



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
DEPARTAMENTO DE MORFOLOGIA E FISIOLOGIA ANIMAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIA ANIMAL

MUNIQUE CRISTIANE TAVARES SANTOS SILVA

IMOBILIZAÇÃO DE PROTEASES COLAGENOLÍTICAS OBTIDAS DE *Aspergillus sclerotiorum* URM 5792 EM NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS REVESTIDAS COM QUITOSANA

RECIFE

2021

MUNIQUE CRISTIANE TAVARES SANTOS SILVA

IMOBILIZAÇÃO DE PROTEASES COLAGENOLÍTICAS OBTIDAS DE *Aspergillus sclerotiorum* URM 5792 EM NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS REVESTIDAS COM QUITOSANA

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biociência Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco para obtenção do grau de Mestre.

Orientadora: Profa. Dra. Tatiana Souza Porto

Coorientadora: Dra. Márcia Nieves C. da Cunha

RECIFE

2021

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal Rural de Pernambuco
Sistema Integrado de Bibliotecas
Gerada automaticamente, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- S586i Silva, Munique Cristiane Tavares Santos
IMOBILIZAÇÃO DE PROTEASES COLAGENOLÍTICAS OBTIDAS DE *Aspergillus sclerotiorum* URM 5792 EM NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS REVESTIDAS COM QUITOSANA / Munique Cristiane Tavares Santos Silva. - 2021.
114 f.
- Orientador: Tatiana Souza Porto.
Coorientador: Marcia Nieves Carneiro Cunha.
Inclui referências e anexo(s).
- Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal, Recife, 2021.
1. *Aspergillus*. 2. Fermentação em estado sólido. 3. colagenase. 4. imobilização. 5. nanopartículas magnéticas. I. Porto, Tatiana Souza, orient. II. Cunha, Marcia Nieves Carneiro, coorient. III. Título

CDD 636.089

Munique Cristiane Tavares Santos Silva

IMOBILIZAÇÃO DE PROTEASES COLAGENOLÍTICAS OBTIDAS DE *Aspergillus sclerotiorum* URM 5792 EM NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS REVESTIDAS COM QUITOSANA

Dissertação de Mestrado defendida e aprovada pela

BANCA EXAMINADORA

Data da qualificação: 05 de março de 2021

Profa. Dra. Tatiana Souza Porto – Presidente/Orientadora
Unidade Acadêmica de Garanhuns – UFRPE

Profa. Dra. Camila Souza Porto
Unidade Educacional de Penedo- Universidade Federal de Alagoas

Dr. Rodrigo Lira de Oliveira
Universidade Federal Rural de Pernambuco

Dr. Jonatas de Carvalho Silva
Unidade Acadêmica de Garanhuns - UFRPE

Dedico este trabalho à Deus por ter me concedido força, disciplina e dedicação para que fosse possível concluí-lo no seu tempo.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela dádiva da vida e por me permitir realizar tantos sonhos nesta existência. Obrigada pelo seu infinito amor, por me permitir errar, aprender, acertar e crescer. Obrigada por não me permitir desistir e por colocar pessoas especiais em minha vida que acreditaram em meu potencial.

A minha orientadora Profa Dra. Tatiana Souza Porto por seu profissionalismo e sua ética admirável. Agradeço a oportunidade que me foi dada e por acreditar que eu seria capaz, por estar sempre presente direcionando minha pesquisa por caminhos que me levassem a resultados exitosos.

A minha coorientadora Dra. Márcia Nieves Carneiro Cunha por toda sua paciência e dedicação em me ensinar a utilizar novas ferramentas para desenvolvimento de minha pesquisa, sempre disposta e presente nos momentos em que precisei.

Aos meus pais Manoel e Maria de Lourdes por todo incentivo e apoio durante toda minha jornada educacional e acadêmica, por sempre estarem dispostos a me ajudar em todos os momentos, e cuidarem tão bem dos meus filhos nos momentos em que eu não estive presente.

Aos meus filhos Cauã e Théo que sempre compreenderam a minha ausência, para realizar minhas atividades na Universidade, como uma oportunidade para oferecer-lhes um futuro melhor.

A minhas irmãs Marcelle e Camila por sempre me incentivarem e ficarem felizes com cada vitória alcançada em toda minha vida.

Ao meu namorado Wadams que sempre me apoiou em minhas decisões e por estar ao meu lado nos momentos em que mais precisei.

Em especial a minha grande amiga Lígia Fernandes por me incentivar a dar continuidade aos meus estudos e me apresentar o programa de pós-graduação em Biociência animal, me ajudar na construção do meu projeto e pela sua torcida fiel

para que eu alcançasse meu objetivo. Obrigada por se fazer presente em muitos momentos importantes de minha existência.

Aos meus colegas de trabalho da EREM Conde Pereira Carneiro por torcerem sempre por resultados prósperos em minha vida acadêmica e por toda compreensão nos momentos em que precisei me ausentar do trabalho para realizar alguma atividade na Universidade.

A todos que fazem o Labtecbio, em especial a Profa Dra. Ana Lúcia Porto, por toda cooperação e disponibilidade para que todas as atividades no laboratório pudessem ocorrer da melhor forma possível.

À Universidade Federal Rural de Pernambuco através do Programa de pós-Graduação em Biociência Animal pela oportunidade de participar do mesmo e pela oferta do curso de pós-graduação.

Enfim, a todos os meus incontáveis amigos que contribuíram com minha jornada acadêmica e que se sentiram felizes com as minhas escolhas e com as minhas vitórias.

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

- Figura 1. Hidrólise do colágeno. Fonte: Adaptado de Zague; Machado-Santelli (2016)17
- Figura 2. Molécula do colágeno.
(Fonte: <http://www.smart.servier.com/srmat_image/collagen-7/>) 18
- Figura 3. Funcionalidades da aplicação das proteases na indústria alimentícia. Fonte: Adaptado de Stahlke (2015)24
- Figura 4. Morfologia representativa de espécies do gênero *Aspergillus*. Fonte: Adaptado de Somai (2018)31
- Figura 5. *Aspergillus sclerotiorum* URM 5792. Conidióforo (1); Métula (2); Vesícula (3), Fiálides (4), Conídios (5). Aumentado 50X.....32
- Figura 6. Número de patentes publicadas contendo processos de imobilização enzimática por ano. (Fonte: <www.lens.org>)35
- Figura 7. Esquema dos métodos físicos (A) e químicos (B) de imobilização enzimática. Fonte: Adaptado de Fernández-Fernández; Sanromán; Moldes (2013)37
- Figura 8. Estrutura do biopolímero quitosana. Fonte: Adaptada de Mendes et al. (2011)39

CAPÍTULO I

- Figura 1. Gráfico de Pareto dos principais efeitos das variáveis independentes (1: Quantidade de Substrato (g); 2: Umidade (%)) sob a produção de protease colagenolítica por *Aspergillus sclerotiorum* URM 5792 em Fermentação em Estado Sólido (FES) utilizando farelo de trigo como substrato (A) e farelo de soja como substrato (B)75
- Figura 2: Efeito das variáveis independentes (Concentração de glutaraldeído (%), Tempo de Ativação (h) e tempo de imobilização (h)) e de suas interações sob o rendimento de imobilização (%) da protease colagenolítica em nanopartículas magnéticas de acordo com o planejamento fatorial 2^3 77

Figura 3. Estabilidade de armazenamento da protease de <i>Aspergillus sclerotiorum</i> URM 5792 immobilizada em NPM's revestida com quitosana.....	79
Figura 4. Ciclos de reuso da protease de <i>Aspergillus sclerotiorum</i> URM 5792 immobilizada em nanopartículas magnéticas revestida com quitosana.....	79
Figura 5. Curva duplo recíproco de Lineweaver-Burk para estimativa dos parâmetros cinéticos da protease extracelular, livre (A) e immobilizada (B), utilizando azocaseína como substrato.....	80
Figura 6. Curvas pH e temperatura ótima e estabilidade da protease livre e immobilizada produzida por <i>Aspergillus sclerotiorum</i> URM 5792. (A) pH ótimo da enzima livre e immobilizada, (B) Estabilidade a diferentes pH da enzima livre e immobilizada no tempo de 24h, (C) Temperatura ótima da enzima livre e immobilizada, (D) Estabilidade a diferentes temperaturas da enzima livre e immobilizada no tempo de 180 min.....	83

LISTA DE TABELAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Tabela 1. Produção de proteases por micro-organismos utilizadas em diversos setores da indústria.....23

CAPÍTULO I

Tabela 1. Produção de proteases por Fermentação em Estado Sólido (FES) utilizando farelo de soja como substrato após 72 horas de cultivo.....72

Tabela 2. Matriz do planejamento fatorial completo 2^2 e resultado de produção enzimática por *Aspergillus sclerotiorum* URM 5792 na FES utilizando farelo de trigo como substrato após 72 horas de cultivo.....73

Tabela 3. Resultado da imobilização da protease colagenolítica em nanopartículas magnéticas revestidas com quitosana de acordo com planejamento fatorial completo 2^3 76

Tabela 4. Efeitos de íons metálicos e inibidores na atividade proteolítica de *Aspergillus sclerotiorum* URM 5792.....85

Tabela 5. Efeitos de surfactantes na atividade proteolítica de *Aspergillus sclerotiorum* URM 5792.....86

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

BDA – Batata Dextrose Agar
CCB – Centro de Ciências Biológicas
EDTA – Ácido Etilenodiamino Tetra-acético
FES – Fermentação em Estado Sólido
FSm – Fermentação Submersa
GRAS – Generally Recognized As Safe
IAM – Infarto Agudo do Miocárdio
K – Coeficiente de partição
 K_m – Constante de Michaelis-Menten
PMSF – Fluoreto de Metilfenilsulfonil
SDS – dodecilsulfato de sódio
TCA – ÁcidoTricloroacético
URM - Universidade Recife Micoteca
U – Unidade de Atividade enzimática
 V_{max} - Velocidade Máxima da reação
Y – Rendimento

RESUMO

As proteases são enzimas que têm sido extensivamente utilizadas em diversos segmentos da indústria. Apesar de apresentar elevado interesse e inúmeras vantagens, sua aplicação expõe ainda algumas limitações. O processo de imobilização tem se tornado uma alternativa, visto que pode aumentar a estabilidade enzimática e promover a reutilização por vários ciclos. A utilização de suportes magnéticos tem sido amplamente explorada, devido a sua versatilidade no setor da biotecnologia de purificação de biomoléculas, e seu revestimento com suportes orgânicos como a quitosana, facilitam o processo, impedindo a oxidação das nanopartículas magnéticas (NPM's), conferindo propriedades ideais para a imobilização. O presente trabalho teve como objetivo selecionar, imobilizar e caracterizar proteases colagenolíticas obtidas de *Aspergillus sclerotiorum* URM5792 em NPM's revestidas com quitosana. Para produção foi realizado um planejamento fatorial completo 2²; tendo como melhor condição de produção (7g de farelo de trigo e 60% de umidade, submetidas a 30°C por 72h de fermentação, com atividade proteolítica de 56,27 U/mL e colagenolítica de 303,00 U/mL). O processo de imobilização foi realizado utilizando planejamento fatorial completo 2³ visando avaliar a influência das variáveis independentes: concentração de glutaraldeído, tempo de ativação e tempo de imobilização sob o rendimento de imobilização enzimática. No ensaio composto por 4% de concentração de glutaraldeído, 2,5h de ativação e 1,5h de imobilização foram obtidos rendimentos de 86,25% para atividade proteásica e 83,83% para atividade colagenolítica. A enzima imobilizada apresentou mais de 95% da atividade inicial após 28 dias de armazenamento e reteve mais de 60% da atividade residual no décimo segundo ciclo de reutilização. Também foram analisadas a influência do pH e temperatura sob a atividade enzimática na forma livre e imobilizada, ambas apresentaram pH ótimo na faixa de 9,0, assim como, temperatura ótima de 30°C e 40°C, respectivamente. A estabilidade ao pH e à temperatura da enzima livre se manteve com mais de 80% e 60% de atividade residual nos tempos de 24h e 180min, respectivamente. E a estabilidade da enzima imobilizada se manteve com 60% e 70% de atividade residual nos mesmos tempos. A fermentação em estado sólido foi eficaz com alta produção enzimática e a imobilização da protease colagenolítica em nanopartículas magnéticas revestidas com quitosana e ativadas em glutaraldeído, mostraram ser métodos eficientes no rendimento, armazenamento e reuso da enzima. A enzima imobilizada apresentou maior afinidade ao substrato em relação à enzima livre, foi inibida pelo íon Cu²⁺, SDS e PMSF indicando a presença de uma serino-protease. Esses resultados indicam que *Aspergillus sclerotiorum* URM 5792 é uma fonte potencial para a produção de protease colagenolítica com possíveis aplicações biotecnológicas em diversos setores da indústria, na produção de detergentes, no setor têxtil e na indústria farmacêutica, no tratamento e regeneração de tecidos em necrose.

Palavras-chave: *Aspergillus*, Fermentação em estado sólido, colagenase, imobilização, nanopartículas magnéticas, quitosana.

ABSTRACT

Proteases are enzymes that have been used extensively in several industry segments. Despite their high interest and numerous advantages, their application still has some limitations. The immobilization process has become an alternative since it increases enzyme stability. The use of magnetic supports has been widely explored, due to its versatility in the biotechnology sector for the purification of biomolecules, and its coating with organic supports such as chitosan, facilitates the process, preventing the oxidation of magnetic nanoparticles (MNP's), giving ideal properties for immobilization. The present work aimed to select, immobilize and characterize collagenolytic proteases obtained from *Aspergillus sclerotiorum* URM5792 in MNP's coated with chitosan. For production, a complete factorial planning was carried out 2^2 ; with the best production condition (7g of wheat bran and 60% humidity, submitted to 30°C for 72h of fermentation, with proteolytic activity of 56,27 U/mL and e collagenolytic of 303,00 U/mL). The immobilization process was carried out using complete factorial planning 2^3 aiming to evaluate the influence of independent variables: glutaraldehyde concentration, activation time and immobilization time under the enzyme immobilization yield. In the assay composed of 4% glutaraldehyde concentration, 2.5h of activation and 1.5h of immobilization yields of 86.25% for protein activity and 83.83% for collagenolytic activity were obtained. The immobilized enzyme showed more than 95% of the initial activity after 28 days of storage and retained more than 60% of the residual activity in the twelfth cycle of reuse. The influence of pH and temperature on enzyme activity in free and immobilized form were also analyzed, both had an optimal pH in the range of 9.0, as well as an optimal temperature of 30 ° C and 40 ° C, respectively. The pH and temperature stability of the free enzyme was maintained with more than 80% and 60% of residual activity within 24 hours and 180 minutes, respectively. And the stability of the immobilized enzyme was maintained with 60% and 70% of residual activity in the same times. The solid-state fermentation was effective with high enzymatic production and the immobilization of protease collagenolytic in magnetic nanoparticles coated with chitosan and activated in glutaraldehyde, proved to be efficient methods in the yield, storage and reuse of the enzyme. The immobilized enzyme showed greater affinity to the substrate in relation to the free enzyme, it was inhibited by the Cu^{2+} ion, SDS and PMSF indicating the presence of active serine protease sites. These results indicate that *Aspergillus sclerotiorum* URM 5792 is a potential source for production of collagenolytic protease with possible biotechnological applications in various sectors of the industry, in the production of detergents, in the textile and pharmaceutical industry, in the treatment and regeneration of tissues in necrosis.

Keywords: *Aspergillus*, Solid state fermentation, collagenase, immobilization, magnetics,

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	14
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
2.1 Proteases.....	15
2.1.1 Proteases com atividade colagenolítica.....	17
2.2 Aplicação das Proteases.....	20
2.2.2 Aplicação Industrial das Proteases.....	21
2.3 Processo de produção de proteases microbianas	28
2.4 O Gênero <i>Aspergillus</i>	31
2.4.1 <i>Aspergillus sclerotiorum</i>	32
2.5 Processo de Imobilização de enzimas	34
2.5.1 Processo Imobilização de enzimas utilizando suportes magnéticos ..	40
2.6 Nanopartículas magnéticas	41
3. OBJETIVOS	43
3.1 Objetivo Geral	43
3.2 Objetivos específicos	43
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	44
CAPÍTULO 1:.....	61
Produção, imobilização em nanopartículas magnéticas e caracterização de protease colagenolítica de <i>Aspergillus sclerotiorum</i> URM 5792.....	61
ANEXO 1:	93

1. INTRODUÇÃO

As enzimas atuam como principal acelerador de quase todas as reações bioquímicas que ocorrem nos meios extra e intracelular. Estes biocatalisadores são proteínas ou glicoproteínas, macromoléculas de proteínas associadas a moléculas de sacarídeos (formadas por uma cadeia polipeptídica e trechos de oligossacarídeos), com sítios ativos e são produzidas nas próprias células (DARWESH et al., 2020) As proteases, ou enzimas proteolíticas, agem especificamente em proteínas degradando-as em aminoácidos livres e peptídeos (ZHANG et al., 2018). Dentre as proteases que apresentam papel importante no processo catalítico podemos destacar as com atividade colagenolítica, que hidrolisam tanto o colágeno quanto o desnaturado, transformando-os em fragmentos de colágeno e peptídeos de colágeno (LIMA et al., 2015).

As proteases apresentam elevada especificidade em relação ao substrato, sítio ativo e catalítico, apresentando funções variadas e importantes aplicações biotecnológicas que vão desde a utilização como aditivos em detergentes à produção de produtos terapêuticos efetivos (WANDERLEY, 2016).

Em meio aos organismos produtores de enzimas podemos destacar os micro-organismos, pois apresentam grande disponibilidade, taxa de crescimento rápida e elevada, podendo ser cultivado a baixo custo e em grandes quantidades, sob condições monitoradas (BON; FERRARA; CORVO, 2008). Além destes fatores, vale ressaltar que as indústrias utilizam extensamente os micro-organismos produtores de enzimas, pois são utilizados na geração de bioprodutos com ampla aplicação, acompanhando uma taxa de crescimento anual composta (CARG) de 8,83% no período de 2019 a 2026 (FIORMARKETS, 2019).

Estima-se que o mercado global de enzimas cresça em ritmo acelerado no mesmo período previsto de 2019 a 2026, promovendo um faturamento que vai de R\$ 8,8 bilhões em 2018 passando para 13,79 bilhões em 2026. Tendo como líderes de vendas a Europa, Oriente Médio e África, concentrando 37% do faturamento. Este crescimento célere de aproximadamente 68% no período previsto é dado devido ao uso extensivo de enzimas em diversos setores da indústria, tais como, detergentes biológicos, alimentos e bebidas, biocombustíveis, agricultura e rações para animais, farmacêutica e biotecnologia (FIORMARKETS, 2019; NOVOZYMES, 2019).

Entre os micro-organismos que se enquadram como bons produtores de biomoléculas podemos destacar os fungos, através do processo de fermentação utilizando resíduos agroindustriais como substrato de ação. O processo de fermentação pode ocorrer por meio da fermentação submersa (FSm) ou fermentação em estado sólido (FES), desde que proporcionem vantagem ao processo, apresentem condições que favoreçam o cultivo do micro-organismo e consequentemente aumentem sua produtividade. A FES apresenta inúmeras vantagens, em processos mediados por fungos filamentosos, melhorando a quantidade da enzima produzida, diminuindo a quantidade de água utilizada, criando ambiente favorável ao crescimento fúngico, apresentando maior produtividade, simplicidade e redução significativa dos custos (SANTOS, et al., 2020).

Após produzidas, as enzimas podem ter seu uso potencializado através do processo de imobilização. A imobilização é uma técnica utilizada para manter a estabilidade enzimática, que tem a se perder em seu estado nativo, na qual a enzima é fixada a um suporte sólido, onde ocorre o confinamento em uma determinada região formando um sistema heterogêneo, promovendo sua fácil recuperação, reutilização, maior resistência a condições externas, como pH e temperatura, tornando o processo catalítico renovável (HOMAEI et al., 2013; MALAR et al., 2020). A imobilização enzimática é uma eficiente alternativa de aplicação desses biocatalizadores em diversos setores da indústria (TOMBÁCZ et al., 2015).

Considerando a importância da utilização de novas proteases imobilizadas obtidas a partir de fungos filamentosos, o objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial de *Aspergillus sclerotiorum* URM 5792 na produção destas enzimas de interesse industrial e comercial, identificar as melhores condições, imobilizar utilizando nanopartículas magnéticas como suporte e caracterizar bioquimicamente a protease livre e imobilizada produzidas por esse fungo.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Proteases

As proteases (EC 3.4) constituem uma classe de enzimas que agem hidrolisando as ligações peptídicas de proteínas em fragmentos de proteínas. De

acordo com o local onde a proteína é clivada, podem ser classificadas como endopeptidases (quebram as ligações peptídicas de aminoácidos não-terminais) e exopeptidases (quebram ligações peptídicas de aminoácidos terminais). Podendo ainda ser subdivididas de acordo com a natureza química do sítio ativo em serino, cisteína, aspártico e metaloproteases (PIRES; FONSECA; SERUDO, 2019).

São um grupo de enzimas promissoras, estando entre as mais importantes devido ao seu potencial biotecnológico e empregabilidade em diversos setores da indústria (SOUZA et al., 2017b). Desempenham elevada atividade funcional. Sua importância em conduzir as funções regulatórias essenciais e o metabolismo é evidente por sua presença em todos os organismos vivos (GRAMINHO et al., 2013).

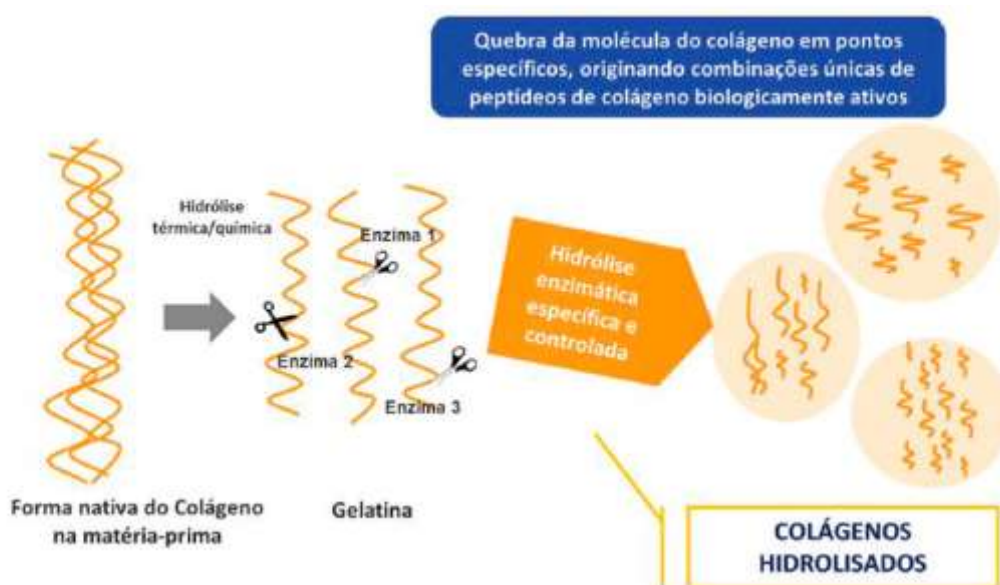
As proteases são amplamente encontradas na natureza, produzidas por animais, plantas e micro-organismos. O processo de obtenção de proteases por plantas e animais é relativamente lento, uma vez que, nas plantas dependem de condições climáticas favoráveis para crescerem e de terras disponíveis para cultivo, já nos animais, além da necessidade de que estejam disponíveis para o abate, envolve ainda políticas públicas e agrícolas que dificultam sua obtenção em larga escala. Desta forma, há insuficiência no atendimento à demanda mundial, e o interesse na produção destas biomoléculas a partir de micro-organismos cresce consideravelmente (INACIO et al., 2015).

As proteases são produzidas por vários micro-organismos, bactérias, leveduras e fungos filamentosos. Podendo ser extracelulares e intracelulares, ligadas ou não a membrana. Os micro-organismos apresentam elevada diversidade bioquímica e podem ser manipulados geneticamente constituindo fontes significantes de proteases. As proteínas são degradadas por micro-organismos e seus produtos são utilizados como fonte de nutrientes para o seu crescimento. A manipulação genética e melhoramento das condições de cultivo permitem o incremento e o rendimento das enzimas produzidas pelo processo de fermentação, de forma a serem produzidas em um tempo reduzido e em grandes volumes (PIRES; FONSECA; SERUDO, 2019). Dentre as proteases produzidas por micro-organismos podemos destacar as que possuem atividade colagenolítica, que apresentam potencial elevado de aplicações e pesquisa, assim como a sua comercialização para diversas finalidades. Com este campo amplo de aplicações a obtenção dessas enzimas pode ser muito vantajosa (ZIMMER et al., 2009).

2.1.1 Proteases com atividade colagenolítica

Colagenases (EC 3.4.24.3) são proteases que podem ser obtidas de uma variedade de fontes e estão presentes em um grupo de enzimas de extrema importância fisiológica. São capazes de promover manutenção e regeneração de órgãos e tecidos além de serem aplicáveis no setor biotecnológico (OLIVEIRA et al., 2017). As proteases colagenolíticas são enzimas capazes de hidrolisar o colágeno nativo (região helicoidal) e o colágeno desnaturado, em pequenos fragmentos (ROSSO et al., 2012), conforme esquematizado na Figura 1.

Figura 1: Hidrólise do colágeno. Fonte: ZAGUE; MACHADO-SANTELLI, 2016.



De forma genérica, as colagenases são divididas em dois grupos bem definidos, de acordo com o sítio catalítico que apresentam, em metalo-colagenases também conhecidas como colagenases verdadeiras ou de vertebrados, e as serino-colagenases, por vezes chamadas de falsas colagenases, são serino-colagenases que apresentam a característica de clivar a porção não helicoidal do colágeno (OLIVEIRA et al., 2017).

As metalo-colagenases atuam em uma série de processos fisiológicos de proliferação e reparação tecidual em animais, processos relacionados à embriogênese, angiogênese, cicatrização, processos de respostas inflamatórias, entre outros. Este grupo faz parte da família das metalo-proteases e se subdivide em

colagenases verdadeiras (atuam clivando a tripla hélice em uma determinada região), gelatinases (que atuam em colágenos desnaturados e gelatinas) e as estromelinas, que podem atuar na degradação proteínas estruturais teciduais (DABOOR et al., 2010; OLIVEIRA et al., 2017).

As serino-colagenases estas enzimas são capazes de quebrar as ligações peptídicas da estrutura tripla hélice dos colágenos tipos I, II e III, que participam de processos fisiológicos como da cascata da coagulação e produção de hormônios a partir de suas formas inativas. Este grupo faz parte da família das serino-proteases por apresentarem em seu sítio catalítico um resíduo de serina. As colagenases do tipo serinas são muito menos abundantes do que metalocolagenases (DABOOR et al., 2010; OLIVEIRA et al., 2017).

O colágeno, o substrato principal das proteases colagenolíticas, é classificado como uma proteína fibrosa cuja principal função é estrutural. Esta proteína corresponde a cerca de 30% da composição do organismo, estando presentes na pele, tendões, ossos, dentes, cartilagens, vasos sanguíneos e intestinos. Cada molécula de colágeno é formada por uma pequena haste rígida organizada por entrelaçamento em uma tripla hélice de três cadeias polipeptídicas denominadas alfa-cadeias (Figura 2). De modo geral, existem mais de 26 tipos diferentes de colágeno, caracterizados de acordo com a diversidade e complexidade de sua estrutura, que variam de acordo com sua função, montagem e seus domínios helicoidais (WANDERLEY et al., 2017).

Figura 2: Collagen Molecule. Fonte: SERVIER (www.servier.com)



O colágeno pode ser encontrado em todo o reino animal, apresenta cadeias peptídicas dos aminoácidos glicina, prolina, lisina, hidroxilisina, hidroxiprolina e alanina. Essas cadeias devido a sua organização estrutural paralela a um eixo originam as fibras de colágeno, que promovem resistência e elasticidade a sua estrutura. Sozinhas ou em junção com outras matrizes extracelulares, as proteínas

de colágeno originam agregados supramoleculares (fibrilas, filamentos ou redes). O colágeno possui características e propriedades mecânicas particulares, sendo o composto mais importante para formação dos tecidos, apresentando propriedades elásticas e de viscosidade, além de ser quimicamente inerte, apresentando como função principal manter a matriz extracelular íntegra, e também promover a fixação celular na matriz. (SILVA; PENNA, 2012).

O colágeno pode ser obtido de diversas espécies animais (bovinos, suínos, peixes, etc.). A maior parte do colágeno é proveniente dos subprodutos da indústria de carne. O principal produto obtido é uma gelatina que é comumente utilizada como aditivo para maximizar a textura de diversos produtos alimentares, aumentando assim a capacidade de reter água e a estabilidade dos mesmos. Os peptídeos de colágeno representam ingredientes satisfatórios para o setor de alimentos funcionais devido ao seu poder antioxidante e, também de sua baixa antigenicidade, tornando-se biomolécula ativa de aplicação promissora no mercado. Os hidrolisados de colágeno podem ser utilizados em diversos setores da indústria, assim como no tratamento de diversas doenças. (LIMA et al., 2014).

Os hidrolisados de colágeno são nutracêuticos seguros, que atuam na prevenção e tratamento de doenças crônicas, cuja síntese na matriz extracelular dos tecidos é estimulada a partir da combinação de aminoácidos (PORFIRO, FONARO 2016). Vários estudos colocam em evidência os possíveis benefícios do colágeno hidrolisado para o organismo, tais como, melhoria da firmeza da pele, proteção dos danos das articulações, melhoria no tratamento da osteoporose, prevenção do envelhecimento, anti-hipertensivo e proteção contra úlcera gástrica (SILVA; PENNA, 2012).

As proteases colagenolíticas podem ser isoladas de diversas fontes de origem animal, vegetal e microbiana. De acordo com Wanderley et al. (2017) estudos demonstraram várias fontes animais e vegetais para obtenção de colagenases, porém as proteases de origem microbiana têm se tornado de uso preferencial devido à variedade bioquímica e a facilidade de manipulação genética apresentada por suas fontes. Além de serem capazes de clivar a tripla hélice do colágeno em vários sítios, o que não ocorre com as colagenases de origem animal, que clivam o colágeno em apenas um sítio (LIMA et al., 2011).

As colagenases microbianas apresentam multifuncionalidade, são altamente específicas em relação ao substrato, promovendo degradação tanto do colágeno

nativo quanto do inativo (DABOOR et al., 2010). A busca por novas fontes dessas enzimas vem sendo estimulada ao longo dos anos, pesquisas recentes na base de dados Web of Science utilizando os seguintes termos de buscas: (collagenolytic OR collagenase) AND (fungi OR fungal OR bacterial OR Bacterian) AND (production OR synthesis OR synthesize) revelam que no período de 2011 a fevereiro de 2021 foram publicados 27 artigos de pesquisa originais evidenciando a produção de colagenases por fungos e bactérias.

Os fungos são os micro-organismos mais eficientes na produção de proteases colagenolíticas, apresentando inúmeras vantagens, tais como, produtividade elevada, baixo custo na produção e possibilitando que a enzima resultante do processo, que é produzida extracelularmente, seja modificada e recuperada com muita facilidade (LIMA et al., 2011). Para produção de colagenase os fungos filamentosos, quando comparados a outros tipos de micro-organismos, são os mais estudados, tendo destaque para os micro-organismos industrialmente relevantes, como os dos gêneros, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Arthrotrix*, *Microsporum*, *Entomophthora* e *Lagenidium* (WANDERLEY et al., 2017).

Os fungos produzem enzimas com diversas vantagens para a expressão de proteínas em relação aos hospedeiros bacterianos. Produção de enzimas proteolíticas ativas numa larga faixa de pH, podendo apresentar características ácidas, neutras ou alcalinas, podendo também, se adequar a substratos específicos secretando proteínas funcionais, além de apresentar crescimento rápido, sendo a sua produção de proteínas mais atrativa do que a das bactérias, possuindo algumas espécies já a certificação GRAS (Generally Recognized as Safe), que é um dos requisitos da indústria alimentícia (KOSALKOVA et al., 2012)

2.2 Aplicação das Proteases

A maioria das proteases utilizadas industrialmente é de origem microbiana, pois estas possuem características bioquímicas desejadas em biotecnologia e baixo custo, além da diversidade das espécies presentes na natureza, muitas das quais ainda inexploradas (INACIO et al., 2015). As enzimas microbianas são mais utilizadas que as enzimas de plantas e animais devido à grande variedade catalítica, além de serem obtidas em elevadas quantidades, com preço relativamente reduzido, possuindo bastante homogeneidade e qualidade (LIMA, 2019). Além disso, são mais

estáveis que seus homólogos obtidos de plantas e animais e seu processo de produção é mais fácil e seguro (INACIO et al., 2015). Os métodos de obtenção destas enzimas podem ser facilmente otimizados e as proteases microbianas podem ser mantidas sob armazenamento por um longo período sem perda significativa de sua atividade, assim como a manipulação genética destes micro-organismos que contribui para ampliar a síntese destes catalisadores biológicos (PRAXEDES; BRITO, 2016).

2.2.2 Aplicação Industrial das Proteases

Em meio ao grande número de enzimas aplicadas industrialmente, em torno de 75% são pertencentes à classe das hidrolases, dentre estas estão as proteases, que constituem cerca de 60% do total das vendas mundiais de enzimas industriais, devido às suas aplicações em diversos setores da indústria (SAGGU; MISHRA, 2017).

As proteases são utilizadas em conjunto diversificado de aplicações - e dominam uma ampla variedade de funcionalidades em diferentes setores da indústria, tais como, setor de alimentos e bebidas, farmacêutico, têxtil, higiene e cosméticos e produtos para agricultura (ração para animal, celulose para papel, etc) (FREEDONIA GROUP, 2015; RAY, 2012; KUMAR; SANGWAN; SINGH, 2014). O mercado que representa maior aplicação das proteases é o de produtos de limpeza, porém o que apresenta maior projeção em crescimento na demanda é o mercado de alimentos e bebidas (FREEDONIA GROUP, 2015).

A aplicação das proteases na indústria também provocou crescimento considerável no mercado até o ano de 2020. Onde a maior demanda do setor tem ocorrido de forma histórica nas áreas de tratamento de doenças crônicas com IAM (Infarto Agudo do Miocárdio) e, também ação contra formação de coágulos sanguíneos, produzindo fármacos trombolíticos, usados para dissolver os trombos (FREEDONIA GROUP, 2015). Entretanto, no cenário atual, o crescimento acelerado no setor de fármacos e biotecnologia, em virtude da pandemia da covid-19, pode levar as indústrias que atuam nesse campo a ocupar lugares elevados no capitalismo global. Desta forma as previsões para os anos de 2020 e 2021 foram de um crescimento maior, em relação ao faturamento do ano de 2019, que atingiu

lucros de aproximadamente U\$\$ 158 bilhões em lucro no ano de 2019 (ABDALLA, 2020)

As proteases também vêm sendo aplicadas em larga escala na indústria de processamento do couro, no amaciamento visto que por razões de cunho ambiental, o uso das enzimas substitui o uso de substâncias químicas sintéticas, como os catalisadores químicos (KANTH et al., 2008), também são aplicadas como pesticidas, em detergentes sintéticos (não biodegradáveis) e outros produtos químicos, visto que são poluentes e tóxicas, de modo que a utilização destas reduz a produção de rejeitos, facilita o controle e aumenta a velocidade da reação, além de serem biodegradáveis (PRAXEDES; BRITO, 2016).

As proteases são produzidas preferencialmente por micro-organismos, para utilização em escala industrial. Esta produção para o mercado é bastante atrativa em função de apresentar papel vital na produção de proteases intra e extracelulares, além de apresentarem especificidade ao substrato e possibilidade de manipulação genética (KALAIYARASI et al., 2017). Algumas aplicações de proteases microbianas podem ser observadas na Tabela 1. A produção das mesmas por micro-organismos tem sido atrativa em função da especificidade do substrato e possibilidade de manipulação genética. A investigação de suas características bioquímicas, como pH e temperatura, são importantes para atuação enzimática, possibilitando melhor forma de aplicação (KOIKE, 2020), assim como a ocorrência dos processos de forma mais limpa, com baixo consumo de energia, com maior eficácia e redução de custos (BASTOS, 2015).

Quanto à utilização das proteases colagenolíticas, pode-se afirmar que as possibilidades são bastante variadas. A sua aplicabilidade encontra benefícios na indústria alimentícia, na produção e processamento de carnes, através da remoção da pele e extração do colágeno (OLIVEIRA et al., 2017). Também encontrando aplicação no setor da indústria têxtil (KANTH et al., 2008). O desempenho das proteases colagenolíticas para produção de detergentes comerciais também foi observado com bastante eficácia (IDA et al., 2017). Assim como na indústria farmacêutica, no tratamento de doenças e com finalidade terapêutica, no tratamento de feridas e regeneração de tecidos necrosados, sem que haja dano ao tecido saudável (ALIPOUR et al., 2016).

Colagenases são enzimas de valor extremamente importante para os diversos setores da indústria. Sendo empregadas em variados segmentos, seu uso

está cada vez mais abrangente, o que torna os processos produtivos ecologicamente viáveis e sustentáveis. Assim, fontes alternativas de colagenases são para o mercado um produto promissor, de qualidade considerável e que impulsiona a economia (OLIVEIRA et al., 2017).

Tabela 1: Produção de proteases por micro-organismos utilizadas em diversos setores da indústria.

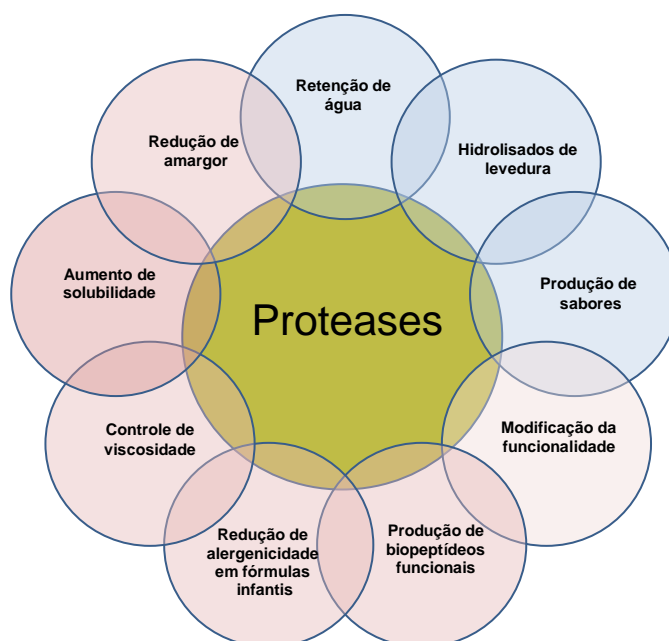
Micro-organismo	Setor	Aplicação
<i>Rizomucor miehei</i>	Alimentos e bebidas	Coagulante para preparo de queijo
<i>Aspergillus niger</i> , <i>Bacillus subtilis</i> e <i>Bacillus licheniformis</i>	Alimentos e bebidas	Processamento de queijo, carnes, pescados, cereais e bebidas (produtos lácteos)
<i>Aspergillus melleus</i> , <i>Mucor miehei</i> e <i>Mucor pusillus</i>	Alimentos e bebidas	Manufatura do queijo (coagulação do leite)
<i>Bacillus subtilis</i> e <i>Bacillus cereus</i>	Alimentos e bebidas	Produção de bebidas e panificação
<i>Bacillus subtilis</i> e <i>Bacillus licheniformis</i>	Detergentes	Fabricação de detergentes
<i>Bacillus spp</i>	Detergentes	Liberção de material proteico das manchas.
<i>Aspergillus niger</i>	Farmacêutico e cosméticos	Hidrólise do colágeno para uso terapêutico
<i>Mucor subtilissimus</i>	Farmacêutico e cosméticos	Tratamento de doenças tromboembólicas
<i>Bacillus spp</i>	Farmacêutico e cosméticos	Agente trombolítico
<i>Aspergillus flavus</i>	Têxtil	Curtimento do couro
<i>Bacillus subtilis</i>	Fotografia	Recuperação da prata
<i>Conidiobolus sp</i>	Biotecnologia	Preparação de cultura de células animais

Fonte: Adaptado de (SOUZA et al., 2017a).

2.2.1.1 Aplicação das Proteases no Setor de Alimentos

Na indústria de alimentos e bebidas o uso de enzimas como transformadores das características e propriedades funcionais das proteínas tem se difundido de forma ampla. De acordo com esse contexto é notório que a utilização das proteases no setor, traduz-se no seu propósito, uma vez que substituem outros agentes utilizados, apresentando inúmeras vantagens como catalisadores biológicos. Originalmente as fontes utilizadas na indústria de alimentos e bebidas tinham procedência de tecidos animais e vegetais, tão logo com o crescimento da demanda mundial, não havendo suprimento por estas fontes, foram substituídas por enzimas de origem microbiana (RAY, 2012; LI et al., 2013). Algumas funções da aplicação de proteases na indústria de alimentos e bebidas são apresentadas na Figura 3.

Figura 3: Funcionalidades da aplicação das proteases na indústria alimentícia.
FONTE: (STAHLKE, 2015)



O uso das proteases na indústria alimentícia é bem evidente no processamento e produção de queijos, na coagulação para sua fabricação. Neste setor as enzimas atuam na precipitação pela hidrólise da k-caseína estabilizando a formação de micelas evitando a coagulação, (RAY, 2012). Outro setor promissor é o da produção de amaciantes de carne, cuja enzima utilizada originalmente para esta função era a papaína, extraída da planta *Carica papaya*, porém, estão sendo mais

exploradas as de origem microbiana (SANTOS et al., 2016). Além desses processos também tem sido crescente o uso das proteases na fabricação de cerveja, no processo de clarificação (RIBEIRO et al., 2018), assim como na limpeza de membranas filtrantes usadas no processamento de suco de frutas e preparação de hidrolisados proteicos com alto teor nutritivo.

2.2.1.2 Aplicação das Proteases no Setor Farmacêutico

Sendo utilizadas na fabricação e desenvolvimento de novos produtos, e principalmente medicamentos, as proteases vêm apresentando extensas aplicações na indústria farmacêutica e na de cosméticos. A sua aplicação se estende desde o auxílio da digestão até o processo de cicatrização de feridas (SANTOS et al., 2008a). A indústria farmacêutica tem se tornado um mercado bastante promissor, visto que o custo das enzimas com aplicações terapêuticas é extremamente elevado (SAID; PIETRO, 2002). Em alguns casos o uso destas enzimas requer certo grau de pureza, o que pode aumentar o custo da produção (ZIMMER et al., 2009).

O uso das proteases no setor é de extrema importância, pois diminui o uso de compostos químicos, que por sua vez são tóxicos e agredem o organismo. Logo, sua aplicação é justificada pela elevada especificidade e catálise eficiente (ZIMMER et al., 2009). Contudo, na indústria farmacêutica é imprescindível assegurar a produção segura da formulação, o que promove dificuldades na manipulação e aplicação das proteases, necessitando de alto grau de pureza e especificidade, a fim de evitar reações imunológicas aos componentes da fórmula e estabilidade em condições fisiológicas (NASCIMENTO, 2018).

Assim como em outros setores, a utilização das enzimas para manipulação de fármacos, tem se mostrado bastante promissor, e nesse caso específico, as de origem microbiana, devem apresentar produção com rendimento elevado, obedecer a critérios mínimos de segurança sob o ponto de vista biológico e fazer parte de GRAS (generally recognized as safe - geralmente considerado como seguro). Apesar de a lista de micro-organismos produtores de enzimas ser vasta, deve-se considerar que as mesmas não apresentem características patogênicas ao homem (PIRES; FONSECA; SERUDO, 2019). Desta forma, apenas uma minoria pode ser empregada ao no processo de manipulação e desenvolvimento de medicamentos na

indústria farmacêutica, assim como também na produção de cosméticos (KUMAR; TAKAGI, 1999)

Micro-organismos também são fontes produtoras de proteases com atividade fibrinolítica. Estas enzimas são capazes de degradar a fibrina, evitando a formação de trombos dentro dos vasos sanguíneos (BATISTA et al., 2017). Estudos revelaram que a administração oral de uma enzima fibrinolítica, produzida por uma cepa de *Bacillus*, elevou a atividade fibrinolítica no plasma e a produção do ativador tecidual de plasminogênio, sugerindo sua utilização na profilaxia de trombose. Também são relatadas aplicações de collagenases, elastases e queratinases em tratamentos dermatológicos e cosméticos (SANTOS et al., 2016).

As queratinases são responsáveis pela hidrólise das ligações peptídicas da queratina, podem ser úteis em formulações tópicas para eliminação da queratina na acne e psoríase e remoção de calos. Foi observada a aplicação industrial de queratinase produzida pela bactéria *Kitococcus sedentarius* para remoção de calosidades em seres humanos (MAHNKE, 2015). As collagenases e elastases são enzimas que atuam na remoção de cicatrizes e queloides, debridamento de queimaduras e úlceras dérmicas. Vários micro-organismos são capazes de produzir essas proteases. Preparações de elastases purificadas da bactéria *Bacillus subtilis* foram imobilizadas em bandagens, para aplicações terapêuticas em queimaduras, edemas, furúnculos e abscessos (SANTOS et al., 2016). Uma collagenase purificada do crescimento da bactéria *Clostridium histolyticum* foi utilizada em pomadas para o tratamento de feridas, como úlceras crônicas e queimaduras, facilitando a cicatrização. Sua atuação visa promover o debridamento ou remoção do tecido em necrose, sem danificar o tecido sadio ao redor (SHI; CARSON, 2009).

2.2.1.3 Aplicação das Proteases no Setor Têxtil

O uso das enzimas na indústria têxtil garante que os tecidos, fios e produtos finais produzidos apresentem uma qualidade elevada em suas propriedades físicas, estéticas e de conforto. Afim de que os danos sobre as fibras, provocados pela ação de produtos químicos, sejam minimizados e conseqüentemente a diminuição do impacto ambiental (KOHAN, 2008).

Para reduzir danos consideráveis às fibras do tecido as proteases são utilizadas conferindo alterações das propriedades das fibras têxteis e removendo

impurezas de forma menos agressiva, de maneira oposta ao que ocorre quando tratadas com reagentes químicos (ARAÚJO; CASAL; CAVACO-PAULO, 2008; DRKIROMOJSOV, 2012). A melhoria da textura e da qualidade das fibras justifica a aplicação das peptidases na indústria têxtil. As principais ações das enzimas no setor são: remoção das impurezas proteicas, resistência ao encolhimento das fibras, desengomagem e aumento da qualidade do tecido ao tingimento (ARAÚJO; CASAL; CAVACO-PAULO, 2008).

A indústria têxtil tem uma extensa história de sucesso na aplicação de enzimas para obter maior eficiência na cadeia produtiva, mais qualidade final dos produtos e também para processos de branqueamento das peças, entre outros. Ao utilizar fibras para a produção de tecidos, como o algodão, por exemplo, as empresas contam os processos enzimáticos para alterar as propriedades das fibras têxteis, com a vantagem de não resultarem em efeitos nocivos ao meio ambiente. Outra forma de aplicação das enzimas é na fase de remoção de impurezas não celulósicas, chamada de biopreparação ou purga enzimática, que gera um processo mais ecológico, substituindo compostos químicos e oferecendo danos menores às fibras. Além disso, após a etapa de alvejamento, é possível eliminar o peróxido de hidrogênio com enzimas, economizando água e tempo neste processo (BATISTA, 2017).

Uma área importante na indústria têxtil é a do tratamento do couro, muitos são os processos utilizados na sua fabricação, para que um produto cru e perecível se torne durável, cujo seu processamento passa por várias etapas na indústria por apresentarem alto teor de proteínas e gorduras. Assim, além das proteases, as lipases são preferenciais no processo antes de seu curtimento, participando das etapas de tratamento, o remolho, a depilação e a purga (DIXIT et al., 2015). Essas estratégias visam substituir produtos químicos nocivos por produtos menos agressivos e minimizar os impactos ao meio ambiente causadas pelo processamento (SOUZA et al., 2015).

2.2.1.4 Aplicação das Proteases na Indústria de Detergentes

O setor industrial de produtos de limpeza compõe o mercado com maior potencial de aplicação de proteases com elevada demanda mundial, encontrando-se em uso extensivo na produção de detergentes (SANTOS et al., 2016). O primeiro

detergente foi desenvolvido por pesquisadores alemães, a partir de enzimas pancreáticas, produzidas por animais, em meados de 1914. Após 42 anos de intensas pesquisas, foi produzido o primeiro detergente contendo enzimas originadas de bactérias (SOUZA, 2012).

As bactérias do gênero *Bacillus*, são os micro-organismos produtores em potencial de enzimas usadas na produção de detergentes. Os membros deste gênero são evidentemente apreciados, pois apresentam elevada produção de biomolécula catalítica, além de apresentarem capacidade de secretar expressivas quantidades de enzimas extracelularmente em curtos ciclos de fermentação (CONTESINI; MELO; SATO, 2017). Nos últimos 30 anos a utilização destas enzimas tornou-se bastante significativa na formulação de detergentes, deixando a posição de pequenos ativos para uma posição privilegiada de ingrediente-chave (RAY, 2012).

Para que as proteases sejam consideradas ideais para sua aplicação na produção de detergentes, faz-se necessário que exista alta especificidade aos substratos, que promova, desta forma, êxito na remoção de diversos tipos de manchas, sem que afete e nem altere a coloração dos tecidos, facilitando a remoção da sujeira durante as lavagens, promovendo assim um efeito superior ao uso de clareadores, que envelhecem os tecidos, diminuindo o uso de produtos químicos que são extremamente agressivos ao meio ambiente e ao usuário (SINHA; KHARE, 2012).

Além de todos os setores citados anteriormente, as proteases também têm atuação em setores como o da indústria química, atuando como catalisadores na produção de materiais sintéticos, também na indústria fotográfica, agindo no bioprocessamento de recuperação da prata que fica impregnada nos filmes fotográficos, cuja sua reciclagem e recuperação podem ser usadas para diversas finalidades. As proteases podem ser utilizadas também como componentes ativos de soluções de limpeza para lentes de contato, dentadura e materiais cirúrgicos, assim como na área de biotecnologia (SANTOS et al., 2016).

2.3 Processo de produção de proteases microbianas

O processo fermentativo para produção de proteases ocorre preferencialmente sob duas formas, a fermentação em estado sólido (FES) e a

fermentação submersa (FSm). Os dois processos são determinados em função da quantidade de água que é utilizada na fermentação (ROCHA, 2018).

A FSm é caracterizada pelo fato de o substrato estar dissolvido em água, os produtos gerados são lançados para o meio líquido e o substrato é rapidamente degradado (SUBRAMANIYAM; VIMALA, 2012). Este processo possibilita uma distribuição uniforme tanto dos nutrientes quanto dos micro-organismos (SINHA; SINHA, 2009). É uma técnica que apresenta inúmeros benefícios em relação aos avanços da instrumentação e controle de processos, tendo aproximadamente 90% da produção de enzimas industriais ocorrendo por FSm, utilizando, com frequência, micro-organismos modificados geneticamente (FARINAS et al., 2014). Porém, o processo requer elevada demanda hídrica e energética, o que encarece o processo e pode torna-lo desvantajoso (BON, E. P. S.; FERRARA, M. A.; CORVO, 2008).

A FES é o processo de crescimento de micro-organismos sobre substratos sólidos contendo umidade suficiente apenas para manter o crescimento e o metabolismo sem, ou quase, água livre. Para este fim, os resíduos agroindustriais têm se mostrado adequados e de custo altamente competitivo, podendo ser utilizados como substrato neste tipo de fermentação no qual o micro-organismo pode crescer entre os fragmentos ou superfície do substrato, consumindo e secretando metabólitos, dentre eles, enzimas (FARINAS et al., 2014; MITCHELL et al., 2006).

Existe uma perspectiva para utilização de processos fermentativos em estado sólido na produção de enzimas de interesse industrial (QUEIROZ et al., 2018). A eficiência do processo FES na obtenção de produtos é dependente tanto do tipo de micro-organismo utilizado, como das variáveis ambientais e operacionais selecionadas durante o cultivo. Fatores como temperatura, pH, umidade, aeração, concentração de nutrientes, tipo e característica do substrato estão entre as principais variáveis do processo de FES (FARINAS et al., 2014).

Diferentes micro-organismos, como bactérias, leveduras e fungos, têm a capacidade de crescer em substratos sólidos; entre eles os fungos filamentosos são os que melhor se adaptam à fermentação sólida devido as suas propriedades fisiológicas e bioquímicas. Um dos aspectos importantes na FES é a extração e recuperação eficiente dos metabólitos produzidos, visando promover a viabilidade econômica do processo para produção da enzima (SANTOS et al., 2008b).

É uma técnica vantajosa, pois além de simular o habitat natural de micro-organismos (principalmente fungos filamentosos), apresenta maior produtividade,

menor susceptibilidade à inibição e maior estabilidade das enzimas (RODRÍGUEZ-ZÚÑIGA et al., 2011). Desta forma, permite a penetração das hifas nos poros entre as partículas dos substratos, auxiliando as trocas gasosas entre as células, para manutenção metabólica (HÖLKER; LENZ, 2005). Apresenta como vantagens também o baixo custo das matérias-primas empregadas no meio de cultivo, a simplicidade do meio de fermentação utilizado, a menor probabilidade de contaminação do meio pela menor quantidade de água livre presente e a possibilidade de obtenção da enzima extracelular mais concentrada (AMARAL, 2007).

Nos últimos anos, uma diversidade de subprodutos da indústria agrícola ou resíduos agroindustriais têm sido estudados com a finalidade de formular substratos para produção de proteases que proporcionam grande potencial de reuso devido à sua composição e características (LADEIRA et al., 2010). Devido à sua ampla aplicabilidade e ao seu alto custo de obtenção, tem-se buscado meios alternativos de produção, tanto na FSm, quanto na FES. Utilizando para esse fim, meios de cultura de baixo custo, levando em consideração que aproximadamente 30 a 40% dos custos envolvidos na sua produção estão relacionados ao meio de cultura utilizado para o crescimento do micro-organismo. Portanto sua otimização é de grande importância para a definição de alternativas de produção economicamente viáveis (SHIKHA; SHARAN; DARMWAL, 2007; MUKHERJEE; ADHIKARI; RAI, 2008).

A utilização de resíduos da agroindústria é crescente, pois estes representam uma das mais importantes fontes renováveis de energia disponíveis no planeta, dentre os quais se destacam os provenientes da soja, cana de açúcar, milho, entre outros. Neste sentido, tem-se intensificado o aproveitamento desses materiais como substratos alternativos no desenvolvimento de vários bioprocessos para a produção de diversas moléculas com alto valor agregado (CUNHA et al., 2016). Tecnicamente, um processo que permite a produção de substâncias a partir de substratos, envolvendo a ação de micro-organismos, é a fermentação. Este processo é definido pelo crescimento microbiano em condições favoráveis e com padrões físico-químicos controlados (ROVEDA; HEMKEMEIER; COLLA, 2010).

Entre os micro-organismos produtores de enzimas através o processo de FES, podemos destacar os fungos filamentosos do gênero *Aspergillus*, pois demanda elevada de aplicação em diversos setores da indústria e baixo custo de

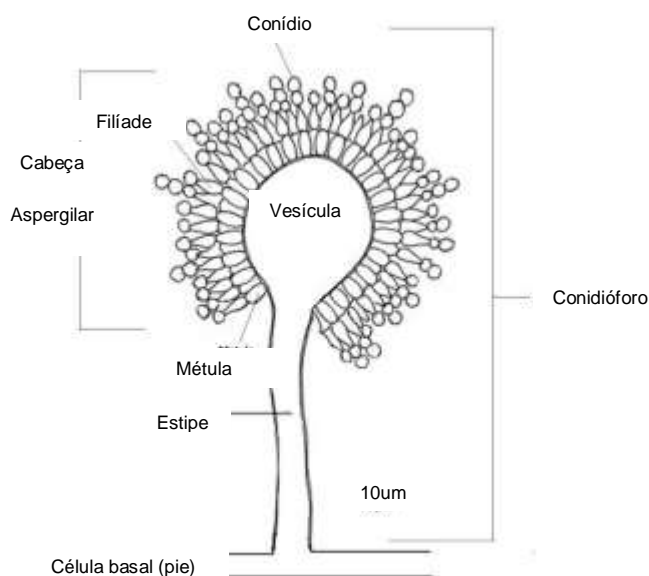
produção quando comparado à produção enzimática por outros micro-organismos, visto que o micélio pode ser filtrado e extraído com facilidade através de técnicas de separação e recuperação enzimática (INDRATININGSIH et al., 2013).

2.4 O Gênero *Aspergillus*

São reconhecidas mais de 300 espécies do gênero *Aspergillus* (VESTH et al., 2018). Os fungos deste gênero são amplamente estudados, pois são os mais comuns do grupo dos fungos filamentosos. Apresentam vasta distribuição mundial, presentes em vários ambientes, secretam altos níveis de proteases extracelularmente, o que é atrativo para as indústrias (AZEVEDO, 2018). Foram descritos pela primeira vez por Micheli no ano de 1729 (ARZANLOU et al., 2016), que verificou que a cabeça conidial desse fungo era semelhante a um "aspergillum" (utensílio usado para espalhar água benta), e Virchow em 1856 isolou esse micro-organismo de lesões pulmonares, em seres humanos (HERNÁNDEZ et al., 2018).

As colônias desses fungos desenvolvem-se rapidamente em seus substratos, sua coloração vai de tons esbranquiçados ao marrom, podendo apresentar também, tons esverdeado ou preto (BAKER; BENNETT, 2008; HUBKA et al., 2013). A sua estrutura inteira, o conidióforo, inclui cabeça aspergilar (vesícula e fiálides), haste (estipe), além da célula-pé (SANTOS, 2007), conforme Figura 4.

Figura 4: Morfologia representativa de espécies do genero *Aspergillus* (SOMAI, 2018).



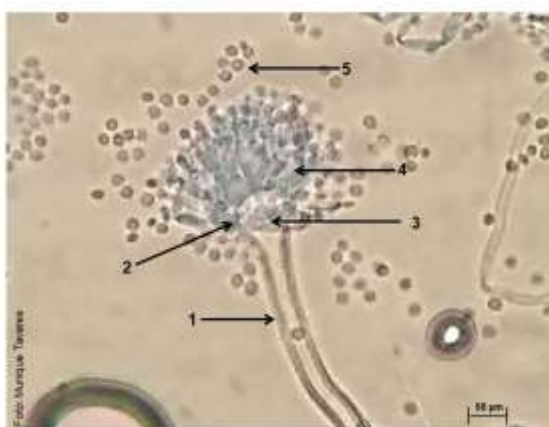
Algumas espécies estão presentes e atuam na decomposição da matéria orgânica (saprófitos), causam doenças em animais e plantas, incluindo humanos (patógenos) (KRIJGSHELD et al., 2013). Muitas das espécies são utilizadas para obtenção de metabólitos bioativos e também enzimas extracelulares (SILVA et al., 2018).

Dentre as espécies de maior importância e as mais utilizadas para o processo industrial e tecnológico de produção enzimática, podemos destacar. *A. niger*, *A. flavus*, *A. oryzae*, *A. versicolor* e *A. clavatus*, em especial as espécies da seção *Nigri*, obtendo êxito, em potencial, na produção de amilases, pectinases e proteases. Além de desempenhar importante papel na produção destas enzimas, estas podem ser utilizadas no processo industrial de produção de alimentos e bebidas, também desempenham papel importante na área da saúde, podendo também, causar doenças em humanos como a aspergilose (MAIA; FRAGA, 2017).

2.4.1 *Aspergillus sclerotiorum*

O fungo filamentoso, *Aspergillus sclerotiorum*, foi descoberto e catalogado por Huber (1933), relacionando-o com a deterioração das maçãs. Este fungo apresenta micélio aéreo escasso de cor branco a amarelo acinzentado, sem odor e exsudato límpido a amarelo pálido. Conídios globosos rugosos, vesículas globosas, raramente alongadas, métula cobrindo a metade superior da superfície da vesícula e fiálides alongadas como mostra a Figura 5.

Figura 5: *Aspergillus sclerotiorum* URM 5792. Conidióforo (1); Métula (2); Vesícula (3), Fiálides (4), Conídios (5). Aumentado 50X. Fonte: A autora.



Linhagens de *A. sclerotiorum* produzem a ocratoxina A, uma micotoxina nociva para animais e humanos (DAVOLOS; PIETRANGELI, 2014; KUNTAWEE; AKARAPISAN, 2015). Esta espécie também foi identificada como patógeno de humanos e animais, podendo causar a onicomiose (AMRI et al., 2010) e otomicose (HARIMA et al. 2004).

Apesar deste fungo ser patogênico e produzir micotoxina, é um fungo economicamente importante podendo ter potencial aplicabilidade bioindustrial como por exemplo, utilizado para transformação bioquímica de esteróides, alcalóides ou fenazinas (VISAGIE et al., 2014; BAO et al., 2016), também é uma fonte prolífica de novos metabólitos secundários bioativos como a lovastatina (PHAINUPHONG et al., 2017; SUWANNARAT et al., 2019), ácido penicílico (KANG et al., 2007; ZHENG et al., 2010), butenólídeos e furanonas (PHAINUPHONG et al., 2017), asperidinas, pirrolidina e piperidina (PHAINUPHONG et al., 2018).

A. sclerotiorum é uma fonte importante na produção de enzimas que degradam a lignocelulose, como a lacase, manganês peroxidase e lignina peroxidase (BONUGLI-SANTOS et al., 2010; ANDLAR et al., 2018). Também produz outras enzimas como inulinase (NAGGAR et al., 2016), α -amilase (YAGAR; ERTAN; BALKAN, 2008), protease (DA SILVA et al., 2016) e colagenase (CARDOSO et al., 2019).

Alguns trabalhos envolvendo o fungo *A. sclerotiorum*, mostraram resultados promissores na imobilização celular (ROCHA et al., 2012) e imobilização enzimática (α -Amilase) (YAGAR; ERTAN; BALKAN, 2008), além de ter grande potencial na biorremediação de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PASSARINI et al., 2011), produzir bioativos com atividade antimicrobiana e antibiofilme (ÜSTÜN et al., 2019).

Os esporos deste fungo foram utilizados com êxito no controle biológico de cupins (HANSEN et al., 2016) e os seus esclerócios contêm compostos que são utilizados na fabricação de pesticidas (WHYTE et al., 1996). Diante disso entende-se que *A. sclerotiorum* é um fungo em potencial para ser utilizado em processos biotecnológicos de diversas áreas industriais. A produção da micotoxina não é um impeditivo para exploração biotecnológica da espécie, salvo em aplicações na indústria farmacêutica, onde segurança na formulação e grau de pureza são imprescindíveis, evitando riscos à saúde humana

2.5 Processo de Imobilização de enzimas

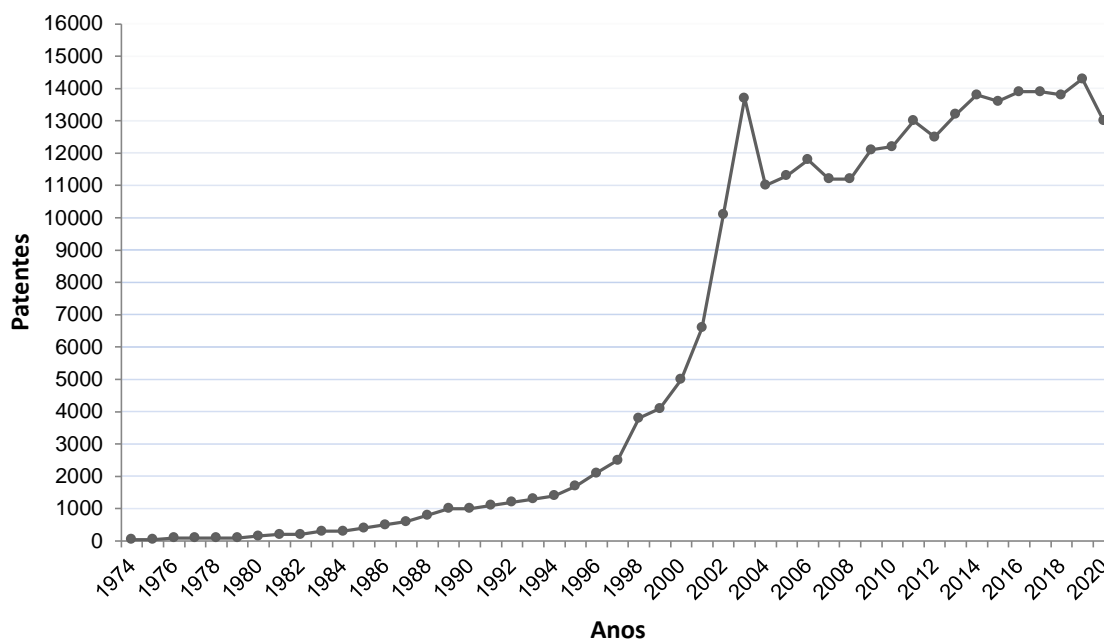
A aplicação de enzimas em diversos ramos industriais tem tornado a tecnologia enzimática uma alternativa cada vez mais atrativa. É requisito da atividade a busca incessante por processos sustentáveis que viabilizem a cultura da química verde, reduzindo ou eliminando o uso e geração de substâncias nocivas ao meio ambiente. Desta forma, podem-se substituir os catalisadores químicos convencionais pelos biocatalisadores altamente específicos (KRAJEWSKA, 2004).

A utilização de enzimas, em alguns casos, pode ser considerada um processo de alto custo, desta forma, para viabilizar economicamente o processo, é necessário que o biocatalisador seja recuperável e reutilizável. O processo de imobilização de um catalisador pode ser uma via direta para permitir a reciclagem e seu reuso. A garantia da produção e biocatalisador estável é muitas vezes alcançada pela técnica de imobilização, que através da alteração das propriedades da enzima, produz biomoléculas estáveis, específicas e altamente ativas (FERNÁNDEZ-LORENTE et al., 2007; HANEFELD; GARDOSI; MAGNER, 2009).

Genericamente a imobilização é uma técnica utilizada para reter uma biomolécula no interior de um reator ou de um sistema analítico. A técnica de imobilização enzimática, consiste em confinar a enzima através de um suporte sólido em meio aquoso e em solventes orgânicos, que pode ocorrer de forma isolada ou combinada com outras técnicas, fazendo com o que o processo ocorra com eficiência, promovendo especificidade, seletividade e estabilidade da enzima (SOUZA et al., 2017b).

Langlois e Dale através de patente datada em 1940 foram os primeiros a relatarem o uso de enzimas para fins industriais, empregando amilases no processo de obtenção de xarope de milho (KATZ, 2015). O processo de imobilização enzimática surpreende em seu histórico, e apenas em meados de 2002, Straathof et al. (2002) estimaram que dentre os processos biocatalíticos, apenas 20% envolvem enzimas imobilizadas. Contudo, no decorrer dos anos, novos processos e protocolos de imobilização enzimática têm sido relatados, pesquisas no banco de dados Lens.org utilizando como termos de buscas (immobilization of enzymes OR enzymatic immobilization) revelaram que no período de 1974 a 2020 foram apresentados um número de publicação de quase 40.000 patentes no período (Figura 6), o que coloca em contínua evidência as perspectivas do método (BRADY; JORDAAN, 2009).

Figura 6: Número de patentes publicadas contendo processos de imobilização enzimática por ano no período de 1974 a 2020 (Fonte: Lens.org)



O processo de imobilização de enzimas apresenta diversas vantagens na área de biotecnologia enzimática, pois garante que esses catalisadores sejam recuperados e reutilizados continuamente. Desta forma, a enzima pode ser manuseada de forma mais conveniente, como uma formulação sólida, promovendo sua separação final do produto, reduzindo ou excluindo a contaminação do produto por proteínas. A imobilização apresenta como objetivo obter maiores vantagens em relação ao aumento da estabilidade enzimática, proteção contra a desnaturação, tornando o catalisador mais robusto, mais resistente, o que reflete diretamente na produtividade (FERNANDES; LIMA; LOPES, 2010; SHELDON; VAN PELT, 2013).

As enzimas quando extraídas do seu meio natural tendem a se transformar em biomoléculas sensíveis à desnaturação, provocada por picos de pH, temperatura e presença de inibidores. A técnica de imobilização de enzimas é um dos métodos mais bem-sucedidos para minimizar essas limitações (ILLANES, 2009; HOMAEI et al., 2013). As enzimas na forma imobilizada são mais resistentes às modificações do meio reacional, podendo ser facilmente reutilizadas, separadas dos reagentes e ter capacidade de operar em processos contínuos (BRADY; JORDAAN, 2009; MENDES et al., 2011).

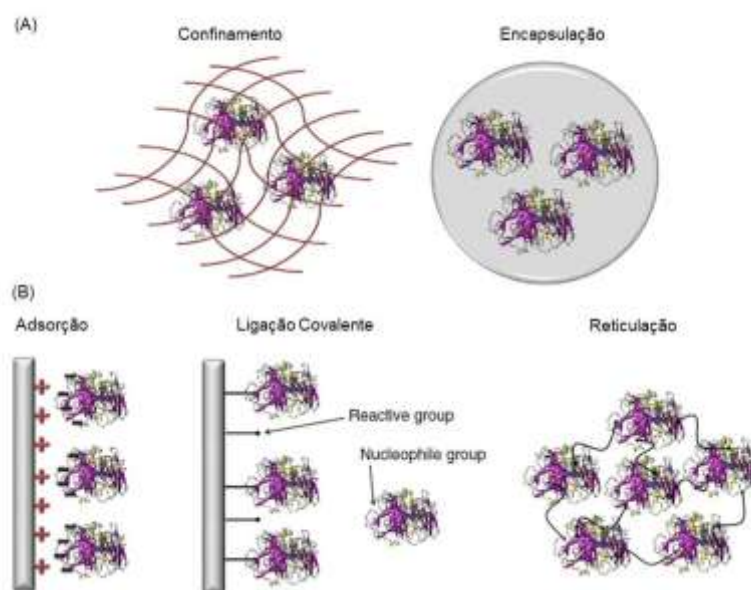
Ainda que, a imobilização enzimática supere o uso das enzimas solúveis, algumas considerações devem ser salientadas, como, perda da atividade enzimática pós-imobilização, custo dos suportes, desfavorecimento nas propriedades cinéticas e incrustação de material indesejado (DI COSIMO et al., 2013). Sendo assim, ao invés de reduzir custos no processo, estes eventos podem torna-lo oneroso (GUISAN, 2006).

As enzimas apresentam propriedades físico-químicas, propriedades dos substratos e produtos e aplicações bem distintas, deste modo, não há como definir uma só técnica de imobilização que seja aplicável a todas as enzimas e em todo seu extenso uso. Levando ainda em consideração que os métodos apresentam vantagens e desvantagens (limitantes) para sua execução. Sendo assim, o melhor método de imobilizar uma enzima, é aquele que promove a melhor e maior retenção de atividade enzimática, estabilidade e durabilidade (SOUZA et al., 2017a).

Há diversos métodos de imobilização, a escolha do método deve ser embasada em alguns parâmetros: atividade do biocatalisador, capacidade de regeneração e inativação, custo, toxicidade dos reagentes, estabilidade, hidrodinâmica e alcance dos objetivos final para o material imobilizado (MENDES et al., 2011; ILLANES et al., 2012).

Conceitualmente, o processo de imobilização enzimática se distingue em duas metodologias básicas, a ligação entre enzima e suporte pode ocorrer através de interação física ou química, evidenciados na Figura 7. Os métodos de retenção física compreendem o confinamento (reter fisicamente a enzima em uma matriz sólida porosa) e a encapsulação (aprisionamento e isolamento da enzima para transferência de massa). Os métodos de conexão química compreendem a adsorção (interações hidrofóbicas, força de Van der Waals, ligações de hidrogênio e ligações iônicas), a ligação covalente (consiste na ligação da enzima com o substrato covalentemente) e *cross linking* ou ligação cruzada, este método envolve a formação de ligação covalente entre moléculas de enzimas e reagentes bifuncionais de baixa massa molar, formando agregados unidos por ligações intermoleculares. (FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ; SANROMÁN; MOLDES, 2013; SOUZA et al., 2017a).

Figura 7: Esquema dos métodos físicos (A) e químicos (B) de imobilização enzimática. Modificado de Fernández-Fernández, Sanromán e Moldes (2013)



Além dos métodos de imobilização é importante frisar a contribuição dada pelos suportes para o bom desempenho da enzima imobilizada no processo. A escolha do suporte está diretamente relacionada às características inerentes da enzima e aos custos empregados na imobilização (MILETIĆ et al., 2009). Existe uma diversidade de matrizes disponibilizadas para imobilizar enzimas, porém a natureza química e física destes suportes pode alterar as propriedades do biocatalisador (CAO, 2005). As matrizes geralmente são de materiais sólidos porosos, não porosos ou de estrutura de gel, insolúvel em água e inerte, que podem interferir no processo e na capacidade de ligação das enzimas. Os materiais porosos possuem elevada área superficial interna disponível para a imobilização de enzimas, porém o diâmetro dos poros do suporte deve ser satisfatoriamente grande para acomodar a enzima e permitir o acesso do substrato. Por outro lado, nos não porosos a acomodação das moléculas de enzima ocorre apenas na sua superfície externa, o que facilita a interação do catalisador com moléculas de substrato (MESQUITA et al., 2018) Na escolha do suporte para um processo aplicável, é importante observar as propriedades físico-químicas da matriz, assim como sua provável capacidade de regeneração (MENDES et al., 2011). De modo geral, os requisitos essenciais para seleção de um suporte são: elevada área superficial, permeabilidade, estabilidade química e mecânica, capacidade de regeneração, custo, morfologia e composição, natureza da afinidade hídrica, resistência ao ataque microbiano, alta densidade de

grupos reativos presentes em sua superfície, dentre outras (MATEO et al., 2007; MENDES et al., 2011; TALBERT; GODDARD, 2012). Os materiais utilizados como suporte para imobilização podem ser classificados como: inorgânicos, orgânicos (sintéticos ou naturais) ou compósitos (matrizes híbridas) (ZDARTA et al., 2018).

Os suportes inorgânicos utilizados no processo de imobilização de enzimas, são caracterizados por apresentarem elevada especificidade de área superficial e potencial funcionalização de superfície, são excelentes estabilizadores térmicos e de pH, além de serem resistentes mecanicamente. Podemos citar entre eles, a sílica, titânio, alumina, zircônia, óxido de zinco, magnetitas, carbonos ativados, nanotubos, entre outros (ZDARTA et al., 2018). Dentre esses, os suportes a base de sílica têm ganhado bastante atenção na área biomédica, pois apresenta composição química bem definida, que garante modificação de sua estrutura (DE SOUZA; MOHALLEM; DE SOUSA, 2011), por métodos químicos e alteração de morfologia e estrutura de poros. Além de apresentar resistência mecânica elevada e serem inertes quimicamente (HOMAEI et al., 2013).

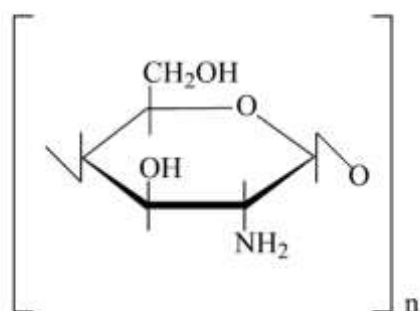
Os suportes orgânicos, especialmente os polímeros, podendo ser naturais ou sintéticos, destacam-se como uma classe de suportes amplamente empregados na imobilização enzimática. Os suportes naturais apresentam vantagens superiores em relação aos sintéticos, apresentando fácil degradação e baixo custo. Por sua vez, os sintéticos tendem a se combinar física e quimicamente para formar um suporte ideal para aplicação específica (FURLANI et al., 2020).

Dentre os diferentes suportes naturais amplamente utilizados na imobilização de enzimas, destacam-se, a celulose, amido, agarose, carragena, colágeno, ágar, alginato e quitosana. Mesmo que sejam utilizadas em baixas concentrações, demonstram eficácia na formação de géis inertes, são insolúveis em água, apresentam alta resistência e ativação eficiente de sua estrutura. O uso desses agentes promove o fortalecimento da estrutura aumentando resistência mecânica e térmica (HOMAEI et al., 2013).

A aplicação da quitosana, entre os polímeros naturais utilizados para suporte de imobilização, tem se tornado um destaque. A eficiência de sua aplicação está diretamente relacionada à capacidade de assumir diferentes configurações geométricas, como pó, escamas, hidrogéis, membranas, fibras, entre outras, além de apresentar diferentes grupos funcionais, como amino e hidroxila, garantindo sua utilização em diferentes métodos de imobilização (MENDES et al., 2011).

A quitosana (Figura 8) é um composto orgânico formado pela desacetilação da quitina, segundo polímero mais abundante da natureza, perdendo apenas para a celulose (GEORGE; ABRAHAM, 2006). É um produto biodegradável de baixo custo de grande importância ambiental e econômica (MENDES et al., 2011). É extraída do exoesqueleto dos crustáceos, como caranguejos e camarões, onde o mesmo torna-se resíduo na indústria pesqueira, considerado poluente, sua utilização promove a redução do impacto ambiental provocado pelo seu acúmulo nos ambientes de produção ou estoque. A quitosana é insolúvel em água e solúvel em meio ácido diluído, produzindo polímero catiônico, através da protonação de grupamento amino ($-NH_2$), que promove características e propriedades especiais em comparação às fibras vegetais como a celulose (BARBOSA et al., 2017).

Figura 8: Estrutura do biopolímero quitosana (MENDES et al., 2011).



Pela presença do grupamento amino ($-NH_2$) e das duas hidroxilas ($-OH$) em cada resíduo de sua estrutura, que confere excelentes propriedades biológicas e químicas, o uso da quitosana vem sendo descrito em diversas aplicações. Além disso, cabe destacar que a quitosana é atóxica, biodegradável, hidrofílica, possui atividade microbiana e capacidade de adsorção de metais pesados, além da biocompatibilidade e da expressiva afinidade proteica (SHUKLA et al., 2013).

Vale salientar ainda, a importância dos compósitos, suporte híbrido, que em virtude das propriedades conferidas, têm despertado o interesse da ciência, nas últimas décadas, para o processo de imobilização de biocatalisadores. Os compósitos são formados pela junção de dois ou mais suportes, podendo ser combinados da seguinte forma, inorgânicos com inorgânicos (sílica - magnetita), orgânico com orgânico (quitosana – alginato) e orgânico com inorgânico (quitosana

– magnetita) O melhor argumento para utilização dos compósitos é unir as propriedades aplicáveis dos materiais maximizando seus efeitos e benefícios (ZDARTA et al., 2018).

2.5.1 Processo Imobilização de enzimas utilizando suportes magnéticos

Atualmente o uso de suportes magnéticos tem despertado o interesse em processos industriais, e a combinação de suas propriedades com a imobilização enzimática tem sido desenvolvida a fim de produzir suportes de fácil separação do meio reacional (DOMINGUES et al., 2020). As nanoestruturas surgem como suportes alternativos para o processo de imobilização enzimática. Várias propriedades atraíram a atenção no campo das ciências da atualidade, tais como, tamanho reduzido das estruturas, elevada área superficial, resistência a temperaturas elevadas, interação entre enzima-substrato e reatividade química. Por apresentarem propriedades superparamagnéticas contribuem para a recuperação do biocatalisador aplicando apenas um campo magnético, como um ímã, proporcionando baixo estresse mecânico às enzimas (HU et al., 2009; COSTA et al., 2016).

O uso de nanopartículas magnéticas como suporte sólido no processo de imobilização de enzimas torna-se importante devido à possibilidade de reutilização e estabilidade do biocatalisador, através da aplicação de campo magnético externo, o que reduz custo de energia e tempo nas etapas de centrifugação. Além de que esse material de dimensão nanométrica apresenta vantagens em relação à razão superfície/volume de modo a facilitar a transferência de massa (PEREIRA et al., 2015).

Desta forma, é comum que a superfície das nanopartículas seja modificada para amparar o processo de imobilização. Podendo as estruturas nanométricas serem modificadas com material orgânico ou inorgânico, com o propósito de formar partículas funcionalizadas, potencializando suas propriedades e garantindo maior efeito na imobilização (REBELO et al., 2010).

A imobilização enzimática utilizando suportes magnéticos apresenta propriedades inovadoras, que conferem ao processo a eliminação de etapas

indesejáveis (centrifugação e diluição da amostra e perda de suporte). Partículas em escala nanométrica promovem ampliação da área superficial em decorrência do seu tamanho reduzido, minimiza a toxicidade, aperfeiçoa a eficiência catalítica, além de fornecer ao processo economia de tempo e eficácia (NETO, 2014).

Devido a sua versatilidade a separação magnética vem sendo bastante utilizada, pois o processo simples e rápido ocorre a partir de aplicação de campo magnético externo à amostra. Esta metodologia vem sendo amplamente aplicada no setor de biotecnologia de purificação de biomoléculas de forma alternativa, o uso destes compósitos na imobilização tem como objetivo principal promover de forma mais eficaz a separação e recuperação do biocatalisador reabilitando para posterior reuso (DOMINGUES et al., 2020; NOURI; KHODAIYAN, 2020).

2.6 Nanopartículas magnéticas

As nanopartículas magnéticas (NPM's) apresentam-se na forma de grãos originando sistemas de ordem nanométrica (10^{-9} m), desta forma encontram-se no estado molecular e atômico, com propriedades físico-químicas assumidamente diferentes das vistas em materiais com mais volume. Estas propriedades estão diretamente ligadas ao tamanho, morfologia e estrutura dessas partículas. São características importantes para que as NPM's sejam em potencial utilizadas tecnologicamente: elevada área superficial em relação ao volume, capacidade de formar nanodomínios magnéticos e eficácia no recobrimento de vários tipos de ligantes (FRANCISQUINI; SCHOENMAKER; SOUZA, 2012).

Nanopartículas de magnetita (Fe_3O_4) são especificamente um dos materiais magnéticos comumente mais utilizados. Por serem biocompatíveis e apresentarem super paramagnetismo com baixa toxicidade, além de apresentarem fortes propriedades magnéticas, são utilizadas frequentemente nos processos de imobilização enzimática e no processo de purificação de proteínas e enzimas (JORDAN; KUMAR; THEEGALA, 2011).

As NPM's apresentam vasta aplicação no setor da nanotecnologia, tais como, agentes de contraste para ressonâncias, separação magnética de células e proteínas, produção de fármacos, entre outros. Dentre as nanopartículas mais utilizadas nestas aplicações tecnológicas pode-se destacar, as NPM's de óxidos de ferro, em especial as de Fe_3O_4 (TASCA et al., 2015).

Métodos de preparação e caracterização de NPM's de Fe_3O_4 têm sido incansavelmente estudados, devido ao aumento considerável de suas aplicações práticas, vários métodos têm sido elaborados. No processo de elaboração e desenvolvimento destes métodos tem-se observado vantagens e desvantagens em relação a sua aplicação, considerando principalmente, tamanho das partículas, escala de produção e custo do processo (GRABIS; HEIDEMANE; RAŠMANE, 2008).

Vários estudos relacionados às nanopartículas magnéticas recobertas com diversos tipos de materiais são relatados na literatura. Cunha (2018) descreveu em seus estudos que materiais orgânicos e inorgânicos vêm sendo utilizados como revestimento na superfície de NPM's, para aprimoramento e segurança em suas aplicações. Dentre os materiais orgânicos biocompatíveis, mais utilizados, estão, o ácido oléico e cítrico, fosfanatos, silanos, polímeros sintéticos e naturais, aminoácidos e biomoléculas. Entre os inorgânicos, podem ser destacados a sílica, metais e não-metals, óxidos metálicos e sulfetos.

Alguns dos estudos de imobilização de enzimas utiliza nanopartículas sem revestimento, porém isso faz com que elas estejam altamente susceptíveis à oxidação, diminuindo sua resposta ao campo magnético. Como consequência, o suporte apresenta uma vida útil curta, diminuindo o potencial de reuso da enzima. Ademais, o produto pode ser contaminado devido à perda de magnetização da amostra, gerando problemas de processo, principalmente quando aplicados em indústria de alimentos, bebidas e têxtil (LIMA, 2016).

Para utilização, as NPM's necessitam de funcionalização com material ativo biologicamente. Este material deve ser de baixo custo, fácil adesão ao suporte, estável e sensível. Dentre as biomoléculas que apresentam estas características destaca-se a quitosana, como um biopolímero atóxico, que exibe biocompatibilidade e elevada capacidade de se ligar a enzimas no processo de imobilização. Diversos estudos evidenciam que o revestimento de NPM's com o biopolímero quitosana não afeta as propriedades magnéticas, viabilizando a sua utilização em diversas aplicações, inclusive na imobilização enzimática (ALBUQUERQUE et al., 2017).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Produzir proteases colagenolíticas pelo fungo filamentoso *Aspergillus sclerotiorum* URM 5792 e imobilizar em nanopartículas magnéticas revestidas com quitosana.

3.2 Objetivos específicos

- Selecionar fungos filamentosos produtores de proteases com atividade colagenolítica;
- Produzir proteases com atividade colagenolítica utilizando fermentação em estado sólido;
- Avaliar a influência de variáveis na produção da protease com atividade colagenolítica utilizando planejamento fatorial 2^2 ;
- Imobilizar a protease colagenolítica produzida em nanopartículas magnéticas e avaliar o processo de imobilização utilizando planejamento fatorial 2^3 ;
- Caracterizar bioquimicamente as enzimas livre e imobilizada.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDALLA, M. A pandemia de 2020, a Ciência e a indústria de Biotecnologia. **Outras Palavras - Tecnologia em disputa**, 2020.

ALBUQUERQUE, I. L. T. et al. Modificação da superfície de nanocompósitos de $\text{Fe}_2\text{O}_3/\text{Fe}_3\text{O}_4$ visando seu uso para imobilização da glicose oxidase. **Cerâmica**, v. 63, p. 244–252, 2017.

ALIPOUR, H. et al. Therapeutic applications of collagenase (metalloproteases): A review. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 6, n. 11, p. 975–981, 2016.

ALMEIDA, E. M. DE. **PRODUÇÃO E PURIFICAÇÃO DE PROTEASES DE *Aspergillus tamaritii* URM 4634 PARA APLICAÇÃO NO AMACIAMENTO DE CARNES**. Universidade Federal Rural de Pernambuco, 2018.

AMARAL, P. F. F. **Produção de lipase de *Yarrowia lipolytica* em biorreator multifásico**. Universidade Federal do rio de Janeiro. 2007.

AMRI, M. et al. *Aspergillus sclerotiorum*: À propos d'un cas d'onychomycose en Tunisie. **Journal de Mycologie Medicale**, v. 20, n. 2, p. 128–132, 2010.

ANDLAR, M. et al. Lignocellulose degradation: An overview of fungi and fungal enzymes involved in lignocellulose degradation. **Engineering in Life Sciences**, v. 18, n. 11, p. 768–778, 2018.

ARAÚJO, R.; CASAL, M.; CAVACO-PAULO, A. Application of enzymes for textile fibres processing. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 26, n. 5, p. 332–349, 2008.

ARZANLOU, M. et al. Two novel *Aspergillus* species from hypersaline soils of The National Park of Lake Urmia, Iran. **Mycological Progress**, v. 15, n. 10–11, p. 1081–1092, 2016.

BAKER, S. E.; BENNETT, J. W. Genomics of the Aspergilli. **The *Aspergilli*: Genomics, Medical Aspects, Biotechnology, and Research Methods**, p. 3–13, 2008.

BAO, J. et al. New furanone derivatives and alkaloids from the co-culture of marine-derived fungi *Aspergillus sclerotiorum* and *Penicillium citrinum*. **Chemistry & Biodiversity**, v. 14, n. 3, 2016.

BARBOSA, M. A. et al. Chitosan. In: **Comprehensive Biomaterials II**. v. 2, n. 13, p. 279–305, 2017.

BASTOS, A. Enzimas: a chave da biotecnologia. **EMBRAPA**, 2015.

BATISTA, J. M. S. et al. Produção e caracterização de protease fibrinolítica de *Streptomyces parvulus* DPUA 1573. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 69, n. 1, p. 123–129, 2017.

BATISTA, P. As enzimas como aliadas da indústria têxtil. **Novozymes**, 2017.

BON, E. P. S.; FERRARA, M. A.; CORVO, M. L. Enzimas em biotecnologia: produção, aplicações e mercado. In: INTERCIÊNCIA (Ed.), p. 506, 2008.

BONUGLI-SANTOS, R. C. et al. Production of laccase, manganese peroxidase and lignin peroxidase by Brazilian marine-derived fungi. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 46, n. 1, p. 32–37, 2010.

BORLIDO, L. et al. Magnetic separations in biotechnology. **Biotechnology Advances**, v. 31, n. 8, p. 1374–1385, 2013.

BRADFORD, M. . A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248–254, 1976.

BRADY, D.; JORDAAN, J. Advances in enzyme immobilisation. **Biotechnology Letters**, v. 31, n. 11, p. 1639–1650, 2009.

CAO, L. Carrier-bound Immobilized Enzymes: Principles, Applications and Design. In: **WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA**. p. 3–527, 2005.

CARDOSO, K. B. B. et al. Collagenase production by *Aspergillus sclerotiorum* URM-5792 using coffee waste as a medium for solid-state fermentation. **Research trends**, v. 10, p. 27–31, 2019.

CHAGAS, P. M. B. et al. Immobilized soybean hull peroxidase for the oxidation of

phenolic compounds in coffee processing wastewater. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 81, p. 568–575, 2015.

CHEN, Z. et al. Preparation and characterization of a novel nanocomposite with double enzymes immobilized on magnetic Fe_3O_4 -chitosan-sodium tripolyphosphate. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 169, p. 280–288, 2018.

CONTESINI, F. J.; MELO, R. R. De; SATO, H. H. Critical Reviews in Biotechnology An overview of *Bacillus* proteases : from production to application An overview of *Bacillus* proteases : from production to application. **Critical Reviews in Biotechnology**, p. 1–14, 2017.

COSTA, V. M. et al. Nanobiocatalytic systems based on lipase- Fe_3O_4 and conventional systems for isoniazid synthesis: A comparative study. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 33, n. 3, p. 661–673, 2016.

CUNHA, J. A. da. **ENCAPSULAMENTO DE NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS E CURCUMINA EM SÍLICA VISANDO APLICAÇÕES BIOMÉDICAS**. 2018. Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2018.

CUNHA, J. R. B. et al. Cultivo de *Penicillium spp.* em resíduos da colheita de soja para produção de celulase, protease e amilase. **Revista Ceres**, v. 63, n. 5, p. 597–604, 2016.

DA SILVA, O. S. et al. Novel Protease from *Aspergillus tamarii* URM4634: Production and Characterization Using Inexpensive Agroindustrial Substrates by Solid-State Fermentation. **Advances in Enzyme Research**, v. 4, n. 4, p. 125–143, 2016.

DABOOR, S. M. et al. Extraction and purification of collagenase enzymes: A critical review. **American Journal of Biochemistry and Biotechnology**, v. 6, n. 4, p. 239–263, 2010.

DALLASTRA, E. D. G.; RAMALHO, E. X.; AGUDELO, L. M. G. VALORIZAÇÃO DE RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS PARA A PRODUÇÃO DO FUNGO ENTOMOPATOGÊNICO *METARHIZIUM ANISOPLIAE* POR PROCESSOS DE FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO. In: **Impactos das Tecnologias na Engenharia Química 3**. p. 29–39, 2019.

DARWESH, O. M. et al. **Enzymes immobilization onto magnetic nanoparticles to improve industrial and environmental applications**. 1. ed. Elsevier Inc., v. 630, 2020.

DAVOLOS, D.; PIETRANGELI, B. A molecular and bioinformatic study on the ochratoxin A (OTA)-producing *Aspergillus affinis* (section *Circumdati*). **Mycotoxin Research**, v. 30, n. 2, p. 113–122, 2014.

DE SOUZA, K. C.; MOHALLEM, N. D. S.; DE SOUSA, E. M. B. Nanocompósitos magnéticos: Potencialidades de aplicações em biomedicina. **Quimica Nova**, v. 34, n. 10, p. 1692–1703, 2011.

DEL R. ROCHA-PIZAÑA, M. et al. Production of a potential collagenolytic protease by nejayote fermentation with *Aspergillus oryzae*. **International journal food science thecnology**, v. 55, n. 10, p. 3289–3296, 2020.

DI COSIMO, R. et al. Industrial use of immobilized enzymes. **Chemical Society Reviews**, v. 42, n. 15, p. 6437–6474, 2013.

DIXIT, S. et al. Toxic hazards of leather industry and technologies to combat threat : a review. **Journal of Cleaner Production**, v. 87, p. 39–49, 2015.

DOMINGUES, O. et al. EVALUATION OF MAGNETIC CARRIERS EMPLOYED IMMOBILIZATION OF LIPASE FROM *CANDIDA RUGOSA* FOR. **The Journal of Engineering and Exact Sciences**, v. 06, n. 04, p. 498–504, 2020.

DRKIROMOJSOV. Enzyme Scouring of Cotton Fabrics: a Review. **International Journal of Marketing e Tecnology**, v. 2, n. 9, p. 256–275, 2012.

DUARTE NETO, J. M. W. et al. Optimization of *Penicillium aurantiogriseum* protease immobilization on magnetic nanoparticles for antioxidant peptides' obtainment. **Preparative Biochemistry and Biotechnology**, v. 47, n. 7, p. 644–654, 2017.

FARINAS, C. S. et al. Desenvolvimentos em fermentação em estado sólido para produção de enzimas de interesse industrial. In: **EMBRAPA**. p. 211–241, 2014.

FERNANDES, K. F.; LIMA, C. S.; LOPES, F. M. Técnicas de Imobilização de Enzimas. **Revista Processos Químicos**, p. 53–58, 2010.

FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ, M.; SANROMÁN, M. Á.; MOLDES, D. Recent developments and applications of immobilized laccase. **Biotechnology Advances**, v. 31, n. 8, p. 1808–1825, 2013.

FERNÁNDEZ-LORENTE, G. et al. Specificity enhancement towards hydrophobic substrates by immobilization of lipases by interfacial activation on hydrophobic supports. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 41, n. 5, p. 565–569, 2007.

FIORMARKETS. Pesquisa de mercado da FiorMarkets: Mercado Global de Enzimas. **Pesquisa de Mercado Fior LLP**, p. 2, 2019.

FOOD INGREDIENTES BRASIL. Natureza e função das enzimas nos alimentos. **Food Ingredientes Brasil**, v. 35, p. 68–76, 2015.

FRANCISQUINI, E.; SCHOENMAKER, J.; SOUZA, J. A. Nanopartículas Magnéticas e suas Aplicações. **Química Supramolecular e Nanotecnologia**, p. 269–289, 2012.

FREEDONIA GROUP. Enzyme Industry Market Research. **The Freedonia Group**, p. 309, 2015.

FURLANI, I. L. et al. IMOBILIZAÇÃO ENZIMÁTICA: CONCEITO E EFEITOS NA PROTEÓLISE. **Química Nova**, v. 43, n. 4, p. 463–473, 2020.

GEORGE, M.; ABRAHAM, T. E. Polyionic hydrocolloids for the intestinal delivery of protein drugs: Alginate and chitosan - a review. **Journal of Controlled Release**, v. 114, n. 1, p. 1–14, 2006.

GRABIS, J.; HEIDEMANE, G.; RAŠMANE, D. Preparation of Fe₃O₄ and γ-Fe₂O₃ nanoparticles by liquid and gas phase processes. **Medziagotyra**, v. 14, n. 4, p. 292–295, 2008.

GRAMINHO, E. R. et al. Purification, characterization, and specificity determination of a new serine protease secreted by *penicillium waksmanii*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 169, n. 1, p. 201–214, 2013.

GUISAN, J. M. **Immobilization of enzymes and cells**. [s.l.: s.n.]

HANEFELD, U.; GARDOSI, L.; MAGNER, E. Understanding enzyme immobilisation. **Chemical Society Reviews**, v. 38, n. 2, p. 453–468, 2009.

HANSEN, G. M. et al. *Aspergillus sclerotiorum* fungus is lethal to both Western drywood (*Incisitermes minor*) and Western subterranean (*Reticulitermes hesperus*) termites. **Fine Focus**, v. 2, n. 1, p. 23–38, 2016.

HERNÁNDEZ, I. r. et al. **Pulmonary aspergillosis. Mycopathologia et Mycologia Applicata**. p. 1207-1214, 2018.

HÖLKER, U.; LENZ, J. Solid-state fermentation - Are there any biotechnological advantages? **Current Opinion in Microbiology**, v. 8, n. 3, p. 301–306, 2005.

HOMAEI, A. A. et al. Enzyme immobilization: An update. **Journal of Chemical Biology**, v. 6, n. 4, p. 185–205, 2013.

HU, B. et al. Immobilization of *Serratia marcescens* lipase onto amino-functionalized magnetic nanoparticles for repeated use in enzymatic synthesis of Diltiazem intermediate. **Process Biochemistry**, v. 44, n. 9, p. 1019–1024, 2009.

HUBER, G. A. *Aspergillus sclerotiorum*, n. sp., and its relation to decay of apples. **Phytopathology**, p. 306–308, 1933.

HUBKA, V. et al. Taxonomic revision of eurotium and transfer of species to *Aspergillus*. **Mycologia**, v. 105, n. 4, p. 912–937, 2013.

IDA, E. L. et al. Biochemical properties and evaluation of washing performance in commercial detergent compatibility of two collagenolytic serine peptidases secreted by *Aspergillus fischeri* and *Penicillium citrinum*. **Preparative Biochemistry and Biotechnology**, v. 47, n. 3, p. 282–290, 2017.

ILLANES, A. Enzyme Biocatalysis: Principles and Applications. **Focus on Catalysts**, p. 391, 2009.

ILLANES, A. et al. Recent trends in biocatalysis engineering. **Bioresource Technology**, v. 115, p. 48–57, 2012.

INACIO, F. D. et al. Proteases of wood rot fungi with emphasis on the genus *Pleurotus*. **BioMed Research International**, v. 2015, p. 10, 2015.

INDRATININGSIH et al. Identification of *Aspergillus species* Using Morphological Characteristic and The Effect of Temperature on The Protease Activity. **Jurnal**

Internasional Biokimia dan Bioteknologi, v. 2, n. 3, p. 298–301, 2013.

JORDAN, J.; KUMAR, C. S. S. R.; THEEGALA, C. Preparation and characterization of cellulase-bound magnetite nanoparticles. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 68, n. 2, p. 139–146, 2011.

KALAIYARASI, M. et al. Statistical Approach for the Production of Protease and Cellulase from *Bacillus cereus* KA3. **Bioprocess Engineering**, v. 1, n. 4, p. 93–103, 2017.

KANG, S. W. et al. Production of penicillic acid by *Aspergillus sclerotiorum* CGF. **Bioresource Technology**, v. 98, n. 1, p. 191–197, 2007.

KANTH, S. V. et al. Studies on the influence of bacterial collagenase in leather dyeing. **Dyes and Pigments**, v. 76, n. 2, p. 338–347, 2008.

KATZ, R. United States: UNITED STATES. **European Journal of Political Research Political Data Yearbook**, v. 54, n. 1, p. 309–315, 2015.

KOHAN, L. Processos Enzimáticos na Indústria Têxtil: uma alternativa com menor impacto ambiental. **Simpósio Internacional de Iniciação Científica da USP**, v. 16, p. 1–6, 2008.

KOIKE, M. A. PROTEASES FÚNGICAS: PRODUÇÃO UTILIZANDO FARELO DE SOJA E FARINHAS DE BANANA, CARACTERIZAÇÃO ENZIMÁTICA E APLICAÇÃO EM FARINHA DE GRILO. **Universidade Estadual Paulista**, p. 33, 2020.

KOSALKOVA et al., Casein phosphopeptides drastically increase the secretion of extracellular proteins in *Aspergillus awamori*. Proteomics studies reveal changes in the secretory pathway. *Microbial Cell Factories*, v11, 2012.

KRAJEWSKA, B. Application of chitin- and chitosan-based materials for enzyme immobilizations: A review. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 35, n. 2–3, p. 126–139, 2004.

KRIJGSHELD, P. et al. Development in *Aspergillus*. **Studies in Mycology**, v. 74, p. 1–29, 2013.

KUMAR, V.; SANGWAN, P.; SINGH, D. Global scenario of industrial enzyme market. **Nova Publishers New York**, n. January, p. 91–11, 2014.

KUNTAWEE, S.; AKARAPISAN, A. Isolation and identification of *Aspergillus species* producing Ochratoxin A in Arabica coffee beans. **International Journal of Agricultural Technology**, v. 11, n. 5, p. 1235–1242, 2015.

LADEIRA, S. A. et al. Utilização de resíduos agroindustriais para A produção de proteases pelo termofílico *Bacillus sp.* em fermentação submersa: Otimização do meio de cultura usando a técnica de planejamento experimental. **Química Nova**, v. 33, n. 2, p. 324–328, 2010.

LEIGHTON, T. J. et al. The relationship of serine protease activity to RNA polymerase modification and sporulation in *Bacillus subtilis*. **Journal of Molecular Biology**, v. 76, n. 1, p. 103–122, 1973.

LI, Q. et al. Commercial proteases: Present and future. **FEBS Letters**, v. 587, n. 8, p. 1155–1163, 2013.

LIMA, C. A. et al. Fermentation medium for collagenase production by *Penicillium aurantiogriseum* URM4622. **Biotechnology Progress**, v. 27, n. 5, p. 1470–1477, 2011.

LIMA, C. A. et al. Antimicrobial and radical scavenging properties of bovine collagen hydrolysates produced by *Penicillium aurantiogriseum* URM 4622 collagenase. **Journal of Food Science and Technology**, v. 52, n. 7, p. 4459–4466, 2014.

LIMA, J. de S. **Imobilização De Celulase Em Nanopartículas Magnéticas Encapsuladas Em Poli(Metacrilato De Metila)**. Universidade Federal de Santa Catarina. 2016.

LIMA, L. A. et al. Protease with collagenolytic activity produced by *Bacillus sp.* DPUA 1728 from Amazonian soil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 46, n. 4, p. 1217–1223, 2015.

LIMA, U. D. A. **Biotecnologia Industrial - Vol. 3: Processos fermentados e enzimáticos**. In: BLUCHER (Ed.). **Biotecnologia Industrial**. 2a Edição ed. p. 762, 2019.

MAGALHÃES, A. A. da S. et al. Produção e caracterização de enzimas proteolíticas de *Lentinus citrinus* (L .) Fr . 1825 DPUA 1693 do bioma amazônico (*Polyporaceae*) Production and characterization of proteolytic enzymes of *Lentinus citrinus* (L .) Fr . 1825 DPUA 1693 from the Amazonia. **Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi**, v. 14, n. 3, p. 453–461, 2019.

MAHNKE, L. C. **Produção e purificação de queratinases empregando micropartículas de magnetita-queratina**. Universidade Federal de Pernambuco. 2015.

MAIA, T. F.; FRAGA, M. E. Bioprospecting *Aspergillus section Nigri* in Atlantic Forest soil and plant litter. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 84, p. 1–7, 2017.

MALAR, C. G. et al. Review on surface modification of nanocarriers to overcome diffusion limitations: An enzyme immobilization aspect. **Biochemical Engineering Journal**, v. 158, 2020.

MARTIM, S. R. et al. Acid proteases from Amazonian edible mushroom for industrial applications. **Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi. Ciências Naturais**, v. 12, n. 3, p. 353–362, 2017.

MATEO, C. et al. Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, n. 6, p. 1451–1463, 2007.

MENDES, A. A. et al. Aplicação de quitosana como suporte para a imobilização de enzimas de interesse industrial. **Química Nova**, v. 34, n. 5, p. 831–840, 2011.

MESQUITA, et al. Enzymatic immobilizations in polymeric matrixes. Informative Geum Bulletin, v. 9, n. 2, p. 38-50, 2018.

MILETIĆ, N. et al. Macroporous poly(glycidyl methacrylate-co-ethylene glycol dimethacrylate) resins-Versatile immobilization supports for biocatalysts. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 56, n. 4, p. 196–201, 2009.

MITCHELL, D. A. et al. The Bioreactor Step of SSF : A Complex Interaction of Phenomena. In: **The General Steps of an SSF Process**. p. 13–32, 2006.

MUKHERJEE, A. K.; ADHIKARI, H.; RAI, S. K. Production of alkaline protease by a

thermophilic *Bacillus subtilis* under solid-state fermentation (SSF) condition using Imperata cylindrica grass and potato peel as low-cost medium: Characterization and application of enzyme in detergent formulation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 39, n. 2, p. 353–361, 2008.

NAGGAR, E.- et al. Statistical optimization of culture conditions and overproduction of inulinase using low cost, renewable feedstocks by a newly isolated aspergillus sclerotiorum under solid-state fermentation conditions: inulin hydrolysis by partially purified inulinase. **Journal of Pure and Applied Microbiology**, v. 10, n. 2, p. 991–1013, 2016.

NASCIMENTO, W. C. A. DO. **ESTUDOS SOBRE A SECREÇÃO DE PROTEASES POR *Bacillus sp.* SMIA-2 E SUA COMPATIBILIDADE COM DETERGENTES COMERCIAIS**. 2005. UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE, 2005.

NASCIMENTO, T. P. et al. Purification, biochemical, and structural characterization of a novel fibrinolytic enzyme from *Mucor subtilissimus* UCP 1262. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 40, n. 8, p. 1209–1219, 2017.

NASCIMENTO, T. P. **Purificação e caracterização de proteases fibrinolíticas**. Universidade Federal de Pernambuco. 2018.

NETO, J. M. W. D. **Imobilização de protease de *Penicillium aurantiogriseum* URM4622 em nanopartículas magnéticas e sua aplicação na produção de peptídeos com atividade antioxidante**. Universidade Federal de Pernambuco. 2014.

NOURI, M.; KHODAIYAN, F. Green synthesis of chitosan magnetic nanoparticles and their application with poly- aldehyde kefiran cross-linker to immobilize pectinase enzyme. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, p. 101681, 2020.

NOVELLI, P. K.; BARROS, M. M.; FLEURI, L. F. Novel inexpensive fungi proteases: Production by solid state fermentation and characterization. **Food Chemistry**, v. 198, p. 119–124, 2016.

NOVOZYMES. The Novozymes Report 2019. **Novozymes**, p. 159, 2019.

OLIVEIRA, R. L.; GOMES, M. H. G.; PORTO, T. S. DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS CINÉTICOS DA PROTEASE DE *Aspergillus niger* URM 5741. **REVISTA BRASILEIRA DE AGROTECNOLOGIA**, v. 5, n. 1, p. 94–98, 2015.

OLIVEIRA, V. de M. et al. Colagenases do pescado e suas aplicações industriais. **Pubvet**, v. 11, n. 3, p. 243–255, 2017.

PAPAGIANNI, M.; SERGELIDIS, D. Purification and biochemical characterization of a novel alkaline protease produced by *Penicillium nalgiovense*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 172, n. 8, p. 3926–3938, 2014.

PASSARINI, M. R. Z. et al. Marine-derived filamentous fungi and their potential application for polycyclic aromatic hydrocarbon bioremediation. **Marine Pollution Bulletin**, v. 62, n. 2, p. 364–370, 2011.

PEREIRA, M. G. et al. Immobilized lipase from *Hypocrea pseudokoningii* on hydrophobic and ionic supports: Determination of thermal and organic solvent stabilities for applications in the oleochemical industry. **Process Biochemistry**, v. 50, n. 4, p. 561–570, 2015.

PHAINUPHONG, P. et al. γ -Butenolide and furanone derivatives from the soil-derived fungus *Aspergillus sclerotiorum* PSU-RSPG178. **Phytochemistry**, v. 137, p. 165–173, 2017.

PHAINUPHONG, P. et al. Asperidines A–C, pyrrolidine and piperidine derivatives from the soil-derived fungus *Aspergillus sclerotiorum* PSU-RSPG178. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 26, n. 15, p. 4502–4508, 2018.

PIRES, C. B. A.; FONSECA, J. S. da; SERUDO, R. L. Proteases Produzidas Por Microorganismos Na Região Amazônica. **Scientia Amazonia**, v. 8, n. 1, p. B15–B33, 2019.

PORFÍRIO et al. Suplementação com colágeno como terapia complementar na prevenção e tratamento de osteoporose e osteoartrite: uma revisão sistemática. *Revista Brasileira de Geriatria e Gerontologia*, v. 19, n. 1, p. 153-164, 2016.

PRAXEDES, L. S.; BRITO, M. V. A Participação Dos Catalisadores Biológicos Na Otimização De Processos Industriais. **META**, v. 1, n. 1, p. 407–413, 2016.

QUEIROZ, C. et al. *Metarhizium anisopliae*. anisopliae: FUNGO ENTOMOPATOGÊNICO COM POTENCIAL PARA PRODUÇÃO DE AMILASE E PROTEASE ATRAVÉS DA FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO. In: ANAIS DO CONGRESSO NACIONAL DE BIÓLOGOS - CONGREBIO, 2018.

RAY, A. Protease Enzyme- Potential Industrial Scope. **International Journal Technology**, v. 2, n. 1, p. 1–4, 2012.

RAZZAQ, A. et al. Microbial Proteases Applications. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 7, n. 110, p. 1–20, 2019.

REBELO, L. P. et al. Enzymatic kinetic resolution of (RS)-1-(phenyl)ethanols by *Burkholderia cepacia* lipase immobilized on magnetic nanoparticles. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 21, n. 8, p. 1537–1542, 2010.

RIBEIRO, B. D. et al. Microbiologia Industrial: Alimentos. 1 ed. Vol. 2. Elsevier Editora Ltda, 2018.

RICARDO CHAVIRA JR.; THOMAS J. BURNETT; JAMES H. HAGEMAN. Assaying Proteinases with Azocoll. **Analytical Biochemistry**, v. 136, p. 446–450, 1983.

ROCHA, C. O. DA. **Nanopartículas magnéticas como suporte para imobilização de lipases**. Universidade Estadual Paulista, 2016.

ROCHA, F. T. D. B. **Produção e purificação de protease obtida do fungo filamentoso *Aspergillus sydowii* por fermentação em estado sólido utilizando resíduo de café como substrato**. Universidade Federal Rural de Pernambuco, 2018.

ROCHA, L. C. et al. Immobilization of marine fungi on silica gel, silica xerogel and chitosan for biocatalytic reduction of ketones. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 84, p. 160–165, 2012.

RODRÍGUEZ-ZÚÑIGA, U. F. et al. Produção de celulases por *Aspergillus niger* por fermentação em estado sólido. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, v. 46, n. 8, p. 912–919, 2011.

ROSSO, B. U. et al. Partitioning and extraction of collagenase from *Penicillium aurantiogriseum* in poly(ethylene glycol)/phosphate aqueous two-phase system.

Fluid Phase Equilibria, v. 335, p. 20–25, 2012.

ROVEDA, M.; HEMKEMEIER, M.; COLLA, L. M. Avaliação da produção de lipases por diferentes cepas de microrganismos isolados em efluentes de laticínios por fermentação submersa. **Ciencia e Tecnologia de Alimentos**, v. 30, n. 1, p. 126–131, 2010.

SAGGU, S. K.; MISHRA, P. C. Characterization of thermostable alkaline proteases from *Bacillus infantis* SKS1 isolated from garden soil. **PLoS ONE**, v. 12, n. 11, p. 1–18, 2017.

SAID, S.; PIETRO, R. **Enzimas de interesse industrial e biotecnológico**. p. 121, 2002.

SANTOS, A. F. et al. Peptidases em biotecnologia: produção, aplicações e mercado. **Biotecnologia Aplicada à Agro&Indústria**, n. 11, p. 381–437, 2016.

SANTOS, A. F. A. et al. Bioprospecting of enzymes produced by *Aspergillus tamaritii* URM 4634, isolated from Caatinga soil, by solid state fermentation. **Brasilian journal of Development.**, Curitiba, v. 6, n.5, p.25663-25676, may, 2020.

SANTOS, E. et al. Enzimas na indústria de cosméticos. **Enzimas em Biotecnologia**, p. 333–48, 2008a.

SANTOS, S. F. de M. Estudo da produção de pectinases por fermentação em estado sólido utilizando pedúnculo de caju como substrato. p. 148, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, 2007.

SANTOS, S. F. de M. et al. Aplicação da metodologia de superfície de resposta no estudo da produção e extração da poligalacturonase. **Química Nova**, v. 31, n. 8, p. 1973–1978, 2008b.

SHELDON, R. A.; VAN PELT, S. Enzyme immobilisation in biocatalysis: Why, what and how. **Chemical Society Reviews**, v. 42, n. 15, p. 6223–6235, 2013.

SHI, L.; CARSON, D. Collagenase Santyl Ointment: A Selective Agent for Wound Debridement. **Ostomy and Continence Nurses Societ**, v. 36, p. 3–7, 2009.

SHIKHA; SHARAN, A.; DARMWAL, N. S. Improved production of alkaline protease from a mutant of alkalophilic *Bacillus pantotheneticus* using molasses as a substrate.

Bioresource Technology, v. 98, n. 4, p. 881–885, 2007.

SHUKLA, S. K. et al. Chitosan-based nanomaterials: A state-of-the-art review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 59, p. 46–58, 2013.

SILVA, E. P. da et al. Seleção de fungos do gênero *Aspergillus* produtores de tanase para inclusão em ração animal. **Pubvet**, v. 12, n. 2, p. 1–7, 2018.

SILVA, T. F. da; PENNA, A. L. B. Colágeno: Características químicas e propriedades funcionais. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 71, n. 3, p. 530–539, 2012.

SINHA, R.; KHARE, S. K. Isolation of a halophilic *Virgibacillus* sp. EMB13: Characterization of its protease for detergent application. **Indian Journal of Biotechnology**, v. 11, n. 4, p. 416–426, 2012.

SINHA, S.; SINHA, S. Studies on the production of acid protease by submerged fermentation. **International Journal of Food Engineering**, v. 5, n. 1, 2009.

SIQUEIRA, A. J. S. et al. Determinação do Km e V Max: Revisão e Uma Nova Proposta. **Ciência em Movimento - Biociências e Saúde**, v. 13, n. 27, p. 47–52, 2011.

SOMAI, C. **Morfologia Aspergillus**. Disponível em: <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Aspergillus_wentii_structure.png>. Acesso em: 12 maio. 2020.

SOUZA, E. F. de. **APLICAÇÃO DE PROTEASES E AMILASES PRODUZIDAS POR *Bacillus* sp. SMIA-2 NA REMOÇÃO DE MANCHAS DE TECIDOS**. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. 2012.

SOUZA, P. M. De et al. A biotechnology perspective of fungal proteases. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 46, n. 2, p. 337–346, 2015.

SOUZA, L. T. A. et al. IMOBILIZAÇÃO ENZIMÁTICA: PRINCÍPIOS FUNDAMENTAIS E TIPOS DE SUPORTE. **Biociência Aplicada à Agro&Indústria**, n. 15, p. 529–568, 2017a.

SOUZA, T. F. de O. et al. Mapeamento Tecnológico Da Aplicação De Proteases Em Detergentes E Composições De Limpeza. **Cadernos de Prospecção**, v. 10, n. 2, p.

226–236, 2017b.

STAHLKE, D. **Enzimas na fabricação de alimentos. Novozymes**, 2015. .

SUBRAMANIYAM, R.; VIMALA, R. Solid State and Submerged Fermentation for the Production of Bioactive Substances : a Comparative Study. **International journal of science and nature**, v. 3, n. 3, p. 480–486, 2012.

SUWANNARAT, S. et al. Optimization of the Production of Lovastatin from *Aspergillus sclerotiorum* PSU-RSPG178 under Static Liquid Culture using Response Surface Methodology. **Sains Malaysiana**, v. 48, n. 1, p. 93–102, 2019.

TALBERT, J. N.; GODDARD, J. M. Enzymes on material surfaces. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 93, p. 8–19, 2012.

TASCA, R. A. et al. Desenvolvendo Habilidades e Conceitos de Nanotecnologia no Ensino Médio por Meio de Experimento Didático Envolvendo Preparação e Aplicação de Nanopartículas Superparamagnéticas. **Química Nova na Escola**, v. 37, n. 3, p. 236–240, 2015.

THAKUR, S. A.; NEMADE, S. N.; SHARANAPPA, A. Solid State Fermentation of Overheated Soybean Meal (Waste) For Production of Protease Using *Aspergillus Oryzae*. **International Journal of Innovative Research in Science, Engineering and Technology**, v. 4, n. 1, p. 18456–18461, 2015.

TOMBÁ CZ, E. et al. Magnetic iron oxide nanoparticles: Recent trends in design and synthesis of magnetoresponsive nanosystems. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 468, n. 3, p. 442–453, 2015.

TUNGA, R.; SHRIVASTAVA, B.; BANERJEE, R. Purification and characterization of a protease from solid state cultures of *Aspergillus parasiticus*. **Process Biochemistry**, v. 38, n. 11, p. 1553–1558, 2003.

ÜSTÜN, A. et al. The Evaluation of Antimicrobial and Antibiofilm Activity of Bioactive Compounds Obtained from *Aspergillus Sclerotiorum*. **Journal of the Institute of Science and Technology**, v. 9, n. 3, p. 1666–1673, 2019.

VERMELHO, A. B. et al. Enzimas proteolíticas: Aplicações biotecnológicas. In: **Enzimas em Biotecnologia: Produção, Aplicações e Mercado**. p. 269–285, 2008.

VESTH, T. C. et al. Investigation of inter- and intraspecies variation through genome sequencing of *Aspergillus section Nigri*. **Nature Genetics**, v. 50, n. 12, p. 1688–1695, 2018.

VISAGIE, C. M. et al. Ochratoxin production and taxonomy of the yellow *Aspergilli* (*Aspergillus section Circumdati*). **Studies in Mycology**, v. 78, n. 1, p. 1–61, 2014.

WANDERLEY, M. C. DE A. PRODUÇÃO, CARACTERIZAÇÃO PARCIAL E PURIFICAÇÃO DE COLAGENASE PRODUZIDA POR *Penicillium sp.* UCP 1286 ISOLADO DA CAATINGA. UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO. 2016.

WANDERLEY, M. C. de A. et al. Collagenolytic enzymes produced by fungi: a systematic review. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 48, n. 1, p. 13–24, 2017.

WHYTE, A. C. et al. Sclerotiamide: A new member of the paraherquamide class with potent antiinsectan activity from the *sclerotia* of *Aspergillus sclerotiorum*. **Journal of Natural Products**, v. 59, n. 11, p. 1093–1095, 1996.

WWW.SERVIER.COM. **Collagen, 2020.**

YAGAR, H.; ERTAN, F.; BALKAN, B. Comparison of some properties of free and immobilized α -amylase by *Aspergillus sclerotiorum* in calcium alginate gel beads. **Preparative Biochemistry and Biotechnology**, v. 38, n. 1, p. 13–23, 2008.

ZAGUE, V.; MACHADO-SANTELLI, G. . Bases Científicas dos Efeitos da Suplementação Oral com Colágeno Hidrolisado na Pele. **Revista Brasileira de Nutrição Funcional**, v. 65, p. 19–25, 2016.

ZANPHORLIN, L. M. et al. Production , Partial Characterization , and Immobilization in Alginate Beads of an Alkaline Protease from a New Thermophilic Fungus *Myceliophthora sp.* **The Journal of Microbiology**, v. 48, n. 3, p. 331–336, 2010.

ZDARTA, J. et al. Developments in support materials for immobilization of oxidoreductases: A comprehensive review. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 258, p. 1–20, 2018.

ZHANG, L. et al. Biocompatible magnetic nanoparticles grafted by poly(carboxybetaine acrylamide) for enzyme immobilization. **International Journal**

of **Biological Macromolecules**, v. 118, p. 1004–1012, 2018.

ZHENG, J. et al. Cyclic tripeptides from the halotolerant fungus *Aspergillus sclerotiorum* PT06-1. **Journal of Natural Products**, v. 73, n. 6, p. 1133–1137, 2010.

ZIMMER, K. R. et al. Enzimas microbianas de uso terapêutico e diagnóstico clínico. **Revista Liberato**, v. 10, n. 14, p. 123–137, 2009.

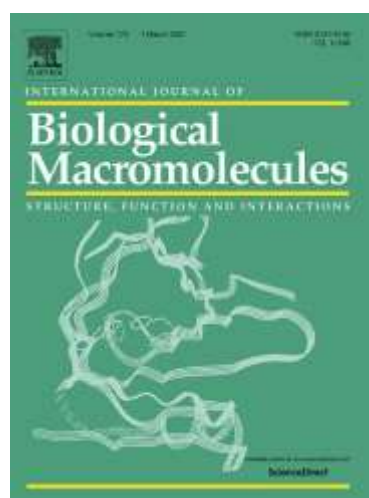
CAPÍTULO 1:

Produção, imobilização em nanopartículas magnéticas e caracterização bioquímica de protease colagenolítica de *Aspergillus sclerotiorum* URM 5792

Munique Cristiane Tavares Santos Silva, Lígia Maria Gonçalves Fernandes, Márcia Nieves Carneiro da Cunha, Ana Lúcia Figueiredo Porto, Tatiana Souza Porto

A ser submetido à revista:

International Journal of Biological Macromolecules



ISSN: 0141-8130

Cite Score: 6.9 Impact Factor: 5.162

Produção, imobilização em nanopartículas magnéticas e caracterização de protease colagenolítica de *Aspergillus sclerotiorum* URM 5792

Munique Cristiane Tavares Santos Silva¹, Lígia Maria Gonçalves Fernandes¹, Márcia Nieves Carneiro da Cunha¹, Ana Lúcia Figueiredo Porto¹, Tatiana Souza Porto^{*2}

1 Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Dois Irmãos, 52171-900, S/N, Recife, PE, Brasil.

2. Unidade Acadêmica de Garanhuns, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Av. Bom Pastor, Boa Vista, 55296-901, Garanhuns, PE, Brasil.

*Autor correspondente Tatiana Souza Porto

Tel: (81) 9987876831

E-mail: portots@gmail.com

Universidade Federal Rural de Pernambuco – Unidade Acadêmica de Garanhuns, Garanhuns, PE 55292-270, Brasil.

RESUMO

As proteases colagenolíticas podem ser obtidas de diversas fontes, sendo as de origem microbiana preferencialmente utilizadas, devido à aplicabilidade biotecnológica. Sendo assim, é importante a busca por fontes de produção destas proteases que sejam de baixo custo para aplicação industrial, bem como a imobilização das mesmas, que possibilita sua reutilização e viabiliza a redução dos custos dos processos. Este trabalho objetivou produzir protease colagenolítica de *Aspergillus sclerotiorum* URM 5792, imobilizar em nanopartículas magnéticas e caracterizar bioquimicamente as enzimas livre e imobilizada. A protease foi produzida extracelularmente por fermentação em estado sólido com atividade máxima de 303 U/mL. A enzima imobilizada em nanopartículas magnéticas revestidas com quitosana apresentou 86,25% de rendimento, manteve mais 75% da atividade inicial após 28 dias de armazenamento e 60% em doze ciclos de reuso. O pH e a temperatura ideais para a atividade enzimática, livre e imobilizada, foram 9,0 para ambas e 30°C e 40°C, respectivamente. A atividade enzimática foi inibida pelo PMSF, o que indica a enzima ser uma serino-protease e discretamente inibida pelos íons de Cu^{+2} e Mg^{2+} . Os valores de V_{max} e K_m , da enzima livre e imobilizada, foram 35,84 U/mL/min e 17,18 U/mL/min e 1,2 mg/mL e 0,8 mg/ml, respectivamente. Protease de *Aspergillus sclerotiorum* URM5792, na forma livre ou imobilizada, pode ser vista como uma ferramenta biocatalítica útil na indústria biotecnológica, reduzindo custos operacionais, diminuindo o uso de processamento químico e, consequentemente, atendendo a demanda industrial.

Palavras-chave: *Aspergillus*, protease colagenolítica, imobilização, nanopartículas magnéticas

ABSTRACT

The collagenolytic proteases can be obtained from several sources, and those of microbial origin are preferable use, due to the biochemical variety, genetic ease and biotechnological applicability. Therefore, it is essential to search for sources of production of these proteases that are of low cost for industrial application. This work aimed to produce collagenolytic protease from *Aspergillus sclerotiorum* URM 5792, immobilize on magnetic nanoparticles and biochemically characterize the free and immobilized enzymes. The protease was produced extracellularly by solid state fermentation with a maximum activity of 303 U/mL. The immobilized enzyme showed 86.25% of yield, retained 75% more of the initial activity after 28 days of storage and 60% in twelve reuse cycles. The ideal pH and temperature for enzyme activity, free and immobilized, were 9.0 for both and 30°C and 40°C, respectively. The enzymatic activity was inhibited by the PMSF, and slightly inhibited by the ions of Cu^{+2} and Mg^{2+} . The V_{max} and K_m values, of the free and immobilized enzyme, were 35.84 U/mL/min e 17.18 U/mL/min e 1.2 mg/mL and 0.8 mg/ml, respectively. This *Aspergillus sclerotiorum* URM5792 Protease, in free or immobilized form, can be seen as a useful biocatalytic tool in the biotechnology industry, reducing operating costs, decreasing the use of chemical processing and, consequently, meeting industrial demand.

Keyword: *Aspergillus*, collagenolytic protease, immobilization, magnetic nanoparticles

1. INTRODUÇÃO

As enzimas têm sido amplamente utilizadas em diversos processos industriais, como têxteis, farmacêuticos, couro, alimentos e detergentes. Mundialmente, seu uso e produção estão aumentando com o uso de matéria-prima, devido à facilidade de obtenção, vantagens em relação aos catalisadores químicos, como maior especificidade, menor consumo energético e maior velocidade da reação. O uso dessa tecnologia promete uma produção mais limpa como alternativa ao uso de produtos químicos perigosos (RAZZAQ et al., 2019).

Dentre as enzimas promissoras no mercado biotecnológico podemos destacar as proteases com atividade colagenolítica, enzimas que hidrolisam colágenos nativos ou desnaturado. A colagenase tem seu uso em potencial no tratamento de feridas, na indústria farmacêutica, na indústria do couro, de cosméticos e como aditivo de alimentos e bebidas (ROCHA-PIZAÑA et al., 2020). Wanderley et al. (2017) relataram em seus estudos que esta enzima pode ser obtida a partir de *Aspergillus*, *Bacillus*, *Candida*, *Penicillium*, *Streptomyces*, entre outros gêneros. Dentre os gêneros citados, destacam-se as espécies do gênero *Penicillium*, pela capacidade de produção enzimática, capacidade de crescimento em diversas condições de cultivo, além de apresentar variados substratos como fonte de nutrientes.

De acordo com Rigo et al., (2021) mais da metade das enzimas industriais são produzidas por leveduras e fungos filamentosos e cerca de 30% por bactérias. Apenas 8% são produzidos por animais e 4% por plantas. Assim como a produção enzimática por várias espécies de *Candida*. Essas fontes de produção prevalente são economicamente viáveis, pois o seu cultivo simples não envolve quaisquer restrições relacionadas com tempo e espaço em comparação com outras fontes.

As proteases colagenolíticas microbianas têm sido enzimas amplamente estudadas. Essas enzimas ganharam interesse não apenas devido ao seu papel vital nas atividades metabólicas, mas também devido à utilização nas indústrias. (RAZZAQ et al., 2019). No entanto, o uso dessas enzimas na forma livre ou solúvel enfrenta limitações em alguns processos, como perda de estabilidade e capacidade catalítica. O processo de imobilização pode ultrapassar algumas dessas limitações e fornecer catalisadores estáveis com tempo de vida e capacidade de reuso mais longos (CHAGAS et al., 2015).

A imobilização enzimática compreende um processo através do qual a enzima livre é fixada a um suporte sólido, a fim de promover a sua estabilidade (CHAGAS et al., 2015). O uso da nanotecnologia tem se tornado bastante promissor na imobilização enzimática. Imobilizar enzimas aplicando suportes magnéticos, como as nanopartículas magnéticas (NPM's), devido a sua versatilidade, vem sendo bastante utilizado, o processo simples e rápido ocorre a partir de aplicação de campo magnético externo à amostra (COSTA et al., 2016), promovendo de forma mais eficaz a separação e recuperação do biocatalisador reabilitando para posterior reuso (BORLIDO et al., 2013).

Algumas nanopartículas, podem apresentar comportamentos como aglomeração, alta reatividade e fácil oxidação no ar, que tem forte impacto em sua vida útil e na atividade enzimática. Assim, é imprescindível fornecer revestimento de superfície para evitar os problemas mencionados (FERNANDES, 2015). Dentre os revestimentos utilizados em imobilização, a quitosana vem sendo bastante estudada e representa uma classe de substâncias orgânicas promissoras, apresentam configurações geométricas variadas e grupos funcionais como hidroxila e amino, que aumentam sua estabilidade e durabilidade (SOUZA et al., 2017a).

Neste estudo, a protease colagenolítica de *Aspergillus sclerotiorum* URM5792 foi produzida utilizando fermentação em estado sólido e imobilizada em nanopartículas magnéticas revestidas com quitosana ativadas por glutaraldeído em seguida a enzima livre e imobilizada foram caracterizadas nas condições mais favoráveis.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Micro-organismo e meio de cultura

As linhagens fúngicas do gênero *Aspergillus* utilizadas para triagem foram obtidas da coleção de culturas URM – do Departamento de Micologia do Centro de Biociências da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Recife - PE, Brasil. Os micro-organismos foram mantidos em meio BDA (Batata Dextrose Agar) a 30°C por 7 dias para induzir a esporulação. Os esporos foram coletados após adição de 5 mL de NaCl a 0,9% (p/v) e solução de Tween 80 a 0,01% (v/v) previamente esterilizada a 121°C por 20 min.

2.2 Triagem e condição de cultura para micro-organismos do gênero *Aspergillus*

A triagem foi realizada com fungos do gênero *Aspergillus* (*A. versicolor* URM 5701, *A. phoenicis* URM 4924, *A. terreus* URM 4658, *A. japonicus* URM 5242, *A. niger* URM 5837, *A. sclerotiorum* URM 5792 e *A. heteromorphus* URM 0269) em fermentação em estado sólido (FES) utilizando como substrato farelo de soja. A FES foi realizada em frascos Erlenmeyer de 125mL contendo 5g do substrato, solução nutritiva (0,5% de extrato de levedura e 1% de glicose), inóculo de 10^6 esporos/mL, correspondendo a 40% de umidade. A FES foi executada por 72h e 96h a 30°C. Após a triagem do fungo melhor produtor da protease, foi realizado um planejamento fatorial 2^2 , com quatro pontos centrais, utilizando como substratos farelo de soja e farelo de trigo para verificar a influência das variáveis, concentração de substrato (3g, 5g e 7g) e umidade (20%, 40% e 60%), para produção da protease e da enzima colagenolítica. A FES foi concluída após 72h a 30°C em estufa incubadora BOD.

O extrato enzimático foi obtido pela adição de 7,5 mL de solução de fosfato de sódio 0,1 M (pH 7,0) por grama de material fermentado e homogeneizado em agitador orbital por 1h a 110 rpm. Posteriormente, o material foi macerado, filtrado à vácuo e centrifugado para a obtenção do extrato enzimático e posterior determinação das atividades enzimáticas.

2.3 Determinação de proteína total e atividades de proteases

A concentração total de proteína ao longo das diferentes etapas na purificação de protease foi determinada usando o método de (BRADFORD, 1976).

A atividade da protease foi medida usando azocaseína como substrato descrito por (LEIGHTON et al., 1973). Uma unidade de atividade (U) foi expressa como a quantidade de enzima capaz de levar a um aumento de 0,1 na absorbância a 440 nm em 1 h.

A atividade específica da protease é definida como a razão entre a atividade enzimática e a concentração proteica e é expressa em U/mg.

A atividade da colagenase foi realizada pelo método Azocoll descrito por CHAVIRA et al., (1983) utilizando azocoll como substrato. Uma unidade de atividade (U) foi expressa como a quantidade de enzima capaz de levar a um aumento de 0,1 na absorbância em 520 nm com 3h.

2.4 Imobilização da protease colagenolítica em NPM's

2.4.1 Preparação das NPM's

As nanopartículas magnéticas de Fe_3O_4 serão sintetizadas através da técnica de co-precipitação de acordo com a metodologia proposta por Chen et al., (2018) adaptada. Inicialmente o $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ e o $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ deverão ser solubilizados em água destilada, submetendo a solução ao aquecimento até atingir a temperatura de 80 °C. Em seguida, adiciona-se rapidamente NH_4OH a 25% (v/v), submetendo a agitação vigorosa por meio de um agitador magnético, mantendo a temperatura a 80 °C por 30 minutos. Após o arrefecimento a temperatura ambiente, as partículas precipitadas deverão ser repetidamente lavadas alternadamente com água destilada e etanol, devendo ser separadas pela ação de um ímã permanente, encaminhando-as posteriormente à estufa em um almofariz a 60°C até a total evaporação do líquido.

2.4.2 Revestimento com quitosana

As nanopartículas deverão ser completamente homogeneizadas em quitosana a uma concentração de 4 mg/mL, dissolvida em ácido acético a 0,35 M. Em seguida deve-se adicionar o tripolifosfato de sódio a uma concentração de 2mg/mL, submetendo a agitação vigorosa durante 30 minutos. Posteriormente, deve-se submeter a mistura ao banho com ultrassom durante um intervalo de 30 minutos. Em seguida, as nanopartículas deverão ser separadas pela ação de um ímã permanente e centrifugadas a uma velocidade de 5000 rpm, 4° C por 10 minutos, lavadas com água destilada e etanol duas vezes alternadamente, separando e encaminhando as mesmas à estufa a 60°C durante 1 hora.

2.4.3 Ativação com glutaraldeído e ligação com a enzima

A ativação das nanopartículas magnéticas ocorrerá durante período determinado pelo planejamento fatorial por meio da incubação das mesmas em glutaraldeído diluído em tampão acetato pH 5,0 (0,1 M) sob agitação (130 rpm) e

temperatura ambiente. Em seguida o suporte ativado deve ser exaustivamente lavado com água destilada (aproximadamente 800 mL). A cada lavagem deve-se verificar a presença de glutaraldeído não ligado por meio de leituras em espectrofotômetro a 245 nm. Posteriormente, adiciona-se 10 mL da solução enzimática, submetendo a mistura a uma agitação de 110 rpm para que ocorra o processo de ligação. Após separar as nanopartículas com a enzima através da aplicação de um campo magnético, as mesmas foram armazenadas sob refrigeração, havendo a necessidade de adicionar 10 mL de tampão a fim de evitar seu ressecamento. Posteriormente devem ser quantificadas as atividades da enzima não ligada, livre e imobilizada, utilizando os métodos descritos no item 2.3.

Os experimentos de imobilização da protease colagenolítica foram realizados de acordo com planejamento fatorial 2^3 , com três pontos centrais. As variáveis analisadas foram: concentrações de glutaraldeído (2,0, 3,0 e 4,0%), tempo de ativação (1,5h, 2h e 2,5h) e tempo de imobilização (0,5h, 1h e 1,5h). O rendimento da imobilização foi tomado como variável resposta do planejamento dos experimentos, sendo expresso pela seguinte equação (1):

$$Y(\%) = \frac{\textit{Atividade da enzima imobilizada}}{\textit{Atividade da enzima livre}} \times 100 \quad (1)$$

2.5 Estabilidade de armazenamento e reutilização da enzima imobilizada

A estabilidade de armazenamento da protease imobilizada foi calculada determinando a atividade proteásica ao longo de 28 dias, nos quais a enzima foi mantida sob refrigeração ($4 \pm 2^\circ\text{C}$). A reutilização da enzima imobilizada está relacionada à sua estabilidade operacional e foi determinada pela realização de 12 ciclos sucessivos de atividade enzimática, com resultados expressos em termos de atividade residual.

2.6 Determinação dos parâmetros cinéticos (K_m , V_{max})

Para determinação dos parâmetros cinéticos, a atividade da protease livre e imobilizada foi avaliada, utilizando o método descrito no item 2.3, utilizando

diferentes concentrações de azocaseína (2 a 40 mg/mL) à 25°C. A constante de Michaelis (K_m) e a taxa de reação máxima (V_{max}) foram estimadas ajustando os dados experimentais usando o modelo Michaelis-Menten (Eq.2), bem como usando a equação de duplo recíproco de Lineweaver-Burk (Eq 3).

$$v = \frac{V_{m\acute{a}x} \cdot [S]}{K_M + [S]} \quad (2)$$

$$\frac{1}{V_0} = \frac{K_m}{V_{m\acute{a}x}[S]} + \frac{1}{V_{m\acute{a}x}} \quad (3)$$

2.7 Caracterização Bioquímica

2.7.1 Efeito do pH na atividade proteolítica e estabilidade

O efeito do pH na atividade proteolítica foi investigado em soluções de azocaseína a 10 mg/mL preparadas em diferentes tampões a 0,1 M: citrato-fosfato (pH 5,0-7,0), Tris-HCl (pH 7,0-9,0) e glicina-NaOH (pH 9,0-12,0) a 25°C durante 60 min. Essa atividade foi então expressa como porcentagem de atividade relativa em comparação com o valor máximo e os resultados foram expressos como média e desvio padrão. A estabilidade da protease foi determinada incubando-se as amostras contendo enzima nos tampões acima sem o substrato, avaliando a atividade da enzima no período de 24 h, com intervalos de 4h, e expressando como porcentagem de atividade residual em comparação com o valor inicial.

2.7.2 Efeito da temperatura na atividade proteolítica e estabilidade

O efeito da temperatura na atividade proteolítica foi investigado entre 20 e 80°C usando uma solução de azocaseína a 10 mg/mL em tampão Tris-HCl 0,1 M (pH 7,5). A atividade relativa foi calculada em porcentagem com base na maior atividade inicial da enzima. A estabilidade enzimática foi determinada incubando-a no tampão acima, avaliando a atividade da enzima no período de 180 min, com intervalos de 60min, e expressando-a como atividade residual.

2.7.3 Efeitos dos íons metálicos na atividade proteolítica

A atividade da protease foi avaliada na presença de íons, como inibidores ou ativadores da atividade. O efeito das soluções iônicas foi avaliado em concentrações de 5 mM em Tris-HCl 0,2 M pH 7,2. Os seguintes íons foram usados: $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, CaCl_2 , $\text{ZnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, FeCl_3 , KCl e NaCl, incubados a 28°C por 30 min. A atividade da enzima sem íons foi considerada como controle (100%).

2.7.4 Efeitos dos inibidores e surfactantes na atividade proteolítica

Para avaliar o efeito dos inibidores na atividade enzimática, os extratos bruto e imobilizado foram expostos aos seguintes inibidores de protease a 5mM: PMSF (fluoreto de fenilmetilsulfonil), β -mercaptoetanol, EDTA (ácido etilenodiaminotetraacético) e ácido iodoacético, realizados a 25°C por 30 min. Os surfactantes testados foram SDS (dodecilsulfato de sódio - $\text{C}_{12}\text{H}_{25}\text{SO}_4\text{Na}$), Triton X - 100 ($\text{C}_{14}\text{H}_{22}\text{O}(\text{C}_2\text{H}_4\text{O})_n$), Tween 20 (monopalmitato de polioxietileno sorbitano - $\text{C}_{58}\text{H}_{114}\text{O}_{26}$) e Tween 80 (monopalmitato de polioxietileno sorbitano - $\text{C}_{64}\text{H}_{124}\text{O}_{26}$), estudados em diferentes concentrações, 1,0% e 2,0%. A atividade enzimática sem surfactante foi considerada controle (100%).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Triagem da linhagem fúngica do gênero *Aspergillus* para produção de protease com atividade colagenolítica

As linhagens fúngicas do gênero *Aspergillus* foram avaliadas através de FES utilizando farelo de soja como substrato por 72 e 96h. Dentre as espécies analisadas, o extrato enzimático de *Aspergillus sclerotiorum* URM5792 foi selecionado devido à alta produção de protease em comparação a outros micro-organismos, obtendo melhor resultado para atividade proteásica 59,63 U/mL e atividade específica de 57,11 U /mL em 72h de fermentação (Tabela 1). Os resultados obtidos evidenciam o potencial do gênero *Aspergillus* como produtor de protease. Indratiningsih et al., (2013) destacaram fungos filamentosos do gênero

Aspergillus como micro-organismos produtores em potencial de enzimas com FES. Em outro estudo realizado por Novelli et al., (2016) também foi avaliada a produção de proteases por cepas de *Aspergillus* em FES utilizando resíduos agroindustriais como substrato, no qual todas as linhagens avaliadas apresentaram atividade proteásica e estabilidade elevadas, demonstrando potencial aplicação biotecnológica.

Tabela 1. Produção de proteases por Fermentação em Estado Sólido (FES) utilizando farelo de soja como substrato após 72 horas de cultivo.

Micro-organismo	Atividade Proteásica (U/mL)	Atividade específica (U/mg)
<i>A. versicolor</i> URM 5701	25,9	23,07
<i>A. phoenicis</i> URM 4924	3,6	2,81
<i>A. terreus</i> URM 4658	5,33	3,98
<i>A. japonicus</i> URM 5242	6,66	4,97
<i>A. niger</i> URM 5837	3,30	3,60
<i>A. sclerotiorum</i> URM 5792	59,63	57,11
<i>A. heteromorphus</i> URM 0269	24,3	33,93

3.2 Planejamento fatorial completo 2² para produção de protease de *A. sclerotiorum* URM5792 por fermentação em estado sólido

Após identificação na triagem do fungo *A. sclerotiorum* URM 5792 como a linhagem de *Aspergillus* melhor produtora das proteases, utilizando o farelo de soja como substrato, foi realizado planejamento fatorial 2², utilizando como substratos, farelo de soja e farelo de trigo, durante 72h de fermentação, observando os efeitos nas variáveis independentes (concentração do substrato e umidade).

Para produção de proteases em FES foram realizados ensaios com base em planejamento fatorial completo 2² tendo como variáveis: concentração do substrato (g) (farelo de trigo e farelo de soja) e umidade (%). Os resultados dos planejamentos com farelo de soja e farelo de trigo estão apresentados na Tabela 2. Ambos os planejamentos mostraram resultados para atividade colagenolítica satisfatórios,

porém o ensaio que obteve maior atividade enzimática foi obtido com a utilização do farelo de trigo como substrato, sendo assim, as demais etapas dos estudos foram desenvolvidas com o farelo de trigo.

O farelo de trigo é um resíduo agroindustrial de baixo custo e fácil acesso, podendo ser usado indistintamente no processo de fermentação, não necessita de tratamento prévio, diminuindo consideravelmente os custos operacionais, além de apresentar elevado valor nutricional (DALLASTRA; RAMALHO; AGUDELO, 2019).

Em todos os ensaios de ambos os planejamentos a enzima produzida por *Aspergillus sclerotiorum* URM 5792 apresentou atividade. O melhor ensaio, após 72h de fermentação utilizando farelo de trigo como substrato, foi o ensaio 4 (7g de substrato e 60% de umidade) que apresentou 56,27 U/mL de atividade proteásica e 303,00 U/mL de atividade colagenolítica (Tabela 2). Evidenciando que a FES é uma técnica eficaz na produção de proteases por *A. sclerotiorum* URM 5792, assim como a melhor produção ocorreu onde a quantidade de substrato e a umidade foram maiores.

Tabela 2. Matriz do planejamento fatorial 2² e resultado de produção enzimática por *Aspergillus sclerotiorum* URM 5792 na FES com farelo de soja e trigo após 72 horas de cultivo.

Ensaio	Concentração de substrato (g)	Umidade (%)	AP _{FT} (U/mL)	AC _{FT} (U/mL)	AP _{FS} (U/mL)	AC _{FS} (U/mL)
1	3	20	39,57	144,40	50,07	197,50
2	7	20	23,43	89,70	52,76	265,40
3	3	60	39,50	216,40	54,86	278,60
4	7	60	56,27	303,00	52,40	299,10
5(C)	5	40	47,77	182,70	52,66	298,10
6(C)	5	40	48,97	201,20	53,03	270,40
7(C)	5	40	52,83	209,30	52,96	231,40

(C) – Pontos centrais do planejamento; AP_{FT} – Atividade proteásica com farelo de trigo; AC_{FT} – Atividade colagenolítica com farelo de trigo; AP_{FS} – Atividade proteásica com farelo de soja; AC_{FS} – Atividade colagenolítica com farelo de soja;

A análise estatística dos efeitos das variáveis independentes e suas interações (Figura 1A) sobre a atividade colagenolítica, mostra que a variável umidade e a interação entre a umidade e a concentração de substrato apresentaram efeito significativo na produção enzimática, utilizando farelo de trigo como substrato, uma vez que o valor do efeito estimado estava acima do nível de significância ($p < 0,05$). A Umidade foi a variável que influenciou positivamente na produção da atividade da protease colagenolítica, indicando que a produção foi maior nos ensaios onde a umidade foi 60% (Figura 1A), assim como, aumentando a umidade e a concentração do substrato, também houve aumento na produção enzimática. Estudos realizados por (THAKUR; NEMADE; SHARANAPPA, 2015) destacaram que a umidade é um importante parâmetro a ser considerado na FES, a presença de água no substrato torna os nutrientes mais acessíveis para o crescimento de fungos.

Em contrapartida, a análise estatística dos efeitos das variáveis independentes (Figura 1B) sobre a atividade colagenolítica, onde foi utilizado como substrato o farelo de soja, mostra que nenhuma das variáveis independentes nem a interação entre elas apresentaram efeito significativo sobre a atividade enzimática.

Desta forma, o farelo de trigo foi utilizado como substrato para a produção da protease colagenolítica de *Aspergillus sclerotiorum* URM5792, visto que apresentou maiores valores para atividade colagenolítica, assim como resultados significantes em relação ao percentual de umidade utilizada no processo fermentativo, além de ser uma fonte de carbono potencial, apresentando em sua composição altos níveis de proteínas. Essas características fazem do farelo de trigo um substrato com potencial para produção de proteases (BAKKER, 2017). O farelo de trigo é constituído aproximadamente de 18% de proteína e 62% de carboidratos. O tamanho de suas partículas (1.5 a 3mm) representa um diferencial, pois garante aumento da superfície de contato e permite maior distribuição dos nutrientes, apresentando características essenciais para produção de proteases extracelulares (ZANPHORLIN et al., 2010).

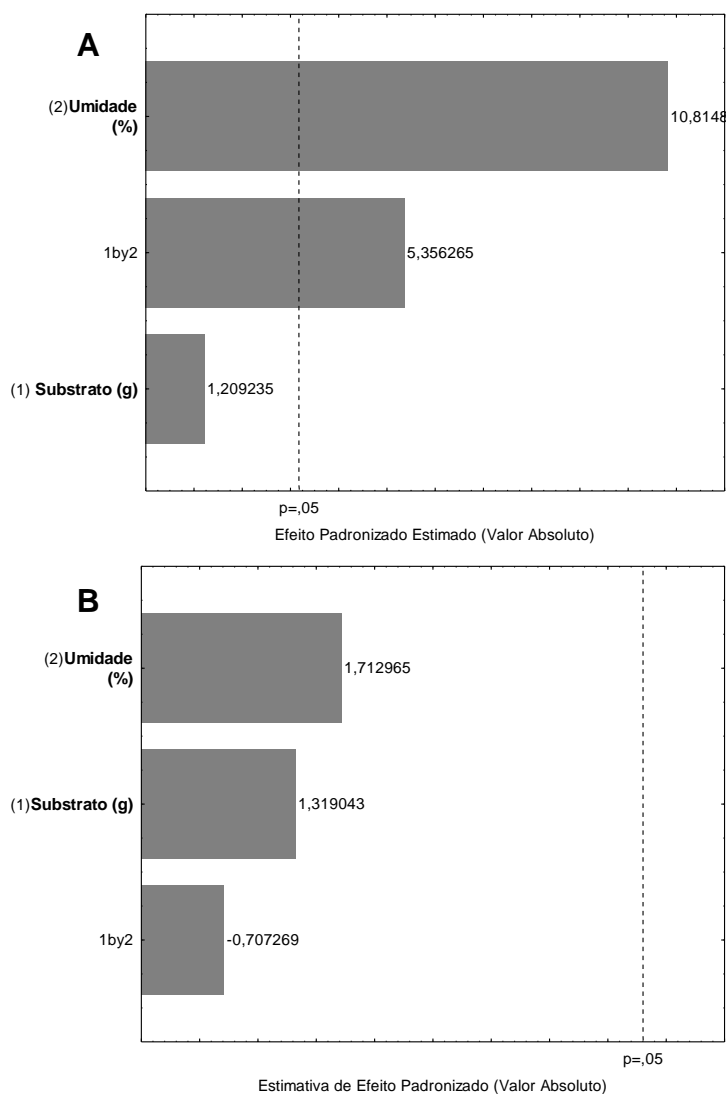


Figura 1. Gráfico de Pareto dos principais efeitos das variáveis independentes (1: Quantidade de Substrato (g); 2: Umidade (%)) sob a produção de protease colagenolítica por *Aspergillus sclerotiorum* URM 5792 em Fermentação em Estado Sólido (FES) utilizando farelo de trigo como substrato (A) e farelo de soja como substrato (B).

3.3 Planejamento fatorial 2^3 para imobilização de protease de *A. sclerotiorum* URM5792

A matriz dos resultados experimentais do planejamento fatorial completo 2^3 para identificar os parâmetros que mais influenciaram a imobilização da protease de *Aspergillus sclerotiorum* URM 5792 em nanopartículas magnéticas, observando os

efeitos das variáveis independentes, concentração de glutaraldeído, tempo de ativação e tempo de imobilização, é apresentada na Tabela 3.

Observou-se que os melhores rendimentos foram obtidos no ensaio 8 (4% de concentração de glutaraldeído, 2,5h de tempo de ativação e 1,5h de tempo de imobilização) com 86,25% de rendimento para atividade proteolítica e 83,83% de rendimento para atividade colagenolítica.

Tabela 3. Resultado da imobilização da protease colagenolítica em nanopartículas magnéticas revestidas com quitosana de acordo com planejamento fatorial 2³

Ensaio	Glutaraldeído (%)	Tempo de Ativação (h)	Tempo de Imobilização (h)	Rendimento (Y) AP (%)	Rendimento (Y) AC (%)
1	2	1,5	0,5	86,13	78,31
2	4	1,5	0,5	86,19	67,95
3	2	2,5	0,5	81,55	59,23
4	4	2,5	0,5	83,45	51,24
5	2	1,5	1,5	89,35	58,43
6	4	1,5	1,5	92,56	80,27
7	2	2,5	1,5	80,36	59,46
8	4	2,5	1,5	86,25	83,83
9 (C)	3	2	1	86,25	55,51
10 (C)	3	2	1	81,13	57,23
11 (C)	3	2	1	75,71	58,92

(C) – Pontos centrais do planejamento; AP – Atividade proteásica; AC – Atividade colagenolítica.

Em estudo realizado por Duarte Neto et al., (2017) foram obtidos na imobilização, em nanopartículas magnéticas revestidas com polianilina, de proteases de *Penicillium aurantiogriseum* 93% de rendimento da atividade inicial. Realizando imobilização de lacase em nanopartículas magnéticas revestidas com quitosana Das; Singh e Yogalakshmi (2017) obtiveram 65 – 70% de rendimento. O grupo funcional NH₂ da quitosana é de grande interesse devido à habilidade de formar ligações coordenadas covalentes com a proteína, as propriedades químicas e físicas do polissacarídeo aumentam sua estabilidade e durabilidade, o que permite obter um suporte apropriado para os diferentes procedimentos de imobilização (SOUZA et al., 2017a).

A análise dos efeitos das variáveis independentes, sobre a atividade colagenolítica, mostrou que as três variáveis apresentam estatisticamente efeito significativo. As variáveis concentração de glutaraldeído e tempo de imobilização influenciaram positivamente a imobilização da enzima, mostrando que o rendimento da imobilização é melhor quando a concentração de glutaraldeído e o tempo de imobilização são maiores, enquanto a variável tempo de ativação influenciou negativamente, mostrando que o rendimento da imobilização foi melhor quando o tempo de ativação é menor. A interação que apresentou estatisticamente maior influência a um nível de confiança de 95% (Figura 2), ocorreu entre a concentração de glutaraldeído e o tempo de imobilização.

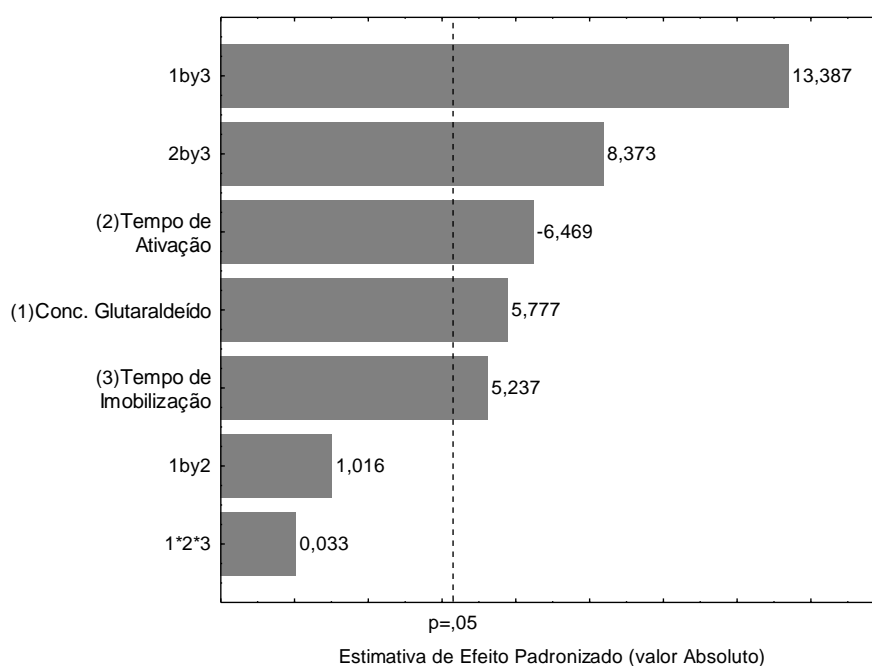


Figura 2. Efeito das variáveis independentes (Concentração de glutaraldeído (%), Tempo de Ativação (h) e tempo de imobilização (h)) e de suas interações sob o rendimento de imobilização (%) da protease colagenolítica em nanopartículas magnéticas de acordo com o planejamento fatorial completo 2^3

. O glutaraldeído atua na ativação de suportes magnéticos como agente de reticulação, melhorando a estabilidade enzimática sem promover alterações consideráveis em sua atividade, funciona como um braço espaçador ligando seus grupos aldeído com os grupos amina das enzimas. A concentração do glutaraldeído e o tempo de ativação das partículas pelo glutaraldeído deve ser otimizado, para que

haja espaço suficiente para a carga máxima da enzima e menor taxa de inativação, resultado em maior retenção da atividade (ROCHA, 2016).

3.4 Estabilidade ao armazenamento e ciclos de reuso

Uma das vantagens da imobilização enzimática é o uso repetido da enzima, bem como a estabilidade da enzima ao armazenamento. A atividade da enzima imobilizada foi mantida em mais de 75% em relação a atividade inicial após 28 dias de armazenamento (Figura 3), nos quais a enzima foi mantida sob refrigeração ($4 \pm 2^\circ\text{C}$). A reutilização da enzima imobilizada foi avaliada por 12 ciclos, no qual foi obtido mais 64% de sua atividade inicial, conforme observado na Figura 4. Desta forma, o custo operacional de aplicações práticas pode ser reduzido significativamente.

Chen et al. (2018) obtiveram resultados semelhantes quando utilizaram partículas magnéticas Fe_3O_4 revestidas com quitosana e tripolifosfato de sódio ($\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-CS-TPP}$) para imobilização simultânea de alcalase e tripsina. A atividade residual do imobilizado foi preservada em 86% após 35 dias de armazenamento e reteve mais de 60% de sua atividade inicial após dez ciclos de reutilização sucessiva. Resultados que confirmam a potencialidade da quitosana como revestimento de NPM's para imobilização de diferentes enzimas.

Estudo semelhante foi realizado por Nouri; Khodaiyan, (2020), que utilizaram NPM's revestidas com quitosana e polissacarídeo de kefiran como agente de reticulação na imobilização da enzima pectinase. Os resultados obtidos mostraram uma recuperação máxima da atividade da enzima pectinase imobilizada e após um mês, a atividade remanescente da enzima imobilizada foi de 60,23%. A pectinase imobilizada manteve sua atividade em 70,02% após 10 ciclos.

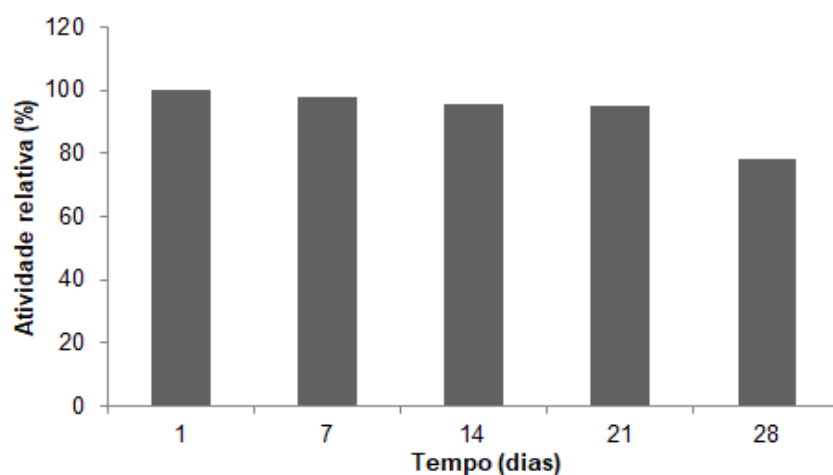


Figura 3. Estabilidade de armazenamento em atividade relativa da enzima proteolítica produzida por *Aspergillus sclerotiorum* URM 5792 imobilizada em NPM's revestida com quitosana.

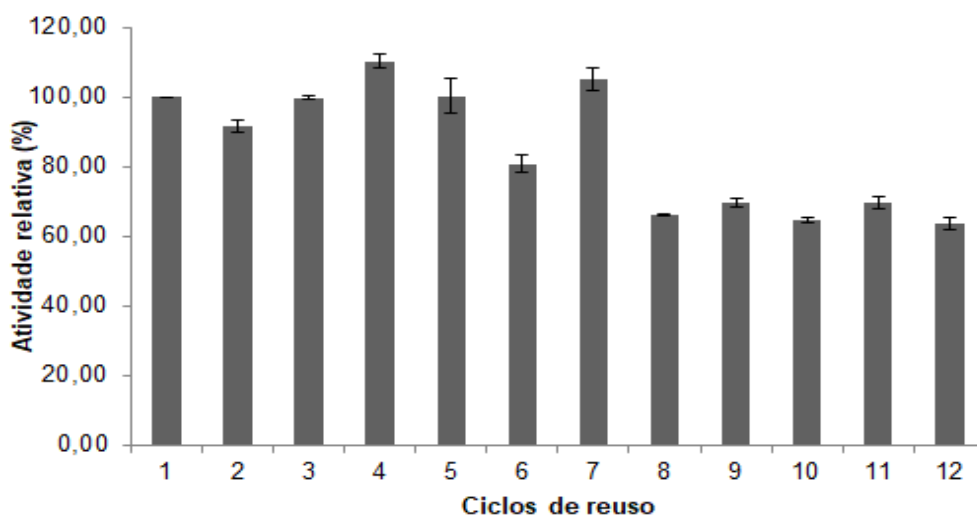


Figura 4. Ciclos de reuso em atividade relativa da enzima proteolítica produzida por *Aspergillus sclerotiorum* URM 5792 imobilizada em NPM's revestida com quitosana.

3.5 Parâmetros cinéticos da atividade de protease

As proteases, livre e imobilizada, de *Aspergillus sclerotiorum* URM5792 exibiram perfil cinético obedecendo as características de enzimas Michaelianas, ou seja, apresentaram uma cinética hiperbólica. Desta forma as enzimas na forma livre e imobilizada apresentaram um $K_m = 1,2$ mg/mL e $V_{max} = 35,84$ U/mL/min e $K_m = 0,8$ mg/mL e $V_{max} = 17,18$ U/mL/min, respectivamente, ambos calculados pela equação

de Lineweaver-Burk, usando azocaseína como substrato (Figura 5). Após a imobilização o valor de K_m da enzima imobilizada foi 1,5 vezes menor que o da enzima livre. O valor de K_m da protease imobilizada mostrou que a mesma apresentou maior afinidade de ligação com o substrato quando comparado com o da enzima livre. Estes resultados sugerem que a imobilização em NPM's pode fornecer capacidade catalítica eficiente. Os parâmetros cinéticos e a velocidade da reação podem ser alterados com a imobilização da enzima, respondendo a fatores como mudança na estabilidade da enzima (temperatura e pH), alteração na estrutura da enzima durante a imobilização e limitação da velocidade da reação em função da taxa de difusão do substrato na superfície do suporte (REIS, 2016)

O K_m e o V_{max} são duas constantes de extrema importância no estudo das reações enzimáticas. O K_m permite entender a função de enzimas que catalisam uma reação específica, que permite identificar o substrato principal, de maior afinidade. Quanto menor o valor da constante, maior será a afinidade da enzima ao substrato (SIQUEIRA et al., 2011). Oliveira; Gomes e Porto (2015) em seu estudo cinético da protease de *Aspergillus niger* URM 5791 obtiveram um K_m de 8,370 mg/mL e V_{max} de 5,596 mg/mL/min, usando azocaseína como substrato. Da Silva et al. (2018) verificaram o resultado do substrato de azocaseína com $K_m = 0,434$ mg/mL e $V_{max} = 7,739$ mg/mL/min para protease de *Aspergillus tamarii* URM 4634, evidenciando uso potencial na indústria de detergentes para roupas.

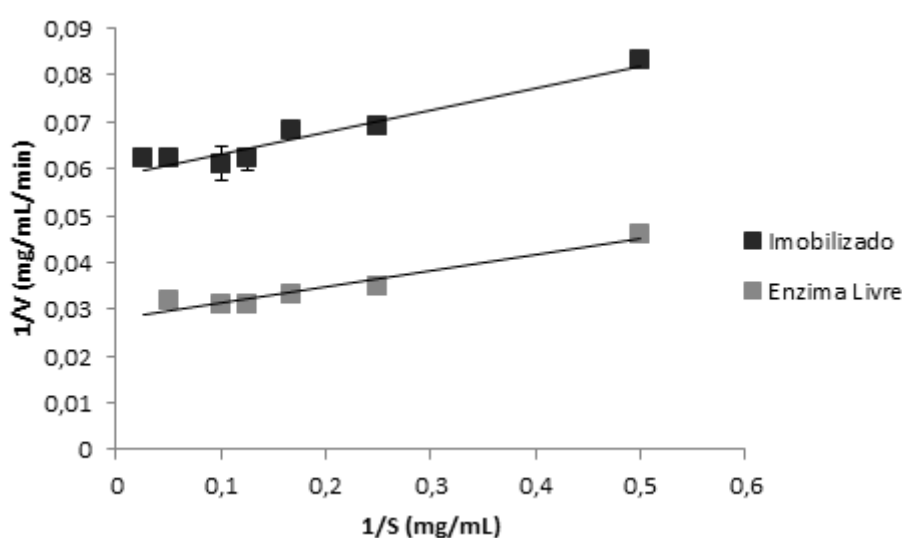


Figura 5. Curva duplo recíproco de Lineweaver-Burk para estimativa dos parâmetros cinéticos da protease extracelular, livre ($R^2 = 0,9484$) e imobilizada ($R^2 = 0,9441$), utilizando azocaseína como substrato.

3.6 Efeito do pH na atividade e estabilidade da protease livre e imobilizada

Os resultados do efeito do pH na atividade e estabilidade da enzima livre e imobilizada podem ser observados na Figura 6A e 6B, respectivamente. O pH ótimo tanto para a enzima livre quanto para a enzima imobilizada foi encontrado na faixa de 9,0 (Tris/HCl 0,1M). Portanto, os resultados mostram que tanto a enzima livre quanto a enzima imobilizada apresentaram atividades relativas superiores a 90% em uma ampla faixa de pH (7,0 - 9,0).

O mesmo pH ótimo (9,0) foi encontrado na imobilização de alcalase e tripsina utilizando NPM's revestidas com quitosana (CHEN et al., 2018), em outro estudo utilizando NPM's para imobilização de proteases, foi encontrado pH 9,0 e 10,0 como ótimos para a enzima livre e imobilizada, respectivamente (DUARTE NETO et al., 2017). Em estudo realizado por Cardoso et al., (2019) com a mesma protease colagenolítica e micro-organismo, utilizando como substrato resíduos de café, *A. sclerotiorum*, obtiveram o pH 8,0 como ótimo, evidenciando propriedades alcalinas da enzima.

A estabilidade do pH da enzima é importante para a caracterização enzimática, antes de ser comercializada (DA SILVA et al., 2016). A protease produzida por *Aspergillus sclerotiorum* URM5792 apresentou estabilidade do pH da enzima livre com mais de 80% de atividade residual no tempo de 24h e a da enzima imobilizada com mais de 60% no mesmo tempo, em todas as faixas de pH avaliadas. Esta estabilidade de pH da protease de *A. sclerotiorum* URM5792 mostrou potencial para possíveis aplicações industriais. Proteases com propriedades alcalinas podem ser aplicadas no processo de tratamento de couro, na produção de detergentes e indústria farmacêutica (ZANPHORLIN et al., 2010).

3.7 Efeito da temperatura na atividade e estabilidade da protease livre e imobilizada

Os resultados do efeito da temperatura na atividade e estabilidade da enzima livre e imobilizada podem ser observados na Figura 6C e 6D, respectivamente. O efeito da temperatura na atividade foi estudado variando de 20 a 80° C. Enquanto a enzima livre apresentou atividade ótima a 40°C, a enzima imobilizada apresentou atividade ótima a 30°C. Além disso, a enzima imobilizada apresentou melhor atividade relativa do que a enzima livre em temperaturas acima de 70°C. A

temperatura é um parâmetro importante que influencia na atividade enzimática, destacando que a maioria das reações químicas se processa em uma velocidade maior à medida que a temperatura aumenta (GOMES, et al., 2006). No presente estudo, observa-se que a temperatura ótima da enzima livre foi maior que da enzima imobilizada, porém em todas as temperaturas testadas observa-se que a enzima imobilizada apresentou atividade relativa superior a 70%, enquanto a enzima livre apresentou perda considerável da atividade relativa em temperaturas acima de 70°C.

A protease livre e imobilizada produzida por *Aspergillus sclerotiorum* URM 5792 foi estável em todos os valores de temperatura testados (20°C - 80°C), apresentando mais 60% e 70%, respectivamente, de atividade residual por até 180min. Em ambos os extratos houve perda significativa da atividade apenas na temperatura de 60°C por 180min.

A influência da temperatura na atividade enzimática de uma protease produzida por *Aspergillus foetidus* foi testada nas faixas entre 30 e 75°C, a protease mostrou-se ativa na faixa de 30 a 65°C, apresentando temperatura ótima de 55°C (SOUZA et al., 2015). Em estudo realizado por Araújo, Souza e Freitas (2020) foi observado o efeito da temperatura na atividade proteolítica de *Aspergillus oryzae* NRRL 1911, demonstrou atividade em todas as temperaturas testadas (30° a 100°C) e apresentou temperatura ótima de 55°C.

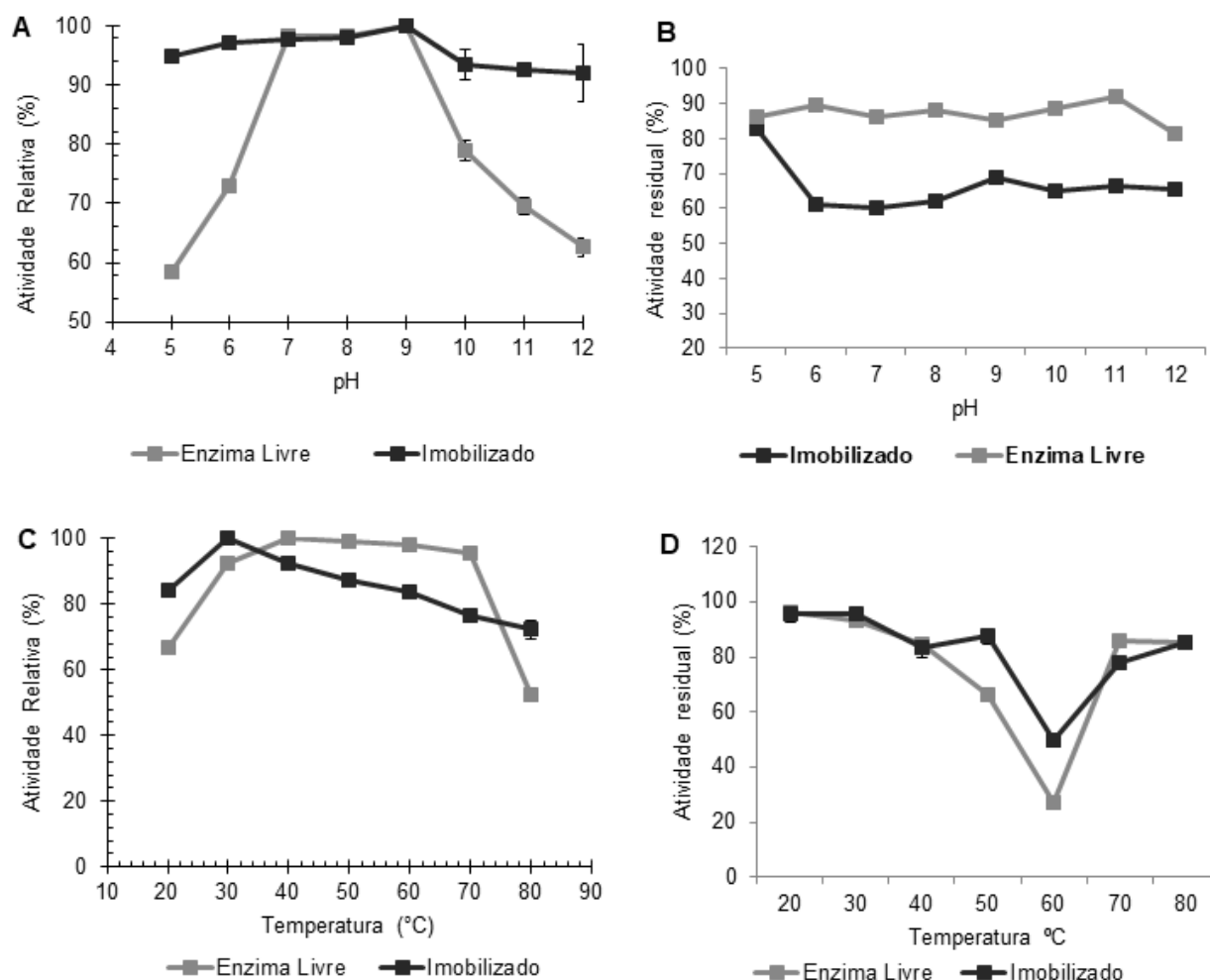


Figura 6. Curvas pH e temperatura ótima e estabilidade da protease livre e imobilizada produzida por *Aspergillus sclerotiorum* URM 5792. (A) pH ótimo da enzima livre e imobilizada, (B) Estabilidade a diferentes pH da enzima livre e imobilizada no tempo de 24h, (C) Temperatura ótima da enzima livre e imobilizada, (D) Estabilidade a diferentes temperaturas da enzima livre e imobilizada no tempo de 180 min.

3.8 Efeito dos íons metálicos na atividade proteolítica

Influências de soluções iônicas foram avaliadas em concentrações de 5 mM (Tabela 4). A ação de alguns íons metálicos pode influenciar a atividade das enzimas. A adição de alguns íons metálicos pode aumentar a atividade das enzimas. Esses metais atuam protegendo as enzimas contra a desnaturação térmica, apresentando papel vital na manutenção de sua atividade catalítica (NASCIMENTO,

2005). De acordo com Pimenta (2020), a interação entre as enzimas hidrolíticas produzidas por fungos e íons metálicos presentes na natureza, pode interferir na atividade das enzimas. Estes íons podem atuar como eletrófilos, podendo interferir também na relação enzima-substrato.

A atividade enzimática dada enzima livre e imobilizada não teve efeito relevante na presença dos íons testados. Ambos os extratos foram ligeiramente inibidos pelo íon Cu^{2+} , apresentando 14,29% de inibição na enzima livre e 12,47% na imobilizada. Os íons de cobre inibem a atividade da enzima, esses cátions podem promover a redução da estabilidade enzimática por desestabilizar as cargas negativas, resultando numa repulsão, que pode acarretar perda da atividade da enzima (GIOVANINI, 2014). Além do Cu^{2+} , o Mg^{2+} 9,98% também apresentou uma leve inibição a enzima imobilizada.

Proteases produzidas por *Aspergillus terreus*₃₁ e *Aspergillus terreus*_{CM6} também sofreram inibição em sua atividade quando na presença de íons de cobre, com retenção de atividade de 72,01% e 34,90%, respectivamente (LIMA, 2016). Assim como, proteases de *A. parasiticus* também sofreram redução em sua atividade proteolítica na presença de íons Cu^{2+} (5mM) (ANITHA e PALANIVELU, 2013).

3.9 Efeito dos inibidores na atividade proteolítica

O efeito de inibidores na atividade de proteases de *Aspergillus sclerotiorum* URM5792 estão demonstrados na Tabela 4. Nos materiais analisados, enzima livre e imobilizada, foram observadas sensibilidade ao inibidor PMSF, tanto na enzima livre quanto na imobilizada o que indica a presença de uma serino-protease. Entretanto, não houve retenção significativa da atividade enzimática na presença dos outros inibidores analisados, mas que não descarta a presença de sítios ativos com resíduos de metalo-proteases e cisteíno-proteases na enzima.

Na literatura científica, há poucos estudos reportando a presença de cisteino-proteases em extratos de fungos filamentosos. Contudo, a produção de serino-proteases por fungos tem sido reportada em vários estudos (MARTIM et al., 2017). Em 2014, Papagianni e Sergelidis observaram inibição total da atividade enzimática de *Penicillium nalgiovense* PNA9 (100%) pelo PMSF, identificando a enzima como uma serino-protease. Forte inibição pelo inibidor de serino-protease PMSF foi

relatada por (TUNGA; SHRIVASTAVA; BANERJEE, 2003) e Barbosa et al., (2020) verificaram que o inibidor de serino-protease, PMSF causou redução de 49,04% na atividade enzimática de *Pleurotus ostreatoroseus*.

Tabela 4. Efeitos de íons metálicos e inibidores na atividade proteolítica de *Aspergillus sclerotiorum* URM 5792

Íons Metálicos (5mM)		
Atividade Residual (%)		
	Enzima livre	Enzima Imobilizada
Controle	100	100
ZnSO ₄	92,69	94,08
KCl	99,05	94,91
NaCl	100,70	98,61
ZnCl ₂	93,08	94,73
CaCl ₂	96,77	95,28
MgSO ₄	101,64	90,01
CuSO ₄	85,70	87,52
FeSO ₄	94,02	96,39
FeCl ₃	94,81	93,16
Inibidores (5mM)		
Controle	100,0	100
EDTA	89,2	99,82
Ácido - Iodoacético	89,0	94,39
β-mercaptoetanol	86,8	91,99
PMSF	54,6	59,96

3.10 Efeito dos surfactantes na atividade proteolítica

Os efeitos dos surfactantes podem ser observados na Tabela 5. Os surfactantes não iônicos Tween-20, Tween-80 e Triton X – 100 (1% e 2% v/v), não exerceram efeito significativo na atividade enzimática, no entanto o surfactante aniônico SDS inibiu em aproximadamente 50% da atividade proteásica, tanto da enzima livre quanto na imobilizada, em ambas as concentrações utilizadas.

Desta forma, a protease investigada apresenta elevada atividade na presença de surfactantes, apresentando potencial para várias aplicações biotecnológicas, em especial na indústria de detergentes. Em estudos realizados por Papagianni e Sergelidis (2014), foram observados elevada estabilidade da atividade enzimática na presença de Tween-80 e Triton X-100 (5%, v/v) e inibição de 75% na presença do SDS (0,5%, p/v).

Tabela 5. Efeitos de surfactantes na atividade proteolítica de *Aspergillus sclerotiorum* URM 5792

	Surfactantes			
	Atividade Residual (%)			
	Enzima livre		Enzima imobilizada	
	1%	2%	1%	2%
Controle	100	100	100	100
Tween - 20	98,95	98,21	85,95	85,95
Tween - 80	95,68	95,53	94,90	87,80
Triton X - 100	92,47	88,97	86,80	86,11
SDS	51,52	65,37	58,25	45,29

4. CONCLUSÃO

A linhagem utilizada *Aspergillus sclerotiorum* URM5792 é uma fonte para produção de protease colagenolítica por fermentação em estado sólido, mostrando produção mais eficiente quando a umidade foi de 60% em farelo de trigo. No presente trabalho uma nova serino-protease alcalina imobilizada e caracterizada e apresentou 86,25% de rendimento na imobilização em nanopartículas magnéticas revestidas com quitosana. A imobilização possibilita o reuso por 12 ciclos consecutivos, e manteve 75% de atividade por até 28 dias de armazenamento. A atividade enzimática em diferentes valores de pH e temperatura demonstra uma versatilidade para aplicações industriais. Esses resultados indicam que *Aspergillus sclerotiorum* URM 5792 é uma fonte potencial para a produção de protease colagenolítica com possíveis aplicações biotecnológicas em diversos setores da indústria, na produção de detergentes, no setor têxtil e na indústria farmacêutica, no tratamento e regeneração de tecidos em necrose.

4. REFERÊNCIAS

- ANITHA , T. S.; PALANIVELU, P. Purification and characterization of na extracellular keratinolytic protease from a new isolate of *Aspergillus parasiticus*. *Protein Expression and Purification*, v. 88, n. 2, p. 214-222, 2013.
- ARAÚJO, F. S.; SOUZA, I. H. S.; FREITAS, A. C. Estudo das condições de Ph e temperatura para máxima atividade de protease de *Aspergillus oryzae* NRRL 1911. *Brazilian Journal Development*. v. 6, n. 1, p. 3077-3091, 2020.
- BAKKER, C. M.C.N. AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO E APLICAÇÃO DE ENZIMAS UTILIZANDO RESÍDUO FARELO DE TRIGO COMO SUBSTRATO POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO. Universidade Federal do rio Grande do Norte. 2017
- BARBOSA, M. A. et al. Chitosan. In: **Comprehensive Biomaterials II**. v. 2, n. 13, p. 279-305, 2017.
- BORLIDO, L. et al. Magnetic separations in biotechnology. **Biotechnology Advances**, v. 31, n. 8, p. 1374–1385, 2013.
- BRADFORD, M. . A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248–254, 1976.
- CARDOSO, K. B. B. et al. Collagenase production by *Aspergillus sclerotiorum* URM-5792 using coffee waste as a medium for solid-state fermentation. **Research trends**, v. 10, p. 27–31, 2019.
- CHAGAS, P. M. B. et al. Immobilized soybean hull peroxidase for the oxidation of phenolic compounds in coffee processing wastewater. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 81, p. 568–575, 2015.
- CHEN, Z. et al. Preparation and characterization of a novel nanocomposite with double enzymes immobilized on magnetic Fe₃O₄ -chitosan-sodium tripolyphosphate. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 169, p. 280–288, 2018.

COSTA, V. M. et al. Nanobiocatalytic systems based on lipase-Fe₃O₄ and conventional systems for isoniazid synthesis: A comparative study. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 33, n. 3, p. 661–673, 2016.

DA SILVA, O. S. et al. Novel Protease from *Aspergillus tamaritii* URM4634: Production and Characterization Using Inexpensive Agroindustrial Substrates by Solid-State Fermentation. **Advances in Enzyme Research**, v. 04, n. 04, p. 125–143, 2016.

DALLASTRA, E. D. G.; RAMALHO, E. X.; AGUDELO, L. M. G. VALORIZAÇÃO DE RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS PARA A PRODUÇÃO DO FUNGO ENTOMOPATOGÊNICO METARHIZIUM ANISOPLIAE POR PROCESSOS DE FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO. In: **Impactos das Tecnologias na Engenharia Química 3**. p. 29–39, 2019.

DEL R. ROCHA-PIZAÑA, M. et al. Production of a potential collagenolytic protease by nejayote fermentation with *Aspergillus oryzae*. **International journal food science thecnology**, v. 55, n. 10, p. 3289–3296, 2020.

DUARTE NETO, J. M. W. et al. Optimization of *Penicillium aurantiogriseum* protease immobilization on magnetic nanoparticles for antioxidant peptides' obtainment. **Preparative Biochemistry and Biotechnology**, v. 47, n. 7, p. 644–654, 2017.

GIOVANINI, G. T. Produção, liofilização, purificação e determinação de especificidade da peptidase isolada do fungo *Scopulariopsis koningii*. UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO, 2014.

GOMES, F. M. et al. Assentement of catalytic properties in aqueous and organic media of lipase from *Candida rugosa* immobilized on wood cellulignin activated with carbonyldiimidazole. **Química Nova**, v. 2, n. 4, 2006.

INDRATININGSIH et al. Identification of *Aspergillus* species Using Morphological Characteristic and The Effect of Temperature on The Protease Activity. **Jurnal Internasional Biokimia dan Bioteknologi**, v. 2, n. 3, p. 298–301, 2013.

LEIGHTON, T. J. et al. The relationship of serine protease activity to RNA polymerase modification and sporulation in *Bacillus subtilis*. **Journal of Molecular Biology**, v. 76, n. 1, p. 103–122, 1973.

LIMA, L. A. et al. Protease with collagenolytic activity produced by *Bacillus* sp . DPUA 1728 from Amazonian soil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 46, n. 4, p. 1217–1223, 2015.

LIMA, E. E. Produção e caracterização bioquímica de proteases produzidas por fungos filamentosos e aplicação biotecnológica. UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL, 2016.

MAGALHÃES, A. A. da S. et al. Produção e caracterização de enzimas proteolíticas de *Lentinus crinitus* (L .) Fr . 1825 DPUA 1693 do bioma amazônico (Polyporaceae) Production and characterization of proteolytic enzymes of *Lentinus crinitus* (L .) Fr . 1825 DPUA 1693 from the Amazonia. **Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi**, v. 14, n. 3, p. 453–461, 2019.

MARTIM, S. R. et al. Proteases ácidas de cogumelo comestível da Amazônia para aplicabilidade industrial Acid proteases from Amazonian edible mushroom for industrial applications. **Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi. Ciências Naturais**, v. 12, n. 3, p. 353–362, 2017.

NASCIMENTO, W. C. A. DO. **ESTUDOS SOBRE A SECREÇÃO DE PROTEASES POR *Bacillus* sp. SMIA-2 E SUA COMPATIBILIDADE COM DETERGENTES COMERCIAIS**. 2005. UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE, 2005.

NOURI, M.; KHODAIYAN, F. Green synthesis of chitosan magnetic nanoparticles and their application with poly- aldehyde kefiran cross-linker to immobilize pectinase enzyme. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, p. 101681, 2020.

OLIVEIRA, R. L.; GOMES, M. H. G.; PORTO, T. S. DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS CINÉTICOS DA PROTEASE DE *Aspergillus niger* URM 5741. **REVISTA BRASILEIRA DE AGROTECNOLOGIA**, v. 5, n. 1, p. 94–98, 2015.

PAPAGIANNI, M.; SERGELIDIS, D. Purification and biochemical characterization of a novel alkaline protease produced by *Penicillium nalgiovense*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 172, n. 8, p. 3926–3938, 2014.

PIMENTA, L. S. CARACTERIZAÇÃO DE MANANASE PRODUZIDA POR *Aspergillus tamarii*. Universidade de Brasília. 2020

RAZZAQ, A. et al. Microbial Proteases Applications. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 7, n. 110, p. 1–20, 2019.

REIS, D. F. Imobilização de protease de *Bacillus sp.*P45 em diferentes suportes. UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE. 2016

RICARDO CHAVIRA JR.; THOMAS J. BURNETT; JAMES H. HAGEMAN. Assaying Proteinases with Azocoll. **Analytical Biochemistry**, v. 136, p. 446–450, 1983.

RIGO, D. et al. Microbiological Production of Enzymes: a Review. **Brazilian Journal of Development**, v.7, n.1, p.9232-9254, 2021.

ROCHA, F. T. D. B. **Produção e purificação de protease obtida do fungo filamentoso *Aspergillus sydowii* por fermentação em estado sólido utilizando resíduo de café como substrato.** 2018. Universidade Federal Rural de Pernambuco, 2018.

SIQUEIRA, A. J. S. et al. Determinação do Km e V Max: Revisão e Uma Nova Proposta. **Ciência em Movimento - Biociências e Saúde**, v. 13, n. 27, p. 47–52, 2011.

SOUZA, P. M. De et al. A biotechnology perspective of fungal proteases. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 46, n. 2, p. 337–346, 2015.

SOUZA, L. T. A. et al. IMOBILIZAÇÃO ENZIMÁTICA: PRINCÍPIOS FUNDAMENTAIS E TIPOS DE SUPORTE. **Biociência Aplicada à Agro&Indústria**, n. 15, p. 529–568, 2017a.

THAKUR, S. A.; NEMADE, S. N.; SHARANAPPA, A. Solid State Fermentation of Overheated Soybean Meal (Waste) For Production of Protease Using *Aspergillus oryzae*. **International Journal of Innovative Research in Science, Engineering and Technology**, v. 4, n. 1, p. 18456–18461, 2015.

TUNGA, R.; SHRIVASTAVA, B.; BANERJEE, R. Purification and characterization of a protease from solid state cultures of *Aspergillus parasiticus*. **Process Biochemistry**, v. 38, n. 11, p. 1553–1558, 2003.

WANDERLEY, M. C. de A. et al. Collagenolytic enzymes produced by fungi: a systematic review. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 48, n. 1, p. 13–24, 2017.

ZANPHORLIN, L. M. et al. Production , Partial Characterization , and Immobilization in Alginate Beads of an Alkaline Protease from a New Thermophilic Fungus *Myceliophthora* sp . **The Journal of Microbiology**, v. 48, n. 3, p. 331–336, 2010.

ANEXO 1:

Revestimentos utilizados em nanopartículas magnéticas para imobilização de enzimas: Uma Revisão

Coatings used in magnetic nanoparticles for enzyme immobilization: a revision

Muniquê Cristiane Tavares Santos Silva, Lígia Maria Gonçalves Fernandes, Ana Lúcia Figueiredo Porto, Márcia Nieves Carneiro da Cunha, Tatiana Souza Porto

Este capítulo de livro foi publicado em:

Ciência, Tecnologia e Inovação: do campo à mesa



CAPÍTULO 44: REVESTIMENTOS UTILIZADOS EM NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS PARA IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS: UMA REVISÃO

CHAPTER 44: COATINGS USED IN MAGNETIC NANOPARTICLES FOR ENZYME IMMOBILIZATION: A REVISION

MunIQUE Cristiane Tavares Santos Silva¹; Lígia Maria Gonçalves Fernandes²; Ana Lúcia Figueiredo Porto³; Márcia Nieves Carneiro da Cunha⁴; Tatiana Souza Porto⁵

Resumo

Enzimas imobilizadas em nanopartículas magnéticas (NPMs) possuem ampla aplicabilidade em processos catalíticos industriais, devido a vantagens como: aumento da produtividade e da estabilidade operacional, facilidade de manuseio e separação, além da possibilidade de reutilização do biocatalizador. Entretanto, a imobilização direta de enzimas na superfície dessas partículas não é recomendada, em razão de sua fraca dispersibilidade aquosa e alta tendência a oxidação. Visando contornar este problema, as NPMs são geralmente revestidas com materiais inertes e impermeáveis. Desta forma, este trabalho teve como objetivo realizar uma breve busca na literatura sobre os materiais comumente utilizados para revestimento de nanopartículas magnéticas. A escolha adequada da natureza e do tipo de material utilizado possibilita o aprimoramento no processo de imobilização, além de aumentar a estabilidade e eficiência catalítica da enzima.

Palavras-Chave: imobilização enzimática, nanopartículas magnéticas, revestimento.

Abstract

Enzymes immobilized in magnetic nanoparticles (MNPs) have wide applicability in industrial catalytic processes, due to advantages such as: increased productivity and operational stability, ease of handling and separation, in addition to the possibility of biocatalyst reusing. However, direct immobilization of enzymes on the surface of these particles is not recommended, due to their poor aqueous dispersibility and high tendency to oxidation. To circumvent this problem, MNPs are generally coated with inert and impermeable materials. Thus, this work aimed to conduct a brief search in the literature on the materials commonly used for coating magnetic nanoparticles. The appropriate choice of the nature and type of material used makes it possible to improve the immobilization process, in addition to increasing stability and catalytic efficiency.

Keywords: enzymatic immobilization, magnetic nanoparticles, coating.

¹ Programa de Pós Graduação em Biociência Animal, Universidade Federal Rural de Pernambuco, muniquepc@gmail.com

² Programa de Pós Graduação em Biociência Animal, Universidade Federal Rural de Pernambuco, profmgf@yahoo.com.br

³ Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Universidade Federal Rural de Pernambuco, analuporto@yahoo.com.br

⁴ Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Universidade Federal Rural de Pernambuco, marcianieves@yahoo.com.br

⁵ Doutora em Tecnologia Bioquímica-Farmacêutica, Universidade Federal do Agreste de Pernambuco, tatiana.porto@ufape.edu.br

Introdução

Enzimas são biocatalizadores altamente específicos, que podem ter seu uso maximizado e melhorado através de sua imobilização. Este processo pode permitir à enzima se tornar mais estável e resistente a condições severas, como grandes intervalos de pH e temperatura, e também pode preservar atividade enzimática por de vários ciclos. A imobilização enzimática é uma alternativa à aplicação eficiente destes biocatalisadores nas indústrias alimentícia, química e farmacêutica. Para que o uso de enzimas imobilizadas seja economicamente viável, deve-se considerar o tipo de suporte e o método de imobilização que será empregado, visto que este irá influenciar na atividade enzimática e na posterior reutilização desses biocatalizadores (TOMBÁ CZ et al., 2015).

Uma das grandes questões do processo de imobilização enzimática é a escolha do suporte, o uso de um suporte adequado é essencial para definir o tipo de imobilização a ser realizado, uma vez que o material utilizado poderá afetar significativamente as propriedades da enzima imobilizada. Os suportes podem ser orgânicos ou inorgânicos e devem ser inertes, estáveis, insolúveis no meio de reação e resistentes às forças mecânicas (GENNARI et al., 2020). O uso de suportes com núcleo magnético diminui a necessidade de centrifugação, a indesejável diluição da amostra e perdas do suporte durante as lavagens, eventos que muitas vezes complicam o uso de reatores de enzimas não-magnéticas. As separações magnéticas são relativamente rápidas, fáceis e requerem aparelhagem simples. Portanto, técnicas de separação magnética têm atualmente encontrado muitas aplicações em áreas diferentes das ciências biológicas, especialmente em escala laboratorial (SEENUVASAN, 2020)

Nanopartículas magnéticas possuem elementos magnéticos que podem ser manipulados por um campo externo, apresentam tamanhos que variam de 1 à 100 nm, tem superfície hidrofílica e alta razão superfície/volume, podem estar em estado superparamagnético, entre outras características físicas e químicas que são fortemente influenciadas pelo seu tamanho, morfologia e estrutura cristalina (BEDÊ, 2010).

Entretanto, nanopartículas magnéticas apresentam certas limitações práticas quando utilizadas em aplicações biológicas e farmacológicas. Dentre esses empecilhos, destacam-se a tendência de se aglomerarem a fim de minimizar a energia livre superficial; baixas estabilidade e dispersividade em determinados solventes (em especial, na água); alta atividade química; facilidade em ser oxidada em ar (principalmente a magnetita) e, conseqüente perda de propriedades magnéticas; absorção pelo corpo; e biodegradação em meio biológico, ocasionando perda de suas propriedades originais (WU, HE e JIANG, 2008). Dessa forma, proporcionar um

recobrimento apropriado dessas partículas mostra-se como uma boa alternativa para amenizar e/ou eliminar essas barreiras, e proporcionar maior eficiência de imobilização enzimática. Diante do exposto, este trabalho objetivou realizar uma busca bibliográfica a respeito dos diversos revestimentos utilizados em nanopartículas magnéticas, avaliando a eficiência deste revestimento na imobilização, na estabilidade e na capacidade de reutilização da enzima imobilizada.

Desenvolvimento

Enzimas

Micro-organismos são fontes atrativas para obtenção de enzimas de uso industrial, pois apresentam grande disponibilidade, taxa de crescimento rápido e fácil manipulação genética, podendo ser cultivados em grandes quantidades sob condições controladas, em meios cultivo de baixo custo e elevada produtividade. Acrescenta-se ainda a vantagem de a produção não estar condicionada às questões sazonais e geográficas (BON et al., 2009). Aplicações de enzimas microbianas em indústrias alimentícias, farmacêuticas, têxteis, papel, couro e outras são numerosas e crescem rapidamente em relação aos métodos convencionais, devido a menos danos ao meio ambiente, maior eficiência e produtos de maior qualidade (SINGH et al., 2016).

Espera-se que o mercado global de enzimas tenha no período de 2019 a 2026 uma taxa anual de crescimento de 6,75%, passando de U\$ 8,8 bilhões em 2018 para U\$ 13,79 bilhões até 2026. Este crescimento acelerado de aproximadamente 68% no período descrito é dado devido ao uso extensivo das enzimas em diversos setores da indústria, tais como, processamento de alimentos, papel, biocombustíveis, detergentes biológicos, setores de biologia molecular, entre outros (FIORMARKETS, 2019).

Na indústria farmacêutica e de diagnóstico, as aplicações enzimáticas estão crescendo rapidamente. Aplicações relacionadas com o debridamento de feridas por enzimas proteolíticas com atividade colagenolítica e o bloqueio de coágulos pelas enzimas fibrinolíticas são proeminentes (SINGH et al., 2016). Um exemplo disto é a protease fibrinolítica produzida por *Mucor subtilissimus* UCP1262 um promissor agente antitrombótico (NASCIMENTO et al., 2016).

O uso de enzimas ou micro-organismos em preparações alimentícias é um processo antigo. A biotecnologia de alimentos, considerada como aplicações de processos biotecnológicos na produção de alimentos, começou antes de 6000 a.C. Fermentar uvas ou fabricar cerveja são exemplos dessa biotecnologia alimentar inicial, apesar de serem rudimentares, a aplicação de enzimas na tecnologia de alimentos já foi estabelecida nesses processos (TAVANO et al., 2018). Com o avanço da tecnologia,

novas enzimas foram desenvolvidas e novas áreas de aplicação ainda estão sendo exploradas.

As enzimas são utilizadas em praticamente todos os segmentos da indústria de alimentos (panificação, laticíneos, bebidas). Um exemplo disto são as pectinases ácidas que podem ser usadas na extração, clarificação e remoção de pectina dos sucos de frutas, a maceração de vegetais para produzir pastas purês e vinificação. Quase todas as preparações comerciais de pectinases são produzidas por espécies fúngicas, pertencentes principalmente ao gênero *Aspergillus*. Entre eles, *Aspergillus aculeatus* destaca-se na produção industrial de enzimas pectinolíticas, visto que a preparação comercial Pectinex® Ultra SPL, obtido a partir deste micro-organismo, foi empregado com sucesso para clarificar e reduzir a viscosidade de sucos de frutas, como maçã, carambola e pitaya vermelha (OLIVEIRA et al., 2018).

Na indústria têxtil e do couro, as enzimas são utilizadas em diferentes etapas do processo de produção industrial. Na indústria têxtil as enzimas vêm sendo utilizadas no desenvolvimento de processos visando minimizar a geração de resíduos e estratégias para melhorar a qualidade do produto final (CHOI et al., 2015). As principais classes de enzimas envolvidas nos processos de pré-tratamento e acabamento do algodão são as hidrolases e as oxidorreduções. O grupo das hidrolases incluem amilase, celulase, quitinase, protease, pectinase e lipase, que estão envolvidas no biopolimento e biossouramento de tecidos, antifelting de lã, amaciamento de algodão, acabamento de jeans, acabamento de lã e modificação de fibras sintéticas. As oxidorreduções incluem catalase, lacase, peroxidase e ligninase, que estão envolvidas no bio-branqueamento, na finalização do branqueamento, na descoloração do corante, no tecido e no acabamento da lã (SINGH et al., 2018).

As enzimas proteolíticas alcalinas são preferíveis aos sintéticos convencionais devido à sua especificidade de substrato, propriedades de limpeza, melhor desempenho em temperaturas de lavagem e atenuação da poluição ambiental. Essas características garantem alta aplicabilidade nas indústrias de detergentes como agente de limpeza e na indústria de cosméticos como sabonetes enzimáticos (FERNANDES et al., 2020).

Imobilização de enzimas

A utilização de enzimas em processos industriais requer o desenvolvimento de técnicas que possibilitem a sua recuperação e reutilização, visando tornar o processo economicamente viável, o que pode ser alcançado a partir da utilização de técnicas de imobilização. A imobilização enzimática favorece a estabilidade da enzima uma vez que o processo pode alterar suas propriedades estruturais, produzindo biocatalisadores com

elevada atividade, especificidade e estabilidade, sendo por isso considerada, nos últimos anos, a técnica mais promissora para tornar competitiva a aplicação de enzimas em larga escala (SOUZA et al., 2017).

Imobilização é um termo genérico empregado para descrever a retenção de uma biomolécula no interior de um reator ou de um sistema analítico (CARDOZO et al., 2009). A imobilização de uma enzima significa combinar a seletividade, a estabilidade e a cinética dessa enzima com as propriedades físicas e químicas do transportador em uma formulação especializada que tem como papel principal maximizar a estabilidade física e enzimática do biocatalisador (BASSO E SERBAN, 2019). Diversas técnicas e protocolos já foram descritos para imobilização de enzimas. A escolha do método e do suporte a ser empregado dependerá principalmente das características físico-químicas da enzima e das condições de uso nas quais a enzima imobilizada será submetida, É igualmente importante avaliar o tempo e os custos necessários para se viabilizar o método de imobilização escolhido, uma vez que tais parâmetros irão se refletir no processo e, portanto, nos custos do produto final (FERNANDES, LIMA e LOPES, 2010).

Bassa e Serban (2019) pontuaram as principais vantagens e desvantagens da utilização de enzimas imobilizadas em processos industriais. A imobilização de biocatalisadores oferece vantagens como a facilidade para reutilização do biocatalizador e custos reduzidos em etapas de “*downstream*”, entretanto, esses processos apresentam algumas limitações, visto que, há uma diminuição na atividade enzimática do imobilizado em comparação a enzima livre, além de custos adicionais referentes as etapas de imobilização, como apresentado no Quadro 1.

Quadro 1. Vantagens e desvantagens de enzimas imobilizadas em processos industriais.

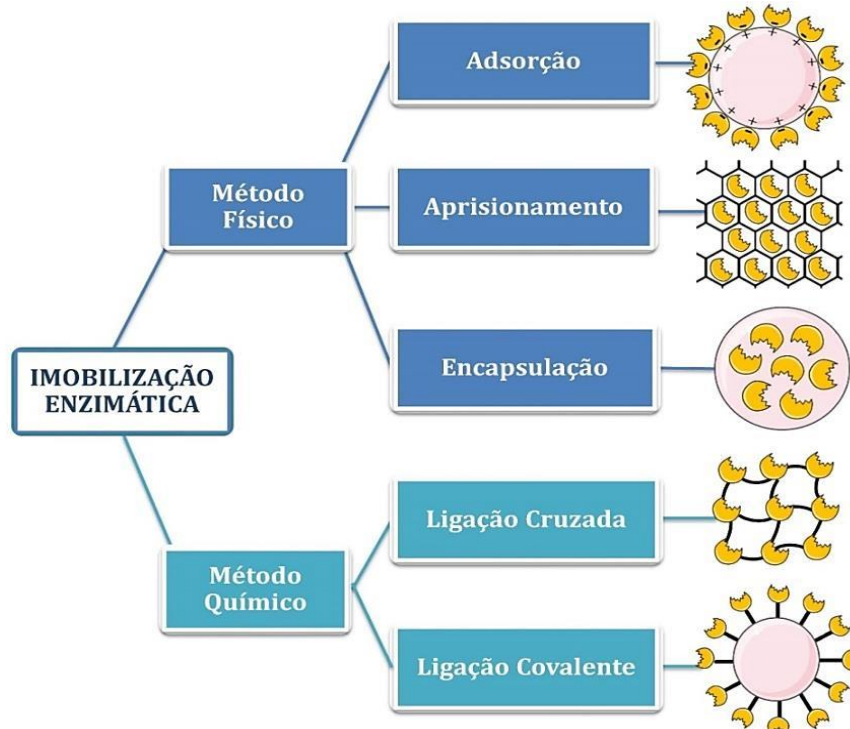
VANTAGENS	DESVANTAGENS
<ul style="list-style-type: none"> ▪ Fácil separação do biocatalisador; ▪ Custos reduzidos de processamento “<i>downstream</i>”; ▪ Uso múltiplo de biocatalisador (reciclagem); ▪ Melhor estabilidade, especialmente em relação a solventes orgânicos e temperaturas mais altas; ▪ Uso de reatores de leito fixo ou batelada sem necessidade de membrana para isolar enzima do produto; ▪ É possível co-imobilizar com outras enzimas. 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Menor atividade enzimática em comparação com a enzima nativa; ▪ Custos adicionais para transportadoras e imobilização; ▪ Taxas de reação mais baixas em comparação com enzimas nativas; ▪ Sujeito a incrustação; ▪ Eliminação de enzima imobilizada exaurida (incineração).

Fonte: Basso e Serban (2019)

As técnicas de imobilização de enzimas podem ser divididas em métodos químicos e físicos (Figura 1). Os métodos químicos envolvem a formação de ligações covalentes obtidas pela ligação de éter, tio-éter, amida ou carbamato entre a enzima e o suporte ou ainda através de ligações cruzadas entre a enzima e um agente reticulante. Nos métodos físicos, a enzima quando se liga por adsorção, formando ligações mais fracas com o suporte de imobilização (ligações de hidrogênio, ligação por afinidade, forças de Van der Waals, interações hidrofóbicas e ligação iônica), ou ainda podem ser aprisionadas ou encapsuladas (FURLANI et al., 2020). As interações enzima-suporte na imobilização podem ser vistas na Figura 1.

O uso de nanopartículas magnéticas como suporte sólido atribui ao biocatalisador um dos requisitos essenciais de fácil recuperação por simples aplicação de um campo magnético externo, reduzindo os custos de energia e tempo das etapas de centrifugação. Além do que nanomateriais apresentam uma alta relação superfície/volume facilitando assim a transferência de massa (PEREIRA et al., 2015).

Figura 1. Classificação e representação de diferentes técnicas de imobilização de enzimas.



Fonte: Adaptado de Furlani et al., 2020; Souza et al., 2017.

Imobilização enzimática em Nanopartículas magnéticas (NPMs)

Nanopartículas magnéticas (NPMs) podem ser preparadas a partir de materiais de magnetização altamente saturados, tais como os metais de transição Ferro, Cobalto, Níquel e os óxidos metálicos Fe_3O_4 , $\gamma-Fe_2O_3$, de acordo com vários métodos diferentes. Metais puros, como nanopartículas de ferro, possuem a maior magnetização, entretanto, também possuem alta toxicidade e são propensos à oxidação. Óxidos de metal mais estáveis e biocompatíveis, como nanopartículas são os de óxido de ferro superparamagnético, sendo preferidos, apesar de sua menor magnetização (QUAN et al., 2020). NPMs à base de óxido de ferro são mais comumente utilizadas e podem ser sintetizadas a partir de uma variedade de métodos químicos como síntese por decomposição térmica, reações hidrotermais, microemulsão e coprecipitação (FRANCISQUINI, SCHOENMAKER e SOUZA, 2010).

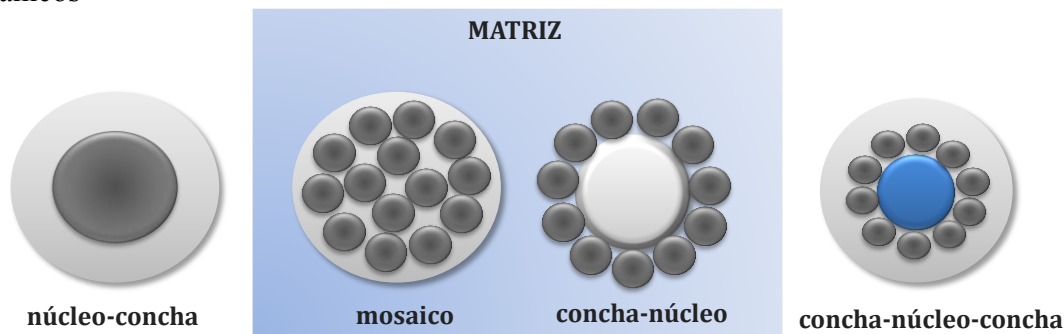
NPMs possuem propriedades intrínsecas interessantes para aplicações biotecnológicas, tais como: tamanho reduzido, área de superfície alta, resistência a altas temperaturas, altas interações enzimas-substrato e alta reatividade química atraindo a atenção dos cientistas. Além do que, devido à propriedade do superparamagnetismo é possível a recuperação do biocatalisador apenas por aplicação de um campo magnético ocasionando baixo estresse mecânico as enzimas (HU et al., 2009; COSTA et al., 2016).

Embora as nanopartículas magnéticas possuam alta biocompatibilidade, mesmo sem modificação de superfície (QUAN et al., 2020). Comumente a superfície das nanopartículas é modificada visando facilitar o processo de imobilização enzimática, e contornar dificuldades como a distribuição não uniforme do tamanho da partícula e a fraca dispersibilidade aquosa, visto que, comportamentos restritos de nanomateriais em diferentes solventes limitam suas aplicações e, portanto, a modificação da superfície é uma estratégia importante que ajusta as propriedades dos nanomateriais para estender suas aplicações. A modificação da superfície pode alterar a propriedade existente ou pode introduzir propriedades completamente novas a partícula (SEENUVASAN et al., 2020).

A superfície das nanoestruturas pode ser modificada com materiais orgânicos (por exemplo, ácido láurico) e inorgânicos (por exemplo, SiO₂) com o intuito de produzir partículas funcionalizadas (por exemplo, grupo amino) para imobilização enzimática (COSTA et al., 2016). Segundo Liu et al. (2020), a funcionalização da superfície das NPMs por compostos orgânicos é um método eficaz para aumentar a estabilidade das partículas durante o armazenamento e utilização. Além disso, as nanopartículas podem ser modificadas com certas biomoléculas para aumentar sua biocompatibilidade e melhor aplicação “*in vivo*”, tornando-as mais específicas e expandindo o escopo de suas aplicações.

As estruturas das NPMs revestidas com compostos orgânicos podem ser divididas em núcleo-concha, matriz e concha-núcleo-concha (Figura 2), sendo formada por duas partes: um núcleo, geralmente formado por qualquer tipo de nanopartícula de óxido ferromagnético, classificado como magnetita, e uma casca/concha que pode ser um polímero, biopolímero ou biomolécula. As partículas modificadas por compostos orgânicos não só possuem as propriedades magnéticas básicas das NPMs, mas também apresentam boa biocompatibilidade e biodegradabilidade. Dentre os revestimentos inorgânicos a sílica é o material mais utilizado, devido a suas características inertes, com alta biocompatibilidade e baixa toxicidade, a sílica é um revestimento funcional para NPMs ideal para utilização no campo médico, pois permite a formação várias ligações de reticulação, além de, formar uma camada de proteção externa inerte para proteger as nanopartículas magnéticas internas (LIU et al., 2020).

Figura 2. Estrutura principal das nanopartículas magnéticas modificadas por materiais orgânicos



Fonte: Adaptado de Liu et al., 2020

Discussão

A metodologia utilizada para a realização deste trabalho foi uma breve revisão bibliográfica, baseada em pesquisas de artigos científicos disponíveis nos bancos de dados: Scopus (<http://www.scopus.com/>); Science Direct (<http://www.sciencedirect.com/>), ISI Web of Science (<http://apps.isiknowledge.com>) e PubMed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>), para a busca foi utilizado o seguinte termo de busca: (“*magnetic nanoparticles*”) AND (*coatings*) AND (“*enzyme immobilization*”). Todo referencial teórico citado nesse artigo é meramente qualitativo sem nenhuma pretensão quantitativa.

Após a preparação das NPMs, algumas modificações devem ser realizadas para protegê-las contra agregações, oxidação e/ou alterações das cargas superficiais, bem como, melhorar a capacidade de imobilização (DARWESH et al., 2019). A literatura traz vários estudos relacionados às NPMs recobertas com diversos materiais. Os materiais orgânicos possibilitam a preservação das características magnéticas das nanopartículas, biocompatibilidade, biodegradabilidade, além de fornecer grupos funcionais reativos (carboxila, amino, aldeído etc.) (LAURENT, et al. 2008). Exemplos desses materiais são moléculas pequenas e surfactantes, como ácido oleico, ácido cítrico, fosfanatos, aminoácidos e silanos; polímeros naturais e sintéticos, como dextran, quitosana, alginato, poli(etilenoglicol), poli(metilmacrilato); e biomoléculas, como proteínas e anticorpos. Os materiais inorgânicos também são biocompatíveis e providenciam às nanopartículas estabilização, funcionalização e antioxidação. Pode-se citar como exemplos a sílica; metais e não-metais (ouro, prata, carbono); e óxidos metálicos e sulfetos (ZnO, CaO, Al₂O₃, ZnS) (TOMBÁ CZ et al., 2015). A Tabela 1 mostra diferentes abordagens do uso de materiais para imobilização de enzimas.

Tabela 1. Tipos de revestimento em nanopartículas magnéticas para imobilização de diferentes enzimas.

^A NPMs	Revestimento Orgânico / inorgânico	Enzima	^B CR	^C AR (%)	Referências
Fe ₃ O ₄	Quitossana	Pectinase	10	70,02%	Nouri e Khodaiyan, 2020
Fe ₃ O ₄	^D CMC	NovoQ	3	>95%	Ni et al., 2020
Fe ₃ O ₄	^D CMC	Lipase	10	83,9%	Hongbo Suo et al., 2020
Fe ₃ O ₄	^E CMD	ADH	***	***	Vasić et al., 2020
Fe ₃ O ₄	^F Poli(Catechol/TEPA)	Lipase	***	***	Tang et al., 2019
Fe ₃ O ₄	^G CS-TPP	Alcalase	10	60%	Chen et al., 2018
Fe ₃ O ₄	Lectinas ConA	Glicose oxidase	8	99%	Yong et al., 2018
Fe ₃ O ₄	Alginato/quitossana	cloroperoxidase	25	25%	García-Embid et al., 2018
Fe ₃ O ₄	Quitossana	Lipase	20	83%	Mendes et al., 2011
Fe ₃ O ₄	^H CT/PDA	α-amilase	6	70%	Manthiriyappan e Lee, 2011
Fe ₃ O ₄	Sílica/epoxi	Lipase	7	79%	Afzal et al., 2020
Fe ₃ O ₄	^I PEG- triclorotriazina	Pectinase	10	55%	Kharazmi et al, 2020
Fe ₃ O ₄	^I PEG- triclorotriazina	Xilanase	9	50%	Kharazmi et al., 2020
Fe ₃ O ₄	Álcool polivinílico	Tripsina	8	56%	Sahin e Ozmen, 2020
AuM	sílica mesoporosa	Celulase	9	58%	Poorakbar et al., 2018
Fe ₃ O ₄	Sílica/naringina	α-amilase	10	50%	Defaei et al., 2018
Fe ₃ O ₄	Sílica/epoxi	L-Asparaginase	10	65%	Ulu et al., 2018
Fe ₃ O ₄	^J PAMAM	α-glicosidase	***	***	Jiang et al., 2019
Fe ₃ O ₄	Sílica	Lacase	6	75%	Fortes et al., 2017
Fe ₃ O ₄	^K PANI	Protease	5	50%	Neto et al., 2017
Fe ₃ O ₄	^L PUU	Lipase	***	***	Chiaradia et al., 2016
Fe ₃ O ₄	^M PEIP	Tripsina	21	>90%	Monteil et al., 2014
Fe ₃ O ₄	Sílica	Glicose oxidase	12	90%	Ashtari et al., 2012

^ANPMs - Nanopartículas magnéticas^BCR - Número de ciclos de reuso^CAR (%) - Atividade residual após os ciclos de reuso^DNPM-CMC–Nanopartículas magnéticas de carboximetilcelulose^ECMD – Carboximetil dextrose^FPoli (Catecol/TEPA) - Catecol/tetraetileno pentamina^GCS-TPP - Quitossana+tripolifosfato de sódio^HCT/PDA –quitina e polidopamina^IPEG - Polietilenoglicol^JPAMAM – poliamidoamina^KPANI - polianilina^LPUU - poli(ureia-uretano)^MPEIP - polietilenimina parcialmente fosfonada

*** - Dados não apresentados

Tipos de revestimentos utilizados em nanopartículas magnéticas

Quitosana

A quitosana é amplamente utilizada como suporte para a imobilização enzimática devido às suas diferentes configurações geométricas, tais como pós, flocos, hidrogéis, membranas, fibras e outros, e a presença de grupos hidroxila e aminoácidos (KUO et al., 2012). Devido à sua versatilidade, as partículas de quitosana também podem ser utilizadas como revestimento para nanopartículas magnéticas, como descrito por Mendes et al. (2011) quando utilizaram nanopartículas magnéticas de Fe_3O_4 revestidas com quitosana para a imobilização covalente de lipase de *Candida rugosa*. A lipase imobilizada apresentou melhor estabilidade operacional a maiores faixas térmicas e de pH, permanecendo estável após 13 dias de armazenamento a 25 °C com atividade residual de 83% após 20 ciclos.

NPMs revestidas com quitosana utilizando polissacarídeo de kefiran como agente de reticulação foram utilizadas na imobilização da enzima pectinase. Os resultados obtidos mostraram uma recuperação máxima da atividade da enzima pectinase imobilizada e após um mês, a atividade remanescente da enzima imobilizada foi de 60,23%. A pectinase imobilizada manteve sua atividade em 70,02% após 10 ciclos. A utilização nanopartículas magnéticas de quitosana em combinação com o reticulador poli-aldeído kefiran foi um método eficiente para imobilização de pectinases (NOURI e KHODAIYAN, 2020).

Resultados que corroboram com os apresentados por Chen et al. (2018) quando utilizaram partículas magnéticas Fe_3O_4 revestidas com quitosana e tripolifosfato de sódio (Fe_3O_4 -CS-TPP) para imobilização simultânea de alcalase e tripsina. Os NPMs de Fe_3O_4 -CS-TPP foram mais estáveis do que a enzima livre em temperaturas acima 40 °C. A atividade residual do imobilizado foi preservada em 86% após 35 dias de armazenamento e reteve mais de 60% de sua atividade inicial após dez vezes de reutilização sucessiva. Resultados que confirmam a potencialidade da quitosana como revestimento de NPMs para imobilização de diferentes enzimas.

Uma abordagem diferente foi utilizada por Manthiriyappan e Lee (2011) quando utilizaram a quitina como matriz protetora e dispersiva para a preparação de partículas magnéticas pelo processo de co-precipitação. Posteriormente as partículas de quitina magnética (MCT) foram modificadas com dopamina para ser utilizada como uma matriz de imobilização enzimática eficaz, oferecendo superfície aderente para enzimas. Os resultados obtidos pelos autores para a imobilização da α -amilase demonstraram uma taxa de hidrólise de amido comparável à da enzima livre. No entanto, as atividades relativas foram maiores do que a enzima livre em faixas mais amplas de pH e

temperatura. Além disso, α -amilase imobilizada reteve mais de 70% de sua atividade original após seis vezes de uso repetido.

Várias composições de nanopartículas de óxido de ferro revestidas com polidopamina e com uma concha polissacarídica obtidas através da combinação de quitosana e alginato foram usadas para imobilizar cloroperoxidase. A enzima foi imobilizada com sucesso com uma eficiência de aprisionamento entre 92% e 100% no caso de suportes com quitosana no interior e exterior respectivamente. Uma excelente estabilidade química foi observada no caso de um invólucro interno de alginato e um revestimento externo de quitosana, juntamente com uma excelente reutilização da enzima imobilizada, que foi reciclada para catalisar até 25 ciclos de reação consecutivos (GARCÍA-EMBED et al., 2018).

Carboximetilcelulose (NPM-CMC) e Carboximetil-dextrana (CMD)

Suo et al. (2020) sintetizaram nanopartículas magnéticas de carboximetilcelulose modificadas com líquidos iônicos e utilizaram como suporte para a imobilização enzimática. A enzima lipase foi utilizada como modelo e sua atividade específica imobilizada foi 1,43 vezes maior do que a atividade da enzima livre. Segundo os autores os compósitos desenvolvidos podem ser utilizados como excelentes suportes para imobilização de enzimas para aplicações industriais. Os resultados para testes de redutibilidade da enzima imobilizada mostraram que após 10 ciclos de reuso a enzima reteve 83,9% de sua atividade inicial. Os autores atribuem essa alta atividade ao suporte magnético que facilita a separação da enzima imobilizada, reduzindo perdas durante o processo de separação.

NPMs-CMC foram utilizadas para imobilizar a enzima pheniltransferase NovQ aplicada para a produção de vitamina K usando menadiona hidroquinol e dimetilalil difosfato (DMAPP) como substratos. Foi observado que carboximetilcelulose (CMC) e Fe_3O_4 formaram uma estrutura núcleo-concha com alta afinidade para a enzima imobilizada, sendo um suporte promissor em bioprocessos de produção de vitamina K (NI et al., 2020).

Carboximetil dextrana (CMD) foi covalentemente ligado a NPMs e a influência de diferentes concentrações nas características de nanopartículas magnéticas revestidas com CMD (CMD- NPMs) foi estudada. Os CMD3- NPMs preparados foram usados como transportadores para a imobilização da enzima álcool desidrogenase (ADH). As CMD- NPMs que foram sintetizadas, exibiram uma camada de revestimento CMD que forneceu propriedades magnéticas e estruturais adequadas e, portanto, podem ser

funcionalizados e usados na imobilização de compostos bioativos, como o ADH (VASIĆ et al., 2020).

Naringina

A naringina (4,5,7-trihidroxi flavanona-7-ramnoglicosídeo) é um flavonoide amargo presente em várias frutas cítricas. Naringina é uma biomolécula natural de baixo custo e hidrofílica, biocompatível e acessível, características que justificam seu uso na funcionalização da superfície de nanopartículas magnéticas.

A imobilização de enzimas em NPMs funcionalizados com naringina pode promover um novo microambiente vantajoso, incluindo a melhoria da estabilidade e do comportamento catalítico da enzima imobilizada. A imobilização da enzima α -amilase em NPMs revestidas de sílica e funcionalizadas com naringina via interações iônicas. Os resultados mostraram que as condições ideais para imobilização da α -amilase no nanocarreador sintetizado ocorreram em pH 6,5 e 55 °C.

Os experimentos de reutilização revelaram manutenção de alta atividade da α -amilase imobilizada mesmo após 10 ciclos de reação. A estabilidade de armazenamento da enzima imobilizada melhorou em comparação com a enzima livre, mantendo 60% de sua atividade inicial após 6 semanas de armazenamento. As melhorias nas propriedades catalíticas da enzima via imobilização tornaram este nanobiocatalisador um bom candidato em aplicações bioindustriais (DEFAEI et al., 2018).

Lectina

Nanopartículas magnéticas foram revestidas com lectinas ConA (NPMConA) para imobilização da enzima glicose oxidase (GO). A distorção conformacional mínima da enzima foi alcançada com NPMs revestido pela ConA, visto que pequenos desvios no espectro de dicroísmo circular (CD) são observados em comparação com aqueles sem ConA. Em comparação com as enzimas de difusão livre, as enzimas GOx-CAT imobilizadas em ConA-NPMs resultam em atividade aumentada de 1,3 vezes, apresentando maior estabilidade, além da facilidade de reciclagem e operação garantida pelo NPMs (YOUNG et al., 2018).

Catecol/poliamida (CPA)

Nanopartículas magnéticas revestidas por um sistema binário Catecol/tetraetileno pentamina (CPA) barato e introduzindo braços espaçadores para ligação enzimática foram sintetizadas por Tang et al. (2019). Posteriormente, os autores utilizaram a imobilização da enzima lipase como modelo do processo de imobilização.

A lipase foi imobilizada na superfície de tais materiais magnéticos funcionalizados com amino-epóxi através de troca iônica e fixação covalente com suporte com uma capacidade de carga de 180,6 mg/g e 69,2% de recuperação da atividade enzimática em condições otimizadas. Além disso, a lipase imobilizada exibiu a faixa de tolerância melhorada de pH, temperatura e estabilidade de armazenamento, bem como excelente capacidade de reutilização.

Sílica

A nanoestrutura da sílica ganhou atenção na área biomédica, devido à sua química bem definida, que permite a modificação da sua estrutura pelos grupos amina, carboxila e tiol, metacrilatos, enzimas, proteínas e DNA (LIMA, 2016).

A lacase, uma enzima oxidativa com inúmeras aplicações industriais, requer novas tecnologias para sua imobilização a fim de melhorar sua atividade biocatalítica com custos reduzidos. Fortes et al. (2017) avaliaram a imobilização desta enzima em NPMs revestidas com sílica, nas condições ideais, a maior atividade de recuperação da lacase imobilizada atingiu 36,3 U/L, e apresentou atividade residual acima de 75% após 6 ciclos consecutivos de reação. Além disto, a estabilidade térmica da lacase imobilizada foi melhorada em comparação a enzima livre.

Resultados semelhantes foram obtidos por Ashtari et al. (2012) na imobilização da glicose oxidase (GOD) em NPMs encapsuladas em sílica preparadas através do método de microemulsão. As NPMs obtidas não apresentaram qualquer atividade citotóxica contra células de carcinoma de pulmão humano e letalidade de salmoura. A ligação da enzima ao suporte foi confirmada pelos espectros de FTIR. O estudo da estabilidade de armazenamento mostrou que a glicose oxidase imobilizada reteve 98% de sua atividade inicial após 45 dias e 90% da atividade também permaneceu após 12 usos repetidos. Melhorias consideráveis na estabilidade térmica da enzima imobilizada também foram observadas em temperaturas elevadas de até 80°C, além disto, a atividade da enzima imobilizada foi menos sensível às mudanças de pH da solução.

Ulu et al. (2018) avaliou a imobilização de L-Asparaginase em NPMs revestidas com sílicas e funcionalizadas por organossilano (epóxi). A L-Asparaginase imobilizada apresentou maior atividade em valores elevados de pH e temperatura. Também manteve mais de 92% da atividade inicial após incubação a 55 °C por 3 h. Em relação aos valores cinéticos, a L-Asparaginase imobilizada apresentou maior V_{max} e K_m menor em comparação à enzima nativa. Além disso, apresentou excelente reutilização por 12 ciclos sucessivos. Após 30 dias de armazenamento a 4 °C e 25 °C, a L-Asparaginase imobilizada reteve 54% e 26% de suas atividades iniciais, enquanto a L-Asparaginase

nativa perdeu cerca de 68% e 84% de sua atividade inicial, respectivamente. NPMs semelhantes foram utilizadas com sucesso na imobilização de lipases (AFZAL et al., 2019).

Poorakbar et al. (2018) utilizou nanopartículas magnéticas de ouro (AuM) revestidas com sílica mesoporosa para imobilização de celulase por ligação covalente com uma eficiência de ligação em 76%. A enzima imobilizada manteve 58% de sua atividade catalítica inicial após nove horas. Nesta pesquisa, um novo nanossistema foi desenhado como um suporte sólido para a imobilização da celulase, aumentando sua estabilidade térmica e facilitou seu armazenamento. Além disso, a enzima imobilizada pode ser aplicada em uma faixa mais ampla de temperatura e pH em comparação com a enzima livre, com separação da enzima de forma simples realizada por um ímã externo.

Polietilenimina (PEIP)

A polietilenimina parcialmente fosfonada (PEIP) foi desenvolvida como um agente de revestimento facilmente funcionalizável para nanopartículas de óxido de ferro. A imobilização por tripsina foi realizada como modelo, os resultados obtidos evidenciaram que o PEIP contribuiu para a alta estabilidade do material, por meio de uma forte ligação covalente com o grupo amino da enzima. A resistência à hidrólise e ao aumento da temperatura garantiram a obtenção de um nanomaterial magnético altamente reciclável projetado para análises proteômicas. Podendo servir para suporte de numerosas enzimas (MONTEIL et al., 2014).

Álcool polivinílico

Sahin e Ozmen (2020) avaliaram nanopartículas magnéticas revestidas com álcool polivinílico e ativadas com glutaraldeído para imobilização de tripsina. A enzima imobilizada foi mais estável do que a enzima livre a 40 °C e reteve 50% de sua atividade inicial, após 12 dias a 4 °C. Apresentando atividade residual de 56% após oito reutilizações sucessivas. O desempenho da enzima imobilizada foi avaliado pela digestão do citocromo C, fragmentos de peptídeo em solução digerida foram determinados usando espectrometria de massa MALDI-TOF. A tripsina imobilizada apresentou atividade proteolítica efetiva em menor tempo (15 min) do que a tripsina livre (24 h). Portanto, é possível inferir que a imobilização enzimática nas condições descritas pode ser um bioprocessamento promissor para estudos de proteômica em larga escala e aplicações práticas.

Polietileno glicol (PEG)

NPMs revestidas com polietilenoglicol via triclorotriazina com alta eficiência de carregamento, foram utilizadas para a imobilização covalente da pectinase. A enzima imobilizada mostrou atividade catalítica aprimorada, estabilidade operacional e fácil reutilização. Estudos de estabilidade térmica e de pH mostraram um melhor desempenho da pectinase imobilizada em comparação a enzima livre. Além disso, a enzima imobilizada reteve até 55 e 94% de sua atividade inicial após 10 reciclagens e 125 dias de armazenamento a 25 °C, respectivamente. Além disso, a redução da turbidez ocorreu em até 59% no suco de abacaxi tratado com pectinase imobilizada, sugerindo aplicabilidade desse sistema nas indústrias de sucos e alimentos (KHARAZMI et al. 2020). Da mesma forma, Kharazmi et al. (2020) utilizaram NPMs semelhantes na imobilização de xilanase estabilizada com atividade catalítica e estabilidade melhoradas. A enzima imobilizada foi aplicada em processos de clarificação de suco de abacaxi e notavelmente, reteve 50% de sua atividade inicial após nove reciclagens de 120 min de incubação a 50 °C a pH 4,5.

Polianilina (PANI)

A polianilina (PANI) representa uma classe de polímeros altamente promissores, em função de seu baixo custo de síntese, facilidade operacional e por apresentar propriedade condutora de elétrons, pois, dependendo das condições de síntese, o polímero pode atuar como semicondutor. A protease de *Penicillium aurantiogriseum* URM4622 foi imobilizada em nanopartículas magnéticas revestidas com polianilina (PANI) ativadas com glutaraldeído. A protease foi covalentemente ligada às nanopartículas via glutaraldeído a 25 °C. Foram determinadas as condições ótimas para imobilização enzimática e a caracterização da enzima imobilizada mostrou um comportamento ligeiramente diferente em comparação com a enzima livre. O processo de imobilização foi capaz de reutilizar a enzima até 5 vezes mantendo mais de 50% da sua atividade inicial. Os resultados obtidos comprovam que as nanopartículas ferromagnéticas revestidas com PANI são suporte eficiente para imobilização de protease fúngica (NETO et al., 2017).

Poli (uréia-uretano) (PUU)

Chiaradia et al. (2016) avaliaram a imobilização de lipase produzida por *Candida antarctica*, em nanopartículas magnéticas de poli (ureia-uretano) (NPMs - PUU) em uma única etapa durante a polimerização em miniemulsão interfacial. Imagens de microscopia eletrônica de transmissão mostraram a morfologia de

nanopartículas magnéticas sintetizadas encapsuladas em nanopartículas de poli (ureia-uretano) e imagens de microscopia de fluorescência confirmaram a imobilização da enzima em NPMs -PUU. Após o processo de imobilização a lipase imobilizada foi atraída por um campo magnético externo e utilizada como biocatalisador para a síntese dos ésteres etil oleato, geranyl propionato e geranyl oleato. Conversões de ésteres acima de 85% foram obtidas para todos os sistemas com base nos conteúdos de ácidos graxos livres medidos por titulação até pH 11 confirmando a eficiência do processo de imobilização.

Considerações Finais

A imobilização de enzimas em nanopartículas magnéticas sem revestimento faz com que elas estejam altamente susceptíveis à oxidação, diminuindo sua resposta ao campo magnético. Como consequência, o suporte apresenta uma vida útil curta, diminuindo o potencial de reuso do biocatalisador. Ademais, o produto pode ser contaminado devido à perda de magnetização da amostra, gerando problemas no processo produtivo. Desta forma, é necessário realizar o revestimento da superfície dessas partículas com materiais que possuam características compatíveis com a enzima alvo e com o bioprocessamento no qual ela será empregada, garantindo assim, uma maior estabilidade e eficiência catalítica. Requisitos estes de suma importância para uso em diversos setores industriais.

Referências

AFZAL, H. A., GHORPADE, R. V., THORVE, A. K., NAGARAJA, S., AL-DHUBIAB, B. E., MERAVANIGE, G., ... & ROOPASHREE, T. S. (2020). Epoxy functionalized polymer grafted magnetic nanoparticles by facile surface-initiated polymerization for immobilization studies of *Candida Antarctica* lipase B. *Reactive and Functional Polymers*, 147, 104454.

ASHTARI, K., KHAJEH, K., FASIHI, J., ASHTARI, P., RAMAZANI, A., & VALI, H. (2012). Silica-encapsulated magnetic nanoparticles: enzyme immobilization and cytotoxic study. *International journal of biological macromolecules*, 50(4), 1063-1069.

BASSO, A., & SERBAN, S. (2019). Industrial applications of immobilized enzymes: A review. *Molecular Catalysis*, 479, 110607.

BEDÊ, P. M., (2010). Produção e Caracterização de Nanopartículas Polimérico Magnéticas para Aplicações Biomédicas. Dissertação de M. Sc., Instituto Militar de Engenharia, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

CARDOSO, C. L., MORAES, M. C. D., & CASS, Q. B. (2009). Imobilização de enzimas em suportes cromatográficos: uma ferramenta na busca por substâncias bioativas. *Química Nova*, 32(1), 175-187.

CHEN, Z., WANG, X., CHEN, Y., XUE, Z., GUO, Q., MA, Q., & CHEN, H. (2018). Preparation and characterization of a novel nanocomposite with double enzymes immobilized on magnetic Fe₃O₄-chitosan-sodium tripolyphosphate. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 169, 280-288.

CHIARADIA, V., VALÉRIO, A., DE OLIVEIRA, D., ARAÚJO, P. H. H., & SAYER, C. (2016). Simultaneous single-step immobilization of *Candida antarctica* lipase B and incorporation of magnetic nanoparticles on poly(urea-urethane) nanoparticles by interfacial miniemulsion polymerization. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 131, 31-35.

CHOI, J. M., HAN, S. S., & KIM, H. S. (2015). Industrial applications of enzyme biocatalysis: Current status and future aspects. *Biotechnology advances*, 33(7), 1443-1454.

COSTA, V.M., SOUZA, M. C. FECHINE, M. P. B. A., MACEDO, A.C. & GONÇALVES, L. R. B. (2016). Nanobiocatalytic systems based on Lipase-Fe₃O₄ and conventional systems for isoniazid synthesis: a comparative study, *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 33(3), 661-673.

DARWESH, O. M., ALI, S. S., MATTER, I. A., ELSAMAHY, T., & MAHMOUD, Y. A. (2020). Enzymes immobilization onto magnetic nanoparticles to improve industrial and environmental applications. In *Methods in Enzymology*, Academic Press, 630, 481-502.

DE OLIVEIRA, R. L., DIAS, J. L., DA SILVA, O. S., & PORTO, T. S. (2018). Immobilization of pectinase from *Aspergillus aculeatus* in alginate beads and clarification of apple and umbu juices in a packed bed reactor. *Food and bioproducts processing*, 109, 9-18.

DEFAEI, M., TAHERI-KAFRANI, A., MIROLIAEI, M., & YAGHMAEI, P. (2018). Improvement of stability and reusability of α -amylase immobilized on naringin functionalized magnetic nanoparticles: A robust nanobiocatalyst. *International Journal of Biological Macromolecules*, 113, 354-360.

FERNANDES, K. F., LIMA, C. S., & LOPES, F. M. (2010). Técnicas de imobilização de enzimas. *Revista Processos Químicos*, 4(7), 53-58.

FERNANDES, L. M. G., DA CUNHA, M. N. C., DE CARVALHO SILVA, J., PORTO, A. L. F., & PORTO, T. S. (2020). Purification and characterization of a novel *Aspergillus heteromorphus* URM 0269 protease extracted by aqueous two-phase systems PEG/citrate. *Journal of Molecular Liquids*, 113957.

FERRARA, M. A. Cap. 6 Bioprocessos para produção de enzimas. FORTES, C. C. S., SILVA, A. L. D., XAVIER, A. M. R. B., & TAVARES, A. P. M. (2017). Optimization of enzyme immobilization on functionalized magnetic nanoparticles for laccase biocatalytic reactions. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, 117, 1-8.

FRANCISQUINI, E., SCHOENMAKER, J. & SOUZA, J. A. (2014) Nanopartículas Magnéticas e suas Aplicações. In: (Ed.). *Série química: Ciência e tecnologia-química supramolecular e nanotecnologia*. São Paulo: Atheneu, 592p.

FURLANI, I. L., AMARAL, B. S., OLIVEIRA, R. V., & CASS, Q. B. (2020). Imobilização enzimática: conceito e efeitos na proteólise. *Química Nova*, 43(4), 463-473.

GARCÍA-EMBED, S., DI RENZO, F., DE MATTEIS, L., SPRETI, N., & M. DE LA FUENTE, J. (2018). Magnetic separation and high reusability of chloroperoxidase entrapped in multi polysaccharide micro-supports. *Applied Catalysis A: General*, 560, 94-102.

GENNARI, A., FÜHR, A. J., VOLPATO, G., & DE SOUZA, C. F. V. (2020). Magnetic cellulose: Versatile support for enzyme immobilization-A review. *Carbohydrate Polymers*, 116646.

HU, B.; PAN, J.; YU, H.; LIU, J. & XU, J. (2009) Immobilization of *Serratia marcescens* lipase onto amino-functionalized magnetic nanoparticles for repeated use in enzymatic synthesis of Diltiazem intermediate. *Process Biochemistry*, Elsevier, 44(9), 1019-1024.

JIANG, J., YU, Y., WANG, L., LI, J., LING, J., LI, Y., & DUAN, G. (2019). Enzyme immobilized on polyamidoamine-coated magnetic microspheres for α -glucosidase inhibitors screening from *Radix Paeoniae Rubra* extracts accompanied with molecular modeling. *Talanta*. 195, 127-136.

KHARAZMI, S., TAHERI-KAFRANI, A., & SOOZANIPOUR, A. (2020). Efficient immobilization of pectinase on trichlorotriazine-functionalized polyethylene glycol-grafted magnetic nanoparticles: A stable and robust nanobiocatalyst for fruit juice clarification. *Food Chemistry*, 126890.

KHARAZMI, S., TAHERI-KAFRANI, A., SOOZANIPOUR, A., NASROLLAHZADEH, M., & VARMA, R. S. (2020). Xylanase immobilization onto trichlorotriazine-functionalized polyethylene glycol grafted magnetic nanoparticles: A thermostable and robust nanobiocatalyst for fruit juice clarification. *International Journal of Biological Macromolecules*.

KUO, C. H., LIU, Y. C., CHANG, C. M. J., CHEN, J. H., CHANG, C., & SHIEH, C. J. (2012). Optimum conditions for lipase immobilization on chitosan-coated Fe₃O₄ nanoparticles. *Carbohydrate Polymers*, 87(4), 2538-2545.

LAURENT, S., FORGE, D., PORT, M., ROCH, A., ROBIC, C., VANDER ELST, L., & MULLER, R. N. (2008). Magnetic iron oxide nanoparticles: synthesis, stabilization, vectorization, physicochemical characterizations, and biological applications. *Chemical Reviews*, 108(6), 2064-2110.

LIMA, J. S., ARAÚJO, P. H. H., SAYER, C., SOUZA, A. A. U., VIEGAS, A. C., & DE OLIVEIRA, D. (2016). Cellulase immobilization on magnetic nanoparticles encapsulated in polymer nanospheres. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 40(4), 511-518.

LIU, S., YU, B., WANG, S., SHEN, Y., & CONG, H. (2020). Preparation, surface functionalization and application of Fe₃O₄ magnetic nanoparticles. *Advances in Colloid and Interface Science*, 102165.

MENDES, A. A., OLIVEIRA, P. C.; CASTRO, H. F. & GIORDANO, R. L. C. (2011) Application of chitosan as support for immobilization of enzymes of industrial interest. *Quím. Nova* [online], 34(5), 831-840.

MONTEIL, C., BAR, N., RETOUX, R., HENRY, J., BERNAY, B., & VILLEMEN, D. (2014). Partially phosphonated polyethylenimine-coated nanoparticles as convenient support for enzyme immobilization in bioprocessing. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 192, 269-274.

NASCIMENTO, T. P., SALES, A. E., PORTO, C. S., BRANDÃO, R. M. P., DE CAMPOS-TAKAKI, G. M., TEIXEIRA, J. A. C., ... & CONVERTI, A. (2016). Purification of a fibrinolytic protease from *Mucor subtilissimus* UCP 1262 by aqueous two-phase systems (PEG/sulfate). *Journal of Chromatography B*, 1025, 16-24.

NETO, J. M. W. D., MACIEL, J. C., CAMPOS, J. F., CARVALHO JUNIOR, L. B., MARQUES, D. A. V., LIMA, C. A. & PORTO, A. L. F. (2017) Optimization of *Penicillium aurantiogriseum* protease immobilization on magnetic nanoparticles for antioxidant peptides' obtainment, *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 47(7), 644-654

NI, W., ZHENG, Z., LIU, H., WANG, P., WANG, L., WANG, H., ... & ZHAO, G. (2020). Synthesis of the carboxymethyl cellulose magnetic nanoparticles for efficient immobilization of prenyltransferase NovQ. *Carbohydrate Polymers*, 235, 115955. Falta

NOURI, M., & FARAMARZ KHODAIYAN. (2020). Green synthesis of chitosan magnetic nanoparticles and their application with poly-aldehyde kefiran cross-linker to immobilize pectinase enzyme. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 101681. Falta

PEREIRA, M.G., FACCHINI, F.D.A., FILÓ, L.E.C., POLIZELI, A.M., VICI, A.C., JORGE, J.A., FERNANDEZ-LORENTE, G., PESSELA, B.C., GUIBAN, J.M. & POLIZELI, M. L. T. M. . (2015). Immobilized lipase from *Hypocrea pseudokoningii* on hydrophobic and ionic supports: Determination of thermal and organic solvent stabilities for applications in the oleochemical industry, *Process Biochemistry*, 50(4), 561-570.

POORAKBAR, E., SHAFIEE, A., SABOURY, A. A., RAD, B. L., KHOSHNEVISAN, K., MA'MANI, L., ... & HOSSEINI, M. (2018). Synthesis of magnetic gold mesoporous silica nanoparticles core shell for cellulase enzyme immobilization: Improvement of enzymatic activity and thermal stability. *Process biochemistry*, 71, 92-100.

QUAN K, ZHANG Z, REN Y, BUSSCHER HJ, VAN DER MEI HC & PETERSON BW, (2020). Possibilities and impossibilities of magnetic nanoparticle use in the control of infectious biofilms, *Journal of Materials Science & Technology*.

SAHIN, S., & OZMEN, I. (2020). Covalent immobilization of trypsin on polyvinyl alcohol-coated magnetic nanoparticles activated with glutaraldehyde. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 184, 113195.

SEENUVASAN, M., KUMAR, K. S., KUMAR, A., & PARTHIBAN, R. (2020). Review on surface modification of nanocarriers to overcome diffusion limitations: An enzyme immobilization aspect. *Biochemical Engineering Journal*, 107574.

- SINGH, R., MITTAL, A., KUMAR, M., & MEHTA, PK (2016). Proteases microbianas em aplicações comerciais. *J Pharm Chem Biol Sei*, 4 (3), 365-74.
- SOUZA, L. T., VERÍSSIMO, L. A., PESSELA, B. C., SANTORO, R. R., RESENDE, R. R., & MENDES, A. A. (2017). Imobilização enzimática: princípios fundamentais e tipos de suporte, In: RESENDE, R. R. *Biotecnologia Aplicada à Agro&Indústria*. Vol 4. Editora Blucher.
- SUO, H., GAO, Z., XU, L., XU, C., YU, D., XIANG, X., ...& HU, Y. (2020). Synthesis of functional ionic liquid modified magnetic chitosan nanoparticles for porcine pancreatic lipase immobilization. *Materials Science and Engineering: C*, 96, 356-364.
- SURESHKUMAR, M., & LEE, C.-K. (2011). Polydopamine coated magnetic-chitin (MCT) particles as a new matrix for enzyme immobilization. *Carbohydrate Polymers*, 84(2), 775-780
- TANG, W., CHEN, C., SUN, W., WANG, P., & WEI, D. (2019). Low-cost mussel inspired poly (Catechol/Polyamine) modified magnetic nanoparticles as a versatile platform for enhanced activity of immobilized enzyme. *International journal of biological macromolecules*, 128, 814-824.
- TAVANO, O. L., BERENQUER- MURCIA, A., SECUNDO, F., & FERNANDEZ-LAFUENTE, R. (2018). Biotechnological applications of proteases in food technology. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, 17(2), 412-436.
- TOMBÁČZ, E., TURCU, R., SOCOLIUC, V., & VÉKÁS, L. (2015). Magnetic iron oxide nanoparticles: Recent trends in design and synthesis of magnetoresponsive nanosystems. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 468(3), 442-453.
- TÜZMEN N, KALBURCU T. & DENIZLI A (2012) α -Amylase immobilization onto dye attached magnetic beads: Optimization and characterization. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 78, 16-23.
- ULU, A., OZCAN, I., KOYTEPE, S., & ATES, B. (2018). Projeto de nanopartículas core-shell de Fe₃O₄ MCM-41 funcionalizadas com epóxi para imobilização enzimática. *International Journal of Biological Macromolecules*, 115, 1122-1130.
- VASIĆ, K., KNEZ, Ž., KONSTANTINOVA, E. A., KOKORIN, A. I., GYERGYEK, S., & LEITGEB, M. (2020). Structural and magnetic characteristics of carboxymethyl dextran coated magnetic nanoparticles: From characterization to immobilization application. *Reactive and Functional Polymers*, 148, 104481.
- WU, W., HE, Q. & JIANG, C. (2008). Magnetic iron oxide nanoparticles: Synthesis and surface functionalization strategies. *Nanoscale Research Letters*, 3(11), 397-415.
- YONG, Y., SU, R., LIU, X., XU, W., ZHANG, Y., WANG, R., ...& LIU, Z. (2018). Lectin corona enhances enzymatic catalysis on the surface of magnetic nanoparticles. *Biochemical Engineering Journal*, 129, 26-32.