

A utilização de redes neurais neste trabalho se deveu ao fato de que com esta ferramenta seria possível estimar a porcentagem de liberação de Phe e distribuição de peptídeos com $MM < 1046Da$ de forma contínua dentro dos domínios de $\%GH_T$ e tempo de hidrólise com CPA investigados, ou seja, seria possível estimar as variáveis-resposta em condições experimentais não ensaiadas e também não previstas pela interpolação; este procedimento se mostra mais completo que a utilização direta da interpolação cúbica, que fornece dados apenas nos pontos da malha. Outro ponto a ser ressaltado refere-se a menor quantidade de parâmetros a ser armazenada para representar satisfatoriamente as superfícies de resposta. No caso da interpolação cúbica, para cada superfície de resposta se faz necessário guardar todos os 273 valores resultantes da interpolação; já no caso das redes neurais aqui utilizadas, este número se reduz a apenas 73⁽¹⁾, relativos aos pesos ajustados durante a fase de treinamento.

⁽¹⁾ Este valor é calculado da seguinte forma:

$N = (\text{número de entradas da rede} + 1) * (\text{número de neurônios na camada oculta}) + (\text{número de neurônios na camada oculta} + 1) * (\text{número de saídas da rede})$

$N = (2 + 1) * 18 + (18 + 1) * 1 = (3 * 18) + 19 = 73.$

Com as redes neurais inferindo os valores das variáveis-resposta de forma contínua em todo o domínio experimental seria possível utilizar esta ferramenta em rotinas de otimização, que buscariam as condições ótimas de operação (%GH_T e tempo de hidrólise com CPA), ou seja, aquelas que resultariam em uma solução de compromisso entre maior porcentagem de liberação de Phe e menor porcentagem de peptídeos pequenos (< 1046Da). Fazia-se necessário, contudo, mais experimentos para se determinar o intervalo de busca. Decidiu-se assim aumentar a concentração de enzima no meio e o tempo de reação com quimotripsina e CPA, buscando-se atingir 100% de conversão do substrato. Uma análise visual das superfícies de resposta obtidas indicava que uma boa região de busca seria graus de hidrólise com tripsina menores que 6% e novas condições dentro dessa região foram assim incluídas. Além disso, como as condições de hidrólise com quimotripsina e CPA seriam alteradas, os experimentos com os graus de hidrólise com tripsina já estudados anteriormente foram repetidos, visando-se confirmar a tendência observada.

4.4.2.4. QUARTA BATELADA DE HIDRÓLISES SEQUENCIAIS

Nesta quarta batelada, o tempo de reação com quimotripsina e CPA foi estendido de sete para dez horas; a concentração de quimotripsina no meio passou de 0,7 para 1,73mgEnz./mL de solução e a concentração de CPA foi aumentada de 50 para aproximadamente 138U_{H-PHE}/gProteína (ver Anexo II). Foram incluídas hidrólises sequenciais com GH_T inicial de 1, 3, e 5% com o intuito de “cercar” condições de operação em torno de GH_T inicial de 4%. A Tabela 4.29 sumariza os resultados obtidos nesta nova batelada de experimentos.

Tabela 4.29: Porcentagem de liberação de Phe e de peptídeos com MM < 1046Da para a hidrólise sequencial das proteínas do soro de queijo com tripsina, quimotripsina e CPA, usando altas concentrações de enzima e tempos prolongados de reação nas etapas desenvolvidas com quimotripsina e CPA.

Ensaio	Tripsina	Quimotripsina	CPA			Phe Liberada (%)	Peptídeos com MM < 1046Da (% p/p)
	GH _T (%)	GH _Q (%)	E/S (p/p)	T _{Reação} (horas)	E/S (p/p)		
⁴ 1	1	11,8	1/7	10	1/367	84,7 ± 0,1	14,5
2	2	11,6				69,4	16,7
3	3	11,2				59,7	17,3
4	4	10,5				68,7	17,0
⁴ 5	5	9,8				87,4 ± 0,1	18,7
6	6	9,4				65,3	18,0
7	8	7,7				69,5	17,9
8	10	5,9				54,0	17,6
9	12	4,2				52,7	16,5

¹ E/S_{máximo} = 1/25, 55°C e pH 8.

² 55°C, pH 8 e 10 horas de reação.

³ 45°C e pH 7.

⁴ Ensaios realizados em duplicata.

Uma análise do conteúdo de peptídeos com MM < 1046Da, apresentado na Tabela 4.29, nos permite observar que praticamente não houve alteração com relação ao valor médio obtido nos ensaios anteriormente discutidos (média dos ensaios anteriores de 18,2% e média atual de 17,3%). Comparando-se os ensaios 1 e 5, vê-se que praticamente mesmo índice de liberação de Phe foi alcançado nesses dois ensaios, porém, o ensaio 1 conduziu à menor degradação dos oligopeptídeos gerados (14,5%).

De fato, aumentos na concentração enzimática e no tempo reacional nas etapas com quimotripsina e CPA conduzem a maiores porcentagens de liberação de Phe. No entanto, o ensaio desenvolvido com GH_T inicial de 4%, que havia sido o melhor resultado da batelada anterior de experimentos, não sofreu ganho significativo para a variável de interesse saltando de 62,45 para apenas 68,7% (aumento de apenas 10%), nas novas condições ensaiadas. Isto indica que esta seqüência deve estar muito próxima da sua capacidade máxima de disponibilização de fenilalanina e, assim, aumentos de tempo e concentração de enzimas (quimotripsina e CPA) não deverão conduzir a resultados muito diferentes dos obtidos. Para as seqüências com altos graus iniciais de hidrólise com tripsina (10 e 12%), os aumentos sofridos (aproximadamente 19 e 8%, respectivamente) não foram suficientes sequer para elevar o conteúdo de Phe liberada para 55%, indicando que provavelmente ensaios desenvolvidos com baixos graus

iniciais de hidrólise com tripsina é que deverão permitir o cumprimento dos objetivos deste trabalho.

Os ensaios desenvolvidos com GH_T de 1 e 5% conduziram a patamares de liberação de Phe até então não atingidos (média de aproximadamente 86%), o que representa grande avanço na busca das condições experimentais que maximizem esta variável de interesse, embora ainda não se tenha atingido conversão total (100%) em nenhuma condição investigada (ver Anexo II).

4.4.2.5. QUINTA BATELADA DE HIDRÓLISES SEQUÊNCIAIS

Nesta batelada de ensaios, as condições de GH_T de 1 e 5%, que apontaram na direção da obtenção de liberação máxima de Phe, foram repetidas aumentando-se a concentração de quimotripsina de 1,73 para 3,05mgEnz./mL de solução e a concentração de CPA de 138 para 200 $\text{U}_{\text{H-PHE}}$ /gProteína e mantendo-se fixo o tempo de reação em ambas as etapas em dez horas. Assim, seria possível determinar entre essas duas condições qual forneceria melhor resultado para liberação de Phe com, preferencialmente, menor redução possível no tamanho dos polipeptídeos formados. Uma vez que o GH_T de 1% é rapidamente alcançado (tempo de reação inferior a 5 minutos), achou-se conveniente investigar também uma situação na qual as proteínas do soro de queijo fossem diretamente hidrolisadas pela quimotripsina, empregando-se as mesmas condições experimentais anteriormente descritas (ensaios 1 e 5%). A Tabela 4.30 traz os resultados obtidos em tais experimentos.

Tabela 4.30: Porcentagem de liberação de Phe e distribuição de peptídeos com $\text{MM} < 1046\text{Da}$ obtidas após ação sequencial de quimotripsina e CPA ou após ação das três enzimas aqui estudadas na hidrólise das proteínas do soro. Ensaios realizados em duplicata.

¹ Tripsina		² Quimotripsina		³ CPA		Phe Liberada (%)	Peptídeos com $\text{MM} < 1046\text{Da}$ (% p/p)
GH_T (%)	GH_Q (%)	E/S (p/p)	$T_{\text{Reação}}$ (horas)	E/S (p/p)			
0	12,4	1/6	10	1/256	$98,3 \pm 0,17$	15,5	
1	12,2				$95,6 \pm 0,21$	17,9	
5	10,0				$91,3 \pm 0,18$	17,0	

¹ E/S_{mássico} = 1/25, 55°C e pH 8.

² 55°C, pH 8; 3,05mgEnz./mL de solução e 10 horas de reação.

³ 45°C, pH 7 e 200 $\text{U}_{\text{H-PHE}}$ /gProteína.

Os resultados apresentados na Tabela 4.30 mostram que os aumentos praticados na concentração de quimotripsina e CPA realmente elevaram o nível de liberação de Phe para patamares superiores a 91%, nos ensaios com GH_T de 1 e 5%, mantendo-se praticamente inalterado o patamar de porcentagem de polipeptídeos com $\text{MM} < 1046\text{Da}$. Hidrólise direta com quimotripsina atingiu GH_Q de aproximadamente 12% e, nesta condição, a conversão obtida foi muito próxima de 100% (98,3%) para remoção de resíduos de Phe carboxi-terminais. Também se constatou uma menor degradação das cadeias protéicas (15,5%) em relação aos ensaios onde foram feitas hidrólises prévias com tripsina. Estes resultados indicam que a quimotripsina parece ter maior afinidade por moléculas com massa molecular mais elevada e, deste modo, a pré-hidrólise com tripsina desfavorece a ação posterior da quimotripsina. Vê-se assim que a hipótese inicial deste projeto, de que um ataque prévio com tripsina disponibilizaria resíduos hidrofóbicos e facilitaria a ação da quimotripsina, não era verdadeira. Do ponto de vista do processo esse resultado foi muito bom, pois elimina uma etapa de hidrólise e conseqüentemente reduz custos.

4.5. ESTUDO CINÉTICO DA HIDRÓLISE DAS PROTEÍNAS DO SORO DE QUEIJO CATALATISADA PELA QUIMOTRIPSINA IMOBILIZADA EM GLIOXIL-AGAROSE 6%

A hidrólise enzimática de proteínas é reconhecidamente um processo complexo. O grande número de espécies presentes simultaneamente no meio reacional (enzima livre, enzima ligada a inibidores competitivos, enzima ligada a produtos da reação, entre outros), seja em reações em série ou em paralelo, estabelece uma limitação natural à possibilidade de estimativa de parâmetros cinéticos básicos. Este é um problema geral na determinação de modelos cinéticos que descrevam a hidrólise de substratos macromoleculares. Se o modelo for demasiadamente simples, sua representação inadequada do mecanismo verdadeiro limitará sua aplicabilidade geral; se, por outro lado, o modelo for muito complexo, onde o número de parâmetros cinéticos envolvidos é muito grande, não poderá ser analisado estatisticamente com precisão suficiente a partir de dados experimentais obtidos de ensaios cinéticos simples. Estas são as principais razões pelas quais modelos cinéticos empíricos são freqüentemente encontrados na literatura para representação de hidrólise de proteínas - Márquez & Vázquez, 1999; Margot *et al.*, 1997; Gonzáles-Tello *et al.*, 1994.

Em conseqüência desta complexidade, optou-se aqui, por se trabalhar com um modelo no qual a concentração de substrato (N) fosse definida em termos de ligações peptídicas com aminoácidos aromáticos na sua porção carboxílica. A determinação desse parâmetro (N) foi feita de acordo com a equação 4.1.

$$N = C_{Soro} * h_{tot} * (GH_{Máx} - GH_{DadoInstante}) \quad (\text{Eq. 4.1})$$

Onde: N é a concentração de ligações peptídicas hidrolisáveis pela quimotripsina em um dado instante, em mmol Lig./L_{reator}; C_{Soro} é a concentração inicial do soro de queijo, em g/L; h_{tot} é a concentração total de ligações peptídicas nas proteínas do soro (8,8 mmol Lig./gProteína); GH_{Total} é o grau de hidrólise máximo que se pode obter pela ação da quimotripsina nas proteínas do soro de queijo; e $GH_{DadoInstante}$ é o grau de hidrólise atingido com quimotripsina em cada experimento, no mesmo instante.

Ensaio de hidrólise em pHstato utilizando o método das velocidades iniciais foram desenvolvidos visando-se determinar a concentração de enzima a ser utilizada nos demais ensaios cinéticos. Assim, soro 15g/L (concentração inicial de substrato (N_o) de 25,74mmol Lig./L_{reator}) foi hidrolisado por um período de 3 minutos, variando-se a concentração inicial de enzima no reator ($C_{Enz.}$ de 0,5 a 6,4gEnz./L_{reator} - derivado contendo 40mgEnz/gGel). A Figura 4.30 mostra a variação das velocidades iniciais (obtidas das curvas de concentração de ligações hidrolisadas, em mmol Lig./L_{reator}, versus tempo, em minutos) em função da concentração de enzima no reator.

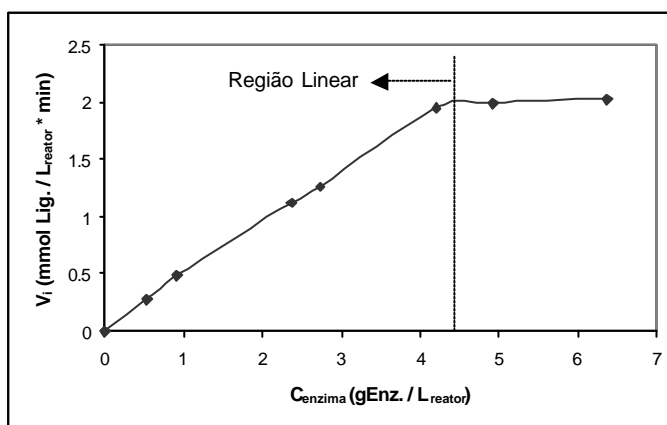


Figura 4.30: Variação da velocidade inicial de reação (V_i) com a concentração de enzima ($C_{Enz.}$) no reator. Condições de operação. Soro 15g/L, 55°C, pH 8 e 3 minutos de reação.

A Figura 4.30 mostra variação linear da velocidade com a concentração de enzima até o limite de aproximadamente $4\text{gEnz./L}_{\text{reator}}$, comportamento típico do modelo de Michaelis-Menten. Acima desta concentração, a hipótese de estado pseudo-estacionário não deve mais estar sendo observada e modelos hiperbólicos não devem mais representar o processo reativo. Assim, a $C_{\text{Enz.}}$ escolhida para ser utilizada nos ensaios para determinação dos parâmetros cinéticos foi $3\text{gEnz./L}_{\text{reator}}$. O uso do método de velocidades iniciais elimina efeitos como inibição pelo produto ou inativação da enzima, em consequência do tempo de reação ter sido bastante curto. Tempos curtos de reação eram utilizados e, deste modo, baixas conversões eram atingidas, portanto, nessas condições apenas a concentração inicial de substrato influencia a velocidade da reação.

4.5.1. DETERMINAÇÃO DA EFETIVIDADE DA REAÇÃO (h)

O uso de altas cargas de enzima por volume de gel irá conduzir a prováveis efeitos difusionais no sistema, pois haverá aumento da velocidade de reação por volume de catalisador. Além disso, maiores cargas enzimáticas implicam ainda em diminuição da difusividade efetiva do substrato. Uma vez que a efetividade diminui com o aumento do módulo de Thiele e este é diretamente proporcional à velocidade da reação e inversamente proporcional à difusividade efetiva (Eq. 2.5 ou 2.6 do item revisão bibliográfica), espera-se diminuição da efetividade com o aumento da carga enzimática.

Experimentalmente, a efetividade da reação foi determinada hidrolisando-se soro de queijo 50g/L com concentração de enzima fixa e igual a $1,5\text{gEnz./L}_{\text{reator}}$, mas utilizando-se derivados de quimotripsina com diferentes cargas: 5, 10, 20, 30 e 40mgEnz./gGel . Com esses experimentos seria possível detectar a presença de limitações difusionais através de medidas de velocidades iniciais de reação. Admitindo-se que a velocidade medida utilizando o derivado contendo baixa carga enzimática (5mgEnz./gGel - derivado-padrão) era correspondente à velocidade real do sistema, ou seja, medida na ausência de limitações difusionais, a efetividade da reação foi calculada como sendo a razão entre as velocidades medidas utilizando-se cada derivado individualmente e a velocidade real do sistema. A Figura 4.31 mostra o perfil da efetividade em função da carga enzimática de cada derivado utilizado.

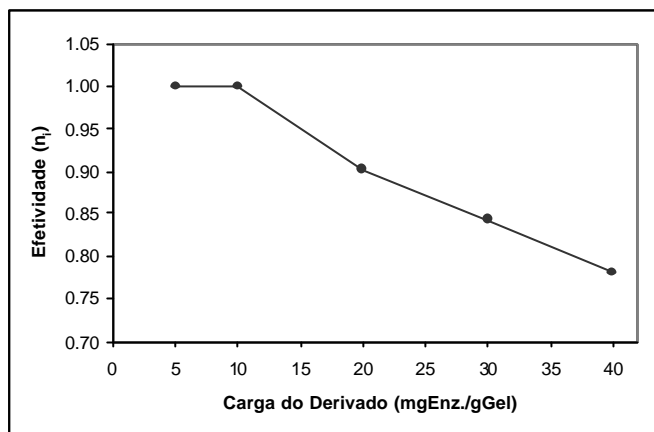


Figura 4.31: Efetividade (razão entre as velocidades aparente, medida na presença de efeitos difusivos, e real, medida na ausência de efeitos difusionais) em função da carga enzimática do derivado utilizado. Condições: Soro 50g/L, V_{soro} de 25mL, NaOH 0,5N e concentração de enzima no reator de 1,5gEnz./L_{reator}.

Para o derivado contendo 5mgEnz./gGel de fato não deve haver efeitos difusivos, pois a utilização do derivado com 10mgEnz./gGel também conduziu a efetividade unitária. Para as demais situações, observa-se que a efetividade da reação diminui com o aumento da carga enzimática do derivado, até atingir 78% para o derivado com 40mgEnz./gGel. Se a velocidade aparente está sendo limitada pela velocidade de transferência de massa intrapartícula, este efeito será tanto mais pronunciado quanto mais carregado estiver o suporte. No entanto, a utilização desses catalisadores é de fundamental importância a nível industrial, onde suportes com máxima atividade observada são requeridos, mesmo que uma fração da enzima imobilizada não esteja de fato atuando. A utilização de tais suportes implica em elevada estabilidade operacional aparente do biocatalisador, pois à medida que a carga enzimática real imobilizada vai inativando, a atividade aparente permanece constante, permitindo operação contínua do reator.

4.5.2. DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS CINÉTICOS APARENTES

$$V_{\text{máx}}^{\text{ap}}, K_m^{\text{ap}} \text{ E } K_S^{\text{ap}}$$

Os parâmetros cinéticos aparentes foram estimados hidrolisando-se 10mL de soro de queijo, nas concentrações de 2; 5; 12,15; 20; 30; 40; 50 e 56,33g/L, com concentração fixa de quimotripsina em 3gEnz./L_{reator} (derivado com 40mgEnz./gGel). Para cada concentração de substrato utilizada uma velocidade inicial (V_i) era

determinada e um gráfico de V_i em função da concentração inicial de substrato, aqui descrita em termos de ligações peptídicas hidrolisáveis por esta enzima, construído. Os dados obtidos estão apresentados na Tabela 4.31.

Tabela 4.31: Velocidades iniciais de hidrólise das proteínas do soro para diferentes concentrações iniciais de substrato, mas $C_{\text{Enz.}}$ fixa e igual a $3\text{gEnz./L}_{\text{reator}}$. Condições: 55°C , pH 8 e três minutos de reação. Experimentos realizados em duplicata.

C_{Soro} (g/L)	Concentração inicial de ligações hidrolisáveis pela quimotripsina N_o (mmol Lig./L _{reator})	V_i (mmol Lig./L _{reator} *min)
0	0	0
2	3,43	0,99
5	8,58	1,19
12,15	20,85	1,51
20	34,32	1,74
30	51,48	1,82
40	68,64	1,77
50	85,80	1,68
56,33	96,66	1,61

Calculado pela Eq. 4.1, com $\text{GH}_{\text{Dado Instante}}$ igual a zero no início da reação.

Analisando-se a Tabela 4.31, observa-se que o aumento da concentração inicial de substrato (N_o) conduz ao aumento na velocidade inicial de reação até N_o igual a $51,48\text{mmol Lig./L}_{\text{reator}}$ (30g/L). A partir desta concentração, as velocidades diminuem com o aumento de N_o . Como pode ser visto na Figura 4.32, este comportamento demonstra claramente um efeito de inibição pelo substrato, razão pela qual o modelo de Michaelis-Menten considerando tal efeito (Eq 4.2) foi ajustado aos dados experimentais para determinação dos parâmetros cinéticos aparentes $V_{\text{máx}}^{\text{ap}}$, K_m^{ap} e K_s^{ap} - Figura 4.32.

$$V = -\frac{dN}{dt} = \frac{dP}{dt} = \frac{K_{\text{Cat}} * E * N}{K_m^{\text{ap}} + N(1 + \frac{N}{K_s^{\text{ap}}})} \quad (\text{Eq. 4.2})$$

Onde: N é a concentração molar de ligações peptídicas hidrolisáveis pela quimotripsina; K_{Cat} (em $\text{mmol Lig./gEnz.*min}$), K_m^{ap} (em $\text{mmol Lig./L}_{\text{reator}}$) e K_s^{ap} (em $\text{mmol Lig./L}_{\text{reator}}$) são parâmetros do modelo cinético e E é a concentração de enzima no reator, em $\text{gEnz./L}_{\text{reator}}$.

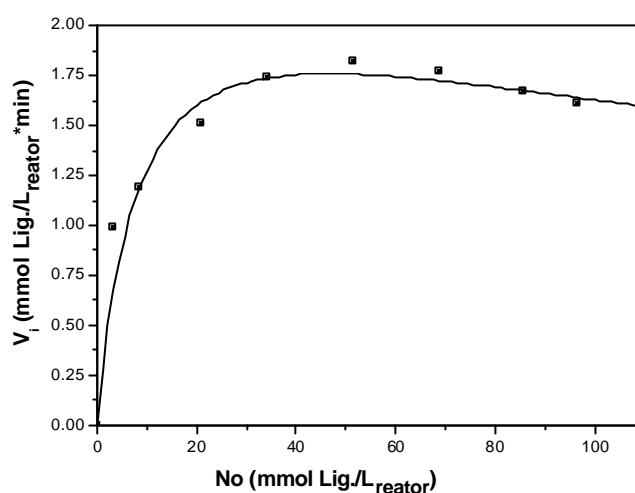


Figura 4.32: Ajuste do modelo de Michaelis-Menten com inibição pelo substrato aos dados experimentais de velocidade inicial de hidrólise de ligações peptídicas hidrolisáveis pela quimotripsina. Condições: 55°C, pH 8 e 3gEnz./L_{reator}. (■) Dados experimentais e (—) Modelo ajustado por busca direta dos parâmetros.

Pode-se observar que o modelo utilizado ajustou-se adequadamente aos dados experimentais de V_i versus N_o . Os parâmetros foram determinados utilizando-se busca direta através do programa *Origin*[®] 6.

$$\rightarrow V_{m\acute{a}x}^{ap} = 2,4 \pm 0,07 \text{ mmol Lig./L}_{\text{reator}} \cdot \text{min}$$

$$V_{m\acute{a}x} = K_{\text{Cat}} \cdot E, \text{ como } E = 3\text{gEnz./L}_{\text{reator}}, \text{ tem-se:}$$

$$K_{\text{Cat}} = 0,8 \text{ mmol Lig./gEnz.} \cdot \text{min}$$

$$\rightarrow K_m^{ap} = 8,4 \pm 0,82 \text{ mmol Lig./L}_{\text{reator}}$$

$$\rightarrow K_s^{ap} = 258,2 \pm 41,32 \text{ mmol Lig./L}_{\text{reator}}$$

4.5.3. DETERMINAÇÃO DO PARÂMETRO CINÉTICO K_i

Obtidos os parâmetros cinéticos $V_{m\acute{a}x}^{ap}$, K_m^{ap} e K_s^{ap} através de ensaios de curta duração, ensaios em batelada de longa duração foram realizados visando-se verificar se o modelo de Michaelis-Menten com inibição pelo substrato representaria adequadamente a formação de produto ao longo do tempo (até altas conversões). Assim, quatro diferentes concentrações de soro de queijo (25mL), 4; 12,15; 30 e 50g/L, foram hidrolisadas pela ação da quimotripsina por um período de 10 horas - Tabela 4.32.

Tabela 4.32: Concentrações iniciais de substrato utilizadas nos experimentos de longa duração – 10 horas.

C_{Soro} (g/L)	Concentração inicial de ligações hidrolisáveis pela quimotripsina - N_o (mmol Lig./L _{reator})
4	6,86
12,15	20,85
30	51,48
50	85,80

Calculado pela Eq. 4.1, com $GH_{Dado\ Instante}$ igual a zero no início da reação.

Nesses experimentos foi utilizada uma concentração enzimática de 4gEnz./L_{reator}, por esta ainda se encontrar na região linear do gráfico representado na Figura 4.30, e, portanto, novo valor de $V_{máx}^{ap}$ foi calculado:

$$V_{máx}^{ap} = K_{Cat} * E \rightarrow E = 4gEnz./L_{reator} \text{ e } K_{Cat} = 0,8 \text{ mmol Lig./gEnz.} * \text{min}$$

$$V_{máx}^{ap} = 3,2 \text{ mmol Lig./L}_{reator} * \text{min}$$

As Figuras 4.33 (A) e (B) mostram a formação de produto ao longo das 10 horas de reação para as quatro concentrações de soro utilizadas e o ajuste do modelo de Michaelis-Menten com inibição pelo substrato para uma das concentrações investigadas (50g/L), respectivamente. Ressalte-se que as barras de erro associadas aos pontos experimentais não foram mostradas em consequência da grande concordância entre as duplicatas realizadas.

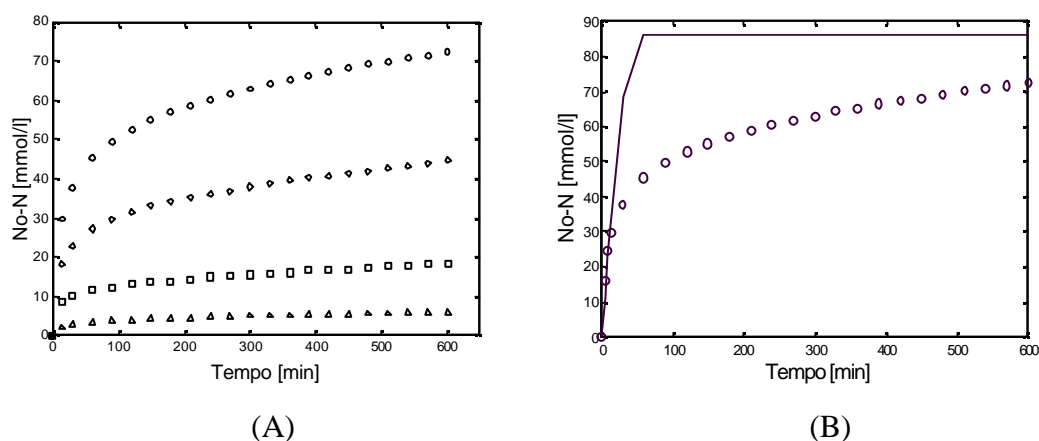
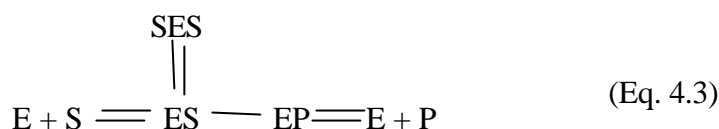


Figura 4.33: (A) Representação das hidrólises em bateladas de longa duração para as quatro concentrações de soro utilizadas: (Δ) $N_o = 6,86$ mmol Lig./L_{reator}; (\square) $N_o = 20,85$ mmol Lig./L_{reator}; (\diamond) $N_o = 51,48$ mmol Lig./L_{reator} e (\circ) $N_o = 85,8$ mmol Lig./L_{reator} e (B) ajuste do modelo de Michaelis-Menten com inibição pelo substrato aos dados experimentais obtidos no ensaio com C_{soro} de 50g/L e N_o de 85,8mmol Lig./ L_{reator}. Condições: 55°C, pH 8 e $C_{Enz.}$ de 4gEnz./L_{reator}.

Como pode ser observado na Figura 4.33 (B) as concentrações de produto preditas pelo modelo foram significativamente superiores às medidas experimentalmente, sugerindo que a reação de hidrólise de ligações peptídicas catalisada pela quimotripsina estaria sendo inibida tanto pelo substrato quanto pelos produtos de reação. Assim, o modelo de Michaelis-Menten com inibição simultânea pelo substrato e pelo produto, baseado no mecanismo apresentado na Eq. 4.3, foi ajustado aos dados experimentais apresentados na Figura 4.33 (A):



$$V = -\frac{dN}{dt} = \frac{dP}{dt} = \frac{K_{Cat} * E * N}{K_m^{ap} \left(1 + \frac{I}{K_I^{ap}}\right) + N \left(1 + \frac{N}{K_S^{ap}}\right)} \quad (\text{Eq. 4.4a})$$

$$V = -\frac{dN}{dt} = \frac{dP}{dt} = \frac{K_{Cat} * E * N}{K_m^{ap} \left(1 + \frac{P}{K_I^{ap}}\right) + N \left(1 + \frac{N}{K_S^{ap}}\right)} \quad (\text{Eq. 4.4b})$$

Onde: I é a concentração molar de inibidor, em mmol Lig./L_{reator}, e K_I^{ap} um parâmetro cinético do modelo, em mmol Lig./L_{reator}. Aqui se considerou que para cada ligação peptídica rompida uma molécula de inibidor era gerada, ou seja, concentração de inibidor (I) igual a concentração de produto (P).

A Figura 4.34 mostra o ajuste do modelo com inibição simultânea pelo substrato e pelo produto aos dados experimentais obtidos para C_{soro} de 4g/L.

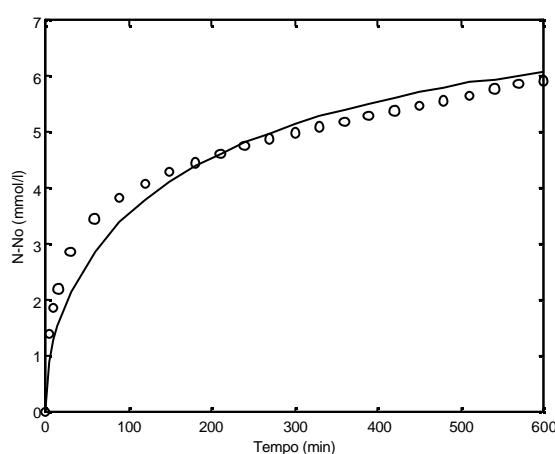


Figura 4.34: Ajuste do modelo de Michaelis-Menten com inibição pelo substrato e pelo produto aos dados experimentais obtidos no ensaio realizado com C_{soro} de 4g/L. Condições: N_o de 6,86 mmol Lig./L_{reator}, 55°C, pH 8 e C_{Enz.} de 4gEnz./L_{reator}.

O modelo de Michaelis-Menten com inibição simultânea pelo substrato e pelo produto (Eq. 4.4a ou 4.4b) representou satisfatoriamente os dados experimentais para a condição testada, fornecendo um valor de K_I^{ap} de 0,039 mmol Lig./L_{reator}. Este valor foi então utilizado para ajuste do modelo aos dados obtidos para as demais concentrações iniciais de substrato estudadas. O resultado dos ajustes está apresentado na Figura 4.35.

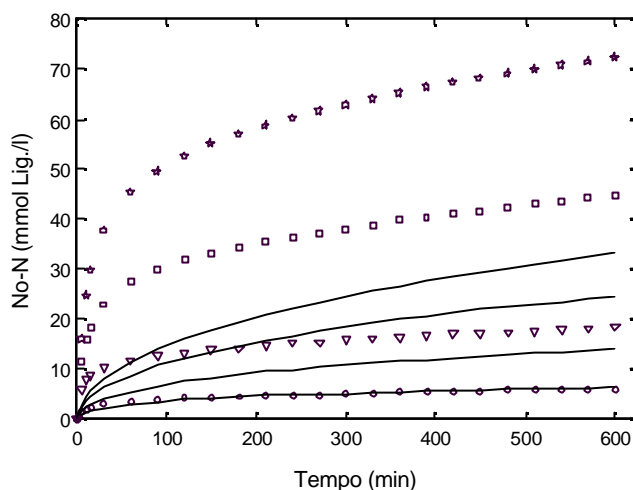


Figura 4.35: Hidrólises em batelada de longa duração das proteínas do soro de queijo catalisadas pela quimotripsina (derivado contendo 40mgEnz./gGel) à 55°C, pH 8 e $C_{Enz.}$ de 4gEnz./L_{reator}. (o) $N_o = 6,86$ mmol Lig./L_{reator}; (∇) $N_o = 20,85$ mmol Lig./L_{reator}; (?) $N_o = 51,48$ mmol Lig./L_{reator} e (☆) $N_o = 85,8$ mmol Lig./L_{reator}; (-) Ajuste do modelo de Michaelis-Menten com inibição pelo substrato e pelo produto com $K_I^{ap} = 0,039$ mmol Lig./L_{reator}.

Analisando-se a Figura 4.35, observa-se que o modelo de Michaelis-Menten com inibição pelo substrato e pelo produto utilizando um único valor de K_I^{ap} (determinado para $N_o = 6,86$ mmol Lig./L_{reator}) não prediz adequadamente a formação de produto ao longo do tempo para todas as concentrações iniciais de substrato investigadas. De acordo com o modelo de Michaelis-Menten, a velocidade da reação varia hiperbolicamente com o aumento da concentração do substrato, sendo uma função linear deste apenas para concentrações de substrato bem menores que K_m . Isto significa que se aumentando a concentração de substrato de N para 5N, a velocidade da reação não aumenta de cinco vezes, como pode ser observado a seguir (Eq. 4.5):

$$V = \frac{N * K_{Cat} * E}{K_m^{ap} + N + \frac{N^2}{K_S^{ap}}} \rightarrow V = \frac{5 * N * K_{Cat} * E}{K_m^{ap} + N + \frac{N^2}{K_S^{ap}} + \left[4N + \frac{24N^2}{K_S^{ap}} \right]} \quad (\text{Eq. 4.5})$$

O termo destacado na Eq. 4.5 impede o aumento proporcional da velocidade com a concentração de substrato. No entanto, pôde-se constatar nos experimentos aqui realizados que todas as curvas $[(N_o-N)/N_o]$ versus tempo ou conversão versus tempo praticamente se sobrepõem quando os dados experimentais são representados em termos de conversão ou grau de hidrólise, como mostra a Figura 4.36. Vale salientar ainda que as curvas experimentais seguem uma ordem aleatória, o que mostra que a dispersão dos pontos se deve a variações dos experimentos.

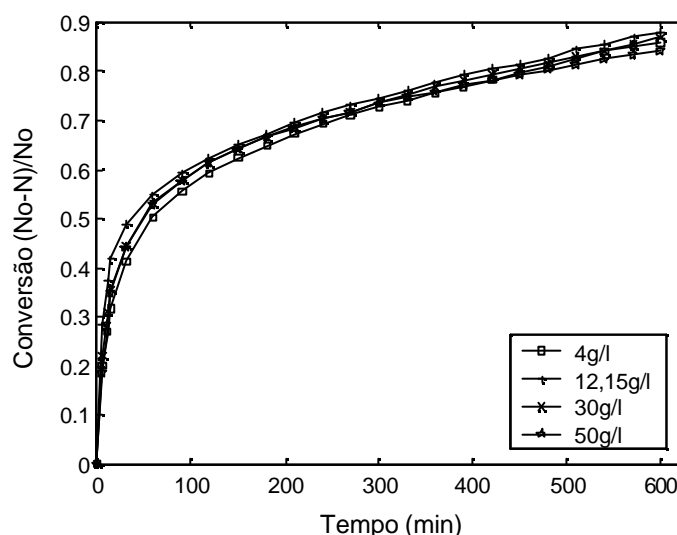


Figura 4.36: Dados experimentais expressos em termos de conversão para as quatro bateladas de longa duração realizadas.

O comportamento dos ensaios realizados, representado na Figura 4.36, seria esperado para uma reação de primeira ordem ($V = k * N$), onde a velocidade da reação aumenta proporcionalmente à concentração de substrato. Nesse caso, a conversão ($X = (N_o - N)/N_o$) seria função apenas do tempo ($X = 1 - e^{-kt}$). No entanto, mesmo para o modelo hiperbólico simples de Michaelis-Menten (sem inibição) a conversão em função do tempo é uma função mais complexa, dependente de N_o e N , conforme mostrado a seguir. Usando-se a expressão integrada do modelo de Michaelis-Menten (Eq. 4.6), tem-se - Bailey, 1986:

$$X = \frac{N_o - N}{N_o} = \frac{V_{m\acute{a}x} * t}{N_o} - \frac{K_m}{N_o} \ln \frac{N_o}{N}, \text{ onde } X = f(t, N_o, N). \quad (\text{Eq. 4.6})$$

O aparente comportamento de primeira ordem deve, pois, resultar de uma combinação de efeitos difusivos e cinéticos. Contudo, tentativas de ajuste do modelo de primeira ordem foram insatisfatórias e, portanto, descartadas. A partir da constatação de que os dados experimentais obtidos para diferentes valores de N_o , quando expressos em termos de conversão praticamente se sobrepunham foi testada uma mudança de variável na qual N e P foram substituídos por N/N_o e P/N_o , em um modelo empírico com estrutura similar a do modelo de Michaelis-Menten com inibição pelo substrato e pelo produto (Eq. 4.4a ou 4.4b). Neste modelo, o comportamento da velocidade da reação segue linearmente o aumento da concentração de substrato, razão pela qual este modelo foi representado pela Eq. 4.7. Este fato permite que os dados experimentais representados na Figura 4.36 sejam adequadamente representados.

$$V = \frac{-dN}{dt} = N_o \left(\frac{K'_{Cat} * E * \frac{N}{N_o}}{K_m^{ap'} \left(1 + \frac{P}{N_o} \right) + \frac{N}{N_o} \left(1 + \frac{N}{K_s^{ap'}} \right)} \right) \quad (\text{Eq. 4.7})$$

Os valores utilizados para os parâmetros K'_{Cat} , $K_m^{ap'}$ e $K_s^{ap'}$ foram *numericamente* iguais àqueles de K_{cat} , K_m^{ap} e K_s^{ap} determinados anteriormente. Um fato que apontou nesta direção foi a constatação que os valores de velocidade fornecidos pela Eq. 4.7 deveriam ser os mesmos que aqueles fornecidos pela Eq. 4.4b quando N_o fosse igual a 1 mmol Lig./L_{reator}. Vale ressaltar, contudo, que as unidades destes dois grupos de parâmetros não são iguais. O ajuste do parâmetro $K_I^{ap'}$ foi efetuado de modo a minimizar o erro quadrático entre a resposta do modelo e os dados experimentais. Os valores dos parâmetros utilizados foram:

$$K_{cat} = 0,8 \text{ L/gEnz. * min}$$

$$K_m^{ap'} = 8,4 \text{ [adimensional]}$$

$$K_s^{ap'} = 258,2 \text{ [adimensional]}$$

$$K_I^{ap'} = 5,7 \times 10^{-3} \text{ [adimensional]}$$

Foram a seguir calculadas as velocidades para as diferentes concentrações iniciais, o que permitiu (após integração da Eq. 4.7) o cálculo das curvas $N_o-N = f(\text{tempo})$. A Fig. 4.37 (A) compara os resultados obtidos nessa simulação com os pontos experimentais. Na Figura 4.37 (B) estão representadas as quatro bateladas em termos de conversão. É interessante notar que este modelo gera apenas uma curva padrão (linha vermelha) que representa satisfatoriamente as quatro curvas experimentais no gráfico *conversão versus tempo*.

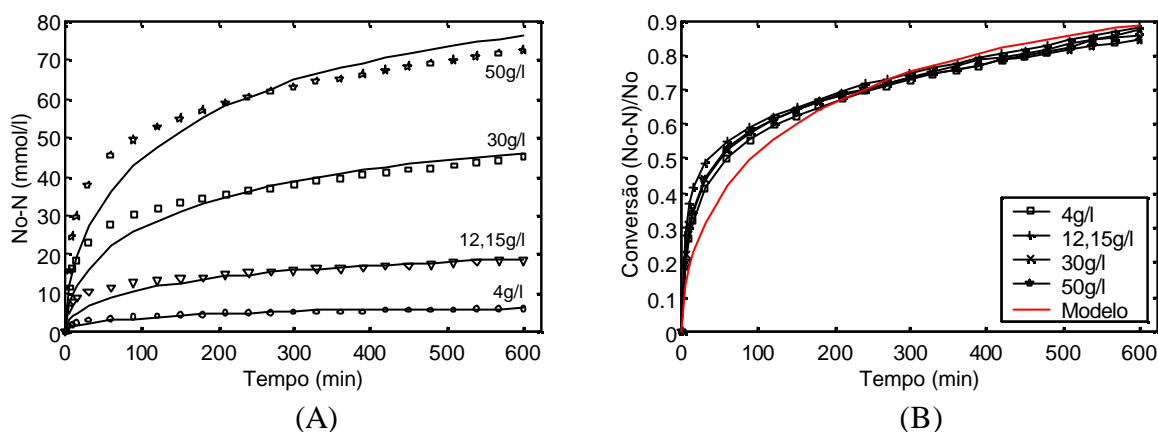


Figura 4.37: (A) Ajuste do modelo matemático representado pela Eq. 4.7 aos dados experimentais obtidos nas quatro bateladas de longa duração e (B) ajuste do modelo aos dados expressos em termos de conversão. (o) $N_o = 6,86 \text{ mmol Lig./L}_{\text{reator}}$; (∇) $N_o = 20,85 \text{ mmol Lig./L}_{\text{reator}}$; (?) $N_o = 51,48 \text{ mmol Lig./L}_{\text{reator}}$ e (\star) $N_o = 85,8 \text{ mmol Lig./L}_{\text{reator}}$.

Conforme pode ser observado (Figura 4.37) o modelo representa de forma satisfatória os dados experimentais para todas as bateladas ensaiadas. No entanto, uma melhor representação talvez pudesse ser obtida considerando-se a formação do produto reversível, diferentemente do modelo anteriormente testado. Assim, um novo modelo empírico baseado na Eq. 4.7 e na consideração de reversibilidade da formação do produto foi proposto. Este modelo está representado na Eq. 4.8 a seguir:

$$V = N_o \left(\frac{K'_{Cat} * E * \left(\frac{N}{N_o} - \frac{P/N_o}{K_{eq}} \right)}{K_m^{ap'} \left(1 + \frac{P/N_o}{K_I^{ap'}} \right) + \frac{N}{N_o} \left(1 + \frac{N/N_o}{K_S^{ap'}} + \frac{P/N_o}{K_J^{ap'}} \right)} \right) \quad (\text{Eq. 4.8})$$

Quando comparado ao modelo expresso pela Eq. 4.7, nota-se que esse novo modelo possui dois novos parâmetros, $K_J^{ap'}$ e K_{eq} . Os parâmetros K_{Cat}' , $K_m^{ap'}$ e $K_s^{ap'}$ utilizados neste modelo foram os mesmos do modelo anterior; K_{eq} foi calculado utilizando-se o máximo grau de hidrólise atingido com quimotripsina (17,7%)⁽¹⁾ e $K_I^{ap'}$ e $K_J^{ap'}$ foram determinados através do ajuste do modelo aos dados experimentais.

As Figuras 4.38 (A) e (B) mostram o ajuste do modelo representado pela Eq. 4.8 aos dados experimentais ($(N_o - N)$ versus t) e o ajuste feito para representar os dados em termos de conversão ($(N_o - N)/N_o$ versus t), respectivamente. Os valores de K_{eq} , $K_I^{ap'}$ e $K_J^{ap'}$ obtidos foram:

$$K_{eq} = 9,83 \text{ [adimensional]}$$

$$K_I^{ap'} = 7,8 \times 10^{-3} \text{ [adimensional]}$$

$$K_J^{ap'} = 0,36 \text{ [adimensional]}$$

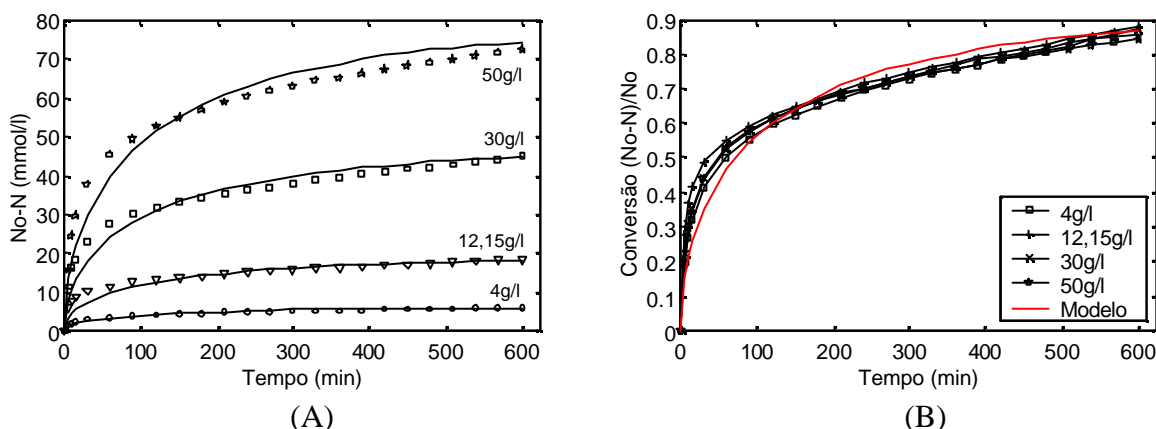


Figura 4.38: (A) Ajuste do modelo matemático representado pela Eq. 4.8 aos dados experimentais obtidos nas quatro bateladas de longa duração e (B) ajuste do modelo aos dados expressos em termos de conversão. (o) $N_o = 6,86 \text{ mmol Lig./L}_{\text{reator}}$; (∇) $N_o = 20,85 \text{ mmol Lig./L}_{\text{reator}}$; (?) $N_o = 51,48 \text{ mmol Lig./L}_{\text{reator}}$ e (\star) $N_o = 85,8 \text{ mmol Lig./L}_{\text{reator}}$.

⁽¹⁾ Cálculo do K_{eq} em termos de grau de hidrólise:

$$K_{eq} = \frac{[GH]_{\text{Máximo}}}{([GH]_{\text{Máx-Teórico}} - [GH]_{\text{Máximo}})} = \frac{17,7}{(19,5 - 17,7)} = 9,83$$

Analisando-se a Figura 4.38 percebe-se que o modelo da Eq. 4.8 ajusta-se de forma bastante satisfatória aos dados experimentais, utilizando-se apenas um valor para $K_I^{ap'}$ e um para $K_J^{ap'}$. Comparando-se os resultados mostrados na Figura 4.38 com os apresentados na Figura 4.37, pode-se observar que o ajuste feito pelo modelo da Eq. 4.8 conseguiu representar de forma mais adequada os 100 primeiros minutos de reação. No entanto, apesar dos bons ajustes utilizando estes dois modelos, outras abordagens foram também investigadas. A primeira delas tratava o sistema reacional em questão como sendo de ordem variável e, neste caso, o modelo era representado pela seguinte equação - Levenspiel, 1974:

$$V = k_1 N^n + k_2 \tag{Eq. 4.9}$$

Plotando-se a concentração de substrato (N) em função do tempo (Figura 4.39), obtinha-se o seguinte comportamento:

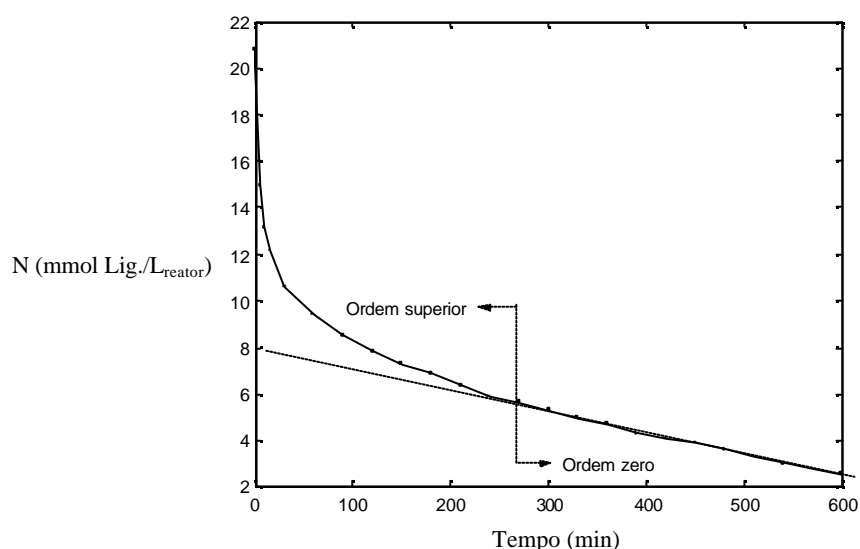


Figura 4.39: Comportamento de um sistema com ordem variável caracterizado pela mudança de alta ordem para baixa ordem quando a concentração de substrato diminui. Teste feito para $N_o = 20,85$ mmol Lig./L_{reator}.

A determinação da ordem superior foi feita para tempo reacional inferior a 270 minutos, a partir da metodologia exposta a seguir - Levenspiel, 1974:

$$V = kN^n \tag{Eq. 4.10}$$

Por separação e integração chega-se a:

$$N^{1-n} - N_o^{1-n} = (n - 1)kt \quad \text{para } n \neq 1 \tag{Eq. 4.11}$$

Rearranjando-se a Eq. 4.11, obtém-se:

$$kt = \frac{N^{1-n} - N_o^{1-n}}{n-1} \quad (\text{Eq. 4.12})$$

A Eq. 4.12 mostra dependência linear do termo à direita com o tempo. Assim, plotando-se essas duas grandezas seria possível determinar a ordem superior da reação. Foram testadas ordens de 2 a 5, mas serão apresentados apenas os resultados obtidos para ordens 3 e 4 - Figura 4.40 (A) e (B). Recorde-se, porém, que este modelo deveria ser ajustado apenas para os primeiros 270 minutos de reação, pois a partir daí, a reação comporta-se como de ordem zero.

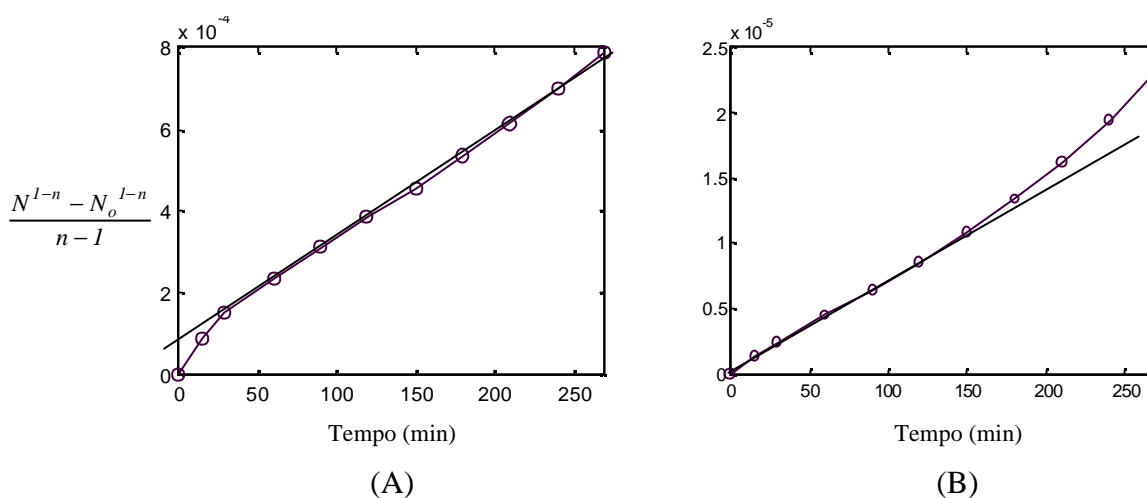


Figura 4.40: (A) Investigação da ordem 3 e (B) ordem 4. $N_o = 20,85$ mmol Lig./L_{reator}.

Como pode ser visto nas figuras acima, empregando-se ordem três não se obtém uma reta passando pela origem, o que ocorre quando ordem 4 é testada. Deste modo, a ordem superior da reação foi aqui determinada como sendo 4 e o modelo matemático utilizado foi definido como apresentado na Eq. 4.13:

$$V = k_1 N^n + k_2, \text{ com } n = 4 \quad (\text{Eq. 4.13})$$

Assim, como descrito anteriormente para o modelo de Michaelis-Menten com inibição simultânea pelo substrato e pelo produto, no modelo representado pela Eq. 4.13 também foi feita mudança de variável de N para N_o/N . A Eq. 4.14 mostra o novo modelo empírico obtido:

$$V = N_o \left(k_1 \left(\frac{N}{N_o} \right)^4 + k_2 \right) \quad (\text{Eq. 4.14})$$

As Figuras 4.41 (A) e (B) mostram os ajustes feitos utilizando-se o modelo da Eq. 4.14. As constantes k_1 e k_2 foram determinadas de modo a minimizar o erro quadrático de todos os ensaios e têm os seguintes valores:

$$k_1 = 0,046 \text{ min}^{-1}$$

$$k_2 = 2,53 \times 10^{-4} \text{ min}^{-1}$$

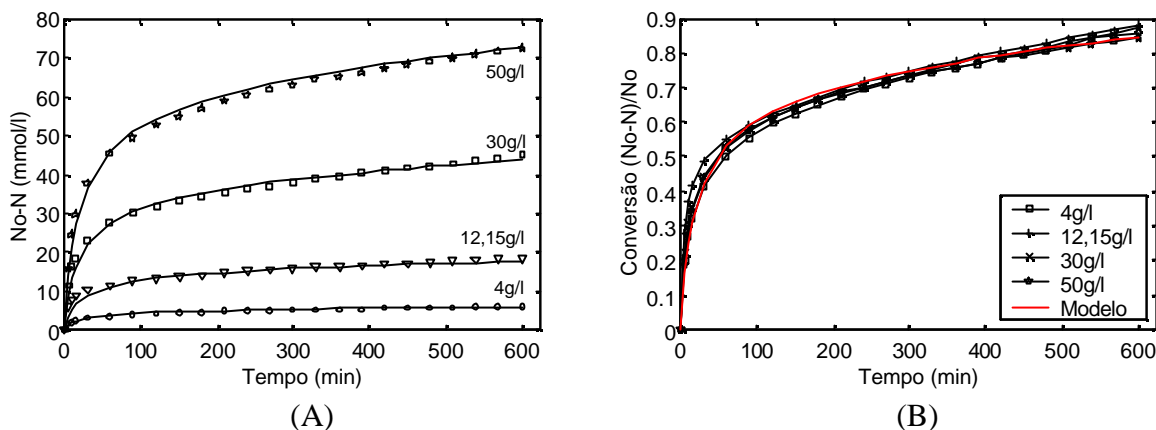


Figura 4.41: (A) Ajuste do modelo matemático representado pela Eq. 4.14 aos dados experimentais obtidos nas quatro bateladas de longa duração e (B) ajuste aos dados expressos em termos de conversão. (o) $N_o = 6,86 \text{ mmol Lig./L}_{\text{reator}}$; (∇) $N_o = 20,85 \text{ mmol Lig./L}_{\text{reator}}$; (?) $N_o = 51,48 \text{ mmol Lig./L}_{\text{reator}}$ e (\star) $N_o = 85,8 \text{ mmol Lig./L}_{\text{reator}}$.

Observando-se as Figuras 4.41 (A) e (B), percebe-se que este modelo representa de forma muito adequada os dados experimentais obtidos ao longo de todo o período reacional ensaiado, utilizando os mesmo valores de k_1 e k_2 em todos os ensaios. O ajuste feito aos dados representados em termos de conversão confirmou que, de fato, a utilização deste modelo conduz a boas estimativas da concentração de produto para todas as situações.

Outra abordagem utilizada seguiu procedimento geral recomendado por Levenspiel (1974), considerando-se que a conversão (X) era apenas função do tempo (e não de N). Assim, supôs-se que:

$$X = k_1 t^n, \text{ sendo } X \text{ a conversão da reação} \quad (\text{Eq. 4.15})$$

Como X é definido como sendo $(N_o - N)/N_o$, tem-se:

$$\frac{N_o - N}{N_o} = k_1 t^n \rightarrow \frac{P}{N_o} = k_1 t^n \rightarrow P = N_o k_1 t^n \quad (\text{Eq. 4.16})$$

Assim, aplicando o \ln à equação 4.16, obtém-se:

$$\ln(P) = \ln(N_o k_1) + n \ln(t) \quad (\text{Eq. 4.17})$$

Plotando-se $\ln(P)$ versus $\ln(t)$, determinou-se o valor de n através do coeficiente angular das retas representadas na Figura 4.42.

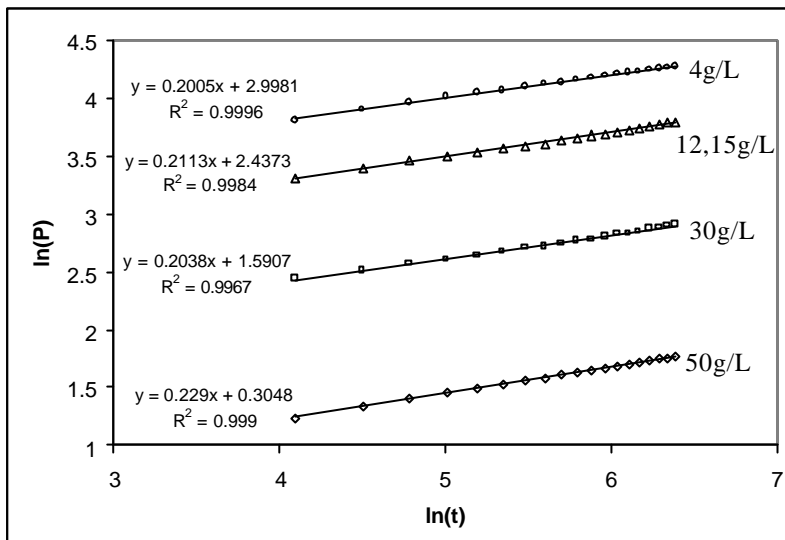


Figura 4.42: Determinação do valor n (Eq. 4.17) através dos coeficientes angulares das retas de $\ln(P)$ versus $\ln(t)$, para as quatro bateladas de longa duração realizadas: (o) $N_o = 6,86$ mmol Lig./L_{reator}; (Δ) $N_o = 20,85$ mmol Lig./L_{reator}; (?) $N_o = 51,48$ mmol Lig./L_{reator} e (\star) $N_o = 85,8$ mmol Lig./L_{reator}.

A linearização dos dados obtidos para as quatro bateladas ensaiadas permitiu determinar um valor médio para n de 0,2. Assim, voltando à Eq. 4.16, tem-se:

$$P = N_o k_1 t^n \rightarrow \frac{P}{N_o} = (kt)^n, \text{ fazendo } k_1 = k^n$$

$$\left(\frac{P}{N_o} \right)^{1/n} = kt \quad (\text{Eq. 4.18})$$

Como $n = 0,2$; $1/n = 1/0,2$. Substituindo $1/0,2$ na Eq. 4.18, resulta:

$$\left(\frac{P}{N_o} \right)^5 = kt \quad (\text{Eq. 4.19})$$

Diferenciando a Eq. 4.19 e agrupando os valores constantes que surgem em uma nova constante k_2 , obtém-se finalmente o modelo matemático:

$$V = \frac{dP}{dt} = \frac{k_2 N_o}{\left(\frac{P}{N_o} \right)^4} \quad (\text{Eq. 4.20})$$

Obtido o modelo matemático, este foi ajustado aos dados experimentais. O valor de k_2 foi determinado, $k_2 = 1,51 \times 10^{-4} \text{ min}^{-1}$, e os resultados dos ajustes estão apresentados nas Figuras 4.43 (A) e (B):

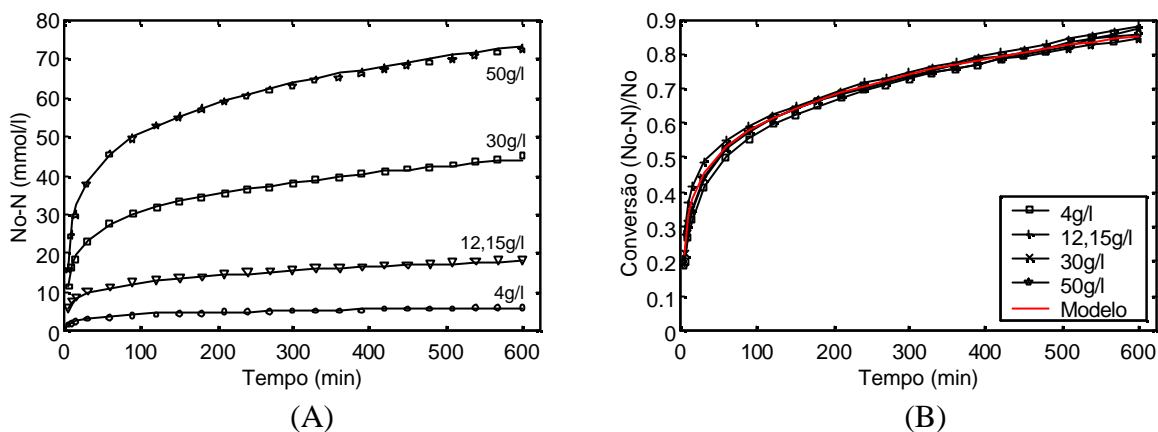


Figura 4.43: (A) Ajuste do modelo matemático representado pela Eq. 4.20, para tempos reacionais superiores a 5 minutos, aos dados experimentais nas quatro bateladas de longa duração e (B) ajuste aos dados expressos em termos de conversão. (o) $N_o = 6,86 \text{ mmol Lig./L}_{\text{reator}}$; (∇) $N_o = 20,85 \text{ mmol Lig./L}_{\text{reator}}$; (?) $N_o = 51,48 \text{ mmol Lig./L}_{\text{reator}}$ e (\star) $N_o = 85,8 \text{ mmol Lig./L}_{\text{reator}}$.

Como observado nas Figuras 4.43, o modelo representado pela Eq. 4.20 ajusta-se perfeitamente aos dados experimentais. Utilizando-se este modelo para representar os dados de conversão da reação, Figura 4.43 B, observa-se que o ajuste aproxima-se muito da curva dos valores médios dos experimentos. Ressalte-se que foram utilizados apenas dois parâmetros neste modelo, sendo um deles N_o .

Devido ao fato de existir no denominador o termo do produto, P , a aplicabilidade do modelo fica restrita a valores de P não muito próximos a zero. Em consequência dessa limitação, buscou-se uma outra abordagem para modelar os cinco primeiros minutos de reação. Uma vez que nesse período as proteínas apresentam massa molecular elevada uma provável situação seria o processo difusivo-reativo estar sendo controlado pela difusão. Nesse caso, como o fluxo difusivo é proporcional à N , o que explicaria uma aparente cinética de primeira ordem para a reação. Assim o modelo composto que representaria a reação em toda sua extensão é dado pelas duas equações a seguir:

$$V = k_1 N \quad \text{para tempo} < 5 \text{ min} \quad (\text{Eq. 4.21})$$

$$V = \frac{k_2 N_o}{\left(\frac{P}{N_o}\right)^4} \quad \text{para tempo} > 5 \text{ min} \quad (\text{Eq. 4.22})$$

onde $k_1 = 0,0503 \text{ min}^{-1}$ e $k_2 = 1,51 \times 10^{-4} \text{ min}^{-1}$

Os resultados obtidos combinando-se estas duas equações estão mostrados nas Figuras 4.44 A e B:

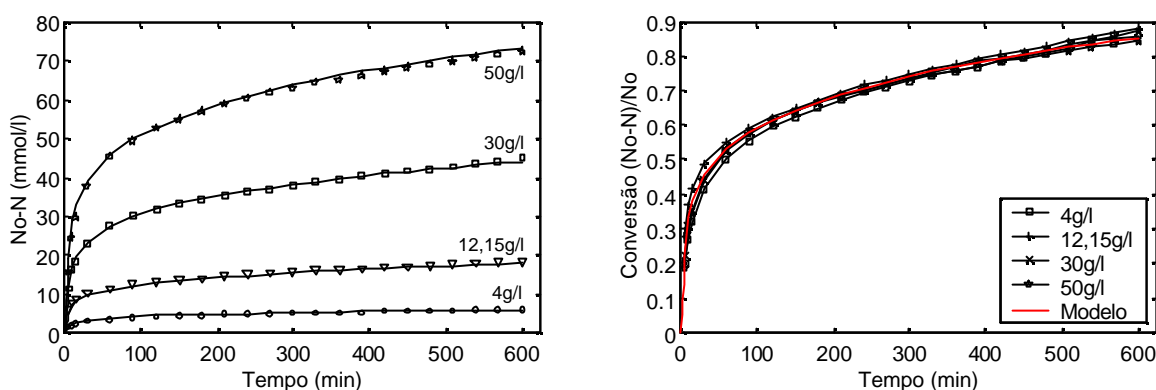
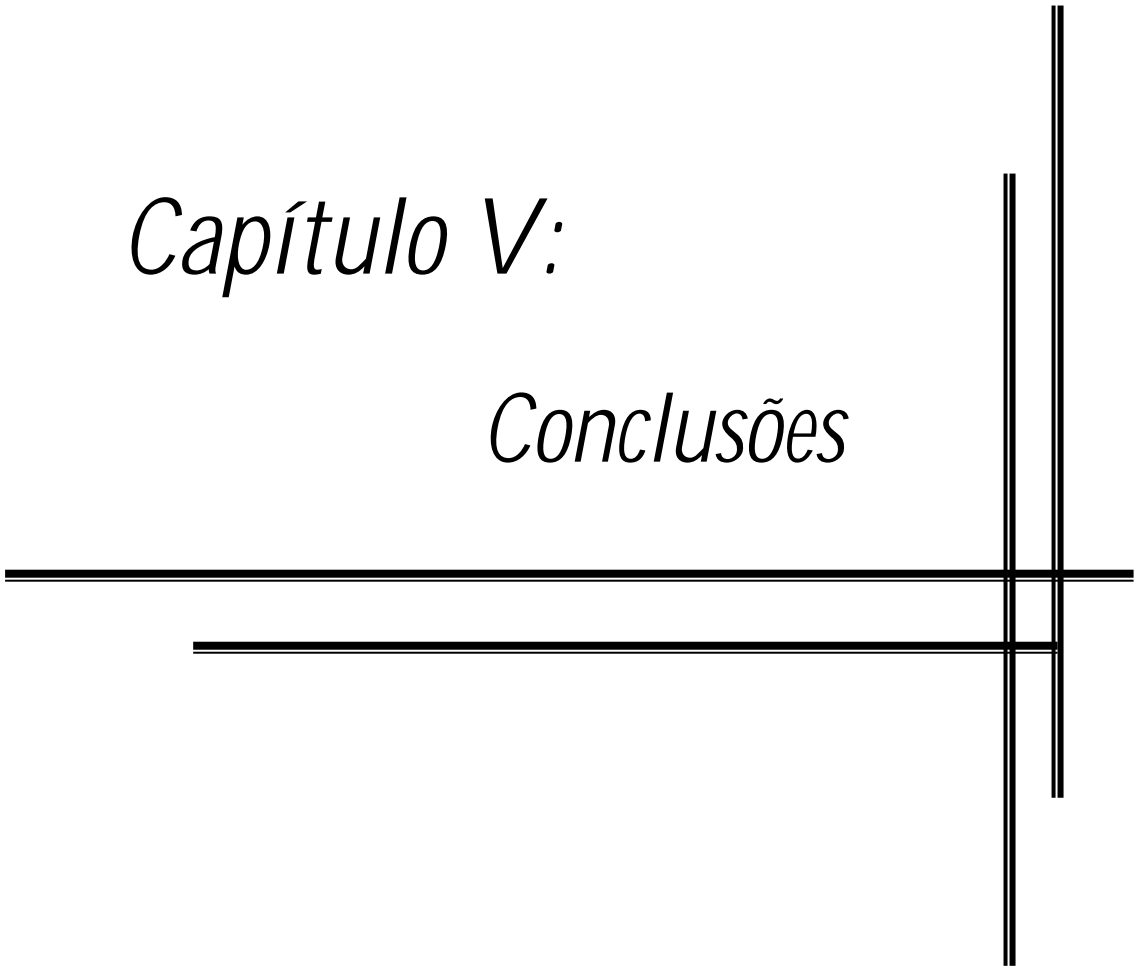


Figura 4.44: (A) Ajuste do modelo matemático representado pelas Eqs. 4.20 e 4.21 aos dados experimentais nas quatro bateladas de longa duração e (B) ajuste aos dados expressos em termos de conversão. (o) $N_o = 6,86 \text{ mmol Lig./L}_{\text{reator}}$; (∇) $N_o = 20,85 \text{ mmol Lig./L}_{\text{reator}}$; (?) $N_o = 51,48 \text{ mmol Lig./L}_{\text{reator}}$ e (\star) $N_o = 85,8 \text{ mmol Lig./L}_{\text{reator}}$.

A combinação das equações 4.20 e 4.21 resultou em um modelo que fornece excelentes ajustes aos dados experimentais para todo o período reacional ensaiado (10 horas de reação). Acredita-se que esse modelo seja perfeitamente aplicável em situações reais de processo (reatores com grande volume), onde a concentração inicial de substrato seja conhecida e se encontre dentro dos limites aqui estudados.

Capítulo V:

Conclusões



5. CONCLUSÕES

O projeto global que previa a obtenção de um hidrolisado a partir das proteínas do soro de queijo através de hidrólises seqüenciais e controladas com tripsina, quimotripsina, carboxipeptidase A (CPA) e Alcalase[®], imobilizadas em gel glioxil-agarose, mostrou-se plenamente factível. As etapas enfocadas neste trabalho, hidrólises com tripsina e quimotripsina, foram estudadas variando-se o grau de hidrólise (GH) inicial com tripsina de 0 a 12% e submetendo-se, em seguida, esses hidrolisados à ação da quimotripsina. Esse estudo mostrou que hidrólise prévia com tripsina desfavorece a ação seqüencial da quimotripsina, contrariamente ao que se havia previsto inicialmente. A quimotripsina parece ter maior afinidade por moléculas dimensionalmente grandes e, desta forma, sua ação direta sobre as proteínas do soro (55°C, pH 8, alta concentração de enzima no reator (3,05mgEnz./mL de solução), tempo reacional prolongado (10 horas) e GH de 12,4%) permitiu disponibilização de praticamente 100% dos resíduos de Phe na porção carboxílica terminal dos peptídeos gerados, que representam o substrato para a CPA, terceira etapa de hidrólise do projeto global. Nesta etapa, aqui utilizada como método analítico para acompanhamento da eficiência da hidrólise com quimotripsina, também se utilizou alta concentração enzimática no reator (200U_{H-PHE}/gProteína) e tempo reacional de 10 horas. Nessas condições, toda a Phe disponibilizada pela ação da quimotripsina foi removida das cadeias protéicas, resultando em um hidrolisado contendo aproximadamente 85% de polipeptídeos com massa molecular superior a 1046Da e 15% de uma mistura de pequenos peptídeos e aminoácidos livres. Os principais resultados obtidos em cada etapa deste trabalho serão apresentados a seguir na seqüência com que os experimentos foram realizados.

5.1. Preparação e Caracterização de Derivados Tripsina-Sepabeads

A preparação de derivados de tripsina sobre sepabeads a 25°C, pH 8 e 24 horas de tempo de contato enzima-suporte, utilizando-se um processo constituído de duas etapas (adsorção física seguida de imobilização covalente), conduziu a rendimentos de imobilização de 100% e completa recuperação da enzima nos três diferentes suportes utilizados (*Sepabeads-IDA-Glicina*, *Sepabeads-IDA-Cu²⁺-Glicina* e *Sepabeads-Ida-Cu²⁺-pH=9,5-Glicina*). Fatores de estabilização a 55°C de aproximadamente 133, 89 e 137 vezes, foram obtidos para tripsina imobilizada sobre os três suportes anteriormente

citados, respectivamente, em relação à enzima solúvel. Esses valores mostram que houve considerável enrijecimento da molécula de enzima através das ligações multipontuais estabelecidas durante o processo de imobilização empregado. O desempenho do melhor derivado preparado, *tripsina-(Sepabeads-IDA-Glicina)*, na hidrólise da caseína (substrato macromolecular) foi comparado ao da enzima solúvel e ao do derivado tripsina-glioxil-agarose (sabidamente eficiente na hidrólise de proteínas), tendo-se observado que a enzima solúvel promove completa degradação da molécula de substrato. Este fato, porém, não foi observado quando a reação foi catalisada pelas enzimas imobilizadas, onde uma fração do substrato permanece intacta até o final da reação, embora maior fracionamento do substrato tenha sido obtido quando o derivado *tripsina-(Sepabeads-IDA-Glicina)* foi utilizado. Esses resultados indicam que a utilização desses derivados na hidrólise de macromoléculas parece depender do tipo e da constituição do substrato a ser hidrolisado, e não apenas de sua massa molecular. Esta indicação é reforçada pelo fato de derivados tripsina-glioxil terem sido satisfatoriamente empregados na hidrólise das proteínas do soro, atingindo-se em tais ensaios mesmos graus de hidrólise com enzima solúvel e imobilizada. Assim, o emprego do derivado tripsina-sepabeads deve ser estudado caso a caso, considerando-se as características específicas de cada sistema.

5.2. Preparação e Caracterização de Derivados Tripsina-Quitosana

O protocolo utilizado para imobilização de tripsina sobre matrizes de quitosana ativadas com glutaraldeído (coagulação em NaOH de 0,1 ou 1N e ativação em pH 7 ou 10) conduziu a rendimentos de imobilização de 100%. No entanto, quando o protocolo de preparação de gel glioxil-agarose foi utilizado para preparação de uma matriz de quitosana, apenas 60% da atividade inicial oferecida para imobilização desapareceu do sobrenadante, embora toda a atividade desaparecida tenha sido recuperada no gel após imobilização. Derivados preparados sobre matrizes ativadas com glutaraldeído a pH 7 permitiram 100% de rendimento e completa recuperação da enzima nos géis até carga enzimática de 40mgEnz./gGel. Porém, não se determinou com os experimentos realizados a carga enzimática necessária para saturar os diferentes géis preparados. Fatores de estabilização em torno de 460 vezes foram obtidos a 40°C para derivados quitosana-glutaraldeído (1N e pHs 7 e 10) em relação à enzima solúvel. A 70°C, o derivado quitosana-glioxil mostrou-se aproximadamente 13 vezes mais estável que

derivados quitosana-glutaraldeído. Já em meio fortemente alcalino (pH 11) este derivado apresentou estabilidade em relação à enzima solúvel (30 vezes) muito próxima daquela observada para o derivado tripsina-glioxil-agarose (34 vezes). Esses resultados indicam que o derivado tripsina-quitosana-glioxil é bastante promissor, visto que a estabilidade operacional das enzimas imobilizadas é um dos principais requisitos para sua utilização a nível industrial. Não foram observados efeitos de partição de íons H^+ nas matrizes de quitosana, pois tanto a enzima solúvel quanto a imobilizada apresentou máxima atividade de hidrólise em pH 9. Contudo, a estabilização alcançada pelos derivados tripsina-quitosana permitiu deslocamento de 10°C na temperatura para máxima atividade de hidrólise (enzima solúvel 40°C). O melhor derivado tripsina-quitosana preparado (coagulação em NaOH 0,1N e ativação a pH 7) mostrou desempenho similar ao da enzima solúvel na hidrólise das proteínas do soro, atingindo após aproximadamente 8,5 horas de reação grau de hidrólise máximo (GH de 12%).

5.3. Preparação e Caracterização de Derivados Tripsina e Quimotripsina sobre Gel Glioxil-Agarose

Rendimentos de imobilização e recuperação das enzimas no gel de aproximadamente 100% foram obtidos após imobilização de tripsina e quimotripsina sobre agarose ativada com glicidol e oxidada com $NaIO_4$ para obtenção de 75 μ moles de aldeído/mL de gel, a 25°C e pH 10,05. A utilização deste protocolo promoveu um significativo enrijecimento das moléculas de enzima, permitindo obtenção de fatores de estabilização da ordem de 3920 e 14535 vezes para tripsina e quimotripsina, respectivamente. Esse alto grau de estabilização foi devido à formação de grande número de ligações multipontuais estabelecidas entre a enzima e o suporte, o que pôde ser confirmado por resultados obtidos através de hidrólises ácidas das enzimas solúveis e derivados estabilizados. Esses experimentos mostraram que 64,76% e 72,15% do total de lisinas presentes na tripsina e na quimotripsina, respectivamente, estavam envolvidas nas multiligações enzima-suporte. Em consequência dos altos fatores de estabilização obtidos, os derivados apresentaram elevação na temperatura e no pH para máxima atividade de hidrólise dos substratos sintéticos: 85°C e pH 11 para tripsina e 70°C e pH 10,5 para quimotripsina.

5.4. Hidrólises Sequenciais das Proteínas do Soro

Estudo da hidrólise sequencial das proteínas do soro mostrou que ação direta da quimotripsina (55°C, pH 8 e $\text{GH}_{\text{quimotripsina}}$ de 12,4%) sobre essas proteínas seguida de hidrólise com carboxipeptidase A (CPA), a 45°C e pH 7, empregando-se tempos prolongados de reação (10 horas) e altas concentrações de enzima no meio reacional (quimotripsina: 3,05mgEnz./mL de solução e CPA 200U_{H-PHE}/gProteína), são condições que conduzem à liberação de praticamente 100% dos resíduos de fenilalanina das cadeias protéicas e geração de 15,5% de peptídeos com massa molecular (MM) inferior a 1046Da. Essas condições são possíveis, visto que as enzimas apresentam alta estabilidade na temperatura e pH empregados.

5.5. Estudo Cinético da Hidrólise das Proteínas do Soro Catalisada pela Quimotripsina

Experimentos de velocidades iniciais utilizando concentração fixa de enzima (3mgEnz./mL de solução) e diferentes concentrações iniciais de substrato (soro 2; 5; 12,15; 20; 30; 40; 50 e 56,33g/L) foram realizados e a estes dados o modelo de Michaelis-Menten com inibição pelo substrato foi ajustado, permitindo determinação dos parâmetros cinéticos K_{Cat} , K_m^{ap} e K_S^{ap} , cujos valores são:

$$K_{Cat} = 0,8 \text{ mmol Lig./gEnz.} \cdot \text{min}$$

$$K_m^{ap} = 8,4 \pm 0,82 \text{ mmol Lig./L}_{\text{reator}}$$

$$K_S^{ap} = 258,2 \pm 41,32 \text{ mmol Lig./L}_{\text{reator}}$$

Cinética de Michaelis-Menten considerando apenas inibição pelo substrato e combinando inibições pelo substrato e pelo produto não se mostraram adequadas para representar os dados experimentais de formação de produto ao longo do tempo, em ensaios em batelada de longa duração (10 horas).

O modelo empírico representado pela Eq. 4.7, que se assemelha ao modelo de Michaelis-Menten com inibição simultânea pelo substrato e pelo produto, embora tenha representado de forma razoável o período final da reação, não forneceu um bom ajuste para as primeiras horas da mesma. O valor do K_I^{ap} utilizado foi de $5,7 \times 10^{-3}$ [adimensional].

Já o modelo representado pela Eq. 4.8, que considera reversível a formação de produto, envolve dois parâmetros a mais que o modelo da Eq. 4.7, $K_J^{ap'}$ e K_{eq} . Este modelo forneceu um ajuste um pouco melhor aos dados experimentais para toda a extensão da reação utilizando os seguintes valores para os parâmetros envolvidos:

$$K_{eq} = 9,83 \text{ [adimensional]}$$

$$K_I^{ap'} = 7,8 \times 10^{-3} \text{ [adimensional]}$$

$$K_J^{ap'} = 0,36 \text{ [adimensional]}$$

Um modelo empírico de ordem variável empregando apenas três parâmetros (Eq. 4.14) também foi investigado seguindo sugestão encontrada na literatura. Este modelo indicou mudança de quarta ordem para ordem zero ao longo das 10 horas de reação, tendo-se obtido um bom ajuste aos dados das bateladas de longa duração. Os valores dos parâmetros utilizados neste modelo são:

$$n = 4$$

$$k_1 = 0,046 \text{ min}^{-1}$$

$$k_2 = 2,53 \times 10^{-4} \text{ min}^{-1}$$

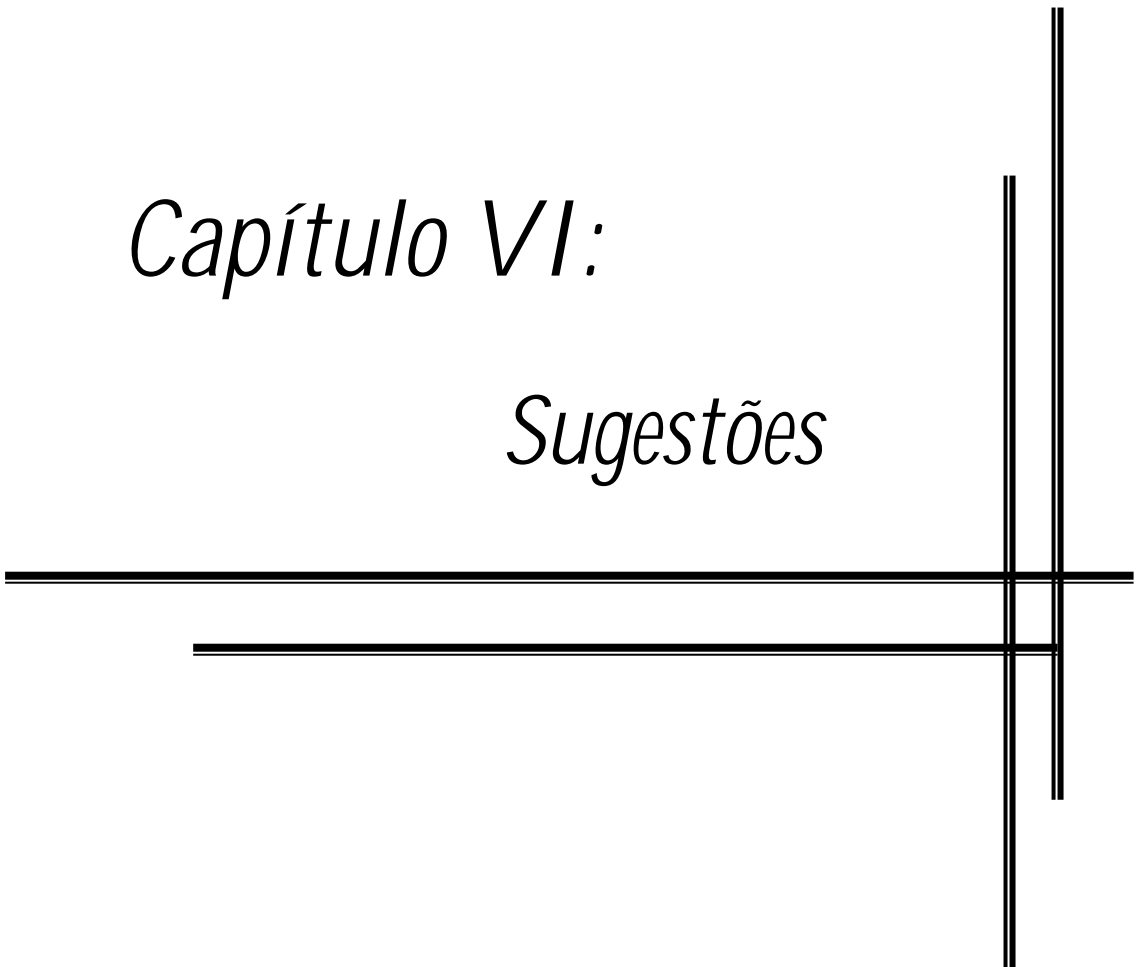
A última abordagem utilizada para determinação da cinética da hidrólise das proteínas do soro valeu-se da constatação que quando expressos em termos de conversão todos os dados experimentais podiam ser representados por uma única curva, uma vez que a conversão (X) era apenas função do tempo (e não de N). Ressalte-se que o modelo obtido (Eq. 4.20) possui apenas dois parâmetros, sendo um deles N_o . Esta abordagem resultou em um perfeito ajuste aos dados experimentais para tempo de reação superiores a cinco minutos. Esta limitação se deveu à presença do termo do produto no denominador da equação citada. Assim, um modelo composto foi gerado de modo a permitir representação de toda a extensão da reação e, neste caso, os 5 primeiros minutos foram representados por uma cinética de primeira ordem (período onde a velocidade da reação estava sendo controlada pela difusão externa) e o período restante pelo modelo da Eq. 4.20. Os dados experimentais de bateladas de longa duração (10 horas) foram perfeitamente ajustados utilizando-se a combinação de duas diferentes equações de velocidade: $V = k_1 N$ para tempos menores que 5 minutos e

$V = k_2 N_o / \left(\frac{P}{N_o} \right)^4$ para tempos superiores a 5 minutos, onde $k_1 = 0,0503 \text{ min}^{-1}$ e $k_2 = 1,51 \times 10^{-4} \text{ min}^{-1}$.

O excelente ajuste fornecido por este modelo leva a crer que ele possa ser perfeitamente aplicável em situações reais de processo (reatores com grande volume), onde a concentração inicial de substrato seja conhecida e se encontre dentro dos limites aqui estudados.

Capítulo VI:

Sugestões



6. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Considerando-se os resultados obtidos durante a realização deste trabalho, algumas atividades podem ser sugeridas:

↳ Realização de novos ensaios de hidrólise da caseína utilizando derivados de tripsina preparados sobre gel glioxil-agarose e sepabeads. Nesses experimentos condições de operação mais drásticas como altas concentrações de enzima imobilizada (em ambos os suportes), temperatura e/ou tempos reacionais prolongados deveriam ser empregadas visando-se confirmar se em tais condições a fração de caseína não atacada pelas moléculas de enzima imobilizada nos ensaios aqui realizados ainda permaneceria intacta. Uma vez que a eficiência do derivado tripsina-glioxil-agarose na hidrólise de proteínas já foi devidamente confirmada, esperava-se completo fracionamento desta proteína pela ação deste derivado.

↳ Completa caracterização das matrizes de quitosana preparadas com relação à distribuição de tamanho de poros, área superficial e morfologia (através de microscopia eletrônica de varredura - MEV), para melhor compreensão do comportamento dessas matrizes no processo de imobilização de enzimas.

↳ Estudo da preparação de matrizes quitosana-glioxil visando obtenção de um protocolo otimizado para produção de derivados estabilizados sobre este suporte, uma vez que a utilização de condições não otimizadas já conduziu a derivados com estabilidade apreciável. Acredita-se que protocolo devidamente modificado deverá resultar em melhores rendimentos de imobilização e produção de derivados com estabilidade comparável àquela observada para derivados tripsina-glioxil-agarose.

↳ Investigação da carga máxima capaz de ser imobilizada nas matrizes de quitosana ativadas tanto com glutaraldeído quanto com glicidol, uma vez que a nível industrial é desejável a utilização de derivados altamente carregados.

↳ Ensaios cinéticos para determinação de parâmetros como $V_{máx}$ e K_m para as diferentes formas da enzima poderiam ser realizados já que a comparação entre tripsina solúvel, derivados tripsina-sepabeads ou tripsina-quitosana e derivados tripsina-glioxil-agarose foi baseada apenas na estabilidade térmica e na atividade proteolítica frente a substratos macromoleculares.

↳ Imobilização e estabilização de outras enzimas, como a quimotripsina, sobre gel quitosana-glioxil, que aqui se mostrou um suporte bastante promissor. A obtenção desses derivados permitiria execução do projeto global no qual está inserido este trabalho, com redução de custos, já que a quitosana é um suporte barato e amplamente disponível em território nacional.

↳ Otimização das hidrólises sequenciais com quimotripsina e carboxipeptidase A no que se refere à concentração de enzimática no meio reacional, pois altas concentrações de enzima no meio conduziriam a máximas conversões em menor tempo de reação, o que, por sua vez, conduziria à redução nos custos globais do processo. Este procedimento é plenamente possível, uma vez que as enzimas imobilizadas envolvidas mostraram-se bastante estáveis nas condições de pH e temperatura aqui empregadas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDEL-NABIS, M.; ISMAIL, A-M. S.; ABDEL-FATTAH, A. M.; ABDEL-FATTAH, A. F. Preparation and Some Properties of Immobilized *Penicillium funiculosum* 258 Dextranase. *Process Biochemistry*, vol. 34, pp. 391-398, 1999.
- ABELES, R. H.; FREY, P. A.; JENCKS, W. P. *Biochemistry*. Jones (Boston) and Bartlett Publishers (London), USA, 1996.
- ADLER-NISSEN, J. *Enzymic Hydrolysis of Food Proteins*. Elsevier Applied Science Publishers, London and New York, 1986.
- ADRIANO, W. S.; SILVA, J. A. & GONÇALVES, L. R. B. Estudo da Imobilização de Penicilina G Acilase em Quitosana: Desenvolvimento de um Novo Biocatalisador para Produção de Antibióticos Lactâmicos. In: *Anais do Simpósio Nacional de Fermentações*, Florianópolis- SC, 2003.
- ALAIS, C. Princípios de Técnica Lechera. *Ciência de La Leche*, Editorial Reverte, Barcelona, 1985.
- AMBER, R. P. Carboxypeptidase A and B. *Methods Enzymology*, vol. 25 B, pp. 261-272, 1972.
- ANTHONSEN, M. W. & SMIDSRØD, O. Hydrogen Ion Titration of Chitosans with Varying Degrees of N-Acetylation by Monitoring Induced ¹H-NMR Chemical Shifts. *Carbohydrate Polymers*, vol. 26, pp. 303-305, 1995.
- ARRUDA, E. J. Concentração e Purificação de β-Amilase de Extrato de Soja por Adsorção em Gel de Afinidade Quitosana-Fenilboronato. *Tese de Doutorado - Unicamp*, Campinas-SP, 1999.
- BAILEY, J. E. & OLLIS, D. F. *Biochemical Engineering Fundamentals*. Mcgraw-Hill Book Company, Second Edition, 1986.
- BIDLINGMEYER, B. A., *Practical HPLC Methodology and Applications* – John Wiley & Sons, Inc., 1992.
- BLANCH, H. W. & CLARK, D. S. *Biochemical Engineering*. Marcel Dekker, Inc. EUA.1997.
- BLANCO, R.M. & GUISÁN, J.M. Stabilization of enzymes by multipoint covalent attachment to agarose-aldehyde gels. Borohydride reduction of trypsin-agarose derivatives. *Enzyme Microb. Technol.*, vol. 11, pp. 360-366, June, 1989.
- BOUNOUS, G.; BATIST, G. & GOLD, R. Whey Proteins in Cancer Prevention. *Cancer Letters*, nº 57, pp. 91-94, 1991.
-

- CARDIAS, H. T. C. Estudo da Imobilização Multipontual de Penicilina G Acilase em Sílica Macroporosa Ativada com Glutaraldeído. *Dissertação de Mestrado - UFSCar*, São Carlos-SP, 1996.
- ÇETINUS, S. A. & ÖZTOP, H. N. Immobilization of Catalase on Chitosan Film. *Enzyme and Microbial Technology*, vol. 26, pp. 497-501, 2000.
- CUSTÓDIO, M. F. Hidrólise Enzimática das Proteínas do Soro de Leite: Caracterização Cinética e Condições Ótimas de Temperatura. *Dissertação de Mestrado - UNESP*, Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Ciências dos Alimentos, Araraquara-SP, 2001.
- FERNANDEZ-SANCHEZ, V. M., Difusão de Aminoácidos e Proteínas em Partículas de Gel de Agarose. *Dissertação de Mestrado - UFSCar*, São Carlos-SP, 2000.
- GALVÃO, C. M. A. Hidrólise de Proteínas do Soro de Queijo com Tripsina e Quimotripsina Livres e Imobilizadas. *Dissertação de Mestrado - UFSCar*, São Carlos-SP, 2000.
- GALVÃO, C. M. A.; SILVA, A. F. S.; CUSTÓDIO, M. F.; MONTI, R. & GIORDANO, R. L. C. Controlled Hydrolysis of Cheese Whey Proteins using Trypsin and α -Chymotrypsin. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, vol. 91-93, pp. 761-776, 2001.
- GALVÃO, C. M. A. & GORDANO, R. L. C. Desempenho de Tripsina Imobilizada Multipontualmente em Gel de Quitosana na Hidrólise de Proteínas do Soro de Queijo. In: *Anais do Simpósio Nacional de Fermentações*, Florianópolis- SC, 2003.
- GONZÁLEZ SISO, M. I. The Biotechnological Utilization of Cheese Whey: A Review. *Bioresource Technology*, vol. 57, pp. 1-11, 1996.
- GONZÁLEZ-TELLO, P.; CAMACHO, F.; JURADO, E.; PÁEZ, M. P. & GUADIX, E. M. Enzymatic Hydrolysis of Whey Proteins: I. Kinetic Models. *Biotechnology and Bioengineering*, vol. 44, pp. 523-528, 1994.
- GRAPPIN, R. & RIBADEAU-DUMAS, B. *Advanced Dairy Chemistry 1 - Proteins*. Fox, Ed: Blackie Academic Professional, pp. 1-62, 1992.
- GUISÁN, J. M. Aldehyde-Agarose Gels as Activated Supports for Immobilization-Stabilization of Enzymes. *Enzyme Microb. Technol.*, vol. 10, pp. 375-382, 1988.
- GUISÁN, J. M.; LAFUENTE, R. F.; RODRIGUES, V.; BASTIDA, A.; BLANCO, R. M. & ALVARO, G. Enzyme Stabilization by Multipoint Attachment to activated Pre-Existing Supports. Stability and Stabilization of Enzymes. *Proceedings of an International Symposium held in Maastricht*, The Netherlands, 22-25, November, 1992.
-

- GUISÁN, J. M.; BASTIDA, A.; CUESTA, C.; LAFUENTE, R. F. & ROSELL, C. M. Immobilization-Stabilization of α -Chymotrypsin by Covalent Attachment to Aldehyde-Agarose Gels. *Biotechnology and Bioengineering*, vol. 38, pp. 1144-1152, 1991.
- ILLANES, A. *Biotecnologia de Enzimas*. Ediciones Universitarias de Valparaíso de la Universidad Católica de Valparaíso, 1994.
- INTERNET: <http://www-ang.kfunigraz.ac.at/~binder/thesis/node41.html>
- INTERNET: <http://www.cnpqgl.embrapa.br/producao/producao.php>
- INTERNET: <http://www.diaion.com>
- INTERNET: <http://www.din.uem.br/ia/neurais/#indice>
- INTERNET: <http://www.meadjohnson.com>
- INTERNET: http://www.mpcfaculty.net/mark_bishop/chymotrypsin.htm
- INTERNET: http://www.portaldovoluntario.org.br/sala/exibe_art.asp?id=5834, matéria publicada em 17/06/2004.
- JORNAL DA UNICAMP. Matéria: *A Nata do Soro - Proteína Retirada de Subproduto do Leite Reforça Defesa do Organismo*, vol. 194, ANO XVII, 14 a 20 de outubro/2002.
- JULIANO, A. M. M.; PETRUS, J. C. C. & TORRANO, A. D. M. Recuperação por Ultrafiltração das Proteínas do Soro para Produção de Queijos. *Rev. Instit. Latic. Cândido Tostes*, vol. 42, nº 251, pp. 3-6, 1987.
- KANANEN, A.; SAVOLAINEN, J.; MÄKINEN, J.; PERTTILÄ, U.; MYLLYKOSKI, L. & PIHLANTO-LEPPÄLÄ, A. Influence of Chemical Modification of Whey Protein Conformation on Hydrolysis with Pepsin and Trypsin. *International Dairy Journal*, vol. 10, pp. 691-697, 2000.
- KAUFMAN, S. An Evaluation of the Possible Neurotoxicity of Metabolites of Phenylalanine. *J. Pediatr.*, vol. 114, nº 5, pp. 895-900, 1989.
- KENNEDY, J. F. Enzyme Technology, vol. 7, In: REHM, H. J., REED, G. *Biotechnology*, VCH, Weinheim, 1987.
- KENNEDY, J. F.; WHITE, C. A. & MELO, E. H. M. The Immobilization of Enzymes and Cells. *Chimicaoggi*, pp. 21-29, 1988.
- KOSIKOWSKI, F.V. Whey Utilization and Whey Products. *Journal of Dairy Science*, vol. 62, pp. 1149-1160, 1979.
-

- KURITA, K. Chemistry and Application of Chitin and Chitosan. *Polymer Degradation and Stability*, vol. 59, pp. 117-120, 1998.
- LARA, M. G. Estudo das Condições de Obtenção de um Hidrolisado Enzimático de Proteínas de Soro de Leite com Baixo Teor de Fenilalanina. *Dissertação de Mestrado - USP*, Ribeirão Preto-SP, 1997.
- LEHNINGER, N. D.; COX, M. M. *Lehninger Principles of Biochemistry*. Worth Publishers, Third Edition, New York, 2000.
- LEVENSPIEL, O. Engenharia das Reações Químicas. Ed. Edgard Blucher e Ed. Da USP, 1974.
- MACKIE, I. M. Fish Protein Hydrolysates. *Process Biochem.*, vol. 31, pp. 26-28, 1982.
- MADIHALLY, S. V. & MATTHEW, H. W. T. Porous Chitosan Scaffolds For Tissue Engineering. *Biomaterials*, vol. 20, pp. 1133-1142, 1999.
- MANRICH, A.; GALVÃO, C. M. A. & GIORDANO, R. L. C. Preparação de Derivados de Tripsina Covalentemente Imobilizados sobre Matrizes de Quitosana. In: *Anais do Simpósio Nacional de Fermentações*, Florianópolis- SC, 2003.
- MARGOT, A.; FLASCHEL, E. & RENKEN, A. Empirical Kinetic Models for Tryptic Whey-Protein Hydrolysis. *Process Biochemistry*, vol. 32, n° 3, pp. 217-223, 1997.
- MÁRQUEZ, M. C. & VÁZQUEZ, M. A Modeling of Enzymatic Protein Hydrolysis. *Process Biochemistry*, vol. 35, pp. 111-117, 1999.
- MARTINO, A.; DURANTE, M.; PIFFERI, P. G.; SPAGNA, G. & BIANCHI, G. Immobilization of β -Glucosidase from Commercial Preparation Part 1. A Comparative Study of Natural Supports. *Process Biochemistry*, vol. 31, n° 3, pp. 281-285, 1996.
- MARWAHA, S.S. & KENNEDY, J.F. Review: Whey - Pollution Problem and Potencial Utilization. *Internacional Journal of Food Science and Technology*, vol. 23, pp. 323-336, 1988.
- MATEO, C. Control de la Interacción Proteína-Soporte: Purificación, Inmovilización y Estabilización de Enzimas Industriales. *Tesis Doctoral – Instituto de Catálisis y Petroleoquímica (CSIC)*, Madrid, 2000.
- 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*, vol. 1, pp. 739-745, 2000.
-

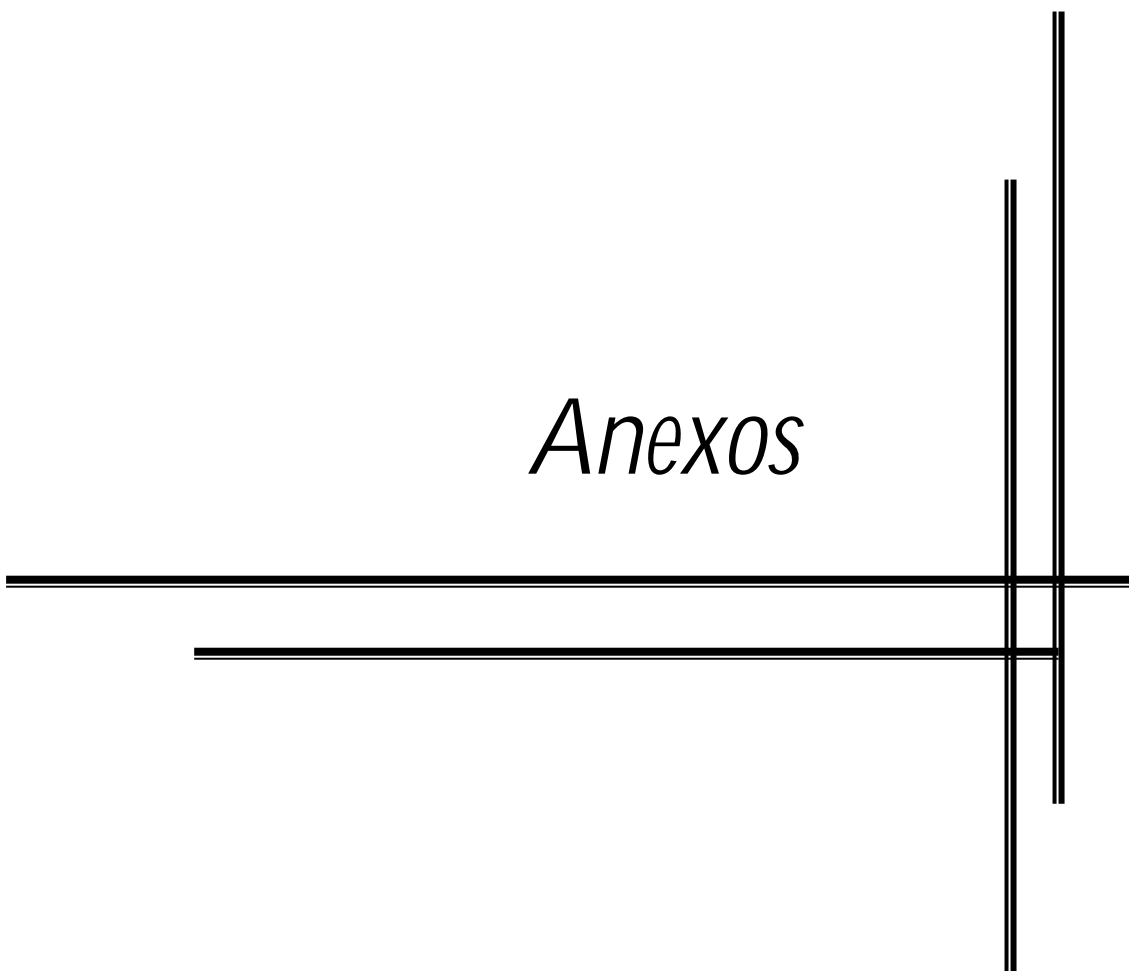
- MATEO, C.; ABIAN, O.; FERNÁNDEZ-LORENTE, G.; PEDROCHE, J.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R. & GUIÁN, J. M. Epoxy Sepabeads: A Novel Epoxy Support for Stabilization of Industrial Enzymes via Very Intense Multipoint Covalent Attachment. *Biotechnol. Prog.*, vol. 18, pp. 629-634, 2002.
- MICRONAL – Boletim. A determinação do nitrogênio de acordo com o método de Kjeldahl, pp. 2-9, 1995.
- MIRA, N. V. M. & MÁRQUEZ, U. M. L. Importância do Diagnóstico e Tratamento da Fenilcetonúria. *Revista Saúde Pública*, vol. 34, nº 1, pp. 86-96, 2000.
- MONSAN, P. Optimization of Glutaraldehyde Activation of a Support for Enzyme Immobilization. *Journal of Molecular Catalysis*, vol. 3, pp. 371-384, 1977/78.
- MONTEIRO, O. & AIROLDI, C. Some Studies of Crosslinking Chitosan-Glutaraldehyde Interaction in a Homogeneous System. *International Journal of Biological Micromolecules*, vol. 26, pp. 119-128, 1999.
- MONTI, J. C. & JOST, R. Solubilization of Cheese Whey Protein by Trypsin and A Process to Recover the Active Enzyme from the Digest. *Biotechnology & Bioengineering*, vol. 20, pp. 1173-1185, 1978.
- MORR, C. V. & HA, Y. W. Whey Protein Concentrates and Isolates: Processing and Functional Properties. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, vol. 33, nº 6, pp. 341-476, 1993.
- NAKAMURA, T.; SADA, H. & SYUKUNOBE, Y. Production of Low Antigenic Whey Protein Hydrolysates by Enzymatic Hydrolysis and Denaturation with High Pressure. *Milchwiss.*, vol. 48, nº 3, pp. 141-144, 1993.
- NEVES, B. S. Elaboração de Bebidas Lácteas a Base de Soro. Artigo Técnico. *Revista Leite e Derivados*, nº 10, pp. 50-54, 1993.
- OLDENDORF, W. H. & SZABO, J. Amino Acid Assigment to One Three Blood-Brain Barrier Amino Acid Carriers. *Am. J. Physiol.*, vol. 230, pp. 96-102, 1976.
- PESELA, B. C. C.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R.; FUENTES, M.; VIÁN, A.; GARCÍA, J. L.; CARRASCOSA, A. V.; MATEO, C. & GUIÁN, J. M. Reversible Immobilization of A Thermophilic β -Galactosidase Via Ionic Adsorption on PEI-Coated Sepabeads. *Enzyme and Microbial Technology*, vol. 32, pp. 369-374, 2003.
- PONSANO, E. H. G.; PINTO, M. F. & CASTRO-GOMES, R. J. H. Soro de Leite - Obtenção, Características e Aproveitamento. Revisão, in: *Seminário Cia. Agr.*, vol. 13, nº 1, pp. 92-96, Londrina, 1992.
- REDDY, I. M.; KELLA, N. K. D. & KINSELLA, J. E. Structural and Conformacional Basis of the Resistance of β -Lactoglobulin to Peptic and Chymotryptic Digestion. *J. Agric. Food Chem.*, vol. 36, p. 737, 1988.
-

- RESENDE, M. M. Proteólise Enzimática de Soro de Queijo em Reator de Taylor-Couette-Poiseuille. *Tese de Doutorado - UFSCar*, São Carlos-SP, 2002.
- REVISTA BIOTECNOLOGIA, CIÊNCIA & DESENVOLVIMENTO, n° 29, pp. 152-157, 2002.
- REVISTA CIÊNCIA HOJE - Seção Ciência em Dia, Matéria: Soro do Leite Estimula Sistema Imunológico. Por Adriana Melo, *Ciência Hoje On-Line*, 07/11/2002.
- REVISTA FOOD INGREDIENTS, Seção Pesquisas & Inovações. *Características, Funções e Novas Aplicações das Proteínas do Soro e Suas Novas Frações*. Edição publicada em Jan/Fev, 2003.
- RICHARDS, N.S. Emprego Racional do Soro. *Indústria de Laticínios*, vol. 67, 1997.
- SAHA, B. & HAYASHI, K. Research Review Paper - Debittering of Protein Hydrolysates. *Biotechnology Advances*, vol. 19, pp. 355-370, 2001.
- SANCHEZ, G. S. Diseño de Derivados de Quimotripsina como Catalizadores en Reacciones de Química Fina. *Tesis Doctoral - Instituto de Catálisis y Petroquímica (CSIC)*, Madrid, 1995.
- SANTOS J. P. V & FERREIRA, C. L. L. F. Alternativas para o Aproveitamento de Soro de Queijo nos Pequenos e Médios Laticínios. *Rev. do Instituto de Laticínios Cândido Tostes*, vol. 56, n° 321, pp. 44-50, 2001.
- SASHIWA, H. & SHIGEMASA, Y. Chemical Modification of Chitin and Chitosan 2: Preparation and Water Soluble Property of N-Acylated or N-Alkylated Partially Deacetylated Chitins. *Carbohydrate Polymers*, vol. 39, pp. 127-138, 1999.
- SCHMIDT, D.G. & POLL, J.K. Enzymatic Hydrolysis of Whey Proteins. Hydrolysis of α -Lactalbumin and β -Lactoglobulin in Buffer Solutions by Proteolytic Enzymes. *Milk Dairy Journal*, pp. 225-240, 1991.
- SCHULZ, A.R. *Enzyme Kinetics from Diastase to Multi-Enzyme System*. Cambridge University Press, 1994.
- SGARBIERI, V. C. *Proteínas em Alimentos Protéicos: Propriedades, Degradações, Modificações*. Câmara Brasileira do Livro, São Paulo, Brasil, 1996.
- SHAHIDI, F.; ARACHCHI, J. K. V. & JEON, Y.-J. Food Application of Chitin and Chitosan. *Trends in Food Science and Technology*, vol. 10, pp. 37-51, 1999.
- SKAUGRUD, O. & SARGENT, G. Chitin and Chitosan: Crustacean Biopolymers with Potential. *International By-products Conference*, pp. 61-72, Anchorage, Alaska, 1990.
-

- SOBRAL, K. C. A.; RODRIGUEZ, R. M. O.; OLIVEIRA, R. D.; MORAES, F. F. & ZANIN, G. M. Immobilization of Cyclodextringlycosyltransferase (CGTase) from *Bacillus firmus* in Commercial Chitosan. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, vol. 44, pp. 383-386, 2002.
- SOBRAL, K. A.; RODRIGUEZ, R. O.; OLIVEIRA, R. D.; OLIVO, J. E.; MORAES, F. F. & ZANIN, G. M. Evaluation of Supports and Methods for Immobilization of Enzyme Cyclodextringlycosyltransferase. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, vol. 105-108, pp. 809-819, 2003.
- SOUSA Jr., R.; RESENDE, M. M.; GIORDANO, R. L. C. & GIORDANO, R. C. Modelo Neural para as Velocidades de Proteólise de Soro de Queijo por Alcalase Imobilizada em Função da Distribuição de Pesos Moleculares. *I Congresso da Sociedade Brasileira de Biotecnologia –SBBiotech*, 12 a 14 de novembro de 2001, São Paulo - SP.
- SOUSA Jr., R. Inteligência Computacional Aplicada à Automação da Hidrólise Enzimática de Soro de Queijo em Reator Contínuo. *Tese de Doutorado - UFSCar*, São Carlos-SP, 2003.
- SPADARO, A. C. *Cromatografia por Troca Iônica, Capítulo V - Introdução a métodos cromatográficos*, pp. 71-94. Editora da UNICAMP, 1995.
- SPAGNA, G.; ANDREANI, F.; SALATELLI, E.; ROMAGNOLI, D. & PIFFERI, P. G. Immobilization of α -L-Arabinofuranosidase on Chitin and Chitosan. *Process Biochemistry*, vol. 33, nº 1, pp. 57-62, 1998.
- SPELLMAN, D.; MCEVOY, E.; O'CUINN, G. FITZGERALD, R. J. Proteinase and Exopeptidase Hydrolysis of Whey Protein: Comparison of the TNBS, OPA and pH Stat Methods for Quantification of Degree of Hydrolysis. *International Dairy Journal*, vol. 13, pp. 447-453, 2003.
- TARDIOLI, P. W. Hidrólise Controlada das Proteínas do Soro de Queijo Usando Carboxipeptidase A e Alcalase[®] Imobilizadas Multipontualmente em Agarose. *Tese de Doutorado - UFSCar*, São Carlos-SP, 2003.
- TARDIOLI, P. W.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R.; GUISÁN, J. M. & GIORDANO, R. L. C. Design of New Immobilized-Stabilized Carboxypeptidase A Derivative for Production of Aromatic Free Hydrolysates of Proteins. *Biotechnology Progress*, vol. 19, pp. 565-574, 2003a.
- 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*, vol. 19, pp. 352-360, 2003b.
- THE U.S. DAIRY EXPORT COUNCIL. *Ingredientes Lácteos para uma Alimentação Saudável*. USDEC News, vol. 2, nº 4, pp. 1-3, 2000.
-

-
- TREFZ, F. K.; BURGARD, P.; KÖNIG, T.; GOEBEL-SCHREINER, B.; LICHTER-KONECKI, U.; KONECKI, D.; SCHMIDT, E.; SCHMIDT, H. & BICKEL, H. Genotype-Phenotype Correlations in Phenylketonuria. *Clin. Chim. Acta*, vol. 217, pp. 15-21, 1993.
- VALSECHI, O. A. Tecnologia de Produtos Agrícolas de Origem Animal - *O Leite e Seus Derivados*. Ufscar - Campus de Araras/SP, 2001.
- VARUM, K. M.; HOLME, H. K.; IZUME, M.; STOKKE, B. T. & SMIDSROD, O. Determination of Enzymatic Hydrolysis Specificity of Partially N-Acetylated Chitosans. *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 1291, pp. 5-15, 1996.
- VARUM, K. M.; OTTY, M. H. & SMIDSROD, O. Water-Solubility of Partially N-Acetylated Chitosans as A Function of pH: Effect of Chemical Composition and Depolymerization. *Carbohydrate Polymers*, vol. 25, pp. 65-70, 1994.
- VOGEL, A. I. Análise Inorgânica Quantitativa. Editora Guanabara Dois, Rio de Janeiro, 1981.
- VOROB'EV, M. M.; LEVICHEVA, I. Y. & BELIKOV, V. M. Kinetic of the Initial Stage of Milk Protein Hydrolysis by Chymotrypsin. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, vol. 32, pp. 219-222, 1994.
- WHITAKER, J. R. *Principles of Enzymology for the Food Sciences*. 2^o Edição, Marcel Dekker Inc.: New York, 1994.
- ZANIN, G. M. Sacarificação de Amido em Reator de Leito Fluidizado com Enzima Amiloglicosidase Imobilizada. *Tese de Doutorado - Unicamp*, pp. 499, Campinas-SP, 1989.
-

Anexos



ANEXO I

TERCEIRA BATELADA DE HIDRÓLISES SEQUENCIAIS: USO DE ENZIMAS COM ALTO TEOR DE PUREZA

Experimentos foram realizados utilizando E/S de 1/25, V_{soro} de 50mL, NaOH 0,2M, 55°C e pH 8 para obtenção dos seguintes graus de hidrólise com tripsina: 2%, 4%, 6%, 8%, 10% e 12%. A Tabela A1-1 mostra o conteúdo de aminoácidos liberados após ação da tripsina sobre as proteínas intactas do soro de queijo.

Tabela A1-1: Conteúdo liberado de aminoácidos após hidrólise com tripsina nos seis ensaios realizados. Cromatografia de troca iônica com derivatização pós-coluna com OPA - 72 minutos de análise.

Aminoácido	¹ Porcentagem de Liberação de Aminoácidos					
	² GH _T = 2%	GH _T = 4%	GH _T = 6%	GH _T = 8%	GH _T = 10%	GH _T = 12%
Asp	7,26	1,51	2,97	2,98	1,79	1,84
Asn/Thr	0,24	0,10	0,16	0,27	0,17	0,19
Ser	1,11	0,33	0,56	1,42	0,41	0,51
Glu	0,21	0,43	0,31	0,51	0,43	0,47
Gly	8,57	2,65	4,07	4,34	2,69	2,72
Ala	0,27	0,15	0,18	0,26	0,18	0,13
Val	-	0,15	-	0,08	0,15	0,14
Met	-	0,03	-	-	-	-
Ileu	0,59	-	0,23	-	-	0,34
Leu	0,25	0,12	2,54	2,56	3,12	3,17
Tyr	5,45	2,05	2,18	2,18	1,09	1,09
Phe	-	1,09	-	-	0,08	0,12
His	10,97	8,45	16,83	23,87	26,86	33,35
Trp	-	9,36	8,83	1,04	-	10,03
Lys	-	-	-	1,85	6,99	1,75
Arg	1,23	0,75	1,36	1,28	1,51	-

¹Cálculos realizados com base nos valores fornecidos por Adler-Nissen, 1986.

²Grau de hidrólise atingido com tripsina GH_T.

Os dados acima apresentados confirmam liberação de aminoácidos após ação individual da tripsina, mesmo tendo-se aqui utilizado tripsina com alto grau declarado de pureza. É possível observar também que a liberação de aminoácidos parece não seguir regras pré-estabelecidas do tipo "aumentando-se o GH_T aumenta-se a liberação de aminoácidos ou vice-versa", pois os dados da tabela acima mostram claramente liberação aleatória ou independente do grau de hidrólise atingido.

A Figura A1-1 mostra os cromatogramas resultantes das análises de distribuição de massa molecular (peptídeos) dos hidrolisados obtidos e a Tabela A1-2 a quantificação das frações em faixas previamente determinadas.

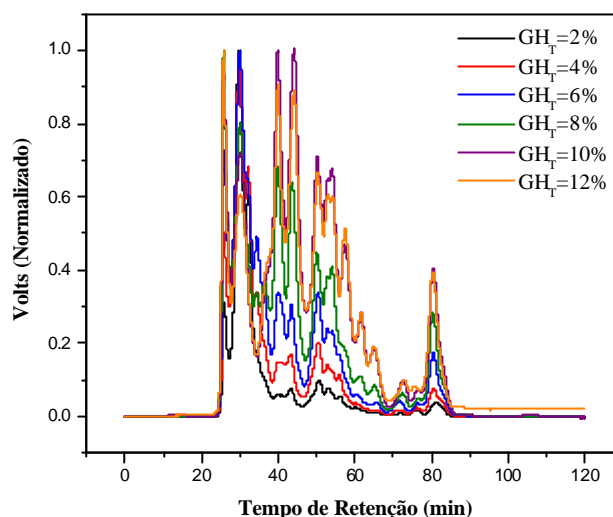


Figura A1-1: Fracionamento do soro de queijo após ser submetido a diferentes graus de hidrólise com a endopeptidase tripsina. Cromatografia de exclusão por tamanho.

Tabela A1-2: Distribuição da massa molecular dos polipeptídeos gerados após ação individual da tripsina sobre proteínas intactas do soro de queijo. Fracionamento desenvolvido por cromatografia de exclusão por tamanho (SE-HPLC).

Massa Molecular (Da)	Porcentagem Mássica de Peptídeos					
	² GH _T = 2%	GH _T = 4%	GH _T = 6%	GH _T = 8%	GH _T = 10%	GH _T = 12%
MM ≥ 5000	73,23	73,78	70,23	60,38	48,05	48,48
5000 >MM ≥ 1672	14,13	16,11	19,71	28,31	35,33	35,09
1672 >MM ≥ 1046	5,63	4,32	6,66	4,84	8,61	9,02
1046 >MM ≥ 555	2,73	1,93	2,40	1,66	2,45	2,31
MM < 555	4,28	3,86	1,00	4,81	5,56	5,10
Total	100	100	100	100	100	100
MM > 1046	92,99	94,21	96,6	93,53	91,99	92,59
MM < 1046	7,01	5,79	3,4	6,47	8,01	7,41

¹Cálculos efetuados segundo metodologia descrita por Sousa Jr. *et al*, 2002.

²Grau de hidrólise atingido com tripsina.

De acordo com os dados tabelados, pode-se observar que em todos os ensaios realizados a porcentagem de oligopeptídeos com MM > 1046Da foi igual ou superior a 92%, inclusive em condições de hidrólise máxima com tripsina (GH de 12%), e que, conseqüentemente, a fração com MM < 1046Da, parcela que passa pela membrana com corte de 1000Da no processo de separação, foi menor ou igual a 8%. Esses resultados parecem satisfatórios, visto que em nenhum ensaio até o momento realizado foi possível

evitar a liberação indesejada de aminoácidos livres e que nesta etapa do processo não era esperada degradação significativa das cadeias protéicas.

A etapa posterior de hidrólise com a quimotripsina foi desenvolvida a 55°C, pH 8, E/S_{mássico} de 1/18, NaOH 0,2M e tempo reacional fixo de sete horas. A Tabela A1-3 apresenta os graus de hidrólise obtidos em cada etapa e o grau de hidrólise total após ação sequencial de tripsina e quimotripsina.

Tabela A1-3: Graus de hidrólise obtidos após ação sequencial da quimotripsina sobre os polipeptídeos gerados nas hidrólises prévias com tripsina.

Ensaio	¹ GH _T (%)	² GH _Q (%)	³ GH _{Total} (%)
1	2	8,22	10,22
2	4	7,91	11,91
3	6	6,78	12,78
4	8	5,22	13,22
5	10	4,04	14,04
6	12	3,99	15,99

¹Grau de hidrólise atingido com tripsina.

²Grau de hidrólise atingido com quimotripsina após ação prévia da tripsina.

³Grau de hidrólise total atingido após ação sequencial de tripsina e quimotripsina.

Os dados apresentados na Tabela A1-3 mostram que à medida que o grau de hidrólise com tripsina aumenta, o grau de hidrólise final com quimotripsina diminui, para mesmos tempos de reação. Seguindo procedimento padrão, no decorrer do período reacional com quimotripsina alíquotas foram coletadas e submetidas a análises de aminoácidos e peptídeos. A Tabela A1-4 mostra os resultados das análises de aminoácidos dos hidrolisados obtidos após ação sequencial de tripsina e quimotripsina.

Tabela A1-4: Conteúdo liberado de aminoácidos após ação seqüencial de quimotripsina. Cromatografia de troca iônica com derivatização pós-coluna com OPA - 72 minutos de análise.

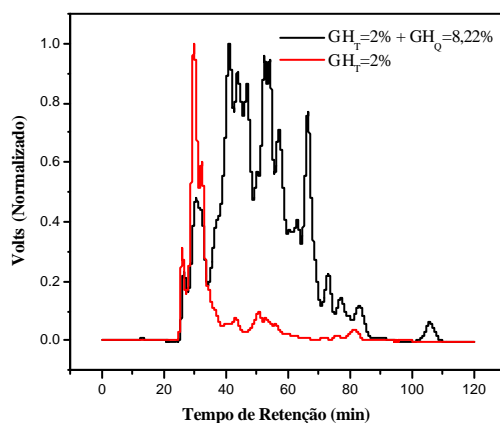
Aminoácido	¹ Porcentagem de Liberação de Aminoácidos					
	² GH _T =2%	GH _T =4%	GH _T =6%	GH _T =8%	GH _T =10%	GH _T =12%
	+ ³ GH _Q =8,22%	+ GH _Q =7,91%	+ GH _Q =6,78%	+ GH _Q =5,22%	+ GH _Q =4,04%	+ GH _Q =3,99%
Asp	7,46	1,73	3,17	3,10	1,94	2,05
Asn/Thr	0,35	0,22	0,29	0,91	0,2	0,29
Ser	1,43	0,56	0,81	1,89	0,57	0,79
Glu	0,28	0,41	0,35	0,54	0,54	0,63
Gly	8,65	2,83	4,2	4,63	2,80	3,09
Ala	0,32	0,18	0,21	0,38	0,19	0,23
Val	-	0,07	-	0,23	0,17	0,21
Ileu	0,59	-	0,23	-	-	0,47
Leu	2,42	2,98	3,29	3,14	3,75	4,17
Tyr	15,52	12,29	9,93	11,76	13,36	14,81
Phe	-	0,44	-	0,14	0,33	0,84
His	33,48	41,84	48,06	54,61	55,93	66,82
Trp	17,46	5,99	15,42	4,59	22,54	-
Lys	-	1,83	3,0	5,91	12,75	18,72
Arg	5,85	9,44	14,23	15,2	14,87	20,78

¹Cálculos realizados com base nos valores fornecidos por Adler-Nissen, 1986.

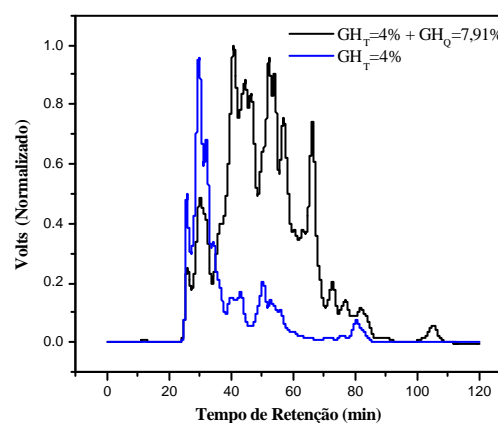
²Grau de hidrólise atingido com tripsina.

³Grau de hidrólise atingido com quimotripsina após ação prévia da tripsina.

A presença de aminoácidos livres nos hidrolisados obtidos após ação das duas endopeptidases utilizadas continuou sendo observada nas novas condições de ensaio. A Figura A1-2 mostra os cromatogramas obtidos das análises de peptídeos realizadas após ação seqüencial dessas duas enzimas e a Tabela A1-5 apresenta a distribuição da massa molecular dos peptídeos obtidos.



(A)



(B)

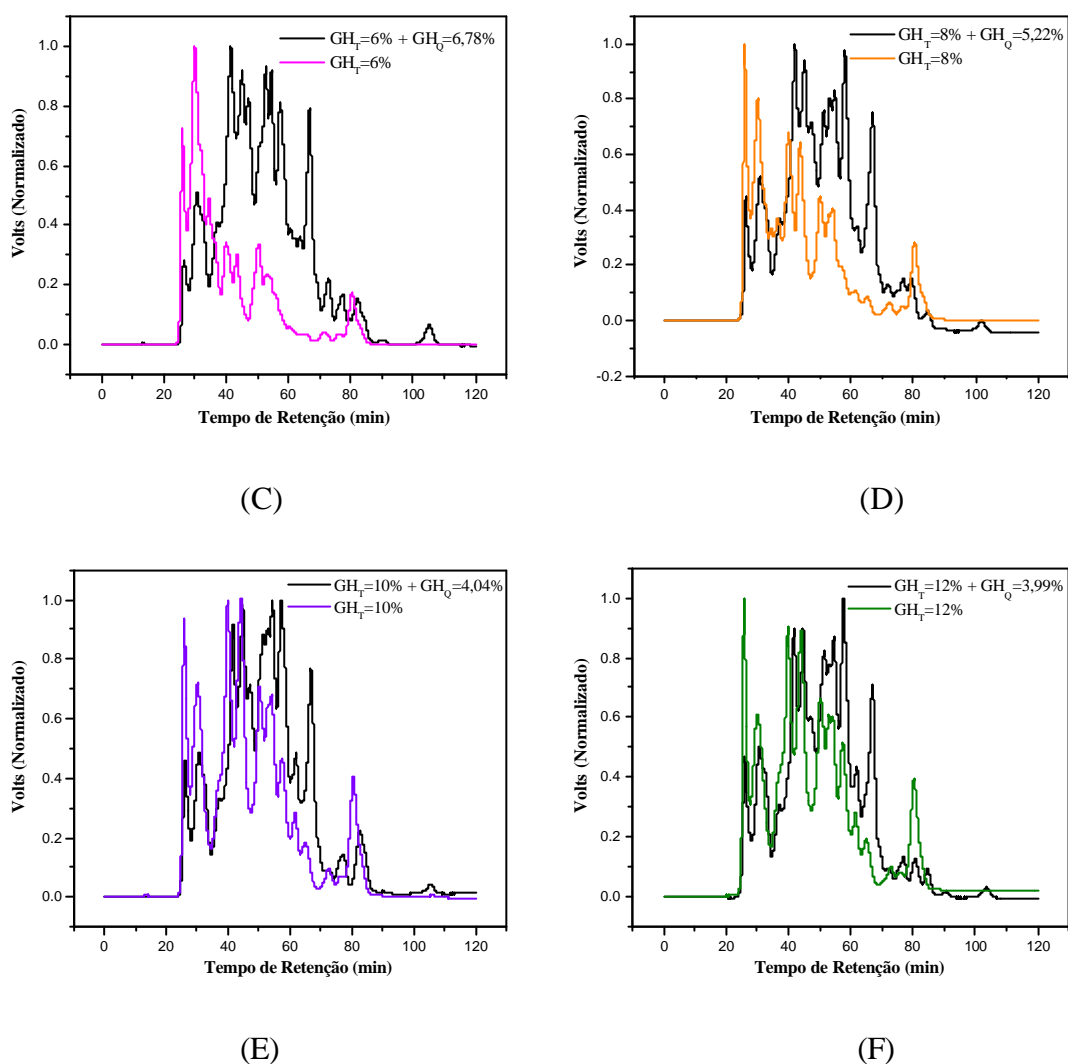


Figura A1-2: Fracionamento dos hidrolisados obtidos após ação seqüencial de tripsina e quimotripsina: (A) GH_T de 2% e GH_Q de 8,22%; (B) GH_T de 4% e GH_Q de 7,91%; (C) GH_T de 6% e GH_Q de 6,78%; (D) GH_T de 8% e GH_Q de 5,22%; (E) GH_T de 10% e GH_Q de 4,04% e (F) GH_T de 12% e GH_Q de 3,99%. Cromatografia de exclusão por tamanho.

Tabela A1-5: Distribuição da massa molecular dos polipeptídeos gerados após ação seqüencial de tripsina e quimotripsina (7 horas de reação).

Massa Molecular (Da)	Porcentagem Mássica de Peptídeos					
	² $\text{GH}_T = 2\%$ + ³ $\text{GH}_Q = 8,22\%$	$\text{GH}_T = 4\%$ + $\text{GH}_Q = 7,91\%$	$\text{GH}_T = 6\%$ + $\text{GH}_Q = 6,78\%$	$\text{GH}_T = 8\%$ + $\text{GH}_Q = 5,22\%$	$\text{GH}_T = 10\%$ + $\text{GH}_Q = 4,04\%$	$\text{GH}_T = 12\%$ + $\text{GH}_Q = 3,99\%$
$\text{MM} \geq 5000$	36,85	36,50	35,60	36,68	35,21	34,86
$5000 > \text{MM} \geq 1672$	37,26	35,13	34,53	36,40	38,58	36,35
$1672 > \text{MM} \geq 1046$	13,44	11,52	14,39	13,10	14,26	13,11
$1046 > \text{MM} \geq 555$	6,49	5,68	5,84	4,54	4,58	6,93
$\text{MM} < 555$	5,96	11,17	9,64	9,28	7,37	8,75
Total	100	100	100	100	100	100
$\text{MM} > 1046$	87,55	83,15	84,52	86,18	88,05	84,32
$\text{MM} < 1046$	12,45	16,85	15,48	13,82	11,95	15,68

¹ Cálculos efetuados segundo metodologia descrita por Sousa Jr. *et al.*, 2002.

² Grau de hidrólise atingido com tripsina.

³ Grau de hidrólise atingido com quimotripsina após ação prévia da tripsina.

Os resultados acima apresentados mostram que todas as situações investigadas resultaram na geração de peptídeos com massa molecular superior a 1046Da entre 83 e 88%, ou seja, nas condições operacionais empregadas não foi possível preservar a máxima integridade das cadeias protéicas como desejado e que com base nesses dados, perder-se-ia aproximadamente de 12 a 17% de proteínas na forma de pequenos peptídeos e aminoácidos na etapa de separação.

A terceira etapa do processo foi desenvolvida submetendo-se os hidrolisados sequenciais à ação da CPA por um período de sete horas. Ao longo desses ensaios amostras foram recolhidas e analisadas quanto ao conteúdo de aminoácidos e distribuição de peptídeos gerados, como realizado nas etapas anteriores de hidrólise. Estes experimentos foram realizados a 45°C, pH 7 e concentração de enzima imobilizada de 50U_{H-PHE}/gProteína. A Tabela A1-6 mostra a porcentagem de liberação de aminoácidos após ação sequencial de tripsina, quimotripsina (7 horas de reação) e carboxipeptidase A (7 horas de reação).

Tabela A1-6: Porcentagem de aminoácidos liberados após ação sequencial de tripsina, quimotripsina e carboxipeptidase A (45°C, pH 7, 50U_{H-PHE}/gProteína e 7 horas de reação).

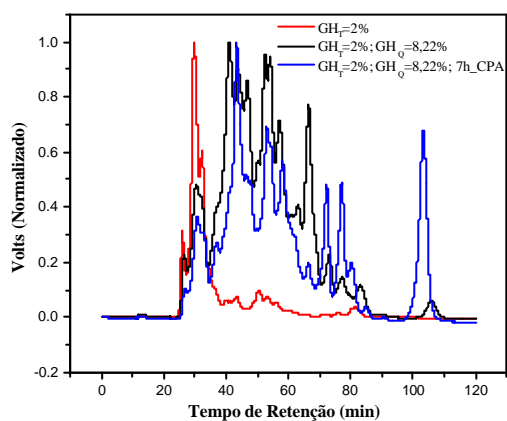
Aminoácido	¹ Porcentagem de Liberação de Aminoácidos					
	² GH _T = 2% + ³ GH _Q =8,22% + 7 horas CPA	GH _T = 4% + GH _Q =7,91% + 7 horas CPA	GH _T = 6% + GH _Q =6,78% + 7 horas CPA	GH _T = 8% + GH _Q =5,22% + 7 horas CPA	GH _T = 10% + GH _Q =4,04% + 7 horas CPA	GH _T = 12% + GH _Q =3,99% + 7 horas CPA
Asp	8	2,81	3,47	3,59	2,50	2,86
Asn/Thr	5,06	6,57	3,61	4,35	6,12	5,67
Ser	1,68	2,36	1,86	3,01	4,45	2,58
Glu	0,55	2	0,82	1,48	1,70	2
Gly	8,89	4,27	4,86	5,21	6,50	3,43
Ala	1,30	3,09	1,14	1,64	3,62	2,09
Val	11,67	17,80	11,11	10,59	18,70	14,55
Met	7,04	28,18	18,73	-	-	-
Ileu	10,40	16,55	11,23	12,64	17,94	13,53
Leu	24,54	41,48	20,90	19	29,79	26,66
Tyr	61,69	75,11	58,33	55,95	62,35	64,95
Phe	50,78	62,45	48,74	47,24	45,36	48,91
His	41,82	57,87	50,82	56,66	57,47	68,82
Trp	84,16	84,55	97,87	41,48	85,42	98,14
Lys	-	5,01	6,33	9,93	20,08	20,12
Arg	7,24	14,90	14,81	19,02	22,66	22,96

¹Cálculos realizados com base nos valores fornecidos por Adler-Nissen, 1986.

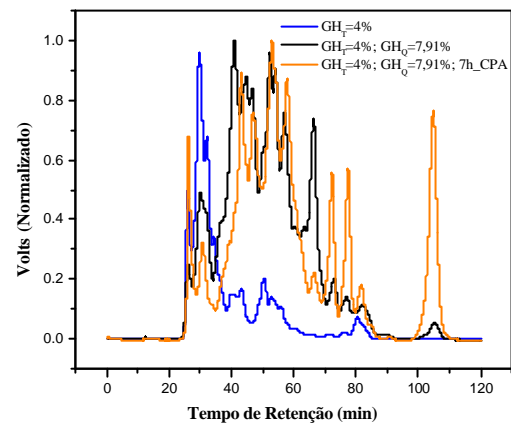
²Grau de hidrólise atingido com tripsina.

³Grau de hidrólise atingido com quimotripsina após ação prévia da tripsina.

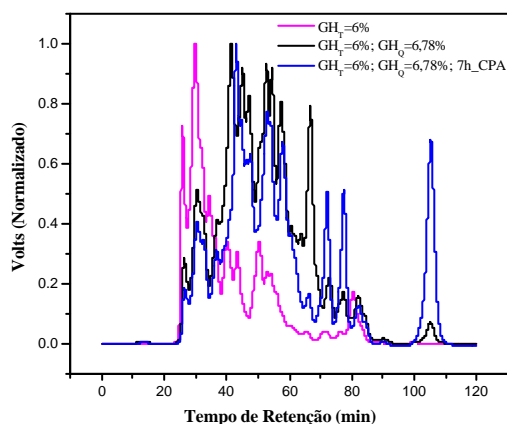
Analisando-se os dados da Tabela A1-6 observa-se que a CPA promoveu a liberação em porcentagens bastante significativas de grande número de aminoácidos. Porém, há que se recordar que, como já comentado em seções anteriores deste trabalho, dado tempo suficiente a esta protease ela remove com diferentes velocidades grande número de aminoácidos das cadeias polipeptídicas. Porém, uma análise consistente dos dados obtidos da ação sequencial de tripsina, quimotripsina e CPA nos ensaios realizados deve considerar também a extensão da degradação promovida ao longo dessas três etapas de hidrólise a que foram submetidas as proteínas do soro. A Figura A1-3 mostra os perfis de distribuição de massa molecular após cada situação investigada e a Tabela A1-7 mostra quantitativamente os dados de distribuição de massa molecular obtidos.



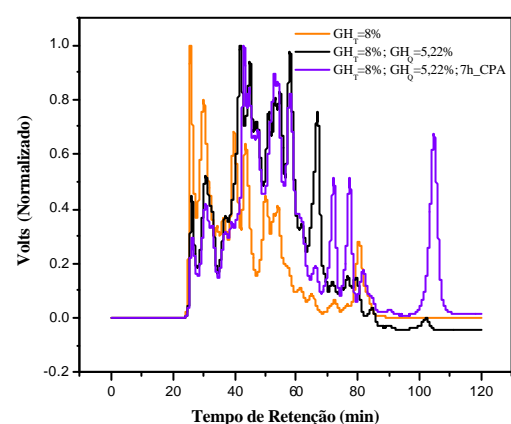
(A)



(B)



(C)



(D)

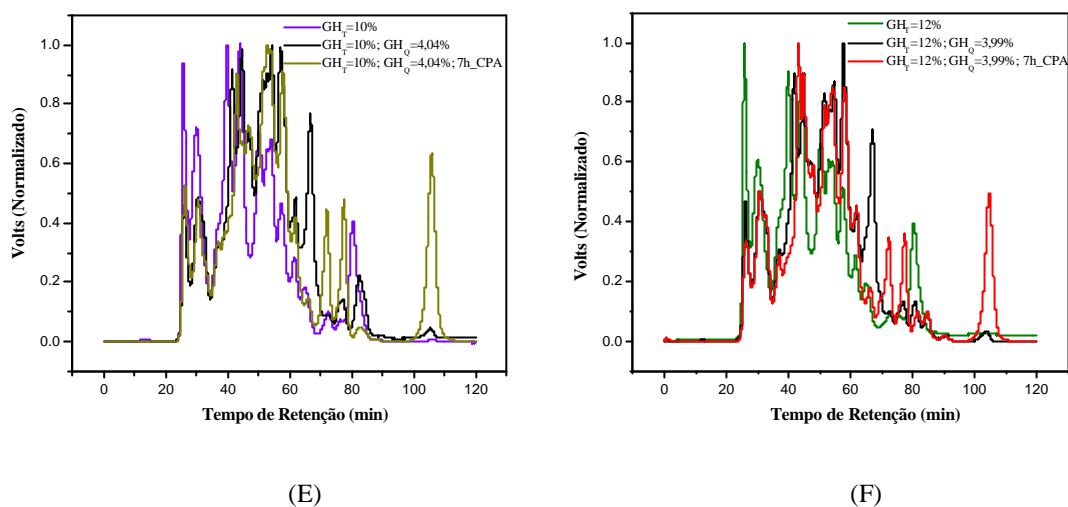


Figura A1-3: Fracionamento dos hidrolisados obtidos após ação seqüencial de tripsina, quimotripsina e carboxipeptidase A: (A) GH_T de 2%, GH_Q de 8,22% e 7hCPA; (B) GH_T de 4%, GH_Q de 7,91% e 7hCPA; (C) GH_T de 6%, GH_Q de 6,78% e 7hCPA; (D) GH_T de 8%, GH_Q de 5,22% e 7hCPA; (E) GH_T de 10%, GH_Q de 4,04% e 7hCPA e (F) GH_T de 12%, GH_Q de 3,99% e 7hCPA. Cromatografia de exclusão por tamanho (SE-HPLC).

Tabela A1-7: Distribuição da massa molecular dos polipeptídeos gerados após ação seqüencial de tripsina, quimotripsina (7 horas de reação) e CPA (7 horas de reação e $50\text{U}_{\text{H-PHE}}/\text{gProteína}$).

Massa Molecular (Da)	Percentagem Mássica de Peptídeos					
	² $\text{GH}_T = 2\%$	$\text{GH}_T = 4\%$	$\text{GH}_T = 6\%$	$\text{GH}_T = 8\%$	$\text{GH}_T = 10\%$	$\text{GH}_T = 12\%$
	+	+	+	+	+	+
	³ $\text{GH}_Q = 8,22\%$	$\text{GH}_Q = 7,91\%$	$\text{GH}_Q = 6,78\%$	$\text{GH}_Q = 5,22\%$	$\text{GH}_Q = 4,04\%$	$\text{GH}_Q = 3,99\%$
	+	+	+	+	+	+
	7 horas CPA	7 horas CPA	7 horas CPA	7 horas CPA	7 horas CPA	7 horas CPA
$\text{MM} \geq 5000$	20,03	34,37	30,94	35,17	28,6	31,14
$5000 > \text{MM} \geq 1672$	48,15	28,91	36,05	35,75	42,41	36,75
$1672 > \text{MM} \geq 1046$	12,42	15,33	13,89	13,34	14,57	12,71
$1046 > \text{MM} \geq 555$	2,83	4,85	5,86	4,4	2,65	5,55
$\text{MM} < 555$	16,57	16,54	13,26	11,34	11,77	13,85
Total	100	100	100	100	100	100
$\text{MM} > 1046$	80,6	78,61	80,88	84,26	85,58	80,6
$\text{MM} < 1046$	19,4	21,39	19,12	15,74	14,42	19,4

¹ Cálculos efetuados segundo metodologia descrita por Sousa Jr. *et al.*, 2002.

² Grau de hidrólise atingido com tripsina.

³ Grau de hidrólise atingido com quimotripsina após ação prévia da tripsina.

ANEXO II

QUARTA BATELADA DE HIDRÓLISES SEQUÊNCIAIS

Nesta quarta batelada, o tempo de reação com quimotripsina e CPA foi estendido de sete para dez horas; a concentração de quimotripsina no meio passou de 0,7 para 1,73mgEnz./mL de solução e a concentração de CPA foi aumentada de 50 para aproximadamente 138U_{H-PHE}/gProteína. Com relação ao conteúdo de Phe liberado após ação seqüencial de tripsina, quimotripsina e carboxipeptidase A, uma comparação entre as duas bateladas com mesmos graus de hidrólise iniciais com tripsina, mas diferentes tempos de reação e concentrações de enzima no meio nas etapas com quimotripsina e CPA, pode ser observada na Figura A2-1.

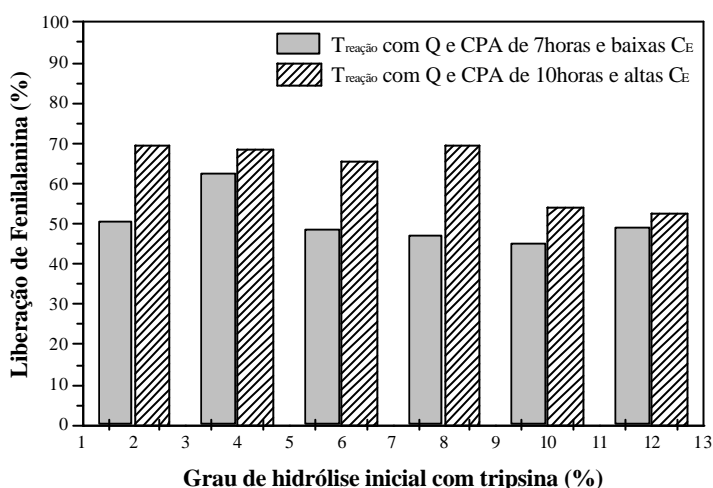


Figura A2-1: Comparação do conteúdo liberado de Phe nos experimentos com mesmos graus de hidrólise iniciais com tripsina (2, 4, 6, 8, 10 e 12%) e diferentes tempos (7 e 10 horas) e concentrações de enzima nas etapas desenvolvidas com quimotripsina (0,67 e 1,73mgEnz./mL de solução) e carboxipeptidase A (50 e 138U_{H-PHE}/gProteína).

Os dados apresentados na Figura A2-1 indicam que aumentos na concentração enzimática e tempo reacional nas etapas com quimotripsina e CPA, conduzem, de fato, a maiores porcentagens de liberação de Phe, como desejado.

Os ensaios desenvolvidos com GH_T de 1 e 5% conduziram a excelentes níveis de liberação de Phe (superiores a 84%). No entanto, em consequência da relevância dos resultados obtidos nesses dois ensaios específicos, era oportuno verificar se a liberação

de Phe ao longo da reação com carboxipeptidase A já havia atingido um patamar ou se aumentos ainda podiam ser observados para o tempo reacional empregado. A Tabela A2-1 permite o acompanhamento do conteúdo liberado de Phe ao longo do período reacional empregado.

Tabela A2-1: Porcentagem de Phe liberada ao longo das dez horas de hidrólise com CPA (aproximadamente $138U_{H-PHE}/g$ Proteína) para seqüências com GH_T de 1 e 5%.

Condição do Substrato	¹ Porcentagem de Liberação de Phe				
	Tempo de Reação com CPA (horas)				
	1	3	5	7	10
² $GH_T = 1\%$ + ³ $GH_Q = 11,84\%$ (10horas)	50,99	62,75	65,50	72,50	84,66
$GH_T = 5\%$ + $GH_Q = 7,72\%$ (10horas)	50,44	53,84	55,79	72,37	87,38

¹Cálculos realizados com base nos valores fornecidos por Adler-Nissen, 1986.

²Grau de hidrólise atingido com tripsina.

³Grau de hidrólise atingido com quimotripsina após ação prévia da tripsina.

Analisando-se os dados acima tabelados, pode-se verificar que aumentos no conteúdo de Phe liberada eram registrados à medida que a reação avançava, indicando que ainda havia substrato específico à ação da CPA a ser consumido e que concentrações de quimotripsina e CPA ainda mais elevadas poderiam responder de forma bastante satisfatória, conduzindo a liberação deste aminoácido a valores muito próximos de 100%.