



**UNIVERSIDADE CATÓLICA DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE ACADÊMICA
COORDENAÇÃO GERAL DE PÓS-GRADUAÇÃO
MESTRADO EM DESENVOLVIMENTO DE PROCESSOS
AMBIENTAIS**

ELISÂNGELA TEIXEIRA DA SILVA

**ESTABILIZAÇÃO DE PROTEASES PARA
APLICAÇÃO TECNOLÓGICA**

Recife

2013

ELISÂNGELA TEIXEIRA SILVA

**ESTABILIZAÇÃO DE PROTEASES PARA
APLICAÇÃO TECNOLÓGICA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Desenvolvimento em Processos Ambientais Universidade Católica de Pernambuco como pré-requisito para obtenção do título de Mestre em **Desenvolvimento de Processos Ambientais**.

Área de Concentração: Desenvolvimento em Processos Ambientais.

Linha de Pesquisa: Biotecnologia e Meio Ambiente.

Orientadora: Prof^a. Dra. Alexandra Amorim Salgueiro

**Recife
2013**

S586e

Silva, Elisângela da

Estabilização de proteases para aplicação tecnológica /
Elisângela Teixeira da Silva ; orientador Alexandra Amorim
Salgueiro, 2013.

xii, 68 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Católica de Pernambuco.
Pró- reitoria Acadêmica. Curso de Mestrado em Desenvolvimento de
Processos Ambientais, 2013.

1. Enzimas proteolíticas. 2. Proteínas - estabilidade. 3. Biotecnologia.
I. Título.

CDU 574.6

ESTABILIZAÇÃO DE PROTEASES PARA APLICAÇÃO TECNOLÓGICA

Elisângela Teixeira da Silva

Examinadores:

Prof^a. Dr^a. Alexandra Amorim Salgueiro (Orientadora)
Universidade Católica de Pernambuco - UNICAP

Prof^a. Dr^a. Leonie Asfora Sarubbo (Titular interno)
Universidade Católica de Pernambuco - UNICAP

Prof^a. Dr^a. Maria de Los Angeles Perez Fernandez Palha (Titular externo)
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Defendida em 26 de maio de 2013

Coordenadora: Prof^a. Dr^a. Alexandra Amorim Salgueiro

A meus queridos pais.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus por toda energia, saúde e força que me concedeu para que conseguisse concluir o Mestrado.

Gostaria de agradecer a meus pais por tudo aquilo que me ensinaram e pelos momentos de dificuldades que enfrentamos, mas que não impediram que me dessem todo apoio necessário, financeiro e humano, desde o início do meu processo de aprendizagem.

Ao meu marido Henrique, pela paciência, equilíbrio e respeito.

Também gostaria de agradecer à minha orientadora, a Profa. Dra. Alexandra Salgueiro por todo o apoio e também por ter me ajudado durante todo o curso.

Aos meus professores, pelo valioso conhecimento adquirido.

Ao meu amigo Gilberto, pelas horas de estudos partilhadas, pelo esforço e ajuda nas horas de sufoco.

Não poderia me esquecer dos colegas de turma do mestrado em Desenvolvimento de Processos Ambientais pela atenção e pela força dadas através do companheirismo, sempre que precisei.

À FACEPE, pelo suporte financeiro oferecido como apoio para o desenvolvimento desta dissertação.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	viii
LISTA DE TABELAS.....	ix
LISTA DE ABREVIATURAS.....	x
RESUMO.....	xii
ABSTRACT.....	xiii
CAPÍTULO I	13
1.1 INTRODUÇÃO.....	13
1.2 OBJETIVOS.....	15
1.2.1 Objetivo geral.....	15
1.2.2 Objetivos específicos.....	15
1.3 REVISÃO DA LITERATURA.....	16
1.3.1 Biotecnologia	16
1.3.2 Enzimas	17
1.3.3 Proteases	21
1.3.3.1 Classificação	21
1.3.3.2 Fonte de proteases.....	23
1.3.3.3 Aplicação tecnológica.....	24
1.3.4 Estabilização de estruturas protéicas.....	25
1.3.5 Imobilização de enzimas.....	28
1.3.6 Ultrafiltração de bioprodutos.....	30
1.3.7 Formulação de bioprodutos.....	32
1.4 REFERÊNCIAS.....	34
CAPÍTULO II.....	38
2.1 INTRODUÇÃO	39
2.2 COMÉRCIO DE ENZIMAS	40
2.3 ESTRUTURA DE PROTEÍNAS	42
2.4 ESTABILIDADE DE ENZIMAS.....	44
2.4.1 Parâmetros físico-químicos.....	46

2.4.2 Parâmetros químicos.....	50
2.4.3 Imobilização.....	52
2.4.4 Biologia molecular.....	53
2.5 FORMULAÇÃO DE ENZIMAS.....	54
2.6 PROTEASES NA COMPOSIÇÃO DE DETERGENTES.....	58
2.6.1 A indústria de detergentes.....	58
2.6.2 Ação de componentes enzimáticos em detergentes.....	59
2.6.3 Estudo de caso.....	60
2.7 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	62
2.8 REFERÊNCIAS.....	64

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

Figura 1	Representação de ultrafiltração por membrana filtrante.....	32
-----------------	---	----

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

Tabela 1	Efeitos de catalisadores sobre a energia de ativação e velocidade de reação na decomposição do peróxido de hidrogênio.....	18
Tabela 2	Comparação entre características de enzimas e catalisadores químicos.....	19
Tabela 3	Classificação de peptidases de acordo com o sítio ativo catalítico.....	22
Tabela 4	Aplicações industriais de proteases obtidas de plantas, animais e micro-organismos.....	25
Tabela 5	Métodos de imobilização.....	29

CAPÍTULO II

Tabela 1	Importação e exportação de enzimas pelo Brasil em milhões de US\$ nos anos de 2000, 2005 e 2011.....	41
-----------------	--	----

LISTA DE ABREVIATURAS

CAPÍTULO I

Asp	Ácido aspártico
DQO	Demanda química de oxigênio
DFP	Fluorofosfato de diodopropila
Da	Dalton
EC	Classificação enzimática
FAD ⁺	Flavina adenina dinucleotídeo
His	histidina
IUB	União Internacional de Bioquímica
kDa	Kilodalton
NAD ⁺	Nicotinamida adenina dinucleotídeo
PMSF	Fluoreto de fenilmetilsufonil
PVDF	Fluoreto de polivinilideno
Ser	Serina-proteases

CAPÍTULO II

Arg	Arginina
Asp	Ácido aspártico
Asn	Asparagina
Cys	Cisteína
DFP	Fluorofosfato de diodopropila
DMF	Dimetilformamida
DMA	Dimetilacetamida
Gli	Glicina
Glu	Ácido glutâmico
GRAS	<i>Generally regarded as safe</i>
His	Histidina

Ile	Isoleucina
Leu	Leucina
Lys	Lisina
LiCl	Cloreto de lítio
Met	Metionina
NaCl	Cloreto de sódio
PMSF	Fluoreto de fenilmetilsufonil
Phe	Fenilalanina
PEG	Polietilenoglicol
pI	Ponto isoelétrico
Ser	Serina
SDS	Dodecil sulfato de sódio
Trp	Triptófano
Tris-HCl	Tris(hidroximetil)aminometano-ácido clorídrico
Tyr	Tirosina
Val	Valina

RESUMO

Enzimas são biocatalisadores específicos que são utilizadas em vários campos de atuação, desde a indústria de alimentos, até na formulação de detergentes. As proteases são biocatalisadores de grande interesse comercial na indústria, movimentando bilhões de dólares com produção de toneladas de detergentes para diferentes aplicações. A demanda de proteases no mercado brasileiro promove pesquisas como também o empreendedorismo nesse segmento embora mais investimentos por parte das agências do governo devam ser necessárias. A potencialidade da matéria prima renovável e o aumento do desenvolvimento de tecnologias para enzimas, como o conhecimento sobre a conformação protéica e estabilidade com atividades catalítica são as bases que podem promover a exportação de enzimas. Ligações de hidrogênio, forças iônicas e de van der Waals, como também as interações hidrofóbicas precisam ser mantidas entre os aminoácidos para gerenciar a conformação espacial das enzimas, evitando desnaturação protéica. No processo de formulação, é necessário investigar a interrelação de parâmetros físicos e aditivos químicos cujas variáveis são importantes para manter a estabilidade da conformação espacial, adicionando elementos como conservantes, sais, polímeros, surfactantes, solventes, detergentes e outros elementos para manter a estrutura da enzima. Nesse trabalho foram analisadas as composições de três bioprodutos dispostos no mercado brasileiro para lavagem de roupa. A presença de agentes ativos entre eles: enzimas e tensioativos e, a interação entre esses aditivos durante o armazenamento e as condições operacionais promovem as respectivas diferenças e características que impulsionam a competitividade desses produtos.

Palavras-chaves: proteases, estabilização de proteínas, aplicação tecnológica.

ABSTRACT

Enzymes are specific biocatalysts that work in wide field of applications as food industry as detergent formulation. The proteases represents an important commercial bioproduct used in industry, managing billion of dollars year by year, producing tons of detergents for different applications. Enzymatic reactions are processed under mild temperature and pressure with great commercial interest, being these catalysts biodegradable. The proteases demand in the brazilian market promotes the researches, as the entrepreneurship in this area although more investments from government agencies must be necessary. The potenciality in renewable raw material and the increase of development of enzyme technologies are the bases that can promote the enzymes exportation. Hydrogen and disulfide bonds, van der Waals and ionic powers, as well as hydrophobic interactions need to be kept among these amino acids to manage the spacial conformation of the enzymes, avoiding the inactivation or the protein desnaturation. The formulation process need of physical and chemical managements to promote the stability of the protein chains to try to protect the catalytic site and the spacial structure, adding elements like preservatives, salts, polymers, surfactantes, solvents, detergents and others elements to manage the structure of the enzyme in this process of formulation is necessary. In this work was analyzed the chemical composition of three bioproducts sold in the brazilian market used for domestic laundry, the presence of the main active agents among them like: enzymes, tensioactives and others, and the interaction these additives during the formulation process that could promote the respective differences and characteristics that make these products competitive.

Keywords: proteases, protein stabilization, technological application.

CAPÍTULO I

1.1 Introdução

A biotecnologia utiliza agentes biológicos para obter bens ou assegurar serviços por meio da manipulação de micro-organismos, plantas e animais para obtenção de processos e produtos de interesse. Os micro-organismos têm sido largamente empregados por apresentarem elevada velocidade de síntese, estabilidade e rendimento elevado de substrato em produto, além de pequeno tempo de geração, diversidade e facilidade de manipulações genética e de condições ambientais (HAZAN; SHAH; HAMMED, 2006; VENTURA; FREITAS; FREIRE, 2008).

Enzimas são proteínas biocatalíticas que regulam a velocidade das reações bioquímicas que ocorrem nos seres vivos. Agem de forma a acelerar a reação com redução de energia de ativação, sem alterar a constante de equilíbrio ou a energia livre de reação. Dentre as diferenças em relação ao catalisador químico, as enzimas catalisam reações em condições suaves de temperatura e de pressão, não são tóxicas aos seres vivos e reduzem as necessidades energéticas e de efeitos corrosivos em reatores (ZANIN; MORAES, 2004). A redução do custo de produção de enzimas é favorecida no país, pela possibilidade de bioconversão de subprodutos agrícolas como farelo de trigo, farelo de algodão, casca de soja, soro de leite e água de maceração de milho dentre outros. Há tendência para o aumento do uso de enzimas de forma geral e em particular, em processos industriais (MUSSATTO; FERNANDES; MILAGRES, 2007).

As peptidases, peptídeo-hidrolases ou proteases são enzimas hidrolíticas que clivam ligações peptídicas em proteínas e em seus fragmentos. Atuam de forma universal nos seres vivos, participando de vias metabólicas e de vias de sinalização celular. Muitos micro-organismos secretam peptidases para o meio externo com o fim de degradar proteínas cujos produtos de hidrólise servem como fonte de carbono e de nitrogênio no metabolismo celular (VERMELHO et al., 2008). A aplicação tecnológica das proteases na produção de pães e biscoitos enriquece as farinhas de trigo de alto teor protéico e melhora tecnologicamente esses produtos, proporcionando a extensibilidade das massas e maior maleabilidade das mesmas no processamento, além de redução do tempo de preparo. Essas enzimas também são utilizadas no preparo de cervejas, medicamentos, óleos vegetais, na indústria de detergentes, em processos que utilizam o couro, dentre outros, proporcionando produtos finais com características específicas (NASCIMENTO, 2006; VIDYASAGAR, 2009). Na última década, a

importação de biocatalizadores tem aumentado exponencialmente. O mercado global de enzimas movimentará US\$ 3,74 bilhões até 2015 decorrentes da soma das vendas de enzimas para indústria de alimentação animal e outros segmentos. Dentre as enzimas utilizadas em biotransformações industriais, as hidrolases são aplicadas em cerca de 50 % dos processos biotecnológicos (ZANIN; MORAES, 2004; BON et al., 2008).

A estrutura molecular de uma enzima depende de ligações peptídicas e dos respectivos aminoácidos, além de interações intramoleculares. A atividade catalítica pode ser alterada em função de agentes externos, como: calor, álcalis, metais pesados e outros agentes oxidantes que podem desnaturar ou inativar a estrutura protéica. Para que esses catalisadores sejam comercializados é fundamental que apresentem estabilidade durante o armazenamento e o processo operacional (VENTURA; FREITAS; FREIRE, 2008).

Considerando o contexto do comércio de enzimas, as vantagens da aplicação desses biocatalizadores em processos tecnológicos, a diversidade das aplicações de proteases e a baixa estabilidade de estruturas conformacionais de proteínas com atividade catalítica, este trabalho visa analisar fatores que influenciam a estabilidade de estruturas de enzimas microbianas, especificamente proteases, para aplicação tecnológica em detergentes.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo geral

O objetivo geral deste trabalho foi analisar estudos de estabilidade de conformação protéica em proteases para aplicação tecnológica em detergentes.

1.2.2 Objetivos específicos

- Exemplificar características, propriedades e fontes de proteases para aplicação tecnológica;
- Discutir interações de caráter físico-químico responsáveis pela estabilidade da conformação espacial de enzimas;
- Descrever reações na cadeia protéica que alteram a atividade catalítica de enzima;
- Exemplificar estratégias utilizadas para aumentar a estabilidade de enzimas;
- Enumerar condições físico-químicas de formulação de enzimas para comercialização;
- Co-relacionar atividade catalítica de enzima e estabilidade da cadeia protéica;
- Avaliar e discutir composições químicas de biodetergentes comerciais.

1.3 REVISÃO DE LITERATURA

1.3.1 Biotecnologia

A biotecnologia clássica era uma habilidade artesanal usada na fabricação de produtos, tais como o vinho, a cerveja, o iogurte e o pão. Esses processos tradicionais de fermentação foram elucidados depois que os mecanismos biológicos foram compreendidos com base científica. Essa ciência aplica princípios científicos e de engenharia no processamento de materiais por agentes biológicos. A biotecnologia é uma área multidisciplinar que envolve biologia, microbiologia, bioquímica, biologia molecular e engenharia química, dentre outras ciências. Os processos biotecnológicos modernos são responsáveis por variedades de produtos, incluindo: alimentos, bebidas, enzimas, vitaminas, antibióticos, proteínas recombinantes, vacinas, combustíveis (SMITH, 2004).

As diversidades biológicas e genéticas são matérias-primas básicas para os avanços que se observam nessa área. Verifica-se, por outro lado, desigual distribuição espacial de recursos biogenéticos e de recursos científico-tecnológicos. Enquanto a biodiversidade encontra-se majoritariamente situada em países em desenvolvimento, o conhecimento que fundamenta a moderna biotecnologia está amplamente concentrado em países de economia avançada.

Com o avanço da biologia molecular, ocorreu o desenvolvimento de sistemas de produção de biomoléculas de interesse comercial, geradas por metabolismos de micro-organismos modificados geneticamente. As biotecnologias genômica e proteômica estão agora anunciando uma nova era, em especial na área de recursos humanos e na gestão do meio ambiente por prevenir e/ou remediar a poluição ambiental (SMITH, 2004).

Historicamente, o primeiro produto comercialmente disponível obtido pela biotecnologia molecular foi a insulina humana. Em 1978, a empresa americana Genentech anunciou a clonagem de genes que codificam as cadeias polipeptídicas que formam a insulina e a sua expressão em células de *Escherichia coli*. A produção de insulina humana por engenharia genética, desenvolvida pelo convênio entre a Universidade de Brasília e a Biobrás, está patenteada nos Estados Unidos e com pedido de patente no INPI, Brasil (SAID; PIETRO, 2004)

Dentre os agentes biológicos utilizados nos processos tecnológicos, ressaltam-se os micro-organismos pelas diversas vantagens de manipulação e de reprodução frente aos outros seres vivos (vegetais e animais). A produção microbiana de enzimas, especificamente proteases, atingiu um percentual de exportação maior que o de importação devido ao

desenvolvimento de tecnologia pelo apoio de órgãos de fomento, financiando pesquisas e distribuindo bolsas para estudos de pós-graduação, que conseqüentemente, impulsionaram uma balança comercial brasileira positiva de bioproduto (BRASIL, 2012).

1.3.2 Enzimas

Pasteur demonstrou que as fermentações, conhecidas como práticas artesanais para produzir bebidas alcoólicas e vinagre, estavam relacionadas à presença de micro-organismos. O trabalho precursor de Eduard Büchner (laureado com o Nobel de 1907), publicado em 1897 mostrou que fermentações são ações puramente químicas que podem ocorrer em meio livre de células, originando a Enzimologia – o estudo das enzimas, isto é, os agentes químicos responsáveis por essas ações fermentativas (VENTURA; FREITAS; FREIRE, 2008).

Muitas reações químicas ocorrem espontaneamente, outras precisam ser catalisadas para proceder a um ritmo significativo. Os catalisadores são moléculas que diminuem a magnitude da barreira de energia necessária para ser ultrapassada por uma substância a ser convertida quimicamente em outra. Termodinamicamente, a magnitude dessa barreira de energia pode ser expressa em termos de variação de energia livre. Eles reduzem a energia devido a interações com o substrato para formar um complexo de transição ativo que libera o produto e regenera o catalisador. Logo, o catalisador não é consumido ou alterado durante a reação de modo que, pode ser utilizado indefinidamente para converter o substrato em produto, entretanto, é limitado pela baixa estabilidade da sua estrutura, isto é, a sua capacidade de deter a sua função catalítica ao longo do tempo nas condições de reação (ILLANES, 2008).

Reações bioquímicas, isto é, as reações químicas que compõem o metabolismo de todas as células vivas, necessitam ser catalisadas para prosseguir com o ritmo requerido para sustentar a vida. Cada uma das reações bioquímicas do metabolismo da célula requer uma enzima específica. Esses biocatalisadores são utilizados há milhares de anos pelo homem cuja aplicação foi difundida pela elucidação dos mecanismos de atuação (VENTURA; FREITAS; FREIRE, 2008).

Enzimas são moléculas de proteínas que evoluíram para preservar e executar de forma eficiente a funcionalidade e a integridade dos sistemas biológicos. São proteínas globulares, de estrutura terciária e quaternária, que agem como catalisadores biológicos, isto é, são moléculas orgânicas biocatalíticas que regulam a velocidade das reações bioquímicas que ocorrem nos seres vivos sem alterar sua própria estrutura neste processo (ILLANES, 2008).

Algumas enzimas requerem pequenas moléculas ou estruturas químicas que possam atuar como catalisadores, denominadas de coenzimas ou cofatores. A coenzima é um termo usado para pequenas moléculas orgânicas que se associam de forma reversível à enzima, mas que não fazem parte da sua estrutura. As coenzimas ligadas a enzimas participam da reação e, por vezes, são chamados co-substratos, uma vez que são de natureza estequiométrica. A nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD⁺) e a flavina adenina dinucleotídeo (FAD⁺) são portadores intermediários de elétrons (coenzimas) em várias reações enzimáticas. O termo cofator é normalmente utilizado para se referir a íons de metal que também se ligam reversivelmente às enzimas, mas, em geral, não são quimicamente alterados durante a reação; cofatores geralmente se ligam fortemente

à estrutura da enzima de modo que não são dissociadas da holoenzima durante a reação. As enzimas agem de forma a acelerar a reação com redução de energia de ativação, sem alterar a constante de equilíbrio ou a energia livre de reação (CAMPBELL; FARRELL 2007).

De acordo com a Tabela 1, a energia de ativação aumenta de 8,4 a 75,4 KJ/mol, dependendo da presença ou não de catalisador durante a decomposição de peróxido de hidrogênio. Está ilustrado que a velocidade de reação por ação da catalase é 10^7 vezes maior que na presença da platina, catalisador inorgânico.

Tabela 1 Efeitos de catalisadores sobre a energia de ativação e velocidade de reação na decomposição do peróxido de hidrogênio

CATALISADOR	ENERGIA DE ATIVAÇÃO (KJ/MOL)	VELOCIDADE RELATIVA DE REAÇÃO
Sem	75,4	1
Platina	50,2	2×10^4
Catalase	8,4	3×10^{11}

Fonte: Zanin e Moraes (2004)

Embora as vantagens catalíticas das enzimas sejam muitas, sua utilização em processos industriais tem sido restringida, por causa principalmente de: (a) baixa estabilidade nas condições de operação; (b) custo elevado de produção desde o isolamento até a purificação; e (c) dificuldade técnica para separação de substrato e produto, ao término da reação. Isto reduz o emprego de enzimas solúveis, essencialmente em processos em batelada, onde a mistura substrato/enzima permanece em contato pelo tempo necessário para se

alcançar um determinado grau de conservação. Ao término do processo, o descarte da enzima e de outras proteínas é realizado por meio de variações de pH ou tratamento térmico. Porém, esses processos desnaturam a enzima, gerando a perda da atividade e impedindo sua reutilização em processos posteriores (SAID; PIETRO, 2004).

As enzimas estão presentes em micro-organismos, animais e vegetais e a redução do custo de produção de enzimas é favorecida no país, por bioconversão microbiana de subprodutos agrícolas como farelo de trigo, farelo de algodão, casca de soja, soro de leite e água de maceração de milho dentre outros (MUSSATTO; FERNANDES; MILAGRES, 2007).

A Tabela 2 apresenta diversas características entre enzimas e catalisadores químicos, ressaltando a elevada especificidade para os substratos, apresentada pelos biocatalisadores. Dentre as outras diferenças em relação ao catalisador químico, tem-se a capacidade de catalisar uma reação em condições suaves de temperatura e de pressão, além de redução de necessidades energéticas e de efeitos corrosivos nos reatores.

Tabela 2 Comparação entre características de enzimas e catalisadores químicos

Características	Enzimas	Catalisadores químicos
Especificidade ao substrato	alta	baixa
Natureza da estrutura	complexa	simples
Sensibilidade à temperatura e pH	alta	baixa
Condições de reação (T, P e pH)	suaves	drástica (geralmente)
Custo de obtenção (isolamento e purificação)	alto	moderado
Consumo de energia	baixo	alto
Formação de subprodutos	baixa	alta
Separação catalisador/produto	custo alto	simples
Atividade catalítica em temperatura ambiente	alta	baixa
Presença de cofatores	sim	não
Estabilidade	baixa	alta
Energia de ativação	baixa	alta
Velocidade de reação	alta	baixa

Fonte: Adaptada de Zanin e Moraes (2004)

As enzimas são utilizadas em processos químicos clássicos por apresentarem inúmeras vantagens. Dentre essas vantagens destacam-se: elevada velocidade de reação; utilização de condições brandas; compatibilidade com substratos sintéticos; em alguns casos podem

catalisar as reações nos dois sentidos e podem, ainda, apresentar alguma seletividade quanto ao tipo de reação que catalisam (ZANIN; MORAES, 2004; PAQUES; MACEDO, 2006). Devido a sua natureza protéica e sua conformação tridimensional, a elevada especificidade das enzimas ao substrato, reduz significativamente a obtenção de subprodutos indesejáveis na reação (SAID; PIETRO, 2004).

Enzimas isoladas ou purificadas apresentam um número de propriedades que as tornam um atrativo catalisador em biotransformação, tais como alta eficiência catalítica (podem elevar a velocidade de uma reação de 10^8 a 10^{12} vezes); seletividade; atuação em condições brandas de temperatura (30 a 70 °C) e em pressão atmosférica. Com um mercado crescente e promissor, grande parte da produção de enzimas ainda é designada às indústrias de detergente e amido. O uso de enzimas isoladas é preferível, quando existem limitações com relação à permeabilidade do substrato na membrana da célula, ou quando acontecem reações secundárias indesejáveis. (CASTRO; BRANDÃO, 2004).

Com os avanços na compreensão da natureza das enzimas e do seu potencial catalítico, vem sendo ampliada sua aplicação industrial, na produção de alimentos, em cervejarias, indústria têxtil, farmacêutica e de detergentes. Esses biocatalisadores são também aplicados principalmente em produtos farmacêuticos e na química fina quando a especificidade da reação é primordial e em tecnologias cujo impacto ambiental seja negativo por utilizarem metais pesados que são compostos tóxicos enquanto as enzimas são proteínas, compostos inócuos aos seres vivos (CAMPBELL; FARELL, 2007).

Em geral, as enzimas são empregadas na alimentação animal com dois propósitos: complementar as enzimas que são produzidas pelo próprio animal em quantidades insuficientes (amilases e proteases) e fornecer aos animais enzimas que eles não conseguem sintetizar (celulases). Com essas práticas, há redução dos efeitos negativos causados pelos polissacarídeos não-amiláceos. Rações para animais contendo matérias-primas alternativas: trigo, cevada, milho e farelo de soja têm utilizado enzimas em sua composição (FISCHER et al., 2002).

Existem enzimas que também podem exercer sua atividade catalítica em meios orgânicos e em condições de alta pressão, como é o caso das lipases, álcool-desidrogenase e fosfatase alcalina. O interesse industrial por tecnologias enzimáticas vem aumentando gradativamente, principalmente em meios não convencionais, as quais expandiram consideravelmente o potencial de aplicação das enzimas como catalisadores em processos industriais (CASTRO; BRANDÃO, 2004).

1.3.3 Proteases

As peptídeo-hidrolases, peptidases ou proteases são enzimas hidrolíticas que clivam ligações peptídicas nas proteínas e em seus fragmentos (peptídeos). Hidrolisam proteínas a peptídeos e aminoácidos; têm presença universal nos seres vivos e representam cerca de 2% do total de proteínas presentes em todos os organismos, atuando em vias metabólicas e vias de sinalização celular.

As proteases de plantas e de animais não atendem à demanda industrial e por conseguinte, as microbianas apresentam grande interesse. A produção industrial de peptidases por micro-organismo é beneficiada pelo seu pequeno tempo de geração e pela diversidade e facilidade de manipulação fisiológica e genética desses seres vivos (VERMELHO et al., 2008).

1.3.3.1 Classificação

As hidrolases compõem a classe de enzimas de maior uso nos tempos atuais. Dentre elas estão amilases, proteases, celulasas e lipases. Esse grupo de enzimas constitui um dos três maiores grupos de enzimas industriais e são responsáveis por 60% das vendas totais de enzimas em todo o mundo (KARBALAEI-HEIDARI et al., 2009; FELIX, NORONHA, MARCO, 2004).

As proteases são classificadas de acordo com três critérios: (a) tipo de reação catalisada; (b) natureza química do sítio catalítico e, (c) relação evolucionária em conformidade com a estrutura (VERMELHO et al., 2008). De acordo com o Comitê Internacional de Enzimas (Enzyme Commission) da União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular, as proteases são enzimas que pertencem à classe 3 (hidrolases) e a subclasse 3.4 (peptídeo-hidrolases ou peptidases). As exopeptidases que agem na região N-terminal da proteína são denominadas aminopeptidases e as que atuam na região C-terminal são chamadas carboxipeptidases que são divididas em subclasses conforme os grupos químicos de centro-ativo envolvidos no mecanismo catalítico. As carboxipeptidases são subdivididas em serina-, metalo- e cisteína-carboxipeptidases. As endopeptidases são subdivididas em serina-, cisteína-, aspártico-, metalo- e treonina-endopeptidases.

As enzimas proteolíticas são classificadas em seis famílias conforme a massa molecular, com suas propriedades elétricas e ainda, conforme a sua especificidade ao

substrato. Cada família de proteases apresenta resíduos de aminoácidos característicos no seu sítio ativo (THYS, 2004).

As proteases constituem um dos grupos mais importantes de enzimas industriais que são agora utilizados em grande variedade de processos industriais: detergentes, alimentos, produtos farmacêuticos, couro e seda. Com a exceção de utilizações farmacêuticas, a indústria dos detergentes tem emergido como um dos grandes consumidores de enzimas hidrolíticas (ADINARAYANA; JYOTHI; ELLAIAH, 2005).

No entanto, a especificidade das peptidases não se relaciona apenas à posição da ligação peptídica ou ao tamanho da cadeia de resíduos de aminoácidos, havendo também seletividade em relação à sequência de aminoácidos vizinhos à ligação. A Tabela 3 apresenta a classificação das proteases baseada na estrutura química do centro ativo, além de proteases cujas estruturas de atuação não estão suficientemente elucidadas e por conseguinte, são classificadas num subgrupo específico (VERMELHO et al., 2008).

Tabela 3 Classificação de peptidases de acordo com o sítio ativo catalítico

Peptidases	EC subclasses
Carboxipeptidases	
Serina-carboxipeptidase	3.4.16
Metalo-carboxipeptidase	3.4.17
Cisteína-carboxipeptidase	3.4.18
Endopeptidases	
Serina-endopeptidase	3.4.21
Cisteína-endopeptidase	3.4.22
Aspártico-endopeptidase	3.4.23
Metalo-endopeptidase	3.4.24
Treonina-endopeptidase	3.4.25
Endopeptidase com mecanismo catalítico desconhecido	3.4.99

Fonte: Zanin e Moraes (2004)

Analisando a faixa de pH na qual possuem maior atividade, as peptidases podem ainda, ser classificadas em peptidases ácidas, alcalinas ou neutras. As ácidas incluem, principalmente, as aspárticos-proteases que apresentam atividade na faixa de pH de 2,0 a 6,0. As peptidases neutras apresentam atividade em pH neutro na faixa de 6,0 a 8,0, sendo representadas, principalmente, pelas cisteíno-proteases, metalo-proteases e algumas serino-proteases. Já as

peptidases básicas apresentam maior atividade na faixa de pH de 8,0 a 13,0 e incluem, principalmente, as serino-proteases (FELIX, NORONHA, MARCO, 2004).

1.3.3.2 Fonte de proteases

Muitas proteases de origem natural, como as do pâncreas de animais e de algumas frutas, não são adequadas ao uso em detergentes, por atuarem em condições ácidas ou neutras. Proteases alcalinas oriundas de intestinos de insetos, como da espécie *Spilosoma obliqua* são bastante utilizadas como aditivos em detergentes, pois esses bioprodutos apresentam atividade em pH alcalino e grande estabilidade em relação aos obtidos de origem bacteriana (FELIX, NORONHA, MARCO, 2004).

Em contraste aos fatores limitantes de produção de enzimas de origem vegetal e animal, as enzimas microbianas são produzidas por cultivo de micro-organismos na presença de resíduos industriais nutritivos. A produção em grande escala com relativo baixo custo é potencialmente ilimitada a partir de fontes renováveis. O agente microbiano, a disponibilidade de nutrientes e o processo tecnológico são determinantes. Após o cultivo microbiano, o grande volume do líquido metabólico é reduzido por concentração através de ultrafiltração, utilizando membranas filtrantes cujos poros são dimensionados para reter as proteases enquanto a água e outras moléculas menores ficam no permeado (RENNEBERG, 2008). Técnicas de evaporação à vácuo e de *spray drying* são também avaliadas para concentrar enzimas (ILLANES, 2008).

O desenvolvimento tecnológico de enzimas depende do custo de produção e da estabilidade do produto final. Para a composição de detergentes, é necessário que os biocatalisadores atuem sob condições de temperatura elevada, pH extremo (alcalino), presença de agentes oxidantes (alvejantes) e solventes orgânicos. Os biodetergentes contêm proteases na proporção de 1:50 que durante o processo de lavagem são capazes de degradar as cadeias protéicas em aminoácidos e peptídeos. As proteínas, principalmente de leite, ovo, chocolate e sangue fixam sujidades e por isso, dificultam o processo de lavagem, porém essas manchas são destacadas com certa facilidade por ação hidrolítica de proteases (ILLANES, 2008; RENNEBERG, 2008; CRUTZEN, DOUGLAS, 1999).

Proteases oriundas de micro-organismos são produzidas por manipulação de condições ambientais devidamente controladas. A produção de proteases por micro-organismos é grandemente influenciada por componentes, especialmente de carbono e nitrogênio e os

fatores físicos tais como temperatura, pH, tempo de incubação, agitação e densidade do inóculo (QURESHI et al., 2011).

As proteases neutras e alcalinas são produzidas principalmente por bactérias do gênero *Bacillus*. Essas enzimas possuem vantagens sobre catalisadores químicos, visto que apresentam elevadas taxas de catálise e especificidade, podendo ser elaboradas em quantidades consideradas comercialmente viáveis. A indústria de detergentes é um consumidor majoritário de peptidases alcalinas. As peptídeos-hidrolases de origem fúngica surgem em maior variedade. Por exemplo, *Aspergillus oryzae* produz proteases ácidas, neutras e alcalinas, as quais atuam em uma vasta faixa de pH de 4 a 11. Há uma tendência em usar enzimas de micro-organismos extremofílicos, visto que tais enzimas possuem características não convencionais e são, por conseguinte, mais resistentes a situação desfavoráveis (SAID; PIETRO, 2004).

Na indústria de detergentes, as proteases alcalinas de *Bacillus* sp. são as mais utilizadas. A produção de proteases depende de condições de cultivo como também do tipo das cepas utilizadas. Os custos de produção envolvem principalmente o cultivo do micro-organismos.

Em relação às enzimas oriundas de fungos, essas representam vantagem em relação às proteases de origem bacteriana pois esses micro-organismos apresentam o fenômeno de autólise natural em culturas envelhecidas, propiciando menos riscos na contaminação do produto enzimático pelas células produtoras (FELIX, NORONHA, MARCO, 2004).

1.3.3.3 Aplicação tecnológica

A hidrólise protéica é uma tecnologia amplamente desenvolvida como forma de agregar valor, funcionalidade e expandir o leque de aplicações para materiais de uso pouco convencional, subprodutos e resíduos da indústria de alimentos (THYS, 2004).

A tabela 4 ilustra as diversas origens de proteases e suas respectivas aplicações industriais. As proteases bacterianas possuem inúmeras aplicações nas indústrias alimentícia e química. Na indústria de alimentação, destacam-se por ter maior aplicação, apresentando um papel fundamental na fabricação de cervejas, na maturação de queijos, no amaciamento de carnes, na produção de hidrolisados funcionais, na panificação, na produção de adoçantes artificiais, como o aspartame e na recuperação e aproveitamento de resíduos e subprodutos (THYS, 2004).

As peptidases possuem potencial para uso em uma vasta variedade de processos industriais. Entre as indústrias e/ou processos que se beneficiam das qualidades catalíticas das peptidases, exemplifica-se as produções de detergentes, alimentos, rações, processamento de couro, tratamento de lixo, a biorremediação, entre outros (FELIX; NORONHA; MARCO, 2004).

Tabela 4 Aplicações industriais de proteases obtidas de plantas, animais e micro-organismos

Fonte	Enzima	Aplicação industrial
Animal	Tripsina, Quimotripsina, etc.	Indústria farmacêutica, de couro, processamento de alimentos, especialmente hidrólise de proteínas e síntese de peptídeos.
Vegetal	Papaína, Ficina, Bromelaína	Produção de extratos de leveduras, cerveja resistente ao congelamento, panificação, fármacos, amaciamento de carne.
<i>Aspergillus niger</i>	Proteases ácidas e neutras	Queijo, carnes, pescado, cereais, bebidas.
<i>Aspergillus oryzae</i>	Proteases ácidas e neutras	Hidrólise proteica, processamento de carne e pescado, indústria cervejeira e de panificação.
<i>Aspergillus melleus</i> , <i>Endothia parasítica</i> , <i>Mucor miehei</i> e <i>Mucor pusillus</i>	Proteases alcalinas	Manufatura de queijo (coagulação do leite).
<i>Bacillus licheniformis</i> e <i>Bacillus subtilis</i>	Proteases alcalinas	Fabricação de detergentes e indústria de couro, processamento de carnes, pescados e derivados lácteos.
<i>Bacillus subtilis</i> e <i>Bacillus cereus</i>	Protease neutra	Produção de bebidas e panificação.

Fonte: Giongo (2006)

As condições que capacitam as peptidases a agirem como catalisadores industriais variam consideravelmente. Enzimas a serem usadas nas indústrias de produção de detergentes e de alimentos devem ser elaboradas em grandes quantidades e devem ser eficientes sem maiores processamentos (*in natura*). Porém, as peptidases usadas em indústrias farmacêuticas (como medicamentos) são elaboradas em poucas quantidades, pois necessitam de procedimentos extensivos de purificação (FELIX; NORONHA; MARCO, 2004).

1.3.4 Estabilização de estruturas protéicas

As enzimas são estruturas moleculares complexas, intrinsecamente instáveis devido às diversas interações na estrutura da molécula: eletrostáticas (forças iônicas entre aminoácidos

com cargas opostas), hidrofílicas (entre aminoácidos polares na superfície), hidrofóbicas (entre aminoácidos apolares internamente), ligações de hidrogênio (entre hidroxilas e átomos de hidrogênio), pontes dissulfeto (entre aminoácidos que contêm enxofre), forças de Van der Waals. As forças de atração e de repulsão entre entidades moleculares ou entre grupos dentro da mesma estrutura molecular interferem na estabilidade da atividade catalítica das enzimas (CAMPBELL; FARRELL, 2007).

A estabilização de enzimas em condições de processo é uma importante estratégia na área de biocatálise. Propostas têm sido desenvolvidas visando: modificação química, imobilização em suportes, concentração por ultrafiltração e modernas técnicas de engenharia de proteínas. Triagem de enzimas intrinsecamente estáveis é uma área importante de pesquisa em biocatálise. Os extremófilos, ou sejam, organismos capazes de sobreviver e prosperar em condições ambientais extremas é uma fonte promissora de enzimas altamente estáveis. Genes de extremófilos têm sido clonados em hospedeiros adequados para desenvolver sistemas biológicos mais propícios para a produção de enzimas e aplicação tecnológica (ILLANES, 2008).

A atividade enzimática capaz de catalisar uma reação química é estritamente dependente da sua estrutura molecular. A função catalítica da enzima depende de resíduos de aminoácidos na estrutura tridimensional da proteína e de interações entre esses aminoácidos. Conseqüentemente, qualquer agente que promove o desdobramento da proteína irá alterar a conformação e ou os aminoácidos que constituem o sítio ativo, diminuindo a sua atividade biológica. Condições adversas de temperatura, pH ou solvente e na presença de metais pesados e agentes quelantes podem causar perda da função, distorcendo a configuração espacial da cadeia protéica. Mesmo que uma pequena parte da molécula de enzima participe da catálise, o restante da molécula é também relevante para o seu desempenho (ILLANES, 2008).

A estabilidade enzimática é muito dependente da estrutura tridimensional da enzima. Certas regiões instáveis denominadas de pontos fracos, isto é, regiões propensas a desdobrar, são determinantes de estabilidade enzimática e estão normalmente localizadas perto da superfície da molécula de proteína, o que explica porque a região superficial da enzima é importante para a sua estabilidade catalítica. A estabilidade é um parâmetro importante, pois determina a viabilidade econômica da aplicação de uma enzima num processo industrial. Elevada estabilidade é considerada, geralmente, como uma vantagem econômica devido ao reduzido volume de enzimas. As enzimas estáveis permitem o uso de elevadas temperaturas

no processo, o que pode ter efeitos benéficos sobre as taxas de reação, solubilidade ao reagente e o baixo risco de contaminação microbiana (EIJSSINK et al., 2004).

A estabilidade das enzimas continua a ser um assunto crítico em Biotecnologia. Uma distinção relevante deve ser feita entre a estabilidade à estocagem e no processo operacional de todo bioproduto com atividade catalítica. Armazenamento e estabilidade operacional influenciam no uso da enzima. Estabilidade em armazenagem, ou vida de prateleira, refere-se à manutenção de sua capacidade catalítica, no período entre o fabrico e a utilização eventual. Estabilidade operacional descreve a persistência da atividade da enzima durante o processo, sob condições operacionais (Ó'FÁGÁIN, 2003).

As estruturas protéicas de enzimas apresentam grande variação na atividade catalítica ao longo do tempo. O critério de estabilidade mais usado é o conceito de tempo de meia-vida, isto é, o tempo necessário para que se observe na atividade relativa da enzima, uma redução de 50% em relação à atividade inicial. A estabilidade do reator é descrita em termos do tempo de meia-vida e calculado a partir das equações do modelo adotado. Entretanto, deve-se atentar que esse tempo de meia-vida difere daquele obtido em reator de batelada (CARNEIRO, 2003).

O progresso obtido nos últimos anos no desenvolvimento de diferentes técnicas relacionadas à tecnologia de DNA recombinante tem possibilitado adquirir biomoléculas previamente planejadas e/ou modificadas, apresentando propriedades mais adaptadas às condições de uso industrial e/ou terapêutico. A utilização de biomoléculas nesses setores exige que elas sejam suficientemente estáveis, afim de que apresentem atividade para usos mais prolongados, sob condições onde podem ocorrer extremas variações de temperatura e de pH, além de não se modificarem na presença de compostos químicos e obter preparação de enzimas especialmente dirigidas para uma determinada finalidade (PAULA et al., 2008; SMITH, 2004).

A estabilidade obtida em escala de laboratório pode não ser reproduzida em escala industrial. Desse modo, é relevante reduzir a contaminação microbiológica pela operação em temperaturas altas, ou incluindo agentes bactericidas, ou ainda por tratamento intermitente do reator com bactericidas e solventes orgânicos. Apesar da sua disponibilidade comercial está relativamente limitada, a produção de enzimas modificadas por técnicas de biologia molecular e/ou que tenham sido produzidas a partir de diferentes sistemas de expressão, constitui uma alternativa concreta de obtenção de moléculas com propriedades físico-químicas mais adaptadas aos diversos ramos de utilização. Além disto, as técnicas disponíveis já estão possibilitando a concepção de processos produtivos de enzimas em condições viáveis aos seus

respectivos usos, permitindo, ao mesmo tempo, uma substancial redução dos custos dos produtos finais. A restrita aplicação industrial de enzimas, comparada ao grande volume de trabalhos publicados, deve-se basicamente ao elevado custo de produção microbiana, à baixa estabilidade operacional, além da necessidade de equipamentos mais complexos para processos contínuos, ou ao fato do produto adquirido não ter ainda um mercado que justifique a competitividade comercial. Essas restrições podem ser solucionadas pelo desenvolvimento de pesquisas em diferentes áreas (ILLANES, 2008).

1.3.5 Imobilização de enzimas

As enzimas podem ser utilizadas nos processos industriais de maneira similar aos catalisadores químicos quando estão ativas e estáveis, além da especificidade ao substrato. Um biocatalisador estável pode ser obtido pela tecnologia de imobilização que depende da escolha de um suporte e do método de imobilização nesse suporte.

A imobilização consiste em manter enzimas ou sistemas enzimáticos fisicamente confinados ou localizados em um suporte com retenção de sua atividade catalítica, podendo ser empregados repetida e continuamente. O termo enzima imobilizada inclui tanto a transformação das enzimas de forma a torná-las insolúveis em água, como o uso de enzimas na forma solúvel em reatores equipados com membranas de ultrafiltração que permitem o escoamento dos produtos da reação e restringem a mobilidade da enzima (ZANIN; MORAES, 2004).

A retenção do catalisador biologicamente ativo no interior de um reator ou de um sistema analítico, pode ser formado por uma única enzima, uma mistura de enzimas ou enzimas contidas em células, armazenadas no interior ou na superfície de um material que é utilizado como suporte. O complexo enzima/suporte apreende as características físicas do suporte e ao mesmo tempo, conserva a atividade biológica da enzima na forma solúvel. Esse sistema imobilizado admite a condução de reações em reatores contínuos, com fácil separação de catalisador/produto, além de elevar a produtividade do processo (CASTRO et al., 2008).

Vários métodos são aplicados na imobilização de enzima em material inerte (suporte), envolvendo adsorção, ligação covalente, ligação covalente cruzada com um reagente multifuncional e o enclausuramento em gel ou membrana. A Tabela 5 apresenta métodos de imobilização de enzimas que podem envolver materiais orgânicos e inorgânicos, naturais ou sintéticos (ALFAYA; KUBOTA, 2002; DALLA-VECCHIA; NASCIMENTO; SOLDI, 2004).

A estabilidade operacional da enzima imobilizada depende da metodologia de imobilização, do suporte e do tipo de substrato utilizado. As preparações obtidas com o método de adsorção e ligação iônica, geralmente conduzem à baixa estabilidade operacional, considerando que a estabilidade com suportes aniônicos e catiônicos é função da força iônica da solução. A técnica de adsorção para a imobilização de enzimas sobre materiais inorgânicos exibe a grande vantagem da simplicidade de execução; entretanto, esse processo apresenta baixa estabilidade da enzima, devido a interação entre enzima e suporte depender de condições do meio (pH, força iônica e temperatura), além da alteração da estrutura tridimensional da enzima durante o tempo de uso (ZANIN; MORAES, 2004).

Tabela 5 Métodos de imobilização

Métodos de imobilização	Características
Adsorção	Interação eletrostática entre suporte e enzima
Ligação iônica	Ligação iônica entre suporte e enzima
Ligação covalente	Ligação covalente entre suporte e enzima
Ligação covalente com ligação cruzada	Na presença de reagente bifuncional que interage com o suporte e a enzima, denominado de <i>spacer</i>
Enclausuramento	Quando há polimerização do suporte aprisionando moléculas de enzimas internamente ou em membranas.

Fonte: Zanin e Moraes (2004)

As preparações mais estáveis são alcançadas com método de ligação covalente na presença ou não do reagente glutaraldeído com ligações cruzadas entre enzima e suporte. Acredita-se que a ligação covalente da enzima ao suporte pode estabilizar a estrutura terciária da enzima. Entretanto, durante o processo, deposição de impurezas no suporte, quebra de partículas por efeitos de pressão, dentre outros fatores podem conduzir a redução do tempo de meia-vida do bioproduto imobilizado (SMITH, 2004).

A grande vantagem da técnica de ligação covalente substrato e enzima é a maior estabilidade do complexo enzima-suporte em relação aos efeitos da variação do pH, da força iônica e do solvente. Todavia, o método possui alta possibilidade de perda da atividade enzimática devido à reação com grupos funcionais do centro ativo da enzima, como também pela modificação da estrutura tridimensional da mesma (ALFAYA; KUBOTA, 2002).

A imobilização com ligações cruzadas intermoleculares entre grupos do suporte e da enzima forma partículas insolúveis macroscópicas, pela aplicação de reagentes bi ou multifuncionais, originando forte interação da enzima com o suporte e conseqüentemente,

grande estabilidade do bioproduto imobilizado com redução da lixiviação durante o processo biotecnológico. As enzimas imobilizadas em suportes inorgânicos por meio de ligação covalente são mais estáveis do que as imobilizadas em suportes orgânicos (ALFAYA; KUBOTA, 2002).

O processo de imobilização aumenta a estabilidade operacional da enzima em relação à enzima livre. Limitações difusionais justificam que somente uma fração da enzima imobilizada é ativa no início do processo, permanecendo a restante como reserva que só começará a atuar quando a atividade inicial estiver desnaturada (SMITH, 2004).

Um fator que pode reduzir a estabilidade operacional da enzima imobilizada é a deposição de impurezas sobre a superfície ou nos poros do suporte, dificultando o acesso do substrato à enzima e provocando uma perda da atividade. A redução da estabilidade operacional por essa obstrução pode ser prevenida pelo uso de substratos clarificados por centrifugação ou filtração que são processos de custos elevados especialmente quando grandes volumes de substrato são transformados em produto de baixo preço (ZANIN; MORAES, 2004).

A estabilidade operacional é fundamental no desenvolvimento dos processos com enzimas imobilizadas. Os processos com enzimas imobilizadas somente serão mais econômicos que os processos com enzima solúvel, se conseguir um tempo de meia-vida suficientemente longo para a enzima imobilizada, pois neste caso, há uma redução no custo operacional do processo advindo do menor consumo de enzima, que deveria, além de compensar as despesas adicionais com o processo de imobilização, ser inferior que a enzima livre. No caso da enzima imobilizada, essa estabilidade depende dos fatores: desprendimento da enzima do suporte, obstrução dos poros por impurezas ou produtos secundários, perda de suporte por atrito ou dissolução, obstrução do leito fixo causando canais preferenciais e crescimento de micro-organismos. O efeito geral desses fatores pode ser determinado experimentalmente e deve ser investigada a minimização desses efeitos (SMITH, 2004).

1.3.6 Ultrafiltração de bioprodutos

A ultrafiltração é um método de concentração amplamente utilizado a fim de recuperar, além de concentrar polissacarídeos, gorduras, emulsões, colóides e proteínas que são utilizados em diversos processos industriais (FRANCO, 2006). Os mecanismos de separação com membrana como a microfiltração, ultrafiltração, nanofiltração e osmose inversa distinguem-

se dos processos clássicos de filtração por utilizar meios filtrantes (membranas) com poros cada vez menores, os quais empregam a diferença de pressão como força motriz (HARBERT; BORGES; NÓBREGA, 2006; WITEK-KROWIAK et al., 2011).

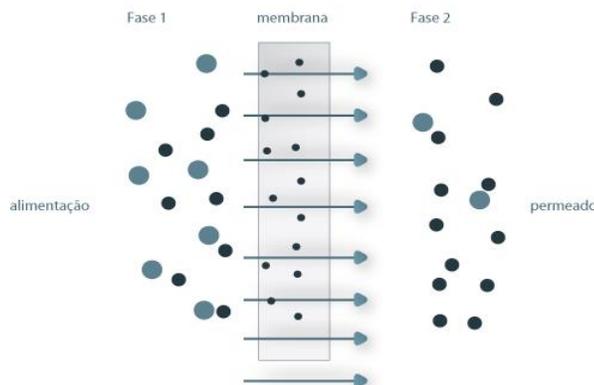
Esse processo caracteriza-se no transporte de soluções por meio de membranas com poros de diâmetros de 0,001 a 0,1 μm , sob pressão de 100 a 500 kPa e fluxo de filtrado de 10 a 200 L/hm². Nesse método, a água e outras moléculas pequenas (menores que os diâmetros dos poros) permeiam pela membrana, enquanto que ficam retidas moléculas com tamanhos superiores ao diâmetro nominal de corte do poro da membrana (*cut-off*) (WEINGARTNER, 2010).

O uso de membranas de ultrafiltração para separação de biossurfactante foi proposta em 1990 por Mulligan e Gibbs para uma mistura de surfactina e ramnolípido. Lin e Jiang (1997) separaram surfactina num processo em duas fases, utilizando membranas com diferentes poros, fazendo uso das propriedades tenso-ativas associadas à formação de micelas. O método de purificação de surfactina foi também modificado por Sen e Swaminathan (2005) e a ultrafiltração em membranas com baixa faixa de porosidade foi perfeitamente adequada para a separação de tais sistemas (WITEK-KROWIAK et al., 2011).

Concentrar proteínas por ultrafiltração tem muitas vantagens, a saber separar bioprodutos de caldos fermentados diluídos, permitir a concentração de compostos a baixa temperatura e pressão, promover a retirada de sais e outras moléculas pequenas e manter constante o pH do meio. O concentrado de enzimas favorece o seu transporte e acondicionamento, pois viabiliza o seu uso por diminuir os gastos com frete e facilitar o manuseio. A ultrafiltração pode também ser utilizada para a purificação de proteínas de acordo com o tamanho das moléculas. Apesar de ser um processo atrativo de purificação, na prática a resolução da técnica é baixa. Isso acontece devido à distribuição do tamanho dos poros não ser uniforme. As moléculas lineares ultrapassam mais facilmente pela membrana do que as globulares e a concentração de polarização e o *fouling* reduzem o *cut-off* da membrana (WEINGARTNER, 2010).

Na ultrafiltração, o fluxo de entrada é separado em dois fluxos de saída, conhecidos como permeado e retentado (Figura 1). O permeado é a fração que ultrapassa a membrana e o retentado (ou concentrado) é a fração enriquecida com os solutos ou sólidos suspensos que não atravessam a membrana, ou seja, é a fração retida pela membrana (SILVA, 2011).

Figura 1 Representação de ultrafiltração por membrana filtrante



Fonte: Adaptado de <http://labvirtual.eq.uc.pt/siteJoomla/images/stories>

A função da membrana é agir como barreira seletiva, admitindo a passagem de certos componentes e detendo outros componentes na mistura. A seletividade da membrana está ligada às dimensões da molécula ou partícula, ao tamanho do poro, à difusibilidade do soluto na matriz e às cargas elétricas associadas (FRANCO, 2006).

A ultrafiltração é utilizada na concentração e fracionamento de proteínas, recuperação de pigmentos e recuperação de óleos. Durante o procedimento de ultrafiltração é aplicada uma força motriz de 1 a 7 atm. Por exemplo, quando o material detido for colóides e macromoléculas de massa molar maior que 5 kDa, o material permeado, são a água (solvente) e os sais solúveis de baixa massa molar, menor do que a porosidade da membrana (FRANCO, 2006).

Brião (2007) analisou o uso da ultrafiltração para a remoção de nutrientes em efluentes de indústrias de laticínio com membranas tubulares e espiraladas de diferentes tamanhos de poros, constituídas por fluoreto de polivinilideno (PVDF) ou polietersulfona. Os resultados demonstraram eficiências de remoção de DQO próxima a 75% e, de proteínas e gorduras acima de 90% (SILVA, 2011).

1.3.7 Formulação de bioprodutos

Formulação de preparações enzimáticas é um passo crucial na produção de enzima em especial no caso de enzimas industriais, uma vez que essa etapa da produção confere ao produtor, a vantagem competitiva. Após a enzima ser purificada até o nível exigido, a preparação deve ser formulada de acordo com o seu uso pretendido. Na formulação

enzimática, há três operações consecutivas que envolvem: polimento final, estabilização e normalização (ILLANES, 2008).

Os fármacos e os cosméticos foram os primeiros produtos biotecnológicos cujas formulações foram investigadas visando à comercialização dos mesmos com estabilidade máxima dos princípios ativos. As vacinas representam a estratégia de intervenção e exemplo dos avanços da microbiologia aliada à biotecnologia com a melhor relação custo-benefício aplicada em saúde pública. O progresso biotecnológico em diversas áreas de pesquisa tem contribuído para o desenvolvimento de formulações mais seguras e eficazes. Essa tecnologia traz perspectiva de que, em futuro próximo, possam estar disponíveis vacinas para o controle de doenças infecciosas e degenerativas ainda não passíveis de prevenção (DINIZ; FERREIRA, 2010).

Na área industrial, especificamente em processos biotecnológicos na presença de enzimas, substâncias químicas estabilizadoras de cadeia protéica e condições do meio (pH, temperatura) têm sido investigados visando aumentar o tempo de meia-vida desses biocatalizadores, além de mantê-los ativos sob condições operacionais.

1.4 REFERÊNCIAS

ADINARAYANA, K., JYOTHI. B., ELLAIAH, P. Production of alkaline protease with immobilized cells of *Bacillus subtilis*. **Pharmscitech Journal**, v. 6, p. 3, 2005.

ALFAYA, A. S.; KUBOTA, L. T. A utilização de materiais obtidos pelo processo de sol-gel na construção de biossensores. **Química Nova**, v. 25, p. 835-841, 2002.

BON, E. P. S.; COSTA, R. B.; SILVA, M. V. A.; FERREIRA-LEITÃO, V. S.; FREITAS, S. P.; FERRARA, M. A. Mercado e perspectivas de uso de enzimas industriais e especiais no Brasil. In: E. P. S. Bon; M. A. Ferrara; M. L. Corvo. **Enzimas em biotecnologia – Produção, Aplicações e Mercado**. Rio de Janeiro: Interciência, p. 463-488, 2008.

BRASIL. **Estudo de viabilidade técnica e econômica destinado à implantação do parque produtivo nacional de aditivos da Indústria de alimentação de animais de produção. Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior**. Disponível em: http://www.mdic.gov.br/arquivos/dwnl_1347635101.pdf. Acesso em: 02 maio 2012.

CAMPBELL, M. K.; FARRELL, S. O. **Bioquímica**, 5. ed., São Paulo: Cengage Learnig, 2007. 847p.

CARNEIRO, A. F. G. C. **Estabilização de Enzimas para Modificação de Fibras Sintéticas**. Dissertação de Mestrado em Tecnologias de Fabricação, Escola de Engenharia, Departamento de Engenharia Têxtil, Portugal, 2003.

CASTRO, M. I.; BRANDÃO, R. L. A biologia molecular e a produção de enzimas de interesse comercial. In: S. Said, R. C. L. R. Pietro. **Enzimas como agentes biotecnológicos**, Ribeirão Preto: Legis Summa, p.115-129, 2004.

CRUTZEN, A.; DOUGLAS, M. L. **Handbook of Detergents**; Broze, G. ed. New York: Marcel Dekker, 1999, 639 p.

DALLA-VECCHIA, R. Aplicações sintéticas de lipases imobilizadas em polímeros. **Química Nova**, v. 27, p. 623-630, 2004.

DINIZ, M O; FERREIRA, L. C. S.; **Biotecnologia aplicada ao desenvolvimento de vacinas**. Estudos Avançados, v. 24, 2010.

EIJSINK, V. G. H.; BJØRK, A.; GÅSEIDNES, S.; SIREVÅG, R.; SYNSTAD, B.; BURG, B. van den; VRIEND, G. Rational engineering of enzyme stability. **Journal of Biotechnology**, v. 113, p. 105, 2004.

FELIX, C. R.; NORONHA, E. F.; MARCO, J. L. Proteases: características e aplicações industriais. In: S. Said; R. C. L. R Pietro. **Enzimas como agentes biotecnológicos**, Ribeirão Preto: Legis Summa, p. 115-129, 2004.

FISCHER, G.; MAIER, J. C.; RUTZ, F.; BERMUDEZ, V. L. Desempenho de Frangos de Corte Alimentados com Dietas à Base de Milho e Farelo de Soja, com ou sem Adição de Enzimas. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 31, p. 402-410, 2002.

FRANCO, R. L. M. **Recuperação e concentração das proteínas do soro do leite das queijarias do município de Nossa Senhora de Lourdes/Sergipe visando o desenvolvimento sustentável da região**. Dissertação de Mestrado em Desenvolvimento e Meio Ambiente, Universidade Federal de Sergipe, Brasil, 2006.

HARBERT, A. C.; BORGES, C. P.; NÓBREGA, R. **Aspectos gerais dos processos com membranas**. In: _____. Processos de separação por membranas. Rio de Janeiro: Editora da Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2006, p. 180.

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

ILLANES, A. **Enzyme Biocatalysis: principles and applications**. Chile: Springer. 2008. 379p.

KARBALAEI-HEIDARI, H. R.; AMOOZEGAR, M. A.; HAJIGHASEMI, M.; ZIAEE, A.-A.; VENTOSA, A. Production, optimization and purification of a novel extracellular protease from the moderately halophilic bacterium *Halobacillus karajensis*. **Indian Journal of Biotechnology**, v. 36, p. 21-27, 2009.

LIN, S-Ch.; JIANG, H-J. Recovery and purification of the lipopeptide biosurfactant of *Bacillus subtilis* by ultrafiltration. **Biotechnology Techniques**, v. 11, p. 413-416, 1997.

MAURER, K. H. Detergents proteases. **Current opinion in Biotechnology**, v. 15, p. 330-334, 2004.

MULLIGAN, C.N.; GIBBS, B. F.; Recovery of biosurfactants by ultrafiltration. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 47, p. 23–29, 1990.

MUSSATTO, S. I.; FERNANDES, M.; MILAGRES, A. M. F. Enzimas, uma ferramenta poderosa na indústria. **Ciência Hoje**, v. 41, p. 29-31. 2007.

NASCIMENTO, M. G.; SOLDI, V. Aplicações sintéticas de lipases imobilizadas em polímeros. **Química Nova**, v. 27, p. 623-630, 2004.

Ó'FÁGÁIN, C. Enzyme stabilization - recent experimental progress. **Enzyme Microbiology Technology**, v. 33, p. 137, 2003.

PAULA, A. V., MORERA, A.B.R.; Comparação do desempenho da lipase de *Candida rugosa* imobilizada em suporte híbrido de polissiloxano-polivinilálcool empregando diferentes metodologias. **Química Nova**, v. 31, p. 35-40, 2008.

QURESHI, A.S., BHUTTO, M. A., KHUSHK, I., DAHOT M.U. Optimization of cultural conditions for protease production by *Bacillus subtilis* EFRL. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, p. 5173-5181, 2011.

RENNEBERG, R.; **Biotechnology for Beginners**, Elsevier: China: 2008. 360 p.

SAID, S.; PIETRO, R. C. L. R., Generalidades sobre a aplicação industrial de enzimas. In: _____. **Enzimas como agentes biotecnológicos**. Ribeirão Preto: Legis Summa, p.1-3; 21-33, 2004.

SMITH, J. E. **Biotechnology**. 4^a ed. Cambridge: Cambridge University Press. 2004. 271 p.

SILVA, M. A. **Produção de protease e biossurfactantes por *Bacillus liqueniformis***. Dissertação de Mestrado, Universidade Católica de Pernambuco, Brasil, 2011.

SWAMINATHAN, S. R. Characterization of concentration and purification parameters and operating conditions for the smallscale recovery of surfactin. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 2953–2958, 2005.

THYS, R. **Produção, caracterização de uma protease produzida pelo microrganismo *Microbacterim sp.*** Pós-graduação em Microbiologia agrícola e do meio ambiente, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2004.

VENTURA, M. M.; FREITAS, S. M.; FREIRE, A. P. Catálise enzimática – alguns destaques na evolução da enzimologia In: E. P. S. Bon; M. A. Ferrara; M. L. Corvo. **Enzimas em biotecnologia – Produção, Aplicações e Mercado.** Rio de Janeiro: Interciência, cap. 1, p. 1-27, 2008.

VERMELHO, A. B.; MELO, A. C. N.; SÁ, M. H. B.; SANTOS, A. L. S.; D'AVILA-LEVY, C. M.; COURI, S.; BON, E. P. S. Enzimas proteolíticas: aplicações biotecnológicas. In: BON, E. P. S.; FERRARA, M. A.; CORVO, M. L. In: **Enzimas em biotecnologia – Produção, Aplicações e Mercado.** Rio de Janeiro: Interciência, cap. 11, p. 273-287, 2008.

VIDYASAGAR, M.; Prakash. B.; Madhugar M.; Muralikrishna. G.; Sreeramulu, K. **Antifeedant activity of three essential oils against the red palm weevil, *Rhynchophorus ferrugineus*.** Process Biochemistry, v.44, p. 210, 2009.

WITEK-KROWIAK, A.; WITEK, J.; GRUSZCZNSKA, A.; SZAFRAN, R. G.; KOZLECKI, T.; MODELSKI, S. Ultrafiltrative separation of rhamnolipid from culture medium. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 27, p. 1961-1964, 2011.

WEINGARTNER, V. **Produção, purificação e identificação de mananase, obtida por fermentação no estado sólido utilizando cascas de soja e *aspergillus niger*.** Dissertação pós-graduação em processos biotecnológicos, Universidade Federal do Paraná, Brasil, 2010.

ZANIN, G. M.; MORAES, F. F. Enzimas imobilizadas. In: S. SAID, R. C. L. R. PIETRO. **Enzimas como Agentes Biotecnológicos.** Ribeirão Preto: Legis Summa, cap. 4, p. 35-85, 2004.

CAPÍTULO II

ESTABILIZAÇÃO DE PROTEASES PARA COMPOSIÇÃO DE DETERGENTES

SILVA, E. T.

COSTA, G.

SALGUEIRO, A. A.

**Centro de Ciências e Tecnologia;
Universidade Católica de Pernambuco;
Rua do Príncipe, 526, Boa Vista, 5050-990, Recife PE, Brasil.**

***Manuscrito submetido à Revista Sanitária de Engenharia e ambiental**

2.1 INTRODUÇÃO

A aplicação de bioprodutos em processos tecnológicos tem crescido exponencialmente nos últimos anos. Dentre esses produtos, as enzimas são biocatalisadores produzidos por diferentes células que apresentam elevada especificidade e versatilidade relativa a substratos sob condições brandas de reação; diminuem a energia de ativação e, por conseguinte, impulsionam a velocidade das reações, além de serem biodegradáveis (ambientalmente favorável) e inócuas aos seres vivos quando comparadas aos catalisadores químicos (JOO, CHANG, 2005; MAURER, 2004).

Por outro lado, a atividade catalítica das enzimas depende da conformação espacial das cadeias protéicas cujas estruturas apresentam baixa estabilidade. Fatores físico-químicos e reações podem alterar essa conformação e conseqüentemente, influenciar a estabilidade dos biocatalisadores. A diminuição da atividade catalítica tem sido explicada por mecanismo molecular de inativação/desnaturação de proteínas (MOZHAEV, MARTINEK, 1982) e, por conseguinte, técnicas de imobilização, biologia molecular e formulação de enzimas têm sido investigadas, visando aumentar a estabilidade de biocatalisadores para elevar a produtividade de processos tecnológicos (ILLANES, 1999 e 2008). É necessário manter a estabilidade enzimática durante o processo de produção, extração, purificação, secagem, estocagem e condições operacionais, além da competitividade econômica.

A comercialização de enzimas é um desafio. O cenário mundial de enzimas industriais atende a uma demanda progressiva, impulsionada pela globalização da economia e realização de acordos internacionais. A pesquisa tem impulsionado a implementação de novas técnicas e metodologias, visando à minimização de custos, otimização do processo, qualidade de produtos e redução de possíveis impactos ambientais. A situação do mercado brasileiro frente ao comércio mundial de enzimas industriais apresenta-se tímido e paradoxal, se comparado a outros países de igual ou menor mercado. A classe das hidrolases compreende as enzimas de maior uso, correspondendo em torno de 75% do total de enzimas utilizadas. As proteases correspondem a cerca de 40% das hidrolases empregadas na indústria, sendo que grande parte dessa produção está destinada à utilização em aditivos para a indústria de detergentes (FELIX, NORONHA, MARCO, 2004).

A diversidade de aplicações de enzimas proteolíticas pode ser exemplificada com a bromelina, extraída do abacaxi: (i) produção de fármaco, em tratamento digestivo e inflamação; (ii) indústria alimentícia, em clarificação de cerveja, fabricação de queijo, amaciamento de carne e preparo de alimentos infantil e dietético; (iii) indústria têxtil, em amaciamento de fibras; e, (iv)

indústria de detergente, na composição de material de limpeza. Essa enzima vem sendo também aplicada no setor automobilístico em revestimentos internos de automóveis, ônibus e caminhões (RENNEBERG, 2008; SILVA, TAMBOURGI, 2011).

Considerando o elevado potencial de proteases na composição de detergentes e a estabilização da atividade catalítica de enzimas ser um fator importante na comercialização, este trabalho visa analisar, comparar e discutir estratégias que estabilizam a estrutura da cadeia protéica sob ação de agentes físicos e químicos, adicionados em formulações comerciais para manter a atividade proteolítica durante o armazenamento e sob condições operacionais adversas de detergentes. Neste trabalho, foram abordados: a demanda brasileira do comércio de proteases, estrutura de proteínas, estabilidade de enzimas, formulação de enzimas, proteases na composição de detergentes e considerações finais.

2.2 Comércio de enzimas

O comércio internacional de enzimas impõe padrões especiais. Essa questão decorre da real impossibilidade de se rastrear a corrente comercial da qual se destinarão as enzimas para aplicação industrial. A Tabela 1 apresenta os valores de importação e exportação de enzimas no Brasil, nos anos de 2000, 2005 e 2006. Analisando a evolução dos números de proteases, o volume de importação foi maior apenas no ano de 2000. No ano de 2011, os valores da balança comercial foram US\$ 9,05 milhões em importação e US\$ 20,69 milhões em exportação de proteases. O saldo positivo nesse mercado comprova que a produção dessas enzimas no país está em ascensão. A importação de proteases que atingiu 25% no ano 2000, diminuiu para 5% no ano de 2011 quando se compara os percentuais dos valores gastos em relação ao total. Logo, o comportamento da exportação foi o inverso, a exportação de proteases em 2000 atingiu apenas 11% cujo valor aumentou para 20% em 2011 (Tabela 1). Em contraste, o déficit na balança comercial de outras enzimas tem aumentado nesse período, isto é, o volume de importação é maior que o de exportação (BRASIL, 2012).

No mercado internacional, o aumento dos valores em milhões de dólares na comercialização de enzimas é um exemplo concreto da aplicação crescente e exponencial desses biocatalisadores no Brasil (Tabela 1). A produção de enzimas no país deverá ascender considerando a diversidade de aplicações desses biocatalisadores, além da existência de incomensuráveis fontes de recursos naturais e biodiversidade passível de exploração, como

também de ciência e tecnologia em desenvolvimento, apropriadas para processar e explorar material biológico na indústria.

As empresas que se destacam na aplicação de enzimas atuam no ramo de diagnósticos, seguido da indústria alimentícia, bebidas e produtos médico-hospitalares. Insumos enzimáticos são também utilizados em atividades relacionadas ao meio ambiente e produção de: tecidos, couro, papel e celulose, ração animal, produtos químicos e veterinários, saneantes e cosméticos. No período de 2003 a 2005, em torno de 334 empresas brasileiras realizaram importação de enzimas ou produtos que contém esses biotacalisadores destinados a uso industrial. Nesse período, o estado de São Paulo destacou-se com mais de 180 empresas que importaram biotacalisadores. Os demais estados, seguem com menor consumo, porém não se deve desconsiderar sua relevância. Esses produtos enzimáticos são transportados, tanto por vias marítima e aérea, como por via rodoviária além de, postal (POLITZER; BON, 2013).

Tabela 1 Importação e exportação de enzimas pelo Brasil nos anos de 2000, 2005 e 2011

Produto	2000		2005		2011	
	Imp.	Exp.	Imp.	Exp.	Imp.	Exp.
Proteases (US\$)	3,16	0,33	2,51	5,91	9,05	20,69
β-glucanase e xilanase (US\$)	0,00	0,00	0,00	0,00	8,01	0,00
Outras enzimas (US\$)	8,81	0,48	16,52	3,26	66,63	17,86
Leveduras e β-glucanase (US\$)	0,73	6,24	0,59	23,11	1,13	63,24
Total (US\$)	12,70	7,05	19,62	32,28	84,82	101,79

Legenda: Imp. = importação; Exp. = exportação

Fonte: Adaptado de Brasil (2012).

A grande maioria das enzimas que são importadas pelo mercado brasileiro são oriundas de países que compõem a União Européia. Destacam-se Dinamarca e Finlândia, fornecedores de cerca de 20% das enzimas importadas; e, França e Alemanha, em torno de 13% (BRASIL, 2012). Por outro lado, o Brasil exporta produtos enzimáticos para dezenas de países, destacando-se os Estados Unidos, responsável por 18% da importação total de

enzimas no ano de 2011. México, Suíça, Dinamarca e Argentina foram os outros países importadores que se destacaram embora as parcelas tenham atingido próximo a 6% por cada país (BRASIL, 2012).

O cenário pernambucano do comércio de enzimas abrange diversas empresas importadoras, sendo algumas responsáveis pela industrialização de produtos que contém esses biocatalizadores em sua composição. O maior percentual corresponde às empresas localizadas em Recife (capital); outras estão distribuídas nas zonas da Mata e do Sertão (BRASIL, 2012).

2.3 ESTRUTURA DE PROTEÍNAS

Os aminoácidos condensam-se, ligam-se entre si por ligação peptídica com formação da proteína e a estrutura terciária de cada enzima é definida pela sequência dos resíduos de aminoácidos. A distância média da ligação peptídica é em torno de 1,31-1,34 Å cujo valor é equivalente à distância da ligação dupla (1,44-1,48 Å) e por isso, menor que a ligação C-N não peptídica. Essa característica da cadeia protéica na estrutura da enzima pode estar relacionada à estabilidade catalítica (NOLTING, 2006).

As estruturas protéicas tridimensionais apresentam *loops* (voltas) na cadeia com resíduos de aminoácidos responsáveis pela catálise, localizados em domínios catalíticos, *catalytic core* (sítio catalítico) (SANTOS, 2012). Numa proteína enovelada, a maioria dos resíduos de aminoácidos externos são polares, enquanto a região interna é rica em aminoácidos hidrofóbicos (apolares). As conformações espaciais das proteínas são mantidas por interações não covalentes entre aminoácidos. Por outro lado, reagentes que desnaturam proteínas (ácidos, bases, surfactantes) tanto induzem à dissociação de enzimas que apresentam subunidades como, são responsáveis pelo desenovelamento da cadeia que é favorecido pelo ganho de energia livre na presença desses desnaturantes (MARANGONI, 2003; MCGOFF, SCHER, 2008; MOZHAEV, MARTINEK, 1982).

A conformação nativa da proteína à temperatura ambiente é atingida num tempo muito pequeno que pode ser da ordem de segundos a milésimos de segundos. Uma proteína contendo 100 resíduos de aminoácidos pode apresentar cerca de 10^{100} conformações espaciais em estados desenovelados, sendo o tamanho da cadeia determinante na taxa de enovelamento. Ressalta-se que diferentes enovelamentos protéicos podem apresentar a mesma função catalítica (NOLTING, 2006).

O enovelamento da cadeia protéica e a atividade catalítica da enzima estão estritamente relacionados entre si. A estrutura nativa da proteína com atividade catalítica apresenta energia livre mínima no estado enovelado. Em algumas enzimas, essa atividade depende de cofatores (íons inorgânicos) ou coenzimas (moléculas orgânicas complexas) que podem fazer parte do centro ativo ou atuarem como ferramentas na sua função catalítica. A atividade enzimática depende da estabilidade da estrutura terciária ou quaternária que está interligada tanto à presença de coenzimas e cofatores, como também de grupos prostéticos, estruturas não protéicas que estão ligadas covalentemente à enzima (CAMPBELL, FARREL, 2007).

A modificação da estrutura da proteína e a consequente inativação da enzima depende da presença de reagentes que interagem com grupos funcionais dos aminoácidos que compõem a cadeia polipeptídica, agentes que viabilizam ligações cruzadas, além de reações que ocorrem nas proteínas e condições do meio (temperatura, pH). A modificação de proteínas visando a aumentar a estabilidade conformacional tem sido investigada por mutagênese, técnicas de engenharia genética ou reações específicas de grupos funcionais que ocorrem sob condições brandas, não alterando a estrutura da cadeia. Às vezes uma pequena alteração num resíduo de aminoácido causa um grande efeito na estrutura da proteína e, conseqüentemente, em sua função catalítica (BUXBAUM, 2011).

As condições fisiológicas das proteínas na natureza são diferenciadas das condições não naturais utilizadas nas aplicações de enzimas em processos tecnológicos, principalmente em sistemas heterogêneos, como os biodetergentes. Essas condições operacionais na indústria causam mudanças conformacionais na estrutura protéica que influenciam diretamente a performance da enzima. A molécula desse biocatalisador não apresenta estrutura rígida, sendo flexível e deformável. Na desnaturação, há mudança da conformação espacial da proteína que pode ser reversível ou não; na inativação, há interações entre macromoléculas sem alterar sua conformação, mas que diminuem a atividade catalítica das enzimas. Geralmente há mudanças conformacionais que resultam em inativação. Por conseguinte, é primordial manter a estrutura tridimensional da enzima para que haja estabilidade catalítica, considerando que nem sempre a atividade inicial do biocatalisador é recuperada no mesmo nível após uma desnaturação ou inibição da proteína (MARANGONI, 2003; MOZHAEV, MARTINEK, 1982; MURAKAMI et al., 2012; RENNEBERG, 2008).

Em suma, o efeito dos vários níveis da estrutura de proteína (primária, secundária, terciária e quaternária) é complexo e variado e, influencia a atividade funcional catalítica da

enzima. Portanto, as estratégias para manter a estabilidade da estrutura nativa desse biocatalisador dependem de fatores que promovem desnaturação ou inativação protéicas.

2.4 ESTABILIDADE DE ENZIMAS

A atividade enzimática capaz de catalisar uma reação química é estritamente dependente da sua estrutura molecular. A atividade da enzima depende de resíduos de aminoácidos na estrutura tridimensional da proteína e de interações entre esses aminoácidos. Conseqüentemente, qualquer agente que promove o desdobramento da proteína pode deslocar aminoácidos que constituem o sítio ativo e, em seguida, reduzir ou destruir a atividade biológica. Condições adversas de temperatura, pH, presença de solvente e metal pesado podem produzir a perda de função por alterar a configuração do sítio catalítico. Mesmo que uma pequena parte da molécula de enzima participe da catálise, o restante da molécula é também relevante para o seu desempenho (ILLANES, 2008).

A estabilidade enzimática é dependente da estrutura tridimensional da enzima. Certas regiões instáveis denominadas como pontos fracos, regiões propensas a desdobrar, são determinantes da estabilidade enzimática e estão normalmente localizadas perto da superfície da molécula de proteína, o que explica porque a cadeia superficial da enzima é tão importante para sua estabilidade catalítica. A estabilidade é um parâmetro importante, pois determina a viabilidade econômica da aplicação de uma enzima num processo industrial. As enzimas estáveis que permitem o uso de elevadas temperaturas no processo apresentam efeitos benéficos sobre as taxas de reação, solubilidade ao reagente e baixo risco de contaminação microbiana (EIJNSINK et al., 2004).

A estabilidade das enzimas continua a ser uma etapa crítica na aplicação desses biocatalisadores na indústria. Uma distinção relevante deve ser feita entre a estabilidade na estocagem e no processo operacional de todo bioproduto com atividade catalítica. Estabilidade em armazenagem, ou vida de prateleira, refere-se à manutenção de suas capacidades catalíticas, no período entre o fabrico e a utilização eventual. Estabilidade operacional descreve a persistência da atividade da enzima durante o processo (Ó'FÁGÁIN, 2003).

Investigações científicas têm sido desenvolvidas visando à produção e maior estabilidade de proteases microbianas para aplicação na composição de detergentes comerciais. O Brasil tem incentivado a pesquisa, mas precisa apoiar as empresas na área de

biotecnologia para que os resultados atinjam uma escala maior e as enzimas sejam comercializadas. A estabilidade de enzimas sob condições de temperatura variada e pH extremos, além da compatibilidade com aditivos inseridos na formulação de detergentes têm sido investigada.

Ladeira et al. (2010), investigaram a estabilidade de proteases produzidas por *Bacillus* sp. SMIA-2 na presença de pectina de maçã, proteínas de soro de queijo e água de maceração de milho, a pH inicial 6,5. O líquido metabólico livre de células com atividade proteolítica (70 U/mg de proteínas a pH 7,0 com 30 h de cultivo submerso) apresentou temperatura ótima a 70 °C e reteve cerca de 80 % da atividade durante 2 h de incubação na faixa de pH 6 a 12, à temperatura ambiente. Considerando os resultados obtidos, a composição do meio de produção deve conter componentes que estabilizaram a estrutura protéica das proteases. Esse autores desenvolveram um bioproduto com grande estabilidade em pH alcalino e temperatura elevada e, por conseguinte, tem perspectiva de ser aplicado na formulação de detergentes.

Alves-Neto (2012) investigou a estabilização de proteases produzidas por *Bacillus* sp. na presença de milhocina e determinou 192 U/mL de proteases quando o líquido metabólico livre de células foi adicionado de sorbato de sódio a 0,5% cloreto de cálcio a 0,5%, glicerol a 7,5% e polietilenoglicol-200 a 0,5%. Esse líquido metabólico livre de células com atividade proteolítica foi concentrado duas vezes por ultrafiltração e apresentou pH ótimo em meio alcalino, temperatura ótima a 50 °C e estabilidade térmica a 40 °C durante 30 min a pH 11. Conseqüentemente, esse bioproduto tem perspectiva de ser aplicado na composição química de detergentes. Ressalta-se que para aplicação prática do líquido enzimático produzido por esse autor, é necessário que investigações científicas subsequentes sejam realizadas, para aumentar a estabilidade da atividade catalítica, considerando que o bioproduto formulado reteve apenas 60% da atividade enzimática com 10 dias de armazenamento à temperatura ambiente (28 °C).

Segundo Silva (2011) proteases foram produzidas por *Bacillus licheniformis* na presença de melão a 1% e uréia a 0,5%, a pH 7,5 e 37 °C durante 24 horas sob cultivo submerso. O extrato enzimático livre de células contendo 118 U/mL de proteases foi concentrado 20 vezes por ultrafiltração, utilizando membrana Millipore, com perda de mais de 50% da atividade enzimática, sugerindo que estruturas químicas responsáveis pela estabilização da cadeia proteica de proteases, foram arrastadas durante o processo. Complementando, esse autor determinou o tempo de meia vida do bioproduto em cerca de 30 dias sob armazenamento a 28 °C quando formulado com sorbato de sódio a 0,2%, glicerol a 2,5%, detergente comercial a 7,5% e PEG a 7,5%. Foram determinadas a atividade máxima em pH 7-9 durante 60 min de

incubação a 37 °C e a retenção de 92% da atividade proteolítica após incubação na faixa de temperatura 40-70 °C durante 60 min. De acordo com esses resultados, ficou confirmada a importância da formulação de enzimas pela adição de agentes estabilizadores de conformações protéicas para que o biocatalisador possa ser aplicado e comercializado.

2.4.1 Parâmetros físico-químicos

A estrutura espacial das proteínas cuja manutenção é essencial para estabilidade da atividade catalítica, depende principalmente de duas interações não-covalentes: (i) interações eletrostáticas que envolvem ligações de hidrogênio, forças de van der Waals e pontes dissulfeto; e, (ii) interações hidrofóbicas, entre grupos não-polares localizados na parte interna da cadeia. Outras forças de atração e de repulsão entre entidades moleculares ou entre grupos da cadeia protéica interferem na estabilidade da atividade catalítica de enzimas; por exemplo, as forças iônicas entre aminoácidos polares com cargas opostas na superfície (forças hidrofílicas) (KOPPENOL, 2008).

Um aspecto relevante do mecanismo catalítico das peptidases são as interações por ligações de hidrogênio entre diversos resíduos de aminoácidos que ajudam a estabilizar a cadeia protéica do complexo intermediário. A estabilidade da atividade enzimática foi identificada por mecanismo eficiente de grupos polares envolvidos em ligações de hidrogênio cujas interações dependem dos aminoácidos glicina (Gli), serina (Ser) e tirosina (Tyr) na posição amino da estrutura α -hélice de proteínas e dos resíduos de Gli e asparagina (Asn) na posição terminal carboxílica da estrutura β -sheet (KOPPENOL, 2008; NOLTING, 2006).

Essas ligações de hidrogênio envolvem cargas positivas e negativas e combinam interações covalentes e eletrostáticas. A eletronegatividade do átomo de oxigênio do grupo hidroxila ocasiona uma carga parcial positiva no átomo de hidrogênio (H-doador) enquanto o átomo de oxigênio do grupo carbonila tem carga parcial negativa (H-receptor) que atrai o átomo de hidrogênio da hidroxila (NOLTING, 2006).

As enzimas podem apresentar conformações globulares desestabilizadas por hidratação de resíduo de aminoácido polar com aumento de energia (entropia) na conformação desenovelada. As interações entre dipolos induzidos (molécula polar e íon) diminuem em função da distância de separação entre cargas e dipolo os quais são os principais componentes

de atração das forças intramoleculares de van der Waals. O potencial dessas forças depende também das interações entre átomos, denominadas de energias de interações. Por outro lado, a repulsão do mecanismo quântico de exclusão de Pauli, também está incluída nas forças de van der Waals (NOLTING, 2006).

As pontes dissulfeto são interligações entre cadeias protéicas ou entre partes da cadeia de aminoácidos que contém enxofre. O dissulfeto resultante obtido a partir da cisteína (Cys) é frequente em proteínas extracelulares de baixa massa molar. Essas interações têm a função de manter a conformação do centro ativo na estrutura de enzimas, podendo até serem quebradas facilmente sem inativar a enzima (ILLANES, 2008; MOZHAEV, MARTINEK, 1982).

As interações hidrofóbicas estabilizam proteínas em solução aquosa na ausência de ligações de hidrogênio entre água e grupo não polar, isto é, entre grupos não polares entre si. Na presença de ciclohexano, cadeias laterais de resíduos de aminoácidos hidrofóbicos, exemplificados por leucina (Leu), isoleucina (Ile) e valina (Val) são energeticamente favoráveis à reação de enovelamento enquanto cadeias laterais hidrofílicas que contém grupos polares são encontradas na superfície da arginina (Arg) na proteína enovelada e preferem ambiente aquoso (NOLTING, 2006).

Ligações iônicas entre resíduos de aminoácidos carregados são também responsáveis pela estabilidade conformacional da enzima. A composição dos aminoácidos da proteína influencia a carga elétrica da cadeia da enzima; por exemplo, a presença de resíduos dos aminoácidos básicos lisina (Lys) e arginina (Arg) que são carregados positivamente a pH 7, induzem à carga elétrica na proteína (positiva), enquanto resíduos dos aminoácidos ácidos, ácido aspártico (Asp) e ácido glutâmico (Glu) induzem a uma carga negativa. A complexidade da estrutura protéica envolve também a transferência de prótons cujo processo metabólico depende da presença da histidina (His) que embora tenha caráter básico em pH neutro, apresenta pKa 6-7 (NOLTING, 2006).

As condições operacionais durante a aplicação tecnológica interferem na atividade catalítica da enzima e, por conseguinte, investigações têm sido direcionadas para manipular o meio ambiente do biocatalisador e aumentar a estabilidade. Alteram o enovelamento da cadeia de proteína: temperatura de -5 a 110 °C, pH entre 4 e 12 e atividade de água entre 1 e 6 por

influenciar o estado de reversibilidade da estrutura (KOPPENOL, 2008; MARANGONI, 2003; NELSON, COX, 2011).

A temperatura é a variável mais relevante em sistemas biológicos, influenciando tanto a atividade como a estabilidade do biocatalisador por serem as proteínas termolábeis (ILLANES, 2008). O controle da temperatura influencia o efeito hidrofóbico: à medida que a temperatura se eleva até 100 °C, esse efeito aumenta na cadeia protéica (NOLTING, 2006).

O aumento da temperatura favorece o número de colisões entre substrato e enzima com aumento da velocidade da reação até atingir a velocidade máxima (temperatura ótima). Sob elevada temperatura, a estrutura tridimensional da proteína pode ser quebrada, os aminoácidos hidrofóbicos internos ficam expostos e, por conseguinte, a proteína precipita, desnaturando-se. As enzimas que apresentam termoestabilidade têm na sua estrutura, *loops* próximos (apertados), maior número de reação de glicosilação e de ligações cruzadas que fortalecem a estabilidade da conformação enovelada. A produção de proteínas engenheiradas termoestáveis tem sido incentivada visando ao aumento da estabilidade de enzimas (AVANTI, 2012; ILLANES, 1999; NELSON, COX, 2011; SANTOS et al., 2012).

A estabilidade de uma enzima depende também do pH. Variações de pH podem mudar a conformação espacial das enzima, isto é, a capacidade de reagir com o substrato, por alterar a carga elétrica e, conseqüentemente, a reatividade de grupos químicos do sítio ativo. Os grupos ionizáveis da proteína são sensíveis à presença de íons hidrônios (H^+) presentes em meio ácido e íons hidroxônios (OH^-), liberados por substâncias de caráter básico. A velocidade máxima (V_{MAX}), a afinidade da enzima pelo substrato, constante de Michaelis-Menten (K_M) e a estabilidade da estrutura conformacional são características que dependem do tempo em que a enzima fica exposta a um pH desfavorável. O meio ácido ou básico influencia a estabilidade da enzima, por alterar as forças eletrostáticas na molécula de proteína, isto é, o estado de ionização (KOPPENOL, 2008).

A diminuição da atividade em ambos os lados do valor de pH ótimo é devido à inativação irreversível da atividade catalítica ou a alterações de parâmetros cinéticos. A dependência do pH pela estabilidade catalítica é semelhante a reações catalisadas por ácidos ou bases (MARANGONI, 2003). As proteases são classificadas em função do pH ótimo em: ácidas quando o pH ótimo está na faixa de 2 a 5; neutras apresentam atividade máxima entre pH 6 e 8; e alcalinas quando apresentam elevada atividade catalítica em pH acima de 8 (FÉLIX, NORONHA, MARCO, 2004).

As enzimas são mais estáveis no ponto isoelétrico (pI) em cujo pH as cargas elétricas opostas estabilizam a estrutura protéica. A presença de molécula com carga elétrica pode

alterar o pI da enzima devido à variação na energia durante a reação. Abaixo do pI , há aumento de cargas positivas e, por conseguinte, as forças repulsivas excedem as forças estabilizantes, ocorrendo a perda da estrutura nativa (KOPPENOL, 2008; NELSON, COX, 2011).

Alterações em micro-ambientes da enzima podem também influenciar na estabilização de cadeias protéicas; por exemplo, a concentração da solução de proteína aumenta a viscosidade do meio e conseqüentemente, diminui a atividade da água, reduzindo a taxa de reação de deamidação. A adição de sais e polímeros a extratos enzimáticos diminui a atividade da água (BUMMER, 2008).

Os agentes quelantes causam inativação de proteínas para grupos de enzimas que apresentam maior eficiência catalítica na presença de cofatores. A importância dos metais na atividade catalítica de enzimas pode ser ilustrada por íons de sais inorgânicos na estabilidade de proteases. Íons cálcio (Ca^{++}) são responsáveis por estabilização térmica e enovelamento de cadeia polipeptídica de proteases Khan et al. (2011) determinaram atividade proteolítica mais estável em temperaturas acima de 50 °C e na presença de Ca^{++} . Os autores determinaram 50% da atividade relativa com Ca^{++} a 60 °C enquanto que a atividade foi cinco vezes menor na ausência desse íon.

Investigações científicas comprovaram que esse íon tem papel estrutural e funcional na atividade proteolítica (ZHANG, CONWAY, THIBODEAU, 2012). As serina-proteases possuem resíduo hidrofóbico (Leu) ou então, aromático (Tyr ou fenilalanina, Phe). Essas proteases quando produzidas por *Bacillus licheniformis* apresentam duas regiões contendo ligações de Ca^{++} que contribuem para a estabilidade da enzima com maior atividade proteolítica a 60 °C, em pH 10 (MIROŃCZUK et al., 2012).

Por outro lado, metais pesados (Hg, Cd, Pb e Cu) inativam proteínas quando interagem com grupo sulfidril, com a cadeia lateral de His e de triptófano (Trp) (MOZHAEV, MARTINEK, 1982).

Dentre outros fatores que influenciam a estabilidade da estrutura de proteínas, os solventes ocasionam mudanças conformacionais na enzima devido à polaridade desses compostos. Matamá et al. (2006) investigaram a adição dos solventes orgânicos: N,N-dimetilformamida (DMF) e N,N-dimetilacetamida (DMA) na estabilidade operacional de cutinase. Os autores observaram que o tempo de meia-vida da enzima aumentou 3,5 vezes com a adição de 15 % do DMA.

Na indústria, além da presença de solvente e surfactante, a exposição à agitação e à pressão, dentre outros, são parâmetros que desenovelam a molécula, ocasionando perda da estrutura espacial da enzima de forma irreversível ou não e, por conseguinte influenciam a atividade do biocatalisador (KOPPENOL, 2008; MARANGONI, 2003; NELSON, COX, 2011). A agitação durante o processo operacional e ou a exposição da enzima a interfaces entre líquido-ar, líquido-sólido e líquido-líquido podem desnaturar a estrutura protéica (BUMMER, 2008).

2.4.2 Parâmetros químicos

A baixa estabilidade das enzimas pode também ser atribuída às reações químicas de deamidação, oxidação e precipitação que ocorrem na estrutura de proteínas (BUMMER, 2008). A modificação química de proteína aumenta a estabilidade catalítica por introduzir grupo hidrofílico na superfície da enzima com redução de região hidrofóbica e prevenção do enovelamento de forma indesejável, isto é, sem atividade catalítica (ILLANES, 1999). Ressalta-se que taxas de degradação de cadeias protéicas variam em função da concentração de enzimas e, por conseguinte, a quantidade de proteínas é um parâmetro que deve ser investigado na estabilidade da atividade catalítica (McGOFF, 2008; SCHER, 2010).

A reação de deamidação é resultante principalmente da hidrólise da Asn em Asp. Essas reações também podem ocorrer em resíduos de Gli presentes na estrutura das enzimas. Vários mecanismos têm sido propostos para elucidar o papel da estrutura protéica (enovelamento) na reação intramolecular de deamidação que pode ser prevista pela presença desses dois aminoácidos e favorecida em função de condições do meio: temperatura, pH, tampão, dentre outros componentes coadjuvantes que estabilizam proteínas (BUMMER, 2008).

Condições alcalinas ou neutras e a presença da água impulsionam a reação de deamidação com liberação de amônia e formação de cadeia cíclica imida (McGOFF, 2008; SCHER, 2010). Em função dos aminoácidos próximos ou adjacentes a Asn ou Gli, há várias alternativas de reações de deamidação com quebra da cadeia protéica. A elucidação da influência dos aminoácidos da proteína tem sido investigada intensamente. Por exemplo, a prolina presente na cadeia protéica, próximo a Asn ou Gli, inibe a formação de compostos intermediários imida na deamidação. Em catálise ácida ($\text{pH} < 3$), não há formação de intermediário cíclico, ocorrendo hidrólise direta da proteína. Em condições extremas, há quebras na cadeia protéica e desnaturação da enzima (BUMMER, 2008).

A reação de oxidação pode ser favorecida pela presença de oxigênio dissolvido, íons metálicos (ferro e cobre), água oxigenada, solvente orgânico e luz. Essas condições que impulsionam a oxidação da cadeia protéica ocorrem durante diversas etapas de produção, armazenamento e ou processo operacional de enzimas. No mecanismo molecular da reação, os metais - presentes como contaminantes - são responsáveis pelo início da oxidação na presença da água e do oxigênio molecular com formação de radicais livres. A água oxigenada é um oxidante específico de metionina (Met), podendo também oxidar resíduo de Trp e de Cys. A His também é susceptível à oxidação por mecanismo de fotocatalise ou por íon-catalise. Complementando, a inativação da proteína pode ser devido à oxidação de grupos contendo enxofre. Ressalta-se que a oxidação de um aminoácido crítico perto do centro ativo da enzima pode provocar perda parcial ou total da atividade catalítica (BUMMER, 2008; MOZHAEV, MARTINEK, 1982). A prevenção da reação de oxidação da cadeia protéica pode ser por eliminação do oxigênio do ar durante processamento e empacotamento do bioproduto, por liofilização devido à eliminação da água do meio ou por adição de antioxidantes (tióis de baixa massa molar, catalase) que protegem os grupos funcionais da enzima. Por outro lado, o ácido ascórbico que é um eficaz agente antioxidante, pode inativar a atividade catalítica da enzima (BUMMER, 2008; MOZHAEV, MARTINEK, 1982).

A agregação entre moléculas de proteínas com precipitação da proteína e consequente inativação da atividade catalítica depende de fatores externos. O número de moléculas agregadas aumenta com o tempo de desnaturação. Esse processo geralmente ocorre em duas etapas; inicialmente a estrutura nativa da proteína é desnaturada para depois ocorrer a agregação das estruturas terciárias, alteradas e inativas. O precipitado depende de interações não covalentes: ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas com possibilidade de ocorrer ou não, reversibilidade para a estrutura nativa. As proteínas formadas por mais de uma cadeia polipeptídica são mais difíceis de serem reativadas. A irreversibilidade da inativação da proteína pode ocorrer por reações químicas que causam quebra da cadeia ou modificação de grupos funcionais (MOZHAEV, MARTINEK, 1982).

A estabilidade da enzima depende de agregados solúveis que podem ser formados ou de partículas insolúveis presentes no meio. O fenômeno de agregação é influenciado pelo pH; quanto mais distante o pH do meio estiver do pI da proteína, esse efeito é menor. No pI, a carga elétrica da proteína está neutralizada, favorecendo a associação entre as moléculas (neutras). Em pH e temperatura ótimos e na presença de íons e surfactantes, esse fenômeno pode ser evitado. Os surfactantes são geralmente aplicados para facilitar a interação enzima-substrato e

umentar a solubilização da proteína e ou do substrato. Por conseguinte, interações intramoleculares eletrostáticas e força de van der Waals que dependem do pH interferem na estabilidade do enovelamento protéico (McGOFF, 2008; NOLTING, 2006; SCHER, 2010).

2.4.3 Imobilização

O processo de imobilização aumenta a estabilidade operacional da enzima em relação à enzima livre além de permitir maior controle do processo e flexibilidade na aplicação de diferentes reatores. Limitações difusionais justificam que somente uma fração da enzima imobilizada é ativa no início do processo, permanecendo a restante como reserva que só começará a atuar quando a atividade inicial estiver desnaturada (SMITH, 2004). A elevada estabilidade em faixa ampla de pH e sob temperatura elevada, além da possibilidade de uso contínuo e produto final livre de biocatalisador, são vantagens da enzima imobilizada quando comparada à solúvel (ILLANES, 1999; RENNEBERG, 2008).

As preparações mais estáveis são alcançadas com método de ligação covalente na presença ou não do reagente glutaraldeído com ligações cruzadas entre enzima e suporte. Acredita-se que a ligação covalente da enzima ao suporte pode estabilizar a estrutura terciária da enzima. Entretanto, durante o processo, deposição de impurezas no suporte, quebra de partículas por efeitos de pressão, dentre outros fatores podem conduzir a redução do tempo de meia-vida do bioproduto imobilizado (SMITH, 2004).

O mecanismo de estabilização de proteína não é totalmente esclarecido embora o derivado imobilizado seja mais estável. Apesar do grande potencial de imobilização na estabilização de enzimas, nessa estratégia pode haver ligações entre suporte e enzima próximas ao centro ativo e ocorrer diminuição da atividade. O número de processos industriais com enzima imobilizada é reduzido por causa de custos elevados, perda de atividade e baixa difusibilidade de substrato/produto (ILLANES, 1999). As características dos suportes relativas a resistências mecânica e microbiana, estabilidade térmica, superfície de contato, porosidade e custos influenciam na seleção enquanto a estrutura química do suporte interfere nas propriedades do derivado imobilizado (pH ótimo e temperatura ótima, tempo de imobilização) (NELSON, COX, 2011; ZANIN, MORAES, 2004).

A estabilidade operacional é fundamental no desenvolvimento dos processos com enzimas imobilizadas. Os processos com enzimas imobilizadas somente serão mais econômicos que os processos com enzima solúvel, se o tempo de meia-vida for suficientemente

longo para a enzima imobilizada, pois neste caso, há redução no custo operacional do processo advindo do menor consumo de enzima, que além de compensar as despesas adicionais com o processo de imobilização, deve ser inferior que a enzima livre. No caso da enzima imobilizada, essa estabilidade depende dos fatores: desprendimento da enzima do suporte, obstrução dos poros por impurezas ou produtos secundários, perda de suporte por atrito ou dissolução, obstrução do leito fixo causando canais preferenciais e crescimento de micro-organismos. O efeito geral desses fatores deve ser determinado experimentalmente para serem minimizados (SMITH, 2004).

2.4.4 Biologia molecular

A biologia molecular favorece a expressão de proteína tanto por organismo procariótico como por eucariótico com rápida produção de enzima em diferentes formas de proteínas clonadas. Na obtenção de proteínas engenheiradas, o problema está relacionado a enovelamentos na correta configuração. O sucesso da aplicação da biologia molecular na obtenção de proteases é devido essas enzimas serem sintetizadas em forma inativa, permanecendo na forma estável até ser requerida a forma ativa da enzima (MARANGONI, 2003).

Técnicas de biologia molecular viabilizaram a obtenção de proteases eficientes para aplicação em detergentes. Foram produzidas proteases termofílicas, resistentes a alvejantes e com atividade máxima em meio alcalino. A estabilidade a pH 10, a 60 °C e atividade na presença de surfactantes e agentes oxidantes (cloro, ácido peracético) são características de proteases geneticamente modificadas, obtidas por substituição da metionina (Met) na posição 222 pela Cys, um aminoácido mais estável (RENNEBERG, 2008; CASTRO, BRANDÃO, 2004; ILLANES, 1999).

A utilização de proteases engenheiradas na composição de detergentes fortaleceu a estabilidade de enzimas sob condições operacionais em processos biotecnológicos. A atuação dessas enzimas alcalinas a elevadas temperaturas e a resistência à ambientes adversos como baixa atividade de água é um desafio na comercialização de bioproduto com atividade catalítica (CRUTZEN, DOUGLAS, 1999). A essas características, foi associada a produção de proteases por micro-organismos em grande quantidade e num menor espaço de tempo, na presença de resíduos industriais como fontes nutritivas, tornando essas enzimas, biocatalisadores

competitivos no mercado (LADEIRA et al., 2010; MEENA et al., 2013; QURESHI et al., 2011; SHER et al., 2010; PARANTAMAN, ALAGUSUNDARAM, INDHUMATHI, 2009).

2.5 FORMULAÇÃO DE ENZIMAS

A formulação de enzimas abrange as etapas de polimento final, estabilização e padronização, sendo essa última, um requisito básico para manter a qualidade do bioproduto na comercialização. O polimento final refere-se à eliminação de elementos indesejáveis que ainda não foram removidos (sais, água) ou ao ajuste de pH. A etapa de estabilização tem como objetivo principal selecionar ingredientes e suas respectivas concentrações para melhorar ou estabilizar a performance do biocatalisador com a mínima quantidade de substâncias visando à redução de custos de produção. É necessário investigar a inter-relação entre os parâmetros físicos e os aditivos químicos que são as variáveis independentes da formulação. A concentração de proteína interfere nesses efeitos e por isso, é paralelamente investigada à adição de agentes estabilizantes (ILLANES, 2008).

A modificação da estrutura da proteína durante o armazenamento limita a estabilidade do produto final. A vida de prateleira para avaliar a estabilidade do biocatalisador deve ser investigada numa primeira etapa, durante três meses sob armazenamento em refrigeração (2 a 8 °C) e pH em torno de 4 a 9. Em etapa subsequente, são investigados o armazenamento durante um ano e sob pH e temperatura extremos (MARANGONI, 2003; McGOFF, SCHER, 2008).

A formulação de enzimas é fundamental para manter a estabilidade da conformação espacial da enzima, sendo geralmente adicionados, além de substratos e inibidores que protegem o sítio ativo, agentes químicos: conservantes microbiológicos, detergentes, sais, solventes, poliols, polímeros, dentre outros compostos. É primordial que esses aditivos sejam inócuos a todos os seres vivos (*generally regarded as safe*, GRAS) para aplicação em indústrias de alimentos e fármacos e que as condições do meio de formulação sejam selecionadas criteriosamente, caso por caso. Por intermédio dessa etapa, é possível comercializar o biocatalisador com estabilidade catalítica durante o armazenamento e o processo operacional (ILLANES, 2008).

Na comercialização de enzimas microbianas produzidas a partir de meios nutritivos é necessário evitar contaminação e garantir a qualidade microbiológica da preparação enzimática.

Considerando os custos, os agentes antimicrobianos são os mais utilizados desde que suas propriedades permaneçam estáveis durante o armazenamento e que sejam compatíveis com outros componentes presentes no bioproduto. Os conservantes atuam alterando componentes da parede celular, membrana citoplasmática ou citoplasma de micro-organismos. A seleção desses compostos químicos depende de: atividades microbicida ou microbioestático, pH, maior solubilidade, eficiência em baixa concentração, presença de metais, dentre outros fatores. São utilizados sorbatos, benzoatos e compostos quaternários de amônio. Os agentes antimicrobianos de aplicação reduzida são: álcools e fenóis que causam desnaturação protéica e formaldeído (formol) por causar efeito neurotóxico em organismos (ELDER, CROWLEY, 2012; ILLANES, 2008; McGOFF, SCHER, 2008).

Os surfactantes não-iônicos ou aniônicos são utilizados como agentes estabilizadores em formulações comerciais de enzimas. Dependendo da concentração, facilitam a reatividade da enzima por aumentar a solubilidade dos componentes da reação (BUXBAUM, 2011). Essas substâncias ligam-se às proteínas, reduzindo a área superficial hidrofóbica disponível e, por conseguinte, diminuem a agregação e qualquer interação prejudicial à sua especificidade. A estabilização do sistema proteína-surfactante resiste à agitação devido às partículas serem menores que a concentração micelar crítica do surfactante (BUMMER, 2008). Por outro lado, há detergentes que quebram a estrutura quaternária da proteína, reduzindo a atividade catalítica; por exemplo, o dodecil sulfato de sódio (SDS) interage com proteínas em baixas concentrações, causando desenovelamento da cadeia. No mecanismo, a parte alifática alongada do surfactante penetra nos poros hidrofóbicos enquanto a parte formada por sulfatos alquílicos não podem penetrar; paralelamente, pode haver também interações entre cargas elétricas negativas do SDS com cargas positivas da proteína (McCOFF, SCHER, 2008).

Os sais estabilizam as proteínas que têm grande carga elétrica por suprimir a repulsão intramolecular. No processo de enovelamento, há interações físicas e covalentes entre duas cadeias protéicas ou entre uma proteína e outra macromolécula ou ainda, entre proteína e solvente. As interações entre cargas elétricas e as forças de van der Waals são os principais responsáveis pela conformação globular, seguidas pelas ligações de hidrogênio e em terceiro lugar, pelas interações hidrofóbicas. Como os íons diminuem as interações eletrostáticas ao neutralizarem as cargas elétricas da cadeia protéica, a concentração de sais presentes no meio, pode favorecer a estabilização das conformações espaciais das enzimas (BUXBAUM, 2011).

Por outro lado, a adição de sais pode causar desnaturação da cadeia devido ao aumento na força iônica e diminuição das interações entre cargas elétricas (McGOFF, SCHER, 2008).

As soluções de efeito tampão favorecem o enovelamento em função da concentração de íons, isto é, da molaridade. Exemplificando, soluções tampão de bicarbonato, glicina e acetato aceleraram a deamidação enquanto o tampão fosfato na concentração de 0 a 20 mM catalisou essa reação com redução da atividade catalítica na presença de NaCl, cloreto de lítio (LiCl) e tampão tris(hidroximetil)aminometano-ácido clorídrico (Tris-HCl). O efeito de solução tampão e de força iônica na deamidação é observado em pH neutro ou alcalino (BUXBAUM, 2011).

Quando enzimas halofílicas são instáveis em baixas concentrações de sais com perda irreversível da atividade, utiliza-se concentrações elevadas desses compostos que promovem baixa atividade de água, e conseqüentemente, a conformação dessas enzimas fica estável (VIDYASAGAR et al., 2009).

A presença de solventes orgânicos na formulação evita a reação da deamidação por desfavorecer a ionização da proteína. Hipóteses são propostas em que os solventes aumentam a rigidez da estrutura protéica, evitando a formação de intermediário imida. A interação do solvente com resíduos externos de aminoácidos mantém a enzima na conformação enovelada. Segundo Illanes (1999), o aumento da estabilidade de biocatalisadores em meio não aquoso é um potencial para aplicação de enzimas em síntese orgânica. Por outro lado, solventes no interior da estrutura protéica interferem na polaridade do meio, aumentando a carga interior e, por conseguinte, podem alterar a estabilidade da enzima. Esse fenômeno é justificado pela baixa permissividade (transmissão de campo elétrico) dos solventes em relação a da água (NOLTING, 2006).

Os co-solventes (fenol, benzeno) alteram as ligações de hidrogênio, desestabilizando a proteína nativa por enfraquecer os grupos polares, carregados eletricamente na superfície da proteína. Por outro lado, trifluor-etanol estabiliza a estrutura protéica ao fortalecer as ligações de hidrogênio além de enfraquecer as interações hidrofóbicas no interior da proteína (BUXBAUM, 2011; NOLTING, 2006).

Os polióis, coadjuvantes de formulação de bioproduto com atividade catalítica, estabilizam a enzima em temperatura elevada pelo mecanismo *protein shell*, isto é, a existência de microcompartimentos na cadeia enovelada onde há um tipo de encapsulamento com várias reações enzimáticas, evidenciados por estruturas de cristais protéicos (YEATES, THOMPSON, BOBIK, 2011).

Os polióis, exemplificados por açúcares: glicose, sacarose, glicerol, manitol, sorbitol e xilitol, além do etilenoglicol são veículos utilizados na formulação de enzimas por proteger os aminoácidos Gli e Asn da reação de deamidação como também, por inibir a oxidação da proteína ao captar os radicais hidroxilas do meio, evitando a propagação da reação. Essas substâncias causam também efeito protetor na enzima devido à complexação de íons metálicos que podem inibir a atividade catalítica. Ressalta-se que são substâncias inócuas e de baixo custo, amplamente utilizadas na estabilização de enzimas. Sacarose ou manitol a pH neutro, adicionados à formulação de enzimas, reduzem a reação de deamidação. Foi observado que a taxa dessa reação diminuiu apenas na presença da sacarose quando o bioproduto com atividade catalítica foi formulado no estado sólido. Esse açúcar, agente estabilizante muito utilizado, causa hidratação na proteína e estabiliza a enzima (McGOFF, SCHER, 2008).

Modificações de enzimas na presença de carboidratos, como sacarose e dextrana foi uma estratégia que aumentou a estabilidade operacional de proteases (SUNDARAM, VENKATESH, 1998; ILLANES, 1999) Proteases halofílicas foram produzidas por *Chromohalobacter* sp. na presença de NaCl ou KCl a 4 M. Essa enzima perdeu a atividade em concentração menor que 1 M de NaCl embora a estabilidade tenha sido máxima na presença de 10 % de sacarose. Além desse açúcar, são também utilizados glicerol e outros alcoóis, além de aminoácidos e seus derivados que atuam como substâncias osmolíticas nos bioprodutos formulados devido a interações hidrofóbicas. Essas substâncias mantêm nas células halofílicas, um balanço de água positivo compatível com o metabolismo celular (VIDYASAGAR et al., 2009).

Os polímeros são adicionados na formulação de enzimas por diminuírem a atividade de água do meio. Logo, são agentes estabilizantes de proteínas ao minimizarem a reação de deamidação. Na presença desses compostos, há um aumento da viscosidade do produto formulado e mobilização da estrutura protéica. Por conseguinte, os bioprodutos formulados em estado sólido apresentam maior estabilidade da atividade catalítica devido à ausência da água (ILLANES, 2008). Um outro mecanismo da estabilidade da estrutura terciária das enzimas pela adição de polímeros é a formação de uma matriz sólida com prevenção do fenômeno de agregação entre proteínas (BUMMER, 2008).

A adição de PEG a extrato enzimático protege a conformação terciária da proteína. Com esse mesmo mecanismo de estabilização de enzimas, sais inorgânicos e sorbitol são também utilizados como suportes. A atividade de proteases foi investigada na presença de líquidos

iônicos com a enzima associada a um suporte inerte que influencia o nível de hidratação e a habilidade de dispersão. Apesar da baixa solubilidade da enzima nesse meio, são obtidas vantagens relativas a elevada taxa de conversão, alta seletividade, maior estabilidade e recuperação no final do processo em meio não aquoso (MONIRUZZAMAN, KAMIYAA, GOTO, 2010; McGOFF, SCHER, 2008).

2.6 PROTEASES NA COMPOSIÇÃO DE DETERGENTES

2.6.1 A indústria de detergentes

Um dos primeiros relatos do uso de biodetergente de forma industrial remonta à década de 1910 quando foi preparado um detergente chamado Burnus contendo carbonato de sódio, além de um extrato pancreático. Entre as décadas de 1950 e 1960, foi inserido no mercado, um dos primeiros biodetergentes contendo proteases de origem bacteriana. No início dos anos de 1970, houve um decréscimo na adição de extrato enzimático nesses produtos, devido ao desenvolvimento de reações alérgicas em funcionários que manipulavam enzimas (ILLANES, 2008). Após contínuas pesquisas, técnicas de encapsulamento foram utilizadas para inserir proteases como aditivos em detergentes, evitando problemas de saúde nos manipuladores desses produtos. Essa indústria tornou-se um dos segmentos de mercado mais consumidor no mundo de proteases alcalinas, tendo sido no início de século XXI, a produção de biodetergente superior a 13 bilhões de toneladas por ano.

A presença de proteases em detergentes facilita a remoção de manchas em usos doméstico e hospitalar além da limpeza de materiais óticos como lentes de contato e de consultório dentário de forma eficiente. A formulação de detergentes evoluiu com a implementação de fibras sintéticas de alta tecnologia para fabricação de tecidos, pois essas fibras não suportam elevadas temperaturas durante o processo de lavagem e dessa forma, os detergentes têm obrigatoriamente de serem efetivos, mesmo quando o processo de lavagem seja realizado com água fria (FELIX, NORONHA, MARCO, 2004).

2.6.2 Ação de componentes enzimáticos em detergentes

Os detergentes são formulados em geral para atuar em meio alcalino e sob temperaturas elevadas. Nesse caso, as enzimas a serem adicionadas aos produtos comercializados, precisam ter pH ótimo entre 8 e 12 e temperaturas ótimas na faixa de 50 a 70 °C cujas condições correspondem a ambientes de lavanderia (VIDYASAGAR et al., 2009).

As enzimas utilizadas na formulação de detergentes em sua grande maioria são em forma de complexos enzimáticos formados por combinação de proteases, amilases, lipases e celulases, responsáveis por catalisar hidrólises de proteína, amido, triglicerídeo e celulose, respectivamente. Esse processo de degradação promove a redução de moléculas maiores em moléculas menores que são mais facilmente solúveis. As proteases estão presentes como principal ingrediente ativo na grande maioria de marcas de detergentes em todo o mundo, facilitando a remoção de manchas por hidrolisar as proteínas de sangue e alimentos que ficam fixadas nas sujidades. As amilases degradam as ligações glicosídicas do amido em dextrinas solúveis, açúcares e oligossacarídeos. As lipases são responsáveis pela degradação de ligações de ésteres de triglicerídeos hidrofóbicos, presentes na maioria das gorduras de origem animal e óleos vegetais. As celulases catalisam a hidrólise de ligações glicosídicas da celulose, conferindo mais brilho e cor por remover as microfibrilas de tecidos (CRUTZEN, DOUGLAS, 1999).

As proteases alcalinas utilizadas na composição de detergentes pertencem ao grupo das serina-proteases que apresentam o resíduo de serina (Ser) além do Asp e His no centro ativo. Essas enzimas são inibidas por ésteres orgânicos fosfatados, fluoreto de fenilmetilsufonil (PMSF), fluorofosfato de diodopropila (DFP) e quimostatina (SINGHAL, NIGAM, VIDYARTHI, 2012).

A protease alcalina produzida por *Aspergillus nidulus* contem 403 aminoácidos com atividades endopeptidase e serina protease; a massa molar é igual a 42,209 Da, hidrolisa proteínas com grande especificidade e são expressas geneticamente na ausência de fontes de nitrogênio, carbono ou enxofre (ALKALINE, 2013).

Alguns aditivos utilizados na formulação de detergentes em conjunto com as enzimas podem reduzir a ação catalítica e alterar a qualidade do produto, se não forem utilizados de forma correta, minimizando as interações. O uso de surfactantes sulfonantes aniônicos, como o alquilbenzeno e de agentes de poder oxidante, como os alvejantes (hipoclorito de sódio) podem promover a desestabilização de enzimas. As interações entre os componentes do detergente devem ser devidamente investigadas e previstas, visto que as enzimas são produzidas por

organismos vivos e todos os cuidados devem ser tomados para que sua estrutura e função não sejam comprometidas e, sua eficácia seja máxima. Os detergentes devem ser aplicados em faixa de temperatura e de pH onde as enzimas mantenham estabilidade (CRUTZEN, DOUGLAS, 1999).

2.6.3 Estudo de caso

A formulação de detergentes depende de propriedades fundamentais dos seus componentes, além de interações entre essas substâncias, isto é, seus efeitos sinérgicos antes, durante e depois da aplicação do produto final. Fosfatos, boratos, citratos, silicatos, sulfatos, polímeros, dentre outros compostos químicos que compõem os detergentes podem apresentar efeitos sinérgicos em função da massa molar desses componentes (CRUTZEN, DOUGLAS, 1999).

A restrição de fosfatos nas formulações de detergentes incentivou as investigações nessa área com impulso para utilização de enzimas. A adição dos biocatalisadores e a formulação de detergentes facilitam a remoção de sujidades e do *fussy* (redeposição de partículas). A atuação das enzimas é fundamental para manutenção da brancura do tecido e do brilho das cores após sucessivas lavagens, além de conservar a qualidade do produto lavado. A inocuidade da estrutura protéica e a biodegradabilidade dos biocatalisadores são dois fatores que contribuem para a adição em formulações de detergentes embora a atividade catalítica seja instável, principalmente em detergentes líquidos (CRUTZEN, DOUGLAS, 1999).

Os componentes de três produtos de detergente em pó de uso comercial dispostos no mercado brasileiro - destinados à lavagem de roupas - foram analisados nesse estudo de caso. Esses produtos foram referenciados como A, B e C, variando de preços desde o de maior valor, no caso o produto A até o de menor valor, o produto C. A tabela 2 apresenta a composição química desses produtos com os respectivos preços médios. A análise dos componentes explicita em comum a presença de agentes ativos principais como surfactantes derivados do sulfonato de sódio, tensoativos (aniônicos, não-iônicos) e enzimas que conferem o poder detergente aos produtos (CRUTZEN, DOUGLAS, 1999). Embora esses componentes ativos estejam presentes nos três produtos, os preços dos mesmos variam. A origem, o tipo e a quantidade dos biocatalisadores podem caracterizar a diferenciação do preço entre os produtos. Porém, a procedência das enzimas utilizadas nos três produtos não foram explicitados, como também os tipos de enzimas utilizados e a forma correta de manipulação. Para o consumidor,

deveriam ser detalhadas informações do tipo de enzima presente na composição dos produtos, visto que há relatos de que a manipulação direta de proteases pode causar reações alérgicas em seres humanos (FELIX, NORONHA, MARCO, 2004).

Tabela 2 Composição e preço médio estimado para os produtos analisados

PRODUTO	PRINCIPAIS COMPONENTES	PREÇO MÉDIO (R\$/500g)
A	Alquil benzeno sulfonato de sódio, lauril sulfonato de sódio, tensoativos aniônicos, tamponantes, coadjuvantes, sinergista, corantes, branqueador ótico, fragrância, carga, água e enzimas	4,99
B	Linear alquil benzeno sulfonato de sódio, alquil éter sulfonato de sódio, polialquiletoxilato tensoativo não iônico, coadjuvantes, branqueador ótico, agentes anti-redepositantes, corantes, fragrância, água e enzimas	3,69
C	Linear alquil benzeno sulfonato de sódio, tensoativo aniônico, alcalinizante sequestrante, carga, coadjuvantes, branqueador ótico, bentonita sódica, corante, agente anti redepositante, fragrância, água, tensoativo biodegradável e enzimas	2,79

Comparando as composições químicas dos detergentes em análise, ficou também constatado a presença de coadjuvantes, branqueador ótico, corantes, fragrância e água nos três produtos comercializados, embora não constem informações específicas (tipos e quantidades) desses aditivos.

O produto A é o único detergente que contém: agentes tamponantes cujas funções são respectivamente, potencializar a ação das enzimas, mantendo o pH em faixa específica e, sinergista que evita possíveis interações entre os diversos componentes. Ressalta-se que não foram especificados os tipos de tampão e nem o agente sinérgico. Apesar do preço de comercialização desse produto ser o maior dentre todos, consta na sua composição a presença de “carga”. Será que esse aditivo da formulação do produto A contém uma função que confere mais eficiência em relação aos outros detergentes comerciais e que o produtor não tem interesse em especificar?

O componente diferenciado dos produtos B e C são agentes anti-redepositantes que evitam o retorno da sujeira em suspensão ao material lavado (tecidos, equipamentos, dentre

outros). A eficiência da lavagem é almejada quando a sujeira removida pelo detergente não é redepositada.

O produto C é o único que contém apenas um tipo de surfactante, linear alquil benzeno sulfonato de sódio e, apesar de ter o preço mais acessível, foi o único produto que especificou a presença de agente biodegradável, importante componente devido à capacidade poluente dos detergentes. No contexto de desenvolvimento sustentável, para causar menos impacto ao meio ambiente, a presença de agente biodegradável na composição de detergentes é uma informação que impulsiona ao cidadão consciente, a adquirir o produto. Esse produto C também é o único detergente que contém betonita sódica. Segundo Carrión (2013), esse mineral compõe detergentes ecológicos e é formado por silicatos de alumínio hidratado cuja função é depositar partículas na superfície do tecido de algodão lavado, aumentando a suavidade das fibras.

Não foi especificada em nenhuma das composições dos biodetergentes A, B e C analisados, a presença de substâncias químicas apresentadas pela literatura como agentes estabilizadores de proteínas. Por outro lado, os produtos comerciais contém coadjuvantes que poderão ser agentes químicos que estabilizam as enzimas.

Em suma, a composição dos detergentes deve apresentar componentes específicos que facilitem a limpeza, minimizando a abrasão, mantendo as fibras intactas e a cor dos tecidos, para que dessa forma possa atender às exigências do consumidor. O mercado internacional crescente de biodetergentes impulsiona a produção de enzimas cujo processo biotecnológico depende da disponibilidade de resíduos agroindustriais. O potencial do Brasil nesse setor e o desenvolvimento tecnológico de enzimas oriundos de pesquisas estimulam a expansão da aplicação desses biocatalisadores em detergentes, embora seja necessária uma política do governo mais forte e precisa para incentivar empresas de biotecnologia a produzirem enzimas.

2. 7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

- A manutenção da conformação espacial da proteína e a reassociação de subunidades no envelhecimento da cadeia é essencial para estabilidade catalítica de enzimas;
- estratégias para manter a estabilidade da estrutura nativa da enzima dependem de fatores que promovem desnaturação ou inativação protéicas;

- perdas na estabilidade física da proteína dependem principalmente de interações eletrostáticas, ressaltando as ligações de hidrogênio e os efeitos hidrofóbicos entre aminoácidos internos;
- reações de deamidação e oxidação, além do fenômeno de agregação são reações químicas que interferem na estabilidade de enzimas;
- a reação de deamidação da cadeia de proteína pode ser suprimida pela redução da quantidade de água, concentração de sais (tampão) e solventes, dependendo de temperatura e pH;
- a oxidação da cadeia protéica pode ser controlada por adição de agentes redutores e pela ausência de oxigênio molecular no processo biotecnológico;
- a agregação de proteínas pode ser suprimida sob condições não desnaturantes de pH extremos e presença de agentes químicos;
- para aplicação em detergentes, as proteases devem apresentar estabilidade da atividade catalítica em pH alcalino, serem termoestáveis e compatíveis com aditivos da formulação: conservantes microbiológicos, específicos substratos, sais, polióis, polímeros, dentre outros;
- a demanda de proteases no mercado brasileiro impulsiona tanto a pesquisa como o empreendedorismo nessa área, desde que haja estímulo e apoio por órgãos governamentais;
- a potencialidade de matéria-prima renovável e o desenvolvimento de tecnologia de enzimas em expansão, além do conhecimento sobre a estabilidade de conformação protéica com atividade catalítica são pilares que favorecem a exportação de enzimas no Brasil.

2.8 REFERÊNCIAS

ALKALINE proteases. **Protein Knowledgebase** (UnitProtKB). Disponível em: <<http://www.uniprot.org/uniprot/Q0020>>. Acesso em: 02 jun 2013.

ALVES-NETO, J. C. **Produção de proteases por *Bacillus* sp. sob cultivo submerso na presença de resíduos agroindustriais**. Dissertação de Mestrado, Universidade Católica de Pernambuco, Brasil, 2012.

AVANTI, C; **Innovative strategies for stabilization of therapeutic peptides in aqueous formulations**. Tese de Doutorado, University of Groningen, Alemanha, 2012.

BRASIL; **Estudo de viabilidade técnica e econômica destinado à implantação do parque produtivo nacional de aditivos da Indústria de alimentação de animais de produção. Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior**. Disponível em: <http://www.mdic.gov.br/arquivos/dwnl_1347635101.pdf>. Acesso em: 02 maio 2012.

BUMMER, P. M. **Chemical considerations in protein and peptide stability**. 2nd ed. North Carolina: Pharmaceutech, 2008, p 7-42.

BUXBAUM, E. **Biophysical Chemistry of Proteins – An Introduction to Laboratory Methods**. Londres: Springer, 2011, 526 p.

CAMPBELL, M. K.; Farrell, S. O. **Bioquímica**, 5. ed., São Paulo: Cengage Learnig, 2007, 263p.

CARRIÓN, F. J. **Las bentonitas en los detergentes ecológicos**. Disponível em: <<http://upcommons.upc.edu/e-prints/bitstream/2117/6189/1/jornadas%20%20%202009pre3%5B1%5D.pdf>>. Acesso em: 02 jun 2013.

CASTRO, I. M.; BRANDÃO, I.; **Enzimas como agentes biotecnológicos**; Said, S.; Pietro, R. C. L. R., eds.; Legis Summa: Ribeirão Preto, 2004, cap 3, p 21-34.

CRUTZEN, A.; Douglas, M. L.; Em **Handbook of Detergents**; Broze, G. ed.; Marcel Dekker: New York, 1999, p 639-690.

EIJSINK, V. G. H.; BJØRK, A.; GÅSEIDNES, S.; SIREVÅG, R.; SYNSTAD, B.; BURG, B. van den; VRIEND, G. Rational engineering of enzyme stability. **Journal of Biotechnology**, v. 113, p. 105, 2004.

ELDER, D. P.; Crowley, P. J. **The Review of American Pharmaceutical Business & Technology**. Disponível em: <<http://www.americanpharmaceuticalreview.com/Featured-Articles/38886-Antimicrobial-Preservatives-Part-One-Choosing-a-Preservative-System/>>.

Acesso em: 02 jun 2013.

FELIX, C. R.; Noronha, E. F.; Marco, J. L.; **Em Enzimas como agentes biotecnológicos**; Said, S.; Pietro, R. C. L. R., eds.; Legis Summa: Ribeirão Preto, 2004, cap. 18, p 237-247.

ILLANES, A. Stability of biocatalysts. **Journal of Biotechnology**, v. 2, p. 1, 1999.

ILLANES, A. **Enzyme Biocatalysis – Principles and Applications**, Chile: Springer, 2008, 398 p.

JOO, H. S.; Chang, C. S. Production of protease from a new alkalophilic *Bacillus* sp. **Process Biochemistry**, v.40, p.1263-1270, 2005.

KHAN, M. A.; AHMAD, N.; ZAFAR, A.U.; NASIR, I. A.; QADIR, M. A. Isolation and screening of alkaline protease producing bacteria and physio-chemical characterization of the enzyme. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, 2011, 6203p.

KOPPENOL, S.; Em **Protein Formulation and Delivery**; McNally, E. J.; Hastedt, J. E., eds.; Informa: North Carolina, 2008, cap. 2, p 7-42.

LADEIRA, S. A.; ANDRADE, M. V. V.; DELATORRE, A. B.; PEREZ, V. H.; MARTINS, M. L. L.; Utilização de resíduos agroindustriais para a produção de proteases por fermentação submersa usando o termofílico *Bacillus* sp. **Química Nova**, v. 33, p. 4, 2010

MARANGONI, A. G. **Enzyme Kinetic – A Modern Approach**. New Jersey: John Wiley & Sons, 2003, 248 p.

MATAMÁ, T.; VAZ, F.; GÜBITZ, G. M.; CAVACO-PAULO, A. The effect of additives and mechanical agitation in surface modification of acrylic fibres by cutinase and esterase. **Biotechnology Journal**, v. 1, p. 7, 2006.

MAURER, K. H. Detergent Proteases. **Current Opinion Biotechnology**, v. 15, 2004, 330 p.

McGOFF, P.; SCHER, D. S. Em **Protein Formulation and Delivery**; McNally, E. J.; Hastedt, J. E. eds.; Informa: North Carolina, 2008, cap. 6, p 133-152.

MEENA, P.; TRIPATHI, A. D.; SRIVASTAVA, S. K.; JHA, A. **Biocatalysis and Agriculture Biotechnology**, doi: 10.1016/j.bcab.2013.05.003, p 1-25.

MIROŃCZUK, A. M.; KRASOWSKA, A.; MURZYN, A.; PŁACHETKA, M.; LUKASZEWICZ, M.; **Production of the *Bacillus licheniformis* SubC protease using *Lactococcus lactis***. SpringerPlus, v.1, 2010, p 1-10.

MONIRUZZAMAN, M.; Kamiyaa, N.; Goto, M. Activation and stabilization of enzymes in ionic liquids. **Organic & Biomolecular Chemistry**, doi: 10.1039/B926130C, p 1-13.

MOZHAEV, V. V.; Martinek, K. Inactivation and reactivation of proteins (enzymes). **Enzyme and Microbial Technology**, v. 4, p. 299, 1982.

NELSON, D. L.; COX, M. M.; **Princípios de Bioquímica de Lehninger**, 5. ed., Porto Alegre: Artmed, 2011, 1304 p.

NOLTING, B; **Protein Folding Kinetics – Biophysical Methods**, 2nd ed. Alemanha:Springer, 2006, 228 p.

Ó'FÁGÁIN, C. Enzyme stabilization - recent experimental progress. **Enzyme Microbiology Technology**, v. 33, p. 137, 2003.

PARANTAMAN, R.; ALAGUSUNDARAM, K.; INDHUMATHI, J. Production of protease from rice mill wastes by *Aspergillus nigen* in solid state fermentation. **World Journal of Agricultural Sciences**, v.5, p.308, 2009.

POLITZER, K.; BON, E. P. S. **Enzimas industriais e Especiais**. Disponível em: <http://www.anbio.org.br/pdf/2/tr03_enzimas.pdf>. Acesso em: 02 maio 2013.

QURESHI, A. S.; BHUTTO, M. A.; KHUSHK, I.; DAHOT M. U. Optimization of cultural conditions for protease production by *Bacillus subtilis*. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, p. 5173-5181, 2011.

RENNEBERG, R. **Biotechnology for Beginners**. China: Elsevier, 2008.

SANTOS, C. R.; Paiva, J. H.; Sforça, M. L.; Neves, J. L.; Navarro, R. Z.; Cota, J.; Akao, P. K.; Hoffmam, Z. B.; Meza, A. N.; Smetana, J. H.; Nogueira, M. L.; Polikarpov, I.; Xavier-Neto, J.; Squina, F. M.; Ward, R. J.; Ruller, R.; Zeri, A. C.; Murakami, M. T. Dissecting structure-function-stability relationships of a thermostable GH5-CBM3 cellulase from *Bacillus subtilis* 168. **Biochemical Journal**, v. 95, p. 441, 2012.

SHER, M. G.; Nadeem, M.; Syed, Q.; Irfan, M.; Baig.; Alkaline Protease Production from Industrial Waste by *Bacillus subtilis* ML-4. **Pakistan Journal of Scientific and Industrial Research**, v. 53, p. 146, 2010.

SILVA, M. A. **Produção de protease e biossurfactantes por *Bacillus liqueniformis***. Dissertação de Mestrado, Universidade Católica de Pernambuco, Brasil, 2011.

SILVA, T. A. L.; TAMBOURGI, E. B. Estudo da estabilidade da enzima bromelina extraída do curauá roxo (*Ananas erectifolius*). **Scientia Plena**, v. 7, p. 1-5, 2011.

SINGHAL, P.; NIGAM, V. K.; VIDYARTHI, A. S. **Studies on production, characterization and applications of microbial alkaline proteases**. International Journal of Advanced Biotechnology and Research, v. 3, p. 653, 2012.

SMITH, J. E. **Biotechnology**, 4th ed., Cambridge: Cambridge University Press, 2004, 236 p.

SUNDARAM, P.; VENKATESH, R. Modulation of stability properties of bovine trypsin after *in vitro* structural changes with a variety of chemical modifiers. **Protein Engineering**, v. 11, 1998, 699 p.

VIDYASAGAR, M.; Prakash. B.; Madhugar M.; Muralikrishna. G.; Sreeramulu, K. Production, purification, and characterization of two extremely halotolerant, thermostable and alkali-stable α -amylases from *Chromohalobacter* sp. **Process Biochemistry**, v. 44, p. 210, 2009.

YEATES, T. O.; THOMPSON, M. C.; BOBIK, T. A. The protein shells of bacterial microcompartment organelles. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 21, p. 223, 2011.

ZANIN, G. M.; Moraes, F. F. Em **Enzimas como agentes biotecnológicos**; Said, S.; Pietro, R. C. L. R., eds.; Legis Summa: Ribeirão Preto, 2004, cap 4, p. 35-82.

ZHANG, L.; CONWAY, J. F.; THIBODEAU, P. H. Calcium-induced folding and stabilization of the *Pseudomonas aeruginosa* alkaline protease. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 287, p. 4311, 2012.