

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

JOÃO PEDRO MIGUEZ

**IMOBILIZAÇÃO E ESTABILIZAÇÃO DE TRIPSINA DE PÂNCREAS DE PORCO
EM HIDROGEL DE QUITOSANA E APLICAÇÃO EM REAÇÕES DE HIDRÓLISE**

ALFENAS/MG

2024

JOÃO PEDRO MIGUEZ

**IMOBILIZAÇÃO E ESTABILIZAÇÃO DE TRIPSINA DE PÂNCREAS DE PORCO
EM HIDROGEL DE QUITOSANA E APLICAÇÃO EM REAÇÕES DE HIDRÓLISE**

Tese apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Química pela Universidade Federal de Alfenas. Área de Concentração: Química Orgânica.
Orientador: Prof. Dr. Adriano Aguiar Mendes
Coorientadora: Prof. Dra. Olga Luisa Tavano

ALFENAS/MG

2024

Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal de Alfenas
Biblioteca Central

Miguez, João Pedro.

Imobilização e estabilização de tripsina de pâncreas de porco em hidrogel de quitosana e aplicação em reações de hidrólise / João Pedro Miguez. - Alfenas, MG, 2023.

77 f. : il. -

Orientador(a): Adriano Aguiar Mendes.

Tese (Doutorado em Química) - Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG, 2023.

Bibliografia.

1. Tripsina do pâncreas suíno. 2. Imobilização. 3. Suporte heterofuncional. 4. Estudos termodinâmicos. 5. Hidrólise de proteínas. I. Mendes, Adriano Aguiar , orient. II. Título.

Ficha gerada automaticamente com dados fornecidos pelo autor.

JOÃO PEDRO MIGUEZ

**IMOBILIZAÇÃO E ESTABILIZAÇÃO DE TRIPSINA DE PÂNCREAS DE PORCO
EM HIDROGEL DE QUITOSANA E APLICAÇÃO EM REAÇÕES DE HIDRÓLISE**

O Presidente da banca examinadora abaixo assina a aprovação da Tese apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Química pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Química Orgânica

Aprovado em: 24 de novembro de 2023.

Prof. Dr. Adriano Aguiar Mendes

Presidente da Banca Examinadora

Instituição: Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL)

Profa. Dra. Maria Valderez Ponte Rocha

Instituição: Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Marcelo Franco

Instituição: Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC)

Prof. Dr. José Geraldo Nery

Instituição: Universidade Estadual Paulista (UNESP)

Profa. Dra. Yara Luiza Coelho

Instituição: Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL)

Documento assinado eletronicamente por **Adriano Aguiar Mendes, Professor do Magistério Superior**, em 24/11/2023, às 18:23, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015

A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.unifalmg.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orga_o_acesso_externo=0.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todas as pessoas que tornaram possível a realização deste trabalho de tese de doutorado. Primeiramente, gostaria de expressar minha sincera gratidão ao meu orientador, o Prof. Adriano, por sua orientação, sabedoria e paciência ao longo desta jornada acadêmica. Seu comprometimento com o meu crescimento e desenvolvimento profissional foi fundamental para o sucesso deste projeto.

Também quero agradecer à minha coorientadora, a Prof. Olga, que vem me acompanhando desde a iniciação científica, se não fosse por ela não teria chegado até aqui.

À minha mãe, Silvana, e aos meus irmãos Marcus Vinícius e Maria Luiza, agradeço pelo apoio incondicional, amor e incentivo ao longo dos anos. Sua presença e encorajamento foram pilares fundamentais em minha jornada acadêmica.

À minha namorada e companheira, Mariana, agradeço por estar ao meu lado, compreender os desafios que enfrentei e oferecer seu apoio emocional. Pela incrível paciência durante todo esse tempo, te amo.

Tenho que agradecer aos meus gatinhos, Selina (Tilili), Zelda, Parça, Noah, Jecht e Salem, por suportar meu mal humor ao longo da concepção deste trabalho, eles não sabem o tanto que me apoiaram.

Não posso deixar de mencionar meus colegas de laboratório, cuja colaboração e troca de conhecimento foram essenciais para o desenvolvimento da pesquisa. Agradeço também aos técnicos do laboratório, pelo apoio e ajuda durante esses anos todos.

A todos vocês, minha mais profunda gratidão. Este trabalho não teria sido possível sem o apoio e contribuições de cada um. Obrigado por fazerem parte deste importante capítulo da minha vida.

Meu profundo agradecimento a CAPES, por ter me concedido bolsa de forma integral, prezando pela continuidade da minha formação e pela ciência do nosso país.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior Brasil (CAPES) Financiamento 01.

O presente trabalho foi realizado com apoio financeiro da Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e a da Pró-reitoria de Pesquisa e Pós-graduação da UNIFAL-MG.

RESUMO

Neste estudo, a tripsina do pâncreas suíno foi imobilizada em um suporte heterofuncional preparado ativando o hidrogel de quitosana (Qui) com glutaraldeído (Glu) e, em seguida, funcionalizando-o com glicina (Qui-Glu-Gli). O desempenho catalítico da tripsina imobilizada nas reações de hidrólise foi comparado com o desempenho catalítico da enzima imobilizada em quitosana ativada com glutaraldeído (Qui-Glu) e hidrogel de quitosana (Qui). A concentração máxima de proteína imobilizada em Qui-Glu-Gli foi de aproximadamente 16 mg.g⁻¹ a pH 9,0 (5 mmol.L⁻¹ de tampão de carbonato de sódio) a 25 °C a partir de uma carga de proteína oferecida de 20 mg.g⁻¹. Esse biocatalisador apresentou uma atividade específica máxima (AE) de 33,1 ± 0,2 nmol.min⁻¹.mg⁻¹ para a hidrólise de benzoil-DL-arginina-*p*-nitroanilida (BAPNA), valores maiores quando comparados com o suporte clássico Qui-Glu (valores de AE variando entre 6,7 ± 0,1 nmol.min⁻¹.mg⁻¹ e 8,1 ± 0,1 nmol.min⁻¹.mg⁻¹). O modelo cinético de Elovich foi usado para descrever o processo de adsorção usando cargas iniciais de proteína baixas (3 mg.g⁻¹) e altas (20 mg.g⁻¹). O estudo de dessorção revelou uma taxa de 32% de dessorção da tripsina a pH 5,00 e 50 °C, na presença de detergente Triton-X, destacando a ocorrência de interações hidrofóbicas e iônicas entre a tripsina e o suporte. A temperatura ideal para a hidrólise de BAPNA catalisada pela tripsina imobilizada (60 °C) foi 10 °C mais alta do que a de sua forma solúvel. Além disso, a enzima imobilizada foi de 16 a 20 vezes mais estável do que sua forma solúvel a 50-55 °C. Estudos termodinâmicos, demonstraram que o fator de estabilização da enzima imobilizada foi de 20 vezes maior que a enzima livre para temperatura de 45 e 50 °C. A hidrólise completa da albumina sérica bovina (ASB) a 37 °C foi alcançada após 2 horas usando uma enzima solúvel, enquanto, para sua forma imobilizada, o rendimento da hidrólise foi de 47%. Testes de reutilização revelaram que esse biocatalisador reteve 37% de sua atividade original após 10 lotes sucessivos de hidrólise. Com base nesses resultados, esse suporte pode ser usado como uma alternativa interessante para a produção de biocatalisadores heterogêneos com alta atividade catalítica e estabilidade térmica, apesar de apresentar baixo desempenho quando comparado com a enzima solúvel no processo de hidrólise da albumina sérica bovina.

Palavras-chave: Tripsina do pâncreas suíno; Imobilização; Suporte heterofuncional; Estudos termodinâmicos; Hidrólise de proteínas.

ABSTRACT

In this study, trypsin from the porcine pancreas was immobilized on a heterofunctional support prepared by activating chitosan (Chit) hydrogel with glutaraldehyde (GA), then functionalizing it with glycine (Chit-GA-Gly). The catalytic performance of the immobilized trypsin in the hydrolysis reactions was compared with the catalytic performance of the immobilized enzyme on glutaraldehyde-activated chitosan (Chit-GA) and chitosan hydrogel (Chit). The maximum concentration of immobilized protein on Chit-GA-Gly was approximately 16 mg.g^{-1} at pH 9.0 (5 mmol.L^{-1} buffer sodium carbonate) at $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$ from an offered protein loading of 20 mg.g^{-1} . This biocatalyst exhibited maximum specific activity (SA) of $33.1 \pm 0.2 \text{ nmol.min}^{-1} .\text{mg}^{-1}$ for benzoyl-DL-arginine-*p*-nitroanilide (BAPNA) hydrolysis, bigger values when compared to the classic Qui-Glu support. (SA values ranging between $6.7 \pm 0.1 \text{ nmol.min}^{-1} .\text{mg}^{-1}$ and $8.1 \pm 0.1 \text{ nmol.min}^{-1} .\text{mg}^{-1}$). The Elovich kinetic model was used to describe the adsorption process using low (3 mg.g^{-1}) and high (20 mg.g^{-1}) initial protein loadings. The desorption study revealed a 32% desorption rate of trypsin at pH 5.00 and $50 \text{ }^{\circ}\text{C}$, in the presence of Triton-X detergent, highlighting the occurrence of hydrophobic and ionic interactions between trypsin and the support. The optimum temperature for BAPNA hydrolysis catalyzed by the immobilized trypsin ($60 \text{ }^{\circ}\text{C}$) was $10 \text{ }^{\circ}\text{C}$ higher than that of its soluble form. Additionally, the immobilized enzyme was 16 to 20 times more stable than its soluble form at $50\text{--}55 \text{ }^{\circ}\text{C}$. Thermodynamic studies have shown that the stabilization factor of the immobilized enzyme was 20 times greater than the free enzyme at temperatures of 45 and 50°C . Complete hydrolysis of bovine serum albumin (BSA) at $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$ was achieved after 2 h using a soluble enzyme, while for its immobilized form, the hydrolysis yield was 47%. Reuse tests revealed that this biocatalyst retained 37% of its original activity after 10 successive hydrolysis batches. Based on these results, this support could be used as an interesting alternative for producing heterogeneous biocatalysts with high catalytic activity and thermal stability when producing protein hydrolysates.

Keywords: Trypsin from porcine pâncreas; Immobilization; Heterofunctional support; Thermodynamics studies; Protein hydrolysis.

LISTA DE FIGURA

- Figura 1 – Representação em cartoon da estrutura tridimensional da tripsina do pâncreas suíno (*Sus scrofa*) (TRANSUE *et al.*, 2004). Esta estrutura ilustra as duas estruturas de barril beta da enzima. As linhas cor-de-rosa representam as conexões entre os resíduos catalíticos formados por His57, Asp102 e Ser195. Código PDB 1S81..... 22
- Figura 2 – A representação gráfica do mecanismo de reação da tripsina utiliza setas para indicar a direção do fluxo de elétrons em cada fase. Na primeira etapa, ocorre a formação de um intermediário acil-enzima, que resulta na liberação da porção N-terminal da ligação peptídica clivada. Em seguida, na etapa subsequente, uma molécula de água (H₂O), ativada pela histidina (His), interage com o intermediário acil-enzima, ocasionando a liberação da porção C-terminal da ligação peptídica clivada..... 23
- Figura 3 – Métodos de imobilização enzimática..... 26
- Figura 4 – Obtenção de quitosana a partir da quitina por meio do processo de desacetilação..... 31
- Figura 5 – Estrutura do copolímero da celulose, quitina e quitosana..... 33
- Figura 6 – Grupos reativos formados pela ativação de suportes com glutaraldeído..... 35
- Figura 7 – Reação de hidrólise de BAPNA (N-alfa- benzoil-DL-arginina-p-nitroanilina), substrato da tripsina..... 38
- Figura 8 – Esquema representativo de preparação do suporte heterofuncional (Qui-Glu-Gli)..... 45
- Figura 9 – Modelos cinéticos de adsorção não lineares de pseudo-primeira ordem (A), pseudo-segunda ordem (B) e Elovich (C) para a imobilização de tripsina do pâncreas suíno em Qui-Glu-Gli a 25 °C e 200 rpm a pH 9,0 (em tampão de carbonato de sódio a 5 mmol.L⁻¹), utilizando cargas iniciais de proteína de 3 mg.g⁻¹ e 20 mg.g⁻¹ de suporte..... 50
- Figura 10 – Influência da temperatura na atividade da tripsina solúvel e imobilizada do pâncreas suíno em Qui-Glu-Gli com uma carga inicial de proteína de 3 mg.g⁻¹ a pH 8,0 (fosfato de sódio a 50 mmol.L⁻¹ de tampão) usando o

	substrato BAPNA, conforme descrito na metodologia. A atividade relativa de 100% corresponde a $86,6 \text{ nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mL}^{-1}$ para a enzima solúvel e $263,4 \text{ nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ para a tripsina imobilizada.....	54
Figura 11 –	Curvas de inativação térmica da tripsina solúvel (■) e imobilizada (□) do pâncreas suíno por incubação a 37 °C (A), 45 °C (B), 50 °C (C) e 55 °C (D). Os de inativação foram realizados a pH 7,0 (fosfato de sódio a 50 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$). A atividade relativa de 100% (ou $a_r = 1$ - consulte a Equação (7)) corresponde à atividade hidrolítica inicial para a tripsina solúvel ($86,6 \text{ nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mL}^{-1}$) e a tripsina imobilizada ($263,4 \text{ nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$).....	56
Figura 12 –	Determinação da energia de inativação térmica (E_d) para a tripsina solúvel (■) e imobilizada (□) do pâncreas suíno por meio da equação de Arrhenius.....	58
Figura 13 –	Perfil de hidrólise de ASB catalisado pela tripsina solúvel do pâncreas suíno imobilizada a 37 °C na ausência de tampão (água destilada – pH 8,0).....	60
Figura 14 –	Testes de estabilidade operacional (reutilização) da tripsina do pâncreas suíno em Qui–Glu–Gli na hidrólise de ASB após lotes sucessivos de 120 minutos cada. As reações de hidrólise foram conduzidas a 37 °C na ausência de agentes tamponates.....	62

LISTA DE TABELA

Quadro 1	– Problemas associados ao uso de enzimas (direita) e as vantagens dos processos de imobilização (esquerda).....	25
Quadro 2	– Enzimas imobilizadas em suporte heterofuncional.....	30
Tabela 1	– Influência do pH nos parâmetros de imobilização da tripsina do pâncreas suíno em hidrogéis de quitosana (Qui), quitosana-glutaraldeído (Qui-Glu) e quitosana-glutaraldeído-glicina (Qui-Glu-Gli).....	47
Tabela 2	– Testes de dessorção da tripsina do pâncreas suíno imobilizada em gel de Qui-Glu-Gli em diferentes valores de pH, força iônica, detergente e temperatura. Estudo foi realizado com agitação mecânica constante (200 rpm), massa de biocatalisador (0,2 g equivalente a 3,2 mg de proteína) e volume da solução de dessorção (6 mL).....	52
Tabela 3	– Valores dos parâmetros cinéticos e termodinâmicos da inativação térmica da suína solúvel e imobilizada em diferentes temperaturas.....	57

LISTA DE ABREVIATURAS

AAs	Aminoácidos
AAbe	Número de mol de grupos amino livres
AAtm	Número de mol total de grupos alfa-amino
ABTS	2,2'-azinobis (ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico) sal de diamônio
AE	Atividade Específica
AH	Atividade Hidrolítica
ASB	Albumina Sérica Bovina
Asp	Aspartato
BAPNA	Benzoil-DL-arginina- <i>p</i> -nitroanilida
Ed	Energia de inativação térmica
FE	Fator de estabilidade
Gli	Glicina
Glu	Glutaraldeído
His	Histidina
LTL	Lipase de <i>Thermomyces lanuginosus</i>
OPA	<i>O</i> -ftalaldeído
pI	Ponto isoelétrico
Qe	Quantidade de enzima imobilizada
PVA	Álcool polivinílico
Qui	Quitosana
RI	Rendimento de imobilização
rpm	Rotações por minuto
Ser	Serina
T _{1/2}	Tempo de meia-vida
k _B	Constante de Boltzmann (1,380649 x 10 ⁻²³ m ² kg s ⁻² K ⁻¹)
N _A	Número de Avogadro (6,022 140 76 x 10 ²³ mol ⁻¹)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	13
2	OBJETIVOS.....	17
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	18
3.1	HIDRÓLISE DE PROTEÍNAS.....	18
3.2	PROTEASES.....	19
3.2.1	Protease na indústria.....	20
3.3	TRIPSINA.....	21
3.4	IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS.....	24
3.4.1	Imobilização em suporte heterofuncional.....	28
3.5	QUITOSANA.....	30
3.6	GLUTARALDEÍDO.....	34
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	36
4.1	MATERIAIS.....	36
4.2	PREPARAÇÃO DOS SUPORTES HETEROFUNCIONAIS.....	36
4.3	PROCEDIMENTO DE IMOBILIZAÇÃO DA TRIPSINA EM HIDROGEL DE QUI-GLU-GLI.....	37
4.4	INFLUÊNCIA DO PH NO PROCESSO DE IMOBILIZAÇÃO.....	39
4.5	INFLUÊNCIA DO TEMPO DE IMOBILIZAÇÃO: ESTUDOS DE ADSORÇÃO CINÉTICA.....	39
4.6	INFLUÊNCIA DE PARÂMETROS NO PROCESSO DE DESSORÇÃO DA TRIPSINA.....	40
4.7	INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA NA ATIVIDADE DE TRIPSINA SOLÚVEL E IMOBILIZADA.....	40
4.8	ESTABILIDADE TÉRMICA: ESTIMATIVA DE PARÂMETROS CINÉTICOS E TERMODINÂMICOS.....	41
4.9	HIDRÓLISE DA ALBUMINA SÉRICA BOVINA (ASB) CATALISADA POR TRIPSINA SOLÚVEL E IMOBILIZADA E TESTES DE ESTABILIDADE OPERACIONAL.....	42
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	44
5.1	INFLUÊNCIA DO PH DA SOLUÇÃO NA IMOBILIZAÇÃO DE TRIPSINA EM DIFERENTES SUPORTES.....	46

5.2	INFLUÊNCIA DO TEMPO NO PROCESSO DE IMOBILIZAÇÃO: ESTUDOS CINÉTICOS DE ADSORÇÃO.....	50
5.3	EFEITO DA CONCENTRAÇÃO NA DESSORÇÃO DA TRIPSINA.....	51
5.4	INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA NA ATIVIDADE DA TRIPSINA SOLÚVEL E IMOBILIZADA.....	54
5.5	TESTES DE ESTABILIDADE TÉRMICA E ESTIMATIVA DE PARÂMETROS CINÉTICOS E TERMODINÂMICOS.....	55
5.6	AValiação DO DESEMPENHO CATALÍTICO DA TRIPSINA SOLÚVEL E IMOBILIZADA NA REAÇÃO DE HIDRÓLISE DE ASB E TESTES DE ESTABILIDADE OPERACIONAL.....	59
6	CONCLUSÃO.....	63
7	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	64
	REFERENCIA.....	65

1 INTRODUÇÃO

Enzimas são catalisadores metabólicos que consistem de proteínas altamente especializadas com habilidade de catalisar reações químicas específicas em sistemas biológicos, o que permite a ocorrência de uma variedade de reações bioquímicas endógenas por meio de uma via bem definida (CHANG; JOHN, 2018). As enzimas aceleram diversas reações biológicas essenciais na manutenção da vida humana e são catalisadores altamente seletivos e estão presentes em todos os seres vivos (SINGH; SINGH; PANDEY, 2019).

Segundo Papadaki *et al.*, 2020, o mercado global de enzimas foi avaliado em US\$ 7,1 bilhões em 2017 e é projetado atingir US\$ 10,5 bilhões em 2024, com uma taxa de crescimento anual de 5,7% de 2018 a 2024. Vale destacar que a Europa contribuiu com um terço da produção global de enzimas em 2017. Globalmente, o setor de enzimas é majoritariamente liderado pelos segmentos de produtos alimentícios, bebidas e pela indústria farmacêutica, que têm impacto direto ou indireto no consumo humano (SINGH *et al.*, 2016).

Dentre as enzimas, as proteases desempenham um papel significativo no setor industrial como enzimas essenciais responsáveis por hidrolisar ligações peptídicas encontradas em proteínas de várias fontes (SHAMSI; PARVEEN; FATIMA, 2016). Elas podem ser classificadas com base em sua capacidade de quebrar ligações peptídicas em endopeptidases (EC 3.4.11-19) e exopeptidases (EC 3.4.21-19). As endopeptidases podem ser ainda categorizadas em subgrupos com base nos aminoácidos presentes em seus sítios catalíticos, nomeadamente serino, aspártico, cisteíno ou metalopeptidases (DORNELLES *et al.*, 2018; GOETTIG, 2021).

A tripsina (EC 3.4.21.4) pertence à família das serinoendopeptidases e serve como uma das principais enzimas digestivas secretadas pelo pâncreas dos animais. Seu papel vital no processo digestivo também envolve a ativação de zimógenos, nomeadamente quimotripsinogênio e procarboxipeptidase (NAVEED *et al.*, 2021). Devido à sua natureza de enzima digestiva e alta especificidade, a tripsina possui inúmeras aplicações bioquímicas e industriais, permitindo um melhor controle na hidrólise de proteínas, devido às condições mais amenas do meio reacional (BURKHART *et al.*, 2012; DENG; GRUPPEN; WIERENGA, 2018; KAUR; SINGH, 2022). Essa enzima tem sido utilizada no processamento de couro, análise de proteoma, para reduzir alergias a proteínas alimentares, gerar peptídeos bioativos e preparar produtos lácteos de fácil digestão para bebês (BOUGATEF, 2013; LACROIX *et al.*, 2017; NATH *et al.*, 2020; TAVANO *et al.*, 2018; WANG *et al.*, 2017). No entanto, apesar de suas

diferentes aplicações industriais, existem certas limitações, como baixa estabilidade sob condições específicas de processo (altas temperaturas, presença de solventes orgânicos e condições de pH extremo), juntamente com desafios na separação da enzima do produto final, dificultando sua recuperação e subsequente reutilização (BASSO; SERBAN, 2019; BOLIVAR; WOODLEY; FERNANDEZ-LAFUENTE, 2022; MAGHRABY *et al.*, 2023). Para superar essas limitações, foram propostas estratégias de imobilização de enzimas que permitiriam o uso repetido de enzimas como a tripsina do pâncreas suíno, facilitando assim a recuperação eficiente dos meios de reação, simplificando os processos de separação e reduzindo os riscos de contaminação tanto nas enzimas quanto nos produtos finais (AYBASTIER; DEMIR, 2010; BASHIR; SOOD; BANDRAL, 2020; BERNAL; RODRÍGUEZ; MARTÍNEZ, 2018; CAVALCANTE *et al.*, 2021; CHANG *et al.*, 2009; GUZIK; HUPERT-KOCUREK; WOJCIESZYNSKA, 2014; RODRIGUES *et al.*, 2021; ZDARTA *et al.*, 2018). Enzimas imobilizadas, em comparação com suas contrapartes solúveis, podem mostrar estabilidade aprimorada se realizadas adequadamente (GUZIK; HUPERT-KOCUREK; WOJCIESZYNSKA, 2014; TONINI; ASTRUP, 2012), ampliando a janela de operação. É crucial observar que a imobilização da tripsina reduz significativamente o risco do processo de autólise ocorrer. (CHERRY; FIDANTSEF, 2003; MASSOLINI; CALLERI, 2005; SASAI *et al.*, 2017).

Uma etapa importante para a imobilização enzimática é a escolha do material do suporte, o qual pode afetar significativamente a atividade e estabilidade das enzimas (BOLIVAR; WOODLEY; FERNANDEZ-LAFUENTE, 2022; SANTOS, *et al.*, 2015). Além disso, as matrizes devem possuir resistência a ataques microbianos, apresentar estabilidade mecânica e não ser tóxicas (BRENA; GONZÁLEZ-POMBO; BATISTA-VIERA, 2013; WAHAB *et al.*, 2020). Várias matrizes, incluindo quitosana (KIM; LEE, 2019), agarose (MIGUEZ; SOUSA; TAVANO, 2023), sílica (LIU *et al.*, 2019), e polímeros sintéticos como o álcool polivinílico (PVA) (SAHIN; OZMEN, 2020), têm sido empregadas na imobilização da tripsina. Dentre os métodos utilizados, a adsorção física é o método mais empregado por manter a alta atividade catalítica e estabilização, além de preservar a estrutura nativa de diferentes enzimas industriais devido à ausência de modificações químicas. Porém, a dessorção de algumas moléculas de enzimas das superfícies externas e/ou internas dos suportes torna-se um problema (GARCIA-GALAN *et al.*, 2011). Dessa forma, uma abordagem eficaz seria o uso de um suporte heterofuncional, que é definido como aquele que possui funcionalidades distintas em sua superfície capazes de interagir com uma enzima, tanto por interações químicas e/ou físicas, o que evita a inativação de proteases por precipitação, autólise e/ou distorção de sua estrutura

(BARBOSA *et al.*, 2013; LIU *et al.*, 2021; WAHAB *et al.*, 2020). Para a construção dos suportes heterofuncionais, a superfície dos materiais pode ser ativada usando agentes bifuncionais específicos, como o glutaraldeído, a divinilsulfona, epóxi ou silanos (AGHAEI; YASINIAN; TAGHIZADEH, 2021; MACHADO *et al.*, 2019; MIGUEZ *et al.*, 2018; PINHEIRO *et al.*, 2019; VASCONCELOS *et al.*, 2020).

Portanto o material escolhido foi a quitosana, extensivamente utilizada como matriz de suporte para a imobilização de enzimas (CARNEIRO *et al.*, 2014; DIVIESTI; HOLZ, 2023; NUNES *et al.*, 2021; OKURA *et al.*, 2020; URRUTIA *et al.*, 2018), é derivada da desacetilação da quitina, um polissacarídeo encontrado em várias fontes, incluindo o exoesqueleto de insetos e crustáceos, como caranguejos, camarões e lagostas (AZMANA *et al.*, 2021; KOU; PETERS; MUCALO, 2021). Este biomaterial é um subproduto abundante da indústria pesqueira (KOU; PETERS; MUCALO, 2021), e tem aplicações específicas em medicamentos de liberação controlada, alimentos funcionais e conservantes alimentares (ARANAZ *et al.*, 2009). A quitosana é altamente adequada para a imobilização de enzimas – uma vez que é não tóxica – fácil de biodegradar, altamente biocompatível e possui uma forte afinidade por proteínas (RIBEIRO *et al.*, 2021). Sua estrutura contém diferentes grupos, como hidroxil e amino livre, o que facilita ainda mais a imobilização de enzimas (SOOZANIPOUR *et al.*, 2019; WAHBA, 2017). No entanto, a modificação de sua estrutura química é preferível quando se busca obter um material mais resistente quimicamente. Além disso, ao imobilizar a enzima covalentemente no suporte, seus grupos amino são modificados com uma variedade de grupos capazes de reagir covalentemente com outras enzimas, transformando-o em um suporte heterofuncional, como exemplificado na quitosana (BASHIR; SOOD; BANDRAL, 2020; PINHEIRO *et al.*, 2019).

Para esse projeto foi utilizado o glutaraldeído, que é um dos agentes bifuncionais mais comumente usados para ativar suportes aminados, como a quitosana, em processos de imobilização de enzimas (BARBOSA *et al.*, 2014). Por meio de ligações covalentes, ele interage com vários grupos químicos presentes na estrutura da proteína, em particular grupos amino primários, tióis, fenóis e imidazol (BARBOSA *et al.*, 2013, 2014; ELIAS *et al.*, 2018; KIM; LEE, 2019; MONTEIRO; AIROLDI, 1999). O grupo amino mais reativo que auxilia na ligação covalente da proteína ao suporte, por meio de um reticulador, é geralmente o grupo amino terminal (SASAI *et al.*, 2017). A reação do glutaraldeído com grupos amino primários da enzima e do suporte é capaz de produzir um suporte heterofuncional dotado da capacidade de apresentar interações físicas e químicas com enzimas (BASHIR; SOOD; BANDRAL, 2020; PINHEIRO *et al.*, 2019; WAHAB *et al.*, 2020).

Neste sentido, o objetivo do estudo foi projetar um suporte heterofuncional derivado de um hidrogel de quitosana (Qui–Glu–Gli) para imobilizar a tripsina do pâncreas suíno. Este suporte conterá grupos catiônicos tanto provenientes do suporte quanto da glicina, bem como grupos aniônicos da glicina e certa hidrofobicidade dos grupamentos de glutaraldeído, resultando em uma forte capacidade de adsorção. A tripsina fisicamente imobilizada será subsequentemente usada para hidrolisar a albumina sérica bovina (ASB) em um sistema em batelada (SHU *et al.*, 2015). Esse suporte heterofuncional foi preparado por meio da ativação sequencial de hidrogéis de quitosana com glutaraldeído, seguida da funcionalização do glutaraldeído com glicina, e foi inicialmente utilizado para imobilizar eficientemente uma lipase microbiana, exibindo alta atividade catalítica e estabilidade operacional em uma reação de esterificação (OKURA *et al.*, 2020).

É importante ressaltar que nossa revisão bibliográfica na base de dados Scopus não revelou nenhuma aplicação anterior deste suporte na imobilização de proteases, incluindo a tripsina do pâncreas suíno, destacando a contribuição inovadora do estudo. A investigação envolve a avaliação da influência do pH na imobilização da tripsina e na carga, além da realização de estudos cinéticos de adsorção no suporte preparado, seguido de testes de dessorção da tripsina. O estudo também inclui uma avaliação da influência da temperatura na atividade da enzima e em sua estabilidade térmica, e determina os parâmetros cinéticos e termodinâmicos. Preparações tanto de tripsina solúvel quanto imobilizada foram empregadas na hidrólise da proteína ASB, que foi selecionada devido à sua solubilidade em água e estrutura bem conhecida (BUJACZ, 2012). Para avaliar a aplicabilidade prática deste biocatalisador, conduzimos testes de reutilização em um sistema sequencial em batelada, empregando um substrato que replica de perto as condições de um substrato de ASB utilizado na indústria para a produção de peptídeos (ATACAN; ÇAKIROĞLU; ÖZACAR, 2016).

2 OBJETIVOS

O objetivo geral é a produção de um biocatalisador heterofuncional a base de quitosana modificada, para a imobilização da tripsina de pâncreas suína capaz de aumentar sua estabilidade térmica e operacional sem que haja significativa perda de atividade hidrolítica, tornando-se capaz de produzir hidrolisados proteicos.

Levando em consideração estes aspectos, o objetivo geral do projeto foi alcançado mediante à execução das seguintes etapas:

- a) Preparação das partículas de quitosana-glutaraldeído-glicina (Qui-Glu-Gli) preparado via sequencial ativação do hidrogel de quitosana;
- b) Avaliar e caracterizar o derivado, determinando suas propriedades catalíticas, bem como selecionar o biocatalisador com a maior atividade catalítica e concentração de proteínas imobilizadas;
- c) Avaliação do impacto do pH de imobilização no desempenho da imobilização, na atividade hidrolítica e na atividade específica;
- d) Avaliação do impacto do tempo na etapa de imobilização da tripsina de pâncreas suína por meio da aplicação de análises cinéticas de adsorção, empregando modelos cinéticos de adsorção;
- e) Avaliação do potencial de dessorção da tripsina de pâncreas suína sob condições variadas de força iônica, valores de pH na solução e a presença de detergentes, a fim de caracterizar as diversas formas de interação entre a enzima e o suporte;
- f) Avaliação da influência da temperatura na atividade da tripsina de pâncreas suína;
- g) Avaliação da estabilidade térmica da tripsina de pâncreas suína em suas formas solúvel e imobilizada, juntamente com a determinação dos parâmetros cinéticos e termodinâmicos associados;
- h) Condução da hidrólise da albumina sérica bovina com o intuito de avaliar o desempenho potencial do produto derivado da hidrólise proteica, comparativamente à enzima solúvel;
- i) Realizar um estudo de estabilidade operacional para avaliar a viabilidade de reutilizar o derivado desenvolvido em várias iterações durante a hidrólise da proteína da albumina sérica bovina.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 HIDRÓLISE DE PROTEÍNA

Uma proteína é uma macromolécula geralmente composta por uma variedade de aminoácidos diferentes (AAs), ligados entre si por meio de ligações peptídicas. A proteína é um componente importante dos tecidos animais (por exemplo, músculo esquelético, glândulas mamárias, fígado e intestino delgado) e produtos derivados (por exemplo, carne, leite, ovos e lã) (MOORE; STEIN, 1948; MUSTATEA *et al.*, 2019).

A hidrólise de proteína é um processo químico ou enzimático no qual ocorrem a clivagem das ligações peptídicas que mantêm as proteínas unidas, resultando na divisão das proteínas em fragmentos menores, como peptídeos e aminoácidos. Consiste em um processo importante em várias aplicações industriais, incluindo na produção de alimentos, suplementos nutricionais, produtos farmacêuticos e produtos químicos, pois pode melhorar a digestibilidade, a solubilidade e a funcionalidade das proteínas (TAVANO, 2013).

O método de escolha para a hidrólise de proteínas depende de suas fontes. Por exemplo, as proteínas provenientes de penas, cerdas, chifres, bicos ou lã contêm a estrutura de queratina e, portanto, são geralmente hidrolisadas por tratamento ácido ou alcalino, ou por queratinases bacterianas (TACIAS-PASCACIO *et al.*, 2020). Em contraste, produtos de origem animal (por exemplo, caseína, soro, intestino e carne) e ingredientes vegetais (por exemplo, proteínas de soja, trigo, arroz, ervilha e algodão) frequentemente são submetidos à hidrólise enzimática ou microbiana geral (TACIAS-PASCACIO *et al.*, 2020; TAVANO, 2013; TAVANO *et al.*, 2018).

Os processos químicos, incluindo a hidrólise alcalina ou ácida, tendem a ser difíceis de controlar e produzem produtos com aminoácidos modificados. Portanto, condições convencionais de hidrólise ácida para a determinação de aminoácidos, que envolvem o uso de ácido forte em altas temperaturas acima de 100 °C durante longos períodos de tempo, podem resultar na destruição do triptofano. (MUSTATEA *et al.*, 2019; TSUGITA; SCHEFFLER, 1982). A hidrólise alcalina pode reduzir quimicamente o conteúdo de cistina, arginina, treonina, serina, isoleucina e/ou lisina e formar resíduos de aminoácidos incomuns (WEFSH *et al.*, 1974). A hidrólise enzimática pode ser realizada em condições suaves e evitar os ambientes extremos necessários para tratamentos químicos. Geralmente, os processos enzimáticos evitam reações secundárias e não diminuem o valor nutricional da fonte de proteína (TAVANO, 2013). Diferentes enzimas proteolíticas são usadas para hidrólise, como papaína, pepsina, pancreatina, tripsina, quimotripsina, álcalis, termolisina, juntamente com as enzimas de fontes bacterianas e

fúngicas, dependendo sobre a proteína-mãe para produzir hidrolisados de proteína (KORHONEN; PIHLANTO, 2006).

3.2 PROTEASES

As proteases (também conhecidas como peptidases, enzimas proteolíticas e hidrolases de ligação peptídica) desempenham papéis importantes nas vias biológicas dos seres vivos. Elas desempenham uma importância fundamental, mesmo nos organismos mais primitivos (SINGH *et al.*, 2016). São um grupo importante de enzimas industriais e correspondem a quase 60% de todo o mercado de enzimas, representando também 40% das vendas globais totais de enzimas (MUTHULAKSHMI *et al.*, 2011; SHARMA *et al.*, 2019). São classificadas de diversas formas, e a diferenciação fundamental entre as proteases ocorre devido à seletividade na quebra das ligações peptídicas, o que leva à classificação das proteases em endopeptidases e exopeptidases (SINGH; SINGH; PANDEY, 2019).

Exopeptidases catalisam a quebra de ligações peptídicas de proteínas distintas adjacentes aos terminais carboxila e amino presentes no substrato. Dependendo da precisão quanto ao local de ação, seja o terminal C ou N, são adicionalmente classificadas em duas principais categorias: carboxipeptidases ou aminopeptidases (SANI *et al.*, 2017; TACIAS-PASCACIO *et al.*, 2020). Por outro lado, as endopeptidases quebram a ligação peptídica no interior da cadeia proteica (DORNELLES *et al.*, 2018).

É importante notar que a função hidrolítica das proteases não ocorre aleatoriamente e varia entre diferentes proteases. Elas apresentam especificidades e seletividades distintas, resultando em uma grande variedade de produtos finais na hidrólise de proteínas, mesmo quando se utiliza o mesmo extrato proteico como substrato. Essas diferenças nas ações das proteases podem ser consideradas uma vantagem, pois proporcionam uma ampla variedade de "ferramentas" a serem escolhidas, permitindo a obtenção de uma ampla gama de produtos finais a partir da mesma fonte de proteína hidrolisada (NAVEED *et al.*, 2021; SOUZA JÚNIOR *et al.*, 2020). Essas características das proteases derivam da interação do centro ativo da enzima com a cadeia proteica do substrato, o que é altamente influenciado pela configuração do sítio ativo da enzima. Além disso, as proteases podem ser classificadas em grupos com base em suas características estruturais e sítios catalíticos, incluindo peptidases aspárticas, cisteínicas, de metal e de serina, bem como aquelas com mecanismos catalíticos mistos ou de tipo desconhecido (DORNELLES *et al.*, 2018).

3.2.1 Proteases na indústria

As proteases são amplamente utilizadas em muitas indústrias biotecnológicas (SIRISHA; JAIN; JAIN, 2016). O uso de enzimas proporcionou oportunidades para o desenvolvimento de química industrial verde, moderna e sustentável devido à sua excepcional especificidade, condições de reação suaves, economia, simplicidade e processos econômicos (BASSO; SERBAN, 2019). Cerca de 60% do mercado industrial de enzimas era atendido por enzimas hidrolíticas, como lipase, protease e amilase, por exemplo (BASHIR; SOOD; BANDRAL, 2020). Foi relatado que 60% das enzimas utilizadas pela indústria são empregadas por grandes setores, como o de produtos de limpeza, têxteis, panificação e ração animal. (NAVEED *et al.*, 2021).

A atuação das proteases na indústria dos alimentos, têm sido cruciais na produção de hidrolisados proteicos para melhorar a qualidade nutricional de alimentos e rações, sendo essenciais no tratamento de distúrbios digestivos. Podem ser obtidas de diversos substratos e proteases comerciais (BUENO *et al.*, 2020; LAMBRÉ *et al.*, 2021). São amplamente aplicadas na indústria alimentícia, em processos como a maceração de cereais, produção de cerveja, clarificação de cerveja, coagulação de queijos e fabricação de produtos de panificação. Na indústria de laticínios, modificam o sabor e reduzem a lactose. Sua versatilidade e importância se estendem por diferentes áreas, contribuindo para a produção de alimentos de qualidade (MUSTATEA *et al.*, 2019; TAVANO *et al.*, 2018).

Nas indústrias de detergentes, as proteases desempenham um papel essencial, representando cerca de 30% da produção global de enzimas e sendo fundamentais em diversas aplicações na biotecnologia industrial (NAVEED *et al.*, 2021). As enzimas auxiliam na remoção de manchas difíceis de serem eliminadas apenas com surfactantes convencionais. As proteases têm um importante papel na hidrólise de grandes moléculas proteicas associadas a manchas persistentes. Durante a hidrólise, as ligações peptídicas que mantêm a molécula proteica unida são quebradas, liberando polipeptídeos menores e aminoácidos (HOU *et al.*, 2017; ROCHA; GONALVES; TEIXEIRA, 2011).

A indústria de processamento de couro envolve diversas etapas, como maceração, curtimento, remoção de pelos, neutralização, desengorduramento e decapagem, que frequentemente utilizam produtos químicos nocivos, como cal, sal, solventes e sulfeto de sódio, resultando em poluição ambiental (FANG *et al.*, 2017). O colágeno é a principal proteína encontrada no couro, mas é essencial remover outros componentes não relacionados ao colágeno para determinar a maciez e durabilidade finais do couro (FANG *et al.*, 2017). O uso

de enzimas, como proteases, em substituição aos produtos químicos, busca reduzir a poluição ambiental e alcançar uma remoção eficiente das proteínas indesejadas na produção de couro (CERA; DI, 2009).

Na indústria de cosméticos, as proteases atuam na quebra de ligações peptídicas que unem queratina, elastina e colágeno na pele (VASCONCELOS *et al.*, 2020). Enzimas como bromelina, papaína e outras têm sido empregadas para suavizar e esfoliar a pele. Essas proteases desempenham um papel na renovação celular, removendo células mortas da epiderme e estimulando a substituição por células semelhantes, enquanto exercem atividade ceratolítica (TACIAS-PASCACIO; MORELLON-STERLING *et al.*, 2021).

Outros segmentos da indústria também utilizam as proteases na indústria química como a produção de ésteres e peptídeos na presença de solventes, na indústria farmacêutica as proteases são utilizadas na cicatrização (VASCONCELOS *et al.*, 2020). Além da utilização na produção de cosméticos, e no tratamento de resíduos (NAVEED *et al.*, 2021).

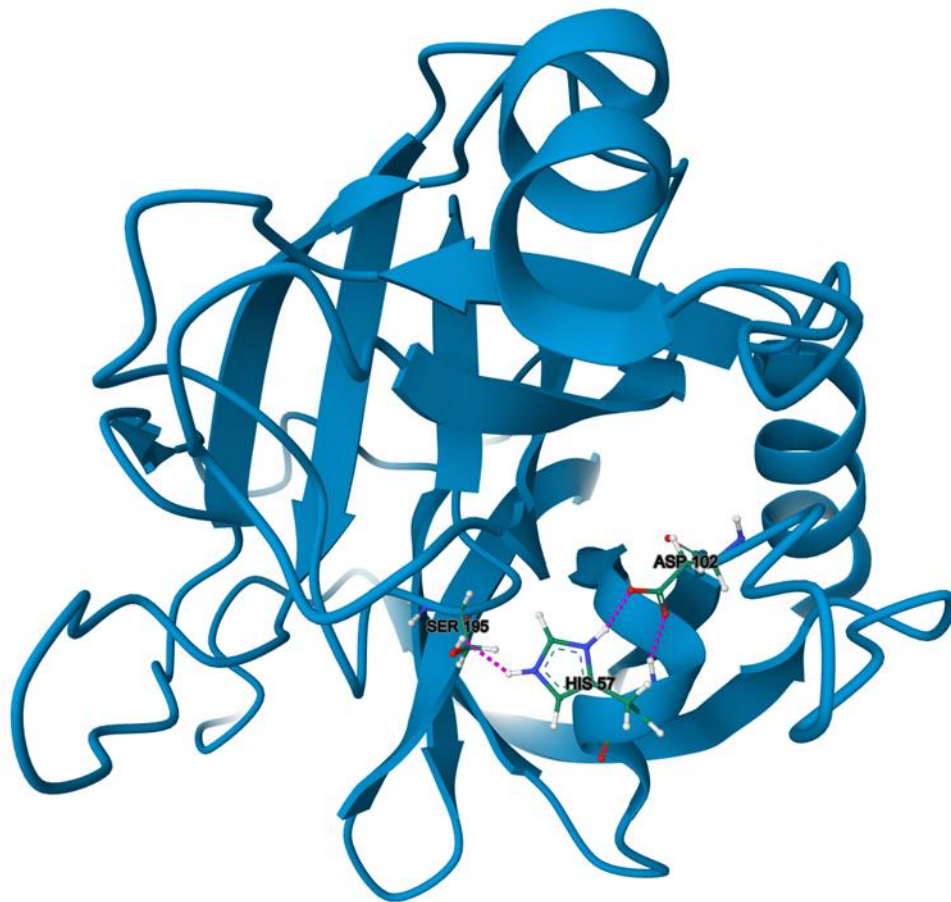
3.3 TRIPSINA

As proteases de serina desfrutam de uma ampla diversidade na natureza, ocorrendo não apenas em todo o reino dos organismos celulares, mas também estão presentes em muitos genomas virais. Das enzimas proteolíticas conhecidas, um terço delas são proteases de serina. Geralmente, essas proteases são endopeptidases, nas quais a clivagem da ligação ocorre na porção central da cadeia. Algumas delas são exopeptidases, que destacam aminoácidos do final da sequência de polipeptídeo. Seu nome origina-se do resíduo de Serina, que é nucleofílico e reside no sítio ativo da enzima. Um intermediário acil-enzima é formado pelo ataque do resíduo de serina na extremidade carbonila da próxima ligação de substrato de peptídeo. (KUMAR, DINESH *et al.*, 2019; PAGE; DI CERA, 2008).

Dentro dessa família de proteases de serina, a tripsina (EC 3.4.21.4) ocupa um lugar de destaque. Ela pertence à família de serina endoproteases e atua como uma das principais enzimas digestivas secretadas pelo pâncreas de animais. Têm seu papel vital no processo digestivo que envolve a ativação de zimógenos, como o quimotripsinogênio e o procarboxipeptidase (NAVEED *et al.*, 2021). Em comparação com outras tripsinas, como a bovina ou a humana, a tripsina do pâncreas suíno exibe a maior atividade na hidrólise de proteínas (DENG; GRUPPEN; WIERENGA, 2018). Sua estrutura é caracterizada por uma conformação composta por duas folhas beta antiparalelas, cada uma com seis hastes. Os resíduos catalíticos estão posicionados na interface entre essas folhas beta. Aminoácidos como,

His 57 e Asp 102 têm origem na barra beta N-terminal, enquanto Ser 195 tem origem na barra C-terminal (NIEMIROWICZ; FRASCH; JOSÉ CAZZULO, 2013), como demonstrado na Figura 1. A tripsina compartilha essa dobradura com outras proteinases pancreáticas, como a quimotripsina (BODE; FEHLHAMMER; HUBER, 1976).

Figura 1 – Representação em cartoon da estrutura tridimensional da tripsina do pâncreas suíno (*Sus scrofa*) (TRANSUE *et al.*, 2004). Esta estrutura ilustra as duas estruturas de barril beta da enzima. As linhas cor-de-rosa representam as conexões entre os resíduos catalíticos formados por His57, Asp102 e Ser195. Código PDB 1S81.

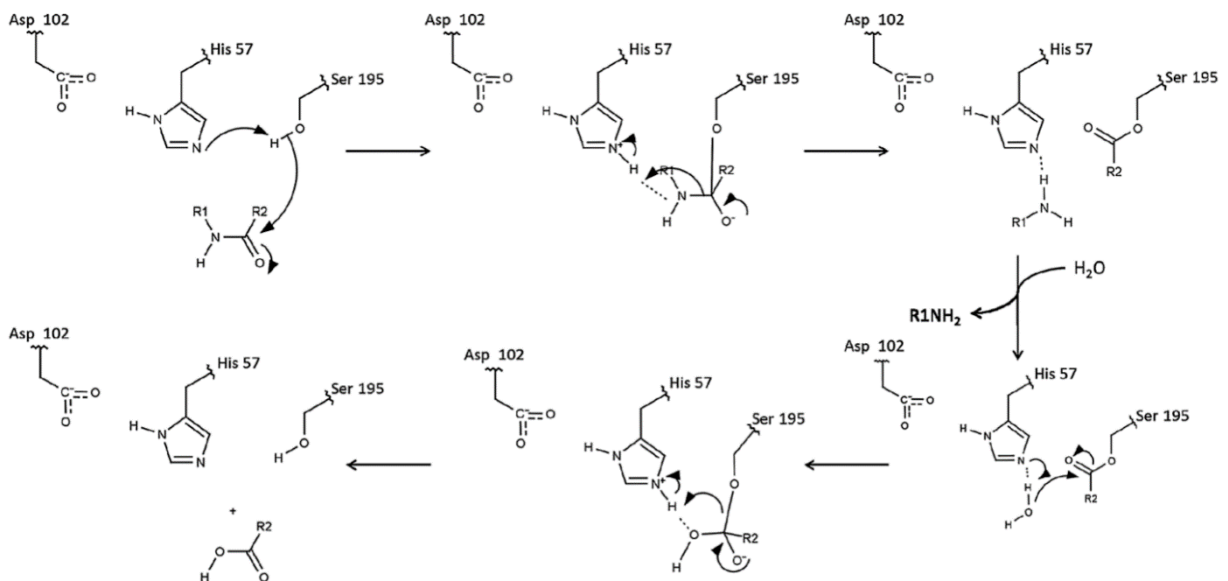


Fonte: Do Autor.

Especificamente, a tripsina hidrolisa as ligações carboxi-terminais (C-terminais) de aminoácidos catiônicos, como arginina e lisina (PERERA *et al.*, 2015). O mecanismo de catálise, frequentemente referido como o sistema de transmissão de carga, baseia-se em três resíduos essenciais: 'Ser' 195, 'His' 57 e 'Asp' 102, que formam a tríade catalítica, como

mencionado anteriormente. Nessa tríade, o 'Ser' atua como nucleófilo, dando início à reação, enquanto o 'His' desempenha um papel duplo. Na primeira etapa, chamada de acilação, o 'His' catalítico age como uma base geral, recebendo um íon de hidrogênio do grupo hidroxila do 'Ser' catalítico, o que promove a formação do intermediário tetraédrico. Posteriormente, na mesma etapa, o 'His' catalítico age como um ácido, doando o próton adquirido para o grupo amina que é liberado quando o intermediário tetraédrico colapsa, ligando assim a primeira etapa com a segunda utilizando a 'His'. Semelhante à primeira etapa, na segunda etapa, denominada de deacetilação, o 'His' catalítico atua como uma base para ativar uma molécula de água, seguido de seu papel como ácido ao doar um próton para o oxigênio da hidroxila do 'Ser' que está sendo liberado. A presença do 'Asp' é fundamental para posicionar adequadamente o 'His' e formar uma ligação de hidrogênio. Essa orientação facilita a remoção do próton do 'Ser', gerando um nucleófilo altamente reativo. Esse sistema de transmissão de carga é uma característica comum a todas as outras serina proteases relacionadas, bem como a proteínas bacterianas, como a subtilisina (BRUGGEN E MOL BIO, 1969; HEDSTROM, 2002; KASSERRA E LAIDLER, 1969). O mecanismo da tripsina pode ser acompanhado pela Figura 2.

Figura 2 – A representação gráfica do mecanismo de reação da tripsina utiliza setas para indicar a direção do fluxo de elétrons em cada fase. Na primeira etapa ocorre a formação de um intermediário acil-enzima, que resulta na liberação da porção N-terminal da ligação peptídica clivada. Em seguida, na etapa subsequente, uma molécula de água (H_2O), ativada pela histidina (His), interage com o intermediário acil-enzima, ocasionando a liberação da porção C-terminal da ligação peptídica clivada.



Fonte: VANDERMARLIERE; MUELLER; MARTENS, 2013.

A utilização satisfatória da tripsina e de outras enzimas na indústria requer atender a algumas necessidades essenciais, pois alta eficiência e estabilidade térmica são cruciais na aplicação industrial de protease, o ambiente industrial desafiador frequentemente dificulta o uso de enzimas nativas, onde a temperatura desempenha um papel crítico na eficiência enzimática. (LONHIENNE *et al.*, 2000; SAQIB; SIDDIQUI, 2018; SILVA *et al.*, 2018). Além disso, nas reações em batelada, a estabilidade e reutilização de enzimas solúveis representam desafios a serem superados. Para atender a essas necessidades, as técnicas de imobilização de enzimas em suportes sólidos se destacam como uma abordagem promissora para tornar seu uso conveniente e econômico, facilitando a reutilização e aprimorando a estabilidade (BOUDRANT; WOODLEY; FERNANDEZ-LAFUENTE, 2020; GUIBAN *et al.*, 2020; REMONATTO *et al.*, 2022).

Outro problema a ser considerado é a autólise das proteases, uma característica indesejável na qual uma molécula de protease se torna o substrato da própria enzima. Para evitar esse fenômeno, costuma-se empregar baixas concentrações de proteases, o que, por sua vez, possa diminuir a taxa de reação. A imobilização é uma técnica eficaz para superar essa limitação, pois as proteases são impossibilitadas de interagir mutuamente na forma imobilizada (TAVANO *et al.*, 2018). Isso proporciona benefícios como controle de processo, redução de custos e fácil separação das enzimas após a transformação catalisada (GUIBAN *et al.*, 2020).

3.4 IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS

Apesar das vastas vantagens associadas ao uso de enzimas em comparação com catalisadores tradicionais, surgem algumas complicações ao utilizá-las em suas formas brutas (BRADY; JORDAAN, 2009) A utilização de enzimas em algumas aplicações em larga escala não é a escolha ideal para a catálise, uma vez que essas moléculas de proteínas são tipicamente instáveis, têm uma vida útil curta e podem ser facilmente inativados por vários mecanismos. As enzimas são altamente sensíveis a diversas condições rigorosas de processo por exemplo, temperatura elevada, pH extremo, etc.) (RIBEIRO *et al.*, 2011). Além disso, várias questões técnicas surgem com o uso de enzimas em aplicações industriais, tornando-as praticamente não confiáveis. Por exemplo, a maioria dos tipos de enzimas opera melhor quando dissolvida em água em sistemas de catálise homogênea, ao contrário dos catalisadores químicos heterogêneos convencionais (BRADY; JORDAAN, 2009). Os métodos tradicionais para recuperação e reutilização de enzimas, por sua vez, são muito difíceis de serem alcançados. Conforme ilustrado na Quadro 1, tais problemas podem ser prevenidos ou, pelo menos, reduzidos por meio

do uso de diferentes técnicas de imobilização (RIBEIRO *et al.*, 2011; SHELDON; PELT, 2013).

Quadro 1 – Problemas associados ao uso de enzimas (direita) e as vantagens dos processos de imobilização (esquerda).

<ul style="list-style-type: none"> • Alta estabilidade; • A enzima e o suporte são fáceis de serem recuperados; • Possibilidade de utilização em meio não aquoso; • Possibilidade de aumento da atividade catalítica; • Reutilização da enzima; 	<ul style="list-style-type: none"> • Baixa estabilidade; • Alta sensibilidade as condições do processo; • Facilmente inativada por diversos mecanismos; • Dificuldade de recuperação e reutilização;
--	--

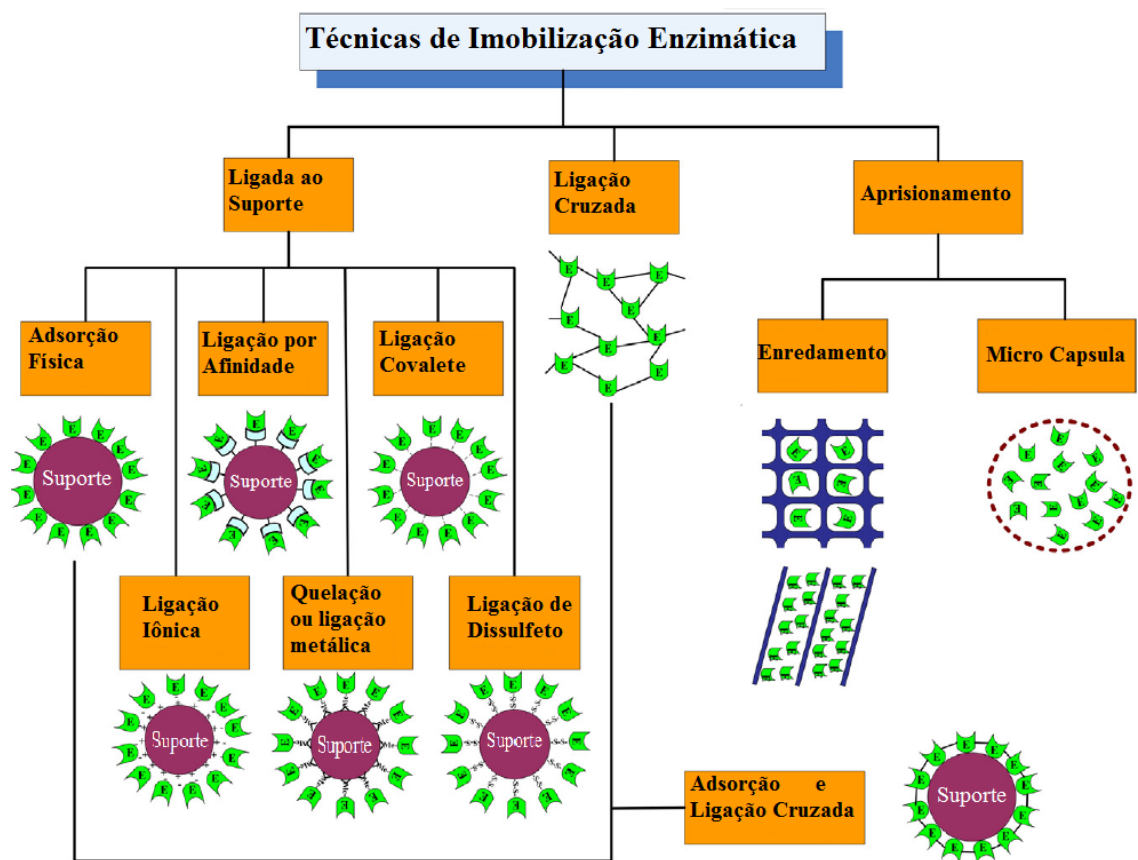
Fonte: BASSO; SERBAN, 2019.

A pesquisa sobre a imobilização de enzimas tem sido muito atrativa por conta de sua aplicação industrial. A definição de uma enzima imobilizada é a “enzima fisicamente confinada ou localizada em certa região definida do espaço, com retenção de sua atividade catalítica, que pode ser utilizada repetida e continuamente” (BICKERSTAFF, 1997). As tecnologias de imobilização vêm cada vez mais progredido gradualmente, o recente avanço nas tecnologias de biotecnologia e nanotecnologia reacendeu consideravelmente o interesse nas estratégias de imobilização de enzimas. Algumas dessas estratégias envolvem a fixação ou aprisionamento de enzimas em materiais de suporte sólidos (ZDARTA *et al.*, 2018). Os pesquisadores propuseram diversos materiais de suporte, bem como abordagens benéficas para a imobilização de enzimas. A principal função desses suportes é estabilizar as estruturas das enzimas, preservando assim sua eficácia e tornando-as mais resistentes ao ambiente reacional (GUISAN *et al.*, 2020).

A imobilização de enzimas oferece a vantagem de facilitar a recuperação tanto das enzimas usadas quanto dos materiais de suporte, o que é particularmente benéfico em aplicações nas áreas de alimentos, medicina e farmacêutica (BERNAL; RODRÍGUEZ; MARTÍNEZ, 2018; SINGH *et al.*, 2016). As enzimas em suas formas imobilizadas apresentam uma estabilidade muito maior e são mais fáceis de manusear em comparação com suas formas solúveis (BRADY; JORDAAN, 2009). Além disso, as reações enzimáticas podem ocorrer em meios não aquosos, onde os suportes sólidos preservam os componentes das enzimas, tornando-

as mais robustas, o que melhora sua atividade catalítica e permite que sejam reutilizadas várias vezes (RODRÍGUEZ-NÚÑEZ; BERNAL; MARTÍNEZ, 2021; SHELDON, 2007). Outra vantagem do processo de imobilização é que os catalisadores podem transitar de formas homogêneas para heterogêneas após a ligação enzimática, facilitando a separação das enzimas e a produção de produtos com alta pureza (HANEFELD; MAGNER, 2013). Diversos métodos de imobilização têm sido empregados até o momento, incluindo encapsulamento, reticulação, ligação covalente, adsorção e aprisionamento, conforme ilustrado na Figura 3.

Figura 3 – Métodos de imobilização enzimática.



Fonte: ZHAO *et al.*, 2015.

A Figura 3 apresenta os métodos de imobilização, que são divididos em três categorias: ligação cruzada, aprisionamento e a enzima ligada diretamente a um suporte (BILAL; IQBAL, 2019). Cada método pode influenciar a enzima e suas propriedades, como atividade, estabilidade e seletividade (HANEFELD; MAGNER, 2013). Na técnica de aprisionamento, a enzima fica fisicamente aprisionada em uma rede polimérica, como alginato, colágeno, agarose, gelatina e poliácridamida, impedindo o contato direto com o ambiente. O aprisionamento é a estratégia mais simples de imobilização enzimática e não causa alterações estruturais. No

entanto, essa abordagem é caracterizada por uma baixa carga enzimática e limitações na transferência de massa (THANGARAJ; SOLOMON, 2019). O método de imobilização por ligação cruzada, ou reticulação intermolecular de proteínas, cria um agregado de enzimas insolúveis, proporcionando alta estabilidade, mas pode causar um alto impedimento estérico ao substrato, tornando-o incapaz de alcançar o sítio ativo da enzima (ZHOU *et al.*, 2015). Esse método depende do uso de reagentes de acoplamento para reticular as moléculas da enzima. Agentes flocculantes, como poliaminas, polietilenimina, sulfonatos de poliestireno e vários fosfatos, têm sido amplamente utilizados. Os métodos químicos de reticulação geralmente envolvem ligações covalentes entre enzimas usando reagentes bi ou multifuncionais, como o glutaraldeído (THANGARAJ; SOLOMON, 2019; VOBĚRKOVÁ *et al.*, 2018).

Por fim, os métodos de imobilização de enzimas ligadas a um suporte sólido podem ocorrer por interações covalentes entre a enzima e um suporte sólido insolúvel, ou pela adsorção da enzima na superfície do suporte (MERYAM SARDAR, 2015; THANGARAJ; SOLOMON, 2019). A imobilização por ligação covalente é uma técnica bem estabelecida de imobilização de enzimas que é realizada conectando as enzimas a materiais de suporte (por exemplo, sílica porosa, poliacrilamida, agarose, vidro poroso etc.) por meio de ligações altamente estáveis e fortes. A ligação covalente possui muitas vantagens, como a produção de enzimas mais estáveis com a possibilidade de recuperação das enzimas para serem reutilizadas. A ligação covalente também aumenta a sua estabilidade (WELTZ *et al.*, 2020). A imobilização de enzimas por ligação covalente ao suporte é irreversível devido à forte interação entre a enzima e o suporte. Essa interação ocorre entre os grupos funcionais presentes nas enzimas e os grupos presentes na matriz do suporte (RODRIGUES *et al.*, 2021).

A imobilização por adsorção é uma técnica simples de imobilização em que a imobilização reversível é alcançada. Essa técnica depende principalmente da adsorção física. Os materiais aplicados para que a adsorção ocorra incluem resinas de troca iônica, alumina, carvão ativado, dentre outros (DATTA; CHRISTENA; RAJARAM, 2012). Este método é relativamente barato e de fácil implementação, no entanto, possui uma fraca força de ligação (ligações de hidrogênio, interações iônicas, ligações hidrofóbicas, etc.) entre o suporte e a enzima, para que ocorra uma adsorção adequada, algumas condições devem ser atendidas, ou seja, a afinidade entre a enzima e o suporte é de vital importância (BERNAL; RODRÍGUEZ; MARTÍNEZ, 2018).

A ligação iônica é uma técnica direta, simples, econômica e reversível de imobilização que envolve a interação iônica entre as enzimas e os materiais de suporte. A característica principal dessa imobilização não covalente é que o procedimento pode ser revertido facilmente

alterando a temperatura e a força iônica (MIGUEZ, *et al.*, 2018). Os materiais de suporte usados nessa técnica de imobilização geralmente devem ser carregados eletricamente (TAPDIGOV, 2021). A ligação iônica pode ser facilmente desfeita através de alterações no pH ou por meio da precipitação das enzimas devido à adição de sais. Para manter um pH ótimo durante a reação, é feito um controle simples da acidez/alcalinidade na mistura, uma vez que a matriz que imobiliza a enzima é constantemente carregada eletricamente. A presença de um suporte com carga elétrica pode acarretar em algumas complicações, como a distorção na estrutura da enzima, alterações na cinética enzimática, entre outros. Além disso, cargas excessivas podem prejudicar a catálise enzimática, o que pode resultar em uma diminuição no rendimento do produto (FUENTES *et al.*, 2007; MORELLON-STERLING *et al.*, 2022).

3.4.1 Imobilização em suporte heterofuncionais

É fundamental reconhecer que a imobilização não garante, necessariamente, a estabilidade da enzima. Na verdade, se o protocolo de imobilização não for meticulosamente projetado, permitindo, por exemplo, interações não controladas entre a enzima e o suporte, as enzimas imobilizadas podem, em vez disso, ser menos estáveis do que suas contrapartes solúveis (BARBOSA *et al.*, 2013).

Diante dessa necessidade, muitos pesquisadores têm se empenhado em compreender e controlar o processo de imobilização de enzimas, visando a utilizar essa abordagem como uma ferramenta poderosa para aprimorar as propriedades das enzimas, como estabilidade, atividade, seletividade e redução de inibições (BEZERRA *et al.*, 2020).

A seleção do protocolo de imobilização e da matriz de suporte mais apropriados depende, principalmente, das condições do processo catalítico e da natureza da enzima envolvida. Para uma escolha adequada do método de imobilização, alguns aspectos-chave devem ser considerados: (1) a escolha criteriosa do suporte (com uma ampla área interna e alta densidade de grupos reativos); (2) as características dos grupos reativos no suporte (idealmente, devem apresentar baixo impedimento estérico para interagir com a enzima e alta estabilidade nas condições de imobilização); e (3) condições de imobilização adequadas (que favoreçam tanto a reatividade dos grupos funcionais do suporte quanto a atividade catalítica da enzima). Portanto, as técnicas de imobilização de enzimas podem aprimorar as aplicações biotecnológicas destes biocatalisadores que, de outra forma, não seriam comumente adequados para a utilização industrial (BARBOSA *et al.*, 2013; BILAL *et al.*, 2019; HANEFELD; CAO; MAGNER, 2013; SILVA *et al.*, 2018).

Nesse sentido, uma estratégia potencialmente mais eficaz para imobilizar proteínas em várias orientações envolve a adoção de diferentes métodos de imobilização. A imobilização de enzimas em um suporte pode atingir maior versatilidade ao utilizar suportes multifuncionais. O termo "suporte heterofuncional" é atribuído àqueles que apresentam várias funcionalidades em sua superfície, sendo essas funcionalidades introduzidas tanto por acaso quanto de forma planejada, o que os capacita a interagir com grupos específicos de uma enzima em diferentes circunstâncias (BARBOSA *et al.*, 2013; ZAAK; SASSI; FERNANDEZ-LAFUENTE, 2018). Além disso, a utilização de diferentes grupos funcionais (como octil, grupos amino primários e secundários, trocadores iônicos e quelatos metálicos) e grupos reativos (incluindo glicoxila, epóxi, aldeído, divinil sulfona, amino ou grupos glutâmicos) demonstra ser altamente eficaz para a adsorção física de proteínas por meio de seus grupos nucleofílicos, capazes de auxiliar na fabricação de suportes com capacidade de interação com a enzima de maneira heterofuncional (BEZERRA *et al.*, 2020; RANJBARI *et al.*, 2019; ZDARTA *et al.*, 2018).

Além disso, para alcançar uma imobilização enzimática eficaz, é crucial considerar as propriedades do material de suporte e a utilização de compostos ativadores, como o glutaraldeído. As propriedades ideais do suporte incluem resistência física à compressão, hidrofobicidade, inércia em relação às enzimas, facilidade de derivatização, biocompatibilidade, resistência ao ataque microbiano e disponibilidade a baixo custo (MERYAM SARDAR, 2015).

Uma variedade de materiais poliméricos naturais, como celulose, alginato, quitina, colágeno, carragenina, quitosana, amido, sefrose, pectina, são amplamente utilizados como suportes devido às suas propriedades vantajosas. Além disso, materiais poliméricos sintéticos oferecem boa estabilidade mecânica e são facilmente modificáveis (BONAZZA *et al.*, 2018; SIRISHA, JAIN; JAIN, 2016).

Também são empregados suportes inorgânicos, como alumina, sílica, zeólitas e sílicas mesoporosas, para a imobilização de enzimas. A escolha do suporte apropriado desempenha um papel fundamental na eficiência da imobilização enzimática (MACHADO *et al.*, 2019; ZDARTA *et al.*, 2015, 2018; ZUCCA; SANJUST, 2014).

Alguns desses materiais estão dispostos na Quadro 2, tornando possível identificar a sua utilização na formação de suportes heterofuncionais utilizados na imobilização de enzimas.

Quadro 2 – Enzimas imobilizadas em suporte heterofuncional.

Matriz de imobilização	Grupo reativo	Enzima (Fonte)	Referência
Closite 30B	Epóxido	Lipase (<i>Candida Rugosa</i>)	(AGHAEI; YASINIAN; TAGHIZADEH, 2021)
Quitosana	Glutaraldeído	Lipase (<i>Thermomyces Lanuginosus</i>)	(OKURA <i>et al.</i> , 2020)
Octil Sepharose CL-4B e sílica	Glutaraldeído	Tripsina (<i>Bos taurus</i>)	(SANTOS <i>et al.</i> , 2023)
Quitosana	Divinil Sulfona	Lipase B (<i>Candida antarctica</i>)	(PINHEIRO <i>et al.</i> , 2019)
Agarose	Epóxido	Proteína recombinante A (<i>Staphylococcus</i>)	(ZHANG <i>et al.</i> , 2020)
Carbano Ativado	Glutaraldeído	Tripsina (<i>Thunnus alalunga</i>)	(POONSIN <i>et al.</i> , 2020)
Lignocelulose	Glutaraldeído	Tripsina (<i>Bos taurus</i>)	(BASSAN <i>et al.</i> , 2016)
Agarose	Vinil Sulfona	β -galactosidase (<i>Aspergillus oryzae</i>)	(ZAAK; SASSI; FERNANDEZ- LAFUENTE, 2018)
Carbano Ativado	Glutaraldeído	Pepsina (<i>Sus scrofa</i>)	(SANTOS, <i>et al.</i> , 2022)
Agarose	Divinil Sulfona	Tripsina (<i>Bos taurus</i>)	(DOS SANTOS <i>et al.</i> , 2015)

Fonte: Do Autor.

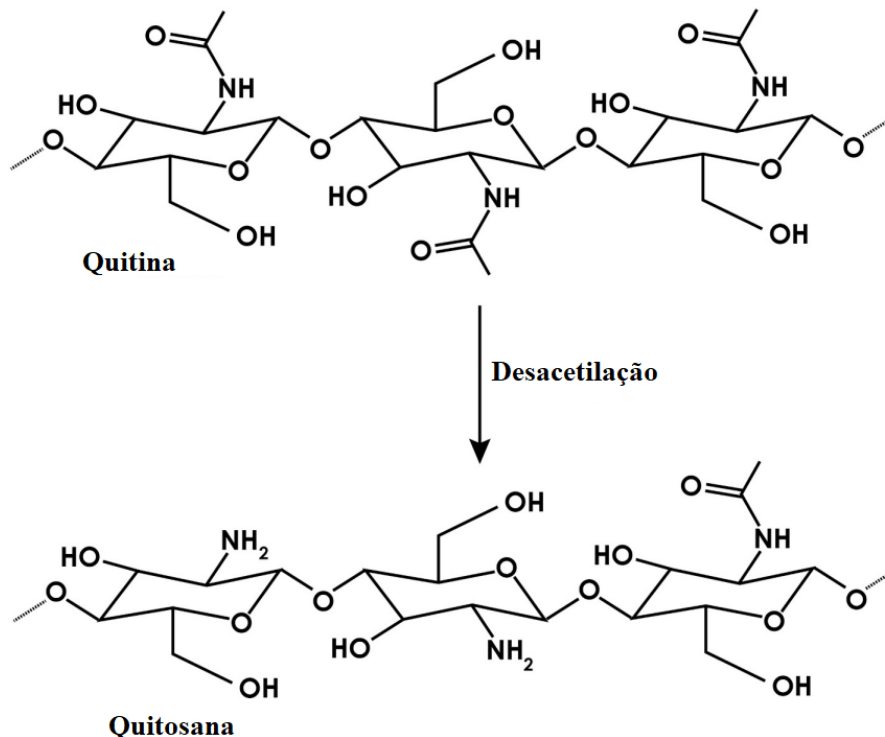
3.5 QUITOSANA

A quitina (β -(1-4)-poli-N-acetil-D-glucosamina) é um polímero natural. Pode ser encontrada nos exoesqueletos de camarões, caranguejos, cutículas de insetos e paredes celulares

de fungos (KOU; PETERS; MUCALO, 2021). Diferentes organismos apresentam variações nos teores de quitina (%), como por exemplo as cascas de crustáceos geralmente apresentam uma constituição em torno de 30% - 50% de carbonato de cálcio e 20% - 30% de quitina, enquanto em alguns gêneros de lagostas, a casca pode chegar a 60% - 75% de conteúdo de quitina (ARBIA *et al.*, 2003; SYNOWIECKI; AL-KHATEEB, 2003).

Para a obtenção da quitosana pelos subprodutos marinhos como crustáceos, é utilizada a reação de desacetilação (Figura 4) utilizando uma solução de KOH, com a reação sendo conduzida a uma temperatura de aproximadamente 100 °C por 1-12 horas e produzem quitosana insolúvel em água com um grau de desacetilação (GD) de 85% - 99% (NO; MEYERS, 1995). A reação consiste na remoção dos grupos acetila da quitina, resultando na formação de quitosana. Esse processo ocorre em duas etapas: primeiro, ocorre a hidrólise em uma solução alcalina, como hidróxido de sódio ou potássio, e em seguida, a quitosana é isolada. Durante a hidrólise, os grupos acetila são quebrados e o acetato de sódio ou potássio são liberados como subprodutos. A quitosana resultante tem um grau de desacetilação variável, dependendo das condições da reação, e possui propriedades diferentes da quitina, sendo útil em diversas aplicações industriais e biomédicas (METHACANON *et al.*, 2003).

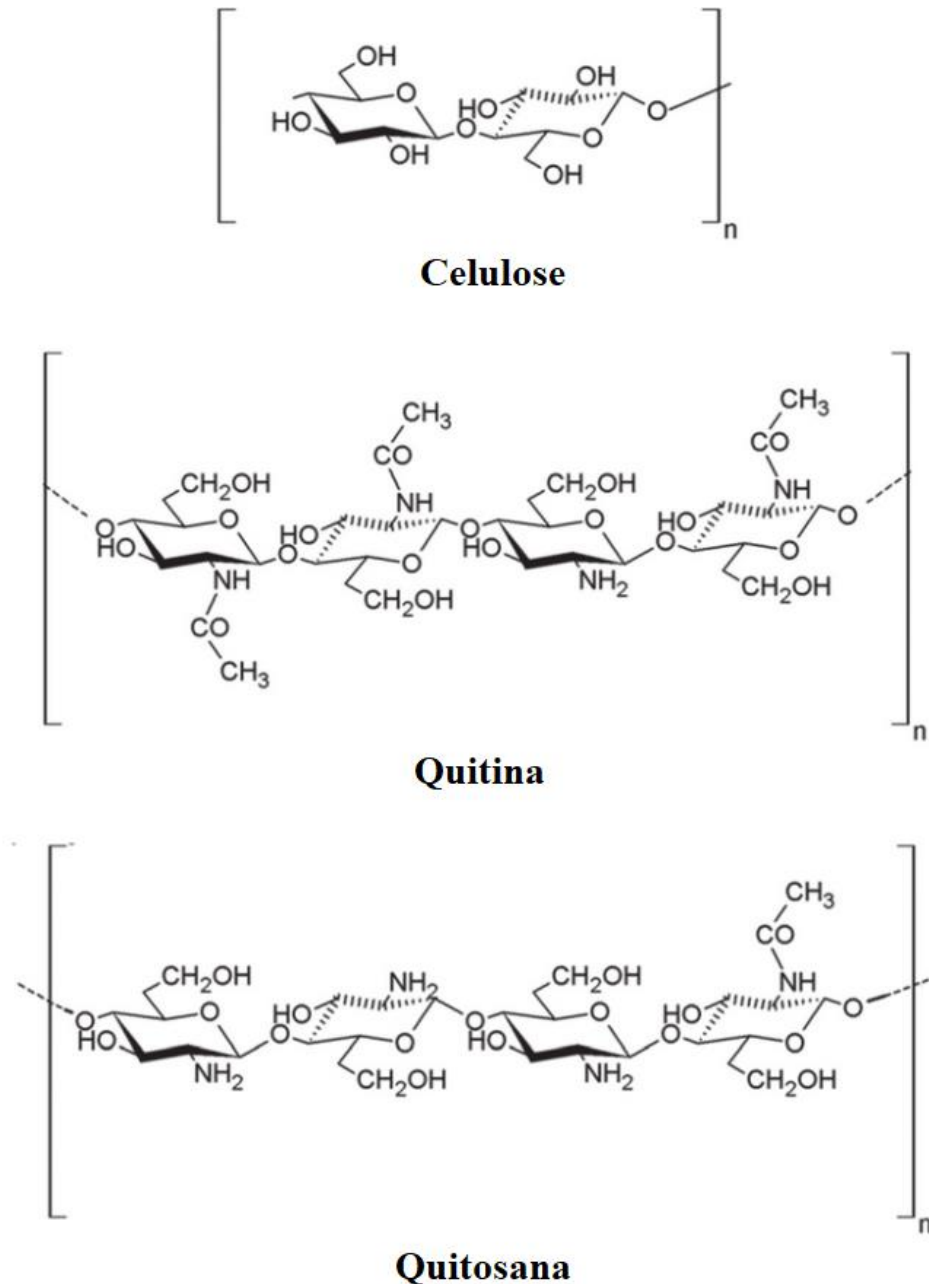
Figura 4 – Obtenção de quitosana a partir da quitina por meio do processo de desacetilação.



A quitosana é um polímero aprovado pela FDA (“*Food and Drug Administration*”), agência regulatória americana, que consiste em unidades de 2-amino-2-desoxi- β -D-glicose ligadas por ligações β -1,4 (glicosamina desacetilada) e unidades de N-acetil-D-glicosamina. Ela possui um peso molecular mais baixo e menor cristalinidade do que a quitina, com um peso molecular superior a 100 kDa (AZMANA *et al.*, 2021; NO; MEYERS, 1995). A estrutura da quitosana é semelhante à celulose, exceto que o grupo hidroxila (-OH) na posição C-2 da celulose é substituído por um grupo amino (-NH₂) na quitosana, de acordo com a Figura 5.

A quitosana apresenta diversos benefícios, como biocompatibilidade, não toxicidade e biodegradabilidade, tornando-a adequada para uso em medicina, cosméticos, embalagens de alimentos e purificação de água (KUMARI *et al.*, 2016). Sua capacidade de formação de filmes finos resistentes e estabilidade térmica a torna valiosa na indústria de embalagens (RODRIGUES *et al.*, 2020). Os bionanocompósitos à base de quitosana também demonstram excelentes propriedades mecânicas como estabilidade térmica, reforçando sua utilidade em várias aplicações (RODRIGUES *et al.*, 2020). A quitosana ainda exibe forte atividade antimicrobiana e antioxidante, com potencial contra fungos, o que a torna promissora para tratamentos médicos e controle de doenças em plantas (BUTNARU *et al.*, 2019). Seu uso pode prolongar a vida útil dos produtos, resultando em benefícios econômicos e de saúde (DAI *et al.*, 2011; RODRIGUES *et al.*, 2020). A quitosana é um polímero biologicamente compatível aprovado para uso na dieta no Japão, Finlândia e Itália (LORENA *et al.*, 2017; YOUNES; RINAUDO, 2015).

Figura 5 – Estrutura do copolímero da celulose, quitina e quitosana.



Fonte: LORENA *et al.*, 2017.

Em sua estrutura a quitosana possui três posições reativas: um grupo amino (-NH₂) e dois grupos hidroxila (-OH) em cada resíduo glicosídico. O grupo amino desempenha um papel fundamental, uma vez que é sensível ao pH, conferindo à quitosana sua natureza catiônica e regulando suas diversas características físico-químicas (YOUNES; RINAUDO, 2015). A solubilidade da quitosana é influenciada pela protonação dos grupos amino em pHs mais baixos, permitindo que ela se dissolva e forme polissacarídeos catiônicos solúveis. Em pHs acima de 6, os grupos amino perdem a protonação, tornando a quitosana insolúvel. Além disso, a

solubilidade da quitosana é afetada pela posição dos grupos acetila na cadeia, pelos métodos de desacetilação e pela força iônica do meio. Em pH ácido, a quitosana pode exibir propriedades quelantes para diversos íons metálicos, seja por meio de grupos amino livres (em pH próximo ao neutro) ou por atração eletrostática em grupos amino protonados (em soluções ácidas) (HUSAIN *et al.*, 2017; MORENO *et al.*, 2018).

A presença de grupos amino reativos (-NH₂) e grupos hidroxila reativos (-OH) na cadeia polimérica facilita a conveniente modificação química da molécula de quitosana, sem alterar sua estrutura básica (KUMARI *et al.*, 2016). Esses grupos funcionais são capazes de reagir com um grande número de agentes ativadores como divinilsulfona, agentes à base de epóxi e aldeídos, etc. Esta modificação química permite a introdução de grupos funcionais no biopolímero para acoplamento com aminoácidos e proteínas e melhorar suas propriedades mecânicas (BEZERRA *et al.*, 2020; MENDES *et al.*, 2011; MONTEIRO; AIROLDI, 1999; PINHEIRO *et al.*, 2019).

3.6 GLUTARALDEÍDO

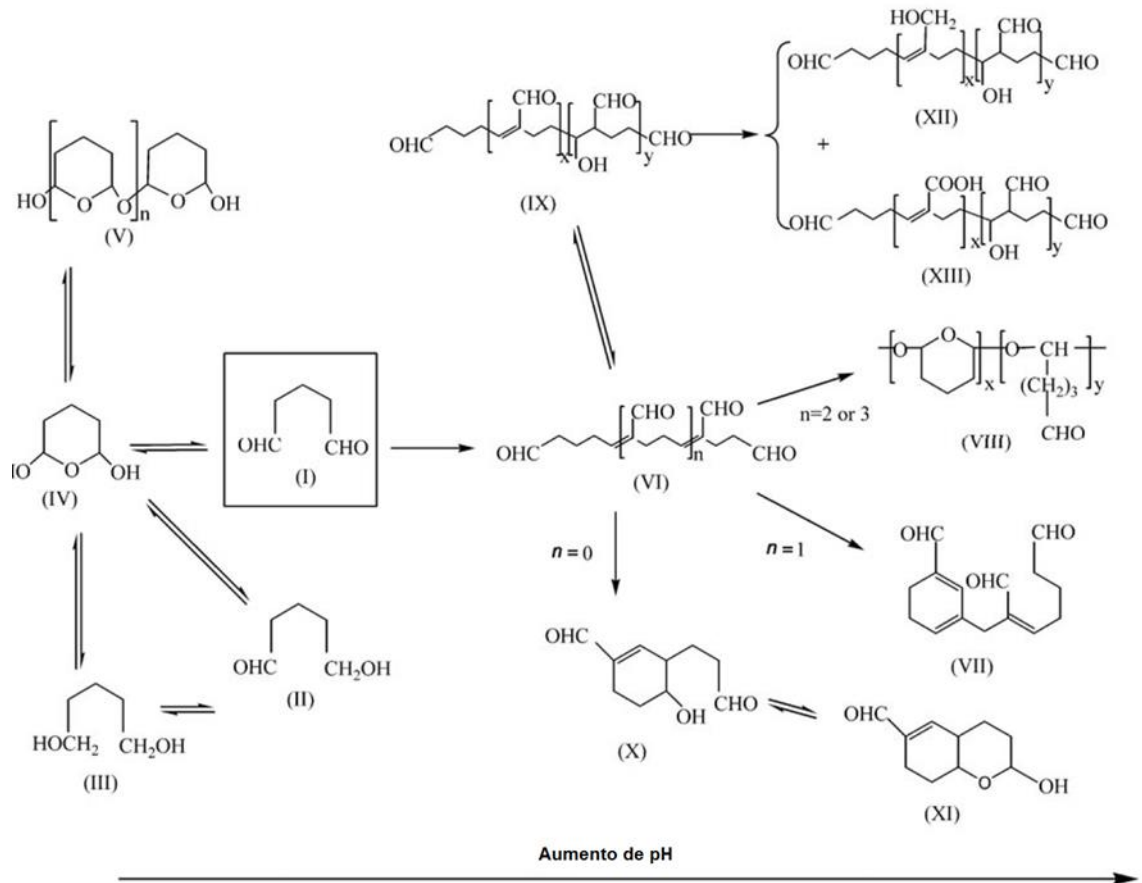
O glutaraldeído é amplamente empregado como um dos principais agentes para melhorar a eficácia da imobilização de enzimas na superfície de suportes. Sua notável reatividade com proteínas em torno do pH neutro é resultado da existência de diversos resíduos reativos nas proteínas, bem como de várias formas moleculares do glutaraldeído em solução aquosa, o que possibilita a ocorrência de diversos mecanismos de reação distintos. (BARBOSA *et al.*, 2014; MIGNEAULT *et al.*, 2018; MONTEIRO *et al.*, 2019).

Os grupos glutaraldeído introduzidos nas superfícies de suporte podem reagir com outros grupos amino livres contidos na superfície do suporte e nas proteínas ou com grupos amino que já reagiram com uma molécula de glutaraldeído, embora também possam reagir eventualmente com outros grupos nucleofílicos como grupamentos imidazol, fenol e tiol (BARBOSA *et al.*, 2014). Os mecanismos envolvidos na reação do glutaraldeído com aminoácidos ou estruturas proteicas são altamente complexos devido à forte influência de alguns parâmetros como concentração de glutaraldeído, valor de pH, densidade de grupos no suporte, tempo de reação, sua reatividade e estrutura química (MONSAN, 1977). Relatos anteriores demonstraram as diferentes formas de glutaraldeído obtidas em soluções aquosas (MIGNEAULT *et al.*, 2004; BARBOSA *et al.*, 2014).

Em uma visão geral publicada por Migneault *et al.* 2004, treze possíveis formas moleculares de glutaraldeído em solução aquosa foram identificadas com base em relatórios

anteriores como observado na Figura 6. A ativação de vários suportes tem sido realizada preferencialmente em condições moderadas ($\text{pH} \leq 7,0$) devido à baixa estabilidade química do glutaraldeído e à ocorrência de reações de polimerização do mesmo em condições alcalinas (BARBOSA *et al.*, 2014; MONSAN, 1977).

Figura 6 – Grupos reativos formados pela ativação do glutaraldeído.



Fonte: MIGNEAUT *et al.*, 2004.

A ativação de suportes de quitosana, com glutaraldeído promove a preparação de suportes heterofuncionais com diferentes grupos funcionais em suas superfícies capazes de interagir com enzimas via quimissorção (ligação covalente) e fisissorção (interações iônicas, ligações de hidrogênio e ativação interfacial) (BARBOSA *et al.*, 2014). Esses diferentes mecanismos de interação entre enzimas e superfícies de suporte heterofuncionais são uma importante ferramenta para fornecer biocatalisadores industriais com alta estabilidade, atividade catalítica e seletividade (BARBOSA *et al.*, 2013; PINHEIRO *et al.*, 2019; SANTOS *et al.*, 2015).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MATERIAIS

A tripsina de pâncreas suína (T-0303, Type IX-S, liofilizada, 13.000-20.000 BAEE unidades.mg⁻¹ proteína), o substrato sintético BAPNA (benzoil-DL-arginina-*p*-nitroanilida), *o*-ftalaldeído (OPA), albumina sérica bovina (ASB), 2,2'-azinobis (ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico) sal de diamônio (ABTS) e o tensoativo não iônico Triton™ X-100 (Polietilenoglicol terc-octilfenil éter) foram adquiridos da Sigma-Aldrich (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA). A Quitosana de camarão (forma em pó com grau de desacetilação de 75-85% e distribuição de massa molecular entre 50 e 190 kDa) também foi adquirida da Sigma-Aldrich. A solução de glutaraldeído (25% v.v⁻¹) e glicina foram adquiridos da Synth® (São Paulo, SP, Brasil). Todos os demais reagentes químicos e solventes orgânicos foram de grau analítico adquiridos da Synth®.

4.2 PREPARAÇÃO DOS SUPORTES HETEROFUNCIONAIS

O hidrogel de quitosana ativado com glutaraldeído (Qui-Glu) foi preparado com base em um estudo anterior (MENDES *et al.*, 2011). Cinco gramas de quitosana em pó foram adicionados a 100 mL de uma solução de ácido acético glacial a 5% (v.v⁻¹) a 25 °C por 4 horas sob agitação mecânica a 1000 rpm. A solução resultante foi então introduzida por seringa em uma solução de NaOH 0,1 mol.L⁻¹ (Qui:NaOH 1:10 v.v⁻¹), submetida a agitação mecânica suave a 100 rpm, 25 °C, por 12 horas para produzir o hidrogel de quitosana (Qui). Em seguida, a suspensão foi filtrada em um funil de Büchner, lavada minuciosamente com água destilada até atingir pH 7,0 e armazenada em uma solução de etanol a 70% (v.v⁻¹) a 4 °C. Em seguida, 10 g de hidrogel de quitosana (Qui) foram imersos em uma solução de glutaraldeído preparada pela adição de 11,2 mL de solução de fosfato de sódio a 0,2 mol.L⁻¹ a pH 7,0 a 16,8 mL de uma solução de glutaraldeído a 25% (v.v⁻¹). A suspensão foi submetida a agitação mecânica contínua (200 rpm) a 25 °C por 1 hora para obter o hidrogel de quitosana ativado com glutaraldeído (Qui-Glu). Este suporte ativado foi então filtrado em um funil de Büchner com papel filtro Whatman N° 41 e lavado minuciosamente com água destilada. Finalmente, o suporte heterofuncional (Qui-Glu-Gli) foi preparado suspendendo 10 g de Qui-Glu em 90 mL de uma solução de glicina a 0,5 mol.L⁻¹ a pH 8,0 e 25 °C sob agitação orbital (200 rpm) por 48 horas. O suporte resultante foi filtrado em um funil de Büchner com papel filtro Whatman N° 41 e

lavado completamente com água destilada. O suporte foi armazenado em uma solução de etanol a 70% (v.v⁻¹) a 4 °C até o uso.

4.3 PROCEDIMENTO DE IMOBILIZAÇÃO DA TRIPSINA EM HIDROGEL DE QUI-GLU-GLI

O procedimento de imobilização da tripsina nos suportes foi conduzido seguindo os métodos estabelecidos em estudos anteriores dentro do nosso grupo de pesquisa (ALVES *et al.*, 2017; MIRANDA *et al.*, 2014). O processo de imobilização envolveu a preparação de uma suspensão combinando a solução enzimática, previamente misturada com uma solução tampão de 5 mmol.L⁻¹ e o suporte na proporção de 1:20 (m.v⁻¹) (suporte/solução de tripsina). A suspensão de imobilização foi então incubada a 25 °C em um *shaker* orbital (200 rpm) por 12 horas de tempo de contato. Os biocatalisadores heterogêneos foram preparados oferecendo cargas iniciais de proteína de 3 mg.g⁻¹ de suporte (baixa carga) e 20 mg.g⁻¹ (alta carga). Uma vez que a enzima foi imobilizada, os biocatalisadores preparados foram filtrados a vácuo usando um funil de Büchner com papel de filtro Whatman N° 41 e lavados exaustivamente com água destilada. O processo de adsorção foi monitorado pela concentração de proteína desaparecida do sobrenadante. Após a imobilização, os biocatalisadores preparados foram estocados a 4 °C em geladeira por 24 h. Neste estudo, os biocatalisadores foram preparados em baixa força iônica (solução tampão de 5 mmol.L⁻¹) para evitar uma possível competição entre os íons do tampão com grupos iônicos provenientes da estrutura da enzima que interagem com a superfície do suporte.

A concentração de proteína foi determinada utilizando o método de Bradford (BRADFORD, 1976) empregando ASB como padrão. A concentração de proteína imobilizada foi determinada (Q_e – mg.g⁻¹ de suporte) foi calculada segundo a Equação (1) (ALVES *et al.*, 2017; LAGE *et al.*, 2016):

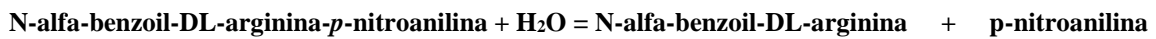
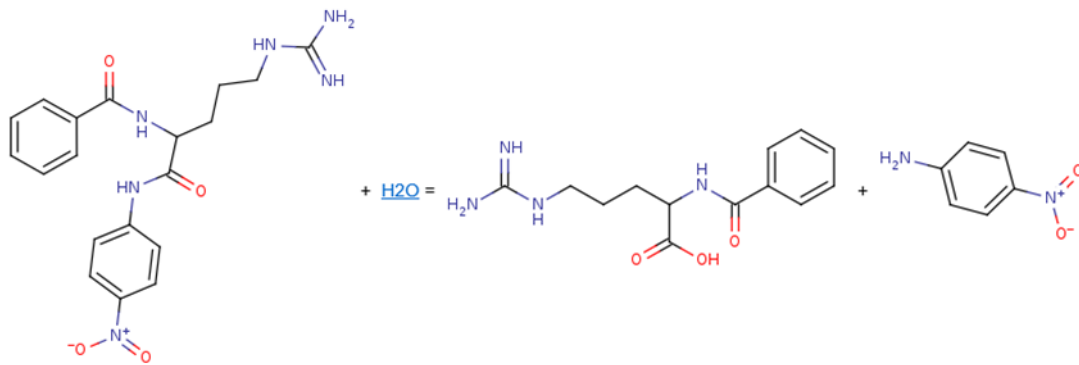
$$Q_e = \frac{V \times (C_0 - C_e)}{m} \quad (1)$$

onde V é o volume de solução enzimática (mL); C_0 é a concentração de proteína inicial (mg.mL⁻¹), C_e é a concentração de proteína após imobilização (mg.mL⁻¹) e m é a massa de suporte (g).

As atividades enzimáticas da tripsina solúvel e imobilizada foram medidas utilizando o BAPNA como substrato (919,7 µmol.L⁻¹) a pH 8,0 (fosfato de sódio 50 mmol.L⁻¹) a 37 °C sob agitação constante (200 rpm) (PESSATO; TAVANO, 2015). A reação foi realizada usando 1,0

mL de solução de BAPNA e 100 μL de solução enzimática em uma cubeta de quartzo com um caminho ótico de 1 cm. A mistura de reação foi incubada a 37 $^{\circ}\text{C}$ por 10 minutos e interrompida pela adição de 250 μL de ácido acético glacial a 30% (v.v^{-1}) no meio. A reação foi monitorada espectrofotometricamente a 410 nm. A atividade enzimática foi calculada usando uma curva analítica construída de p-nitroanilina (o produto liberado após a hidrólise do BAPNA – Figura 7). A atividade foi expressa em nmol.g^{-1} (para a enzima imobilizada) e nmol.mL^{-1} (para a enzima solúvel).

Figura 7 – Reação de hidrólise de BAPNA (N-alfa- benzoil-DL-arginina-p-nitroanilina), substrato da tripsina.



Fonte: Do Autor.

A atividade específica (AE – $\text{nmol.min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$) do biocatalisador heterogêneo foi determinada estabelecendo a relação entre a atividade enzimática e a concentração de proteína imobilizada (Equação (2)) (ALVES *et al.*, 2017; LAGE *et al.*, 2016):

$$AE = \frac{AH}{PI} \quad (2)$$

onde AH é a atividade hidrolítica aparente do biocatalisador preparado ($\text{nmol.min}^{-1}.\text{g}^{-1}$ de biocatalisador) e Qe é a concentração de proteína imobilizada ($\text{mg de enzima.g}^{-1}$ de biocatalisador).

O rendimento de imobilização (RI) foi determinado de acordo com a Equação (3) (LAGE *et al.*, 2016):

$$RI = \frac{(AH_0 - AH_e) \times 100}{AH_0} \quad (3)$$

onde HA_0 é a atividade hidrolítica inicial ($\text{nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mL}^{-1}$), e HE_e é a atividade hidrolítica residual no sobrenadante após a imobilização ($\text{nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mL}^{-1}$) (BOUDRANT; WOODLEY; FERNANDEZ-LAFUENTE, 2020).

4.4 INFLUÊNCIA DO PH NO PROCESSO DE IMOBILIZAÇÃO

Foram avaliados 3 tipos de suportes preparados: quitosana (Qui), quitosana ativada com glutaraldeído (Qui-Glu) e o suporte de quitosana ativada com glutaraldeído e glicina (Qui-Glu-Gli). A influência do pH do meio nos parâmetros de imobilização foi examinada em um intervalo de pH de 4,0 a 10,0, usando tampões apropriados para cada faixa de pH, com uma concentração de $5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$. Para pH entre 4,0 e 5,0, utilizou-se tampão acetato de sódio; para pH entre 6,0 e 8,0, tampão fosfato de sódio; e para pH entre 9,0 e 10,0, tampão carbonato de sódio. Essas investigações foram conduzidas com o uso de um biocatalisador preparado com uma alta carga de proteína ($20 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$). Os ensaios foram realizados ao longo de 12 horas, com agitação a 200 rpm e a uma temperatura de $25 \text{ }^\circ\text{C}$.

4.5 INFLUÊNCIA DO TEMPO DE IMOBILIZAÇÃO: ESTUDOS DE ADSORÇÃO CINÉTICA

O estudo da cinética de adsorção da tripsina pancreática suína no suporte de quitosana ativada com glutaraldeído e glicina (Qui-Glu-Gli) foi estudada sob condição de baixo carregamento ($3 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$) e alto carregamento ($20 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$) de proteína. O processo de imobilização foi monitorado medindo a concentração de proteína residual no sobrenadante da suspensão, pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976). Os estudos foram realizados aplicando três modelos cinéticos não lineares convencionais aos dados obtidos experimentalmente, a saber, o modelo de pseudo-1ª ordem (Equação (4)), pseudo-2ª ordem (Equação (5)) e Elovich (Equação (6)) (TAN; HAMEED, 2017), foram ajustados aos dados obtidos experimentalmente:

$$q_t = q_e \times (1 - e^{-k_1 \times t}) \quad (4)$$

$$q_t = \frac{k_2 \times q_e^2 \times t}{1 \times k_2 \times q_e \times t} \quad (5)$$

$$q_t = \frac{\ln(\alpha + \beta)}{\beta} + \frac{\ln(t)}{\beta} \quad (6)$$

onde q_t e q_e são as quantidades de tripsina adsorvida em um determinado momento t e no equilíbrio (mg.g^{-1}), respectivamente; k_1 (min^{-1}) e k_2 ($\text{mg.g}^{-1}.\text{min}^{-1}$) são as constantes de taxa de adsorção de primeira e segunda ordem, respectivamente; α é a taxa de adsorção inicial ($\text{mg.g}^{-1}.\text{min}^{-1}$); β é a constante de dessorção ($\text{g.g}^{-1}.\text{mg}^{-1}$); e t é o tempo de contato.

4.6 INFLUÊNCIA DE PARÂMETROS NO PROCESSO DE DESSORÇÃO DA TRIPSINA

A influência do pH, força iônica, temperatura e do uso de um emulsificante/tensoativo não iônico (Triton X-100) na dessorção da tripsina imobilizada no suporte de quitosana (Qui-Glu-Gli) foi minuciosamente avaliada. Este estudo foi conduzido com um biocatalisador preparado com uma carga elevada de imobilização de proteína (20 mg.g^{-1}) a fim de assegurar a sensibilidade do método de detecção de proteína. Foram examinados valores de pH que variaram de 5,0 (utilizando tampão acetato de sódio) a 9,0 (utilizando tampão carbonato de sódio), e o detergente Triton X-100 ($0,5\% \text{ v.v}^{-1}$) foi utilizado juntamente com tampão acetato de sódio 5,0 em diferentes concentrações das soluções. O biocatalisador foi incubado por 24 horas, mantendo temperaturas de $25 \text{ }^\circ\text{C}$ e $50 \text{ }^\circ\text{C}$, com agitação a 200 rpm, e variações na força iônica de 50, 100, 250, 500, 750 e 1000 mmol.L^{-1} .

4.7 INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA NA ATIVIDADE DE TRIPSINA SOLÚVEL E IMOBILIZADA

A influência da temperatura na atividade de tripsina solúvel e imobilizada foi avaliada com uma carga de 3 mg.g^{-1} para minimizar os efeitos de difusão na atividade da enzima. A atividade da enzima foi avaliada a várias temperaturas, variando de $25 \text{ }^\circ\text{C}$ a $80 \text{ }^\circ\text{C}$, com incrementos de $5 \text{ }^\circ\text{C}$. Neste estudo, o valor de atividade hidrolítica mais alto observado foi considerado como 100% (atividade relativa de 100% corresponde a $86,6 \text{ nmol.min}^{-1}.\text{mL}^{-1}$ para a enzima solúvel e $263,4 \text{ nmol.min}^{-1}.\text{g}^{-1}$ para a tripsina imobilizada). As reações foram realizadas em fosfato de sódio a 50 mmol.L^{-1} e pH 8,0.

4.8 ESTABILIDADE TÉRMICA: ESTIMATIVA DE PARÂMETROS CINÉTICOS E TERMODINÂMICOS

O ensaio da estabilidade térmica da tripsina imobilizada em suporte de quitosana (Qui-Glu-Gli), com uma carga de 3 mg.g^{-1} para minimizar os efeitos de difusão na estabilização da enzima, foi inicialmente realizado pela incubação da enzima imobilizada em fosfato de sódio a 50 mmol.L^{-1} e pH 7,0 a temperaturas variando de $37 \text{ }^\circ\text{C}$ a $55 \text{ }^\circ\text{C}$. Amostras foram retiradas periodicamente e imediatamente resfriadas em um banho de gelo para interromper a inativação. A atividade residual foi avaliada a $37 \text{ }^\circ\text{C}$ e pH 8,0, como descrito na Seção 2.3. A atividade hidrolítica inicial foi considerada como atividade relativa 100% (ou seja, 1 para este estudo, o que corresponde a $86,6 \text{ nmol.min}^{-1}.\text{mL}^{-1}$ para a enzima solúvel e $263,4 \text{ nmol.min}^{-1}.\text{g}^{-1}$ para a tripsina imobilizada). As constantes de inativação (k_d) e os tempos de meia-vida ($t_{1/2}$) foram determinados usando o modelo de decaimento exponencial não linear proposto por Sadana e Henley, Equações (7) e (8), respectivamente (SADANA; HENLEY, 1987). Os dados experimentais foram analisados usando o software Origin Pro, versão 8.3.

$$a_r = \alpha + (1 - \alpha) \times e^{-k_d \times t} \quad (7)$$

$$t_{1/2} = \frac{\ln(0,5 - \alpha)}{k_d(1 - \alpha)} \quad (8)$$

onde a_r é a atividade relativa (adimensional); α é a razão entre a atividade específica do estado final (E_1) e o estado inicial (E); k_d é a constante de taxa de inativação térmica (min^{-1}); t é o tempo de inativação térmica (min); e $t_{1/2}$ é a meia-vida (min).

O fator de estabilização (FE) foi calculado como a razão entre as meias-vidas da tripsina imobilizada ($t_{1/2}^{\text{imob}}$) e solúvel ($t_{1/2}^{\text{solub}}$) nas mesmas condições experimentais, como mostrado na Equação (9):

$$FE = \frac{t_{1/2}^{\text{imobilizada}}}{t_{1/2}^{\text{solúvel}}} \quad (9)$$

A energia de inativação térmica (E_d) da tripsina solúvel e imobilizada foi determinada usando a equação de Arrhenius linearizada (gráfico de $\ln k_d$ em função do inverso da temperatura absoluta - $1/T$), conforme mostrado na Equação (10) (KUMAR *et al.*, 2013):

$$\ln k_d = \ln A - \frac{E_d}{R} \times \frac{1}{T} \times 10^3 \quad (10)$$

onde A é o fator de frequência, e R é a constante dos gases ideais ($8,314 \times 10^{-3} \text{ kJ.mol}^{-1}.\text{K}^{-1}$).

Os valores de entalpia ($\Delta H^\#$), energia Gibbs ($\Delta G^\#$) e entropia ($\Delta S^\#$) para a inativação térmica da tripsina solúvel e imobilizada do pâncreas suíno foram determinados usando as equações 11, 12 e 13, respectivamente:

$$\Delta H^\# = E_d - RT \quad (11)$$

$$\Delta G^\# = -RT \ln \left(\frac{k_d}{k_B} \times \frac{h}{T} \right) \quad (12)$$

$$\Delta S^\# = \frac{\Delta H^\# - \Delta G^\#}{T} \quad (13)$$

onde T é a temperatura absoluta (K), h é a constante de Planck ($6,626 \times 10^{-34} \text{ J.s}$ ou $1,104 \times 10^{-35} \text{ J.min}$), e k_B é a constante de Boltzmann ($1,3807 \times 10^{-23} \text{ J.K}^{-1}$).

4.9 HIDRÓLISE DA ALBUMINA SÉRICA BOVINA (ASB) CATALISADA POR TRIPSINA SOLÚVEL E IMOBILIZADA E TESTES DE ESTABILIDADE OPERACIONAL

Os experimentos de hidrólise foram realizados preparando soluções de ASB com concentração fixa (8 mg.mL^{-1}) em água destilada a pH 8,0. As proteólises foram realizadas em tubos de ensaio (10 mL) contendo 1 mL de solução de ASB imersa em um banho-maria controlado a $37 \text{ }^\circ\text{C}$ por 2 horas sob agitação mecânica constante (200 rpm), seguindo a metodologia descrita em um estudo anterior (PESSATO; TAVANO, 2015). Em seguida, os biocatalisadores foram adicionados às misturas de reação na proporção de 0,32 mg de proteína, o que corresponde a 20 mg de tripsina imobilizada ou 20 μL de tripsina solúvel. Alíquotas do

sobrenadante foram coletadas em intervalos de tempo diferentes. O grau de hidrólise foi determinado medindo o aumento de grupos amino livres causado pela liberação de novos peptídeos usando o reagente OPA (o-ftaldialdeído) (CHURCH *et al.*, 1983). Resumidamente, alíquotas das amostras variando de 0 a 130 μL foram misturadas com 1,0 mL de reagente OPA recém-preparado. O reagente OPA foi preparado diariamente combinando 25 mL de tetraborato de sódio a 100 mmol.L^{-1} , 2,5 mL de SDS a 20% (m.v⁻¹), 40 mg de OPA em 1 mL de metanol e 100 μL de α -mercaptoetanol, e então ajustado para 50 mL com água destilada. Após uma breve mistura, a absorvância a 340 nm foi medida exatamente após 2 minutos. Uma curva-padrão usando L-Leucina foi construída para determinar o número de grupos amino primários relacionados ao grau de hidrólise (% H) de ASB, como mostrado na Equação (14) (PESSATO; TAVANO, 2015):

$$\%H = \frac{(AAs - AAbe) \times 100}{AAtm} \quad (14)$$

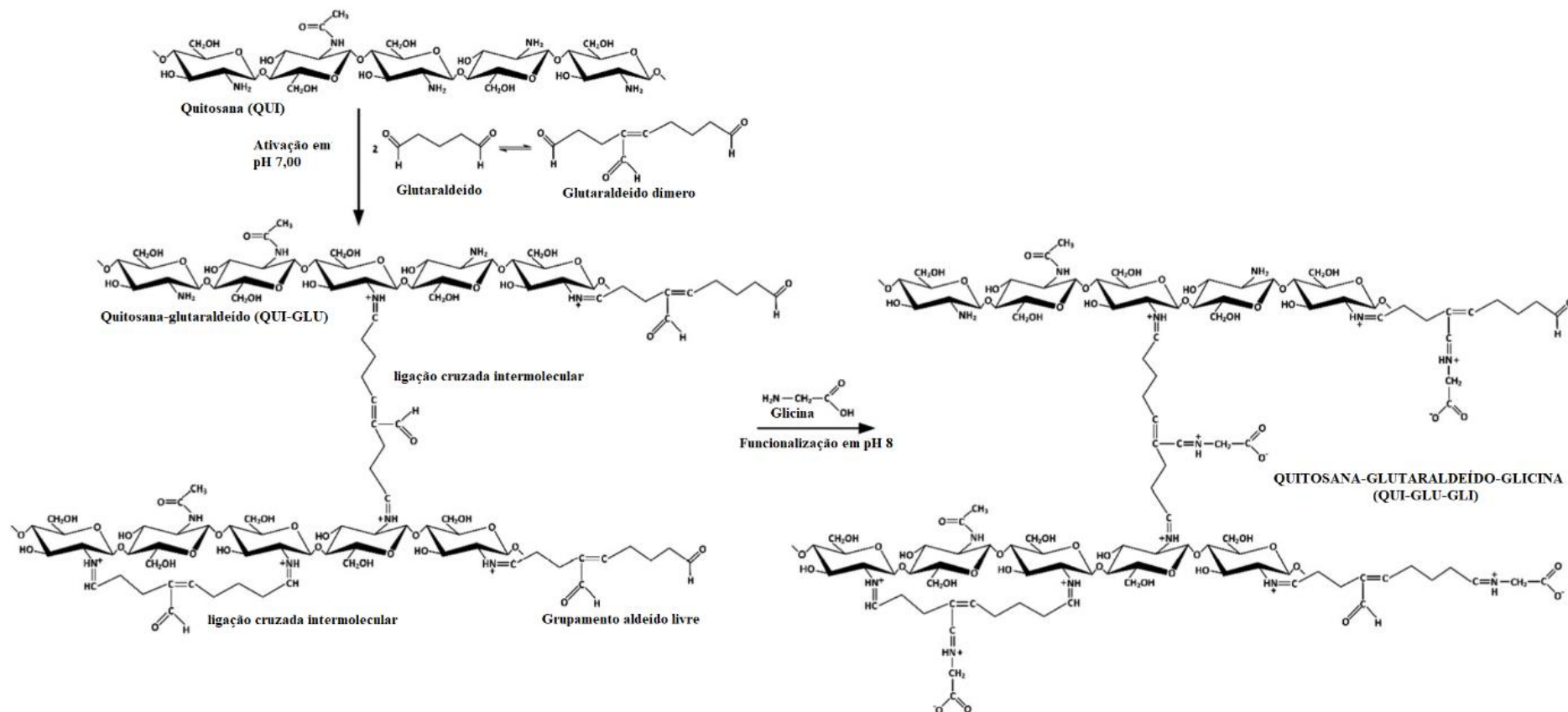
onde: AAs=mol de grupos amino livres determinados no sobrenadante da amostra, AAbe=mol de grupos amino livres determinados no sobrenadante do branco das enzimas (apenas enzimas e tampão como usado no ensaio da amostra e AAtm=mol total de grupos alfa-amino na amostra estimado pela massa total de proteína na amostra e a massa molecular média dos aminoácidos (113 g.mol^{-1}), na qual cada aminoácido representa um grupo alfa-amino.

Testes de reutilização do biocatalisador também foram realizados, incluindo dez ciclos sucessivos de reação de hidrólise de ASB, cada um com duração de 2 horas, como previamente relatado na reação de hidrólise de ASB. Após cada lote, o biocatalisador heterogêneo preparado foi recuperado por filtração a vácuo em um funil de Büchner usando papel de filtro Whatman Nº 41. Em seguida, foi lavado com água destilada para eliminar moléculas de produto e substrato residual das partículas do biocatalisador. O biocatalisador lavado foi então adicionado a uma nova solução de substrato para iniciar um novo lote de reação.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

No presente estudo, a tripsina foi imobilizada em suporte de quitosana ativada com glutaraldeído, onde temos sua estrutura representada pela Figura 8, um possível mecanismo apresentado por OKURA *et al.* (2020), baseado nas propriedades do glutaraldeído em meio aquoso e em trabalhos anteriores (BILAL; IQBAL, 2019; MONTEIRO JR.; AIROLDI, 1999; CAI *et al.* 2016; MONSAN, 1978; MIGNEAULT *et al.*, 2004; BARBOSA *et al.*, 2014).

Figura 8 – Esquema representativo de preparação do suporte heterofuncional (Qui-Glu-Gli).



Fonte: (OKURA *et al.*, 2020).

As etapas se iniciam com a ativação do hidrogel de quitosana com dímeros de glutaraldeído obtidos via condensação aldólica (CAI *et al.*, 2016), e funcionalização com glicina. Neste mecanismo proposto, é possível observar que a tripsina pode ser imobilizada por diferentes estratégias como: (i) via ligação covalente de grupos funcionais da enzima com grupos aldeídos livres do glutaraldeído e seu dímero, (ii) adsorção iônica de grupos carboxilato ($-\text{COO}^-$) da enzima com grupos imina protonados ($-\text{C}=\text{NH}^+$) dos grupos suporte e carboxilato do suporte com grupos amino protonados de tripsina – amino terminal e grupos amino de resíduos de lisina e arginina, (iii) adsorção física via interações hidrofóbicas – mecanismo de “ativação interfacial” com carbono introduzido e (iv) ligações de hidrogênio entre a enzima e os grupos hidroxila e amino livres das unidades de glucosamina da quitosana (SILVA *et al.*, 2018; GUIBAN *et al.*, 2020). Além disso, também são mostradas as reações de reticulação intra e intermoleculares formadas na ativação da quitosana com glutaraldeído que são responsáveis pela melhora de sua estabilização estrutural contra tensão de cisalhamento e alterações de pH (BILAL; IQBAL, 2019; MONTEIRO JR.; AIROLDI, 1999).

5.1 INFLUÊNCIA DO PH DA SOLUÇÃO NA IMOBILIZAÇÃO DE TRIPSINA EM DIFERENTES SUPORTES

Neste estudo, a influência do pH da solução (variando de 4,0 a 10,0) no processo de imobilização da enzima foi inicialmente avaliada usando Qui–Glu–Gli. O ponto isoelétrico (pI) da tripsina do pâncreas suíno varia de 10,1 a 10,5 (BUCK; VITHAYATHIL; SORD, 1962), enquanto o pI do suporte Qui–Glu–Gli é pH 4,7 (OKURA *et al.*, 2020). O desempenho deste suporte foi então comparado com o de hidrogel de quitosana sem etapas adicionais de ativação, e o suporte clássico hidrogel de quitosana ativada com glutaraldeído (Qui–Glu). Esses testes foram conduzidos em baixa concentração (5 mmol.L^{-1}) para evitar potencial competição entre os íons na solução e os grupos iônicos presentes na superfície dos três suportes testados, todos sob alta carga de proteína (20 mg.g^{-1}). Os parâmetros de imobilização para os diferentes processos de imobilização e biocatalisadores heterogêneos preparados estão resumidos na Tabela 1.

Tabela 1 – Influência do pH nos parâmetros de imobilização da tripsina do pâncreas suíno em hidrogéis de quitosana (Qui), quitosana-glutaraldeído (Qui-Glu) e quitosana-glutaraldeído-glicina (Qui-Glu-Gli).

Suporte	pH	Qe^a (mg.g⁻¹)	RI^b (%)	AH^c (nmol.g⁻¹)	AE^d (nmol.mg⁻¹)
Qui-Glu-Gli	4.0	6.8 ± 0.2	30.7 ± 0.5	18.1 ± 2.0	2.7 ± 0.3
	5.0	5.4 ± 0.3	25.6 ± 1.1	29.7 ± 0.8	4.4 ± 0.1
	6.0	6.8 ± 0.1	32.4 ± 0.5	45.5 ± 0.9	6.7 ± 0.1
	7.0	9.1 ± 0.3	44.5 ± 1.1	115.5 ± 3.7	17.3 ± 0.5
	8.0	11.7 ± 0	56.2 ± 0.2	163.3 ± 2.4	23.8 ± 0.4
	9.0	16.2 ± 0.2	81.0 ± 0.2	224.8 ± 1.6	33.1 ± 0.2
	10.0	15.1 ± 0.1	71.6 ± 0.2	117.2 ± 5.9	26.1 ± 0.9
Qui	8.0	2.1 ± 0.4	10.5 ± 1.8	57.6 ± 5.7	26.9 ± 2.7
	9.0	3.8 ± 0.3	19.8 ± 1.4	84.3 ± 2.6	21.9 ± 0.7
Qui-Glu	7.0	20.0	100.0	161.5 ± 1.1	8.1 ± 0.1
	8.0	20.0	100.0	139.3 ± 2.2	7.1 ± 0.2
	9.0	19.1 ± 0.2	98.6 ± 0.8	129.1 ± 2.1	6.7 ± 0.1

Fonte: Do Autor.

Legenda: a) Proteína imobilizada;

b) Rendimento de imobilização;

c) Atividade hidrolítica;

d) Atividade específica;

Com base nos resultados, a capacidade de adsorção do suporte recém-preparado (Qui-Glu-Gli) aumentou com o aumento do pH da solução. Isso está de acordo com o ponto isoelétrico elevado da tripsina (entre 10,1 e 10,5) (BUCK; VITHAYATHIL; SORD, 1962), o que significa que a proteína terá predominantemente caráter catiônico em pH inferior a 10. Em condições ácidas (pH entre 4,0 e 6,0), observamos a menor quantidade de proteína imobilizada, variando de $5,4 \pm 0,3$ a $6,8 \pm 0,1$ mg de enzima por grama de suporte.

Em um meio de pH neutro, pode ser observado um aumento na quantidade de proteína imobilizada, cerca de 9 mg por grama de suporte (RI=44,5%). Quando o pH da solução foi elevado de 7,0 para 9,0 (diminuindo o caráter catiônico da enzima, mas ao mesmo tempo diminuindo o caráter catiônico da quitosana e do grupo de amina da glicina, mas destacando o caráter aniônico do grupo carboxílico da glicina), a concentração de proteína imobilizada quase dobrou, aumentando de $9,1 \pm 0,3$ mg por grama (pH 7,0) para $16,2 \pm 0,2$ mg por grama (pH 9,0), resultando em um IY mais elevado, aproximadamente 81% (ver Tabela 1). Da mesma forma, os maiores valores de atividade hidrolítica (AH=224,8 \pm 1,6 nmol por grama) e atividade específica (AE=33,1 \pm 0,2 nmol por mg de proteína imobilizada) também foram observados em pH 9,0.

Esses resultados demonstram claramente a forte influência do caráter iônico nas superfícies da enzima e do suporte durante o processo de imobilização. Portanto, a adsorção por meio de interações iônicas é um dos mecanismos envolvidos no processo de imobilização, o que está de acordo com um estudo anterior sobre a imobilização da lipase de *Thermomyces lanuginosus* (LTL) usando esse suporte heterofuncional.

Em valores de pH abaixo de 10,1, a enzima se torna carregada positivamente. Consequentemente, a interação da enzima ocorre por meio de grupos carregados positivamente na superfície (grupos amino protonados de lisina, arginina e resíduos amino terminais) com os grupos carboxilato introduzidos pela funcionalização com glicina.

A imobilização em pH superior ao ponto isoelétrico do suporte confere ao suporte uma carga negativa (devido ao aumento da densidade de cargas negativas da desprotonação dos grupos carboxilato introduzidos pela funcionalização com glicina). Dessa forma, a interação entre a enzima e o suporte é influenciada por interações preferenciais entre esses grupos e os grupos amino protonados na superfície da enzima.

Em pH 9,0 o meio em que o suporte exibiu a maior capacidade de adsorção e desempenho catalítico (expresso em valores de AH e AE), a interação entre a enzima e o suporte pode envolver as interações mencionadas anteriormente. Além disso, outras interações iônicas podem ocorrer entre os grupos carboxilato desprotonados de resíduos de aspartato e glutamato,

bem como o grupo carboxílico terminal, com grupos amino protonados no suporte de quitosana introduzidos pela funcionalização com glicina, contribuindo ainda mais para o processo de imobilização. Deve-se notar que a imobilização de enzimas por meio de interações iônicas é um processo heterogêneo e multiponto que envolve vários grupos iônicos da enzima e do suporte (SOTO; ESCOBAR; MESA, 2017), mesmo de natureza diferente (BOUDRANT; WOODLEY; FERNANDEZ-LAFUENTE, 2020).

As interações hidrofóbicas geradas pela presença de moléculas de glutaraldeído também parecem desempenhar um papel crítico no processo de imobilização, visto que a capacidade máxima de adsorção não ocorre no ponto isoelétrico médio do suporte e da enzima (OKURA *et al.*, 2020). Isso indica que a interação entre a enzima e o suporte preparado é um processo complexo que envolve diferentes tipos de interações.

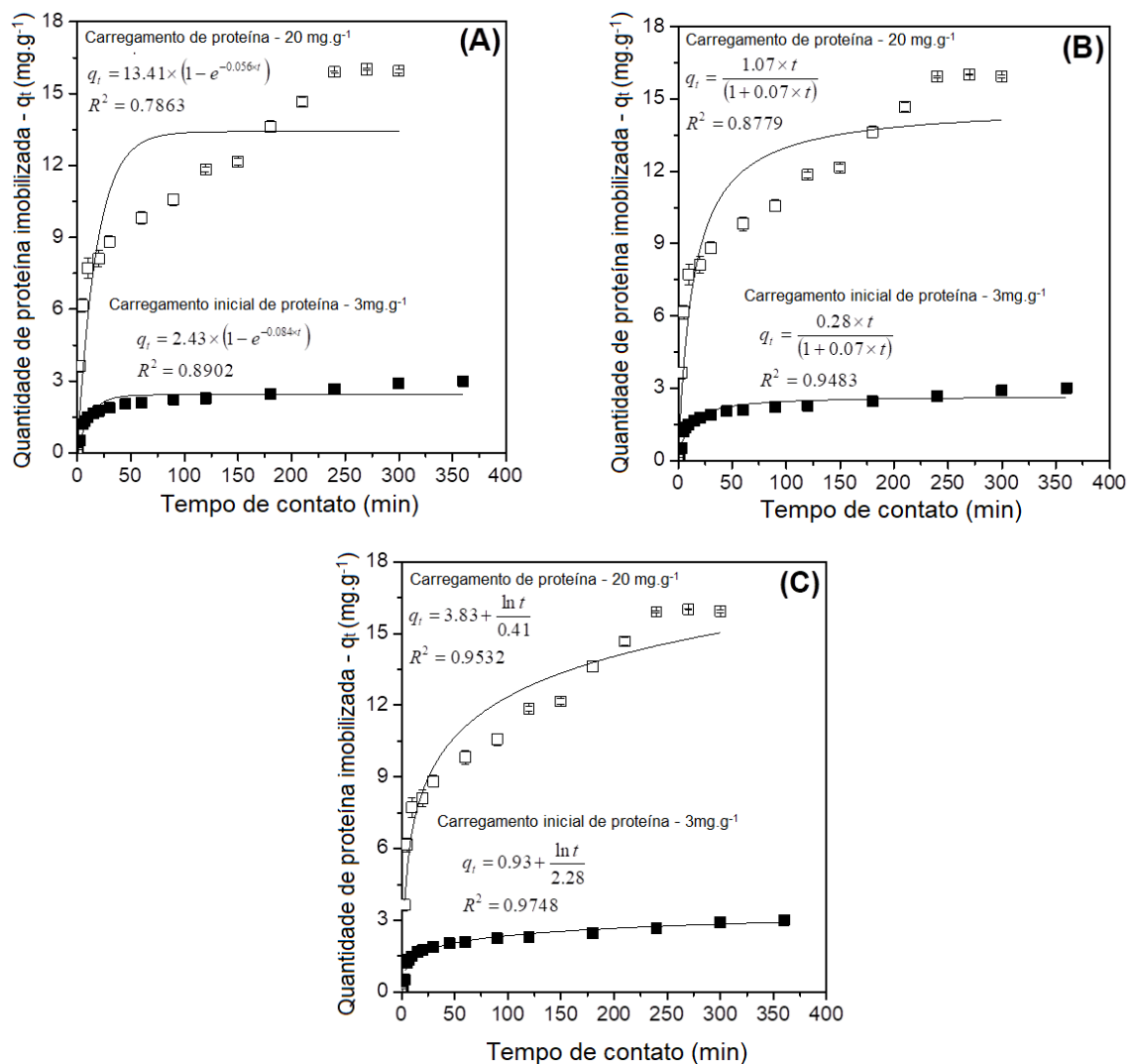
O hidrogel de quitosana (Qui) sem modificação química, que é apenas um trocador aniônico, apresentou uma capacidade de imobilização relativamente baixa dentro da faixa de pH ideal de 8,0 a 9,0, resultando em menos de 4 mg por grama (ou um RI inferior a 20%), uma vez que a proteína se torna um polímero multicatiônico sob essas condições. Além disso, os valores de atividade hidrolítica foram comparativamente mais baixos, variando de $57,6 \pm 5,7$ nmol.g⁻¹ a pH 8,0 a $87,3 \pm 2,6$ nmol.g⁻¹ a pH 9,0, em comparação com os valores de atividade hidrolítica obtidos ao usar Qui-Glu-Gli. Por outro lado, os valores de atividade específica, variando de $26,9 \pm 2,7$ nmol.mg⁻¹ a pH 8,0 a $21,9 \pm 0,7$ nmol.mg⁻¹ a pH 9,0, foram mais elevados do que os obtidos com a enzima imobilizada no novo suporte, o que pode ser atribuído a menores limitações para a difusão do substrato, já que o tratamento com glutaraldeído pode reduzir o diâmetro dos poros. Além disso, como a carga da enzima é menor, os efeitos das limitações de difusão do substrato também são menores.

A tripsina foi completamente imobilizada em Qui-Glu dentro da faixa de pH ideal de 7,0 a 9,0. O processo de imobilização nesse suporte é atribuído às primeiras trocas iônicas/interações hidrofóbicas, seguidas pela formação de ligações covalentes entre grupos reativos da enzima e grupos de glutaraldeído introduzidos no suporte (OKURA *et al.*, 2020). Sob essas condições experimentais, observamos atividade hidrolítica máxima de $161,5 \pm 1,1$ nmol.g⁻¹ a pH 7,0. No que diz respeito à atividade específica, esses valores foram quase duas vezes menores do que os obtidos para o suporte heterofuncional Qui-Glu-Gli. Conseqüentemente, o valor de pH de imobilização da enzima foi fixado em pH 9,0 usando Qui-Glu-Gli como suporte. Os suportes Qui e Qui-Glu foram excluídos de estudos subsequentes devido aos valores superiores de atividade catalítica do biocatalisador preparado usando Qui-Glu-Gli.

5.2 INFLUÊNCIA DO TEMPO NO PROCESSO DE IMOBILIZAÇÃO: ESTUDOS CINÉTICOS DE ADSORÇÃO

Neste estudo, a influência do tempo no processo de imobilização da enzima em Qui–Glu–Gli foi avaliada usando cargas iniciais baixas (3 mg.g^{-1}) e altas (20 mg.g^{-1}) de proteína. Esses testes foram conduzidos em 5 mmol.L^{-1} de carbonato de sódio a pH 9,0 e $25 \text{ }^\circ\text{C}$, com agitação mecânica a 200 rpm. Conforme mostrado na Figura 9A–C, aumentar o tempo de contato aumenta a quantidade de enzima adsorvida no suporte.

Figura 9 – Modelos cinéticos de adsorção não lineares de pseudo-primeira ordem (A), pseudo-segunda ordem (B) e Elovich (C) para a imobilização de tripsina do pâncreas suíno em Qui–Glu–Gli a $25 \text{ }^\circ\text{C}$ e 200 rpm a pH 9,0 (em tampão de carbonato de sódio a 5 mmol.L^{-1}), utilizando cargas iniciais de proteína de 3 mg.g^{-1} e 20 mg.g^{-1} de suporte.



Fonte: Do autor.

O equilíbrio no processo de adsorção conduzido com baixa carga de proteína (3 mg.g^{-1}) foi alcançado após 60 minutos de contato. No entanto, o processo de imobilização, quando realizado com uma carga de proteína alta (20 mg.g^{-1}), só atingiu o equilíbrio após 300 minutos de tempo de contato devido a possíveis agregações de moléculas de enzima e aumento da viscosidade no meio reacional, exigindo, assim, tempos de contato mais longos.

Para obter uma compreensão mais aprofundada do processo de adsorção da enzima no suporte heterofuncional preparado, os modelos cinéticos não lineares de pseudo-primeira ordem, pseudo-segunda ordem e Elovich foram ajustados aos dados experimentais resultantes. O coeficiente de correlação (R^2) foi usado para selecionar o modelo cinético mais apropriado para o processo de adsorção. Como mostrado, os modelos cinéticos pseudo-primeira ordem (Figura 9A) e pseudo-segunda ordem (Figura 9B) produziram os valores mais baixos de R^2 para as duas cargas avaliadas ($0.7863 \geq R^2 \geq 0.9483$). No entanto, o modelo cinético de Elovich (Figura 9C) produziu os valores mais altos de coeficiente de correlação ($R^2 = 0.9748$ para carga de 3 mg.g^{-1} e $R^2 = 0.9532$ para carga de 20 mg.g^{-1}) e, portanto, foi selecionado para descrever a cinética da imobilização de tripsina no suporte selecionado. Esse modelo não prevê nenhum mecanismo definido para o processo de adsorção devido à alta heterogeneidade do suporte (TAN; HAMEED, 2017), resultante da introdução de diferentes grupos reativos na superfície, como mencionado anteriormente. A imobilização da enzima por meio de várias interações pode contribuir para a estabilização, o que é um requisito essencial ao preparar biocatalisadores altamente estáveis e ativos.

5.3 EFEITO DA CONCENTRAÇÃO NA DESSORÇÃO DA TRIPSINA

A influência do pH, concentração do tampão (100 a 1000 mmol.L^{-1}), presença de detergente e temperatura (25 e $50 \text{ }^\circ\text{C}$) no processo de dessorção da enzima foi avaliada em nosso estudo para obter uma compreensão melhor do processo de imobilização. Conforme mostrado na Tabela 2, esses testes foram conduzidos a pH 5.0 porque, nesse valor de pH, a concentração mais baixa de proteína imobilizada foi obtida ($5,4 \pm 0,3 \text{ mg.g}^{-1}$ de proteína imobilizada usando uma carga inicial de proteína de 20 mg.g^{-1} de suporte – ver Tabela 1). Isso sugere que há menos interação entre a enzima e o suporte sob essa condição experimental, o que pode favorecer o processo de dessorção. Esses resultados foram então comparados com os dados obtidos a pH 9.0 - o valor de pH correspondente à concentração máxima de proteína imobilizada ($16,2 \pm 0,2 \text{ mg.g}^{-1}$ de suporte, o que corresponde a um rendimento de imobilização de 81% – ver Tabela 1).

Tabela 2 – Testes de dessorção da tripsina do pâncreas suíno imobilizada em hidrogel de Quit–Glu–Gli em diferentes valores de pH, concentração do tampão, detergente e temperatura. Este estudo foi realizado com agitação mecânica constante (200 rpm), massa de biocatalisador (0,2 g equivalente a 3,2 mg de proteína) e volume da solução de dessorção (6 mL).

Tampão	pH	Concentração do tampão (mmol.L ⁻¹)	Temperatura (°C)	Proteína Dessorvida (%)
Acetato de sódio	5.0	50	25	1,0 ± 0,2
		100		1,5 ± 0,2
		250		1,8 ± 0,3
		500		2,1 ± 0,7
		750	3,6 ± 0,5	
		1000	7,1 ± 0,7	
		1000	50	7,2 ± 0,5
Acetato de sódio + 0.5% (v.v ⁻¹) Triton X - 100	5.0	1000	25	29,6 ± 2,4
		100		24,6 ± 1,2
		1000	50	31,6 ± 1,5
Carbonato de sódio	9.0	50	25	0
		100		0
		250		0
		500		0
		750		0
		1000		1,1 ± 0,4

Fonte: Do Autor.

O aumento da força iônica de 50 para 1000 mmol.L⁻¹ a 25 °C resultou em um aumento, mesmo que muito pequeno de dessorção da enzima (de 1,0 ± 0,2% para 7,2 ± 0,5%). Isso pode ser atribuído à competição entre os grupos iônicos da enzima e os íons do tampão. No entanto, a porcentagem de dessorção da enzima foi baixa, destacando a forte interação da enzima com

o microambiente do suporte heterofuncional preparado, muito provavelmente apontando para o papel das interações hidrofóbicas na imobilização da enzima.

Para explorar o impacto de maior concentração do tampão e temperatura, um ensaio foi realizado no valor máximo de 1000 mmol.L⁻¹ e 50 °C. Temperaturas mais elevadas tendem a aumentar a repulsão eletrostática entre o adsorvente (suporte) e a molécula adsorvida (enzima), potencialmente facilitando a dessorção (MOMINA; MOHAMMAD; SUZYLAWATI, 2020). Posteriormente, foram realizados testes para confirmar possíveis interações hidrofóbicas entre a enzima e o suporte, usando o detergente não iônico Triton X-100 0,5% (v.v⁻¹), nas mesmas condições previamente apresentadas de força iônica e temperatura. Este detergente foi escolhido devido ao seu uso neste suporte Qui–Glu–Gli para a dessorção da lipase (OKURA *et al.*, 2020). A dessorção máxima foi de aproximadamente 32%, usando alta força iônica e detergente a uma temperatura de 50 °C. Esse resultado, quando comparado com a ausência de detergente ou baixa força iônica (dessorção máxima de 7,2%), demonstra que aproximadamente 25% das enzimas imobilizadas estão interagindo hidrofobicamente com o suporte. Além disso, as temperaturas elevadas reduzem a viscosidade do meio, melhorando a difusão iônica para as superfícies externas e internas do adsorvente (suporte).

Surpreendentemente, o aumento da temperatura não aumentou consideravelmente a porcentagem de dessorção, apenas um aumento de 2% em comparação com os resultados obtidos a 25 °C (29,6 ± 2,4%), quando se usa detergente, resulta em uma maior dessorção. Testes subsequentes de dessorção foram realizados a 25 °C usando os mesmos valores de força iônica a pH 9.0, onde ocorreu a máxima interação enzima/suporte. Nessas condições, a taxa de dessorção permaneceu em apenas 1%, mesmo na maior força iônica avaliada neste estudo (1000 mmol.L⁻¹).

A tripsina do pâncreas suíno é uma enzima com massa molecular de 23,4 kDa e um pI variando de 10,1 a 10,5 (BUCK; VITHAYATHIL; SORD, 1962). Conseqüentemente, nos valores de pH de dessorção testados, a enzima mostra uma presença substancial de grupos iônicos (aminos protonados e carboxilatos), promovendo interações fortes com muitos grupos iônicos no suporte. Além disso, com o uso de detergente, foi possível identificar uma interação hidrofóbica entre a enzima e o suporte. Devido ao seu peso molecular relativamente baixo, a enzima se imobiliza preferencialmente na superfície interna do suporte, o que pode dificultar o processo de dessorção (gradientes de concentração iônica entre o meio externo e interno do biocatalisador heterogêneo). Diante disso, os mecanismos de interação mencionados anteriormente também podem estar envolvidos no processo de imobilização. Portanto, não

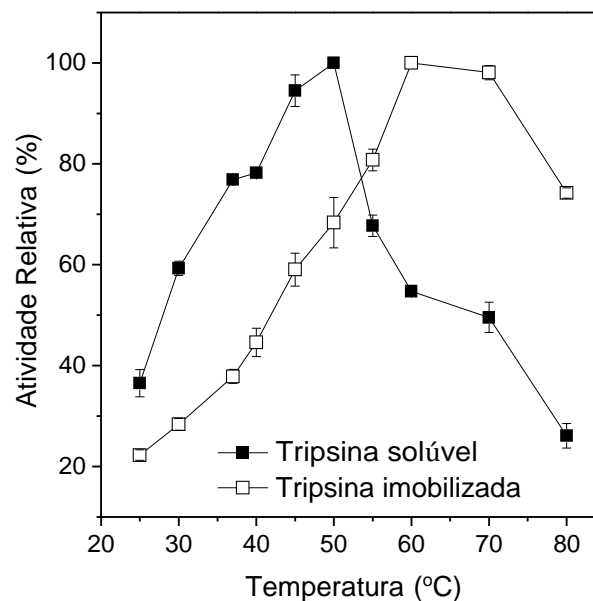
conseguimos explicar os mecanismos precisos que sustentam a imobilização da enzima, dada a complexidade do sistema, como foi descrito nos estudos cinéticos na Seção 3.2.

Contudo, esses resultados destacam que, mesmo em condições elevadas de força iônica, temperatura e na presença de detergente, a enzima permanece fortemente ligada ao suporte. Isso pode levar a resultados promissores em testes de estabilidade térmica e testes de reutilização sucessiva em batelada (reuso), que são importantes ao preparar biocatalisadores heterogêneos industriais.

5.4 INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA NA ATIVIDADE DA TRIPSINA SOLÚVEL E IMOBILIZADA

A influência da temperatura na atividade, tanto da tripsina solúvel quanto da tripsina imobilizada, foi investigada entre 25 e 80 °C. Este estudo foi conduzido em baixa força iônica (5 mmol.L⁻¹) tampão fosfato de sódio a pH 8,0, com agitação mecânica contínua a 200 rpm (Figura 10).

Figura 10 – Influência da temperatura na atividade da tripsina solúvel e imobilizada do pâncreas suíno em Qui–Glu–Gli com uma carga inicial de proteína de 3 mg.g⁻¹ a pH 8,0 (fosfato de sódio a 50 mmol.L⁻¹ de tampão) usando o substrato BAPNA, conforme descrito na metodologia. A atividade relativa de 100% corresponde a 86,6 nmol.min⁻¹.mL⁻¹ para a enzima solúvel e 263,4 nmol.min⁻¹.g⁻¹ para a tripsina imobilizada.



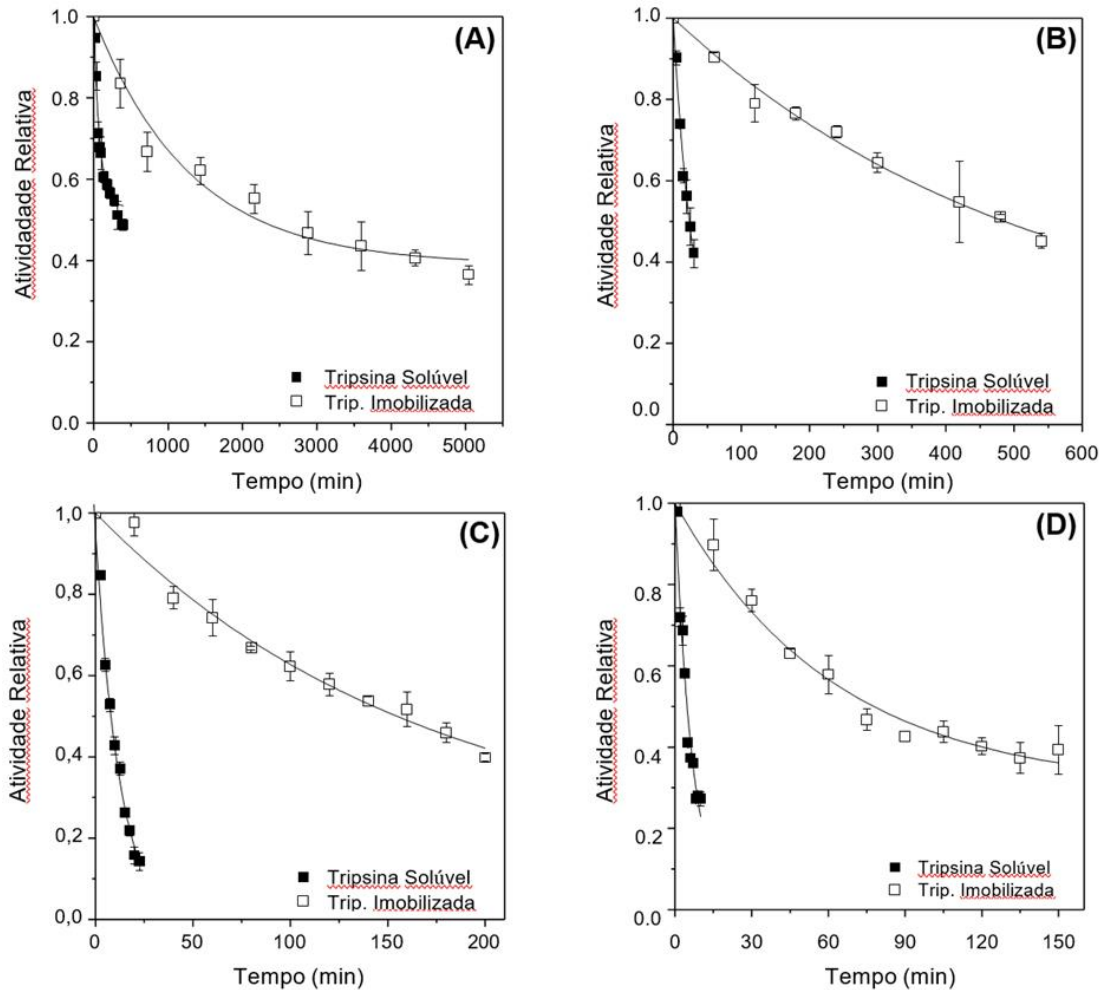
Fonte: Do Autor.

A máxima atividade relativa para a tripsina solúvel foi observada a 50 °C, enquanto para a tripsina imobilizada, foi encontrada a 60 °C. Dentro da faixa de temperatura de 55 a 80 °C, a tripsina imobilizada apresentou uma atividade relativa mais alta do que a enzima solúvel. Esses resultados fornecem evidências claras da estabilização térmica aprimorada da enzima após a imobilização no suporte heterofuncional, como descrito anteriormente, por meio de várias interações.

5.5 TESTES DE ESTABILIDADE TÉRMICA E ESTIMATIVA DE PARÂMETROS CINÉTICOS E TERMODINÂMICOS

Testes de estabilidade térmica foram conduzidos na tripsina do pâncreas suíno em suas formas solúvel e imobilizada. A investigação ocorreu a pH 7,0 (fosfato de sódio a 50 mmol.L⁻¹) e abrangeu uma faixa de temperatura de 37 a 55 °C. Como mostrado na Figura 11A–D, a inativação da enzima aumentou com a temperatura de incubação.

Figura 11 – Curvas de inativação térmica da tripsina solúvel (■) e imobilizada (□) do pâncreas suíno por incubação a 37 °C (A), 45 °C (B), 50 °C (C) e 55 °C (D). Os testes de inativação realizados a pH 7,0 (fosfato de sódio a 50 mmol.L⁻¹). A atividade relativa de 100% (ou $a_r = 1$) corresponde à AH inicial para a tripsina solúvel (86,6 nmol.min⁻¹.mL⁻¹) e a tripsina imobilizada (263,4 nmol.min⁻¹.g⁻¹).



Fonte: Do autor.

As constantes de inativação térmica (k_d) mostraram um aumento gradual, acompanhado por uma diminuição nos valores de meia-vida ($t_{1/2}$), à medida que a temperatura aumentou (Tabela 3). Para a tripsina solúvel, os valores de k_d variaram de 0,01262 min⁻¹ ($t_{1/2} = 340$ min) a 37 °C a 0,14721 min⁻¹ ($t_{1/2} = 4,5$ min) a 55 °C, enquanto para a tripsina imobilizada, a faixa foi de 0,00077 min⁻¹ ($t_{1/2} = 2100$ min) a 37 °C a 0,01600 min⁻¹ ($t_{1/2} = 72$ min) a 55 °C.

Tabela 3 – Valores dos parâmetros cinéticos e termodinâmicos da inativação térmica da tripsina suína solúvel e imobilizada em diferentes temperaturas.

Parâmetro	Biocatalisador	Temperatura (°C)			
		37	45	50	55
R ²	S ^a	0,97521	0,98830	0,99503	0,96078
	I ^b	0,96722	0,98837	0,97837	0,98275
k _d (min ⁻¹)	S ^a	0,01262	0,03123	0,07999	0,14721
	I ^b	0,00077	0,00188	0,00593	0,01600
t _{1/2} (min)	S ^a	340	23	8	4.5
	I ^b	2100	485	164	72
FE	S ^a	1	1	1	1
	I ^b	6,2	21.1	20.5	16.0
E _d (kJ.mol ⁻¹)	S ^a		121,7		
	I ^b		147,2		
ΔH [#] (kJ.mol ⁻¹)	S ^a	119,1	119,0	119,0	118,9
	I ^b	144,6	144,5	144,5	144,4
ΔG [#] (kJ.mol ⁻¹)	S ^a	85,9	85,8	84,7	84,4
	I ^b	93,1	93,3	91,7	90,4
ΔS [#] (J.mol ⁻¹ .K ⁻¹)	S ^a	106,9	107,1	110,6	111,5
	I ^b	166,0	165,4	170,4	174,2

Fonte: Do Autor.

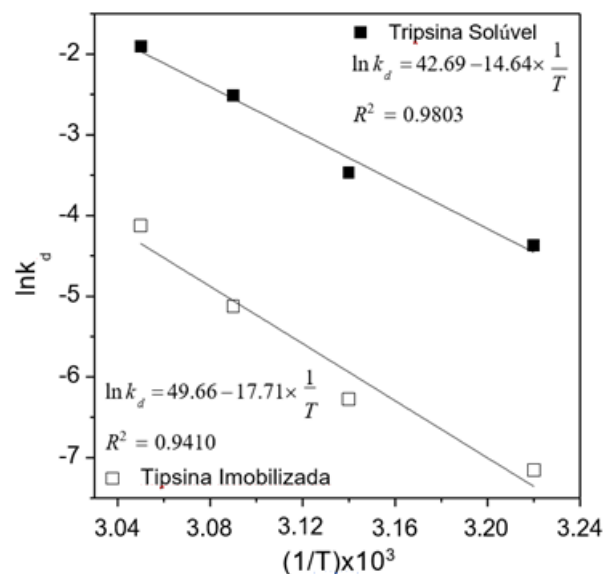
Legenda: a) Tripsina solúvel;

b) Tripsina imobilizada;

Os parâmetros termodinâmicos aparentes da inativação térmica também foram determinados e estão resumidos na Tabela 3. A 50 °C, cerca de 40% da atividade inicial foi

retida pela tripsina solúvel após 12 minutos de incubação, enquanto a tripsina imobilizada manteve uma atividade semelhante após 3 horas de incubação. O fator de estabilização máximo, aproximadamente 20 vezes, foi observado a 40 °C e 50 °C, seguido por incubação a 55 °C ($FE = 16$) e 37 °C ($FE = 6,2$). A estimativa dos parâmetros termodinâmicos fornece informações essenciais sobre o mecanismo de inativação da enzima (MIRANDA *et al.*, 2014). Os valores de energia de inativação térmica (E_d) para a tripsina solúvel e imobilizada foram determinados traçando os valores do logaritmo natural da constante de inativação térmica ($\ln k_d$) versus o inverso da temperatura absoluta ($1/T$) - Equação de Arrhenius (Figura 12). Os valores de energia de inativação térmica para a tripsina solúvel e imobilizada foram determinados como 121,7 e 147,2 kJ.mol⁻¹, respectivamente. Esses resultados demonstram que a tripsina imobilizada requer uma energia de inativação mais alta em comparação com a enzima solúvel. Essas descobertas estão em consonância com estudos anteriores relatados na literatura (BEZERRA *et al.*, 2017, 2020; FARIA *et al.*, 2021; MANRICH *et al.*, 2008; MENDES *et al.*, 2011).

Figura 12 – Determinação da energia de inativação térmica (E_d) para a tripsina solúvel (■) e imobilizada (□) do pâncreas suíno por meio da equação de Arrhenius.



Fonte: Do autor.

A Tabela 3 também mostra os valores dos parâmetros termodinâmicos aparentes, incluindo entalpia ($\Delta H^\#$), energia de Gibbs ($\Delta G^\#$) e entropia ($\Delta S^\#$). As formas solúvel e imobilizada da tripsina apresentaram valores de $\Delta H^\#$ de aproximadamente 119 e 144 kJ mol⁻¹, respectivamente. Esses resultados indicam que mais energia é necessária para a inativação

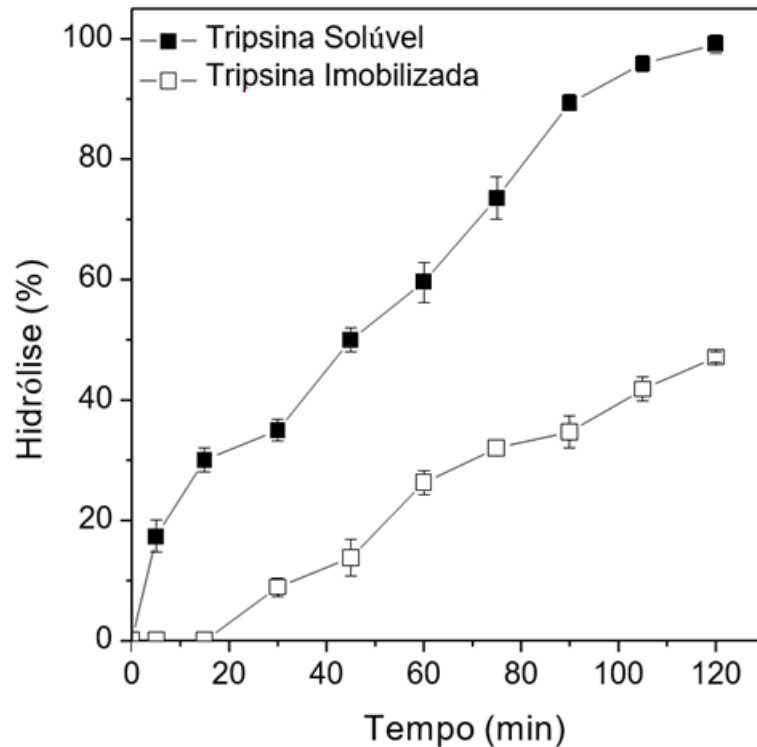
térmica da enzima em sua forma imobilizada (SAQIB; SIDDIQUI, 2018; VIEILLE; ZEIKUS, 1996), como mencionado anteriormente. Além disso, os valores positivos indicam que o processo de inativação térmica é endotérmico, exigindo energia térmica para romper interações intermoleculares, como ligações de hidrogênio, interações hidrofóbicas e/ou iônicas, que estabilizam a estrutura nativa da enzima (SAQIB; SIDDIQUI, 2018; VIEILLE; ZEIKUS, 1996).

A enzima imobilizada também apresentou valores mais altos de $\Delta G^\#$ em comparação com a enzima solúvel, sugerindo uma maior resistência da enzima imobilizada à distorção térmica dentro da faixa de temperatura avaliada (37 °C a 55 °C). Como apresentado na Tabela 3, os valores positivos obtidos para $\Delta S^\#$ variaram de 106,9 a 111,5 J mol⁻¹.K⁻¹ e de 166,0 a 174,2 J mol⁻¹.K⁻¹ para tripsina solúvel e imobilizada, respectivamente. Esses valores positivos de $\Delta S^\#$ confirmam uma modificação química irreversível nas cadeias polipeptídicas das enzimas, resultando em estruturas aleatórias e aumento da desordem em suas configurações (GOHEL; SINGH, 2013; VIEILLE; ZEIKUS, 1996). Isso também indica que o biocatalisador preparado era termodinamicamente mais estável do que a forma solúvel da enzima, confirmando a superior estabilização térmica da tripsina imobilizada em comparação com sua forma solúvel.

5.6. AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO CATALÍTICO DA TRIPSINA SOLÚVEL E IMOBILIZADA NA REAÇÃO DE HIDRÓLISE DE ASB E TESTES DE ESTABILIDADE OPERACIONAL

Neste estudo, o desempenho catalítico da tripsina solúvel e imobilizada na hidrólise de ASB foi analisado. Antes disso, foram realizados testes com a enzima solúvel para medir o tempo necessário para a conversão máxima do produto de hidrólise. O tempo de reação determinado foi de 2 horas, este tempo foi previamente estabelecido devido ao tempo de reação máximo atingido pela enzima livre, que foi capaz de converter 100% do reagente em produto. Portanto, os experimentos foram realizados comparativamente nesse espaço de tempo de 2 horas para comparar o desempenho da hidrólise do ASB com a enzima solúvel e imobilizada, conforme mostrado na Figura 13.

Figura 13 – Perfil de hidrólise de ASB catalisado pela tripsina solúvel do pâncreas suíno imobilizada a 37 °C na ausência de tampão (água destilada - pH 8,0).



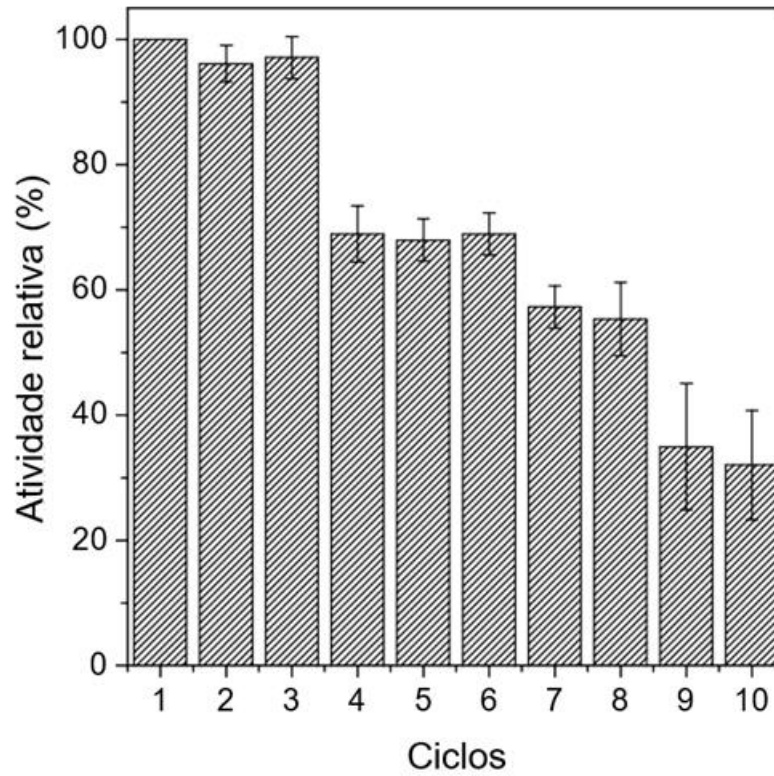
Fonte: Do autor.

A Figura 13 ilustra os perfis de hidrólise de ASB tanto para a tripsina solúvel quanto para a tripsina imobilizada após 120 minutos, onde a conversão máxima atingiu 100% e 47%, respectivamente, representando a liberação de 381,3 nmol e 178,1 nmol de grupos α -amino por miligrama de proteína. Usando a enzima imobilizada, é claramente visível um tempo de espera aparente - um tempo de espera que não é visualizado com a enzima solúvel. No caso da hidrólise de proteínas, existem alguns problemas. Em primeiro lugar, o substrato é muito grande; dessa forma, apenas moléculas de enzima devidamente orientadas podem agir contra ele, enquanto todas as moléculas de enzima podem atacar o pequeno substrato sintético. Uma vez que as proteases com a orientação adequada começam a hidrolisar a ASB, os fragmentos de tamanho menor podem ser atacados por outras moléculas de enzima imobilizadas (MORELLON-STERLING *et al.*, 2022; TACIAS-PASCACIO; CASTAÑEDA-VALBUENA; *et al.*, 2021; TACIAS-PASCACIO; MORELLON-STERLING; *et al.*, 2021). Além disso, o grande tamanho da ASB aumentará a falta de substrato para as moléculas internas de enzima imobilizadas devido a problemas de difusão do substrato; além disso, a redução do tamanho da ASB ao longo da reação pode reduzir esse problema (MORELLON-STERLING *et al.*, 2022; TACIAS-PASCACIO; CASTAÑEDA-VALBUENA; *et al.*, 2021; TACIAS-PASCACIO;

MORELLON-STERLING; *et al.*, 2021). No entanto, não há um curso claro de reação exponencial. Esses resultados demonstram que a realização da hidrólise usando as novas enzimas imobilizadas é viável, embora mais lenta. Apesar de problemas potenciais como dificuldades de difusão e subsequente redução na velocidade da reação, é importante considerar as vantagens de lidar com o biocatalisador heterogêneo com facilidade e a possibilidade de reutilização.

A reutilização de enzimas imobilizadas é um aspecto crucial de sua aplicabilidade em processos industriais. Para demonstrar os benefícios do procedimento de imobilização, foi realizado um estudo sobre a reutilização do biocatalisador, realizando lotes sucessivos de hidrólise de ASB, como descrito anteriormente. Conforme mostrado na Figura 14, a atividade relativa da tripsina imobilizada em quitosana modificada (Qui-Glu-Gli) diminuiu gradualmente com o aumento do número de lotes. Nos três primeiros lotes, o biocatalisador reteve 97% da porcentagem de hidrólise no primeiro ciclo. No entanto, do quarto ao sexto lote, houve uma queda na porcentagem de hidrólise para cerca de 69%, seguida por uma diminuição adicional nos sétimo e oitavo lotes para cerca de 55%. Finalmente, após o décimo lote, a tripsina imobilizada reteve 35% de sua atividade inicial. Uma explicação possível para a perda gradual da atividade catalítica é o acúmulo de substrato e/ou produtos não convertidos adsorvidos na enzima ou no suporte, que podem bloquear parcialmente o acesso das moléculas de ASB ao centro ativo da enzima. Resultados semelhantes foram observados em estudos anteriores para a tripsina, documentados na literatura especializada (ASLANI; ABRI; PAZHANG, 2018; MAGEED; EZZ; RADWAN, 2019; MANOEL *et al.*, 2015; POONSIN *et al.*, 2020).

Figura 14 – Testes de estabilidade operacional (reutilização) da tripsina do pâncreas suíno imobilizada em Qui–Glu–Gli na hidrólise de ASB após lotes sucessivos de 120 minutos cada. As reações de hidrólise foram conduzidas a 37 °C na ausência de tampão.



Fonte: Do autor.

6 CONCLUSÃO

A pesquisa conduzida com êxito utilizou um suporte heterofuncional à base de quitosana para imobilizar a enzima industrial tripsina de pâncreas suíno, mantendo uma atividade catalítica substancial, como evidenciado pela concentração significativa de proteína imobilizada. Pelos ensaios que avaliaram o tempo de adsorção, empregando modelos cinéticos e investigando estudos de dessorção, foi possível analisar a versatilidade do suporte heterofuncional, o qual foi capaz de interagir com a enzima de várias maneiras, incluindo interações hidrofóbicas, iônicas e possíveis ligações covalentes. Além disso, os testes realizados a uma temperatura de 50 °C, na qual o biocatalisador apresentava atividade máxima, revelaram que o fator de estabilização foi 20 vezes maior em comparação com a tripsina solúvel.

É notável que a tripsina imobilizada demonstrou excelente estabilidade operacional, mantendo cerca de 37% de sua atividade inicial mesmo após 10 ciclos sucessivos de hidrólise de ASB. Esse processo de imobilização eficaz superou as limitações inerentes às enzimas solúveis, como solubilidade em água e reutilização limitada, oferecendo maior estabilidade estrutural e facilitando sua aplicação em processos industriais. Esses resultados promissores abrem portas para avanços significativos na indústria, onde a enzima tripsina imobilizada pode ser um componente valioso em diversas aplicações. As diferentes estratégias empregadas para a imobilização da enzima estabeleceram uma forte ligação com o suporte, tornando-o promissor para aplicações em processos industriais, como a hidrólise de proteínas para obtenção de peptídeos.

7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Com base nos resultados preliminares podemos sugerir:

- a) Otimização da reação da hidrólise;
- b) Utilização do suporte preparado para a imobilização de outras proteases (papaína, alcalase, quimotripsina, etc.);
- c) Avaliação de hidrólise de outras proteínas de interesse industrial, assim como a caracterização da bioatividade dos peptídeos formados;
- d) Utilização do derivado estudado em reatores batelada e contínuo

REFERÊNCIAS

- AGHAEI, H.; YASINIAN, A.; TAGHIZADEH, A. Covalent immobilization of lipase from *Candida rugosa* on epoxy-activated cloisite 30B as a new heterofunctional carrier and its application in the synthesis of banana flavor and production of biodiesel. **International Journal of Biological Macromolecules**, [S. l.], v. 178, p. 569–579, 2021.
- ALVES, M. D. *et al.* Isotherm, kinetic, mechanism and thermodynamic studies of adsorption of a microbial lipase on a mesoporous and hydrophobic resin. **Chemical Engineering Journal**, [S. l.], v. 311, p. 1–12, 2017.
- ARANAZ, I. *et al.* Functional Characterization of Chitin and Chitosan. **Current Chemical Biology**, [S. l.], v. 3, p. 203-230, 2009.
- ARBIA, W. *et al.* Chitin Recovery Using Biological Methods, **Food Technology and Biotechnology**, [S. l.], v. 51, p. 12–25, 2013.
- ASLANI, E.; ABRI, A.; PAZHANG, M. Immobilization of trypsin onto Fe₃O₄@SiO₂-NH₂ and study of its activity and stability. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, [S. l.], v. 170, p. 553–562, 1 out. 2018.
- ATACAN, K.; ÇAKIROĞLU, B.; ÖZACAR, M. Improvement of the stability and activity of immobilized trypsin on modified Fe₃O₄ magnetic nanoparticles for hydrolysis of bovine serum albumin and its application in the bovine milk. **Food Chemistry**, [S. l.], v. 212, p. 460–468, 1 dez. 2016.
- AYBASTIER, Ö.; DEMIR, C. Optimization of immobilization conditions of *Thermomyces lanuginosus* lipase on styrene-divinylbenzene copolymer using response surface methodology. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, [S. l.], v. 63, n. 3–4, p. 170–178, maio 2010.
- AZMANA, M. *et al.* A review on chitosan and chitosan-based bionanocomposites: Promising material for combatting global issues and its applications. **International Journal of Biological Macromolecules**, [S. l.], v. 185, p. 832–848, 2021.
- BARBOSA, O. *et al.* Heterofunctional supports in enzyme immobilization: From traditional immobilization protocols to opportunities in tuning enzyme Properties. **Biomacromolecules**, [S. l.], v. 14, p. 2433–2462, 2013.
- _____. **Glutaraldehyde in bio-catalysts design: A useful crosslinker and a versatile tool in enzyme immobilization** RSC Advances, [S. l.], v. 4, p. 1583-1600, 2014.
- BASHIR, N.; SOOD, M.; BANDRAL, J. D. Enzyme immobilization and its applications in food processing: A review. **International Journal of Chemical Studies**, [S. l.], v. 8, n. 2, p. 254–261, 2020.
- BASSAN, J. C. *et al.* Immobilization of trypsin in lignocellulosic waste material to produce peptides with bioactive potential from whey protein. **Materials**, [S. l.], v. 9, 2016.

BASSO, A.; SERBAN, S. Industrial applications of immobilized enzymes—A review **Molecular Catalysis**, [S. l.], v. 479, 2019.

BERNAL, C.; RODRÍGUEZ, K.; MARTÍNEZ, R. Integrating enzyme immobilization and protein engineering: An alternative path for the development of novel and improved industrial biocatalysts, **Biotechnology Advances**, [S. l.], v. 36, p. 1470-1480, 2018.

BEZERRA, R. M. *et al.* Design of a lipase-nano particle biocatalysts and its use in the kinetic resolution of medicament precursors. **Biochemical Engineering Journal**, [S. l.], v. 125, p. 104–115, 2017.

_____. A new heterofunctional support for enzyme immobilization: PEI functionalized Fe₃O₄ MNPs activated with divinyl sulfone. Application in the immobilization of lipase from *Thermomyces lanuginosus*. **Enzyme and Microbial Technology**, [S. l.], v. 138, 2020.

BICKERSTAFF, G. F. **Immobilization of Enzymes and Cells Some Practical Considerations**, [S. l.], v. 1, 1997.

BILAL, M. *et al.* Multi-point enzyme immobilization, surface chemistry, and novel platforms: a paradigm shift in biocatalyst design, **Critical Reviews in Biotechnology**, [S. l.], v. 39, p. 202-219, 2019.

BILAL, M.; IQBAL, H. M. N. Naturally-derived biopolymers: Potential platforms for enzyme immobilization, **International Journal of Biological Macromolecules**, [S. l.], v. 130, p. 462–482, 2019.

BODE, W.; FEHLHAMMER, H. AND HUBER, R. Crystal Structure of Bovine Trypsinogen at 143 Å Resolution. I. Data Collection, Application of Patterson Search Techniques and Preliminary Structural Interpretation, **Journal of Molecular Biology**, [S. l.], v. 106, 1976.

BOLIVAR, J. M.; WOODLEY, J. M.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Is enzyme immobilization a mature discipline? Some critical considerations to capitalize on the benefits of immobilization, **Chemical Society Reviews**, [S. l.], v. 51, p. 6251-6290, 2022.

BONAZZA, H. L. *et al.* Operational and Thermal Stability Analysis of *Thermomyces lanuginosus* Lipase Covalently Immobilized onto Modified Chitosan Supports. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, [S. l.], v. 184, n. 1, p. 182–196, 2018.

BOUDRANT, J.; WOODLEY, J. M.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Parameters necessary to define an immobilized enzyme preparation, **Process Biochemistry**, [S. l.], v. 90, p. 66-80, 2020.

BOUGATEF, A. Trypsins from fish processing waste: Characteristics and biotechnological applications - Comprehensive review, **Journal of Cleaner Production**, [S. l.], v. 57, p. 257-265, 2013.

BRADFORD, M. M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding, **Analytical Biochemistry**, [S. l.], v. 1, p. 248-254, 1976.

- BRADY, D.; JORDAAN, J. Advances in enzyme immobilisation, **Biotechnology Letters**, [S. l.], v. 31, p. 1639-1650, 2009.
- BRENA, B.; GONZÁLEZ-POMBO, P.; BATISTA-VIERA, F. Immobilization of enzymes: A literature survey, **Methods in Molecular Biology**, [S. l.], v. 1051, p. 15-31, 2013.
- BRUGGEN, V.; MOL BIO, J. Biological Function of Pancreatic Ribonuclease, **Academic Press**, [S. l.], 1969.
- BUCK, F. F.; VITHAYATHIL, A. J.; SORD, F. F. On the Mechanism of Enzyme Action. LXXIII. Studies on Trypsins from Beef, Sheep and Pig Pancreas, **ARCHIVES OF BIOCHEMISTRY AND BIOPHYSICS**, [S. l.], p. 417-424, 1962.
- BUENO, D. B. *et al.* The germination of soybeans increases the water-soluble components and could generate innovations in soy-based foods. **LWT**, [S. l.], v. 117, 2020.
- BUJACZ, A. Structures of bovine, equine and leporine serum albumin. **Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography**, [S. l.], v. 68, n. 10, p. 1278–1289, 2012.
- BURKHART, J. M. *et al.* Systematic and quantitative comparison of digest efficiency and specificity reveals the impact of trypsin quality on MS-based proteomics. **Journal of Proteomics**, [S. l.], v. 75, n. 4, p. 1454–1462, 2012.
- BUTNARU, E. *et al.* Chitosan-based bionanocomposite films prepared by emulsion technique for food preservation. **Materials**, [S. l.], v. 12, n. 3, 2019.
- CARNEIRO, L. A. B. C. *et al.* Immobilization of lipases produced by the endophytic fungus *Cercospora kikuchii* on chitosan microparticles. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, [S. l.], v. 57, n. 4, p. 578–586, 2014.
- CAVALCANTE, F. T. T. *et al.* Current status and future perspectives of supports and protocols for enzyme immobilization, **Catalysts**, [S. l.], v. 11, p. 1222, 2021.
- CERA, E. DI. Serine proteases, **IUBMB Life**, [S. l.], v. 31, p. 510-515, 2009.
- CHANG, Q. *et al.* Sensitive fluorescent probes for determination of hydrogen peroxide and glucose based on enzyme-immobilized magnetite/silica nanoparticles, **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, [S. l.], p. 2377-2385, 2009.
- CHERRY, J. R.; FIDANTSEF, A. L. Directed evolution of industrial enzymes: An update, **Current Opinion in Biotechnology**, [S. l.], v.14, p. 438-443, 2003.
- CHURCH, F. C. *et al.* Spectrophotometric Assay Using o-Phthaldialdehyde for Determination of Proteolysis in Milk and Isolated Milk Proteins. **Journal of Dairy Science**, [S. l.], v. 66, n. 6, p. 1219–1227, 1983.
- DAI, T. *et al.* Chitosan preparations for wounds and burns: Antimicrobial and wound-healing effects, **Expert Review of Anti-Infective Therapy**, [S. l.], v. 9, p. 857-879, 2011.

DATTA, S.; CHRISTENA, L. R.; RAJARAM, Y. R. S. Enzyme immobilization: an overview on techniques and support materials. **3 Biotech**, [S. l.], p. 1–9, 2012.

DENG, Y.; GRUPPEN, H.; WIERENGA, P. A. Comparison of Protein Hydrolysis Catalyzed by Bovine, Porcine, and Human Trypsins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 66, n. 16, p. 4219–4232, [S. l.], 2018.

DIVIESTI, K.; HOLZ, R. C. Catalytic Biomaterials for Atrazine Degradation. **Catalysts**, [S. l.], v. 13, n. 1, 2023.

DORNELLES, L. P. *et al.* Purification and characterization of a protease from the visceral mass of *Mytella charruana* and its evaluation to obtain antimicrobial peptides. **Food Chemistry**, [S. l.], v. 245, p. 1169–1175, 2018.

ELIAS, N. *et al.* Characterization, optimization and stability studies on *Candida rugosa* lipase supported on nanocellulose reinforced chitosan prepared from oil palm biomass. **International Journal of Biological Macromolecules**, [S. l.], v. 114, p. 306–316, 2018.

FANG, Z. *et al.* Keratinolytic protease: a green biocatalyst for leather industry, **Applied Microbiology and Biotechnology**, [S. l.], v. 101, p. 7771-7779, 2017.

FARIA, L. L. *et al.* Biochemical characterization of extracellular fructosyltransferase from *Aspergillus oryzae* IPT-301 immobilized on silica gel for the production of fructooligosaccharides. **Biotechnology Letters**, [S. l.], v. 43, n. 1, p. 43–59, 2021.

FUENTES, M. *et al.* Mixed ion exchange supports as useful ion exchangers for protein purification: Purification of penicillin G acylase from *Escherichia coli*. **Biomacromolecules**, [S. l.], v. 8, n. 2, p. 703–707, 2007.

GARCIA-GALAN, C. *et al.* Potential of different enzyme immobilization strategies to improve enzyme performance, **Advanced Synthesis and Catalysis**, [S. l.], v. 353, p. 2885-2904, 2011.

GOETTIG, P. Reversed proteolysis—proteases as peptide ligases, **Catalysts**, [S. l.], v.11, p. 1-18, 2021.

GOHEL, S. D.; SINGH, S. P. Characteristics and thermodynamics of a thermostable protease from a salt-tolerant alkaliphilic actinomycete. **International Journal of Biological Macromolecules**, [S. l.], v. 56, p. 20–27, 2013.

GUISAN, J. M. *et al.* The Science of Enzyme Immobilization. *Em: Methods in Molecular Biology*. Humana Press Inc., New York, v. 2100, p. 1–26, 2020.

GUZIK, U.; HUPERT-KOCUREK, K.; WOJCIESZYNSKA, D. Immobilization as a strategy for improving enzyme properties- Application to oxidoreductases. **Molecules**, [S. l.], v. 19(7), p. 8995-9018, 2014.

HANEFELD, U.; CAO, L.; MAGNER, E. Enzyme immobilisation: Fundamentals and application. **Chemical Society Reviews**, [S. l.], v. 42, n. 15, p. 6211–6212, 2013.

HEDSTROM, L. Serine protease mechanism and specificity. **Chemical Reviews**, [S. l.], v. 102, n. 12, p. 4501–4523, 2002.

HOU, Y. *et al.* Protein hydrolysates in animal nutrition: Industrial production, bioactive peptides, and functional significance. **Journal of Animal Science and Biotechnology**, [S. l.], v. 8, 2017.

HUSAIN, S. *et al.* Chitosan biomaterials for current and potential dental applications. **Materials**, [S. l.], v. 10, 2017.

KASSERRA, H. P.; LAIDLER, K. J. Mechanisms of action of trypsin and chymotrypsin. **Canadian Journal of Chemistry**, [S. l.], v. 47, 1969.

KAUR, J.; SINGH, P. K. Trypsin Detection Strategies: A Review. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, [S. l.], v. 52(5), p. 949-967, 2022.

KIM, J. S.; LEE, S. Immobilization of trypsin from porcine pancreas onto chitosan nonwoven by covalent bonding. **Polymers**, [S. l.], v. 11, n. 9, 2019.

KORHONEN, H.; PIHLANTO, A. Bioactive peptides: Production and functionality. **International Dairy Journal**, [S. l.], v. 16, p. 945-960, 2006.

KOU, S. (GABRIEL); PETERS, L. M.; MUCALO, M. R. Chitosan: A review of sources and preparation methods. **International Journal of Biological Macromolecules**, [S. l.], v. 169, p. 85-94, 2021.

KUMAR, D. *et al.* Covalent immobilization of organic solvent tolerant lipase on aluminum oxide pellets and its potential application in esterification reaction. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, [S. l.], v. 87, p. 51–61, mar. 2013.

KUMAR, D. *et al.* Proteases: Industrial Applications and Approaches used in Strain Improvement. **Biological Forum – An International Journal**, [S. l.], v. 10, p. 158-167, 2018.

KUMARI, S. *et al.* Chitosan-based bionanocomposites for biomedical application. **Bioinspired, Biomimetic and Nanobiomaterials**, [S. l.], v. 7, n. 4, p. 219–227, 2016.

LACROIX, I. M. E. *et al.* Investigation into the bioavailability of milk protein-derived peptides with dipeptidyl-peptidase IV inhibitory activity using Caco-2 cell monolayers. **Food and Function**, [S. l.], v. 8, n. 2, p. 701–709, 2017.

LAGE, F. A. P. *et al.* Preparation of a biocatalyst via physical adsorption of lipase from *Thermomyces lanuginosus* on hydrophobic support to catalyze biolubricant synthesis by esterification reaction in a solvent-free system. **Enzyme and Microbial Technology**, [S. l.], v. 84, p. 56–67, 2016.

LAMBRÉ, C. *et al.* Safety evaluation of food enzyme trypsin from porcine pancreas. **EFSA Journal**, [S. l.], v. 19, n. 6, 2021.

- LIU, J. *et al.* Immobilization of trypsin onto large-pore mesoporous silica and optimization enzyme activity via response surface methodology. **Solid State Sciences**, [S. l.], v. 89, p. 15–24, 1 mar. 2019.
- LIU, S. *et al.* Smart chemistry of enzyme immobilization using various support matrices – A review. **International Journal of Biological Macromolecules**, [S. l.], v. 190, p. 396-408, 2021.
- LONHIENNE, T.; GERDAY, C.; FELLER, G. Psychrophilic enzymes: revisiting the thermodynamic parameters of activation may explain local flexibility. **Biochimica et Biophysica Acta** [S. l.], v. 1543 p. 1-10, 2000.
- LORENA O., F. *et al.* Quitosana: da Química Básica à Bioengenharia. **Química Nova na Escola**, [S. l.], v. 39, n. 4, 2017.
- MACHADO, N. B. *et al.* Preparation, functionalization and characterization of rice husk silica for lipase immobilization via adsorption. **Enzyme and Microbial Technology**, [S. l.], v. 128, p. 9–21, 1 set. 2019.
- MAGEED, H. A.; EZZ, N. A.; RADWAN, R. Bio-inspired trypsin-chitosan cross-linked enzyme aggregates: A versatile approach for stabilization through carrier-free immobilization. **Biotechnologia**, [S. l.], v. 100, n. 3, p. 301–309, 2019.
- MAGHRABY, Y. R. *et al.* Enzyme Immobilization Technologies and Industrial Applications. **ACS Omega**, [S. l.], v. 8, p. 5184-5196, 2023.
- MANOEL, E. A. *et al.* Accurel MP 1000 as a support for the immobilization of lipase from Burkholderia cepacia: Application to the kinetic resolution of myo-inositol derivatives. **Process Biochemistry**, [S. l.], v. 50, n. 10, p. 1557–1564, 1 out. 2015.
- MANRICH, A. *et al.* Immobilization of trypsin on chitosan gels: Use of different activation protocols and comparison with other supports. **International Journal of Biological Macromolecules**, [S. l.], v. 43, n. 1, p. 54–61, 1 jul. 2008.
- MASSOLINI, G.; CALLERI, E. Immobilized trypsin systems coupled on-line to separation methods: Recent developments and analytical applications. **Journal of Separation Science**, [S. l.], v. 28, p. 7-21, 2005.
- MENDES, A. A. *et al.* Multipoint covalent immobilization of lipase on chitosan hybrid hydrogels: Influence of the polyelectrolyte complex type and chemical modification on the catalytic properties of the biocatalysts. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, [S. l.], v. 38, n. 8, p. 1055–1066, 2011.
- MERYAM SARDAR, R. A. Enzyme Immobilization: An Overview on Nanoparticles as Immobilization Matrix. **Biochemistry & Analytical Biochemistry**, [S. l.], v. 4, p. 1000178, 2015.
- METHACANON, P. *et al.* Heterogeneous N-deacetylation of squid chitin in alkaline solution. **Carbohydrate Polymers**, [S. l.], v. 52, p. 119–123, 2003.

MIGUEZ, J. P. *et al.* Enzymatic synthesis optimization of a cosmetic ester catalyzed by a homemade biocatalyst prepared via physical adsorption of lipase on amino-functionalized rice husk silica. **Chemical Engineering Research and Design**, [S. l.], v. 139, p. 296–308, 2018.

MIGUEZ, J. P.; SOUSA, A. E. A.; TAVANO, O. L. Increased trypsin resilience in aqueous-acetonitrile environment when immobilized on glyoxyl-agarose may improve its applicability. **Biocatalysis and Biotransformation**, [S. l.], v. 8, p. 1-8, 2023.

MIRANDA, J. S. *et al.* Immobilization of *Thermomyces lanuginosus* lipase on mesoporous poly-hydroxybutyrate particles and application in alkyl esters synthesis: Isotherm, thermodynamic and mass transfer studies. **Chemical Engineering Journal**, [S. l.], v. 251, p. 392–403, 2014.

MOMINA; MOHAMMAD, S.; SUZYLAWATI, I. Study of the adsorption/desorption of MB dye solution using bentonite adsorbent coating. **Journal of Water Process Engineering**, [S. l.], v. 34, p. 101155, 2020.

MONTEIRO, O. A. C.; AIROLDI, C. Some studies of crosslinking chitosan-glutaraldehyde interaction in a homogeneous system. **International Journal of Biological Macromolecules**, [S. l.], v. 26, p. 119–128, 1999.

MONTEIRO, R. R. C. *et al.* Immobilization of lipase a from *Candida antarctica* onto Chitosan-coated magnetic nanoparticles. **International Journal of Molecular Sciences**, [S. l.], v. 20, n. 16, 2 ago. 2019.

MOORE, S.; STEIN, W. H. Photometric ninhydrin method for use in the chromatography of amino acids. **The Journal of biological chemistry**, [S. l.], v. 176, n. 1, p. 367–388, 1 out. 1948.

MORELLON-STERLING, R. *et al.* A review on the immobilization of pepsin: A Lys-poor enzyme that is unstable at alkaline pH values. **International Journal of Biological Macromolecules**, [S. l.], v. 210, p. 682-702, 2022.

MORENO, J. A. S. *et al.* Development of electrosprayed mucoadhesive chitosan microparticles. **Carbohydrate Polymers**, [S. l.], v. 190, p. 240–247, 15 jun. 2018.

MUSTATEA, G. *et al.* Protein acidic hydrolysis for amino acids analysis in food-progress over time: A short review. **Journal of Hygienic Engineering and Design**, Bucharest, v. 26, p. 81-87, 2019.

MUTHULAKSHMI, C. *et al.* Production, Purification and Characterization of Protease by *Aspergillus flavus* under Solid State Fermentation. **Jordan Journal of Biological Sciences**. [S. l.], v. 4, n. 3, p. 137-148, 2011

NATH, A. *et al.* Production of liquid milk protein concentrate with antioxidant capacity, angiotensin converting enzyme inhibitory activity, antibacterial activity, and hypoallergenic property by membrane filtration and enzymatic modification of proteins. **Processes**, [S. l.], v. 8, n. 7, 2020.

- NAVEED, M. *et al.* Protease—A Versatile and Ecofriendly Biocatalyst with Multi-Industrial Applications: An Updated Review. **Catalysis Letters**, [S. l.], v. 151, n. 2, p. 307–323, 2021.
- NIEMIROWICZ, G. T.; FRASCH, A. P.; JOSÉ CAZZULO, J. Carboxypeptidase Taq-Like Peptidases from Trypanosomatids. *In: Handbook of Proteolytic Enzymes*. [S. l.] Elsevier Ltd, v. 1, p. 1253–1257. 2013.
- NO, H. K.; MEYERS, S. P. Preparation and characterization of chitin and chitosan- a review. **Journal of Aquatic Food Product Technology**, [S. l.], v. 4, n. 2, p. 27–52, 1995.
- NUNES, Y. L. *et al.* Chemical and physical Chitosan modification for designing enzymatic industrial biocatalysts: How to choose the best strategy? **International Journal of Biological Macromolecules**, [S. l.], v. 181, p. 1124-1170, 2021.
- OKURA, N. S. *et al.* Improved immobilization of lipase from *Thermomyces lanuginosus* on a new chitosan-based heterofunctional support: Mixed ion exchange plus hydrophobic interactions. **International Journal of Biological Macromolecules**, [S. l.], v. 163, p. 550–561, 2020.
- PAGE, M. J.; CERA, E. DI. Serine peptidases: Classification, structure and function. **Cellular and Molecular Life Sciences**, [S. l.], v. 65 p. 1220 – 1236, 2008.
- PAPADAKI, E. *et al.* Feasibility of multi-hydrolytic enzymes production from optimized grape pomace residues and wheat bran mixture using *Aspergillus niger* in an integrated citric acid-enzymes production process. **Bioresource Technology**, [S. l.], v. 309, 2020.
- PERERA, E. *et al.* Trypsin isozymes in the lobster *Panulirus argus* (Latreille, 1804): from molecules to physiology, **Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology**, [S. l.], v. 185, 17-35, 2015.
- PESSATO, T. B.; TAVANO, O. L. Hydrolysis of casein and β -lactoglobulin by immobilized papain after pre-treatment with immobilized trypsin. **Acta Alimentaria**, [S. l.], v. 44, n. 4, p. 570–577, 1 dez. 2015.
- PINHEIRO, B. B. *et al.* Chitosan activated with divinyl sulfone: a new heterofunctional support for enzyme immobilization. Application in the immobilization of lipase B from *Candida antarctica*. **International Journal of Biological Macromolecules**, [S. l.], v. 130, p. 798–809, 1 jun. 2019.
- P-MONSAN. Optimization of glutaraldehyde actjyation of a support for enzyme immobilization, **Journal of Molecular Catalysis**. [S. l.], v. 3, p. 371-384, 1978.
- POONSIN, T. *et al.* Optimal immobilization of trypsin from the spleen of albacore tuna (*Thunnus alalunga*) and its characterization. **International Journal of Biological Macromolecules**, [S. l.], v. 143, p. 462–471, 2020.
- RANJBARI, N. *et al.* Improved features of a highly stable protease from *Penaeus vannamei* by immobilization on glutaraldehyde activated graphene oxide nanosheets. **International Journal of Biological Macromolecules**, [S. l.], v. 130, p. 564–572, 2019.

REMONATTO, D. *et al.* Applications of immobilized lipases in enzymatic reactors: A review, **Process Biochemistry**, [S. l.], v. 114, p. 1-20, 2022.

RIBEIRO, B. D. *et al.* Production and use of lipases in bioenergy: A review from the feedstocks to biodiesel production, **Enzyme Research**, [S. l.], v. 2011, p. 16, 2011.

RIBEIRO, E. S. *et al.* Chitosan-based nanofibers for enzyme immobilization, **International Journal of Biological Macromolecules**, [S. l.], v. 183, p. 1959-1970, 2021.

ROCHA, C.; GONALVES, M. P.; TEIXEIRA, J. A. Immobilization of trypsin on spent grains for whey protein hydrolysis. **Process Biochemistry**, [S. l.], v. 46, n. 2, p. 505–511, 2011.

RODRIGUES, C. *et al.* Mechanical, Thermal and Antimicrobial Properties of Chitosan-Based-Nanocomposite with Potential Applications for Food Packaging. **Journal of Polymers and the Environment**, [S. l.], v. 28, n. 4, p. 1216–1236, 2020.

RODRIGUES, R. C. *et al.* Stabilization of enzymes via immobilization: Multipoint covalent attachment and other stabilization strategies, **Biotechnology Advances**, [S. l.], v. 52, p. 107821, 2021.

RODRÍGUEZ-NÚÑEZ, K.; BERNAL, C.; MARTÍNEZ, R. Immobilized Biocatalyst Engineering: High throughput enzyme immobilization for the integration of biocatalyst improvement strategies. **International Journal of Biological Macromolecules**, [S. l.], v. 170, p. 61–70, 2021.

SADANA, A.; HENLEY, J. P. Single-Step Unimolecular Non-First-Order Enzyme Deactivation Kinetics, **Biotechnology and Bioengineering**, [S. l.], v. 30, p. 717-723, 1987.

SAHIN, S.; OZMEN, I. Covalent immobilization of trypsin on polyvinyl alcohol-coated magnetic nanoparticles activated with glutaraldehyde. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, [S. l.], v. 184, p. 113195, 2020.

SANI, J. T. *et al.* The Importance of Alkaline Protease Commercial Applications: a Short Review. **Indian Journal of Research in Pharmacy and Biotechnology**, [S. l.], v. 5, n. 1, p. 5–8, 2017.

SANTOS, J. C. S. D. *et al.* Importance of the Support Properties for Immobilization or Purification of Enzymes. **ChemCatChem**, [S. l.], v. 7, n. 16, p. 2413–2432, 2015.

SANTOS, J. C. S. DOS *et al.* Bovine trypsin immobilization on agarose activated with divinylsulfone: Improved activity and stability via multipoint covalent attachment. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, [S. l.], v. 117, p. 38–44, 2015.

SANTOS, M. P. F. *et al.* Pepsin immobilization: Influence of carbon support functionalization. **International Journal of Biological Macromolecules**, [S. l.], v. 203, p. 67–79, 2022.

____. Functionalized activated carbon as support for trypsin immobilization and its application in casein hydrolysis. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, [S. l.], v. 46, p. 1651-1664, 2023.

SAQIB, A. A. N.; SIDDIQUI, K. S. How to calculate thermostability of enzymes using a simple approach. **Biochemistry and Molecular Biology Education**, [S. l.], v. 46, n. 4, p. 398-402, 2018.

SASAI, Y. *et al.* Synthesis and characterization of highly stabilized polymer-trypsin conjugates with autolysis resistance. **Catalysts**, [S. l.], v. 7, p. 1-10, 2017.

SHAMSI, T. N.; PARVEEN, R.; FATIMA, S. Characterization, biomedical and agricultural applications of protease inhibitors: A review, **International Journal of Biological Macromolecules**, [S. l.], v. 91, p. 1120-1133, 2016.

SHARMA, M. *et al.* A review on microbial alkaline protease: An essential tool for various industrial approaches, **Industrial Biotechnology**, [S. l.], v. 15, p. 69-78, 2019.

SHELDON, R. A. Enzyme immobilization: The quest for optimum performance. **Advanced Synthesis and Catalysis**, [S. l.], v. 349, n. 8–9, p. 1289–1307, 2007.

SHELDON, R. A; PELT, S. VAN. Enzyme immobilisation in biocatalysis: why, what and how. **Chemical Society reviews**, [S. l.], v. 42, n. 15, p. 6223–35, 2013.

SHU, M. *et al.* Expression, activation and characterization of porcine trypsin in *Pichia pastoris* GS115. **Protein Expression and Purification**, [S. l.], v. 114, p. 149–155, 2015.

SILVA, C. *et al.* Practical insights on enzyme stabilization, **Critical Reviews in Biotechnology**, [S. l.], v. 38, p. 335-350, 2018.

SINGH, R. *et al.* Microbial enzymes: industrial progress in 21st century, **3 Biotech**, [S. l.], v. 6, p. 1-15, 2016.

SINGH, R. S.; SINGH, T.; PANDEY, A. Microbial Enzymes—An Overview. [S. l.], *In*: **Advances in Enzyme Technology, First Edition**, p. 1–40, 2019.

SIRISHA, V. L.; JAIN, ANKITA; JAIN, AMITA. Enzyme Immobilization: An Overview on Methods, Support Material, and Applications of Immobilized Enzymes. *Em*: **Advances in Food and Nutrition Research**. [S. l.], Academic Press Inc., v. 79, p. 179–211. 2016.

SOOZANIPOUR, A. *et al.* Preparation of a stable and robust nanobiocatalyst by efficiently immobilizing of pectinase onto cyanuric chloride-functionalized chitosan grafted magnetic nanoparticles. **Journal of Colloid and Interface Science**, [S. l.], v. 536, p. 261–270, 2019.

SOTO, I. D.; ESCOBAR, S.; MESA, M. Study of the physicochemical interactions between *Thermomyces lanuginosus* lipase and silica-based supports and their correlation with the biochemical activity of the biocatalysts. **Materials Science and Engineering C**, [S. l.], v. 79, p. 525–532, 2017.

SOUZA JÚNIOR, E. C. *et al.* Hydrolysis of casein from different sources by immobilized trypsin on biochar: Effect of immobilization method. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, [S. l.], v. 1146, 1 jun. 2020.

SYNOWIECKI, J.; AL-KHATEEB, N. A. Production, Properties, and Some New Applications of Chitin and Its Derivatives. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, [S. l.], v. 43, p. 145–171, 2003.

TACIAS-PASCACIO, V. G. *et al.* Use of Alcalase in the production of bioactive peptides: A review, **International Journal of Biological Macromolecules**, [S. l.], v. 185, p. 2143-2196, 2020.

TACIAS-PASCACIO, V. G.; CASTAÑEDA-VALBUENA, D.; *et al.* Bioactive peptides from fisheries residues: A review of use of papain in proteolysis reactions, **International Journal of Biological Macromolecules**, [S. l.], v. 184, p. 415-428, 2021.

TACIAS-PASCACIO, V. G.; MORELLON-STERLING, R.; *et al.* Immobilization of papain: A review, **International Journal of Biological Macromolecules**, [S. l.], v. 188, p. 94-113, 2021.

TAN, K. L.; HAMEED, B. H. Insight into the adsorption kinetics models for the removal of contaminants from aqueous solutions. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, [S. l.], v. 74, p. 25–48, 1 maio 2017.

TAPDIGOV, S. Z. The bonding nature of the chemical interaction between trypsin and chitosan based carriers in immobilization process depend on entrapped method: A review, **International Journal of Biological Macromolecules**, [S. l.], v. 183, p. 1976-1696, 2021.

TAVANO, O. L. Protein hydrolysis using proteases: An important tool for food biotechnology. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, [S. l.], v. 90, p. 1–11, 2013.

____. Biotechnological Applications of Proteases in Food Technology. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, [S. l.], v. 17, n. 2, p. 412–436, 2018.

THANGARAJ, B.; SOLOMON, P. R. Immobilization of Lipases – A Review. Part I: Enzyme Immobilization, **ChemBioEng Reviews**, [S. l.], v. 6, p. 157-166, 2019.

TONINI, D.; ASTRUP, T. Life-cycle assessment of a waste refinery process for enzymatic treatment of municipal solid waste. **Waste Management**, [S. l.], v. 32, n. 1, p. 165–176, 2012.

TRANSUE, T. R. *et al.* X-ray and NMR Characterization of Covalent Complexes of Trypsin, Borate, and Alcohols. **Biochemistry**, [S. l.], v. 43, n. 10, p. 2829–2839, 2004.

TSUGITA, A.; SCHEFFLER, J. -J. A Rapid Method for Acid Hydrolysis of Protein with a Mixture of Trifluoroacetic Acid and Hydrochloric Acid. **European Journal of Biochemistry**, [S. l.], v. 124, n. 3, p. 585–588, 1982.

URRUTIA, P. *et al.* Use of chitosan heterofunctionality for enzyme immobilization: β -galactosidase immobilization for galacto-oligosaccharide synthesis. **International Journal of Biological Macromolecules**, [S. l.], v. 116, p. 182–193, 2018.

VANDERMARLIERE, E.; MUELLER, M.; MARTENS, L. Getting intimate with trypsin, the leading protease in proteomics, **Mass Spectrometry Reviews**, [S. l.], v. 32, p. 453–465, 2013.

VASCONCELOS, N. F. *et al.* Papain immobilization on heterofunctional membrane bacterial cellulose as a potential strategy for the debridement of skin wounds. **International Journal of Biological Macromolecules**, [S. l.], v. 165, p. 3065–3077, 2020.

VIEILLE, C.; ZEIKUS, J. G. Thermozyms: identifying molecular determinants of protein structural and functional stability. **Tibtech**, [S. l.], v. 14, 1996.

VOBĚRKOVÁ, S. *et al.* Immobilization of ligninolytic enzymes from white-rot fungi in cross-linked aggregates. **Chemosphere**, [S. l.], v. 202, p. 694–707, 2018.

WAHAB, R. A. *et al.* On the taught new tricks of enzymes immobilization: An all-inclusive overview. **Reactive and Functional Polymers**, [S. l.], v. 152, 2020.

WAHBA, M. I. Porous chitosan beads of superior mechanical properties for the covalent immobilization of enzymes. **International Journal of Biological Macromolecules**, [S. l.], v. 105, p. 894–904, 2017.

WANG, X. *et al.* A novel antioxidant and ACE inhibitory peptide from rice bran protein: Biochemical characterization and molecular docking study. **LWT**, [S. l.], v. 75, p. 93–99, 2017.

WEFSH J NORMANN R BEETNER G FREV A, L. K. *et al.* Association of Official Agricultural Chemists. **American Association of Cereal Chemists, St. Paul, Minn**, Academic Press, [S. l.], v. 746, 1974.

WELTZ, J. S. *et al.* Reduced Enzyme Dynamics upon Multipoint Covalent Immobilization Leads to Stability-Activity Trade-off. **Journal of the American Chemical Society**, v. 142, n. 7, p. 3463–3471, 2020.

YOUNES, I.; RINAUDO, M. Chitin and chitosan preparation from marine sources. Structure, properties and applications. **Marine Drugs**, [S. l.], v. 13, n. 3, p. 1133–1174, 2015.

ZAAK, H.; SASSI, M.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. A new heterofunctional amino-vinyl sulfone support to immobilize enzymes: Application to the stabilization of β -galactosidase from *Aspergillus oryzae*. **Process Biochemistry**, [S. l.], v. 64, p. 200–205, 2018.

ZDARTA, J. *et al.* Immobilization of Amano Lipase A onto Stöber silica surface: Process characterization and kinetic studies. **Open Chemistry**, [S. l.], v. 13, n. 1, p. 138–148, 2015.

_____. A general overview of support materials for enzyme immobilization: Characteristics, properties, practical utility. **Catalysts**, [S. l.], v. 8, n. 2, 2018.

ZHANG, X. *et al.* Optimal spacer arm microenvironment for the immobilization of recombinant Protein A on heterofunctional amino-epoxy agarose supports. **Process Biochemistry**, [S. l.], v. 91, p. 90–98, 2020.

ZHAO, X. *et al.* Lipase-catalyzed process for biodiesel production: Enzyme immobilization, process simulation and optimization. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, [S. l.], v. 44, p. 182-197, 2015.

ZHOU, Z. *et al.* Immobilization of lipase in cage-type mesoporous organosilicas via covalent bonding and crosslinking. **Catalysis Today**, [S. l.], v. 243, n. C, p. 173–183, 2015.

ZUCCA, P.; SANJUST, E. Inorganic materials as supports for covalent enzyme immobilization: Methods and mechanisms. **Molecules**, [S. l.], v. 19, n. 9, p. 4139-4194, 2014.