



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE

ESCOLA DE QUÍMICA E ALIMENTOS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E CIÊNCIA DE ALIMENTOS

APLICAÇÃO DE LÍQUIDOS IÔNICOS: ESTABILIDADE E PROPRIEDADES  
CATALÍTICAS DE PROTEASE QUERATINOLÍTICA

ENG<sup>a</sup>. THAIS DE MATOS DE BORBA

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. SUSANA JULIANO KALIL

ORIENTADORA

RIO GRANDE, RS

2015



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE

ESCOLA DE QUÍMICA E ALIMENTOS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E CIÊNCIA DE ALIMENTOS

APLICAÇÃO DE LÍQUIDOS IÔNICOS: ESTABILIDADE E PROPRIEDADES  
CATALÍTICAS DE PROTEASE QUERATINOLÍTICA

Dissertação apresentada como  
parte dos requisitos para a  
obtenção do título de mestre em  
Engenharia e Ciência de  
Alimentos

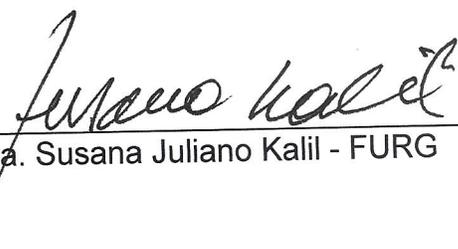
Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. SUSANA JULIANO KALIL  
ORIENTADORA

RIO GRANDE, RS

2015

## APROVAÇÃO

Dissertação defendida por Thais de Matos de Borba e aprovada em 20 de março de 2015, pela Comissão Examinadora constituída pelos professores:



---

Profa. Dra. Susana Juliano Kalil - FURG



---

Profa. Dra. Jaqueline Garda Buffon - FURG



---

Profa. Dra. Janaína F. de Medeiros Burkert - FURG



---

Profa. Dra. Ana Paula Manera - UNIPAMPA

B726a Borba, Thais de Matos de.  
Aplicação de líquidos iônicos: estabilidade e propriedades catalíticas de  
protease queratinolítica / Thais de Matos de Borba. – 2015.  
62 f.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande – FURG,  
Programa de Pós-graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos,  
Rio Grande/RS, 2015.

Orientadora: Dr<sup>a</sup>. Susana Juliano Kalil.

1. Queratinase 2. Estabilidade térmica 3. Atividade enzimática  
4. *Bacillus* 5. Preservativo químico I. Kalil, Susana Juliano II. Título.

CDU 664

*Dedico este trabalho a minha mãe Leila Maria,  
primeira pessoa a acreditar que tudo isso seria possível.*

## AGRADECIMENTOS

À Deus por tudo que Ele tem realizado e permitido acontecer em minha vida, por ser a razão da minha existência e a Força que me sustenta.

À minha orientadora, Susana, pela amizade, atenção constante, ensinamentos e pela confiança na realização deste trabalho, agradeço por tudo isso e por ter me dado a oportunidade de entrar na família LMB. Quero que saibas que és meu exemplo de profissional, além dos ensinamentos, sempre preocupada com todos os orientados, como tu mesma diz: somos "teus filhos acadêmicos".

À minha mãe, Leila Maria, minha maior inspiradora e incentivadora, quem nunca mediu esforços para eu sempre poder aprimorar meus conhecimentos, pela minha educação e por me tornar a pessoa responsável e íntegra que sou. Agradeço todas as palavras certas nos momentos de insegurança, pela companhia e amor. Tu és a pessoa que sempre irei me espelhar.

A minha irmã Tássia, pelos momentos compartilhados e por estar sempre presente.

A minha iniciante científica Natália, meu braço direito, parceria que deu certo, sempre muito comprometida, obrigada especial por toda prestatividade e confiança, além da tua agradável companhia. Grande parte deste trabalho também é seu.

Ao Édipo, pelo carinho, atenção, compreensão e companheirismo. Por sempre se dispor a me acompanhar ao laboratório nos finais de semana de trabalho.

Aos integrantes da banca pelas valiosas contribuições, ensinamentos e a disponibilidade dedicada a este trabalho.

À Ana, técnica do laboratório, por toda alegria e prestatividade, pela amizade e por me acolher de braços abertos no laboratório.

A todos colegas do LMB, Ailton, Daiane, Deborah, Elida, Felipe, Gabi, Joana, Luísa e Samuel por todo apoio e ajuda técnica que foram de fundamental importância para a realização deste trabalho. Pela companhia diária e os momentos de descontração.

Outro agradecimento a Gabi por se dispor a me ajudar fora da universidade transmitindo os seus conhecimentos, para ser possível otimizar o tempo.

Aos meus companheiros de viagens diária Pelotas - Rio Grande, Adriana, Gabi (novamente), Ana Paula, Michele, Márcia, Anelise, Nívia, Kricelle que através das conversas no final do dia, tornaram o cansaço menos intenso.

Ao laboratório de Operações Unitárias, por disponibilizar equipamentos fundamentais na realização deste trabalho, em especial ao colega Ricardo por todo auxílio técnico e prestatividade.

Ao laboratório de Controle Ambiental por dispor do reômetro, e a Karolina pela disponibilidade em me ajudar.

Ao laboratório de Análise Sensorial, por disponibilizar o liofilizador. A Michele Paludo por sempre se dispor a operá-lo e por toda a amizade.

Aos meus colegas de mestrado Annie, Antônio, Carina, Carolina, Claudio, Dianini, Etiele, Janaína, Jéssica, Kricelle, Náthali, Viviane e Rosmer pela companhia no primeiro ano durante as disciplinas cursadas e as várias conversas e trocas de experiência.

A Denise, Juliana e Mariana, amigas queridas que posso contar em todas as horas.

Ao professor Adriano Brandelli, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, por nos ceder a cepa do micro-organismo.

À Capes (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) e a Fapergs (Fundação de Amparo à Pesquisa do estado do Rio Grande do Sul) pelo apoio financeiro.

À Universidade Federal do Rio Grande.

Enfim, difícil nomear cada um, agradeço a todos que contribuíram de forma direta ou indireta, vocês fizeram parte da minha história. Muito obrigada.

A maior recompensa pelo nosso trabalho  
não é o que pagam por ele,  
mas aquilo o que ele nos transforma.

John Ruskin



## RESUMO

A alta quantia de coprodutos residuais queratinosos depositados no meio ambiente desencadeou o desenvolvimento de processos biotecnológicos com enzimas queratinolíticas. O emprego de líquidos iônicos (LI) é apontado como uma nova tecnologia podendo aprimorar a estabilidade de enzimas. No presente trabalho, a queratinase foi tratada em LI para investigar o efeito na estabilidade térmica e atividade catalítica. A enzima foi obtida a partir do gênero *Bacillus* sp. P45, purificada por sistema aquoso bifásico seguido de ultrafiltração/diafiltração e liofilizada. A termoestabilidade da enzima foi avaliada nos LIs [Mmim][CH<sub>3</sub>SO<sub>4</sub>], [TEAA], [Bmim][PF<sub>6</sub>] e [Emim][Tf<sub>2</sub>N]. O tratamento da enzima foi realizado sob agitação magnética a 4°C por 30 min. Adicionalmente foi feita uma comparação da estabilidade enzimática no LI selecionado com os preservativos polietilenoglicol 1500 54% e o uso conjunto de sorbitol 50% e CaCl<sub>2</sub> 5 mmol.L<sup>-1</sup>, com tempo de incubação de 15 e 60 min a 55°C e de 15 min a 70°C. Na sequência foi determinado os parâmetros cinéticos (meia vida e constante de desnaturação) e as propriedades térmicas por calorimetria diferencial de varredura (DSC) da enzima tratada em [Emim][Tf<sub>2</sub>N] e forma liofilizada. O efeito na atividade catalítica da enzima tratada foi determinado através do estudo da concentração de [Emim][Tf<sub>2</sub>N] no meio reacional, da temperatura e pH ótimos tanto no LI como nos preservativos e ainda pela adição dos solventes orgânicos acetona, etanol e isopropanol, nas concentrações de 25 e 50% (v/v) (solvente/enzima tratada no LI). No ensaio contendo o solvente orgânico e LI foi calculado a constante de Michaelis-Menten (K<sub>M</sub>) e a velocidade máxima (V<sub>máx</sub>). O LI selecionado como melhor estabilizante da queratinase foi o hidrofóbico [Emim][Tf<sub>2</sub>N], com o melhor efeito em 70°C, reduzindo 16% da atividade inicial após 15 min, enquanto que tratada em sorbitol+CaCl<sub>2</sub> a redução foi de 38%. A meia vida a 70°C determinada para a enzima tratada em polietilenoglicol 1500, sorbitol+CaCl<sub>2</sub> e [Emim][Tf<sub>2</sub>N] foi de 2,2 min, 28,9 min e 6,4 h, respectivamente, e de 6,4 h para sorbitol+CaCl<sub>2</sub> e 3,0 h para polietilenoglicol, a 55°C. A 55°C a enzima tratada em LI teve pouca redução na atividade, mantendo 70% da inicial por 32 dias. Na análise de DSC, a enzima foi melhor estabilizada termodinamicamente quando tratada em [Emim][Tf<sub>2</sub>N], mantendo a sua integridade molecular até a temperatura de 143,2°C. A concentração de LI adicionado no meio reacional que conduziu a maior atividade foi 4,5% (v/v). A temperatura ótima da enzima tratada no LI [Emim][Tf<sub>2</sub>N] e em sorbitol+CaCl<sub>2</sub> foi de 50 e 60°C, e pH ótimo igual a 8,0 e 8,5, respectivamente. A enzima tratada em 50% (v/v) do LI e acetona, adicionados ao meio reacional com concentração de LI igual a 2,3% (v/v) aumentou 1,5 vezes o valor da atividade, com K<sub>M</sub> de 0,94 mg.mL<sup>-1</sup> e V<sub>máx</sub> de 25,9 U.mg<sup>-1</sup>. Portanto, o LI [Emim][Tf<sub>2</sub>N] foi capaz de estabilizar a queratinase e a adição de acetona permitiu utilizar uma menor quantidade deste LI, obtendo maior atividade.

**PALAVRAS CHAVE:** queratinase, 1-etil-3-metilimidazólio bis(trifluorometilsulfonil)imida, estabilidade térmica, atividade enzimática, *Bacillus*, preservativos químicos.

## IONIC LIQUIDS APPLICATION: STABILITY AND CATALYTIC PROPERTIES OF PROTEASE KERATINASE

### ABSTRACT

The high amount of keratin waste byproducts deposited in the environment started the development of biotechnological processes with keratinolytic enzymes. The use of ionic liquids (IL) is considered as a new technology can enhance the stability of enzymes. In this study, the keratinase was treated in IL to investigate the effect on the thermal stability and catalytic activity. The enzyme was obtained from *Bacillus* sp. P45, purified by aqueous two-phase system followed by ultrafiltration/diafiltration and lyophilized. The thermal stability of the enzyme was evaluated in ionic liquids [Mmim][CH<sub>3</sub>SO<sub>4</sub>], [TEAA], [Bmim][PF<sub>6</sub>] and [Emim][Tf<sub>2</sub>N]. The enzyme treatment was performed under magnetic stirring at 4°C for 30 min. A comparison of enzyme stability in IL selected with preservatives polyethylene glycol 1500 54% and joint use sorbitol 50% and CaCl<sub>2</sub> 5 mmol.L<sup>-1</sup> was done, with an incubation time of 15 min and 60 min at 55°C and 15 min at 70 °C. Then it was determined kinetic parameters (half life and inactivation rate constant) and thermal properties by differential scanning calorimetry (DSC) of the enzyme treated in [Emim][Tf<sub>2</sub>N] and preservatives. The effect on the catalytic activity of treated enzyme was determined by studying the [Emim][Tf<sub>2</sub>N] concentration in reaction medium, temperature and pH optimum in both IL and preservatives, and by the addition of organic solvents acetone, ethanol and isopropanol at concentrations 25% and 50% (v/v) (solvent/enzyme treated in IL). In the assay containing organic solvent and IL it was calculated Michaelis-Menten constant (K<sub>M</sub>) and the maximal velocity (V<sub>max</sub>). The IL selected as the best keratinase stabilizing was the hydrophobic [Emim][Tf<sub>2</sub>N], with the best effect at 70°C, reducing 16% of its initial activity after 15 min, whereas the enzyme treated in sorbitol+CaCl<sub>2</sub> was 38%. The half life at 70°C were determined for the keratinase treated in polyethylene glycol 1500, sorbitol+CaCl<sub>2</sub> and [Emim][Tf<sub>2</sub>N] of 2.2 min, 28.9 min and 6.4 h, respectively, and 6.4 h for sorbitol+CaCl<sub>2</sub> and 3 h for polyethylene glycol at 55°C. At 55°C the enzyme in IL had little reduction in activity, maintaining 70% of the initial in 32 days. In DSC analysis, the enzyme was stable thermodynamically better when treated in [Emim][Tf<sub>2</sub>N], maintaining its molecular integrity until the temperature 143.2°C. The concentration of IL added to the reaction medium which led to highest activity was 4.5% (v/v). The optimum temperature of the enzyme treated in IL and sorbitol+CaCl<sub>2</sub> was 50 and 60°C and the optimum pH was 8.0 and 8.5, respectively. The enzyme treated at 50% (v/v) of IL and acetone added to the reaction medium with IL concentration of 2.3% (v/v) increased 1.5 times the activity value, with K<sub>M</sub> of 0.94 mg.mL<sup>-1</sup> and V<sub>max</sub> of 25.9 U.mg<sup>-1</sup>. Therefore, [Emim][Tf<sub>2</sub>N] was able to stabilize the keratinase and with the addition of acetone provided the use of a smaller amount of the IL, obtaining higher activity.

**KEY WORDS:** keratinase, 1-ethyl-3-methylimidazolium bisv (trifluoromethylsulfonyl)imide, thermal stability, enzymatic activity, *Bacillus*, chemical preservative.

## **LISTA DE TABELAS**

Tabela 1 – Parâmetros cinéticos de desnaturação térmica da enzima queratinase. ....	41
Tabela 2 – Temperatura de transição ( $T_m$ ), inicial e final das alterações na molécula da queratinase, determinados por análise de DSC.....	44

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Tipos de íons presentes nos líquidos iônicos. (I) 1-alkil-3-metilimidazólio; (II) <i>N</i> -alkil- <i>N</i> -metilpirrólico; (III) tetraalkilamônio; (IV) etilamônio; (V) colina; (VI) guanidina; (VII) trifluorometilsulfonato; (VIII) bis(trifluorometilsulfonyl)imida; (IX) alkilsulfato; (X) dicianida. ....	12
Figura 2 – Líquidos iônicos mais utilizados.....	13
Figura 3 – Esquema do arranjo de cátions imidazólio apresentando os canais onde os ânions esféricos A são acomodados.....	15
Figura 4 – Micro-organismo <i>Bacillus</i> sp. P45, aumento de 1000x. ....	22
Figura 5 – Etapas do sistema aquoso bifásico. (a) 1° SAB (b) 2° SAB (I) Fase de topo (II) Fase de fundo. ....	23
Figura 6 – Estabilidade da queratinase nos líquidos iônicos hidrofílicos a 55°C. (a) Atividade residual (%) da queratinase nos diferentes LI. (b) A/A <sub>0</sub> (%) da queratinase nos diferentes LI. ....	29
Figura 7 – Estabilidade da queratinase nos líquidos iônicos hidrofóbicos a 55°C. (a) Atividade residual (%) da queratinase nos diferentes LI. (b) A/A <sub>0</sub> (%) da queratinase nos diferentes LI. ....	31
Figura 8 – Efeito dos preservativos na estabilidade da queratinase tratada. PEG: polietilenoglicol, PG: propilenoglicol. ....	34
Figura 9 – Efeito do líquido iônico [Emim][Tf <sub>2</sub> N] na estabilidade da queratinase tratada.....	36
Figura 10 – Linearização da cinética de desnaturação térmica da enzima em tampão tris-HCl pH 7,5 (controle). (a) Temperatura de 55°C e (b) Temperatura de 70°C. ....	38
Figura 11 – Linearização da cinética de desnaturação térmica da enzima em PEG 1500 54%. (a) Temperatura de 55°C e (b) Temperatura de 70°C. ....	39
Figura 12 – Linearização da cinética de desnaturação térmica da enzima em sorbitol 50% com CaCl <sub>2</sub> 5 mmol.L <sup>-1</sup> . (a) Temperatura de 55°C e (b) Temperatura de 70°C.....	40
Figura 13 – Linearização da cinética de desnaturação térmica da enzima no líquido iônico [Emim][Tf <sub>2</sub> N] na temperatura de 70°C. ....	41
Figura 14 – Curva de DSC da amostra enzima queratinase em diferentes condições e do LI [Emim][Tf <sub>2</sub> N]. ....	43
Figura 15 – Efeito de diferentes concentrações do LI [Emim][Tf <sub>2</sub> N] na atividade enzimática da queratinase. ....	46
Figura 16 – Efeito da temperatura na atividade da queratinase, pH fixado em 7,5.....	46
Figura 17 – Efeito do pH na atividade da queratinase, temperatura fixada em 40°C.....	47

Figura 18 – Efeito de solventes orgânicos na atividade da queratinase em LI [Emim][Tf<sub>2</sub>N].48

Figura 19 – Efeito de diferentes concentrações do LI [Emim][Tf<sub>2</sub>N] em meio contendo acetona na atividade enzimática da queratinase..... 50

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Efeito de vários desnaturantes físicos, químicos e biológicos com seus sítios alvo e o resultado da forma desnaturada da proteína. ....	9
Quadro 2 – Preservativos estudados em proteases. ....	10

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- [Bmim][Br]: 1-butil-3-metilimidazólio brometo
- [Bmim][Cl]: 1-butil-3-metilimidazólio clorídrico
- [Bmim][PF<sub>6</sub>]: 1-butil-3-metilimidazólio hexafluorofosfato
- [Bmim][BF<sub>4</sub>]: 1-butil-3-metilimidazólio tetrafluoroborato
- [BuPy][CF<sub>3</sub>COO]: N-*n*-butilpiridínio trifluoroacetato
- [C<sub>6</sub>mim][Cl]: 1-hexil-3-metilimidazólio clorídrico
- [C<sub>6</sub>mim][PF<sub>6</sub>]: 1-hexil-3-metilimidazólio hexafluorofosfato
- [C<sub>6</sub>mim][BF<sub>4</sub>]: 1-hexil-3-metilimidazólio tetrafluoroborato
- CaCl<sub>2</sub>: cloreto de cálcio
- DSC: calorímetro diferencial de varredura
- [Emim][Tf<sub>2</sub>N]: 1-etil-3-metilimidazólio bis(trifluorometilsulfonil)imida
- [Emim][CF<sub>3</sub>COO]: 1-etil-3-metilimidazólio trifluoroacetato
- [Emim][BF<sub>4</sub>]: 1-etil-3-metilimidazólio tetrafluoroborato
- ΔG: energia livre de Gibbs
- ΔH: entalpia
- k<sub>d</sub>: constante de desnaturação
- K<sub>M</sub>: Constante de Michaelis-Mentem
- [Mmim][CH<sub>3</sub>SO<sub>4</sub>]: 1,3-dimetilimidazólio metil sulfato
- PEG: polietilenoglicol
- PG: propilenoglicol
- SAB: sistema aquoso bifásico
- t<sub>1/2</sub>: meia vida
- T<sub>m</sub>: temperatura de transição térmica
- [TEAA]: trietilamônio acetato
- UF/DF: ultrafiltração/diafiltração
- V<sub>máx</sub>: velocidade máxima
- η: viscosidade dinâmica



## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO .....	1
2 OBJETIVOS .....	3
2.1 Objetivo Geral.....	3
2.2 Objetivos Específicos.....	3
3 REVISÃO DA LITERATURA .....	4
3.1 Enzimas.....	4
3.2 Proteases.....	5
3.3 Produção e purificação de queratinase.....	6
3.4 Mecanismos de estabilidade.....	7
3.5 Líquidos iônicos.....	11
3.5.1 Propriedades dos líquidos iônicos.....	14
3.5.1.1 Polaridade.....	15
3.5.1.2 Ligações de hidrogênio .....	15
3.5.1.3 Nucleofilicidade do ânion .....	16
3.5.1.4 Viscosidade .....	16
3.6 Caracterização enzimática.....	16
3.6.1 Temperatura e pH ótimos.....	17
3.6.2 Termoestabilidade .....	18
3.7 Efeito de solventes orgânicos na atividade enzimática.....	19
3.8 Calorimetria Diferencial de Varredura .....	19
4 MATERIAL E MÉTODOS .....	22
4.1 Micro-organismo.....	22
4.2 Obtenção do inóculo .....	22
4.3 Produção da enzima queratinase .....	22
4.4 Purificação do extrato enzimático.....	23
4.4.1 Sistema aquoso bifásico .....	23
4.4.2 Ultrafiltração/Diafiltração .....	24
4.5 Estabilidade térmica da queratinase em líquidos iônicos.....	24
4.5.1 Termoestabilidade em diferentes líquidos iônicos.....	24
4.5.2 Efeito de preservativos e de líquido iônico hidrofóbico na estabilidade .....	24
4.5.3 Parâmetros cinéticos de desnaturação térmica.....	25
4.5.4 Determinação das propriedades térmicas.....	25
4.6 Efeito do líquido iônico na atividade enzimática da queratinase.....	26
4.6.1 Efeito da concentração do LI na atividade enzimática .....	26

4.6.2 Determinação da temperatura e pH ótimos da queratinase na presença de LI .....	26
4.6.3 Efeito de solventes orgânicos e líquido iônico hidrofóbico na atividade da queratinase	26
4.6.4 Efeito da concentração do LI em meio contendo acetona na reação enzimática .....	26
4.6.4.1 Determinação do valor de $K_M$ e $V_{m\acute{a}x}$ .....	27
4.7 Determinações Analíticas .....	27
4.7.1 Atividade Proteolítica .....	27
4.7.2 Determinação da viscosidade .....	27
4.7.3 Tratamento dos dados .....	28
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	29
5.1 Termoestabilidade da enzima queratinase em líquidos iônicos .....	29
5.2 Efeito de preservativos e de líquidos iônicos hidrofóbicos na estabilidade da queratinase	33
5.3 Parâmetros Cinéticos de desnaturação térmica .....	37
5.4 Propriedades Térmicas .....	43
5.5 Efeito da concentração do LI na atividade enzimática .....	45
5.6 Determinação da temperatura e pH ótimos da queratinase na presença de LI .....	46
5.7 Efeito de solventes orgânicos e do líquido iônico hidrofóbico na atividade da enzima.....	48
5.8 Efeito da concentração de LI em meio contendo acetona na reação enzimática.....	49
6 CONCLUSÃO .....	52
7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	53
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	54



## 1 INTRODUÇÃO

A queratina é uma proteína estrutural de difícil degradação, pois é formada por cadeias compactas e rígidas de pontes dissulfeto e ligações cruzadas. Está presente em pelos, penas, unhas, chifres, escamas e cascos. A alta geração desses resíduos queratinosos faz com que haja acúmulo no ambiente (ANITHA; PALANIVELU, 2013; GUPTA; RAMNANI, 2006).

A enzima queratinase, um tipo especial de protease, tem atraído atenção de pesquisadores por causa de sua ação de hidrólise sobre a queratina. Micro-organismos queratinolíticos e queratinases microbianas apresentam um ramo de potencial aplicações industriais, com alta bioconversão de resíduos queratinosos: agentes depilatório na indústria de couro e têxtil (LETOURNEAU et al., 1998; RIFFEL; ORTOLAN; BRANDELLI, 2003; FOROUGH; KESHAVARZ; EVANS, 2006; ISMAIL et al., 2012), degradação de penas de galinha em frigoríficos, hidrolisados proteicos para alimentos (GRAZZIOTIN et al., 2007), hidrólise de príons (LANGEVELD et al., 2003; YOSHIOKA et al., 2007), produção de biohidrogênio (BÁLINT et al., 2005), aditivo na formulação de detergentes (HADJ-ALI et al., 2007), aumento da eficácia de medicamentos (MOHORČIČ et al., 2007), fertilizantes (PAUL et al., 2013), dentre outros.

Devido ao seu vasto campo de aplicação, é necessário manter a estrutura tridimensional da protease e evitar mudanças no seu microambiente, os quais causam a desnaturação levando ao desdobramento e inativação enzimática (PATEL; KUMARI; KHAN, 2014). A aplicação industrial destes biocatalisadores é dependente de sua estabilidade operacional e de armazenamento, a meia vida, que fornece informações sobre a capacidade de manutenção biocatalítica entre o tempo de fabricação e uso. Por outro lado, a estabilidade operacional descreve a persistência da enzima durante o processo sob as condições de utilização (AGUIAR-OLIVEIRA; MAUGERI, 2011).

Os métodos de estabilidade de enzimas variam de acordo com o tipo da protease, dentre eles destacam-se a utilização de preservativos como polietilenoglicol, polióis, amido, solventes orgânicos, íons metálicos, detergentes e líquidos iônicos (LI); imobilização; sistemas de alta pressão e engenharia de proteínas (DE DIEGO et al., 2004; RADHA; GUNASEKARAN, 2009; GHORBEL; SELLAMI-KAMOUN; NASRI, 2003; IYER; ANANTHANARAVAN, 2008; PRAKASH; JAYALAKSHMI; SREERAMULU, 2010, EISENMENGER; REYES-DE-CORCUERA, 2009, FÁGÁIN, 2003). Sendo cada método limitado pelo tipo de biocatalisador (enzima), custos e condições operacionais.

As enzimas do tipo celulase, peroxidase,  $\alpha$ -quimotripsina,  $\beta$ -galactosidase são reportadas por Bose, Barnes e Petrich (2011), Machado e Saraiva (2005), Attri, Venkatesu e Kumar, (2011) e Kaftzik, Wasserscheid e Kragl (2002), respectivamente, por exibirem aumento de estabilidade em líquidos iônicos, essas enzimas também favoreceram a seletividade pelo substrato, regio- e enantioseletividade (MONIRUZZAMAN et al., 2010). Os líquidos iônicos são conceituados como sais, inteiramente compostos por íons, que são compostos por um cátion orgânico e um ânion inorgânico (LOZANO, 2010). A possibilidade de manipulação de suas características físico-químicas os torna adequados para as inúmeras aplicações industriais. Em comparação com os solventes orgânicos, os líquidos iônicos tem muitas propriedades favoráveis, tais como baixa pressão de vapor, elevada condutividade iônica, elevada estabilidade térmica e capacidade de dissolução de uma variedade de solutos (NAUSHAD et al., 2012).

Além da estabilidade enzimática, a atividade biocatalítica é outra característica importante na manutenção da funcionalidade de proteínas. Esta é afetada por diversas propriedades dentre elas a polaridade do LI, viscosidade do meio, forma de dispersão, tipos de ligantes, que são dependentes do LI escolhido (PATEL; KUMARI; KHAN, 2014; MONIRUZZAMAN et al., 2010; RANTWIJK; SHELDON, 2007; ZHAO, 2005), e por fatores ambientais, como temperatura, pH e meio reacional, parâmetros que devem ser conhecidos para uma melhor otimização do processo (JURADO et al., 2004).

Com base na importância do exposto acima, o uso de líquidos iônicos é uma tecnologia promissora e aplicável na estabilização e biocatálise de diversas enzimas. Considerando a carência de um estudo aprofundado para a enzima queratinase, este trabalho se deteve na avaliação da estabilidade e propriedades catalíticas da protease queratinolítica produzida por *Bacillus* sp. P45, com o intuito de colaborar cientificamente com este campo do conhecimento.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Avaliar a estabilidade térmica e as propriedades catalíticas da protease queratinolítica tratada em líquidos iônicos.

### 2.2 Objetivos Específicos

Realizar o tratamento da enzima com líquidos iônicos, selecionando-o quanto as propriedades de termoestabilidade.

Determinar o efeito estabilizante pelo uso de preservativos químicos comparando ao uso de líquido iônico no tratamento da queratinase.

Determinar os parâmetros cinéticos (meia vida e  $k_d$ ) e propriedades térmicas da enzima tratada nas melhores condições.

Determinar a temperatura e pH ótimos da enzima tratada no líquido iônico e preservativos selecionados.

Avaliar o efeito de solventes orgânicos na atividade enzimática da enzima tratada com líquido iônico.

## 3 REVISÃO DA LITERATURA

### 3.1 Enzimas

A biotecnologia está se expandindo no mercado, devido ao aumento da conscientização sobre questões ambientais, oferecendo vantagens em relação as tecnologias químicas. De acordo com o estudo publicado eletronicamente na Business Communications Company Inc., o mercado industrial de enzimas foi estimado em quase \$4,5 bilhões em 2012 e cerca de \$4,8 bilhões em 2013. O mercado deve chegar a 7,1 bilhões em 2018, com uma taxa composta de crescimento de 8,2% de 2013 até 2018.

As enzimas, em sua maioria proteínas, apresentam eficiência catalítica com a característica de apresentar alto grau de especificidade por seu substrato. Atuam em sequências organizadas, catalisando as centenas de reações sucessivas pelas quais as moléculas nutrientes são degradadas, sendo fundamentais para qualquer processo bioquímico (LEHNINGER, 1997).

As proteínas são heteropolímeros formados por aminoácidos ligados covalentemente por ligações peptídicas. As regiões da proteína são divididas em quatro níveis. A denominada ligação primária corresponde a sequência de aminoácidos. A estrutura secundária corresponde ao arranjo espacial de aminoácidos adjacentes na forma tipo  $\alpha$ -hélice e do tipo folha  $\beta$ . As interações entre aminoácidos, provocando torções e dobramentos de regiões da macromolécula, compõe a estrutura terciária, importante por configurar o sítio catalítico da enzima. A estrutura quaternária refere-se ao arranjo espacial das subunidades das cadeias proteicas (LIMA et al., 2001).

Para uma enzima ser comercialmente utilizável, esta deve possibilitar uma melhoria de processo, viabilizar produtos que não são disponíveis ou presentes em pequenas quantidades. Embora alguns destes biocatalisadores sejam extraídos de tecidos animais e vegetais, a grande maioria das enzimas industriais é obtida de micro-organismos (bactérias, leveduras e fungos filamentosos). As principais enzimas utilizadas industrialmente são:  $\alpha$ -amilase, glicoamilase,  $\beta$ -galactosidase, glicose isomerase e várias proteases (HARJU; KALLIOINEN. TOSSAVAINEN, 2012; BON; FERRARA; CORVO, 2008; LIMA et al., 2001).

Muitas enzimas apresentam uma estrutura tridimensional característica. Esta estrutura, é o principal fator para a atividade, sendo mantida por pontes de dissulfeto, ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas (van der Waals) (RANTWIJK; SHELDON, 2007).

Em condições extremas, as enzimas podem sofrer desnaturação, se for reversível, causa o desdobramento da estrutura terciária da enzima em desordenadas cadeias polipeptídicas sem estrutura funcional ou estabilidade. Se for irreversível, a enzima pode sofrer alterações

químicas levando a perda de atividade seguida da inativação por desdobramento (IYER; ANANTHANARAVAN, 2008).

### 3.2 Proteases

As proteases, também denominadas proteinases ou peptidases, participam das reações de catálise na hidrólise de ligações peptídicas em proteínas e peptídeos. Têm presença universal em todas as formas de vida e constituem um dos mais importantes grupos de enzimas comerciais com aplicações principalmente na indústria de processamento de alimentos, detergentes e couro (BRANDELLI, 2008; ANITHA; PALANIVELU, 2013).

São hidrolases, porém existem outros critérios que as classificam em vista de que todas catalisam, basicamente, a mesma reação – hidrólise de ligações peptídicas. São eles (i) pH de atividade ótima, em proteases ácidas, neutras ou alcalinas; (ii) natureza química e mecanismo do sítio catalítico, em aspartil, cisteíno, metaloproteases, serino ou treonino; (iii) tipo de reação catalisada, em endo ou exoproteases, dependendo do local de clivagem em relação às regiões terminais do substrato e (iv) relações evolutivas no que diz respeito à sua estrutura, classificadas em seis grupos denominados “clans” todas com a mesma origem: serinoproteases (RAO et al., 1998; GUPTA; BEG; LORENZ, 2002; PAGE; Di CERA, 2008; BARRETT; RAWLINGS, 1995).

As queratinases (EC 3.4.21-24/99.11) são uma particular classe de enzimas proteolíticas, na sua maioria extracelular, classificadas, predominantemente, como serino ou metaloproteases (RADHA; GUNASEKARAN, 2009). Como característica diferencial frente a outras enzimas, apresentam a capacidade de degradar a queratina (proteínas recalcitrantes presente na epiderme e seus constituintes como penas, pelos, chifres, unhas, cascos e lã) (BACH et al., 2011; ANITHA; PALANIVELU, 2013; GUPTA; RAMNANI, 2006).

Com relação aos mecanismos de hidrólise, as queratinases são principalmente endoproteases que mostram uma ampla faixa de atividade, frequentemente de forma mais eficaz na hidrólise de proteínas solúveis (como caseína) do que nas proteínas insolúveis (como queratina) (SALA et al., 2014; SYED et al., 2009; FARAG; HASSAN, 2004). Resíduos ricos em queratinas são de difícil degradação, por apresentar cadeias polipeptídicas densamente compactas e fortemente estabilizadas por várias ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas, além disso o grande número de pontes dissulfeto intercadeias conferem estabilidade mecânica e resistência a degradação proteolítica de queratinas por proteases comuns (BRANDELLI; DAROIT; RIFFEL, 2010).

No cultivo microbiano para a produção de queratinase ocorre um processo complexo, pois a hidrólise da queratina envolve sulfitólise e proteólise, isto é, a redução de pontes de dissulfeto, a qual compõe a estrutura da queratina, evidenciada pela produção de intra e extracelulares dissulfeto redutases, liberando sulfito e tiosulfato durante o crescimento microbiano, ou mesmo através do potencial redutor das células microbianas (BRANDELLI; DAROIT; RIFFEL, 2010). Portanto, com poucas exceções, as enzimas queratinolíticas purificadas são ineficazes para hidrolisar a queratina nativa, esse comportamento é atribuído aos altos níveis de pontes dissulfeto na molécula de queratina.

### 3.3 Produção e purificação de queratinase

Micro-organismos são produtores de uma grande variedade de proteases, de forma intracelular e/ou extracelular. Proteases intracelulares são importantes para vários processos metabólicos e fisiológicos, e as extracelulares são importantes para a hidrólise de proteínas em ambientes livres de células, permitindo que o produto de hidrólise sirva como fonte de carbono e nitrogênio para multiplicação celular (GUPTA; BEG; LORENZ, 2002; BON; FERRARA; CORVO, 2008).

Muitos são os micro-organismos queratinolíticos. Entre os fungos, queratinases são particularmente produzidas por dermatófitos isolados de lesões humanas e animais (MARCONDES et al., 2008). Entre as bactérias, a atividade queratinolítica tem sido bastante estudada entre cepas do gênero *Bacillus* (CORRÊA; DAROIT; BRANDELLI, 2010; LEÃES et al., 2013; SHRINIVAS; KUMAR; NAIK, 2012) e *Streptomyces* (XIE et al., 2010; TATINENI et al., 2008;). No entanto, vários estudos documentam que há uma diversidade de bactérias com habilidades de produção, incluindo bactérias gram-positivas como as *Arthobacter* sp. (LUCAS et al., 2003), *Mycrobacterium* sp. (THYS et al., 2004) e *Kocuria rósea* (BERNAL; CAIRÓ; COELLO, 2006), e bactérias gram-negativas como as *Vibrio* sp. (GRAZZIOTIN et al., 2007), *Stenotrophomonas* sp. (JEONG et al., 2010), *Chryseobacterium* sp. (SILVEIRA; JAEGER; BRANDELLI, 2009) e *Serratia* sp. (BACH et al., 2012).

A produção de queratinase é induzida por substratos queratinosos (penas de galinha, farinha de penas e pelos) que são frequentemente adicionados ao meio de cultivo. Estes materiais ricos em queratina, são produzidos em quantidades elevadas pelos setores agroindustriais, sendo normalmente descartados como resíduos. Portanto, a tecnologia microbiana alia a produção de produtos rentáveis (queratinases, biomassa microbiana, hidrolisados de proteínas) a partir de substratos de baixo custo como uma alternativa eficiente de aproveitamento de resíduos (BRANDELLI; DAROIT; RIFFEL, 2010).

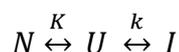
Queratinases microbianas têm várias aplicações biotecnológicas como, por exemplo, hidrolisar resíduos queratinosos (penas, cabelo e chifre), em formulações de detergentes para eliminar tensão epitelial de células que aderem às fibras têxteis, limpar as obstruções no sistema de esgoto durante o tratamento de águas residuais nas indústrias, promissores biocatalisadores nos processos de depilação em indústria de couros, degradação de príons e utilizados em produtos farmacêuticos e cosméticos. Além disso, elas podem também ser usadas na conversão de penas de aves ou resíduos agroindustriais em produtos com valor agregado, incluindo aminoácidos essenciais (serina, cisteína e prolina), peptídeos, fertilizantes, colas, filmes e fonte de queratina de baixo custo para melhoria nutricional de rações e aplicações biotecnológicas (ANITHA; PALANIVELU, 2013).

De acordo com o grau de pureza de interesse, é necessário realizar, após a produção, um processo de *downstream*, que consiste em etapas envolvendo operações unitárias, como exemplo, a cromatografia de troca iônica, *salting out* com sulfato de amônio, ultrafiltração, liofilização e sistema aquoso bifásico (GUPTA et al., 2002). Neste contexto, o sistema aquoso bifásico, formado por dois polímeros ou um polímero e sal, é uma técnica de partição onde a biomolécula se concentra em uma das fases, geralmente composta pelo polímero. Essa técnica apresenta como vantagem ser econômica, fácil, permitindo ampliação de escala (WU et al., 2000). Seu uso combinado com a ultrafiltração, processo de separação por membranas, permite a concentração do bioproduto com menor número de contaminantes através de lavagens sucessivas, com água ou tampão, pela técnica de diafiltração.

No estudo de Sala et al. (2014) o sistema aquoso bifásico foi aplicado na purificação da queratinase produzida por *Bacillus* sp. P45. Compreendendo duas etapas, formada por PEG e sais, foi capaz de promover a purificação desta enzima em 5,6 vezes com 90% de recuperação enzimática. A queratinase foi particionada na fase de topo, composta por PEG. A retirada deste polímero foi através da aplicação de ultrafiltração e diafiltração, resultando em um fator de purificação de 6,1 e recuperação enzimática de 56,3%.

### 3.4 Mecanismos de estabilidade

O mecanismo de estabilidade apresenta duas distintas definições, a termodinâmica (ou conformacional) e a cinética. A estabilidade termodinâmica conceitua-se como a resistência da proteína em se dobrar de uma forma que leva a desnaturação enquanto que a cinética mede a resistência para a inativação irreversível. Ambos tipos são representados como:



$N \xrightarrow{K} U$  corresponde a estabilidade termodinâmica;

$N \xrightarrow{k} I$  corresponde a estabilidade cinética.

A molécula da enzima normalmente existe no estado ativo nativo N que está em equilíbrio com a parte desnaturada e enzimaticamente inativo (estado U). Em altas temperaturas, a enzima tende a se desdobrar em um processo cooperativo. A temperatura em que  $N = U$  é chamada temperatura de transição ou temperatura média de desnaturação ( $T_m$ ) da enzima. A  $T_m$  de enzimas varia de 30°C até próximo a 100°C (IYER; ANANTHANARAVAN, 2008; FÁGÁIN, 1995).

A estabilidade catalítica é um fator limitante na maioria dos bioprocessos, pois indica a viabilidade do processo. A atividade e estabilidade térmica das enzimas são influenciadas por diversos fatores ambientais (temperatura, pH, agitação e meio reacional), os quais dependem fortemente da estrutura tridimensional ou conformação espacial da proteína (JURADO et al., 2004). O conhecimento destes parâmetros, nas condições de funcionamento, auxiliam na otimização e rentabilidade dos processos enzimáticos.

O princípio que rege a estabilidade das enzimas é a camada de água ligada à superfície da proteína por ligações de hidrogênio, que a envolve por toda a molécula. Essa camada de hidratação ou parte dela representa a parte íntegra da proteína e, é essencial para a sua função. A inativação que ocorre por vários solventes orgânicos se deve ao deslocamento da água limite, por parte do solvente, ocasionando uma mudança drástica na estrutura da proteína (IYER; ANANTHANARAVAN, 2008).

São vários os métodos de estabilidade de enzimas do tipo proteases, dentre eles destacam-se: (i) uso de compostos como PEG, polióis, amido, solventes orgânicos, íons metálicos, detergentes e líquidos iônicos (GUPTA et al., 2002; KARBALAEI-HEIDARI; SHAHBAZI; ABSALAN, 2013; RADHA; GUNASEKARAN, 2009; GHORBEL; SELLAMI-KAMOUN; NASRI, 2003); (ii) sistemas de alta pressão (MICHELS; CLARK, 1997; EISENMENGER; REYES-DE-CORCUERA, 2009); (iii) imobilização (ABDEL-NABY et al., 1998; PRAKASH; JAYALAKSHMI; SREERAMULU, 2010); (iv) engenharia de proteínas (ILLANES, 1999). Tais abordagens têm sido bastante exploradas para impedir as alterações conformacionais da enzima em ambientes adversos, e consequente desativação.

O Quadro 1 apresenta um esquema geral dos fatores físicos, químicos e biológicos que afetam a estabilidade e o Quadro 2 apresenta os tipos de compostos preservativos que já foram utilizados para proteases alcalinas.

**Quadro 1** –Desnaturantes físicos, químicos e biológicos com seus sítios alvo e o resultado da forma desnaturada da proteína.

Tipo de desnaturante	Alvo	Forma final
Desnaturantes Físicos		
Calor	Ligações de hidrogênio	Estrutura desordenada Agregados
Frio	Ligações hidrofóbicas Grupos solvatados	Agregados Monômeros inativos
Forças mecânicas	Grupos solvatados Volume vazio	Estrutura desordenada Monômeros inativos
Radiação	Grupos funcionais como cisteína e ligações peptídicas	Estrutura desordenada Agregados
Desnaturantes Químicos		
Ácido	Grupos descarregados ocultos no interior da molécula	Totalmente desnaturado
Álcali	Grupos descarregados ocultos no interior da molécula	Totalmente desnaturado
Orgânicos formadores de ligações de hidrogênio	Ligações de hidrogênio	Totalmente desnaturado
Sais	Grupos polares e não polares	Estrutura desordenada
Solventes	Grupos não polares	Cadeias peptídicas ordenadas com regiões helicoidais
Surfactantes	Domínios hidrofóbicos e grupos carregados	Conformação desordenada Larga região helicoidal
Oxidantes	Grupos funcionais	Enzima inativada Algumas estruturas desnaturadas
Metais Pesados	Grupos funcionais	Enzima inativada
Agentes quelantes	Cátions importantes para a estrutura ou funcional	Enzima inativada
Desnaturantes biológicos		
Proteases	Ligações peptídicas	Oligopeptídeos, aminoácidos

Fonte: BAILEY; OLLIS, 1986; IYER; ANANTHANARAVAN, 2008.

**Quadro 2** – Preservativos estudados em proteases.

Fonte microbiana	Preservativos	Condições do ensaio	Considerações	Fonte
<i>Conidiobolus brefeldianus</i> MTCC 5184	CaCl <sub>2</sub> (5, 10, 20 mmol.L <sup>-1</sup> ), MgCl <sub>2</sub> (5, 10, 20 mmol.L <sup>-1</sup> ), glicina (0,5 e 1 mol.L <sup>-1</sup> ), glicerol (10 e 20%), manitol (10 e 20%), sorbitol (10 e 20%), xilitol (10 e 20%), PEG 6000 (5, 10 e 15%), NaCl (0,5 e 1M), K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (0,5 e 1M), (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (5, 10 e 15%), trealose e sorbitol (10, 20, 30, 40 e 50%)	Estudos de estabilidade a 50°C/ pH 9/ 3 h.	Trealose e sorbitol foram destaque com 80% da atividade residual depois de 4 h de incubação a 50°C.	NIRMAL; LAXMAN, 2014
<i>Bacillus cereus</i> BG1	Glicerol, manitol, sorbitol e xilitol (ambos 10%), Ca <sup>2+</sup> , Mg <sup>+2</sup> , Mn <sup>+2</sup> , Zn <sup>2+</sup> e Cu <sup>2+</sup> (5 mmol.L <sup>-1</sup> )	60°C/ pH 8/ 1-3 h.	A concentração de 5 mol.L <sup>-1</sup> de sorbitol promoveu termoestabilidade da protease quando incubada por 60 min a 60°C, na presença do íon Ca <sup>2+</sup> aumentou 350% a atividade relativa da enzima.	GHORBEL; SELLAMI-KAMOUN; NASRI, 2003
<i>Bacillus mojavenis</i>	Ca <sup>2+</sup> (1, 5, 10 mmol.L <sup>-1</sup> ), PEG 6000, glicerol, sacarose, manitol, sorbitol, amido (todos 1% m/v)	60°C e 65°C/ pH 10,5/ 6 h.	Todos os preservativos aumentaram a meia vida da protease em 2 e 4 vezes a 60 e 65°C, respectivamente.	BEG; GUPTA, 2003
<i>Bacillus clausii</i> I-52	Propilenoglicol 10% (v/v) e Ca <sup>2+</sup> 1 mmol.L <sup>-1</sup>	50°C/ pH 11/ até 24 h.	A adição de Ca <sup>2+</sup> ou álcoois polihídricos causaram aumento da estabilidade térmica.	JOO et al., 2005
<i>Bacillus</i> sp. P45	CaCl <sub>2</sub> , CoCl <sub>2</sub> , CuSO <sub>4</sub> , HgCl <sub>2</sub> , MgSO <sub>4</sub> , MnCl <sub>2</sub> , ZnSO <sub>4</sub> (todos 1 e 5 mmol.L <sup>-1</sup> )	25°C/ pH 7/ 10 min	A presença de CaCl <sub>2</sub> e MgSO <sub>4</sub> aumentaram a atividade para 121,5 e 124,2%, respectivamente.	DAROIT et al., 2010

Fágáin (1995) classifica os preservativos em osmólitos e iônicos. Osmólitos são considerados descarregados e afetam a viscosidade do solvente e tensão superficial, são incluídos polióis, polissacarídeos e aminoácidos. Preservativos iônicos atuam protegendo as cargas superficiais.

A estabilidade está relacionada com o aumento das forças hidrofóbicas no interior da molécula de proteína. Solventes com baixa constante dielétrica fortalecem as interações hidrofóbicas entre resíduos não polares. Íons estabilizantes agem ligando-se, por ligações específicas ou não específicas, ao sítio catalítico. Também, podem permitir uma ligação adicional dentro da molécula de proteína impedindo o desdobramento da mesma em altas temperaturas. Altos teores destes resíduos carregados em torno da molécula da enzima contribuem para a manutenção da estabilidade por interações eletrostáticas (BIJINA et al., 2011).

### 3.5 Líquidos iônicos

Líquidos iônicos (LI) são sais orgânicos formados de um cátion orgânico (frequentemente por um grupamento alquil ligado em um imidazólio ou piridina ou íon amônio quaternário) e um ânion inorgânico (MONIRUZZAMAN et al., 2010). Tem atraído considerável atenção e motivado novos interesses em transformações enzimáticas (DABIRMANESH et al., 2011), sendo que a sua utilização na área de biotecnologia ainda não foi totalmente determinada.

Apesar de haver muita discussão na literatura sobre a real definição dos LI, existe um conceito mais amplo que parece ser consenso entre os especialistas neste assunto: são substâncias eletrolíticas líquidas a temperaturas abaixo de 100°C, constituídos exclusivamente por íons. Apresentando como características físico-químicas (MEDEIROS et al., 2013; LOZANO, 2010):

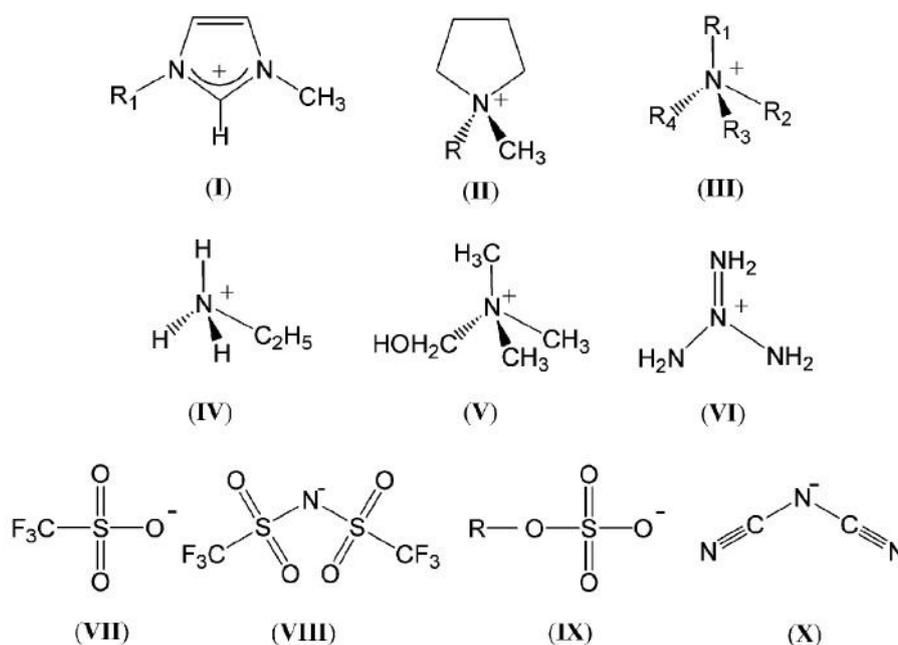
- (i) Possuir pressão de vapor desprezível, ou seja, não contribuem para a poluição atmosférica da forma como contribuem os solventes orgânicos;
- (ii) Apresentar-se como bons solventes para muitos materiais orgânicos e inorgânicos. Isso permite que sejam usados em reações com ambos os tipos de reagentes, sendo, portanto, viáveis e extremamente atrativos do ponto de vista tecnológico e industrial;
- (iii) Possuir propriedades ajustáveis com relação à polaridade, hidrofobicidade, viscosidade, densidade e miscibilidade a um solvente;
- (iv) Não são inflamáveis;

(v) Possuir a capacidade para estabilizar as enzimas, mantendo a sua conformação nativa e ativa sob condições adversas.

Dentre suas atuais aplicações destacam-se na área técnica industrial (separação de gases, extração de solutos, novos solventes), biologia aplicada (fármacos, biomassa, pesticidas), energia (baterias, células solares, propulsão iônica), física aplicada (transferência de calor, nanocompostos, lubrificantes), catalisadores homogêneos e heterogêneos, processos biocatalíticos, remoção de íons metálicos, purificação de gases, degradação fotolíticas de compostos orgânicos (ÁLVAREZ, 2010).

A Figura 1 apresenta alguns cátions e ânions que formam os LI.

**Figura 1** – Tipos de íons presentes nos líquidos iônicos. (I) 1-alkuil-3-metilimidazólio; (II) *N*-alkuil-*N*-metilpirrólico; (III) tetraalkuilamônio; (IV) etilamônio; (V) colina; (VI) guanidina; (VII) trifluorometilsulfonato; (VIII) bis(trifluorometilsulfonil)imida; (IX) alquilsulfato; (X) dicianida.



Fonte: WEINGARTNER; CABRELE; HERRMANN, 2012.

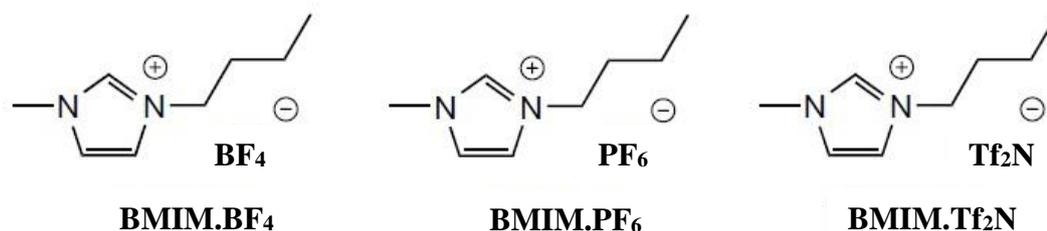
Estudos de reações enzimáticas em líquidos iônicos apresentaram que as enzimas exibiram uma excelente seletividade pelo substrato, regio- e enantioseletividade. Adicionalmente, muitas enzimas mantiveram elevada estabilidade térmica e operacional (MONIRUZZAMAN et al., 2010). A suscetibilidade à desnaturação das proteínas em líquidos iônicos é influenciada pelo tipo de íon do líquido. Cátions e ânion podem interagir com os

grupos carregados da enzima alterando a sua estrutura, os ânions predominantemente são mais relevantes neste quesito, por serem mais polarizáveis e fortemente hidratados (YANG; PAN, 2005).

O efeito de íons na atividade e estabilidade enzimática segue a série de Hofmeister, em que a solução enzimática é normalmente estabilizada por ânions cosmotrópicos e cátions caotrópicos, mas desestabilizada por ânion caotrópico e cátion cosmotrópico (ZHAO, 2005). Ânions e cátions cosmotrópicos são formadores da estrutura da água fortemente hidratados, possuem uma forte interação com as moléculas de água. Os ânions cosmotrópicos proporcionam uma camada de hidratação muito bem estruturada e levam ao efeito “*salting-out*”, dos grupos não polares da superfície da proteína. Por outro lado, os ânions caotrópicos e cátions cosmotrópicos solubilizam, termo do inglês “*salting-in*”, a porção peptídica e consequentemente interagem mais fortemente com a forma desdobrada da proteína do que a forma nativa. Essa definição não se aplica para LIs hidrofóbicos e hidrofílicos anidro (RANTWIJK; SHELDON, 2007; PATEL; KUMARI; KHAN, 2014).

As enzimas são usualmente ativas em LI contendo ânions  $\text{BF}_4$ ,  $\text{PF}_6$  e  $\text{NTf}_2$  (Figura 2), mas não em LI contendo ânions  $\text{Cl}$ ,  $\text{NO}_3$ ,  $\text{CF}_3\text{SO}_3$ , trifluoroacetato ou acetato. Uma possível razão para essa diferença é a menor interação por ligações de hidrogênio entre a enzima e o ânion. O ânion  $\text{BF}_4$  distribui a carga negativa através dos quatro átomos de flúor, o ânion  $\text{PF}_6$  sobre os seis átomos de flúor e o ânion  $\text{NTf}_2$  sobre cinco átomos. A baixa interação diminui a interferência destas pontes com as ligações de hidrogênio internas da enzima, afetando positivamente a atividade (PARK; KAZLAUSKAS, 2003).

**Figura 2** – Líquidos iônicos mais utilizados.



Fonte: PARK; KAZLAUSKAS, 2003.

Estudos mostram a utilização de LIs em sistemas de biocatálise, Dang et al. (2007) verificaram que a atividade da enzima lipase pré-tratada com LIs hidrofóbicos ( $[\text{Bmim}][\text{PF}_6]$  e  $[\text{Emim}][\text{Tf}_2\text{N}]$ ) mostrou-se levemente mais alta do que a atividade quando utilizando os LIs do

tipo hidrofílicos ([Bmim][BF<sub>4</sub>] e [Emim][BF<sub>4</sub>]), com valores de atividade 1,81, 1,66, 1,56, 1,60 vezes maior que a enzima sem tratamento, respectivamente. Também, o uso de LIs aumentou a estabilidade térmica da enzima, mantendo sua atividade em altas temperaturas (60°C) por durante 7 dias, ao invés de 12 h sem o tratamento. Essa melhoria deve-se provavelmente a presença dos íons que compactam a estrutura da enzima protegendo-a da desnaturação. Karbalaei-Heidari, Shahbazi e Absalan (2013) estabilizaram uma protease extracelular purificada em pelo menos uma das concentrações testadas dos líquidos durante o tempo de 30 min A 37°C, com melhor comportamento para o [C<sub>6</sub>mim][PF<sub>6</sub>], obtendo ainda, o aumento de 90% na atividade enzimática na concentração de 50%. Por outro lado, Dabirmanesh et al. (2011) avaliaram a influência do tampão aquoso adicionado de LIs ([Bmim][Cl] e [C<sub>6</sub>mim][Cl]) frente a atividade e estabilidade das enzimas  $\alpha$ -amilase mesófila e termófila, observaram acentuado decréscimo da atividade enzimática, de 80% na enzima termófila e de 30% da enzima mesófila, se comparados com a atividade inicial (sem adição de LIs).

Em comparação com outros aditivos, o número de cátions e ânions que formam os líquidos iônicos permite o ajuste nas propriedades destes solventes de acordo com o interesse de aplicação, oferecendo estratégias eficientes para a finalidade do processo.

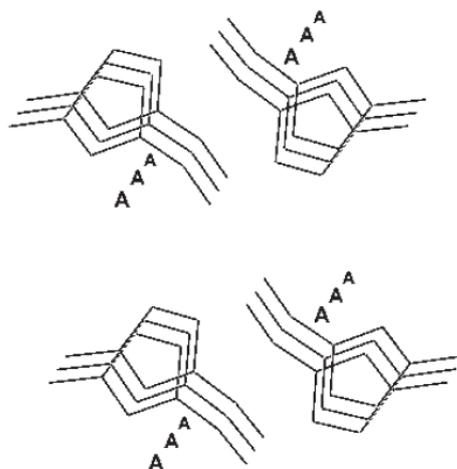
### 3.5.1 Propriedades dos líquidos iônicos

As propriedades físicas, químicas e biológicas geralmente dependem da estrutura do cátion (da simetria, do tamanho da cadeia alquil, grupos hidrofóbicos) bem como do grau de deslocamento da carga aniônica. Uma das mais notáveis propriedades dos líquidos iônicos é que são capazes de formar interações intermoleculares, como dipolo, ligações de hidrogênio, dispersiva e iônica (MONIRUZZAMAN et al., 2010).

O arranjo tridimensional dos líquidos iônicos a base de imidazólio são geralmente formados através de cadeias de ligações imidazólio (Figura 3). Em alguns casos, são típicas as interações  $\pi$ - $\pi$  entre as ligações imidazólio e, em sais 1-alkil-3-metilimidazólio também podem ocorrer interações fracas do tipo C-H $\cdots$  $\pi$  entre grupos metil e ligações imidazólio (DUPONT, 2004).

Os LIs são caracterizados por diversas propriedades, consideradas impactantes na atividade e estabilidade de enzimas, como sua polaridade, ligações de hidrogênio, nucleofilicidade do ânion, viscosidade, pH e impurezas (ZHAO, 2005).

**Figura 3** – Esquema do arranjo de cátions imidazólio apresentando os canais onde os ânions esféricos A são acomodados.



FONTE: DUPONT, 2004.

#### 3.5.1.1 Polaridade

Os líquidos iônicos formados por 1-alkil-3-metilimidazólio são solventes polares, miscíveis em solventes como clorometileno e imiscível em hexano e água (com exceções, como o [Bmim][BF<sub>4</sub>]), um indicativo que mede a polaridade é através da escala de Reichardt's (PARK; KAZLAUSKAS, 2003). Em vários LIs a polaridade medida por esta escala é cerca de 0,6 (tendo como valor 0, o tetrametilsilano (não-polar) e 1 para a água (polar)) (ZHAO, 2005).

Há um decréscimo na polaridade em líquidos iônicos a base de 1-alkil-3-metilimidazólio com o aumento do tamanho da cadeia alquílica, consequentemente resultando na perda da atividade enzimática, verificado através do estudo de Machado et al. (2014), para uma peroxidase obtida de uma raiz.

Lozano et al. (2001) observaram que em baixa polaridade dos LIs, a atividade da  $\alpha$ -quimiotripsina é reduzida. O mesmo comportamento foi observado para lipase, a atividade da enzima aumenta com o aumento da polaridade do LI durante a reação de acetilação do 1-feniletanol com vinil acetato (PARK; KAZLAUSKAS, 2001).

#### 3.5.1.2 Ligações de hidrogênio

Segundo Lau et al. (2004) as ligações de hidrogênio podem ser responsáveis pela compreensão das interações de proteínas e líquidos iônicos. A água é um meio composto por ligações de hidrogênio e um líquido iônico deve seguir com a mesma finalidade da água para dissolver as proteínas em particular no que diz respeito as propriedades do ânion. A interação

por ligações de hidrogênio acceptoras não pode ser muito forte, do contrário, a dissociação das ligações de hidrogênio que mantém a integridade estrutural por  $\alpha$ -hélices e  $\beta$ -folhas irá causar o desdobramento da proteína. Assim, para manter a atividade de enzimas dissolvidas em LI, deve haver um equilíbrio das ligações de hidrogênio entre moderados aceptores e doadores.

Adicionalmente, estas ligações podem ser um fator para verificar a compatibilidade das enzimas com um determinado líquido iônico. Ânions que formam fortes ligações de hidrogênio podem dissociar estas ligações que mantém a integridade das  $\alpha$ -hélices e  $\beta$ -folha, causando desdobramento parcial ou total da proteína (RANTWIJK; SHELDON, 2007).

#### 3.5.1.3 Nucleofilicidade do ânion

Através do estudo de Kaar et al. 2003 foi sugerido que a forte nucleofilicidade (carregado negativamente) do ânion afetam a atividade da enzima, ânions como  $[\text{NO}_3]$ ,  $[\text{CH}_3\text{CO}_2]$  e  $[\text{CF}_3\text{CO}_2]$  são mais nucleofílicos que  $[\text{PF}_6]$  podendo mais fortemente ser coordenado para locais carregados positivamente na estrutura da lipase, causando mudanças na estrutura desta enzima. Outros efeitos dos ânions são mostrados por Zhao et al. (2006) que os classifica como cosmotrópicos e caotrópicos de acordo com a série de Hofmeister e os valores do B-coeficientes.

#### 3.5.1.4 Viscosidade

A viscosidade dos LI é elevada se comparado com a dos solventes orgânicos. Assim como nos solventes orgânicos, a viscosidade é dependente das interações íon-íon, como van der Waals e ligações de hidrogênio (MONIRUZZAMAN et al., 2010).

A viscosidade trata-se de uma grandeza correlacionada com a polaridade, por exemplo, um LI com cadeias alquil mais curtas no cátion tem uma viscosidade inferior, porém uma polaridade mais elevada. O aumento do comprimento da cadeia alquil produz uma ligeira redução na polaridade do LI, mas um aumento na viscosidade. A viscosidade é mais afetada pelas cargas do ânion do que do cátion. A viscosidade diminui na presença de pequenas quantias de água ou solventes orgânicos ou pelo aumento de temperatura (MONIRUZZAMAN et al., 2010).

### 3.6 Caracterização enzimática

Com o emprego de novas tecnologias, visando maior estabilidade e aplicabilidade, faz-se necessário avaliar e conhecer as mudanças ocorridas na enzima, assim como cada parâmetro que influencia na sua desnaturação. Biocatalisadores com estabilidade operacional determinam uma grande parcela da viabilidade do processo biotecnológico (ILLANES, 1999).

Frente a isso, as propriedades físicas e químicas das queratinases vêm sendo estudadas como forma de monitorar as alterações ocorridas durante o processo.

Além dos parâmetros temperatura e pH ótimos, é necessário determinar a cinética enzimática e estabilidade térmica, através da determinação da meia vida e constante de desnaturação térmica ( $k_d$ ), constante de Michaelis-Menten ( $K_M$ ) e velocidade máxima de reação ( $V_{m\acute{a}x}$ ) da queratinase, nas condições do estudo.

A inativação térmica pode ser causada por diversos fatores tais como desnaturação, agregação ou dissociação de subunidades (SANT'ANNA et al., 2013). A energia de desnaturação é conhecida por ser um processo em que a estrutura secundária, terciária e quaternária de uma proteína se altera sem quebrar nenhuma ligação covalente. O  $k_d$  é inversamente proporcional à estabilidade da enzima, como é função da temperatura segundo a equação de Arrhenius, pode ser usado para determinar a energia de ativação para reação de desativação  $E_d$ .

### **3.6.1 Temperatura e pH ótimos**

A influência do pH na atividade enzimática é geralmente analisada apenas para determinar a faixa ideal de pH, sem propor modelos cinéticos que possam explicar essa dependência, porém modelos cinéticos podem ser realizados, através da desprotonação da enzima (JURADO et al., 2004). Todas as enzimas são sensíveis à concentração de  $H^+$  do meio, existindo uma zona de pH em que a atividade enzimática é máxima. Isso ocorre porque as enzimas possuem grupos ionizáveis, pertencentes aos resíduos de aminoácidos da molécula, de forma que as alternâncias de pH podem mudar sua conformação, sua capacidade de união com o substrato e a atividade catalítica dos grupos que formam o sítio ativo. Em consequência pode haver uma troca na velocidade máxima de reação, na afinidade da enzima pelo substrato ou na própria estabilidade (WISEMAN, 1991).

As enzimas são moléculas proteicas complexas, sua atividade catalítica está relacionada a preservação da sua estrutura terciária. Se uma enzima absorve excesso de energia, a estrutura terciária pode ser rompida e a enzima muda para o estado desnaturado, acarretado pela perda de atividade catalítica. A temperatura é uma variável crítica de alguns processos enzimáticos que podem levar a inativação. Ao se aumentar a temperatura, espera-se um aumento de atividade da enzima resultante de colisões entre enzima/substrato, até um limite dito ótimo, temperaturas altas fora deste limite as colisões tornam-se desfavoráveis a enzima e o aumento de atividade cessa (RODRIGUEZ-NOGALES; DELGADILLO, 2005).

A temperatura e pH são fatores fundamentais, pois influenciam na velocidade de reação de catálise enzimática. Todos os grupos ionizáveis da enzima devem estar numa forma iônica favorável para manter a conformação do sítio ativo, evitando que seja desnaturada (RODRIGUEZ-NOGALES; DELGADILLO, 2005).

As propriedades da queratinase microbiana tem forte dependência pelo micro-organismo produtor. A temperatura ótima de queratinases é bastante variável, frequentemente na faixa de 30 a 80°C. Gradisar et al. (2005) caracterizaram duas queratinases obtidas de diferentes fungos, obtendo como temperatura ótimas a região de 60-65°C e pH ótimo de 8. Também avaliaram a  $V_{\text{máx}}$  e  $K_M$  no substrato formado por peptídeos aromáticos com valores de  $V_{\text{máx}}$  de  $7,3 \cdot 10^7$  mmol.s<sup>-1</sup> e  $11,7 \cdot 10^7$  mmol.s<sup>-1</sup> e  $K_M$  de  $0,17$  mmol.L<sup>-1</sup> e  $1,03$  mmol.L<sup>-1</sup> em cada uma das queratinases. A temperatura ótima da queratinase obtida por *Bacillus* varia de 50-65°C, sendo que a queratinase por *Bacillus* sp. P45 apresentou atividade ótima na temperatura de 55°C (DAROIT et al., 2010). Muitas são proteases alcalinas ou neutras apresentando pH ótimo na faixa de 7,5-9,0. No entanto, algumas enzimas queratinolíticas são otimamente ativas fora desta faixa, mesmo em valores extremos de pH alcalino ou pH ligeiramente ácido (BRANDELLI, DAROIT; RIFFEL, 2010). O valor de pH ótimo da queratinase obtida de *Bacillus* sp. P45 foi igual a 8, com alta atividade enzimática em peptídeos sintéticos, com  $V_{\text{máx}}$  de  $54,34$  mmol min<sup>-1</sup>mg-proteína<sup>-1</sup> e  $K_M=1,69$  mmol.L<sup>-1</sup> (DAROIT et al., 2010).

Chaudhari, Chaudhari e Chincholkar (2013) caracterizaram uma metalo protease queratinolítica de *Chryseobacterium gleum*, com valores de temperatura e pH ótimos de 30°C e 8, respectivamente. Utilizaram o substrato azoqueratina para obter a velocidade máxima igual a  $1,56$  U.min<sup>-1</sup> e  $K_M$  de  $1,7$  mg.mL<sup>-1</sup>. Na literatura consultada não foi encontrado a caracterização de proteases na presença de líquidos iônicos.

### 3.6.2 Termoestabilidade

Estudos como o de Corrêa, Daroit e Brandelli (2010) avaliaram a termoestabilidade da queratinase de *Bacillus* sp. P7 nas temperaturas entre 45-70°C por 90 min. Menos que 25% da atividade inicial foi mantida depois de incubada nas temperaturas de 55, 60 e 65°C por 10 min, no entanto foi completamente inativada a 70°C neste tempo. A incubação em 45°C por 10 e 90 min resultou em atividade residual de 85% e 65%, respectivamente, e a 50°C, 78% e 25% da atividade inicial foi mantida depois de 10 e 90 min, respectivamente. A meia vida foi calculada como 173 min a 45°C e 53 min a 50°C. A queratinase obtida de *Kocuria rósea* manteve totalmente ativa depois de 1 h incubada nas temperaturas de 10-60°C, apresentando

40% da sua atividade inicial depois de 1 h incubada a 90°C (BERNAL; CAIRÓ; COELLO, 2006).

A meia vida determinada para a queratinase de *Bacillus* sp. P45 sem a presença do íon  $\text{Ca}^{2+}$  a 50°C foi de 1,06 min, no entanto a 55°C com a presença de cálcio foi de 14 min (DAROIT; SANT' ANNA; BRANDELLI, 2011). Para a queratinase obtida a partir da *Chryseobacterium* sp. kr6, a meia vida a 55°C com e sem a adição do íon  $\text{Ca}^{2+}$  foi de 81,8 e 4 min, respectivamente (SILVEIRA et., 2010).

### **3.7 Efeito de solventes orgânicos na atividade enzimática**

As enzimas exibem uma capacidade catalítica desejável quando se encontram na configuração nativa. A conformação nativa de moléculas em solução é determinada pela presença de uma rede composta de ligações de hidrogênio e interações eletrostática e hidrofóbicas, que combinadas garantem a camada de hidratação ao redor da proteína. O rompimento dessa camada ou uma forte distorção ocasiona a entrada do solvente orgânico no interior da molécula modificando as interações que mantêm a forma nativa, o que implica na perda de propriedades catalíticas (KHMELNITSKY et al., 1988).

Quando a camada de hidratação é preservada, as enzimas suspensas em solventes orgânicos mantêm sua atividade por muito mais tempo do que quando dissolvidas em tampão aquoso. Uma maneira na qual os solventes afetam a atividade é por interação direta com a água essencial em torno da molécula enzimática, a capacidade de solventes hidrofóbicos alterarem a camada de hidratação da enzima é menor, assim, esse tipo de solvente afeta parcialmente a atividade enzimática. A atividade enzimática está relacionada com a quantidade de água ligada a proteína e não a concentração de água nos solventes orgânicos. Outra propriedade do solvente que está relacionado com a atividade catalítica, é a constante dielétrica. A baixa constante dielétrica das ligações de hidrogênio intramoleculares favorecem o aumento das interações eletrostáticas (LIMA; ANGNES, 1999).

### **3.8 Calorimetria Diferencial de Varredura**

Uma análise térmica é um termo que abrange um grupo de técnicas nas quais a propriedade física ou química de uma substância, ou de seus produtos de reação, é monitorada em função do tempo ou temperatura, enquanto a temperatura da amostra, sob uma atmosfera específica, é submetida a uma programação controlada (Comitê de Nomenclatura da Confederação Internacional de Análises Térmicas – ICTA).

O entendimento da relação entre a estrutura da proteína, as energias de sua estabilidade e ligações com outras biomoléculas é um ponto interessante na bioquímica e biotecnologia. Os parâmetros geralmente usados para caracterizar a estabilidade do sistema (por exemplo: o estado de dobramento e desdobramento da proteína) é a constante de equilíbrio ( $K$ ) ou a energia livre ( $\Delta G_0$ ), que é a soma da entalpia ( $\Delta H$ ) e entropia ( $\Delta S$ ), estes parâmetros são dependentes da temperatura, através da alteração da capacidade de calor ( $\Delta C_p$ ) (BRUYLANTS; WOUTERS; MICHAUX, 2005).

São várias técnicas aplicadas para monitorar a desnaturação proteica *in vitro*, dentre elas as técnicas espectrofotométricas como UV/Vis, fluorescência intrínseca ou extrínseca, absorvância RI, dicroísmo circular (próximo e longe do UV) e espectroscopia de Raman. As técnicas citadas são utilizadas para isolar proteínas e membranas, mas não são apropriadas para estudar a desnaturação da proteína intacta em células, devido a dispersão de luz e a complexidade dos sistemas celulares, assim outras duas técnicas tem sido aplicadas como calorimetria diferencial de varredura, do termo em inglês *differential scanning calorimetry* (DSC), e insolubilização de proteínas (LEPOCK, 2005).

A formação de estruturas únicas de macromoléculas biológicas, como proteínas e seus complexos específicos, ocorrem através de reações termodinâmicas. Nestas reações, as medidas diretas do efeito do calor associado aos processos intramoleculares e intermoleculares são requeridos, através da utilização de técnicas calorimétricas, como o DSC, o qual é considerado uma das principais técnicas para determinar a estabilidade térmica de proteínas e a medida de parâmetros termodinâmicos da proteína desdobrada termicamente (GILL; MOGHADAM; RANJBAR, 2010).

Essa técnica pode ser usada para estudar as mudanças na proteína em função da temperatura. A desnaturação térmica induzida pode ser causada pela ruptura de várias forças químicas. As modificações endotérmicas estão associadas com a ruptura de ligações de hidrogênio, enquanto que as mudanças exotérmicas são resultantes do enfraquecimento das interações hidrofóbicas e de agregações da proteína. Sob condições controladas de taxa de aquecimento e concentração de proteína, a estabilidade térmica pode ser monitorada pela temperatura de transição. A variação de entalpia determina a quantidade de calor necessário para que ocorra desdobramento da molécula como resultado de desnaturação (LI-CHAN; MA, 2002; GILL; MOGHADAM; RANJBAR, 2010).

As forças termodinâmicas fundamentais são a base da estrutura e função das moléculas sendo a essência da tecnologia química. A  $\Delta G$  é útil para descrever quantitativamente o dobramento da proteína, enquanto que a variação da entalpia calorimétrica e  $T_m$  são usadas

para delinearizar as forças estabilizantes não-covalentes nos diferentes estados estruturais (ATTRI; VENKATESU; KUMAR, 2011).

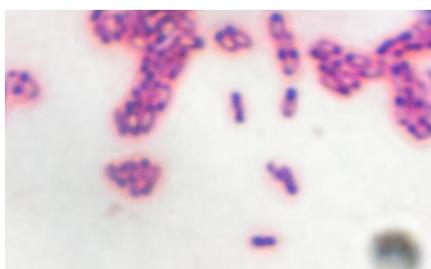
Quando uma macromolécula muda seu estado termodinâmico (por exemplo: desdobrada), a mudança calorífica é observada. Esta mudança é devido ao fato que o calor necessário para aumentar a temperatura de uma solução de proteína desdobrada é maior que a necessária para uma solução de proteína dobrada. A variação da capacidade calorífica no estado desdobrado, é devido as mudanças na hidratação das cadeias laterais que são ocultadas na conformação nativa, mas que ficam expostas ao solvente no estado desnaturado (BRUYLANTS; WOUTERS; MICHAUX, 2005), sendo originadas da ruptura de forças estabilizantes da estrutura da proteína nativa.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Micro-organismo

A bactéria com comprovada ação queratinolítica, *Bacillus* sp. P45 (Figura 4), foi utilizada neste estudo. A cepa foi gentilmente cedida pelo Laboratório de Bioquímica e Microbiologia Aplicada da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS, Porto Alegre). As culturas foram mantidas a 4°C em placas com ágar infusão de cérebro e coração (BHI), sendo renovadas periodicamente (DAROIT; CORREA; BRANDELLI, 2011).

**Figura 4** – Micro-organismo *Bacillus* sp. P45, aumento de 1000x.



### 4.2 Obtenção do inóculo

Para o preparo do inóculo, foi raspado suavemente a cultura em ágar BHI, e adicionada em solução estéril de NaCl (8,5 g.L<sup>-1</sup>) até obter uma suspensão homogênea com densidade óptica ( $\lambda=600$  nm) de 0,5 (DAROIT; CORREA; BRANDELLI, 2011).

### 4.3 Produção da enzima queratinase

O cultivo submerso foi realizado conforme Daroit, Corrêa e Brandelli (2011), utilizando farinha de penas como substrato. O meio de cultura contendo 50 mL foi composto por (g.L<sup>-1</sup>): farinha de penas (43) e NH<sub>4</sub>Cl (1,9) preparado em meio mineral (NaCl (0,5), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0,4), K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (0,3)), pH fixado em 7. O cultivo foi iniciado com a adição de 1% de inóculo (v/v) e após conduzidos para uma incubadora rotatória a 30°C, 125 rpm, durante 48 h. Ao término, o extrato enzimático foi clarificado através de centrifugação (5000 x g por 20 min), o sobrenadante foi utilizado na etapa de purificação.

A farinha de penas utilizada no cultivo foi preparada no laboratório de Microbiologia e Biosseparações - Furg. As penas foram cedidas pela Danby Cosulati, de Morro Redondo. Para obtenção da farinha, procedeu-se a lavagem das penas e tratamento térmico de

121°C com pressão de 1,1 atm por 30 min e secagem em estufa de circulação de ar na temperatura de 50°C. Após foram moídas com granulometria inferior a 1 mm (adaptado de BERTSCH; COELLO, 2005).

#### 4.4 Purificação do extrato enzimático

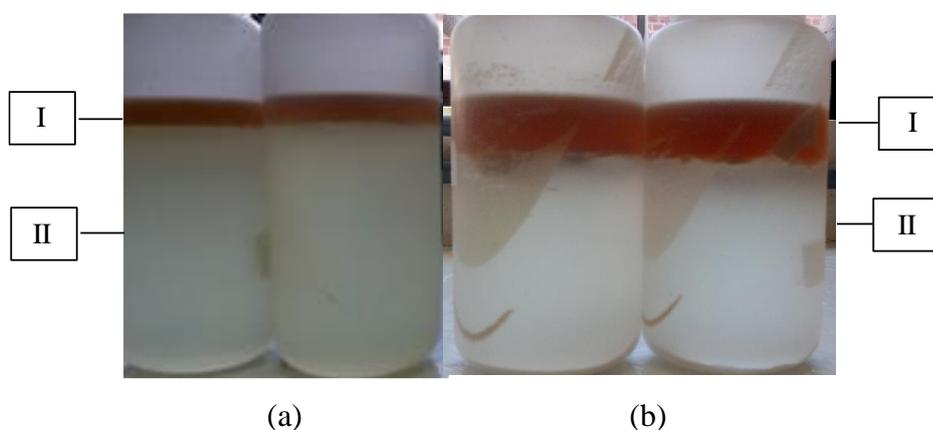
A purificação do extrato enzimático foi realizado segundo Sala et al. (2014) compreendendo duas etapas de sistema aquoso bifásico seguido de ultrafiltração/diafiltração.

##### 4.4.1 Sistema aquoso bifásico

O sistema aquoso bifásico foi preparado em tubos de centrífuga de 500 mL. A primeira etapa (Figura 5a) é composta de (m/m): 3% de PEG 1500 Da, 23% de tampão fosfato de potássio pH 7, 8% de NaCl e 46% de água deionizada. Os tubos foram homogeneizados e deixados por 24 h a 37°C até total dissolução do PEG. Após, os tubos foram resfriados a 10°C para adição de 20% do extrato enzimático (pH fixado em 7). O sistema foi centrifugado (5000 x g por 30 min) e deixado em repouso até atingir o equilíbrio entre as fases. A fase de topo foi separada para compor a segunda etapa do sistema.

O segundo sistema (Figura 5b) foi composto de 36% da fase de topo da etapa anterior, 36% de tampão tris-HCl 100 mmol.L<sup>-1</sup> pH 7 e 28% de sulfato de amônio. Os tubos foram homogeneizados, centrifugados (5000 x g por 30 min) e deixados em repouso até atingir o equilíbrio das fases. A enzima é particionada para a fase de topo nos dois sistemas.

**Figura 5** – Etapas do sistema aquoso bifásico. (a) 1° SAB (b) 2° SAB (I) Fase de topo (II) Fase de fundo.



#### 4.4.2 Ultrafiltração/Diafiltração

O processo de ultrafiltração foi operado no modo descontínuo de diafiltração utilizando uma membrana com massa molar de corte de 10 kDa. Ao módulo da membrana foi adicionado o volume de 40 mL de fase de topo e 80 mL de tampão tris-HCl pH 7 (capacidade máxima do sistema). A cada ciclo foi permeado 80 mL, o processo foi interrompido após a alimentação com tampão por 5 ciclos. O sistema foi operado na pressão de 1,5 kgf.cm<sup>-2</sup> e 15°C.

No final do processo, o extrato enzimático foi congelado em ultrafreezer à -80°C por 48 h para posterior liofilização à -55°C por 48 h.

#### 4.5 Estabilidade térmica da queratinase em líquidos iônicos

##### 4.5.1 Termoestabilidade em diferentes líquidos iônicos

Foram testados quatro líquidos iônicos: [Mmim][CH<sub>3</sub>SO<sub>4</sub>], TEAA, [Bmim][PF<sub>6</sub>] e [Emim][Tf<sub>2</sub>N], os dois primeiros com caráter hidrofílico e os outros dois com caráter hidrofóbico. Para a realização dos ensaios, a enzima liofilizada foi tratada em cada LI no tempo de 30 min sob agitação magnética à 4°C.

As suspensões de enzima tratada em LIs foram incubadas na temperatura de 55°C (RIFFEL et al., 2003). Em intervalos de 24 h durante 144 h (Dang et al., 2007), alíquotas foram retiradas e resfriadas. Nos LI hidrofílicos, a termoestabilidade foi avaliada na enzima tratada no LI puro (100%) e 50% (v/v) em tampão tris-HCl 100 mmol.L<sup>-1</sup> pH 7,5. Nos hidrofóbicos a enzima foi tratada somente na forma pura dos LI.

Os resultados foram apresentados em duas formas, a primeira corresponde a atividade residual (%), a qual é expressa em relação à atividade do ensaio controle (enzima sem tratamento, suspensa em tampão tris-HCl pH 7,5) no tempo de 0 min. A segunda forma, expressa como A/A<sub>0</sub> (%), refere-se a atividade do ensaio em relação a sua atividade inicial.

##### 4.5.2 Efeito de preservativos e de líquido iônico hidrofóbico na estabilidade

O efeito dos preservativos CaCl<sub>2</sub> 5 mmol.L<sup>-1</sup> (DAROIT et al., 2010), propilenoglicol 10% (v/v) (JOO et al., 2005), glicerol 10% (v/v) e manitol 10% (m/v) (GHORBEL; SELAMI-KAMOUN; NASRI, 2003), sorbitol 50% (m/v) e PEG 6000 15% (m/v) (NIRMAL; LAXMAN, 2014), PEG 1500 15% e 54% (m/v) e uso conjunto dos preservativos sorbitol 50% (m/v) e CaCl<sub>2</sub> (5 mmol.L<sup>-1</sup>) na atividade da queratinase foram avaliados a partir de incubação da enzima com o respectivo preservativo a 55°C durante 15 e 60 min e a 70°C por 15 min, antes de efetuar

os ensaios de atividade enzimática (DAROIT et al., 2010). Nas mesmas condições, foi verificado o efeito na atividade enzimática da enzima tratada no líquido iônico [Emim][Tf<sub>2</sub>N].

O tratamento consistiu no contato entre a enzima liofilizada (solubilizada em tampão tris-HCl 100 mmol.L<sup>-1</sup> pH 7,5) e o preservativo, ou a enzima liofilizada suspensa no LI, durante 30 min sob agitação magnética a 4°C.

A atividade foi expressa em percentual em relação a atividade do ensaio no tempo de 0 min.

#### 4.5.3 Parâmetros cinéticos de desnaturação térmica

A estabilidade térmica foi estudada em termos da meia vida ( $t_{1/2}$ ). A enzima em preservativo ou LI foi incubada na temperatura de 55°C e 70°C. Alíquotas foram coletadas em tempos pré-determinados até a atividade perder 50% ou mais da atividade inicial. A constante de desnaturação ( $k_d$ ) foi determinada através do coeficiente angular da regressão linear obtida do gráfico logaritmo neperiano de acordo com a Equação 1, para o cálculo somente regressões com valores de R<sup>2</sup> acima de 0,93 foram aceitos.

$$\ln\left(\frac{A_t}{A_0}\right) = k_d t \quad (1)$$

Onde  $A_t$  é a atividade enzimática no tempo  $t$ ,  $A_0$  a atividade inicial da enzima,  $k_d$  é a constante de primeira ordem para a desnaturação e  $t$  é o tempo.

A meia vida ( $t_{1/2}$ ) da enzima foi obtida através da Equação 2.

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

#### 4.5.4 Determinação das propriedades térmicas

A análise foi realizada em um calorímetro Shimadzu modelo DSC 60, Japão. As amostras analisadas foram: queratinase na forma liofilizada, queratinase em [Emim][Tf<sub>2</sub>N] e [Emim][Tf<sub>2</sub>N]. Alíquotas de até 3 mg foram transferidas para os cadinhos do DSC, em seguida foram tapados e selados usando uma prensa. A transição térmica ocorreu com um fluxo de calor de 10°C.min<sup>-1</sup> e 30 psi de fluxo de nitrogênio. Cada amostra foi aquecida de 20 até 250°C. Os experimentos foram conduzidos com a concentração de 500 mg.mL<sup>-1</sup> de queratinase. As propriedades térmicas obtidas foram entalpia e a temperatura de transição térmica.

## **4.6 Efeito do líquido iônico na atividade enzimática da queratinase**

### **4.6.1 Efeito da concentração do LI na atividade enzimática**

A concentração da suspensão de enzima tratada no LI [Emim][Tf<sub>2</sub>N] adicionada na reação da atividade enzimática foi avaliada. As concentrações testadas foram 1,8%, 2,7%, 4,5% e 9,1% (v/v) em relação ao volume total dos reagentes utilizados na determinação da atividade enzimática (DANG et al., 2007).

### **4.6.2 Determinação da temperatura e pH ótimos da queratinase na presença de LI**

A temperatura e pH ótimos foram determinados para a enzima submetida a dois tratamentos: [Emim][Tf<sub>2</sub>N] e ao uso conjunto dos preservativos sorbitol 50% e CaCl<sub>2</sub> 5 mmol.L<sup>-1</sup>. A concentração de LI utilizada foi de 4,5%, conforme resultados do item 4.6.1. A temperatura ótima foi determinada na reação enzimática através da atividade da queratinase nas temperaturas de 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65 e 70°C, fixado o valor de pH de análise (tampão tris-HCl 100 mmol.L<sup>-1</sup> pH 7,5).

Para o estudo da influência do valor do pH na atividade enzimática a 40°C, foram utilizados 2 tampões na faixa de 6,0-9,0, com incremento de 0,5 unidade: tampão fosfato de sódio 100 mmol.L<sup>-1</sup> (pH 6,0-6,5) e tampão tris-HCl 100 mmol.L<sup>-1</sup> (pH 7,0-9,0).

Na temperatura e pH em que a atividade enzimática foi máxima, foi fixado como 100% na atividade relativa (BACH et al., 2012).

### **4.6.3 Efeito de solventes orgânicos e líquido iônico hidrofóbico na atividade da queratinase**

O efeito dos solventes foi verificado na atividade da enzima com o LI [Emim][Tf<sub>2</sub>N]. Os solventes analisados foram acetona, etanol e isopropanol. As concentrações de 25 e 50% (v/v) corresponderam ao volume de solvente orgânico adicionado com relação ao volume total da mistura contendo a enzima e LI. O tempo de contato da mistura foi de 2 min (DE DIEGO et al., 2005) a 25°C. A atividade relativa (%) foi determinada em relação a amostra controle, que corresponde a enzima tratada no LI [Emim][Tf<sub>2</sub>N] (sem adição de solvente orgânico).

### **4.6.4 Efeito da concentração do LI em meio contendo acetona na reação enzimática**

A concentração do LI [Emim][Tf<sub>2</sub>N] presente na mistura selecionada no item 4.6.3, contendo a enzima e 50% (v/v) de acetona/LI [Emim][Tf<sub>2</sub>N], foi avaliada quando adicionada na reação da atividade enzimática. As concentrações testadas foram de 2,3%, 4,5%, 6,8% e

9,1% (v/v), em relação ao volume total dos reagentes utilizados na determinação atividade enzimática.

#### 4.6.4.1 Determinação do valor de $K_M$ e $V_{m\acute{a}x}$

A cinética de muitas reações catalisadas por enzimas seguem a equação de Michaelis-Mentem (Equação 3):

$$V = \frac{V_{m\acute{a}x}[S]}{K_M + [S]} \quad (3)$$

Onde V é a velocidade da reação e S é a concentração de substrato.

A taxa máxima ( $V_{m\acute{a}x}$ ) e a constante de Michaelis Mentem ( $K_M$ ) da enzima foram determinados por Lineweaver Burk (Equação 4). O gráfico  $1/V$  versus  $1/S$  foi plotado utilizando a faixa de concentração do substrato azocaseína de 1 a 8 mg.mL<sup>-1</sup>.

$$\frac{1}{V} = \left(\frac{K_M}{V_{m\acute{a}x}}\right) \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{m\acute{a}x}} \quad (4)$$

## 4.7 Determinações Analíticas

### 4.7.1 Atividade Proteolítica

A atividade proteolítica foi determinada conforme Daroit, Corrêa e Brandelli (2009) com modificação no valor do pH, utilizando a azocaseína como substrato. A mistura reacional contendo 100 µL de tampão Tris-HCl (100 mmol.L<sup>-1</sup>, pH 7,5), 300 µL de azocaseína 1% (m/v) (em tampão Tris-HCl) e 100 µL do extrato enzimático foi mantida em banho termostático com agitação a 40°C por 30 min, a reação foi finalizada com a adição de 600 µL de ácido tricloroacético 10% (m/v). Posteriormente a mistura foi centrifugada (5000 x g por 20 min) e 800 µL do sobrenadante foi misturado com 200 µL de hidróxido de sódio 1,8 mol.L<sup>-1</sup>. A leitura espectrofotométrica foi realizada a 420 nm. Uma unidade de atividade proteolítica (U) é definida como a quantidade de enzima necessária para provocar o aumento de 0,1 unidade de absorvância sob as condições do ensaio.

Ensaio de branco foram conduzidos para cada condição, onde o ácido tricloroacético foi adicionado antes do extrato enzimático, para que não ocorresse a reação.

### 4.7.2 Determinação da viscosidade

A viscosidade dinâmica ( $\eta$ ) das soluções de sorbitol 50% (m/v) e CaCl<sub>2</sub> 5 mmol.L<sup>-1</sup>, PEG 1500 54% (m/v) e do LI [Emim][Tf<sub>2</sub>N] foi medida em um Reômetro

Brookfield RV/DV – III Ultra, nas condições de taxa de cisalhamento 200 a 700 s<sup>-1</sup> e temperatura de 25°C.

#### **4.7.3 Tratamento dos dados**

Os ensaios foram realizadas em triplicata, exceto nas determinações de termoestabilidade da queratinase em líquidos iônicos e preservativos químicos. Paralelamente aos ensaios, foram conduzidos ensaios controle, referente a enzima sem tratamento. Aos ensaios realizados em triplicata, os resultados foram analisados a partir de ANOVA e Teste de Tukey, com 95% de confiança. Nas demais determinações os resultados foram expressos como a média da triplicata da amostra.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

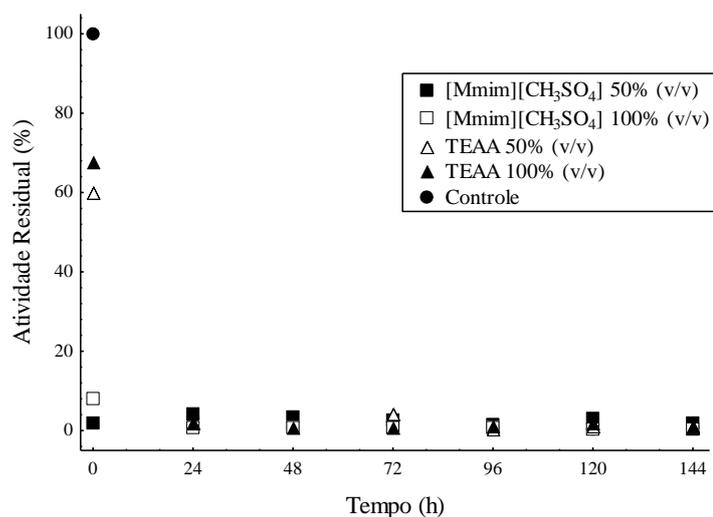
Após as etapas de produção e purificação, a enzima foi liofilizada e armazenada sob refrigeração a 10°C para posterior realização dos ensaios descritos a seguir.

### 5.1 Termoestabilidade da enzima queratinase em líquidos iônicos

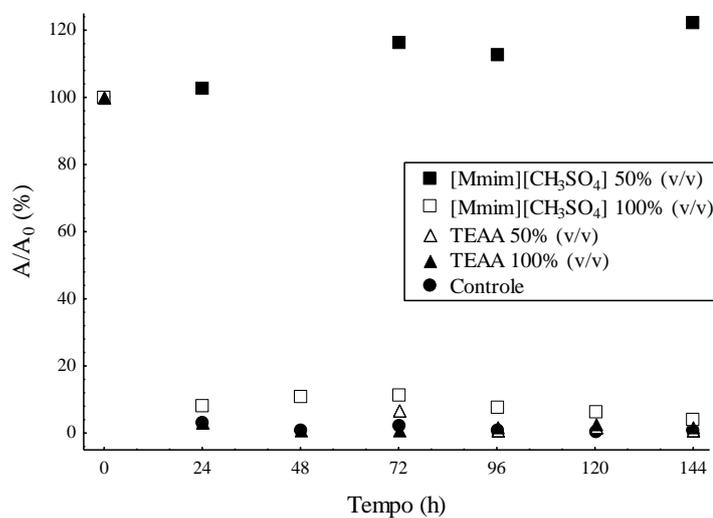
Neste ensaio a enzima sofreu tratamento com os líquidos iônicos, as cinéticas obtidas durante o tempo de 144 h estão mostradas na Figura 6, para os líquidos hidrofílicos e na Figura 7, para os líquidos hidrofóbicos.

**Figura 6** – Estabilidade da queratinase nos líquidos iônicos hidrofílicos a 55°C.

(a) Atividade residual (%) da queratinase nos diferentes LI. (b)  $A/A_0$  (%) da queratinase nos diferentes LI.



(a)



(b)

Na Figura 6 foi possível observar o efeito dos líquidos iônicos hidrofílicos na enzima queratinase. A Figura 6a mostra que a enzima tratada no LI trietilamônio acetato (TEAA) apresentou uma atividade residual, no tempo 0 min, alta comparado com o outro LI hidrofílico testado, o 1,3-dimetilimidazólio metil sulfato [Mmim][CH<sub>3</sub>SO<sub>4</sub>], correspondendo a 60% e 68% na concentração de 50% e 100% do LI, respectivamente, porém nas primeiras 24 h essa atividade foi totalmente perdida. No entanto, diferente destes resultados, o estudo realizado por Attri, Venkatesu e Kumar (2011), o líquido iônico TEAA mostrou ser fortemente estabilizante da proteinase  $\alpha$ -quimotripsina, através da análise da mudança estrutural e dobramento da proteína, pela técnica de dicróismo circular e, estudos na atividade enzimática através de experimentos em espectrofotômetro de UV-vis. Nos resultados do estudo citado, o LI apresentou potencial efeito no redobramento da molécula da enzima e foi constatado que o mesmo interage com a superfície da  $\alpha$ -quimotripsina, estabilizando a dobra da estrutura nativa, sem interferir com os grupamentos funcionais.

Ao avaliarmos a Figura 6b, que corresponde a atividade em cada ponto em relação a atividade inicial, ocorreu uma distinção de comportamento para as duas concentrações testadas do líquido iônico [Mmim][CH<sub>3</sub>SO<sub>4</sub>]. Na concentração de 100% deste líquido iônico, a enzima perdeu 90% da sua atividade catalítica durante as primeiras 24 h. Quando dissolvido em tampão tris-HCl pH 7,5 na concentração de 50% (v/v), o contato com a enzima fez com que houvesse um aumento de 10% na atividade, mantendo-a durante as 144 h. A queratinase tratada neste líquido iônico apresenta baixa atividade enzimática inicial em relação ao controle (sem LI), mas foi estável durante o período de análise.

Conforme dito por Nakashima et al. (2005) nem sempre as enzimas exibem atividade catalítica satisfatória quando dissolvidas em líquidos iônicos, isto se deve, provavelmente, as mudanças estruturais da proteína. Para contornar este fato, tem-se realizado a modificação química ou a imobilização da enzima em suportes sólidos (KAAR et al., 2003).

Embora apresentando baixa atividade catalítica inicial, a enzima queratinase apresentou estabilidade quando tratada no LI [Mmim][CH<sub>3</sub>SO<sub>4</sub>], isso porque, conforme sugerido por Dupont (2004), o LI (a base de imidazólio) hidratado não pode ser considerado um solvente homogêneo, mas sim nanoestruturas formadas por uma rede de cargas com regiões polares e apolares em que a enzima interage, em locais menos polares, por ligações de hidrogênio, mantendo sua funcionalidade em condições adversas. No estudo de Jia et al. (2014) o efeito de estabilização foi justificado pela presença do cátion caotrópico e do ânion cosmotrópico de [Mmim][CH<sub>3</sub>SO<sub>4</sub>] que está relacionado com a série de Hofmeister. Mmim<sup>+</sup> é

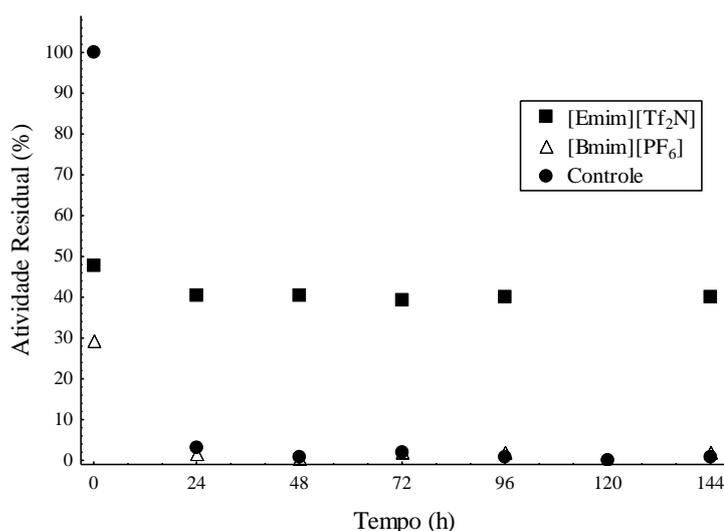
um caotrópico que estabiliza a estrutura da proteína e  $\text{CH}_3\text{SO}_4^-$  é um cosmotrópico estabilizante das redes de água e estrutura da proteína.

No estudo de Kaftzik, Wasserscheid e Kragl (2002) foi verificado que a concentração de 100% do LI  $[\text{Mmim}][\text{CH}_3\text{SO}_4]$  favoreceu a estabilização térmica da enzima  $\beta$ -galactosidase, porém não induziu a síntese de *N*-acetilactosamina, por causa da diminuição da atividade catalítica decorrente, provavelmente, pelas limitações de transporte de massa devido a alta viscosidade do meio reacional, mesmo em altas temperaturas.

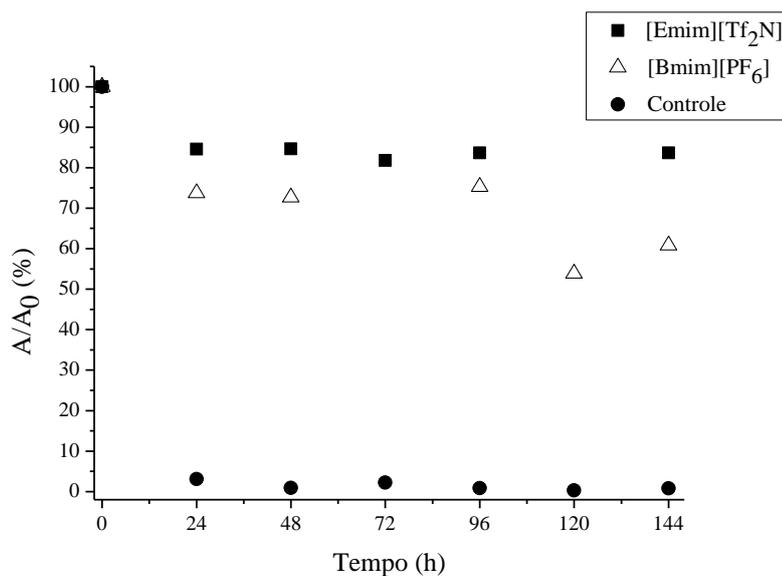
Segundo Persson e Bornscheuer (2003), o aumento observado na estabilidade ao longo do tempo não é atribuído as diferenças de hidratação da enzima nos solventes aplicados, mas pelas interações eletrostáticas entre o LI e a enzima, resultando em uma molécula mais rígida e estável. A estabilidade térmica da enzima esterase de *Bacillus stearotherophilus* imobilizada em celite na temperatura de 40°C foi verificada em LIs e em solventes orgânicos. Um aumento na meia vida da enzima na presença dos LIs 1-butil-3-metilimidazólio hexafluorofosfato  $[\text{BMim}][\text{PF}_6]$  e 1-butil-3-metilimidazólio tetrafluoroborato  $[\text{BMim}][\text{BF}_4]$  foi observado em relação aos solventes orgânicos *n*-hexano e éter metil *terc*-butílico, com maior valor correspondendo a 240 h para  $[\text{BMim}][\text{PF}_6]$ , que foi 30 e 3 vezes superior se comparado a *n*-hexano e éter metil *terc*-butílico, respectivamente.

**Figura 7** – Estabilidade da queratinase nos líquidos iônicos hidrofóbicos a 55°C.

(a) Atividade residual (%) da queratinase nos diferentes LI. (b)  $A/A_0$  (%) da queratinase nos diferentes LI.



(a)



(b)

De acordo com a Figura 7a, pode-se observar que o tratamento da enzima em ambos os LI causaram perda de atividade inicial para 48% e 29% no tratamento com [Emim][Tf<sub>2</sub>N] e [Bmim][PF<sub>6</sub>], respectivamente. Porém a enzima tratada no LI [Bmim][PF<sub>6</sub>] não conseguiu manter a atividade, com redução para 1% (total desnaturação) durante as primeiras 24 h de ensaio a 55°C, mesmo comportamento para a amostra controle. O melhor comportamento foi no tratamento na presença do LI [Emim][Tf<sub>2</sub>N], que embora perdendo 52% de atividade no primeiro contato, em relação a amostra controle, manteve-se constante durante as 144 h de armazenamento.

A Figura 7b mostrou que em relação atividade inicial do ensaio, o melhor comportamento de estabilidade da enzima foi quando tratada no LI [Emim][Tf<sub>2</sub>N], pois foi mantida em torno de 80% durante as 144 h do ensaio, já para a enzima tratada no LI [Bmim][PF<sub>6</sub>] a atividade permaneceu em 70% até 96 h e depois caiu para 55% até o final do tempo de análise. Diferentemente, para a amostra controle a atividade foi totalmente perdida nas primeiras 24 h de análise.

A alta estabilidade da enzima queratinase frente ao LI [Emim][Tf<sub>2</sub>N] pode ser função da baixa basicidade das ligações de hidrogênio entre a enzima e o ânion compatível. A distribuição das cargas negativa aos cinco ânions de Tf<sub>2</sub>N, formam ligações de hidrogênio fortes e estáveis no meio, o que minimiza as interações por ligações de hidrogênio com as moléculas internas da enzima, impedindo que ocorra um rearranjo desfavorável (PARK; KAZLAUSKAS, 2003).

A baixa solubilidade do LI [Emim][Tf<sub>2</sub>N] em água e sua alta habilidade para dissolver álcoois de cadeia curta, conferindo sua característica polar, pode estar envolvido com a preservação das moléculas de água essenciais no microambiente da enzima (DE DIEGO et al., 2005).

Embora haja estabilidade da enzima tratada em ambos os LIs, a atividade inicial é menor que a enzima sem tratamento (controle), como observado na Figura 7a. A diferença nos valores de atividade pode estar relacionado com a viscosidade do meio, altas viscosidades diminuem a taxa de difusão da enzima com o substrato, resultando em um abaixamento da atividade. No estudo de Bose, Barnes e Petrich (2011) foi verificado através da enzima endo-1,4-β-*D*-glucanase que o aumento da viscosidade, correspondente da adição de 10%, 50% e 99% do líquido iônico tris-(2-hidroxietil)-metilamônio metilsulfato, ocasionou diminuição da atividade residual.

Outro fator que evidencia a interação da queratinase com os LIs hidrofóbicos, é que durante o processo de purificação, nas etapas do sistema aquoso bifásico, a enzima foi particionada para a fase de topo (composta por PEG), isto é, fase com características hidrofóbicas, indicando a melhor afinidade desta enzima na fase menos polar (SALA et al., 2014).

## **5.2 Efeito de preservativos e de líquidos iônicos hidrofóbicos na estabilidade da queratinase**

A atividade da queratinase foi investigada após incubação da enzima com vários preservativos, retirados da literatura como sendo mais efetivos, por 15 e 60 min a 55°C e 15 min a 70°C. O efeito destes aditivos estão apresentados na Figura 8, com a atividade no tempo inicial (zero min) fixada como 100%. Posteriormente, os melhores preservativos foram comparados com o LI hidrofóbico selecionado por ser mais estável, o [Emim][Tf<sub>2</sub>N].

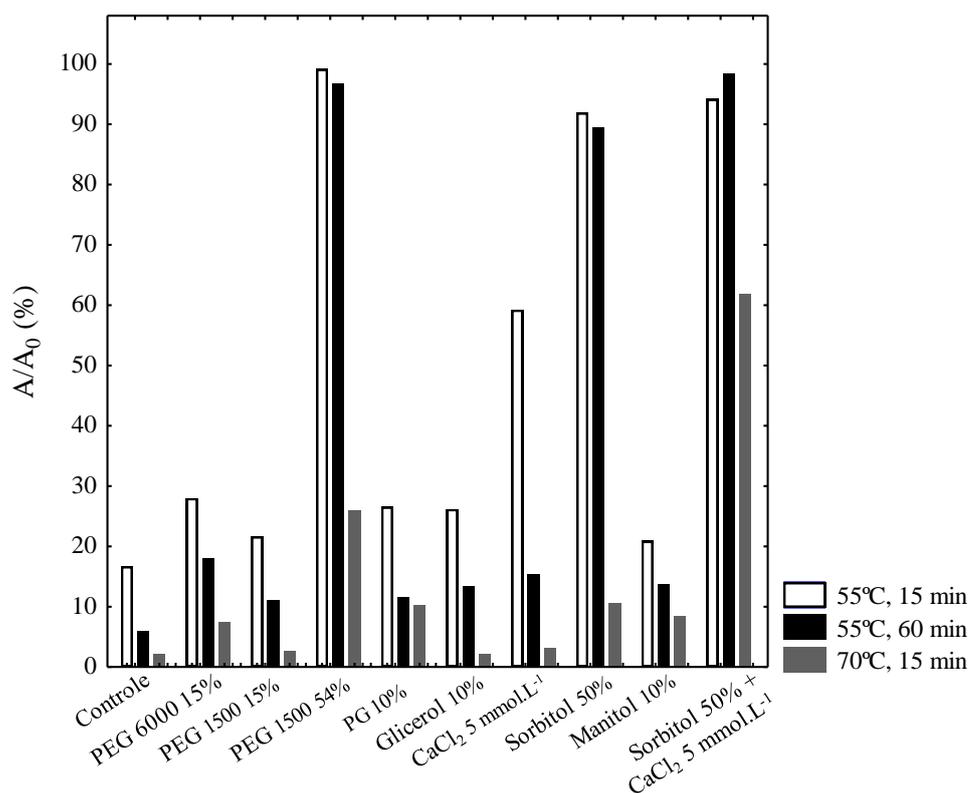
A termoestabilização de enzimas pode ser aumentada pela modificação do ambiente através da adição de vários aditivos (por exemplo polióis, PEG), os quais promovem um efeito protetor que pode ser explicado pelo fortalecimento das interações hidrofóbicas dentro da molécula de proteína e pela ação indireta sobre a molécula de água (GHORBEL; SELLAMI-KAMOUN; NASRI, 2003). Além disso, os polióis mantêm as interações solvofóbicas, as quais preservam a conformação ativa/nativa da enzima (DE DIEGO et al., 2004).

Nas condições estudadas a enzima na presença dos preservativos mostrou ser mais estável que a amostra controle. Na temperatura de 55°C, em ambos os tempos avaliados, o

menor desempenho foi na presença de PEG 1500 15% e manitol 10% com 22% e 21% de atividade no tempo de incubação de 15 min e 11% e 14% (60 min), respectivamente.

**Figura 8** – Efeito dos preservativos na estabilidade da queratinase tratada.

PEG: polietilenoglicol, PG: propilenoglicol.



A presença de íons de cálcio nas moléculas de protease podem contribuir com a estabilidade, há evidências experimentais que pelo menos um íon de cálcio pode desempenhar um efeito regulatório, entre o estado estável e instável, governado pelo processo de desdobramento na região terminal da molécula, que contém nitrogênio (EIJSink et al., 2011). Assim, a presença de CaCl<sub>2</sub> juntamente com a queratinase, a 55°C, apresentou percentual de atividade de 59% em 15 min, com perda de 44% em 60 min de incubação, o aumento da temperatura para 70°C conduziu a somente 3% de atividade. Na literatura o aumento da estabilidade térmica da queratinase pode ser obtido pela adição CaCl<sub>2</sub>. Além dos trabalhos de Beg e Gupta (2003) e Joo et al. (2005) apresentados no Quadro 2, no estudo de Bressollier et al. (1999) foi verificado que a presença de 2 mmol.L<sup>-1</sup> de CaCl<sub>2</sub> aumentou a estabilidade térmica de uma serino protease queratinolítica, através do aumento da meia vida, a 60°C, para 72 min na presença deste composto, em relação a apenas 6 min com sua ausência.

Referente a atividade enzimática, o estudo de Bressollier et al. (1999) mostrou que a adição do cálcio não ocasionou aumento da atividade inicial. Por outro lado, o estudo de Ghorbel, Sellami-Kamoun e Nasri (2003) em uma protease de *Bacillus cereus* BG1 a 60°C foi verificado que o íon  $\text{Ca}^{2+}$  é um ótimo indutor, com aumento na atividade desta enzima em 450%, na concentração de 5 mmol.L<sup>-1</sup> deste íon. As características favoráveis em proteases juntamente de  $\text{CaCl}_2$  e também de sorbitol (verificado no Quadro 2), estimulou o estudo de estabilidade da queratinase na presença ao uso conjunto de sorbitol 50% e  $\text{CaCl}_2$  5 mmol.L<sup>-1</sup>.

Através da Figura 8, o uso conjunto do sorbitol e  $\text{CaCl}_2$  agiram como estabilizantes favoráveis para a queratinase, assim como o PEG 1500 54% e sorbitol 50% que mantiveram a atividade enzimática, a 55°C, em 94%, 99% e 92% no tempo de 15 min, e 98%, 97% e 89% após transcorrido 60 min, respectivamente. Com aumento da atividade residual de aproximadamente 5 vezes em 15 min e mais de 10 vezes em 60 min em comparação com a enzima sem preservativos (controle).

A estabilidade durante os 60 min à 55°C apresentada pela enzima tratada em sorbitol+ $\text{CaCl}_2$  pode ser explicado pelo efeito lioprotetor (protetores contra a retirada de água) atribuído ao sorbitol, pois conforme as moléculas de água são removidas da superfície da enzima, estes lioprotetores ligam-se em torno da proteína formando uma matriz vítrea por ligações de hidrogênio com as cadeias laterais de aminoácidos da enzima (SHAH; GUPTA, 2007). Além dos efeitos estabilizantes apresentados anteriormente na presença de  $\text{Ca}^{2+}$  ligado a enzima.

Segundo Nirmal e Laxman (2014) o efeito da estabilidade da enzima em PEG é dependente da estrutura da proteína e da massa molar do polímero, e quanto maior melhor. O processo de purificação da queratinase consistiu de duas etapas de SAB, composta por PEG 1500 e sais, seguido de UF/DF. A concentração de 54% (m/v) de PEG 1500 é a mesma utilizada no processo de purificação da enzima ao final do 2º estágio de SAB (SALA et al., 2014), a qual se mostrou estável para manter a atividade da enzima nas condições do processo. Assim, quando um alto grau de pureza não é desejado e maiores volumes de bioproduto são requeridos, a etapa de UF/DF não se faz necessária, propondo redução de custos e tempo de processo.

As diferenças na eficiência de estabilização entre os aditivos PEG 15% e 54% estão relacionadas ao valor de viscosidade. Rantwijk e Sheldon (2007) argumentaram que as mudanças na conformação da enzima são lentas em solventes mais viscosos, o que favorece a manutenção da atividade e estabilidade das enzimas por longos períodos de tempo.

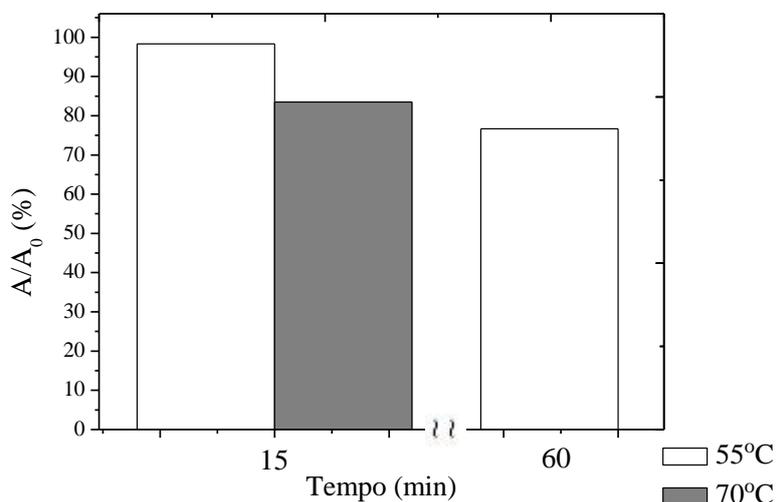
Na temperatura de 70°C, a enzima queratinase perdeu mais de 50% da sua atividade inicial em quase todos os preservativos, porém foram mais eficazes que a amostra controle, que

conseguiu manter apenas 2% da atividade enzimática nestas condições. Outros preservativos com menor rendimento foram  $\text{CaCl}_2$  5  $\text{mmol.L}^{-1}$ , PEG 1500 15% e glicerol 10% com atividades remanescentes de 3%, 2% e 2%, respectivamente, após 15 min. Jia, Hu e Huang (2014) verificaram que a desativação de muitas enzimas em solução aquosa e em altas temperaturas está relacionada com o contato entre a superfície hidrofóbica de partes da enzima e a água ao seu redor.

Os preservativos com melhor eficiência em alta temperatura evidenciado neste trabalho, em ordem decrescente, foram sorbitol 50% e  $\text{CaCl}_2$  5  $\text{mmol.L}^{-1}$  > PEG 1500 54% > sorbitol 50% > propilenoglicol 10% que mantiveram 62%, 26%, 11% e 10%, respectivamente, de atividade residual. O estabilizante mais eficiente apresentou uma melhoria de mais de 30 vezes com relação ao controle (sem nenhum aditivo).

A Figura 9 apresenta o comportamento da queratinase tratada no líquido iônico [Emim][Tf<sub>2</sub>N]. Na temperatura de 55°C, após decorrido 15 min a atividade manteve 98%, com redução para 77% no tempo de 60 min. O aumento de temperatura para 70°C, a atividade foi de 83% após 15 min de contato.

**Figura 9** – Efeito do líquido iônico [Emim][Tf<sub>2</sub>N] na estabilidade da queratinase tratada.



Estes resultados foram comparados com os preservativos PEG 1500 54% e uso conjunto de sorbitol 50% e  $\text{CaCl}_2$  5  $\text{mmol.L}^{-1}$ , sendo possível verificar que na temperatura de 55°C a enzima tratada no LI apresentou redução de 23% na atividade enzimática após 60 min de incubação, enquanto que essa redução foi menor na presença de PEG 1500 54%, igual a 3% e 2% quando foi utilizado os preservativos sorbitol e  $\text{CaCl}_2$ .

Embora o efeito do sorbitol 50% e  $\text{CaCl}_2$  5  $\text{mmol.L}^{-1}$  tenha favorecido a atividade no tempo de 60 min na temperatura de 55°C, este efeito não foi superior ao do LI [Emim][Tf<sub>2</sub>N], na temperatura para 70°C, pois manteve a atividade residual em 62%, enquanto a enzima tratada no LI [Emim][Tf<sub>2</sub>N] manteve 83% da atividade, com melhoria de 40 vezes em comparação ao controle. Na presença do preservativo PEG 1500 54%, o aumento de temperatura não favoreceu a atividade enzimática, mantendo apenas 26% da atividade inicial.

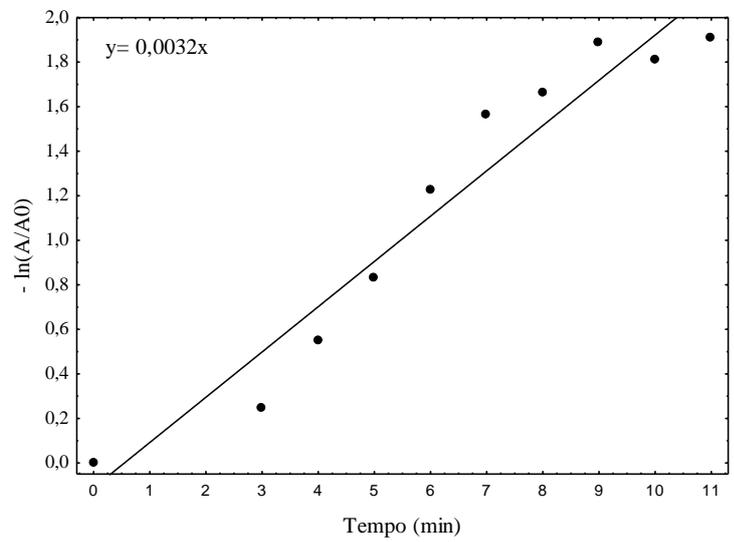
No estudo de De Diego et al. (2004) foi verificado, através da análise de fluorescência, que apesar do sorbitol em meio aquoso ser um clássico estabilizante, se mostrou incapaz de prevenir o desdobramento da enzima, enquanto que o LI [Emim][Tf<sub>2</sub>N] estabilizou a atividade da enzima por redobramento da proteína para uma conformação semelhante à nativa e mais compacta.

Em vista dos melhores resultados de estabilidade, foi dado seguimento aos estudos na determinação dos parâmetros cinéticos da enzima queratinase em LI [Emim][Tf<sub>2</sub>N], sorbitol 50% +  $\text{CaCl}_2$  5  $\text{mmol.L}^{-1}$  e PEG 1500 54%.

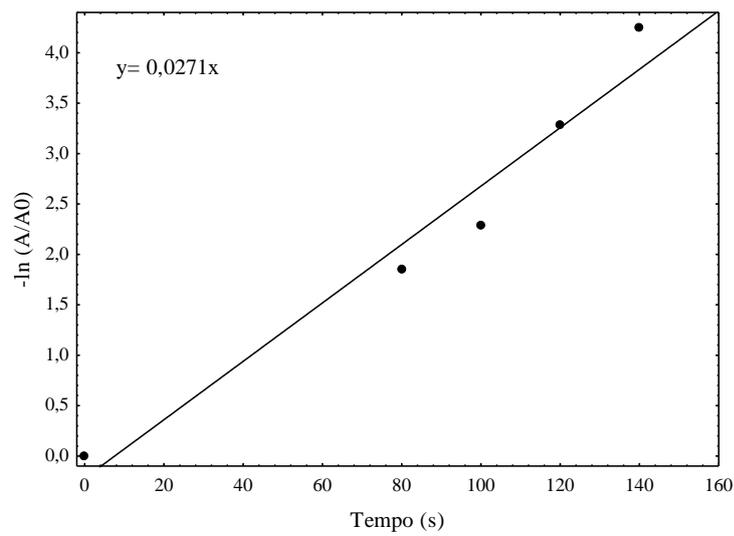
### **5.3 Parâmetros Cinéticos de desnaturação térmica**

Os experimentos resultantes das Figuras 10 a 13, apresentam os perfis cinéticos de desnaturação térmica da queratinase tratada nas seguintes condições: amostra controle (sem tratamento), no líquido iônico [Emim][Tf<sub>2</sub>N] e em preservativos (sorbitol 50% +  $\text{CaCl}_2$  5  $\text{mmol.L}^{-1}$  e PEG 1500 54%), os quais seguem um modelo de primeira ordem. A linha reta nas figuras representa o ajuste linear dos pontos experimentais.

**Figura 10** – Linearização da cinética de desnaturação térmica da enzima em tampão tris-HCl pH 7,5 (controle). (a) Temperatura de 55°C e (b) Temperatura de 70°C.



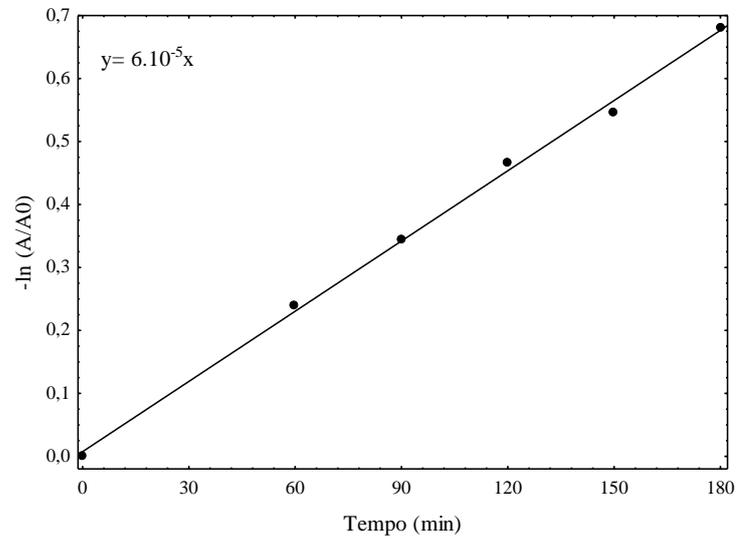
(a)



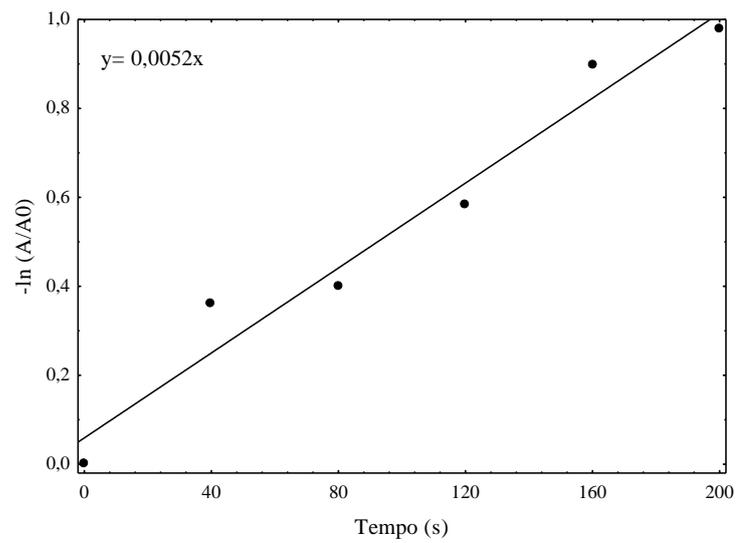
(b)

**Figura 11** – Linearização da cinética de desnaturação térmica da enzima em PEG 1500 54%.

(a) Temperatura de 55°C e (b) Temperatura de 70°C.

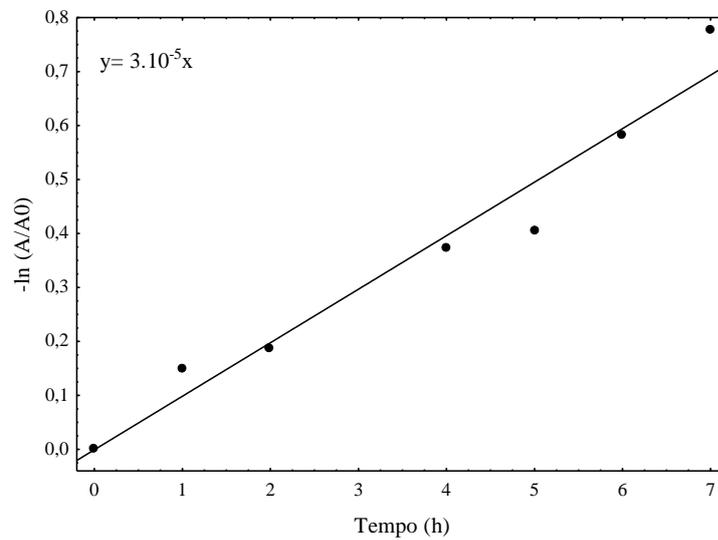


(a)

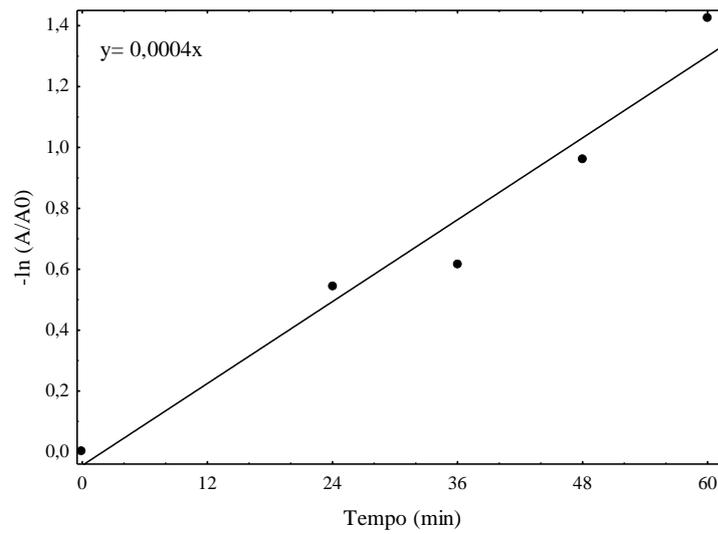


(b)

**Figura 12** – Linearização da cinética de desnaturação térmica da enzima em sorbitol 50% com  $\text{CaCl}_2$  5  $\text{mmol.L}^{-1}$ . (a) Temperatura de 55°C e (b) Temperatura de 70°C.

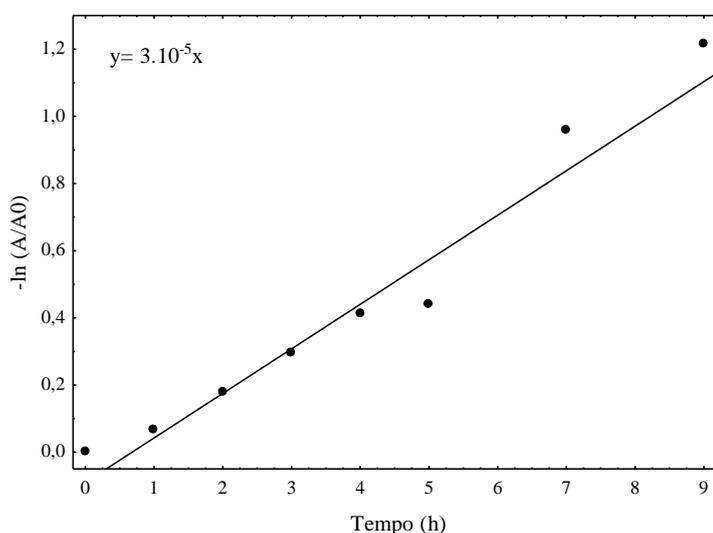


(a)



(b)

**Figura 13** – Linearização da cinética de desnaturação térmica da enzima no líquido iônico [Emim][Tf<sub>2</sub>N] na temperatura de 70°C.



A enzima quando tratada com o LI [Emim][Tf<sub>2</sub>N], a 55°C, mostrou-se bastante estável mantendo a atividade em torno 70% da atividade inicial durante 32 dias, em vista de não apresentar redução na atividade, não foi mostrado a cinética de desnaturação térmica nesta temperatura, comportamento esse que já foi previamente observado na Figura 7b. Na temperatura de 70°C, a enzima queratinase foi perdendo gradativamente a atividade. O tempo em que a enzima perdeu 50% da sua atividade inicial foi após 6 h de contato.

A constante de desnaturação ( $k_d$ ) para a enzima queratinase, determinada através da regressão linear dos dados experimentais verificados nas Figuras 10 a 13 estão apresentadas na Tabela 1. É possível observar que os valores de  $k_d$  aumentaram com o aumento de temperatura e que esse valor é inversamente proporcional a meia vida.

**Tabela 1** – Parâmetros cinéticos de desnaturação térmica da enzima queratinase.

Tratamento	55°C			70°C		
	$k_d$ (s <sup>-1</sup> )	$t_{1/2}$ (h)	R <sup>2</sup>	$k_d$ (s <sup>-1</sup> )	$t_{1/2}$ (h)	R <sup>2</sup>
Controle	$3 \cdot 10^{-3}$	$6,1 \cdot 10^{-2}$	0,931	$2,7 \cdot 10^{-2}$	$7,1 \cdot 10^{-3}$	0,952
PEG 1500 54%	$6 \cdot 10^{-5}$	3,0	0,997	$5,2 \cdot 10^{-3}$	$3,7 \cdot 10^{-2}$	0,949
Sorbitol 50% + CaCl <sub>2</sub> 5mmol.L <sup>-1</sup>	$3 \cdot 10^{-5}$	6,4	0,971	$4 \cdot 10^{-4}$	0,5	0,956
[Emim][Tf <sub>2</sub> N]	-	> 768	-	$3 \cdot 10^{-5}$	6,4	0,954

Como mostrado na Tabela 1, a enzima tratada com os preservativos e o LI [Emim][Tf<sub>2</sub>N] exibiu alta termoestabilidade quando comparado com a enzima controle. O aumento da estabilidade em altas temperaturas é atribuído por diversos fatores previamente citados: rigidez da molécula da enzima modificada em LI/preservativo, fortalecimento das ligações de hidrogênio e da basicidade, polaridade e viscosidade do LI.

De acordo com Rantwijk e Sheldon (2007), as enzimas em líquidos iônicos mantem sua atividade e sua estrutura por muito mais tempo do que em solventes orgânicos e em temperaturas mais elevadas, decorrente da elevada viscosidade dos líquidos iônicos, o que retarda a alteração da conformação ativa para forma inativa na proteína. Porém, através da análise reológica, foi determinado para a amostra do LI [Emim][Tf<sub>2</sub>N] a viscosidade de 30 mPa.s, corroborando com a faixa de viscosidade citada por Tariq et al. (2011), viscosidade essa que foi maior ao da amostra sorbitol 50% + CaCl<sub>2</sub> 5 mmol.L<sup>-1</sup> (igual a 6 mPa.s) e inferior ao apresentado pela amostra PEG 1500 54% (igual a 32 mPa.s), evidenciando que não só a viscosidade mantém a molécula da enzima ativa e estável por maiores períodos de tempo, também existem outras propriedades, como exemplo: a polaridade, as ligações de hidrogênio, as interações dipolo-dipolo e forças de van der Waals, hidrofobicidade formadas exclusivamente pelos LIs que conferem o efeito protetor à enzima.

Nirmal e Laxman (2014) investigaram a estabilidade de uma protease alcalina produzida a partir de uma cepa fúngica na presença de açúcares álcoois como glicerol, manitol e sorbitol, a 50°C. Todos apresentaram estabilidade maiores que a amostra controle, estes polióis foram mais efetivos quando se aumentou a concentração de 20% (m/v) para 50% (m/v), com aumento na meia vida de 50 min (controle) para mais de 240 min, provavelmente em decorrência ao aumento da ação lioprotetora e das pontes de hidrogênio no meio.

No trabalho de De Diego et al. (2004) foi confirmado que os líquidos iônicos e polióis são agentes estabilizantes de enzimas, através de seus resultados onde o sorbitol 3 mol.L<sup>-1</sup> e [Emim][Tf<sub>2</sub>N] apresentaram-se como melhores estabilizantes do que a água pura, aumentando a meia vida da enzima  $\alpha$ -quimotripsina em 2,7 e 6 vezes, respectivamente, a 30°C.

Vários autores justificam a estabilidade proteica, Park e Kazlauskas (2003) expuseram que é em decorrência da baixa basicidade do meio e a alta polaridade do líquido iônico relacionada com a pequena cadeia alquílica, Rantwijk e Sheldon (2007) a relacionam com a alta viscosidade, Jia, Hu e Huang (2014) atribuem ao efeito da formação de um escudo protetor impedindo a aproximação de desestabilizantes, Persson e Bornscheuer (2003) remeteram às interações eletrostáticas entre o LI e a enzima, dentre outros. Assim, é possível

verificar na literatura consultada que não existe uma explanação exata sobre o fato de como os líquidos iônicos aumentam a estabilidade enzimática.

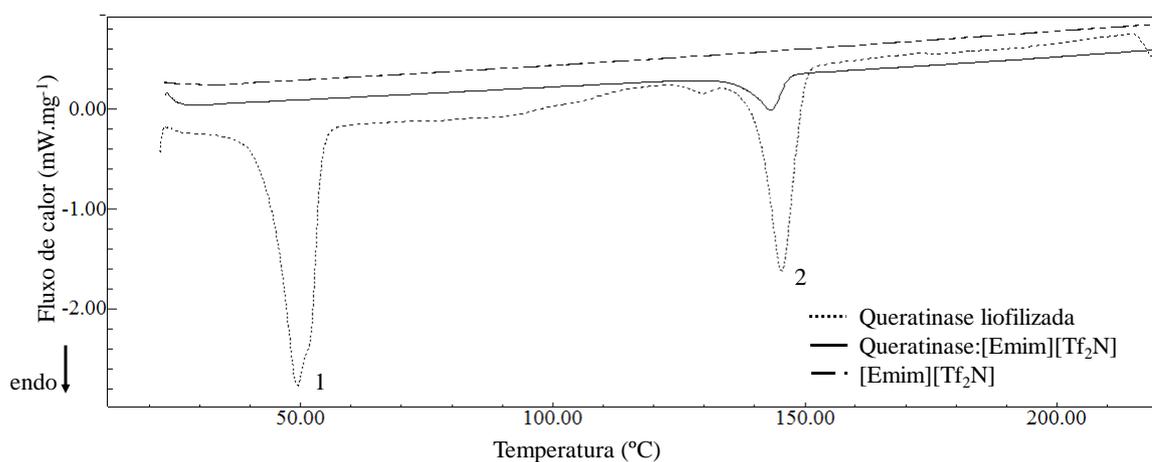
#### 5.4 Propriedades Térmicas

As propriedades térmicas entalpia e temperatura de transição foram investigadas por análise de DSC. O comportamento da enzima queratinase foi estudado em três diferentes amostras: queratinase liofilizada, queratinase:[Emim][Tf<sub>2</sub>N] e [Emim][Tf<sub>2</sub>N].

A Figura 14 apresenta a curva de DSC apresentados em picos endotérmicos de absorção de calor. As alterações endotérmicas na molécula da queratinase podem estar relacionadas com a ruptura das ligações de hidrogênio (LI-CHAN; MA, 2002). A Tabela 2 apresenta a temperatura de transição, assim como as temperaturas inicial e final que ocorre alterações na molécula da queratinase.

O aumento da estabilidade da enzima pode estar relacionado com o valor de  $T_m$ , sendo diretamente proporcionais. A variação de entalpia foi obtida através da área sob o pico, que também pode ser usada para interpretar as mudanças representadas pelo total de calor absorvido/liberado durante o processo de transição.

**Figura 14** – Curva de DSC da amostra enzima queratinase em diferentes condições e do LI [Emim][Tf<sub>2</sub>N].



**Tabela 2** – Temperatura de transição ( $T_m$ ), inicial e final das alterações na molécula da queratinase, determinados por análise de DSC.

Amostra		$T_{inicial}$ (°C)	$T_m$ (°C)	$T_{final}$ (°C)
Queratinase liofilizada	Pico 1	44	49,5	54,2
	Pico 2	140,3	145,5	149,7
Queratinase:[Emim][Tf <sub>2</sub> N]		138,7	143,2	146,8

A determinação de  $T_m$  é verificada pelo mínimo de cada curva, correspondendo ao ponto de temperatura onde há transição conformacional da enzima para o estado de desdobramento nas condições do ensaio (DE DIEGO et al., 2004). As técnicas quantitativas de obtenção do valor de  $T_m$ , não estão diretamente relacionadas com as perdas na atividade enzimática. A ocorrência de perdas são evidenciadas antes de qualquer mudança estruturais serem detectadas (MACHADO et al., 2014).

De acordo com a Tabela 2 foi observado que a estabilidade da queratinase aumentou na presença do [Emim][Tf<sub>2</sub>N] com valores de  $T_m$  de 49,5 (forma liofilizada) e 143,2°C (presença do líquido iônico). Na presença do líquido iônico, a molécula estava protegida suficientemente conseguindo manter a sua integridade até temperaturas superiores a 110°C.

Quando a molécula passa para o estado desnaturado em temperaturas inferiores a 110°C, é porque não possui interações hidrofóbicas suficientes para garantir a manutenção do seu microambiente, do inglês denominado *core* (PRIVALOV, 1982, citado por LI-CHAN; MA, 2002). Assim, é possível prever a presença de dois picos nas curvas de DSC. Na Figura 14, o fluxo de calor endotérmico no pico 1, a 49,5°C, causou modificações na molécula da enzima liofilizada, através da ruptura das ligações de hidrogênio, mantendo o seu *core* protegido pelas interações hidrofóbicas, porém no pico 2 a preservação do *core* foi perdida pela alta temperatura, superior a 110°C. Abou-Hachem, Olsson e Karlsson (2003) sugerem que cada pico está associado com o desenrolamento de módulos ou domínios da enzima, dessa forma a enzima na presença de LI apresentou melhor estabilidade termodinâmica que a enzima na forma liofilizada, começando a se desenrolar acima de 140°C.

Através da determinação da entalpia, foram obtidos os valores de 26,94 J.g<sub>enzima</sub><sup>-1</sup> ( $T_m$ = 143,2°C) na enzima tratada no LI [Emim][Tf<sub>2</sub>N] e de 116,1 J.g<sub>enzima</sub><sup>-1</sup> ( $T_m$ = 49,5°C) na forma liofilizada. Essa redução no valor da entalpia com aumento de  $T_m$  também foi observado por Uchaneishvili et al. (2014) na faixa de 62,8°C a 67,7°C, porém apresentou pouca variação na faixa de 67,7°C a 76,0°C quando estudando a enzima  $\alpha$ -quimotripsina. Este comportamento não ocorreu nos estudos de De Diego et al. (2004), para a enzima  $\alpha$ -quimotripsina e de Byrne

e Angell (2008) para as enzimas lisozima e ribonuclease A, que obtiveram aumento de entalpia com a aumento da temperatura de transição.

Os líquidos iônicos são solventes estáveis a uma temperatura acima de 110°C. Em particular, LI dicatiônicos mostraram ser mais estáveis termicamente do que os monocatiônicos. Por exemplo, os LI contendo o cátion *bis*(2,3-dimetilimidazólio) tem excelente estabilidade com apenas 5% de degradação térmica a 440°C (MONIRUZZAMAN et al., 2010). O líquido iônico [Emim][Tf<sub>2</sub>N] não foi degradado na faixa de temperatura analisada.

Assim, através da análise de DSC, foi possível verificar que a enzima queratinase tratado no LI [Emim][Tf<sub>2</sub>N] apresentou melhor estabilidade molecular, provocando alterações na molécula somente na temperatura de 143,2°C.

### 5.5 Efeito da concentração do LI na atividade enzimática

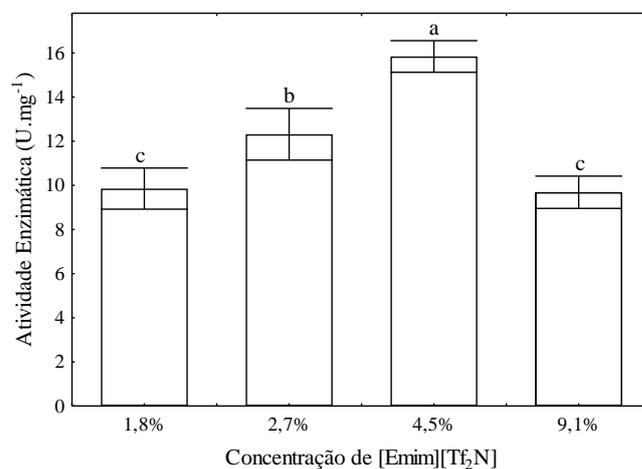
Com base nos melhores resultados para a estabilidade, o LI [Emim][Tf<sub>2</sub>N] foi selecionado para verificar o efeito da concentração na reação enzimática. A Figura 15 apresenta os resultados de atividade da queratinase em função de concentração. A atividade variou de  $9,7 \pm 0,7$  a  $15,8 \pm 0,7$  U.mg<sup>-1</sup>. Foi observado que a menor atividade enzimática (concentração de 9,1%) não se diferiu estatisticamente ( $p < 0,05$ ) da concentração de 1,8%, este igual a  $9,8 \pm 0,9$  U.mg<sup>-1</sup>. A maior atividade enzimática foi verificada na concentração de 4,5% de LI, diferindo estatisticamente da concentração de 2,7%, que apresentou valor de  $12,3 \pm 1,2$  U.mg<sup>-1</sup>.

Alguns estudos abordaram o comportamento da atividade enzimática a partir do uso de líquidos iônicos. Dang et al. (2007) avaliaram a atividade da enzima lipase obtida por *Mucor javanicus* pré-tratada com vários LI. Primeiramente investigaram a melhor concentração entre 0,2, 0,5, 1, 2 e 3% (v/v) sobre a atividade utilizando um LI hidrofílico ([Bmim][BF<sub>4</sub>]) e obtiveram o pico de atividade na concentração de 0,5%, valor este 1,4 vezes mais elevado que na concentração de 3%, a qual apresentou menor valor de atividade enzimática. A concentração ótima foi fixada para avaliar o pré-tratamento com mais outros três LI. Os autores constataram que os LI hidrofóbicos ([Bmim][PF<sub>6</sub>] e [Emim][Tf<sub>2</sub>N]) apresentaram uma atividade levemente mais alta que os hidrofílicos ([Bmim][BF<sub>4</sub>] e [Emim][BF<sub>4</sub>]), mostrando que são favoráveis na atividade desta enzima.

Zhao et al. (2006) verificaram que o aumento da concentração de 0,7 mol.L<sup>-1</sup> para 2,5 mol.L<sup>-1</sup> afetou negativamente o valor da atividade enzimática para uma protease produzida por *Aspergillus melleus* em ambos os LI testados, [BuPy][CF<sub>3</sub>COO] e [Emim][CF<sub>3</sub>COO],

sugerindo que altas forças iônicas inibem a atividade enzimática, assim como fazem os sais inorgânicos tradicionais.

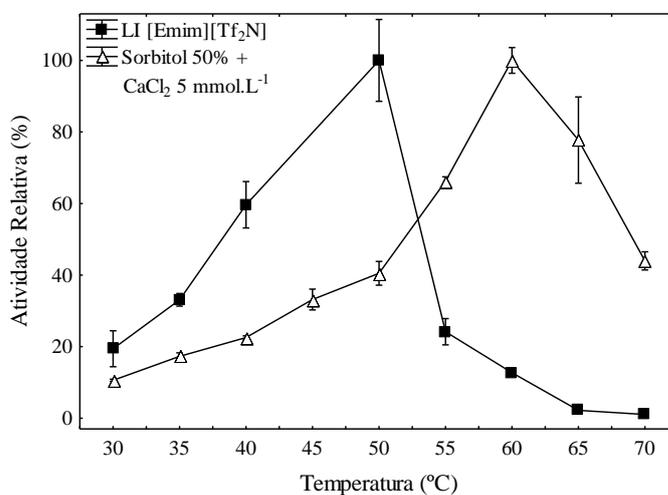
**Figura 15** – Efeito de diferentes concentrações do LI [Emim][Tf<sub>2</sub>N] na atividade enzimática da queratinase.



### 5.6 Determinação da temperatura e pH ótimos da queratinase na presença de LI

O efeito da temperatura na atividade da queratinase foi investigado através da atividade enzimática, utilizando o substrato azocaseína no pH 7,5. A enzima foi analisada em diferentes temperaturas na faixa de 30 a 70°C. A atividade máxima obtida para a queratinase tratada com LI [Emim][Tf<sub>2</sub>N] foi na temperatura de 50°C e para a enzima tratada em sorbitol 50% e CaCl<sub>2</sub> 5 mmol.L<sup>-1</sup> correspondeu a temperatura de 60°C, conforme verificado na Figura 16. A enzima sem tratamento (controle) apresentou temperatura ótima de 55°C, de acordo com o estudo de Alvares et al. (2013).

**Figura 16** – Efeito da temperatura na atividade da queratinase, pH fixado em 7,5.

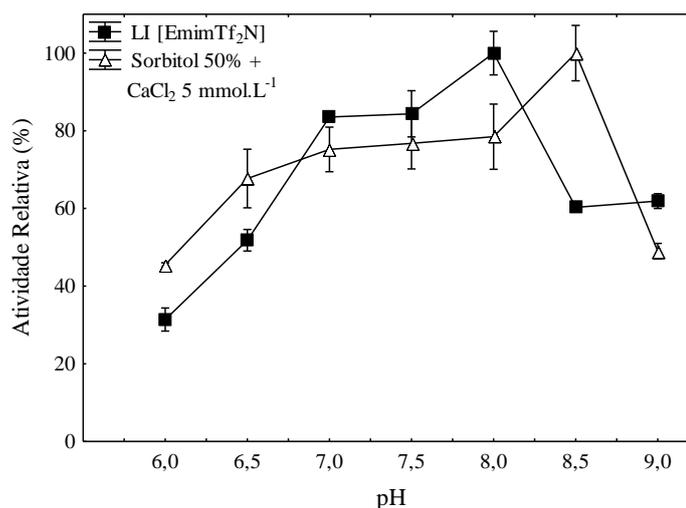


A enzima tratada com LI foi desnaturada na temperatura de 70°C, o que não ocorreu nos ensaios prévios de estabilidade, esse diferente comportamento pode estar relacionado com a presença de tampão no meio reacional, diferentemente dos ensaios de estabilidade que a enzima estava em líquido iônico puro.

Em relação ao efeito do pH, a enzima queratinase foi ativa em todas as faixas estudadas (6,0-9,0), para as duas condições em que foi submetida. Como mostrado na Figura 17, a enzima tratada no LI [Emim][Tf<sub>2</sub>N], apresentou máxima atividade no pH igual a 8,0. A enzima tratada em sorbitol 50% e CaCl<sub>2</sub> 5 mmol.L<sup>-1</sup>, o pH ótimo verificado foi 8,5. Essa enzima sem tratamento, apresentou pH ótimo de 7,5 (ALVARES et al., 2013).

Conforme verificado neste trabalho a enzima tratada nas duas condições mostrou ótimos de pH acima da enzima sem tratamento, podendo ser operada em faixas mais extremas.

**Figura 17** – Efeito do pH na atividade da queratinase, temperatura fixada em 40°C.



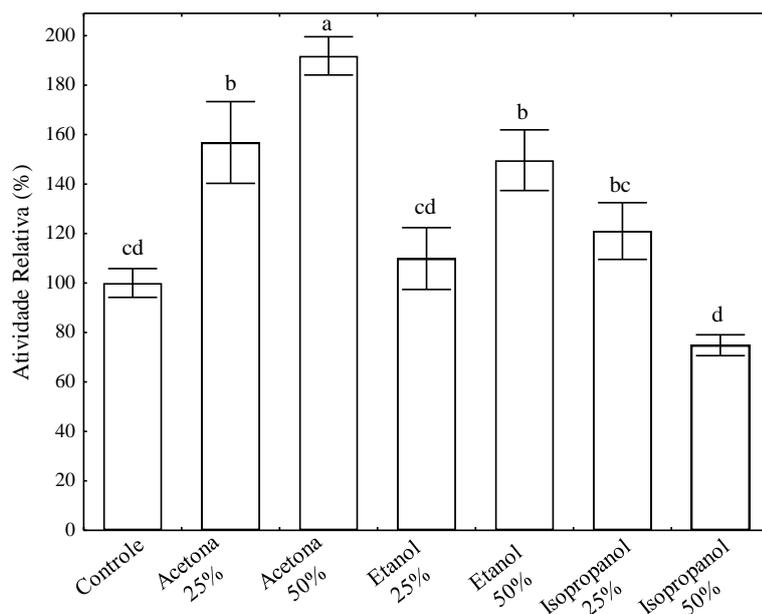
A temperatura ótima de queratinases varia entre 45-60°C e pH ótimo varia entre 7,0-11,0 (TATINENI et al., 2008; RIFFEL et al., 2007; SYED et al., 2009; DAROIT et al., 2010; BRESSOLLIER et al., 1999; THYS et al., 2004). Na literatura consultada não foi verificado a caracterização enzimática da enzima tratada em líquido iônico ou em sorbitol + CaCl<sub>2</sub>. A partir deste trabalho foi possível observar que após o tratamento para a resposta pH ótimo em ambas condições e temperatura ótima quando tratada em sorbitol com CaCl<sub>2</sub>, a enzima pode suportar faixas mais extremas, apresentando picos de atividade enzimática em pontos com maiores valores, em comparação com a forma sem tratamento (controle).

### 5.7 Efeito de solventes orgânicos e do líquido iônico hidrofóbico na atividade da enzima

O efeito de solventes foi verificado na atividade catalítica. Cada solvente foi misturado com a enzima tratada em [Emim][Tf<sub>2</sub>N], nas concentrações de 25 e 50% (v/v) correspondente ao volume de solvente orgânico adicionado com relação ao volume total da mistura contendo a enzima e LI.

Nos resultados obtidos foi evidenciado que os solventes de naturezas químicas diferentes agem na atividade da queratinase de maneira diferenciada. De acordo com a Figura 18, verificou-se uma maior ou igual atividade da queratinase tratada no LI [Emim][Tf<sub>2</sub>N] em contato com os solventes orgânicos, em comparação com a amostra controle (enzima e [Emim][Tf<sub>2</sub>N] puro), exceto na presença do solvente isopropanol 50%, que apresentou a atividade relativa menor.

**Figura 18** – Efeito de solventes orgânicos na atividade da queratinase em LI [Emim][Tf<sub>2</sub>N].



A melhor atuação da enzima tratada foi na presença de acetona 50% (v/v) com atividade relativa de  $192 \pm 8\%$ , diferindo estatisticamente das demais amostras ao nível de 95% de confiança. O restante das atividades relativas foram de  $157 \pm 16\%$ ,  $150 \pm 12\%$ ,  $121 \pm 11\%$ ,  $110 \pm 12\%$  referentes ao meio contendo acetona 25% (v/v), etanol 50% (v/v), isopropanol 25% (v/v) e etanol 25% (v/v).

A atividade enzimática em meio orgânico é função de vários fatores que podem alterar o comportamento catalítico, como exemplo a atividade de água (SANTUCCI et al., 2002) e o tipo de solvente (SEREBRYAKOVA; ZOORIN; KARYAKIN, 2009). O fator mais

significativo pode estar relacionado com a estrutura da molécula da enzima, que se apresenta na forma nativa em meio aquoso através de forças não covalentes como ligações de hidrogênio, interações iônicas e hidrofóbicas. A adição de solventes orgânicos em meio contendo água pode levar a ruptura destas forças resultando em mudanças na eficiência catalítica (SEREBRYAKOVA; ZOORIN; KARYAKIN, 2009). Entretanto, através dos resultados, com o tratamento dado a enzima no líquido iônico foi possível manter ou melhorar a atividade na presença de solventes orgânicos.

O coeficiente de partição é a razão do solvente na fase octanol com o mesmo solvente na fase aquosa, o logaritmo deste coeficiente é referido como o log do valor P. Solventes que apresentam alto log P (solventes hidrofóbicos) e alta capacidade de solvatação como tetrahidrofurano (THF) e álcoois altos (isômeros de butanol) são fortes desnaturantes, causando a inativação enzimática em concentrações abaixo de 30%, do contrário, os solventes hidrofílicos como glicerol, etileno glicol e formaldeído podem ser usados na concentração de 50-60% (IYER; ANANTHANARAVAN, 2008). Através do valor de log P é possível analisar a diferença no comportamento apresentado pela queratinase nos três solventes. O log P do isopropanol é o mais alto, igual a 0,28, se comparado com o da acetona e etanol, iguais a -0,24 e -0,31, respectivamente (Biblioteca Eletrônica Nacional de Medicina U.S. (NIH), LIMA; ANGNES, 1999).

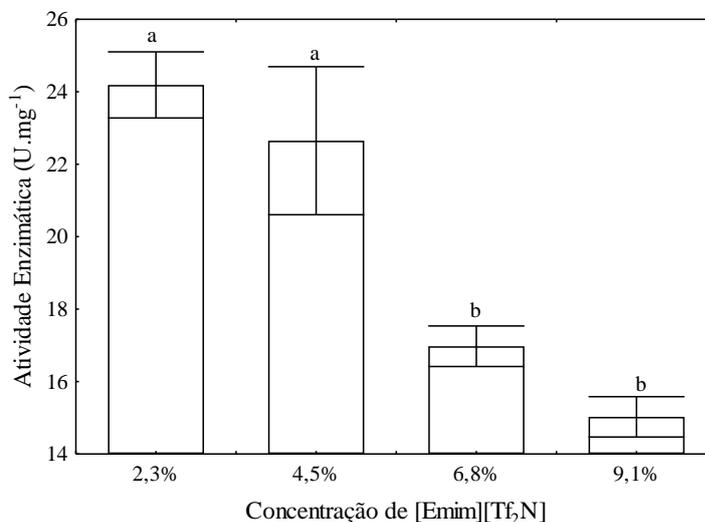
Com estes resultados foi possível prever que em uma reação de biocatálise, a presença de solventes orgânicos no meio junto ao líquido iônico hidrofóbico favorece a taxa de conversão/hidrólise, através do melhoramento da atuação da enzima.

Estudos reportaram que a síntese de peptídeos pode ser aumentada pela adição de solventes orgânicos na mistura reacional (GHORBEL; SELLAMI-KAMOUN; NASRI, 2003). Assim, a presença de solventes orgânicos no meio reacional contendo a enzima queratinase tratada em líquido iônico pode ser uma alternativa na reação de hidrólise de substratos proteicos.

### **5.8 Efeito da concentração de LI em meio contendo acetona na reação enzimática**

O efeito da concentração de LI e acetona (1:1) no meio reacional foi investigado. As concentrações de LI e acetona avaliadas foram 2,3%, 4,5%, 6,8% e 9,1% (v/v). A Figura 19 apresenta os resultados de atividade enzimática da queratinase nas concentrações testadas. O valor de atividade variou de  $15,0 \pm 0,5$  a  $24,2 \pm 0,9$  U.mg<sup>-1</sup>. O menor valor de atividade correspondeu a concentração de 9,1%, não se diferindo estatisticamente da concentração de 6,8%, ao nível de 95% de confiança.

**Figura 19** – Efeito de diferentes concentrações do LI [Emim][Tf<sub>2</sub>N] em meio contendo acetona na atividade enzimática da queratinase.



A concentração de [Emim][Tf<sub>2</sub>N] na mistura orgânica em que a enzima mostrou maior atividade catalítica foi 2,3%, concentração de LI inferior a apresentada na Figura 15 (4,5%). Embora não se diferindo estatisticamente da concentração de 4,5% ( $22,6 \pm 2 \text{ U.mg}^{-1}$ ) ao nível de 95% de confiança, é preferível o uso na concentração de 2,3%, fazendo com que o consumo de LI seja reduzido na presença de acetona, visto que o LI apresenta maior valor de mercado que a acetona, reduzindo os custos de processo.

Nesta condição, foi realizado o estudo de  $K_M$  e  $V_{m\acute{a}x}$ . O  $K_M$  foi determinado medindo a atividade da queratinase na faixa de 1 a 8  $\text{mg.mL}^{-1}$  do substrato azocaseína. Esta faixa foi suficiente para que nos últimos pontos de análise a atividade permanecesse constante. O valor para  $K_M$  foi de  $0,94 \text{ mg.mL}^{-1}$ , com o  $V_{m\acute{a}x}$  igual a  $25,9 \text{ U.mg}^{-1}$ .

Quanto menor o valor de  $K_M$  representa melhor afinidade pelo substrato, conforme a equação de Michaelis-Mentem, o  $K_M$  corresponde a concentração de substrato azocaseína necessária para obter a metade da velocidade máxima. O resultado de  $K_M$  obtido neste trabalho foi comparado com outros estudos de caracterização de proteases. Uma serino protease obtida a partir de *Bacillus circulans* apresentou para o substrato caseína o valor de  $K_M$  de  $0,597 \text{ mg.mL}^{-1}$  (RAO et al., 2009), uma protease purificada de *Bacillus subtilis* DKMNR apresentou para o substrato caseína o valor de  $K_M$  de  $0,761 \text{ mg.mL}^{-1}$  (KEZIA et al., 2011). No substrato azocaseína, a queratinase por *Bacillus* sp. P45 apresentou  $K_M$  de  $2,85 \text{ mg.mL}^{-1}$  (DAROIT et al., 2010). Assim, é possível prever que a enzima queratinase obtida de *Bacillus* sp. P45 purificada e tratada nos protocolos do presente trabalho mostrou uma melhor afinidade pelo substrato azocaseína, verificado pelo valor de  $K_M$  ser inferior a  $2,85 \text{ mg.mL}^{-1}$ .

Um aumento da afinidade também foi evidenciada por Jia, Hu e Huang (2014) para a enzima lipase modificada com vários LI, contendo no meio reacional o líquido iônico [Mmim][CH<sub>3</sub>SO<sub>4</sub>], os valores de K<sub>M</sub> obtidos para a enzima tratada foram inferiores ao da enzima não tratada, o ensaio com menor rendimento apresentou K<sub>M</sub> igual a 0,212 mmol.L<sup>-1</sup> e V<sub>máx</sub> de 98,15 U.g<sup>-1</sup>, enquanto que a enzima não tratada apresentou valor de 0,216 mmol.L<sup>-1</sup> e V<sub>máx</sub> de 30,41 U.g<sup>-1</sup>.

## 6 CONCLUSÃO

A estabilidade térmica e as propriedades catalíticas da enzima tratada em líquidos iônicos foram determinadas, com melhor comportamento para o 1-etil-3-metilimidazólio bis(trifluorometilsulfonil)imida – [Emim][Tf<sub>2</sub>N], de caráter hidrofóbico.

A enzima queratinase quando tratada nos preservativos químicos sorbitol 50% e CaCl<sub>2</sub> 5 mmol.L<sup>-1</sup> apresentou melhor estabilidade durante o tempo de 60 min a 55°C, se comparado com o [Emim][Tf<sub>2</sub>N], porém, na temperatura de 70°C, a estabilidade foi reduzida para 62% da atividade inicial, enquanto que o LI manteve 83%. A meia vida da enzima nos preservativos foi de 6,4 h e 0,5 h, a 55 e 70°C, respectivamente. Para a enzima tratada no LI, a atividade se manteve em torno de 70% durante 32 dias, à 55°C e a meia vida determinada na temperatura de 70°C foi igual a 6,4 h.

De acordo com a análise de DSC, foi constatado que a maior estabilidade termodinâmica da enzima foi quando tratada no LI [Emim][Tf<sub>2</sub>N], conseguindo manter a sua integridade molecular até a temperatura de 143,2°C.

A temperatura e pH ótimos da enzima, na presença dos preservativos sorbitol 50% e CaCl<sub>2</sub> 5 mmol.L<sup>-1</sup> e quando tratada em [Emim][Tf<sub>2</sub>N] foi de 60 e 50°C, 8,5 e 8,0, respectivamente.

Com relação a atividade catalítica, a enzima tratada em 50% (v/v) do LI e acetona, adicionados ao meio reacional na concentração de 2,3% (v/v) do líquido iônico proporcionou o aumento de 1,5 vezes na atividade específica com relação a enzima tratada no mesmo líquido iônico na concentração de 4,5% (v/v) no meio reacional (sem solvente orgânico).

## 7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Estudar diferentes tempos de contato durante o tratamento da enzima no líquido iônico [Emim][Tf<sub>2</sub>N];
- Utilizar as tecnologias de espectro de ressonância magnética – RMN e infravermelho para verificar as alterações ocorridas na molécula da queratinase após o tratamento com líquido iônico;
- Determinar os parâmetros constante de Michaelis-Mentem e velocidade máxima de reação para a enzima sem tratamento, tratada no LI [Emim][Tf<sub>2</sub>N] e na presença dos preservativos químicos sorbitol 50% e CaCl<sub>2</sub> 5 mmol.L<sup>-1</sup>;
- Estudar diferentes concentrações de líquido iônico [Emim][Tf<sub>2</sub>N] e o solvente orgânico acetona juntamente da queratinase na reação de biocatálise de substratos como caseína e farinha de penas;
- Estudar meios de purificação e analisar a funcionalidade dos produtos de hidrólise da reação de biocatálise;
- Obter os estudos de estabilidade da enzima queratinase no meio reacional contendo o LI [Emim][Tf<sub>2</sub>N] e acetona 50%.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDEL-NABY, M. A.; ISMAIL, A. M. S.; AHMED, S. A.; FATTAH, A. F. A. Production and immobilization of alkaline protease from *Bacillus mycooides*. **Bioresource Technology**, v. 64, p. 205-210, 1998.

ABOU-HACHEM, M.; OLSSON, F.; KARLSSON, E. N. Probing the stability of the modular family 10 xylanase from *Rhodothermus marinus*. **Extremophiles**, v. 7, p. 483-491, 2003.

AGUIAR-OLIVEIRA, E.; MAUGERI, F. Thermal stability of the immobilized fructosyltransferase from *Rhodotorula* sp. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 28, n. 03, p. 363-372, 2011.

ALVARES, G. T.; LEMES, A. C.; BRANDELLI, A.; KALIL, S. J. Caracterização parcial de um queratinase obtida do cultivo de *Bacillus* sp. P45 utilizando coproduto agroindustrial. In: 12ª MOSTRA DE PRODUÇÃO UNIVERSITÁRIA. Universidade Federal do Rio Grande, 2013.

ÁLVAREZ, V. H. Á. **Termodinâmica e Aplicações de líquidos iônicos**. Tese de Doutorado. Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química. Campinas, São Paulo, SP, 2010.

ANITHA, T. S.; PALANIVELU, P. Purification and characterization of an extracellular keratinolytic protease from a new isolate of *Aspergillus parasiticus*. **Protein Expression and Purification**, v. 88, p. 214-220, 2013.

ATTRI, P.; VENKATESU, P.; KUMAR, A. Activity and stability of  $\alpha$ -chymotrypsin in biocompatible ionic liquids: enzyme refolding by triethyl ammonium acetate. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 13, p. 2788-2796, 2011.

BACH, E.; SANT'ANNA V.; DAROIT, D. J.; CORRÊA, A. P. F.; SEGALIN, J.; BRANDELLI, A. Production, one-step purification, and characterization of a keratinolytic protease from *Serratia marcescens* P3. **Process Biochemistry**, v. 47, p. 2455-2465, 2012.

BACH, E.; CANNAVAN, F. S.; DUARTE, F. R. S.; TAFFAREL, J. A. S.; TSAI, S. M.; BRANDELLI, A. Characterization of feather-degrading bacteria from Brazilian soils. **International Biodeterioration e Biodegradation**, v. 65, p. 102-107, 2011.

BAILEY, J. E.; OLLIS, D. F. **Biochemical engineering fundamentals**. McGraw-Hill Book, Singapore, 1986.

BÁLINT, B.; BAGI, Z.; TÓTH, A.; RÁKHELY, G.; PEREI, K.; KOVÁCS, K. Utilization of keratin-containing biowaste to produce biohydrogen. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 69, p. 404-410, 2005.

BARRET, A. J.; RAWLINGS, N. D. Perspectives in biochemistry and biophysics: Families and Clans of serine peptidases. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 318, p. 247-250, 1995.

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

BERNAL, C.; CAIRÓ, J.; COELLO, N. Purification and characterization of a novel exocellular keratinase from *Kocuria rosea*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 38, p. 49-54, 2006.

BERTSCH, A.; COELLO, N. A biotechnological process for treatment and recycling poultry feathers as a feed ingredient. **Bioresource Technology**, v. 96, p. 1703-1708, 2005.

Biblioteca Eletrônica Nacional de Medicina. Disponível em: <http://www.nlm.nih.gov>. Acesso em 21 jan. 2015.

BIJINA, B.; CHELLAPPAN, S.; BASHEER, S. M.; ELYAS, K. K.; BAHKALI, A. H.; CHANDRASEKARAN, M. Protease inhibitor from *Moringa oleifera* leaves: Isolation, purification, and characterization. **Process Biochemistry**, n. 46, p. 2291-2300, 2011.

BON, E. P. S.; FERRARA, M. A.; CORVO, M. L. **Enzimas em biotecnologia: Produção, aplicação e mercado**. Interciência: Fundação de Amparo à Pesquisa, UFRJ, Rio de Janeiro, 2008.

BOSE, S.; BARNES, C. A.; PETRICH, J. W. Enhanced stability and activity of cellulose in an ionic liquid and the effect of pretreatment on cellulose hydrolysis. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 109, n. 2, p. 434-443, 2011.

BRANDELLI, A. Bacterial keratinases: useful enzymes for processing agroindustrial wastes and beyond. **Food and Bioprocess Technology**, v. 1, p. 105–116, 2008.

BRANDELLI, A.; DAROIT, D. J.; RIFFEL, A. Mini-Review: Biochemical features of microbial keratinases and their production and applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 85, p.1735-1750, 2010.

BRESSOLLIER, P.; LETOUNEAU, F.; URDACI, M. VERNEUIL, B. Purification and characterization of a keratinolytic serine proteinase from *Streptomyces albidoflavus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n. 6, p. 2570-2576, 1999.

BRUYLANTS, G.; WOUTERS, J.; MICHAUX, C. Differential scanning calorimetry in life science: Thermodynamics, stability, molecular recognition and application in drug design. **Current Medical Chemistry**, v. 12, p. 2011-2020, 2005.

BYRNE, N.; ANGELL, C. A. Protein unfolding, and the “turning in” of reversible intermediate states, in protic ionic liquid media. **Journal of Molecular Biology**, v. 378, p. 707-714, 2008.

CHAUDHARI, P. N.; CHAUDHARI, B. L.; CHINCHOLKAR, S. B. Iron containing keratinolytic metallo-protease produced by *Chryseobacterium gleum*. **Process Biochemistry**, v. 48, p. 144-151, 2013.

CORRÊA, A. P. F.; DAROIT, D. J.; BRANDELLI, A. Characterization of a keratinase produced by *Bacillus* sp. P7 isolated from an Amazonian environment. **International Biodeterioration & Biodegradation**, n. 64, p. 1-6, 2010.

DABIRMANESH, B.; DANESHJOU, S.; SEPAHI, A. A.; RANJBAR, B.; KHAVARINEJAD, R. A.; GILL, P.; HEYDARI, A.; KHAJEH, K. Effect of ionic liquids on the structure, stability and activity of two related  $\alpha$ -amylases. **International Journal of Biological Macromolecules**, n. 48, p. 93-97, 2011.

DANG, T. D.; HA, S. H.; LEE, S.; CHANG, W.; KOO, Y. Enhanced activity and stability of liquid-pretreated lipase. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 45, p. 118-121, 2007.

DAROIT, D. J.; CORRÊA, A. P. F.; BRANDELLI, A. Production of keratinolytic proteases through bioconversion of feather meal by the Amazonian bacterium *Bacillus* sp. P45. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 65, p. 45-51, 2011.

DAROIT, D. J.; SANT' ANNA, V.; BRANDELLI, A. Kinetic stability modelling of keratinolytic protease P45: influence of temperature and metal ions. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 165, p. 1740-1753, 2011.

DAROIT, D. J.; CORRÊA, A. P. F.; SEGALIN, J.; BRANDELLI, A. Characterization of a keratinolytic protease produced by the feather-degrading Amazonian bacterium *Bacillus* sp. P45. **Biocatalysis and Biotransformation**, v.28, n.5-6, p. 370-379, 2010.

DAROIT, D. J.; CORRÊA, A. P. F.; BRANDELLI, A. Keratinolytic potential of a novel *Bacillus* sp. P45 isolated from the Amazon basin fish *Piaractus mesopotamicus*. **International Biodeterioration e Biodegradation**, v. 63, p. 358-363, 2009.

DE DIEGO, T.; LOZANO, P.; GMOUH, S.; VAULTIER, M.; IBORRA, J. L. Understanding structure – Stability relationships of *Candida antarctica* lipase B in ionic liquids. **Biomacromolecules**, v. 6, p. 1457-1464, 2005.

DE DIEGO, T.; LOZANO, P.; GMOUH, S.; VAULTIER, M.; IBORRA, J. L. Fluorescence and CD spectroscopic analysis of the  $\alpha$ -chymotrypsin stabilization by the ionic liquid, 1-ethyl-3-methylimidazolium bis[(trifluoromethyl)sulfonyl]amide. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 88, n. 7, p. 916-924, 2004.

DUPONT, J. On the solid, liquid and solution structural organization of imidazolium ionic liquids. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 15, n. 3, p. 341-350, 2004.

EIJSSINK, V. G. H.; MATTHEWS, B. W.; VRIEND, G. The role of calcium ions in the stability and instability of a thermolysin-like protease. **Protein science**, v. 20, p. 1346-1355, 2011.

EISENMENGER, M.; REYES-DE-CORCUERA, J. I. High pressure enhancement of enzymes: A review. **Enzyme and Microbial Technology**, n. 45, p. 331-347, 2009.

FÁGÁIN, C. Ó. Enzyme stabilization – recent experimental progress. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 33, p. 137-149, 2003.

FÁGÁIN, C. Ó. Understanding and increasing protein stability. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1252, p. 1-14, 1995.

FARAG, A. M.; HASSAN, M. A. Purification, characterization and immobilization of a keratinase from *Aspergillus oryzae*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 34, p. 85-93, 2004.

FOROUGH, F.; KESHAVARZ, T.; EVANS, C. S. Specificities of proteases for use in leather manufacture. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 81, p. 257-261, 2006.

GILL, P.; MOGHADAM, T. T.; RANJBAR, B. Differential scanning calorimetry techniques: applications in biology and nanoscience. **Journal of Biomolecular Techniques**, v. 21, p. 167-193, 2010.

GRADISAR, H.; FRIEDRICH, J.; KRIZAJ, I.; JERALA, R. Similarities and specificities of fungal keratinolytic proteases: comparison of keratinases of *Paecilomyces marquandii* and *Doratomyces microspores* to some known proteases. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, p. 3420-3426, 2005.

GRAZZIOTIN, A.; PIMENTEL, F. A.; SANGALI, S.; de JONG, E. V.; BRANDELLI, A. Production of feather protein hydrolysate by keratinolytic bacterium *Vibrio* sp. kr2. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 3172-3175, 2007.

GHORBEL, B.; SELAMI-KAMOUN, A.; NASRI, M. Stability studies of proteases from *Bacillus cereus* BG1. **Enzyme and Microbial Technology**, n. 32, p. 513-518, 2003.

GUPTA, R.; BEG, Q. K.; LORENZ, P. Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, n. 59, p. 15-32, 2002.

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

GUPTA, R.; RAMNANI, P. Microbial keratinases and their prospective applications: an overview. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 70, p. 21-33, 2006.

HADJ-ALI, N.; AGREBI, R.; GHORBEL-FRIKHA, B.; SELAMI-KAMOUN, A.; KANOUM, S.; NASRI, M. Biochemical and molecular characterization of a detergent stable alkaline serine-protease from a newly isolated *Bacillus licheniformis* NH1. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, p. 515-523, 2007.

HARJU, M.; KALLIOINEN, H.; TOSSAVAINEN, O. Lactose hydrolysis and other conversions in dairy products: Technological aspects. **International Dairy Journal**, v. 22, p. 104-109, 2012.

ILLANES, A. Stability of biocatalysts. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 2, p. 7-15, 1999.

ISMAIL, A. S.; HOUSSEINY, M. M.; ABO-ELMAGD, H. I.; EL-SAYED, N. H.; HABIB, M. Novel keratinase from *Trichoderma harzianum* MH-20 exhibiting remarkable dehairing capabilities. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 70, p. 14-19, 2012.

IYER, P. V.; ANANTHANARAYAN, L. Enzyme stability and stabilization –aqueous and non-aqueous environment. **Process Biochemistry**, v. 43, p. 1019-1032, 2008.

JEONG, J.; LEE, O.; JEON, Y.; KIM, J.; LEE, N.; LEE, C.; SON, H. Production of a keratinolytic enzyme by a newly isolated feather-degrading *Stenotrophomonas maltophilia* that produces plant growth-promoting activity. **Process Biochemistry**, v. 45, p. 1738-1745, 2010.

JIA, R.; HU, Y.; HUANG, H. Improving the catalytic performance of porcine pancreatic lipase in the presence of [MMim][MeSO<sub>4</sub>] with the modification of functional ionic liquids. **Process Biochemistry**, v. 49, p. 668-672, 2014.

JOO, H.; KOO, Y.; CHOI, J.; CHANG, C. Stabilization method of an alkaline protease from inactivation by heat, SDS and hydrogen peroxide. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 36, p. 766-772, 2005.

JURADO, E.; CAMACHO, F.; LUZÓN, G.; VICARIA, J. M. Kinetic models of activity for  $\beta$ -galactosidase: influence of pH, ionic concentration and temperature. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 34, p. 33-40, 2004.

KAAR, J. L.; JESIONOWSKI, A. M.; BERBERICH, J. A.; MOULTON, R.; RUSSELL, A. J. Impact of ionic liquids physical properties on lipase activity and stability. **Journal of the American Chemical Society**, v. 125, p. 4125-4131, 2003.

KAFTZIK, N.; WASSERSCHIED, P.; KRAGL, U. Use of ionic liquids to increase the yield and enzyme stability in the  $\beta$ -galactosidase catalyzed synthesis of *N*-acetyllactosamine. **Organic Process Research & Development**, v. 6, p. 553-557, 2002.

KARBALAEI-HEIDARI, H. R.; SHAHBAZI, M.; ABSALAN, G. Characterization of a novel organic solvent tolerant protease from a moderately halophilic bacterium and its behavior in ionic liquids. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 170, p. 573-586, 2013.

KEZIA, D.; CHANDRAKALA, G.; PRASANTHI, V.; NAIDU, S. V.; NARASIMHA RAO M. Influence of diferente factors on production of purified protease by *Bacillus subtilis* DKMNR. **International Journal of Pharma and Bio sciences**, v. 2, n. 3, p. 73-85, 2011.

KHMELNITSKY, Y. L.; LEVASHOV, A. V.; KLYACHKO, N. L.; MARTINEK, K. Engineering biocatalytic systems in organic media with low water content. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 10, p. 710-724, 1988.

LANGEVELD, J. P. M.; WANG, J.; VAN del WIEL, D. F. M.; SHIH, G. C.; GARSSSEN, G. J.; BOSSERS, A.; SHIH, J. C. H. Enzymatic degradation of prion protein in brain stem from infected cattle and sheep. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 188, p. 1782-1789, 2003.

LAU, R. M.; SORGEDRAGER, M. J.; CARREA, G.; van RANTWIJK, F.; SECUNDO, F.; SHELDON, R. Dissolution of *Candida antarctica* lipase B in ionic liquids: effects on structure and activity. **Green Chemistry**, v. 6, p. 483-487, 2004.

LEÃES, F. L.; VELHO, R. V.; CALDAS, D. G. G.; PINTO, J. V.; TSAI, S. M.; BRANDELLI, A. Influence of pH and temperature on the expression of *sboA* and *ituD* genes in *Bacillus* sp. P11. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 104, p. 149-154, 2013.

LEHNINGER, A.L. **Princípios de Bioquímica**. 3. Ed. São Paulo: Edgard Blucher Ltda, 1232 p., 1997.

LEPOCK, J. R. Measurement of protein stability and protein denaturation in cells using differential scanning calorimetry. **Methods**, v. 35, p. 117-125, 2005.

LETOURNEAU, F.; SOUSSOTTE, V.; BRESSOLLIER, P.; BRANLAND, P.; VERNEUIL, B. Keratinolytic activity of *Streptomyces* sp. S.K<sub>1-02</sub>: a new isolated strain. **Letters in Applied Microbiology**, v. 26, p. 77-80, 1998.

LI-CHAN, E. C. Y.; MA, C. Y. Thermal analysis of flaxseed (*Linum usitatissimum*) proteins by differential scanning calorimetry. **Food Chemistry**, v. 77, p. 495-502, 2002.

LIMA, A. W. O.; ANGNES, L. Biocatálise em meios aquo-restritos: fundamentos e aplicações em química analítica. **Química Nova**, v. 22, n. 2, p. 1-26, 1999.

LIMA, U. de A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. **Biotecnologia Industrial – Processos Fermentativos e enzimáticos**. São Paulo: Edgard Blucher, 2001.

LOZANO, P. Enzymes in neoteric solvents: From one-phase to multiphase systems. **Green Chemistry**, v. 12, p. 555-569, 2010.

LOZANO, P.; DE DIEGO, T.; CARRÍE, D.; VAULTIER, M.; IBORRA, J.L. Over-stabilization of *Candida antartica* lipase B by ionic liquids in ester synthesis. **Biotechnology Letters**, v. 23, p. 1529-1533, 2001.

LUCAS, F. S.; BROENNIMANN, I. F.; HEEB, P. High diversity among feather-degrading bacteria from a dry meadow soil. **Microbial Ecology**, v. 45, p. 282-290, 2003.

MACHADO, M. F.; QUEIRÓS, R. P.; SANTOS, M. D.; FIDALGO, L. G.; DELGADILLO, I.; SARAIVA, J. A. Effect of ionic liquids alkyl chain length on horseradish peroxidase thermal inactivation kinetics and recovery after inactivation. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 30, p. 487-494, 2014.

MACHADO, M. F.; SARAIVA, J. M. Thermal stability and activity regain of horseradish peroxidase in aqueous mixtures of imidazolium-based ionic liquids. **Biotechnology Letters**, v. 27, p. 1233-1239, 2005.

MARCONDES, N. R.; TAIRA, C. L.; VANDRESEN, D. C.; SVIDZINSKI, T. I. E.; KADOWAKI, M. K.; PERALTA, R. M. New feather-degrading filamentous fungi. **Microbial Ecology**, n. 56, p. 13-17, 2008.

MEDEIROS, G. A.; GONÇALVES, S. B.; RODRIGUES, D.S.; NETO, B. A. D. Enzimas e Líquidos Iônicos: Uma combinação promissora para um biodiesel limpo. **Revista Virtual de Química**, n.5, v.1, p. 74-94, 2013.

MICHELS, P. C.; CLARK, D. S. Pressure-enhanced activity and stability of a hyperthermophilic protease from a deep-sea methanogen. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, p. 3985-3991, 1997.

MONIRUZZAMAN, M.; NAKASHIMA, K.; KAMIYA, N.; GOTO, M. Recent advances of enzymatic reactions in ionic liquids. **Biochemical Engineering Journal**, v. 48, p. 295-314, 2010.

MOHORČIČ, M.; TORKAR, A.; FRIEDRICH, J.; KRISTL, J.; MURDAN, S. An investigation into keratinolytic enzymes to enhance ungula drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 332, p. 196-201, 2007.

NAKASHIMA, K.; MARUYAMA, T.; KAMIYA, N.; GOTO, M. Comb-shaped poly(ethylene glycol)-modified subtilisin Carlsberg is soluble and highly active in ionic liquids. **Chemical Communication**, p. 4297-4299, 2005.

NAUSHAD, M.; ALOTHMAN, Z. A.; KHAN, A. B.; ALI, M. Effect of ionic liquid on activity, stability, and structure of enzymes: A review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 51, p. 555-560, 2012.

NIRMAL, N. P.; LAXMAN, R. S. Enhanced Thermostability of a fungal alkaline protease by different additives. **Enzyme Research**, v. 2014, p. 1-8, 2014.

PAGE, M. J.; Di CERA, E. Evolution of peptidase diversity. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 283, p. 30010-30014, 2008.

PARK, S.; KAZLAUKAS, R. J. Biocatalysis in ionic liquids – advantages beyond green technology. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 14, p. 432-437, 2003.

PARK, S.; KAZLAUKAS, R. J. Improved preparation and use of room-temperature ionic liquids in lipase-catalyzed enantio- and regioselective acylations. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 66, p. 8395-8401, 2001.

PATEL, R.; KUMARI, M.; KHAN, A. B. Recent advances in the applications of ionic liquids in protein stability and activity: a review. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 172, p. 3701-3720, 2014.

PAUL, T.; HALDER, S. K.; DAS, A.; BERA, S.; MAITY, C. Exploitation of chicken feather waste as a plant growth promoting agent using keratinase producing novel isolate *Paenibacillus woosongensis* TKB2. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 2, p. 50-57, 2013.

PERSSON, M.; BORNSCHEUER, W. T. Increased stability of an esterase from *Bacillus stearothermophilus* in ionic liquids as compared to organic solvents. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 22, p. 21-27, 2003.

PRAKASH, P.; JAYALAKSHMI, S. K.; SREERAMULU, K. Production of keratinase by free and immobilized cells of *Bacillus halodurans* strain PPKS-2: partial characterization and its application in feather degradation and dehairing of the goat skin. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 160, p. 1909-1920, 2010.

RADHA, S.; GUNASEKARAN, P. Purification and characterizations of keratinase from recombinant *Pichia* and *Bacillus* strains. **Protein Expression and Purification**, v. 64, p. 24-31, 2009.

RAO, C. S.; SATHISH, T.; RAVICHANDRA, P.; PRAKASHAM, R. S. Characterization of thermo- and detergent stable serine protease from isolated *Bacillus circulans* and evaluation of eco-friendly applications. **Process Biochemistry**, v. 44, p. 262-268, 2009.

RAO, M. B.; TANKSALE, A. M.; GHATGE, M. S.; DESHPANDE, V. V. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. **Microbiology and molecular biology reviews**, v. 62, p. 597-635, 1998.

RANTWIJK, F. van; SHELDON, R. A. Biocatalysis in ionic liquids. **Chemical Reviews**, v. 107, p. 2757-2785, 2007.

RIFFEL, A.; BRANDELLI, A.; BELLATO, C. M.; SOUZA, G. H. M. F.; EBERLIN, M. N.; TAVARES, F. C. A. Purification and characterization of a keratinolytic metalloprotease from *Chryseobacterium* sp. kr6. **Journal of Biotechnology**, v. 128, p. 693-703, 2007.

RIFFEL, A.; LUCAS, F.; HEEB, P.; BRANDELLI, A. Characterization of a new keratinolytic bacterium that completely degrades native feather keratin. **Archives of Microbiology**, v. 179, p. 258-265, 2003.

RIFFEL, A.; ORTOLAN, S.; BRANDELLI, A. De-hairing activity of extracellular proteases produced by keratinolytic bacteria. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 78, p. 855-859, 2003.

RODRIGUEZ-NAGALES, J. M.; DELGADILLO, A. Stability and catalytic kinetics of microencapsulated  $\beta$ -galactosidase in liposomes prepared by the dehydration-rehydration method. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 33, p. 15-21, 2005.

SALA, L.; GAUTÉRIO, G. V.; YOUNAN, F. F.; BRANDELLI, A.; MORAES, C. C.; KALIL, S. J. Integration of ultrafiltration into an aqueous two-phase system in the keratinase purification. **Process Biochemistry**, v. 49, p. 2016-2024, 2014.

SANT'ANNA, V.; CORRÊA, A. P. F.; DAROIT, D. J.; BRANDELLI, A. Kinetic modeling of thermal inactivation of the *Bacillus* sp. Protease P7. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v.36, p. 993-998, 2013.

SANTUCCI, R.; LAURENTI, E.; SINIBALDI, F.; FERRARI, R. P. Effect of dimethyl sulfoxide on the structure and the functional properties of horseradish peroxidase as observed by spectroscopy and cyclic voltammetry. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1596, p. 225-233, 2002.

SEREBRYAKOVA, L. T.; ZORIN, N. A.; KARYAKIN, A. A. Improvement of hydrogenase enzyme activity by water-miscible organic solvents. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 44, p. 329-333, 2009.

SHAH, S.; GUPTA, M. Obtaining high transesterification activity for subtilisin in ionic liquids. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1770, p. 94-98, 2007.

SHRINIVAS, D.; KUMAR, R.; NAIK, G. R. Enhanced production of alkaline thermostable keratinolytic protease from calcium alginate immobilized cells of thermoalkalophilic *Bacillus halodurans* JB 99 exhibiting dehairing activity. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 39, p. 93-98, 2012.

SILVEIRA, S. T.; CASARIN, F.; GEMELLI, S.; BRANDELLI, A. Thermodynamics and kinetics of heat inactivation of a novel keratinase from *Chryseobacterium* sp. strain kr6. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 162, p. 548-560, 2010.

SILVEIRA, S. T.; JAEGER, M. K.; BRANDELLI, A. Kinetic data and substrate specificity of a keratinase from *Chryseobacterium* sp. strain kr6. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 84, p. 361-366, 2009.

SYED, D. G.; LEE, J. C.; LI, W.; KIM, C.; AGASAR, D. Production, characterization and application of keratinase from *Streptomyces gulbargensis*. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 1868-1871, 2009.

TARIQ, M. CARVALHO, P. J., COUTINHO, J. A. P.; MARRUCHO, I. M.; LOPES, J. N. C.; REBELO, L. P. N. Viscosity of (C<sub>2</sub>-C<sub>14</sub>) 1-alkyl-3-methylimidazolium bis(trifluoromethylsulfonyl)amide ionic liquids in an extended temperature range. **Fluid Phase Equilibria**, v. 301, p. 22-32, 2011.

TATINENI, R.; DODDAPANENI, K. K.; POTUMARTHI, R. C.; VELLANKI, R. N.; KANDATHIL, M. T.; KOLLI, N.; MANGAMOORI, L. N. Purification and characterization of an alkaline keratinase from *Streptomyces* sp. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 1596-1602, 2008.

THYS, R. C. S.; LUCAS, F. S.; RIFFEL, A.; HEEB, P.; BRANDELLI, A. Characterization of a protease of a feather-degrading *Microbacterium* species. **Letters in Applied Microbiology**, v. 29, p. 181-186, 2004.

UCHANEISHVILI, S.; MAKHARADZE, M.; SHUSHANYAN, M.; ELDIK, R. v.; KHOSHARIYA, D. E. Notable stabilization of  $\alpha$ -chymotrypsin by the protic ionic additive, [ch][dhp]: calorimetric evidence for a fine enthalpy/entropy balance. **International Scholarly Research Notices**, v. 2014, p. 1-6, 2014.

WEINGÄRTNER, H.; CABRELE, C.; HERRMANN, C. How ionic liquids can help to stabilize native proteins. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 14, p. 415-426, 2012.

WISEMAN, A. **Manual de biotecnologia de los enzimas**, Espanha, Zaragoza: Acribia, 1991, p. 444.

WU, Y. T.; PEREIRA, M.; VENÂNCIO, A.; TEIXEIRA, J. Recovery of endopolygalacturonase using polyethylene glycol-salt aqueous two-phase extraction with polymer recycling. **Bioseparation**, v. 9, p. 247-254, 2000.

XIE, F.; CHAO, Y.; YANG, X.; YANG, J.; XUE, Z.; LUO, Y.; QIAN, S. Purification and characterization of four keratinases produced by *Streptomyces* sp. Strain 16 in native human foot skin medium. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 344-350, 2010.

YANG, Z.; PAN, W. Ionic liquids: Green solvents for nonaqueous biocatalysis. **Enzyme and Microbial Technology**, n. 37, p. 19-28, 2005.

YOSHIOKA, M.; MIWA, T.; HORII, H.; TAKATA, M.; YOKOYAMA, T.; NISHIZAWA, K.; WATANABE, M.; SHINAGAWA, M.; MURAYAMA, Y. Characterization of a proteolytic enzyme derived from a *Bacillus* strain that effectively degrades prion protein. **Journal of Applied Microbiology**, v. 102, p. 509-515, 2007.

ZHAO, H.; OLUBAJO, O.; SONG, Z.; SIMS, A. L.; PERSON, T. E.; LAWAL, R. A.; HOLLEY, L. A. Effect of kosmotropicity of ionic liquids on the enzyme stability in aqueous solutions. **Bioorganic Chemistry**, v. 34, p. 15-25, 2006.

ZHAO, H. Effect of ion and other compatible solutes on enzyme activity, and its implication for biocatalysis using ionic liquids. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 37, p. 16-25, 2005.