

Artigo

Aplicação de Enzimas: Propostas para Disciplina Experimental**Ribeiro, B. D.;*** **Castro, A. M.;** **Salgado, A. M.;** **Coelho, M. A. Z.***Rev. Virtual Quim.*, 2013, 5 (5), 787-805. Data de publicação na Web: 9 de setembro de 2013<http://www.uff.br/rvq>**Application of Enzymes: Proposals for an Experimental Class**

Abstract: Currently, several groups of enzymes belonging to the classes of oxidoreductases and hydrolases have been applied as clean alternatives for many processes in food, detergents, textiles and pharmaceutical industries. The objective of this article is to present new approaches for undergraduate experimental classes based on simple and rapid methodologies, concerning the application of enzymes (cellulases, hemicellulases, pectinases, proteases, ureases and tyrosinases). The practices are adequated to be used in disciplines in the areas of enzyme technology and food technology, among others.

Keywords: Enzymes; hydrolysis; biocatalysis.

Resumo

Diversos grupos de enzimas das classes das oxidorreduções e hidrolases são aplicados como alternativas limpas em muitos processos nas indústrias de alimentos, detergentes, têxteis e fármacos. O objetivo desse artigo é apresentar novas abordagens para disciplinas experimentais do ensino superior, baseadas em metodologias simples e rápidas, para a aplicação de alguns grupos de enzimas (celulases, hemicelulases, pectinases, proteases, ureases e tirosinases). As práticas são adequadas para serem oferecidas em disciplinas nas áreas de tecnologia enzimática e tecnologia de alimentos, dentre outras.

Palavras-chave: Enzimas; hidrólise; biocatálise.

* Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, Centro de Tecnologia, Ilha do Fundão, CEP: 21941-598, Rio de Janeiro-RJ, Brasil. Tel.: (21) 2562-7622.

✉ bernardo@eq.uff.br

DOI: [10.5935/1984-6835.20130057](https://doi.org/10.5935/1984-6835.20130057)

Aplicação de Enzimas: Propostas para Disciplina Experimental

Bernardo D. Ribeiro,^{a,*} Aline M. Castro,^b Andrea M. Salgado,^a Maria Alice Z. Coelho^a

^a Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, Centro de Tecnologia, Ilha do Fundão, CEP: 21941-598, Rio de Janeiro-RJ, Brasil.

^b Petrobras, Gerência de Biotecnologia, Centro de Pesquisas Leopoldo A. Miguez de Mello, Av. Horácio Macedo, 950, Ilha do Fundão, CEP: 21941-920, Rio de Janeiro-RJ, Brasil.

*bernardo@eq.ufrj.br

Recebido em 12 de março de 2012. Aceito para publicação em 11 de fevereiro de 2013

- 1. Introdução**
- 2. Procedimento experimental**
 - 2.1. Orientações Gerais
 - 2.2. Celulases
 - 2.3. Pectinases e Hemicelulases
 - 2.4. Proteases
 - 2.5. Ureases
 - 2.6. Tirosinases
- 3. Resultados e Discussão**
 - 3.1. Celulases
 - 3.2. Pectinases e Hemicelulases
 - 3.3. Proteases
 - 3.4. Ureases
 - 3.5. Tirosinases
- 4. Conclusões**

1. Introdução

As enzimas são catalisadores biológicos de natureza essencialmente proteica, que participam em várias reações bioquímicas, tendo como papel fundamental o controle metabólico. Estas moléculas aceleram reações termodinamicamente viáveis, sendo extremamente versáteis, estereoespecíficas,

e de elevada importância nos processos biotecnológicos.¹

Normalmente os processos enzimáticos têm ação rápida, não apresentam toxidez nem geram problemas ambientais, ocorrem em condições brandas de temperatura e pH, atuando sobre um substrato específico.^{1,2}

Em disciplinas nas áreas de bioquímica e cinética enzimática, conceitos relacionados a

propriedades termodinâmicas e cinéticas das reações catalisadas por enzimas são abordados com profundidade,^{3,4} com a realização de experimentos nas aulas práticas, conduzidos em condições ideais de reação (baixa concentração de enzima em relação à concentração de substrato, visando garantir a verificação da taxa inicial de hidrólise) e sob condições variadas de temperatura e concentrações de substrato, de forma a se determinar parâmetros como K_m , K_i e V_m .^{5,6} Outra abordagem possível é baseada no ponto de vista tecnológico da biocatálise, ou seja, a representação de reações reais, como se observaria no cotidiano das indústrias, de forma que alunos de cursos de graduação em engenharias e ciências exatas (por exemplo) tenham contato com procedimentos aplicados em larga escala para o monitoramento de bioprocessos, como o método de Lowry⁷ para dosagem de proteínas (Sigma Aldrich)⁸ e de Somogyi⁹ ou Somogyi-Nelson^{10,11} para dosagem de açúcares redutores totais.¹²

Com o conhecimento da natureza das enzimas e do seu poder catalítico, seu uso estendeu-se gradualmente a várias áreas, como na produção de alimentos, na fabricação de detergentes e nas indústrias têxtil e médico-farmacêutica. A maioria das enzimas utilizadas comercialmente (aproximadamente 90 %) é de origem microbiana extracelular, tendo como exemplos proteases, pectinases, celulases e hemicelulases.^{13,14}

Dessa forma, a proposta deste trabalho foi avaliar e comparar a aplicação de enzimas em diversos substratos, focalizando àqueles presentes na rotina diária das pessoas, facilitando assim seu apelo didático em aulas experimentais e fornecendo subsídios para o ensino de práticas realizadas industrialmente em bioprocessos envolvendo a aplicação de enzimas.

2. Procedimento experimental

2.1. Orientações Gerais

Em todos os experimentos para a realização da cinética enzimática, após a adição da enzima à solução de substrato, é necessária a imediata retirada de uma alíquota (1,5 mL) como ponto inicial da reação. Este volume deve ser colocado em um tubo de polipropileno (tipo *Eppendorf*), sendo então incubado por 5 min em banho a 100 °C (para inativação das enzimas), centrifugado e o sobrenadante analisado de acordo com a metodologia de cada prática. Este ponto inicial pode ser considerado como o branco da reação. Em intervalos de tempo pré-estabelecidos (por exemplo, a cada 15 minutos), outras amostras devem ser retiradas e submetidas a esse mesmo procedimento, perfazendo assim um total de 1 hora e meia de reação, tempo estabelecido como adequado para a condução das aulas experimentais.

2.2. Celulases

As celulases compreendem um complexo enzimático com numerosas enzimas (como endoglucanases, EC 3.2.1.4; beta-glicosidases, EC 3.2.1.21; e celobio-hidrolases, EC 3.2.1.91), que atuam sinergicamente na hidrólise da fibra celulósica, um homopolissacarídeo constituído por unidades de glicose unidas por ligações do tipo β -1,4 e cuja unidade de repetição é o dissacarídeo celobiose.¹⁵ Produtos (majoritariamente glicose e celobiose) podem inibir a ação das enzimas. Em alguns casos, o material celulósico é submetido a um ou mais tipos de pré-tratamentos (dentre alcalinos, ácidos, mecânicos ou biológicos), previamente ao tratamento enzimático, com o objetivo de tornar a celulose menos cristalina e mais suscetível à ação das enzimas. As celulases apresentam aplicação nas indústrias de papel

e celulose, têxtil, sucos de frutas, álcool e detergentes, dentre outras.¹⁵⁻¹⁸ A Figura 1 apresenta a reação geral de hidrólise da

celulose, onde a unidade em destaque na fibra (entre colchetes) representa a unidade de repetição, celobiose.

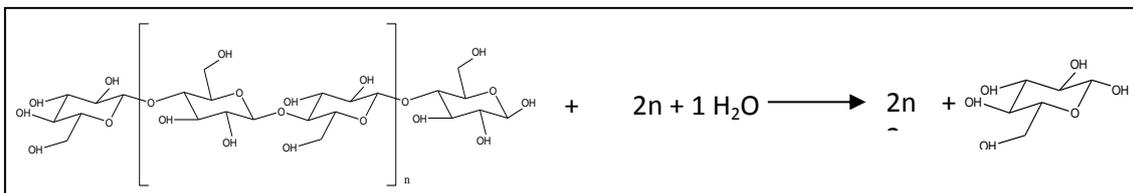


Figura 1. Reação geral de hidrólise da celulose

O objetivo deste experimento é determinar a atividade enzimática das celulases (através da dosagem da concentração de açúcares redutores totais pelo método de Somogyi, usando-se glicose pura como açúcar padrão⁹), frente à várias matérias-primas, como cascas de frutas (maçã e laranja), jornal, papel, algodão, tecidos (jeans e malha) por até 90 min de atuação das enzimas.

Os equipamentos necessários para sua realização são: *shaker* de bancada, balança analítica, placa de aquecimento, centrífuga para tubos de polipropileno, espectrofotômetro para leitura na região do visível e pipeta automática de 1 mL. Já os materiais de laboratório requeridos são: frascos cônicos (tipo *Erlenmeyer*) de 250mL, proveta de 100 mL, espátula, faca de ponta arredondada, tubos de polipropileno, ponteiros para pipetas de 1mL, tubos tipo Folin-Wu, bécher de 1 L e cubeta de plástico. Por fim, os reagentes necessários são: carbonato de sódio anidro, sal de Rochelle (tartarato duplo de sódio e potássio), bicarbonato de sódio, sulfato de sódio anidro, sulfato de cobre penta-hidratado, ácido sulfúrico, molibdato de amônio, arseniato de sódio hepta-hidratado, glicose pura (para preparo dos reagentes de Somogyi),⁹ ácido bórico, ácido acético, ácido fosfórico e hidróxido de sódio (para preparo do tampão). Caso algum reagente citado esteja disponível em outro grau de hidratação, este poderá ser utilizado,

contanto que se faça o ajuste na massa que deve ser pesada do reagente.

O tampão universal pH 5 deve ser preparado misturando-se 74,2 mL de solução estoque ácida 40 mM (2,3 mL/L de ácido fosfórico, 2,3 mL/L de ácido acético e 2,47 g/L de ácido bórico) e 25,8 mL de solução estoque alcalina (200 mN de hidróxido de sódio).¹⁹

Para a realização dos experimentos, deve-se utilizar 1 g de cada substrato, previamente cortado em tamanhos pequenos (0,5 cm x 0,5 cm). Em frascos cônicos de vidro de 250 mL, já contendo os substratos, deve-se adicionar 100 mL de tampão universal pH 5,¹⁹ aclimatar o frasco a 50 °C, e então adicionar 500 µL de uma preparação comercial a base de celulases (como por exemplo Celluclast[®] 1.5 L, comercializada pela Novozymes). Uma vez adicionada à enzima, a reação se inicia e o tempo deve ser registrado. Os frascos devem ser incubados a 50 °C em *shaker*, sob agitação orbital de 200 rpm. O procedimento de inativação das enzimas deve ser realizado conforme descrito na seção 2.1.

Os sobrenadantes das amostras de cada tempo de reação devem então ser utilizados para a dosagem de açúcares redutores totais (recomenda-se realizar a análise de cada amostra do experimento em triplicata), conforme o método de Somogyi,⁹ cujo procedimento é bem estabelecido e amplamente reportado.^{20,21} Como a escala em que o método é realizado pode variar de acordo com os materiais disponíveis,

recomenda-se que se adicione 100 µL de amostra (diluída em água destilada, caso necessário) aos tubos Folin-Wu, já contendo 900 µL de água destilada e 1 mL de solução resultante das misturas das soluções A (2 % p/v de bicarbonato de sódio, 1,5 % p/v de tartarato duplo de sódio e potássio, 3 % p/v de carbonato de sódio anidro e 14,25 % p/v de sulfato de sódio anidro) e B (2 % p/v de sulfato de cobre penta-hidratado e 10 % p/v de sulfato de sódio anidro), em proporção 4:1 (v/v). Depois de 10 min. a 100 °C, seguido de resfriamento por aproximadamente 15 min, deve-se adicionar 2 mL do reagente C (5 % p/v de molibdato de amônio, 5 % v/v de ácido sulfúrico concentrado e 0,6 % p/v de arseniato de sódio hepta-hidratado, previamente preparada e mantida a 37 °C por 2 dias), agitar em vórtex, completar com água destilada até a marca de 25 mL (geralmente gravada nos tubos). Terminada esta operação faz-se a leitura das absorvâncias em espectrofotômetro a 540 nm. É importante atentar que a leitura de absorvância no espectrofotômetro deve ser zerada com uma solução de 100 µL de amostra do início (0 min) da reação. Esta amostra é submetida às mesmas etapas descritas acima.

Uma curva de calibração deve ser preparada, utilizando-se uma solução estoque 1 g/L de glicose pura, em diferentes diluições. Recomenda-se utilizar como pontos da curva a própria solução estoque, bem como esta solução diluída (em água destilada) 1,5, 2, 3, 5 e 10 vezes, todos em triplicata. Cada ponto da curva (incluindo o branco da curva, no qual se utiliza 100 µL de água destilada ao invés de solução de glicose) deve ser tratado como uma amostra e submetido ao mesmo procedimento descrito no parágrafo anterior.

Os pares de dados (absorvância e concentração de glicose, em g/L) devem ser plotados em *software* com planilha de cálculo, onde ferramentas de regressão linear devem ser aplicadas para a obtenção da equação da curva de calibração, que recomenda-se que seja forçada a passagem pela origem. Plotando-se, por exemplo, os dados de absorvância no eixo *x* e os de

concentração no eixo *y*, o cálculo da concentração de açúcares nas amostras dos experimentos poderá ser feito pela seguinte equação:

$$\text{Conc. Açúcares (g/L)} = \alpha \times \text{Abs} \times \text{dil} \quad (1)$$

Onde α é o coeficiente angular da curva, Abs é o valor médio das absorvâncias registradas para as réplicas de uma mesma amostra do experimento e dil é o fator de diluição, ao qual às amostras dos experimentos foram submetidas.

Uma boa curva padrão deve apresentar coeficiente de ajuste (R^2) de pelo menos 0,9900.

Recomenda-se o uso de luvas tipo cirúrgicas durante a adição dos reagentes, bem como de luva de proteção térmica ao retirar os tubos de Folin-Wu do banho de aquecimento. Após o registro da absorvância das soluções, estas devem ser colocadas em frascos de plástico ou de vidro, para seu adequado descarte.

2.3. Pectinases e Hemicelulases

Pectinases e hemicelulases são enzimas importantes no processamento de frutas e vegetais e na produção de vinhos, atuando de formas distintas nessas aplicações. Enquanto as pectinases atuam na despolimerização (poligalacturonase, EC 3.2.1.15) ou na hidrólise de grupamentos éster (pectina esterases, EC 3.1.1.1) de pectinas, produzindo ácidos poligalacturônicos, galacturônicos e metanol, as hemicelulases (tais como endo-1,4- β -xilânase, EC 3.2.1.8; xilana-1,4- β -xilosidase, EC 3.2.1.37; e α -N-arabinofuranosidase, EC 3.2.1.55) atuam sobre diversos substratos, como mananas, xilanas, arabinanas, entre outros polissacarídeos.²²⁻²⁴ A atuação destas enzimas pode ser sinérgica, acelerando assim a hidrólise dos substratos.²⁵ A Figura 2 ilustra uma reação esquemática da hidrólise de uma molécula hipotética de pectina, destacando

os dois principais produtos da reação: o ácido galacturônico em sua forma metilada e não metilada.

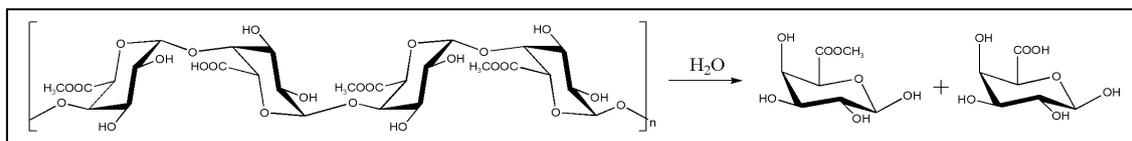


Figura 2. Reação hipotética de hidrólise da pectina. A reação está intencionalmente sem balanço estequiométrico, pois a proporção entre moléculas de ácido galacturônico metiladas e não metiladas depende da fonte do polissacarídeo

O objetivo deste experimento é a determinação da atividade enzimática (através da dosagem da concentração de açúcares redutores totais pelo método de Somogyi)⁹ frente à atuação das enzimas pectinases e hemicelulases, empregadas conjuntamente ou em separado, sobre polpas de frutas (maçã e laranja, sem casca) como substratos, durante até 90 min.

Os equipamentos necessários para sua realização são *shaker* de bancada, balança analítica, placa de aquecimento, centrífuga para tubos de polipropileno, liquidificador, espectrofotômetro para leitura na região do visível e pipeta automática de 1 mL. Já os materiais de laboratório requeridos são frascos cônicos (tipo *Erlenmeyer*) de 250 mL, proveta de 100 mL, ponteiras para pipetas de 1 mL, tubos de polipropileno, espátula, faca de ponta arredondada, tubos tipo Folin-Wu, bécher de 1 L e cubeta de plástico. Por fim, os reagentes necessários são carbonato de sódio anidro, sal de Rochelle (tartarato duplo de sódio e potássio), bicarbonato de sódio, sulfato de sódio anidro, sulfato de cobre penta-hidratado, ácido sulfúrico, molibdato de amônio, arseniato de sódio hepta-hidratado, glicose pura (para preparo dos reagentes de Somogyi), fosfato dibásico de sódio e ácido cítrico (para preparo do tampão).

Para cada 100 mL de tampão fosfato-citrato pH 5 a ser preparado, deve-se misturar 25,7 mL de solução 200 mM de fosfato dibásico de sódio, 24,3 mL de solução

100 mM de ácido cítrico e 50 mL de água destilada.²⁶

Para a realização deste experimento, devem ser preparados sucos de frutas (60 g de substrato em 300 mL de tampão fosfato-citrato pH 5,²⁶ processados em liquidificador por 1 minuto, e utilizados na forma integral, sem filtração), que devem ser mantidos a 45 °C em frascos cônicos de vidro de 250 mL. Os experimentos podem ser realizados de 3 formas distintas, conduzidos em paralelo, adicionando-se aos 100 mL de suco de cada frasco: A) 200 µL de preparado comercial a base hemicelulases (como por exemplo *Viscozyme*®, comercializado pela *Novozymes*), apenas; B), 200 µL de pectinase comercial (por exemplo *Ultrazym*®, comercializado pela *Novozymes*), apenas; e C) 100 µL de cada um desses preparados. Em todos os casos, o mesmo procedimento experimental deve ser seguido. Os frascos devem então ser incubados sob agitação orbital de 200 rpm.

Amostras devem ser aliqüotadas do meio de reação (pelo uso de pipeta automática de 1 mL) periodicamente, e os sobrenadantes devem então ser utilizados para a dosagem de açúcares redutores totais, conforme o protocolo de Somogyi⁹ descrito na seção 2.2.1. Recomenda-se neste caso também o uso de luvas tipo cirúrgicas durante a adição dos reagentes, bem como de luva de proteção térmica ao retirar os tubos de Folin-Wu do banho de aquecimento. A assistência do professor ou do monitor da disciplina nos momentos de manipulação dos tubos no

banho é recomendada. Após o registro da absorvância das soluções, estas devem ser colocadas em frascos de plástico ou de vidro, para seu adequado descarte.

2.4. Proteases

As proteases catalisam a clivagem de proteínas via reações de hidrólise, onde uma molécula de água é adicionada aos aminoácidos envolvidos em cada ligação peptídica, facilitando assim o ataque nucleofílico a uma carbonila normalmente não reativa, de acordo com a reação apresentada na Figura 3.²⁷

Dentre os diversos tipos de proteases, destaca-se a bromelina (*fruit bromelain*, EC 3.4.22.33), que é uma protease do tipo cisteínica. Esta enzima usa como estratégia a ativação do radical de cisteína por uma histidina, a qual faz a função de um nucleófilo que ataca a ligação peptídica. A bromelina é extraída do abacaxi (*Ananas sativa*) por precipitação com álcool (etanol). Sua aplicação industrial normalmente se dá para o amaciamento de carnes, estabilização de cervejas e vinhos, fabricação de couro, auxiliares digestivos e produção de hidrolisados proteicos.^{1,28,29}

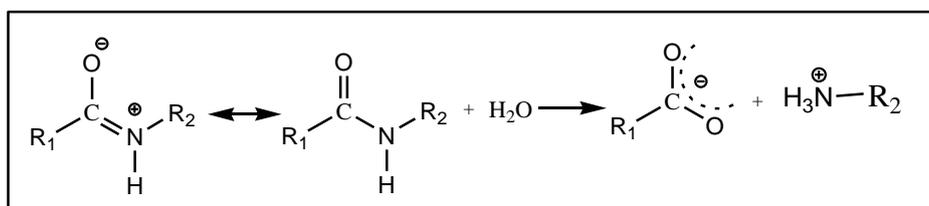


Figura 3. Representação da ação de proteases sobre substratos proteicos

O objetivo deste experimento é a avaliação do desempenho da enzima bromelina na catálise da hidrólise de proteínas de vários substratos (amendoim sem casca, carne bovina moída e ovo – clara e gema), durante um período de reação de 90 min. A quantificação do progresso da reação ocorre pela dosagem da concentração de proteínas solúveis totais, de acordo com o método de Lowry.⁷

Os equipamentos necessários para sua realização são *shaker* de bancada, balança analítica, centrífuga para tubos de polipropileno, liquidificador, vórtex, espectrofotômetro para leitura na região do visível, pipeta automática de 1 mL e pipeta automática de 100 μ L. Já os materiais de laboratório requeridos são frascos cônicos (tipo *Erlenmeyer*) de 250 mL, proveta de 100 mL, tubos de polipropileno, espátula, faca de ponta arredondada, ponteiros para pipetas de 1 mL e 100 μ L e cubeta de plástico. Por fim, os reagentes necessários são soro

albumina bovina (BSA), ácido tricloroacético (TCA), carbonato de sódio, sulfato de cobre penta-hidratado, tartarato duplo de sódio e potássio, hidróxido de sódio, reagente Folin-Ciocalteu (para preparo dos reagentes de Lowry), ácido bórico, ácido acético, ácido fosfórico e hidróxido de sódio (para preparo do tampão). Caso algum reagente citado esteja disponível em outro grau de hidratação, este poderá ser utilizado, contanto que se faça o ajuste na massa que deve ser pesada do reagente.

O tampão universal pH 6 deve ser preparado misturando-se 70,4 mL de solução estoque ácida 40 mM (2,3 mL/L de ácido fosfórico, 2,3 mL/L de ácido acético e 2,47 g/L de ácido bórico) e 29,6 mL de solução estoque alcalina (200 mN de hidróxido de sódio).¹⁹

Com base no método de Lowry,⁷ sugere-se o preparo de 3 soluções estoque; solução A (2 % p/v de carbonato de sódio em 100 mN

de hidróxido de sódio), solução B (1 % p/v de sulfato de cobre penta-hidratado) e solução C (4 % p/v de tartarato duplo de sódio e potássio). As soluções A, B e C devem ser misturadas na proporção de 99:0,5:0,5 (v/v/v) para compor a solução final para a reação (reagente de cobre).

Para realização do experimento, recomenda-se utilizar 20 g de cada substrato triturado (por cerca de 1 min, em liquidificador) junto com 100 mL de tampão universal (pH 6), a 50 °C.¹⁹ Da mistura formada, devem ser separados 90 mL, e adicionados 10 mL de polpa de abacaxi recém-obtida, seguindo-se o procedimento experimental geral apresentado no início da seção 2. Frascos cônicos de vidro de 250 mL contendo a mistura foram mantidos a 50 °C, sob agitação orbital de 200 rpm.

Amostras devem ser aliqüotadas do meio de reação (1 mL em cada tempo de reação) periodicamente, e os sobrenadantes devem então ser utilizados para a dosagem de proteínas. Para tal, 500 µL de amostra (se necessário, diluída em água destilada) devem ser adicionados a tubos de polipropileno contendo 1 mL de solução 20 % p/v de TCA, seguido de incubação a temperatura ambiente por 10 min. Em seguida, as amostras devem ser centrifugadas por 5 min a 1000 g. Do sobrenadante da centrifugação, transfere-se 50 µL para outro tubo plástico, onde se adiciona 2 mL do reagente de cobre e 450 µL de água destilada, seguido por agitação em vórtex. Depois de 10 min de reação a temperatura ambiente sem incidência de luz (os tubos podem ser cobertos com uma folha de papel alumínio, por exemplo), deve-se adicionar em cada tubo 200 µL de reagente de Folin-Ciocalteu (previamente diluído 2 vezes em água destilada), e agitar novamente em vórtex. Os tubos devem ser deixados a temperatura ambiente por mais 30 min, e ao final, as absorvâncias das soluções a 660 nm devem ser registradas. Importante atentar que a leitura de absorvância no espectrofotômetro deve ser zerada com uma solução de 500 µL de amostra do início (0 min) da reação, e

submetida às mesmas etapas descritas acima.

Uma curva de calibração deve ser preparada, utilizando-se uma solução estoque 0,1 g/L de BSA, em diferentes diluições. Recomenda-se utilizar como pontos da curva a solução estoque diluída (em água destilada) 1,5, 1,7, 2, 3, 5 e 10 vezes, todos em triplicata. Cada ponto da curva (incluindo o branco da curva, no qual se utiliza 500 µL de água destilada ao invés de solução de BSA) deve ser tratado como uma amostra e submetido ao mesmo procedimento descrito no parágrafo anterior.

Os pares de dados (absorvância e concentração de proteínas, em g/L) devem ser plotados em *software* com planilha de cálculo, onde ferramentas de regressão linear devem ser aplicadas para a obtenção da equação da curva de calibração, que recomenda-se que seja forçada a passagem pela origem. Plotando-se, por exemplo, os dados de absorvância no eixo *x* e os de concentração no eixo *y*, o cálculo da concentração de proteínas nas amostras dos experimentos poderá ser feito pela Equação 1.

Recomenda-se o uso de luvas tipo cirúrgicas durante a adição dos reagentes e manipulação dos tubos com as soluções, bem como durante a leitura de absorvância em espectrofotômetro. Após o registro das absorvâncias, estas devem ser colocadas em frascos de plástico ou de vidro, para seu adequado descarte.

2.5. Ureases

Ureases (ureia amido-hidrolase, EC 3.5.1.5) são enzimas que catalisam a hidrólise da ureia, a uma taxa 10^{14} vezes mais rápida que a reação sem enzima, produzindo amônia e gás carbônico. A urease está presente em materiais como sementes de soja, feijão de porco (*Canavalia ensiformis*), melão (*Citrullus vulgaris*), guandu (*Cajanus cajan*), dentre outros. No entanto, nos

últimos anos, o conhecimento sobre ureases de origem bacteriana tem ultrapassado ao daquelas provenientes de plantas, pois a medida da eficiência da fertilização do solo com nitrogênio advindo da ureia é diminuída sensivelmente pela atividade ureolítica microbiana, e aumenta em consequência do arado do solo,³⁰ o que demonstra a forte ação destas enzimas de fontes microbianas. Recentemente, as ureases de *Klebsiella aerogenes*, *Bacillus pasteurii* e *Helicobacter pylori* foram obtidas e caracterizadas por cristalografia de raio-X, apesar de terem sido associadas a várias patologias.³¹

Também foi demonstrado recentemente que a urease pode ser usada para fins analíticos,²⁹ como na aplicação em biossensores, que permite o uso de eletrodos

de amônia como medidores, ou em ensaios quimioluminescentes, produzindo assim um sinal, onde sua intensidade é linear na faixa 4 – 400 mM,³² ou ainda em ensaios colorimétricos, onde se usa uma segunda enzima, glutamato desidrogenase, cujo progresso da reação pode ser medido pela diminuição na concentração de NADH, conforme apresentado na reação da Figura 4. Biossensores contendo ureases imobilizadas são utilizados crescentemente em análises clínicas, ambientais e em alimentos, e tem sido apontados, recentemente, como uma alternativa promissora. São de fácil uso, resposta rápida, elevada portabilidade e confiabilidade para análise de ureia em diferentes amostras.^{33,34}

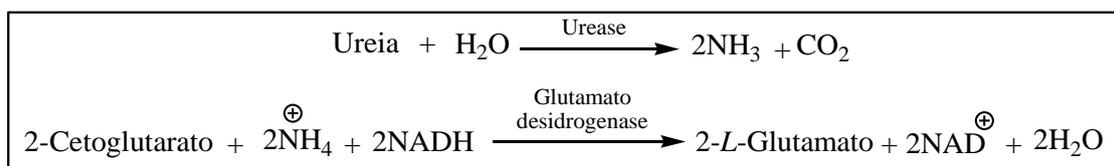


Figura 4. Representação da ação de ureases, como ocorrido em biossensores

A urease também pode ser utilizada na análise de alimentos, como carnes e leite, pois como a ureia é o produto final do metabolismo proteico mais importante, esta serve como um índice de proteína na dieta bovina. Ainda, o conteúdo de ureia em águas de tratamento ou piscinas indica a concentração de urina.¹⁴

O objetivo deste experimento é a determinação do desempenho de ureases provenientes de várias fontes (sementes de feijão de porco, de melão e de abóbora) na catálise da hidrólise de ureia. A reação é acompanhada pelo aumento da concentração de nitrogênio amoniacal, detectado pelo método do fenol-hipoclorito.³⁵ Para as reações, utiliza-se uma solução 1,5 % (p/v) de ureia, durante 90 min, e comparando os resultados obtidos.

Os equipamentos necessários para sua realização são *shaker* de bancada, balança analítica, centrífuga para tubos de

polipropileno, liquidificador, banho termostaticado, espectrofotômetro para leitura na região do visível, pipeta automática de 1 mL. Já os materiais de laboratório requeridos são frascos cônicos (tipo *Erlenmeyer*) de 250 mL, proveta de 100 mL, tubos de polipropileno, tubos tipo Folin Wu, espátula, faca de ponta arredondada, ponteiras para pipetas de 1 mL e cubeta de plástico. Por fim, os reagentes necessários são cloreto de amônio, fenol, nitroprussiato de sódio, hidróxido de sódio, hipoclorito de sódio (para preparo dos reagentes de fenol-hipoclorito), ácido bórico, ácido acético, ácido fosfórico e hidróxido de sódio (para preparo do tampão).

O tampão universal pH 8 deve ser preparado misturando-se 62,4 mL de solução estoque ácida 40 mM (2,3 mL/L de ácido fosfórico, 2,3 mL/L de ácido acético e 2,47 g/L de ácido bórico) e 37,6 mL de solução estoque alcalina (200 mN de hidróxido de sódio).¹⁹

Para a realização dos experimentos, deve-se pesar 1,5 g de ureia e dissolvê-la em 100 mL de tampão universal (pH 8),¹⁹ a 30 °C, adicionando em seguida 10 g da fonte enzimática previamente triturada. As reações devem ocorrer em frascos cônicos de vidro de 250 mL, sob agitação orbital de 200 rpm. O procedimento experimental geral, apresentado no início da seção 2, deve ser adotado.

Recomenda-se a retirada de amostras do meio de reação (pelo uso de pipeta automática de 1 mL) a cada 15 min, e uso dos sobrenadantes para a dosagem de nitrogênio amoniacal. O nitrogênio amoniacal deve ser dosado conforme método anteriormente descrito³⁵, para o qual, se recomenda as seguintes quantidades. Em tubos do tipo Folin-Wu, adiciona-se 500 µL de amostra, 500

µL de solução de fenol (0,5 % p/v de fenol e 0,025 % p/v de nitroprussiato de sódio) e 500 µL de solução de hipoclorito (0,21 % v/v de hipoclorito de sódio e 0,25 % p/v de hidróxido de sódio), incubando-se os tubos por 6 min a 56 °C. Passado esse tempo, deve-se adicionar água destilada aos tubos, até a marcação de 25 mL contida no vidro, seguida de homogeneização por inversão. As absorvâncias das amostras a 625 nm devem ser registradas.

A reação envolvida na detecção da amônia na presença dos reagentes é apresentada na Figura 5, na qual o nitroprussiato atua como um catalisador e o composto formado, o corante azul de indofenol, apresenta coloração azul escuro.

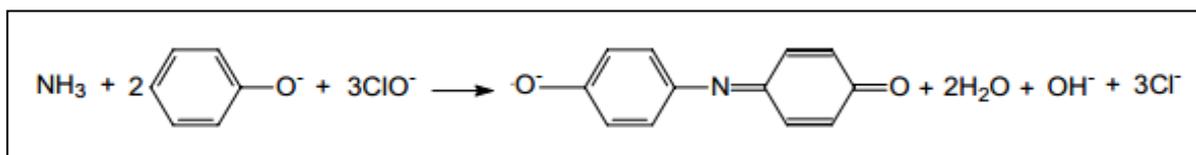


Figura 5. Representação geral da detecção de amônia na presença de fenol e hipoclorito³⁶

Uma curva de calibração deve ser preparada, utilizando-se solução uma solução estoque 3,8 g/L de cloreto de amônio, em diferentes diluições. Recomenda-se utilizar como pontos da curva a solução estoque diluída (em água destilada) entre 1000 e 5000 vezes, todos em duplicata. Cada ponto da curva (incluindo o branco da curva, no qual se utiliza 500 µL de água destilada ao invés de solução de cloreto de amônio) deve ser tratado como uma amostra e submetido ao mesmo procedimento descrito no parágrafo anterior. O teor de nitrogênio amoniacal será 26,4 % do teor de cloreto de amônio (relação mássica entre o peso do átomo N e do peso molecular do sal).

Os pares de dados (absorvância e concentração de nitrogênio amoniacal, em µg/L) devem ser plotados em *software* com planilha de cálculo, onde ferramentas de

regressão linear devem ser aplicadas para a obtenção da equação da curva de calibração. Recomenda-se que seja forçada a passagem pela origem. Plotando-se, por exemplo, os dados de absorvância no eixo *x* e os de concentração no eixo *y*, o cálculo da concentração nitrogênio amoniacal nas amostras dos experimentos poderá ser feito pela Equação 1.

Recomenda-se o uso de luvas tipo cirúrgicas durante a adição dos reagentes e manipulação dos tubos com as soluções de reação, bem como durante a leitura de absorvância em espectrofotômetro. Após o registro das absorvâncias, estas devem ser colocadas em frascos de plástico ou de vidro, para seu adequado descarte.

2.6. Tirosinases

A reação promovida pela polifenoloxidase (PFO), também conhecida como tirosinase (monofenol monooxigenase, EC 1.14.18.1), na

presença de oxigênio, gera quinonas e outros produtos de condensação, responsáveis pelo escurecimento dos vegetais (Figura 6).³⁷ Como exemplo desta ação, destaca-se o escurecimento da polpa de maçã, após seu corte.

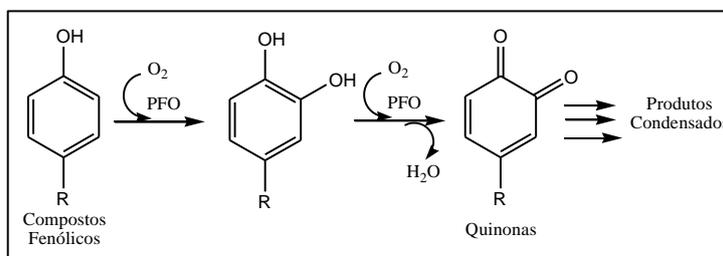


Figura 6. Representação da oxidação de fenóis catalisada pela tirosinase (PFO)

A polifenoloxidase utiliza oxigênio molecular para catalisar a oxidação de compostos fenólicos, mediante 2 reações distintas. Uma é a *orto*-hidroxilação de monofenóis em catecóis e a outra é a oxidação destes a *o*-quinonas. Estas últimas reagem espontaneamente entre si, formando oligômeros, que são instáveis em soluções aquosas, e, dependendo do substrato empregado, precipitam dentro de poucas horas.³⁷

Esta enzima pode ser obtida através de fontes vegetais, como batata doce (*Ipomea batatas*), casca de manga (*Mangifera indica*), folhas de chá (*Camellia sinensis*), tabaco (*Nicotiana tabacum*), fruta do conde (*Annona squamosa*), bem como de fontes fúngicas, como *Neurospora crassa*, *Coriolus sp.*, *Latania sp.* e *Agaricus bisporus*.³⁸

A polifenoloxidase pode ser utilizada no tratamento de efluentes contendo fenóis, na polimerização de compostos fenólicos, na composição de biossensores para detecção de fenol, na remoção de compostos xenobióticos e na oxidação de catecol, dentre outras aplicações.³⁹

O objetivo deste experimento é determinar o desempenho de tirosinases (através da medida da variação de absorbância a 280 nm, comparando-se com um padrão de tirosina a 0,05 % p/v) frente a

vários substratos, como fenol (0,1 % v/v), ácido tânico (0,03 % p/v), extratos de repolho roxo, rosa vermelha e beterraba (2 % p/v) por até 90 min.

Os equipamentos necessários para sua realização são *shaker* de bancada, balança analítica, centrífuga para tubos de polipropileno, espectrofotômetro para leitura na região do visível, pipeta automática de 1 mL. Já os materiais de laboratório requeridos são frascos cônicos (tipo *Erlenmeyer*) de 250 mL, proveta de 100 mL, tubos de polipropileno, espátula, faca de ponta arredondada, ponteiras para pipetas de 1 mL e cubeta de plástico. Por fim, os reagentes necessários são ácido bórico, ácido acético, ácido fosfórico e hidróxido de sódio (para preparo do tampão, conforme descrito na seção 2.4.1).

Para realização deste experimento, deve-se adicionar 1 g de cogumelo (*Agaricus bisporus*) picado (cerca de 0,5 cm x 0,5 cm) a 100 mL de solução dos substratos preparados com tampão universal (pH 6),¹⁹ a uma temperatura de 30 °C, e realizando o procedimento experimental geral descrito no início da seção 2. O sistema de reação deve ser mantido em frascos cônicos de vidro de 250 mL, sob agitação orbital de 200 rpm.

As amostras aliqüotadas ao longo das reações (pelo uso de pipeta automática de 1

mL) devem ser centrifugadas e os sobrenadantes devem ter sua leitura de absorvância diretamente registrada, ou seja, diferentemente dos exemplos anteriores, não há reações adicionais para desenvolvimento de coloração e detecção dos produtos de hidrólise nesse caso.

O uso de luvas é opcional durante a maior parte das reações, sendo recomendado sistematicamente apenas no caso da reação contendo fenol como substrato. Ao final, as soluções podem ser descartadas na pia, à exceção daquela contendo fenol.

3. Resultados e Discussão

3.1. Celulases

Os resultados obtidos em função dos vários substratos utilizados são comparados

na Figura 2. Substratos que contém celulose e que são menos processados, como as cascas de maçã e de laranja, devem resultar em maior concentração de açúcares redutores totais (expressos como glicose) durante a reação. No caso da casca de maçã, o resultado mostrado na Figura 7 indica maior hidrólise do material. Já no caso da casca de laranja, a conversão não muito elevada pode estar associada a um fenômeno de inibição enzimática devido ao elevado teor inicial de açúcares redutores observado neste material (ou seja, o material utilizado já continha açúcares livres). A hidrólise mais extensa de materiais como a casca de maçã é um resultado esperado, já que os fungos filamentosos produtores de celulases (como *Aspergillus niger* e *Trichoderma reesei*) são agentes de deterioração de frutas e vegetais, processo que ocorre através da produção de enzimas que catalisam a degradação da parede celular da planta.⁴⁰

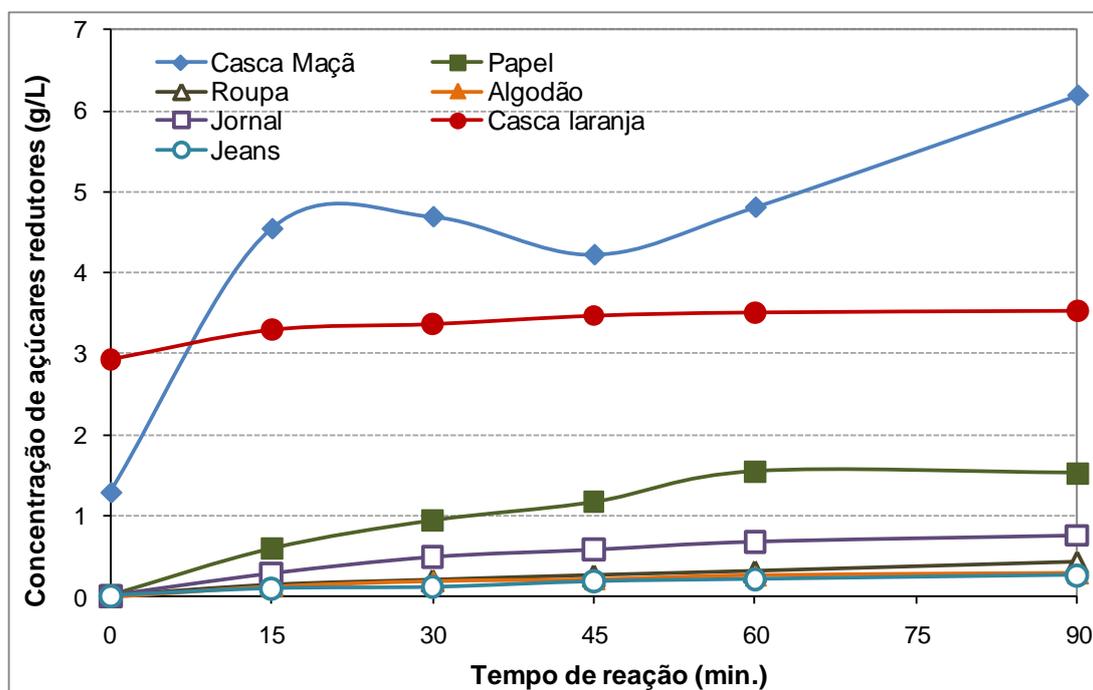


Figura 7. Cinética de hidrólise de materiais celulósicos, catalisada por celulases

No caso de materiais como papel, jornal, algodão e seus derivados têxteis (jeans e

roupa), a celulose apresenta grande porção da estrutura ainda na forma cristalina, o que

dificulta a ação de endoglucanases (que atuam randomicamente clivando as ligações de β -1,4-glicose nas regiões internas da celulose). Isso favorece a ação majoritária de exoglucanases (catalisando a clivagem apenas de terminais, redutores e não-redutores, da celulose) e beta-glicosidases (catalisando a clivagem de oligossacarídeos solúveis a glicose). O grau de hidrólise aparenta ser afetado pela presença de corantes em alguns dos materiais, como no caso do jornal e do jeans.^{1,15,17}

3.2. Pectinases e Hemicelulase

Os resultados observados durante a hidrólise de polpa de laranja e de polpa de maçã são apresentados nas Figuras 8a e 8b, respectivamente. A polpa de laranja apresenta um maior conteúdo de pectina, que possui grupos carboxílicos mais esterificados que os da polpa da maçã. No entanto, esta última apresenta um teor de hemiceluloses (27 %) maior que o da polpa de laranja (5%).¹

Pelos resultados apresentados na Figura 8a, pode ser observado como o maior grau de esterificação da pectina cítrica prejudicou a hidrólise da polpa de laranja. Isso ocorre porque a pectinase necessita de grupos carboxilas livres para sua ação hidrolítica.² A ação sinérgica entre hemicelulases e pectinases não foi tão eficiente, não se observando grandes aumentos na produção de açúcares redutores. Já na Figura 8b, percebe-se que houve uma maior hidrólise da polpa de maçã, comparada à da polpa de laranja, evidenciado pela maior quantidade de açúcares redutores liberados. Na hidrólise da polpa de maçã, os perfis de liberação de

açúcares redutores foram similares, tanto quando as enzimas foram aplicadas em separado, quanto em conjunto.

Caso os processos propostos estivessem sendo conduzidos em larga escala, as ações que poderiam ser tomadas seriam a interrupção da hidrólise da polpa de laranja após 45 min. de reação e da hidrólise da polpa de maçã após 60 min. de reação, ambas catalisadas por hemicelulases. A continuidade dessas reações por tempos mais longos não contribui para maior liberação de açúcares redutores. Já no caso da hidrólise da polpa de maçã catalisada por pectinases, o perfil de liberação de açúcares redutores indica que a reação poderia ser continuada por tempos mais longos. A decisão em um cenário real, no entanto, deve levar em consideração outros fatores, como o gasto energético do processo (para manter o reator agitado e na temperatura da reação) e a qualidade do produto de interesse.

No caso da hidrólise da polpa de laranja, uma alternativa para se aumentar a conversão seria o uso de preparados enzimáticos com maior atividade de pectina esterases, e uma proporção diferente entre pectinases e hemicelulases (80/20, v/v) devido à menor quantidade de hemicelulose. No caso da polpa de maçã, além das enzimas utilizadas, poderia se adicionar preparados comerciais nomeadamente à base de celulasas, já que na estrutura das paredes celulares vegetais há também celulose, em que pese o preparado comercial proposto para esta prática, Viscozyme, apresentar alguma atividade de celulasas (cerca de 12 % da atividade em carboximetilcelulose e 48 % da atividade em celulose cristalina, respectivamente, das observadas no preparado Celuclast).²⁷

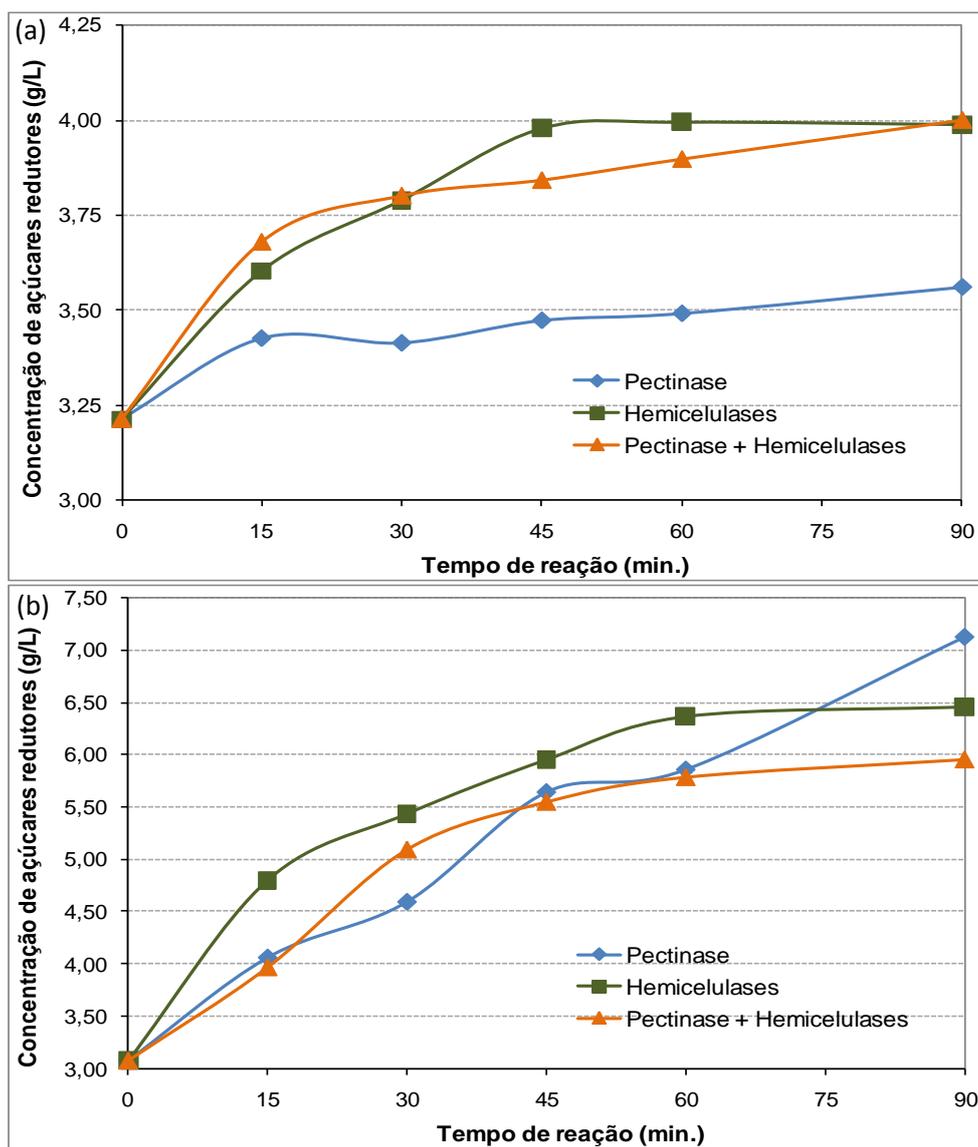


Figura 8. Cinética de hidrólise de (a) polpa de laranja e (b) polpa de maçã, catalisada por pectinases e hemicelulases

3.3. Proteases

A Figura 9 apresenta os resultados obtidos com os três diferentes substratos. As proteases apresentam diferentes estratégias de catálise: covalente com ataque nucleofílico (proteases serínicas e cisteínicas) e ácido-base (proteases aspárticas e metaloproteases).⁴¹ Por isso, sua reatividade varia sobre diferentes tipos de substratos. Desta forma, os resultados mostram que para a hidrólise de amendoim, a bromelina

promoveu boa hidrólise das proteínas (Figura 9), mas isso não implica que sua hidrólise será boa também quando incubada com outros tipos de proteases.¹ Já quando ovo foi utilizado como substrato, acredita-se que maiores teores de proteínas poderiam ter sido observados caso a clara tivesse sido separada da gema, já que estas frações possuem proteínas com propriedades funcionais diferentes (tais como ovoalbuminas e ovoglobulinas na clara e lipovitelininas e fosvitinas na gema).⁴²

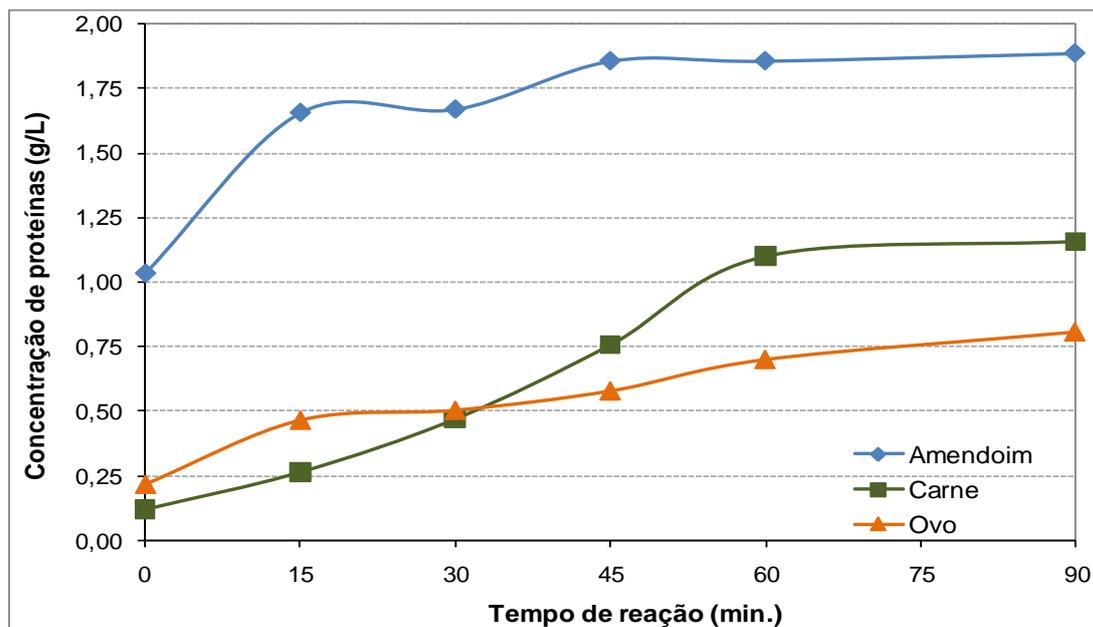


Figura 9. Cinética de hidrólise de substratos proteicos catalisada por bromelina

3.4. Ureases

Os resultados obtidos demonstram que feijão de porco apresenta ação de urease muito superior às demais fontes enzimáticas avaliadas, sendo cerca de 100 vezes maior que a da semente de abóbora e 1000 vezes maior que a da semente de melão (conforme

concentrações de nitrogênio amoniacal observadas após 90 min de reação), como visto na Figura 10. Outros experimentos poderiam ser propostos visando comparar a urease obtida desta fonte com outras leguminosas similares (soja, ervilha, lentilha, outros tipos de feijão), ou mesmo com alguma fonte de urease microbiana.

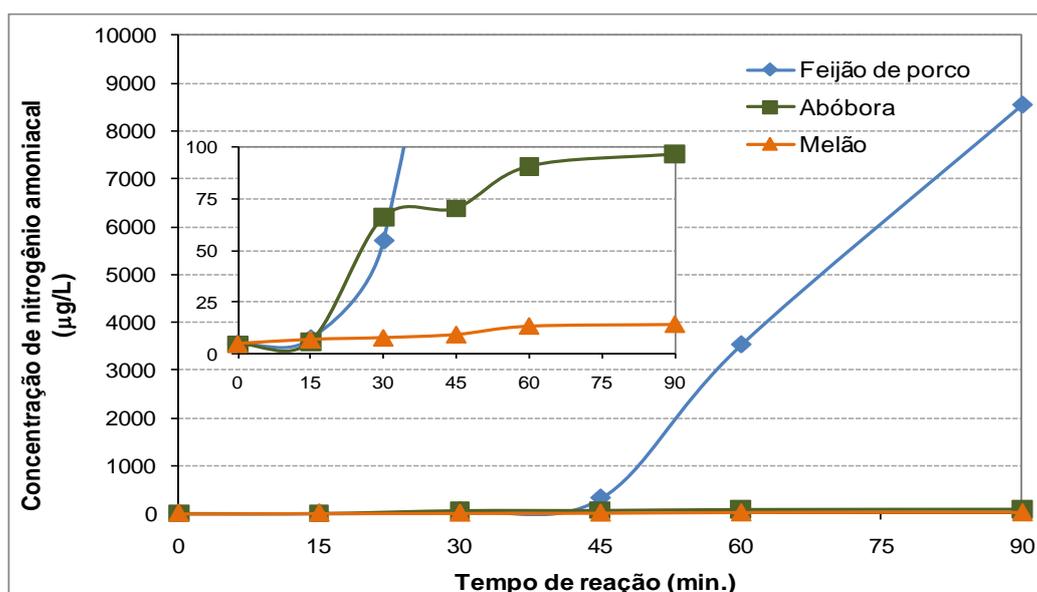


Figura 10. Cinética da atuação de ureases de fontes vegetais sobre ureia

Interessante observar por este conjunto de resultados que o método é aplicável à identificação da atividade de urease inclusive em baixas concentrações. Nas amostras obtidas após 60 min e 90 min de reação, os valores de nitrogênio amoniacal ultrapassam o limite da curva de calibração, demandando diluição das amostras previamente às análises.

3.5. Tirosinases

Os resultados apresentados na Figura 11, concernente à oxidação enzimática da tirosina, revelaram perfis esperados, indicando aumento da absorvância das soluções a 280 nm. Este comprimento de onda foi utilizado, por ser usado na detecção de alguns aminoácidos com cadeias laterais aromáticas (tirosina, triptofano, fenilalanina). Os valores de absorvância apresentados na Figura 11 já são os valores totais, obtidos

pela multiplicação das absorvâncias registradas em espectrofotômetro pelos fatores de diluição (em água destilada) aplicados a cada amostra.

Já os perfis observados quando foram empregados substratos ricos em antocianinas (rosa, repolho e beterraba), bem como fenol e ácido tânico, foram distintos. Nesses casos, a oxidação enzimática promove uma reação de polimerização, que não necessariamente gera variação na coloração que possa ser detectada na faixa de luz ultravioleta. As estruturas de algumas substâncias fenólicas são apresentadas na Figura 12.

No caso do uso de substratos ricos em antocianinas e outros compostos fenólicos, seria preciso variar os comprimentos de onda para cada tipo de composto fenólico a ser detectado, apresentando-se como exemplos 520 nm para antocianinas,⁴³ 385 nm para taninos hidrolisáveis e 430 nm para taninos condensados.⁴⁴

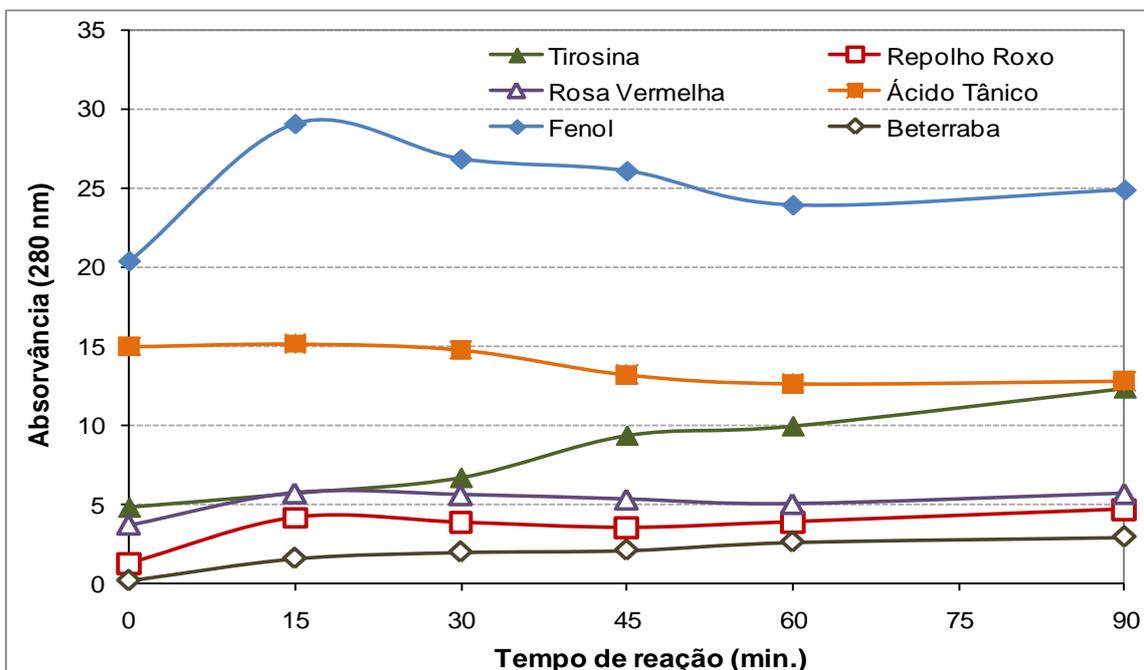


Figura 11. Cinética de oxidação de substratos fenólicos catalisada por tirosinases

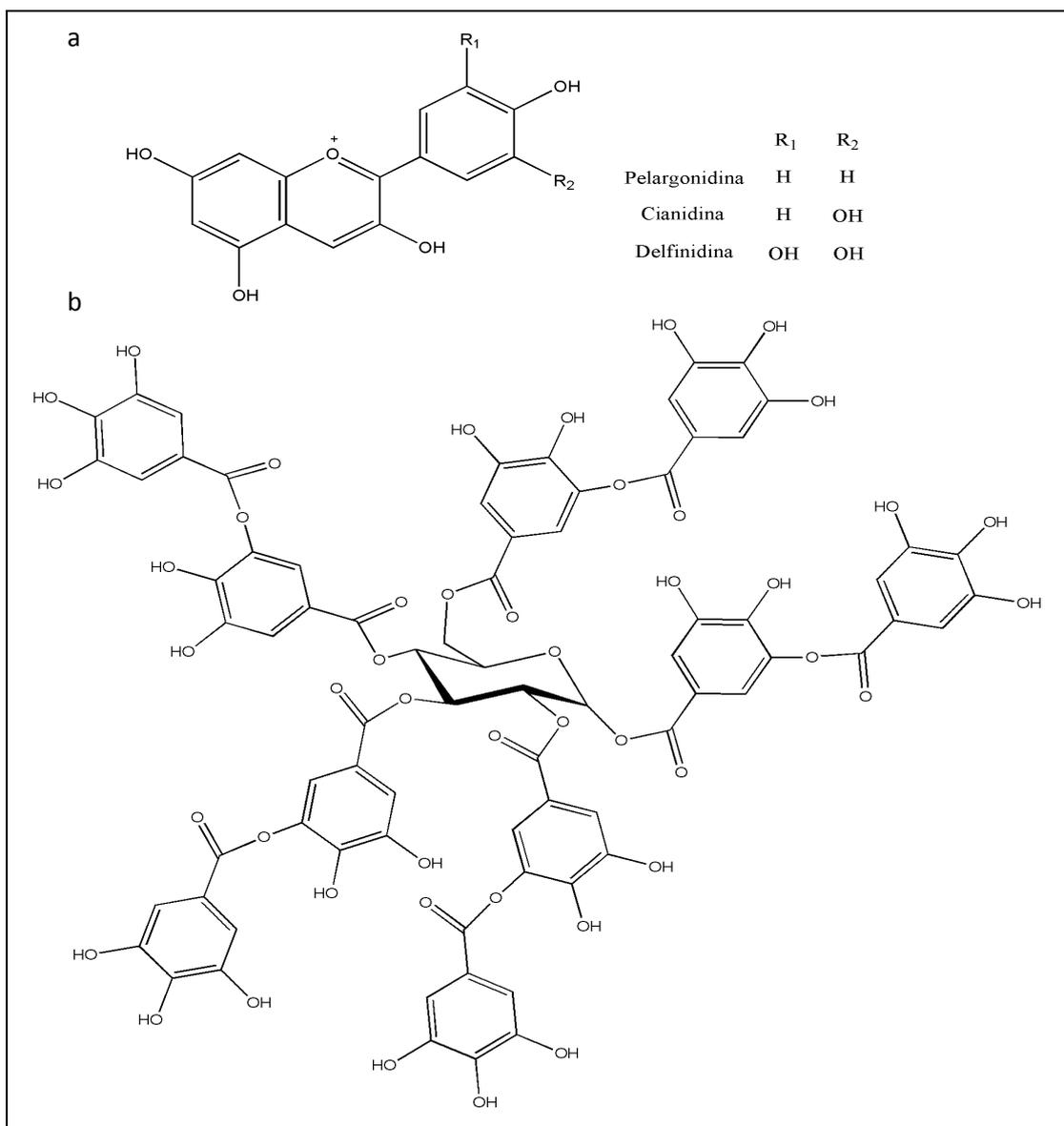


Figura 12. Exemplos de compostos fenólicos. (a) Antocianinas; e (b) Ácido tânico ⁴⁵

4. Conclusões

O presente trabalho mostra a possibilidade de se construir experimentos de fácil execução a serem aplicados em aulas práticas de disciplinas de tecnologia de alimentos e tecnologia enzimática, utilizando materiais de uso cotidiano e de fácil obtenção, como roupas, frutas, verduras e legumes. Adicionalmente a essa praticidade, os experimentos são de curta duração, podendo a maioria ser empregados em aulas com período de 2 horas, mediante o prévio

preparo dos materiais. Outro aspecto importante das práticas propostas é que as reações enzimáticas promovem alterações nos materiais utilizados que são de fácil e rápida detecção, como alterações de cor, além da visualização da mudança de consistência dos meios de reação e liquefação das matérias-primas sólidas. Por fim, as metodologias propostas demandam equipamentos básicos de laboratório, como balança, placa de aquecimento com agitação magnética, banho termostático ou *shaker* com agitação orbital, centrífuga e espectrofotômetro.

Desta forma, o estudo em questão comprova que de maneira eficaz e factível é possível enriquecer atividades didáticas relativas a disciplinas das áreas de engenharias e ciências exatas, com a inserção de aulas experimentais aplicadas. Isto contribui para o maior aprendizado dos alunos no que tange a procedimentos aplicados em larga escala envolvendo a biocatálise.

Referências Bibliográficas

- ¹ Aehle, W.; *Enzymes in Industry*, Wiley-VCH Verlag: Weinheim, 2004.
- ² Polaina, J.; MacCabe, A. P.; *Industrial Enzymes: Structure, Function and Applications*, Springer: Dordrecht, 2007.
- ³ Sítio da Wageningen University. Disponível em: <<http://biochemistry.wur.nl/MenB/Hoofdstuk%208%20en%2015.pdf>>. Acesso em: 01 maio 2012.
- ⁴ Sítio do grupo Biological Systems Engineering. Disponível em: <http://www.eq.ufri.br/biose/courses_enzimolind.html>. Acesso em: 01 maio 2012.
- ⁵ Sítio da Universidade Federal do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://www.eq.ufri.br/graduacao/programas/instquimica/iqb248.pdf>>. Acesso em: 01 maio 2012.
- ⁶ Sítio da London South Bank University. Disponível em: <<http://www.lsbu.ac.uk/biology/enzyme/practical1.html>>. Acesso em: 01 maio 2012.
- ⁷ Lowry, O.H.; Rosenbrough, N. J.; Farr, A. L.; Randall, R. J. *J. Biol. Chem.* **1951**, *193*, 265. [Link]
- ⁸ Sítio da Sigma Aldrich. Disponível em: <<http://www.sigmaaldrich.com/life-science/proteomics/post-translational-analysis/glycosylation/glycolytic-enzymes.html>>. Acesso em: 01 maio 2012.
- ⁹ Somogyi, M. *J. Biol. Chem.* **1952**, *195*, 19. [Link]
- ¹⁰ Nelson, N. *J. Biol. Chem.* **1944**, *153*, 375. [Link]
- ¹¹ Somogyi, M. *J. Biol. Chem.* **1945**, *160*, 61. [Link]
- ¹² Paschoalini, G.; Alcarde, V.E. *Revista Ciênc. Tecnol.* **2009**, *16*, 59. [Link]
- ¹³ Cabral, J. M. S.; Aires-Barros, M.R.; Gama, M.; *Engenharia Enzimática*, Lidel Edições Técnicas: Lisboa, 2003.
- ¹⁴ Gerhartz, W.; *Enzymes in Industry: Production and Applications*, VCH Publishers: New York, 1990.
- ¹⁵ Castro, A. M.; Pereira Jr., N. *Quím. Nova* **2010**, *33*, 181. [CrossRef]
- ¹⁶ Vyas, S.; Lachke, A. *Enzyme Microb. Technol.* **2003**, *32*, 236. [CrossRef]
- ¹⁷ Bhat, M. K. *Biotechnol. Adv.* **2000**, *18*, 355. [CrossRef] [PubMed]
- ¹⁸ Mahmoud, Y. A. G.; Mohamed, T.M. Em *Cellulase: Types and Actions, Mechanism, and Uses*; Golan, A. E., ed.; Nova Science: Nova Iorque, 2011, cap 7.
- ¹⁹ Castro, A. M.; Ribeiro, B. D. *Methods to Determine Enzymatic Activity*, Vermelho, A. B.; Couri, S., eds.; Bentham Science: Sharjah, 2012, cap 5.
- ²⁰ Demiate, I. M.; Wosiacki, G.; Czelusniak, C.; Nogueira, A. *Ciências Exatas e da Terra, Ciências Agrárias e Engenharia* **2002**, *8*, 65. [Link]
- ²¹ Silva, R. N.; Monteiro, V. N.; Alcanfor, J. X.; Assis, E. M.; Asquieri, E. R. *Ciênc. Tecnol. Aliment.* **2003**, *23*, 337. [CrossRef]
- ²² Jayani, R. S.; Saxena, S.; Gupta, R. *Process Biochem.* **2005**, *40*, 2931. [CrossRef]
- ²³ Kashyap, D. R.; Vohra, P. K.; Chopra, S.; Tewari, R. *Bioresour. Technol.* **2001**, *77*, 215. [CrossRef]
- ²⁴ Saha, B. C. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **2003**, *30*, 279. [CrossRef] [PubMed]

- ²⁵ Dhiman, S. S.; Sharma, J.; Battan, B. *Bioresources* **2008**, *3*, 1377. [[Link](#)]
- ²⁶ Ruzin, S. E. *Plant Microtechnique and Microscopy*; 1a. ed., Oxford University: Nova Iorque, 1999. [[Link](#)]
- ²⁷ Castro, A. M.; *Dissertação de Mestrado*, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brasil, 2006. [[Link](#)]
- ²⁸ Berg, J. M.; Tymoczko, J. L.; Stryer, L.; *Bioquímica*, 5a. ed., Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 2004.
- ²⁹ Clemente, A. *Trends Food Sci. Technol.* **2000**, *11*, 254. [[CrossRef](#)]
- ³⁰ Gil-Sotres, F.; Trasar-Cepeda, C.; Leirós, M.C.; Seoane, S. *Soil Biol. Biochem.* **2005**, *37*, 877. [[CrossRef](#)]
- ³¹ Das, N.; Kayastha, A. M.; Srivastava, P. K. *Phytochemistry* **2002**, *61*, 513. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ³² Zhang, Z.; Zhang, S.; Zhang, X. *Anal. Chim. Acta*, **2005**, *541*, 37. [[CrossRef](#)]
- ³³ Singh, M.; Verma, N.; Garg, A.K.; Redhu, N. *Sens. Actuators, B.* **2008**, *134*, 345. [[Crossref](#)]
- ³⁴ György, E.; Sima, F.; Mihailescu, I.N.; Smausz, T.; Megyeri, G.; Kékesi, R.; Hopp, B.; Zdrentu, L.; Petrescu, S. M. *J. Biomed. Mater. Res. A* **2009**, *89A*, 186. [[CrossRef](#)]
- ³⁵ Weatherburn, M. W. *Anal. Chem.* **1967**, *39*, 971. [[CrossRef](#)]
- ³⁶ Santos, J. S.; *Dissertação de Mestrado*, Universidade Federal de Viçosa, Brasil, 2007. [[Link](#)]
- ³⁷ Kameda, E.; *Dissertação de Mestrado*, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brasil, 2003.
- ³⁸ Durán, N.; Esposito, E. *Appl. Catal., B.* **2000**, *28*, 83. [[CrossRef](#)]
- ³⁹ Durán, N.; Rosa, M.A.; D'Annibale, A.; Gianfreda, L. *Enzyme Microb. Technol.* **2002**, *31*, 907. [[CrossRef](#)]
- ⁴⁰ Jay, J. Y.; *Microbiologia de Alimentos*, 6a. Ed., Artmed Editora: Porto Alegre, 2005. 22.
- ⁴¹ Beynon, R.; Bond, J. S.; *Proteolytic Enzymes; A Practical Approach*, 2a. ed., Oxford University Press: Oxford, 2001.
- ⁴² Mine, Y.; *Egg Bioscience and Biotechnology*, Wiley Interscience: Hoboken, 2008.
- ⁴³ Wrolstad, R. E.; Durst, R. W.; Lee, J. *Trends Food Sci. Technol.* **2005**, *16*, 423. [[CrossRef](#)]
- ⁴⁴ Barreto, D. W.; Ribeiro, B. D.; *Proceedings of the 2nd Mercosur Congress on Chemical Engineering and 4th Mercosur Congress on Process Systems Engineering*, Mangaratiba, Brasil, 2005.
- ⁴⁵ Waterman, P. G.; Mole, S.; *Analysis of Phenolic Plant Metabolites*, Blackwell Scientific Publications: Oxford, 1994.