



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

LUCIANA CARVALHO GRADE

**IMOBILIZAÇÃO DE  $\beta$ -GLICOSIDASE DE SOJA EM  
QUITOSANA**

---

Londrina  
2011

LUCIANA CARVALHO GRADE

**IMOBILIZAÇÃO DE  $\beta$ -GLICOSIDASE DE SOJA EM  
QUITOSANA**

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado em Biotecnologia, do Departamento de Bioquímica e Biotecnologia da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup>. Mara Lúcia Luiz Ribeiro

Londrina  
2011

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da  
Universidade Estadual de Londrina**

**Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)**

G732i Grade, Luciana Carvalho.  
Imobilização de  $\beta$ -glicosidase de soja em quitosana / Luciana Carvalho Grade. –  
Londrina, 2011.  
107 f. : il.

Orientador: Mara Lúcia Luiz Ribeiro.  
Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Estadual de Londrina,  
Centro de Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, 2011.  
Inclui bibliografia.

1. Enzimas – Aplicações industriais – Teses. 2. Quitosana – Teses. 3. Isoflavonas –  
Teses. 4. Soja – Indústria – Teses. 5. Superfícies de resposta (Estatística) – Teses. I.  
Ribeiro, Mara Lúcia Luiz. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências  
Exatas. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. III. Título.

CDU 663.1

LUCIANA CARVALHO GRADE

## **IMOBILIZAÇÃO DE $\beta$ -GLICOSIDASE DE SOJA EM QUITOSANA**

da Universidade Estadual de Londrina, como requisito  
Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado em  
Biotecnologia, do Departamento de Bioquímica e  
Biotecnologia parcial para obtenção do título de Mestre.

### **BANCA EXAMINADORA**

---

Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Mara Lúcia Luiz Ribeiro  
UEL – Londrina - PR

---

Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Elza Iouko Ida  
UEL – Londrina - PR

---

Prof. Dr. Luiz Henrique Dall'Antonia  
UEL – Londrina - PR

Londrina, 23 de março de 2011.

Dedico este trabalho aos meus pais, irmão, amigos e a todos aqueles que acreditam que a ousadia e o erro são caminhos para grandes realizações.

## AGRADECIMENTOS

À Profª. Drª. Mara Lúcia Luiz Ribeiro, pela orientação e apoio durante o desenvolvimento deste trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)/MEC pela concessão da bolsa de estudos e à Fundação Araucária pelo suporte financeiro.

À Embrapa Soja pelo fornecimento da amostra utilizada neste trabalho.

À Profª. Drª. Suzana Mali de Oliveira pelo auxílio na análise de alguns resultados e valiosas sugestões.

Aos docentes do Programa de Mestrado em Biotecnologia que contribuíram para meu desenvolvimento acadêmico, transmitindo conhecimentos indispensáveis para a minha formação profissional e acadêmica.

Aos funcionários do Departamento de Bioquímica e Biotecnologia (CCE/UUEL): Nelson Janeiro Rodriguez, Sílvia Borba, Sérgio Evangelista, Sandra Defende, Neusa Zamuner de Souza e colegas de laboratório pela amizade, colaboração e auxílio.

Um agradecimento às estagiárias Amanda Orcioli e Virgínia Prezzi, pela ajuda nos experimentos e pela amizade; e um agradecimento especial ao Caio Ferreira de Oliveira, pela amizade, convivência, compreensão e apoio nos momentos difíceis e pelos momentos agradáveis de distração!

Aos meus pais e irmão, por todo incentivo, esforço e confiança em mim depositada e por me suportarem nos momentos de ansiedade, o que tornou possível a realização deste projeto.

Ao Igor Eduardo, pessoa especial de todas as horas, pelo carinho, apoio, incentivo, companheirismo e principalmente pela compreensão em todos os momentos.

Às amigas especiais, Alexandra Scherer, Amanda Silvone, Camila Rodrigues, Caroline Cunha, Claudia Tsuruda, Elisa Dolfini, Eloisi e Emily Ruzzon, Emília Felipe de Melo, Suzana Matsubara, Tatiane Ferraz, Thaís Alexandrino, Viviane Dalto.

Aos amigos de estudos Adriana Petri, Aline de Souza, Ana Elisa S. Verselheze, Paulo Ricardo Marcelino, Leandro Freire, Luciana Von H. Ferreira, Carolina N. Rossi, Rafael dos Santos, Michele Barreto, Fernando Bazani, Douglas Gomes, Leonardo Cardoso, Emilyn Emy Matsumura, Lucas Bissoqui, Bruna Caroline Gonçalves, Letícia Cristina Ferreira, Karita Reis Costa, Kelly Goes, Cristina de Melo, Anelize Bauer, Letícia Babujia, Elaine Moreno, Thaís de Araujo, Ismael R. Amador e Leandro José dos Santos pela contribuição com seus conhecimentos e pela amizade que foi construída, pelo apoio e pelos momentos felizes que passamos juntos.

Acima de tudo agradeço a Deus, meu amparo e refúgio, por estar sempre presente em minha vida, tornar tudo possível e me dar forças para seguir sempre em frente.

E a todos aqueles que de alguma forma me auxiliaram e contribuíram para esta dissertação tornar-se realidade, o meu MUITO OBRIGADA.

*"É melhor tentar e falhar,  
que preocupar-se e ver a vida passar;  
é melhor tentar, ainda que em vão,  
que sentar-se fazendo nada até o final.  
Eu prefiro na chuva caminhar,  
que em dias tristes em casa me esconder.  
Prefiro ser feliz, embora louco,  
que em conformidade viver ..."*

Martin Luther King

GRADE, Luciana C. **Imobilização de  $\beta$ -glicosidase de soja em quitosana**. 2011. 107f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Estadual de Londrina. Londrina, 2011.

## RESUMO

A  $\beta$ -glicosidase ( $\beta$ -D-glicosídeo glicohidrolase, EC 3.2.1.21) é uma enzima que cliva ligações  $\beta$ -glicosídicas de di e/ou oligossacarídeos liberando aglicona e glicose, estando amplamente distribuída na natureza. Estas enzimas hidrolisam as isoflavonas  $\beta$ -glicosídicas (genistina, daidzina e glicitina) e liberam as isoflavonas agliconas (genisteína, daidzeína e gliciteína) que apresentam ação benéfica na saúde humana. O objetivo deste trabalho foi otimizar a imobilização da  $\beta$ -glicosidase de cotilédones de soja em quitosana, caracterizá-la parcialmente e aplicá-la em extrato aquoso de soja. A  $\beta$ -glicosidase foi extraída de farinha de cotilédones com tampão fosfato de sódio 100 mM, pH 6,6, na proporção 1:10 (p/v), com posterior acidificação com HCl 0,1N até pH 5,0 para obtenção do extrato bruto que foi fracionado com  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  de 0-40% e 40-85% de saturação a 4°C. Os precipitados, ressuspensos em tampão fosfato citrato 50 mM, pH 5,0 e os sobrenadantes foram dialisados no mesmo tampão. A fração com maior atividade de  $\beta$ -glicosidase foi imobilizada em grânulos de quitosana 1%. Para otimizar a imobilização, foram utilizados planejamentos fatoriais completos e metodologia de superfície de resposta. Na etapa de otimização de ativação dos grânulos de quitosana com glutaraldeído, foi encontrado como ideal o uso de glutaraldeído 2,5%, 8 h de agitação e uso de tampão TRIS-acetato pH 7,5. Para a etapa de imobilização da  $\beta$ -glicosidase, as condições ótimas foram 7 h de agitação num total de 20 h de incubação, adição de um teor de proteínas de 23,81 mg e uso de tampão fosfato-citrato pH 6,5 durante a imobilização. A  $\beta$ -glicosidase imobilizada apresentou condições ótimas de reação em pH 5,5 e a 50°C. A 70°C, a enzima apresentou baixa estabilidade, com redução de 89% da atividade, após 10 min de incubação. O  $K_m$  e  $V_{m\acute{a}x}$  da enzima imobilizada com o substrato  $p$ -nitrofenil- $\beta$ -D-glicopiranosídeo foi de 0,4936 mM e 1,118  $\mu\text{mol } p\text{-nitrofenol/min}$ , respectivamente, por grânulo. A enzima imobilizada apresentou boa estabilidade operacional, com uma meia-vida de sete ciclos. A atividade de  $\beta$ -glicosidase imobilizada foi inibida por  $\text{Li}_2\text{SO}_4$ , LiCl,  $\text{CoCl}_2$ ,  $\text{CuSO}_4$ ,  $\text{CuCl}_2$ ,  $\text{AgNO}_3$ ,  $\text{HgCl}_2$ ,  $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2$ , glucona- $\delta$ -lactona e acetato de cobre 10 mM, apresentando atividade residual de 72, 81, 83, 76, 49, 71, 36, 57, 35 e 52%, respectivamente. O  $\text{MnCl}_2$  e  $\text{MnSO}_4$  aumentaram a atividade da enzima em 93 e 88%, respectivamente. A aplicação da  $\beta$ -glicosidase imobilizada em extrato aquoso de soja mostrou-se eficiente na liberação de glicose e conseqüentemente na liberação de isoflavonas agliconas.

**Palavras chave:**  $\beta$ -glicosidase. Imobilização. Quitosana. Metodologia de superfície de resposta. Aplicação.

GRADE, Luciana C. **Immobilization of  $\beta$ -glucosidase from soybean in chitosan.** 2011. 107p. Dissertation (Master in Biotechnology) - Universidade Estadual de Londrina. Londrina, 2011.

## ABSTRACT

$\beta$ -glucosidase ( $\beta$ -D-glucoside glucohydrolase, EC 3.2.1.21) is an enzyme that cleaves  $\beta$ -glycosidic bonds of di- and/or oligosaccharides releasing aglycone and glucose and is widely distributed in nature. These enzymes hydrolyze the  $\beta$ -glycosidic isoflavones (genistin, daidzin and glycitin) and release the aglycones (genistein, daidzein and glycitein) that have a beneficial effect on human health. The aim of this study was to optimize the immobilization of  $\beta$ -glucosidase from soybean cotyledons on chitosan, characterize partially it and apply it in an aqueous extract of soybeans. The  $\beta$ -glucosidase was extracted from cotyledon meal with sodium phosphate buffer 100 mM, pH 6.6, at 1:10 (w/v) with subsequent acidification with 0.1 N HCl to pH 5.0 to obtain crude extract was fractionated with  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  of 0-40% and 40-85% saturation at 4°C. The precipitate, resuspended in 50 mM citrate phosphate buffer, pH 5.0 and supernatants were dialyzed in the same buffer. The fraction with highest activity of  $\beta$ -glucosidase was immobilized on chitosan beads of 1%. To optimize the immobilization, we used complete factorial designs and response surface methodology. In the step of activation of chitosan beads with glutaraldehyde, was found to be ideal to use 2.5% glutaraldehyde, 8 h of stirring and the use of TRIS-acetate buffer pH 7.5. For step immobilization of  $\beta$ -glucosidase, the optimum conditions were 7 h stirring a total of 20 h of incubation, addition of a protein content of 23.81 mg and the use of citrate-phosphate buffer pH 6.5 during immobilization. The immobilized  $\beta$ -glucosidase showed optimum reaction conditions at pH 5.5 and 50 ° C. At 70 ° C, the enzyme showed low stability, with 89% reduction of activity after 10 min of incubation. The  $K_m$  and  $V_{max}$  of the immobilized enzyme with the substrate  $p$ -nitrophenyl- $\beta$ -D-glucopyranoside was 0.4936 mM and 1.118 mmol  $p$ -nitrofenol/min, respectively, per bead. The immobilized enzyme showed good operational stability, with half-life of seven cycles. The activity of immobilized  $\beta$ -glucosidase was inhibited by  $\text{Li}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{LiCl}$ ,  $\text{CoCl}_2$ ,  $\text{CuSO}_4$ ,  $\text{CuCl}_2$ ,  $\text{AgNO}_3$ ,  $\text{HgCl}_2$ ,  $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2$ , glucono- $\delta$ -lactone and 10 mM copper acetate, with residual activity of 72, 81, 83, 76, 49, 71, 36, 57, 35 and 52% respectively. The  $\text{MnCl}_2$  and  $\text{MnSO}_4$  increased the enzyme activity in 93 and 88% respectively. The application of  $\beta$ -glucosidase immobilized in an aqueous extract of soybean was efficient in glucose release and consequently the release of aglycones.

**Keywords:**  $\beta$ -glucosidase. Immobilization. Chitosan. Response surface methodology. Application.

## LISTA DE TABELAS

|   |    |
|---|----|
| <b>Tabela 1</b> – Estrutura química das isoflavonas agliconas presentes na soja .....   | 19 |
| <b>Tabela 2</b> – Estrutura química das isoflavonas $\beta$ -glicosídicas não conjugadas e $\beta$ -glicosídicas conjugadas com acetil e malonil presentes na soja .....  | 19 |
| <b>Tabela 3</b> - Caracterização bioquímica de $\beta$ -glicosidases vegetais.....  | 27 |
| <b>Tabela 4</b> - Taxas de imobilização obtidas com diferentes suportes e enzimas.....  | 36 |
| <b>Tabela 5</b> – Técnicas de planejamento experimental e respectivos objetivos .....   | 38 |
| <b>Tabela 6</b> – Matriz dos ensaios do delineamento composto central rotacional (DCCR) para as variáveis independentes, com triplicata no ponto central .....  | 43 |
| <b>Tabela 7</b> - Valores utilizados no delineamento composto central rotacional (DCCR) para três níveis de fatores codificados em valores reais para as variáveis do planejamento experimental da etapa de ativação da quitosana ..... | 44 |
| <b>Tabela 8</b> - Valores codificados e reais para as variáveis independentes do planejamento experimental $2^3$ da etapa de otimização da imobilização da $\beta$ -glicosidase de cotilédones de soja.....                             | 45 |

## LISTA DE FIGURAS

|   |    |
|---|----|
| <b>Figura 1</b> - Estrutura química geral das isoflavonas (fonte: FARAJ, VASANTHAN, 2004) .....   | 18 |
| <b>Figura 2</b> - Biossíntese de isoflavonas (daidzeína e genisteína) (Adaptado de SIMÕES, 2004) .....  | 20 |
| <b>Figura 3</b> - Transformações ocorridas com isoflavonas em humanos e animais domésticos (Fonte: AGUIAR et al., 2007) .....                   | 23 |
| <b>Figura 4</b> - Via metabólica para a daidzeína (Fonte: AGUIAR et al., 2007).....   | 23 |
| <b>Figura 5</b> - Estrutura cristalina da $\beta$ -glicosidase. (Fonte: NAM; SUNG; HWANG, 2010) .....   | 25 |
| <b>Figura 6</b> - Esquema ilustrativo dos quatro tipos básicos de métodos de imobilização enzimáticos (Adaptado de: BRADY; JORDAAN, 2009) ..... | 31 |
| <b>Figura 7</b> - Representação da estrutura química da quitina e quitosana (fonte: DUTTA et al., 2009).....                                    | 32 |
| <b>Figura 8</b> - Esquema simplificado dos processos de fabricação industrial de quitosana (Fonte: VILLELA, 2006) .....                         | 33 |
| <b>Figura 9</b> - Esquema da reação entre quitosana (QTS), glutaraldeído e $\beta$ -glicosidase (Adaptado de OLIVEIRA; VIEIRA, 2006).....       | 34 |

## SUMÁRIO

|          |  |    |
|----------|--|----|
| <b>1</b> | <b>INTRODUÇÃO</b> .....  | 14 |
| <b>2</b> | <b>OBJETIVOS</b> .....   | 15 |
| 2.1      | OBJETIVOS GERAIS.....  | 15 |
| 2.2      | OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....  | 15 |
| <b>3</b> | <b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....   | 16 |
| 3.1      | A SOJA.....  | 16 |
| 3.2      | AS ISOFLAVONAS.....  | 17 |
| 3.3      | $\beta$ – GLICOSIDASES.....  | 24 |
| 3.3.1    | Classificação e Mecanismo de Ação .....  | 25 |
| 3.3.2    | Caracterização Bioquímica.....   | 26 |
| 3.3.3    | Aplicação de $\beta$ -glicosidase em Produtos de Soja.....   | 27 |
| 3.4      | IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS .....  | 28 |
| 3.4.1    | Suportes Para Imobilização de Enzimas.....   | 29 |
| 3.4.2    | Métodos de Imobilização de Enzimas .....   | 31 |
| 3.4.3    | Quitossana .....   | 31 |
| 3.5      | PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL .....  | 37 |
| <b>4</b> | <b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....  | 39 |
| 4.1      | MATERIAL .....   | 39 |
| 4.1.1    | Matéria-Prima .....  | 39 |
| 4.1.1.1  | Preparo da matéria-prima .....   | 39 |
| 4.1.2    | Reagentes.....   | 39 |
| 4.2      | MÉTODOS .....  | 39 |
| 4.2.1    | Determinação de Atividade de $\beta$ -glicosidase .....  | 39 |
| 4.2.2    | Determinação de Proteínas Solúveis .....   | 40 |
| 4.2.3    | Determinação de Atividade Específica de $\beta$ -glicosidase.....                                  | 40 |
| 4.3      | OBTENÇÃO DE $\beta$ -GLICOSIDASE .....   | 40 |
| 4.3.1    | Extração .....   | 40 |
| 4.3.2    | Precipitação Fracionada de $\beta$ -glicosidase de Cotilédones de Soja com Sulfato de Amônio ..... | 40 |

|   |   |             |
|---|---|-------------|
| 4.4                                     | IMOBILIZAÇÃO DE B-GLICOSIDASE DE COTILÉDONES DE SOJA EM QUITOSANA .....   | 411         |
| 4.4.1                                   | Preparo de Grânulos de Quitosana e sua Ativação com Glutaraldeído .....   | 412         |
| 4.4.3                                   | Imobilização de $\beta$ -glicosidase nos Grânulos de Quitosana Ativados por Meio<br>de Ligação Cruzada com Glutaraldeído .....  | 43          |
| 4.4.4                                   | Condições Ótimas para Imobilização de $\beta$ -glicosidase .....  | 44          |
| 4.5                                     | PROPRIEDADES BIOQUÍMICAS DA B - GLICOSIDASE IMOBILIZADA .....   | 444         |
| 4.5.1                                   | Determinação de Temperatura e pH Ótimos .....   | 444         |
| 4.5.2                                   | Determinação da Termoestabilidade .....   | 45          |
| 4.5.3                                   | Determinação de $K_m$ e $V_{m\acute{a}x}$ .....   | 45          |
| 4.5.4                                   | Determinação da Estabilidade Operacional .....  | 466         |
| 4.5.5                                   | Efeito de Íons e Compostos Orgânicos .....  | 46          |
| 4.6                                     | APLICAÇÃO DE B-GLICOSIDASE IMOBILIZADA EM EXTRATO AQUOSO DE SOJA .....  | 46          |
| <b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b> |   | <b>47</b>   |
| <b>5</b>                                | <b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>   | <b>56</b>   |
| 5.1                                     | ARTIGO CIENTÍFICO .....   | 56          |
| 5.2                                     | TRABALHOS APRESENTADOS EM EVENTOS CIENTÍFICOS .....   | 56          |
| 5.3                                     | ARTIGO CIENTÍFICO .....   | 57          |
| <b>6</b>                                | <b>CONCLUSÕES .....</b>   | <b>99</b>   |
| <b>CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>       |   | <b>100</b>  |
| <b>ANEXOS .....</b>                     |   | <b>1011</b> |
| ANEXO A                                 | Tabela 1: Coeficientes de regressão, efeitos estimados e erros padrão<br>das variáveis X1 (concentração de glutaraldeído), X2 (pH) e X3 (tempo<br>de agitação) no DCCR da etapa de ativação dos grânulos de quitosana<br>com glutaraldeído .....                | 102         |
| ANEXO B                                 | Tabela 2: Análise de variância (ANOVA) para o modelo que representa<br>a taxa de imobilização pelas variáveis X1 (concentração de<br>glutaraldeído), X2 (pH) e X3 (tempo de agitação) na etapa de ativação<br>dos grânulos de quitosana com glutaraldeído. .... | 103         |

|         |  |     |
|---------|--|-----|
| ANEXO C | Tabela 3: Coeficientes de regressão, efeitos estimados e erros padrão das variáveis X1 (teor de proteína), X2 (pH) e X3 (tempo de agitação) no DCCR da etapa de imobilização de $\beta$ -glicosidase de cotilédones de soja em grânulos de quitosana.....                | 104 |
| ANEXO D | Tabela 4: Análise de variância (ANOVA) para o modelo que representa a taxa de imobilização pelas variáveis X1 (teor de proteína), X2 (pH) e X3 (tempo de agitação) na etapa de imobilização de $\beta$ -glicosidase de cotilédones de soja em grânulos de quitosana..... | 105 |
| ANEXO E | Figura 1: Efeito da concentração de $\rho$ -NPG (mM) na atividade de $\beta$ -glicosidase de cotilédones de soja imobilizada em grânulos de quitosana (Gráfico de Michaelis-Menten).....   | 106 |
| ANEXO F | Figura 2: Grânulo de quitosana 1% ativado com glutaraldeído.....   | 107 |

## 1 INTRODUÇÃO

A soja [*Glycine Max* (L.) Merrill] é um alimento protéico muito consumido por humanos e animais, sendo comprovado que esta leguminosa traz vários benefícios à saúde, devido à presença de nutrientes essenciais para uma vida saudável, entre estes, a proteína. As isoflavonas tem sido pesquisadas quanto a diferentes efeitos na saúde humana e estão presentes no grão de soja, na forma glicosídica. Porém, sabe-se que as isoflavonas na forma aglicona são melhor absorvidas pelo organismo e proporcionam mais benefícios à saúde, sendo desejável maior teor desta forma nos produtos de soja.

As isoflavonas agliconas são obtidas através da ação da enzima  $\beta$ -glicosidase sobre as isoflavonas glicosídicas. Esta ação ocorre naturalmente nos grãos de soja, mas há a necessidade de buscar uma aplicação alternativa desta enzima em produtos de soja que apresente bons resultados em termos de custo-benefício. A imobilização de  $\beta$ -glicosidases da soja em diferentes suportes ainda não foi investigada, mas estas enzimas, estando imobilizadas, poderão ser adequadas para uso na indústria de alimentos, desde que o suporte não seja tóxico e não altere as características do produto, como cor, sabor e aroma.

A utilização da enzima imobilizada apresenta diversas vantagens como sua estabilização e possibilidade de operações contínuas. Isto permite a sua aplicação em produtos alimentares para a obtenção de alimentos funcionais com características definidas, como por exemplo, a quantidade aumentada de isoflavonas agliconas. Assim, o conhecimento sobre a imobilização das  $\beta$ -glicosidases endógenas da soja poderá favorecer a sua aplicação em produtos de soja. Também será possível a recuperação da enzima ao final da aplicação, tornando-a mais atraente sob o ponto de vista econômico.

A metodologia de superfície de resposta tem a vantagem de analisar as variáveis simultaneamente, podendo-se verificar e quantificar efeitos sinérgicos e antagônicos entre os fatores de interesse, pois quando estes são analisados separadamente, a condição otimizada não pode ser atingida por não se detectar a interação entre eles.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVOS GERAIS

O objetivo deste trabalho foi determinar as condições ótimas para a imobilização da  $\beta$ -glicosidase de cotilédones de soja, em grânulos de quitosana, aplicando a metodologia de superfície de resposta, caracterizar a enzima imobilizada e avaliar sua aplicação em extrato aquoso de soja.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Obter  $\beta$ -glicosidase de cotilédones de soja fracionada com sulfato de amônio.

Determinar as condições ótimas para a imobilização da  $\beta$ -glicosidase utilizando grânulos de quitosana como suporte e aplicando a metodologia de superfície de resposta.

Avaliar a atividade de  $\beta$ -glicosidase no sistema imobilizado.

Determinar propriedades bioquímicas e cinéticas da enzima imobilizada.

Verificar a estabilidade operacional da enzima imobilizada.

Aplicar e avaliar a ação da  $\beta$ -glicosidase imobilizada nas isoflavonas glicosídicas de extrato aquoso de soja comercial.

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 A SOJA

A soja, *Glycine max* (L.) Merrill, é uma espécie vegetal originária da Ásia e cultivada na China desde o século XI a.C. (HYMOWITZ; SHURTLEFF, 2005). Ao longo dos séculos foi disseminada para os outros países do oriente e a sua introdução no ocidente ocorreu a partir do século XVIII (HYMOWITZ, 1970). Devido à sua adaptabilidade em diferentes latitudes, solos e condições climáticas, o cultivo de soja se expandiu por todo mundo, tornando-a uma das principais espécies de leguminosas cultivadas (DALLA NORA, 2007; LIU, 1997). A soja chegou ao Brasil via Estados Unidos, em 1882, e em 1900 e 1901 têm-se registro do primeiro cultivo de soja no Rio Grande do Sul (EMBRAPA SOJA, 2010).

A soja é o principal grão oleaginoso produzido no mundo. Estima-se que sua produção mundial na safra 2010/2011 será de 254,89 milhões de toneladas, sendo os Estados Unidos o maior produtor mundial do grão, com 94,8 milhões de toneladas (COGO, 2010). Esta oleaginosa ocupa lugar de destaque no mercado de *commodities* brasileiro, com aumento crescente em sua produção. Para a safra de 2010/2011, a Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB, 2010) estima que a cultura ocupará uma área entre 23,76 e 24,20 milhões de hectares, o que representa 2,82% do território brasileiro, totalizando uma produção entre 67,64 e 68,90 milhões de toneladas. Os maiores produtores no Brasil são os estados do Mato Grosso e Paraná (EMBRAPA, 2010). O Brasil é o principal exportador de farelo de soja, detendo 32% do mercado mundial, o que significa uma exportação considerável de proteína (APROSOJA, 2010). A soja proporciona efeitos benéficos à saúde e apresenta ampla diversidade de usos: é utilizada na alimentação humana, “in natura” e em produtos como tofu e extrato aquoso; na alimentação animal, compondo rações de alto valor energético; e como matéria-prima industrial para produtos não alimentícios, como tintas, resinas, óleos industriais e na produção de biodiesel, um combustível alternativo e de matéria-prima renovável (LIU, 1997; BORSATO et al., 2010).

O consumo de produtos de soja contribui para a diminuição na incidência de doenças coronarianas, aterosclerose, diabetes tipo 2, no risco de alguns tipos de câncer, como de mama e próstata, e a melhora na saúde óssea e alívio de sintomas da menopausa (XIAO, 2008). O FDA (U. S. Food and Drug Administration) em outubro de 1999, aprovou a alegação de que a ingestão de 25 g de proteínas de soja por dia, associada a uma dieta com baixo teor de gordura saturada e colesterol pode reduzir o risco de doenças coronarianas. A

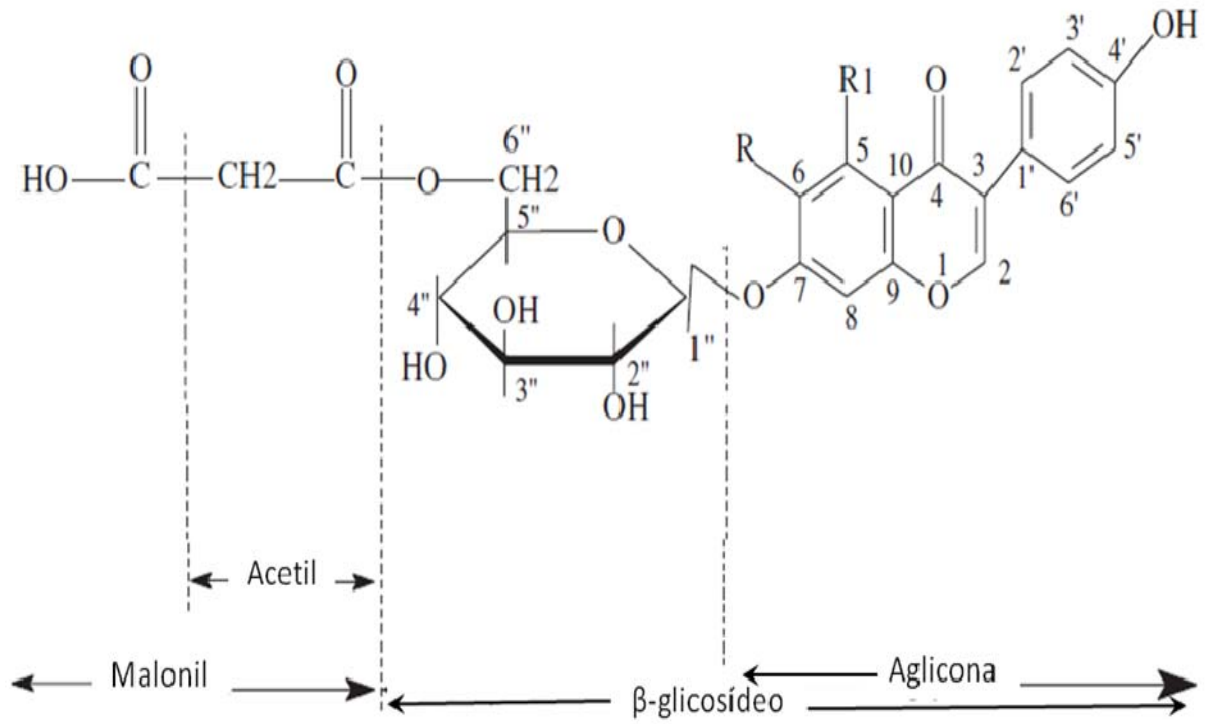
divulgação dos benefícios à saúde atribuídos ao consumo desta leguminosa tem aumentado a procura por alimentos derivados de soja.

A soja contém cerca de 40% de proteínas de alta qualidade, 20% de lipídeos com alta concentração de ácidos graxos poliinsaturados, 35% de carboidratos, teor considerável de vitaminas do complexo B e minerais como magnésio, fósforo, ferro e zinco (CARRÃO-PANIZZI; BORDINGNON, 2000; MORAES et al., 2006). Entre os componentes funcionais da soja, além das proteínas, destacam-se as isoflavonas, as mais investigadas devido aos seus efeitos benéficos para a saúde humana (ISMAIL; HAYES, 2005).

### 3.2 AS ISOFLAVONAS

As isoflavonas, também denominadas de isoflavonóides, são compostos fenólicos pertencentes ao grupo dos flavonóides e à classe dos fitoestrógenos, estando amplamente distribuídos no reino vegetal (ESTEVES; MONTEIRO, 2001). As isoflavonas apresentam uma estrutura composta por dois anéis benzeno ligados a um terceiro anel, sendo que as isoflavonas da soja podem existir em quatro formas químicas: aglicona (livre de açúcar);  $\beta$ -glicosídica (glicose ligada à hidroxila do C7 do anel benzeno) e  $\beta$ -glicosídicas conjugadas com grupos acetil e com grupos malonil (Figura 1). As isoflavonas agliconas são daidzeína, genisteína e gliciteína (Tabela 1); as  $\beta$ -glicosídicas não-conjugadas são daidzina, genistina e glicitina; as formas  $\beta$ -glicosídicas conjugadas com acetil são 6''O-acetil-daidzina, 6''O-acetil-genistina e 6''O-acetil-glicitina; e as formas conjugadas com malonil são 6''O-malonil-daidzina, 6''O-malonil-genistina e 6''O-malonil-glicitina (Tabela 2).

**Figura 1** – Estrutura química geral das isoflavonas (Adaptado de: FARAJ, VASANTHAN, 2004).



**Tabela 1** – Estrutura química das isoflavonas agliconas presentes na soja.

| <b>Isoflavona</b>                             | <b>R</b>          | <b>R1</b> |
|---|-------------------|-----------|
| Daidzeína (4,7-dihidroxiisoflavona)           | -H                | -H        |
| Genisteína (4,5,7-trihidroxiisoflavona)       | -H                | -OH       |
| Gliciteína (4,7-dihidroxi-6-metoxiisoflavona) | -OCH <sub>3</sub> | -H        |

**Tabela 2** – Estrutura química das isoflavonas  $\beta$ -glicosídicas não conjugadas e  $\beta$ -glicosídicas conjugadas com acetil e malonil presentes na soja.

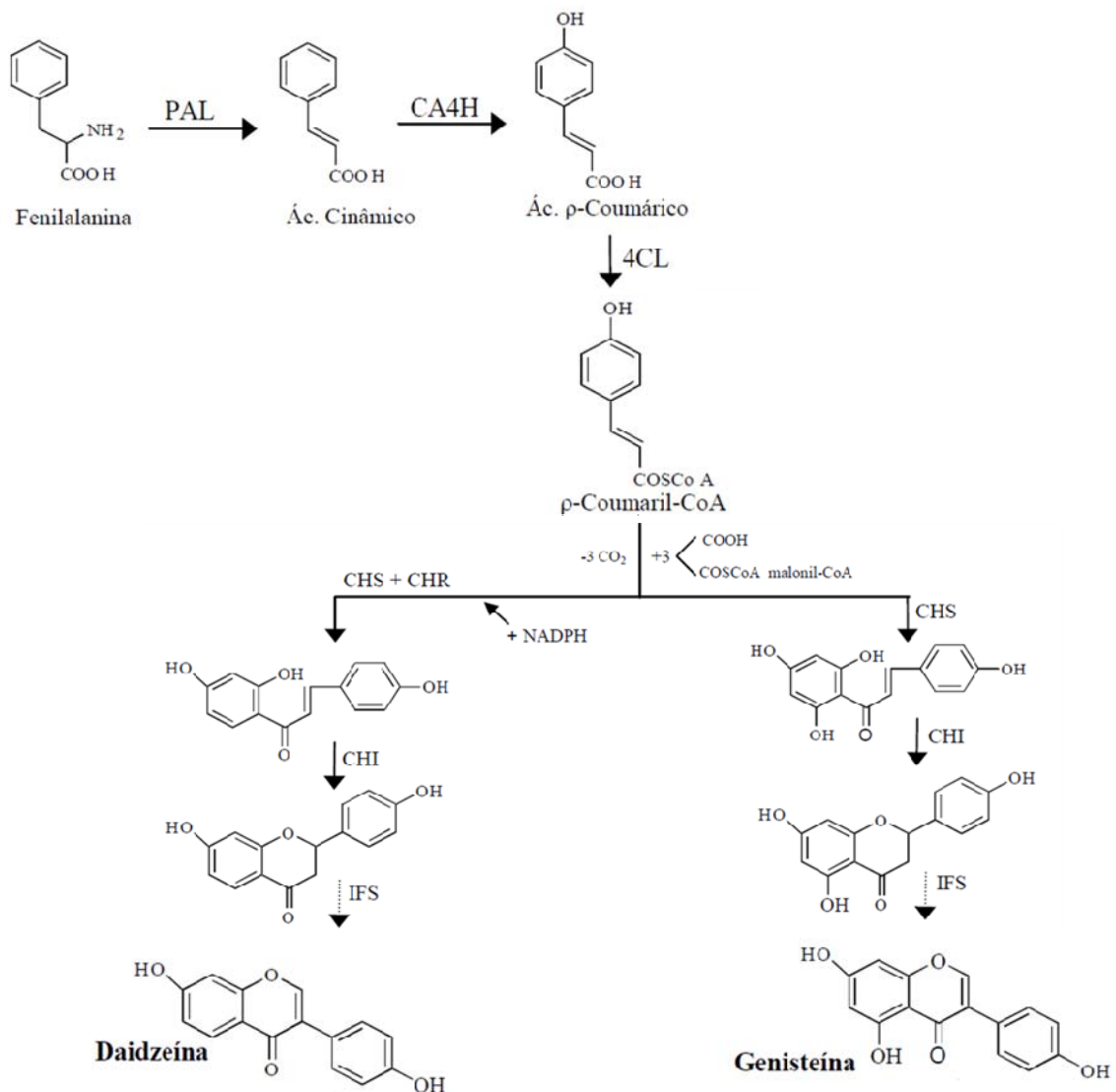
| <b>ISOFLAVONAS</b>  | <b>R</b>           | <b>R1</b> |
|---|--------------------|-----------|
| <b><math>\beta</math>-glicosídicas não conjugadas</b>         |                    |           |
| Daidzina  | -H                 | -H        |
| Genistina   | -H                 | -OH       |
| Glicitina   | - OCH <sub>3</sub> | -H        |
| <b><math>\beta</math>-glicosídicas conjugadas com acetil</b>  |                    |           |
| 6''O-Acetil-daidzina  | -H                 | -H        |
| 6''O-Acetil-genistina   | -H                 | -OH       |
| 6''O-Acetil-glicitina   | - OCH <sub>3</sub> | -H        |
| <b><math>\beta</math>-glicosídicas conjugadas com malonil</b> |                    |           |
| 6''O-Malonil-daidzina   | -H                 | -H        |
| 6''O-Malonil-genistina  | -H                 | -OH       |
| 6''O-Malonil-glicitina  | - OCH <sub>3</sub> | -H        |

Em contraste com a ampla distribuição de flavonóides no reino vegetal, a maior parte dos isoflavonóides está presente nas leguminosas, possivelmente devido à presença de isoflavona sintase (IFS) nestas espécies vegetais. Esta enzima catalisa uma etapa envolvida na síntese de isoflavonas, sendo uma reação combinada de migração de aril, catalisada pela 2-hidroxiisoflavanona sintase (2-HIS), e a reação subsequente de desidratação, catalisada pela enzima 2-hidroxiisoflavanona desidratase (2-HID) (TIAN; PANG; DIXON, 2008).

Os isoflavonóides são produzidos pela via de biossíntese de flavonóides (Figura 2), iniciando com a conversão do aminoácido fenilalanina em ácido cinâmico pela fenilalanina amônia liase. Na seqüência, reações são catalisadas pelo ácido cinâmico 4-hidrolase, formando o ácido 4-hidroxil cinâmico (ácido *p*-cumárico), que pela ação do ácido

$\rho$ -cumárico CoA ligase libera o  $\rho$ -cumariol CoA. Três moléculas de malonil CoA reagem com uma molécula de  $\rho$ -cumariol CoA formando a chalcona, que pode ser isomerizada pela chalcona isomerase, originando as flavononas. A formação das isoflavonas está associada à ação da isoflavona sintase, que transforma as flavononas naringenina e liquiritigenina em isoflavonas genisteína e daidzeína, respectivamente (AGUIAR, 2004; MORAES et al., 2009).

**Figura 2** – Biossíntese de isoflavonas daidzeína e genisteína (Adaptado de SIMÕES, 2004). PAL, fenilalanina amônia liase; CA4H, ácido cinâmico 4-hidrolase; 4CL, ácido  $\rho$ -cumárico CoA ligase; CHS, chalcona sintase; CHR, chalcona redutase; CHI, chalcona isomerase; IFS, isoflavona sintase.



As isoflavonas são armazenadas inicialmente como glicosil conjugados nas sementes das leguminosas. Quando estas germinam, as isoflavonas conjugadas são hidrolisadas por  $\beta$ -glicosidases a agliconas e ocorre também uma nova síntese destes

compostos (KAUFMAN et al., 1997). Os  $\beta$ -glicosídeos e agliconas representam em média 31 e 2% do total de isoflavonas em grãos de soja (RIBEIRO et al., 2006). Os alimentos derivados de soja contêm concentrações mais elevadas de genistina e daidzina, em relação a outras leguminosas e vegetais. Também foram detectadas daidzeína e genisteína em frutas, amêndoas e uva passas (LIGGINS et al., 2000).

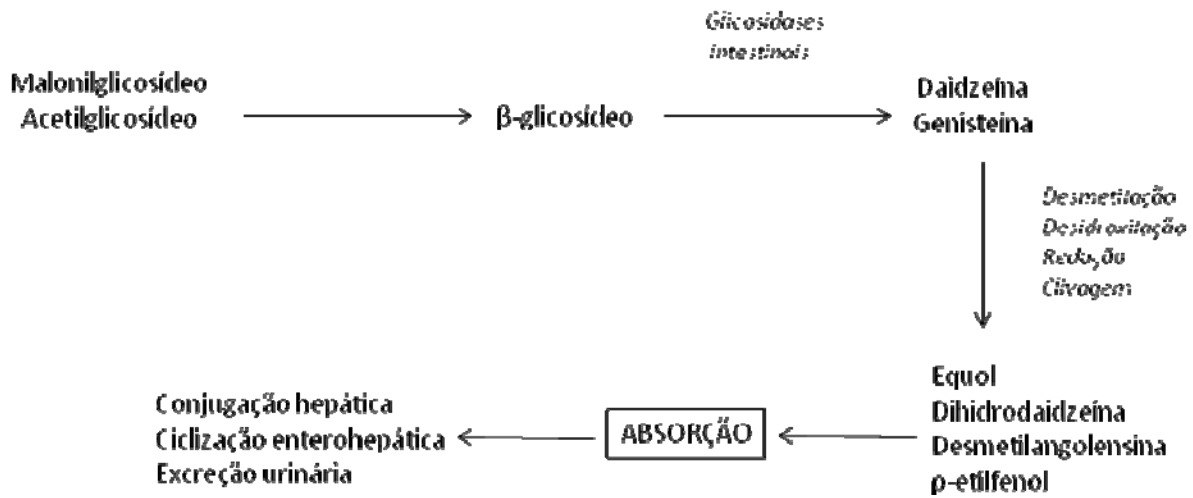
As isoflavonas têm sido descritas devido às suas atividades biológicas. Segundo Brouns (2002), muitas pesquisas demonstraram melhores condições cardiovasculares e ósseas em mulheres asiáticas, quando comparadas às ocidentais. Os epidemiologistas em nutrição atribuíram estes resultados, em parte, a uma dieta rica em soja, que é consumida há mais de 5.000 anos pelos orientais, em contraste com os povos ocidentais, sendo que a soja é rica em isoflavonas. Assim, evidências indicaram que as isoflavonas da soja podem ter contribuído com estes resultados benéficos.

Entre os possíveis efeitos das isoflavonas, destacam-se a possibilidade de atividade estrogênica (LIGGINS et al., 2000; LIU; KANJO; MIZUTANI, 2010; MESSINA, 2000; MOLTENI; BRIZIO-MOLTENI; PERSKY, 1995); manutenção da densidade óssea (KURZER; XU, 1997; LEVIS et al., 2010; LIGGINS et al., 2000; POTTER et al., 1998; WILLIAMS et al., 1998); diminuição do colesterol sérico e triglicérides (LOVATI et al., 2000; MENG et al., 1999; POTTER et al., 1998); prevenção de doenças cardiovasculares (KURZER; XU, 1997; LIGGINS et al., 2000; RIMBACH et al., 2008); atividade antioxidante (MA et al., 2010; HUANG et al., 2008; PARK et al., 2001); redução dos sintomas indesejáveis da menopausa (LEVIS et al., 2010; SOUSA-MUÑOZ; FILIZOLA, 2009; VIEIRA et al., 2007); redução da dependência de álcool (KEUNG, 2003); melhora da memória (LEPHART et al., 2002); atividade antiviral (ANDRES; DONOVAN; LUHLENSCHMIDT, 2009); e anti-carcinogênica, diminuindo o risco de câncer de próstata, cólon e de mama (ADLERCREUTZ, 1998; LI et al., 1999; LIGGINS et al., 2000). Estas atividades biológicas são mais acentuadas nas formas agliconas que glicosiladas, pois as agliconas apresentam maior absorção, ou seja, necessitam de menor tempo para atingir sua concentração plasmática máxima (IZUMI et al., 2000). Além disso, foi relatado que a atividade antioxidante de isoflavonas agliconas foi superior à glicosilada (AGUIAR, 2002), uma vez que a capacidade antioxidante das isoflavonas foi relacionada ao número de grupos hidroxila presente na sua estrutura química (BARBOSA et al., 2006). A conversão de  $\beta$ -glicosil em isoflavonas agliconas resulta em quantidades maiores de compostos benéficos à saúde humana (PARK et al., 2001).

O consumo de alimentos com maior teor de agliconas é desejável, entretanto, as agliconas estão presentes em pequenas quantidades nos grãos de soja e considerando que estas são formadas a partir da clivagem de seus conjugados  $\beta$ -glicosídeos pela ação de  $\beta$ -glicosidases endógenas da soja, estudos têm sido realizados para aumentar o teor de agliconas. O tratamento hidrotérmico foi eficaz no aumento de agliconas (MATSUURA; OBATA; FUKUSHIMA, 1989; GÓES-FAVONI, 2002; CARRÃO-PANIZZI; SIMÃO; KIKUCHI, 2003). Góes-Favoni (2002) relatou que após hidratação de grãos de soja a 50°C por 24 horas, o teor de genisteína aumentou de 20,4 a 48,7 vezes. Ribeiro et al. (2006) observaram que a germinação afetou a atividade de  $\beta$ -glicosidase, o teor de isoflavonas totais e suas formas isoméricas. Durante a germinação, a atividade de  $\beta$ -glicosidase aumentou em radículas e cotilédones, enquanto o teor de isoflavonas totais aumentou nos cotilédones e diminuiu nas radículas. Daidzeína apresentou pequena variação em seu teor e genisteína foi detectada em baixas concentrações em alguns tempos de germinação.

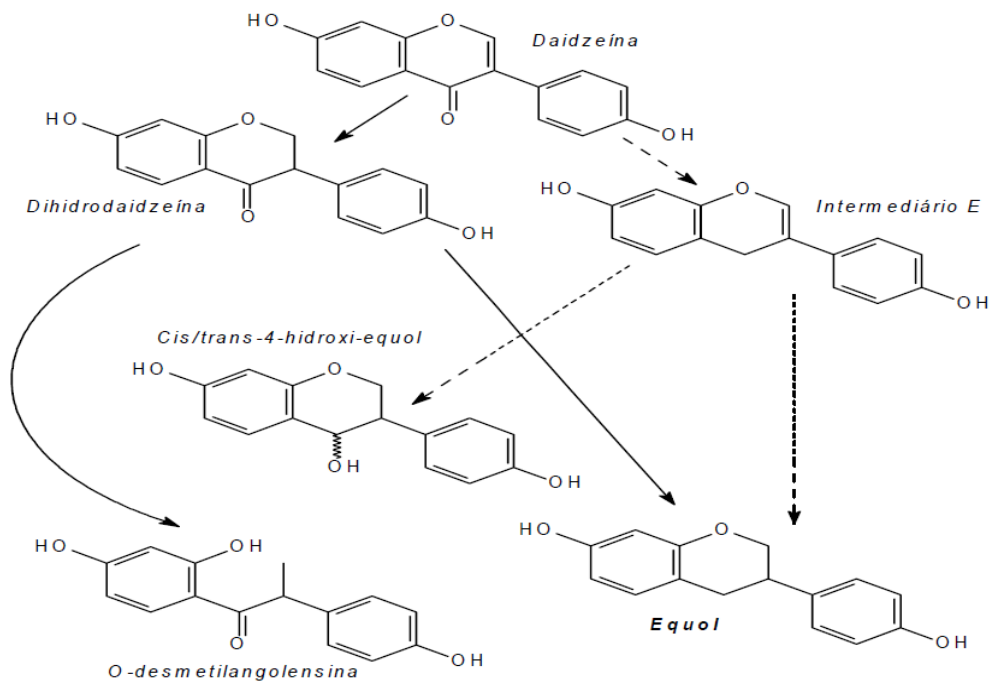
Quando consumidos, os  $\beta$ -glicosídeos podem ser hidrolizados a agliconas pela ação de enzimas com atividade de  $\beta$ -glicosidases produzidas pela microflora intestinal (SETCHELL, 1998). Uma vez absorvidas, as agliconas sofrem glucuronidação hepática e tornam-se substratos para sulfotransferases (SARACINO; RAGGI, 2010). Porém, a disponibilidade da  $\beta$ -glicosidase no intestino é limitada e o metabolismo das isoflavonas pode variar entre populações e em função da dieta, ingestão de medicamentos e tempo de permanência do alimento no intestino (ISMAIL; HAYES, 2005). Após a ingestão, as formas conjugadas das isoflavonas são hidrolisadas pelas  $\beta$ -glicosidases de bactérias intestinais, liberando as principais agliconas, daidzeína e genisteína (AGUIAR et al., 2007; SETCHELL, 1998). A daidzeína e a genisteína podem ser absorvidas ou metabolizadas por bactérias intestinais e produzir metabólitos específicos, tais como equol ou *O*-desmetilangolensina (ODMA) a partir da daidzeína e *p*-etilfenol a partir da genisteína (SETCHELL, 2000). A atividade biológica das isoflavonas pode ser afetada por seu metabolismo, que pode gerar metabólitos inativos como o *p*-etilfenol (MESSINA, 1997) e ativos como equol e *O*-desmetilangolensina (Figura 3) (MENDEL; SUYENAGA, 2010).

**Figura 3** – Transformações ocorridas com isoflavonas em humanos e animais domésticos (Fonte: AGUIAR et al., 2007).



Na Figura 4 observa-se uma possível via metabólica para a daidzeína, flavonóide muito consumido na dieta oriental (AGUIAR et al., 2007).

**Figura 4** – Via metabólica para a daidzeína (Fonte: AGUIAR et al., 2007).



É desejável a presença de isoflavonas agliconas em teor elevado nos produtos de soja, pois esta é a forma melhor absorvida pelo organismo. O consumo desta leguminosa está crescendo devido às propriedades benéficas ao organismo humano, sendo que as agliconas podem ser utilizadas na indústria farmacêutica, uma vez que elas minimizam

os sintomas da menopausa (LEVIS et al., 2010; SOUSA-MUÑOZ; FILIZOLA, 2009; VIEIRA et al., 2007), além dos outros efeitos benéficos.

### 3.3 $\beta$ – GLICOSIDASES

Estudos sobre as  $\beta$ -glicosidases têm aumentado devido ao seu papel importante em processos biológicos e biotecnológicos (CZJZEK et al., 2001; MORANT et al., 2008), como o uso em sacarificação e fermentação (HAN; CHEN, 2008), na produção de aromas (CZJZEK et al., 2001; OPASSIRI et al., 2003) em chás, vinhos e sucos de frutas (MIZUTANI et al., 2002; SU et al, 2010; MAICAS; MATEO, 2005; FIA; GIOVANI; ROSI, 2005), em engenharia de microrganismos para uso na conversão de biomassa como constituintes de  $\beta$ -glicosidase em parte importante do complexo de celulase (HAAN et al., 2007) e na produção de alimentos fermentados de soja, como misô, natto, tempeh e shoyu, contendo principalmente isoflavonas agliconas obtidas pela ação das  $\beta$ -glicosidases microbianas nas isoflavonas glicosídicas (LIU, 1997).

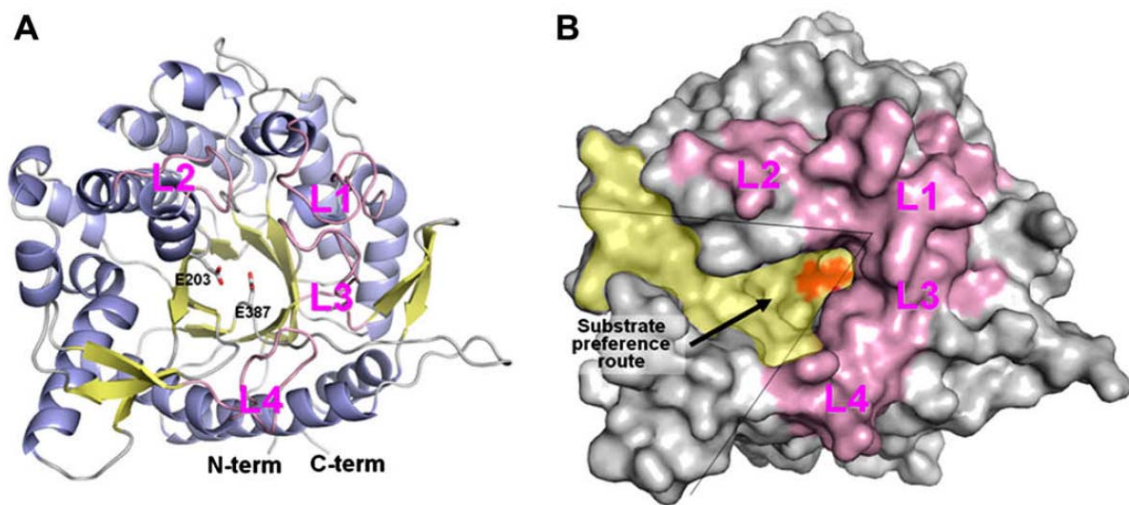
Alguns autores relataram a transformação de isoflavonas em produtos de soja não fermentados pela ação de  $\beta$ -glicosidases, tratamentos hidrotérmico e ácido ou maceração e trituração durante a produção do extrato aquoso de soja (CHANG, 2002; GÓES-FAVONI; CARRÃO-PANIZZI; BELEIA, 2010; WILKENS; HACKLER, 1969; ISHIHARA et al., 2007). As  $\beta$ -glicosidases atuam especificamente sobre as isoflavonas  $\beta$ -glicosídicas da soja, as quais são encontradas em maior proporção em produtos de soja não fermentados (CARRÃO-PANIZZI; GÓES-FAVONI; KIKUCHI, 2004), produzindo isoflavonas agliconas.

As  $\beta$ -glicosidases ( $\beta$ -D-glicosídeo glicohidrolase, EC 3.2.1.21), também denominadas gentiobiase e celobiase (PONTOH; LOW, 2002), formam um grupo heterogêneo de enzimas que hidrolisam a ligação  $\beta$ -glicosídica de oligossacarídeos e outros conjugados glicosídicos, liberando uma aglicona e glicose. Estas enzimas, cuja estrutura pode ser observada na Figura 5, podem catalisar também a hidrólise entre dois resíduos de glicose, como na celobiose (ESEN, 2003) e são amplamente distribuídas na natureza, podendo ser sintetizadas por plantas, microrganismos e animais (HSIEH; GRAHAM, 2001).

### 3.3.1 Classificação e Mecanismo de Ação

As  $\beta$ -glicosidases foram subdivididas por Pontoh e Low (2002) em três classes com base na sua especificidade pelo substrato. A classe 1 inclui enzimas com atividade glicosil  $\beta$ -glicosidase e aril  $\beta$ -glicosidase; com a capacidade de hidrolisar celobiose, lactose,  $\beta$ - $\rho$ -nitrofenilglicosídeo ( $\beta$ - $\rho$ NPG),  $\beta$ - $\rho$ -nitrofenilgalactosídeo ( $\beta$ - $\rho$ NPGal),  $\beta$ - $\rho$ -nitrofenilfrutosídeo ( $\beta$ - $\rho$ NPFru) e outros substratos semelhantes. Na classe 2 encontram-se as enzimas com atividade glicosil  $\beta$ -glicosidase; podendo hidrolisar substratos como celobiose e lactose. A classe 3 inclui enzimas apenas com atividade aril (ou alquil)  $\beta$ -glicosidase; com atividade significativa em  $\beta$ - $\rho$ -nitrofenilglicosídeos ( $\rho$ -NPG) e substratos semelhantes.

**Figura 5** – Estrutura da  $\beta$ -glicosidase. (A) Estrutura geral da  $\beta$ -glicosidase representada no modelo em fita. Os bolsões para a ligação do substrato estão coloridos em rosa. (B) Modelo de superfície molecular. (Fonte: NAM; SUNG; HWANG, 2010)



No sítio ativo da  $\beta$ -glicosidase há dois resíduos de aminoácidos ácidos envolvidos na catálise (Figura 5). Um resíduo de ácido glutâmico (E387) atua como nucleófilo atacando o carbono anomérico do substrato, com formação do intermediário covalente enzima  $\alpha$ -D-glicosil. O grupo carboxílico do outro ácido glutâmico (E203) age como catalisador ácido/base protonando o oxigênio glicosídico formado na primeira etapa (NAM; SUNG; HWANG, 2010).

### 3.3.2 Caracterização Bioquímica

Várias  $\beta$ -glicosidases vegetais já foram purificadas e caracterizadas, tais como a de cereja (GERARDI et al., 2001), semente de maçã (YU et al., 2007), sementes de centeio germinadas (SUE; ISHIHARA; IWAMURA, 2000), forragem de milho (HAN; CHEN, 2008), bagaço de laranja (CAMERON et al., 2001) e arroz germinado (AKIYAMA; KAKU; SHIBUYA, 1998), apresentando pequenas diferenças entre si quanto aos valores de pH isoelétrico, temperatura e pH ótimos e massa molecular. Alguns destes valores são apresentados na Tabela 3.

Em relação à  $\beta$ -glicosidase da soja, há poucos trabalhos relatados na literatura. Matsuura e Obata (1993) isolaram, purificaram e caracterizaram três isoformas de  $\beta$ -glicosidase de cotilédones de soja. Duas destas  $\beta$ -glicosidases tiveram uma massa molecular estimada em 52 kDa, por filtração em gel em Sephadex G-150. Apresentaram atividade máxima em 45°C, pH ótimo de 5,5, com atividade de 4,3–7,0. Posteriormente a terceira isoforma de  $\beta$ -glicosidase foi caracterizada, apresentando uma atividade ótima em pH 4,5 a 45°C, estável a pH 4,0–6,0 a 5°C e pI estimado em 6,68. A massa molecular foi estimada em 81 kDa por filtração em gel em HPLC e 36 kDa por eletroforese desnaturante (MATSUURA; SASAKI; MURAO, 1995).

Hsieh e Graham (2001) purificaram e caracterizaram a  $\beta$ -glicosidase da raiz da soja. O processo de purificação da enzima envolveu precipitação com sulfato de amônio e cromatografia de troca iônica com resina aniônica DEAE Sephadex A-50 e catiônica CM-Sephadex C-50. A enzima foi estável a 50°C, mantendo 87% de atividade após 45 minutos. O pH e temperatura ótimos foram 6,0 e 30°C, respectivamente.

**Tabela 3** - Caracterização bioquímica de  $\beta$ -glicosidases vegetais.

| <b>Planta</b>     | <b>Massa molecular</b>                         | <b>Temperatura e<br/>pH ótimos</b> | <b>Referências</b>            |
|-------------------|--|------------------------------------|-------------------------------|
| Arroz (germinado) | 56 kDa (SDS-PAGE)                              | 4,5 e 50°C                         | Akiyama, Kaku e Shibuya, 1998 |
| Centeio (semente) | 300 kDa (filtração em gel) e 60 kDa (SDS-PAGE) | 5,5 e 25-30°C                      | Sue, Ishihara e Iwamura, 2000 |
| Cereja            | 70 kDa (filtração em gel) e 68 kDa (SDS-PAGE)  | - -                                | Gerardi et al., 2001          |
| Laranja (bagaço)  | 55 kDa (filtração em gel) e 64 kDa (SDS-PAGE)  | 5,0 e 40°C                         | Cameron et al., 2001          |
| Maçã (semente)    | 120 kDa (filtração em gel) e 60 kDa (SDS-PAGE) | 6,0 e 70°C                         | Yu et al., 2007               |
| Milho (forragem)  | 62,4 kDa (SDS-PAGE)                            | 4,8 e 37°C                         | Han e Chen, 2008              |

Ribeiro (2006) purificou e caracterizou parcialmente a  $\beta$ -glicosidase de cotilédones de soja da cultivar BRS 213. A enzima foi purificada utilizando precipitação com sulfato de amônio, cromatografia de troca-iônica com CM-Sephadex C-50 e filtração em gel com Sephadex G-100 para posterior caracterização. O pH e temperatura ótimos da enzima foram 5,0 e 45 °C, sendo que a 25 °C a enzima foi estável até 4 dias e após 10 dias ocorreu redução de apenas 35% da atividade.

### 3.3.3 Aplicação de $\beta$ -glicosidase em Produtos de Soja

Há poucos estudos relatando a aplicação de  $\beta$ -glicosidase em produtos de soja para obtenção de maior teor de isoflavonas agliconas.

Kao, Chien e Chen (2008) estudaram a conversão de isoflavonas glicosídicas de torta de soja em agliconas utilizando  $\beta$ -glicosidase de amêndoas, apresentando um aumento de aproximadamente 7,5 vezes no teor de agliconas. Pyo, Lee e Lee (2005)

pesquisaram a fermentação de bactérias lácticas produtoras de  $\beta$ -glicosidases em leite de soja para obtenção das isoflavonas agliconas bioativas, daidzeína e genisteína e observaram um aumento de 7,1 vezes no teor de agliconas.

Santos (2010) aplicou a  $\beta$ -glicosidase em farinha de soja integral (FSI) tratada sob diferentes condições: autoclavada (121°C/30min), mantida em banho fervente (100°C/1h) e sem tratamento (condição ambiente – 25°C) e observou que a enzima foi eficiente na liberação de glicose, sendo os melhores resultados obtidos com a FSI mantida em banho fervente. Esta liberação de glicose está diretamente relacionada com a liberação simultânea de isoflavonas agliconas.

### 3.4 IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS

A utilização de enzimas imobilizadas é uma estratégia promissora para a condução de bioprocessos contínuos. Quando está associada à engenharia, bioquímica, microbiologia e genética, esta tecnologia pode ser utilizada como ferramenta para melhorar a eficiência de processos biotecnológicos, reduzindo os custos de produção.

Imobilizar uma enzima significa confiná-la ou localizá-la em uma porção do espaço utilizando métodos químicos ou físicos, mantendo sua atividade catalítica. Portanto, entende-se por enzima imobilizada, aquela física ou quimicamente associada a um suporte ou matriz, usualmente sólida, insolúvel em água e inerte, que não seja essencial à sua atividade. O objetivo principal da imobilização é reutilizar a enzima e também aumentar a sua estabilidade (COELHO; SALGADO; RIBEIRO, 2008). Nelson e Griffin (1916) foram os primeiros pesquisadores a imobilizar enzimas, com a adsorção da invertase em carvão ativo e alumina.

A dificuldade em se recuperar a enzima livre do meio reacional ao final da catálise, aliada à instabilidade e inadequação para uso em determinados solventes ou condições de pH, temperatura e exposição a agentes desnaturantes, podem ser superadas por meio da imobilização (CANILHA; CARVALHO; ALMEIDA E SILVA, 2006). A partir da metade do século passado, muitos esforços foram dedicados ao desenvolvimento de enzimas imobilizadas insolúveis para diversas aplicações. Essas aplicações podem beneficiar-se do uso das enzimas imobilizadas. Como exemplo, biocatalisadores heterogêneos reutilizáveis, com objetivo de reduzir os custos de produção por meio da reciclagem eficiente e controle do processo, dispositivos estáveis e reutilizáveis para aplicações médicas e analíticas, adsorventes seletivos para purificação de proteínas e enzimas, instrumentos fundamentais para

química de proteína de fase sólida e microdispositivos eficazes para liberação controlada de medicamentos proteicos (CAO, 2005).

Outras vantagens econômicas da imobilização de enzimas são o aumento da estabilidade, operações contínuas e facilidade de separação do produto de reação (CHANG et al., 2007; SU et al., 2010). As enzimas imobilizadas oferecem considerável vantagem operacional sobre enzimas livres, podendo apresentar propriedades físicas ou químicas alteradas seletivamente e servir como sistemas modelos para enzimas naturais, *in vivo*, ligadas a membrana (ZABORSKY, 1974).

Qualquer enzima imobilizada, por definição, deve apresentar duas funções essenciais, que são as funções não-catalíticas (FNC), projetadas para ajudar na separação, isolamento de catalisadores do ambiente de aplicação, reutilização dos catalisadores e o controle do processo; e as funções catalíticas (FC) que são projetadas para converter os substratos dentro do tempo e espaço desejados (CAO, 2005).

Na prática, as funções catalíticas são projetadas conforme a atividade desejada, seletividade, especificidade de substrato, produtividade e rendimento espaço-tempo, alta tolerância da variação estrutural dos substratos, alta produtividade, alto rendimento de espaço-tempo e alta durabilidade do catalisador. Por outro lado, os critérios de seleção de funções não-catalíticas, especialmente propriedades geométricas, são basicamente dependentes do tipo de reator (lote, tanque de movimento, coluna e fluxo de tomada), os tipos de meio de reação (aquoso, solvente orgânico ou sistema bifásico), os sistemas de reação (pasta fluida, líquido-líquido, líquido-sólido ou sólido-sólido) e as condições de processo (pH, temperatura, pressão) (CAO, 2005).

### 3.4.1 Suportes Para Imobilização de Enzimas

Mesmo com o grande número de trabalhos publicados na área, a aplicação industrial da tecnologia de imobilização enzimática em escala industrial é pouco empregada (KNÈZEVIC; SILER-MARINKOVIC; MOJOVIC, 2004).

A seleção de um suporte é uma etapa essencial para implementar um sistema reacional utilizando enzimas imobilizadas. Preferencialmente, a etapa de seleção da matriz de imobilização deve considerar os dados existentes relativos à estrutura e atividade da enzima, ao método de imobilização escolhido e às condições de processamento (AIRES-BARROS; FERNANDES, 2003). Dessa forma, não existe um método geral de imobilização ou um suporte universal adequado para qualquer tipo de processo.

Alguns critérios são importantes na avaliação de um sistema enzima-suporte, dentre estes: estabilidade de fixação, estabilidade enzimática, resistência mecânica e capacidade de carga (COELHO; SALGADO; RIBEIRO, 2008).

Os suportes são classificados conforme a sua composição química, em orgânicos (quitosana, polissacarídeos, proteínas, poliestireno, polipropileno, poliacrilatos, poliamidas etc.) e inorgânicos (areia, terra de diatomáceas, vidro, carvão ativado, metais, óxidos metálicos etc). No entanto, esta classificação não é adequada para a caracterização completa dos parâmetros do suporte, uma vez que não se considera a área disponível para a ligação do catalisador ao suporte, que determina a quantidade de enzima que consegue se ligar ao suporte. Assim, os suportes podem também ser classificados segundo a sua morfologia, em porosos (quitosana, poliacrilamida, alumina, sílica, triacetato de celulose etc.) e não porosos (vidro, sílica, aço) (AIRES-BARROS; FERNANDES, 2003). Os suportes não porosos possuem a desvantagem da pequena área para imobilização, sendo que a enzima se fixa na superfície, onde há formação de várias camadas de enzimas com forças de interação cada vez menores (MATEO et al., 2007).

Considerando o catalisador imobilizado no processo de produção, as matrizes de imobilização com características mais flexíveis são selecionadas preferencialmente. Os suportes inorgânicos têm a vantagem de ser quimicamente inertes, apresentar boa estabilidade mecânica e térmica em relação aos suportes orgânicos (AIRES-BARROS; FERNANDES, 2003); durabilidade, densidade, estabilidade e controle de porosidade mais apropriados (NAGASHIMA, 1984); além da facilidade de esterilização e limpeza (MOUEDDEB et al., 1996).

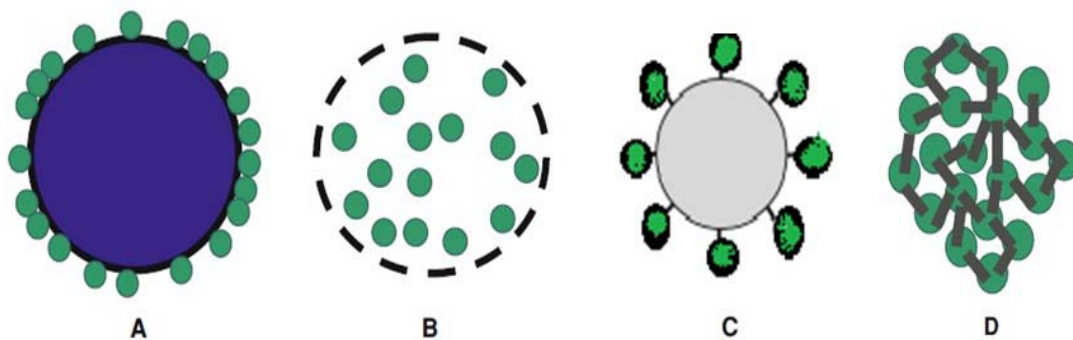
Os materiais utilizados como suportes devem, preferencialmente, ser encontrados com facilidade e abundância, ter baixo custo, resultar em baixo custo de imobilização, facilidade de operação em grande escala, apresentar alta capacidade de retenção e ter resistência mecânica para uma longa vida operacional (NAGASHIMA, 1984; CANILHA; CARVALHO; ALMEIDA E SILVA, 2006). A quitosana tem sido muito utilizada para imobilização de diversas enzimas, apresentando ótimos resultados (Tabela 3), principalmente quando ativado pelo reagente bifuncional glutaraldeído.

### 3.4.2 Métodos de Imobilização de Enzimas

Vários métodos de imobilização têm sido descritos na literatura para melhorar a estabilidade e otimizar o emprego de enzimas em processos industriais, pois seu uso na forma livre, e o posterior descarte representam um processo dispendioso e caro (DALLA-VECCHIA; NASCIMENTO E SOLDI, 2004). A imobilização de enzimas homogêneas pode ocorrer por reticulação com reagentes multifuncionais (AIRES-BARROS; FERNANDES, 2003) ou basear-se no tipo de interação entre a enzima e o suporte sólido como adsorção, encapsulação, ligação covalente e ligação iônica (Figura 6) (ZHAO et al., 2006).

O método de ligação covalente em quitosana pode ser utilizado juntamente com os reagentes multifuncionais, como o glutaraldeído. Segundo Betancor et al. (2006), a ativação de suportes com glutaraldeído é uma metodologia simples e eficiente que permite melhorar a estabilidade enzimática devido às ligações multipontuais ou ligações entre as subunidades da enzima na imobilização. A eficiência das reticulações do suporte depende da concentração do agente de reticulação, do pH do meio reacional, da temperatura, tempo de reação e do grau de desacetilação da quitosana (BERGER et al., 2004). Um período longo de tempo e uma alta concentração de agente reticulante geram muitas reticulações. Os grupamentos reativos do glutaraldeído reagem facilmente com os grupos amino da enzima e do suporte (ZABORSKI, 1974).

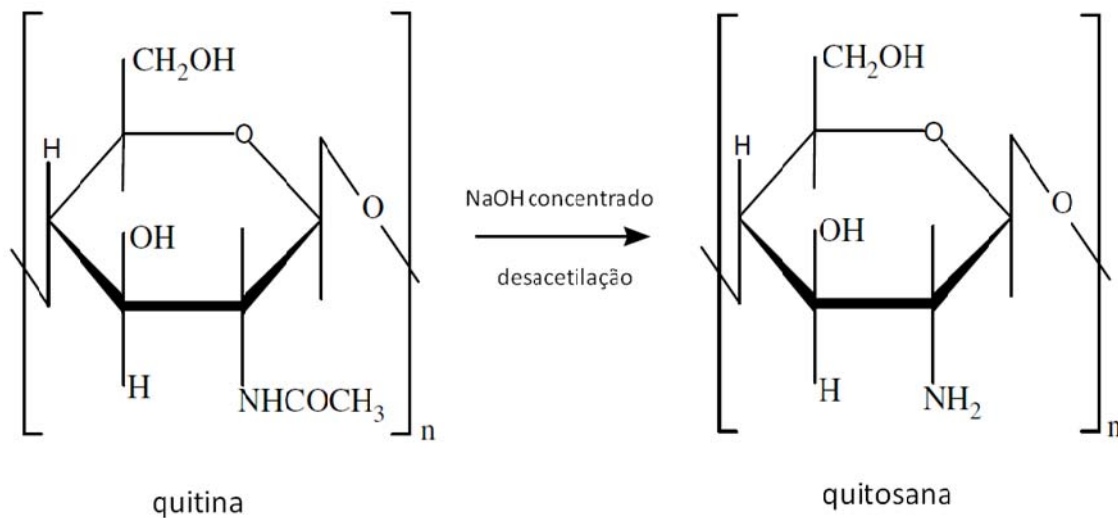
**Figura 6 -** Esquema ilustrativo dos quatro tipos básicos de métodos de imobilização enzimáticos: a) adsorção; b) encapsulação; c) ligação covalente; d) ligação cruzada. Enzimas são representadas por círculos (Adaptado de: BRADY; JORDAAN, 2009).



### 3.4.3 Quitosana

A quitosana (Figura 7) foi descoberta em 1859, pelo professor C. Rouget, quando este pesquisador colocou em ebulição uma solução de hidróxido de potássio com quitina, um polímero de N-acetil glicosamina. Portanto, a quitosana é obtida por reação de hidrólise alcalina da quitina, resultando no biopolímero constituído predominantemente das unidades de  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)-2-amino-2-desoxi-D-glicopirranose, apresentando em sua cadeia aproximadamente 70-90% de grau de desacetilação (VILLELA, 2006). A transformação da quitina em quitosana modifica suas propriedades, de modo que a quitina insolúvel em água, torna-se solúvel na maioria dos ácidos orgânicos, como ácido acético, ácido fórmico e ácidos inorgânicos, como o ácido clorídrico. A produção comercial ocorre essencialmente a partir de fonte marinha, utilizando exoesqueletos de crustáceos (Figura 8).

**Figura 7** - Representação da estrutura química da quitina e quitosana (fonte: DUTTA et al., 2009).

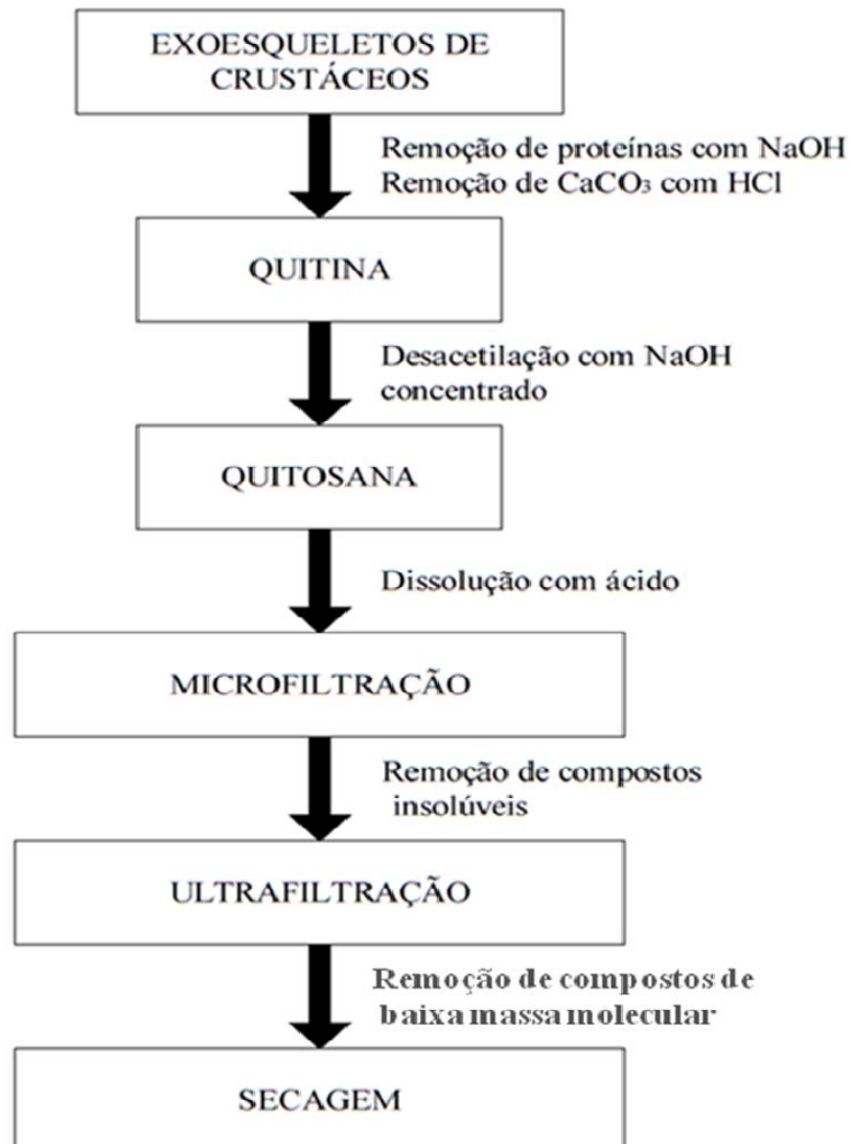


Devido à presença de grupos amino livres na quitosana e sua conseqüente solubilidade em soluções aquosas de certos ácidos, seu caráter de polieletrólito e suas propriedades físicas, químicas e biológicas, tornam este polímero mais versátil quimicamente quando comparado com seu análogo, a quitina. Assim, a quitosana torna-se uma alternativa atraente para muitas aplicações (VILLELA, 2006). Como a quitosana possui grupos amino ( $-\text{NH}_2$ ) e hidroxilas ( $-\text{OH}$ ), ela se liga facilmente às enzimas e pode fazer ligação cruzada com o agente bifuncional glutaraldeído (Figura 9) (CHANG; JUANG, 2007).

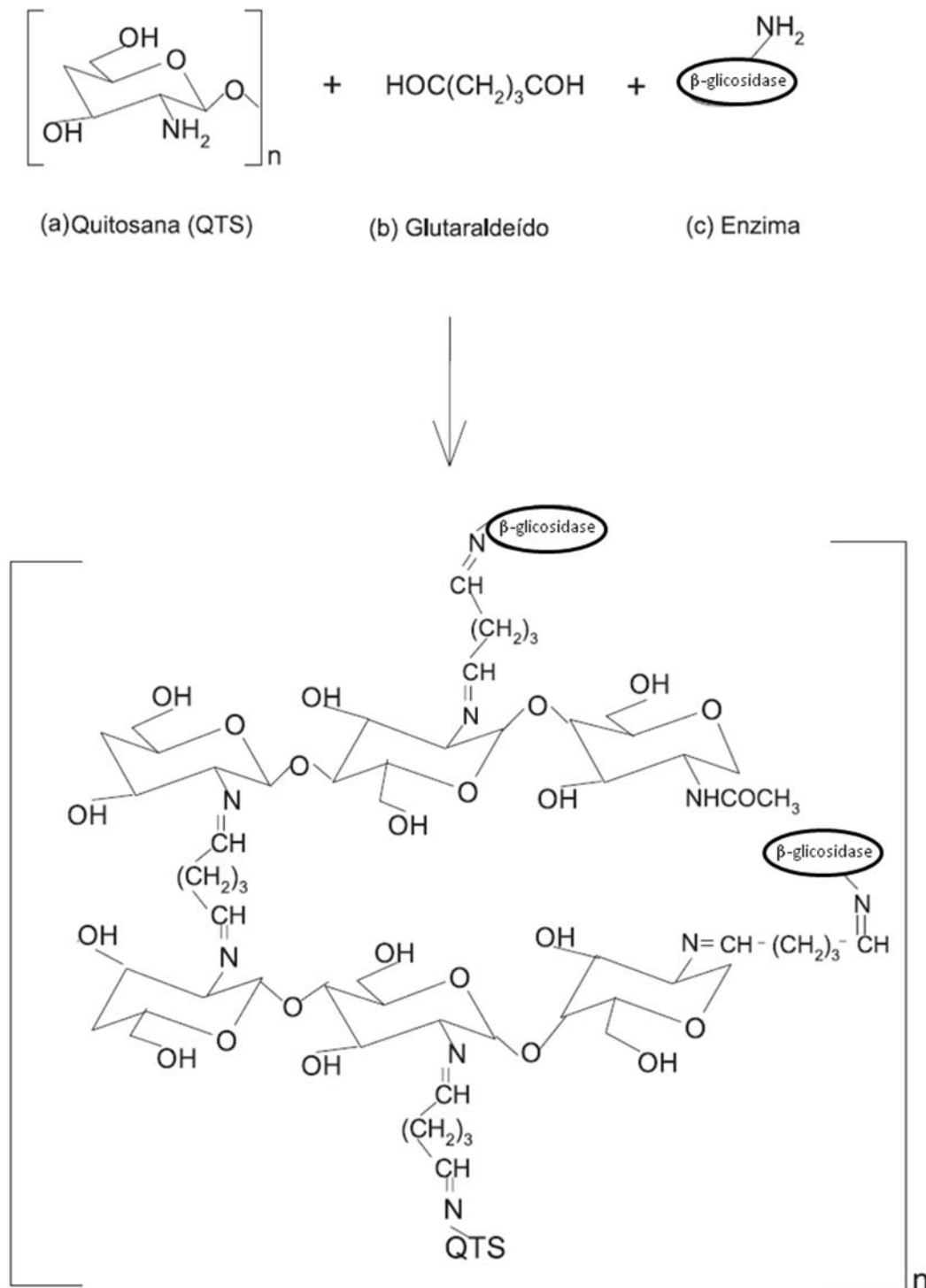
A quitosana apresenta insolubilidade em pH superior a 6,5, insolubilidade em  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , baixa solubilidade em  $\text{H}_3\text{PO}_4$ , insolubilidade em solventes orgânicos e grupos amínicos protonados ( $-\text{NH}_3^+$ ), capacidade de formar soluções viscosas com formação de geleificação com poliânions e de se solubilizar em misturas de água e álcool (DAMIAN et al., 2005).

A quitosana é considerada um suporte adequado para imobilização de enzimas por ser biocompatível, disponível de diversas formas (gel, membrana, fibra e filme), atóxico, resistente a modificações químicas e biodegradável (YI; NOH; LEE, 2009; GOMATHI et al., 2010). Devido a estas características, a quitosana apresenta um potencial para aplicação como biomaterial (ARNAUD; BARROS NETO; DINIZ, 2010).

**Figura 8** - Esquema simplificado dos processos de fabricação industrial de quitosana (Fonte: VILLELA, 2006).



**Figura 9 -** Esquema da reação entre quitosana (QTS), glutaraldeído e  $\beta$ -glicosidase (Adaptado de OLIVEIRA; VIEIRA, 2006).



A quitosana vem sendo utilizada como suporte para imobilização de microrganismos e enzimas, devido às suas propriedades, e, principalmente, em função de sua matéria prima (quitina) ser de baixo custo, obtida, principalmente, de resíduos da indústria pesqueira (AMORIM et al., 2003). Além disso, a quitosana em grânulos possui vantagens

como elevada porosidade e grande área de adesão (AZEVEDO et al., 2007; CHANG; JUANG, 2007). Na maioria dos estudos, a quitosana é ligada a um agente bifuncional, como o glutaraldeído, para o estabelecimento de ligações covalentes e cruzadas.

Bissett e Sternberg (1978) imobilizaram  $\beta$ -glicosidase de *Aspergillus phoenicis* QM 329 em quitosana utilizando glutaraldeído e observaram aumento na atividade da enzima na reação e a possibilidade de seu uso repetido. Chang e Juang (2007) imobilizaram  $\beta$ -glicosidase de amêndoas em grânulos compósitos de quitosana e argila secos (liofilizados) e úmidos ativados com glutaraldeído e verificaram que a estabilidade operacional da enzima imobilizada foi maior que a da enzima livre e que a enzima imobilizada em grânulo compósito úmido pode ser mais adequada para aplicação industrial, uma vez que apresentou boa estabilidade de armazenamento.

Su e col. (2010) imobilizaram  $\beta$ -glicosidase (Fluka) em quitosana e observou que as propriedades da enzima imobilizada apresentaram algumas diferenças quando comparadas à enzima livre, tais como diminuição da temperatura ótima, estabilidades em pH e térmica aumentadas, maior afinidade pelo substrato e melhor estabilidade.

Na Tabela 4 observam-se os resultados obtidos em estudos realizados com diferentes técnicas de imobilização de enzimas. Ressalta-se que a quitosana foi um suporte que apresentou uma excelente taxa de imobilização para algumas enzimas.

A imobilização de  $\beta$ -glicosidase de soja e sua aplicação ainda não foi descrita na literatura. Assim, considerando a importância das isoflavonas agliconas para a saúde humana e que sua obtenção está relacionada com a  $\beta$ -glicosidase, a sua imobilização em quitosana foi investigada. A aplicação desta enzima imobilizada poderá melhorar o aspecto nutricional e agregar valor aos produtos de soja.

**Tabela 4** - Taxas de imobilização obtidas com diferentes suportes e enzimas.

| <b>Enzima imobilizada</b>          | <b>Suporte</b>      | <b>Taxa de imobilização (%)</b> | <b>Referência</b>                           |
|------------------------------------|---------------------|---------------------------------|---|
| $\beta$ -glicosidase               | $\alpha$ -alumina   | 15%                             | Martino et al.,<br>1996                     |
|                                    | $\gamma$ -alumina   | 15%                             |   |
|                                    | Celulose            | 18%                             |   |
|                                    | Eupergit C          | 30%                             | Tu et al., 2006                             |
|                                    | <i>Quitosana</i>    | 25,1%                           | Su et al., 2010                             |
|                                    | Alginato de sódio   | 31,4%                           |   |
| $\beta$ -galactosidase             | <i>Quitosana</i>    | 67,12%                          | Dwevedi;<br>Kayastha, 2009                  |
| Ciclodextrina-glicosil-transferase | <i>Quitosana</i>    | 88,6%                           | Rodrigues et al., 2002                      |
| Glucanase                          | Quitina             | 15%                             | Vaillant et al.,<br>2000                    |
|                                    | Nylon               | 8,1%                            |   |
| Pectinaliase                       | Quitina             | 25,6%                           | 2000  |
|                                    | Nylon               | 21,4%                           |   |
| Invertase                          | Bucha vegetal       | 0,428%                          | Poças et al.,<br>2004                       |
| Lipase                             | Fibra de coco verde | 63%                             | Pinheiro;<br>Brígida;<br>Gonçalves,<br>2005 |
| Peroxidase                         | <i>Quitosana</i>    | 98,4%                           | Monier et al.,<br>2010                      |
| Urease                             | Alginato            | 54,04%                          | Kumar;                                      |
|                                    | <i>Quitosana</i>    | 77%                             | Dwevedi;<br>Kayastha, 2009                  |

### 3.5 Planejamento Experimental

Segundo Rodrigues e Iemma (2009), a necessidade crescente da otimização de produtos e processos, minimizando custos e tempos, maximizando rendimento, produtividade e qualidade de produtos, dentre outros objetivos, tem levado profissionais de diferentes formações a buscarem técnicas sistemáticas de planejamento de experimentos.

O planejamento experimental é uma técnica que vem sendo usada em grande escala, com o objetivo de obter um modelo matemático apropriado para descrever um certo fenômeno, utilizando o mínimo possível de experimentos. O planejamento experimental permite eficiência e economia no processo experimental e o uso de métodos estatísticos na análise dos dados obtidos resulta em objetividade científica nas conclusões (CALADO; MONTGOMERY, 2003).

Segundo Calado e Montgomery (2003) os métodos básicos usados para realizar um eficiente planejamento experimental têm como objetivos a seleção do melhor modelo entre uma série de modelos plausíveis e a estimativa eficiente de parâmetros do modelo selecionado. Todo planejamento experimental começa com uma série inicial de experimentos, com o objetivo de definir as variáveis e os níveis importantes. Podem-se ter variáveis qualitativas (tipo de catalisador, tipo de equipamento, operador etc.) e quantitativas (temperatura, pressão, concentração, pH do meio etc.). Os resultados devem ser analisados e modificações pertinentes devem ser feitas no planejamento experimental. Antes de iniciar os experimentos, os objetivos e critérios devem estar bem claros, de modo a dar subsídios para a escolha das variáveis envolvidas nos experimentos, da faixa de variação das variáveis selecionadas, dos níveis escolhidos para essas variáveis, da variável de resposta e do planejamento experimental.

Quando inicia-se um trabalho com um número de variáveis superior a quatro, deve-se estabelecer uma estratégia sequencial dos experimentos (RODRIGUES; IEMMA, 2009). No planejamento experimental deve-se considerar o tamanho da amostra (número de repetições), a seleção de uma ordem de realização dos experimentos e dos métodos de análise dos resultados dos experimentos. Os métodos estatísticos são usados para guiar uma tomada de decisão objetiva (CALADO; MONTGOMERY, 2003).

Segundo Rodrigues e Iemma (2009) há vantagens na utilização do planejamento experimental, destacando-se a redução do número de experimentos ou repetições com melhoria da qualidade da informação obtida; a análise simultânea dos fatores;

a otimização de mais de uma resposta ao mesmo tempo e o cálculo e avaliação do erro experimental.

O planejamento experimental deve ser realizado conforme os objetivos do trabalho a ser executado (Tabela 5).

**Tabela 5** – Técnicas de planejamentos experimentais e respectivos objetivos.

| <b>Objetivo</b>                      | <b>Técnica</b>                                       |
|--------------------------------------|--|
| Triagem das variáveis                | Planejamentos fracionários                           |
| Avaliação da influência de variáveis | Planejamentos fatoriais completos                    |
| Construção de modelos empíricos      | Modelagem por mínimos quadrados                      |
| Otimização                           | Metodologia de superfície de resposta (MSR), simplex |

**Adaptado de:** Barros Neto, Scarminio e Bruns (2002)

Neste trabalho, para imobilizar a  $\beta$ -glicosidase, foram utilizadas as técnicas de planejamento fatoriais completos (delineamento composto central rotacional) e a MRS, estabelecendo a relação entre a resposta em taxa de imobilização e um conjunto de variáveis, como concentração de glutaraldeído, tempo de agitação, pH e teor de proteínas, com o objetivo de determinar as condições ótimas de imobilização de  $\beta$ -glicosidase de soja em quitosana.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 MATERIAL

#### 4.1.1 Matéria-Prima

Foram utilizados cotilédones da cultivar de soja BRS 213 desenvolvida na Fazenda Experimental da Embrapa Soja, Londrina, Paraná.

##### 4.1.1.1 Preparo da matéria-prima

Os grãos de soja foram submetidos a seleção prévia e separação mecânica das cascas, eixos embrionários e cotilédones. Os cotilédones foram moídos para obtenção de sua farinha.

#### 4.1.2 Reagentes

Foi utilizada quitosana de alta massa molecular em pó, com grau de desacetilação igual ou maior que 75%, da Sigma-Aldrich.

Os reagentes utilizados para a execução dos experimentos foram de pureza analítica de diferentes procedências comerciais.

### 4.2 MÉTODOS

#### 4.2.1 Determinação de Atividade de $\beta$ -glicosidase

Para determinar a atividade de  $\beta$ -glicosidase das amostras obtidas nas diferentes etapas do trabalho foi utilizado o substrato sintético  $p$ -nitrofenil- $\beta$ -D-glicopiranosídeo ( $p$ -NPG), conforme procedimento descrito por Matsuura e Obata (1993). Amostras foram centrifugadas e o sobrenadante foi analisado para atividade enzimática por transferência de 2 mL de  $p$ -NPG 1mM em tampão fosfato-citrato 0,1M, pH 5,0 para os tubos de ensaio, que permaneceram em banho-maria a 30°C por 10 min. Após este tempo, 0,5 mL do sobrenadante das amostras foram adicionados e colocados em banho-maria a 30°C por 30 min. A reação foi interrompida pela adição de 2,5 mL de carbonato de sódio 0,5 M. O  $p$ -

nitrofenol ( $\rho$ -NP) liberado na reação foi determinado pela coloração amarela, lida em espectrofotômetro a 420 nm. Uma curva de calibração de  $\rho$ -nitrofenol (20 - 160 mM) foi preparada previamente para determinar a atividade enzimática. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de  $\beta$ -glicosidases que liberou 1  $\mu$ M  $\rho$ -nitrofenol  $\text{min}^{-1}$  sob as condições experimentais.

#### 4.2.2 Determinação de Proteínas Solúveis

O teor de proteínas solúveis dos extratos foi quantificado pelo método de Lowry et al. (1951) utilizando solução padrão de albumina de soro bovino (BSA).

#### 4.2.3 Determinação de Atividade Específica de $\beta$ -glicosidase

A atividade específica foi definida como relação entre unidades de atividade da enzima (UA) e mg de proteínas, ou seja, UA  $\text{mg}^{-1}$  de proteínas.

### 4.3 OBTENÇÃO DE $\beta$ -GLICOSIDASE

#### 4.3.1 Extração

A extração da enzima foi realizada com farinha de cotilédones de soja e tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 6,6, na proporção de 1:10 (peso : volume), com agitação lenta por 1h a 4°C e posterior centrifugação a 4000 x g por 15 min, conforme Matsuura e Obata (1993). O sobrenadante obtido foi acidificado com HCl 0,1 M até pH 5,0 e novamente centrifugado nas mesmas condições. O sobrenadante ou extrato bruto (EB) foi utilizado como fonte de enzima para fracionamento com sulfato de amônio.

#### 4.3.2 Precipitação Fracionada de $\beta$ -glicosidase de Cotilédones de Soja com Sulfato de Amônio

O extrato bruto foi precipitado com sulfato de amônio a 4°C de 0 até 40% e de 40 a 85%, conforme Ribeiro (2006). Ao extrato bruto foi adicionado lentamente sulfato de amônio até atingir 40% de saturação e mantido em repouso a 4°C até completa precipitação. O material foi centrifugado a 4000 x g por 15 min a 4°C. Ao sobrenadante ( $S_{0-40}$ ) foi

adicionado lentamente o sulfato de amônio até atingir 85% de saturação mantido a 4°C. Após completa precipitação, o material foi centrifugado novamente nas mesmas condições. O precipitado obtido P<sub>40-85</sub> foi ressuspensão com tampão fosfato-citrato 50 mM pH 5,0 e dialisado contra o mesmo tampão. Aliquotas das frações obtidas, previamente dialisadas, foram utilizadas para determinação da atividade da enzima, do teor de proteína solúvel e suas atividades específicas, conforme descrito nos itens 4.2.1, 4.2.2 e 4.2.3. A fração com maior atividade específica de  $\beta$ -glicosidase foi imobilizada em quitosana.

#### 4.4 IMOBILIZAÇÃO DE B-GLICOSIDASE DE COTILÉDONES DE SOJA EM QUITOSANA

A  $\beta$ -glicosidase foi imobilizada em quitosana pelo método de ligação covalente cruzada utilizando glutaraldeído como agente bifuncional. Tanto as condições para ativação da quitosana com glutaraldeído como para imobilização da enzima foram analisadas e otimizadas com planejamentos fatoriais e metodologia de superfície de resposta.

##### 4.4.1 Preparo de Grânulos de Quitosana e sua Ativação com Glutaraldeído

Ensaio preliminares para obtenção dos grânulos de quitosana foram realizados utilizando soluções de 2 e 3%. Porém estes apresentaram-se instáveis, de fácil dissolução em água, sendo descartados para estudos posteriores.

Assim, uma solução de quitosana (1% p/v) foi preparada em água MilliQ com ácido acético 1,5% e aquecida em banho-maria a 60°C. Uma seringa, com extremidade envolvida em parafilme, foi preenchida com solução de KOH 1M a 37°C. Esta solução passou por um poro de 1mm de diâmetro no parafilme, sendo adicionada gota a gota sobre a solução de quitosana. Os grânulos obtidos, de aspecto branco opalescente e aproximadamente 5mm de diâmetro, foram imediatamente lavados e armazenados com água MilliQ a 4°C, até a etapa de ativação com glutaraldeído (KUMAR; DWEVEDI; KAYASTHA, 2009).

Os grânulos de quitosana foram ativados por incubação e agitação com glutaraldeído a 37°C. Estes foram armazenados em tampão TRIS-acetato 0,1M até serem utilizados. A influência da concentração de glutaraldeído (0 a 5%), do tempo de agitação/reposo durante as 8 h de incubação e do pH de lavagem (5 a 8) na taxa de imobilização da  $\beta$ -glicosidase foram avaliados por DCCR e metodologia de superfície de resposta.

#### 4.4.2 Condições Ótimas para Ativação da Quitosana com Glutaraldeído

Para otimizar as condições de ativação dos grânulos de quitosana com glutaraldeído foi utilizado o Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) 2<sup>3</sup>, incluindo 6 pontos axiais e triplicata no ponto central, totalizando 17 experimentos (Tabela 6). As variáveis independentes, X<sub>1</sub> (concentração de glutaraldeído), X<sub>2</sub> (pH) e X<sub>3</sub> (tempo de agitação/repouso) e seus níveis de variação estão apresentados na Tabela 6.

Para este planejamento, a variável dependente ou Y (resposta experimental) e  $\hat{Y}$  (resposta estimada) foram expressas em taxa de imobilização (%), que foi determinada pela relação entre a atividade específica da enzima imobilizada e a atividade específica da enzima solúvel multiplicada por 100. A atividade específica da enzima imobilizada foi determinada subtraindo a atividade específica durante a lavagem (enzima não-imobilizada) da atividade específica da enzima solúvel. As variáveis independentes e os níveis de variação foram selecionados em função de estudos preliminares e dados de literatura conforme Kumar, Dwevedi e Kayastha (2009).

$$\% \text{ de imobilização} = \frac{\text{atividade específica da enzima imobilizada}}{\text{atividade específica da enzima livre}} \times 100$$

Para análise de regressão e variância e superfície de resposta dos planejamentos foi utilizado o software Statistica 7.0 (Stat Soft, Inc.). As fórmulas gerais dos modelos de superfície de resposta foram expressas conforme a Equação 1.

$$\hat{Y} = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{22} X_2^2 + \beta_{33} X_3^2 + \beta_{12} X_1 X_2 + \beta_{13} X_1 X_3 + \beta_{23} X_2 X_3 + \varepsilon \quad (\text{Equação 1})$$

Onde:

$\hat{Y}$  = função-resposta estimada;

X<sub>1</sub>, X<sub>2</sub> e X<sub>3</sub> = níveis codificados das variáveis independentes;

$\beta$ 's = coeficientes codificados pelo modelo de superfície de resposta;

$\varepsilon$  = resíduo (erro experimental).

**Tabela 6** – Matriz dos ensaios do delineamento composto central rotacional (DCCR) para as variáveis independentes, com triplicata no ponto central.

| Experimentos | Codificado (real)    |                      |                      |
|--------------|----------------------|----------------------|----------------------|
|              | Glutaraldeído (%)    | pH                   | Tempo (h)            |
|              | $\times_1$ ( $X_1$ ) | $\times_2$ ( $X_2$ ) | $\times_3$ ( $X_3$ ) |
| 1            | -1 (1,7)             | -1 (5,5)             | -1 (2/6)             |
| 2            | +1 (4,2)             | -1 (5,5)             | -1 (2/6)             |
| 3            | -1 (1,7)             | +1 (7,5)             | -1 (2/6)             |
| 4            | +1 (4,2)             | +1 (7,5)             | -1 (2/6)             |
| 5            | -1 (1,7)             | -1 (5,5)             | +1 (6/2)             |
| 6            | +1 (4,2)             | -1 (5,5)             | +1 (6/2)             |
| 7            | <b>-1 (1,7)</b>      | <b>+1 (7,5)</b>      | <b>+1 (6/2)</b>      |
| 8            | +1 (4,2)             | +1 (7,5)             | +1 (6/2)             |
| 9            | <b>-1,68 (0)</b>     | <b>0 (6,5)</b>       | <b>0 (4/4)</b>       |
| 10           | +1,68 (5)            | 0 (6,5)              | 0 (4/4)              |
| 11           | 0 (2,5)              | -1,68 (5,0)          | 0 (4/4)              |
| 12           | 0 (2,5)              | +1,68 (8,0)          | 0 (4/4)              |
| 13           | 0 (2,5)              | 0 (6,5)              | -1,68 (0/8)          |
| 14           | 0 (2,5)              | 0 (6,5)              | +1,68 (8/0)          |
| 15           | 0 (2,5)              | 0 (6,5)              | 0 (4/4)              |
| 16           | 0 (2,5)              | 0 (6,5)              | 0 (4/4)              |
| 17           | 0 (2,5)              | 0 (6,5)              | 0 (4/4)              |

\*Tempo (h): tempo de agitação/tempo de repouso durante a ativação dos grânulos.

#### 4.4.3 Imobilização de $\beta$ -glicosidase nos Grânulos de Quitosana Ativados por Meio de Ligação Cruzada com Glutaraldeído

Para a imobilização da  $\beta$ -glicosidase em quitosana, os grânulos ativados foram incubados com 1 mL de solução enzimática (181,62 UA / mL) a 4°C sob leve agitação em agitador de plataforma basculante. Posteriormente, foram lavados com tampão TRIS-acetato 0,1M para remover a enzima não-imobilizada. Foram feitas determinações de atividade e teor de proteínas nos tampões de lavagem para posterior cálculo da taxa de imobilização (KUMAR; DWEVEDI; KAYASTHA, 2009).

A influência da relação entre o teor de proteínas e quantidade de suporte, do pH do tampão de lavagem e tempo de agitação por 20 h de incubação sobre a taxa de imobilização foi avaliada pela MSR.

#### 4.4.4 Condições Ótimas para Imobilização de $\beta$ -glicosidase

Para otimizar as condições de imobilização da  $\beta$ -glicosidase foi utilizado como planejamento experimental o Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR)  $2^3$ , conforme descrito para o planejamento 1 no item 4.4.2. As 3 variáveis independentes,  $X_1$  (teor de proteína/suporte),  $X_2$  (pH) e  $X_3$  (tempo de agitação/tempo de repouso) e os níveis de variação estão apresentados na Tabela 7. A variável dependente ou função resposta (Y) foi expressa como % de imobilização. Os dados deste delineamento foram analisados da mesma forma que o delineamento (1).

Após a análise dos resultados, experimentos em triplicata nas condições ótimas foram realizados para validação do modelo proposto.

**Tabela 7 -** Valores codificados e reais para as variáveis independentes do planejamento experimental  $2^3$  da etapa de otimização da imobilização da  $\beta$ -glicosidase de cotilédones de soja.

| Variáveis                | Código | Níveis |      |       |       |        |
|--------------------------|--------|--------|------|-------|-------|--------|
|                          |        | - 1,68 | - 1  | 0     | + 1   | + 1,68 |
| mg proteína / 4 grânulos | $X_1$  | 5,95   | 9,52 | 14,88 | 20,24 | 23,81  |
| pH                       | $X_2$  | 5      | 5,5  | 6,5   | 7,5   | 8      |
| Tempo (h)                | $X_3$  | 0/20   | 7/13 | 10/10 | 13/7  | 20/0   |

\*Tempo (h): tempo de agitação/tempo de repouso durante a imobilização da enzima.

#### 4.5 PROPRIEDADES BIOQUÍMICAS DA $\beta$ - GLICOSIDASE IMOBILIZADA

Foram determinados os valores de temperatura e pH ótimos, termoestabilidade,  $K_m$  e  $V_{m\acute{a}x}$  da  $\beta$ -glicosidase imobilizada.

##### 4.5.1 Determinação de Temperatura e pH Ótimos

Para a determinação de temperatura e pH ótimos foi utilizado como planejamento experimental o Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR)  $2^2$ , incluindo 4 pontos axiais e triplicata no ponto central, totalizando 11 experimentos (Tabela 8).

A temperatura variou de 25 a 75°C e o pH de 3,0 a 8,0. Foi incubado 800  $\mu$ L de p-NPG em tampão fosfato-citrato 0,1 M por 30 min com a  $\beta$ -glicosidase imobilizada. Os resultados foram expressos em porcentagem de atividade de  $\beta$ -glicosidase (atividade relativa) em função da temperatura e pH.

**Tabela 8 -** Matriz dos ensaios do delineamento composto central rotacional (DCCR) com as variáveis independentes e resposta experimental e estimada para os efeitos de pH e temperatura na taxa de imobilização (%).

| Experimentos | Codificado (real) |                 |
|--------------|-------------------|-----------------|
|              | pH                | T (°C)          |
|              | $\times_1$ (X1)   | $\times_2$ (X2) |
| 1            | -1 (4,0)          | -1 (35)         |
| 2            | -1 (4,0)          | +1 (65)         |
| 3            | +1 (7,0)          | -1 (35)         |
| 4            | +1 (7,0)          | +1 (65)         |
| 5            | -1,41 (3,0)       | 0 (50)          |
| 6            | +1,41 (8,0)       | 0 (50)          |
| 7            | 0 (5,5)           | -1,41 (25)      |
| 8            | 0 (5,5)           | +1,41 (75)      |
| 9            | 0 (5,5)           | 0 (50)          |
| 10           | 0 (5,5)           | 0 (50)          |
| 11           | 0 (5,5)           | 0 (50)          |

#### 4.5.2 Determinação da Termoestabilidade

Grânulos de quitosana com  $\beta$ -glicosidase imobilizada foram pré-incubados a 30, 50 e 70°C em tampão no pH ótimo durante 0, 5, 10, 15, 20, 30, 45, 60, 90, 120, 150, 180, 210 e 240 minutos. Os grânulos foram retirados do meio de incubação nos intervalos de tempo determinados e analisados quanto à atividade de  $\beta$ -glicosidase residual, utilizando o tampão no pH ótimo. A determinação de atividade foi realizada conforme item 4.2.1.

A termoestabilidade foi determinada plotando-se os valores da atividade  $\beta$ -glicosídica relativa versus o tempo de incubação.

#### 4.5.3 Determinação de $K_m$ e $V_{m\acute{a}x}$

Os valores de  $K_m$  e  $V_{m\acute{a}x}$  foram determinados pelo método de Lineweaver-Burk conforme descrito por Lehninger, Nelson e Cox (1995), em condições ótimas de temperatura e pH. Foram preparados tubos contendo p-NPG de 0,1 a 20 mM com concentração constante da enzima, ou seja, mesmo número de grânulos, e posteriormente foi medida a atividade de  $\beta$ -glicosidase expressa em  $\mu$ M p-NP/min conforme item 4.2.1, para determinar  $V_0$ . Tomando-se os valores de concentração e  $V_0$ , foi construído o gráfico de

Michaelis-Mentem. Os resultados foram transformados conforme Lineweaver-Burk, com os inversos dos valores das concentrações de substrato e  $V_0$ .

#### 4.5.4 Determinação da Estabilidade Operacional

Para determinar a estabilidade operacional da  $\beta$ -glicosidase imobilizada, dois grânulos foram incubados com 800  $\mu$ L de  $p$ -NPG 1 mM e analisados quanto à atividade residual nas condições ótimas de pH e temperatura, por usos consecutivos dos mesmos grânulos. Foi analisada a redução da atividade residual até o 13º ciclo plotando-se os valores da atividade de  $\beta$ -glicosidase relativa versus o número de ciclos utilizados nos ensaios.

#### 4.5.5 Efeito de Íons e Compostos Orgânicos

O efeito de íons e compostos orgânicos sobre a atividade da  $\beta$ -glicosidase imobilizada foi determinado pré-incubando dois grânulos com 0,20 mL de KCl,  $MgSO_4$ ,  $Na_2SO_4$ ,  $MnSO_4$ ,  $CaCl_2$ ,  $ZnSO_4$ ,  $MnCl_2$ , LiCl,  $LiSO_4$ ,  $CuCl_2$ ,  $CoCl_2$ ,  $Ni(NO_3)_2$ ,  $CuSO_4$ ,  $AgNO_3$ , sacarose, maltose, acetato de sódio, acetato de cobre II, glucona- $\delta$ -lactona, ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), tween 80, triton X-100, ácido tricloroacético, na concentração de 10 mM, exceto  $HgCl_2$ , para o qual testou-se as concentrações de 1, 5 e 10 mM, e glicose, de 1, 10, 50, 100 e 150 mM, a 50°C durante 30 minutos. O ensaio de atividade de  $\beta$ -glicosidase sem adição dessas substâncias foi considerado o controle e sua atividade definida como 100%. A determinação da atividade de  $\beta$ -glicosidase foi realizada conforme item 4.2.1 nas condições ótimas de pH e temperatura.

#### 4.6 APLICAÇÃO DE B-GLICOSIDAS E IMOBILIZADA EM EXTRATO AQUOSO DE SOJA

Os experimentos de aplicação de  $\beta$ -glicosidase imobilizada em extrato aquoso de soja (EAS) foram realizados com dois grânulos de quitosana com a enzima e 1 mL de EAS comercial diluído 1:2, em tempos de contato de 2 a 120 min, pH 5,5 e 50°C. Como controle, foi utilizado o extrato aquoso de soja sem adição dos grânulos.

A concentração de glicose foi determinada pelo método da glicose oxidase (Glicose-PP Analisa). Neste procedimento, a glicose liberada pela hidrólise de isoflavonas glicosídicas foi quantificada por espectrofotometria a 500 nm e o resultado expresso como aumento da taxa de glicose (%)/mL de EAS.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADLERCREUTZ, H. Epidemiology of phytoestrogens. **Baillière's Clinical Endocrinology and Metabolism**, v.12, n.4, p.605-623, 1998.
- AGUIAR, C. L. Isoflavonas de soja e propriedades biológicas. **B. CEPPA**, Curitiba, v.20, n.2, p.323-334, jul./dez. 2002.
- \_\_\_\_\_. **Transformações física e bioquímica de isoflavonas conjugadas de soja (*Glycine Max L.*) e o efeito na atividade biológica *in vitro***. 2004. Campinas, Tese (Doutorado em Ciências de Alimentos) – UNICAMP, Campinas.
- AGUIAR, C. L. et al. Transformações enzimáticas de flavonoides. **B. CEPPA**, Curitiba, v.25, n.1, p.61-76, jan./jun. 2007.
- AIRES-BARROS, M. R.; FERNANDES, P. Imobilização dos biocatalisadores. In: Gama, M; Aires-Barros, M. R.; Cabral, J. **Engenharia Enzimática**. Lisboa: Lidel, 2003.
- AKIYAMA, T.; KAKU, H.; SHIBUYA, N. Cell wall-bound fl-glucosidase from germinated Rice: purification and properties. **Phytochemistry**, v.48, n.1, p.49-54, 1998.
- AMORIM, R. V. S. et al. Chitosan from *Syncephalastrum racemosum* used as a film support for lipase immobilization. **Bioresource Technology**, v.89, p.35-39, 2003.
- ANDRES, A.; DONOVAN, A.; LUHLENSCHMIDT, M. S. Soy isoflavones and virus infections. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v.20, p.563–569, 2009.
- APROSOJA. **Alternativa alimentar dieta humana**. Disponível em: <<http://www.aprosoja.com.br/novosite/soja.php?tipo=1>>. Acesso em: 18 out 2010.
- ARNAUD, T. M. S.; BARROS NETO, B.; DINIZ, F. B. Chitosan effect on dental enamel de-remineralization: An in vitro evaluation. **Journal of Dentistry**, v.38, p.848-852, 2010.
- AZEVEDO, V. V. et al. Quitina e quitosana: aplicação como biomateriais. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**, v.2, n.3, p.27-34, 2007.
- BARBOSA, A. C. L. et al. Teores de isoflavonas e capacidade antioxidante da soja e produtos derivados. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.26, n.4, p.921-926, 2006.
- BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria**. 2ed. Campinas: Editora da UNICAMP, 2002. 401p.
- BERGER, J. et al. Structure and interactions in covalently and ionically crosslinked chitosan hydrogels for biomedical applications. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v.57, p.19–34, 2004.
- BETANCOR, L. et al. Different mechanisms of protein immobilization on glutaraldehyde activated supports: effect of support activation and immobilization conditions. **Enzyme and Microbial Technology**, v.39, p.877–882, 2006.

- BISSETT, F.; STERNBERG, D. Immobilization of *Aspergillus* beta-Glucosidase on chitosan. **Applied and Environmental Microbiology**, v.35, n.4, p.750-755, 1978.
- BRADY, D.; JORDAAN, J. Advances in enzyme immobilization. **Biotechnology Letters**, v.31, p.1639-1650, 2009.
- BORSATO, D. et al. Otimização das condições de obtenção de biodiesel de óleo de soja utilizando o delineamento experimental de mistura. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, v.31, n.1, p.3-13, 2010.
- BROUNS, F. Soya isoflavones: a new and promising ingredient for the health foods sector. **Food Research International**, v.35, p.187-193, 2002.
- CALADO, V.; MONTGOMERY, D. C. **Planejamento de experimentos usando o Statistica**. Rio de Janeiro: E-papers, 2003.
- CAMERON, R. G. et al. Purification and characterization of a beta-glucosidase from *Citrus sinensis* var. Valencia Fruit tissue. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.49, p.4457-4462, 2001.
- CANILHA, L. et al. Biocatalizadores imobilizados. Uso de células e enzimas imobilizadas em processos biotecnológicos. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, n.36, p.48-57, 2006.
- CAO, L. **Carrier-bound Immobilized Enzymes: Principles, Application and Design**. Weinheim: WILEY-VCH, 2005.
- CARRÃO-PANIZZI, M. C.; BORDINGNON, J. R. Activity of beta-glucosidase and levels of isoflavone glucosides in soybean cultivars affected by the environment. **Revista Agropecuária Brasileira**, v.35, n.5, p.873-878, mai. 2000.
- CARRÃO-PANIZZI, M. C.; GÓES-FAVONI, S. P.; KIKUCHI, A. Hydrothermal treatments in the development of isoflavone aglycones in soybean (*Glycine Max* (L.) Merrill) grains. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.47, n.2, 2004.
- CARRÃO-PANIZZI, M. C.; SIMÃO, A. S.; KIKUCHI, A. Efeitos de genótipos, ambientes e de tratamentos hidrotérmicos na concentração de isoflavonas agliconas em grãos de soja. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.38, n.8, p.897-902, 2003.
- CHANG, S. K. C. Isoflavones from soybeans and soy foods. In: Shi, J.; Mazza, G.; Maguer, M. L. **Functional Foods: Biochemical and Processing Aspects**. Ontario: CRC Press, 2002.
- CHANG, M.; JUANG, R. Use of chitosan-clay composite as immobilization support for improved activity and stability of  $\beta$ -glucosidase. **Biochemical Engineering Journal**, v.35, p.93-98, 2007.
- CHANG, S.; CHANG, S.; YEN, Y.; SHIEH, C. Optimum immobilization of *Candida rugosa* lipase on Celite by RSM. **Applied Clay Science**, v.37, p.67-73, 2007.
- COGO, C. **Soja: Tendência estável no curto prazo e alta no longo prazo**. Disponível em: [http://www.deere.com.br/pt\\_BR/ag/veja\\_mais/info\\_mercado/soy.html](http://www.deere.com.br/pt_BR/ag/veja_mais/info_mercado/soy.html). Acesso em: 18 out 2010.

- CONAB. **Acompanhamento de safra brasileira: grãos**, primeiro levantamento, outubro 2010. Brasília : Conab, 2010. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/9da1999de7b61ab5fd1be1226edfc45b.pdf>. Acesso em: out 2010.
- COELHO, M. A. Z.; SALGADO, A. M.; RIBEIRO, B. D. **Tecnologia enzimática**. Rio de Janeiro: EPUB, 2008.
- CZJZEK, M. et al. Crystal structure of a monocotyledon (maize ZMGlu1)  $\beta$ -glucosidase and a model of its complex with *p*-nitrophenyl  $\beta$ -D-thioglucoside. **Biochemical Journal**, v.354, p.37-46, 2001.
- DALLA NORA, T. **Comportamento de genótipos de soja aos nematóides formadores de galhas e a podridão vermelha da raiz**. 2007. Londrina, Dissertação (Mestrado em Agronomia) – UEL, Londrina.
- DALLA-VECCHIA, R.; NASCIMENTO, M. G.; SOLDI, V. Aplicações sintéticas de lipases imobilizadas em polímeros. **Química Nova**, v.27, n.4, p.623-630, 2004.
- DAMIAN, C. et al. Quitosana: um amino polissacarídeo com características funcionais. **Alimentos e Nutrição - Brazilian Journal of Food and Nutrition**, v.16, n.2, p.195-205, 2005.
- DUTTA, P. K. et al. Perspectives for chitosan based antimicrobial films in food application. **Food Chemistry**, v.114, p.1173-1182, 2009.
- DWEVEDI, A.; KAYASTHA, A. M. Optimal immobilization of  $\beta$ -galactosidase from Pea (PsBGAL) onto Sephadex and chitosan beads using response surface methodology and its applications. **Bioresource Technology**, v.100, p.2667-2675, 2009.
- EMBRAPA SOJA. **Cultivo da soja: a soja no Brasil**. Disponível em: <<http://www.cnpso.embrapa.br>>. Acesso em: mai. 2010.
- EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Disponível em: <<http://www.embrapa.br>> Acesso em: set/2010.
- ESEN, A.  **$\beta$ -glucosidase**. In: WHITAKER, J. R.; VORAGEN, A. G. J.; WONG, D. W. S. **Handbook of Food Enzymology**. New York: Marcel Dekker, 2003. 1108p.
- ESTEVES, E. A.; MONTEIRO, J. B. R. Efeitos benéficos das isoflavonas de soja em doenças crônicas. **Revista de Nutrição**, v.14, n.1, p.43-52, 2001.
- FARAJ, A.; VASANTHAN, T. Soybean isoflavones: effects of processing and health benefits. **Food Reviews International**, v.20, n.1, pp.51–75, 2004.
- FDA – FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. Food labeling: health claims, soy protein and coronary heart disease. **Federal Register**, v.64, 1999.
- FIA, G.; GIOVANI, G.; ROSI, I. Study of  $\beta$ -glucosidase production by wine-related yeasts during alcoholic fermentation. A new rapid fluorimetric method to determine enzymatic activity. **Journal of Applied Microbiology**, v.99, p.509-517, 2005.

GERARDI, C. et al. Purification and characterisation of a  $\beta$ -glucosidase abundantly expressed in ripe sweet cherry (*Prunus avium* L.) fruit. **Plant Science**, v.160, p.795–805, 2001.

GOMATHI, P. et al. Fabrication of novel chitosan nanofiber/gold nanoparticles composite towards improved performance for a cholesterol sensor. **Sensors and Actuators B: Chemical** (2010), doi: 10.1016/j.snb.2010.10.005.

GÓES-FAVONI, S. P.; CARRÃO-PANIZZI, M. C.; BELEIA, A. Changes of isoflavone in soybean cotyledons soaked in different volumes of water. **Food Chemistry**, v.119, p.1605–1612, 2010.

GÓES-FAVONI, S. P. **Desenvolvimento de Farinha de Soja [*Glycine Max* (L.) Merrill] com Maior Teor de Genisteína**. 2002. Londrina, Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – UEL, Londrina.

HAAN, R. D. et al. Hydrolysis and fermentation of amorphous cellulose by recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. **Metabolic Engineering**, v.9, p.87–94, 2007.

HAN, Y.; CHEN, H. Characterization of  $\beta$ -glucosidase from corn stover and its application in simultaneous saccharification and fermentation. **Bioresource Technology**, v.99, p.6081–6087, 2008.

HSIEH, M. C.; GRAHAM, T. L. Partial purification and characterization of a soybean beta-glucosidase with high specific activity towards isoflavone conjugates. **Phytochemistry**, v.58, p.995–1005, 2001.

HUANG, G. et al. Effects of genistein on oxidative injury in endothelial cells. **Journal of Nutritional Science and Vitaminology**, v.54, n.5, p.402-408, 2008.

HYMOWITZ, T. On the domestication of the soybean. **Economic Botany**, v.24, p.408-421, 1970.

HYMOWITZ, T.; SHURTLEFF, W. R. Debunking soybean myths and legends in the historical and popular literature. **Crop Science**, v.45, p.473-476, 2005.

ISHIHARA, M. et al. Content composition and antioxidant activity of isoflavones in commercial and homemade soymilk and tofu. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.87, p.2844–2852, 2007.

ISMAIL, B.; HAYES, K.  $\beta$ -glycosidase activity toward different glycosidic forms of isoflavones. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.53, p.4918-4924, 2005.

IZUMI, T. et al. Soy isoflavone aglycones are absorbed faster and in higher amounts than their glucosides in humans. **The Journal of Nutrition**, v.130, p.1695–1699, 2000.

KAO, T. H.; CHIEN, J. T.; CHEN, B. H. Extraction yield of isoflavones from soybean cake as affected by solvent and supercritical carbon dioxide. **Food Chemistry**, v.107, p.1728–1736, 2008.

KAUFMAN, P. B. et al. A Comparative survey of leguminous plants as sources. **The Journal of Alternative and Complementary Medicine**, v.3, n.1, p.7-12, 1997.

- KEUNG, W. M. Anti-dipsotropic isoflavones: the potential therapeutic agents for alcohol dependence. **Medicinal Research Reviews**, v.23, n.6, p.669-696, 2003.
- KNÈZEVIC, Z. D.; SILER-MARINKOVIC, S. S.; MOJOVIC, L. V. Immobilized lipases as practical catalysts. **APTEFF**, v.35, p.151-164, 2004.
- KUMAR, S.; DWEVEDI, A.; KAYASTHA, A. M. Immobilization of soybean (*Glycine max*) urease on alginate and chitosan beads showing improved stability: analytical applications. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic** v.58, p.138–145, 2009.
- KURZER, M. S.; XU, X. Dietary phytoestrogens. **Annual Review of Nutrition**, v.17, p.353-381, 1997.
- LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica**. 2ª Ed. São Paulo: Sarvier, 1995. 839p.
- LEPHART, E.D. et al. Neurobehavioral effects of dietary soy phytoestrogens. **Neurotoxicology and Teratology**, v.24, n.1, p.5-16, 2002.
- LEVIS, S. et al. Design and baseline characteristics of the Soy Phytoestrogens As Replacement Estrogen (SPARE) study — A clinical trial of the effects of soy isoflavones in menopausal women. **Contemporary Clinical Trials**, v.31, p.293–302, 2010.
- LI, Y. et al. Induction of apoptosis in breast cancer cells MDA-MB-231 by genistein. **Oncogene**, v.18, p.3166 – 3172, 1999.
- LIGGINS, J. et al. Daidzein and genistein contents of vegetables. **British Journal of Nutrition**, v.84, p.717-725, 2000.
- LIU, K. **Soybeans: chemistry, technology and utilization**. Nova Iorque: Chapman e Hall, ITP, 1997.
- LIU, Z.; KANJO, Y.; MIZUTANI, S. A review of phytoestrogens: Their occurrence and fate in the environment. **Water Research**, v.44, p.567–577, 2010.
- LOVATI, M.R. et al. Soy protein peptides regulate cholesterol homeostasis in Hep G2 cells. **Journal of Nutrition**, v.130, n.10, p.2543-2549, 2000.
- LOWRY, O. H. et al. Protein measurement with the folin phenol reagent. **Journal of Biology Chemistry**, v.193, p.265-275, 1951.
- MA, W. et al. Genistein as a neuroprotective antioxidant attenuates redox imbalance induced by  $\beta$ -amyloid peptides 25–35 in PC12 cells. **Int. J. Devl Neuroscience**, v.28, p.289-295, 2010.
- MAICAS, S.; MATEO, J. J. Hydrolysis of terpenyl glycosides in grape juice and other fruit juices: a review. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.67, p.322-335, 2005.
- MARTINO, A. et al. Immobilization of  $\beta$ -glucosidase from a commercial preparation. Part 1. A comparative study of natural supports. **Process Biochemistry**, v.31, n.3, p.281-285, 1996.

- MATEO, C. et al. Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. **Enzyme and Microbial Technology**, v.40, p.1451–1463, 2007.
- MATSUURA, M.; OBATA, A.  $\beta$ -glucosidases from soybeans hydrolyze daidzin and genistin. **Journal of Food Science**, v.58, n.1, p.144-147, 1993.
- MATSUURA, M.; OBATA, A.; FUKUSHIMA, D. Objectionable flavor of soy milk developed during the soaking of soybeans and its control. **Journal of Food Science**, v.54, n.3, p.602–605, 1989.
- MATSUURA, M.; SASAKI, J.; MURAO, S. Studies on  $\beta$ -glucosidases from soybean that hydrolyze daidzin and genistin: isolation and characterization of an isozyme. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v.59, p.1623–1627, 1995.
- MENDEL, M. T.; SUYENAGA, E. S. Farmacocinética das isoflavonas da soja. **Revista Conhecimento Online**, v.2, set. 2010. Disponível em: [www.feevale.br/revistaconhecimentoonline](http://www.feevale.br/revistaconhecimentoonline). Acesso em: out. 2010
- MENG, Q-E. et al. Incorporation of esterified soybean isoflavones with antioxidant activity into low density lipoprotein. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1438, p.369-376, 1999.
- MESSINA, M. J. **Soyfoods**: their role in disease prevention and treatment. In: LIU, K. Soybeans – Chemistry, Technology and Utilization. Nova Iorque: Chapman e Hall, ITP, 1997. p. 442-469.
- MESSINA, M. Soyfoods and soybean phyto-oestrogens (isoflavones) as possible alternatives to hormone replacement therapy (HRT). **European Journal of Cancer**, v.36, p.S71±S77, 2000.
- MIZUTANI, M. et al. Cloning of  $\beta$ -primeverosidase from tea leaves, a key enzyme in tea aroma formation. **Plant Physiology**, v.130, p.2164–2176, 2002.
- MOLTENI, A.; BRIZIO-MOLTENI, L.; PERSKY, V. In vitro hormonal effects of soybean isoflavones. **Journal of Nutrition**, v.125, n.3, p.751-756, 1995.
- MONIER, M. et al. A. Immobilization of horseradish peroxidase on modified chitosan beads. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.46, p.324-330, 2010.
- MORAES, R. M. A. et al. Caracterização bioquímica de linhagens de soja com alto teor de proteína. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.41, n.5, p.725-729, 2006.
- MORAES, C. S.; PASTORE, G. M.; SATO, H. H.; PARK, Y. K. **Isoflavonas de soja e suas atividades biológicas**. São Paulo: Varela, 2009.
- MORANT, A. V. et al.  $\beta$ -Glucosidases as detonators of plant chemical defense. **Phytochemistry**, v.69, p.1795–1813, 2008.
- MOUEDDEB, H. et al. M. Membrane bioreactor for lactic acid production. **Journal of Membrane Science**, v.114, p.59-71, 1996.
- NAGASHIMA, M. Continuous ethanol fermentation using immobilized yeast cells. **Biotechnology and Bioengineering**, v.21, p.49-58, 1984.

- NAM, K. H.; SUNG, M. W.; HWANG, K. Y. Structural insights into the substrate recognition properties of  $\beta$ -glucosidase. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.391, p.1131–1135, 2010.
- NELSON, J. M.; GRIFFIN, E. G. Adsorption of invertase. **Journal of American Chemical Society**, v.38, p.1109-1115, 1916.
- OLIVEIRA, I. R. W. Z.; VIEIRA, I. C. Construção e aplicação de biossensores usando diferentes procedimentos de imobilização da peroxidase de vegetal em matriz de quitosana. **Química Nova**, v.29, n.5, p.932-939, 2006.
- OPASSIRI, R. et al. Characterization of a rice  $\beta$ -glucosidase highly expressed in flower and germinating shoot. **Plant Science**, v.165, p.627-638, 2003.
- PARK, Y.K.; AGUIAR, C.L.; ALENCAR, S.M.; SCAMPARINI, A.R.P.; Biotransformação de isoflavonas de soja: aplicação da biotecnologia enzimática na conversão de isoflavonas com maior atividade biológica. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, v.20, p.12-14, 2001.
- PINHEIRO, A. D. T.; BRÍGIDA, A. I. S.; GONÇALVES, L. R. B. **Influência do pH no processo de imobilização de lipase em fibra da casca de coco verde**. In: VI Congresso Brasileiro de Engenharia Química em Iniciação Científica, 2005, UNICAMP. Disponível em: <<http://www.feq.unicamp.br/~cobeqic/tBT60.pdf>>. Acesso em: out/2010.
- POÇAS, E. C.; BUZATO, J. B.; CELLIGOI, M. A. P. C.; CAMILIOS NETO, D. Aplicação de bucha vegetal (*Luffa Cylindrica*) como suporte para produção de xarope de açúcar invertido. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, Londrina, v.25, n.1, p.53-58, 2004.
- PONTOH, J.; LOW, N. H. Purification and characterization of  $\beta$ -glucosidase from honey bees (*Apis mellifera*). **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v.32, p.679–690, 2002.
- POTTER, S.M. et al. Soy protein and isoflavones: their effects on blood lipids and bone density in postmenopausal women. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.68, n.6, p.1375S-1379S, 1998.
- PYO, Y.; LEE, T.; LEE, Y. Enrichment of bioactive isoflavones in soymilk fermented with  $\beta$ -glucosidase-producing lactic acid bacteria. **Food Research International**, v.38, p.551–559, 2005.
- RIBEIRO, M. L. L. **Teor de isoflavonas e atividade de  $\beta$ -glucosidase em grãos de soja germinada e de diferentes grupos de maturação**. Purificação e caracterização bioquímica parcial da  $\beta$ -glucosidase. 2006. Londrina, Tese (Doutorado em Ciências de Alimentos) – UEL, Londrina.
- RIBEIRO, M. L. L. et al.  $\beta$ -glucosidase activity and isoflavone content in germinated soybean radicles and cotyledons. **Journal of Food Biochemistry**, v.30, p.453-465, 2006.
- RIMBACH, G. et al. Dietary isoflavones in the prevention of cardiovascular disease – A molecular perspective. **Food and Chemical Toxicology**, v.46, p.1308–1319, 2008.
- RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. **Planejamento de experimentos e otimização de processos**. Campinas, SP: Cárita, 2009.

RODRIGUES, R. M. O. et al. Imobilização de ciclodextrina-glicosil-transferase por ligação covalente com hexametilenodiamônio e glutaraldeído. In: XI Encontro Anual de Iniciação Científica, 2002, Maringá. Disponível em: <[http://www.ppg.uem.br/Docs/pes/eaic/XI\\_EAIC/trabalhos/arquivos/11-0364-0.pdf](http://www.ppg.uem.br/Docs/pes/eaic/XI_EAIC/trabalhos/arquivos/11-0364-0.pdf)>. Acesso em: out/2010.

SANTOS, R. F. **Purificação, caracterização e aplicação de  $\beta$ -glicosidase de cotilédones de soja**. 2010. Londrina, Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – UEL, Londrina.

SARACINO, M. A.; RAGGI, M. A. Analysis of soy isoflavone plasma levels using HPLC with coulometric detection in postmenopausal women. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.53, p.682-687, 2010.

SETCHELL, K. D. Absorption and metabolism of soy isoflavones – from food to dietary supplements and adults to infants. **The Journal of Nutrition**, v.130, p.654S-655S, 2000.

SETCHELL, K. D. Phytoestrogens: the biochemistry, physiology, and implications for human health of soy isoflavones. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.68, p.1333S-46S, 1998.

SIMÕES, K. **Caracterização do eliciador do fungo *Mucor ramosissimus* e estudo da supressão de sua atividade indutora em soja por fragmentos de polissacarídeos pécticos**. 2004. Campinas, Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Estrutural) – UNICAMP, Campinas.

SOUSA-MUÑOZ, R. L.; FILIZOLA, R. G. Efficacy of soy isoflavones for depressive symptoms of the climacteric syndrome. **Maturitas**, v.63, p.89–93, 2009.

SU, E. et al. Immobilization of  $\beta$ -glucosidase and its aroma-increasing effect on tea beverage. **Food and Bioproducts Processing**, v.88, n.(2-3), p.83-89, 2010.

SUE, M.; ISHIHARA, A.; IWAMURA, H. Purification and characterization of a  $\beta$ -glucosidase from rye (*Secale cereale* L.) seedlings. **Plant Science**, v.155, p.67–74, 2000.

TIAN, L.; PANG, Y.; DIXON, R. A. Biosynthesis and genetic engineering of proanthocyanidins and (iso)flavonoids. **Phytochemistry Reviews**, v.7, p.445–465, 2008.

TU, M. et al. Immobilization of *b*-glucosidase on Eupergit C for lignocellulose hydrolysis. **Biotechnology Letters**, v.28, p.151–156, 2006.

VAILLANT, F.; MILLAN, A.; MILLAN, P.; DORNIER, M.; DECLoux, M.; REYNES, M. Co-immobilized pectinlyase and endocellulase on chitin and nylon supports. **Process Biochemistry**, v.35, p.989–996, 2000.

VIEIRA, L. H. L. et al. Efeitos da isoflavona e dos estrogênios conjugados equinos sobre a qualidade de vida na pós-menopausa. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v.29, n.5, p.248-252, 2007.

VILLELA, S. M. **Imobilização de lacase e seu uso na biotransformação de efluentes de indústrias papeleiras**. 2006. Florianópolis, Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – UFSC, Santa Catarina.

XIAO, C. W. Health effects of soy protein and isoflavones in humans. **The Journal of Nutrition**, v.138, n.6, p.1244S-1249S, jun. 2008.

YI, S.; NOH, J.; LEE, Y. Amino acid modified chitosan beads: improved polymers supports for immobilization of lipase from *Candida rugosa*. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.57, p.123–129, 2009.

YU, H.; XU, J.; LU, W.; LIN, G. Identification, purification and characterization of  $\beta$ -glucosidase from apple seed as a novel catalyst for synthesis of *O*-glucosides. **Enzyme and Microbial Technology**, v.40, p.354–361, 2007.

WILKENS, W.F.; HACKLER, L.R. Effect of processing conditions on the composition of soy milk. **Cereal Chemistry**, v.46, n.4, p.391-397, 1969.

WILLIAMS, J.P.; JORDAN, S.E.; BARNES, S.;BLAIR, H. Tyrosine kinase inhibitor effects on avian osteoclastic acid transport. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.68(suppl), p.1369S–1374S, 1998.

ZABORSKY, O. R. **Immobilized enzymes**. Ohio: CRC Press, 1974.

ZHAO, X. S.; BAO, X. Y.; GUO, W.; LEE, F. Y. Immobilizing catalysts on porous materials. **Materials Today**, v.9, n.3, p.32-39, 2006.

## **5 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Os resultados obtidos estão redigidos na forma de artigo científico e de trabalhos apresentados em eventos científicos.

### **5.1 ARTIGO CIENTÍFICO**

O artigo “Imobilização de  $\beta$ -glicosidase de soja em quitosana, caracterização bioquímica e aplicação” será submetido à revista Química Nova.

### **5.2 TRABALHOS APRESENTADOS EM EVENTOS CIENTÍFICOS**

### 5.3 ARTIGO CIENTÍFICO

O artigo “Imobilização de  $\beta$ -glicosidase de soja em quitosana, caracterização bioquímica e aplicação” será submetido à revista Química Nova. As normas para publicação estão anexadas após o artigo.

## **IMOBILIZAÇÃO DE $\beta$ -GLICOSIDASE DE SOJA EM QUITOSANA, CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E APLICAÇÃO**

Luciana Carvalho Grade<sup>1</sup>, Caio Ferreira de Oliveira<sup>1</sup>, Virgínia Prezzi Santos<sup>1</sup>, Amanda Medeiros Orcioli<sup>1</sup>, Mara Lúcia Luiz Ribeiro<sup>1\*</sup>

### **Immobilization of $\beta$ -glucosidase from soybean on chitosan, biochemical characterization and application**

#### **ABSTRACT**

$\beta$ -glucosidase from soybean was immobilized on chitosan activated by glutaraldehyde. Immobilized  $\beta$ -glucosidase was studied in terms of pH, temperature, kinetic parameters and thermal stability with the substrate  $p$ -nitrophenyl- $\beta$ -D-glucopyranoside. The optimum pH and temperature for activity was 5.5 and 50 °C. The  $K_M$  value indicated that immobilization process reduced the enzyme-substrate affinity; immobilized  $\beta$ -glucosidase showed good operational stability, was activated by  $MnCl_2$  and  $MnSO_4$  and applied in aqueous extract of soybean to obtain a product with higher content of isoflavone aglycones. After 120 min of incubation, the glucose content showed an increase of 48%, directly proportional to the release of aglycones.

**Keywords:**  $\beta$ -glucosidase. Immobilization. Chitosan.

---

<sup>1</sup> Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, Departamento de Bioquímica e Biotecnologia, Universidade Estadual de Londrina. Caixa Postal 6001, CEP 86.051-990, Londrina-PR-Brasil

\* Autor para correspondência: Tel/fax: 55 (43) 3371-4270  
E-mail: [maraluciaribeiro@uel.br](mailto:maraluciaribeiro@uel.br)

## INTRODUÇÃO

As  $\beta$ -glicosidases ( $\beta$ -D-glicosídeo glicohidrolase, EC 3.2.1.21) formam um grupo heterogêneo de enzimas que hidrolisam a ligação  $\beta$ -glicosídica de oligossacarídeos e outros conjugados glicosídicos, liberando uma aglicona e glicose. São amplamente distribuídas na natureza, podendo ser sintetizadas por plantas, microrganismos e animais. Estas enzimas hidrolisam as isoflavonas  $\beta$ -glicosídicas presentes na soja (genistina, daidzina e glicitina) e liberam as isoflavonas agliconas (genisteína, daidzeína e gliciteína) os quais são descritos devido a possíveis ações benéficas na saúde humana como anti-carcinogênica, redução do risco de câncer de próstata, cólon e mama,<sup>1</sup> melhora da memória,<sup>2</sup> diminuição do colesterol sérico e triglicérides,<sup>3</sup> redução da dependência de álcool,<sup>4</sup> prevenção de doenças cardiovasculares,<sup>5</sup> atividade antiviral,<sup>6</sup> atividade estrogênica,<sup>7</sup> manutenção da densidade óssea,<sup>8</sup> atividade antioxidante<sup>9</sup> e redução dos sintomas indesejáveis da menopausa.<sup>8</sup>

Considerando que o teor de isoflavonas agliconas na soja é de 2%,<sup>10</sup> a aplicação de  $\beta$ -glicosidase em produtos de soja pode ser viável para aumentar o teor destas isoflavonas. Entretanto, a utilização de enzima livre em um processo é dispendioso, sem a recuperação desta. A utilização de enzimas imobilizadas é uma estratégia promissora para a condução de bioprocessos contínuos, pois pode melhorar a eficiência de processos biotecnológicos, reduzindo os custos de produção<sup>11</sup> por aumentar a estabilidade e facilitar a separação do produto de reação.<sup>12,13</sup>

Os materiais utilizados como suportes na imobilização devem, preferencialmente, ser encontrados com facilidade e abundância, ter baixo custo, facilidade de operação em grande escala, capacidade de retenção e resistência mecânica para uma longa vida operacional.<sup>14,11</sup> A quitosana é considerada um suporte adequado para imobilização de enzimas por ser biocompatível, disponível de diversas formas (gel, membrana, fibra e filme), atóxico, resistente a modificações químicas e biodegradável.<sup>15,16</sup> Além disso, a quitosana tem

sido utilizada para imobilização de diversas enzimas, apresentando ótimos resultados, principalmente quando ativada pelo reagente bifuncional glutaraldeído.<sup>17,18,19,13</sup>

Entretanto, existem algumas dificuldades relacionadas à imobilização de enzimas, uma vez que há diversas variáveis envolvidas e devem ser controladas, como concentração, tempo, pH, entre outras, o que implica na necessidade de grande número de experimentos e prolongado tempo de otimização. Neste contexto, o planejamento experimental é uma técnica que permite eficiência e economia do processo com o uso de ferramentas estatísticas para explorar e entender uma gama crescente de dados e informações originadas de um sistema. A utilização do planejamento fatorial completo tem sido uma alternativa para esta questão. Em um planejamento fatorial são investigadas simultaneamente as influências de todas as variáveis experimentais de interesse e os efeitos de interação nas respostas resultando em objetividade científica nas conclusões.<sup>20</sup>

Assim, considerando a importância da aplicação de  $\beta$ -glicosidase no aumento do teor de isoflavonas agliconas, o objetivo deste trabalho foi determinar as melhores condições para a imobilização de  $\beta$ -glicosidase de soja em quitosana, caracterizar a enzima imobilizada e aplicá-la em extrato aquoso de soja, para obtenção de um produto com teor elevado de isoflavonas agliconas.

## **PARTE EXPERIMENTAL**

### **Materiais**

Foram utilizados cotilédones da cultivar de soja BRS 213 desenvolvida pela Embrapa Soja, Londrina, Paraná; quitosana de alta massa molecular em pó, com grau de

desacetilação igual ou maior que 75%, adquirida da Sigma-Aldrich e reagentes de pureza analítica de diferentes procedências comerciais.

## **Métodos**

### *Determinação de Atividade de $\beta$ -glicosidase e de Proteínas Solúveis*

A atividade de  $\beta$ -glicosidase foi determinada utilizando o substrato sintético  $p$ -nitrofenil- $\beta$ -D-glicopiranosídeo ( $p$ -NPG), conforme descrito por Matsuura e Obata.<sup>21</sup> Uma unidade de atividade de  $\beta$ -glicosidase foi definida como a quantidade de enzima que liberou 1  $\mu$ M  $p$ -NP  $\text{min}^{-1}$ , nas condições experimentais.

O teor de proteínas solúveis foi quantificado pelo método de Lowry et al.<sup>22</sup> utilizando solução padrão de albumina de soro bovino (BSA) (40-400  $\mu\text{g/mL}$ ).

### *Determinação de Atividade Específica de $\beta$ -glicosidase*

A atividade específica de  $\beta$ -glicosidase foi definida pela relação entre unidades de atividade da enzima (UA) e mg de proteínas, ou seja, UA  $\text{mg}^{-1}$  de proteínas.

### *Extração e Fracionamento de $\beta$ -glicosidase*

A extração da enzima foi realizada conforme metodologia descrita por Matsuura e Obata.<sup>21</sup> O extrato bruto (EB) foi utilizado como fonte de enzima para fracionamento com sulfato de amônio de 0 a 40% e de 40 a 85% de saturação, conforme Ribeiro.<sup>23</sup> Após diálise das frações, foram determinados a atividade de  $\beta$ -glicosidase e o teor

de proteínas solúveis. A fração denominada de P<sub>40-85</sub> com elevada atividade de  $\beta$ -glicosidase foi utilizada para imobilização em quitosana.

#### *Preparo de Grânulos de Quitosana*

O preparo dos grânulos de quitosana foi realizado segundo Kumar, Dwevedi e Kayastha.<sup>24</sup>

#### *Ativação de Quitosana com Glutaraldeído*

Os grânulos de quitosana foram ativados por incubação com glutaraldeído a 37°C sob agitação, durante 8 horas, sendo lavados e armazenados em tampão TRIS-acetato 0,1M até serem utilizados.

#### *Otimização da Ativação da Quitosana com Glutaraldeído*

Para determinar as melhores condições de ativação dos grânulos de quitosana com glutaraldeído foi utilizado o Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) 2<sup>3</sup> com três variáveis independentes, seis pontos axiais e triplicata no ponto central, totalizando 17 experimentos, com posterior avaliação por metodologia de superfície de resposta (MSR).

Os níveis das variáveis independentes, X<sub>1</sub> (concentração de glutaraldeído), X<sub>2</sub> (pH) e X<sub>3</sub> (tempo de agitação/tempo de repouso) foram selecionados com base na literatura<sup>24,25,26,27,13</sup> e os ensaios foram realizados aleatoriamente e em triplicata.

A variável dependente ou função resposta (Y) foi expressa em taxa de imobilização (%) da  $\beta$ -glicosidase, que foi determinada pela relação entre a atividade específica da enzima imobilizada e a atividade específica da enzima solúvel multiplicada por 100. A atividade específica da enzima imobilizada foi determinada subtraindo a atividade específica durante a lavagem (enzima não-imobilizada) da atividade específica da enzima solúvel. O modelo proposto foi expresso conforme a Equação 1.

$$\hat{Y} = \beta_0 + \beta_1 \times_1 + \beta_2 \times_2 + \beta_3 \times_3 + \beta_{11} \times_1^2 + \beta_{22} \times_2^2 + \beta_{33} \times_3^2 + \beta_{12} \times_1 \times_2 + \beta_{13} \times_1 \times_3 + \beta_{23} \times_2 \times_3 + \varepsilon$$

(Equação 1)

Onde:

$\hat{Y}$  = função-resposta estimada;

$\times_1, \times_2$  e  $\times_3$  = níveis codificados das variáveis independentes;

$\beta$ 's = coeficientes codificados pelo modelo de superfície de resposta;

$\varepsilon$  = resíduo (erro experimental).

A Tabela 1 apresenta a matriz do DCCR com seus níveis de variação, respostas experimentais (Y) e estimada ( $\hat{Y}$ ), expressas como taxa de imobilização de  $\beta$ -glicosidase (%).

#### *Imobilização de $\beta$ -glicosidase nos Grânulos de Quitosana Ativados com Glutaraldeído*

Para a imobilização da  $\beta$ -glicosidase, os grânulos de quitosana ativados foram incubados com 1 mL de solução enzimática (181,62 UA / mL) por 20 horas a 4°C, sob leve agitação em agitador de plataforma basculante. Posteriormente, estes foram lavados com tampão TRIS-acetato 0,1M para remover a enzima não-imobilizada.<sup>24</sup> A influência da relação

entre o teor de proteínas e a quantidade de suporte, do pH do tampão de lavagem e do tempo de agitação/tempo de repouso por 20 h de incubação sobre a taxa de imobilização foi avaliada pela MSR.

#### *Otimização da Imobilização de $\beta$ -glicosidase*

Para determinar as condições ótimas de imobilização da  $\beta$ -glicosidase foi utilizado o DCCR 2<sup>3</sup> com três variáveis independentes, seis pontos axiais e triplicata no ponto central, totalizando 17 experimentos. Os níveis das variáveis independentes,  $X_1$  (teor de proteína/suporte),  $X_2$  (pH) e  $X_3$  (tempo de agitação/tempo de repouso) foram selecionados com base na literatura.<sup>25,26,27,13</sup> A função resposta (Y) foi expressa em taxa de imobilização (%) e o modelo proposto foi expresso conforme a equação 1.

A Tabela 2 apresenta a matriz do DCCR com seus níveis de variação, respostas experimentais (Y) e estimada ( $\hat{Y}$ ), expressas como taxa de imobilização de  $\beta$ -glicosidase (%).

#### *Análises estatísticas*

Para análise de regressão e variância (ANOVA), curvas de contorno e mapas de superfície de resposta foi utilizado o software Statistica 7.0 (Stat Soft, Inc.). Os resultados foram expressos como média com nível de confiança de 95%.

#### *Caracterização da $\beta$ - glicosidase Imobilizada*

Foram determinados os valores de temperatura e pH ótimos, termoestabilidade,  $K_m$  e  $V_{m\acute{a}x}$  da  $\beta$ -glicosidase imobilizada para verificar a influência da imobilização na atividade catalítica da enzima.

### *Determinação de Temperatura e pH Ótimos*

Para a determinação de temperatura e pH ótimos, foi utilizado o DCCR 2<sup>2</sup> com duas variáveis independentes, quatro pontos axiais e triplicata no ponto central, totalizando 11 experimentos (Tabela 3). Os níveis das variáveis independentes  $X_1$  (pH) e  $X_2$  (temperatura) foram selecionados com base na literatura<sup>23</sup> e os ensaios foram realizados aleatoriamente e em triplicata. Foram incubados 800  $\mu$ L de  $\rho$ -NPG em tampão fosfato-citrato 0,1 M por 30 min com a  $\beta$ -glicosidase imobilizada. A atividade de  $\beta$ -glicosidase foi estimada conforme Matsuura e Obata<sup>21</sup> e os resultados expressos em porcentagem de atividade em relação ao controle.

### *Determinação da Termoestabilidade*

A  $\beta$ -glicosidase imobilizada foi pré-incubada a 30, 50 e 70°C em tampão no pH ótimo até 240 min e os grânulos foram retirados do meio de incubação em diferentes intervalos de tempo. Os resultados de atividade de  $\beta$ -glicosidase foram expressos em porcentagem de atividade em relação ao controle.

### *Determinação dos parâmetros cinéticos*

Os valores de  $K_m$  e  $V_{m\acute{a}x}$  foram determinados pelo método de Lineweaver-Burk conforme descrito por Lehninger, Nelson e Cox,<sup>28</sup> em condições ótimas de temperatura e pH. Foi utilizado  $\rho$ -NPG de 0,1 a 20 mM incubado com concentração constante da enzima (dois grânulos de quitosana com enzima imobilizada) e a atividade de  $\beta$ -glicosidase foi expressa em  $\mu$ M  $\rho$ -NP/min.

### *Determinação da Estabilidade Operacional*

Os grânulos de quitosana com enzima imobilizada foram analisados quanto à atividade de  $\beta$ -glicosidase residual, utilizando o tampão fosfato-citrato 0,1 M pH 5,5, a 50°C por 30 min, por 13 usos consecutivos da enzima imobilizada.

### *Efeito de Íons e Compostos Orgânicos*

O efeito de íons e compostos orgânicos na atividade da  $\beta$ -glicosidase imobilizada foi determinado nas condições ótimas de pH e temperatura. A  $\beta$ -glicosidase imobilizada foi incubada por 30 min em tampão fosfato citrato 0,1 M pH 5,5, com adição dos sais acetato de sódio, acetato de cobre II, KCl, MgSO<sub>4</sub>, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, MnSO<sub>4</sub>, CaCl<sub>2</sub>, ZnSO<sub>4</sub>, MnCl<sub>2</sub>, LiCl, LiSO<sub>4</sub>, CuCl<sub>2</sub>, CoCl<sub>2</sub>, Ni(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, CuSO<sub>4</sub>, AgNO<sub>3</sub> na concentração de 10 mM, exceto HgCl<sub>2</sub>, que foi testado nas concentrações de 1, 5 e 10 mM. Os compostos orgânicos sacarose, maltose, glucona- $\delta$ -lactona, ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), tween 80, triton X-100 e ácido tricloroacético foram adicionados na concentração de 10 mM. A glicose foi testada nas concentrações de 1, 10, 50, 100 e 150 mM. O ensaio de atividade de  $\beta$ -glicosidase sem adição dessas substâncias foi considerado o controle e sua atividade definida como 100%.

### *Aplicação de $\beta$ -glicosidase Imobilizada em Extrato Aquoso de Soja*

Os experimentos de aplicação de  $\beta$ -glicosidase imobilizada em extrato aquoso de soja foram realizados incubando-se dois grânulos de quitosana com enzima

imobilizada com 1 mL de EAS comercial diluído 1:2 em frascos com capacidade para 7 mL em banho-maria a 50°C. O contato da enzima imobilizada com o EAS foi interrompido nos tempos de 2 a 120 min e posteriormente foi determinado o teor de glicose, sendo os ensaios realizados em triplicata.

#### *Determinação Quantitativa de Glicose*

A glicose liberada após aplicação da enzima imobilizada em EAS foi determinada pelo método da glicose oxidase.<sup>29</sup> Neste procedimento, a glicose liberada pela hidrólise de isoflavonas glicosídicas foi quantificada por espectrofotometria a 500 nm e o resultado expresso como aumento da taxa de glicose (%)/mL de EAS em relação ao tempo zero.

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

#### *Preparo dos Grânulos de Quitosana*

Grânulos de quitosana 1% foram utilizados nos experimentos, uma vez que testes preliminares realizados utilizando quitosana 2 e 3% não apresentaram bons resultados. Os grânulos obtidos apresentavam aspecto branco opalescente e aproximadamente 5 mm de diâmetro.

#### *Otimização da Ativação da Quitosana (DCCR 2<sup>3</sup>)*

Na Tabela 1 observa-se as respostas experimentais (Y) e estimadas ( $\hat{Y}$ ) pelo modelo de avaliação da concentração de glutaraldeído, pH e tempo de agitação durante a ativação na taxa de imobilização de  $\beta$ -glicosidase.

O melhor resultado obtido para taxa de imobilização de  $\beta$ -glicosidase foi igual a 41,55%, nas seguintes condições: glutaraldeído 1,7% ( $X_1 = -1$ ), pH de 7,5 ( $X_2 = +1$ ) e agitação de 6h, com 2h de repouso ( $X_3 = +1$ ). Kumar e col.<sup>24</sup> obtiveram uma taxa de imobilização de urease de aproximadamente 65%, utilizando glutaraldeído 1%. Chang e Juang<sup>27</sup> imobilizaram 48,2% de  $\beta$ -glicosidase de amêndoas com glutaraldeído 0,5%, enquanto Dwevedi e col.<sup>18</sup> observaram uma eficiência máxima de imobilização de  $\beta$ -galactosidase de 67,12% com glutaraldeído 1%, utilizando processo de otimização. Ocorre diferença nessas taxas porque a imobilização depende da enzima empregada e do tipo de interação estabelecido entre o suporte e a enzima.

A concentração de glutaraldeído ( $X_1$ ), o pH ( $X_2$ ) e o tempo de agitação/tempo de repouso ( $X_3$ ) apresentaram efeitos lineares significativos, ou seja, valor  $P < 0,05$ . A interação entre pH e concentração de glutaraldeído também foi significativa. Quanto à concentração de glutaraldeído, quando esta aumenta, a quantidade de grupos aldeídos livres na superfície do suporte também aumenta. No entanto, quando esta concentração é muito aumentada, o excesso de ligações cruzadas podem causar agregação, precipitação, distorção na estrutura tridimensional da enzima e causar diminuição da atividade.<sup>30</sup>

O pH pode variar a quantidade de grupos amino na superfície da quitosana, nos quais o glutaraldeído se liga, sendo importante durante a imobilização.<sup>18</sup>

A agitação foi significativa ( $p \leq 0,05$ ) e é importante no processo de ativação do suporte, pois proporciona o seu movimento, favorecendo o contato do glutaraldeído com o grânulo de quitosana. Esta variável foi padronizada em 8h de agitação para ativação da

quitosana após análise da superfície de resposta (Figura 1). Os valores positivos dos coeficientes dos efeitos lineares de pH (7,38), glutaraldeído (4,61) e tempo de agitação (2,09) indicam que o processo de imobilização de  $\beta$ -glicosidase foi favorecido por estas variáveis nesta etapa.

O modelo apresentou regressão significativa em nível de 95% de confiança, pois  $F_{\text{calculado}}$  da interação (177,38) e das variáveis significativas ( $X_1$ , 329,06;  $X_2$ , 845,35;  $X_3$ , 67,98) foram superiores ao  $F_{\text{tabelado}}$  (12,71), com  $R^2$  igual a 0,86, evidenciando que o modelo explicou 85% da variação dos dados experimentais. Assim, um modelo matemático foi desenvolvido usando as variáveis preditivas codificadas para as respostas significativas  $X_1$ ,  $X_2$  e  $X_3$ . O modelo que melhor representa a taxa de imobilização contém somente as variáveis codificadas significativas e interações significativas (Equação 2).

$$\hat{Y} = 25,48 + 4,61 \times_1 - 2,92 \times_1^2 + 7,38 \times_2 + 2,75 \times_2^2 + 2,09 \times_3 - 4,42 \times_1 \times_2 \text{ (Equação 2)}$$

Na Figura 1 observa-se o efeito do pH, da concentração de glutaraldeído e do tempo de agitação/tempo de repouso na ativação da quitosana com o glutaraldeído, o que reflete na taxa de imobilização da enzima. Observa-se que há uma região ótima para taxa de imobilização quando ocorre a interação entre estas variáveis, sendo esta preferencial em relação a um resultado pontual.<sup>31</sup>

Para as combinações de pH e concentração de glutaraldeído os intervalos foram de 7,5 – 8,5 e 1,7 – 4% (Figura 1A). Em relação a glutaraldeído e tempo de agitação, estes foram de 1,7 – 4% e 7 – 8 h. Quando a variável glutaraldeído foi empregada em condições mínimas (Tabela 1, ensaio 9) a taxa de imobilização da enzima foi 14,5 vezes inferior à obtida no ensaio 7 (41,55%).

Assim, para ativar a quitosana com glutaraldeído foram selecionados os valores de pH de 7,5, glutaraldeído 2,5% e 8 h de agitação após a análise das superfícies de resposta obtidas.

#### *Otimização da Imobilização da $\beta$ -glicosidase*

Após a escolha de parâmetros para a etapa de ativação da quitosana (glutaraldeído 2,5%, pH 7,5 e 8 h de agitação), foram avaliadas as condições de imobilização da  $\beta$ -glicosidase utilizando os parâmetros mg de proteína/4 grânulos ( $X_1$ ), pH ( $X_2$ ) e tempo de agitação/repouso (h) durante a ligação da enzima ao suporte ativado ( $X_3$ ).

Na Tabela 2 observa-se as respostas experimentais (Y) e estimadas ( $\hat{Y}$ ) pelo modelo de avaliação da concentração de glutaraldeído, pH e tempo de agitação/tempo de repouso durante a ativação na taxa de imobilização de  $\beta$ -glicosidase.

O melhor resultado obtido foi igual a 73,75%, nas seguintes condições: pH 7,5; agitação por 7 h mais 13 h de repouso e teor de proteínas de 20,24 mg (ensaio 4). O teor de proteínas, pH e tempo de agitação durante o processo de imobilização foram significativos para a taxa de imobilização (%), pois seus efeitos lineares apresentaram valor  $P < 0,05$ .

O pH da solução pode influenciar a quantidade de enzima ligada ao suporte e na sua atividade relativa por alterar as cargas elétricas do suporte.<sup>30</sup>

O modelo apresentou regressão significativa em nível de 95% de confiança, pois  $F_{\text{calculado}}$  das variáveis significativas ( $X_1$ , 186,82;  $X_2$ , 137,19;  $X_3$ , 227,98) foram superiores ao  $F_{\text{tabelado}}$  (12,71), com  $R^2$  igual a 0,77316. O modelo matemático, obtido por meio da regressão dos dados experimentais, está apresentado na Equação 3, contendo apenas variáveis codificadas significativas e interações significativas.

$$\hat{Y} = 54,62 + 9,34 \times_1 - 3,71 \times_1^2 + 8,01 \times_2 - 11,02 \times_2^2 - 10,32 \times_3 \quad (\text{Equação 3})$$

A partir destes resultados foi possível construir as curvas de contorno (Figura 2), sendo que para as combinações de pH e teor de proteínas (Figura 2A) os intervalos observados foram 6,5 – 7,5 e 14 – 26 mg. Em relação a pH e tempo de agitação, os intervalos foram de 6,0 – 8,0 e de 0 a 12 h de agitação (Figura 2B).

Quando o teor de proteínas foi empregado em condições mínimas (Tabela 2, ensaio 5), a taxa de imobilização da  $\beta$ -glicosidase foi aproximadamente 6,5 vezes inferior à obtida no ensaio 4 (73,75%).

Portanto, para a imobilização de  $\beta$ -glicosidase em quitosana ativada com glutaraldeído foram selecionados os valores de 7 h de agitação somadas a 13 h de repouso, pH 6,5 e 23,81 mg de proteínas / 4 grânulos.

A taxa de imobilização de  $\beta$ -glicosidase de cotilédones de soja em quitosana obtida neste trabalho foi superior às relatadas para outras enzimas em estudos utilizando quitosana e outros suportes, como  $\alpha$  e  $\gamma$ -alumina (15%) e celulose (18%),<sup>32</sup> Eupergit C (30%),<sup>33</sup> quitosana (25,1%) e alginato de sódio (31,4%).<sup>13</sup> Os resultados foram satisfatórios, obtendo-se uma taxa máxima de 73,75% nas condições selecionadas neste estudo.

#### *Determinação de Temperatura e pH Ótimos da $\beta$ -glicosidase Imobilizada*

A influência da temperatura e do pH na atividade da  $\beta$ -glicosidase imobilizada foi analisada utilizando o planejamento experimental DCCR 2<sup>2</sup> e a superfície de resposta (Figura 3). Observou-se que a faixa de temperatura ótima foi de 30 a 50 °C e a faixa de pH ótimo de 3,5 a 6,5.

Como a  $\beta$ -glicosidase possui dois ácidos carboxílicos envolvidos na sua atividade catalítica,<sup>34</sup> esta deve estar desprotonada para exercer sua função e isto ocorre com maior facilidade quando o meio encontra-se menos ácido, ou seja, a melhor escolha neste caso é o pH 5,5. A temperatura de 50°C e pH 5,5 foram utilizados para determinação de termoestabilidade,  $K_m$ ,  $V_{m\acute{a}x}$ , estabilidade operacional e efeitos de íons, açúcares e compostos orgânicos sobre a atividade da  $\beta$ -glicosidase imobilizada.

#### *Termoestabilidade da $\beta$ -glicosidase Imobilizada*

A estabilidade térmica de  $\beta$ -glicosidase imobilizada foi investigada por meio de sua atividade residual em relação ao controle em pH 5,5, após manutenção da enzima em diferentes tempos e temperaturas de incubação (Figura 4).

A  $\beta$ -glicosidase imobilizada apresentou um tempo de meia-vida de 60 min na temperatura ótima (50°C) e de 3 h a 30°C. Em temperatura de 70°C a enzima imobilizada apresentou redução de cerca de 77% de sua atividade após 5 min de incubação. As perdas de atividade da enzima imobilizada foram menores que as perdas da enzima livre, pois a 50°C, enquanto a  $\beta$ -glicosidase livre perdeu 91% da atividade após 20 min de incubação,<sup>23</sup> a  $\beta$ -glicosidase imobilizada perdeu 87% após 4 h de incubação.

#### *Efeito da Concentração de $\rho$ -NPG na Atividade de $\beta$ -glicosidase Imobilizada*

A velocidade de reação da  $\beta$ -glicosidase imobilizada foi determinada em função da concentração do substrato sintético  $\rho$ -NPG em pH 5,5 a 50°C. Os valores das constantes cinéticas da  $\beta$ -glicosidase imobilizada foram determinados e esta apresentou  $K_m$  de 0,49 mM e  $V_{m\acute{a}x}$  de 1,12  $\mu$ M de  $\rho$ -NP/min, enquanto a  $\beta$ -glicosidase livre apresentou  $K_m$  de

0,16 mM e  $V_{\text{máx}}$  de 4,3  $\mu\text{M}$  de p-NP/ min.<sup>23</sup> Estes valores indicam uma redução de afinidade da  $\beta$ -glicosidase pelo substrato, na forma imobilizada.

Esse comportamento depende do método de imobilização e ocorre devido à interação entre enzima e suporte, a qual pode ocasionar mudanças conformacionais que afetam a função catalítica, impedimento estérico do suporte que dificulta o acesso do substrato ao sítio ativo da enzima e as propriedades do suporte, como sua natureza hidrofílica ou hidrofóbica, ou a presença de cargas fixas que afetam o modo de ação da enzima.<sup>35</sup>

#### *Estabilidade Operacional da $\beta$ -glicosidase Imobilizada*

A possibilidade de reutilização da  $\beta$ -glicosidase imobilizada foi analisada durante uma sequência de 13 ciclos, por meio de aplicação sucessiva da mesma enzima imobilizada sobre o p-NPG. Na Figura 5 observa-se a perda de atividade a cada ciclo de reutilização do grânulo. Após 13 ciclos de reutilização dos grânulos, a enzima imobilizada perdeu 75% da sua atividade e sua meia-vida foi de aproximadamente sete ciclos. Estes resultados evidenciam que o processo de imobilização proporcionou estabilidade operacional à enzima.

#### *Efeito de Íons e Compostos Orgânicos (aplicabilidade)*

A  $\beta$ -glicosidase imobilizada foi incubada na presença de diversos íons, açúcares e outros compostos orgânicos e a atividade  $\beta$ -glicosídica residual sobre p-NPG foi determinada. Os resultados obtidos estão demonstrados na Figura 6.

O efeito de diversos íons sobre a atividade da  $\beta$ -glicosidase imobilizada pode ser observado na Figura 6A. Os íons  $\text{Ca}^{+2}$  e  $\text{K}^{+}$  aumentaram ligeiramente o rendimento da reação, o que foi descrito por Wang et al.<sup>36</sup> e, no caso do  $\text{Ca}^{+2}$  este é um ponto favorável,

pois a enzima pode ser utilizada para hidrólise de lactose, no intuito de diminuir os efeitos deste açúcar em indivíduos que apresentam intolerância à lactose.<sup>37</sup>

O  $\text{ZnSO}_4$  não influenciou a atividade da  $\beta$ -glicosidase imobilizada neste estudo. O ânion  $\text{SO}_4^-$  aumentou a atividade da enzima, exceto na forma de  $\text{Li}_2\text{SO}_4$ . O  $\text{LiCl}$ ,  $\text{CoCl}_2$  e  $\text{CuSO}_4$  apresentaram efeito inibitório sobre a enzima. O  $\text{CuCl}_2$  teve um efeito inibitório de 51% na atividade de  $\beta$ -glicosidase e o  $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2$  inibiu 44% da atividade enzimática, pois os íons  $\text{Ni}^{+2}$  e  $\text{Cu}^{+2}$  complexam com grupamentos amino presentes na estrutura da enzima. Com a adição de  $\text{AgNO}_3$  e  $\text{HgCl}_2$  observou-se um efeito inibitório na atividade de  $\beta$ -glicosidase, o que pode ser explicado pela interação dos cátions  $\text{Ag}^+$  e  $\text{Hg}^{+2}$  com a cisteína, formando um complexo insolúvel com enxofre, enquanto outros íons formam complexos solúveis.<sup>38</sup> A inibição por  $\text{Ag}^+$  e  $\text{Hg}^{+2}$  sugere que o grupo sulfidrilado pode ter um papel fundamental na atividade de  $\beta$ -glicosidase.<sup>39</sup>

O acetato de sódio não exerceu influência na atividade da  $\beta$ -glicosidase imobilizada, enquanto o acetato de cobre II inibiu em 47% a atividade.

O  $\text{MnCl}_2$  e  $\text{MnSO}_4$  aumentaram a atividade de  $\beta$ -glicosidase em 93 e 88%, respectivamente. O fato de o  $\text{Mn}^{+2}$  poder ser um efetor positivo pode estar relacionado com o sítio ativo da enzima. Esen<sup>40</sup> sugere que este cátion divalente pode ser necessário para a atividade da enzima, por estar presente na estrutura cristalizada da mirosinase ( $\beta$ -s-glicosidase). A atividade da enzima foi aumentada na presença de  $\text{Mg}^{+2}$  (27%) e  $\text{Na}^+$  (67%), o que também foi observado por Wang et al.<sup>36</sup>

Entre os compostos orgânicos (Figura 6B), a glucona- $\delta$ -lactona tem sido descrita na literatura como forte inibidor de  $\beta$ -glicosidase de várias fontes vegetais,<sup>39,41,21</sup> inibindo 65% da atividade da enzima imobilizada, sendo que na forma livre a inibição foi de 94%.<sup>42</sup> O EDTA inibiu apenas cerca de 8% da atividade de  $\beta$ -glicosidase imobilizada. A não inibição pelo EDTA mostra que a enzima não depende de um cofator metálico em seu sítio

ativo, porém, a baixa inibição pode estar relacionada com uma possível alteração das cargas dos aminoácidos do sítio ativo por este composto orgânico.<sup>43</sup>

O tween-80 e o triton X-100 não afetaram a atividade da enzima e o ácido tricloroacético reduziu 15% da atividade.

Entre os açúcares (Figura 6C), a sacarose e a maltose não exerceram efeito sobre a atividade da enzima e a glicose teve efeito inibitório sobre a atividade de  $\beta$ -glicosidase. A atividade residual da  $\beta$ -glicosidase imobilizada diminuiu quando incubada com concentrações crescentes de glicose, que variou de 1 a 150 mM. Assim, a glicose é um inibidor competitivo da  $\beta$ -glicosidase e esta enzima pode ser inibida pelos produtos formados após a sua ação.<sup>44</sup>

Segundo Esen,<sup>40</sup> as  $\beta$ -glicosidases são inibidas por açúcares análogos como a glucona- $\delta$ -lactona, substratos glicosídicos análogos e agliconas livres dos seus substratos, sendo distintos os locais de ligação no sítio ativo de agliconas e gliconas. A compreensão da inibição ou ativação da  $\beta$ -glicosidase por diferentes compostos é fundamental para sua aplicação em alimentos, uma vez que a matéria-prima é complexa e pode conter substâncias que inibem sua atividade.<sup>42</sup>

#### *Aplicação da $\beta$ -glicosidase Imobilizada em Extrato Aquoso de Soja*

Os experimentos de aplicação de  $\beta$ -glicosidase imobilizada em EAS foram realizados a 50°C, com interrupção da incubação da enzima com EAS nos tempos de 2 a 120 minutos. O teor de glicose foi determinado pelo método de glicose oxidase<sup>29</sup> e o aumento deste teor pode ser observado na Tabela 4.

Após 120 min de incubação, o teor de glicose apresentou um aumento de aproximadamente 48%, sendo este aumento diretamente proporcional à liberação de

isoflavonas agliconas. Santos<sup>42</sup> observou um aumento de 50% na liberação de glicose após 4 a 6 h de incubação de  $\beta$ -glicosidase livre parcialmente purificada em farinha de soja integral. Assim, a taxa de liberação de isoflavonas agliconas com o emprego da enzima imobilizada em apenas 2 h foi similar à taxa obtida com enzima livre após 4 a 6 h, sendo a enzima imobilizada mais eficiente.

## CONCLUSÕES

A imobilização da  $\beta$ -glicosidase de cotilédones de soja em quitosana foi satisfatória e a aplicação em derivados  $\beta$ -glicosídicos como  $\rho$ -NPG resulta em liberação de glicose, o que indica indiretamente que ocorre a liberação de agliconas a partir da hidrólise de conjugados glicosídicos. As condições de ativação da quitosana com glutaraldeído e a imobilização da  $\beta$ -glicosidase foram estabelecidas por meio de planejamentos fatoriais, melhorando a imobilização da enzima. O valor de  $K_m$  da  $\beta$ -glicosidase imobilizada indica alteração da afinidade da enzima pelo substrato. A estabilidade térmica foi superior à observada pela enzima livre, além de apresentar meia vida de sete ciclos. Pode ser inibida por  $HgCl_2$  e glucona- $\delta$ -lactona e ativada por  $MnCl_2$  e  $MnSO_4$ .

A aplicação de  $\beta$ -glicosidase imobilizada em extrato aquoso de soja comercial mostrou-se eficiente na liberação de glicose, o que indica indiretamente que a mesma foi eficiente na liberação de isoflavonas agliconas, benéficas à saúde humana.

## AGRADECIMENTOS

À CAPES pela concessão de bolsa e Fundação Araucária pelo apoio financeiro.

## REFERENCIAS

1. Liggins, J.; Bluck, L. J. C.; Runswick, S.; Atkinson, C.; W. A. Coward, W. A.; Bingham, S. A. *Br. J. Nutr.* **2000**, *84*, 717.
2. Lephart, E.D.; West, T.W.; Weber, K.S.; Rhees, R.W.; Setchell, K.D.R.; Adlercreutz, H.; Lund, T.D. *Neurotoxicol. Teratol.* 2002, *24*, 1, 5.
3. Lovati, M.R.; Manzoni, C.; Gianazza, E.; Arnoldi, A.; Kurowska, E.; Carroll, K.K.; Sirtori, C.R. *J. Nutr.* **2000**, *130*, 10, 2543.
4. Keung, W. M. *Med. Res. Rev.* **2003**, *23*, 6, 669.
5. Rimbach, G.; Boesch-Saadatmandi, C.; Frank, J.; Fuchs, D.; Wenzel, U.; Daniel, H.; Hall, W. L.; Weinberg, P. D. *Food Chem. Toxicol.* **2008**, *46*, 1308.
6. Andres, A.; Donovan, A.; Luhlenschmidt, M. S. *J. Nutr. Biochem.* **2009**, *20*, 563.
7. Liu, Z.; Kanjo, Y.; Mizutani, S. *Water Res.* **2010**, *44*, 567.
8. Levis, S.; Strickman-Stein, N.; Doerge, D. R.; Krischer, J. *Contemp. Clin. Trials* **2010**, *31*, 293.
9. Ma, W.; Yuan, L.; Yu, H.; Ding, B.; Xi, Y.; Feng, J.; Xiao, R. *Int. J. Dev. Neurosci.* **2010**, *28*, 289.
10. Ribeiro, M. L. L.; Mandarino, J.M.G.; Carrão-Panizzi, M. C.; de Oliveira, M. C. N.; Campo, C. B. H.; Nepomuceno, A. L.; Ida, E. I. *J. Food Compos. Anal.* **2007**, *20*, 19.
11. Canilha, L.; Carvalho, W.; Almeida E Silva, J. B. *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento* **2006**, *36*, 48.
12. Chang, S.; Chang, S.; Yen, Y.; Shieh, C. *Appl. Clay Sci.* **2007**, *37*, 67.
13. Su, E.; Xia, T.; Gao, L.; Dai, Q.; Zhang, Z. *Food and Bioproducts Processing* **2010**, *88*, (2-3), 83.
14. Nagashima, M. *Biotechnol. Bioeng.* **1984**, *21*, 49.
15. Yi, S.; Noh, J.; Lee, Y. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2009**, *57*, 123.
16. Gomathi, P.; Ragupathy, D.; Choi, J. H.; Yeum, J. H.; Lee, S. C.; Kim, J. C.; Lee, S. H.; Ghim, H. D. *Sens. Actuators, B* (**2010**), doi: 10.1016/j.snb.2010.10.005.
17. [http://www.ppg.uem.br/Docs/pes/eaic/XI\\_EAIC/trabalhos/arquivos/11-0364-0.pdf](http://www.ppg.uem.br/Docs/pes/eaic/XI_EAIC/trabalhos/arquivos/11-0364-0.pdf), acessada em Outubro 2010.
18. Dwevedi, A.; Kayastha, A. M. *Bioresour. Technol.* **2009**, *100*, 2667.

19. Monier, M.; Ayad, D. M.; Wei, Y.; Sarhan, A. A. *Int. J. Biol. Macromol.* **2010**, *46*, 324.
20. Calado, V.; Montgomery, D. C. *Planejamento de experimentos usando o Statistica*. Rio de Janeiro: E-papers, 2003.
21. Matsuura, M.; Obata, A. *J. Food Sci.* **1993**, *58*, 1, 144.
22. Lowry, O. H.; Rosenbrough, N. J.; Farr, A. L.; Randal, R. J. *J. Biol. Chem.* **1951**, *193*, 265.
23. Ribeiro, M. L. L. *Tese de Doutorado*, Universidade Estadual de Londrina, Brasil, 2006.
24. Kumar, S.; Dwevedi, A.; Kayastha, A. M. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2009**, *58*, 138.
25. Bissett, F.; Sternberg, D. *Appl. Environ. Microbiol.* **1978**, *35*, 4, 750.
26. Wolosowska, S.; Synowiecki, J. *Food Chem.* **2004**, *85*, 181.
27. Chang, M.; Juang, R. *Biochem. Eng. J.* **2007**, *35*, 93.
28. Lehninger, A. L.; Nelson, D. L.; Cox, M. M. *Princípios de Bioquímica*. 2ª Ed. São Paulo: Sarvier, 1995.
29. Trinder, P. *Ann. Clin. Biochem.* **1969**, *6*, 24.
30. Hua, F.; Jun, H.; Liyun, D.; Mingtian, L.; Zhao, C. *Journal of Wuhan University of Technology-Mater. Sci. Ed.* **2009**, *24*, 1, 42.
31. Rodrigues, M. I.; Iemma, A. F. *Planejamento de experimentos e otimização de processos*. Campinas, SP: Cárita, 2009.
32. Martino, A.; Durante, M.; Pifferi, P. G.; Spagna, G.; Bianchi, G. *Process Biochem.* **1996**, *31*, 3, 281.
33. Tu, M.; Zhang, X.; Kurabi, A.; Gilkes, N.; Mabee, W.; Saddler, J. *Biotechnol. Lett.* **2006**, *28*, 151.
34. Nam, K. H.; Sung, M. W.; Hwang, K. Y. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2010**, *391*, 1131.
35. Simões, A. S.; Mori, R. Y.; Faria, R.; Castro, H. F. *Quím. Nova* **2011**, *34*, 1, 33.
36. Wang, W.; Li, C. Q.; Hu, X. L. *Biol. Plant.* **2009**, *53*, 1, 138.
37. Pessela, B. C.Ch.; Mateo, C.; Fuentes, M.; Vian, A.; García, J. L.; Carrascosa, A. V.; Guisán, J. M.; Fernández-Lafuente, R. *Enzyme Microb. Technol.* **2003**, *33*, 199.
38. Esen, A. *Plant Physiol.* **1992**, *98*, 174.

39. Hsieh, M. C.; Graham, T. L. *Phytochemistry* **2001**, *58*, 995.
40. Esen, A.  *$\beta$ -glucosidase*. In: Whitaker, J. R.; Voragen, A. G. J.; Wong, D. W. S. *Handbook of Food Enzymology*. New York: Marcel Dekker, 2003. 1108p.
41. Cameron, R. G.; Manthey, J. A.; Baker, R. A.; Grohmann, K. J. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49*, 4457.
42. Santos, R. F. *Dissertação de Mestrado*, Universidade Estadual de Londrina, Brasil, 2010.
43. Harnpicharnchai, P.; Champreda, V.; Sornlake, W.; Eurwilaichitr, L. *Protein Expression Purif.* **2009**, *67*, 61.
44. Sonia, K. G.; Chadha, B. S.; Badhan, A. K.; Saini, H. S.; Bhat, M. K. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **2008**, *24*, 599.

**Tabela 1** – Matriz dos ensaios do delineamento composto central rotacional (DCCR) com as variáveis independentes e resposta experimental e estimada para a ativação de quitosana pelo glutaraldeído.

| Experimentos | Codificado (real)            |                              |                              |              | Taxa de imobilização (%) |  |
|--------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|--------------|--------------------------|--|
|              | Glutaraldeído (%)            | pH                           | Tempo de ativação (h)        | Y            | Ŷ                        |  |
|              | $\times_1$ (X <sub>1</sub> ) | $\times_2$ (X <sub>2</sub> ) | $\times_3$ (X <sub>3</sub> ) |              |                          |  |
| 1            | -1 (1,7)                     | -1 (5,5)                     | -1 (2/6)                     | 10,59        | 6,82                     |  |
| 2            | +1 (4,2)                     | -1 (5,5)                     | -1 (2/6)                     | 22,70        | 24,86                    |  |
| 3            | -1 (1,7)                     | +1 (7,5)                     | -1 (2/6)                     | 32,66        | 30,42                    |  |
| 4            | +1 (4,2)                     | +1 (7,5)                     | -1 (2/6)                     | 39,10        | 30,78                    |  |
| 5            | -1 (1,7)                     | -1 (5,5)                     | +1 (6/2)                     | 12,19        | 11,00                    |  |
| 6            | +1 (4,2)                     | -1 (5,5)                     | +1 (6/2)                     | 32,56        | 29,04                    |  |
| 7            | <b>-1 (1,7)</b>              | <b>+1 (7,5)</b>              | <b>+1 (6/2)</b>              | <b>41,55</b> | <b>34,60</b>             |  |
| 8            | +1 (4,2)                     | +1 (7,5)                     | +1 (6/2)                     | 32,26        | 34,96                    |  |
| 9            | <b>-1,68 (0)</b>             | <b>0 (6,5)</b>               | <b>0 (4/4)</b>               | <b>3,62</b>  | <b>9,51</b>              |  |
| 10           | +1,68 (5)                    | 0 (6,5)                      | 0 (4/4)                      | 23,39        | 24,97                    |  |
| 11           | 0 (2,5)                      | -1,68 (5,0)                  | 0 (4/4)                      | 11,88        | 13,08                    |  |
| 12           | 0 (2,5)                      | +1,68 (8,0)                  | 0 (4/4)                      | 31,64        | 37,88                    |  |
| 13           | 0 (2,5)                      | 0 (6,5)                      | -1,68 (0/8)                  | 25,03        | 29,73                    |  |
| 14           | 0 (2,5)                      | 0 (6,5)                      | +1,68 (8/0)                  | 33,99        | 36,75                    |  |
| 15           | 0 (2,5)                      | 0 (6,5)                      | 0 (4/4)                      | 24,92        | 25,48                    |  |
| 16           | 0 (2,5)                      | 0 (6,5)                      | 0 (4/4)                      | 26,06        | 25,48                    |  |
| 17           | 0 (2,5)                      | 0 (6,5)                      | 0 (4/4)                      | 26,78        | 25,48                    |  |

\* Y (resposta experimental) e Ŷ (resposta estimada) do DCCR utilizando as variáveis X<sub>1</sub> (concentração de glutaraldeído), X<sub>2</sub> (pH) e X<sub>3</sub> (tempo de agitação durante a ativação).

\*\* Tempo de ativação (h): agitação/repouso.

**Tabela 2** – Matriz dos ensaios do delineamento composto central rotacional (DCCR) com as variáveis independentes e resposta experimental e estimada para a imobilização de  $\beta$ -glicosidase em quitosana.

| Experimentos | Codificado (real)          |                  |                         | Taxa de          |              |
|--------------|----------------------------|------------------|-------------------------|------------------|--------------|
|              | mg proteína/ 4<br>grânulos | pH               | Tempo de ligação<br>(h) | imobilização (%) |              |
|              | $\times_1 (X_1)$           | $\times_2 (X_2)$ | $\times_3 (X_3)$        | Y*               | $\hat{Y}$    |
| 1            | -1 (9,52)                  | -1 (5,5)         | -1 (7)                  | 32,60            | 32,86        |
| 2            | +1 (20,24)                 | -1 (5,5)         | -1 (7)                  | 53,48            | 51,54        |
| 3            | -1 (9,52)                  | +1 (7,5)         | -1 (7)                  | 70,27            | 48,88        |
| <b>4</b>     | <b>+1 (20,24)</b>          | <b>+1 (7,5)</b>  | <b>-1 (7)</b>           | <b>73,75</b>     | <b>67,56</b> |
| <b>5</b>     | <b>-1 (9,52)</b>           | <b>-1 (5,5)</b>  | <b>+1 (13)</b>          | <b>11,46</b>     | <b>12,22</b> |
| 6            | +1 (20,24)                 | -1 (5,5)         | +1 (13)                 | 20,64            | 30,9         |
| 7            | -1 (9,52)                  | +1 (7,5)         | +1 (13)                 | 22,90            | 28,24        |
| 8            | +1 (20,24)                 | +1 (7,5)         | +1 (13)                 | 45,37            | 46,92        |
| 9            | -1,68 (5,95)               | 0 (6,5)          | 0 (10)                  | 17,57            | 28,46        |
| 10           | +1,68 (23,81)              | 0 (6,5)          | 0 (10)                  | 60,15            | 59,84        |
| 11           | 0 (14,88)                  | -1,68 (5,0)      | 0 (10)                  | 13,65            | 10,06        |
| 12           | 0 (14,88)                  | +1,68 (8,0)      | 0 (10)                  | 22,72            | 36,97        |
| 13           | 0 (14,88)                  | 0 (6,5)          | -1,68 (0)               | 46,10            | 71,95        |
| 14           | 0 (14,88)                  | 0 (6,5)          | +1,68 (20)              | 39,41            | 37,28        |
| 15           | 0 (14,88)                  | 0 (6,5)          | 0 (10)                  | 55,33            | 54,62        |
| 16           | 0 (14,88)                  | 0 (6,5)          | 0 (10)                  | 57,70            | 54,62        |
| 17           | 0 (14,88)                  | 0 (6,5)          | 0 (10)                  | 52,65            | 54,62        |

\* Y (resposta experimental) e  $\hat{Y}$  (resposta estimada) do DCCR utilizando as variáveis  $X_1$  (concentração de glutaraldeído),  $X_2$  (pH) e  $X_3$  (tempo de agitação durante a imobilização).

\*\* Tempo de ligação (h): agitação/repouso.

**Tabela 3** - Matriz dos ensaios do delineamento composto central rotacional (DCCR) com as variáveis independentes e resposta experimental e estimada para os efeitos de pH e temperatura na taxa de imobilização (%).

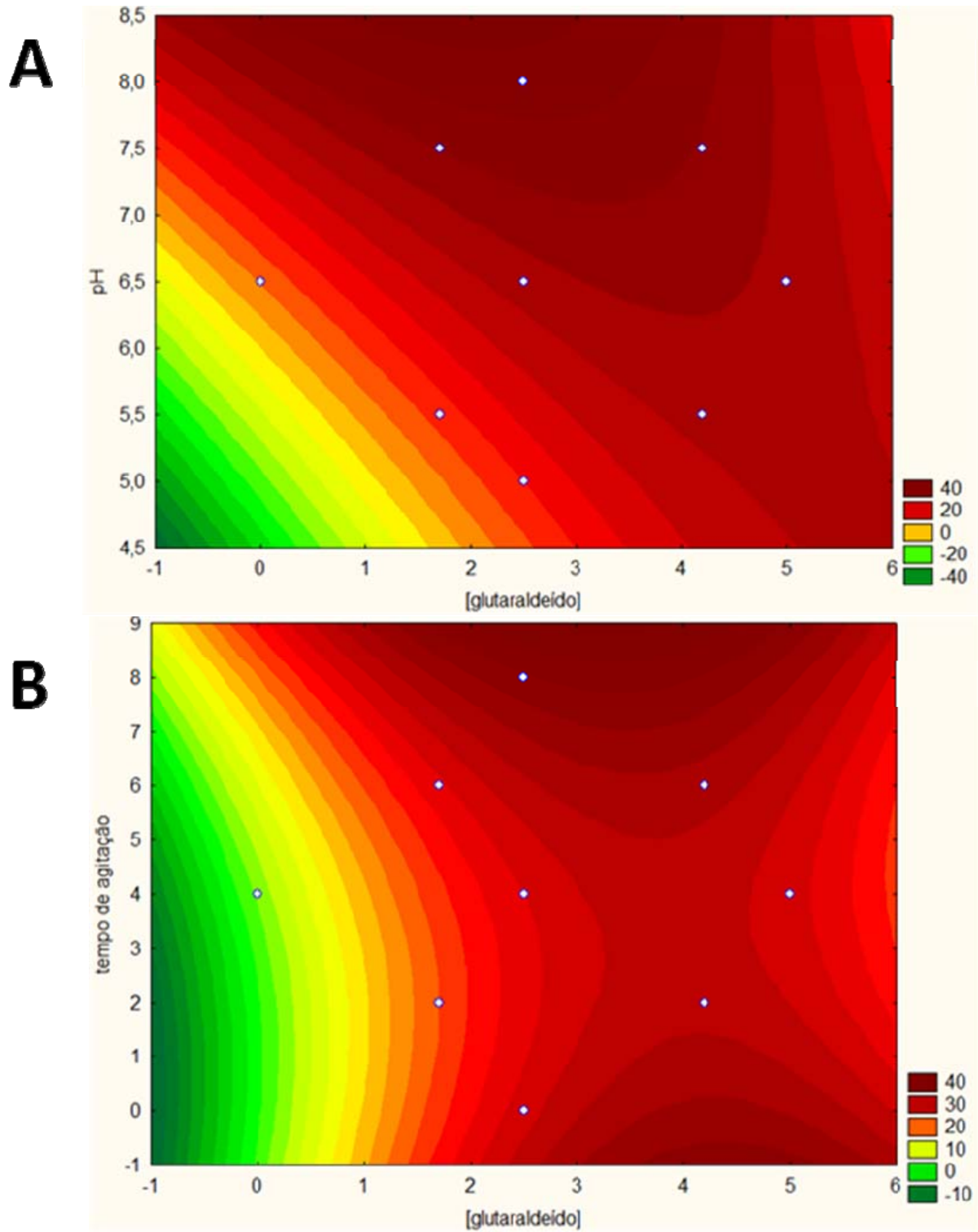
| Experimentos | Codificado (real)     |                           | Atividade relativa (%) |
|--------------|-----------------------|---------------------------|------------------------|
|              | pH<br>$\times_1$ (X1) | T (°C)<br>$\times_2$ (X2) |                        |
| 1            | -1 (4,0)              | -1 (35)                   | 83,62                  |
| 2            | -1 (4,0)              | +1 (65)                   | 18,24                  |
| 3            | +1 (7,0)              | -1 (35)                   | 30,07                  |
| 4            | +1 (7,0)              | +1 (65)                   | 6,00                   |
| 5            | -1,41 (3,0)           | 0 (50)                    | 29,87                  |
| 6            | +1,41 (8,0)           | 0 (50)                    | 23,22                  |
| 7            | 0 (5,5)               | -1,41 (25)                | 30,90                  |
| 8            | 0 (5,5)               | +1,41 (75)                | 5,58                   |
| 9            | 0 (5,5)               | 0 (50)                    | 94,83                  |
| 10           | 0 (5,5)               | 0 (50)                    | 100                    |
| 11           | 0 (5,5)               | 0 (50)                    | 83,62                  |

**Tabela 4** – Resultados de liberação de glicose após aplicação de  $\beta$ -glicosidase imobilizada em extrato aquoso de soja comercial.

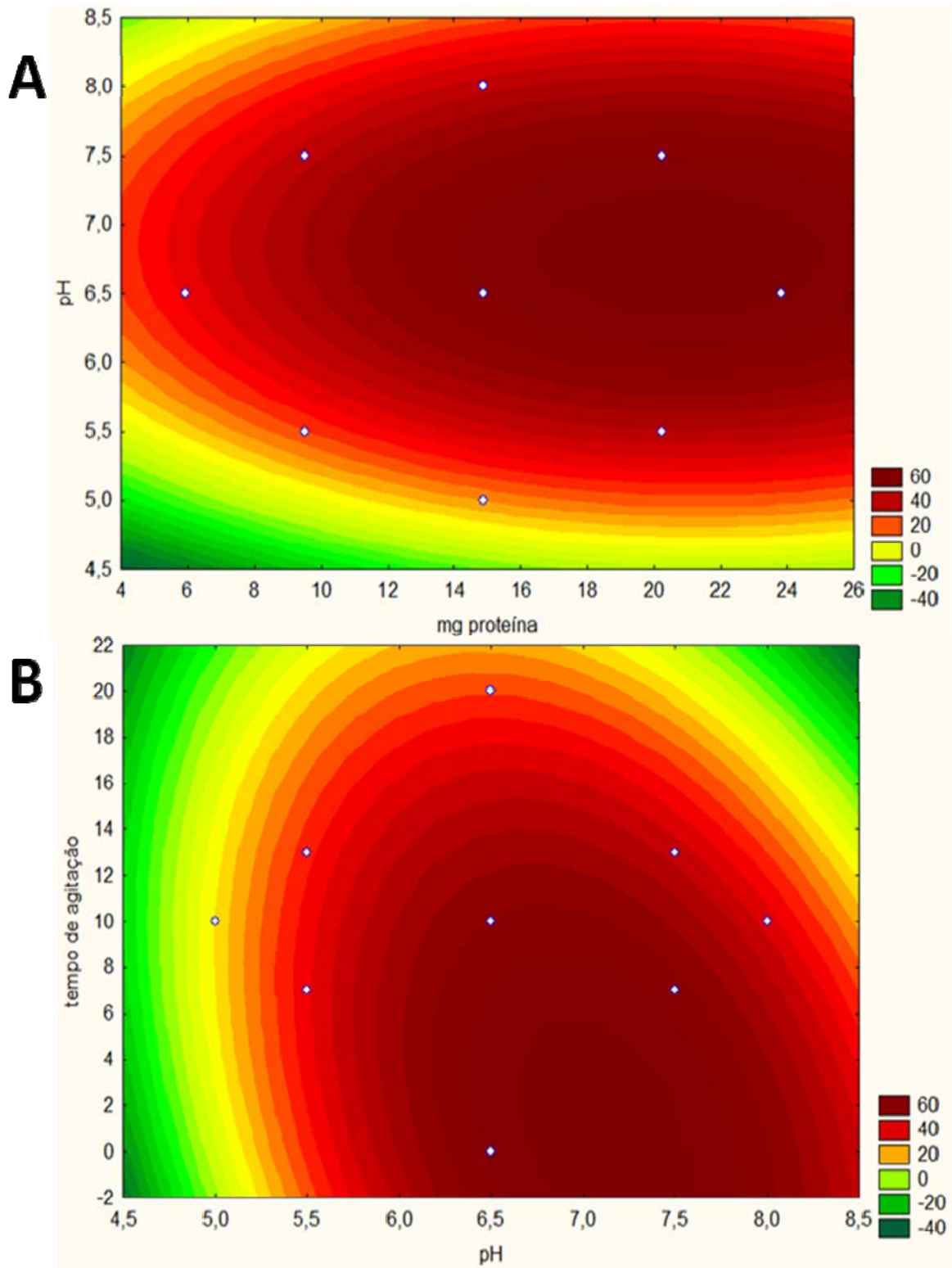
| Tempo de incubação<br>(min) | Teor de glicose<br>(mg/mL)* | Aumento do teor de<br>glicose (%) |
|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------------|
| 0                           | 0,984±0,006                 | -                                 |
| 2                           | 1,129±0,016                 | 14,79                             |
| 5                           | 1,257±0,007                 | 27,81                             |
| 10                          | 1,286±0,004                 | 30,77                             |
| 15                          | 1,298±0,008                 | 31,95                             |
| 20                          | 1,333±0,009                 | 35,50                             |
| 30                          | 1,350±0,008                 | 37,28                             |
| 45                          | 1,379±0,011                 | 40,24                             |
| 60                          | 1,420±0,005                 | 44,38                             |
| 75                          | 1,426±0,006                 | 44,97                             |
| 90                          | 1,437±0,006                 | 46,15                             |
| 120                         | 1,455±0,005                 | 47,92                             |

\* Médias  $\pm$  erro padrão da média (n=3).

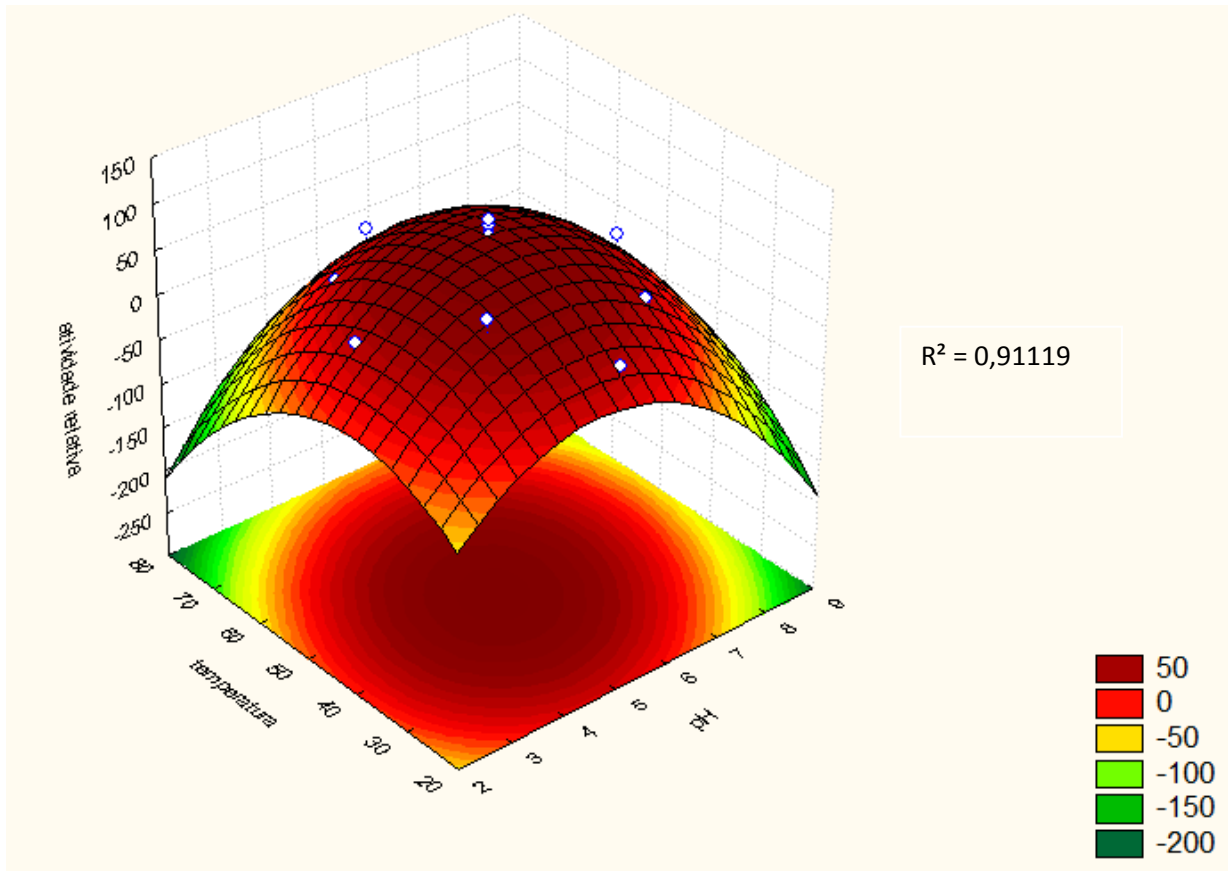
**Figura 1** – Curvas de contorno para o efeito do pH, da concentração de glutaraldeído e do tempo de agitação sobre a taxa de imobilização de  $\beta$ -glicosidase em quitosana.



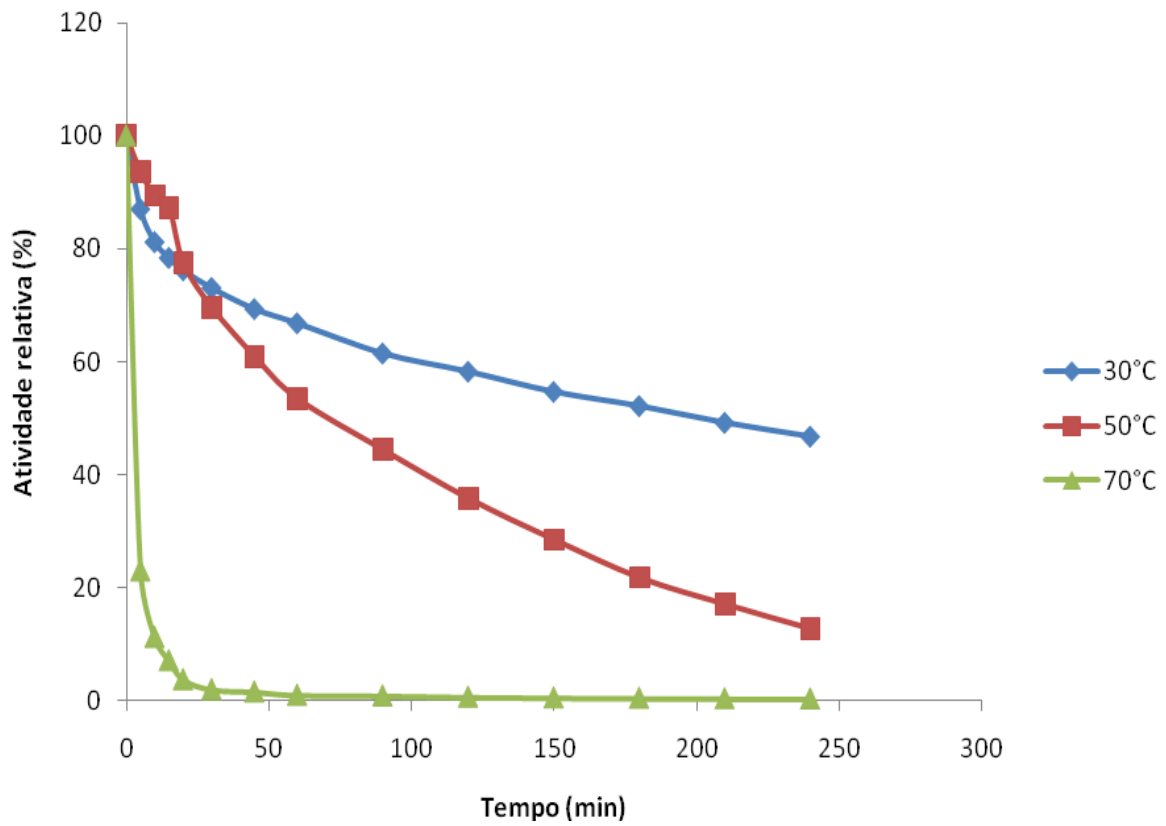
**Figura 2** – Curvas de contorno para o efeito do pH, teor de proteínas e tempo de agitação sobre a taxa de imobilização de  $\beta$ -glicosidase em quitosana

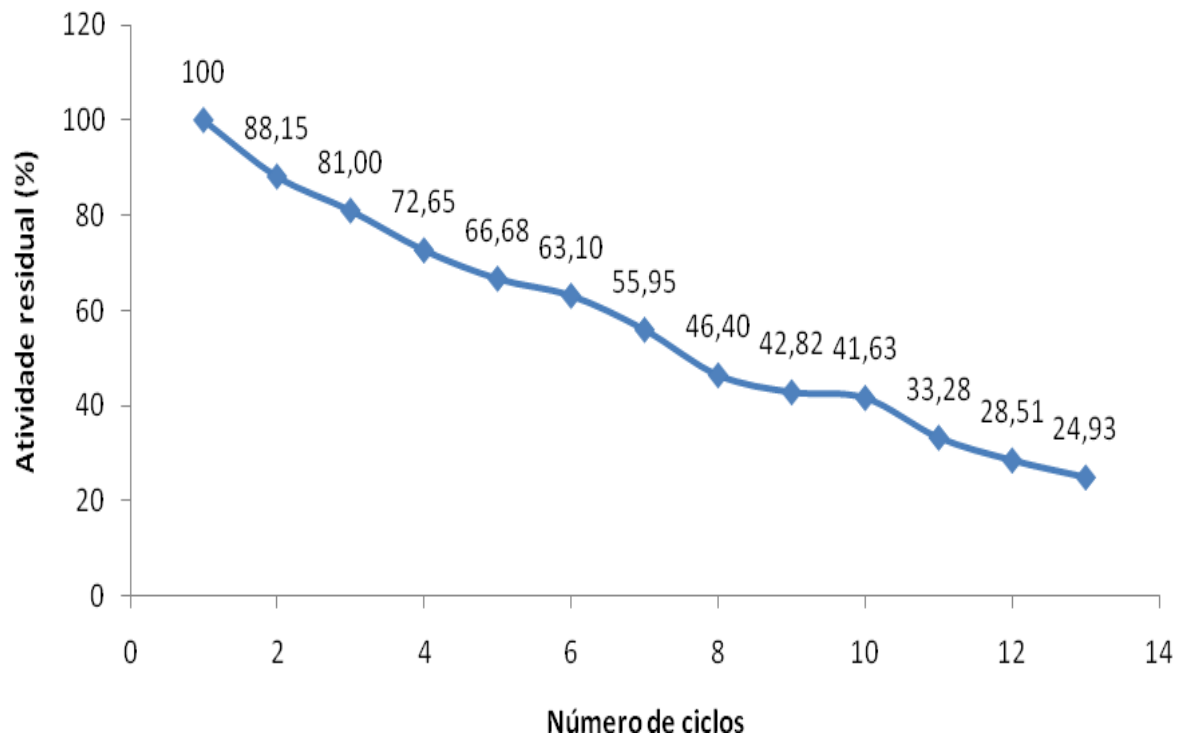


**Figura 3** - Efeito da temperatura e pH na atividade de  $\beta$ -glicosidase imobilizada.

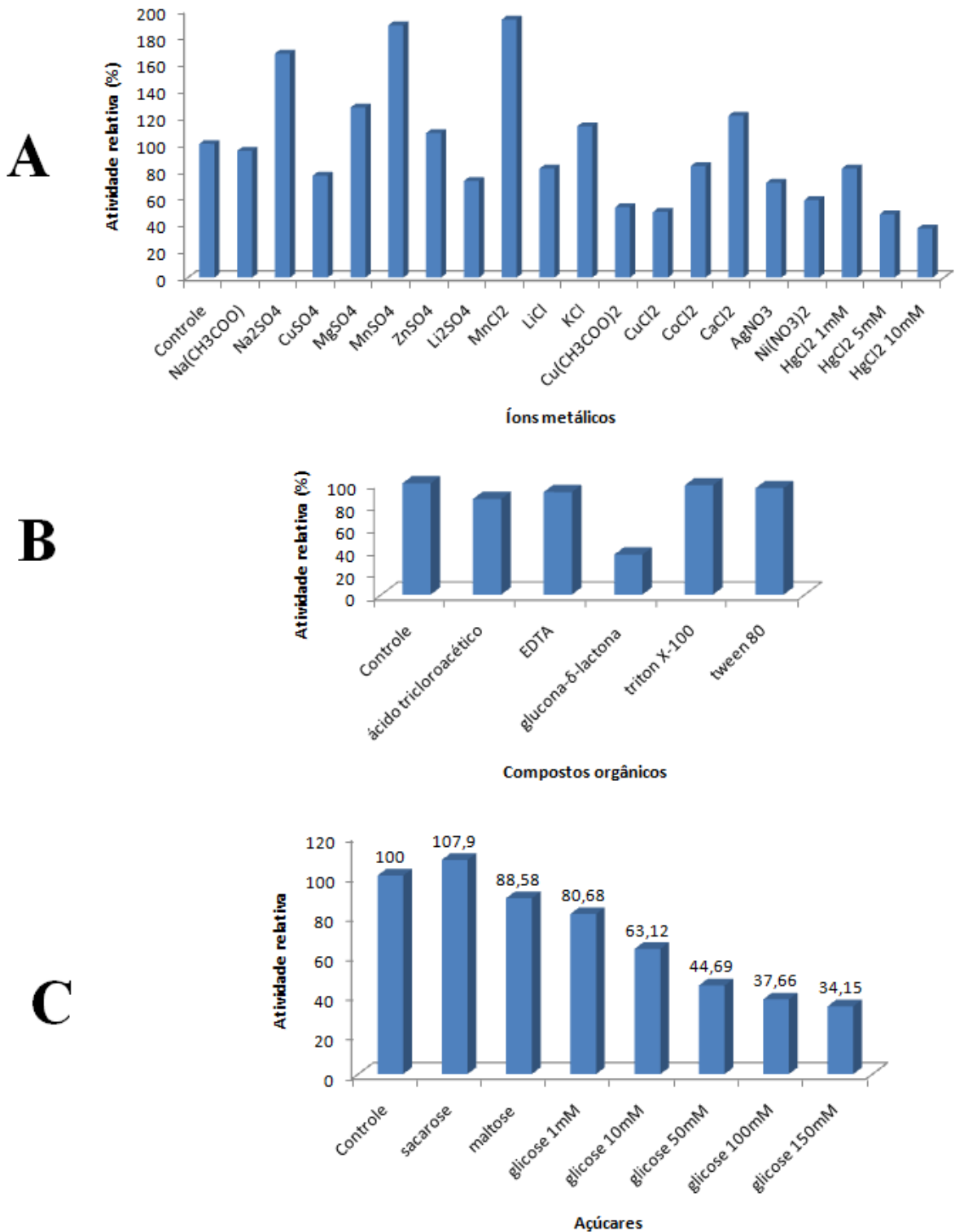


**Figura 4** - Estabilidade da  $\beta$ -glicosidase nas condições ótimas de pH e temperaturas de 30, 50 e 70°C.



**Figura 5** - Estabilidade operacional na atividade da  $\beta$ -glicosidase imobilizada.

**Figura 6 -** Efeito de íons metálicos, compostos orgânicos e açúcares na atividade de  $\beta$ -glicosidase imobilizada.



## NORMAS DE PUBLICAÇÃO 2010

**GERAL** - Serão considerados para publicação na Revista Química Nova manuscritos que cubram as áreas tradicionais da Química bem como artigos sobre Ensino de Química, História da Química, Política Científica, etc, além de artigos de áreas afins, desde que tenham acentuado conteúdo químico. Os trabalhos devem se encaixar dentro de uma das modalidades abaixo:

**Artigos Originais** (em português, inglês ou espanhol): refere-se a trabalhos inéditos de pesquisa. Devem seguir a forma usual de apresentação, contendo Introdução, Resultados e Discussão, Parte Experimental etc, de acordo com as peculiaridades de cada trabalho. Deverão ter no máximo 25 páginas, incluindo figuras, tabelas, esquemas, etc e todas as páginas deverão ser numeradas.

**Artigos de Revisão** (em português, inglês ou espanhol): destinados à apresentação do progresso em uma área específica de Química, com o objetivo de dar uma visão crítica do estado da arte do ponto de vista do especialista altamente qualificado e experiente. Deverão ter no máximo 40 páginas, incluindo figuras, tabelas, esquemas, etc e todas as páginas deverão ser numeradas.

É imprescindível que, na referida área, o autor tenha publicações que comprovem a sua experiência e qualificação. Antes do envio do manuscrito, o autor deverá submeter à editoria, por e-mail, um resumo da revisão pretendida, acompanhado de uma carta explicativa da pertinência do trabalho. O material será analisado pelos Editores e, uma vez aprovado, será solicitado ao autor o envio do manuscrito completo, dentro das normas de QN, e só então será dado início ao processo de avaliação pelos assessores.

O Corpo Editorial de QN poderá, eventualmente, convidar pesquisadores qualificados para submeter artigo de revisão.

**Artigos sobre Educação** (em português ou espanhol): trabalhos de pesquisas relacionadas ao ensino de Química e divulgação de experiências inovadoras no ensino de graduação e pós-graduação. Deverão ter no máximo 25 páginas, incluindo figuras, tabelas, esquemas, etc e todas as páginas deverão ser numeradas.

**Notas Técnicas** (em português, inglês ou espanhol): trabalhos de comunicação de métodos, validação de métodos, técnicas, aparelhagens ou acessórios desenvolvidos no laboratório de origem do autor do manuscrito. Deverão ter no máximo 25 páginas, incluindo figuras, tabelas, esquemas, etc e todas as páginas deverão ser numeradas.

**Assuntos Gerais** (em português, inglês ou espanhol): abordagem de assuntos de interesse geral dos químicos, tais como política científica, programas de graduação e pós-graduação, história da química. etc. Deverão ter no máximo 40 páginas, incluindo figuras, tabelas, esquemas etc. e todas as páginas deverão ser numeradas.

**PREPARAÇÃO DE MANUSCRITOS** - Todos os trabalhos deverão ser digitados em espaço duplo, utilizando somente Microsoft Word. A seguir, deve ser gerado um único arquivo no formato *.pdf*, do trabalho todo, para ser submetido através do sistema *on line de QN*. A revista não aceita mais a submissão de trabalhos por outra forma.

A primeira página deverá conter o título do trabalho, nome e endereço dos autores. Havendo autores com diferentes endereços, estes deverão vir imediatamente após o nome de cada autor. Os autores deverão ser agrupados por endereço. O autor para correspondência, que

deverá ser o mesmo que submete o artigo *on line*, deverá ser indicado com asterisco (\*) e seu e-mail colocado no rodapé da página (um só e-mail).

A segunda página deverá conter o título e o resumo do trabalho em inglês (abstract), com no máximo 100 (cem) palavras, e a indicação de 3 palavras-chave (keywords), também em inglês.

As figuras (incluindo gráficos, esquemas, etc) deverão ser em número máximo de 7 figuras simples e ter qualidade gráfica adequada (usar somente fundo branco). Para número maior ver o item Material Suplementar. As figuras, tabelas, esquemas, etc deverão ser colocadas após as referências e devidamente identificadas pelo respectivo número. Se escaneadas, deverão ser em alta resolução (*800 dpi/bitmap para traços*). No caso particular de esquemas contendo estruturas químicas, estas deverão ter sempre a mesma dimensão, para que possam ser reduzidas uniformemente, além de boa qualidade gráfica. Considerar que as figuras deverão ter largura máxima de uma coluna (8,5 cm).

Figuras coloridas terão custo de publicação repassado aos autores, quando da publicação. Esse valor só poderá ser informado aos autores quando o trabalho estiver previsto para ser publicado, ocasião em que a gráfica fornece o orçamento.

Para figuras, gráficos, esquemas, tabelas, etc idênticos aos já publicados anteriormente na literatura, os autores deverão pedir permissão para publicação junto à empresa/sociedade científica que detenha os direitos autorais e enviá-la à editoria de *QN* junto com a versão final do manuscrito.

As referências deverão ser numeradas consecutivamente no texto, na forma de expoentes, após a pontuação (se houver). A lista de referências deverá ser colocada no final do texto. As legendas das figuras, gráficos e esquemas deverão ser colocadas em uma única folha à parte, separadas das figuras. A seguir, deverão ser colocadas as figuras, os gráficos, os esquemas, as tabelas e os quadros. Colocar os títulos acima de cada tabela. No texto, deverá ser indicada apenas a inserção de cada um(a).

## Referências

### Revistas:

Será utilizada a abreviatura da revista como definida no Chemical Abstracts Service Source Index (ver <http://www.cas.org/sent.html>). Caso a abreviatura autorizada de uma determinada revista não puder ser localizada e não for óbvio como o título deve ser abreviado, deve-se citar o título completo.

1. Varma, R. S.; Singh, A. P.; *J. Indian Chem. Soc.* **1990**, *67*, 518.

2. No caso especial da revista citada não ser de fácil acesso, é recomendado citar o seu número de Chemical Abstract, como segue:

Provstyanoi, M. V.; Logachev, E. V.; Kochergin, P. M.; Beilis, Y. I.; *Izv. Vyssh. Uchebn. Zadev.; Khim. Khim. Tekhnol.* **1976**, *19*, 708. (CA 85:78051s).

3. Caso o trabalho tenha doi, mas não a referência completa, citar doi da seguinte maneira: Vidotti, M.; Silva, M. R.; Salvador, R. P.; de Torresi, S. I. C.; Dall'Antonia, L. H.; *Electrochimica Acta* (2007), doi:10.1016/j.electacta.2007.11.029.

É recomendado o uso de referências compostas na medida do possível, em lugar de uma lista de referências individuais. O estilo das referências compostas é o seguinte:

4. Varela, H.; Torresi, R. M.; *J. Electrochem. Soc.* **2000**, *147*, 665; Lemos, T. L. G.; Andrade, C. H. S.; Guimarães, A. M.; Wolter-Filho, W.; Braz-Filho, R.; *J. Braz. Chem. Soc.* **1996**, *7*, 123; Ângelo, A. C. D.; de Souza, A.; Morgon, N. H.; Sambrano, J. R.; *Quim. Nova* **2001**, *24*, 473.

### Patentes:

Devem ser identificadas da seguinte forma (na medida do possível o número do Chemical Abstracts deve ser informado entre parênteses).

5. Hashiba, I.; Ando, Y.; Kawakami, I.; Sakota, R.; Nagano, K.; Mori, T.; *Jpn. Kokai Tokkyo Koho 79 73,771* **1979**. (CA 91:P193174v)

6. Kadin, S.B.; *US pat. 4,730,004* **1988**. (CA 110:P23729y)

7. Eberlin, M. N.; Mendes, M. A.; Sparrapan, R.; Kotiaho, T. *Br PI 9.604.468-3*, **1999**.

**Livros:**

com editor(es):

8. Regitz, M. Em *Multiple Bonds and Low Coordination in Phosphorus Chemistry*; Regitz, M.; Scherer, O. J., eds.; Georg Thieme Verlag: Stuttgart, 1990, cap. 2.

sem editor(es):

9. Cotton, F.A.; Wilkinson, G.; *Advanced Inorganic Chemistry*, 5<sup>th</sup> ed., Wiley: New York, 1988.

**Programas de computação (Softwares):**

10. Sheldrick, G. M.; *SHELXL-93; Program for Crystal Structure Refinement*; Universidade de Göttingen, Alemanha, 1993.

**Teses:**

11. Velandia, J. R.; *Tese de Doutorado*, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Brasil, 1997.

**Material apresentado em Congressos:**

12. Ferreira, A. B.; Brito, S. L.; *Resumos da 20<sup>a</sup> Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química*, Poços de Caldas, Brasil, 1998.

**Páginas Internet:**

<http://www.sbq.org.br/jbcs>, acessada em Junho 2001.

**Material não publicado:**

Para material aceito para publicação: Magalhães, U. H.; *J. Braz. Chem. Soc.*, no prelo. Para material submetido mas ainda não aceito: Magalhães, U. H.; *J. Braz. Chem. Soc.*, submetido. Para trabalho não publicado ou comunicação pessoal: Magalhães, U. H.; trabalho não publicado ou Magalhães, U. H., comunicação pessoal. Os resultados não publicados só poderão ser citados com a permissão explícita das pessoas envolvidas na sua obtenção.

Os autores devem procurar seguir, naquilo que for possível, as normas recomendadas pela IUPAC, inclusive o Sistema Internacional de Unidades. Sobre a nomenclatura de compostos (orgânicos e inorgânicos) já há traduções para a língua portuguesa publicadas em QN. Quanto aos Símbolos e Terminologias, onde não há tradução, espera-se que adaptação seja feita pelos autores, criando então, paulatinamente, um conjunto de normas em português.

**SUBMISSÃO DOS ARTIGOS** – A QN oferece aos autores a submissão *on line*, que pode ser acessada através do registro de Login e Senha. É possível registrar-se em nossa home page (<http://quimicanova.sbq.org.br>) usando a opção Novo Usuário. Usuários da plataforma do JBCS, já estão cadastrados na base (pois ela é comum às duas revistas), devendo utilizar o mesmo Login e Senha. Após estar cadastrado no sistema, o autor pode facilmente seguir as instruções fornecidas na tela. Será solicitada a submissão de um único arquivo do manuscrito completo, em formato .pdf. Está disponível uma ferramenta para gerar o arquivo

*.pdf*, a partir de arquivo *.doc* ou *.rtf*, com envio automático para o e-mail do autor. Tão logo seja completada a submissão, o sistema informará automaticamente, por e-mail, o código temporário de referência do manuscrito, até que este seja verificado pela editoria. Então será enviado e-mail com o número de referência do trabalho.

Se não for recebido o e-mail com código de submissão temporária, por algum motivo, a submissão não foi completada e o autor terá prazo máximo de 5 (cinco) dias para completá-la. Depois desse prazo, o sistema não permite o envio, devendo ser feita nova submissão.

O autor poderá acompanhar, diretamente através do sistema, a situação de seu manuscrito.

Ao fazer a submissão, solicita-se uma carta de apresentação, que deverá ser digitada no local indicado, sendo obrigatória a apresentação dos e-mails de todos os autores. Além disso, devem ser enviados também os nomes, instituições a que pertencem e e-mails de três ou quatro possíveis assessores, que não podem pertencer à(s) mesma(s) instituição(ões) dos autores.

**Material Suplementar** – Esta modalidade foi criada para que na versão impressa da revista apareça o número estritamente necessário de figuras e tabelas (6 a 7 figuras simples). Ressalta-se que, como este material ficará disponível apenas na versão *on line*, figuras, tabelas e ilustrações coloridas apresentadas na forma de material suplementar não terão custo repassado aos autores, nem limite de páginas. Porém, devem ter boa qualidade gráfica. O material suplementar deverá ser colocado no final do trabalho, com indicação clara. Deverá ser submetido um único documento *.pdf*, incluindo o material suplementar.

Os Editores poderão solicitar aos autores, em qualquer fase da tramitação, a separação de Material Suplementar.

**MANUSCRITOS REVISADOS** – Manuscritos enviados aos autores para revisão deverão retornar à Editoria dentro de prazo máximo de trinta dias ou serão considerados retirados, sendo que o sistema encerra o processo, não permitindo que seja reaberto. Vencido o prazo, deverá ser feita nova submissão, dando início a um novo processo.

A submissão do manuscrito revisado deverá ser feita pelo mesmo autor, usando o Login e a Senha registrados anteriormente. O autor deve seguir as instruções fornecidas na tela, para envio do documento *.pdf* completo da versão revisada e das respostas aos assessores, detalhando as alterações feitas na nova versão e justificando as alterações sugeridas nos pareceres e que não foram aceitas pelos autores. Esses dois arquivos devem ser enviados através da seção Envio de Nova Versão, na Página do Autor, no sistema de submissão *on line* de QN.

Tão logo seja completada a submissão o sistema informará automaticamente, por e-mail, o código temporário de referência do manuscrito, até que ele seja verificado pela editoria. Então será enviado e-mail contendo o número de referência do trabalho.

Se não receber o e-mail com código de submissão temporária, por algum motivo, a submissão não foi completada e o autor terá prazo máximo de 5 (cinco) dias para completá-la. Depois desse prazo, o sistema não permite o envio, devendo ser feita nova submissão.

O autor poderá acompanhar, diretamente através do sistema, o status de seu manuscrito.

**VERSÃO FINAL** – Quando for solicitada a versão final, o autor receberá instruções específicas quanto a programas para envio de arquivos (texto, figuras, tabelas, etc) . Arquivos em formato *.pdf* não são mais solicitados nessa fase.

Se as Figuras forem escaneadas, deverão ser em alta resolução (800 dpi/bitmap para traços) com extensão *tif* ou *jpg*, desde que nas dimensões especificadas pelos Editores. As fotos ou desenhos com cor (300 dpi/grayscale) deverão ser enviadas com extensão *tif/jpg*, com largura máxima total de 8,5 cm para não haver problemas ao aplicá-las no padrão da Revista. Outras extensões possíveis: *cdr, eps, cdx ou opj*. No caso particular de esquemas

contendo estruturas químicas, estas deverão ter sempre a mesma dimensão, para que possam ser reduzidas uniformemente.

*A Editoria de QN reserva-se o direito de efetuar, quando necessário, pequenas alterações nos manuscritos, de modo a adequá-los às normas da revista ou tornar seu estilo mais claro, respeitando, naturalmente, o conteúdo do trabalho. Qualquer que seja a natureza do manuscrito submetido, ele deve ser original em nível de metodologia, informação, interpretação ou crítica. A qualificação do trabalho será atestada por dois consultores, indicados pela Editoria.*

## 5.2 TRABALHOS APRESENTADOS EM EVENTOS CIENTÍFICOS

O trabalho intitulado “Imobilização de  $\beta$ -glicosidase em quitosana” foi apresentado no V Workshop de Biocatálise e Biotransformação da Universidade Estadual de Maringá – Maringá/PR.

O trabalho intitulado “Otimização das condições de ativação de quitosana para imobilização de cotilédones de soja” foi apresentado no I Congresso Sul Americano de Farmácia da Universidade Estadual de Maringá – Maringá/PR.

## Imobilização de $\beta$ -glicosidase em quitosana

Grade, L. C., Oliveira, C. F., Orcioli, A. M., Ribeiro, M. L. L.

Departamento de Bioquímica e Biotecnologia, Universidade Estadual de Londrina, Rod. Celso Garcia Cid Pr 445 Km 380, Campus Universitário, CEP 87020-900, Londrina-PR, Brasil.

\* Corresponding author. Tel./Fax: +55-43-3371-4270 ; e-mail:maraluciaribeiro@uel.br

palavras-chave:  $\beta$ -glicosidase, imobilização, quitosana.

### INTRODUÇÃO

A imobilização de enzimas tem sido utilizada na indústria, pois favorece a sua aplicação por períodos prolongados, em processos contínuos ou semicontínuos<sup>1</sup>. Entretanto, as matrizes a serem utilizadas devem ser atóxicas, baratas e renováveis, tais como, quitina, alginato, agar etc.

As  $\beta$ -glicosidases ( $\beta$ -D-glicosídeo glicohidrolase, EC 3.2.1.21) são enzimas capazes de clivar as ligações  $\beta$ -glicosídicas de di e/ou oligosacarídeos, ou outros conjugados glicosídicos, liberando glicose e são amplamente distribuídas na natureza. Estas enzimas hidrolisam as isoflavonas  $\beta$ -glicosídicas (genistina, daidzina e glicitina) e liberam as isoflavonas agliconas (genisteína, daidzeína e gliciteína) que apresentam ação benéfica na saúde humana<sup>2</sup>. Assim, podem ser aplicadas em produtos não fermentados de soja, produzindo alimentos funcionais com teor elevado de agliconas<sup>2</sup>. Este trabalho teve como objetivo imobilizar  $\beta$ -glicosidase extraída de soja utilizando como suporte grânulos de quitosana compostos por ligação cruzada com glutaraldeído em diferentes concentrações.

### RESULTADOS E DISCUSSÃO

A  $\beta$ -glicosidase purificada de cotilédones de soja foi utilizada para imobilização em esferas de quitosana 1%. As esferas foram incubadas com glutaraldeído variando de 0,5 a 5,0% (v/v) por 8 h a 37°C. Para a imobilização, as esferas ativadas e a  $\beta$ -glicosidase de soja (26,4 UA mL<sup>-1</sup> de solução) foram mantidas a 4°C por 20 h<sup>3</sup>. Na Tabela 1 observa-se os resultados da imobilização (%) em relação à concentração de glutaraldeído (%) utilizada. A taxa de imobilização (%) foi

calculada a partir da relação entre a atividade específica da enzima imobilizada pela atividade específica da enzima livre multiplicado por 100. Assim, observa-se que a  $\beta$ -glicosidase foi imobilizada nas esferas de quitosana 1% ativadas com diferentes concentrações de glutaraldeído. A taxa de imobilização da enzima aumentou conforme o aumento de glutaraldeído, sendo que o melhor resultado foi obtido na concentração de 4%. Acima desta concentração, não ocorreu aumento na taxa de imobilização da enzima.

**Tabela 1.** Porcentagem de imobilização em esferas de quitosana preparadas nas diversas concentrações de glutaraldeído.

| % glutaraldeído | % imobilização |
|-----------------|----------------|
| 0,5             | 70,73          |
| 1               | 69,38          |
| 2               | 73,28          |
| 3               | 78,07          |
| 4               | 82,15          |
| 5               | 80,78          |

### CONCLUSÃO

A imobilização de  $\beta$ -glicosidase em quitosana 1% foi eficiente.

### AGRADECIMENTOS

CAPES e Fundação Araucária pelo apoio financeiro.

<sup>1</sup> Carvalho, W.; Canilha, L.; Silva, S.S.; *Revista Analytica* 2006, 23, 60.

<sup>2</sup> Hsieh, M. C.; Graham, T. L.; *Phytochemistry* 2001, 58, 995.

<sup>3</sup> Kumar, S.; Dwevedi, A.; Kayastha, A.M.; *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 2009, 58, 138.

# OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE ATIVAÇÃO DE QUITOSANA PARA IMOBILIZAÇÃO DE $\beta$ -GLICOSIDASE DE COTILÉDONES DE SOJA

Orcioli, Caio Ferreira de Oliveira Luciana Medeiros, Virgínia Carvalho Grade, Amanda Prezzi Santos, Suzana Mali de Oliveira, Geni da Silva Varéa, Mara Lúcia Luiz Ribeiro.

e-mail: [maraluciaribeiro@uel.br](mailto:maraluciaribeiro@uel.br) Universidade Estadual de Londrina/Departamento de Bioquímica e Biotecnologia/Londrina, PR.

## Imobilização de $\beta$ -glicosidase em quitosana



Luciana Carvalho Grade<sup>1\*</sup>; Caio Ferreira de Oliveira<sup>2\*</sup>; Amanda Medeiros Orcioli<sup>3\*</sup>; Mara Lúcia Luiz Ribeiro<sup>4</sup>

<sup>1\*</sup> Mestrado em Biotecnologia; <sup>2\*</sup> IC-Uel; <sup>3\*</sup> Colaboradora em Projeto de Pesquisa; <sup>4</sup> Departamento de Bioquímica e Biotecnologia/CCE/Uel – C.P. 6001, CEP 86.051-990, Londrina – PR, e-mail: maraluciaribeiro@uel.br



### INTRODUÇÃO

A imobilização de enzimas tem sido utilizada na indústria por favorecer sua aplicação por períodos prolongados<sup>1</sup>. Entretanto, as matrizes a serem utilizadas devem ser atóxicas, de baixo custo, renováveis e biodegradáveis, tais como, quitina, alginato, agar etc.

As  $\beta$ -glicosidases ( $\beta$ -D-glicosídeo glicosidolase, EC 3.2.1.21) são enzimas capazes de clivar as ligações  $\beta$ -glicosídicas de di e/ou oligossacarídeos, ou outros conjugados glicosídicos, liberando glicose e são amplamente distribuídas na natureza. Estas enzimas hidrolisam as isoflavonas  $\beta$ -glicosídicas (genistina, daidzina e glicitina) e liberam as isoflavonas agliconas (genisteína, daidzeína e gliciteína) (Figura 1) as quais apresentam ação benéfica na saúde humana<sup>2</sup>.

Estas enzimas tem recebido atenção especial devido à sua aplicação biotecnológica e industrial podendo ser utilizada em produtos não fermentados à base de soja, produzindo alimentos funcionais com alto teor de agliconas<sup>3</sup>.

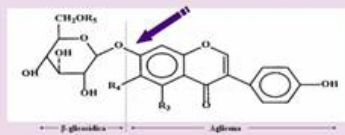


Figura 1. Estrutura das isoflavonas de soja e local de atuação da  $\beta$ -glicosidase.

### OBJETIVO

Imobilizar  $\beta$ -glicosidase extraída de soja utilizando como suporte grânulos de quitosana compostos por ligação cruzada com glutaraldeído em diferentes concentrações.

### METODOLOGIA

#### PREPARO DAS AMOSTRAS

Amostras de soja foram previamente selecionadas e moídas para obtenção de farinhas de cotilédones.

#### EXTRAÇÃO DA $\beta$ -GLICOSIDASE<sup>3</sup>



#### DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DE $\beta$ -GLICOSIDASE<sup>3</sup>



UA = quantidade de  $\beta$ -glicosidase que irá liberar 1  $\mu$ M de p-NP min<sup>-1</sup>, nas condições do ensaio.

#### PREPARO DOS GRÂNULOS DE QUITOSANA<sup>4</sup>



As esferas de quitosana são lavadas com água MilliQ antes de serem ativadas com glutaraldeído, variando de 0,5 a 5,0% (v/v). Após a ativação, estas são lavadas com tampão tris-acetato 0,1 M pH 7,6.

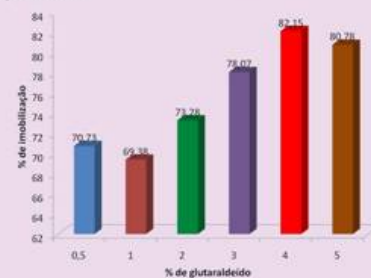
#### IMOBILIZAÇÃO DE $\beta$ -GLICOSIDASE NAS ESFERAS DE QUITOSANA<sup>4</sup>



A taxa de imobilização (%) foi calculada a partir da relação entre a atividade específica da enzima imobilizada pela atividade específica da enzima livre, multiplicado por 100.

### RESULTADOS

Observa-se que a  $\beta$ -glicosidase foi imobilizada nas esferas de quitosana 1% ativadas com diferentes concentrações de glutaraldeído. A taxa de imobilização da enzima aumentou conforme o aumento de glutaraldeído, sendo que o melhor resultado foi obtido na concentração de 4%. Acima desta concentração, não ocorreu aumento na taxa de imobilização da enzima.



### CONCLUSÃO

A partir dos resultados, conclui-se que a imobilização de  $\beta$ -glicosidase em quitosana 1% foi eficiente.

### REFERÊNCIAS

- CARVALHO, W.; CANILHA, L.; SILVA, S.S. 2006. *Revista Analytica*, v. 23, p. 60.
- HSIEH, M. C.; GRAHAM, T. L. 2001. *Phytochemistry*, v. 58, p. 995-1005.
- MATSUURA, M.; OBATA, A. 1993. *Journal of Food Science*, v. 58, p. 144-147.
- KUMAR, S.; DWEVEDI, A.; KAYASTHA, A. M. 2009. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 58, p. 138.

### AGRADECIMENTOS

Apoio financeiro: CAPES, Fundação Araucária, IC/Uel

## **Biotecnologia.**

**Palavras-chave:** quitosana,  $\beta$ -glicosidase, imobilização.

### **Introdução**

A imobilização de enzimas tem sido utilizada na indústria, favorecendo a sua aplicação por períodos prolongados, em processos contínuos ou semicontínuos. No entanto, as matrizes a serem utilizadas devem ser atóxicas, baratas e renováveis, tais como, quitina, alginato, agar etc.

As  $\beta$ -glicosidases ( $\beta$ -D-glicosídeo glicohidrolase, EC 3.2.1.21) são enzimas capazes de clivar as ligações  $\beta$ -glicosídicas de di e/ou oligosacarídeos, ou outros conjugados glicosídicos, liberando glicose e estão amplamente distribuídas na natureza. Estas enzimas hidrolisam as isoflavonas  $\beta$ -glicosídicas (genistina, daidzina e glicitina) e liberam as isoflavonas agliconas (genisteína, daidzeína e gliciteína) que apresentam ação benéfica na saúde humana. Desse modo, podem ser aplicadas em produtos não fermentados de soja, produzindo alimentos funcionais com teor elevado de agliconas. O objetivo deste trabalho foi otimizar a ativação dos grânulos de quitosana compostos por ligação cruzada com glutaraldeído para imobilização de  $\beta$ -glicosidase extraída de soja, utilizando metodologia de superfície de resposta.

### **Materiais e métodos**

#### *Preparação de grânulos de quitosana*

A solução de quitosana (1% p/v) foi preparada em água MilliQ com 1,5% (v/v) de ácido acético e aquecida a 60°C. Uma seringa, com extremidade envolvida em parafilme, foi preenchida com solução de KOH 1N a 37°C. Esta solução passou por um poro de 1mm de diâmetro no parafilme, sendo adicionada gota a gota sobre a solução de quitosana. Os grânulos de aproximadamente 5mm de diâmetro obtidos foram imediatamente lavados com água MilliQ e armazenados em água a 4°C, até a etapa de ativação com glutaraldeído.

#### *Ativação com glutaraldeído*

Os grânulos de quitosana foram ativados por 8h a 37°C com glutaraldeído através de um planejamento fatorial completo  $2^3$  com 4 pontos axiais e 3 pontos centrais, totalizando 17 experimentos. Foi avaliada a influência das variáveis concentração de glutaraldeído (0; 1,7; 2,5; 4,2 e 5%), pH (5; 5,5; 6,5; 7,5 e 8) e tempo de agitação (0, 2, 4, 6 e 8h) na taxa de imobilização da  $\beta$ -glicosidase. Após a incubação, os grânulos foram lavados com tampão tris-acetato 0,1M com pH variando de 5 a 8 e armazenados no mesmo tampão até serem utilizados.

A função resposta foi determinada pela relação entre a atividade específica da enzima imobilizada e a atividade específica da enzima solúvel multiplicada por 100. A atividade específica da enzima imobilizada foi determinada subtraindo a atividade específica durante a lavagem (enzima não-imobilizada) da atividade específica da enzima solúvel.

#### *Imobilização em grânulos de quitosana*

Para a imobilização da  $\beta$ -glicosidase em quitosana, os grânulos ativados foram incubados com 1 mL de solução enzimática (181,62 UA / mL) por 20h a 4°C sob leve agitação e lavados com tampão tris-

acetato 0,1M pH 7,6 para remover a enzima não-imobilizada. Foram feitas determinações de atividade e teor de proteínas nos tampões de lavagem para posterior cálculo da taxa de imobilização.

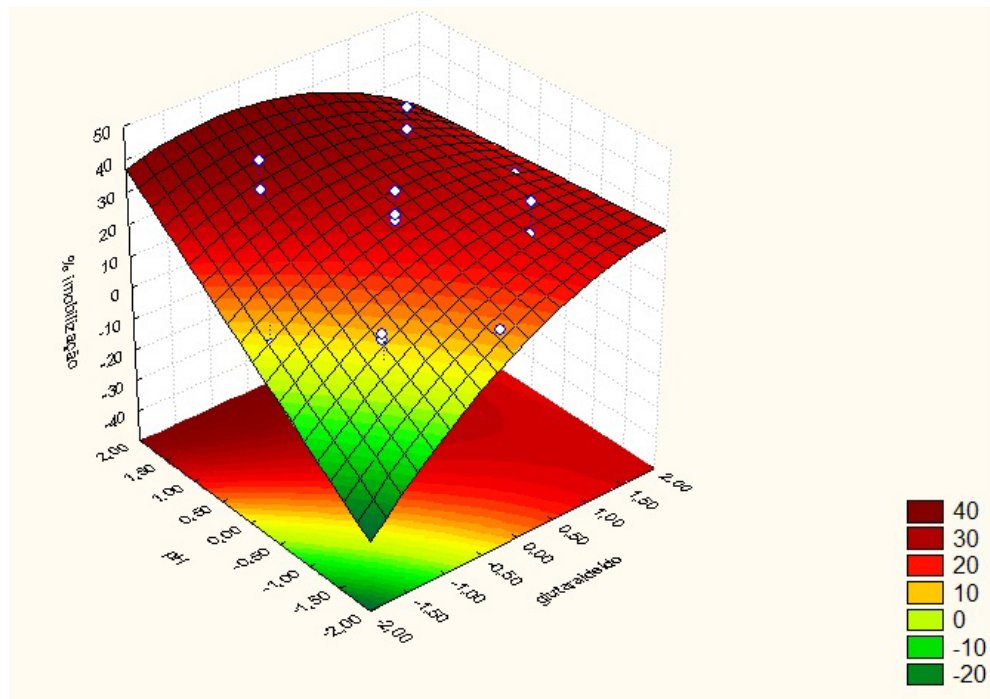
### Resultados e Discussão

O modelo matemático obtido para a taxa de imobilização (%) da  $\beta$ -glicosidase foi significativo em nível de 5% de significância ( $p \leq 0,05$ ), apresentando  $r^2$  igual a 0,85704, ou seja, 85,70% dos dados estão ajustados ao modelo. A concentração de glutaraldeído e o pH foram significativos ( $p \leq 0,05$ ) no modelo obtido. O gráfico de superfície de resposta gerado mostrou que os melhores resultados foram obtidos em valores de pH mais elevados (7,5 e 8) e em maiores concentrações de glutaraldeído (5%) (Figura 1).

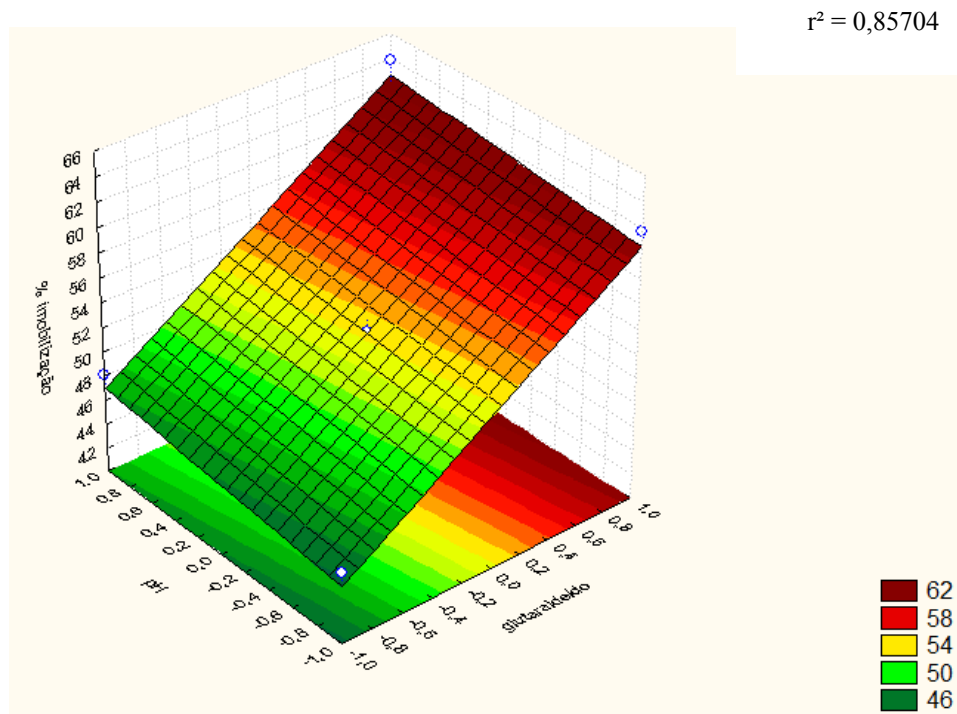
Como o tempo de agitação não foi significativo ( $p > 0,05$ ) na ativação dos grânulos de quitosana, foi realizado novo planejamento experimental, um delineamento fatorial completo  $2^2$  com 2 repetições no ponto central (6 experimentos) onde foi avaliada a influência da concentração de glutaraldeído (5, 6 e 7) e do pH (7, 8 e 9) na taxa de imobilização (%) de  $\beta$ -glicosidase, sendo fixo o valor do tempo de agitação em 4h. Os resultados deste novo planejamento mostraram que apenas a concentração de glutaraldeído foi significativa ( $p < 0,10$ ), com  $r^2$  de 0,92532, ou seja, 92,53% dos dados ajustados ao modelo. Estes dados geraram um gráfico de superfície de resposta que mostra como as maiores taxas de imobilização foram observadas quando se empregou maior concentração de glutaraldeído (5%) (figura 2).

**Figura 1** – Superfície de resposta para taxa de imobilização de  $\beta$ -glicosidase em função do pH, quantidade de glutaraldeído (%) e tempo de agitação (h).

$$Y = 25,48 + 4,6 X_1 - 2,92 X_1^2 + 7,38 X_2 + 2,09 X_3 + 2,75 X_3^2 - 4,42 X_1 X_2$$



**Figura 2** – Superfície de resposta para taxa de imobilização de  $\beta$ -glicosidase em função do pH e quantidade de glutaraldeído (%), com tempo de agitação fixado no nível intermediário.



Pode-se observar que nos dois delineamentos a concentração de glutaraldeído foi significativa, o que pode ser explicado pelo fato deste reagente atuar como um ligante bifuncional ao formar pontes entre os grupos aminados da quitosana e da enzima.

## Conclusões

Após a realização de dois delineamentos experimentais, observou-se que a concentração de glutaraldeído foi a variável significativa na ativação dos grânulos de quitosana para imobilização de  $\beta$ -glicosidase de soja.

## Agradecimentos

A CAPES e a PIBIC/UEL pelas bolsas concedidas.

Apoio financeiro: Fundação Araucária.

# OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE ATIVAÇÃO DE QUITOSANA PARA IMOBILIZAÇÃO DE $\beta$ -GLICOSIDASE DE COTILÉDONES DE SOJA



**Luciana Carvalho Grade<sup>1\*</sup>; Amanda Medeiros Orcioli<sup>2\*</sup>; Caio Ferreira de Oliveira<sup>2\*</sup>; Virginia Prezzi Santos; Suzana Mali de Oliveira\*; Geni da Silva Varêa\*; Mara Lúcia Luiz Ribeiro\***

<sup>1</sup> Mestrado em Biotecnologia; <sup>2</sup> IC-UEL; <sup>3</sup> Colaboradora em Projeto de Pesquisa; <sup>4</sup> Departamento de Bioquímica e Biotecnologia/CCE/UEL – C.P. 6001, CEP 86.051-990, Londrina – PR, e-mail: maraluclaribeiro@uel.br



## INTRODUÇÃO

A imobilização de enzimas tem sido utilizada na indústria, favorecendo a sua aplicação por períodos prolongados, em processos contínuos ou semicontínuos<sup>1</sup>. As matrizes a serem utilizadas devem ser atóxicas, baratas e renováveis, tais como, quitina, alginato, agar etc.

As  $\beta$ -glicosidases ( $\beta$ -D-glicosídeo glicohidrolase, EC 3.2.1.21) são enzimas capazes de clivar as ligações  $\beta$ -glicosídicas de di e/ou oligossacarídeos, ou outros conjugados glicosídicos, liberando glicose (Figura 1). Estas enzimas hidrolisam as isoflavonas  $\beta$ -glicosídicas (genistina, daidzina e glicetina) e liberam as isoflavonas agliconas (genisteína, daidzeína e gliciteína) que apresentam ação benéfica na saúde humana. Desse modo, podem ser aplicadas em produtos não fermentados de soja, produzindo alimentos funcionais com teor elevado de agliconas<sup>2</sup>.

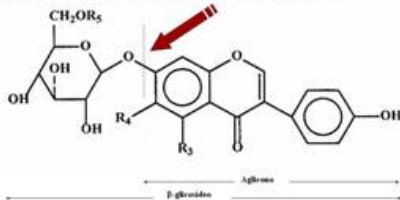


Figura 1. Estrutura geral das isoflavonas de soja e local de atuação da  $\beta$ -glicosidase.

## OBJETIVO

Otimizar a ativação de grânulos de quitosana compostos por ligação cruzada com glutaraldeído para imobilização de  $\beta$ -glicosidase extraída de soja, utilizando metodologia de superfície de resposta.

## METODOLOGIA

### Preparação e ativação de grânulos de quitosana com glutaraldeído<sup>3</sup>

O preparo dos grânulos de quitosana e sua ativação com glutaraldeído pode ser observado na Figura 2. Foi utilizado um planejamento fatorial completo 2<sup>2</sup> com 4 pontos axiais e 3 pontos centrais. A concentração de glutaraldeído variou de 0 a 5% (v/v), e os tempos de agitação, de 0 a 8h. Após a incubação, os grânulos foram lavados com tampão tris-acetato 0,1M com pH de 5 a 8 e armazenados no mesmo tampão até serem utilizados.

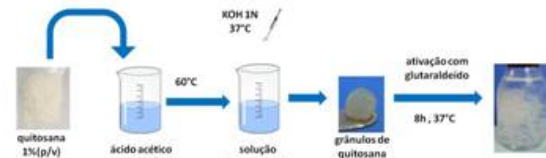


Figura 2. Preparo e ativação dos grânulos de quitosana com glutaraldeído.

### Imobilização da $\beta$ -glicosidase em grânulos de quitosana

Para a imobilização da  $\beta$ -glicosidase em quitosana, os grânulos ativados foram incubados com 1 mL de solução enzimática (181,62 UA / mL) por 20h a 4°C sob leve agitação e lavados com tampão tris-acetato 0,1M pH 7,6 para remover a enzima não-imobilizada. Foram feitas determinações de atividade e teor de proteínas nos tampões de lavagem para posterior cálculo da taxa de imobilização.

## RESULTADOS

O modelo matemático obtido para a taxa de imobilização (%) da  $\beta$ -glicosidase foi significativo em nível de 5% de significância, com  $r^2$  de 0,85704. A concentração de glutaraldeído e o pH foram significativos. No gráfico de superfície de resposta observa-se que os melhores resultados foram obtidos em valores de pH mais elevados (7,5 e 8,0) e em maiores concentrações de glutaraldeído (5%) (Figura 3).

Como o tempo de agitação não foi significativo ( $p > 0,05$ ) na ativação dos grânulos de quitosana, foi realizado novo planejamento experimental, um delineamento fatorial completo 2<sup>2</sup> onde foi avaliada a influência da concentração de glutaraldeído e do pH na taxa de imobilização (%) da  $\beta$ -glicosidase, sendo fixo o tempo de agitação em 4h. Os resultados deste novo planejamento mostraram que apenas a concentração de glutaraldeído foi significativa ( $p < 0,10$ ), com  $r^2$  de 0,92532. Estes dados geraram um gráfico de superfície de resposta (Figura 4) que indicou que as taxas de imobilização superiores foram observadas quando foi utilizado a maior concentração de glutaraldeído.

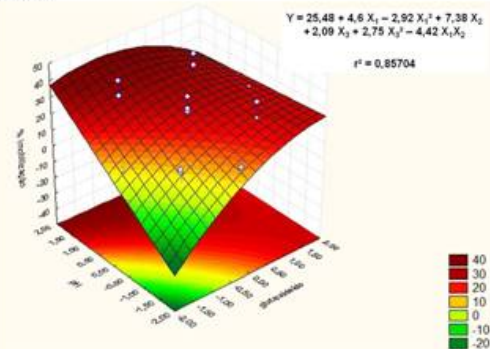


Figura 3. Superfície de resposta para taxa de imobilização de  $\beta$ -glicosidase em função do pH, quantidade de glutaraldeído (%) e tempo de agitação (h).

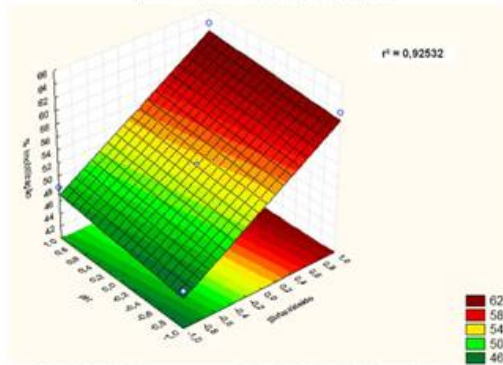


Figura 4. Superfície de resposta para taxa de imobilização de  $\beta$ -glicosidase em função do pH e quantidade de glutaraldeído (%), com tempo de agitação fixado no nível intermediário (4h).

## CONCLUSÃO

A partir dos resultados, conclui-se que a imobilização de  $\beta$ -glicosidase em quitosana 1% ativada com glutaraldeído foi mais eficiente com a utilização de maior concentração de glutaraldeído na ativação das esferas de quitosana.

## REFERÊNCIAS

- CARVALHO, W.; CANILHA, L.; SILVA, S.S. 2006. *Revista Analytica*, v. 23, p. 60.
- HSIEH, M. C.; GRAHAM, T. L. 2001. *Phytochemistry*, v. 58, p. 995-1005.
- KUMAR, S.; DWEVEDI, A.; KAYASTHA, A. M. 2009. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 58, p. 138.

## AGRADECIMENTOS

Apoio financeiro: CAPES, Fundação Araucária, IC/UEL

## Referências

Carvalho, W; Canilha, L.; Silva, S.S. Uso de biocatalisadores imobilizados: uma alternativa para a condução de bioprocessos. *Revista Analytica*. 2006, 23, 60.

Hsieh, M.C.; Graham, T.L. Partial purification and characterization of a soybean beta-glucosidase with high specific activity towards isoflavone conjugates. *Phytochemistry*. 2001, 58, 995.

Kumar, S.; Dwevedi, A.; Kayastha, A.M. Immobilization of soybean (*Glycine max*) urease on alginate and chitosan beads showing improved stability: Analytical applications. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 2009, 58, 138.

## 6 CONCLUSÕES

Nos ensaios realizados no planejamento fatorial composto central para a etapa de ativação de grânulos de quitosana, verificou-se que a concentração de glutaraldeído, o pH e o tempo de agitação foram variáveis significativas para aumentar a taxa de imobilização (%) de  $\beta$ -glicosidase, sendo os valores ótimos de 2,5% de glutaraldeído, pH 7,5 e 8 h de agitação.

Para a etapa de imobilização enzimática, nos ensaios realizados no planejamento fatorial composto central, foi observado que o teor de proteínas adicionado, o pH e o tempo de agitação foram significativos para o aumento na taxa de imobilização, sendo ótimos os valores de 23,81 mg de proteínas, pH 6,5 e 7 h de agitação.

Os valores de temperatura e pH ótimos para  $\beta$ -glicosidase imobilizada foram 50 °C e 5,5, respectivamente. A enzima imobilizada foi estável a 30°C, enquanto a 50°C perdeu 47% da atividade após 1 h de incubação.

A  $\beta$ -glicosidase imobilizada apresentou meia-vida de 7 ciclos, sofreu redução de 75% de sua atividade em 13 ciclos, foi fortemente inibida por HgCl<sub>2</sub> e glucona- $\delta$ -lactona e ativada por MnCl<sub>2</sub> e MnSO<sub>4</sub>.

A aplicação da  $\beta$ -glicosidase imobilizada em extrato aquoso de soja mostrou-se eficiente na liberação de glicose e, portanto, na liberação de isoflavonas agliconas.

## **CONSIDERAÇÕES FINAIS**

O estudo envolvendo imobilização de  $\beta$ -glicosidase extraída de cotilédones de soja é inédito e os resultados obtidos neste trabalho iniciam novas perspectivas para a sua aplicação. Então é necessário dar continuidade dos estudos para otimização das condições de imobilização e emprego de novos suportes para possível aplicação industrial.

**ANEXOS**

## ANEXO A

**Tabela 1** - Coeficientes de regressão, efeitos estimados e erros padrão das variáveis  $X_1$  (concentração de glutaraldeído),  $X_2$  (pH) e  $X_3$  (tempo de agitação) no DCCR da etapa de ativação dos grânulos de quitosana com glutaraldeído.

| Variáveis <sup>1</sup> | $R^2 = 0,85704$           |          |             |
|------------------------|---------------------------|----------|-------------|
|                        | Coeficientes de regressão | Efeitos  | Erro padrão |
| Média                  | 25,47786                  | 25,47786 | 0,540342    |
| $\times_1$ G (L)*      | 4,60568                   | 9,21136  | 0,507796    |
| $\times_1$ G(Q)*       | -2,91901                  | -5,83802 | 0,559427    |
| $\times_2$ pH (L)*     | 7,38206                   | 14,76413 | 0,507796    |
| $\times_2$ pH (Q)      | 0,00581                   | 0,01161  | 0,559427    |
| $\times_3$ T (L)*      | 2,09331                   | 4,18662  | 0,507796    |
| $\times_3$ T (Q)*      | 2,75170                   | 5,50339  | 0,559427    |
| G (L) x pH (L)*        | -4,41625                  | -8,83250 | 0,663174    |
| G (L) x T (L)          | -0,93375                  | -1,86750 | 0,663174    |
| pH (L) x T (L)         | -1,17625                  | -2,35250 | 0,663174    |

<sup>1</sup>Variáveis - G: % de glutaraldeído; T: tempo de agitação/repouso; Efeitos - L: linear; Q: quadrático.

\*Valores significativos ( $P < 0,05$ )

## ANEXO B

**Tabela 2** – Análise de variância (ANOVA) para o modelo que representa a taxa de imobilização pelas variáveis X1 (concentração de glutaraldeído), X2 (pH) e X3 (tempo de agitação) na etapa de ativação dos grânulos de quitosana com glutaraldeído.

| <b>R<sup>2</sup> = 0,85704</b> |                 |    |          |          |          |
|--------------------------------|-----------------|----|----------|----------|----------|
| Variáveis <sup>1</sup>         | Soma quadrática | GL | QM       | F        | P        |
| × <sub>1</sub> G (L)*          | 289,4376        | 1  | 289,4376 | 329,0559 | 0,003025 |
| × <sub>1</sub> G(Q)*           | 95,792          | 1  | 95,7919  | 108,9040 | 0,009058 |
| × <sub>2</sub> pH (L)*         | 743,572         | 1  | 743,5718 | 845,3522 | 0,001181 |
| × <sub>2</sub> pH (Q)          | 0,000           | 1  | 0,0004   | 0,0004   | 0,985321 |
| × <sub>3</sub> T (L)*          | 59,791          | 1  | 59,7908  | 67,9750  | 0,014394 |
| × <sub>3</sub> T (Q)*          | 85,125          | 1  | 85,1255  | 96,7775  | 0,010176 |
| G (L) x ×pH (L)*               | 156,026         | 1  | 156,0261 | 177,3830 | 0,005590 |
| G (L) x T (L)                  | 6,975           | 1  | 6,9751   | 7,9299   | 0,106363 |
| pH (L) x T (L)                 | 11,069          | 1  | 11,0685  | 12,5836  | 0,071098 |
| Lack of fit*                   | 252,326         | 5  | 50,4652  | 57,3729  | 0,017219 |
| Erro puro                      | 1,759           | 2  | 0,8796   |          |          |

<sup>1</sup>Variáveis - G: % de glutaraldeído; T: tempo de agitação/repouso; Efeitos - L: linear; Q: quadrático.

\* Valores significativos ( $P < 0,05$ )

## ANEXO C

**Tabela 3** - Coeficientes de regressão, efeitos estimados e erros padrão das variáveis X1 (teor de proteína), X2 (pH) e X3 (tempo de agitação) no DCCR da etapa de imobilização de  $\beta$ -glicosidase de cotilédones de soja em grânulos de quitosana.

| Variáveis <sup>1</sup>             | <b>R<sup>2</sup> = 0,77316</b>   |                |                    |
|------------------------------------|----------------------------------|----------------|--------------------|
|                                    | <b>Coeficientes de regressão</b> | <b>Efeitos</b> | <b>Erro padrão</b> |
| Média                              | 54,6225                          | 54,6225        | 1,455870           |
| × <sub>1</sub> mg de proteína (L)* | 9,3448                           | 18,6896        | 1,367378           |
| × <sub>1</sub> mg de proteína(Q)*  | -3,7054                          | -7,4108        | 1,504999           |
| × <sub>2</sub> pH (L)*             | 8,0080                           | 16,0160        | 1,367378           |
| × <sub>2</sub> pH (Q)*             | -11,0151                         | -22,0302       | 1,504999           |
| × <sub>3</sub> T (L)*              | -10,3231                         | -20,6462       | 1,367378           |
| × <sub>3</sub> T (Q)               | -2,3283                          | -4,6566        | 1,504999           |
| G (L) x pH (L)                     | -0,5138                          | -1,0275        | 1,786566           |
| G (L) x T (L)                      | 0,9113                           | 1,8225         | 1,786566           |
| pH (L) x T (L)                     | -2,7213                          | -5,4425        | 1,786566           |

<sup>1</sup>Variáveis - T: tempo de agitação/repouso; Efeitos - L: linear; Q: quadrático.

\*Valores significativos ( $P < 0,05$ )

## ANEXO D

**Tabela 4** – Análise de variância (ANOVA) para o modelo que representa a taxa de imobilização pelas variáveis X1 (teor de proteína), X2 (pH) e X3 (tempo de agitação) na etapa de imobilização de  $\beta$ -glicosidase de cotilédones de soja em grânulos de quitosana.

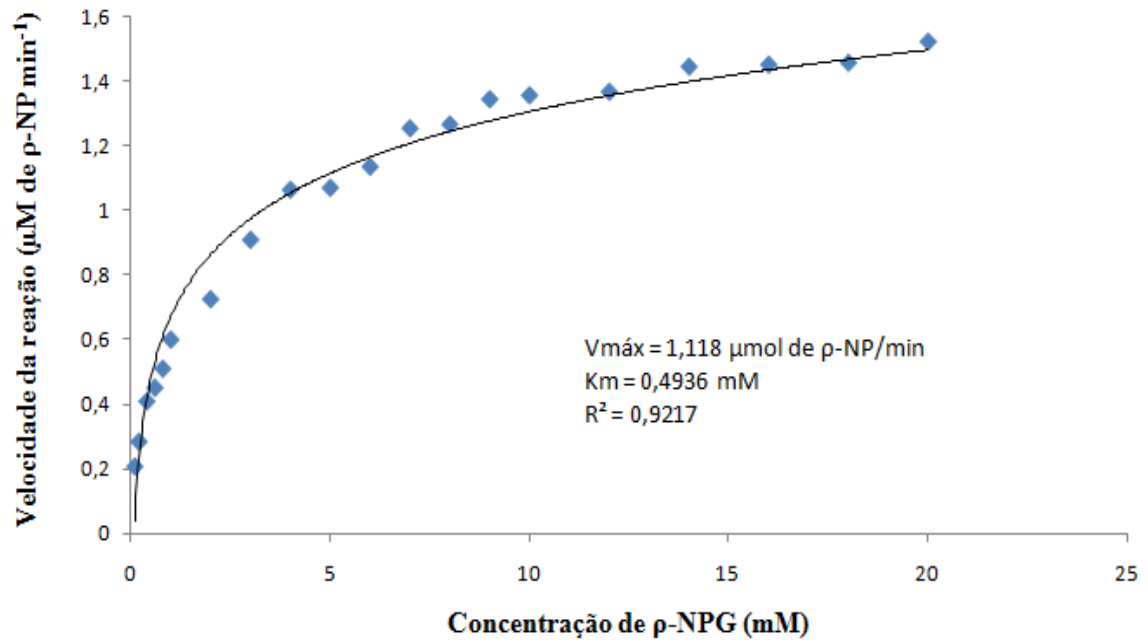
| <b>R<sup>2</sup> = 0,77316</b>     |                    |    |          |          |          |
|------------------------------------|--------------------|----|----------|----------|----------|
| Variáveis <sup>1</sup>             | Soma<br>quadrática | GL | QM       | F        | P        |
| × <sub>1</sub> mg de proteína (L)* | 1192,592           | 1  | 1192,592 | 186,8202 | 0,005310 |
| × <sub>1</sub> mg de proteína (Q)* | 154,782            | 1  | 154,782  | 24,2467  | 0,038855 |
| × <sub>2</sub> pH (L)*             | 875,784            | 1  | 875,784  | 137,1921 | 0,007210 |
| × <sub>2</sub> pH (Q)*             | 1367,829           | 1  | 1367,829 | 214,2712 | 0,004635 |
| × <sub>3</sub> T (L)*              | 1455,364           | 1  | 1455,364 | 227,9837 | 0,004358 |
| × <sub>3</sub> T (Q)               | 61,112             | 1  | 61,112   | 9,5733   | 0,090501 |
| G (L) x ×pH (L)                    | 2,112              | 1  | 2,112    | 0,3308   | 0,523285 |
| G (L) x T (L)                      | 6,643              | 1  | 6,643    | 1,0406   | 0,414985 |
| pH (L) x T (L)                     | 59,242             | 1  | 59,242   | 9,2802   | 0,092973 |
| Lack of fit*                       | 1447,095           | 5  | 289,419  | 45,3377  | 0,021721 |
| Erro puro                          | 12,767             | 2  | 6,384    |          |          |

<sup>1</sup>Variáveis - T: tempo de agitação/repouso; Efeitos - L: linear; Q: quadrático.

\* Valores significativos ( $P < 0,05$ )

## ANEXO E

**Figura 1** - Efeito da concentração de  $\rho$ -NPG (mM) na atividade de  $\beta$ -glicosidase de cotilédones de soja imobilizada em grânulos de quitosana (Gráfico de Michaelis-Menten).



## ANEXO F

**Figura 2** - Grânulo de quitosana 1% ativado com glutaraldeído.

