

CAPÍTULO II – O ESTUDO DA CINÉTICA DE REACÇÕES ENZIMÁTICAS NA FORMA LIVRE E IMOBILIZADA

Pretende-se, com este capítulo estudar a cinética dos enzimas – coagulantes do leite e de lipases em reacções bioquímicas para diferentes condições de temperatura, pH, avaliando o tempo de coagulação e a formação de ácidos por medição com um eléctrodo de pH, respectivamente.

Imobilizou-se o biocatalisador pelo método da oclusão com alginato de sódio e verificou-se a eficiência da actividade enzimática na forma livre e imobilizada.

Demonstrou-se a importância dos enzimas e da biocatálise desde o uso doméstico até à utilização Industrial Biotecnológica.

A- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1- INTRODUÇÃO AO CONCEITO DE BIOCATALISADOR

Os biocatalisadores são substâncias que intervêm nas reacções biológicas, promovendo o aumento da velocidade da reacção e uma subsequente diminuição da energia de activação da reacção. Salienta-se ainda, que se pode pensar na reutilização do catalizador, recorrendo aos processos de imobilização.

Os enzimas são biocatalisadores (proteínas) capazes de catalizar uma reacção bioquímica *in vivo* ou *in vitro*. Para exercerem as suas funções, por vezes, os enzimas estão associados a co-factores, geralmente iões metálicos (oligoelementos). Porém estes não estão permanentemente ligados aos enzimas, mas na ausência deles o enzima é inactivo. A fracção proteica na ausência do seu cofactor é denominada por Apoenzima; na presença do mesmo de Holoenzima. Designa-se de Coenzima, se o cofactor for uma molécula orgânica (Campos, 1999).

Os enzimas são extremamente eficientes, aumentam a velocidade da reacção sem interferir no processo, actuam em concentrações baixas, em determinadas condições de pH e temperatura.

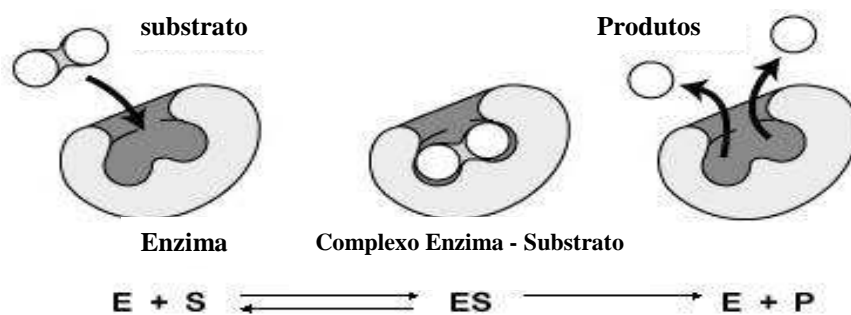


Figura 2.1 – Esquema da reacção bioquímica dos enzimas (adaptado de Marques *et al.*, 1999).

O enzima liga-se a uma molécula de substrato numa região específica denominado centro activo (Figura 2.1). As moléculas do substrato passam por uma série de formas geométricas e electricamente alteradas antes de formarem os produtos da

reação e a energia livre destes intermediários, especialmente aquelas que se encontram em estados de transição mais instáveis, são os mais determinantes da velocidade da reação. Os enzimas têm muito maior afinidade por estes estados de transição do substrato do que têm por formas mais estáveis, como esta interação diminui a energia destes estados de transição críticos os enzimas aceleram uma determinada reação.

Em 1894, Emil Fischer propôs um modelo chave-fechadura para explicar a ação enzimática, onde o enzima se liga ao substrato específico no centro activo, como uma chave e fechadura (representação na figura 2.2).

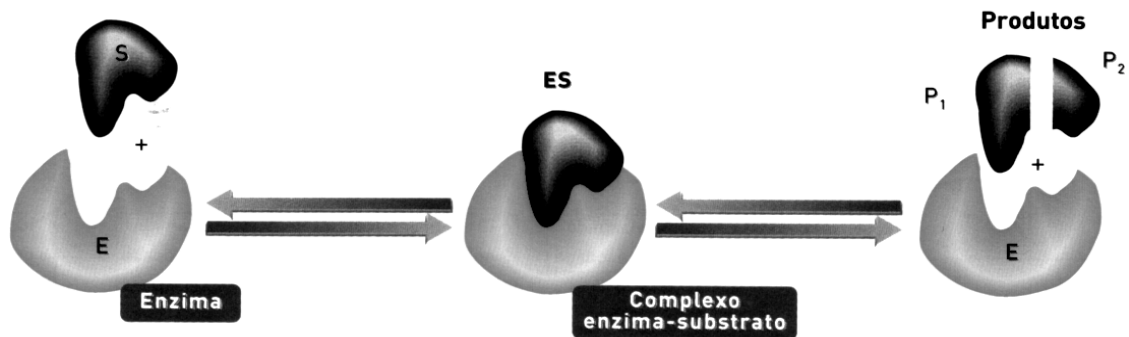


Figura 2.2 – Representação do modelo Emil Fisher – Complementaridade estrutural (chave fechadura). Extraído de Marques *et al.*, 1999.

Quando, tanto o enzima como o substrato sofrem conformação para o encaixe, e o enzima não aceita simplesmente o substrato, há uma distorção para a conformação exacta com o centro activo. Neste caso é denominado encaixe por indução e foi proposto por Koshland (figura 2.3).

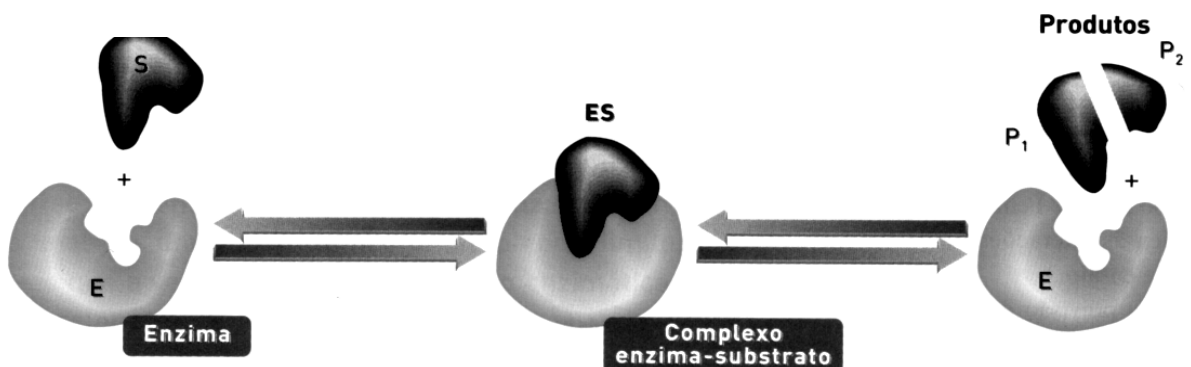


Figura 2.3. Representação do Modelo de Koshland - Encaixe induzido (extraído de Marques *et al.*, 1999).

A cinética enzimática proporciona uma melhor compreensão do mecanismo dos enzimas. A velocidade de reacção pode definir-se como a variação da concentração de produto da reacção formado por unidade de tempo ou como a variação do consumo do substrato da reacção formado por unidade de tempo. Sabe-se, no entanto, que a velocidade da reacção não se mantém constante no tempo, decrescendo progressivamente. Assim, é necessário indicar a que tempo se refere uma certa velocidade. A velocidade inicial v_0 , numericamente igual ao declive da recta tangente à curva de variação da concentração de produto formado em função do tempo (figura 2.4).

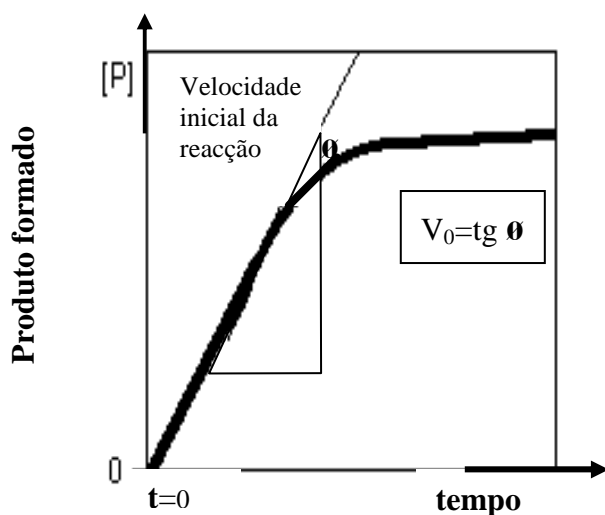


Figura 2.4 – Velocidade inicial igual ao declive da recta tangente à curva (adaptado de Ferreira J.P, 1997).

Um dos modelos de interpretação cinética muito relevante deve-se aos trabalhos de Leonor Michaelis e Maud Menten cuja representação da reacção enzimática é a seguinte (figura 2.5):

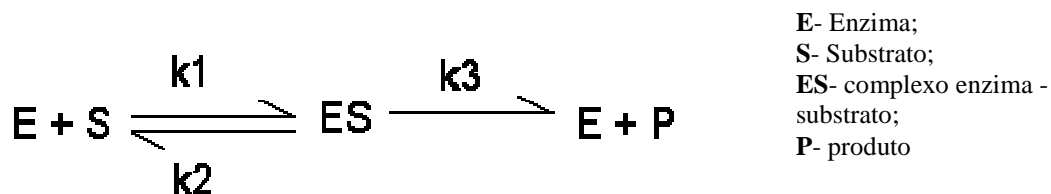


Figura 2.5. – Representação de uma reacção enzimática (adaptado de Campos, 1999).

O passo determinante da reacção é a transformação do complexo ES (enzima/substrato) em P (Produto), por ser o mais lento. A velocidade de formação do produto depende da concentração do complexo enzima-substrato, que por sua vez depende da concentração de enzima, da concentração de substrato da relação k_1 / k_2 e de k_3 . Nestas condições a velocidade da reacção é máxima ($v_{M\acute{a}x.}$) na situação de toda a enzima ter os centros activos ocupados (figura 2.6). Quando a concentração de substrato é constante e em excesso, a velocidade de formação de produto é directamente proporcional à concentração do enzima (Ferreira, 1997)

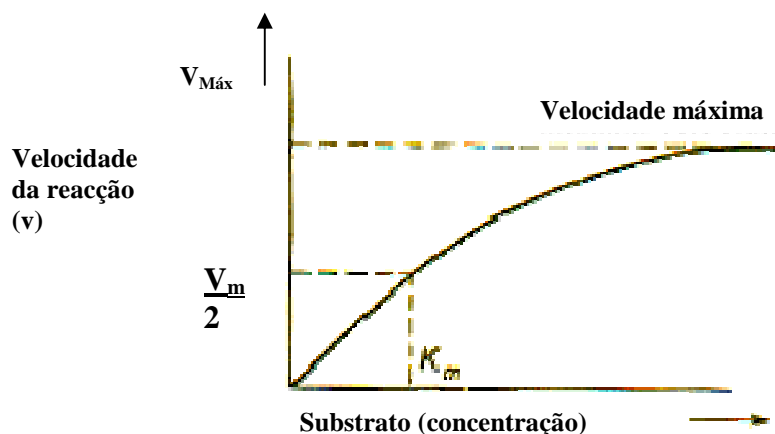


Figura 2.6 – Efeito da concentração de enzima na velocidade da reacção (adaptado de Campos, 1999).

A concentração de substrato necessária para obter metade da velocidade máxima é definida como a constante de Michaelis (K_M), e é expressa em moles de substrato por litro de solução. A constante de Michaelis representa portanto, a concentração de substrato necessária para saturar metade da quantidade de enzima e é característica de cada enzima (Figura 2.7), ou seja, permite o estudo da velocidade da reacção do enzima, na formação de produto por minuto.

$$v = \frac{V_{max} \cdot [S]}{K_M + [S]}$$

Figura 2.7 – Representação da equação de Michaelis-Menten. (Wong *et al.*, 1994).

A determinação das constantes cinéticas características de uma enzima ($K_M, V_{M\acute{a}x}$), a partir da representação hiperbólica de v_0 em função de $[S]$, é pouco exacta, dado v ser um valor assintótico. Assim, torna-se necessário recorrer a formas linearizadas da equação de Michaelis-Menten. A mais utilizada é a representação de Lineweaver-Burk, de $1/v_0$ em função de $1/[S]$ que se obtém invertendo a equação. Neste gráfico (figura 2.8), os pontos experimentais deverão ajustar-se a uma recta, que cruza o eixo das ordenadas em $1/v$, e o eixo das abcissas em $-1/k_M$; o declive dessa recta é igual a K_M/v (Ferreira, 1997 ; Campos, 1999).

A figura 2.8, representação gráfica de Lineweaver-Burk, baseia-se nos dados de velocidade inicial, em função da concentração de substrato, segundo o comportamento cinético de Michaelis-Menten (Wong *et al.*, 1994).

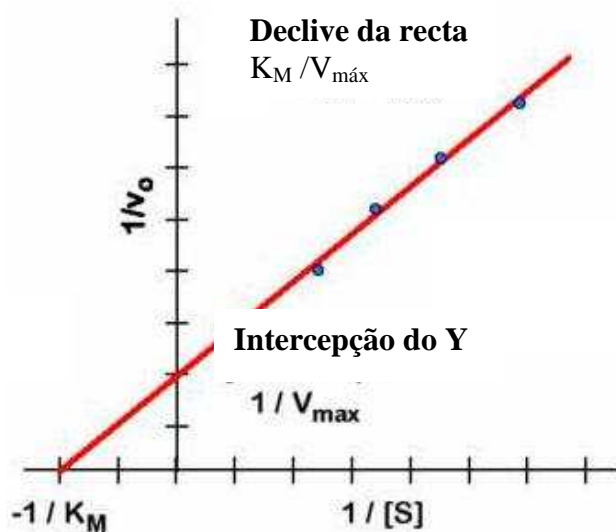


Figura 2.8.- Gráfico de representação linear de Lineweaver-Burk (adaptado de Wong *et al.*, 1994).

2- ENZIMAS COAGULANTES DO LEITE

2.1- ORIGEM VEGETAL – *Cynara cardunculus* L.– CARDU

O cardo, *Cynara cardunculus* L., tal como outras plantas, pertencentes a variadíssimas famílias como, Bromeláceas, Compostas, Euforbiáceas, Muráceas,

leguminosas e plantas carnívoras tem em comum o facto de possuírem em determinados órgãos e/ ou nas secreções uma elevada concentração de enzimas proteolíticas, entre outras, com elevada capacidade coagulante. Foram feito estudos destes enzimas, em particular nas figueiras, papaína, ananás e cardo e têm sido aplicados actualmente na indústria.

O cardo tem sido tradicionalmente utilizado, em Portugal, no fabrico do queijo e nos últimos anos, as indústrias de queijo, e as que tem em particular o selo DOP (Denominação de origem protegida), têm destacado a importância dos agentes coagulantes, nomeadamente os vegetais, do leite.

CARACTERÍSTICAS: A espécie *Cynara cardunculus* L, vulgarmente conhecida em Portugal por cardo, cardo de coalho, cardo coalhador, coalha-leite, cardo-santo e cardo hortense (Gardê *et al.*, 1988, cit. Gomes, 2002), classifica-se por pertencer à família das Compositae, sub-família da Tubuliflorae e género *Cynara*.

Planta herbácea vivaz (planta perene que apresenta crescimento anual) (Godinho *et al.*, 1994), com um caule erecto, podendo atingir ciclos de metro e meio de altura, densamente coberto por folhas basais grandes, espinhosas e lanceoladas penatipartidas (**c**) figura 2.9), com o segmento terminal maior que os laterais e todos penatifendidos (**d**) figura 2.9), tendo na parte adaxial (parte superior- **a**) e abaxial (parte inferior- **b**) coberta por tomentos (Godinho *et al.*, 2006).



Figura 2.9 – Fotografias da *Cynara cardunculus* L. localizando as diferentes estruturas que a constituem (Adaptado Godinho *et al.*, 2006).

Os caules terminam em inflorescências de capítulos globulosos de cor azul violeta (e) figura 2.9) com as brácteas prolongadas em espinho forte patente (f) figura 2.9) as flores, com um receptáculo onde se desenvolve o fruto. Os frutos são pequenos aquênios usados como sementes, têm cor acastanhada, são oblongos, ligeiramente espalmados e têm um poder germinativo de cinco anos, mas também se podem propagar por multiplicação vegetativa, sendo a altura ideal em Maio (Cermeño, 1988 e Maroto, 1986 cit. Gomes 2005).

Quanto às raízes, estas assemelham-se às das alcachofras, raízes profundantes e muito penetrantes.

LOCALIZAÇÃO: É originária da bacia Mediterrânica já era conhecida pelos antigos Egípcios, Gregos e Romanos. Actualmente esta planta surge espontaneamente a Sul e Oeste da região Mediterrânea e nos bordos dos caminhos e estradas. Em Portugal na parte Centro e Sul e na Madeira. (Ferreira, 1998). Curiosamente foi introduzida na

Argentina pelos Espanhóis, onde se desenvolveu rapidamente nas pampas, formando grandes “cardais” e tornando-se numa praga (Castro, 1981 cit. Ferreira, 1998).

CARACTERÍSTICAS EDAFO-CLIMÁTICAS: Desenvolve-se em condições muito severas, em solos pedregosos (bordos da estrada e ladeiras, lugares incultos ou de pouso) e sob stress hídrico, tendo uma grande capacidade de adaptação climática e apresentando vários ciclos ao longo da sua existência (Godinho *et al.*, 1994). Esta planta cresce espontaneamente, tendo o seu ciclo início com a germinação de sementes, no final do Verão aquando as primeiras chuvas, e nos meses seguintes, as plantas desenvolvem-se formando uma roseta de folhas, e passando o Inverno no estado vegetativo (Morbey, 1990 cit. Gomes, 2005). A floração desta espécie é sazonal (Junho e Julho).

APLICAÇÃO DO CARDO: O cardo devido às suas características particulares, tem para além da sua aplicação no fabrico do queijo, outras utilidades com fins terapêutico (tabela A₁).

Tabela A₁ - Representação das aplicações de *Cynara cardunculus*. (Adaptado de Castro (1981) e Pereira Coutinho (1939) cit. Ferreira, 1998)

PARTE DA PLANTA UTILIZADA	APLICAÇÃO
Raiz	• Febrífuga
Folhas	• Estimulante hepático, vesicular e renal • Promove a eliminação da arterioesclorose. • Tratamento da anemia. • Reumatismo
Capítulos (flores)	• Coalha o leite (fabrico de queijo)

A flor do cardo, após a colheita, tem de ser cuidadosamente preparada (a secagem natural deverá ser suficiente para assegurar a sua conservação - secagem rápida, para 30 dias, conduz a uma redução da actividade enzimática), para conservar

em condições de se poder utilizar, pois facilmente sofre contaminações, nas quais se desenvolvem bolores e outros microrganismos, susceptíveis de a degradar.



Figura 2.10 – Fotografia demonstrativa da “apanha” da *Cynara cardunculus*.

A actividade microbiana não pode ser degradada na totalidade. Sabe-se contudo, que determinada flora microbiana é necessária para sua manutenção (cardo) na altura da sua utilização e que tem um importante papel no sabor do produto final. Assim é necessário e importante encontrar novas formas de conservação do extracto do cardo. Durante o desenvolvimento do Projecto AGRO 281-Valorização do queijo de cabra curado na serra algarvia (DRAPALG/FERN - UALG) foi patenteada uma forma de congelação do extracto da flor com elevado grau de assepsia.

2.1.1. CARACTERIZAÇÃO DOS ENZIMAS COAGULANTES PRESENTES NA *CYNARA CARDUNCULUS* L.

A espécie *Cynara cardunculus* L. apresenta agentes coagulantes no capítulo floral, na parte azul-violeta (época de floração Junho/ Julho). Em estudos realizados por Barbosa (1983) citado por Gomes, 2005, confirmam que a maior concentração de substância coagulante está na parte superior do estiole, estando a actividade coagulante restrita ao pistilo (Pires *et al.*, 1997). Esses agentes são proteínases aspárticas, que

foram isoladas e purificadas e parcialmente caracterizadas por Hemingartner e colaboradores, (1990) citado por Gomes (2005), que as denominaram por ciprosinas e posteriormente, caracterizadas por Faro e colaboradores (1992), denominando-as por cardosinas. As proteínases aspárticas são um grupo de enzimas com uma estrutura tridimensional semelhante, estão distribuídas na natureza e tem importância na regulação de sistemas biológicos, como precursores de proteínas (proteínas retrovirais), regulação sanguínea entre outros. Além disso, julga-se que as proteínas aspárticas das plantas estejam, também envolvidas na hidrólise e armazenamento de proteínas intracelulares (Pires *et al.*, 1994 cit. Gomes, 2005). As duas formas isoladas de cardosinas que encontramos nos estigmas da florescência de *Cynara cardunculus* são do tipo A e B (Veríssimo *et al.* 1996, e Pires *et al.*, 1994, cit. Gomes 2005). Ambas as cardosinas são constituídos por duas sub-unidades, com massa molecular aparente de 31KDa e 15KDa, para a cardosina A e de 34KDa e 14KDa, para a cardosina B. Apresentam actividade em pH que varia entre 2 e 7, sendo a actividade máxima no valor pH-5,5. Contudo, fazendo uma extracção a pH 3 obtêm-se extractos aquosos com maior actividade coagulante (Pires *et al.*, 1994 cit Gomes, 2005), e em condições de pH alcalino caracterizam-se por elevada instabilidade (Cabezas *et al.*, 1982 cit. Gomes, 2005). Alguns autores sugerem que as cardosinas são endopeptidases e também glicoproteínas como refere Faro *et al.*, (1992) e Salgueiro (2002), respectivamente. Ambas as cardosinas mantêm actividade a 60 °C, contudo a estabilidade a elevadas temperaturas é relativamente baixa. Segundo Veríssimo *et al.* (1995), citado por Gomes (2005), como na maioria das outras proteínases aspárticas, as cardosinas clivam preferencialmente péptidos em bandas entre resíduos hidrofóbicos. A cardosina B apresenta maior especificidade que a cardosina A, contudo ambas mostraram preferência por bandas de péptidos com lugar nas cadeias hidrofóbicas. A cardosina A

hidrolisa o péptido na banda Leu15-Tyr16; Leu17-Val18 e Phe25-Tyr26; a clivagem pela cardosina B foi encontrada em Glu13-Ala14; Ala14- Leu15; Leu15-Tyr16; Leu17-Val18; Phe24-Phe25 e Phe25 (figura 2.11).

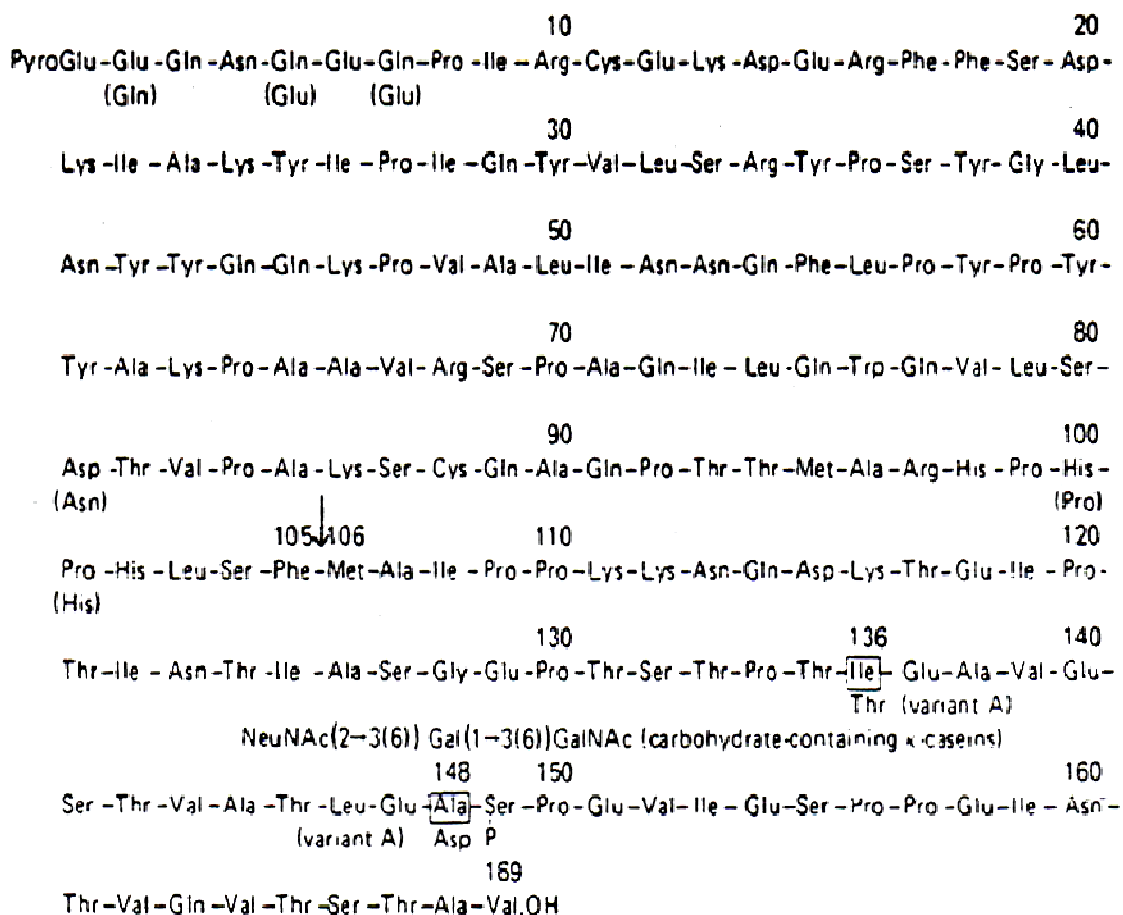


Figura 2.11 – Estrutura primária da caseína k do leite de vaca. Os aminoácidos incluídos no retângulo correspondem a mudanças genéticas. As setas indicam o ponto de ataque da quimosina. Os aminoácidos entre parênteses indicam as diferenças encontradas por outros autores (Whitney *et al.*, 1976 cit. Esquivel, 1987).

2.2-ORIGEM ANIMAL - COALHO COMERCIAL

O coalho comercial é normalmente de origem animal e obtido a partir das glândulas gástricas dos vitelos não desmamados contém quimosina (88% a 94%) e pepsina (6% a 10%). A quimosina é um enzima muito específico, hidrolisando a ligação fenilalalina-metionina da caseína k. O seu papel fisiológico é muito restrito, pois serve

unicamente para a coagulação do leite nos animais que estão no seu período de lactação. A pepsina tem uma maior acção proteolítica degradando uma grande variedade de proteínas. Este enzima começa a ser necessário quando o animal deixa de ter o leite como única fonte alimentar (Raymond and Bricas, 1979 e Ramet, 1984 cit. Esquível, 1987). Comparando os dois enzimas podemos dizer que a quimosina actua especificamente como agente coagulante apresentando um óptimo de pH próximo da neutralidade (pH 6,2 a 6,4), enquanto a pepsina tem um poder proteolitico muito intenso, situando-se o óptimo de actividade em meio ácido (pH 1,7 a 2,3) (Raymond and Bricas, 1979 e Ramet, 1984 cit. Esquível, 1987). Como a quimosina possui maior poder coagulante que proteolítico, é mais apropriado para o fabrico de queijo do que a pepsina. Industrialmente estas duas enzimas são utilizadas em misturas cujas proporções variam conforme as fórmulas comerciais. Quanto maior a quantidade de quimosina na mistura melhor será o coalho. O facto dos coalhos não acusarem grande poder proteolítico, apesar de possuírem pepsina, deve-se em parte à baixa de concentração desta e por outro, à sua fraca actividade por estar a actuar longe do seu óptimo de pH. Devido à escassez mundial de coalho animal tem-se vindo a experimentar extractos enzimáticos provenientes do sistema digestivo de outros animais ruminantes, como os borregos novos, cabritos, porcos e frangos. Contudo, o estômago do frango e do porco contém unicamente pepsina, em contraste com os sucos gástricos dos ruminantes que em regra contêm quimosina e pepsina.

3. LEITE

3.1. CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E FÍSICA

PROTEÍNAS

O leite contém dois tipos de proteínas diferentes quanto à sua solubilidade:

- uma fracção solúvel constituída por albuminas, imunoglobulinas, entre outras que representam 15 a 22% de teor proteico;
- uma fracção coloidal que é instável, constituída por um complexo de micelas de caseína e de fosfato de cálcio que representam cerca de 78 a 85% do teor proteico total do leite.

A **caseína** é a principal proteína do leite (Scott, 1991 cit. Gomes, 2005). As fosfoproteínas; tem elevada quantidade de resíduos apolares o que faz com que sejam, entre todas as outras proteínas, as mais hidrofóbicas; possuem elevados teores de ácido glutâmico e prolina, apresentam nas suas duas cadeias peptídicas segmentos com carga e polaridade diferentes. Distinguem-se umas das outras pelo número de grupos fosforilados (Luquet, 1985 cit. Gomes, 2002), pela presença ou ausência de glícidos, de cisteína, e por apresentarem maior ou menor grau de hidrofobia. Assim, diferenciamos quatro tipos de caseínas, como (α_{s1} , α_{s2} , β e k) em que a sua percentagem varia com o tipo de leite a que está associado à presença ou ausência de glícidos. Destas destaca-se em particular a k-caseína, por ser responsável pelo desencadeamento do processo de coagulação (Von, 2006). As caseínas não se encontram isoladas formam entre os seus diferentes tipos, associações estáveis denominadas suspensões micelares. A estabilidade no meio aquoso do leite deve-se ao baixo teor em fósforo e à riqueza de glícidos da k-caseína. A desestabilização pode ser causada por diferentes tipos de factores físico-

químicos, como a variação de pH, variação de temperatura ou pela presença de enzimas. Este último processo é normalmente utilizado no fabrico de queijo (Von *et al.*, 2006).

3.2. PROCESSO DE COAGULAÇÃO DO LEITE

A coagulação do leite é uma reacção bastante complexa, em que o leite no estado líquido se transforma num gel branco designado por coalhada ou coágulo. O fabrico do queijo inicia-se pelo processo de desestabilização das micelas de caseína, em especial a k-caseína, e desencadeia todo o processo de coagulação formada por uma rede proteica.

Para a coagulação ocorrer é necessário que haja uma clivagem na ligação Phe105-Met106 da k-caseína (figura 2.11-pp.17). A k-caseína é a única proteína, que é uma glicoproteína, contendo galactose, galactosamina e ácido siálico, contém glícidos, possui propriedades hidrófilicas e exibe uma maior solubilidade na presença do ião cálcio, pois as outras caseínas, α_{s1} e α_{s2} são ricas em fósforo, logo precipitam mais facilmente (Yahyaoui, 2003 cit. Gomes, 2005). O processo de coagulação do leite consiste na precipitação do sistema proteico principal (as caseínas) arrastando consigo as gorduras, que ficam aprisionadas no coágulo (figura 2.12). Os restantes constituintes solúveis do leite, tais como as restantes proteínas, a lactose, algumas vitaminas e alguns sais minerais, vão constituir o soro que será removido.

A coagulação do leite compreende duas fases distintas, uma enzimática outra não enzimática (Berridge, 1942 cit. Esquível, 1987). No fabrico de queijo estas duas fases sobrepõem-se consideravelmente. A fase enzimática corresponde a uma proteólise muito limitada e específica das caseínas, pois a única proteína que se divide é a k-caseína (Yahyaoui, 2003 cit. Gomes, 2005) a nível da ligação fenilalanina 105 e

metionina 106 (Phe105-Met106). Esta ligação 105-106 é muito lábil (a sua fragilidade aumenta com o aumento da cadeia de aminoácidos), daí ser a primeira ligação a ser quebrada pelas enzimas proteolíticas.

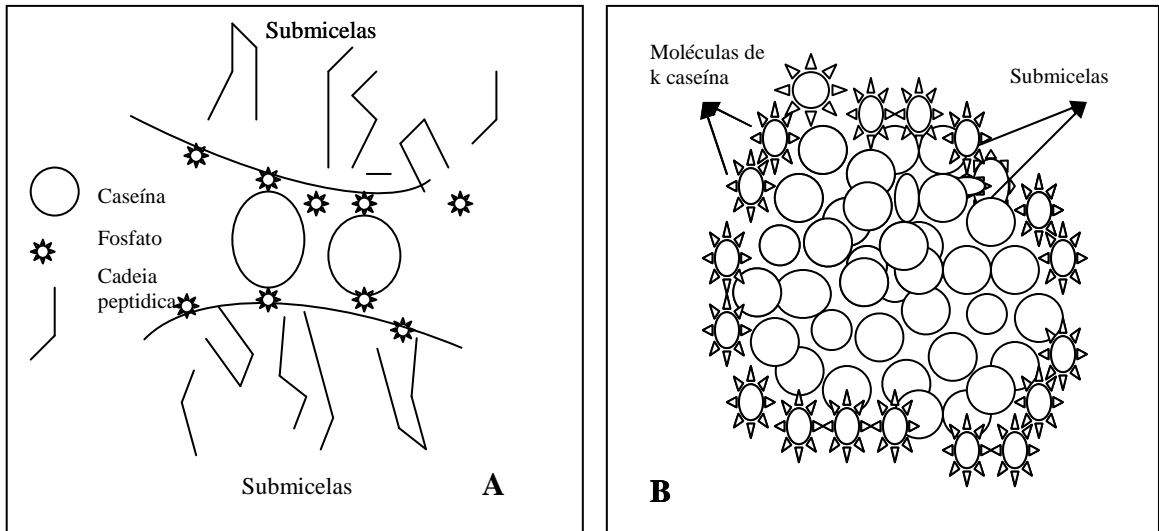


Figura 2.12 – **A**- Aspecto molecular da ligação; **B**- Localização periférica da k-caseína entre as micelas (adaptado de Schmidt, 1982 cit. Gomes, 2002).

No entanto, sabe-se que os aminoácidos que se encontram na proximidade desta ligação, também contribuem para que se dê a reacção que irá contribuir para a coagulação. Formar-se-ão dois segmentos de natureza diferente, um hidrofóbico e básico, designado por paracaseína-k e outro hidrofílico e ácido, chamado caseína macropéptido. O primeiro segmento peptídico fica ligado às outras caseínas e integrado nas micelas, enquanto o segundo se liberta ficando em solução. À medida que se vai processando a fase de hidrólise da k-caseína vai aumentando o número de micelas modificadas e conseqüentemente a sua agregação. Constituem-se cadeias de micelas o que leva à formação de um gel. Estas micelas vão-se inter cruzando dando origem a uma rede proteica, até que se atinge um ponto em que existe suficiente k-caseína hidrolisada para que a interacção entre as cadeias de micelas atinja um limite. Nesse ponto, o gel é termodinamicamente instável e destrói-se formando uma coalhada

compacta, quando há uma ruptura física. Dá-se a precipitação da malha de rede proteica, separando-se da fase aquosa.

Na comparação do coagulante de origem animal (quimosinas e pepsinas) e de origem vegetal (cardosinas-proteases aspárticas), não se distinguem diferenças durante o processo de coagulação, no entanto a actividade proteolítica é superior no coagulante de origem vegetal (Cabezo *et al.*, 1980 cit. Gomes, 2005). No caso da mistura de cardosinas com quimosinas, estas não apresentam uma relação linear, entre o tempo de coagulação e a concentração do enzima na coagulação do leite, como seria de esperar uma vez que se estabelece uma relação de competição entre a quimosina e a cardosina pela banda Phe105-Met106 (Picón *et al.*, 1995 cit. por Gomes 2005) (figura 2.11-pp.17).

Assim, um bom enzima para o fabrico de queijo caracteriza-se por um elevado poder coagulante e baixa actividade proteolítica, isto é, o enzima deverá romper rapidamente a ligação Phe105-Met106 da k-caseína, mas ter pouca actividade proteolítica em relação às outras caseínas (Pires *et al.*, 1994 cit. Gomes, 2005). Na presença de um excesso de proteólise das caseínas ocorre um abaixamento de rendimento e/ou aparecimento de sabores amargos.

O fenómeno de coagulação pode dar-se também por acidificação do leite. Ao pH normal do leite (pH 6,8), as caseínas apresentam um excesso de carga negativa. Isto acontece devido a grande parte dos aminoácidos de caseínas apresentarem os radicais ácidos ionizados (COO⁻), pois os pontos isoelectrónicos desses aminoácidos são inferiores ao pH do meio. As micelas estão por isso carregadas o que origina uma repulsão electrostática que se opõe à agregação micelar. A agregação resulta do abaixamento do pH que fará diminuir a repulsão electrostática entre as micelas, pois a maioria dos aminoácidos das caseínas deixam de estar carregados negativamente. Esta diminuição

das cargas negativas fará, também com que os sais minerais existentes passem para a solução destabilizando, também as micelas. Este modo de coagulação é observado quando o leite é inoculado com bactérias lácticas e incubado a temperaturas inconvenientes (20° a 25°C). O ácido láctico, produto da fermentação da lactose, baixa progressivamente o pH do leite. Quando se chega a pH próximos de 5 dá-se floculação das caseínas formando-se uma coalhada ácida. Esta transformação pode dar-se de uma forma espontânea, devido à acção do ácido láctico, proveniente da actividade microbiana existente no leite. Por essa razão a coagulação ácida é, por vezes designada coagulação espontânea.

As propriedades das coalhadas obtidas por uma coagulação enzimática são diferentes das obtidas por coagulação ácida.

Rebelo (1983), citado por Esquível (1987), caracteriza os dois tipos de coalhada:

- Coalhada ácida é muito delicada, tenra, pelo que pouco firme e coesa, possui textura áspera e granulosa, dificilmente forma soro, mesmo com intervenção mecânica. Neste caso, quase não tem cálcio, o qual sai sob a forma de lactato de cálcio, que é solúvel, o que justifica a designação de coalhada desmineralizada.

- Coalhada enzimática gelatinosa contráctil, pastosa elástica, flexível e quase impermeável, aumentando a sua consistência com a saída de soro, cujo grau de esgotamento pode ser mais ou menos controlado. O soro larga convenientemente por intervenção mecânica, é rico em sais de cálcio e o dessoramento nunca é completo.

4. LÍPIDOS

4.1. CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E FÍSICA

Nos últimos anos tem existido um crescente interesse na técnica de modificação de lípidos. Esta tendência deve-se essencialmente, ao facto desses materiais serem obtidos de fontes naturais e de serem importantes matérias-primas para a indústria farmacêutica e alimentar (Oskolkova *et al.*, 2003).

Os lípidos são biomoléculas orgânicas de carbono, hidrogénio e oxigénio e são estruturalmente heterogéneas, possuem uma reduzida solubilidade na água, sendo bastante solúveis em solventes orgânicos como o clorofórmio, éter, benzeno, etc (Castro *et al.*, 2004). Os componentes mais expressivos dos lípidos são os triglicéridos, e suas propriedades físicas dependem da estrutura e distribuição dos ácidos gordos presentes, estabelecendo ligações éster.

Os lípidos simples são constituídos por ácidos gordos e glicerol (figura 2.13 e 2.14), é considerado um álcool trivalente por possuir três grupos hidroxilo, que reagem com as moléculas de ácidos gordos estabelecendo ligações éster.

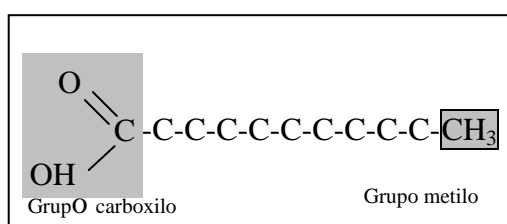


Figura 2.13 – Estrutura geral de um ácido gordo – ácido láurico (adaptado de Marques *et al.*, 1999).

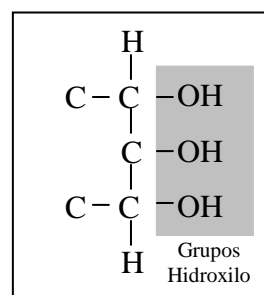


Figura 2.14 – Estrutura geral de um glicerol (adaptado de Marques *et al.*, 1999).

Por exemplo, existem monoglicéridos que resultam da reacção entre o grupo hidroxilo (OH) do glicerol e o grupo carboxilo (COOH) da molécula de ácido gordo

com a perda de uma molécula de água, ou triglicéridos, se os três hidroxilos do glicerol reagem com os carboxilos das três moléculas de ácidos gordos.

Os lípidos complexos podem ser constituídos por ácidos gordos e glicerol, para além de outras moléculas não lipídicas. Se essas moléculas forem de ácido fosfórico, os lípidos, denominar-se-ão fosfolípidos. Pertencentes a este grupo, encontram-se ainda, os lípidos que não possuem ácidos gordos nem glicerol, como é o caso dos esteróides (ex. colesterol).

Podem, ainda, ser classificados consoante o preenchimento das ligações à cadeia de carbono em Monoinsaturadas, como o azeite, nozes, amêndoas, amendoins; Polinsaturadas como os óleos vegetais e peixes, sendo os peixes azuis como o salmão, o carapau ou a sardinha e os frutos secos ricos em ácidos gordos ómega-3; as Saturadas como carnes e produtos lácteos gordos (leite, queijo, manteiga); e as Transaturadas como os produtos de pastelaria doces e salgados, bolachas, batatas fritas e margarinas para culinária.

Alimentos como azeite, a margarina, ou óleo extraídos, são constituídos quase na sua totalidade por lípidos e vestígios de vitaminas lipossolúveis (A e E).

No caso do azeite, quando colocado a temperaturas entre 0°C e 6°C sofre alterações: uma parte mantém-se líquida e amarelada, trata-se do ácido gordo oleína; a outra passa ao estado sólido – são os ácidos gordos de palmitina e linoleína.

A estrutura básica dos lípidos pode ser redesenhada por meio da modificação química dos ácidos gordos (hidrogenação), pela reversão da ligação éster (hidrólise) e reorganização dos ácidos gordos na cadeia principal dos triglicéridos (interesterificação) (Castro, *et al.*, 2004).

Existem, no entanto, casos em que a estrutura dos lípidos tem de ser alterada a fim de adequá-los a determinada aplicação, daí a indústria ser a responsável pelo

desenvolvimento de diversos processos para manipular a composição das misturas de triglicéridos (Lithauer *et al.*, 2001).

Assim, através da hidrólise obtém-se os produtos, de ácidos gordos e uma solução rica em glicerol, e também subprodutos que necessitam de ser removidos, através, por exemplo de destilação. Em seguida, os produtos da hidrólise poderão ser automaticamente utilizados ou convertidos em outros produtos.

O processo de interesterificação é normalmente empregue para modificar as características e as propriedades dos lípidos, através da alteração dos grupos glicéridos. Neste processo, são utilizados catalisadores alcalinos (ex. sódio metálico) que são responsáveis por prover a migração dos grupos acíla, para que os produtos formados sejam de resíduos de acíla de ácidos gordos distribuídos aleatoriamente (especialmente utilizado em margarinas).

No entanto, a obtenção destes produtos, em geral, tem as suas limitações, sem considerar processos de hidrogenação e de fraccionamento, e essas reflectem-se nos catalisadores que são utilizados, que são pouco versáteis e requerem altas temperaturas para atingir uma velocidade de reacção razoável.

4.2. LIPASES

Nos últimos anos, o estudo das lipases tem-se destacado, devido aos valores nutricionais dos lípidos, particularmente devido aos efeitos metabólicos associados ao consumo de glicéridos, que contêm níveis substanciais de resíduos específicos de ácidos gordos, levando ao desenvolvimento de novas tecnologias para a modificação de lípidos, de modo a aumentar e a potenciar os benefícios para a saúde, que resultam da ingestão dessas substâncias. Para além deste aspecto nutricional, também estudos

realizados nos últimos quatro anos têm permitido um melhor conhecimento da estrutura das lipases e das suas propriedades (Schrag *et al.*, 1996).

CARACTERÍSTICAS FÍSICAS E QUÍMICAS

Investigações feitas nas estruturas das lipases, desde as de origem microbiana (fungos, leveduras e bactérias), vegetais até às enzimas dos mamíferos, apresentam grande parte delas uma estrutura constituída por uma folha β hidrofóbica central entre duas camadas de hélices α amfifílicas (dobra entrelaçada α e β hidrolase), também comum à maior parte das hidrolases, logo são consideradas hidrolases. As lipases (hidrolases de triacilglicerol) catalisam a hidrólise de triglicérides insolúveis de cadeias longas e de outros ésteres ou ácidos gordos insolúveis (Pleiss *et al.*, 1998) tendo preferência nos substratos de acilglicerol (Castro *et al.*, 2004). Em contra partida as esterases restringem-se a ésteres hidrossolúveis de ácidos carboxílicos.

As lipases podem apresentar uma massa molecular que varie entre 20 a 75 Dka, uma actividade na faixa entre pH 4 a 9 e em temperaturas variando desde a ambiente até 70°C, estes factores dependem da sua fonte. São, normalmente estáveis em soluções aquosas neutras e à temperatura ambiente, no entanto grande parte delas apresenta actividade óptima em temperaturas entre 30 a 40°C. As lipases que apresentam maior estabilidade térmica são as de origem microbiana (Oskolkova *et al.*, 2003; Castro *et al.*, 2004).

O centro activo das lipases é formado por uma tríade catalítica constituída por aminoácidos: serina, ácido aspárico (ou glutâmico) e histaina; o resíduo nucleofílico de serina localiza-se no C-terminal da fita β 5 de um pentapeptídeo, altamente conservado formando uma “ β em torno de α ” designada cavidade nucleofílica. Este é estruturado por 8 fitas β diferentes (β_1 a β_2) conectadas com 6 α hélices (A a F) (Cygler *et al.*, 1994

cit. Pleiss *et al.*, 1998; Schrag *et al.*, 1996; Castro *et al.*, 2004; Santarossa, *et al.*, 2005)
(figura 2.15).

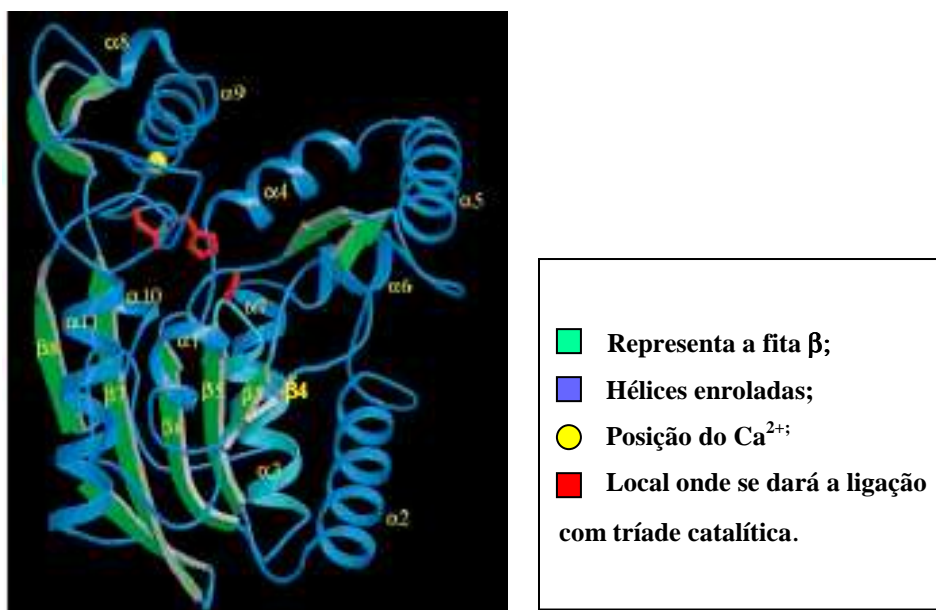


Figura 2.15- Representação da estrutura de uma lipase (*Pseudomonas cepacia*) (adaptado de Schrag *et al.*, 1996).

A hidrólise do substrato inicia-se com o ataque nucleofílico pelo oxigénio da serina do átomo de carbono carboxílico na ligação éster, levando à formação de um tetraédrico, estabilizado pelas ligações de hidrogénio, átomos de nitrogénio de resíduos da cadeia principal pertencente à cavidade de oxianião. Um álcool é libertado após a formação do complexo acil-lipase, o qual finalmente é hidrolisado com a libertação dos ácidos gordos e regeneração da enzima (Cygler *et al.*, 1994 cit. Pleiss *et al.*; Castro *et al.*, 2004).

As reacções lipolíticas ocorrem geralmente na interface água-lípido, podendo em alguns casos impedir que a cinética das reacções enzimáticas sejam descritas pelas equações de Michaelis-Menten, que são válidas apenas em reacções catalíticas que ocorram em meio homogéneo. Os substratos lipolíticos normalmente formam um

equilíbrio entre os estados monoméricos, micelas e emulsificados proporcionando um modelo para o estudo da cinética da lipase (Litthauer *et al.*, 2001).

A determinação da estrutura tridimensional proporciona uma explicação para a activação interfacial. Assim, o centro activo da lipase é coberto por uma superfície interlaçada denominada, por vezes por "tampa". Quando há ligação do substrato com a enzima esta tampa move-se, alterando a forma fechada do enzima para forma aberta, agora com o centro activo acessível, e ao mesmo tempo expõe uma grande superfície hidrofóbica que facilita a ligação da lipase à interface (Santarossa *et al.*, 2005).

As lipases para além de quebrarem as ligações de ésteres de triacilgliceróides com o consumo de moléculas de água, também são capazes de catalizar uma reacção reversa, sob as condições microaquosas, como por exemplo a formação de ligações ésteres, a partir de um álcool e ácido carboxílico (síntese de éster) (Oskolkova *et al.*, 2003). Estes dois processos básicos podem ser combinados numa sequência lógica para resultar em reacções de acidólise, alcoólise e transesterificação dependendo dos reagentes iniciais.

Quanto à sua especificidade, as lipases podem-se dividir em 3 grupos: as lipases não específicas, como *Cândida rugosa*, *Staphylococcus aureus*, *Chromobacterium viscosum*, *Pseudomonas* sp. Estas quebram as moléculas acilglicerol, produzindo ácidos gordos livres, glicerol, monoacilgliceróis e diacilgliceróis como intermediários. Os produtos são semelhantes aos produzidos por catálise química, mas com menor grau de termodegradação devido à temperatura na biocatálise ser inferior; as lipases específicas como *Aspergillus niger*, *Mucor javanicus*, *Shumicola lanuginosa*, *Cândida lipolytica* entre outras, libertam os ácidos gordos das posições 1 e 3 formando produtos diferentes às das anteriores, e até mesmo com catalizador químico; e as lipases ácido gordo específicas, são aquelas que são específicas para hidrólise de

ésteres, cujos ácidos gordos são de cadeias longas com dupla ligação em “cis” no carbono 9.

Algumas lipases têm a capacidade de ignorar a estereoespecificidade, não actuando sobre os enantiómeros. Desta forma, pode dizer-se que a especificidade e selectividade do enzima advém da quiralidade do mesmo, ou seja, da sua simetria estrutural que limita a sua acção em substratos que não tenham determinadas disposições espaciais. Desta forma, a catálise enzimática permite criar centros quirais nas moléculas assim como, distinguir formas enantiómeras (Litthauer *et al.*, 2001).

4.2.1. *PSEUDOMONA CEPACIA*

As lipases *Pseudomonas cepacias* são de origem bacteriana, não são específicas podendo ter actividade catalítica interfacial. Têm aplicações, por exemplo em detergentes comerciais.

As *pseudomonas* apresentam uma pequena homologia com as lipases procarióticas (Litthauer *et al.*, 2001) e questiona-se qual será a sequência de aminoácido que funcionará como precursor. Arpigny e Jaeger (1999), citados por Litthauer *et al.* (2001), sugerem uma nova classificação das lipases de origem bacteriana: a Família I *Pseudomona luteola* baixa; subfamília 2, formada por um grupo conjunto de *P. glumae*, *C. viscosum*, *Pseudomonas S5* e as *Ps cepacia* com uma cadeia de 320 resíduos. Nas lipases *P. glumae* e *C. viscosum* o precursor está entre a Ala 44 e Ala 45, a prolina estará na posição 1Ala aminoácido e na posição +1 na *Pseudomona cepacia*.

Comparando a especificidade da enzima *Pseudomona cepacia* com as outras enzimas de origem bacteriana de estrutura semelhante, a partir de ensaios realizados por Oskolkova *et al.*, (2003), Litthauer *et al.*, (2001) e Santorossa *et al.*, (2005), é verificável que o comportamento é muito semelhante nos perfis de temperatura e pH, na

estabilidade e selectividade do substrato. Destes estudos (em particular Oskolkova *et al.*, 2003) referem ainda as afinidades das lípases fosfonatadas, perante os inibidores (como, ácido metilpropanóico, ácido butanóico, ácido octanóico, ácido metil ester heptanóico e o perilenebutanoilamino), referindo num estudo comparativo com *Pseudomona cepacia*, *Pseudomonas species* e *Rhizopus oryzae*, que o inibidor de cadeia dupla de perilenebutanoilamino fosfanato, tem preferência na inibição das *Pseudomonas cepacias* e que todos os inibidores organofosfanatos sem qualquer preferência inibem a *Pseudomonas species*. Desta forma, verifica-se que a lipase *Pseudomona cepacia* é bastante selectiva não reconhecendo os enantiómeros e que a sua inibição é restrita a determinados inibidores.

4.2.2. DETERGENTES

Os detergentes domésticos, são geralmente constituídos por sais de sódio, os mais usados são tripolifosfato, o tetraborato e o sulfonato de dodecilbenzo, fosfatos, apesar de a sua presença ter decaído bastante, devido aos efeitos nefastos dos seus compostos no crescimento de plantas em rios e outras vias navegáveis e derivados de alcenos (olefinas) entre outros. São os sais de materiais alcalinos de ácidos gordos – sabões (ácidos alifáticos constituídos por longas cadeias de ácidos gordos que terminam num grupo carboxílico) que em solução aquosa tem uma cadeia de hidrocarbonetos (hidrofóbica) e uma extremidade de carboxilato hidrofílica. Devido a esta polaridade as moléculas de sabão, envolvem as partículas de gordura ou sujidade deixando as extremidades carboxílicas ionizadas apontadas para fora, dissolvendo-se na água, resultando uma emulsão e formando micelas. Numa tentativa de retratar a actuação de um detergente doméstico, que normalmente é utilizado para lavagem de roupa, verifica-se que a sujidade quando em contacto com a solução aquosa contendo detergente, irá ser

envolvida por aniões de sabão, “obrigando-a” a sair do tecido, ficando pequenas micelas (gotículas) suspensas na água.

5. IMOBILIZAÇÃO

Um biocatalisador imobilizado pode ser um só enzima ou uma mistura de enzimas (células ou organelos, ou sua combinação) que está confinada a, ou sobre um material de suporte. Num contexto bioquímico, a imobilização, é um termo genérico usado para descrever a retenção de um catalizador biologicamente activo, num reactor ou num sistema analítico. A vantagem da imobilização, segundo Salis *et al.*, (2003), de um biocatalisador consiste na manutenção biocatalítica, permitindo a sua reutilização e possibilitando os processos contínuos, facilitando o controlo do processo e optimização do rendimento e a qualidade do produto. Outras vantagens são, não se misturam com o produto, e tornam-se mais estáveis. No entanto, levantam-se algumas limitações como a perda de actividade catalítica durante a imobilização, problemas na transferência de massa, discriminação física entre o catalizador e o fluído.

Existem diferentes métodos de imobilização, que podem ser, conforme os critérios adoptados. Uma das classificações possíveis baseia-se na natureza da combinação com o suporte (figura 2.16).

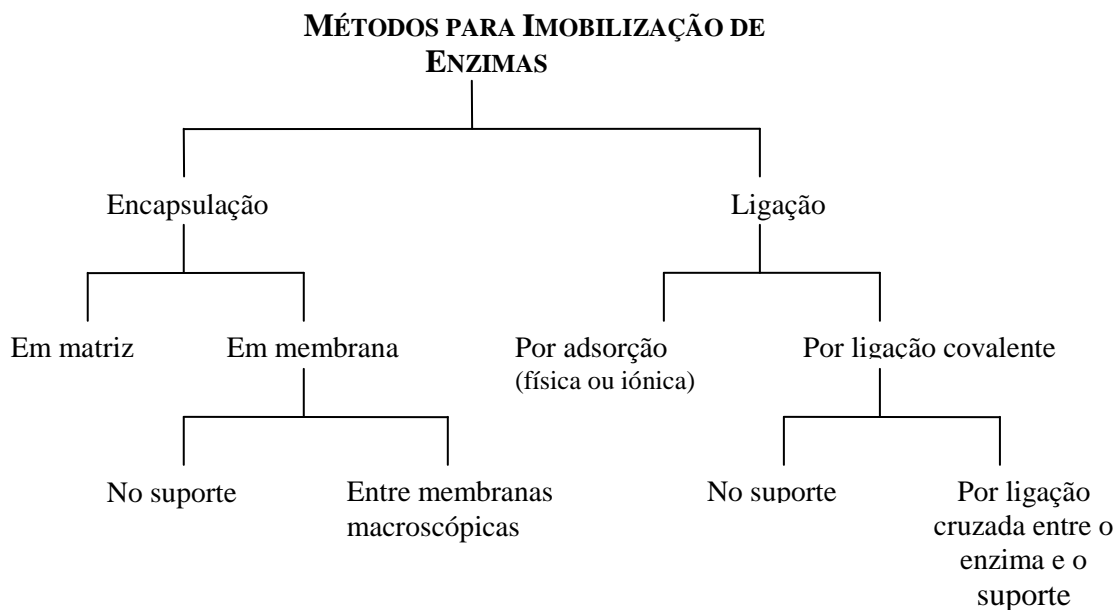


Figura 2.16 -Esquema ilustrativo dos métodos de immobilização de enzimas (adaptado de Gomes, 2005).

Reticulação com reagentes bifuncionais

Células ou Enzimas podem ser reticulados covalentemente através de ligações cruzadas (Cross-linking) com reagentes bi- ou multifuncionais, como por exemplo aldeídos, aminas ou diisocianatos, o que resulta na formação de agregados tridimensionais insolúveis em água. A toxicidade destes reagentes limita a sua utilização, todavia o mais utilizado é o glutaraldeído que reage com grupos amina dos resíduos de lisina. A reacção de formação da ligação é irreversível e mantém-se estável em valores extremos de pH e temperatura (Bickerstaff, 1997 cit. Gomes, 2005).

Imobilização em suportes sólidos

Os métodos existentes para immobilização em suportes sólidos, dividem-se em dois grandes grupos: a ligação a um suporte e oclusão em matrizes porosas. Na ligação ao suporte, o biocatalisador é retido à superfície de um sólido, mediante interações estabelecidas entre a matriz e o biocatalisador. Na immobilização por oclusão, a

solidificação de uma suspensão contendo o biocatalisador é induzida por meios químicos ou físicos. Deste processo resulta um gel insolúvel em água, no interior do qual fica retido o biocatalisador, numa forma cativa.

A selecção do suporte a utilizar é uma selecção decisiva na implementação de um sistema reaccional utilizando biocatalisadores imobilizados. Idealmente, a etapa de selecção da matriz de imobilização deverá tomar em consideração os dados existentes relativos à estrutura e actividade do biocatalisador, ao método de imobilização escolhido e às condições processuais. Os suportes podem ser classificados quanto à sua natureza em orgânicos e inorgânicos e quanto à sua morfologia em porosos e não porosos (área disponível da matriz para a ligação com o biocatalisador).

Ligação covalente de enzimas

Este método de imobilização é dos mais estudados. Envolve o estabelecimento de ligações entre os resíduos dos aminoácidos da proteína e grupos reactivos do suporte. Este método origina biocatalisadores mais estáveis, não se registando qualquer remoção da enzima a partir do suporte numa vasta gama de condições operacionais. A metodologia de imobilização inclui processos de activação em etapas múltiplas, para a formação das ligações covalentes. A maioria dos métodos privilegia o estabelecimento destas com o grupo amino (de Lys), carboxilo (de Asp e de Glu), hidroxilo (de Ser e Thr), tiol (Cys) e fenol (Tyr). Embora, uma das maiores vantagens deste suporte seja o seu carácter inerte, esta característica dificulta a imobilização de enzimas por ligação covalente.

Método de oclusão

Neste método de imobilização o biocatalisador é confinado ao interior de uma matriz, sem que seja estabelecida qualquer ligação química. No decurso do processo de imobilização poderão ocorrer variações de temperatura ou de pH, ou poderá haver exposição do biocatalisador a compostos químicos agressivos. Por estas razões é de esperar que tal possa traduzir em alguma desactivação.

Mas o uso deste método apresenta principalmente a baixa estabilidade mecânica e a reduzida longevidade do gel, o qual pode ser destruído devido a crescimento celular, aquando da imobilização de células metabolicamente activas e em crescimento, ou à libertação de CO₂. Também, se podem verificar algumas limitações significativas à transferência de massa, dado que esta ocorre apenas por difusão molecular, tornando-se mais relevante nos processos aeróbios.

Adsorção e ligação iónica

Método mais antigo e simples para imobilização de biocatalisadores, consiste na adsorção a um suporte sólido (ex. carvão, celite, vidro), sem qualquer modificação prévia da matriz ou do biocatalisador e simples para imobilização de biocatalisadores. A retenção do biocatalisador na matriz deve-se a ligações fracas, do tipo Van der Waals, hidrofóbicas, electrostáticas ou ligações de hidrogénio. Para que a imobilização ocorra basta colocar o biocatalisador em contacto com a matriz, em condições seleccionadas de pH, força iónica, natureza do tampão e temperatura. A sua aplicação é limitada dada a natureza reversível da ligação entre o catalizador e a matriz. A adsorção pode ser causada por alterações conformacionais da proteína ou pelas condições hidrodinâmicas do sistema reaccional.

B – MATERIAIS E METÓDOS

B-I- MATERIAIS

1.1. INFLORESCÊNCIAS DE *CYNARA CARDUNCULUS* L.

Utilizou-se uma mistura de extracto das flores de *Cynara cardunculus*, colhidas no Barrocal Algarvio e Campina de Faro, entre meados de Junho e finais de Julho de 2003.

Esta colheita foi realizada, por Mafalda Gomes, e segundo a mesma, “as plantas colhidas apresentavam evidente desenvolvimento dos estigmas de cor lilás e o modo de colheita utilizado foi o corte dos estiletes ao nível dos estigmas, seleccionando as inflorescências com interesse, evitando as brácteas, as que estavam no final da floração e as mais abertas” (Gomes, 2005).

Após a secagem em local seco, escuro e arejado (metodologia tradicional), o material foi moído (reduzido a pó) e posteriormente, conservado em frasco hermeticamente fechado. O qual foi utilizado ao longo deste trabalho.

1.2. LEITE

O leite utilizado nos ensaios deste trabalho foi “ Vigor” do dia.

1.3. MARGARINA

Utilizou-se margarina comercial, “Planta – fácil de barrar”, a mesma apresenta-se como “um creme vegetal para barrar a 59% e com os seguintes ingredientes: Óleos e gorduras vegetais, água, sal (1,7%) emulsionantes (lecitina, mono e diglicéridos de ácidos gordos), soro de leite em pó, conservante (sorbato de potássio), regulador de acidez (ácido cítrico), aromas, vitamina E, corante (β - caroteno), vitamina A e Vitamina

D. A composição do produto resulta de uma selecção de óleos continuamente optimizada”. Esta caracterização é da responsabilidade da empresa que vende a marca.

1.4. *PSEUDOMONA CEPACIA*

A *Pseudomona cepacia* foi adquirida para esta actividade, na Fluka Chemistry que recomenda que a enzima seja preparada tendo em conta a sua actividade enzimática, que neste caso é 0,05U/g.

1.5. DETERGENTE

O detergente doméstico utilizado é da marca “Presto”. A embalagem faz referência aos ingredientes e descreve-os da seguinte forma: 15 a 30% Zeólitos, Tensoactivos aniónicos; até 5% Policarboxilatos, Tensoactivos não-iónicos, sabão, perfume, enzima, Branqueador Óptico, Botylphenyl Methylpropinal, Hexyl Cinnamal e Benzyl Salicylate.

Na embalagem, faz ainda uma sugestão das dosagens recomendadas tendo em conta a dureza da água.

Salienta-se que, este detergente foi o escolhido, pois comparativamente a outras marcas do mercado como “Blanka-Oxi-action”, “Blanka Frennd”, “OMO”, “Tide”, entre outras, que se referiam especificas para tratamento de sujidade (gorduras), foi a que apresentou resultados mais favoráveis.

1.6. COALHO COMERCIAL

O coalho comercial líquido, foi adquirido numa farmácia, está referenciado com a marca “FABRE, LDA “ – “ fabrico de queijo”. O frasco conta-gotas tem a capacidade de 30 ml, a qual é aconselhada para 150 ml de leite. A marca sugere a seguinte forma de

usar: “Para 5 litros, usar 20 gotas de coalho na maneira de usar de coalho. O leite deve ser aquecido a 30 °C e mexer durante dois minutos. Deixar em repouso durante 30 a 40 minutos. Caso deseje a coalhada pronta rápido, junte mais coalho. Para melhor conservação do coalho manter o frasco fechado em local fresco e seco”

O coalho não passou por nenhum tratamento especial para ser utilizado neste trabalho, foi directamente retirado do frasco.

1.7. REAGENTES E SOLUÇÕES

MATERIAIS (MATERIAL BIOLÓGICO, MEIO DE CULTURA, REAGENTES UTILIZADOS):

- Alginato de sódio;
- Solução tampão de Acetato a 1,1 M pH – 4,5; 5,6; 6,1;
- Solução de Cloreto de Cálcio a 1% e outra a 2%
- Solução de Hidróxido de Potássio a 0,1M;
- Solução de Etanol-acetona a 50%;
- Indicador de Fenolftaleína;
- Solução de HCl a 0,1mM.

B-II – MÉTODOS

2.1. PREPARAÇÃO DO EXTRACTO ENZIMÁTICO DA FLOR DA *CYNARA CARDUNCULUS*

Preparou-se solução de extracto de flores da *Cynara cardunculus* com uma concentração de 0,15g/ml, obtida a partir da imersão de 15 g de cardo seco e moído (já

previamente preparado) em 100 ml de água destilada. Esta mistura foi mantida em repouso durante 1 hora à temperatura ambiente. Em seguida, foi filtrada em funil de buckner com papel de filtro Whatman nº 4 e bomba de vácuo, obtendo-se assim o extracto enzimático, utilizado nos ensaios. A solução obtida foi guardada no frio a $(4^{\circ}\pm 1C)$ (Gomes, 2005).

2.2. PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO DE INDICADOR DE FENOFTALEÍNA

Preparou-se 100 ml de solução de fenolftaleína a 0,1% dissolvendo 0,1g de fenolftaleína em 100ml de água destilada. Essa solução é um indicador de pH com uma zona de viragem pH a 8,2 (incolor) e pH a 10,0 (púrpura).

2.3. PREPARAÇÃO DO ENZIMA LIPASE *PSEUDOMONA CEPACIA*

Preparou-se uma solução com a concentração de 0,01g/ml de *Pseudomona cepacia*, dissolvendo-se 1 mg em 10 ml de água destilada. Esta solução, para facilitar a dissolução do enzima, foi agitada num agitador magnético, a 250 rpm durante 2 minutos. Em seguida, essa solução foi colocada em eppendorfs contendo 2 ml da mesma, as quais foram, depois congeladas a $(-18^{\circ}\pm 1C)$. Sempre que fossem necessárias, as mesmas eram retiradas pelo menos com uma hora de antecedência.

2.4. PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO DE DETERGENTE DOMÉSTICO

Preparou-se uma solução de detergente a 2% (p/v), dissolvendo-se 2g de detergente em 100 ml de água destilada. Esta solução foi homogeneizada num agitador magnético a 200rpm e teve de ser feita diariamente, visto que os enzimas perdiam a sua actividade, mesmo quando guardada a frio $(4^{\circ}C\pm 1)$.

2.5. COAGULAÇÃO DO LEITE

2.5.1. DETERMINAÇÃO DA ACTIVIDADE DO EXTRACTO ENZIMÁTICO DA FLOR DA *CYNARA CARDUNCULUS*

Colocou-se 50 ml de leite gordo e adicionou-se 83 μ l de extracto enzimático da flor da *Cynara cardunculus* (0,15g/ml) à temperatura de 37°C. Foram registados os tempos de coagulação (tendo em conta o início e o fim), a partir de uma leitura visual, até ao aparecimento do soro.

Os ensaios para o estudo de diferentes pH foram realizados pela adição de NaOH 1M (básico) e a adição de ácido láctico a 85% (ácido). Após a preparação das soluções foram medidos o pH e colocadas a diferentes temperaturas (temperatura ambiente, 37°C e 55°C). Em seguida, adicionou-se 83 μ l do extracto enzimático da *Cynara* e a partir desse momento o tempo de coagulação obtido foi controlado até à obtenção da coalhada, com observação da obtenção de soro.

2.5.2. DETERMINAÇÃO DA ACTIVIDADE DE UM COALHO COMERCIAL DE ORIGEM ANIMAL

Foram realizados ensaios de determinação do tempo de coagulação do leite utilizando 0,2 ml de coalho comercial de origem animal.

Estudou-se o tempo de coagulação deste enzima coagulante em pH e temperaturas diferentes, tendo-se observado e registado, o fim da coagulação com a formação do soro.

2.5.3. MÉTODO DA IMOBILIZAÇÃO COM ALGINATO DE SÓDIO

FUNDAMENTAÇÃO DO MÉTODO

O estudo realizado baseou-se no método de imobilização por retenção física, que consiste na oclusão dos biocatalisadores. Este método é aplicável a todos os biocatalisadores, sendo mais usado na imobilização de células.

O nome de alginatos é dado aos diversos sais de ácido algérico, um polissacárido constituído por ácido manurónico e gulurónico que ocorre em vários tipos de algas e produzido extracelularmente por diversos microrganismos. O método de oclusão em alginatos baseia-se no facto de contra-íões monovalentes (Na^+ e K^+) produzem alginatos solúveis em água, enquanto que espécies polivalentes (Ca^{2+} , Sr^{2+} , Ba^{2+} , etc...) originam géis.

O método consiste em juntar o biocatalisador a uma solução de alginato de sódio, a qual é adicionada gota a gota à solução aquosa contendo íões polivalentes, neste caso de cálcio. Por troca iónica ocorre a gelificação. É necessário incluir uma concentração mínima de íões de cálcio nos meios onde a matriz vai ser usada e evitar a presença de agentes quelantes, para o cálcio, tais como EDTA e o ácido cítrico para não ocorrer troca de íões monovalentes e consequentemente a solubilização da matriz (figura 2.17).

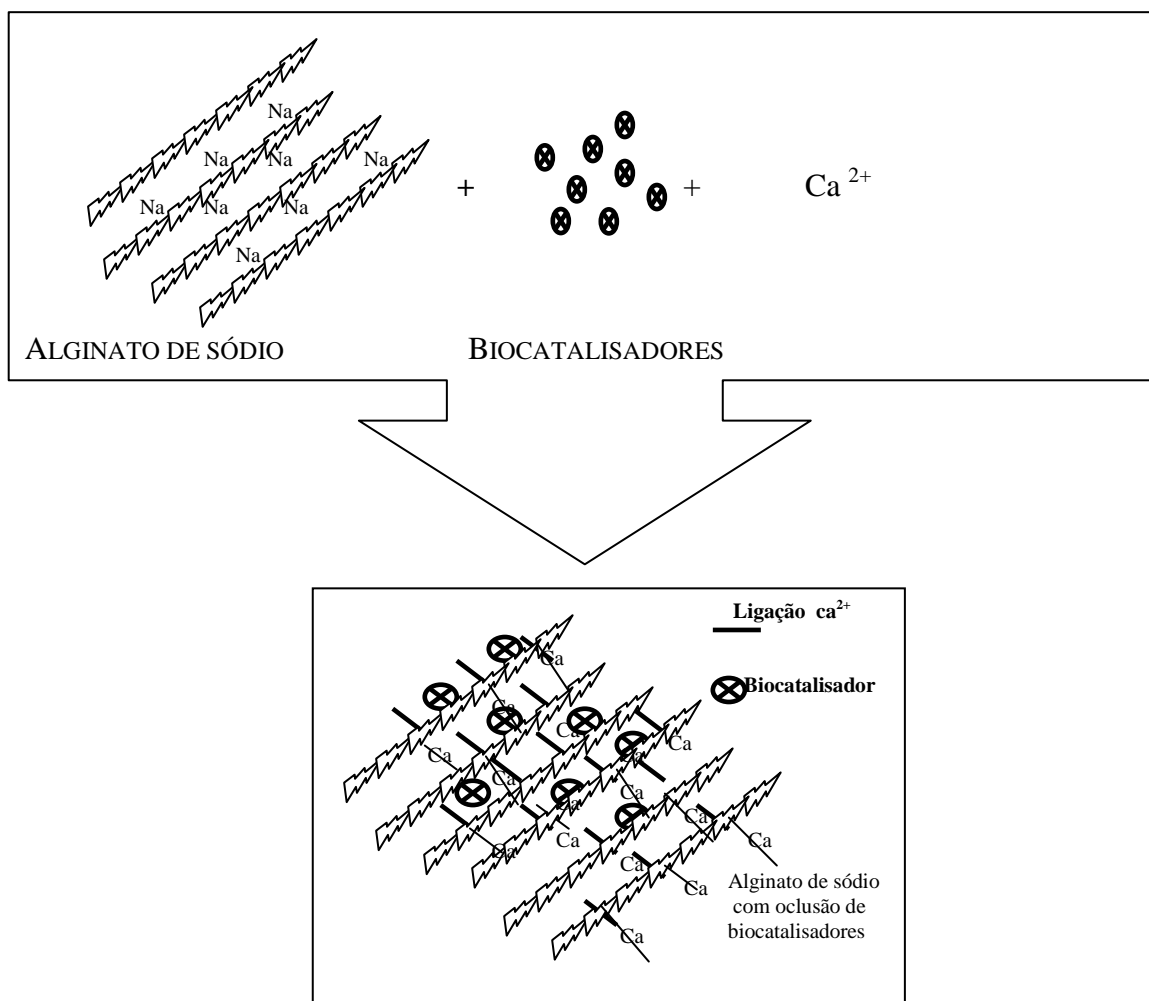


Figura 2.17. Diagrama indicando a oclusão de biocatalisadores (Adaptado de Ferreira, 1998).

2.5.4. OCLUSÃO DE EXTRACTO ENZIMÁTICO DAS FLORES DE *CYNARA CARDUNCULUS* OU DE COALHO CORMECIAL DE ORIGEM ANIMAL

Foram dissolvidos 0,22g de alginato de sódio em 10 ml de água destilada (temperatura de 20 a 25°C), num tubo de ensaio, mexeu-se com uma vareta, até a solução ficar homogénea, formando um gel.

Adicionou-se em seguida:

- No caso da imobilização do extracto enzimático da flor da *Cynara cardunculus* – 1 ml;
- No caso da imobilização de coalho comercial de origem animal – 0,2ml;

A mistura resultante foi transferida, gota a gota, por intermédio de uma seringa (100 ml) para uma solução agitada de 100ml de cloreto de cálcio a 2% (p/v) em água destilada. As esferas formadas na solução de CaCl_2 , foram mantidas em agitação (250rpm) durante cerca de 15 a 20 minutos, para que fosse completa a gelificação. Em seguida, as esferas foram recolhidas e lavadas com solução tampão acetato de pH 4,5 e por uma solução de CaCl_2 a 1%, por último foram recolhidas para um papel absorvente.

2.5.5. DETERMINAÇÃO DA ACTIVIDADE COAGULANTE DO EXTRACTO ENZIMÁTICO DA FLOR DE *CYNARA CARDUNCULUS* E DO COALHO COMERCIAL DE ORIGEM ANIMAL NA FORMA LIVRE E IMOBILIZADA

PROCEDIMENTO COM O EXTRACTO ENZIMÁTICO DA FLOR DE *CYNARA CARDUNCULUS*

Colocaram-se em 2 séries de copos de precipitação 50 ml de leite gordo (estes ensaios foram realizados em triplicado). Em seguida, foram colocados em banho-maria à temperatura de 37°C, quando o leite atingiu essa temperatura, foram colocados os enzimas do extracto de flor da *Cynara cardunculus* na forma livre (série I) e na forma imobilizada (série II).

A partir desse momento, o tempo de coagulação em cada um dos ensaios foi controlado até à obtenção da coalhada por formação de soro, sendo registado o tempo inicial e o tempo final da coagulação.

PROCEDIMENTO COM O COALHO COMERCIAL DE ORIGEM ANIMAL

A metodologia utilizada foi a mesma que a anterior, com o extracto enzimático da flor da *Cynara cardunculus*, alterando-se neste caso, para coalho comercial de

origem animal. Foram também, feitos os registos do tempo no início da coagulação e do final da mesma.

2.6. HIDRÓLISE DOS LÍPIDOS

Foram feitos diversos ensaios para testar a hidrólise de vários lípidos, como a manteiga, o óleo e o azeite, em meios de pH diferentes, utilizando os enzimas *Pseudomonas cepacia* e os enzimas existentes num detergente comercial.

2.6.1. HIDRÓLISE DE LÍPIDOS (MARGARINA OU ÓLEO OU AZEITE) USANDO AS LIPASES *PSEUDOMONA CEPACIA* E AS EXISTENTES EM DETERGENTE DE USO DOMÉSTICO.

A – SOLUÇÃO DAS LIPASES

Preparação das soluções de detergente comercial e das *Pseudomonas cepacia* (0,01g/ml) como referidos nos pontos 2.3 e 2.4.

B – ENSAIOS DE HIDRÓLISE

Colocou-se 40 ml de uma das soluções tampão acetato com diferentes pH (6,1; 5,5; 4,5) ou água destilada (pH 6,6), adicionou-se em seguida, 10 g (ou 10ml) de substrato, e por último 10 ml de enzima, colocando-se em banho-maria a 40°C.

Retirou-se, tomas de 2ml em triplicado, de 10 em 10 minutos do vaso reaccional e colocou-se em gelo durante 1 minuto. Em seguida, foram adicionadas a 10 ml de solução acetona/etanol 50% (v/v).

Foi medido pH, de cada uma das amostras e registado.

Repetiu-se o mesmo ensaio, utilizando o detergente comercial (2% (p/v)).

2.6.2. MÉTODO DE IMOBILIZAÇÃO COM ALGINATO DE SÓDIO

O método de imobilização como foi referido anteriormente, funciona com a oclusão do biocatalizador numa rede de esferas de alginato, permitindo desta forma a sua reutilização.

PROCESSO DE HIDROLISE DE LÍPIDOS USANDO AS LIPASES DE *PSEUDOMONA CEPACIA* E DE DETERGENTE IMOBILIZADAS

O procedimento de imobilização das *Pseudomonas cepacias* (0,01g/ml) e do detergente (2% (p/v)) foi idêntico ao descrito em 2.5.5 (imobilização do cardo e do coalho comercial) utilizando as quantidades de 1ml e de 0,2 ml respectivamente.

Colocou-se 40 ml de água destilada, adicionou-se o substrato, 5 g de margarina, e por fim o enzima imobilizado, a restante parte do ensaio foi semelhante ao referido no procedimento anterior (2.5.5), retirando de 10 em 10 minutos tomas de 2 ml, colocando-as em gelo (1 minuto) e adicionando-as à solução de etanol/acetona 50% (v/v).

C – RESULTADOS E DISCUSSÃO

C-I – REACÇÃO ENZIMÁTICA DE COAGULAÇÃO DO LEITE

Foram realizados ensaios preliminares para avaliar a influência do pH e da temperatura na actividade dos enzimas presentes no extracto da flor de *Cynara cardunculus* e no coalho comercial de origem animal.

A actividade enzimática foi quantificada pelo tempo de obtenção da coalhada – tempo de coagulação – após a adição do enzima ao leite, como descrito (B- Materiais e Métodos).

Na determinação do tempo de coagulação, destacaram-se duas fases de observação, o início da coagulação propriamente dita, com o aparecimento da floculação, e a fase final da coagulação definida quando o soro que se liberta da coalhada se torna incolor, o que permite afirmar que a coagulação tinha terminado o tempo (Rebelo, 1994 cit. Gomes, 2005).

A coagulação do leite pode ocorrer por acidificação do leite ou por acção enzimática, como referido anteriormente.

A temperatura é outro factor relevante que intervém na coagulação, visto influenciar a actividade dos enzimas. O extracto enzimático das flores de *Cynara cardunculus* apresenta estabilidade a elevadas temperaturas. Estes enzimas presentes na flor do cardo, à temperatura $\pm 55^{\circ}\text{C}$, segundo Barbosa (1983), citado por Gomes (2005) comportam-se de uma forma estável. No entanto, a temperatura de fabrico da maior parte dos queijos varia entre (28-30°C), afastando-se bastante desta temperatura de acção da flor do cardo, havendo assim uma coagulação mais lenta (Barbosa, 1983 cit. Gomes, 2005).

Com a finalidade de estudar enzimas com capacidade de coagular o leite e que são utilizadas desde sempre no fabrico do queijo, realizaram-se ensaios de determinação da actividade enzimática através da quantificação do tempo de coagulação do leite.

Este estudo enzimático foi encarado na perspectiva de aquisição de conhecimentos científicos nas reacções bioquímicas, e transferência para o ensino do 3º ciclo de conhecimentos fundamentais da função dos enzimas nas reacções metabólicas que integram o programa curricular das disciplinas de Ciências Naturais e Físico-Química.

1-DETERMINAÇÃO DA ACTIVIDADE DO EXTRACTO ENZIMÁTICO DA FLOR DE *CYNARA CARDUNCULUS*

Foram realizados ensaios de coagulação do leite com o extracto da flor do cardo a diferentes temperaturas (temperatura ambiente, 37°C e 55°C) e a diferentes pH no intervalo de 3 a 10. Os tempos de coagulação para as diferentes condições foram registados nas tabelas C₁, C₂ e C₃. Utilizou-se o ácido láctico a diferentes concentrações para acidificar o meio da reacção e o hidróxido de sódio para alcalinizar, de acordo com o descrito em materiais e métodos.

Tabela C₁ – Variação dos tempos de coagulação do leite para diferentes pH e à temperatura de 37°C, utilizando o extracto enzimático da *Cynara cardunculus*. Os valores são uma média de três réplicas.

pH	Tempo de coagulação (minutos)	Características da coalhada
6.7**	/	Não se observou coagulação
6.7*	15,95	Coágulo consistente formação de soro.
9.6**	/	Não se observou coagulação
9,6*	/	Não se observou coagulação
10.8**	/	Não se observou coagulação
10.8*	/	Não se observou coagulação
5.4**	1,05	Coágulo dissociado em flocos
5.4*	0,20	Coágulo dissociado em flocos
3.8**	0,05	Coágulo dissociado em flocos
3.8*	0,15	Coágulo dissociado em flocos

* com enzima
** sem enzima

Analisando a tabela C₁, verificou-se que em soluções de pH alcalino (9.6 e 10.8), não se observou a formação de coágulos, na presença do extracto enzimático da flor da *Cynara cardunculus*. No entanto, em meio ácido (3.8 e 5.4) verificou-se uma coagulação sob a forma de flocos (coagulação dissociada), com e sem adição de extracto enzimático, sendo esta atingida num menor tempo, quase de imediato após a adição do ácido.

Com o valor de pH natural do leite (6.7) sem adição de qualquer reagente, o tempo de coagulação foi, aproximadamente, dezasseis minutos e a coalhada apresentou-se como um gel com textura firme e consistente, diferenciando-se da observada a um pH ácido.

Tabela C₂ – Variação dos tempos de coagulação do leite para diferentes pH e à temperatura ambiente, utilizando o extracto enzimático da *Cynara cardunculus*. Os valores são uma média de três réplicas.

pH	Tempo de coagulação (minutos)	Características da coalhada
6.7**	/	Não se observou coagulação
6.7*	/	Não se observou coagulação
9.6**	/	Não se observou coagulação
9.6*	/	Não se observou coagulação
10.8**	/	Não se observou coagulação
10.8*	/	Não se observou coagulação
5.4**	/	Não se observou coagulação
5.4*	/	Não se observou coagulação
3.8**	120	Coágulo dissociado em flocos
3.8*	115	Coágulo dissociado em flocos

* - com enzima

** - sem enzima

Os ensaios realizados à temperatura ambiente estão expressos na tabela C₂, verificando-se que não existe actividade enzimática observável à temperatura ambiente. A actividade coagulante observada para pH 3.8 pode ser atribuída à acidificação que conduzirá à desestabilização das micelas e fará com que a repulsão electrostática entre as cargas negativas das micelas diminua, formando um coágulo pouco consistente e praticamente sem soro (Von *et al.*, 2006).

Analisando a tabela C₃, onde são apresentados os resultados dos ensaios de coagulação realizados à temperatura 55°C, verifica-se que o leite, a um pH neutro, na presença do extracto enzimático de cardo coagula, formando uma coalhada consistente. Em meio ácido observa-se a formação quase imediata de um coágulo fragmentado em flocos e frágil, como observado à temperatura de 37°C e à temperatura ambiente. Este facto, sugere claramente que o efeito da floculação e não formação do gel se deve à acidificação do meio, sendo independente da temperatura do ensaio.

Tabela C₃ – Variação dos tempos de coagulação do leite para diferentes pH e à temperatura de 55 C, utilizando o extracto enzimático da *Cynara cardunculus*. Os valores são uma média de três réplicas.

pH	Tempo de coagulação (minutos)	Características da coalhada
6.7**	/	Não se observou coagulação
6.7*	6,40	Coágulo consistente
9.6**	/	Não se observou coagulação
9.6*	/	Não se observou coagulação
10.8**	/	Não se observou coagulação
10.8*	/	Não se observou coagulação
5.4**	1,50	Coágulo dissociado em flocos
5.4*	Imediato após adição do ácido	Coágulo dissociado em flocos
3.8**	0,15	Coágulo dissociado em flocos
3.8*	Imediato após adição do ácido	Coágulo dissociado em flocos

* com enzima

** sem enzima

Na figura 2.18, são comparados os valores dos tempos de coagulação expressos nas tabelas C₁ e C₃, relativamente ao factor temperatura. É notório, que ocorreu o menor tempo de coagulação para a temperatura de 55°C. Segundo Barbosa (1983) citado por Gomes (2005), a esta temperatura os enzimas da flor do cardo comportam-se de uma forma estável, o que permite afirmar que é a esta temperatura que o enzima atingirá o seu ideal em termos térmicos. Nos resultados obtidos verificou-se que a essa temperatura a coagulação é quase imediata, após a adição do enzima.

Verificou-se ainda, pela interpretação do gráfico (figura 2.18), que o tempo de coagulação será tanto menor quanto menor for o seu pH. Assim, esta coagulação (coalhada ácida) formada, comparativamente à coagulação formada por presença do extracto enzimático das flores é mais floculosa, com menos soro e menos resistente.

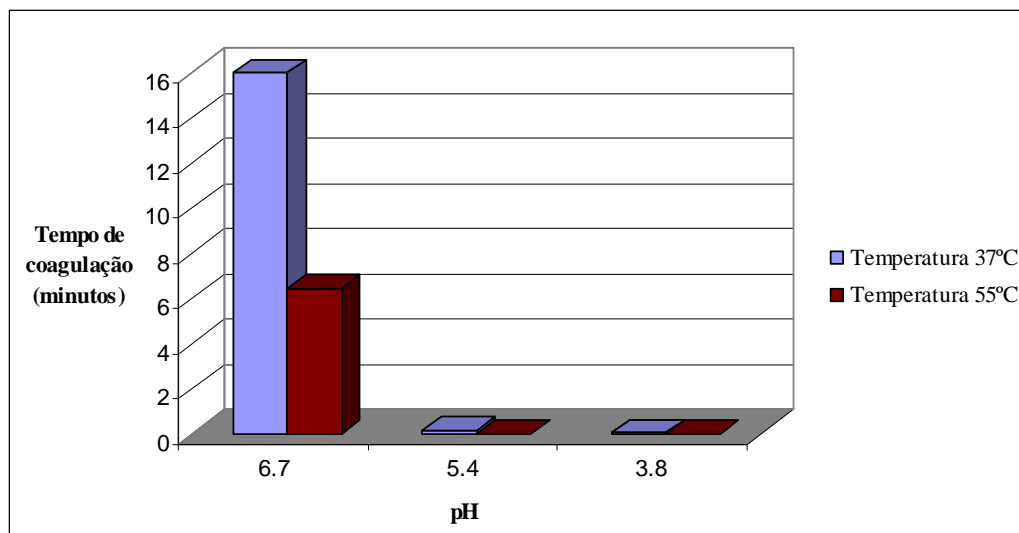


Figura 2.18 – Variação do tempo de coagulação com extracto das flores da *Cynara cardunculus* em diferentes pH e temperaturas. Os valores apresentados representam a média \pm erro padrão de três réplicas.

Ainda relativamente ao factor temperatura, verificou-se que à temperatura ambiente só houve coagulação nos meios com acidez de 3,8 e apresentando um tempo de coagulação na ordem dos 120 minutos. As restantes soluções durante o decorrer da experiência (4 horas), não apresentaram coagulação. Verifica-se actividade enzimática crescente com as temperaturas de 37° e 55°.

2-DETERMINAÇÃO DA ACTIVIDADE DO COALHO COMERCIAL DE ORIGEM ANIMAL

O coalho comercial de origem animal possui o enzima quimosina, também designada por renina. Este enzima é muito específico, hidrolisando a ligação fenilalanina-metionina da k-caseína. O seu papel fisiológico é muito restrito, pois serve

unicamente para coagulação do leite nos animais que estão no seu período de lactação. A quimosina actua especificamente como agente coagulante do leite de vaca, apresentando um pH óptimo próximo da neutralidade (pH 6.2-6.4). A quimosina possui maior poder coagulante do que proteolítico, sendo por isso mais apropriada para o fabrico do queijo. Assim o coalho comercial será tanto melhor quanto maior for a quantidade de quimosina.

Ainda nos ensaios preliminares foram feitos estudos semelhantes aos realizados com o extracto de flor da *Cynara cardunculus*, mas utilizando coalho comercial de origem animal. Pretendeu-se neste estudo determinar a actividade deste enzima em diferentes pH (6.7-11.1) e temperaturas (temperatura ambiente, 37°C e 55°C). Os tempos de coagulação para as diferentes condições foram registados nas tabelas (C₄ e C₅).

Tabela C4 – Variação dos tempos de coagulação do leite para diferentes pH e à temperatura de 37°C, o coalho animal. Os valores são uma média de três réplicas.

pH	Tempo de coagulação (minutos)	Características da coalhada
6.7**	/	Não se observou coagulação
6.7*	12,40	Coagulo consistente
8.7**	/	Não se observou coagulação
8.7*	/	Não se observou coagulação
11.1**	/	Não se observou coagulação
11.1*	/	Não se observou coagulação
5.5**	0,50	Coágulo dissociado em flocos
5.5*	0,20	Coágulo dissociado em flocos
3.7**	0,15	Coágulo dissociado em flocos
3.7*	0,50	Coágulo dissociado em flocos

* com enzima

** sem enzima

Verificou-se que os resultados dos tempos de coagulação para o coalho comercial são muito semelhantes aos do extracto enzimático das flores de *Cynara cardunculus*, como verificado na figura 2.19. Contudo, o coalho comercial apresentou uma velocidade de actuação enzimática ligeiramente superior, nas condições testadas. É

de realçar que a concentração de cada um dos enzimas é fundamental na comparação de diferentes tipos de enzimas.

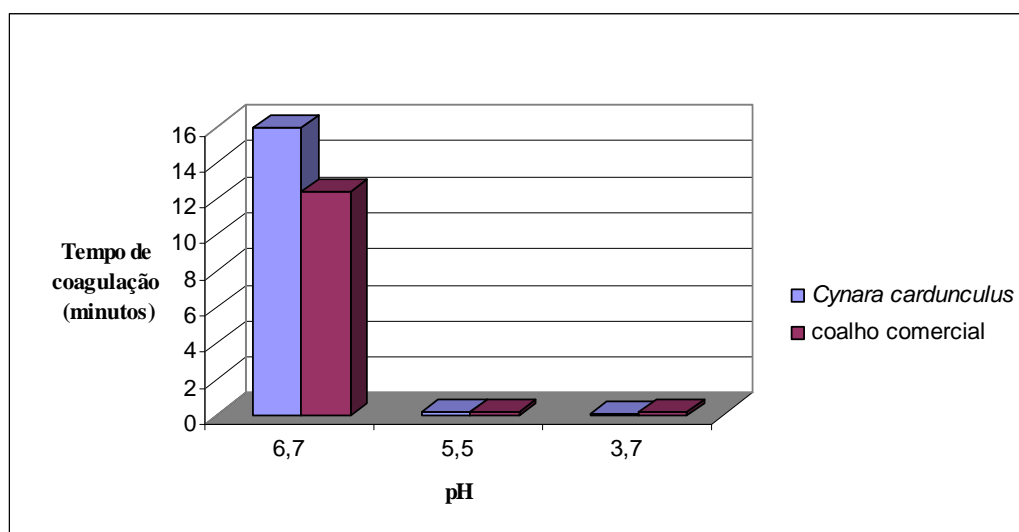


Figura 2.19 – Tempo de coagulação do extracto das flores de *Cynara cardunculus* e do coelho comercial à temperatura de 37°C em diferentes condições de pH.

Estes ensaios foram também realizados para a temperatura a 55°C e temperatura ambiente apresentados na tabela C₅.

Tabela C₅ – Actividade do enzima de coelho comercial a diferentes temperaturas (temperatura ambiente e 55°C) e a diferentes pH. Os valores apresentados apresentam uma média de três réplicas.

pH	Temperatura ambiente		Temperatura 55°C	
	Tempo de coagulação (minutos)	Características do coágulo	Tempo de coagulação (minutos)	Características do coágulo
6,7**	/	Não houve coagulação	/	Não houve coagulação
6,7*	/	Não houve coagulação	5,20	Coágulo consistente
9,6**	/	Não houve coagulação	/	Não houve coagulação
9,6*	/	Não houve coagulação	/	Não houve coagulação
10,8**	/	Não houve coagulação	/	Não houve coagulação
10,8*	/	Não houve coagulação	/	Não houve coagulação
5,4**	/	Não houve coagulação	1,05	Coalhada floculada pouco resistente
5,4*	/	Iniciou-se a coagulação	Imediatamente	Coalhada fragmentada
3,8**	190	Houve coagulação	0,05	Coalhada fragmentada
3,8*	115	Houve coagulação	Imediatamente	Coalhada fragmentada

* com enzima

** sem enzima

Observando os resultados obtidos através da tabela C₅, verificamos que para a temperatura de 55°C, o enzima apresentou um menor tempo de coagulação do leite, e

em meios ácidos há uma aceleração da formação da coalhada (coalhada ácida), tal como registado para os enzimas da flor do cardo.

Podemos constatar, que a actividade enzimática, através da observação da coagulação, do extracto de origem vegetal, cardosinas (extracto enzimático das flores da *Cynara cardunculus*) e do extracto de origem animal - quimosinas (coalho comercial) é ligeiramente diferente, a acção do agente coagulante cardosinas é mais lento do que com quimosinas. (Cabezo *et al.*, 1980 cit. Gomes, 2005; Salgueiro, 1980 cit Esquível,1987). Desta forma, é aparente que a quimosina, é ligeiramente mais eficaz na sua actuação a essas temperaturas e para as concentrações testadas. No entanto, a primeira fase da identificação da coagulação, a formação de flocos aderentes às paredes dos copos de precipitação, é mais rapidamente visível com o extracto de origem vegetal.

Relativamente ao pH verificou-se que os tempos de coagulação obtidos com o coalho comercial são semelhantes aos resultados com o extracto de *cynara cardunculus*. Como já referimos, a quimosina é um enzima muito específico hidrolisando a ligação fenilalanina/metionina da k-caseína e apresenta um pH óptimo próximo do neutro. Destaque-se ainda, que o extracto enzimático do cardo é estável a temperaturas altas, mantendo uma actividade enzimática até cerca de 70°C (Barbosa, 1983 cit. Gomes, 2005).

Os queijos normalmente são produzidos a temperaturas mais baixas, daí o processo de coagulação na presença de extracto das flores de *Cynara cardunculus* ser mais lento do que o coalho comercial. No entanto, em ensaios tecnológicos em queijos da Serra feitos com estes dois enzimas coagulantes, os melhores resultados quanto a consistência, aroma e sabor foram obtidos pelo extracto vegetal do cardo (Barbosa, 1983 cit. Gomes, 2005).

3- IMOBILIZAÇÃO DOS EXTRACTOS ENZIMÁTICOS DE ORIGEM ANIMAL E VEGETAL

3.1. MÉTODO DE IMOBILIZAÇÃO

Como já foi referido, este método consiste em encapsular os enzimas no interior das esferas de alginato. Este suporte favorece a coagulação do leite devido à presença do ião cálcio, importante como estabilizador das micelas de caseína.

Foram comparadas as actividades dos dois enzimas imobilizados em alginato, o extracto de flores da *Cynara cardunculus* (0,01g/ml) e o coalho comercial (0,2 ml) com os enzimas na forma livre.

Estas esferas contendo o enzima foram colocadas em leite a 37°C e registaram-se os tempos de coagulação (figura 2.20). Verificou-se, mais uma vez que os enzimas do coalho comercial são mais eficazes, obtendo-se em menor tempo uma coagulação, mesmo quando imobilizados.

Observa-se que a imobilização das enzimas não afecta a actividade enzimática, ocorrendo coagulação do leite, embora com uma diferença temporal não significativa. O enzima imobilizado permite a sua reutilização. Foram realizados ensaios com as esferas de alginato após terem sido conservadas a 4°C±1, durante várias semanas, verificando-se que os enzimas promoviam igualmente a coagulação do leite. Assim, a imobilização por oclusão com o alginato de sódio não interfere na coagulação do leite podendo trazer grandes vantagens nas queijarias ou até mesmo em contexto sala de aula, em que ajudará à compreensão do conceito de enzima como catalisador biológico, que intervém na reacção sem se consumir.

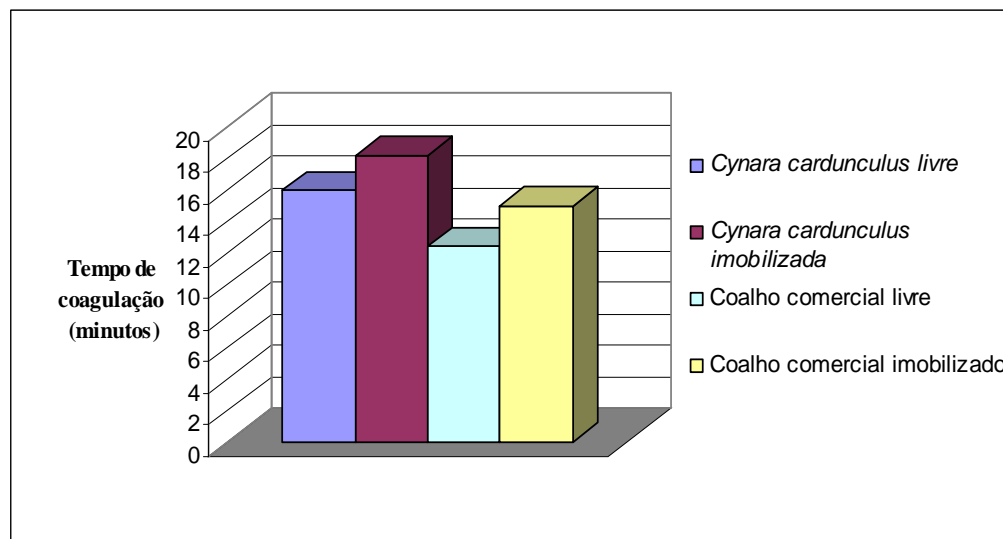


Figura 2.20 – Actividade enzimática dos enzimas de extracto de flores de *Cynara cardunculus* e coalho comercial na forma livre e imobilizada.

3.2. PROCESSO DE COAGULAÇÃO NUM REACTOR CONTÍNUO

Este processo de coagulação do leite em contínuo, só pode funcionar quando se conseguem separar em duas fases daquele processo, evitando-se assim o entupimento do reactor pelos flocos do leite coagulado. Essa separação das fases de coagulação pode ser obtida por diferenças de temperatura. No entanto, neste trabalho foram realizados ensaios em que essa diferença de temperatura não se verificava, para que se pudesse comparar.

Foram feitos ensaios contínuos com o leite à temperatura de $37^{\circ}\text{C}\pm 1$ e de $4^{\circ}\text{C}\pm 1$.

Os ensaios de coagulação em contínuo foram realizados com enzimas coagulante imobilizados de extracto enzimático das flores de *Cynara cardunculus* e com coalho comercial de origem animal, tal como os ensaios já descritos.

Foi elaborado um pequeno reactor, com uma seringa (50 ml) - colocando um material poroso na extremidade e colocando as esferas de alginato de forma a que seja constituído um leito fixo, e que haja a retenção das esferas de alginato na coluna (figura 2.21).

Iniciou-se o fluxo de leite a $37^{\circ}\text{C} \pm 1$ determinando o tempo de residência do leite, para o caudal escolhido. Determinou-se o tempo de coagulação fazendo a recolha do leite a 37°C , após passar na coluna.

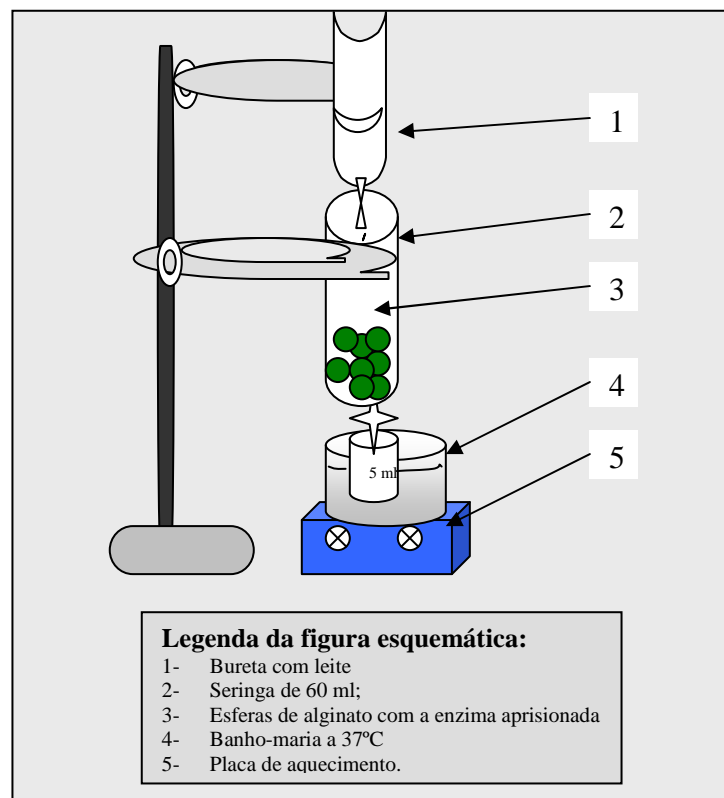


Figura 2.2 – Representação esquemática do reator para um sistema de coagulação contínua do leite.

Foi realizado o mesmo procedimento experimental, adicionando o leite à temperatura de $4^{\circ}\text{C} \pm 1$ para avaliar a influência da temperatura no momento da reacção enzimática.

Verificamos que quando o leite é introduzido no reator à temperatura de 4°C (primeira fase), passando pelas esferas contendo o extracto enzimático imobilizado e recolhido à temperatura de 37°C (segunda fase), observa-se um fluxo fixo (com um caudal previamente determinado) e começa-se a contar o tempo de coagulação, a partir do momento que no copo de recolha se começa a verificar aderência nas paredes do mesmo. No entanto, quando não há distinção destas fases, ou seja, quando os leites

utilizados têm a mesma temperatura, observa-se que a passagem do caudal é dificultada, pois dá-se a coagulação dentro da coluna do reactor entupindo-o.

Assim, a coagulação do leite por um processo contínuo, levanta desde logo um problema, que parte de um substrato que é líquido, para um produto final em forma de gel. Este processo tem que correr por um reactor, por isso será necessário conseguir que as duas fases de coagulação, hidrólise propriamente dita e floculação ocorram em locais diferentes (contrariamente ao que acontece no fabrico de queijo em que estão sobrepostas) (Bugen and Shaw, 1983 cit. Esquível, 1987). A segunda fase apresenta maior energia de activação. Segundo Berrige (1942) citado por Esquível (1987), refere que o leite colocado em baixas temperaturas, mesmo com enzimas suficientes não coagulava, mas colocando o leite em temperaturas mais elevadas era observável a coagulação. Desta forma o leite em contacto com a coluna (bureta) com os enzimas imobilizados, desencadeia o processo de hidrólise e posteriormente, o processo de coagulação que terá lugar no efluente da coluna onde é aquecido.

C-II – REACÇÃO ENZIMÁTICA DE DEGRADAÇÃO DOS LÍPIDOS

Os triglicéridos, lípidos comuns são biomoléculas formados por uma cadeia de carbono ligada a átomos de hidrogénio e oxigénio e que poderão ser classificados consoante o preenchimento dessas ligações na cadeia de carbono. Assim poderemos ter ácidos monoinsaturados (azeite), polinsaturados (óleos), saturados e as moléculas transaturados. Como já referido, as lipases para além de quebrarem as ligações de ésteres dos triacilglicéridos com o consumo de moléculas de água, são capazes de catalizar uma reacção inversa, em condições aquosas, como por exemplo a formação de ligações ésteres, a partir de um álcool e de um ácido carboxílico – síntese de éster.

Os lípidos na presença de solventes orgânicos como álcool, acetona, éter entre outros são, em geral, emulsionados, isto é, ocorrem duas fases que se misturam, dispersando-se uma no seio da outra.

Com a finalidade de estudar enzimas com capacidade de degradar gorduras presentes em efluentes contaminados com óleo, realizaram-se ensaios de determinação da actividade enzimática de lipases presentes no microrganismo *Pseudomonas cepacia* e em alguns detergentes de uso doméstico. Este estudo cinético de desenvolvimento científico foi encarado na perspectiva de aquisição de conhecimentos científicos na área da enzimologia, desenvolvimento da capacidade investigativa e transferência para o ensino do 3º ciclo, de conhecimentos fundamentais da função dos enzimas nas reacções metabólicas que integram o programa curricular das disciplinas de Biologia e Físico-Química.

1- DETERMINAÇÃO DA ACTIVIDADE ENZIMÁTICA DAS LIPASES PRESENTES EM *PSEUDOMONAS CEPACEAS* E DETERGENTE DE USO DOMÉSTICO NA FORMA LIVRE

Realizaram-se ensaios enzimáticos, para diferentes pH, para otimizar as condições da reacção da lipase na degradação de diferentes gorduras e compreender a cinética enzimática da reacção bioquímica. Verificou-se ainda, em qual dos substratos testados (margarina, azeite e óleo - Anexo I;C-I), a sua actividade era mais notória por medição de pH.

Na figura 2.22., está representada a variação de pH por acção da lipase *Pseudomona cepacia* ao longo do tempo da reacção, resultante da degradação dos triglicéridos da margarina em ácidos gordos a pH 6.6.

Os registos obtidos foram feitos a partir de várias séries de repetições do ensaio descrito. Os valores apresentados representam uma média de três réplicas.

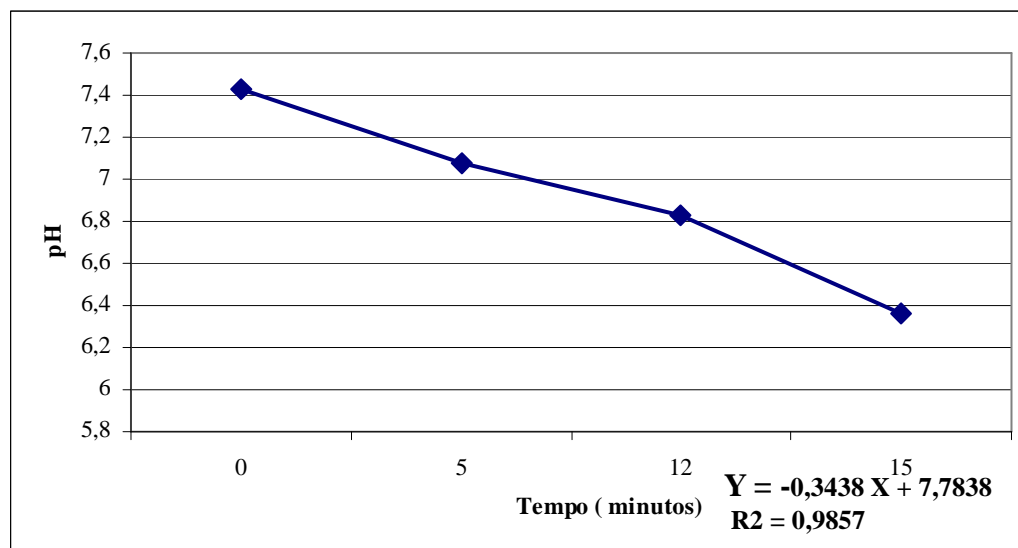


Figura 2.22 – Variação de pH ao longo do tempo da reacção enzimática da *Pseudomonas cepacia* com margarina a pH 6.6. Os valores apresentados apresentam uma média de três réplicas.

A velocidade da reacção traduz-se pela variação do produto da reacção formado por unidade de tempo (Campos, 1999) e foi quantificada através da medição do pH. A velocidade inicial é numericamente igual ao declive da recta de variação de produto formado em função do tempo ($V_0 = \text{tg } \theta$).

Para as condições expressas na figura 2.22, o substrato margarina e pH 6.6 a velocidade da reacção apresentou um valor de 0,34/min.

A reacção enzimática foi estudada para outros pH (4.5; 6.1) na perspectiva de otimizar as condições de maior eficácia da lipase. Para tal, a água foi substituída por tampão acetato, respectivamente a pH 4.5 e 6.1. As velocidades de reacção são respectivamente 0,10 e 0,16. No anexo I encontram-se as figuras (anexos A- I e A – II) correspondentes a cada uma destas determinações para as *Pseudomonas cepaciae* e detergente a pH 4.5 e 6.1 e os diferentes substratos.

Na figura 2.23., comparam-se as velocidades iniciais de reacção dos enzimas presentes no detergente e na *Pseudomonas cepacia*, determinadas para as diferentes condições ensaiadas.

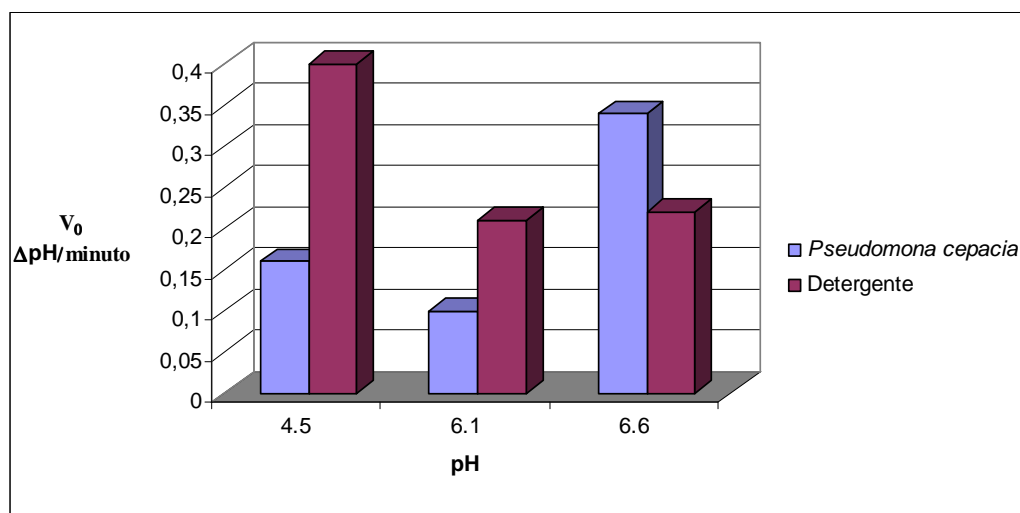


Figura 2.23 – Representa a variação da velocidade da reacção, das lipases de *Pseudomonas cepacia* e presentes no detergente comum sobre o substrato margarina.

É possível verificar que as lipases *Pseudomonas cepacias*, comparativamente ao detergente doméstico, apresentam uma maior variação na velocidade da degradação da margarina (Anexo-I; C-I). Foi igualmente verificada uma diminuição acentuada para o pH mais ácido (4.5) e, entre os pH estudados, revelou-se uma optimização para o pH próximo do neutro 6.6. É de realçar ainda, que a maior velocidade reaccional foi obtida em solução aquosa não tamponizada, o que sugere que a utilização de tampão, neste tipo de reacção enzimática pode ser inibitório da reacção de degradação lipídica, visto os produtos das reacções serem ácidos gordos.

A utilização de uma solução aquosa é facilitadora na utilização didáctica destes ensaios, em estratégia de aula do Ensino Básico ou Secundário e foi nessa perspectiva que foi aplicada e que se revelou de fácil aplicação.

A velocidade inicial das reacções realizadas com o detergente de uso doméstico não pareceu sensível á alteração de pH, sugerindo que estas enzimas deverão ter um maior espectro de actividade e de estabilidade atendendo à sua aplicação específica nas lavagens, em condições não controladas. O detergente utilizado não dá indicações na embalagem sobre os constituintes enzimáticos, apenas referindo a presença de lipases.

Contudo, a embalagem do detergente refere que em águas mais duras (pH alcalino) a concentração a utilizar deverá ser maior, o que significa que será necessário uma maior concentração de enzimas para meios que poderão eventualmente ser menos favoráveis à utilização deste detergente.

2- DETERMINAÇÃO DA ACTIVIDADE ENZIMÁTICA DAS LIPASES PRESENTES EM *PSEUDOMONAS* E NO DETERGENTE DE USO DOMÉSTICO, NA FORMA IMOBILIZADA

Foi igualmente, estudada a acção das lipases na forma imobilizada e comparada com a velocidade da reacção das lipases na forma livre (figura 2.24.).

As enzimas foram imobilizadas com alginato de sódio, seguindo-se a metodologia descrita em B (nos materiais e métodos).

As enzimas após imobilização em alginato de cálcio são apresentadas nas figuras 2.24 e 2.25. A cor verde do gel foi devido ao aditivo alimentar, adicionado para motivar os estudantes aquando a sua utilização didáctica.



Figura 2.24 – Lipases presentes no detergente doméstico, imobilizadas em alginato.



Figura 2.25 - *Pseudomonas cepacia* imobilizadas em alginato.

A imobilização do detergente em pó deu origem à formação de massa gelatinosa de alginato não uniforme (figura 2.24) e a sua reutilização não foi possível já que estas se encontravam com a rede de gel destruída, não retendo o enzima. A imobilização com

Pseudomonas cepacia foi mais consistente e homogênea (figura 2.25), o que facilitou e permitiu a sua utilização na reacção em estudo.

As velocidades das reacções das enzimas presentes na *P. cepacea* e no detergente após imobilização são respectivamente, 0,25 e 0,23 de acordo com o declive das rectas (AnexoI; B-I e B-II).

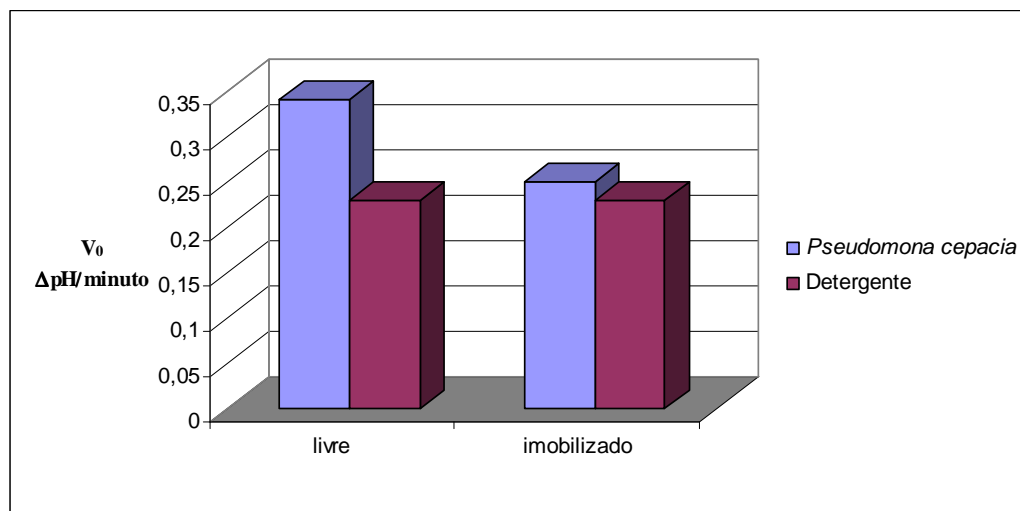


Figura 2.24 – Velocidade da reacção do enzima imobilizado e livre. Os valores apresentados apresentam uma média de três réplicas.

Mais uma vez, é bem visível que o enzima na forma imobilizado diminui a sua activação, logo terá uma velocidade menor como é visível no gráfico. Além disso como já referimos, o detergente não permite que haja consistência na imobilização o que leva à perda do enzima sugerindo que as barreiras difusionais existentes ao transporte de moléculas, ao movimento das moléculas de substrato afectam a cinética da reacção enzimática que ocorre nas esferas de alginato não conseguir reter o enzima do detergente, podendo mesmo actuar e destruir a rede do gel, como é visível através das figuras 2.24 e 2.25, A consistência das esferas de alginato contendo cada um destes enzimas lípidos é bem diferente da verificada com os outros enzimas.

D – CONCLUSÃO DOS RESULTADOS

Como referido anteriormente, pretendeu-se, com este trabalho investigativo na área da enzimologia, avaliar e estudar a capacidade de coagular o leite e de degradar gorduras presentes em efluentes contaminados com óleo utilizando diferentes tipos de enzimas. Caracterizaram-se cineticamente as proteases presentes no extracto das flores de *Cynara cardunculus L.* e no coalho comercial, as lipases presentes na *Pseudomona cepacia* e no detergente, nas formas livre e imobilizada, de forma a contribuir para uma melhor compreensão da coagulação do leite e da hidrólise dos lípidos por acção enzimática e alguns domínios emergentes na biotecnologia alimentar e ambiental

O processo de coagulação do leite é um processo complexo em que este sofre transformações passando do estado líquido para uma pasta. Isto acontece porque a principal proteína a k-caseína, que se dispõe numa estrutura estável constituída por micelas carregadas negativamente se destabiliza devido a factores físico-químicos, diminuição do pH (valores próximos de 4.6), aumento de temperatura e pela presença de enzimas. Relativamente ao extracto enzimático das flores de *Cynara cardunculus* e comparativamente ao coalho comercial, verificou-se que o extracto de origem vegetal, é mais estável a temperaturas elevadas e demonstrou que a coalhada é a pH baixo, logo favorecem a coagulação. Segundo Gomes, 2005, foi verificado que o aumento da viscosidade da coalhada está directamente relacionado com o aumento da temperatura de coagulação e a redução do tempo de coagulação, concordando com os resultados obtidos neste trabalho em que o menor tempo de coagulação do leite foi atingido para 55 °C.

Igualmente as lipases apresentaram melhor actividade para pH 6.6, próximo de valores neutros. Quanto ao pH do meio, verificou-se que a *Pseudomona cepacia*,

apresenta, relativamente aos valores de pH estudados, uma optimização nos valores próximos do neutro. Contudo, de acordo com o descrito nas características deste enzima a sua actividade é máxima para pH a ± 8 e à temperatura de 40°C, temperatura essa que foi a seleccionada para realização de todos os ensaios com as lipases.

O detergente de uso doméstico não evidenciou um efeito claro da influência do pH na actividade enzimática, no entanto apresentou preferencialmente, em meio ácido, uma maior velocidade de reacção para o pH 4,5. Este ensaio perspectiva a sua transferência e adaptação para uma possível abordagem em sala de aula (3ºCiclo) e desenvolver uma estratégia PBL de interacção com os alunos na descoberta da acção do enzima e a função da imobilização.

Uma conclusão essencial a retirar deste estudo é a influência determinante de parâmetros, como sejam o pH e a temperatura na actividade enzimática e que condicionam todo o funcionamento dos enzimas.

Quanto aos enzimas na forma livre e imobilizada (enzimas coagulantes do leite e lipases), verificou-se que estes na forma imobilizada apresentavam sempre valores ligeiramente mais baixo (aumento do tempo de coagulação do leite e diminuição da variação do pH na solução lipídica). Este facto pode, eventualmente, ser atribuído à perda do enzima, através dos poros da rede de alginato, muito susceptível à variação de temperatura pH, inibidores e à contaminação. A partir de estudos feitos por Gomes, 2005, verificou-se que os enzimas imobilizados em alginato e mantidos a 4°C±1°C mantinham a sua actividade enzimática ao longo do tempo, levando a crer que a rede de alginato não impede o enzima de reagir, embora afecte ligeiramente a velocidade de reacção.

O estabelecimento da coagulação do leite numa coluna em processo contínuo e o ensaio realizado a temperaturas diferentes, utilizando o extracto enzimático imobilizado, requer que haja a separação em duas fases, a da hidrólise e a da coagulação e que se podem obter por elevação de pH, descalcificação do leite e ainda por diferenças de temperatura. Neste estudo, estas fases foram obtidas por diferença de temperatura. Outra condição, é que a matriz onde o enzima se encontra imobilizado tenha uma estrutura que permita o contacto da k-caseína com o agente catalizador. Esta coluna em contínuo poderá ser muito útil para a aplicação didáctica do processo de obtenção de queijo e compreensão do enzima nele envolvido.

Quanto à hidrólise dos lípidos com as lipases *Pseudomona cepacia* e as presentes no detergente doméstico, verificou-se uma maior afinidade com os lípidos classificados como saturados - margarina comparativamente aos substratos usados. Estes substratos ensaiados revelaram valores pouco conclusivos (anexo I; C-I). Isso poderá estar associado ao facto deste composto apresentar-se apenas com ligações simples, sendo por isso a energia necessária para quebrar uma ligação, menor.

Comparando a coagulação do leite e a actuação da *Pseudomona cepacia*, parece à priori que não estão relacionados no entanto sabe-se que a *Pseudomonas cepacia* é uma das bactérias que tem maior impacto na qualidade do leite. Enzimas bacterianas são mais significativas na deterioração do leite e na cura do queijo. Por exemplo, muitas bactérias psicotróficas (aquelas que crescem à temperaturas abaixo de 7°C) produzem enzimas estáveis termicamente que podem ser activas no leite e queijos mesmo depois dessas bactérias serem mortas no processo de pasteurização.

No âmbito desta dissertação, salienta-se que o método de imobilização poderá facilitar as actividades de biocatálise a realizar no contexto sala de aula, mas não só,

pois poderá trazer mais valias em termos industriais, quer seja na indústria de queijos ou nos tratamentos de efluentes gorduroso, uma vez que o enzima poderá ser reutilizado.