



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA

GABRIELLE LAPORTE SANTOS

**PRODUÇÃO, PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DE PROTEASES DE *PENICILLIUM*
*CITRINUM***

CAMPINAS

2019

GABRIELLE LAPORTE SANTOS

**PRODUÇÃO, PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DE PROTEASES DE *PENICILLIUM*
*CITRINUM***

Dissertação apresentada à Faculdade de Engenharia Química da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestra em Engenharia Química.

Orientador: Prof. Dr. Elias Basile Tambourgi

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELA ALUNA GABRIELLE LAPORTE SANTOS, E ORIENTADA PELO PROF. DR. ELIAS BASILE TAMBOURGI.

CAMPINAS

2019

Agência de fomento e nº de processo: CNPq, 147240/2017-4

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Área de Engenharia e Arquitetura
Rose Meire da Silva - CRB 8/5974

Santos, Gabrielle Laporte, 1994-
Sa59p Produção, purificação e caracterização parcial de proteases de *Penicillium citrinum* / Gabrielle Laporte Santos. – Campinas, SP : [s.n.], 2019.

Orientador: Elias Basile Tambourgi.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química.

1. *Penicillium citrinum*. 2. Protease. 3. Purificação. 4. Precipitação. I. Tambourgi, Elias Basile, 1957-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia Química. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Production, purification and partial characterization of proteases of *Penicillium citrinum*

Palavras-chave em inglês:

Penicillium citrinum

Protease

Purification

Precipitation

Área de concentração: Engenharia Química

Titulação: Mestra em Engenharia Química

Banca examinadora:

Elias Basile Tambourgi [Orientador]

Reinaldo Gaspar Bastos

Sandra Regina Ceccato Antonini

Data de defesa: 27-09-2019

Programa de Pós-Graduação: Engenharia Química

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0003-0832-2437>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/3108853893001133>

Folha de Aprovação da Defesa de Dissertação de Mestrado defendida por Gabrielle Laporte Santos aprovada em 27 de setembro de 2019 pela banca examinadora constituída pelos seguintes doutores:

Prof. Dr. Elias Basile Tambourgi (Orientador)

FEQ/UNICAMP

Dra. Sandra Regina Ceccato Antonini

Universidade Federal de São Carlos

Dr. Reinaldo Gaspar Bastos

Universidade Federal de São Carlos

Ata de defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa da Unidade.

Dedicatória

Aos meus pais, Andréa e Alberto, pelos aprendizados e valores. Por me ensinarem a batalhar pelos meus objetivos. Também pelo árduo trabalho para proporcionarem as oportunidades que tive.

Aos meus irmãos, Isabella e Allan, pelo apoio e momentos de descontração.

Ao meu amor e melhor amigo Gabriel, por todo o carinho, companheirismo e ensinamentos. Por sempre me incentivar a não desistir de meus sonhos. Sobretudo pelo apoio nesta importante etapa de minha vida.

Agradecimentos

À Universidade Estadual de Campinas pela oportunidade de realização do mestrado em Engenharia Química e contribuição em minha formação acadêmica.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Elias Basile Tambourgi, pela orientação, confiança, incentivo e momentos de descontração durante o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Edgar Silveira Campos pelo apoio, ensinamentos e contribuição para o bom andamento do trabalho.

À Prof. Dra. Daniele Viana, pela prontidão e apoio na pesquisa.

Às minhas amigas Natália e Nathiele, por todo auxílio e amizade.

À todos os colegas e amigos do Laboratório de Processos de Separação II (LPS-II), DESQ-FEQ-Unicamp, por toda colaboração e apoio.

Às minhas amigas Carol, Thaís e Larissa por todo o apoio e incentivo.

Aos professores e doutores que compuseram a banca avaliadora.

Aos meus demais amigos e todos os meus familiares.

O presente trabalho foi realizado com o apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) – Processo 147240/2017-4.

Muito Obrigada!!

“Lembre-se que as pessoas podem tirar tudo de você, menos o seu conhecimento.”

Albert Einstein

Resumo

Avanços na biotecnologia têm possibilitado a produção de biomoléculas de interesse comercial. Dentre essas, se encontram as enzimas proteolíticas, que correspondem a mais de 65% do mercado total de enzimas. Essas estão envolvidas em processos biológicos essenciais e, além disso, apresentam diversas aplicações no ramo industrial, sendo utilizadas na indústria têxtil, farmacêutica e de alimentos, por exemplo. No Brasil, a maioria das proteases empregadas industrialmente é importada, sendo menos de 2% produzidas no país e se fazendo necessário o crescimento da produção nacional. Nesse contexto de produção de biomoléculas, se destaca a etapa de separação e purificação das mesmas, já que esta é responsável por 50 a 90% do custo total do processo. Desse modo, há a necessidade de elaboração de estratégias que viabilizem a produção de tais enzimas. Dessa forma, o presente projeto visa a produção, purificação e caracterização parcial de proteases do fungo filamentoso *Penicillium citrinum*. Inicialmente, foi avaliada a produção de protease por fermentação em estado sólido e em estado submerso. Foi observado que a fermentação em estado sólido foi mais produtiva, alcançando uma atividade proteolítica de 19,23 U/mL. Visando a concentração e purificação do extrato enzimático, foi realizada a precipitação de proteínas. Os procedimentos foram realizados a 20, 40, 60 e 80% de saturação, utilizando etanol e sulfato de amônio. A precipitação com sulfato de amônio se mostrou mais eficaz, atingindo uma atividade específica de 14,70 U/mg, fator de purificação de 1,43 vezes e recuperação de 52,96 %. De modo a avaliar a aplicabilidade das proteases obtidas, foram realizados testes de efeito de pH e de temperatura. Assim, foi verificado que as enzimas produzidas por *Penicillium citrinum* apresentaram um pH ótimo de 8,2 em tampão Tris HCl, e uma temperatura ótima de 50°C, indicando uma potencial aplicação na indústria de detergentes e do couro.

Palavras-chave: *Penicillium citrinum*, purificação, protease, precipitação.

Abstract

Advances in biotechnology enabled the production of biomolecules of commercial interest. These include proteolytic enzymes, which account over 65% of the total enzyme market. These are involved in essential biological processes and have various applications in the industrial field, like in textile, pharmaceutical and food industries. In Brazil, since less than 2% are produced in the country, most of the industrially employed proteases are imported, making the increase of production necessary. In this context of production of biomolecules, the downstream processing is highlighted, due to the fact that it's responsible for 50 to 90% of the total cost of the process. Thus, the development of strategies that enable the production of such enzymes are needed. Therefore, the present project aims at the production, purification and partial characterization of proteases of the filamentous fungus *Penicillium citrinum*. Initially, protease production was evaluated by solid state and submerged fermentation. It was observed that the solid state fermentation was more productive, reaching a proteolytic activity of 19,23 U/mL. In order to concentrate and purify the enzyme extract, protein precipitation was performed. The procedures were performed at 20, 40, 60 and 80% of saturation, using ethanol and ammonium sulfate. Ammonium sulfate precipitation was more effective, reaching a specific activity of 14.70 U/mg, a 1.43 fold purification factor and a 52.96% recovery. To evaluate the applicability of the proteases obtained, pH and temperature effect tests were performed. Thus, it was verified that the enzymes produced by *Penicillium citrinum* had an optimum pH of 8.2 in Tris HCl buffer, and an optimum temperature of 50°C, indicating a potential application in the detergent and leather industry.

Keywords: *Penicillium citrinum*, purification, protease, precipitation.

Lista de Figuras

Figura 1- Esquema de um processo genérico de recuperação e purificação de bioprodutos.	27
Figura 2- Esquema representativo das atividades desenvolvidas neste trabalho.	33
Figura 3 - Farinha e flocão de arroz, respectivamente, utilizados nos experimentos.	36
Figura 4- Meio de fermentação submersa composto por glicose e extrato de levedura após incubação por 7 dias à 28°C, com agitação em agitador orbital de 150 rpm.	43
Figura 5- Meio de fermentação em estado sólido composto por farinha de arroz após incubação por 5 dias à 28°C.	44
Figura 6- Perfil de produção proteolítica nos processos de fermentação em estado sólido e submersa.	45
Figura 7- Avaliação do efeito do pH sobre as enzimas purificadas.	48
Figura 8- Avaliação do efeito da temperatura sobre a atividade proteolítica das proteases purificadas.	49

Lista de Tabelas

Tabela 1- Classificação em termos de tipo catalítico.	19
Tabela 2- Tipos catalíticos e seus inibidores.....	20
Tabela 3- Fontes de carbono e nitrogênio avaliadas na fermentação submersa.	34
Tabela 4- Meios utilizados para verificação da influência das fontes de carbono e de nitrogênio na produção de proteases por fermentação submersa.....	35
Tabela 5- Resultados obtidos nos processos de fermentação submersa: quantificação de proteínas totais e atividade proteolítica.....	42
Tabela 6- Purificação des proteases por precipitação fracionada com etanol.	46
Tabela 7- Purificação des proteases por precipitação fracionada com sulfato de amônio.....	47

Sumário

Capítulo 1 - Introdução.....	14
1.1 Organização Estrutural da Dissertação.....	14
1.2 Enzimas Proteolíticas: Perspectiva Atual.....	15
Capítulo 2 – Objetivos	17
2.1 Objetivo Geral	17
Produzir, purificar e caracterizar parcialmente proteases de <i>Penicillium citrinum</i>	17
2.2 Objetivos Específicos.....	17
Capítulo 3 – Revisão Bibliográfica.....	18
3.1 Proteases.....	18
3.1.1 Definição e funções	18
3.1.2 Classificação.....	18
3.2 Fontes de Proteases.....	21
3.2.1 Proteases de Plantas.....	21
3.2.2 Proteases de Animais.....	22
3.2.3 Proteases Microbianas	22
3.3 Produção Enzimática por Processos Fermentativos.....	25
3.4 Recuperação e Purificação de Bioprodutos	26
3.5 Aplicações Industriais	28
3.5.1 Aplicação de Proteases na Indústria de Detergentes	28
3.5.2 Aplicação de Proteases na Indústria Farmacêutica.....	29
3.5.3 Aplicação de Proteases na Indústria de Cosméticos.....	30
3.5.4 Aplicação de Proteases na Indústria Alimentícia	31
3.5.5 Aplicação de Proteases na Indústria do Couro	32

Capítulo 4 – Material e Métodos.....	33
4.1 Microrganismo e Conservação	34
4.2 Produção Proteolítica e Extrato Enzimático	34
4.2.1 Fermentação Submersa	34
4.2.2 Fermentação em Estado Sólido.....	36
4.3 Determinação de Proteínas Totais.....	37
4.4 Atividade Proteolítica	37
4.5 Precipitação de Proteínas	38
4.5.1 Precipitação de Proteínas por Etanol	38
4.5.2 Precipitação de Proteínas por Sulfato de Amônio	39
4.7 Caracterização Parcial das Proteases Purificadas	40
Capítulo 5 – Resultados e Discussão.....	42
5.1 Produção Proteolítica.....	42
5.2 Precipitação Fracionada com Etanol e Sulfato de Amônio	45
5.4 Caracterização Parcial das Proteases Purificadas	48
Capítulo 6 – Conclusão	51
Capítulo 7 - Sugestões para Próximos Trabalhos	52
Capítulo 8 – Referências Bibliográficas.....	53

Capítulo 1 - Introdução

1.1 Organização Estrutural da Dissertação

O presente trabalho encontra-se organizado na forma de capítulos, nos quais:

- O Capítulo 1 exibe uma introdução geral sobre o tema do trabalho, englobando a importância de enzimas no mercado mundial e, sobretudo, sobre as proteases;
- O Capítulo 2 apresenta os objetivos do trabalho desenvolvido;
- O Capítulo 3 envolve uma revisão bibliográfica acerca do tema do trabalho, englobando tópicos como definição, fontes e produção de proteases. Além disso, também são esclarecidos os meios de produção e de separação destas enzimas;
- O Capítulo 4 compreende o material e os métodos utilizados para a execução do presente trabalho;
- O Capítulo 5 expõe os resultados obtidos com os experimentos e a discussão acerca dos mesmos;
- A partir dos capítulos anteriores, o Capítulo 6 contempla as principais conclusões da dissertação;
- O Capítulo 7 sugere propostas para futuros trabalhos;
- O Capítulo 8 apresenta as referências bibliográficas utilizadas para a confecção deste trabalho.

1.2 Enzimas Proteolíticas: Perspectiva Atual

Devido à sua atividade catalítica e natureza biodegradável, as enzimas são amplamente empregadas em processos industriais, podendo atuar como substitutas de agentes químicos. Elas possibilitam o uso de processos mais limpos e economicamente viáveis (SANCHEZ; DEMAIN, 2011). O mercado global de enzimas possui uma especulação positiva, sendo previsto um crescimento anual de 4,7% entre os anos de 2016 a 2021, quando se estima o alcance do valor de \$6,3 bilhões (DEWAN, 2017). Aproximadamente 65% do mercado total de enzimas é representado pelas proteases, sendo essas uma das mais importantes na indústria catalítica (ANNAMALAI et al., 2014).

As enzimas proteolíticas, também denominadas proteases, são biomoléculas que possuem a capacidade de quebrar ligações peptídicas (BON et al., 2008). Elas apresentam um amplo campo de aplicações, podendo ser utilizadas na indústria farmacêutica, de cosméticos, de couro, no processamento de alimentos, na fabricação de detergentes, na produção de bebidas, no aumento da digestibilidade em alimentos de animais, entre outros (GIONGO, 2006).

Nos seres humanos, essas biomoléculas estão relacionadas com processos biológicos essenciais. Elas também podem ser produzidas por animais, plantas e microrganismos, havendo destaque para estes últimos. Isso ocorre devido ao fato de que as proteases microbianas apresentam vantagens com relação às demais, como por exemplo o rápido crescimento microbiano, tornando os processos mais acelerados, o que reflete em seu amplo uso. Cerca de 40% das enzimas proteolíticas utilizadas na indústria são de origem microbiana (JOHNVESLY; NAIK, 2001). Dentre os microrganismos utilizados para produção, os fungos são os que apresentam maior variedade de proteases, sendo que a produção comercial se dá principalmente pelos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* (COLEN, 2006).

A produção de proteases por microrganismos sofre influência de diversos componentes do processo, tais como composição do meio, se destacando as fontes de carbono e nitrogênio, o pH, a temperatura, nível de oxigenação do meio, inóculo e tempo de incubação (MESBAH; WIEGEL, 2014). Nesses processos, são produzidos diversos compostos, sendo necessário o uso posterior de métodos adequados de separação para a retirada de produtos indesejados.

Devido à complexidade das misturas de proteínas e à necessidade de manter a atividade biológica das mesmas, a purificação representa uma etapa de extrema importância e complexidade. Cerca de 50 a 90% do custo total de produção de um produto biológico é determinado pela etapa de purificação (PORTO et al., 2008).

Embora apresentem ampla utilidade comercial e industrial, a produção de proteases no Brasil é muito baixa, apresentando menos de 2% do total de enzimas utilizadas na indústria, sendo a maioria das enzimas importadas (GIONGO, 2006). Sendo assim, se faz necessário estudos que visem a produção de tais enzimas através de métodos que apresentem custo reduzido e alta eficiência.

Capítulo 2 – Objetivos

2.1 Objetivo Geral

Produzir, purificar e caracterizar parcialmente proteases de *Penicillium citrinum*.

2.2 Objetivos Específicos

- Produzir proteases por:
 - Fermentação em estado sólido, avaliando a farinha e o flocão de arroz como substratos;
 - Fermentação submersa, avaliando as fontes de carbono e nitrogênio;
- Purificação enzimática por precipitação com etanol e sulfato de amônio;
- Caracterização parcial da protease purificada.

Capítulo 3 – Revisão Bibliográfica

3.1 Proteases

3.1.1 Definição e funções

Proteases, também chamadas de peptidases e enzimas proteolíticas, compreendem a classe de enzimas que possuem a habilidade de hidrolisar ligações peptídicas (RAO et al., 1998). Já que a hidrólise de peptídeos é extremamente lenta, essas enzimas facilitam e aceleram esse processo (BERG et al., 2002).

De acordo com o Comitê de Nomenclatura da União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (NC-IUBMB), essas enzimas são classificadas na classe 3 (hidrolases) e subclasse 4 (peptidases) (VERMELHO et al., 2008).

Enzimas proteolíticas ocorrem em uma grande variedade de fontes, como animais, plantas e microrganismos. Segundo Vermelho et al. (2008), elas são fisiologicamente necessárias para os seres vivos e representam cerca de 2% do total de proteínas presentes em todos os organismos. Essas enzimas estão envolvidas em processos como adaptação, esporulação, germinação, nutrição, inflamação, crescimento de tumor, regulação da expressão gênica, coagulação do sangue e morte (RAO et al., 1998). Devido a isso, inibidores de proteases são usados como importantes drogas no tratamento de algumas doenças, como AIDS e para regular a pressão sanguínea (BERG et al., 2002). Além disso, proteases também estão presentes no metabolismo de nitrogênio das células (SABOTIC; KOS, 2012).

3.1.2 Classificação

As enzimas proteolíticas podem ser classificadas de acordo com três critérios: especificidade, tipo catalítico e homologia. Com relação a especificidade, essas biomoléculas são subdivididas com base em seus sítios de ação. Quando a clivagem ocorre na ligação peptídica próxima de amino ou carboxi terminais do substrato, são chamadas de exopeptidases. Quando o ataque enzimático ocorre em ligação peptídicas internas, são denominadas endopeptidases (RAO et al., 1998).

Exopeptidases podem ser divididas de acordo com seus sítios de ação no N ou C terminal, sendo chamadas amino e carboxipeptidases, respectivamente. As aminopeptidases podem liberar um resíduo de aminoácido, um dipeptídeo (dipeptidil-peptidase) ou a tripeptídeo (tripeptidil-peptidase). Carboxipeptidases liberam um único aminoácido ou um dipeptídeo (peptidil-dipeptidase) (BARRETT, 1994). Segundo Rao et al. (1998), esse último ainda pode ser dividido com base na natureza dos resíduos de aminoácidos no sítio ativo das enzimas. Assim, podem ser classificados como serino, metalo ou cisteíno carboxipeptidases.

Quando se trata de endopeptidases, a ação preferencial nas ligações peptídicas nas regiões internas da cadeia define seu tipo. Assim, são divididas em seis grupos: serino, aspártica, cisteína, ácido glutâmico, treonina e metaloproteases (BARRETT, 1994; WARD et al., 2009). Além disso, algumas dessas enzimas atacam apenas pequenos peptídeos, sendo chamadas de oligopeptidases. Outras agem em peptídeos e proteínas de quaisquer tamanhos, denominadas endopeptidases. Essas que agem em ligações peptídicas com aminoácidos modificados ou na ausência de carbono alfa são nomeadas omegapeptidases (BRIX e STÖCKER, 2013).

Em termos de tipo catalítico, enzimas são subdivididas de acordo com os grupos químicos envolvidos no mecanismo catalítico. Nessa classificação, ambas carboxipeptidases e endopeptidases são categorizadas, como pode ser visto na Tabela 1 (BARRETT, 1994; WARD et al., 2009).

Tabela 1- Classificação em termos de tipo catalítico.

Proteases		Tipo catalítico
Carboxipeptidases	Serino carboxipeptidase	Serina
	Metalo carboxipeptidase	Metalo
	Cisteíno carboxipeptidase	Cisteína
	Serino endopeptidase	Serina
	Endopeptidases aspártica	Aspártica

Endopeptidases	Cisteíno endopeptidase	Cisteína
	Ácido glutâmico endopeptidase	Ácido glutâmico
	Treonina endopeptidase	Treonina
	Metalo endopeptidase	Metalo

Ademais, devido ao fato de que cada uma dessas enzimas tem uma estrutura diferente, elas possuem certos inibidores, que são mostrados na Tabela 2. Ácido glutâmico e treonina são subgrupos recentes, então não há informações suficientes sobre estes (RAO et al., 1998; WARD et al., 2009).

Tabela 2- Tipos catalíticos e seus inibidores.

Classificação	Inibidores
Serino Proteases	3,4-dicloroisocumarina (3,4-DCI), diisopropilfluorofosfato (DFP), fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF), tosil-L-lisina clorometil cetona (TLCK)
Aspártico Proteases	Pepstatina, éster metílico de diazo acetil-L-norleucina (DAN), 1,2-epoxy-3- (p-nitro fenil) propano (E PNP)
Cisteíno Proteases	PCMB
Ácido glutâmico Proteases	-
Treonina Proteases	-
Metalo Proteases	EDTA

Segundo Barrett (1994), também é possível classificar enzimas proteolíticas por homologia. Comparando as sequencias de aminoácidos das peptidases, as relações evolutivas e estruturais podem ser conhecidas. Elas são agrupadas em famílias de acordo com a similaridade da sequência de aminoácido

do seu sítio catalítico da enzima representativa. Assim, famílias são agrupadas em específicos clãs (BARRETT et al., 2003). Essa abordagem mostra que as similaridades dentro de uma família comumente refletem importantes similaridades no mecanismo catalítico e funções biológicas (BARRETT, 1994). Visando saber mais informações como inibidores, famílias e clãs de uma peptidase conhecida, é possível usar a base de dados MEROPS (RAWLINGS et al., 2014).

3.2 Fontes de Proteases

De acordo com Rao et al. (1998), por serem essenciais para os organismos, as proteases podem ser encontradas em uma grande variedade de fontes, como plantas, animais e microrganismos.

3.2.1 Proteases de Plantas

A produção de proteases através de plantas é um processo demorado. Além disso, sua produção depende de vários fatores, tais como a disponibilidade de terra para o cultivo e condições climáticas favoráveis para crescimento. Bromelina, papaína, ficina e queratinase representam as proteases produzidas por plantas que estimulam interesse comercial, sendo a bromelina e a papaína as que mais se destacam (RAO et al., 1998; TREMACOLDI, 2009).

A papaína é uma cisteíno protease extraída do látex de mamão (*Carica papaya*) e sua performance depende de alguns fatores como fonte, condições climáticas de crescimento e os métodos utilizados para sua extração e purificação. Essa enzima possui um pH ótimo entre 5 e 9, e é estável de 80 a 90°C na presença de substratos (RAO et al., 1998). Além disso, devido a sua estabilidade a altas temperaturas e ampla faixa de variação de pH com atividade ótima, essa enzima pode ser usada para várias aplicações. Abdalla et al. (2013) estudaram o amaciamento de carne utilizando folhas de mamão e conseguiu um resultado efetivo. Monetta (1988) verificou a eficiência do uso da papaína em curativos, concluindo que esta é um recurso valioso no tratamento de lesões na pele.

A bromelina, também uma cisteíno protease, é obtida através do caule e suco de abacaxi. Essa enzima é ativa em uma escala de pH de 5 até 9, e inativada em 70°C (RAO et al., 1998). Bromelina tem sido amplamente utilizada nas indústrias médica, farmacêutica, cosmética e alimentícia (ATAIDE et al, 2018; BRIX e STÖCKER, 2013).

3.2.2 Proteases de Animais

Há quatro tipos comuns de proteases de animais. A tripsina é uma serino protease que é a principal enzima digestiva intestinal responsável pela hidrólise de proteínas de alimentos. Quimotripsina é uma enzima proteolítica encontrada em extrato pancreático animal. A pepsina, uma protease ácida, é encontrada no estômago da maioria dos vertebrados e é responsável pela hidrólise de ligações peptídicas entre dois aminoácidos hidrofóbicos. Por último, a renina é uma protease animal que é ativada pela ação da pepsina ou por autocatálise (RAO et al., 1998).

A produção dessas enzimas é complicada por dependerem do abate de animais para a sua obtenção. Assim, pesquisadores vêm estudando novas fontes de proteases. Com o objetivo de encontrar um uso para os resíduos de processamento de peixe, Murthy et al. (2017) verificaram a presença de proteases em vísceras de peixe. Dessa forma, a presença de protease foi reportada em catla (*Catla catla*), tilápia (*Oreochromis mossambicus*) e atum de cavala (*Euthynnus affinis*). Além destes, Younes et al. (2014) extraíram e caracterizaram proteases alcalinas de vísceras de peixe escorpião. O estudo sugere a presença de pelo menos três proteases principais diferentes e o extrato bruto foi altamente recomendado para aplicação em formulações de detergentes.

3.2.3 Proteases Microbianas

Microrganismos produzem uma grande variedade de proteases, que podem ser extracelulares e/ou intracelulares. Quando produzidas no meio extracelular, essas enzimas possuem a função de hidrolisar proteínas em ambientes livres de células, permitindo sua absorção e uso pela célula. Proteases intracelulares são essenciais para células pois estão envolvidas em vários processos celulares e

metabólicos, como a diferenciação, esporulação e maturação enzimática de enzimas e hormônios (KALISZ, 1988).

Enzimas proteolíticas microbianas são preferidas às de animais e plantas, uma vez que apresentam uma variada diversidade bioquímica e características desejáveis para aplicações biotecnológicas (RAO et al., 1998). Essas podem ser cultivadas em grandes quantidades em um tempo relativamente curto por métodos de fermentação, e têm uma fácil manipulação genética (GUPTA et al., 2002a; WARD, 1983). Em geral, essas enzimas são mais estáveis do que suas homólogas de plantas e animais, permitindo seu armazenamento em condições menos ideais por semanas sem perda significativa de atividade (GUPTA et al., 2002a; WISEMAN, 1991). Segundo Savitha et al. (2011), além de todas essas vantagens apresentadas por proteases microbianas, estas também possuem um processo de separação mais simples. Isso ocorre devido ao fato de que essas geralmente são extracelulares e secretadas no meio de fermentação por seu produtor, facilitando o processo de *downstream*.

A produção de proteases extracelulares por microrganismos é fortemente influenciada pela característica do meio de fermentação, tais como pH, temperatura, tempo de incubação, fonte de carbono e nitrogênio, aeração e densidade de inoculação. É importante enfatizar a importância da taxa carbono/nitrogênio, já que estes apresentam grande influência (GUPTA et al., 2002b). A tecnologia de obtenção de enzimas por microrganismos consiste em uma série de processos, na qual se incluem a seleção do microrganismo, cultivo deste sob condições que o induzam à produção da biomolécula de interesse, e clarificação e concentração (DASU et al., 2003). A fim de potencializar a produção de enzimas proteolíticas por microrganismos, é possível o aprimoramento da cepa microbiana por mutagenese convencional (exposição a UV ou química) ou tecnologia de DNA recombinante (rDNA) (GUPTA et al., 2002b).

Em 1996, foi relatado que proteases microbianas representavam aproximadamente 40% do total das vendas mundiais de enzimas (GODFREY e WEST, 1996). Esse valor sofreu significativo aumento em 1999, atingindo 67%, o que corresponde a aproximadamente 2/3 do total de vendas de enzimas (KUMAR e TAKAGI, 1999).

Em vírus é possível encontrar aspártica, serino e cisteíno peptidases (RAWLINGS e BARRETT, 1993). Algumas doenças fatais, como a AIDS e o câncer, são afetadas diretamente por proteases virais. Essas enzimas são responsáveis por catalisar o processamento de proteínas virais e o processo maturacional de capsídeos, e sua atividade catalítica é necessária para a produção de um novo e infeccioso vírus (TONG, 2002). Assim, proteases virais representam um alvo atrativo para o desenvolvimento de novos agentes antivirais.

Com relação às proteases bacterianas, *Bacillus sp.* é um produtor de destaque principalmente devido a sua capacidade de secretar essas biomoléculas, sendo um forte candidato para a produção em larga escala (MOON e PARULEKAR, 1991). Além disso, este também possui uma fácil adaptação e crescimento em meios complexos e sintéticos, sendo a fonte mais popular de proteases alcalinas comerciais (TAKAMI et al., 1990). Outras fontes bacterianas conhecidas como potenciais produtores são *Alcaligenes faecalis*, *Flavobacterium balustinum*, *Serratia marcescens*, entre outras (WARD, 1983).

Dentre as proteases fúngicas, existem dois fungos que se destacam, que são os gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*. Enzimas proteolíticas produzidas por *Aspergillus* são ácidas e apresentam atividade em pH no intervalo de 4 a 6 (CHAUD et al., 2007). Em contrapartida, as produzidas por *Penicillium* podem ser neutras, ácidas ou alcalinas (DJAMEL et al., 2009). Essas enzimas exibem um processo de recuperação simples devido ao fato de que há a possibilidade de uso da filtração para a separação do micélio, tornando o custo do processo mais barato quando comparado a proteases bacterianas (KALPANA et al., 2008). Dependendo da aplicação, é necessário que a enzima seja termoestável, como na indústria de panificação, cerveja, couro e detergentes. Nesses processos, a enzima deve agir numa faixa de temperatura de 65 a 86°C. Assim, um fungo termofílico deve ser usado para a produção desta enzima, como *Thermoascus aurantiacus* e *Thermomyces lanuginosus*, por exemplo (MERHEB et al., 2007).

3.3 Produção Enzimática por Processos Fermentativos

Os processos microbianos possibilitam a obtenção de diversos produtos, tais como enzimas, hormônios, pigmentos, biossurfactantes, entre outros (KULKARNI et al., 2018); (RODRIGUES, 2018); (SADALLA-PINTO, 2018); (COSTA et al., 2019). As enzimas proteolíticas têm sido amplamente produzidas por bioprocessos, podendo esses ser classificados de acordo com a quantidade de água no meio, sendo chamados de fermentação submersa e fermentação em estado sólido (MIYASHIRA et al., 2003).

A fermentação submersa (FS) baseia-se em um processo fermentativo que ocorre na presença de grande volume de água, onde se encontram dissolvidos os nutrientes necessários ao microrganismo (SINHA; SINHA, 2009); (SINGHANIA et al., 2009). Essas fermentações devem ser mantidas sob agitação constante para propiciar disponibilidade de nutrientes e aeração ideal, demandando alto gasto de energia no processo (OLIVEIRA et al., 2012). A alta atividade de água ocasiona facilidade de contaminação, possibilitando conseqüente crescimento de microrganismos indesejáveis (SANTOS et al., 2011).

Como garante a homogeneidade do meio e a capacidade de controle dos parâmetros do processo, a FS apresenta facilidade em cultivo em larga escala. Assim, a produção de enzimas em escala industrial ocorre, majoritariamente, por este tipo de bioprocessos (WANDERLEY et al., 2011).

Já a fermentação em estado sólido (FES) envolve o cultivo de microrganismos em meios com relativa ausência de água, garantindo o estado sólido. A umidade deste deve ser suficiente para assegurar crescimento e metabolismo dos microrganismos (PANDEY, 2003). O meio utilizado na FES é geralmente simples, possibilitando o uso de uma grande diversidade de produtos agrícolas, já que estes podem conter todos os nutrientes necessários para o crescimento do microrganismo. Dessa forma, produtos como farelo de trigo, soja, arroz, bagaço de laranja e bagaço de cana podem ser utilizados (GERMANO et al., 2003); (SILVA et al., 2002).

Por utilizarem baixo volume de água, os sistemas FES permitem uma produção de enzimas mais concentradas quando em comparação com FS, tornando os custos de extração e purificação menores (SILVA et al., 2002). Além disso, a FES

reduz o problema de contaminação e apresenta, na maioria das vezes, produções enzimáticas superiores. Ainda neste tipo de fermentação, há a dificuldade de controle efetivo dos parâmetros fermentativos, sendo o meio heterogêneo e existindo regiões de concentrado crescimento microbiano (GERMANO et al, 2003); (VINIEGRA-GONZÁLEZ et al., 2003).

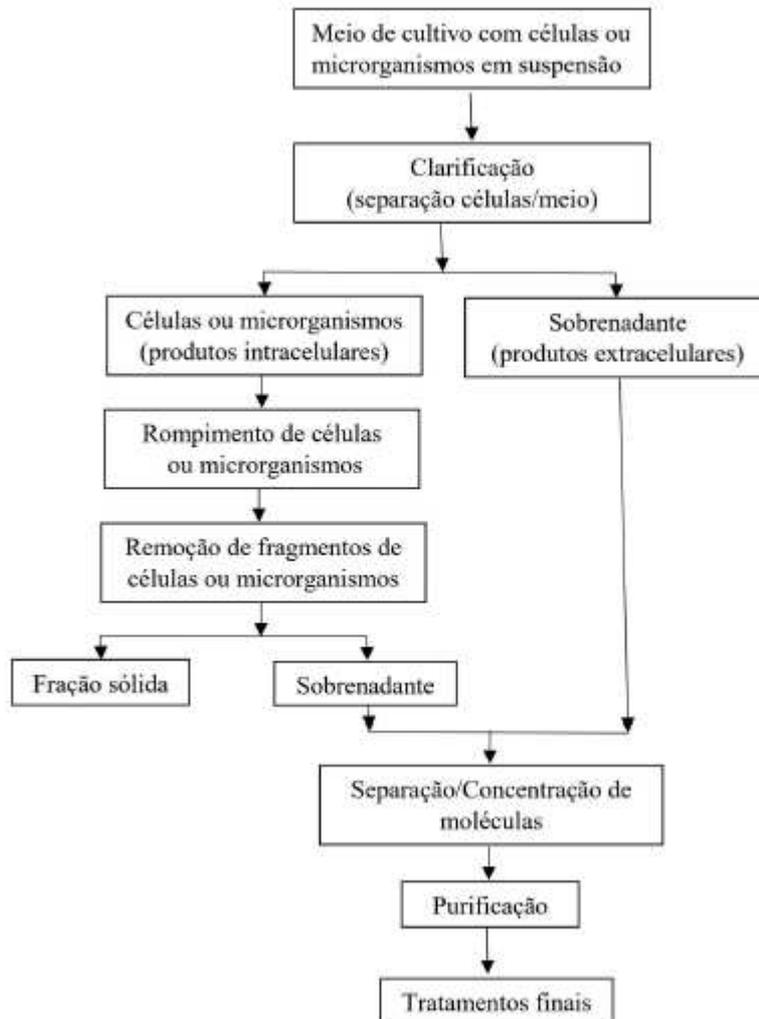
3.4 Recuperação e Purificação de Bioprodutos

As etapas de recuperação e purificação de um produto biológico, também chamadas de *downstream process*, têm grande influência sobre o custo deste, sendo responsável por 50 a 90% do custo total (PORTO et al., 2008). Dessa forma, devido à alta demanda de bioprodutos com elevado grau de pureza, o desenvolvimento de métodos de *downstream process* é de grande interesse (ZUÑIGA et al., 2003).

Variadas técnicas podem ser empregadas na purificação de produtos biotecnológicos, sendo que a seleção do processo mais adequado é de acordo com a aplicação final da molécula em questão. Os biofármacos, por exemplo, demandam o maior grau de pureza, elevando a complexidade e os custos do processo (PESSOA JR; KILIKIAN, 2005).

De forma geral, como pode ser visualizado na Figura 1, as etapas que compõe o processo de recuperação e purificação de biomoléculas são: clarificação, concentração, purificação e polimento (ZUÑIGA et al., 2003). O objetivo desse processo é atingir um alto rendimento com elevada seletividade, considerando os custos das operações, ou seja, é necessário ter uma sequência adequada das técnicas envolvidas e um número otimizado das mesmas, reduzindo o tempo de processamento (SILVA, 2000).

Figura 1- Esquema de um processo genérico de recuperação e purificação de bioprodutos.



Fonte: PESSOA JR; KILIKIAN (2005).

A clarificação é a operação que visa a eliminação de partículas em suspensão de um líquido. Dessa forma, essa etapa depende da localização da molécula alvo, podendo ela ser intracelular ou extracelular (SANT'ANNA JR, 2001). Quando intracelular, a ruptura das células é necessária. Essa pode ser realizada através de moagem por esferas de vidro, homogeneização em alta pressão, sonicação e congelamento, ou por tratamentos químicos. Essas operações aumentam o custo de produção desses bioprodutos (SANT'ANNA JR, 2001; ABRAHÃO NETO, 2001). Quando extracelular, essa etapa é efetuada através de

processos como floculação, filtração, flotação e centrifugação (CRUEGER; CRUEGER, 1993).

Após a clarificação, normalmente se dispõe de um grande volume de extrato. Como as etapas subsequentes de purificação geralmente são limitadas a pequenos volumes de amostra, é conveniente a aplicação de um método que promova sua concentração. Nesta fase, pode ser realizada uma precipitação de proteínas ou cromatografia de troca iônica (BEYNON; BOND, 1996).

Nas etapas de purificação, geralmente são empregadas as técnicas de cromatografia, que consistem nas etapas mais caras do procedimento (CRUEGER; CRUEGER, 1993). Nessas, podem ser exploradas diferentes características físico químicas das proteínas como mecanismo de separação, tais como carga, hidrofobicidade, massa molecular e especificidade a ligantes (ALMEIDA; KURTENBACH, 2002). Também podem ser utilizados os sistemas bifásicos aquosos, que apresentam alta eficiência, versatilidade, baixo custo e facilidade de ampliação de escala (BELTER et al., 1988).

3.5 Aplicações Industriais

As proteases apresentam grande importância econômica, representando cerca de 60% do mercado mundial de enzimas (SANA et al., 2006- untitled). Elas apresentam uma grande variedade de aplicações, sendo utilizadas em diversos setores: alimentício, farmacêutico, de detergentes, do couro e de cosméticos.

3.5.1 Aplicação de Proteases na Indústria de Detergentes

O uso de enzimas proteolíticas na indústria de detergentes corresponde ao maior emprego comercial destas enzimas, sendo cerca de 30% do total das vendas mundiais de enzimas direcionadas a este fim (RAVAL et al., 2014; SILVA, 2011; SANA et al., 2006). O maior emprego das peptidases nesse setor se deve a estabilidade dessas enzimas nessas formulações, além da ação em uma grande variedade de substratos proteicos em combinação com amilases, celulasas e lipases (RAO et al., 1998).

Para a adição dessas enzimas em detergentes, há alguns pré-requisitos como: atividade em pH alcalino (entre 8,0 e 12,0), estabilidade em temperaturas entre 50 e 70°C, compatibilidade com agentes quelantes e oxidantes (GUPTA et al., 2002). Além disso, também se considera a eficiência na remoção de manchas em baixas concentrações, a especificidade a vários substratos e o aumento do potencial de limpeza de um detergente (VASCONCELOS et al., 2006); (MOREIRA et al., 2003); (SANA et al., 2006).

Devido ao fato de serem biodegradáveis e de haver um aumento na razão entre o desempenho do detergente e o custo do processo quando as proteases são adicionadas nas formulações dos detergentes, a utilização dessas enzimas como aditivos tem crescido substancialmente (SAISUBRAMANIAN et al., 2006). Elas agem sobre as manchas específicas, degradando resíduos orgânicos de origem proteica. Dessa forma, há a substituição ou redução de uso de produtos cáusticos, ácidos e solventes tóxicos, que agredem o meio ambiente e causam desgaste de tecidos e de equipamentos (VASCONCELOS et al., 2006).

O início do uso de enzimas proteolíticas em detergentes se deu por volta de 1914, onde era utilizado carbonato de cálcio e extrato de enzimas pancreáticas (RAO et al., 1998). Somente em 1956 as proteases microbianas começaram a ser utilizadas na produção de detergentes (GUPTA et al., 2002b). Nos últimos anos, os estudos de produção de proteases microbianas para aplicação em detergentes se intensificaram. Em 2009, Rai e Mukherjee realizaram um estudo e verificaram que a protease produzida por *Bacillus subtilis* apresentou potencial para aplicação e compatibilidade com as formulações de detergentes de limpeza comerciais. Resultados semelhantes foram observados para peptidases produzidas pela bactéria *Streptomyces flavogriseus* HS1 (GHORBEL et al., 2014) e pelos fungos *Graphium putredinis*, *Trichoderma harzianum* (SAVITHA et al., 2011) e *Schizophyllum commune* (BOYCE; WALSH, 2012).

3.5.2 Aplicação de Proteases na Indústria Farmacêutica

Em função da ocorrência de uma variedade de pesquisas e do descobrimento de novas fontes produtoras de enzimas proteolíticas, a aplicação

dessas biomoléculas na indústria farmacêutica tem crescido. Dentre essas, se destacam as colagenases, queratinases e elastases.

As colagenases são amplamente empregadas em práticas médicas, sendo utilizadas para remoção de manchas e queloides, tratamento de queimaduras e úlceras (SUKHOSYROVA et al., 2003). Kumar e Takagi (1999) (cerrado) verificaram que a protease alcalina produzida por *Aspergillus niger* LCF9 foi capaz de hidrolisar vários tipos de colágeno, apresentando potencial uso terapêutico.

As queratinases promovem a hidrólise de proteínas fibrosas e insolúveis, as queratinas. Essas enzimas podem ser utilizadas no tratamento da acne, psoríase e de micoses (BON; VERMELHO, 2004).

A elastase pode ser utilizada sobre bandagem para aplicações terapêuticas no tratamento de queimaduras purulentas, edemas, furúnculos e abscessos profundos. Estudos verificaram a sua produção por *Bacillus subtilis* 316M, sendo esta de alta atividade elastolítica (KUMAR; TAKAGI, 1999).

Estudos com *Bacillus licheniformis* (CHAUD et al., 2007) mostraram o potencial uso das proteases produzidas por esta bactéria na substituição de antibióticos por probióticos. Além disso, as proteases apresentam grande importância no tratamento da doença celíaca (SHAN et al., 2004).

3.5.3 Aplicação de Proteases na Indústria de Cosméticos

Na indústria de cosméticos, enzimas que agem sobre o colágeno, elastina e queratina são muito importantes. Essas são empregadas em vários produtos, como em creme esfoliantes e pomadas (GUPTA et al., 2002b).

Por promoverem a remoção das células mortas presentes na epiderme e restaurarem a mesma, proporcionando um aspecto mais jovem, proteases como a papaína e a bromelina têm sido utilizadas na realização de peeling e alisamento da pele (LODS et al., 2000).

3.5.4 Aplicação de Proteases na Indústria Alimentícia

As proteases apresentam uma grande diversidade de aplicações na indústria alimentícia. Elas podem ser utilizadas na produção e maturação de queijos, onde são empregadas na coagulação do leite por meio da hidrólise da ligação peptídica específica para gerar caseína e macropéptídeos (RAO et al., 1998). O estudo de Dini (2010), que isolou e purificou a peptidase produzida pelo fungo *Thermomucor indicae-seudaticae* N31, sugere que esta enzima matura o queijo tipo Prato de forma semelhante ao coagulante comercial. Resultados semelhantes foram encontrados por Furtado e colaboradores (1999), utilizando *Penicillium roqueforti*. As enzimas proteolíticas produzidas por *Mucor michei* e *Endothia parasitica* estão substituindo, gradualmente, a renina de animais na fabricação de queijos (DEMAIN; ADRIO, 2008).

Na panificação, a adição dessas biomoléculas altera o glúten da farinha de trigo, afetando a elasticidade e textura. Além disso, elas contribuem com a redução do tempo de mistura da massa e no custo da produção. Proteases de *Aspergillus oryzae* têm sido utilizadas na hidrólise do glúten (RAO et al., 1998); (SILVA, 2011).

No processamento de carnes, essas enzimas podem ser utilizadas para amaciá-las. Este processo se dá de diversas maneiras: imersão, pulverização, adicionadas a condimentos, por injeção direta em animais vivos ou logo após o abate. As peptidases também podem ser utilizadas para facilitar a separação mecânica da carne, e dos ossos (EVANGELISTA et al., 2001).

Em 1999, Kumar e Takagi mostraram a utilização de proteases na extração de óleos de algumas sementes. Essas enzimas foram produzidas por *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis* e *Aspergillus niger*, sendo que as enzimas deste último conferiram o rendimento de extração mais elevado.

Além disso, essas enzimas também são empregadas nos hidrolisados proteicos, onde possuem a função de melhorar o sabor e qualidade dos mesmos. Esses hidrolisados comumente ser gerados a partir de caseína, proteína de soro de leite e proteínas de soja (FURTADO et al., 1999). As proteases alcalinas e neutras de origem fúngica apresentam um importante papel no processamento do molho de soja e em outros produtos de soja (RAO et al., 1998).

3.5.5 Aplicação de Proteases na Indústria do Couro

Para a remoção dos pelos em peles de animais e em peles para a indústria do couro, comumente é aplicado o método que utiliza sulfeto de sódio. Este é um componente altamente tóxico, ocasionando problemas aos trabalhadores e ao meio ambiente (ROTH et al., 1995). Dessa forma, a depilação enzimática tem sido altamente aceita como uma alternativa para este processo químico, assegurando uma redução na poluição e uma melhoria na qualidade do couro (GIONGO, 2006-cerrado). As enzimas usadas nesse processo são geralmente as peptidases, onde nem todas podem ser utilizadas devido a degradação do colágeno, que pode danificar a estrutura (RIFFEL, 2006).

Em 1910, Otto Rohm fez uso de enzimas pancreáticas para remoção de pelos do couro, mas devido à falta de especificidade dessas biomoléculas, não obteve sucesso. Assim então se iniciou as buscas por enzimas microbianas que oferecessem um método mais rápido e de custo inferior (GERMANN, 1997).

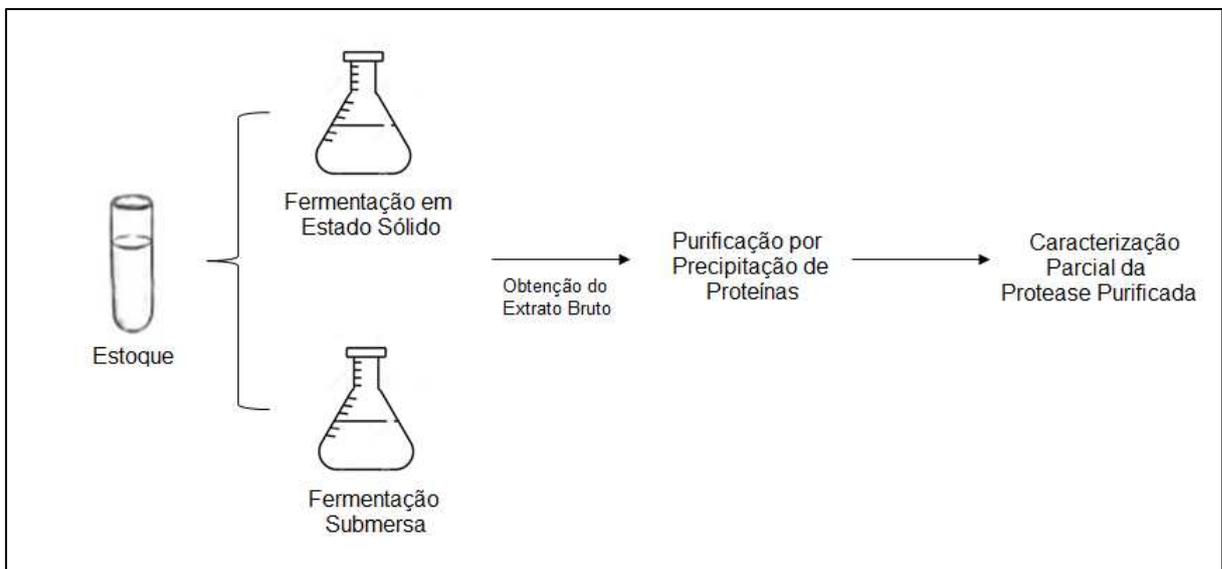
Em 2011, Verma e colaboradores constataram que a protease alcalina de *Thermoactinomyces* sp. mostrou potencial aplicação no couro de animais, sem gerar efeitos adversos para a pele. Resultados semelhantes foram encontrados utilizando proteases alcalinas de *Aspergillus flavus* e *Conidiobolus coronatus* (MALATHI; CHAKRABORTY, 1991); (LAXMANAN et al., 2005). Uma protease queranolítica neutra de *Aspergillus parasiticus* foi purificada e empregada com sucesso no processamento do couro, na indústria de cosméticos para tratamento da acne e no tratamento de águas residuais (ANITHA; PALANIVELU, 2013).

Outra aplicação para estas enzimas é a degradação de proteínas fibrosas animais como penas, chifres, cabelos e unhas. Peptidases alcalinas de *Bacillus subtilis* são empregadas em resíduos da indústria do couro. Dessa forma, são gerados produtos úteis, como cola de uso em carpintaria e suplemento proteico de ração animal (ANWAR; SALEEMUDDIN, 1997).

Capítulo 4 – Material e Métodos

De modo geral, as principais atividades neste trabalho englobaram a obtenção do fungo *Penicillium citrinum* e seu inóculo em dois tipos de meios fermentativos distintos: em estado sólido e submerso. Com os resultados obtidos nesses testes, foram avaliados o tipo e o meio de fermentação mais efetivo para a produção de proteases. Assim, com base nesses resultados, foi dado seguimento nos experimentos, sendo realizada a precipitação de proteínas do extrato enzimático bruto. Para essas práticas, foram utilizados o etanol e o sulfato de amônio como agentes de precipitação. Dessa forma, foi analisado qual agente alcançou os melhores parâmetros de purificação. Foi feita a caracterização parcial das proteases purificadas, obtendo temperatura e o pH ótimos. Essas atividades se encontram esquematizadas na Figura 2.

Figura 2- Esquema representativo das atividades desenvolvidas neste trabalho.



4.1 Microrganismo e Conservação

O fungo filamentosso *Penicillium citrinum* foi cedido pelo Departamento de Microbiologia e Parasitologia, da Universidade Federal de Pernambuco. O microrganismo foi cultivado em caldo *Sabouraud* (glicose 40g/L e peptona 10g/L) sob agitação em agitador orbital por 120 horas, a 28°C. Para armazenamento e consequentes repiques, foi realizado estoque congelado em tubos contendo glicerol.

4.2 Produção Proteolítica e Extrato Enzimático

Para a produção de proteases e obtenção do extrato enzimático bruto, foram testados dois tipos de fermentação: submersa e em estado sólido. Ao final de cada um dos processos, foram realizados os testes e cálculos necessários, de modo a obter o tipo de fermentação mais eficaz para dar continuidade nos experimentos.

4.2.1 Fermentação Submersa

Visando a produção de protease por fermentação submersa, foram avaliadas diversas fontes de carbono e nitrogênio, sendo estas listadas na Tabela 3.

Tabela 3- Fontes de carbono e nitrogênio avaliadas na fermentação submersa.

Fontes de Carbono	Fontes de Nitrogênio
Glicose	Peptona
Extrato de abacaxi	Nitrato de amônio
Extrato de levedura	Sulfato de amônio
Sacarose	Extrato de levedura
Peptona	Citrato de amônio
Citrato de sódio	
Extrato de caju	

As fontes de carbono foram inseridas na concentração de 10 g/L, enquanto as de nitrogênio em 2g/L. A fonte de carbono fixada foi a glicose, sendo testadas as de nitrogênio. Além disso, o nitrato de amônio foi fixado como fonte de nitrogênio, sendo testadas as de carbono.

O extrato de abacaxi foi preparado através de processamento da fruta, com sequente filtração e centrifugação. O pellet foi descartado, sendo utilizado o sobrenadante. O mesmo procedimento foi realizado para a obtenção do extrato de caju.

Dessa forma, os meios fermentativos foram preparados conforme a Tabela 4. O microrganismo foi previamente pré-inoculado em caldo *Sabouraud*, e teve suas colônias separadas e ressuspendidas em água pura, sendo adicionados 10 mL dessa suspensão em cada um destes meios (Tabela 4).

O processo fermentativo ocorreu sob agitação em agitador orbital a 150 rpm, por 168 horas, a 28°C. Ao final deste, o conteúdo dos frascos foi filtrado, separando a biomassa do extrato enzimático bruto. Cada teste foi realizado em triplicata e foram mensuradas a atividade proteolítica e a quantidade de proteínas totais destes.

Tabela 4- Meios utilizados para verificação da influência das fontes de carbono e de nitrogênio na produção de proteases por fermentação submersa.

Meio	Fonte de carbono	Fonte de Nitrogênio
1	Glicose	Peptona
2	Glicose	Nitrato de Amônio
3	Glicose	Sulfato de Amônio
4	Glicose	Extrato de Levedura
5	Glicose	Citrato de Amônio
6	Extrato de Abacaxi	Nitrato de Amônio
7	Extrato de Levedura	Nitrato de Amônio
8	Sacarose	Nitrato de Amônio
9	Peptona	Nitrato de Amônio
10	Citrato de Sódio	Nitrato de Amônio
11	Extrato de Caju	Nitrato de Amônio

4.2.2 Fermentação em Estado Sólido

O microrganismo foi pré inoculado em caldo *Sabouraud*, e submetido à agitação de 150 rpm, por 120 horas, a 28°C. Posteriormente, as colônias foram separadas do meio e ressuspensas em água pura.

Como substrato dos meios, foram utilizados a farinha e o flocão de arroz, sendo estes adquiridos à granel em supermercado - estes se encontram representado na Figura 3.

Figura 3 - Farinha e flocão de arroz, respectivamente, utilizados nos experimentos.



Assim, para a avaliação da produção de enzimas proteolíticas por meio de fermentação em estado sólido, 10 mL da suspensão de células preparada anteriormente foi adicionada em erlenmeyer contendo 10g de farinha de arroz devidamente esterilizado. A fermentação foi realizada num período de 120 horas, a 28°C. O mesmo processo foi realizado utilizando-se o flocão de arroz.

Após o processo fermentativo, foram adicionados 50 mL de água destilada em cada frasco. Assim, o meio de cultura foi agitado em agitador orbital por 1 hora. O conteúdo dos frascos foi filtrado e posteriormente centrifugado, separando a biomassa celular do extrato enzimático. Os experimentos foram realizados em triplicata e foram avaliadas a atividade proteolítica e as proteínas totais de cada um dos meios.

4.3 Determinação de Proteínas Totais

Para a determinação da concentração de proteínas totais, foi utilizado o método descrito por Bradford (1976), em que ocorre uma reação colorimétrica entre grupos aromáticos da proteína e o corante *Coomassie brilliant blue* em meio ácido.

Após a centrifugação do meio fermentativo, 20 µL do extrato enzimático e 1 mL do reagente de Bradford foram inseridos em microtubos, sendo realizada uma agitação por inversão destes. Em seguida, estes foram incubados por 5 minutos à temperatura ambiente. Assim, a leitura em espectrofotômetro foi realizada a 595 nm.

Para interpretação dos resultados e conversão da leitura em concentração de proteínas, foi realizada uma curva padrão utilizando como padrão o BSA (albumina de soro bovino).

4.4 Atividade Proteolítica

A atividade proteolítica foi determinada de acordo com a metodologia descrita por Charney e Tomarelli (1947) através do uso do substrato azocaseína (Sigma, St. Louis, MO, USA). Dessa forma, 125 µL do extrato enzimático reagiram com 125 µL de azocaseína a 1% em solução tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 7,0,

durante 15 min a 37 °C. Em seguida, a reação foi finalizada com a adição de 750 µL de ácido tricloroacético (TCA) 5% e, uma centrifugação a 6.000 g por 5 min a 25 °C.

Assim, foi acrescentado 1 mL de hidróxido de sódio (NaOH) 0,5 M ao sobrenadante. As avaliações de absorbância foram feitas à 440 nm, utilizando amostra branco apropriada. A atividade proteolítica foi expressa em unidades de atividade enzimática (U).

4.5 Precipitação de Proteínas

De modo a avaliar o melhor agente de precipitação de proteases do extrato enzimático previamente obtido, foram realizadas precipitações de proteínas utilizando etanol e sulfato de amônio.

4.5.1 Precipitação de Proteínas por Etanol

A precipitação de proteases do extrato enzimático por adição de etanol foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Englard e Seifter (1990). Assim, etanol resfriado a 0°C foi adicionado em diversas concentrações (20, 40, 60 e 80% v/v), por gotejamento, ao extrato bruto enzimático, constantemente agitado e resfriado a 4°C. A cada concentração atingida, o extrato foi deixado em agitação magnética por 20 minutos. Em seguida, a solução foi centrifugada a 1.000g por 20 minutos a 4°C, e o pellet resultante ressuspendido em tampão fosfato de sódio 100 mM de pH 7,0 para posterior determinação de proteínas totais e atividade proteolítica. Visando a obtenção de resultados precisos, esse experimento foi realizado em triplicata.

Com os dados obtidos nas análises, foi determinada a atividade específica, correspondente à razão entre a atividade proteolítica e a concentração de proteínas (Equação 1).

$$\textit{Atividade Específica (U/mg)} = \frac{\textit{Atividade Proteolítica}}{\textit{Proteínas Totais}} \quad (1)$$

Através da atividade específica, foi possível calcular o fator de purificação do método, obtido através da razão entre a atividade específica inicial e a atividade específica após o procedimento de precipitação, ambas expressas em U/mg, como pode ser visto na Equação 2.

$$\text{Fator de Purificação} = \frac{\text{Atividade Específica Inicial}}{\text{Atividade Específica Purificado}} \quad (2)$$

Através da razão entre a atividade proteolítica inicial e a atividade proteolítica após a precipitação, foi analisada a recuperação de proteases (Equação 3).

$$\text{Recuperação (\%)} = \left(\frac{\text{Atividade Proteolítica Inicial}}{\text{Atividade Proteolítica Purificado}} \right) \cdot 100 \quad (3)$$

O Rendimento da purificação foi calculado através da razão entre as quantidades de proteínas totais e do extrato purificado (Equação 4).

$$\text{Rendimento (\%)} = \left(\frac{\text{Proteínas Totais Inicial}}{\text{Proteínas Totais Purificado}} \right) \cdot 100 \quad (4)$$

4.5.2 Precipitação de Proteínas por Sulfato de Amônio

A precipitação de proteases por adição de sulfato de amônio também foi realizada seguindo a metodologia descrita por Englard e Seifter (1990). Desse modo, foi adicionado sulfato de amônio sólido ao extrato enzimático até a obtenção das concentrações de 20, 40, 60 e 80%. Assim, atingida cada uma dessas concentrações, o extrato enzimático foi mantido sob agitação magnética por 30 minutos. Ao final da agitação, o volume da solução foi medido para cálculo da quantidade necessária a ser adicionada para obtenção da concentração seguinte. Em seguida, a solução foi centrifugada a 1.000g por 30 minutos a 4°C, e o pellet resultante ressuspendido em tampão fosfato de sódio 100 mM de pH 7,0 para

realização dos testes de atividade proteolítica e proteínas totais. Visando a obtenção de resultados precisos, esse experimento foi realizado em triplicata.

Com os dados obtidos nas análises, foram determinadas: atividade específica (Equação 1), fator de purificação (Equação 2), recuperação (Equação 3) e o rendimento (Equação 4).

4.7 Caracterização Parcial das Proteases Purificadas

De modo a avaliar as potenciais aplicações industriais das proteases obtidas neste trabalho, foram realizados testes de temperatura e pH ótimos.

Visando encontrar o pH ótimo da protease purificada, foram realizados ensaios utilizando os seguintes tampões: citrato fosfato (pH 5,0 e 5,8), fosfato de sódio (pH 5,8; 6,6 e 7,4), Tris HCl (pH 7,4; 8,2 e 9,0), carbonato-bicarbonato (pH 9,8 e 10,6), fosfato-NaOH (pH 11,0) e KCl-NaOH (pH 12,0 e 13,0). Todos os tampões foram preparados à 100mM, e a partir desses, foram preparadas as soluções contendo 1% de azocaseína. A protease purificada foi incubada em cada uma dessas soluções, e a atividade proteolítica foi determinada, de modo similar ao descrito no item 4.4. Dessa forma, os resultados obtidos foram comparados com os de atividade proteolítica segundo a metodologia original, dando a atividade residual. Conseqüentemente, foram calculadas as atividades relativas.

Com os dados obtidos nesses experimentos, foi possível calcular a atividade residual através da razão entre a atividade proteolítica obtida conforme descrição no item 4.4, e a atividade proteolítica obtida com a incubação da enzima em cada um dos pHs testados (Equação 5).

$$\textit{Atividade Residual} (\%) = \left(\frac{\textit{Atividade Proteolítica Padrão}}{\textit{Atividade Proteolítica pH}} \right) \cdot 100 \quad (5)$$

Com as atividades residuais, estabeleceu-se a maior delas como 100%. A partir disso, foi calculada uma razão entre essa e as demais, o que corresponde a atividade relativa (Equação 6).

$$\textit{Atividade Relativa (\%)} = \left(\frac{\textit{Atividade Residual}}{\textit{Atividade Residual Superior}} \right) \cdot 100 \quad (6)$$

Para a determinação da temperatura ótima, a enzima purificada foi submetida ao procedimento de determinação de atividade proteolítica similar ao descrito no item 4.4, utilizando diferentes temperaturas (0, 10, 20, 30, 40, 50, 60 e 70° C). Para esse experimento, foi utilizada azocaseína 1% em tampão Tris HCl 100mM, em pH 8,2. Dessa forma, através da comparação com a atividade proteolítica obtida segundo a metodologia descrita no item 4.4, foi obtida a atividade residual. Conseqüentemente, foram calculadas as atividades relativas.

Com os dados obtidos nesses experimentos, foi possível calcular a atividade residual através da razão entre a atividade proteolítica obtida nas condições exibidas no item 4.4 e a atividade proteolítica obtida da incubação da enzima nas temperaturas testadas (Equação 7).

$$\textit{Atividade Residual (\%)} = \left(\frac{\textit{Atividade Proteolítica Padrão}}{\textit{Atividade Proteolítica T}} \right) \cdot 100 \quad (7)$$

Com essa atividade residual, foi calculada a atividade relativa, como descrito na Equação 6.

Capítulo 5 – Resultados e Discussão

5.1 Produção Proteolítica

Os procedimentos necessários foram realizados, seguindo método 4.2.1. Assim, ao final da fermentação submersa, foi possível verificar as melhores fontes de carbono e nitrogênio para a indução da produção de enzimas proteolíticas. Os resultados obtidos se encontram na tabela abaixo (Tabela 5).

Tabela 5- Resultados obtidos nos processos de fermentação submersa: quantificação de proteínas totais e atividade proteolítica.

Meio	Composição	Proteínas totais (mg/mL)	Atividade Proteolítica (U/mL)
1	Glicose/Peptona	0,0447	0,5334
2	Glicose/Nitrato de Amônio	0,0434	2,5386
3	Glicose/Sulfato de Amônio	0,0288	0,9066
4	Glicose/Extrato de Levedura	0,2486	6,2400
5	Glicose/Citrato de Amônio	0,0055	1,2054
6	Extrato Abacaxi/Nitrato de Amônio	0,0113	1,4292
7	Extrato Levedura/Nitrato de Amônio	0,0576	4,1388
8	Sacarose/Nitrato de Amônio	0,0479	1,0347
9	Peptona/Nitrato de Amônio	0,1029	3,3066
10	Citrato Sódio/Nitrato de Amônio	0,0052	1,9947
11	Extrato Caju/Nitrato de Amônio	0,0453	0,7146

Levando em consideração que a glicose é uma das melhores fontes de carbono para a produção de protease (LAXMAN et al., 2005), e tendo em vista os resultados apresentados pelos meios 3 e 5, que apresentam a glicose como fonte de carbono, é possível concluir que o sulfato de amônio e o citrato de amônio não apresentaram efeito positivo na produção desta enzima. Esse resultado concorda com estudos realizados por Chu et al. (1992) e Laxman et al. (2005) que mostram que, quando inseridos nos meios, os sais de amônio atuam como inibidores de

produção de protease. Outros valores baixos de atividade proteolítica foram encontrados nos meios 6, 8, 10 e 11, constituídos de extrato de abacaxi e nitrato de amônio, sacarose e nitrato de amônio, citrato de sódio e nitrato de amônio, e extrato de caju e nitrato de amônio, respectivamente.

O maior valor de atividade proteolítica foi obtido no meio 4, composto de glicose e extrato de levedura, representado na Figura 4. Este apresentou uma atividade de 6,24 U/mL., concordando com Haddar et al. (2010) e Laxman et al. (2005), que constataram que o extrato de levedura é uma das melhores fontes de nitrogênio para a indução da produção de protease.

Figura 4- Meio de fermentação submersa composto por glicose e extrato de levedura após incubação por 7 dias à 28°C, com agitação em agitador orbital de 150 rpm.



Dando sequência nos experimentos, foi realizada a avaliação da fermentação em estado sólido, segundo item 4.2.2. Terminados os processos, os testes necessários foram realizados. O meio contendo flocão de arroz apresentou uma atividade proteolítica de 6,72 u/mL e uma concentração de proteínas totais de 0,05 mg/mL. Já no meio composto por farinha de arroz, que pode ser visualizado na Figura 5, a atividade proteolítica obtida foi de 19,23 U/mL. Ainda neste, a concentração de proteínas totais foi de 0,54 mg/mL. Esses resultados concordam

com Brito et al. (2006), onde foi verificado que o arroz apresenta nutrientes indutores de produção de protease.

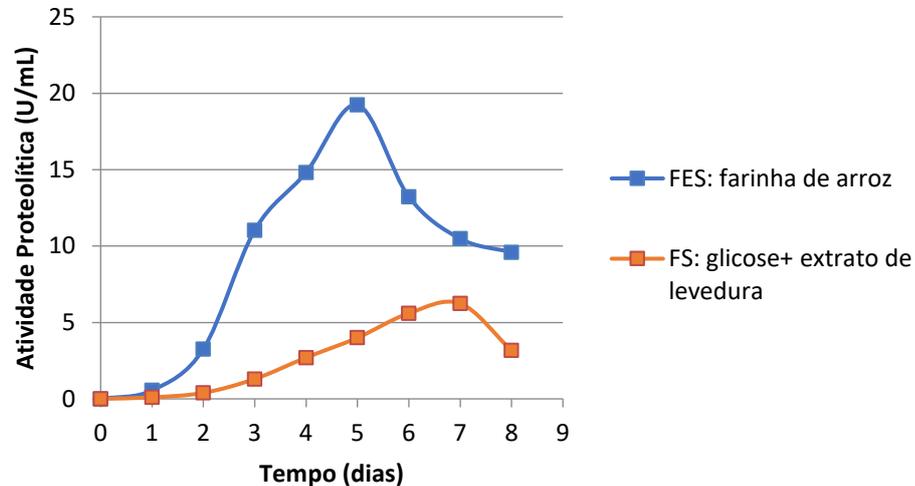
Figura 5- Meio de fermentação em estado sólido composto por farinha de arroz após incubação por 5 dias à 28°C.



Assim, fazendo uma comparação do perfil de produção proteolítica entre os meios com melhor produção em FS (meio 6: glicose e extrato de levedura) e em FES (meio com farinha de arroz), tem-se os resultados exibidos na Figura 6. Nesta, é possível verificar que o meio FES apresentou a maior atividade proteolítica. Tal resultado também foi obtido por Souza (2016), onde o fungo *Mucor subtilissimus* apresentou produção de protease inferior em meio líquido. Isso se deve ao fato de que algumas enzimas produzidas na FS ficam aderidas à parede celular do microrganismo. Em contrapartida, no cultivo em estado sólido, essas biomoléculas são secretadas para o ambiente extracelular (ODA et al., 2006).

Além disso, foram necessários cinco dias para que o pico de produção em estado sólido fosse atingido. Já na fermentação submersa, foram necessários 7 dias para que a maior produção de protease fosse alcançada. Esse resultado mostra que o fungo se adaptou ao meio sólido mais rapidamente do que ao meio líquido, com consequente produção mais rápida da biomolécula de interesse neste primeiro. Resultados semelhantes também foram obtidos por Hamin Neto (2012), utilizando o fungo *Eupenicillium javanicum* para produção de proteases.

Figura 6- Perfil de produção proteolítica nos processos de fermentação em estado sólido e submersa.



Dessa forma, tem-se que a fermentação em estado sólido utilizando a farinha de arroz como substrato se mostrou mais eficiente para dar continuidade nos experimentos, já que esta possibilitou produção de enzimas proteolíticas e de proteínas totais superior.

5.2 Precipitação Fracionada com Etanol e Sulfato de Amônio

A técnica utilizada para a purificação do extrato enzimático bruto foi a precipitação de proteínas, sendo utilizados o etanol e sulfato de amônio como agentes de separação. Como pode ser visto na Tabela 6, na precipitação com etanol, a maioria das proteases foi recuperada nas concentrações de 60 e 80%, apresentando 29,64 e 24,35% de recuperação, respectivamente. As proteínas totais também tenderam a precipitar nessas duas faixas. Dentre essas, a atividade específica na saturação de 60% foi maior, de 14,23 U/mg. Conseqüentemente, essa etapa apresentou, também, um maior fator de purificação, de 0,89 vezes. Resultado semelhante foi obtido por Hamim Neto (2012), onde proteases de *Eupenicillium javanicum* apresentaram um fator de purificação de 0,9 vezes quando utilizado o etanol como agente de separação na precipitação de proteínas.

Além disso, também é possível verificar que, quando utilizado 40% de etanol, houve uma recuperação de 15,35% das proteases. Como houve baixa precipitação das proteínas totais nessa faixa, de 21,27%, esta apresentou um fator de purificação de 0,72 vezes.

Dessa forma, tendo em vista que a precipitação com etanol exibiu apenas fatores de purificação inferiores a 1 em todas as faixas de saturação, percebe-se que o método é ineficaz para a purificação do extrato enzimático e posterior continuidade dos experimentos.

Tabela 6- Purificação des proteases por precipitação fracionada com etanol.

Concentração de Etanol (%)	Atividade Específica (U.mg⁻¹)	Fator de Purificação	Recuperação (%)	Rendimento (%)
0	15,88 ± 1,19	-	-	-
20	8,42 ± 2,40	0,53	9,19	17,34
40	11,46 ± 3,49	0,72	15,35	21,27
60	14,23 ± 3,64	0,89	29,64	33,08
80	9,42 ± 3,18	0,59	24,35	41,05

Como é possível verificar na Tabela 7, a precipitação de enzimas proteolíticas com sulfato de amônio foi maior nas concentrações de 60 e 80%, com recuperação de 63,48 e 52,96%, respectivamente. As proteínas totais tenderam a precipitar na faixa de 60% de concentração.

Embora tenha precipitado mais proteases na concentração de 60%, a faixa de 80% de saturação apresentou uma menor precipitação de proteínas totais, tendo esta, então, uma atividade específica superior, de 14,70 U/mg. Conseqüentemente, como a atividade específica inicial foi de 10,26 U/mg, esta etapa apresentou um fator de purificação elevado, de 1,43 vezes. Resultado semelhante foi obtido por GIMENES (2018), onde a precipitação com sulfato de amônio de proteases de *Aspergillus terreus* VSP-22 foram purificadas com êxito, obtendo um fator de purificação de 2,07 vezes.

Tabela 7- Purificação des proteases por precipitação fracionada com sulfato de amônio.

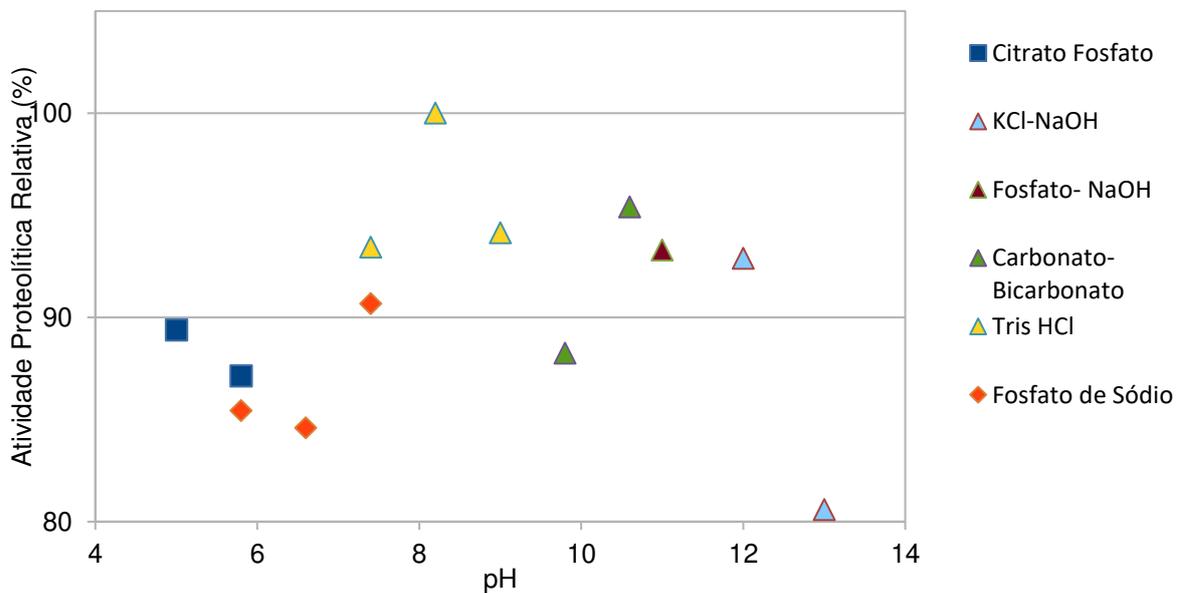
Concentração de Sulfato de Amônio (%)	Atividade Específica (U.mg⁻¹)	Fator de Purificação	Recuperação (%)	Rendimento (%)
0	10,26 ± 2,53	-	-	-
20	1,06 ± 0,22	0,10	9,41	11,12
40	3.43 ± 1,45	0,33	13,01	18,85
60	6,72 ± 2,07	0,65	63,48	36,96
80	14,70 ± 1,54	1,43	52,96	26,90

Sendo assim, tendo em vista que a aplicação do método com o uso do etanol se mostrou ineficiente, este foi descartado para dar continuidade nos experimentos. A obtenção deste resultado pode se dever ao fato de que o etanol pode promover a desnaturação das proteínas, causando perdas durante o processo (PESSOA; KILIKIAN, 2005). Em contrapartida, o uso de sulfato de amônio se apresentou eficaz, mais especificamente na faixa de 60% de saturação, sendo então este o método utilizado para dar prosseguimento no trabalho.

5.4 Caracterização Parcial das Proteases Purificadas

Inicialmente, foi realizado o teste de efeito de pH sobre a atividade proteolítica das enzimas purificadas, gerando os resultados exibidos na Figura 7.

Figura 7– Avaliação do efeito do pH sobre as enzimas purificadas.



Como pode ser verificado na Figura 6, quando utilizados os tampões citrato-fosfato e fosfato de sódio, que compreendem a faixa de pH de 5 a 7,4, os valores de atividade proteolítica relativas foram baixos. Esses resultados mostram que a enzima em questão não é ácida.

Além disso, quando em tampão Tris HCl de pH 8,2, a enzima apresentou a maior atividade proteolítica. Os melhores resultados obtidos no experimento se encontram na faixa de pH de 7,4 a 10,6, sugerindo que as enzimas produzidas são alcalinas. Resultado semelhante foi encontrado por Caprara (2015), onde proteases de *Penicillium restrictum* apresentaram pH ótimo de 8,0. Papagianni e Seregelidis (2014) purificaram proteases de *Penicillium nalgiovense*, sendo essas ativas na faixa de pH de 4,0 a 10,0, com pH ótimo de 8,0.

Segundo Beg e Gupta (2003), as proteases microbianas comerciais geralmente possuem atividade ótima na faixa de pH de 8,0 a 12,0. Dessa forma,

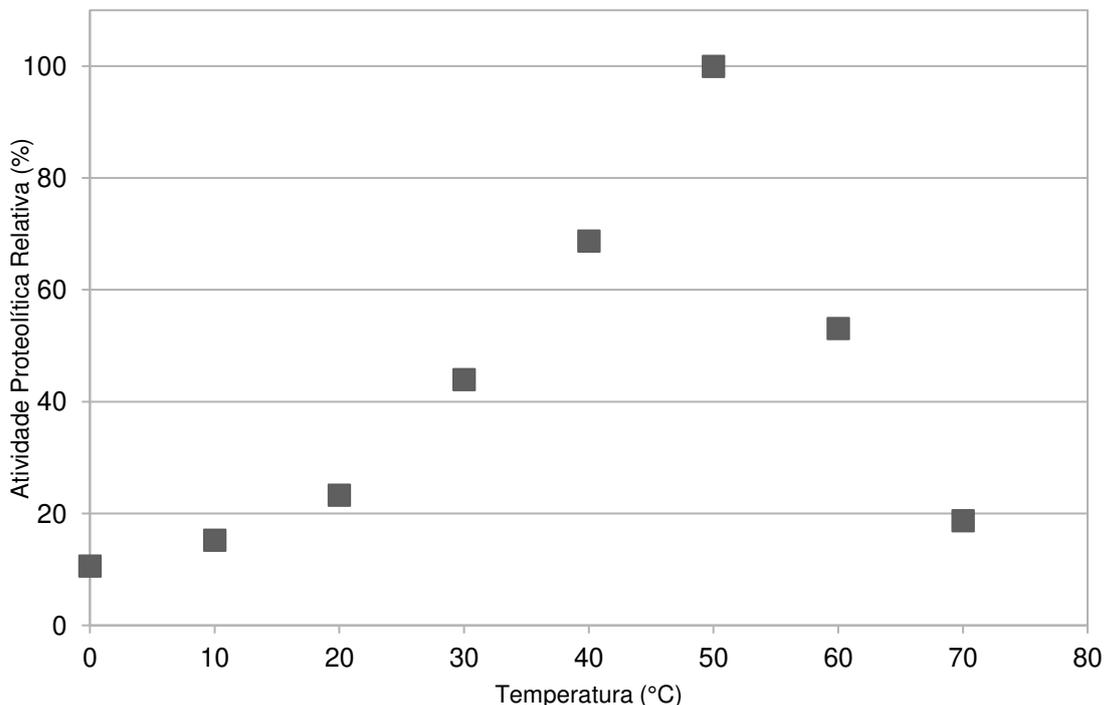
tendo em vista o pH ótimo alcalino das enzimas produzidas neste projeto, se verifica o potencial das mesmas em uso de formulações de detergentes.

Dando seguimento nos experimentos, também foi verificado o efeito da temperatura sobre a atividade proteolítica das proteases purificadas (Figura 8).

A atividade proteolítica da enzima foi aumentando conforme o aumento da temperatura, sendo esse processo interrompido quando alcançado os 60°C. Em baixas temperaturas (0 – 20°C) foram obtidos valores baixos de atividade proteolítica relativa, não ultrapassando 30%. Resultado semelhante foi encontrado quando testada a temperatura de 70°C, que apresentou atividade proteolítica relativa de 18,8%.

Quando incubada a 50°C, a enzima purificada exibiu a maior atividade proteolítica, caracterizando esta então como sua temperatura ótima. As proteases produzidas e purificadas por Caprara (2015), utilizando *Penicillium restrictum*, apresentaram temperatura ótima de 55°C, valor similar ao encontrado neste trabalho.

Figura 8- Avaliação do efeito da temperatura sobre a atividade proteolítica das proteases purificadas.



As proteases microbianas Alcalase® e a Esperase® , produzidas para uso em formulação de detergentes, apresentam temperatura ótima de 60°C (NASCIMENTO; MARTINS, 2006)- o que confirma o potencial uso das enzimas produzidas neste trabalho na aplicação em questão.

Capítulo 6 – Conclusão

Os resultados obtidos neste trabalho mostraram que *Penicillium citrinum* apresentou baixa e lenta produção de proteases na fermentação submersa, alcançando atividade proteolítica máxima de 6,24 U/mL apenas no sétimo dia do processo. A fermentação em estado sólido, utilizando a farinha de arroz como substrato, apresentou uma produção superior, atingindo seu pico no quinto dia, com uma atividade proteolítica de 19,23 U/mL. Esses resultados demonstraram que, além de produzir mais enzimas proteolíticas, o processo de fermentação em estado sólido também se mostrou mais rápido.

A precipitação fracionada das proteínas presentes no extrato enzimático se mostrou eficiente quando usado o sulfato de amônio como agente de separação. Neste, na faixa de 60 a 80% de saturação, a atividade específica atingida foi de 14,70 U/mg, ou seja, o fator de purificação foi de 1,43 vezes. Além disso, a recuperação da protease foi de 52,96% e o rendimento foi de 36,90%. Conclui-se então que a maioria das enzimas foram recuperadas neste processo e que parte das proteínas presentes foram descartadas nesta etapa, purificando o extrato enzimático. Em contrapartida, a precipitação de proteínas com o etanol como agente de separação não se mostrou eficiente, uma vez que o maior fator de purificação alcançado foi de 0,89 vezes, na faixa de 40 a 60% de saturação.

A caracterização parcial das proteases obtidas após a purificação por precipitação de proteínas mostrou informações importantes acerca das mesmas. Através dos testes de efeito de pH, sugeriu tratar-se de uma protease alcalina, já que as maiores atividades proteolíticas relativas foram verificadas na faixa de pH entre 7,00 e 11,00, sendo o pH ótimo de 8,2. A avaliação da temperatura mostrou que a temperatura ótima das proteases é de 50°C, sendo na faixa de 40 a 60°C onde essas apresentam as maiores atividades proteolíticas relativas. Dessa forma, a protease proveniente do fungo filamentoso *Penicillium citrinum* demonstrou potencial de aplicação nas indústrias de couro e de detergentes, por exemplo.

Capítulo 7 - Sugestões para Próximos Trabalhos

Tendo em vista o potencial de aplicação em indústria de detergentes exibido pelas proteases produzidas e purificadas neste trabalho, em experimentos futuros seria interessante a análise da compatibilidade destas enzimas com as formulações de detergentes. Também poderia ser verificado o desempenho de lavagem das mesmas. Além disso, devido a sua natureza alcalina, poderiam ser realizados testes de remoção de pelos de couro.

Caso seja necessária uma maior pureza das enzimas obtidas, estas poderiam ser submetidas a outros processos de purificação, de modo a aprimorá-las. Dessa forma, poderia ser realizada a purificação por sistemas bifásicos aquosos, por exemplo.

Capítulo 8 – Referências Bibliográficas

ABDALLA, H. O.; ALI, N. N. A.; SIDDIQ, F. S.; ALI, S. A. M. Improving tenderness of spent layer hens meat using papaya leaves (*Carica papaya*). **Pakistan Veterinary Journal** (Pakistan), v 33, 2013.

ABRAHÃO NETO, J. Purificação de Enzimas. In: Lima, U. A.; Aquarone, E.; Borzani, W.; Schimidell, W. **Biotecnologia Industrial**. 1 ed. São Paulo, Blucher, 2001. cap.17, p. 377–390. 2001.

ALMEIDA, M. S., KURTENBACH, E. Como purificar proteínas. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, v. 24, p. 30-35, 2002.

ANITHA, T. S.; PALANIVELU, P. Purification and characterization of an extracellular keratinolytic protease from a new isolate of *Aspergillus parasiticus*. **Protein Expr Purif**, 88:214–220, 2013.

ANNAMALAI, N.; RAJESWARI, M. V.; BALASUBRAMANIAN, T. Extraction, purification and application of thermostable and halostable alkaline protease from *Bacillus alveayuensis* CAS 5 using marine wastes. **Food and Bioproducts Processing**, v. 92, n. 4, p. 335-342, 2014.

ANWAR, A.; SALEEMUDDIN, M. Alkaline proteases: a review. **Bioresource Technology**, v. 64, p.175-183, 1997.

ATAIDE, J. A.; GERIOS, E. F.; MAZZOLA, P. G.; SOUTO, E. B. Bromelain-loaded nanoparticles: A comprehensive review of the state of the art. **Advances in Colloid and Interface Science**, 254, 48–55, 2018.

BARRETT, A. J. Classification of Peptidases. **Methods Enzymol**, p. 244:1-15, 1994.

BARRET A. J.; TOLLE, D. P.; RAWLINGS, N. D. Managing peptidases in the genomic era. **Biol Chem**, 384, 873-82, 2003.

BEG, Q. K.; GUPTA, R. Purification and characterization of an oxidation-stable, thiol-dependent serine alkaline protease from *Bacillus mojavensis*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 32(2), p. 294-304, 2003.

BELTER, P.A.; CUSSLER, E.L.; HU, W.S. **Bioseparations**: downstream processing for biotechnonology. New York: John Wiley, 1988. 368p.

BERG, J. M.; TYMOCZKO, J. L.; STRYER, L. **BIOCHEMISTRY**. Proteases: Facilitating a Difficult Reaction. New York: W. H. Freeman; 2002.

BEYNON, R.J.; BOND, J.S. **Proteolytic Enzymes: A Practical Approach** . New York: Oxford University Press, 1996, 257p, 1996.

BOYCE, A.; WALSH, G. Identification of fungal proteases potentially suitable for environmentally friendly cleaning-in-place in the dairy industry. *Chemosphere*, v. 88, p. 211–218, 2012.

BON, E. P. S.; VERMELHO, A. B. Queratinase. In: SAID, S.; PIETRO, R. C. L. R. **Enzimas como agentes biotecnológicos**. Ribeirão Preto: Editora Legis Summa, p. 291-306, 2004.

BON, E. P. S.; FERRARA, M. A.; CORVO, M. L. **Enzimas em Biotecnologia: Produção, Aplicações e Mercado**. Rio de Janeiro: Editora Interciência, 2008, 506 p.

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**, v. 72, n. 1, p. 248-254, 1976.

BRITO, A. K. P.; PIMENTA, L.; SILVA, L. S. C.; MARTIM, S. R.; TEIXEIRA, M. F. S.; MACHADO, A. R. G.; KIRSCH, L. S. D. Produção de Proteases por *Aspergillus niger* DPUA 399 em Fermentação Submersa. Em XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática -ENZITEC, 2016.

BRIX, K.; STÖCKER, W. Proteases: Structure and function. Springer-Verlag Wien, p. 1-564, 2013.

CAPRARA, C. S. C. Processo de obtenção e caracterização de proteases extracelulares expressas por *Penicillium restrictum*. 2015. 73 f., il. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde)—Universidade de Brasília, Brasília, 2015.

CHARNEY, J.; TOMARELLI, R. M. A colorimetric method for the determination of the proteolytic activity of duodenal juice. **Journal of Biological Chemistry**, v. 171, p. 501-505, 1947.

CHAUD, L. C. S.; VAZ, P. V.; FELIPE, M. G. Considerações sobre a produção microbiana e aplicações de proteases. **Nucleus**, 4:1-2, 2007.

CHU, I. M.; LEE, C.; LI, T. S. Production and degradation of alkaline protease in batch cultures of *Bacillus subtilis* ATCC 14416. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 14(9), p. 755–761, 1992.

COLEN, G. **Isolamento e seleção de fungos filamentosos produtores de lipases**. Faculdade de Farmácia da UFMG, (Belo Horizonte-MG), 2006 [Tese de Doutorado].

COSTA, J. P. V.; OLIVEIRA, C. F. D.; ARAUJO, W. D. B.; VENDRUSCOLO, F. Effect of pH and serum concentration of cheese on the production of pigments by *Monascus ruber* in solid culture. **Brazilian Journal Of Animal And Environmental Research**. Curitiba, p. 756-765. mar. 2019.

CRUEGER, W.; CRUEGER, A. (1993) *Biotechnologia: Manual de Microbiologia Industrial*. Zaragoza: *Acribia*, 413 p.

DASU, V. V.; PANDA, T.; CHIDAMBARAM, M. Determination of significant parameters for improved griseofulvin production in a batch bioreactor by Taguchi's method. **Process Biochemistry**, v. 38, p. 877-880, 2003.

DEMAIN, A. L.; ADRIO, J. L. Contributions of microorganisms to industrial biology. **Mol Biotechnol**, v. 38, n. 1, p. 41-55, 2008.

DEWAN, S. S. **Global Markets for Enzymes in Industrial Applications**. Wellesley, USA.: Market Research Reports, 2017.

DINI C. M. Produção, purificação e caracterização da protease de *Thermomucor indiciae-seudaticae* n31 e avaliação de sua aplicação na fabricação de queijo

maturado. Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto, 2010 [Tese de doutorado].

DJAMEL, C; ALI, T; NELLY, C. Acid Protease Production by Isolated Species of *Penicillium*. 2009.

ENGLARD, S.; SEIFTER, S. Precipitation techniques. In: MURRAY, P. D. (Ed.). **Methods in Enzymology**: Academic Press, v.Volume 182, 1990. p.285-300. ISBN 0076-6879.

EVANGELISTA, E. A.; GALBAN, V. D.; MIGLIORINI, R. H.; DO CARMO KETTELHUT, I. Role of ubiquitinproteasome- dependent proteolytic process in degradation of muscle protein from diabetic rabbits. **Mol Cell Biochem**, 225:35-41, 2001.

FURTADO, C.; PEBODY, R. G.; ROJAS, A.; MCCARTHY, N.; NYLEN, G.; RUUTU, P.; LEINO, T.; CHALMERS, R.; DE JONG, B.; DONNELLY, M. An international outbreak of Vero cytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 infection amongst tourists; a challenge for the European infectious disease surveillance network. **Epidemiol Infect**, 123:217-223, 1999.

GERMANN, G.H. The 1997 John Arthur Wilson memorial lecture: the evolution of the unhairing process as influenced by technological, economic and ecological consideration. **The Journal of the American Leather Chemists Association** , Lubbock, TX, v.92, n.4, p.84-92, 1997.

GERMANO, S.; PANDEY, A.; OSAKU, C. A.; ROCHA, S. N.; SOCCOL, C. R. Characterization and stability of proteases from *Penicillium* sp produced by solid-state fermentation. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 32, n. 2, p. 246-251, fev. 2003.

GIMENES, N. C. Purificação e caracterização de protease de *Aspergillus terreus* VSP-22. 2018. 1 recurso online (111 p.). Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química, Campinas, SP.

GIONGO, J. L. Caracterização e aplicação de proteases produzidas por linhagens de *Bacillus* sp. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Faculdade de Agronomia. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente. Porto Alegre, BR- RS, 1-95, 2006 (Dissertação de Mestrado).

GODFREY, T.; WEST, S. Industrial enzymology, 2nd ed., p. 3. Macmillan .Publishers Inc., New York, 1996.

GHORBEL, S.; KAMMOUN, M.; SOLTANA, H.; NASRI, M.; HMIDET, N. *Streptomyces flavogriseus* HS1:Isolation and Characterization of Extracellular Proteases and Their Compatibility with Laundry Detergents. **BioMed Res Int**,1-8, 2014.

GUPTA, R., BEG, Q. K., KHAN, S., CHAUHAN, B. An overview on fermentation, downstream processing and properties of microbial alkaline proteases. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 60, p. 381–395, 2002a.

GUPTA, R.; BEG, Q. K.; LORENZ, P. Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial application. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, 59, 15-32, 2002b.

HADDAR, A.; FAKHFAFK-ZOUARI, N.; HMIDET, N.; FRIKHA, F.; NASRI, M.; KAMOUN, A. S. Low-cost fermentation medium for alkaline protease production by *Bacillusmojavensis* A21 using hulled grain of wheat and sardinella peptone. **J Biosci Bioeng**, v. 110, n. 3, p. 288-294, 2010.

HAMIN NETO, Y. A. A. **Fermentação, purificação, caracterização bioquímica e microencapsulação da protease produzida pelo fungo *Eupenicillium javanicum***. 2012. Dissertação (Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São

Paulo, Ribeirão Preto, 2012. doi:10.11606/D.60.2012.tde-01112012-151150. Acesso em: 2019-08-16.

JOHNVESLY, B.; NAIK, G. R. Studies on production of thermostable alkaline protease from thermophilic and alkaliphilic *Bacillus* sp. JB-99 in a chemically defined medium. **Process Biochemistry**, Oxford, UK, v. 37, p. 139-144, 2001.

KALISZ, H.M. Microbial proteinases. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 36:1-65, 1988.

KALPANA, D. M.; RASHEEDHA, B. A.; GNANAPRABHAL, G. R.; PRADEEP, B. V.; PALANISWAMY, M. Purification, characterization of alkaline protease enzyme from native isolate *Aspergillus niger* and its compatibility with commercial detergents. **Indian Journal of Science and Technology**. 2008;1(7):1-6.

KULKARNI, N.; VAIDYA, T.; RATHI, G. Optimization of cellulase production by *Aspergillus* species under solid state fermentation. **The Pharma Innovation Journal**, p. 193-196. jan. 2018.

KUMAR, C. G.; TAKAGI, H. Microbial alkaline proteases: from a bioindustrial viewpoint. **Biotechnol Adv** 17:561–594, 1999.

LODS, L. M.; DRES, C.; JOHNSON, C.; SCHOLZ, D. B.; BROOKS, G. J. The future of enzymes in cosmetics. **Int J Cosmet Sci**, v. 22, n. 2, p. 85-94, 2000.

LAXMAN, R. S.; SONAWANE, A. P.; MORE, S. V.; RAO, B. S.; RELE, M. V.; JOGDAND, V. V.; DESHPANDE, V. V.; RAO, M. B. Optimization and scale up of production of alkaline protease from *Conidiobolus coronatus*. *Process Biochem*, v. 40, p. 3152-3158, 2005.

LAXMANAN, S.; DATTA, D.; GEEHAN, C.; BRISCOE, D. M.; PAL, S. CD40: a mediator of pro- and anti-inflammatory signals in renal tubular epithelial cells. **J Am Soc Nephrol**, v. 16, n. 9, p. 2714-23, 2005.

MALATHI, S.; CHAKRABORTY, R. Production of Alkaline Protease by a New *Aspergillus flavus* Isolate under Solid-Substrate Fermentation Conditions for Use as a Depilation Agent. **Appl Environ Microbiol**, v. 57, n. 3, p. 712-6, 1991.

MERHEB, C. W.; CABRAL, H.; GOMES, E. Partial characterization of protease from a thermophilic fungus, *Thermoascus aurantiacus*, and its hydrolytic activity on bovine casein. **Food Chem** 104:127-131, 2007.

MESBAH, N. M.; WIEGEL, J. Purification and biochemical characterization of halophilic, alkalithermophilic protease AbCP from *Alkalibacillus* sp. NM-Fa4. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 105, p. 74-81, 2014.

MIYASHIRA, G. Y.; RODRIGUES, R.; KILIKIAN, B. V. Seleção de linhagens de *monascus* sp. para cultivo em meio semi-sólido. Florianópolis: UFSC, 2003.

MONETTA, L. Uso da papaína nos curativos feitos pela enfermagem. **Revista Brasileira de Enfermagem**, v. 40, p. 66- 73, 1988.

MOON, S.H.; PARULEKAR, S.J.. A parametric study of protease production in batch and fed-batch culture of *Bacillus firmus*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 37, p. 467-483, 1991.

MOREIRA, K. A.; PORTO, T. S.; TEIXEIRA, M. F. S.; PORTO, A. L. F.; LIMA FILHO, J. L. New alkaline protease from *Nocardiopsis* sp.: partial purification and characterization. **Process Biochemistry**, v. 39, p. 67–72, 2003.

MURTHY, L. N.; PHADKE, G. G.; UNNIKRISHNAN, P.; ANNAMALAI, J.; JOSHY, C. G.; ZYNUDHEEN, A. A.; RAVISHANKAR, C. N. Valorization of Fish Viscera for Crude Proteases Production and Its Use in Bioactive Protein Hydrolysate Preparation. **Waste and Biomass Valorization**, p. 1-12, 2017.

NASCIMENTO, W. C. A.; MARTINS, M. L. L. Produção de proteases por *Bacillus* sp SMIA-2 crescido em soro de leite e água de maceração de milho e compatibilidade das enzimas com detergentes comerciais. Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos. 2006.

ODA, K.; KAKIZONO, D.; YAMADA, O.; IEFUJI, H.; AKITA, O.; IWASHITA, K. Proteomic analysis of extracellular proteins from *Aspergillus oryzae* grown under submerged and solid-state culture conditions. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, p. 3448-3457, 2006.

OLIVEIRA, A.C.D.; WATANABE, F. M. F.; VARGAS, J. V. C.; MARIANO, A. B.; RODRIGUES, M. L. F. Comparação entre três bioprocessos para a produção de enzimas proteolíticas utilizando resíduos agroindustriais. **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial**, v. 06, n. 02, p. 822- 831, 2012.

PANDEY, A. Solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 13, p. 81-84, 2003.

PAPAGIANNI, M.; SERGELIDI, D. Purification and biochemical characterization of a novel alkaline protease produced by *Penicillium nalgioense*. **Applied biochemistry and biotechnology**. v. 172 (8), p. 3926- 38, 2014.

PESSOA JR., A.; KILIKIAN, B. V. **Purificação de Produtos Biotecnológicos**. Editora Manole, São Paulo, 2005.

PORTO, T.S.; MEDEIROS E SILVA, G.M.; PORTO, C.S.; CAVALCANTI, M.T.H.; NETO, B.B.; LIMAFILHO, J.L.; CONVERTI, A.; PORTO, A.L.F.; PESSOA JR., A. Liquid– liquid extraction of proteases from fermented broth by PEG/citrate aqueous two-phase system. **Chemical Engineering and Processing**, v. 47, p. 716-721, 2008.

RAI, S. K.; MUKHERJEE, A. K. Optimization of production of an oxidant and detergent-stable alkaline β -keratinase from *Brevibacillus* sp. strain AS-S10-II: Application of enzyme in laundry detergent formulations and in leather industry. **Biochemical Engineering Journal**, v. 54, p. 47-56, 2011.

RAO, M. B.; TANKSALE, A. M.; GHATGE, M. S.; DESHPANDE, V. V. Molecular and biotechnological aspects of microbial peptidases. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 62, n. 03, p. 597–635, 1998.

RAVAL, V. H.; PILLAI, S.; RAWAL, C. M.; SINGH, S. P. Biochemical and structural characterization of a detergent-stable serine alkaline protease from seawater haloalkaliphilic bacteria. **Process Biochem**, v. 49, p. 955–962, 2014.

RAWLINGS, N. D.; BARRETT, A. J. Evolutionary families of peptidases. **Biochemical Journal**, v. 290, n. 1, p. 205–218, 1993.

RAWLINGS, N. D.; BARRETT, A. J.; BATEMAN, A. Using the MEROPS Database for Proteolytic Enzymes and Their Inhibitors and Substrates. **Current Protocols in Bioinformatics**. V. 2014; p. 1.25.21-21.25.33, 2014.

RIFFEL, A. Avaliação de proteases extracelulares da linhagem *Chryseobacterium* sp.kr6, purificação e caracterização de uma metaloprotease queratinolítica. Universidade de São Paulo. Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”. Piracicaba, BR-SP, 1-98, 2006 [Tese de Doutorado].

RODRIGUES, P. H. M. Ensaio para produção de biossurfactantes pela levedura *Starmerella bombicola* em meio de cultura contendo resíduos agroindustriais. 40 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biotecnologia) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2018.

ROTH, S.H.; SKARAJNY, B.; REIFFESTEIN, R.J. Alteration of the morphology and neurochemistry of the mammalian nervous system hydrogen sulphide. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, Victoria, Austrália, v.22, p.379-380,1995.

SABOTIČ, J; KOS, J. Microbial and fungal protease inhibitors—Current and potential applications. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 93, p. 1351–1375, 2012.

SADALLA-PINTO, E. A. Hormônio de crescimento recombinante de tabaqui (*Colossoma macropomum*): otimização da expressão em frascos agitados e produção em biorreator. 2018. 86 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2018.

SAISUBRAMANIAN, N.; EDWINOLIVER, N.; NANDAKUMAR N.; KAMINI N.; PUVANAKRISHNAN, R. Efficacy of lipase from *Aspergillus niger* as an additive in detergent formulations: a statistical approach. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 33, p. 669-676, 2006.

SANA, B.; GHOSH, D.; SAHA, M.; MUKHERJEE, J. Purification and characterization of a salt, solvent, detergent and bleach tolerant protease from a new gamma-

Proteobacterium isolated from the marine environment of the Sundarbans. **Process Biochemistry**, v. 41, p. 208–215, 2006.

SANCHEZ, S.; DEMAIN, A. L. Enzymes and bioconversions of industrial, pharmaceutical, and biotechnological significance. *Organic Process Research & Development*, v. 15, p. 224-230, 2011. **Acta Biologica Szegediensis**, v. 55 n. 1 p. 13-18, 2011.

SANT'ANNA JR, G.L., 2001. Produção de Enzimas Microbianas. In: Lima, U. A.; Aquarone, E.; Borzani, W.; Schimidell, W. **Biotecnologia Industrial**. 1 ed. São Paulo, Blucher, 2001. cap.14, p. 351–362. 2001.

SANTOS, V. C. et al. Liquid–liquid extraction by mixed micellar systems: a new approach for clavulanic acid recovery from fermented broth. **Biochemical Engineering Journal**, v. 56, p. 75-83, 2011.

SAVITHA, S.; SADHASIVAM, S.; SWAMINATHAN, K.; LIN, F. H. Fungal protease: Production, purification and compatibility with laundry detergents and their wash performance. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v. 42, p. 298-304, 2011.

SHAN, L.; MARTI, T.; SOLLID, L. M.; GRAY, G. M.; KHOSLA, C. Comparative biochemical analysis of three bacterial prolyl endopeptidases: implications for coeliac sprue. **Biochemical Journal**, v. 383, p. 311-318, 2004.

SILVA, Fábio Ribeiro Campos da. Estudo da adsorção de inulinas em colunas com resinas de troca iônica: parâmetros experimentais e modelagem. 2000. 161p. Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia Química, Campinas, SP.

SILVA, D.; MARTINS, E. S.; SILVA, R.; GOMES, E. Pectinase production by *Penicillium viridicatum* RFC3 by solid state using agricultural wastes and agro-industrial by-products. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.33, p.318-324, 2002.

SILVA, G. A. B.; ALMEIDA, W. E. S.; MARTINS, E. S. Produção e caracterização de proteases obtidas por *Glicocladium verticilloides* através da fermentação em estado sólido de subprodutos agroindustriais. **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial**, v. 3, n.1, p. 28-41, 2009.

SILVA, R. R. Fermentação, Purificação e Caracterização da protease Produzida Pelo Fungo *Aspergillus fumigatus* Fresenius. Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus São José do Rio Preto, 2011 (Dissertação de Mestrado).

SINGHANIA, R. R.; PATEL, A. K.; SOCOOL, C. R.; PANDEY, A. Recent advances in solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 44, p.13-18, 2009.

SINHA, S; SINHA, S. Studies in the Production of Acid Protease by Submerged Fermentation. **International Journal of Food Engineering**, v.5, 2009.

SOUZA, K. S. P. **Produção e extração das proteases de *Mucorsubtilissimus* UCP 1262 cultivado em fermentação sólida e submersa**. 2016. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco.

SUKHOSYROVA, E. A.; NIKITINA, Z. K.; YAKOVLEVA, M. B.; VESHCHIKOVA, E. V.; BYKOV, V. A. Characteristics of collagenolytic enzymes secreted by deuteromycete fungi *Aspergillus flavus*. **Bulletin of Experimental Biology and medicine**, v. 135, n. 5, p. 447-451, 2003.

TAKAMI, H.; AKIBA, T.; HORIKISHI, K. Production of extremely thermostable alkaline protease from *Bacillus* sp. **Applied Microbiology Biotechnology**, v.34, p.157-162, 1990.

TONG, L. Viral Proteases. **Chemical Reviews**, p. 4609-4626, 2002.

TREMACOLDI, C. R. Proteases e inibidores de proteases na defesa de plantas contra pragas. 1 ed. Belém, 2009, 44 p.

VASCONCELOS, A.; SILVA, C. J. S. M.; SCHROEDER, M.; GUEBITZ, G. M.; CAVACO-PAULO, A. Detergent Formulations for Wool Domestic Washings Containing Immobilized Enzymes. **Biotechnology Letters**, v. 28, p. 725-731, 2006.

VERMA, A.; PAL, H. S.; SINGH, R.; AGARWAL, S. Potential of alkaline protease isolated from *thermoactinomyces* sp. RM4 as an alternative to conventional chemicals in leather industry dehairing process. **Int. Jr. of Agril., Env. And Biotech.**, v. 4, n. 2, p. 173-178, 2011.

VERMELHO, A.B.; MELO, A.C.N.; BRANQUINHA, M.B.; SANTOS, A.L.S.; MASINI, C.; LEVY, A.; COURI, S.; BOM, E.P.S. Enzimas em biotecnologia: produção, aplicações e mercado, Edição: 1, Capítulo: 11, Editora Interciência, p.273-287, 2008.

VINIEGRA-GONZALEZ, G.; FAVELA-TORRES, E.; AGUILAR, C.N.; ROMERO-GOMEZ, S.D.; DIAZ-GODINEZ, G.; AUGUR, C. Advantages of fungal enzyme production in solid state over liquid fermentation systems. **Biochemical Engineering Journal**, v. 13, p. 157-167, 2003.

WANDERLEY, M. D.; NEVES, E.; ANDRADE, C. J. Aspectos da produção industrial de enzimas. **Revista Hestia Citino**, v. 1, n.1, p. 30-36, 2011.

WARD, O. P. Proteinases. In: FOGARTY, W. M. (Ed.). Microbial enzymes and biotechnology. London: Applied Science Publishers, 1983. p. 251-305.

WARD, O. P.; RAO, M. B.; KULKARNI, A. Proteases, Production. **Encyclopedia of Microbiology** (Third Edition). Oxford: Academic. Press; 2009. p. 495-511.

WISEMAN, A. Manual de biotecnologia de las enzimas. Zaragoza: Acribia, 1991. 444p.

YOUNES, I.; NASRI, R.; BKHAIRIA, I.; JELLOULI, K.; NASRI, M. New proteases extracted from red scorpionfish (*Scorpaena scrofa*) viscera: Characterization and application as a detergent additive and for shrimp waste deproteinization. **Food and Bioproducts Processing**, p. 2-11, 2014.

ZUÑIGA, A. D. G.; PEREIRA, J. A. M.; COIMBRA, J. S. R.; MINIM, L. A.; ROJAS, E. E. G. Revisão: técnicas usadas no processo de purificação de biomoléculas. B. CEPPA, Curitiba, v. 21, n. 1, p. 61-82, 2003.