



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CAMPUS FLORIANÓPOLIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

Clara Mariana Barros Calado

Imobilização de Bromelina e Papaína em Óxido de Grafeno: Avaliação do Derivado Enzimático como Agente Antimicrobiano e na Biotransformação de Tetraciclina

Florianópolis

2023

Clara Mariana Barros Calado

Imobilização de Bromelina e Papaína em Óxido de Grafeno: Avaliação do Derivado Enzimático como Agente Antimicrobiano e na Biotransformação de Tetraciclinas

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial para a obtenção do título de Doutora em Engenharia Química.

Orientador: Prof. Dr. Agenor Furigo Júnior
Coorientadora: Dr. Rosana Oliveira Henriques

Florianópolis

2023

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Calado, Clara Mariana Barros
Imobilização de Bromelina e Papaína em Óxido de Grafeno:
Avaliação do Derivado Enzimático como Agente Antimicrobiano
e na Biotransformação de Tetraciclina / Clara Mariana
Barros Calado ; orientador, Agenor Furigo Junior,
coorientadora, Rosana Oliveira Henriques, 2023.
125 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro Tecnológico, Programa de Pós-Graduação em
Engenharia Química, Florianópolis, 2023.

Inclui referências.

1. Engenharia Química. 2. Imobilização Enzimática. 3.
Óxido de Grafeno. 4. Agente Antimicrobiano. 5.
Biotransformação de Tetraciclina. I. Junior, Agenor
Furigo. II. Henriques, Rosana Oliveira. III. Universidade
Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em
Engenharia Química. IV. Título.

Clara Mariana Barros Calado

Título: Imobilização de Bromelina e Papaína em Óxido de Grafeno: Avaliação do Derivado Enzimático como Agente Antimicrobiano e na Biotransformação de Tetraciclinas

O presente trabalho em nível de Doutorado foi avaliado e aprovado, em 22 de maio de 2023, pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Wiaslan Figueiredo Martins, Dr.
Instituição Instituto Federal Goiano

Prof.(a) Camila Michels, Dr.(a)
Instituição Universidade Federal de Santa Catarina

Pesquisadora Karina Cesca, Dr.(a)
Instituição Universidade Federal de Santa Catarina

Certificamos que esta é a versão original e final do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de Doutora em Desenvolvimento de Processos Químicos e Biotecnológicos.

Insira neste espaço a
assinatura digital

Coordenação do Programa de Pós-Graduação

Insira neste espaço a
assinatura digital

Prof. Agenor Furigo Junior, Dr.
Orientador

Florianópolis, 2023.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus que sempre me fortaleceu a cada dia, conferindo saúde física e mental, colocando pessoas maravilhosas na minha jornada.

Aos meus pais, Laura e Paulo, por se fazerem tão presentes mesmo com toda distância, me apoiando, incentivando e, principalmente, por todo amor incondicional. Obrigada por serem meu porto seguro. E aos meus irmãos Paulo Henrique e Leonardo Augusto, por serem meus grandes amigos.

Ao meu orientador, professor doutor Agenor Furigo Júnior, pela oportunidade, confiança e pela contribuição para o meu crescimento pessoal e profissional. Obrigada por ser um exemplo de gentileza, paciência e bom humor.

À coorientadora Dr^a Rosana Henriques pela contribuição no desenvolvimento desse trabalho.

Aos membros da banca examinadora, por aceitarem o convite e contribuírem para a melhoria desse trabalho.

Ao amigo e IC, Alberto Flemming, por toda dedicação e ajuda durante 3 longos anos.

Aos amigos Alessandro, Ana Dejan, Jeovandro, José Luiz e Marcelo, pelos bons momentos passados juntos, por todos os cafés e risadas. À Deise Tramontin pelo inventivo e disponibilidade, pelos momentos de cafés com bolos, chopes com fritas, risadas e fofocas. À Flávia pela amizade improvável que perdura por anos, obrigada dona baratinha.

Aos amigos Jaízia Santos, Sandra Seo e Thalles Canton pelos momentos de risadas, troca de conhecimentos, disponibilidade e gentileza. Amigos e companheiros de Covid-19.

À Danielle Severo, a quem nunca irei agradecer o suficiente. Obrigada por sua generosidade em dividir seu conhecimento, pela disponibilidade em ajudar e pela amizade construída ao longo desses anos. Por confiar e me permitir fazer parte da vida de Leon e Ágatha, eternos nenéns que titia ama. Você foi fundamental no desenvolvimento deste trabalho.

À Universidade Federal de Santa Catarina, especialmente ao Programa de Pós-Graduação de Engenharia Química.

Ao secretário da Pós-Graduação, Edevilson Silva, por sua disposição em ajudar.

À CAPES pelo apoio financeiro.

A todos, o meu muito obrigada.

RESUMO

Neste estudo foi sintetizado e caracterizado óxido de grafeno (OG) para imobilização das proteases bromelina e papaína para aplicação como agente antimicrobiano e na biotransformação de tetraciclinas. A obtenção de OG foi realizada pelo método de Hummers modificando a etapa de filtração por liofilização. O OG foi caracterizado quimicamente pela determinação dos elementos químicos, das ligações e dos grupos funcionais, oxidação do grafite em OG, cristalinidade e estabilidade da suspensão. A caracterização microestrutural foi realizada por imagens de microscopia eletrônica de varredura e de transmissão. Os derivados enzimáticos foram obtidos imobilizando-se bromelina (B) e papaína (P) em óxido de grafeno (B-OG e P-OG) e em óxido de grafeno funcionalizado com glutaraldeído (B-OG-Glu e P-OG-Glu) a 25 °C e pH 7. Foram estudadas 3 diferentes razões m/m (1:1; 2:1 e 3:1) de enzima mantendo-se constante a massa de OG e o volume da solução. Ambos os processos de imobilização atingiram o equilíbrio de imobilização em 30 min e, a razão 1:1 teve toda a massa de enzima inicial transferida para o OG independente da enzima. A caracterização das enzimas livres e seus derivados enzimáticos mostrou que a temperatura de 50 °C foi a melhor para a atividade enzimática, enquanto o pH variou entre 6 para B-OG e P-L, e 7 para bromelina livre, B-OG-Glu, P-OG e P-OG-Glu. Imagens de microscopia eletrônica de transmissão (MET) mostraram presença das enzimas nas nanofolhas de OG. As enzimas e seus derivados possuem estabilidade térmica a 50 °C por no mínimo 4 h e, melhor desempenho de estabilidade de estocagem a 4 °C, de 14 dias para a bromelina livre e 24 dias para P-OG-Glu mantendo 50% da atividade inicial. Quanto ao reuso, B-OG e B-OG-Glu mantiveram 50% de atividade por 5 e 2 ciclos, e P-OG e P-OG-Glu por 4 ciclos, respectivamente. Parâmetros cinéticos segundo modelo de Michaelis-Menten indicam aumento da afinidade entre substrato e enzima quando imobilizadas com glutaraldeído. As enzimas livres e B-OG e P-OG obtiveram resultados promissores como agentes antimicrobianos contra *Escherichia coli* em ensaios realizados a 25 °C em meio BHI em pH 7 e em suco comercial de maçã em pH 4. Em todas as análises em meio BHI e em suco utilizando os derivados foi observado Fenômeno Fênix e que o OG possui comportamento sinérgico com as enzimas, retardando o desenvolvimento das células bacterianas. As análises em suco mostraram menor ação antimicrobiana das enzimas quando comparadas ao meio BHI. Ambos os derivados enzimáticos apresentam resultados promissores como agente antimicrobiano. Ao serem aplicados como agentes biotransformadores de tetraciclinas, as enzimas livres e seus derivados não obtiveram desempenho satisfatório, obtendo no máximo 18% de biotransformação da tetraciclina após 10 h utilizando bromelina livre em pH 6 a 25 °C. O efeito da temperatura na biotransformação foi analisado com cinética a 40 °C. Os fármacos se mostraram susceptíveis a hidrólise térmica evidenciado pelo escurecimento da solução dos fármacos, principalmente da oxitetraciclina. Assim, o desenvolvimento dos derivados de bromelina e papaína é viável, sua aplicação como agente antimicrobiano é satisfatório. Quanto a biotransformação de tetraciclinas se faz necessária uma maior investigação.

Palavras-chave: Óxido de Grafeno; Imobilização; Tetraciclinas; *Escherichia coli*; Biotransformação de Fármacos.

ABSTRACT

In this study, graphene oxide (GO) was synthesized and characterized for the immobilization of bromelain and papain proteases as an antimicrobial agent and in the biotransformation of tetracyclines. The GO was obtained by the modified Hummers method, with the filtration step being replaced by lyophilization. The GO was chemically characterized by determining the chemical elements, bonds, and functional groups, graphite oxidation to GO, crystallinity, and suspension stability. Microstructural characterization was performed using scanning and transmission electron microscopy images. The enzyme derivatives were obtained by immobilizing bromelain (B) and papain (P) on graphene oxide (B-OG and P-OG) and graphene oxide functionalized with glutaraldehyde (B-OG-Glu and P-OG-Glu) at 25°C and pH 7. Three different enzyme-to-OG mass ratios (1:1, 2:1, and 3:1) were studied, keeping the OG mass and solution volume constant. Both immobilization processes reached immobilization equilibrium within 30 min, and the 1:1 ratio resulted in all initial enzyme mass being transferred to the OG, regardless of the enzyme. Characterization of the free enzymes and their enzyme derivatives showed that the optimal temperature for enzymatic activity was 50°C, while the pH varied between 6 for B-OG and P-L, and 7 for free bromelain, B-OG-Glu, P-OG, and P-OG-Glu. Transmission electron microscopy (TEM) images showed the presence of enzymes on the nanosheets of OG. The enzymes and their derivatives had thermal stability at 50°C for at least 4 h and better storage stability performance at 4°C, with free bromelain maintaining 50% of initial activity for 14 days, and P-OG-Glu for 24 days. Regarding reuse, B-OG and B-OG-Glu maintained 50% of activity for 5 and 2 cycles, respectively, while P-OG and P-OG-Glu maintained it for 4 cycles. Kinetic parameters, according to the Michaelis-Menten model, indicate an increase in substrate-enzyme affinity when immobilized with glutaraldehyde. Free enzymes and B-OG and P-OG showed promising results as antimicrobial agents against *Escherichia coli* in assays performed at 25°C in BHI medium at pH 7 and in commercial apple juice at pH 4. In all BHI and juice assays using the derivatives, the Phoenix Phenomenon was observed, and OG exhibited synergistic behavior with the enzymes, delaying the development of bacterial cells. The analyses in juice showed lower antimicrobial action of the enzymes compared to BHI broth. Both enzymatic derivatives show promising results as antimicrobial agents. However, when applied as biotransformation agents for tetracyclines, the free enzymes and their derivatives did not perform satisfactorily, achieving a maximum of 18% tetracycline biotransformation after 10 hours using free bromelain at pH 6 and 25 °C. The effect of temperature on biotransformation was analyzed with kinetics at 40 °C. The drugs proved susceptible to thermal hydrolysis, evidenced by the darkening of the drug solution, especially oxytetracycline. Thus, the development of bromelain and papain derivatives is viable, and their application as antimicrobial agents is satisfactory. Further investigation is needed regarding the biotransformation of tetracyclines.

Keywords: Graphene oxide; Immobilization; Tetracyclines; *Escherichia coli*; Drug biotransformation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura do grafeno e alguns alótropos: (a) Fulerenos, (b) Nanotubos de carbono, (c) Grafeno e (d) Grafite 3D	27
Figura 2 - Estrutura molecular do óxido de grafeno.....	28
Figura 3 - Estrutura molecular da tetraciclina	35
Figura 4 - Estrutura molecular da oxitetraciclina	35
Figura 5 - Indicação dos grupos funcionais onde as enzimas papaína e bromelina atuam	36
Figura 6 - Espectros de UV-vis para diferentes concentrações de óxido de grafeno	58
Figura 7 - Banda G e D do óxido de grafeno por espectroscopia Raman	60
Figura 8 - Espectrograma por FTIR do óxido de grafeno	60
Figura 9 - Espectrograma obtido por DRX do óxido de grafeno	61
Figura 10 - Microestrutura do óxido de grafeno obtida por MEV	62
Figura 11 - Microestrutura das nanofolhas do óxido de grafeno obtida pelo MET	62
Figura 12 - Potencial elétrico do óxido de grafeno para pHs entre 2 e 9,8	63
Figura 13 - Atividade relativa da enzima bromelina livre (B-L) e os derivados B-OG (sem glutaraldeído) e B-OG-Glu (com glutaraldeído) para pHs entre 6 e 9 e temperaturas fixas em 25, 30, 40 ou 50 °C.....	70
Figura 14 - Atividade relativa da enzima papaína livre (P-L) e os derivados P-OG (sem glutaraldeído) e P-OG-Glu (com glutaraldeído) para pHs entre 6 e 9 e temperaturas fixas em 25, 30, 40 ou 50 °C.....	71
Figura 15 - Influência do pH e temperatura na relação entre a atividade específica da bromelina nos derivados enzimáticos e a atividade específica em solução na forma livre (a_{if})	73
Figura 16 - Influência do pH e temperatura na relação entre a atividade específica da papaína nos derivados enzimáticos e a atividade específica em solução na forma livre (a_{if})	74
Figura 17 - Microestrutura dos derivados B-OG, B-OG-Glu, P-O e P-OG-Glu obtidas por MET.	75
Figura 18 - Estabilidade térmica à 50 °C e pH 7 da: A) bromelina livre (B-L) e seus derivados sem glutaraldeído (B-OG) e com glutaraldeído (B-OG-Glu) e, B) papaína livre (P-L) e seus derivados sem glutaraldeído (P-OG) e com glutaraldeído (P-OG-Glu).....	76
Figura 19 - Estabilidade de estocagem à 4 °C referentes a bromelina livre (B-L) a pH 7, o derivado B-OG a pH 6 e o derivado B-OG-Glu a pH 7	77

Figura 20 - Estabilidade de estocagem à 4 °C referentes papaína livre (P-L) a pH 6, P-OG a pH 7 e P-OG-Glu a pH 7	78
Figura 21 - Cinéticas de crescimento da <i>E. coli</i> a 25 °C em meio BHI e pH 7 utilizando bromelina livre nas concentrações de A)1 g·L ⁻¹ , B) 2 g·L ⁻¹ , C)10 g·L ⁻¹ , D)12 g·L ⁻¹ e E) 15 g·L ⁻¹	81
Figura 22 - Cinéticas de crescimento da <i>E. coli</i> a 25 °C em meio BHI e pH 7 utilizando papaína livre nas concentrações de A) 1 g·L ⁻¹ , B) 2 g·L ⁻¹ , C) 5 g·L ⁻¹ , D) 8 g·L ⁻¹ e E) 10 g·L ⁻¹	84
Figura 23 - Cinéticas de crescimento da <i>E. coli</i> a 25 °C em meio BHI e pH 7 utilizando bromelina livre e o derivado B-OG nas concentrações de proteína de 1 e 2 g·L ⁻¹	86
Figura 24 - Cinéticas de crescimento da <i>E. coli</i> a 25 °C em meio BHI e pH 7 utilizando papaína livre e o derivado P-OG nas concentrações de 1 e 2 g·L ⁻¹	89
Figura 25 - Cinéticas de crescimento da <i>E. coli</i> a 25 °C em suco de maçã comercial e pH 4 utilizando bromelina livre e o derivado B-OG nas concentrações de 1 e 2 g·L ⁻¹	91
Figura 26 - Cinéticas de crescimento da <i>E. coli</i> a 25 °C em suco de maçã comercial e pH 4 utilizando papaína livre e o derivado P-OG nas concentrações de 1 e 2 g·L ⁻¹	93
Figura 27 - Biotransformação de tetraciclina (TC) utilizando bromelina livre a 25 °C para valores de pH em 3,5, 6 e 7	95
Figura 28 - Biotransformação de tetraciclina (TC) utilizando papaína livre a 25 °C para valores de pH em 3,5, 6 e 7.....	96
Figura 29 - Biotransformação de tetraciclina e oxitetraciclina utilizando bromelina (B) e papaína (P) livre à 25 e 40 °C para pH 6	97
Figura 30 - Coloração do fármaco oxitetraciclina (OTC) à 25 e 40 °C em pH 7 no início da reação e após 5, 10 e 24 h para amostras com e sem bromelina (B) e papaína (P).....	98
Figura 31 - Coloração do fármaco tetraciclina (TC) à 25 e 40 °C em pH 7 ao início da reação e após 5, 10 e 24 horas h para amostras com e sem bromelina (B) e papaína (P).....	98
Figura 32 - Espectros de UV-vis de tetraciclina puro (TC), tetraciclina com papaína (TC-P) e tetraciclina com bromelina (TC-B) para 25 e 40 °C	99
Figura 33 - Espectros de UV-vis de oxitetraciclina puro (OTC), oxitetraciclina com bromelina (OTC-B) e oxitetraciclina com papaína (OTC-P) para 25 e 40 °C	100
Figura 34 - Modificação do carbono quiral da oxitetraciclina e tetraciclina para formação dos epímeros	101
Figura 35 - Biotransformação de tetraciclina (TC) e oxitetraciclina (OTC) utilizando o derivado enzimático B-OG à 25 °C e pH 7	101

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Divisão das enzimas por ordem, classe, subclasses e tipos de reações catalisadas.	21
Tabela 2 - Principais trabalhos da literatura utilizando bromelina na forma livre e/ou imobilizada	36
Tabela 3 - Principais trabalhos da literatura utilizando papaína na forma livre e/ou imobilizada	41
Tabela 4 - Principais trabalhos da literatura utilizando enzimas na forma livre e/ou imobilizada como agente antimicrobiano e biotransformador de fármacos.....	45
Tabela 5 - Bandas G e D características do óxido de grafeno (OG) obtidas por outros autores	59
Tabela 6 - Massa de bromelina e papaína adsorvida em óxido de grafeno (OG) durante 2 h a 25 °C e pH 7	64
Tabela 7 - Massa de bromelina e papaína adsorvida em óxido de grafeno (OG) funcionalizado com glutaraldeído durante 2 h a 25 °C e pH 7	65
Tabela 8 - Valores de concentração de enzima livre inicial ($C_f, 0$) e após imobilização (C_f, t) em solução, a concentração de enzima no óxido de grafeno (OG) e em óxido de grafeno funcionalizado (OG-Glu) $-qE-$ e o rendimento de imobilização por proteína (Y_p) para a enzima bromelina durante o processo de imobilização.....	66
Tabela 9 - Valores de concentração, em solução, de enzima livre inicial ($C_f, 0$) e após imobilização (C_f, t), a concentração de enzima no óxido de grafeno (OG) e óxido de grafeno funcionalizado (OG-Glu) $-qE-$ e o rendimento de imobilização por proteína (Y_p) para a enzima papaína durante o processo de imobilização	68
Tabela 10 - Valores de rendimento de imobilização por atividade específica (Y_a) e a eficiência de imobilização (E) para os derivados enzimáticos da bromelina e da papaína durante o processo de imobilização em óxido de grafeno (B-OG e P-OG) e em óxido de grafeno funcionalizado com glutaraldeído (B-OG-Glu e P-OG-Glu)	69
Tabela 11 - Parâmetros cinéticos para a enzima bromelina (B-L) e o derivado enzimático (B-OG-Glu) em pH 7, papaína livre (P-L) em pH 6 e o derivado enzimático (P-OG-Glu) em pH 7, todos à 50 °C	79
Tabela 12 - Redução da concentração de células de <i>E. coli</i> em log UFC·mL ⁻¹ para as concentrações de bromelina de 1, 2, 10, 12, 15 g·L ⁻¹ e crescimento celular da bactéria para o controle em relação concentração celular inicial para cada inóculo a 25 °C e pH 7.....	83

Tabela 13 - Redução da concentração de células de <i>E. coli</i> em log UFC·mL ⁻¹ para as concentrações de papaína de 1, 2, 5, 8 e 10 g·L ⁻¹ e crescimento celular da bactéria para o controle em relação concentração celular inicial para cada inóculo em meio BHI a 25 °C e pH 7	85
Tabela 14 - Redução da concentração de células de <i>E. coli</i> em log UFC·mL ⁻¹ para as concentrações 1 e 2 g·L ⁻¹ para bromelina livre e o derivado físico B-OG e crescimento celular da bactéria para o controle em relação à concentração celular inicial para cada inóculo em meio BHI a 25 °C e pH 7.....	88
Tabela 15 - Redução da concentração de células de <i>E. coli</i> em log UFC·mL ⁻¹ para as concentrações 1 e 2 g·L ⁻¹ para papaína livre e o derivado físico P-OG e crescimento celular da bactéria para o controle em relação concentração celular inicial para cada inóculo em meio BHI a 25 °C e pH 7	90
Tabela 16 - Redução da concentração de células de <i>E. coli</i> em log UFC·mL ⁻¹ para as concentrações 1 e 2 g·L ⁻¹ para bromelina e papaína livres e seus respectivos derivados físicos e crescimento celular da bactéria para o controle em relação concentração celular inicial para cada inóculo em suco comercial de maçã a 25 °C e pH 4	94

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABTS	Ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico)
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
B-OG	Imobilizado de Bromelina em Óxido de Grafeno
B-OG-Glu	Imobilizado de Bromelina em Óxido de Grafeno com Glutaraldeído
BHI	<i>Brain Heart Infusion Broth</i>
BOD	<i>Biologic Oxygen Demand</i>
BSA	Albumina de Soro Bovina
CDC	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
CMRVS	Coleção de Microrganismos de Referência em Vigilância Sanitária
DPPH	2,2-difenil-1-picril-hidrazil
DRX	Difração de Raios X
DTAs	Doenças Transmitidas por Alimentos
EC	<i>Enzyme Commission</i>
EDX	Energia Dispersiva de Raio-X
FRAP	<i>Ferric Reducing Antioxidant Power</i>
FTIR	Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier
IUMB	<i>International Union Of Biochemistry And Molecular Biology</i>
MET	Microscopia Eletrônica de Transmissão
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
OG	Óxido de Grafeno
ORAC	<i>Oxygen Radical Absorbance Capacity</i>
OTC	Oxitetraciclina
P.A.	Pureza Analítica
PCA	<i>Plate Count Agar</i>
P-OG	Imobilizado de Papaína em Óxido de Grafeno
P-OG-Glu	Imobilizado de papaína em Óxido de Grafeno com glutaraldeído
RNA	Ácido Ribonucleico
TC	Tetraciclina
TCA	Ácido Tricloroacético
UFC	Unidades Formadoras de Colônia

UNESCO *United Nations Educational, Scientific and Cultural Organization*
UV-vis Ultravioleta na Região Visível

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
1.1	OBJETIVOS	17
1.1.1	Objetivo Geral	17
1.1.2	Objetivos Específicos	18
1.2	DIAGRAMA CONCEITUAL.....	18
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	21
2.1	ENZIMAS	21
2.2	ÓXIDO DE GRAFENO	26
2.3	APLICAÇÕES PROPOSTAS	29
2.3.1	Ação Antimicrobiana da Bromelina e Papaína	29
2.3.2	Biotransformação via Enzimática de Contaminantes Emergentes	31
2.4	ESTADO DA ARTE	36
2.4.1	Bromelina	36
2.4.2	Papaína	40
2.4.3	Enzimas como Agentes Antimicrobianos e Biotransformadoras de Fármacos 44	
3	MATERIAL E MÉTODOS	48
3.1	MATERIAL.....	48
3.2	METODOLOGIA.....	48
3.2.1	Síntese do Óxido de Grafeno	48
3.2.2	Caracterização do Óxido de Grafeno	50
3.2.2.1	<i>Preparação das amostras líquidas</i>	50
3.2.2.2	<i>Caracterização química do OG</i>	50
3.2.2.3	<i>Caracterização microestrutural das nanofolhas de OG</i>	51
3.2.3	Caracterização da Enzima Livre e Imobilizada	51
3.2.3.1	<i>Determinação da atividade enzimática e parâmetros cinéticos</i>	51
3.2.3.2	<i>Imobilização enzimática</i>	52
3.2.3.3	<i>Avaliação de estabilidade dos derivados</i>	55
3.2.4	Atividade Antimicrobiana das Enzimas	56
3.2.4.1	<i>Preparação do inóculo</i>	56
3.2.4.2	<i>Preparação do derivado enzimático para análise da atividade antimicrobiana</i>	56
3.2.4.3	<i>Análise da atividade antimicrobiana da papaína e da bromelina</i>	56

3.2.5	Biotransformação via Enzimática dos Fármacos	57
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	58
4.1	CARACTERIZAÇÃO DO ÓXIDO DE GRAFENO	58
4.2	CARACTERIZAÇÃO DA ENZIMA LIVRE E IMOBILIZADA.....	63
4.2.1	Caracterização dos Processos de Imobilização	63
4.2.2	Caracterização da Atividade Enzimática dos Derivados.....	69
4.2.3	Avaliação da Estabilidade dos Derivados Enzimáticos.....	75
4.3	ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DAS ENZIMAS	80
4.3.1	Avaliação da Atividade Antimicrobiana das Enzimas Livres.....	80
4.3.2	Avaliação da Atividade Antimicrobiana das Enzimas Livres e Derivados Enzimáticos em Meio BHI	86
4.3.3	Avaliação da Atividade Antimicrobiana das Enzimas Livres e Derivados Enzimáticos no Suco de Maçã	90
4.4	BIOTRANSFORMAÇÃO DOS FÁRMACOS VIA ENZIMÁTICA.....	94
4.4.1	Biotransformação de Tetraciclina via Enzimática em Função do pH do Meio	94
4.4.2	Biotransformação de Tetraciclina e Oxitetraciclina via Enzimática em Função da Temperatura	97
4.4.3	Biotransformação de Tetraciclina e Oxitetraciclina via Derivado Enzimático de Bromelina	101
5	CONCLUSÕES.....	103
6	SUGESTÕES	105
	REFERÊNCIA.....	106

1 INTRODUÇÃO

A utilização de processos verdes, seja na síntese e desenvolvimento de novos produtos ou na modificação de processos existentes, faz com que pesquisadores busquem alternativas de fácil aplicação e baixo custo de implementação.

Nessa vertente, nas últimas décadas tem-se investigado as propriedades das enzimas, seja de origem animal, vegetal ou microbiana para aplicações diversas, desde tratamentos estéticos, fabricação de biossensores, como em indústrias de alimentos, farmacêuticas e em sistemas de tratamento de efluentes. As enzimas vegetais, em geral, são mais abundantes e de menor custo, sendo a papaína e a bromelina as enzimas mais utilizadas em processos industriais como amaciante de carnes, clarificante de bebidas como sucos, vinhos e cervejas, e em cosméticos como esfoliante. Ambas são obtidas em grande quantidade e com baixo custo devido a fonte de extração.

Assim como esta pesquisa, estudos visam melhorar as características e estabilidade das enzimas livres (atividade, pH e temperatura de atuação) por meio da imobilização em suportes e para facilitar sua recuperação visando reduzir custos de processos industriais que fazem uso dessa tecnologia. A busca por novos suportes faz com que pesquisadores desenvolvam materiais ou realizem combinações de materiais conhecidos para obtenção de características mecânicas e de interação suporte-enzima diferenciadas. Dentre os novos materiais tem-se o óxido de grafeno que apresenta diversas características atrativas como alta flexibilidade, solubilidade em água, elevada área superficial e presença de grupos funcionais como epóxi, hidroxila e ácido carboxílico que facilitam o processo de imobilização.

Existem diversas aplicações para um novo derivado suporte-enzima, incluindo seu uso como agente antimicrobiano e na biotransformação de fármacos.

Diversas bactérias patogênicas ou com potencial de patogenicidade podem estar presentes em alimentos, o que torna essencial o cuidado em torno da higiene e segurança de alimentos para garantir ao consumidor alimentos seguros de qualidade. Devido à sensibilidade de muitas substâncias presentes nos alimentos, tais como compostos fenólicos e vitaminas, a tratamentos térmicos, têm-se buscado alternativas a esses tratamentos. O potencial das enzimas para emprego em processamentos a frio tem sido usado na eliminação de diversas bactérias como *Listeria monocytogenes*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter* sp., *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, entre outras.

Além disso, enzimas têm sido exploradas como agente biotransformador de contaminantes emergentes. Esses são substâncias geralmente não monitoradas e sem legislação regulatória, que mesmo em pequenas concentrações podem trazer risco à saúde humana, a fauna e a flora terrestre e aquática. Entre esses estão os componentes de cosméticos, os produtos de limpeza, os herbicidas e os fármacos de uso humano e veterinário. Os resíduos de compostos farmacêuticos, em geral, são resistentes à biotransformação, de modo a maximizar o período em que exercem efeito terapêutico. Essa resistência faz com que em processos de degradação desses compostos, no meio ambiente por microrganismos naturais ou em estações de tratamento com microrganismos mais adaptados, sejam considerados ambientalmente persistentes o que pode levar a geração cepas de bactérias mais resistentes. A geração de cepas de bactérias patogênicas resistentes a fármacos traz preocupação aos cientistas e as instituições governamentais de monitoramento e proteção a saúde da população devido aos riscos de epidemias, pandemias e alto custo aos programas de saúde pública do país.

Diante dessa problemática, o objetivo desse estudo foi imobilizar as enzimas bromelina e papaína em óxido de grafeno. Essas enzimas foram selecionadas devido ao alto volume de produção e baixo custo quando comparadas a tantas outras e, o óxido de grafeno foi selecionado como suporte por possui grupos funcionais que facilitam a imobilização sem a obrigatoriedade do uso de substâncias ativadoras e/ou ligantes, além de dispersão em água e grande área superficial. O uso dos derivados suporte-enzima foi avaliado como agente antimicrobiano para aplicação em processamento de sucos e na biotransformação dos antibióticos tetraciclina e oxitetraciclina.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

Objetivou-se com o desenvolvimento deste trabalho, investigar a imobilização das enzimas bromelina e papaína em nanofolhas de óxido de grafeno, com o propósito de avaliar o desempenho do derivado enzimático como agente antimicrobiano e na biotransformação dos antibióticos tetraciclina e oxitetraciclina.

1.1.2 Objetivos Específicos

- Sintetizar e caracterizar nanofolhas de óxido de grafeno;
- Imobilizar as enzimas bromelina e papaína, com e sem ligante glutaraldeído, em nanofolhas de óxido de grafeno;
- Analisar a estabilidade das enzimas livres e imobilizadas frente ao pH, temperatura, reuso e tempo de estocagem;
- Analisar a ação das enzimas livres e imobilizadas como agentes antimicrobianos contra a bactéria *Escherichia coli* em meio de cultura BHI e em suco de maçã industrializado;
- Avaliar a biotransformação dos antibióticos tetraciclina e oxitetraciclina em meio aquoso via enzimas livres;
- Avaliar a biotransformação dos antibióticos via bromelina imobilizada em óxido de grafeno funcionalizado com glutaraldeído.

1.2 DIAGRAMA CONCEITUAL

Imobilização de Bromelina e Papaína em Óxido de Grafeno: Avaliação do Derivado Enzimático como Agente Antimicrobiano e na Biotransformação de Tetraciclina

Por que? Para que?

A imobilização enzimática é uma ferramenta útil para a recuperação e reuso das enzimas em processos contínuos e descontínuos reduzindo o custo para aplicações industriais. Ao utilizar óxido de grafeno como suporte excluímos a obrigatoriedade do uso de agentes para promover ligação entre a enzima e o suporte em função dos grupos funcionais presentes em sua superfície, além da ampla área superficial.

As enzimas papaína e bromelina encontram ampla aplicação em indústrias alimentícias, farmacêuticas e cosméticas. Assim, a proposta é utilizar estes derivados enzima-suporte como agente antimicrobiano em processamento de suco, visto que essas enzimas possuem outras aplicações em bebidas como espessantes e clarificantes e podem atuar de forma conjunta a esses processos e, avaliar os derivados quanto ao

tratamento de efluentes para degradação de contaminantes emergentes, em específico, antibióticos da família tetraciclina.

Quem já fez?

Não há relatos na literatura sobre imobilização de bromelina em óxido de grafeno (OG) até o presente momento e há apenas um trabalho de imobilização de papaína em OG. Esse trabalho é do ano de 2018, no qual foi estudado a imobilização da papaína em OG utilizando 3-aminopropiltriétoxissilano (APTES) para funcionalizar a superfície do OG. Gu *et al.* (2018), estudaram o efeito da temperatura e do pH na imobilização, porém não demonstraram para qual aplicação esse derivado poderia ser utilizado.

Existem alguns estudos aplicando a enzima pura ou extratos obtidos das folhas do mamoeiro, das cascas de mamão e extratos das cascas de abacaxi como agentes antimicrobianos, porém em meio de cultura e em biofilmes de algumas bactérias patogênicas e/ou com potencial de patogenicidade. No entanto, não há relatos da aplicação dessas enzimas livre ou imobilizadas em OG como agente antimicrobiano diretamente em sucos.

Também não há registros da aplicação de bromelina e papaína, livre ou imobilizada, no tratamento de efluentes como biotransformadores dos antibióticos tetraciclina e oxitetraciclina.

Hipóteses

A modificação da etapa de filtração e secagem por liofilização na síntese de OG a partir do método de Hummers não altera as características químicas do nanomaterial.

É possível obter altas concentrações de enzimas no suporte ao imobilizar papaína e bromelina em OG para obter um derivado suporte-enzima que seja estável frente à temperatura, pH, reuso e tempo de estocagem.

O derivado suporte-enzima pode apresentar ação antimicrobiana contra bactérias potencialmente patogênicas.

O derivado suporte-enzima pode atuar como agente biotransformador dos fármacos tetraciclina e oxitetraciclina em compostos de menor toxicidade por meio da atividade enzimática.

Metodologia Científica

Caracterização do suporte: a caracterização química foi realizada por meio da determinação dos elementos químicos, identificação das ligações, dos grupos funcionais, confirmação de oxidação do grafite em OG, cristalinidade e estabilidade da suspensão. A caracterização microestrutural foi realizada por meio de imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura e de transmissão.

Caracterização da enzima livre e imobilizada: foram realizadas análises de atividade enzimática, imobilização enzimática com e sem a utilização de glutaraldeído, rendimento e eficiência de mobilização, estabilidade térmica e de estocagem e reúso.

Atividade antimicrobiana das enzimas: foram preparados inóculos de *E. coli* e semeados em placas para acompanhamento de cinéticas de morte e/ou crescimento por meio de contagem em placas.

Biotransformação dos fármacos via enzimática: a concentração de fármaco em solução foi quantificada ao longo do tempo por espectrofotometria UV-visível.

Respostas

Comprovar que a modificação do método de secagem do método de Hummers não altera as propriedades do OG obtido.

Obter derivados suporte-enzima estáveis com alta carga de carregamento.

Reduzir e/ou inibir o crescimento de bactérias patogênicas.

Biotransformar os fármacos tetraciclina e oxitetraciclina em compostos de menor toxicidade.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 ENZIMAS

Enzimas são proteínas formadas por aminoácidos que estão unidos por ligações peptídicas e estão agrupadas segundo a reação que catalisam, muitas receberam seus nomes pela adição do sufixo “ase” ao nome dos seus substratos ou a uma palavra que descreve sua atividade. Segundo o Comitê de Nomenclatura da União Internacional de Bioquímica (1984), as enzimas foram agrupadas em 6 classes distintas (Tabela 1) (NELSON; COX, 2014; YOO *et al.*, 2017).

Tabela 1 - Divisão das enzimas por ordem, classe, subclasses e tipos de reações catalisadas.

Nº de Ordem	Classe	Subclasse	Tipo de Reação
1	Oxidoredutases	Oxidases	Catalisam reações de oxirredução (transferência de elétrons).
		Oxigenases	
		Peroxidases	
2	Transferases	Metiltransferases	Catalisam reações de transferência de grupos.
		Transaminases	
		Sulfotransferases	
		Fosfotransferases	
3	Hidrolases	Proteases	Promove a hidrólise de ésteres, amidas, peptídeos e outros contendo função C-N, bem como hidratação das ligações C=C, e epóxidos.
		Esterases	
		Lipases	
4	Liasas	Aldolases	Clivagem de C-C, C-O, C-H ou outras ligações por eliminação, rompimento de ligações duplas ou anéis, ou adição de grupos a ligações duplas
		Ketolases	
		Decarboxilases	
		Hidratases	
5	Isomerasas	Racemases	Transferência de grupos dentre de uma mesma molécula produzindo formas isoméricas.
		Epimerases	
6	Ligases	Isomerasas	Formação de ligações C-C, C-O, C-N e C-S e ligações de éster fosfato.
		Sintatases	
		Carboxilases	

Fonte: adaptado de Lehninger; Nelson; Cox, 1995 e Yoo *et al.*, 2017

Algumas enzimas tiveram nomeação que não denotam seus substratos, como a pepsina e a tripsina. Então, a União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (*International Union Of Biochemistry And Molecular Biology* - IUBMB) atribuiu a cada enzima um nome e um número de quatro níveis, conhecidos como *Enzyme Commission* (EC). Em julho de 2022 o IUBMB foi atualizado e passou a incluir as translocases como a sétima classe de enzimas. Essas são responsáveis por reações de translocação de cátions, ânions inorgânicos, aminoácidos, peptídeos, carboidratos e derivados.

Na nomenclatura pelo sistema EC o primeiro número refere-se à classe de enzima, o segundo indica a subclasse pelo tipo de substrato ou ligação clivada, o terceiro e quarto números, a subclasse pelo acceptor de elétrons do tipo de grupo removido e número de série da enzima ao ser identificada, respectivamente. A forma de classificação ocorre da maneira a seguir:

EC x.y.z.w

Em que x é o número de ordem, y é a subclasse, z é subclasse do acceptor e w número de série da enzima.

O interesse em enzimas com uso industrial tem crescido devido ao tempo de processamento reduzido, baixo consumo de energia, custo-benefício, características não tóxicas e ecológicas, alta seletividade e especificidade o que reduzem formação de subprodutos indesejados podendo eliminar a etapa de purificação (COSTA-SILVA *et al.*, 2021; SINGH *et al.*, 2016).

As proteases são uma das maiores subclasses de enzimas comerciais que cobrem a maior parte do mercado de enzimas em todo o mundo. São identificadas como hidrolases, o que as coloca na classe 3, e podem ser localizadas mais especificamente na subclasse 3.4., ou seja, aquelas que hidrolisam ligações peptídicas (MCDONALD, 1985; TACIAS-PASCACIO *et al.*, 2021b).

Várias enzimas proteolíticas são utilizadas em aplicações terapêuticas, biotecnológicas e industriais. Essas enzimas são capazes de catalisar a hidrólise de ligações peptídicas em uma variedade de processos biológicos e podem ser classificadas como exopeptidases ou endopeptidases. As exopeptidases atuam nas extremidades das cadeias polipeptídicas enquanto as endopeptidases atuam aleatoriamente nas regiões internas das cadeias polipeptídicas e podem ser subdivididas em seis grupos, com base

no resíduo catalítico presente no sítio ativo: serina, aspártico, cisteína, metalo, ácido glutâmico e treonina protease (BRITO *et al.*, 2021; LI *et al.*, 2013; NAVEED *et al.*, 2021; RAVEENDRAN *et al.*, 2018).

As proteases de cisteína ou proteases de tiol compartilham um mecanismo catalítico comum envolvendo uma cisteína nucleofílica na unidade catalítica, que é composta por uma tríade de aminoácidos. Essas enzimas possuem uma estrutura com dois domínios principais: um domínio helicoidal N-terminal e um domínio folha β C-terminal, contendo o sítio catalítico com os resíduos de aminoácidos característicos de cisteína, além de histidina e asparagina. Graças a essa cisteína em seu sítio ativo, essas proteases são classificadas na subclasse 3.4.22 (cisteína endopeptidases). Dentre as proteases de cisteína, a primeira isolada e caracterizada foi a papaína, obtida do látex de mamão (*Carica papaya*) (NAVEED *et al.*, 2021; TACIAS-PASCACIO *et al.*, 2021b; VERMA; DIXIT; PANDEY, 2016).

A papaína (EC 3.4.22.2) é uma enzima vegetal isolada do látex de *Carica papaya* e uma das enzimas industriais mais importantes. Tem atraído atenção devido à sua excelente atividade enzimática, atividade antioxidante, estabilidade em alta temperatura, segurança, não toxicidade e baixo custo (ARSHAD *et al.*, 2016; FERNÁNDEZ-LUCAS; CASTAÑEDA; HORMIGO, 2017; PANKOVA *et al.*, 2022; TACIAS-PASCACIO *et al.*, 2021a). A papaína cliva preferencialmente as ligações peptídicas envolvendo aminoácidos básicos, em particular arginina e lisina. É uma proteína de cadeia simples com peso molecular de 23 kDa e consiste em 212 aminoácidos (AMRI; MAMBOYA, 2012; HAFID *et al.*, 2020; TACIAS-PASCACIO *et al.*, 2021b). A molécula de papaína contém sete resíduos de cisteína, das quais uma está envolvida na catálise, enquanto as 6 restantes formam três pontes dissulfeto. O pH ótimo para papaína varia na faixa de 6,0 a 7,0, dependendo do substrato. O ponto isoelétrico está em pH 8,7 (TANTAMACHARIK *et al.*, 2018).

A papaína tem seu uso principal na indústria de alimentos, especialmente como amaciante de carne, na fabricação de cerveja, na panificação, porém suas aplicações são amplas e variadas, incluindo aplicações nas indústrias química, de couro, farmacêutica e cosmética e na produção de peptídeos bioativos, devido às características antifúngicas, antibacterianas e anti-inflamatórias (ARSHAD *et al.*, 2016; BAREKAT; SOLTANIZADEH, 2017; ESTI *et al.*, 2013; PANKOVA *et al.*, 2022; TACIAS-PASCACIO *et al.*, 2021a), entre outras que serão explicadas na seção 2.4.

Outra importante protease cisteína vegetal é a bromelina, essa pode ser obtida a partir do caule, fruto, folhas, casca e raiz do abacaxi (*Ananas comosus*) (KETNAWA; CHAIWUT; RAWDKUEN, 2011b; PANKOVA *et al.*, 2022), também conhecido como *Ananassa sativa*, *A. sativus*, *Bromelia ananas* ou *B. comosa*, cultivado em vários países tropicais e subtropicais como Brasil, Costa Rica, Filipinas, Tailândia, China, Indonésia, Índia, Malásia, Havaí e Quênia (DEVAKATE *et al.*, 2009; JANČIČ; GORGIEVA, 2021; NWAGU; UGWUODO, 2019). Identificada pela primeira vez em 1891 por Vicente Marcano, um químico venezuelano, sua produção comercial só começou em 1957, sendo o caule a principal fonte de extração da bromelina devido sua maior concentração (DE LENCASTRE NOVAES *et al.*, 2016; MAURER, 2001).

A bromelina do caule (EC 3.4.22.32), anteriormente EC 3.4.22.4, são proteases cisteína de cadeia simples e peso molecular médio de 24,5 kDa, composta por 212 resíduos de aminoácidos e inclui sete cisteínas, assim como a papaína, apenas uma está envolvida na catálise, enquanto as demais formam três pontes dissulfeto. A bromelina purificada é estável quando armazenada a -20 °C; possui atividade ótima no intervalo de temperatura entre 50 °C e 60 °C em pH 6,0 a 8,5 e tem ponto isoelétrico em pH 9,5.(ERRASTI *et al.*, 2018; GAGAOUA *et al.*, 2021; TANTAMACHARIK *et al.*, 2018).

A bromelina apresenta diversas funções podendo ser utilizada na área médica e farmacêutica em aplicações terapêuticas como antiedematosas, fibrinolíticas, anticancerígenas, anti-inflamatórias, antibióticas, anticoagulantes e antitrombóticas, na indústria de alimentos e bebidas como amaciante de carnes e clarificante de bebidas, indústrias têxteis e cosméticas (AMINI *et al.*, 2018; ATAIDE *et al.*, 2017; DEBNATH *et al.*, 2019; MA *et al.*, 2022; MANZOOR *et al.*, 2016; WANG *et al.*, 2018), entre outras aplicações que serão explicadas na seção 2.4.

Porém, existem vários problemas relacionados a utilização de enzimas como catalisadores. As enzimas podem ser inibidas por concentrações relativamente baixas de produtos finais, alta temperatura, condições extremas de pH, presença de sais, alguns íons metálicos e solventes, além de terem preço elevado para uso em larga escala (NELSON; COX, 2014).

Para minimizar esses problemas foram desenvolvidas técnicas para imobilizar as enzimas em suportes sólidos não solúveis, que possibilita recuperação da enzima ao final do processo e confere maior estabilidade a variações bruscas de pH e temperatura por formar um microambiente que protege a enzima e possibilita a utilização de enzimas

em reações subsequentes (FERNANDEZ-LOPEZ *et al.*, 2017; ZAHIRINEJAD *et al.*, 2021; ZHANG; YUWEN; PENG, 2013).

A imobilização de enzimas é uma técnica que converte a enzima solúvel em água em uma forma insolúvel para facilitar a recuperação e reutilização. Ocorre por meio da fixação das enzimas sobre ou dentro dos materiais de suporte e quando realizada de forma adequada pode melhorar suas propriedades e aplicações da enzima (YOO *et al.*, 2017).

Existem diferentes métodos de imobilização, esses se dividem de forma geral entre físicos e químicos. Os métodos físicos incluem adsorção, aprisionamento e encapsulamento; métodos químicos incluem ligação cruzada e ligação covalente (ALVARADO-RAMÍREZ *et al.*, 2021; SHELDON, 2007) exemplificados abaixo:

- Adsorção: é um dos métodos de imobilização mais utilizados, por ser simples, barato, não necessitar reações químicas e nem ativação do suporte. Envolve a fixação física da enzima sobre material de suporte através de ligações fracas, como Van der Waals, interações hidrofóbicas ou forças de dispersão. Porém, depende de diversos fatores como tamanho da enzima, área superficial do suporte, tamanho de poro e taxa de porosidade, além de poder ocorrer dessorção, uma vez que a força de ligação enzima-suporte é fraca, as enzimas podem ser facilmente lixiviadas e, assim, contaminar o produto (DALLA-VECCHIA; NASCIMENTO; SOLDI, 2004; YOO *et al.*, 2017);
- Aprisionamento ou confinamento: as enzimas são capturadas dentro das cavidades de uma matriz ou em microcápsulas poliméricas, mas que permitem a passagem do substrato e produto. Esse método geralmente reduz as chances de lixiviar as enzimas e melhora a estabilização, porém resulta em limitações de transferência de massa do substrato e do produto (ALVARADO-RAMÍREZ *et al.*, 2021; VILLELA, 2006);
- Encapsulação: a enzima fica protegida por um material que serve como uma capa e consegue manter a conformação natural e estabilidade por um longo período de tempo, porém a transferência de massa para o sítio ativo da enzima é limitado (ALVARADO-RAMÍREZ *et al.*, 2021);
- Cross-Linking: por meio de um agente reticulante é possível formar uma rede tridimensional de enzimas, que as tornam estáveis devido à forte interação enzima-enzima, mas os reagentes de reticulação e as condições usadas podem danificar as enzimas. Uma desvantagem é a possibilidade de modificação estrutural da enzima devido a força da ligação (ALVARADO-RAMÍREZ *et al.*, 2021; YOO *et al.*, 2017);

- Ligação covalente: ligação covalente a uma matriz é amplamente utilizada e tem como vantagem interações fortes entre a enzima e o suporte, o que torna a enzima muito estável. Determinados grupos das enzimas se ligam aos agentes de reticulação, que estão ligados ao suporte. Normalmente, os grupos que realizam esse tipo de ligação são o grupo carboxila, grupo amina, grupo fenólico, grupo sulfídrico, entre outros (ALVARADO-RAMÍREZ *et al.*, 2021; SIRISHA; JAIN; JAIN, 2016).

Esses métodos podem ser combinados para melhorar as características do imobilizado, como por exemplo a co-imobilização (HENRIQUES *et al.*, 2018).

Após a imobilização, é necessário verificar pelo menos três pontos: se a atividade enzimática se manteve, se está ocorrendo impedimento estérico e se o suporte escolhido tem boas propriedades mecânicas, como, por exemplo, alta resistência mecânica. A imobilização geralmente afeta o microambiente entorno da enzima, isso quer dizer as condições ótimas de pH e de temperatura e as características de seletividade, estabilidade e atividade enzimática podem ter sido alteradas (FERNANDEZ-LOPEZ *et al.*, 2017).

Os suportes podem ser orgânicos e inorgânicos, logo a escolha do suporte também é muito importante, não só pelas propriedades mecânicas, mas também pelas interações que ocorrerão entre ele e a enzima. Li *et al.* (2017) afirmaram que a imobilização enzimática em suportes à base de carbono, como nanotubos de carbono, grafeno, óxido de grafeno, apresentam características desejáveis para imobilização e poderiam proporcionar vasta aplicações em áreas como na ciência energética e ambiental.

Dentre os suportes existentes, os inorgânicos são amplamente utilizados para a imobilização enzimática devido suas características físico-químicas e mecânicas como resistência ao ataque químico, resistência mecânica e a possibilidade de regeneração (WANG *et al.*, 2011).

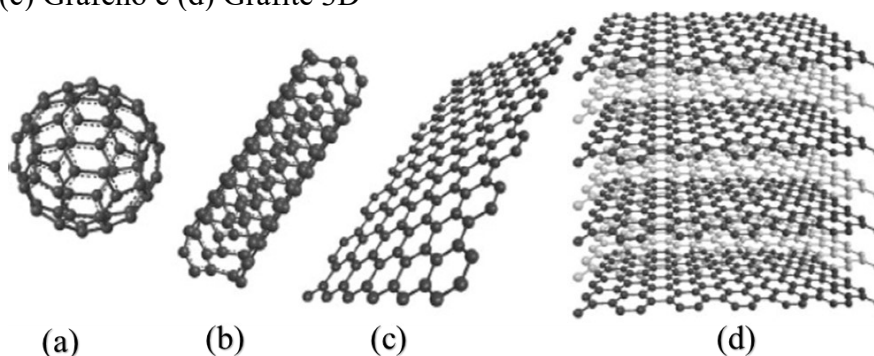
2.2 ÓXIDO DE GRAFENO

Com o avanço da nanotecnologia, o grafeno e seus alótropos como fulereno, nanotubos de carbono, grafite, óxido de grafite e óxido de grafeno, têm atraído interesse em diversos campos de pesquisa. Na Figura 1 é possível visualizar as estruturas do grafeno e seus alótropos, exceto óxido de grafeno que será mostrado adiante.

O grafeno é um material formado por apenas uma camada plana de átomos de carbono, com hibridização em sp^2 , formando uma rede bidimensional (2D) sendo uma

delas da espessura de um átomo (monoatômica) e sem grupos funcionais em sua superfície, o que o difere do óxido de grafeno. Seus átomos estão arranjados em uma estrutura cristalina hexagonal semelhante ao favo de mel (WANG *et al.*, 2011; ZHOU *et al.*, 2014).

Figura 1 - Estrutura do grafeno e alguns alótropos: (a) Fulereo, (b) Nanotubos de carbono, (c) Grafeno e (d) Grafite 3D



Fonte: Basu; Bhattacharyya, 2012.

O óxido de grafeno (OG) é um dos alótropos mais importantes devido à alta área superficial, boa dispersibilidade apesar de não solubilizar em água, alta condutividade térmica, excelente flexibilidade mecânica, transporte rápido de elétrons e fácil funcionalização (GU *et al.*, 2018; NOVOSELOV *et al.*, 2004; RAZAQ *et al.*, 2022; SU *et al.*, 2011; WANG *et al.*, 2011).

O OG, também chamado de ácido grafítico, pode ser obtido a partir da oxidação do pó de grafite por permanganato (síntese de Hummers e Offeman) ou por clorato (métodos desenvolvidos por Brodie, Staudenmaier e Hofmann). A síntese mais utilizada é a de Hummers, por ser considerada segura, pois trabalha apenas com um ácido concentrado (ácido sulfúrico) e sais de nitrato de sódio e permanganato de potássio em temperaturas abaixo de 95 °C, sem geração de gases tóxicos. Contrário à primeira síntese de OG que foi realizada por Brodie em 1859, que utilizava clorato de potássio e ácido nítrico fumegante e, ainda, a síntese de Staudenmaier em 1898, que utilizava ácido sulfúrico e nítrico concentrados junto com clorato de potássio que geravam gases tóxicos (HUMMERS; OFFEMAN, 1958; WONG *et al.*, 2014).

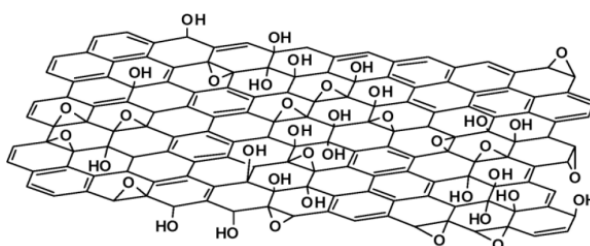
A estrutura do OG é semelhante ao grafeno, também possui hibridização sp^2 , porém tem em sua superfície grupo epóxi ($-O-$), hidroxila ($-OH$) e ácido carboxílico ($-COOH$) obtidos a partir do tratamento de grafite com oxidantes fortes e por isso pode apresentar inúmeras estruturas (COMPTON; NGUYEN, 2010; JIŘÍČKOVÁ *et al.*, 2022;

RAZAQ *et al.*, 2022). Esses grupos funcionalizam o OG com grupos contendo oxigênio que permite caráter anfifílico, deixando o plano basal hidrofóbico e as extremidades predominantemente hidrofílica, dispersando-se em água (SHAH *et al.*, 2015). Além disso, os grupos funcionais contendo oxigênio podem fornecer sítios reativos para modificação química ou funcionalização de OG, que por sua vez podem ser usados para desenvolver materiais à base de OG (RAZAQ *et al.*, 2022). A estrutura do OG, com seus possíveis grupos na superfície, está representada na Figura 2.

Devido à sua estrutura e grupos na superfície, o OG possui propriedades que proporcionam elevada interação com moléculas orgânicas por meio de forças não covalentes, como força de Van der Waals, ligações de hidrogênio, empilhamento π - π , forças eletrostáticas e interações hidrofóbicas, além de alta capacidade de adsorção (MAUTER; ELIMELECH, 2008; PYRZYNSKA, 2011). A introdução desses grupos na superfície do OG, principalmente hidroxila e epóxi, conferem aumento do espaçamento entre suas “folhas” (interlamelar), assim como modifica parte da hibridização dos carbonos oxidados, passando de sp^2 (planar) para sp^3 (tetraédrica) (CISZEWSKI; MIANOWSKI, 2014; SHAH *et al.*, 2015).

Em razão às suas características, é um material que pode ser empregado em biossensores, supercapacitores na produção e armazenamento de energia, células solares, nanocompósitos, chips microfluídicos, optoeletrônica, eletrônica flexível, sensoriamento eletroquímico, robótica, indústria têxtil, membranas para tratamento de água e separação de gás (BAO *et al.*, 2011; JIA *et al.*, 2022; RAZAQ *et al.*, 2022).

Figura 2 - Estrutura molecular do óxido de grafeno



Fonte: Wang *et al.*, 2011

2.3 APLICAÇÕES PROPOSTAS

2.3.1 Ação Antimicrobiana da Bromelina e Papaína

É crescente o interesse em torno da higiene, segurança de alimentos e na incidência de doenças transmitidas por alimentos devido à estreita correlação com a saúde pública. A contaminação microbiológica de alimentos por microrganismos patogênicos, sua persistência, replicação e/ou produção de toxinas tornou-se uma das principais preocupações dos consumidores, indústrias alimentícias e agências reguladoras em todo o mundo (TROPEA, 2022).

Os principais perigos presentes em alimentos normalmente são agrupados em três categorias: biológicos, físicos e químicos. Os perigos físicos estão relacionados com a presença de objetos estranhos ao alimento e que podem causar algum tipo de injúria ao consumidor, como adornos dos manipuladores, fragmentos de metais, vidros ou madeira, materiais de utensílios e peças de equipamentos; já os perigos químicos estão relacionados aos aditivos alimentares quando utilizados em concentrações incorretas, metais pesados tóxicos, toxinas naturais, produtos químicos introduzidos no processo e fármacos veterinários; enquanto os perigos biológicos são os microrganismos presentes nos alimentos, podendo ser deteriorantes ou patogênicos (DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010).

A contaminação por microrganismos é um dos principais desafios enfrentados pela indústria de alimentos, pois pode resultar em uma grande variedade de doenças transmitidas por alimentos (DTAs), muitas vezes com consequências graves, incluindo mortalidade e grandes perdas econômicas (TAUXE *et al.*, 2010). Com o desenvolvimento da economia global e a globalização do comércio ocorre a necessidade do abastecimento transnacional de alimentos, o que pode levar a uma rápida disseminação das DTAs se tornando uma ameaça a oferta de alimentos. A contaminação pode ocorrer por diversas formas, seja por meio do ar contaminado, superfícies de equipamentos e utensílios, más condições de higiene do manipulador de alimentos ou ainda por falhas no controle de sanitização na cadeia produtiva (DOROTÍKOVÁ *et al.*, 2022; SÃO JOSÉ, 2012). Assim, faz-se necessário o combate a contaminação microbiana em alimentos, principalmente dos microrganismos patogênicos (ITURRIZA-GOMARA; O'BRIEN, 2016; MA *et al.*, 2019).

A patogenicidade é a capacidade, depois de instalado no organismo humano ou animal, de um agente infeccioso produzir sintomas, que podem ser de maior ou menor proporção, entre os hospedeiros infectados (BALALI *et al.*, 2020). A indústria de alimentos faz uso de aditivos como forma de prevenir contaminação microbiológica nos produtos, assim como prolongar sua vida útil evitando alterações indesejáveis nas características sensoriais dos alimentos e perda do valor nutricional. Com a preocupação dos produtores e consumidores com a utilização de aditivos sintéticos, tem-se estudado o uso de compostos naturais que exerçam essas funções. As substâncias mais aplicadas são as bacteriocinas, metabólitos fúngicos, mono e sesquiterpenos, fenilpropanóides, compostos bioativos e óleos essenciais (ASIOLI *et al.*, 2017; BARBOZA; DE ALMEIDA; SILVA, 2022).

Apesar dos patógenos de origem alimentar geralmente serem submetidos a estresses físicos, químicos e nutricionais durante o processamento, sua eliminação e/ou inibição continua sendo um desafio, mesmo com os avanços em tecnologias de tratamentos térmicos e não térmicos (ESHAMAH *et al.*, 2014). Os surtos de doenças são causados por 31 patógenos conhecidos e muitos desconhecidos, entre esses, *Vibrio spp.*, *Salmonella spp.*, *Aeromonas hydrophila*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Campylobacter jejuni*, *Staphylococcus aureus*, *Shigella spp.* e *Yersinia spp.* são os mais comuns encontrados em água, plantas, frutos do mar, indústrias de carnes, ovos e laticínios, frutas e produtos frescos (BOSS; OVERESCH; BAUMGARTNER, 2016; BRIDIER *et al.*, 2015; NAHAR *et al.*, 2018).

Bromelina e papaína foram estudadas para eliminar vários patógenos formadores de biofilme associados a alimentos como *L. monocytogenes* e *Klebsiella pneumoniae*, sendo mais eficaz contra a segunda (MOHAMED *et al.*, 2018; NGUYEN; BURROWS, 2014). A papaína também foi estudada em suas formas livre e imobilizada para controlar *L. monocytogenes*, *Acinetobacter sp.* e *S. aureus* (MANOHAR *et al.*, 2015; NGUYEN; BURROWS, 2014), além de possuir atividade antimicrobiana contra *Bacillus subtilis*, *Enterobacter cloacae*, *E. coli*, *Salmonella Typhi* e *Proteus vulgaris* (ESHAMAH *et al.*, 2014).

Dentre as muitas bactérias patogênicas, uma das mais comuns é a *E. coli*, cuja identificação como patógeno humano ocorreu em 1982 (ERIBO; ASHENAFI, 2003). É uma bactéria pertencente à família Enterobacteriaceae, normalmente encontrada no trato gastrointestinal de humanos e muitos animais, porém algumas cepas podem causar

infecção no trato digestivo, trato urinário, trato respiratório ou muitas outras partes do corpo (KHAIRY *et al.*, 2019). A contaminação por *E. coli* pode ocorrer por meio do consumo de produtos de origem animal como carne, leite e derivados, mas pode também ser disseminada por meio de água não clorada, vegetais, frutas e brotos (GÖKMEN *et al.*, 2022; KRUK; TRZASKOWSKA, 2021; MA *et al.*, 2019).

É uma bactéria Gram-negativa, ou seja, possui três camadas de revestimento, uma membrana externa, a parede celular de peptidoglicano e a membrana citoplasmática ou interna. É a presença da membrana externa que confere a essa bactéria sua classificação como Gram-negativa (HWANG; KIM; KIM, 2020; SILHAVY; KAHNE; WALKER, 2010).

A membrana externa desempenha um papel importante na proteção de organismos Gram-negativos do ambiente, excluindo moléculas tóxicas e fornecendo uma camada estabilizadora adicional ao redor da célula. O peptidoglicano é o que confere rigidez as bactérias e não permite que essas sofram lise, formando um exoesqueleto rígido. A sua rigidez determina a forma da célula, conferindo normalmente a forma de bastonetes para bactérias entéricas (SAPUTRA *et al.*, 2020; SILHAVY; KAHNE; WALKER, 2010). Segundo Centros de Controle e Prevenção de Doenças (*Centers for Disease Control and Prevention – CDC*), as bactérias Gram-negativas são mais resistentes a medicamentos e antibióticos devido sua membrana externa. Essa camada protetora auxilia a bactéria a desenvolver novos mecanismos de resistência e a transmitir material genético para outras bactérias, possibilitando que elas também se tornem resistentes a medicamentos.

2.3.2 Biotransformação via Enzimática de Contaminantes Emergentes

Ao realizar o levantamento bibliográfico foi observado que as enzimas bromelina e papaína não são aplicadas em tratamentos de efluentes. Segundo a UNESCO (2017a) a crescente demanda por água doce, faz com que as águas residuais ganhem cada vez mais espaço como fonte alternativa, mudando o paradigma de gestão de águas residuais de “tratamento e eliminação” para “reutilizar, reciclar e recuperar recursos”. Assim, o que era até então esgoto e visto como um problema que necessita de solução, passa a fazer parte da solução de desafios enfrentados pelas sociedades, como fonte de energia, nutrientes e outros produtos úteis, rentáveis e sustentáveis, que vão muito além

da saúde humana e ambiental, com implicações na segurança alimentar e energética, bem como amenizando as mudanças climáticas.

Basicamente, a água residual é composta por 99% de água e 1% de sólidos suspensos. Embora essa composição possa variar dependendo da localidade e sazonalidade, em sua maioria é constituída por água. As águas residuais domésticas são geralmente consideradas livres de substâncias quimicamente perigosas, porém há preocupação crescente com os chamados poluentes emergentes, como pesticidas, produtos de higiene pessoal, surfactantes, além de medicamentos, que mesmo em baixas concentrações, podem trazer impactos a longo prazo (UNESCO, 2017b).

Os poluentes emergentes são novos produtos ou produtos químicos sem estatuto regulamentar e cujos efeitos sobre o meio ambiente e a saúde humana são desconhecidos. Esses contaminantes muitas vezes não precisam persistir no ambiente, uma vez que sua liberação para o meio ambiente é contínua e pode compensar elevadas taxas de transformação/remoção (BARCELÓ, 2003). Esses compostos são majoritariamente detectados na gama dos $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ e $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$ podendo, no entanto, ser suficiente para induzir efeitos tóxicos (FENT; WESTON; CAMINADA, 2006).

Nos anos de 1970 foram realizadas as primeiras descobertas sobre a presença de fármacos no ambiente. O alto consumo de fármacos mundialmente os torna compostos que requerem atenção na problemática dos contaminantes emergentes, além de serem capazes de apresentar efeitos farmacodinâmicos, devido ao fato de serem substâncias biologicamente ativas, mostram-se potencialmente prejudicial a qualidade dos recursos naturais, afetando o equilíbrio de ecossistemas (KOCH *et al.*, 2021; MELO *et al.*, 2009; NAPOLEÃO *et al.*, 2015). Dentre esses contaminantes, os antibióticos tanto utilizados na medicina humana quanto na veterinária, têm atraído cada vez mais atenção devido ao efeito tóxico à fauna e à flora, principalmente aquáticas, além de poder contribuir para o surgimento de resistência bacteriana no meio (HALLING-SØRENSEN *et al.*, 2003; HALLING-SØRENSEN; SENDELØV; TJØRNELUND, 2002; LARSSON, 2014).

Analisando mais precisamente os antibióticos tetraciclina (TC) e oxitetraciclina (OTC), foi verificada sua presença em águas residuais e corpos d'água naturais (JEONG *et al.*, 2010; WEN; JIA; LI, 2009). Além de que as tetraciclinas, incluindo a tetraciclina, oxitetraciclina e clortetraciclina, são antibióticos amplamente utilizados para tratamento em humanos como na pecuária moderna. Maior problema da utilização das tetraciclinas é que menos de 20% da dose é absorvida devido suas baixas taxas metabólicas, ou seja, cerca de 80% é excretada de forma inalterada por meio da urina e fezes (BORGHI;

PALMA, 2014; REGITANO; LEAL, 2010). Podendo resultar em resíduos de tetraciclina em produtos alimentícios derivados de animais (PENA *et al.*, 2007), assim como em legumes (SHENKER *et al.*, 2011).

Os antibióticos são um dos grupos mais importantes de fármacos utilizados, tem como definição ser um agente quimioterapêutico que inibe ou suprime o crescimento de microrganismos, tais como bactérias, fungos ou protozoários. O termo “antibiótico” originalmente se referia a qualquer agente natural com atividade biológica contra os organismos vivos, porém, na atualidade o termo refere-se a qualquer substância, seja natural, semissintética ou sintética, com atividade antibacteriana, antifúngica ou antiparasitária (KÜMMERER, 2009).

Há diversas maneiras pelas quais os fármacos e seus metabólitos chegam ao meio ambiente, como pelo descarte inadequado de embalagens e produtos vencidos, pelo esgoto doméstico ou ainda por lavagens de contêineres utilizados em indústrias produtoras de fármacos. Assim como a utilização de esterco de rebanhos tratados com tetraciclina como fertilizante de solo, o que pode contaminar não apenas o local de aplicação, mas também águas superficiais e subterrâneas (FARRÉ *et al.*, 2008; KAY; BLACKWELL; BOXALL, 2005; KEMPER, 2008). Um dos grandes problemas dos fármacos é que são desenvolvidos para terem efeitos duradouros, mantendo suas propriedades químicas por tempo suficiente para servir a sua finalidade terapêutica, assim, a maioria desses compostos têm longa vida útil (FARRÉ *et al.*, 2008). A presença de antibióticos no meio ambiente pode desenvolver patógenos resistentes que podem se disseminar globalmente devido a hábitos insuficientes de limpeza e/ou hábitos de viagens (BRANDT *et al.*, 2013).

Os tratamentos convencionais de água geralmente não são efetivos na remoção de grande parte dos contaminantes emergentes, levando a necessidade de desenvolvimento de novas técnicas para remoção desses compostos. Outros processos utilizados individualmente ou combinados foram a ozonização, precipitação química, adsorção, volatilização, Fenton, oxidação supercrítica, radiação ionizante, fotocatalise e ultrassonografia (sonólise), porém a maioria dessas técnicas não é eficiente quanto à eliminação da toxicidade presente nos fármacos (ANDREOZZI *et al.*, 2003).

Atualmente, uma alternativa a esses métodos de tratamentos é a biodegradação de antibióticos utilizando enzimas. Devido às suas características como seletividade e especificidade, temperatura e pressão de trabalho baixas, operação em condições ambientes, os processos enzimáticos podem ser considerados “verdes”. Alguns exemplos

de degradação de TC e OTC por enzimas são peroxidase de manganês bruta e peroxidase de lignina (*Phanerochaete chrysosporium*) e lacase de diferentes fontes (NAIR; DEMARCHE; AGATHOS, 2013; WEN; JIA; LI, 2009, 2010; YANG *et al.*, 2017).

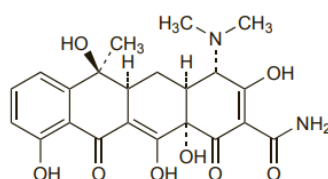
Dentre as enzimas utilizadas para degradação de compostos no meio ambiente, a mais comum quando o tema é degradação de fármaco é a lacase. Ela também é utilizada em diversas outras áreas, como biossensores, degradação de corantes e indústrias químicas (NAIR; DEMARCHE; AGATHOS, 2013; PANDI *et al.*, 2019; RODRÍGUEZ-DELGADO *et al.*, 2015; YANG *et al.*, 2018). Com o intuito de ampliar as opções de enzimas que possam ser utilizadas para degradação de fármaco, neste trabalho, estudou-se a utilização de bromélia e papaína na degradação de TC e OTC.

As TC são um grupo de antibióticos originalmente derivados de certas espécies de *Streptomyces* spp. e são caracterizadas por possuírem uma estrutura de quatro anéis. Embora todas as TC tenham uma estrutura comum, elas diferem umas das outras pela presença ou ausência de grupos cloreto, metil e hidroxilo. Essas modificações não alteram seu espectro de atividade, mas sim suas propriedades farmacológicas, como o pKa, tempo de meia-vida, a carga aniônica ou catiônica, alterando a ligação das proteínas no soro (SASSMAN; LEE, 2005).

As TC são geralmente bacteriostáticas, têm um amplo espectro de atividade que inclui bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, atuando também em algumas micobactérias e protozoários ao interferir na síntese de proteínas em organismos suscetíveis, ligando-se aos ribossomos e impedindo que o RNA de transferência se fixe ao ribossomo. Desse modo, impede a síntese proteica e o crescimento da bactéria (APFELBAUM, 2009; OLIVEIRA, 2013).

A TC ($C_{22}H_{24}N_2O_8$) é um pó amarelo, cristalino e inodoro de alta solubilidade em água, e dissolve em soluções ácidas e básicas diluídas. É sensível à forte luminosidade e pode quelar cátions metálicos para produzir complexos insolúveis. Quando em suspensão a 1% em água tem pH entre 3,5 e 6,0. É indicado para bovinos, suínos, ovinos e caprinos, e também em humanos (APFELBAUM, 2009). A Figura 3 representa a cadeia da tetraciclina.

Figura 3 - Estrutura molecular da tetraciclina

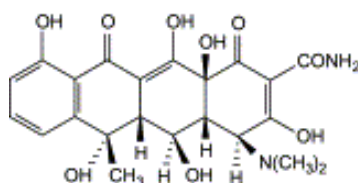


Fonte: Jia et al., 2009.

A OTC (C₂₂H₂₄N₂O₉) é um derivado da tetraciclina e possui atuação semelhante; quando em suspensão em água a 1% tem pH entre 4,5 e 7,5. Possui três estados de equilíbrio de ionização com valores de pKa 3,57; 7,49 e 9,88 (FIGUEROA; LEONARD; MACKAY, 2004) e alta solubilidade em água e em soluções ácidas e básicas diluídas.

Em 2008, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) divulgou um regulamento para o uso de OTC como bactericida e fungicida para aplicação foliar nas culturas de ameixa, alho, batata, café, cebola, citros, feijão, maracujá, pêssego, pimentão e tomate. Também é comum o seu uso tanto na medicina veterinária quanto em humanos, aplicada de forma semelhante a TC, para adultos é geralmente utilizada de 250 a 500 mg a cada 6 horas (quatro vezes ao dia), atingindo concentrações plasmáticas no estado estacionário de 3 a 4 mg·mL⁻¹. O uso em crianças possui maior restrição, no Reino Unido, seu uso é permitido em crianças maiores de 12 anos, porém nos Estados Unidos da América, a liberação é a partir dos 8 anos (APFELBAUM, 2009). A Figura 4 representa a estrutura molecular da oxitetraciclina.

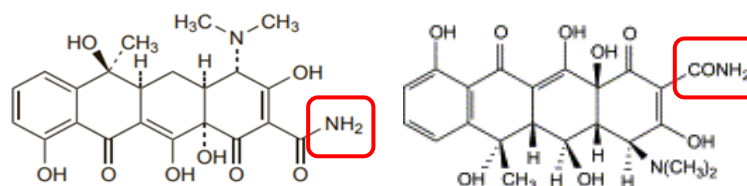
Figura 4 - Estrutura molecular da oxitetraciclina



Fonte: Halling-Sørensen *et al.*, 2003.

Papaína e bromelina foram selecionadas a partir do estudo das moléculas dos fármacos TC e OTC. Como pode ser visualizado na Figura 5, a família das tetraciclinas possui em uma das extremidades cadeias ligações peptídica, onde a protease deve agir.

Figura 5 - Indicação dos grupos funcionais onde as enzimas papaína e bromelina atuam



Fonte: adaptado de Jia et al., 2009 e Halling-Sørensen *et al.*, 2003.

2.4 ESTADO DA ARTE

Diversos trabalhos são relatados na literatura com o uso das enzimas bromelina e papaína, livre e/ou imobilizadas, para diversas finalidades. A seguir, serão apresentados em quatro tópicos alguns dos trabalhos recentes da literatura seguidas por uma breve explicação sobre a bromelina, a papaína e algumas outras enzimas aplicadas como agentes antimicrobianos e na biotransformação de fármacos tetraciclina e oxitetraciclina.

2.4.1 Bromelina

Nesse tópico tem-se alguns dos principais trabalhos da literatura nos quais foram utilizados a enzima bromelina para diversas aplicações. Na Tabela 2 é possível observar se a enzima foi utilizada de forma livre ou imobilizada, a aplicação avaliada pelo estudo e a referência.

Tabela 2 - Principais trabalhos da literatura utilizando bromelina na forma livre e/ou imobilizada

Suporte	Aplicação	Referência
Livre	Clarificação de suco de romã	(Cerreti <i>et al.</i> , 2016)
Nanocelulose bacteriana	Aplicação terapêutica como agente cicatrizante, antibacteriano e antioxidante	(Ataide <i>et al.</i> , 2017)
Encapsulação em alginato e quitosana	Atividade antibacteriana	(Anjos <i>et al.</i> , 2018)
Esporos de <i>Bacillus</i> sp.	Aplicação terapêutica como agente cicatrizante, antibacteriano e antioxidante	(Nwagu; Ugwuodo, 2019)
Nanofibras eletrofiadas de triacetato de celulose	Aplicação terapêutica como agente cicatrizante e anti-inflamatório	(De Melo Brites et al., 2020)

CLEA	Aplicação antitumoral	terapêutica (Wang <i>et al.</i> , 2020)
Livre	Amaciantes de carne de lula jumbo	(Jun-Hui <i>et al.</i> , 2020)
Livre	Hidrólise enzimática	(Borrajo <i>et al.</i> , 2020)
Nanopartículas de Ouro	Aplicações terapêuticas	(Brito <i>et al.</i> , 2021)
Livre	Amaciante para carne suína	(Saengsuk <i>et al.</i> , 2021)
Estrutura lamelar semelhante a Flowers de fosfato de cobalto	Obtenção do suporte por via alternativa	(Ma <i>et al.</i> , 2022)

Fonte: elaborada pela autora

Cerreti *et al.* (2016) estudaram o efeito das enzimas pectinase Klerzyme, bromelina e papaína na turbidez durante o armazenamento a frio e estabilidade de cor do suco de romã visto que essas características afetam diretamente a escolha do consumidor. Os autores estudaram cada enzima separadamente e a combinação da pectinase com bromelina e com papaína. As amostras foram colocadas em banho-maria a 50 °C por 2 h e em seguida aquecidas a 85 °C por 1 min para inativar a enzima. Os autores afirmaram que para as amostras utilizando apenas bromelina e papaína, a turbidez não tem redução quando comparada com a amostra padrão, porém tem efeito sinérgico quando são utilizadas em combinação com a pectinase, possuindo os melhores resultados, além de não alterarem composição das antocianinas e a cor do suco.

Ataide *et al.* (2017) desenvolveram um dispositivo a base de nanocelulose bacteriana para a liberação controlada de bromelina. Inicialmente as membranas de nanocelulose foram produzidas através do cultivo de *Gluconacetobacter xylinus* (ATCC® 53582™) em cultura estática e posteriormente purificada. As membranas foram então submersas em solução de bromelina esterilizada e incubadas a 25 °C sob 100 rpm por 24 h. A membrana com bromelina imobilizada foi avaliada quanto as propriedades físico-químicas, concentração de proteínas, atividade antioxidante e antimicrobiana. Os autores concluíram que a membrana de nanocelulose bacteriana é capaz de absorver e liberar de forma seletiva a bromelina e que ao ser incorporada a membrana tem sua atividade antimicrobiana aumentada em até 9 vezes.

Anjos *et al.* (2018) estudaram o efeito inibidor e antibacteriano das enzimas papaína e bromelina, após tratamento térmico a 80 °C durante 10 min, contra cinco espécies de *Alicyclobacillus* spp. para aumentar a vida útil de alimentos cítricos, visto que essa bactéria é deteriorante de alimento com baixo pH. Para isso, os autores encapsularam as enzimas em alginato e quitosana pelo método de *spray drying* para reduzir a perda de

atividade da enzima durante o tratamento térmico, simulando o processo de pasteurização. Os autores chegaram à conclusão de que a papaína e bromelina livres apresentam potencial antimicrobiano significativo contra cepas de *Alicyclobacillus* spp. e que a microencapsulação é uma alternativa para manter parte da atividade dessas enzimas. Foi observado que a papaína perde sua atividade inibitória, à medida que os valores de concentração mínima inibitória aumentam e que a enzima bromelina não obtém resultados satisfatórios após serem submetidas ao tratamento térmico.

Nwagu e Ugwuodo (2019) criaram um suporte comestível a partir dos esporos de *Bacillus* sp. para imobilização de bromelina e posterior aplicação terapêutica não especificada. Os autores avaliaram parâmetros como o efeito do pH, da temperatura e da concentração enzimática na imobilização da bromelina seguido da caracterização do derivado. Foi observado que a bromelina se tornou mais estável, teve aumento na estabilidade quanto a variação de pH e temperaturas elevadas, o que pode viabilizar seu uso como suporte comestível, sendo necessário maiores estudos como por exemplo aplicação *in vivo*.

De Melo Brites *et al.* (2020) sintetizaram triacetato de celulose a partir do bagaço de cana-de-açúcar para obtenção de membranas de nanofibras contendo bromelina pela técnica de eletrofiação com aplicação terapêutica como material cicatrizante e anti-inflamatório para possibilitar o tratamento de feridas, queimaduras, feridas promovidas por diabetes e pós-cirúrgicas, úlceras de pressão, entre outras. As membranas foram reticuladas com glutaraldeído durante a obtenção das nanofibras. Os autores analisaram *in vitro* por testes de liberação controlada e concluíram que, após 3 dias, a bromelina é totalmente liberada.

Wang *et al.* (2020) produziram nanopartículas sensíveis ao pH foram preparados por reticulação de bromelina por meio de ligações orto-éster para aplicação terapêutica. Nesse estudo, as nanopartículas de bromelinas foram utilizadas para liberação controlada de fármaco anticâncer e para degradar a matriz extracelular densa que serve para envolver células tumorais, restringindo a permeação de drogas terapêuticas nos tecidos tumorais. Os autores desenvolveram um novo nanocarreador sensível ao pH, no qual ao acessar a área tumoral inicia-se o processo de degradação da matriz extracelular densa liberando o fármaco e o desprendimento de bromelina. Ao realizarem testes *in vivo* perceberam que a bromelaína pode melhorar tanto o acúmulo quanto a permeação do fármaco no local do tumor podendo também apresentar um efeito sinérgico, assim como inibir o crescimento tumoral.

Jun-Hui *et al.* (2020) utilizaram as enzimas papaína e bromelina como amaciantes da lula jumbo. Após remoção das cabeças e vísceras, a lula foi lavada e fracionada em pequenos pedaços, com aproximadamente 3,0–3,5 cm de largura e 15,0–15,5 cm de comprimento e, então, embebidos em água destilada com bromelina ou papaína por 40 min em banho-maria a 30 °C. Foram realizados ensaios de textura, atividade proteolítica, capacidade de retenção de água e índice de fragmentação miofibrilar. Os autores relataram que tanto a papaína quanto a bromelina possuem alta atividade proteolítica quando aplicada como amaciante para lula jumbo nessas condições, reduzindo desvantajosamente a capacidade de retenção de água e gerando maior número de pequenos fragmentos nos tecidos musculares, diminuindo a estabilidade e integridade da microestrutura.

Borrajo *et al.* (2020) utilizaram alcalase, bromelina e papaína para obtenção de hidrolisados a partir de proteínas de fígado suíno para posterior utilização como antioxidantes e agente antimicrobiano. A hidrólise enzimática foi realizada em duas durações diferentes, 4 e 8 h na condição de pH ideal para cada enzima. As reações foram desativadas aquecendo as amostras por 3 min a 95 °C. As misturas foram então rapidamente arrefecidas até à temperatura ambiente em banho de gelo, centrifugadas a 10.000 x g por 10 min e, então, filtradas pela técnica de ultrafiltração a vácuo usando filtros de membrana de celulose regenerada. Quanto à atividade antioxidante, os hidrolisados foram avaliados utilizando 4 diferentes métodos, DPPH, ABTS, FRAP e ORAC. Como agente microbianos foram utilizados contra bactérias Gram-positivas (*Brochothrix thermosphacta*, *L. monocytogenes* e *S. aureus*) e Gram-negativas (*P. aeruginosa*, *E. coli* e *S. enterica*) pelo método de teste de halo. Os autores observaram que o tipo de enzima e a duração do processo influenciaram a hidrólise das proteínas hepáticas e que nenhum dos hidrolisados possuíam atividade microbiana contra bactérias Gram-negativas, mas que aqueles obtidos por bromelina e alcalase foram capazes de paralisar a expansão de *B. thermosphacta* e *L. monocytogenes*.

Brito *et al.* (2021) imobilizaram bromelina em interfaces de nanopartículas de ouro para aplicações terapêuticas. Foi observado que durante a síntese das nanopartículas de ouro a enzima bromelina pode ser utilizada como agente redutor e estabilizador. Os autores afirmam que ao imobilizar a enzima nas nanopartículas, esta teve melhorias na estabilidade da atividade específica, de armazenamento e térmica. Apesar de mencionarem que o uso seria terapêutico, os autores não indicam possíveis aplicações.

Saengsuk *et al.* (2021) utilizaram bromelina em várias concentrações como amaciante de carne suína reestruturada. Foram retirados excesso de gordura e pele da carne, esta foi moída, adicionado água, bromelina e uma pré-mistura de alginato sob agitação por um tempo total de 5 min. A carne suína foi reestruturada em anel circular de aço inoxidável com diâmetro de 5,5 cm e altura de 1,5 cm, acondicionados em bolsa plástica e selados a vácuo. A enzima foi ativada a 50 °C por tempo que variou entre 3 e 12 min e, inativada a 95 °C por tempo fixo de 10 min. O mesmo processo foi realizado para amostras sem adição de bromelina. Os autores concluíram que as amostras contendo bromelina tiveram força de cisalhamento, parâmetros de textura (dureza, coesividade, elasticidade, gomosidade, mastigabilidade e adesividade) e degradação proteica fortemente afetadas. Foram obtidos bifes com menor força de cisalhamento ao serem fatiados, melhor mastigabilidade, além de manterem a cor vermelha, resultados favoráveis comparados as amostras que não possuíam a enzima. Os autores sugerem que o processo utilizado pode ser implementado em escala industrial agregando o valor das aparas de carne suína fornecendo um produto destinado a pessoas com disfunção mastigatória, como consumidores idosos.

Ma *et al.* (2022) imobilizaram bromelina em fosfato de cobalto sólido produzido utilizando cloreto de colina e betaína-glicerol como solvente eutético. A imobilização foi baseada na interação específica entre os íons cobalto do carreador e as cisteínas inerentes contidas nas moléculas de bromelina. A interação específica entre cobalto e bromelina promoveu a agregação semelhantes a flores expandindo a área superficial do suporte potencializando a adsorção da bromelina, assim como melhorou a estabilidade e eficiência catalítica da enzima no suporte em relação a enzima livre.

2.4.2 Papaína

A Tabela 3 apresenta alguns trabalhos que utilizaram papaína, se a enzima foi imobilizada, a aplicação avaliada pelo estudo e a referência.

Tabela 3 - Principais trabalhos da literatura utilizando papaína na forma livre e/ou imobilizada

Suporte	Aplicação	Referência
Nanopartículas magnéticas revestidas de sílica	Clarificação de sucos de frutas	(Mosafa; Moghadam; Shahedi, 2013)
Livre	Atividade antimicrobiana contra <i>E. coli</i> e <i>L. monocytogenes</i> .	(Eshamah <i>et al.</i> , 2014)
Encapsulada por eletrofição e imobilizada por ligação covalente	Biossensor	(Moreno-Cortez <i>et al.</i> , 2015)
Livre	Clarificação de suco de romã	(Cerreti <i>et al.</i> , 2016)*
Livre (extrato)	Atividade antimicrobiana contra <i>Salmonella Typhimurium</i> e amaciante de carne bovina	(Saeed <i>et al.</i> , 2017)
Encapsulação em alginato e quitosana	Atividade antibacteriana	(Anjos <i>et al.</i> , 2018)*
Óxido de Grafeno	Obtenção do suporte	(Gu <i>et al.</i> , 2018)
Livre	Hidrólise enzimática	(Borrajo <i>et al.</i> , 2020)*
Suporte híbrido com nanopartículas de ZnO e quitosana	Aplicação biomédica	(Soares <i>et al.</i> , 2020)
Livre (extrato)	Atividade antimicrobiana contra <i>salmonella</i> spp e amaciante de carne de frango	(Chen <i>et al.</i> , 2022)
Incorporada a filmes comestíveis à base de amido	Amaciante de carne bovina	(Wongphan <i>et al.</i> , 2022)

*Referência mencionada na Tabela 2 e não serão descritas no texto novamente.

Fonte: elaborada pela autora

Mosafa, Moghadam e Shahedi (2013) estudaram a preparação de nanopartículas magnéticas de ferro revestidas com sílica para imobilização química da papaína e avaliaram sua aplicação como agente clarificante do suco de romã. Para o processo de imobilização, os autores estudaram diferentes valores de pH (3 a 9), de temperatura (10 a 50 °C) e tempo de contato entre a enzima e as nanopartículas (1 a 9 h), sendo a melhor condição como 27,3 °C; pH 7,1; concentração de enzima: 3,3 mg·mL⁻¹; e tempo de imobilização: 10 h, obtido segundo o modelo de otimização por superfície de resposta. Os autores revelam que a papaína imobilizada apresentou melhores resultados quanto a clarificação do suco, atividade enzimática em maior amplitude de temperatura e pH, além de melhor estabilidade de armazenamento e possibilidade de reutilização.

Eshamah *et al.* (2014) estudaram a eficácia das proteases actidina e papaína, normalmente utilizadas como amaciantes de carne pela indústria, na redução de *L. monocytogenes* e de uma população mista constituída por 3 cepas de *E. coli* em carne bovina. Diferentes concentrações enzimáticas foram utilizadas. Uma alíquota de 0,5 mL do inóculo com 5-6 log UFC·cm⁻² foi pipetado sobre a carne, após 5 min em temperatura ambiente foi adicionado 1 mL de solução enzimática e então, as amostras foram mantidas em sacos selados em três temperaturas diferentes (5, 25 e 35 °C). Os autores observaram que a redução média de *E. coli* foi maior quando comparada a *L. monocytogenes* e para as maiores concentrações de enzima a redução bacteriana também foi maior. Quando comparadas as enzimas e o efeito de redução de cada uma, a actidina obteve melhores resultados se for observado apenas a redução, porém a concentração máxima de actidina foi de 700 mg·mL⁻¹ contra 10 mg·mL⁻¹ de papaína.

Moreno-Cortez *et al.* (2015) encapsularam papaína em nanofibras de poli(álcool vinílico) por meio da técnica de eletrofição sem uso de qualquer solvente orgânico e utilizaram vapor de glutaraldeído para reticular a nanofibra promovendo imobilização da papaína por meio de ligações covalente. A concentração de enzima foi calculada em relação a massa do polímero. Após reticulação as nanofibras eram tratadas termicamente a 40 °C por 20 min, armazenadas em temperatura ambiente por 24 h e então eram utilizadas para as demais análises. As nanofibras foram caracterizadas quanto a morfologia e em relação a atividade enzimática. Os autores observaram que a papaína imobilizada manteve 88% da atividade catalítica quando comparada com a enzima livre e puderam ser utilizadas por 6 ciclos seguidos. Quanto a estabilidade de estocagem, a enzima manteve 40 % de atividade catalítica em comparação com a atividade inicial após 14 dias. Os autores sugerem a aplicação como de biossensores especializados na detecção de íons metálicos.

Saeed *et al.* (2017) obtiveram quatro extratos diferentes de mamão, a partir das cascas do mamão verde e maduro e o látex dos frutos verdes e maduros. Foram analisados quanto a concentração proteica, atividade proteolítica, atividade antibacteriana e concentração inibitória mínima contra *Salmonella typhimurium* e como amaciante de carne. O pH de estudo foi o obtido em cada extrato e variou entre 4.5 e 6.0. Quanto a atividade antibacteriana, os autores observaram que os extratos da casca madura e o látex do fruto verde tiveram melhor potencial para controlar o crescimento de *S. Typhimurium*, sendo o extrato de látex do fruto verde o que obteve melhores resultado e apenas ele foi

utilizado nas análises como amaciante de carne. Os autores afirmam que houve melhora quanto a textura e a aceitabilidade, porém houve perdas quanto a suculência e a cor.

Gu *et al.* (2018) avaliaram a imobilização da papaína em suporte de óxido de grafeno com o auxílio de 3-aminopropiltriétoxisilano como agente ligante. Os autores estudaram a otimização das condições de imobilização a partir de parâmetros como estabilidade térmica e de armazenamento, pH e temperatura ótimos, atividade enzimática e reuso, caracterizando o derivado óxido de grafeno e papaína. Todas as análises realizadas para a enzima imobilizada foram comparadas à enzima livre, os autores observaram que para a razão de $6,75 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ de enzima por óxido de grafeno foi obtido o melhor rendimento e eficiência de imobilização, atingindo 78% e 63%, respectivamente, obtidos na temperatura de $35 \text{ }^\circ\text{C}$ e pH 8. No entanto, a papaína quando imobilizada tem pH ótimo igual a 7 e a enzima livre em 8. Quanto ao armazenamento, após 30 dias a papaína imobilizada manteve 63% da sua atividade inicial contra apenas 41% da enzima livre.

Soares *et al.* (2020) estudaram o desenvolvimento de um novo biomaterial de composição híbrida constituído por nanopartículas de óxido de zinco e quitosana para imobilização de papaína utilizando glutaraldeído como agente ligante para aplicações biomédicas. Inicialmente foram produzidas as nanopartículas e então incorporadas a uma solução de quitosana e mantido por 30 min em agitação magnética. Em seguida foi adicionado NaOH para precipitar as nanopartículas que foram lavadas e secas por 2 h a $100 \text{ }^\circ\text{C}$. Para a imobilização, o suporte foi ativado com glutaraldeído a 2,5% (v/v) durante 2 h e então lavado e adicionado em uma solução de papaína de $6 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ por 2 h. O novo nanomaterial foi caracterizado quanto a microestrutura, hidrólise de colágeno, degradação de caseína, aplicação em camundongos e citotoxicidade. Os autores concluíram que a obtenção do suporte híbrido e imobilização da papaína foi de grande êxito visto que a enzima não perdeu a capacidade proteolítica, apresenta baixa citotoxicidade, não ativa o sistema fagocitário celular. Além de que o novo nanomaterial é uma alternativa de baixo custo que também pode ser aplicada na imobilização de outras enzimas.

Chen *et al.* (2022) estudaram a combinação entre o uso do extrato de mamão e processamento a alta pressão para inativar *Salmonella* spp. em carne de peite de frango cru. Foi investigado a inativação da *Salmonella* spp., a qualidade e microestrutura da carne após processamento. As amostras foram fracionadas em pedaços de 5 g e então tratadas com extrato do mamão por 1, 3 ou 5 h seguido pelo processamento a alta pressão

utilizando 350 ou 450 MPa de pressão. Os autores observaram que apenas o tratamento com o extrato de mamão não é suficiente para inibir o crescimento da *Salmonella* spp., mas que as células podem ser lesionadas e ao combinar o processamento a alta pressão pode-se alcançar uma redução superior a 5 log UFC·g⁻¹. Porém, parâmetros como pH, cor e microestrutura da carne foram afetados negativamente.

Wongphan *et al.* (2022) desenvolveram embalagens comestíveis utilizando amido de mandioca pré-gelatinizado de alta e baixa dissolução incorporados com papaína para serem aplicados para o amaciamento de carnes. Os filmes foram produzidos misturando, por 3 h contínuas, 5% (p/p) de amido pré-gelatinizado com 35% (p/p) de glicerol e água destilada. Em seguida a papaína em pó era adicionada em diferentes proporções (0%, 5%, 10% e 15% p/p) e agitados a 25 °C por mais 1 h. Os autores observaram que a papaína modifica as ligações OH do amido, alterando sua estrutura ordenada, conferindo maior elasticidade aos filmes, reduzindo a sensibilidade e solubilidade à água. Para avaliar a maciez da carne, os filmes foram colocados em contato com pedaços de carne por 1 h e então avaliados os valores de cisalhamento Warner-Bratzler e dureza. Os filmes obtidos com amido de alta dissolução apresentaram melhores resultados quanto a maciez da carne devido a rápida dissolução e liberação da papaína, enquanto os filmes com baixa dissolução conferiram maior estabilidade a estrutura do filme. Foi concluído que os filmes obtidos produziram embalagens funcionais eficazes que modificaram as texturas da carne.

2.4.3 Enzimas como Agentes Antimicrobianos e Biotransformadoras de Fármacos

A Tabela 4 -Tabela 4 apresenta alguns estudos que utilizaram enzimas, livres ou em forma de derivados, como agentes antimicrobianos e como biotransformadoras de tetraciclinas.

Tabela 4 - Principais trabalhos da literatura utilizando enzimas na forma livre e/ou imobilizada como agente antimicrobiano e biotransformador de fármacos.

AGENTE ANTIMICROBIANO		
Suporte	Enzima	Referência
Óxido de grafeno Óxido de grafeno Reduzido	Lisozima	(Duan <i>et al.</i> , 2015)
Grânulos de celulose	Glicose oxidase	(Califano <i>et al.</i> , 2021)
Óxido de zinco Óxido de ferro (II, III)	α -amilase	(Długosz <i>et al.</i> , 2021)
BIOTRANSFORMADOR DE FÁRMACOS		
Suporte	Suporte	Suporte
Nanopartículas magnéticas	Lacase cerrena	(Yang <i>et al.</i> , 2017)
Membrana de microfiltração de fibra oca de polissulfona	Tirosinase e lacase	(Ba <i>et al.</i> , 2018)
Livre	Peroxidase de raiz-forte	(Leng <i>et al.</i> , 2020)
Espuma de sílica mesoestruturada	Lacase	(Zdarta <i>et al.</i> , 2020)

Fonte: elaborada pela autora

A seguir um breve resumo dos estudos selecionados sobre enzimas como agentes antimicrobianos:

Duan *et al.* (2015) estudaram o uso do óxido de grafeno e óxido de grafeno reduzido como suporte para imobilização da enzima lisozima como agente bio-antibacteriano. Os autores averiguaram que a lisozima tem um excelente desempenho antibacteriano e que os produtos da biocatálise não são tóxicos. Após essa etapa foram confeccionadas membranas de ultrafiltração híbridas com cada óxido (grafeno e grafeno reduzido) com polietersulfona via método de inversão de fases para avaliar a formação de biofilmes.

Califano *et al.* (2021) estudaram o desenvolvimento de grânulos de celulose antimicrobianos utilizando glicose oxidase para liberar peróxido de hidrogênio em concentrações antimicrobianas com o objetivo de encontrar uma alternativa aos antibióticos. Os autores avaliaram fatores como resistência mecânica, vida útil e produção de peróxido de hidrogênio para otimizar a produção dos grânulos funcionalizados com a enzima. Por meio de testes de inibição do crescimento de *P. aeruginosa*, *E. coli* e *S.*

aureus e observou-se que eles foram capazes de inibir o crescimento de todos os microrganismos testados. Os autores sugerem aplicações potenciais como a fabricação de produtos biomédicos e aditivos para preservação de alimentos.

Długosz *et al.*, (2021) estudaram a imobilização da enzima α -amilase em nanopartículas de ZnO e Fe₃O₄, e determinaram as melhores condições do processo, como concentrações de enzimas, temperaturas e tempos, analisando o equilíbrio e a cinética de adsorção. A α -amilase imobilizada em Fe₃O₄ foi investigada para aplicação como catalisador na hidrólise de amido e manteve alta atividade catalítica. O ZnO- α -amilase foi investigado quanto as propriedades antimicrobianas contra *P. fluorescens* e *E. coli*. Os autores observaram que as propriedades antimicrobianas da amilase preparada a partir de ZnO resultam da ação sinérgica das nanopartículas de óxido de zinco com a enzima, uma vez que a α -amilase em si não possui propriedades antimicrobianas. A cinética de pseudo-segunda ordem e a isoterma de Langmuir foram as melhores para descrever os processos de imobilização.

A seguir um breve resumo dos estudos selecionados sobre enzimas como biotransformadores de fármacos:

Yang *et al.* (2017) estudaram a lacase Cerrena para formar agregados enzimáticos de ligações cruzadas (CLEAs) com nanopartículas de magnetita para utilização na degradação de sete antibióticos e avaliar a atividade antimicrobiana da tetraciclina e oxitetraciclina. Foi utilizado glutaraldeído como agente ligante entre as partículas magnéticas e a enzima. Os autores realizaram testes de degradação com concentração de 100 mg·L⁻¹ para os fármacos com e sem mediador redox ABTS. Eles averiguaram que na ausência do mediador, a degradação da tetraciclina e oxitetraciclina pela lacase Cerrena teve maior eficiência, enquanto que para sulfametoxazol, ampicilina e trimetoprima a degradação foi elevada na presença do mediador. Já para o cloranfenicol a degradação não ocorreu, nem mesmo na presença do mediador redox. A degradação total da tetraciclina se deu com 48 h em pH 6 a 25 °C, sendo mais de 80 % de degradação em 12 h. Também foi observado redução significativa na atividade antimicrobiana da tetraciclina e oxitetraciclina.

Ba *et al.* (2018) estudaram a eficiência de um biorreator híbrido de agregados de tirosinase e lacase reticulados combinados e membrana de microfiltração de fibra oca de polissulfona para remoção uma mistura de 14 produtos farmacêuticos em concentração

ambientalmente relevante de $10 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. Os autores observaram que a remoção completa de todos os produtos farmacêuticos após 5 dias de operação contínuo e destacam que a remoção completa para diferentes tipos de fármacos é devido a ação sinérgica da membrana e das enzimas insolúveis. O biocatalisador reteve quase 70% de sua atividade enzimática inicial durante o período de tratamento. Os autores afirmam que os resultados dão promissores e sugerem que o biorreator híbrido poderia ser avaliado para outras enzimas e fármacos.

Leng *et al.* (2020) investigaram o uso da enzima peroxidase de raiz-forte (HRP), com ou sem um mediador redox chamado ácido 2,2-Azino-bis-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico) (ABTS), para degradar a tetraciclina em tratamento de água. Os autores observaram que a taxa de remoção da tetraciclina foi influenciada pela temperatura e pH da água, devido à atividade enzimática e à presença do ABTS. A adição de ABTS acelerou a degradação da tetraciclina. Os autores propuseram possíveis mecanismos de transformação da tetraciclina e concluíram que o sistema HRP/ABTS tem potencial para tratamento de efluentes domésticos contaminados por tetraciclina. No entanto, são necessárias otimizações no projeto do tratamento enzimático para tornar essa tecnologia ainda mais eficiente.

Zdarta *et al.* (2020) utilização espuma de sílica mesoestruturada sem e com funcionalização utilizando cobre como suporte para imobilização da enzima lacase de *Trametes versicolor*. Foi obtido rendimento de imobilização de 95% e 85%, respectivamente. Os derivados enzimáticos foram utilizados para degradação de tetraciclina em solução aquosa. Os autores observaram que a modificação da superfície da espuma de sílica melhorou a atividade enzimática, mantendo melhor atividade em uma ampla faixa de pH e temperatura, além de permitir a remoção completa da tetraciclina da solução aquosa na concentração de 1 mg L^{-1} .

Este estudo inovador propõe a imobilização das proteases bromelina e papaína em nanofolhas de óxido de grafeno, estabelecendo um marco pioneiro nessa área de pesquisa. Dois processos de imobilização foram utilizados, com e sem utilização de glutaraldeído como agente ligante. Os derivados suporte-enzima podem ser empregados em diversas aplicações, para este estudo foram avaliados como agentes antimicrobianos contra a bactéria *Escherichia coli* em meio de cultura BHI e em suco de maçã industrializado e, na biotransformação dos antibióticos tetraciclina e oxitetraciclina em meio aquoso.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MATERIAL

Para a síntese de óxido de grafeno foram utilizados grafite em pó com 99% de carbono (Sigma-Aldrich Chemical Co, EUA), ácido sulfúrico P.A., nitrato de sódio P.A. e permanganato de potássio P.A. (Nuclear, Brasil), peróxido de hidrogênio a 30% P.A. (PanReac AppliChem, Itália), água destilada e gelo para resfriamento durante a reação.

As enzimas utilizadas neste estudo foram bromelina do caule de abacaxi (atividade $\geq 3 \text{ U}\cdot\text{mg}^{-1}$ de proteína) e papaína de *Carica papaya* (atividade $\geq 3,6 \text{ U}\cdot\text{mg}^{-1}$ de proteína), ambas adquiridas da Sigma-Aldrich Chemical Co (EUA). Para as demais análises foram utilizados caseína (Dinâmica Química, Brasil), ácido tricloroacético (TCA, Neon, Brasil), reagente de Bradford, Albumina de soro bovina (BSA) (Sigma-Aldrich) e tirosina (Synth, Brasil). Todas as análises foram realizadas em solução tampão pH 6, 7 e 8 (fosfato de potássio) e pH 9 (carbonato de sódio) na concentração de 50 mmol.

A cepa utilizada neste estudo foi *E. coli* (ATCC® 10536™) adquirida da Coleção de Microrganismos de Referência em Vigilância Sanitária – CMRVS (Fundação Oswaldo Cruz – FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil). Foram utilizados os meios de cultura ágar padrão para contagem (*plate count agar* – PCA) e caldo *brain heart infusion* (BHI), e água peptona, todos adquiridos na Kasvi (Brasil) e preparados conforme instrução do fabricante. E suco de maçã comercial esterilizado por temperatura ultra alta (*ultra high temperature* – UHT) da marca Del Valle, Coca-Cola.

Os antibióticos utilizados no estudo de biotransformação via enzimática foram a tetraciclina e oxitetraciclina, todos adquiridos na Sigma-Aldrich.

3.2 METODOLOGIA

3.2.1 Síntese do Óxido de Grafeno

A síntese foi realizada segundo o método de Hummers com modificações (HUMMERS; OFFEMAN, 1958). Em banho de gelo e sob agitação magnética, adicionou-se 1 g de grafite e 23 mL de ácido sulfúrico P.A. em um Erlenmeyer de 250 mL. A solução permaneceu sob agitação magnética por 15 min, para garantir a completa

dispersão do grafite e em seguida, adicionou-se 0,5 g de nitrato de sódio e 3 g de permanganato de potássio, mantendo a agitação contínua por 2 h. Após completa homogeneização, a solução foi mantida em banho-maria (Dist DI911-S) a 35 °C onde permaneceu por 30 min, observando a formação de uma pasta de coloração marrom. Em seguida, adicionou-se 46 mL de água destilada e elevou-se a temperatura do banho-maria para 98 °C, deixando por mais 30 min. Após esse período, o meio foi transferido para um béquer e colocado novamente sob agitação magnética. Em seguida, adicionou-se 140 mL de água destilada e 10 mL de peróxido de hidrogênio a 30% sob agitação constante e lenta, por 15 min. Observou-se a mudança da cor marrom escuro para marrom com aspecto dourado.

O meio reacional foi mantido em repouso por 15 h, em seguida, centrifugou-se (Fanem Excelsa II-Mod206BL) à 3600 rpm (aproximadamente 1450 força g) por 30 min, descartando o sobrenadante. O material decantado passou por cinco lavagens com ácido clorídrico à 1 M e dez vezes com ácido clorídrico à 0,1 M. Após cada lavagem o óxido de grafeno foi ressuspensão utilizando um vórtex (Biomixer QL-901) e novamente centrifugado à 3600 rpm por 60 min, observando-se a mudança de coloração do precipitado de amarelo escuro para preto.

Após a lavagem com ácido, o óxido de grafeno foi lavado com água destilada, em torno de 70 °C, e centrifugado, nas mesmas condições anteriores, até o sobrenadante atingir pH próximo a 6. Observou-se a formação de gel quando o OG é lavado com água destilada.

Diferentemente do processo realizado por Hummers, o gel obtido foi congelado em ultrafreezer vertical (Glacier) à -80 °C; e posteriormente, liofilizado em um liofilizador de bancada (L-101, Liotop) à -50 °C por um período de 48 h.

Após a liofilização, o OG foi pesado e adicionado água destilada seguindo a proporção 1 mg·mL⁻¹ em relação a massa de grafeno e volume de água. A suspensão foi agitada em banho ultrassônico (Unique Ultraclean1600) por 6 h para esfoliação e obtenção das nanofolhas de OG. Para armazenamento, a suspensão contendo as nanofolhas de OG foi então distribuída em placas de Petri e secas em estufa à 60 °C; ao final, foi removido das placas e acondicionado em frascos de vidro de 5 mL hermeticamente fechados.

3.2.2 Caracterização do Óxido de Grafeno

3.2.2.1 Preparação das amostras líquidas

Uma suspensão de concentração $67 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ foi preparada e a partir desta foram feitas 5 novas suspensões. Para preparar a suspensão inicial foi pesado 1 mg de OG e disperso em 15 mL de água destilada durante 6 h em banho ultrassônico. Para preparação das novas suspensões foram determinados 5 fatores de diluição (5, 10, 25, 50, 100) em água destilada e novamente agitadas por 1 h em banho ultrassônico.

3.2.2.2 Caracterização química do OG

Para confirmar a oxidação do grafite em óxido de grafeno, análises para identificação de ligações e elementos químicos foram realizadas. Por meio da análise de Espectroscopia de Energia Dispersiva de Raio-X (EDX) foi realizada a caracterização dos componentes elementares do OG utilizando um microscópio eletrônico de varredura (SEM-HITACHI TM3030) com EDX acoplado para uma amostra sólida.

Foram realizadas análises diversas para identificar as ligações, grupos funcionais e características referentes a cristalinidade e oxidação desse material. Foi realizada uma varredura entre 200 e 600 nm de comprimento de onda para cinco amostras com concentrações 13,4; 6,7; 2,68; 1,34 e 0,67 ppm, em espectrofotometria UV-visível (Q898U2M5, Quimis); análise de Espectroscopia Raman (PeakSeeker PRO-785) realizada em um espectrômetro dispersivo com potência do laser a 5 mW e detector CCD TE-cooled para uma amostra no estado sólido sem tratamento prévio; Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR) por ATR da amostra sólida e, Difração de Raios-X (DRX) realizada em geometria Bregg-Brentanno, com 2θ variando de 3° a 40° . O espaçamento basal foi calculado a partir da Equação (1).

$$d = \frac{n \cdot \lambda}{2 \cdot \sin\theta} \quad (1)$$

no qual d é espaçamento interplanar, n é a ordem de reflexão, λ é o comprimento de onda do raio-X (foi utilizado do cobre, 0,15418 nm) e θ é o ângulo incidente (posição do pico).

Quanto ao estudo das cargas superficiais e estabilidade da suspensão foi preparada uma amostra com concentração de 13,4 ppm e utilizado o equipamento Stabino Nanoflex para visualizar o perfil do potencial zeta desse material entre o pH 2 e 10.

3.2.2.3 Caracterização microestrutural das nanofolhas de OG

Para analisar a formação das nanofolhas e sua morfologia foram realizadas análises de microscopia eletrônica de varredura (MEV) e de transmissão (TEM). Para o MEV (JEOL JSM-6390LV) duas amostras foram preparadas, uma líquida com concentração de 13,4 ppm, definida após a espectrofotometria UV-visível, gotejada em *stub* e seca, e uma segunda amostra na forma sólida que não passou por nenhum tratamento antes de ser fixada no *stub*. Não foi necessário fazer o recobrimento das amostras com ouro, pois o carbono é emissor de elétrons. Para o MET (JEM-1011, 100kV) uma amostra líquida de concentração 13,4 ppm foi gotejada em um *grid* e seca em temperatura ambiente.

3.2.3 Caracterização da Enzima Livre e Imobilizada

3.2.3.1 Determinação da atividade enzimática e parâmetros cinéticos

A atividade enzimática foi determinada para as enzimas bromelina e papaína na forma livre e imobilizada com e sem glutaraldeído, e expressa em $U \cdot mL^{-1}$, para diferentes pHs (solução tampão fosfato à 50 mmol para pH 6, 7 e 8, e solução tampão carbonato à 50 mmol para pH 9) e diferentes temperaturas (25, 30, 40 e 50 °C).

As análises foram realizadas de acordo com a metodologia utilizada por Canton *et al.* (2022). Em um microtubo de 2 mL foram adicionados 0,65 mL de solução enzimática ($0,5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) e 0,65 mL de solução de caseína 0,65% (m/v). A mistura foi incubada por 20 min em banho com temperatura controlada. Ao final dos 20 min foram adicionados 0,65 mL de TCA a 10% (m/v) para interromper a reação. Os microtubos foram mantidos em temperatura ambiente por 10 min para então serem centrifugados por 10 min a 8170 g. O sobrenadante foi quantificado por meio de um espectrofotômetro UV-vis (Hitachi, U-2900) no comprimento de onda de 281 nm e a absorbância obtida foi relacionada com uma curva padrão de tirosina utilizando cubeta de quartzo. As soluções

de caseína e enzima foram preparadas em solução tampão no pH a ser estudado e ajustado conforme necessário. Todas as análises foram realizadas em triplicata e acompanhadas de um controle, sendo que este teve a adição de 0,65 mL de TCA em 0,65 mL de caseína e só então adicionou-se 0,65 mL da solução enzimática.

O modelo de Michaelis-Menten foi utilizado para determinar os parâmetros cinéticos de velocidade máxima (V_{max}) e a constante de Michaelis (K_m). De forma semelhante à atividade enzimática, foi adicionado 0,65 mL de solução de caseína, porém variando a concentração entre 0,15 e 1,55 %. Em seguida, adicionou-se 0,65 mL de solução enzimática $0,5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ e ao final de 20 min, a reação era finalizada com adição de 0,65 mL de TCA a 10% (m/m). Todas as análises foram realizadas em triplicata e acompanhadas de um controle.

3.2.3.2 Imobilização enzimática

O processo de imobilização foi realizado pelos métodos físico e químico, utilizando glutaraldeído (Glu) 1% v/v como ligante. Com base no potencial zeta foi definido o pH 7 (50 mmol) para o processo de imobilização, pH de maior estabilidade do OG em suspensão.

Inicialmente o OG foi agitado em banho ultrassônico por 6 h em solução tampão fosfato na proporção 1:1 (m/v). Para imobilização química, adicionou-se glutaraldeído e agitou-se, por 5 h, em agitador Kline (Splabor, SP-241-AN) à 150 rpm. Em seguida, o OG-Glu foi recuperado por centrifugação a 8170 g, lavado por 3 vezes com solução tampão pH 7 para remoção do glutaraldeído não ligado e novamente disperso utilizando um vórtex (Biomixer QL-901).

Em ambos os processos de imobilização, as enzimas foram adicionadas nas proporções 1:1, 2:1 e 3:1 m/m de enzima:OG, e colocados em agitação à 150 rpm em agitador Kline a temperatura de 25 °C e pH 7. Essas proporções foram determinadas para visando saturação do suporte, uma vez que o suporte tem custo superior as enzimas bromelina e papaína. A cada 30 min, durante 2 h, foram retiradas alíquotas de 500 μL que foram centrifugadas a 8170 g para decantação do OG. As alíquotas foram ressuspensas com 1 mL de solução tampão fosfato pH 7 para garantir que toda enzima não aderida ao suporte fosse quantificada.

A concentração de enzima no suporte de OG (q_E) foi determinada a partir da diferença das concentrações de proteína na solução inicial e no sobrenadante após o

período de imobilização e descontado a concentração de enzima perdida na lavagem, calculada conforme a Equação 2.

$$q_E = \frac{(C_{f,0} - C_{f,t}) \cdot V - C_w \cdot V_w}{W} \quad (2)$$

em que $C_{f,0}$, $C_{f,t}$ e C_w é a concentração inicial, após o período de imobilização e na água de lavagem, respectivamente, de enzimas na solução ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$); V e V_w o volume da solução e de lavagem do suporte (L); W é a massa do OG (g) e q_E é concentração de enzima no suporte ($\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$).

Para determinar a concentração de proteína foi utilizado o método de Bradford (BRADFORD, 1976). Esse é um método bem aceito na literatura (LIANG *et al.*, 2016; YANG *et al.*, 2015; YÜCEL, 2012; ZDARTA *et al.*, 2015) e que se baseia na mudança de cor da solução ácida de *Coomassie Brilliant Blue G 250*, ao se ligar a uma proteína a absorvância máxima muda de 465 para 595 nm. Os valores de absorvância das amostras são correlacionados a curva padrão construída com albumina de soro bovina (BSA).

O rendimento de imobilização em proteína (Y_p) foi determinado relacionando-se a quantidade de proteína total imobilizada e quantidade de proteína livre antes da imobilização, segundo a Equação 3.

$$Y_p = \frac{q_E \cdot W}{C_{f,0} \cdot V} \quad (3)$$

na qual q_E é concentração de enzima no suporte ($\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$), W é a massa do OG (g); V é o volume da solução (L); $C_{f,0}$ é a concentração enzimática da solução inicial ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) e Y_p é o rendimento de imobilização em proteína.

Substituindo q_E da Equação 2 na Equação 3, obtemos a Equação 4.

$$Y_p = \frac{(C_{f,0} - C_{f,t})}{C_{f,0}} - C_w \cdot \frac{V_w}{C_{f,0} \cdot V} \quad (4)$$

sendo $C_{f,0}$, $C_{f,t}$ e C_w a concentração enzimática da solução inicial, ao final de imobilização e na água de lavagem ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$), respectivamente; V e V_w o volume da solução e de lavagem do suporte (L) e, Y_p é o rendimento de imobilização em proteína.

Foi determinado o rendimento de imobilização em atividade ou atividade recuperada (Y_a) relacionando-se a atividade total da enzima imobilizada e a atividade total da enzima livre antes da imobilização, segundo a Equação 5.

$$Y_a = \frac{A_{i,t}}{A_{f,0}} \quad (5)$$

Sendo $A_{i,t}$ é a atividade total da enzima imobilizada ao final da imobilização (U) e $A_{f,0}$ é a atividade total da enzima livre no início da imobilização (U) e Y_a é a atividade enzimática recuperada.

A eficiência de imobilização foi obtida relacionando-se a atividade específica da enzima imobilizada e a atividade específica da enzima livre em solução ou pela relação entre a atividade recuperada (Y_a) e o rendimento de imobilização (Y_p), de acordo com a Equação 6.

$$E = \frac{a_i}{a_f} = \frac{Y_a}{Y_p} \quad (6)$$

Onde, E é a eficiência de imobilização, a_i é a atividade específica da enzima imobilizada ($\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}$), a_f é a atividade específica da enzima livre em solução ($\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}$), Y_a é a atividade recuperada ou rendimento da imobilização em atividade e Y_p é o rendimento da imobilização em proteína.

A enzima imobilizada foi denominada como derivado enzimático. As nomenclaturas utilizadas em gráficos para enzima livre será a inicial da enzima (B para bromelina e P para papaína) seguida por L (B-L ou P-L), o derivado obtido por imobilização sem glutaraldeído será a inicial da enzima seguida por OG (B-OG ou P-OG)

e o derivado obtido por imobilização com glutaraldeído será a inicial da enzima seguida por OG-Glu (B-OG-Glu ou P-OG-Glu).

Os derivados foram analisados por TEM para certificar que as enzimas ficaram aderidas ao OG.

3.2.3.3 Avaliação de estabilidade dos derivados

Os testes de estabilidade térmica e de estocagem foram realizados para as enzimas livres e imobilizadas física e quimicamente. A estabilidade térmica foi analisada em intervalos de 30 min durante 4 h à 50 °C, enquanto o teste de estabilidade de estocagem foi realizado à 4 °C até que a atividade enzimática relativa fosse reduzida em 50%.

A determinação da estabilidade de uso foi semelhante a análise de atividade enzimática, 0,65 mL de suspensão dos derivados com concentração enzimática em 0,5 g·L⁻¹ foi adicionado em um microtubo de 2 mL, seguido da adição de 0,65 mL de solução de caseína 0,65% (m/v). A mistura foi incubada por 20 min em banho com temperatura de 50 °C. Ao final dos 20 min foram adicionados 0,65 mL de TCA a 10% (m/v) para interromper a reação. Os microtubos foram mantidos em temperatura ambiente por 10 min para então serem centrifugados por 10 min a 4085 g. O sobrenadante foi quantificado por meio de um espectrofotômetro UV-vis (Hitachi, U-2900) no comprimento de onda de 281 nm, enquanto o derivado suporte-enzima foi redisperso e realizado novamente o mesmo procedimento até que o valor de atividade relativa fosse inferior a 50% da atividade relativa do primeiro ciclo.

As condições utilizadas foram pH e temperaturas ótimas dentre os valores estudados. Para papaína o pH para a enzima livre, imobilizada fisicamente e quimicamente foram 6, 7 e 7, respectivamente. Para a bromelina, os valores de pH foram 7, 6 e 7. A temperatura que apresentou maior atividade foi 50 °C para todas as enzimas tanto na forma livre quanto de derivado.

3.2.4 Atividade Antimicrobiana das Enzimas

3.2.4.1 Preparação do inóculo

Para o preparo dos inóculos de *E. coli*, 100 μL das suspensões de células foi descongelada e transferida para um tubo contendo 10 mL de caldo BHI e, cultivada à 37 °C por 16 h até a fase estacionária de crescimento para obter uma concentração de 10^9 UFC·mL⁻¹.

3.2.4.2 Preparação do derivado enzimático para análise da atividade antimicrobiana

Para as análises utilizando o derivado enzimático, o OG foi inicialmente esterilizado em luz UV por 15 min e disperso em banho ultrassônico por 7 h diretamente no meio BHI ou em suco de maçã. A enzima foi pesada em ambiente estéril, adicionada ao OG disperso e colocados em agitação à 150 rpm em agitador Kline a temperatura de 25 °C durante 1 h.

3.2.4.3 Análise da atividade antimicrobiana da papaína e da bromelina

As análises de atividade antimicrobianas foram realizadas em meio de cultura BHI a pH 7 e em suco de maçã comercial, com pH 4, esterilizado por temperatura ultra alta (*ultra high temperature - UHT*) da marca Del Valle.

Para as análises de atividade antimicrobiana em meio de cultura, foram realizadas diluições seriadas do inóculo em caldo BHI para se obter uma concentração inicial de 10^7 UFC·mL⁻¹. Os experimentos foram realizados em tubos contendo 10 mL de caldo BHI em temperatura isotérmica de 25°C em *Biologic Oxygen Demand* (BOD) (Tecnal, TE391-1) e registrada por mini data-logger (Texto, 174 H). As análises de atividade microbiana em suco de maçã ocorreram de forma análoga, porém as diluições e experimentos foram realizados também em suco. Foi determinada a temperatura de 25 °C pois essa é a temperatura de comercialização de suco esterilizado por temperatura ultra alta. Todas as cinéticas foram acompanhadas por 24 h e para cada análise foi realizado um controle sem enzima.

Para bromelina, foram analisadas concentrações de 10, 12 e 15 g·L⁻¹ dissolvidas diretamente no meio de cultura. Para a papaína foram analisadas concentrações de 5, 8 e 10 g·L⁻¹ também dissolvidas diretamente no meio de cultura. Essas concentrações foram determinadas por meio do estudo da literatura (ESHAMAH *et al.*, 2014; WONGPHAN *et al.*, 2022). As concentrações de 1 e 2 g·L⁻¹ também foram analisadas com ambas as enzimas nas formas livre e para os derivados B-OG e P-OG em meio BHI e em suco de maçã.

Para quantificação de *E. coli*, por contagem padrão em placas, diluições seriadas em água peptonada foram preparadas e alíquotas de 100 µL das diluições foram semeadas em superfície de PCA e, em seguida, incubadas em BOD a 37 °C por 24 h.

A média e o desvio padrão da contagem de UFC·mL⁻¹ de três amostras independentes de cada amostragem, as quais foram retiradas em intervalos de tempo pré-determinados, de cada ponto da curva de inativação e/ou crescimento foram calculados para determinar a cinética.

3.2.5 Biotransformação via Enzimática dos Fármacos

A análise da biotransformação dos fármacos com papaína e bromelina livres foi realizada em batelada e quantificada por espectrofotometria UV-vis. Para isto, construiu-se a curva padrão para cada fármaco utilizando soluções entre 1 e 24 mg·L⁻¹ em um comprimento de 357 nm, característico das tetraciclina. Foram preparadas soluções de 100 mg·L⁻¹ para cada antibiótico, em água (pH 3,5) e em solução tampão fosfato à 50 mmol (pH 6 e 7). Em um Erlenmeyer foi adicionado 75 mL da solução do antibiótico e 540 µL de solução enzimática (0,5 g·L⁻¹) resultando em aproximadamente 3,6% m/m de enzima em relação ao fármaco. A solução foi colocada em agitação contínua em duas temperaturas, 25 e 40 °C, e protegida da luz. Uma alíquota foi retirada em tempos pré-estabelecidos de reação (0, 0,5, 1, 2, 3, 4, 6, 8 e 10 h) e analisada em espectro UV-vis (Q898U2M5, Quimis). As análises foram realizadas em triplicatas.

Foi avaliada a ação do derivado B-OG como agente biotransformador para TC e OTC em pH 7 como descrito acima para as enzimas livres.

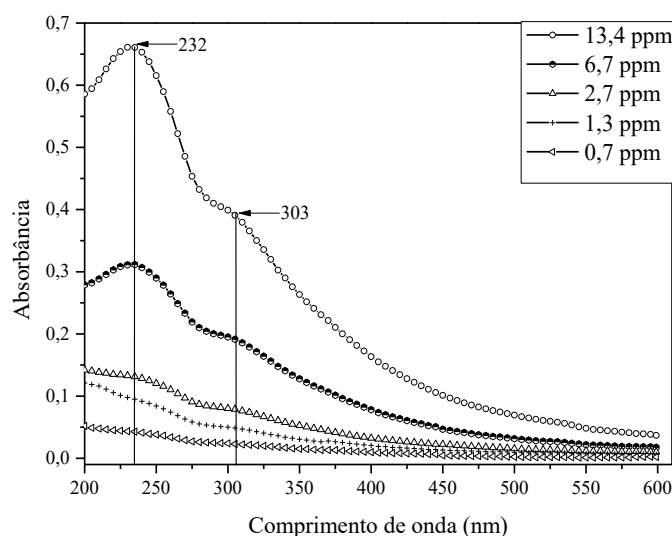
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Caracterização do Óxido de Grafeno

O óxido de grafeno (OG) produzido foi caracterizado por espectroscopia dispersiva de raios-X para identificação dos elementos químicos que compõe a molécula e suas proporções. A porcentagem em átomos fornecidos pelo microscópio de energia dispersiva de raio-X foi de 82,3% para o carbono e de 17,7% para o oxigênio, correspondente a 77,7% e 22,3% em massa, respectivamente, com desvio padrão de 0,6%.

A presença desses elementos também foi detectada por meio da espectrofotometria UV-visível pela identificação dos picos em comprimentos de ondas (λ) característicos para OG. Na Figura 6 é possível observar os espectros obtidos por meio de espectrofotometria UV-visível para 5 concentrações diferentes de OG.

Figura 6 - Espectros de UV-vis para diferentes concentrações de óxido de grafeno



Fonte: elaborado pela autora

Para as concentrações com 13,4 e 6,7 (ppm) os picos estão mais evidentes, é possível visualizar na Figura 6 a presença de dois comprimentos de onda, 232 e 303 nm. O pico em 232 nm é o de maior absorção e atribui-se à transição das ligações π - π (C=C) presentes em anéis aromáticos, enquanto que o pico em 303 nm é atribuído a n- π das duplas ligações C=O. Na literatura, diversos autores encontraram resultados semelhantes (CHAUHAN *et al.*, 2022; ÇIPLAK; YILDIZ; ÇALIMLI, 2015; DUAN *et al.*, 2015; ZHANG *et al.*, 2010).

Após as análises fundamentais, foi realizada a espectrofotometria Raman do OG que está representado na Figura 7, sendo possível observar duas bandas. A primeira banda é conhecida como banda G e possui número de onda de 1584 cm^{-1} , correspondente ao fónon E_{2g} de átomos de carbono ligados a carbonos sp^2 em uma rede hexagonal bidimensional, causada por vibração ótica planar desses átomos de carbono no plano. A segunda é conhecida como banda D e apresenta número de onda de 1327 cm^{-1} com hibridização do carbono sp^3 . Essa banda é um indicador de desordem, que pode surgir de certos defeitos, como a presença de grupos funcionais, espaços vazios, limites de grãos e espécies de carbono amorfo, e está relacionada a vibrações de átomos de carbono com ligações em terminações planas de forma desordenada, o que ocasiona a quebra de simetria (DASGUPTA *et al.*, 2017; JIŘÍČKOVÁ *et al.*, 2022).

Essas bandas são características de materiais carbonáceos como grafeno e seus alótropos. Diversos autores que utilizaram o método de Hummers para obtenção de OG obtiveram resultados muito semelhantes aos obtidos neste estudo (Tabela 5).

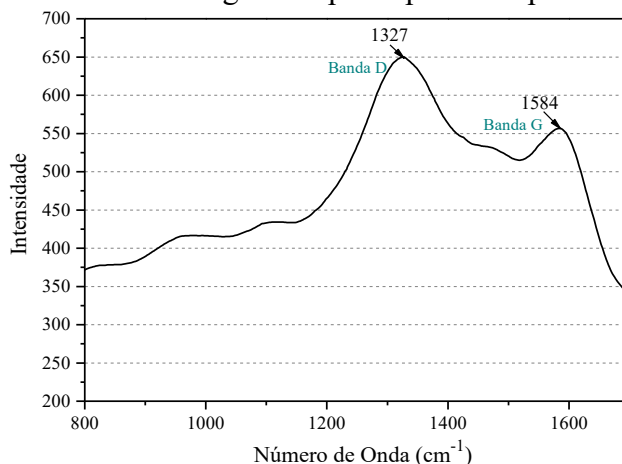
Tabela 5 - Bandas G e D características do óxido de grafeno (OG) obtidas por outros autores

Banda G (cm^{-1})	Banda D (cm^{-1})	Referências
1580	1350	(Shen <i>et al.</i> , 2010)
1577	1351	(Sun; Yang; Huang, 2011)
1605	1353	(Johra; Lee; Jung, 2014)
1585	1330	(Çiplak; Yildiz; Çalimli, 2015)
1590	1361	(Kuang; Zhang, 2016)
1584	1327	(Dasgupta <i>et al.</i> , 2017)
1600	1350	(Jiříčková <i>et al.</i> , 2022)

Fonte: elaborado pela autora

A razão de intensidade dessas duas bandas indica a qualidade do OG quanto a oxidação. Ainda, na Figura 7, tem-se as intensidades para cada banda, sendo sua razão, ID/IG, de 0,86. Essa razão para grafeno puro é ≥ 1 , logo, quando o grafeno é oxidado essa razão é menor que 1, indicando que a obtenção do OG mesmo com modificações na secagem teve oxidação (LIN; CHEN, 2014).

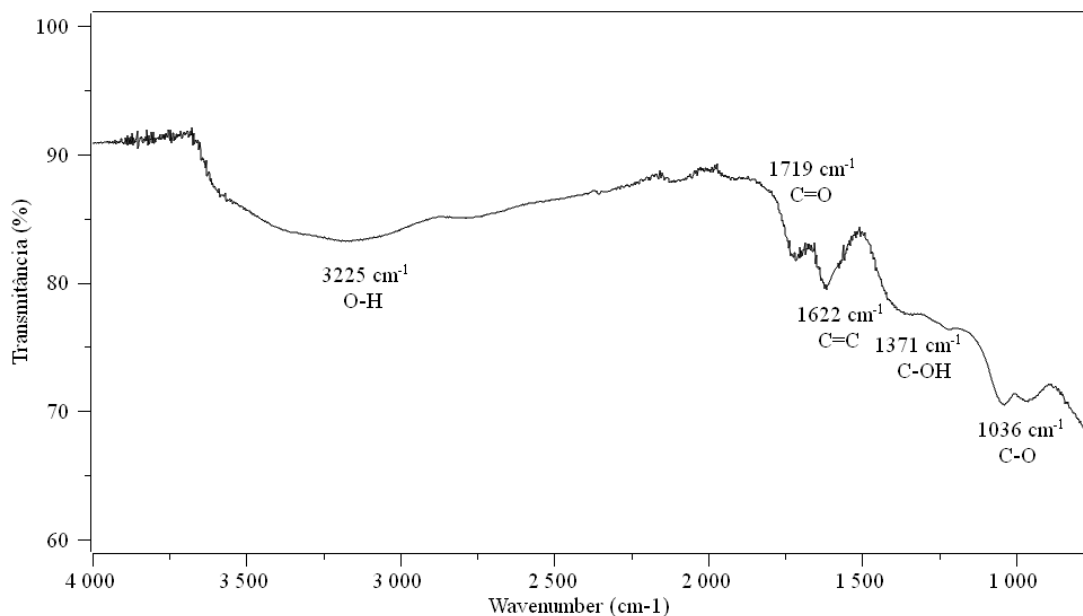
Figura 7 - Banda G e D do óxido de grafeno por espectroscopia Raman



Fonte: elaborado pelo autor

Por meio da análise de FTIR-ATR foi possível comprovar a presença dos grupos funcionais do OG. A Figura 8 apresenta o espectro obtido para uma amostra de OG sintetizado.

Figura 8 - Espectrograma por FTIR do óxido de grafeno



Fonte: elaborado pela autora

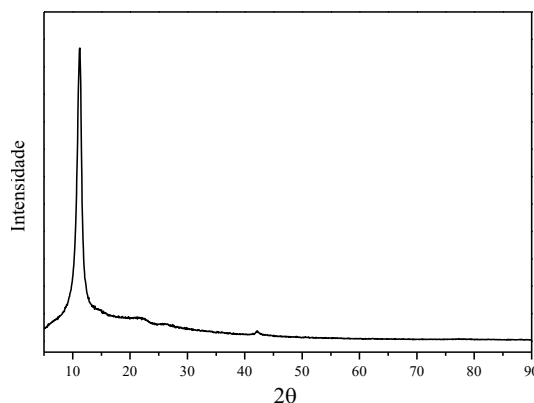
Os grupos epóxis contribuem para a formação do pico em 900 cm^{-1} que se deve às vibrações de flexão de C-O-C, do pico em 1036 cm^{-1} devido às vibrações de alongamento das ligações C-O-C e do pico 1622 cm^{-1} referente à vibração do plano híbrido sp^2 das ligações C=C. Os grupos contendo hidroxila são representados na formação dos picos em 1036 cm^{-1} devido à vibração de alongamento do C-O-C e em

3225 cm^{-1} que se deve à vibração de alongamento de O–H. O pico de 3225 cm^{-1} contém além do grupo hidroxila, o grupo carboxila e moléculas de água na amostra. Esse pico mais amplo e menos intenso pode ocorrer devido à quantidade de água absorvida na superfície do OG, pois durante o processo de oxidação do pó de grafite os grânulos maiores não são oxidados ou atingem baixos níveis de oxidação, reduzindo seu caráter hidrofílico e a quantidade de ligações O–H (MANORATNE; ROSA; KOTTEGODA, 2017; SUDESH *et al.*, 2013; XIANG *et al.*, 2022).

Os grupos carboxilas são representados nos picos 1371 cm^{-1} referente a vibração de alongamento de C–OH, em 1719 cm^{-1} das vibrações de alongamento de C=O e em 3400 cm^{-1} das ligações O–H. Também pode ocorrer um pequeno número de ligações éster correspondentes aos picos 1719 cm^{-1} vibração de alongamento de C=O e a vibração de alongamento de C–OH no pico 1371 cm^{-1} (ÇIPLAK; YILDIZ; ÇALIMLI, 2015; XIANG *et al.*, 2022).

Em seguida, foi realizada a análise de difração de raios-X para avaliar as características da estrutura e o espaçamento entre camadas e átomos do OG. Como pode ser visto na Figura 9, foi obtido um pico estreito e alongado em $2\theta = 11,2$ e espaçamento basal de $7,94\text{ \AA}$ (Equação 1). Quando comparado com o espaçamento basal do grafite puro ($3,36\text{ \AA}$), o espaçamento do OG é maior devido aos grupos funcionais em sua superfície.

Figura 9 - Espectrograma obtido por DRX do óxido de grafeno



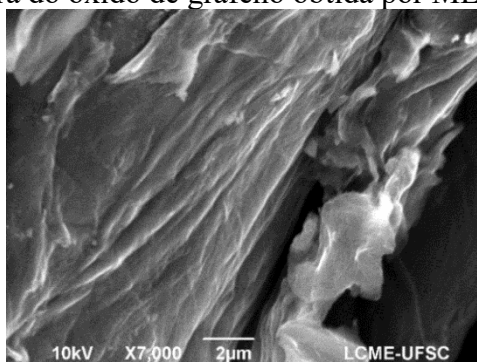
Fonte: elaborado pela autora

O formato do pico é característico de materiais cristalinos e pode estar relacionado com a formação de uma estrutura ordenada através da secagem da suspensão de OG formado pela aglomeração das camadas. Observações e difratogramas

semelhantes também foram obtidos por diversos autores (CHAUHAN *et al.*, 2022; DASGUPTA *et al.*, 2017; KASHEFI; BORGHEI; MAHMOODI, 2018; KAUR; KAUR; KUKKAR, 2018; SUN; YANG; HUANG, 2011).

A aglomeração das camadas foi confirmada pelas microscopias eletrônicas de varredura (MEV) e de transmissão (MET), onde é possível obter informações sobre topografia da superfície do OG. Nota-se na MEV (Figura 10) que para a amostra sólida houve o empilhamento das nanofolhas do OG, que tendem a se agrupar para formar aglomerados de multicamadas, prejudicando a visualização das monocamadas.

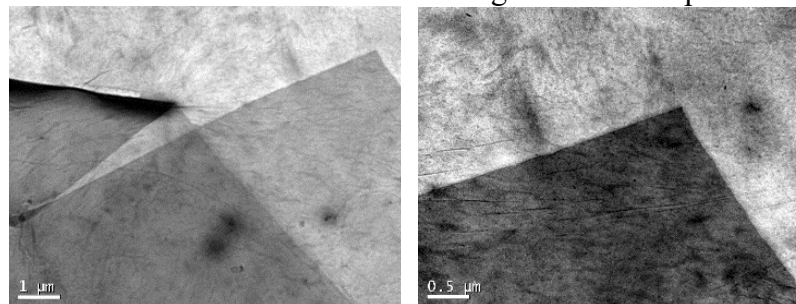
Figura 10 - Microestrutura do óxido de grafeno obtida por MEV



Fonte: elaborado pela autora

Para evitar a aglomeração, foi realizada a dispersão das nanofolhas em água destilada e, posteriormente, a amostra foi analisada no MET. Na Figura 11, é possível visualizar a presença bem definida das nanofolhas que, em sua maioria, estão empilhadas ou dobradas. Nas imagens, a região mais clara indica a presença de apenas uma folha, enquanto a região mais escura indica o acúmulo dessas folhas ou que estas estão dobradas. Nota-se também uma aparência enrugada, característica do OG devido aos grupos funcionais contidos na superfície.

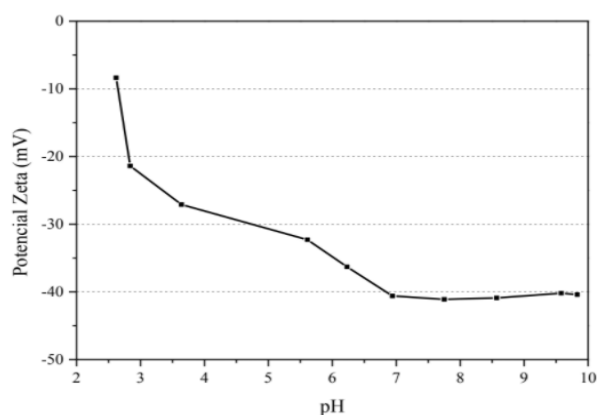
Figura 11 - Microestrutura das nanofolhas do óxido de grafeno obtida pelo MET



Fonte: elaborado pela autora

O estudo das cargas superficiais contidas no OG foi realizado variando o pH entre 2 e 10. A Figura 12 apresenta como o perfil de potencial elétrico varia com o pH. Nota-se que o potencial variou entre -9 e -41, sem a presença do ponto isoelétrico (potencial elétrico igual a 0), que é o ponto em que todas as cargas superficiais estão neutras. Esse comportamento deve-se à ionização dos múltiplos grupos funcionais oxigenados como epóxi (-O-), hidroxila (-OH) e ácido carboxílico (-COOH) que estão presentes na superfície do OG. O potencial elétrico indica que quanto mais distante o OG está do potencial 0 (neutro), seja para valores positivos ou negativos, mais carregada é a sua superfície, gerando maior repulsão entre as nanofolhas mantendo-as em suspensão. Sendo assim, visando maior estabilidade da suspensão de OG, o pH 7 foi fixado para os testes de imobilização com e sem glutaraldeído. Além disso, o pH 7 também é favorável para atuação de grande parte das biomoléculas. Valores e comportamentos semelhantes foram relatados por outros autores (KUANG; ZHANG, 2016; PARLAK; TURNER; TIWARI, 2015; TIDÉN *et al.*, 2022).

Figura 12 - Potencial elétrico do óxido de grafeno para pHs entre 2 e 9,8



Fonte: elaborado pela autora

4.2 CARACTERIZAÇÃO DA ENZIMA LIVRE E IMOBILIZADA

4.2.1 Caracterização dos Processos de Imobilização

O processo de imobilização foi analisado quanto a massa de enzima imobilizada, ao rendimento de imobilização por proteína e por atividade específica e a eficiência de imobilização.

A Tabela 6 apresenta a massa (mg) adsorvida das enzimas bromelina e papaína em OG durante de 2 h em temperatura de 25 °C e pH 7. A quantidade de enzima foi variada em 10, 20 e 30 mg, enquanto a massa de OG foi mantida constante em 10 mg, suspensa em volume fixo de 10 mL de tampão fosfato pH 7.

Tabela 6 - Massa de bromelina e papaína adsorvida em óxido de grafeno (OG) durante 2 h a 25 °C e pH 7

Razão enzima:OG (mg·mg ⁻¹)	Tempo (h)	Bromelina (mg)	Papaína (mg)
1:1	0,5	9,99 ± 0,02	10,00 ± 0,02
	1,0	10,00 ± 0,02	10,00 ± 0,00
	1,5	10,00 ± 0,01	10,00 ± 0,01
	2,0	10,00 ± 0,00	10,00 ± 0,00
2:1	0,5	19,66 ± 0,01	16,09 ± 0,00
	1,0	19,85 ± 0,00	16,31 ± 0,02
	1,5	19,93 ± 0,01	16,60 ± 0,04
	2,0	19,88 ± 0,00	16,52 ± 0,01
3:1	0,5	25,40 ± 0,01	22,48 ± 0,01
	1,0	25,52 ± 0,00	22,49 ± 0,09
	1,5	25,81 ± 0,00	22,50 ± 0,01
	2,0	26,13 ± 0,01	22,38 ± 0,00

A massa de OG foi mantida em 10 mg e suspensa em volume fixo de 10 mL de tampão fosfato pH 7.

Fonte: elaborado pela autora

Observa-se que o tempo necessário para atingir o equilíbrio de adsorção das enzimas é de 0,5 h, independente da razão estudada e não varia mais do que 2% ao final do processo de 2 h. A razão 1:1 (m/m) adsorveu toda a massa de enzima fornecida para ambas as enzimas. Esse é um resultado semelhante ao observado por Gu *et al.* (2018) ao imobilizarem papaína em OG no tempo de 1 h e por Zdarta *et al.* (2015) ao demonstrarem que intervalos de tempo superiores a 2 h não aumentaram o rendimento de imobilização de forma significativa, porém há estudos que utilizam até 24 h no processo de imobilização (DE MELO BRITES *et al.*, 2020; KASHEFI; BORGHEI; MAHMOODI, 2018; ZDARTA *et al.*, 2015). Para as demais razões (2:1 e 3:1) a bromelina atingiu

maiores valores de massa adsorvidos do que a papaína, isso pode ocorrer devido a bromelina ser mais susceptível a interações eletrostáticas do que a papaína (ATAIDE *et al.*, 2019; SARKAR *et al.*, 2017).

A Tabela 7 apresenta a massa (g) adsorvida das enzimas bromelina e papaína em OG durante de 2 h em temperatura de 25 °C e pH 7 utilizando glutaraldeído como agente ligante. A quantidade de enzima foi variada em 10, 20 e 30 mg enquanto a massa de OG foi mantida constante em 10 mg, suspenso em volume fixo de 10 mL de tampão fosfato pH 7.

Tabela 7 - Massa de bromelina e papaína adsorvida em óxido de grafeno (OG) funcionalizado com glutaraldeído durante 2 h a 25 °C e pH 7

Razão enzima:OG (mg·mg ⁻¹)	Tempo (h)	Bromelina (mg)	Papaína (mg)
1:1	0,5	10,00 ±0,00	9,06 ±0,00
	1,0	10,00 ±0,01	10,00 ±0,00
	1,5	10,00 ±0,01	9,94 ±0,03
	2,0	10,00 ±0,00	10,00 ±0,00
2:1	0,5	19,81 ±0,00	14,13 ±0,00
	1,0	19,80 ±0,00	14,74 ±0,01
	1,5	19,43 ±0,00	14,31 ±0,00
	2,0	19,85 ±0,00	14,18 ±0,02
3:1	0,5	27,77 ±0,01	21,15 ±0,02
	1,0	28,31 ±0,01	21,96 ±0,02
	1,5	28,04 ±0,00	22,08 ±0,02
	2,0	28,20 ±0,01	22,18 ±0,00

A massa de OG foi mantida em 10 mg e suspensa em volume fixo de 10 mL de tampão fosfato pH 7. Glutaraldeído 1% v/v em relação ao volume de solução tampão.

Fonte: elaborado pela autora

Observa-se que o comportamento da imobilização utilizando glutaraldeído é semelhante ao comportamento da imobilização sem glutaraldeído, ambos atingem o máximo de massa adsorvida em OG no intervalo de aproximadamente 0,5 h após a enzima entrar em contato com o OG ou com OG-Glu e a massa de bromelina adsorvida é maior

do que a de papaína. Nesse caso a enzima se liga ao glutaraldeído que interagiu com os grupos funcionais do OG ligando-se a eles. Enquanto a enzima papaína não houve diferença significativa na quantidade de enzima imobilizada quando o suporte é funcionalizado, a enzima bromelina teve um pequeno aumento quando imobilizada com glutaraldeído na razão 3:1. Isso pode ocorrer porque o glutaraldeído por ser uma molécula composta por cadeias longas atua como um braço espaçador e permite que mais enzima possa ser imobilizada (MODENEZ *et al.*, 2018; POON; WILSON; HEADLEY, 2014).

Na Tabela 8 encontram-se os valores de concentração de enzima livre ($C_{f,0}$) e após ser imobilizada ($C_{f,t}$) ambas em solução, a concentração de enzima no OG (q_E) e o rendimento de imobilização por proteína (Y_p) para a enzima bromelina durante o processo de imobilização em OG e OG funcionalizado (OG-Glu).

Tabela 8 - Valores de concentração de enzima livre inicial ($C_{f,0}$) e após imobilização ($C_{f,t}$) em solução, a concentração de enzima no óxido de grafeno (OG) e em óxido de grafeno funcionalizado (OG-Glu) - q_E - e o rendimento de imobilização por proteína (Y_p) para a enzima bromelina durante o processo de imobilização

Razão enzima:OG (mg·mg ⁻¹)	Tempo (h)	OG				OG-Glu		
		$C_{f,0}$ (g·L ⁻¹)	$C_{f,t}$ (g·L ⁻¹)	q_E (g·g ⁻¹)	Y_p (g·g ⁻¹)	$C_{f,t}$ (g·L ⁻¹)	q_E (g·g ⁻¹)	Y_p (g·g ⁻¹)
1:1	0,5	1,00	0,01	0,99	0,99	0,00	1,00	1,00
	1,0		0,00	1,00	1,00	0,00	1,00	1,00
	1,5		0,00	1,00	1,00	0,00	1,00	1,00
	2,0		0,00	1,00	1,00	0,00	1,00	1,00
2:1	0,5	2,00	0,03	1,97	0,98	0,02	1,98	0,99
	1,0		0,02	1,98	0,99	0,02	1,98	0,99
	1,5		0,01	1,99	1,00	0,06	1,94	0,97
	2,0		0,01	1,99	0,99	0,02	1,98	0,99
3:1	0,5	3,00	0,46	2,53	0,84	0,22	2,77	0,92
	1,0		0,45	2,54	0,84	0,17	2,83	0,94
	1,5		0,42	2,57	0,85	0,20	2,80	0,93
	2,0		0,39	2,60	0,86	0,18	2,81	0,94

Fonte: elaborado pela autora

Observa-se que a concentração de enzimas (q_E) no OG, funcionalizado ou não, aumenta com o aumento da massa de bromelina fornecida inicialmente, porém o rendimento de imobilização (Y_p) tem comportamento inverso, diminuindo ao aumentar a massa de bromelina. Isso ocorre porque apesar de mais enzima estar se fixando ao suporte, a quantidade de enzima que permanece no sobrenadante após o processo de imobilização também é maior, o que reduz o rendimento de imobilização. O Y_p foi maior para o grafeno funcionalizado, isso pode ocorrer devido ao glutaraldeído funcionar como braço espaçador permitindo maior espaço entre as moléculas da enzima evitando a repulsão entre essas e permitindo que uma maior quantidade de enzima se ligue ao OG funcionalizado.

Na Tabela 9 encontram-se os valores de concentração, em solução, de enzima livre ($C_{f,0}$) e após ser imobilizada ($C_{f,t}$) em solução, a concentração de enzima no OG (q_E) e o rendimento por proteína (Y_p) para a enzima papaína durante o processo de imobilização em óxido de grafeno e óxido de grafeno funcionalizado.

Tabela 9 - Valores de concentração, em solução, de enzima livre inicial ($C_{f,0}$) e após imobilização ($C_{f,t}$), a concentração de enzima no óxido de grafeno (OG) e óxido de grafeno funcionalizado (OG-Glu) - q_E - e o rendimento de imobilização por proteína (Y_p) para a enzima papaína durante o processo de imobilização

Razão enzima:OG (mg·mg ⁻¹)	Tempo (h)	OG				OG-Glu		
		$C_{f,0}$ (g·L ⁻¹)	$C_{f,t}$ (g·L ⁻¹)	q_E (g·g ⁻¹)	Y_p (g·g ⁻¹)	$C_{f,t}$ (g·L ⁻¹)	q_E (g·g ⁻¹)	Y_p (g·g ⁻¹)
1:1	0,5	1,00	0,00	1,00	1,00	0,09	0,99	0,99
	1,0		0,00	1,00	1,00	0,00	1,00	1,00
	1,5		0,00	1,00	1,00	0,00	1,00	1,00
	2,0		0,00	1,00	1,00	0,00	1,00	1,00
2:1	0,5	2,00	0,39	1,59	0,78	0,59	1,40	0,69
	1,0		0,37	1,61	0,79	0,53	1,46	0,72
	1,5		0,34	1,64	0,81	0,57	1,42	0,70
	2,0		0,35	1,63	0,80	0,58	1,40	0,69
3:1	0,5	3,00	0,75	2,23	0,73	0,89	2,10	0,69
	1,0		0,75	2,23	0,73	0,80	2,18	0,71
	1,5		0,74	2,24	0,73	0,79	2,19	0,72
	2,0		0,76	2,22	0,73	0,78	2,20	0,72

Fonte: elaborado pela autora

Assim como ocorreu com a bromelina, observa-se que a concentração de enzimas (q_E) no OG, funcionalizado ou não, aumenta com o aumento da massa de papaína fornecida inicialmente e redução do rendimento de imobilização (Y_p). Porém, o OG funcionalizado não mostrou a mesma tendência quando imobilizado papaína, não houve aumento da massa ligada ao suporte quando o OG foi funcionalizado com glutaraldeído.

Na Tabela 10 estão presentes os valores de rendimento de imobilização por proteína (Y_a) e a eficiência de imobilização (E) para os derivados enzimáticos da bromelina e da papaína obtidos para a razão 1:1 durante 1 h de processo de imobilização em óxido de grafeno (B-OG e P-OG) e em óxido de grafeno funcionalizado com glutaraldeído (B-OG-Glu e P-OG-Glu). Essa razão e tempo foram fixados para os demais

testes, pois para todos os derivados enzimáticos foi o tempo e proporção na qual toda a massa de enzima foi imobilizada.

Tabela 10 - Valores de rendimento de imobilização por atividade específica (Y_a) e a eficiência de imobilização (E) para os derivados enzimáticos da bromelina e da papaína durante o processo de imobilização em óxido de grafeno (B-OG e P-OG) e em óxido de grafeno funcionalizado com glutaraldeído (B-OG-Glu e P-OG-Glu)

	Y_a	E (%)
B-OG	0,32	32,49
B-OG-Glu	0,52	52,45
P-OG	0,44	44,40
P-OG-Glu	0,50	50,11

Fonte: elaborado pela autora

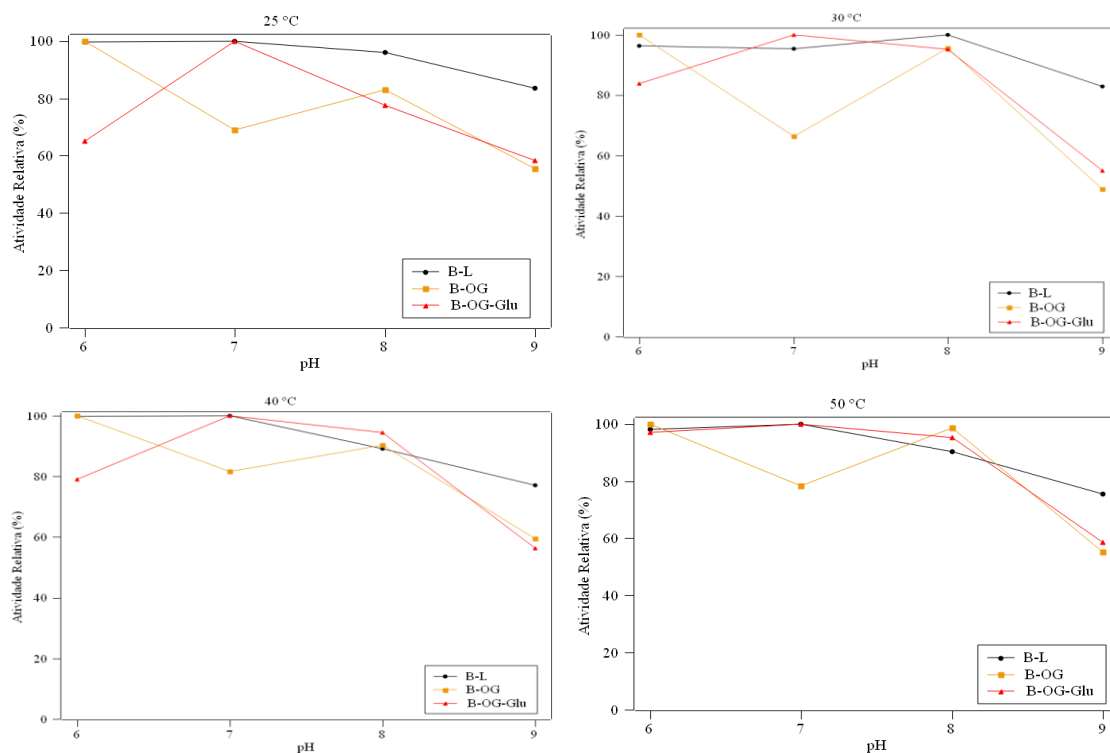
Assim como observado com o rendimento de imobilização por proteína (Y_p), o rendimento de imobilização por atividade específica (Y_a) é maior quando o suporte é funcionalizado com glutaraldeído. Quanto a eficiência (E), essa quantifica quanto de atividade específica a enzima mantém após ser imobilizada, que também foi maior quando utilizado OG funcionalizado. Nesse caso, Y_a e E são iguais, pois a imobilização foi 100% da massa inicial de enzima.

4.2.2 Caracterização da Atividade Enzimática dos Derivados

Inicialmente os derivados enzimáticos foram caracterizados quanto a atividade enzimática e a influência do pH entre as atividades específicas dos derivados enzimáticos em relação a enzima livre.

A atividade enzimática foi determinada para as enzimas livres e seus derivados com e sem glutaraldeído para diferentes valores de pH e temperatura. Na Figura 13 observa-se a atividade relativa da enzima bromelina livre (B-L) e para os derivados B-OG e B-OG-Glu para o pH variado de 6 a 9 e temperatura fixa em 25, 30, 40 ou 50 °C.

Figura 13 - Atividade relativa da enzima bromelina livre (B-L) e os derivados B-OG (sem glutaraldeído) e B-OG-Glu (com glutaraldeído) para pHs entre 6 e 9 e temperaturas fixas em 25, 30, 40 ou 50 °C.



Fonte: elaborado pela autora

Para bromelina livre (B-L) a maior atividade enzimática ocorreu em pH 7 para a maioria das temperaturas avaliadas, exceto 30 °C. O pH de menor atividade enzimática foi para o pH 9, independente da temperatura estudada. Foi observado que o aumento da temperatura aumenta a atividade enzimática para todos os valores de pHs. Dentre as condições avaliadas, a B-L teve melhor desempenho no pH 7 e temperatura de 50 °C.

Para o derivado sem glutaraldeído (B-OG) observa-se a redução do pH ótimo de 7 para 6. Este derivado enzimático teve maior atividade no pH 6 em todas as temperaturas avaliadas, aumentando com o acréscimo de temperatura. A condição que o derivado enzimático B-OG teve melhor desempenho foi no pH 6 e temperatura de 50 °C. O pH 8 foi o segundo pH de melhor atuação da enzima, também tendo a atividade enzimática crescente com a temperatura.

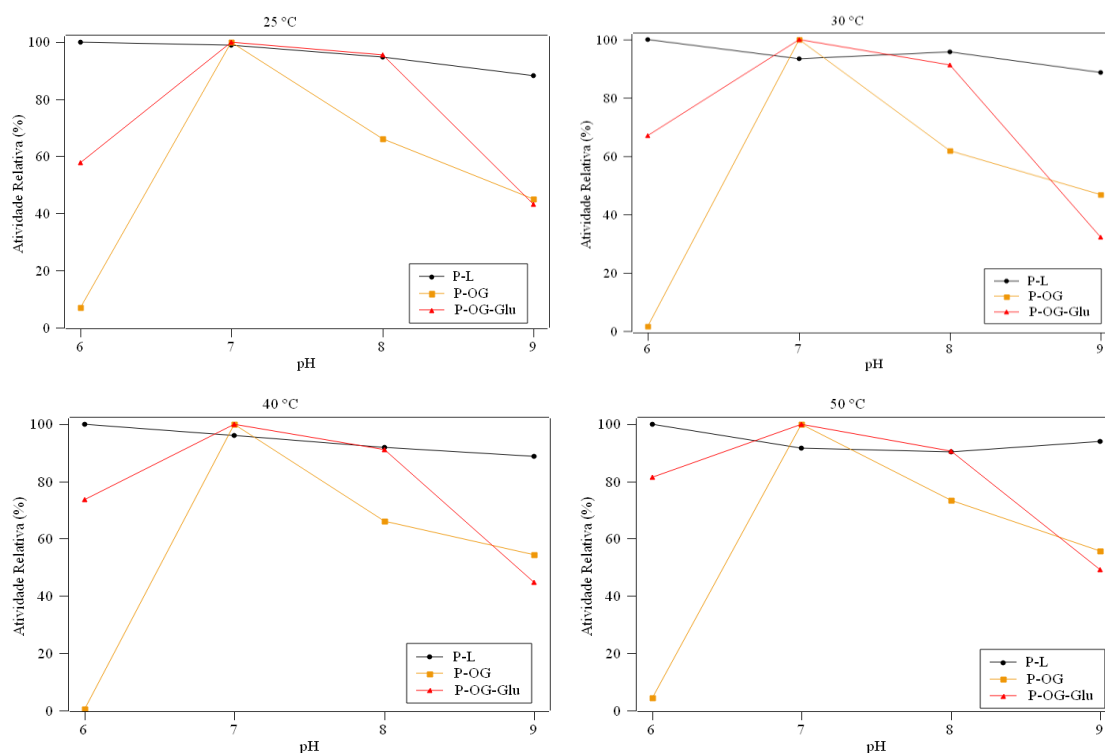
O derivado obtido utilizando glutaraldeído (B-OG-Glu) teve comportamento semelhante a bromelina livre, no qual o pH de melhor atuação foi o pH 7, independente da temperatura. Também se observou o aumento da atividade enzimática com o acréscimo

da temperatura. Assim como a bromelina livre, a condição que o derivado enzimático B-OG-Glu teve melhor desempenho foi no pH 7 e temperatura de 50 °C.

A atividade enzimática manteve um padrão crescente quando a temperatura foi aumentada de 25 até 50 °C independente se a enzima estava na forma livre ou imobilizada sem ou com glutaraldeído. O mesmo comportamento não foi observado para o pH, a atividade enzimática não aumenta com o aumento do pH. Em cada pH a enzima livre e seus derivados têm um comportamento específico. A enzima livre e o derivado B-OG-Glu obtiveram pH ótimo em 7, enquanto o pH ótimo para o derivado B-OG foi 6. O pH 6 foi o segundo melhor pH de atuação para a enzima livre enquanto o pH 8 foi o segundo melhor para os derivados. Porém, um comportamento semelhante entre a enzima livre e seus derivados foi observado para o pH 9, no qual a atividade enzimática foi a menor baixa em todas as temperaturas.

A Figura 14 compara a atividade relativa da enzima papaína livre (P-L) e para os derivados P-OG e P-OG-Glu para o pH variado de 6 a 9 e temperatura fixa em 25, 30, 40 ou 50 °C.

Figura 14 - Atividade relativa da enzima papaína livre (P-L) e os derivados P-OG (sem glutaraldeído) e P-OG-Glu (com glutaraldeído) para pHs entre 6 e 9 e temperaturas fixas em 25, 30, 40 ou 50 °C.



Fonte: elaborado pela autora

A papaína livre (P-L) teve maior atividade enzimática para pH 6 em todas as temperaturas avaliadas. A atividade enzimática da papaína, assim como da bromelina, aumenta com o aumento da temperatura para um mesmo pH. Dentre as condições avaliadas, a P-L teve melhor desempenho no pH 6 e temperatura de 50 °C.

Para derivado sem glutaraldeído (P-OG) observa-se a melhoria do pH de atuação de 6 da enzima livre para 7; porém em pH 6 o derivado enzimático pode ser considerado sem atividade independentemente da temperatura. A condição que o derivado enzimático P-OG teve melhor desempenho foi no pH 7 e temperatura de 50 °C. O derivado obtido utilizando glutaraldeído (P-OG-Glu) teve comportamento semelhante ao derivado sem glutaraldeído, no qual o pH de melhor atuação foi o pH 7, independente da temperatura. Além disso, observou-se aumento da atividade enzimática com o aumento da temperatura para um mesmo pH. Para P-OG-Glu a condição de melhor desempenho foi o pH 7 e temperatura de 50 °C.

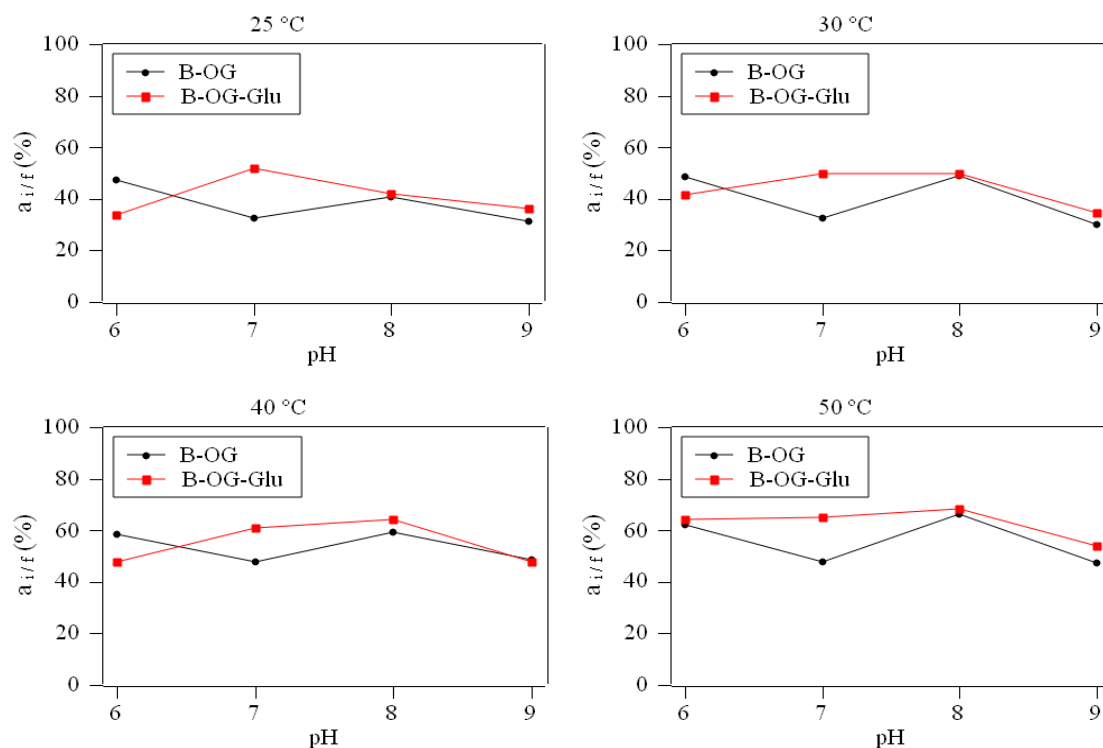
A atividade enzimática da papaína e seus derivados mantiveram um padrão crescente quando a temperatura foi aumentada de 25 até 50 °C para um mesmo pH, assim como observado para a bromelina. Quanto ao pH, não é observado um padrão entre a papaína livre e os derivados. Enquanto o pH 9 foi o de menor atividade enzimática para P-L e P-OG-Glu, o pH 6 foi o de pior desempenho para o derivado P-OG.

Normalmente a atividade enzimática é maior para enzimas livres, pois ao imobilizá-la pode ocorrer alteração na conformação da enzima dificultando o acesso do substrato ao sítio-ativo ou até mesmo desnaturando-as, assim como outros fatores como interação eletrostática entre a enzima e o suporte, a ligação entre a enzima e suporte ocorrer no próprio sítio-ativo da enzima ou de forma que o sítio-ativo não fique disponível ao substrato podendo ficar voltado para o suporte, a força da ligação pode causar mudanças na conformação da enzima impossibilitando o acesso do substrato ao sítio-ativo principalmente para imobilização por ligações covalentes, entre outros (ALVARADO-RAMÍREZ *et al.*, 2021; FERNANDEZ-LOPEZ *et al.*, 2017; GU *et al.*, 2018; SIRISHA; JAIN; JAIN, 2016; SKORONSKI *et al.*, 2017; TACIAS-PASCACIO *et al.*, 2021b, 2021a; YOO *et al.*, 2017).

Na Figura 15 e Figura 16 estão apresentados como o pH influencia as atividades específicas entre a enzima livre e seus derivados enzimáticos e das enzimas livres, por meio da relação da atividade específica.

Na Figura 15 - Influência do pH e temperatura na relação entre a atividade específica da bromelina nos derivados enzimáticos e a atividade específica em solução na forma livre (tem-se como o pH influencia os derivados enzimáticos B-OG e B-OG-Glu variando o pH de 6 a 9 para 4 temperaturas (25, 30, 40 e 50 °C), condições utilizadas para mensurar a atividade enzimática. O derivado O-OG ao ser comparado com o O-OG-Glu, sofreu maior influência negativa do pH, obtendo menores valores de atividade relativa. B-OG teve melhor relação entre as atividades no pH 8 a 50 °C (~66%) e pior relação em pH 9 a 30 °C (~30%). O derivado B-OG-Glu apresentou maior atividade relativa para a maioria das temperaturas e pHs avaliados, exceto para o pH 6 nas temperaturas 25, 30 e 40 °C, sendo a melhor condição em pH 8 a 50 °C (~68%) e pior condição em pH 6 a 25 °C (~34%).

Figura 15 - Influência do pH e temperatura na relação entre a atividade específica da bromelina nos derivados enzimáticos e a atividade específica em solução na forma livre ($a_{i/f}$)

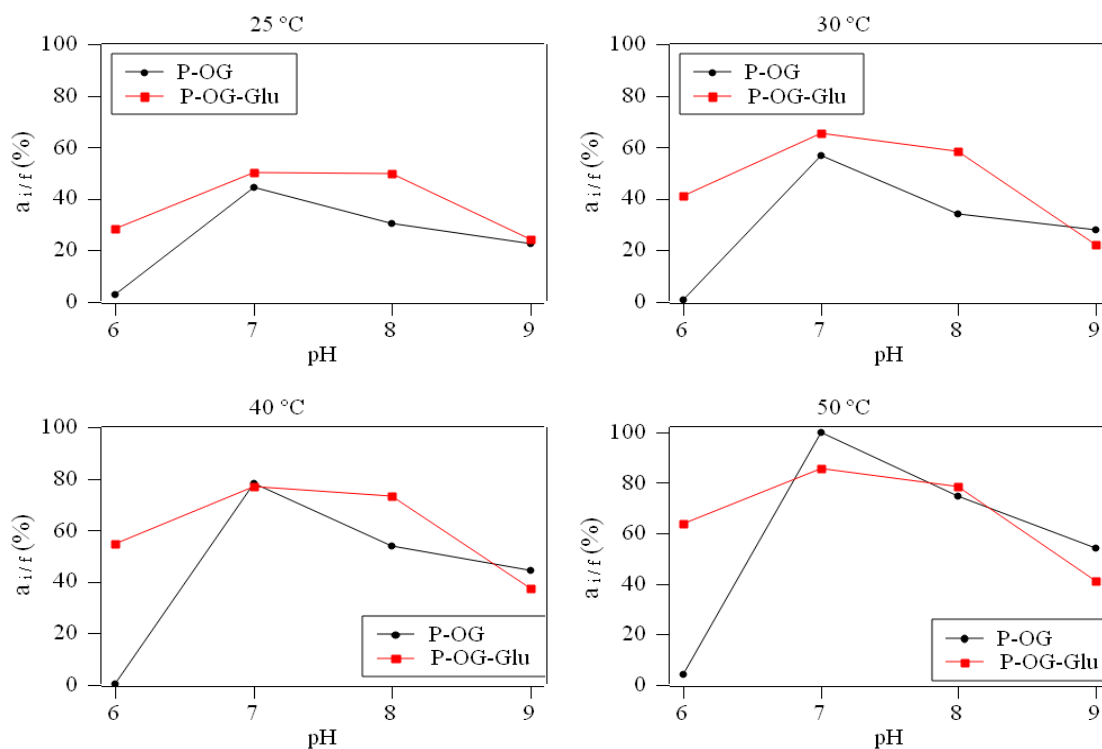


B-OG - Bromelina imobilizada em óxido de grafeno, B-OG-Glu - Bromelina imobilizada em óxido de grafeno funcionalizado com glutaraldeído.

Fonte: elaborado pela autora

Na Figura 16 tem-se como o pH influencia os derivados enzimáticos de papaína, P-OG e P-OG-Glu, variando o pH de 6 a 9 para 4 temperaturas (25, 30, 40 e 50 °C). O derivado P-OG-Glu apresentou melhor relação entre as atividades específicas da enzima livre e após imobilização para a maioria das temperaturas e pHs avaliados, exceto para o pH 9 nas temperaturas 30, 40 e 50 °C e para pH 7 a 50 °C ao ser comparado ao derivado P-OG. Para P-OG o pH 6 foi o que teve maior influência negativa, obtendo valores inferiores a 4% de atividade relativa. A melhor condição foi determinada no pH 7 a 50 °C, mantendo 100% da atividade relativa ao ser imobilizado. Para P-OG-Glu, a condição de maior influência negativa foi em pH 9 a 30 °C (~22) e a maior em pH 7 a 50 °C (~85).

Figura 16 - Influência do pH e temperatura na relação entre a atividade específica da papaína nos derivados enzimáticos e a atividade específica em solução na forma livre ($a_{i/f}$)



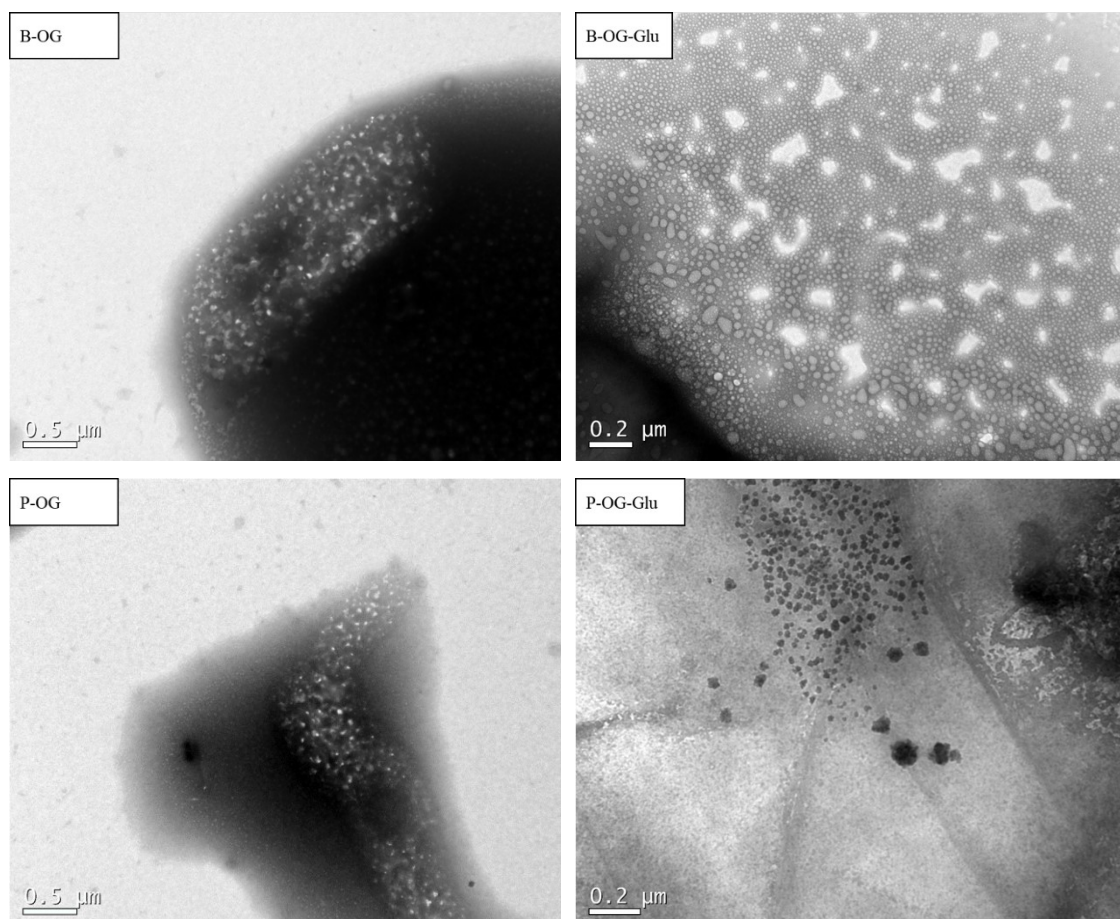
P-OG – Papaína imobilizada em óxido de grafeno, P-OG-Glu - Papaína imobilizada em óxido de grafeno funcionalizado com glutaraldeído.

Fonte: elaborado pela autora

A imobilização das enzimas nas nanofolhas de OG foi confirmada por meio de MET. Nota-se na micrografia de transmissão (Figura 17) é possível visualizar a presença bem definida das nanofolhas, assim como a presença das enzimas. Os pontos escuros são

acúmulo das nanofolhas de OG, enquanto os pontilhados mais claros são as enzimas imobilizadas.

Figura 17 - Microestrutura dos derivados B-OG, B-OG-Glu, P-O e P-OG-Glu obtidas por MET.



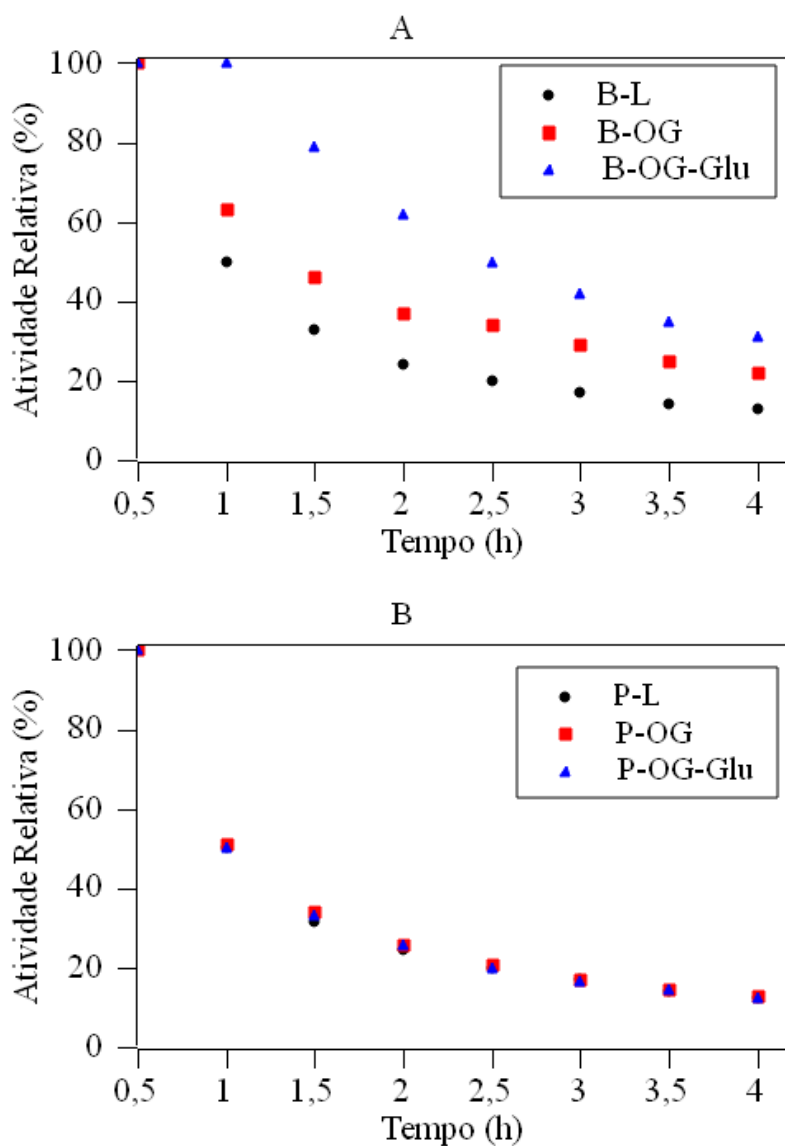
Fonte: elaborada pela autora

4.2.3 Avaliação da Estabilidade dos Derivados Enzimáticos

A estabilidade dos derivados enzimáticos foi avaliada por teste de estabilidade térmica, estabilidade de estocagem, reúso e determinação dos parâmetros cinéticos por Michaelis-Menten.

A estabilidade térmica das enzimas livres e dos derivados enzimáticos foi avaliada na temperatura de 50 °C durante 4 h e pode ser observada na Figura 18.

Figura 18 - Estabilidade térmica à 50 °C e pH 7 da: A) bromelina livre (B-L) e seus derivados sem glutaraldeído (B-OG) e com glutaraldeído (B-OG-Glu) e, B) papaína livre (P-L) e seus derivados sem glutaraldeído (P-OG) e com glutaraldeído (P-OG-Glu)



Fonte: elaborado pela autora.

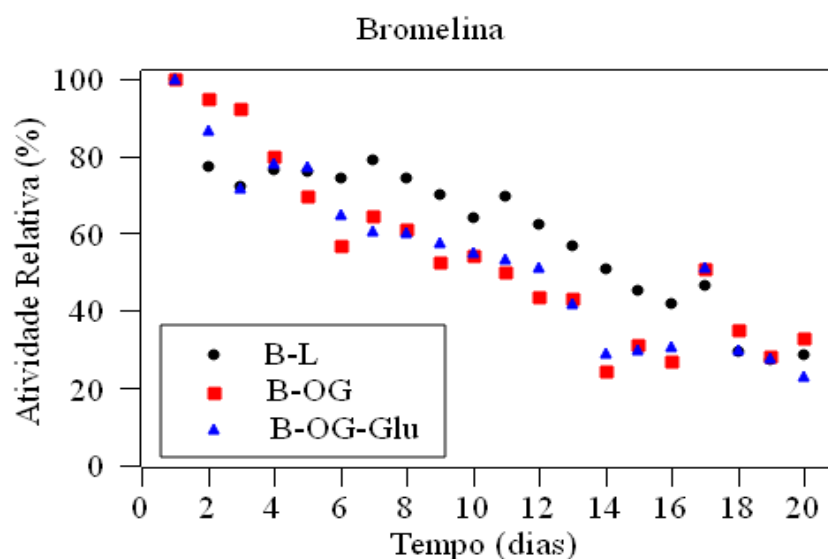
A enzima bromelina, ao ser imobilizada sem e com glutaraldeído, teve a estabilidade térmica melhorada quando comparada com a enzima livre. Este tipo de comportamento também foi observado por outros pesquisadores (ANWAR; AHMAD; YOUNUS, 2007; GUPTA; MAQBOOL; SALEEMUDDIN, 2007). Dentre estes, o derivado enzimático com glutaraldeído se mostrou mais estável que os demais, mantendo mais de 50% de atividade relativa por 2,5 h. Para a enzima papaína não foi observado

variação na estabilidade térmica entre a enzima livre e seus derivados, independente da presença de glutaraldeído, e manteve 50% de atividade relativa por 1 h.

Diante desses resultados, a enzima bromelina se mostra mais estável do que a papaína. A bromelina é mais susceptível a interações eletrostáticas do que a papaína, isso pode ter criado um microambiente de proteção ao entorno da bromelina deixando-a mais estável termicamente (ATAIDE *et al.*, 2019; FERNÁNDEZ-LUCAS; CASTAÑEDA; HORMIGO, 2017; SARKAR *et al.*, 2017).

Na Figura 19 observam-se os perfis de estabilidade de estocagem a 4 °C referentes a enzima bromelina livre e seus derivados. Nota-se que no intervalo de 3 dias houve uma perda de atividade mais acentuada para a bromelina livre e B-OG-Glu que reduziram em aproximadamente 25 % de atividade ao serem comparadas com o ponto inicial, enquanto o B-OG se mostrou mais estável perdendo apenas 8 % de atividade.

Figura 19 - Estabilidade de estocagem à 4 °C referentes a bromelina livre (B-L) a pH 7, o derivado B-OG a pH 6 e o derivado B-OG-Glu a pH 7



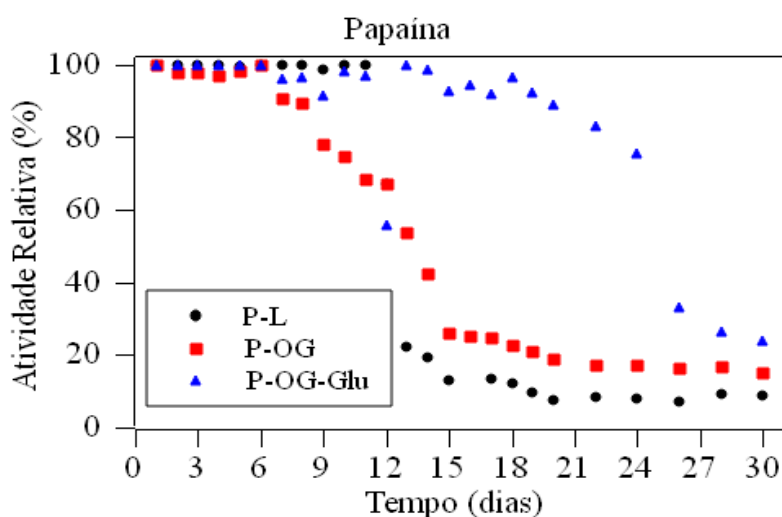
Fonte: elaborado pela autora

A partir do quarto dia a bromelina livre reduz lentamente levando 11 dias (14º dia) para reduzir mais 25 % de atividade, perdendo 50% da sua atividade. Para B-OG, a redução foi maior entre o terceiro e quarto dia, reduzindo a atividade em aproximadamente 15% e então reduzindo 50% no 11º dia de estocagem. O B-OG-Glu reduziu em aproximadamente 50% no 12º dia. Ao final da análise de estocagem, todas as amostras permanecem com cerca de 30% de atividade entre os 18º e 20º dias.

Sendo assim, os dados sugerem que os derivados apresentaram uma atividade enzimática melhor frente a enzima livre em 4 dias de estocagem, após esse período a enzima livre se mostrou mais estável com redução da atividade mais lenta, além de manter pelo menos 50% da atividade por mais tempo do que os seus derivados.

Na Figura 20 observam-se os perfis de estabilidade de estocagem à 4 °C referentes a enzima papaína livre e seus derivados. Diferentemente dos perfis de estocagem das amostras com bromelina, todas as amostras de papaína permaneceram com 90 % da atividade por no mínimo 7 dias.

Figura 20 - Estabilidade de estocagem à 4 °C referentes papaína livre (P-L) a pH 6, P-OG a pH 7 e P-OG-Glu a pH 7



Fonte: elaborado pela autora

A papaína livre manteve 95% da atividade relativa até o 11º dia, no qual foi observado uma redução significativa da atividade enzimática, reduzindo para 63% a atividade no 12º dia. Entre o 12º e 13º dia houve uma redução brusca de atividade provavelmente causada pela inativação e/ou autólise de parte da enzima, chegando a 20%. A partir do 19º dia, a atividade se manteve constante, porém com valor de atividade baixo (~ 8%). Comportamento semelhante foi observado por Gu *et al.* (2018) ao estudar a imobilização de papaína em OG tendo 50% da atividade reduzida em 18 dias para a enzima livre.

O derivado P-OG começou a reduzir a atividade relativa de forma mais lenta e uniforme que a papaína livre, perdendo pouco mais de 10% da atividade no 8º dia, e manteve 50% de atividade por até 13 dias. Um comportamento semelhante de redução

proeminente foi observado entre o 14° e 15° dias e, estabiliza a atividade a partir do 19° dia, mantendo cerca de 18% até o final de 30 dias.

O derivado P-OG-Glu foi o mais estável de todas as amostras, seja com bromelina ou papaína, e manteve 90% de atividade até o 24° dia de estocagem, seguido de uma brusca redução de atividade semelhante ao perfil da papaína livre entre os dias 24 e 25, restando 23% de atividade ao final de 30 dias de estocagem.

Quanto a estabilidade ao reuso, os derivados B-OG e B-OG-Glu mantiveram 50% de atividade por 5 e 2 ciclos, respectivamente. Enquanto os derivados P-OG e P-OG-Glu mantiveram 50% de atividade ambos por 4 ciclos. Esse resultado, juntamente com o ensaio de estabilidade de estocagem, mostra que os derivados obtidos com OG funcionalizado com glutaraldeído tende a maior estabilidade do que os derivados obtidos sem glutaraldeído. O glutaraldeído pode servir como braço espaçador reduzindo a interação da enzima diretamente com os grupos funcionais do OG, e assim, a interação eletrostática também é reduzida causando menores mudanças na configuração das enzimas (MODENEZ *et al.*, 2018; POON; WILSON; HEADLEY, 2014).

Na Tabela 11 estão presentes os parâmetros cinéticos para bromelina e papaína livres e os derivados com glutaraldeído B-OG-Glu e P-OG-Glu, calculados a partir da linearização de Lineweaver-Burk.

Tabela 11 - Parâmetros cinéticos para a enzima bromelina (B-L) e o derivado enzimático (B-OG-Glu) em pH 7, papaína livre (P-L) em pH 6 e o derivado enzimático (P-OG-Glu) em pH 7, todos à 50 °C

Amostra	V_{max} ($\mu\text{M}\cdot\text{min}^{-1}$)	K_m (μM)	R^2
B-L	33,7	1094,8	0,993
B-OG-Glu	12,1	177,9	0,903
P-L	47,9	1499,6	0,996
P-OG-Glu	22,0	487,2	0,992

Fonte: elaborado pela autora

Para ambas as enzimas livres ocorreu a redução da constante de Michaelis (K_m) para os derivados, que demonstrou que a afinidade de ligação entre as enzimas e o substrato foi melhorada. Isso pode ocorrer porque o OG e glutaraldeído serviram como estabilizadores das enzimas, mantendo a conformação das mesmas facilitando o acesso do substrato ao centro ativo (BANERJEE *et al.*, 2020; GU *et al.*, 2018).

4.3 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DAS ENZIMAS

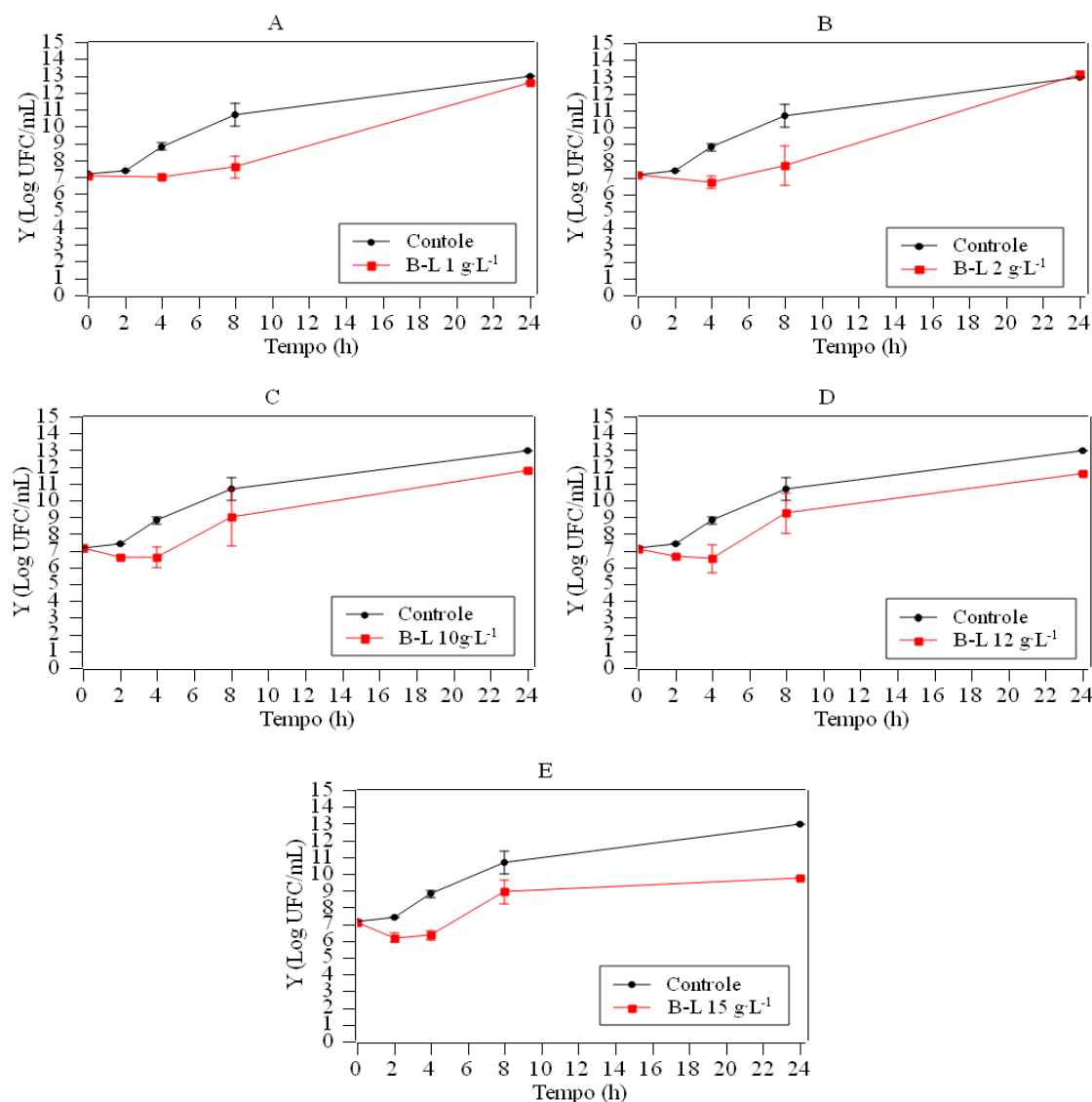
4.3.1 Avaliação da Atividade Antimicrobiana das Enzimas Livres

Para avaliar o efeito antimicrobiano da bromelina e da papaína na forma livre, foram realizadas cinéticas de crescimento de *E. coli* em meio BHI à temperatura de 25 °C variando-se a concentração enzimática.

A Figura 21 mostra os dados obtidos para as cinéticas experimentais do crescimento da *E. coli* para seis inóculos a 25 °C em meio BHI com pH 7 utilizando-se bromelina como agente antimicrobiano nas concentrações 1, 2, 10, 12 e 15 g·L⁻¹, juntamente com um controle sem adição de enzima. Todas as cinéticas iniciaram com concentração de células bacterianas (Y), aproximadamente, de 7 log UFC·mL⁻¹ e foram realizadas em duplicata.

Os gráficos mostram que a bromelina livre causa uma redução na concentração da *E. coli* em relação ao controle. Esta redução fica mais evidente com o aumento da concentração enzimática.

Figura 21 - Cinéticas de crescimento da *E. coli* a 25 °C em meio BHI e pH 7 utilizando bromelina livre nas concentrações de A) 1 g·L⁻¹, B) 2 g·L⁻¹, C) 10 g·L⁻¹, D) 12 g·L⁻¹ e E) 15 g·L⁻¹.



Y é o logaritmo da concentração de células. As linhas que ligam os pontos representam uma tendência do crescimento do microrganismo.

Fonte: elaborado pela autora

Para a concentração 1 g·L⁻¹ não houve uma redução celular no início da cinética, demonstrando apenas uma fase de adaptação (fase *lag*) até aproximadamente 4 h de incubação seguida por um crescimento exponencial até próximo ao controle. Para a concentração enzimática de 2 g·L⁻¹ houve uma redução de quase 0,5 log UFC·mL⁻¹ até 4 h de incubação, seguido de um crescimento exponencial atingindo concentração celular próxima ao controle, assim como ocorreu para concentração de 1 g·L⁻¹. Para as concentrações de 10, 12 e 15 g·L⁻¹, nota-se uma redução celular mais pronunciada

inicialmente (2 h) seguido de uma fase de pouca ou nenhuma redução celular (4 h). Para o intervalo entre 4 e 8 h é possível observar um crescimento exponencial, seguido da redução de velocidade específica de crescimento das células bacterianas indicando o início da fase estacionária que fica mais evidente para a concentração enzimática de 15 g·L⁻¹.

Esse comportamento de redução inicial da população microbiana, seguido por um período de concentração de células quase ou totalmente inalterada, e posterior crescimento exponencial de geração de células até atingir a fase estacionária é denominado, na literatura, como Fenômeno Fênix. Esse comportamento tem sido relatado por diversos autores no estudo de inativação de alguns patógenos como *Salmollena* spp. (ASPRIDOU; AKRITIDOU; KOUTSOUMANIS, 2018; PAGANINI *et al.*, 2022), *Campylobacter jejuni* (KELLY *et al.*, 2003) e *E. coli* (MELLEFONT; KOCHARUNCHITT; ROSS, 2015). Mellefont, Kocharunchitt e Ross (2015) ao estudarem como a temperatura do ar e atividade de água durante refrigeração de carcaças bovinas em frigoríficos poderia afetar a cinética de crescimento da *E. coli*. Os autores observaram que, inicialmente, tinha-se uma redução da quantidade de células seguido por um crescimento exponencial, comportamento semelhante ao obtido no presente estudo.

O Fenômeno Fênix sugere que as células morrem no período inicial, devido à capacidade reduzida da *E. coli* de formar colônias em meio de cultura devido às células mortas, lesionadas e/ou danificadas pela ação enzimática. Isso resulta em um estágio de latência e uma diminuição do crescimento celular, que ocorre entre 2 e 4 h. Nesse período, em cada inóculo estão presentes 3 tipos de subpopulações: células inativadas, sobreviventes e crescentes. Quando as células capazes de se adaptarem iniciam seu crescimento, a concentração de colônias nas placas começa a aumentar novamente, entrando na fase exponencial. Nessa fase, a bactéria se multiplica em uma maior velocidade específica de crescimento mais rápida, ocorrendo entre 4 e 8 h (ASPRIDOU; AKRITIDOU; KOUTSOUMANIS, 2018; MELLEFONT; KOCHARUNCHITT; ROSS, 2015; PAGANINI *et al.*, 2022; PRESSER; ROSS; RATKOWSKY, 1998).

Ao final da cinética de 24 h, a concentração celular bacteriana para o controle e para as concentrações enzimáticas de 1 e 2 g·L⁻¹ têm crescimento semelhante enquanto para as demais concentrações (10, 12 e 15 g·L⁻¹) ocorre redução da concentração celular quando comparados ao crescimento de controle. Observa-se que quanto maior a concentração de bromelina livre, maior é a redução celular no meio BHI (Tabela 12).

A Tabela 12 apresenta os valores de redução da concentração de células de *E. coli* em log UFC·mL⁻¹ para as concentrações de bromelina de 1, 2, 10, 12, 15 g·L⁻¹ e crescimento celular da bactéria para o controle em relação concentração celular inicial para cada inóculo a 25 °C e pH 7.

Tabela 12 - Redução da concentração de células de *E. coli* em log UFC·mL⁻¹ para as concentrações de bromelina de 1, 2, 10, 12, 15 g·L⁻¹ e crescimento celular da bactéria para o controle em relação concentração celular inicial para cada inóculo a 25 °C e pH 7

Varição do logaritmo de concentração celular de <i>E. coli</i> (Y em UFC·mL⁻¹) em relação a concentração celular inicial						
C_{e,b} (g·L⁻¹)	Y₀ (Log UFC·mL⁻¹)	2 h	4 h	8 h	24 h	Y_f (Log UFC·mL⁻¹)
0	7,17	0,21 ± 0,00	1,63 ± 0,22	3,49 ± 0,68	5,80 ± 0,00	12,97
1	7,09	-	-0,06 ± 0,17	0,51 ± 0,64	5,50 ± 0,01	12,59
2	7,17	-	-0,43 ± 0,37	0,54 ± 1,15	5,97 ± 0,20	13,14
10	7,14	-0,52 ± 0,09	-0,54 ± 0,58	1,85 ± 1,69	4,63 ± 0,10	11,77
12	7,06	-0,40 ± 0,02	-0,54 ± 0,84	2,17 ± 1,20	4,54 ± 0,04	11,60
15	7,10	-0,89 ± 0,30	-0,76 ± 0,30	1,84 ± 0,71	2,67 ± 0,00	9,76

C_{e,b} é a concentração da enzima bromelina; Y₀ e Y_f é o logaritmo da concentração celular no início e ao final da cinética.

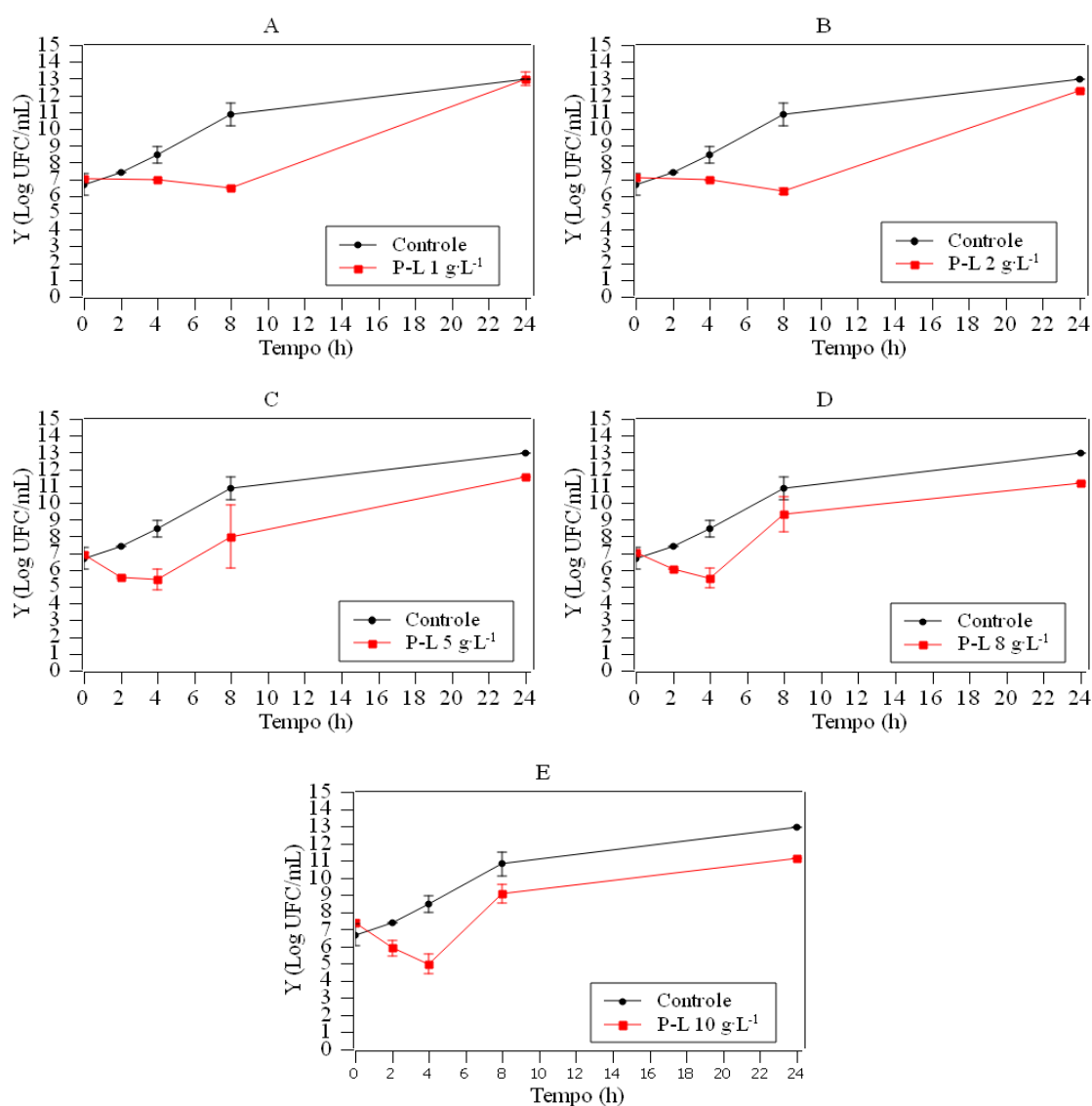
Fonte: elaborado pela autora

A g·L⁻¹.

Figura 22 mostra os dados obtidos para as cinéticas experimentais do crescimento da *E. coli* para seis inóculos a 25 °C em meio BHI com pH 7 utilizando-se papaína como agente antimicrobiano nas concentrações de 1, 2, 5, 8 e 10 g·L⁻¹, juntamente com um controle sem adição de enzima. Todas as cinéticas iniciaram com concentração de células bacterianas aproximadamente de 7 log UFC·mL⁻¹ e foram realizadas em duplicata.

As cinéticas construídas utilizando papaína mostraram perfis semelhantes aos obtidos para bromelina, ou seja, a adição de papaína livre também causou a redução na concentração da *E. coli*, que fica mais evidente com o aumento da concentração enzimática. Porém a papaína mesmo em baixas concentrações obtém redução da concentração celular bacteriana comparado ao ponto inicial de cada cinética, o que não foi observado para bromelina a 1 g·L⁻¹.

Figura 22 - Cinéticas de crescimento da *E. coli* a 25 °C em meio BHI e pH 7 utilizando papaína livre nas concentrações de A) 1 g·L⁻¹, B) 2 g·L⁻¹, C) 5 g·L⁻¹, D) 8 g·L⁻¹ e E) 10 g·L⁻¹



Y é o logaritmo da concentração de células. As linhas que ligam os pontos representam uma tendência de crescimento do microrganismo

Fonte: elaborado pela autora

Para as concentrações 1 e 2 g·L⁻¹ houve, no intervalo de 4h de incubação, a presença de uma fase de adaptação (fase lag) seguida por uma redução na concentração celular bacteriana entre o intervalo de 4 e 8 h de incubação. Após o intervalo de 8 h, houve

crescimento exponencial para ambas as concentrações enzimáticas atingindo aproximadamente a concentração celular final do controle, sendo $1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ igual ao controle e $2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ a diferença foi $1 \text{ log UFC}\cdot\text{mL}^{-1}$ a menos que o controle.

Para as outras concentrações, também foi observada uma redução na concentração celular inicial no intervalo de 2 h. No entanto, para a concentração de $10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, essa redução foi ainda maior e se estendeu até 4 h, resultando em uma redução de $2,4 \text{ log UFC}\cdot\text{mL}^{-1}$ (Tabela 13). Essa redução foi maior dentre todos os tratamentos realizados neste estudo, tanto com bromelina quanto com papaína livres. Após essa fase de redução, a concentração celular começa a crescer de maneira exponencial, seguida por uma redução na velocidade específica de crescimento das células bacterianas. Isso indica o início da fase estacionária, que se torna mais evidente nas concentrações enzimáticas de 8 e $10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$.

A Tabela 13 apresenta os valores de redução da concentração de células de *E. coli* em $\text{log UFC}\cdot\text{mL}^{-1}$ para as concentrações de papaína de 1, 2, 5, 8 e $10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ e crescimento celular da bactéria para o controle em relação concentração celular inicial para cada inóculo a $25 \text{ }^\circ\text{C}$ e pH 7.

Tabela 13 - Redução da concentração de células de *E. coli* em $\text{log UFC}\cdot\text{mL}^{-1}$ para as concentrações de papaína de 1, 2, 5, 8 e $10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ e crescimento celular da bactéria para o controle em relação concentração celular inicial para cada inóculo em meio BHI a $25 \text{ }^\circ\text{C}$ e pH 7

Variação do logaritmo de concentração celular de <i>E. coli</i> (Y em $\text{UFC}\cdot\text{mL}^{-1}$) em relação a concentração celular inicial						
$C_{e,p}$ ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	Y_0 (Log $\text{UFC}\cdot\text{mL}^{-1}$)	2 h	4 h	8 h	24 h	Y_f (Log $\text{UFC}\cdot\text{mL}^{-1}$)
0	6,68	$0,70 \pm 0,00$	$1,79 \pm 0,49$	$4,19 \pm 0,68$	$6,29 \pm 0,00$	12,97
1	7,06	-	$-0,07 \pm 0,00$	$-0,55 \pm 0,09$	$5,91 \pm 0,40$	12,98
2	7,11	-	$-0,16 \pm 0,02$	$-0,82 \pm 0,17$	$5,19 \pm 0,01$	12,31
5	6,90	$-1,36 \pm 0,06$	$-1,47 \pm 0,64$	$1,07 \pm 1,88$	$4,66 \pm 0,00$	11,56
8	7,01	$-0,95 \pm 0,00$	$-1,50 \pm 0,58$	$2,32 \pm 1,06$	$4,18 \pm 0,03$	11,19
10	7,08	$-1,47 \pm 0,44$	$-2,40 \pm 0,58$	$1,69 \pm 0,53$	$3,74 \pm 0,01$	11,12

$C_{e,p}$ é a concentração da enzima papaína; Y_0 e Y_f é o logaritmo da concentração celular no início e ao final da cinética.

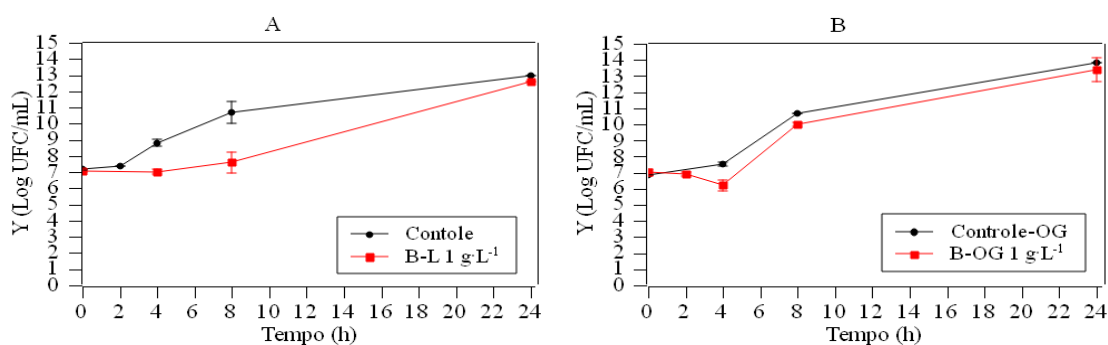
Fonte: elaborado pela autora

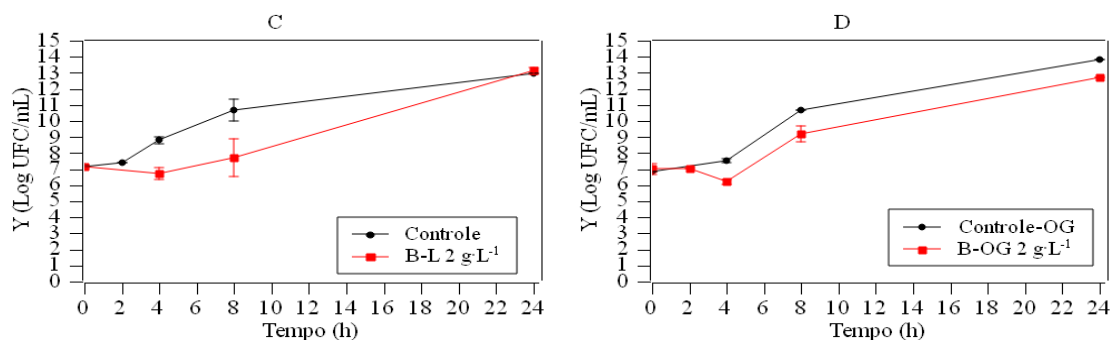
4.3.2 Avaliação da Atividade Antimicrobiana das Enzimas Livres e Derivados Enzimáticos em Meio BHI

Para avaliar o efeito antimicrobiano dos derivados obtidos por imobilização das enzimas bromelina e papaína em óxido de grafeno, foram realizadas cinética de crescimento para a bactéria *E. coli* à temperatura de 25 °C em meio BHI variando a concentração enzimática em 1 e 2 g·L⁻¹.

A Figura 23 mostra os dados obtidos para as cinéticas experimentais do crescimento da *E. coli* para três inóculos à 25 °C em meio BHI e pH 7, utilizando o derivado de bromelina como agente antimicrobiano. Utilizou-se concentrações de proteína de 1 e 2 g·L⁻¹ do derivado de bromelina imobilizada em óxido de grafeno (B-OG) e, posteriormente, foram comparados com os dados obtidos anteriormente para bromelina livre (B-L) nas concentrações 1 e 2 g·L⁻¹. A amostra controle consistiu em OG disperso em meio de cultura BHI em pH 7. Todas as cinéticas iniciaram com concentração de células bacterianas aproximadamente de 7 log UFC·mL⁻¹ e foram realizadas em duplicata.

Figura 23 - Cinéticas de crescimento da *E. coli* a 25 °C em meio BHI e pH 7 utilizando bromelina livre e o derivado B-OG nas concentrações de proteína de 1 e 2 g·L⁻¹





Y é o logaritmo da concentração de células. As linhas que ligam os pontos representam uma tendência do crescimento do microrganismo.

Fonte: elaborado pela autora

Na Figura 23, é possível observar que a amostra controle, quando o OG é utilizado, tem uma fase *lag* no intervalo inicial de 4 h, ao contrário das outras cinéticas das amostras controle que não utilizaram OG. Esse fenômeno ocorre devido à interação entre as células de *E. coli* e as nanofolhas do OG, que possuem várias cargas superficiais negativas. Essa interação pode resultar em lesões leves ou severas à membrana celular, expondo o citoplasma das células. Esse efeito é causado pelo estresse oxidativo gerado pelas cargas superficiais das nanofolhas de OG. Esse comportamento foi relatado anteriormente por Hu et al. (2010) que estudaram o efeito antimicrobiano e citotoxicidade do OG em solução e em formas de folhas macroscópicas contra *E. coli* e, por Efremova et al. (2015) ao estudarem a toxicidade e ação antimicrobiana de nanomateriais à base de carbono por meio da luminescência. Ambos os estudos mostraram ação antimicrobiana contra *E. coli* e citotoxicidade leve, visto que ocorre apenas uma pequena diminuição na viabilidade celular sem levar a apoptose ou morte de células.

A presença das cargas superficiais do OG causou um período de adaptação da *E. coli*, resultando na redução da concentração celular após 2h de exposição à bromelina. Ao comparar esse comportamento com o observado nas enzimas livres, pode-se afirmar que o OG atua sinergicamente com a bromelina na redução das células, induzindo o estresse oxidativo e tornando-as mais susceptível à ação enzimática.

Após um período de incubação de 4 h, é observado um aumento na concentração celular para ambas as concentrações do derivado, caracterizando o fenômeno conhecido como “Fenômeno Fênix”. No entanto, esse fenômeno não foi observado quando a bromelina livre foi utilizada nessas mesmas concentrações, o que reforça a ação sinérgica entre o OG e a enzima na redução das células bacterianas. Ao final da cinética de 24 h, nota-se que o derivado na concentração 1 g·L⁻¹ é menos eficiente em retardar o

crescimento das células de *E. coli* em comparação com o derivado na concentração $2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, que retardou o crescimento em aproximadamente $1 \text{ log UFC}\cdot\text{mL}^{-1}$ no final do processo.

É importante observar que, ao utilizar os derivados B-OG, independentemente da concentração enzimática, são obtidos perfis de cinética de crescimento semelhantes para a bactéria *E. coli* quando comparados com altas concentrações de bromelina livre (10 , 12 e $15 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$). Portanto, o uso de derivados se mostra vantajoso, uma vez que esses produzem efeitos similares utilizando concentrações até 10 vezes menores do que a enzima livre, além de permitir a recuperação e o reúso dos derivados por vários ciclos.

A Tabela 14 apresenta os valores de redução em $\text{log UFC}\cdot\text{mL}^{-1}$ para as concentrações 1 e $2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ e o controle com OG para o derivado de bromelina por imobilização física e para bromelina livre em relação concentração celular inicial para cada inóculo a $25 \text{ }^\circ\text{C}$ e $\text{pH } 7$.

Tabela 14 - Redução da concentração de células de *E. coli* em $\text{log UFC}\cdot\text{mL}^{-1}$ para as concentrações 1 e $2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ para bromelina livre e o derivado físico B-OG e crescimento celular da bactéria para o controle em relação à concentração celular inicial para cada inóculo em meio BHI a $25 \text{ }^\circ\text{C}$ e $\text{pH } 7$

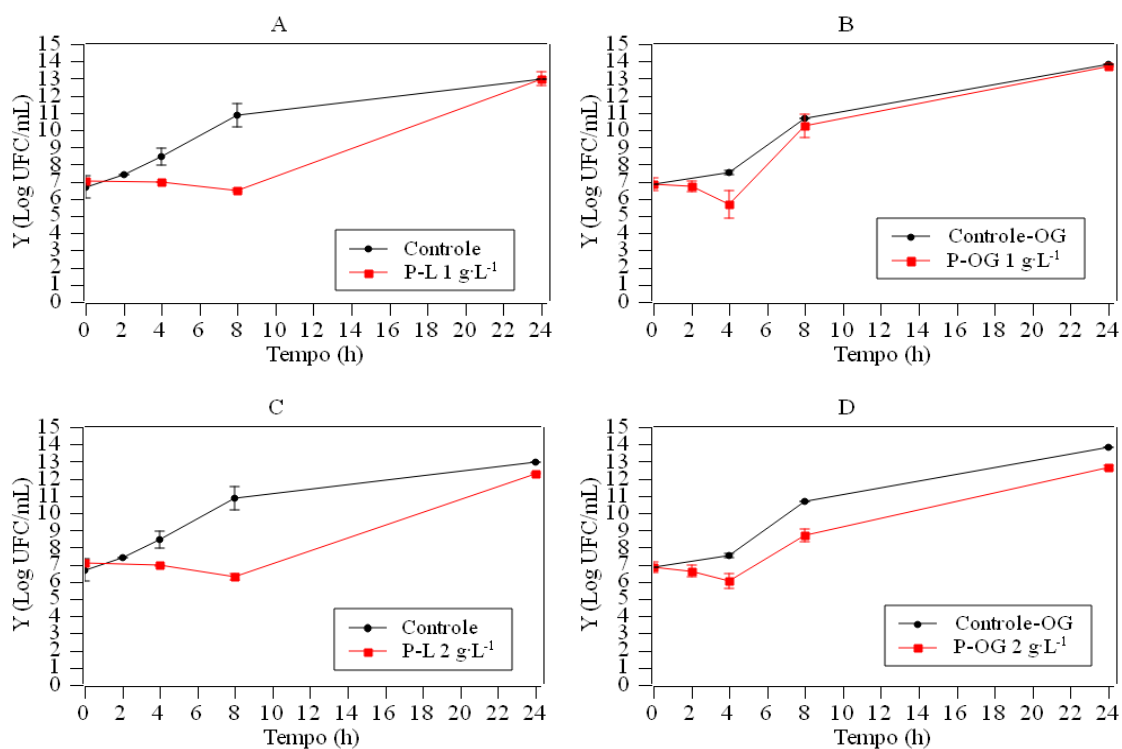
Variação do logaritmo de concentração celular de <i>E. coli</i> (Y em $\text{UFC}\cdot\text{mL}^{-1}$) em relação a concentração celular inicial							
	$C_{e,b}$ ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	Y_0 (Log $\text{UFC}\cdot\text{mL}^{-1}$)	2 h	4 h	8 h	24 h	Y_f (Log $\text{UFC}\cdot\text{mL}^{-1}$)
OG	0	6,86	-	$0,66 \pm 0,01$	$3,80 \pm 0,11$	$6,98 \pm 0,00$	13,84
B-L	1	7,09	-	$-0,06 \pm 0,17$	$0,51 \pm 0,64$	$5,50 \pm 0,01$	12,59
	2	7,17	-	$-0,43 \pm 0,37$	$0,54 \pm 1,15$	$5,97 \pm 0,20$	13,14
B-OG	1	7,01	$-0,10 \pm 0,11$	$-0,79 \pm 0,35$	$2,97 \pm 0,13$	$6,39 \pm 0,72$	13,40
	2	7,01	$0,06 \pm 0,05$	$-0,19 \pm 0,14$	$2,97 \pm 0,50$	$5,71 \pm 0,01$	12,71

$C_{e,b}$ é a concentração da enzima bromelina; Y_0 e Y_f é o logaritmo da concentração celular no início e ao final da cinética.

Fonte: elaborado pela autora

A Figura 24 mostra as cinéticas experimentais do crescimento da *E. coli* para três diferentes inóculos a $25 \text{ }^\circ\text{C}$ no meio BHI com $\text{pH } 7$. Foram utilizados 2 inóculos com papaína livre e 2 com o derivado da papaína P-OG nas concentrações de 1 e $2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ juntamente com um controle com OG e um controle sem OG. Todos os inóculos iniciaram em aproximadamente $7 \text{ log UFC}\cdot\text{mL}^{-1}$.

Figura 24 - Cinéticas de crescimento da *E. coli* a 25 °C em meio BHI e pH 7 utilizando papaína livre e o derivado P-OG nas concentrações de 1 e 2 g·L⁻¹



Y é o logaritmo da concentração de células. As linhas que ligam os pontos representam uma tendência de crescimento do microrganismo.

Fonte: elaborado pela autora

O derivado P-OG, nas concentrações de 1 e 2 g·L⁻¹, exibe cinéticas de crescimento semelhantes às obtidas anteriormente com concentrações maiores de enzima livre (5, 8 e 10 g·L⁻¹), além de apresentar o Fenômeno Fênix. Da mesma forma que ocorre nos derivados com bromelina, os derivados com papaína também demonstraram um efeito sinérgico com o OG, devido às suas cargas superficiais, sendo capazes de reduzir a quantidade de células ao longo de um intervalo de 2 h. Esse comportamento não é observado quando as mesmas concentrações são utilizadas de forma livre.

A Tabela 15 apresenta os valores de redução em log UFC·mL⁻¹ para as concentrações 1 e 2 g·L⁻¹ e o controle com OG para o derivado de papaína por

imobilização física e para papaína livre em relação concentração celular inicial para cada inóculo a 25 °C e pH 7.

Tabela 15 - Redução da concentração de células de *E. coli* em log UFC·mL⁻¹ para as concentrações 1 e 2 g·L⁻¹ para papaína livre e o derivado físico P-OG e crescimento celular da bactéria para o controle em relação concentração celular inicial para cada inóculo em meio BHI a 25 °C e pH 7

Variação do logaritmo de concentração celular de <i>E. coli</i> (Y em UFC·mL⁻¹) em relação a concentração celular inicial							
	C _{e,p} (g·L ⁻¹)	Y ₀ (Log UFC·mL ⁻¹)	2 h	4 h	8 h	24 h	Y _f (Log UFC·mL ⁻¹)
OG	0	6,86	-	0,66 ± 0,01	3,80 ± 0,11	6,98 ± 0,00	13,84
P-L	1	7,06	-	-0,07 ± 0,00	-0,55 ± 0,09	5,91 ± 0,40	12,98
	2	7,11	-	-0,16 ± 0,02	-0,82 ± 0,17	5,19 ± 0,01	12,31
P-	1	6,87	-0,14 ± 0,33	-1,20 ± 0,82	3,39 ± 0,67	6,85 ± 0,01	13,72
OG	2	6,86	-0,24 ± 0,33	-0,81 ± 0,42	1,86 ± 0,36	5,80 ± 0,10	12,66

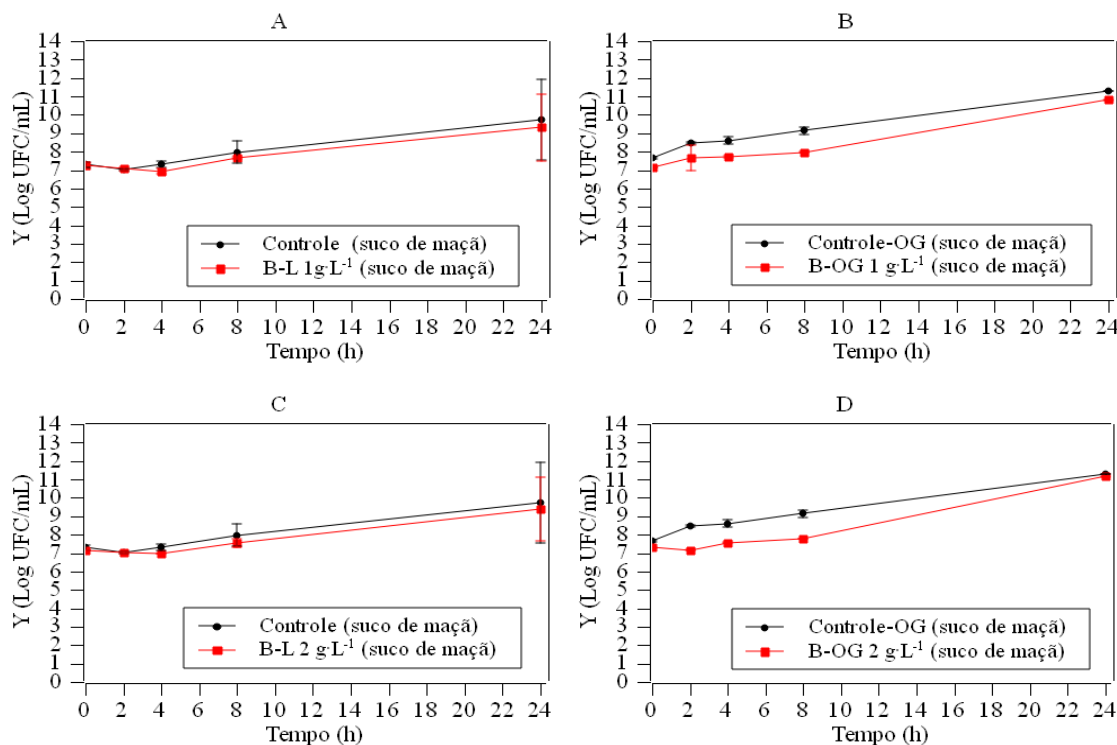
C_{e,p} é a concentração da enzima papaína; Y₀ e Y_f é o logaritmo da concentração celular no início e ao final da cinética.

Fonte: elaborado pela autora

4.3.3 Avaliação da Atividade Antimicrobiana das Enzimas Livres e Derivados Enzimáticos no Suco de Maçã

Com intuito de avaliar a aplicação em um produto no qual essas enzimas já são utilizadas foram realizados testes em suco industrial de maçã. Essas enzimas podem ser usadas em bebidas como espessantes, clarificantes, manutenção de vida útil em sucos, entre outras aplicações (CERRETI *et al.*, 2016; DOS ANJOS *et al.*, 2016; MOSAFA; MOGHADAM; SHAHEDI, 2013). As enzimas foram utilizadas nas formas livre e derivados físicos nas concentrações 1 e 2 g·L⁻¹ a 25 °C e pH 4, pH do suco analisado, durante cinéticas de 24 h.

Figura 25 - Cinéticas de crescimento da *E. coli* a 25 °C em suco de maçã comercial e pH 4 utilizando bromelina livre e o derivado B-OG nas concentrações de 1 e 2 g·L⁻¹



Y é o logaritmo da concentração de células. As linhas que ligam os pontos representam uma tendência de crescimento do microrganismo.

Fonte: elaborado pela autora

Na Figura 25, observa-se que tanto a concentração baixa quanto a alta de bromelina livre apresentaram comportamento semelhante e não diferiram do controle em mais de 0,7 log UFC·mL⁻¹ no final do processo. No entanto, ao comparar as cinéticas em meio de cultura BHI e em suco, a ação enzimática foi inferior no suco. Isso pode ser atribuído a dois fatores que podem interferir na atividade enzimática. O primeiro fator é o pH do suco, que é aproximadamente 4. Como mencionado anteriormente, a bromelina é uma enzima alcalina que tem melhor atuação em um pH entre 6 e 9, embora ainda apresente atividade em pH mais baixo, como 3 (DUBEY; REDDY; MURTHY, 2012; GAGAOUA *et al.*, 2021; KETNAWA; CHAIWUT; RAWDKUEN, 2011a). Valores de pH baixos podem afetar a estrutura interna da bromelina, e a repulsão de cargas pode levar a uma diminuição nas ligações eletrostáticas, impedindo que o centro ativo da enzima se ligue às células bacterianas (ATAIDE *et al.*, 2019; SARKAR *et al.*, 2017).

O segundo fator a ser considerado é a presença de proteínas e sólidos insolúveis, como minerais e fibras insolúveis, no suco. O suco de maçã possui uma média de 1,4% de proteína e 2% de sólidos insolúveis (CORRÊA *et al.*, 2019; NUNES *et al.*, 2016). A

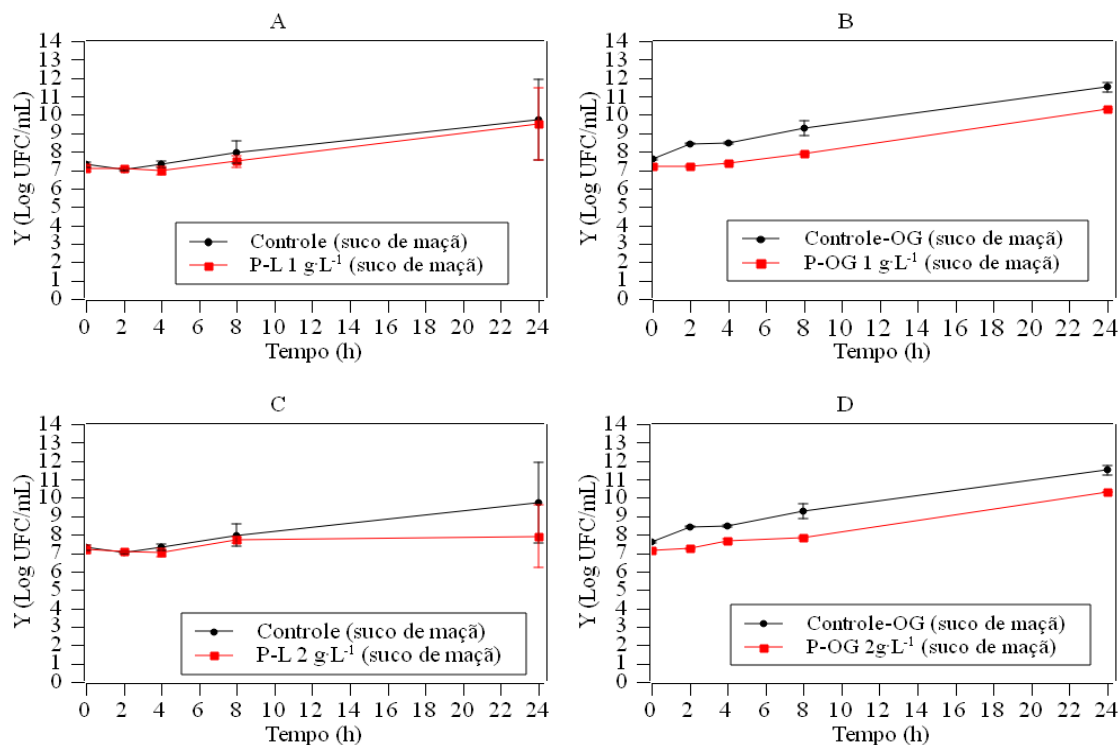
presença de proteínas no suco atua como inibidor competitivo, onde essas proteínas se ligam à enzima ocupando o sítio ativo, impedindo que a enzima se ligue às células de *E. coli* e reduza significativamente a sua quantidade. Além disso, as fibras e minerais, como ferro e alumínio, presentes no suco podem inativar a bromelina (NOUR; TRANDAFIR; IONICA, 2010; RAJASHREE *et al.*, 2012; ZHOU *et al.*, 2021).

As cinéticas observadas com o uso do derivado B-OG são semelhantes às obtidas com a enzima livre. A ligeira redução na concentração de células ocorre devido à interação entre as cargas superficiais do OG e as células de *E. coli*. Porém, quando comparado ao uso do derivado em meio BHI, não é observada a fase *lag* inicial (conforme mostrado na Figura 23). Isso se deve à interação reduzida das cargas superficiais do OG, uma vez que ele também interage com os íons metálicos presentes no suco.

Tanto para a papaína na forma livre quanto para o derivado P-OG (Figura 35), os perfis cinéticos foram semelhantes aos obtidos com o uso da bromelina. Isso indica que o suco exerce uma influência maior na cinética de crescimento de *E. coli* do que o tipo ou a forma de enzima é utilizada.

A papaína livre, na concentração de $2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, resultou em uma redução de $1 \text{ log UFC}\cdot\text{mL}^{-1}$, enquanto o derivado apresentou redução de $1,4 \text{ log UFC}\cdot\text{mL}^{-1}$ em comparação ao controle após 24 h. Assim como a bromelina, a papaína é uma enzima alcalina que apresenta melhor desempenho em pH entre 6 e 8,5, mas também tem ação em pH mais baixo (TANTAMACHARIK *et al.*, 2018). No entanto, no pH 4, a ação da papaína pode ser reduzida, além de haver a presença de proteínas e sólidos insolúveis, como minerais e fibras insolúveis, no suco, que podem competir ou inativar a papaína, incluindo íons ferro II, cobre II, cálcio, magnésio e outros íons bivalentes (HOMAEI, 2015; SANGEETHA; ABRAHAM, 2006; SILVA *et al.*, 2006). Além disso, observa-se que não houve uma fase *lag* pronunciada no início da cinética, devido ao efeito da interação das cargas superficiais do OG tanto com as células de *E. coli* quanto com os íons metálicos presentes.

Figura 26 - Cinéticas de crescimento da *E. coli* a 25 °C em suco de maçã comercial e pH 4 utilizando papaína livre e o derivado P-OG nas concentrações de 1 e 2 g·L⁻¹



Y é o logaritmo da concentração de células. As linhas que ligam os pontos representam uma tendência do crescimento do microrganismo.

Fonte: elaborado pela autora

A Tabela 16 apresenta os valores de redução em log UFC·mL⁻¹ para as concentrações 1 e 2 g·L⁻¹ e o controle com e sem OG para os derivados de bromelina e papaína por imobilização física e para essas enzimas livres em relação concentração celular inicial para cada inóculo a 25 °C e pH 4.

Tabela 16 - Redução da concentração de células de *E. coli* em log UFC·mL⁻¹ para as concentrações 1 e 2 g·L⁻¹ para bromelina e papaína livres e seus respectivos derivados físicos e crescimento celular da bactéria para o controle em relação concentração celular inicial para cada inóculo em suco comercial de maçã a 25 °C e pH 4

Varição do logaritmo de concentração celular de <i>E. coli</i> (Y em UFC·mL⁻¹) em relação a concentração celular inicial							
	C_c (g·L ⁻¹)	Y_0 (Log UFC·mL ⁻¹)	2 h	4 h	8 h	24 h	Y_f (Log UFC·mL ⁻¹)
Suco	0	7,29	-0,26 ± 0,07	0,02 ± 0,18	0,66 ± 0,60	2,46 ± 2,46	9,75
B-L	1	7,25	-0,18 ± 0,09	-0,33 ± 0,14	0,39 ± 0,06	2,08 ± 1,81	9,32
	2	7,12	-0,10 ± 0,07	-0,14 ± 0,00	0,42 ± 0,21	2,26 ± 1,72	9,39
P-L	1	7,11	0,00 ± 0,01	-0,12 ± 0,22	0,38 ± 0,32	2,42 ± 1,95	9,53
	2	7,22	-0,16 ± 0,01	-0,20 ± 0,23	0,47 ± 0,18	0,68 ± 1,70	7,90
Suco-OG	0	7,59	0,84 ± 0,02	0,89 ± 0,04	1,70 ± 0,41	3,91 ± 0,28	11,50
Suco-B-OG	1	7,14	0,52 ± 0,70	0,58 ± 0,06	0,82 ± 0,03	3,67 ± 0,05	10,81
	2	7,29	-0,12 ± 0,01	0,29 ± 0,01	0,49 ± 0,00	3,86 ± 0,04	11,15
Suco-P-OG	1	7,22	-0,02 ± 0,05	0,16 ± 0,05	0,66 ± 0,05	3,08 ± 0,00	10,30
	2	7,16	0,09 ± 0,02	0,49 ± 0,10	0,68 ± 0,04	3,14 ± 0,00	10,30

C_c é a concentração da enzima; Y_0 e Y_f é o logaritmo da concentração celular no início e ao final da cinética.

Fonte: elaborado pela autora

4.4 BIOTRANSFORMAÇÃO DOS FÁRMACOS VIA ENZIMÁTICA

A biotransformação dos antibióticos tetraciclina (TC) e oxitetraciclina (OTC) via enzimática foi avaliada por meio de espectrofotometria UV-visível no comprimento de onda 357 nm comparando a concentração inicial com a concentração após períodos de tempo pré-estabelecidos por meio de uma curva padrão previamente elaborada com 30 pontos para cada fármaco.

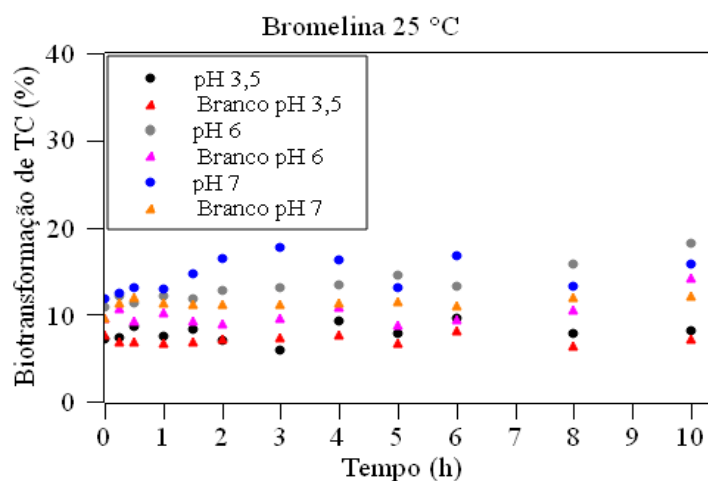
4.4.1 Biotransformação de Tetraciclina via Enzimática em Função do pH do Meio

Primeiramente foram estudados 3 valores distintos de pH utilizando bromelina e papaína em uma solução de concentração de 100 mg·L⁻¹ de TC à temperatura de 25 °C sob agitação mecânica em banho termostático e protegido da luz em sistema batelada por 10 h. Para o pH 3,5 a TC foi diluída apenas em água destilada, enquanto que para pH 6 e

7 utilizou-se solução tampão de fosfato de sódio para evitar que as moléculas de TC formassem quelatos, visto que esse fármaco reage facilmente com cátions bivalentes (GUERRA *et al.*, 2016). O tempo máximo de cada experimento foram de 10 h baseado no tempo de meia vida de cada fármaco, para TC é aproximadamente de 12 h (AGWUH, 2006).

Observa-se na Figura 27 a porcentagem de biotransformação da TC utilizando bromelina livre na temperatura de 25 °C para valores de pH em 3,5, 6 e 7 até 10h de processo em batelada.

Figura 27 - Biotransformação de tetraciclina (TC) utilizando bromelina livre a 25 °C para valores de pH em 3,5, 6 e 7



As amostras denominadas branco são constituídas apenas de fármaco em água (pH 3,5) ou em solução tampão fosfato a 50 mmol (pHs 6 e 7).

Fonte: elaborado pela autora

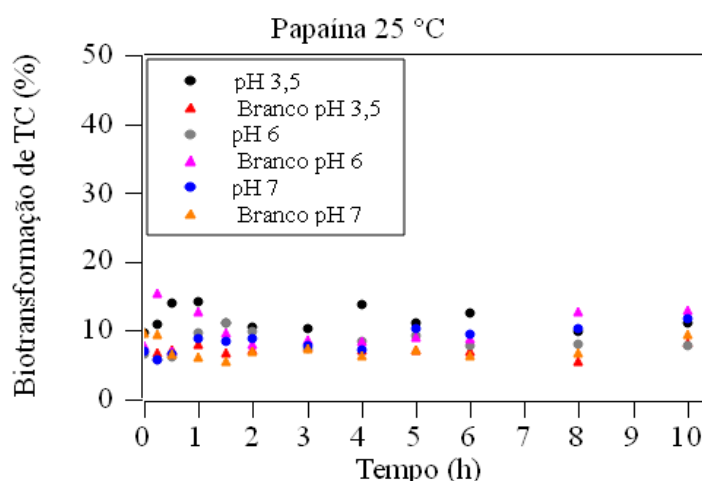
Nessa temperatura, a curva obtida para o pH 3,5 mostrou-se sem alterações significativas entre o ponto 0 h (7,24 %) e o ponto após 10 h (8,09 %). Esse comportamento por ser atribuído a 2 fatores. O primeiro é o pH de atuação da bromelina: por ser uma enzima alcalina tem melhor atuação em pH entre 6 e 9 (GAGAOUA *et al.*, 2021) apesar de apresentar atividade em pH menor como pH 3 (DUBEY; REDDY; MURTHY, 2012; KETNAWA; CHAIWUT; RAWDKUEN, 2011a). Ao utilizar o pH 3,5 a presença dos íons hidrogênios afetam as cargas dos aminoácidos no interior da bromelina reduzindo sua atividade enzimática podendo levar a inativação permanente da enzima, assim como para valor de pH muito ácido a repulsão de cargas se associa a uma diminuição nas ligações eletrostáticas impossibilitando que o centro ativo da enzima se ligue a molécula do fármaco (ATAIDE *et al.*, 2019; SARKAR *et al.*, 2017).

O segundo fator é a estabilidade dos fármacos em água. Ao serem apenas dissolvidos, estes permanecem nas suas formas mais estáveis, sem ionização ou deslocamento de cargas superficiais ou ainda a formação de quelatos com cátions bivalentes que possam estar presentes. Esse comportamento foi obtido por Zhong *et al.* (2022) e afirmam que tetraciclinas em meios ácidos têm tempo de meia-vida de hidrólise mais longo que em outras condições devido sua maior estabilidade.

Quanto as curvas obtidas para os valores de pH 6 e 7, pode-se observar que a porcentagem de biotransformação aumentou ao final das 10 h de experimento, com 18,21% para pH 6 e 15,84% para pH 7, quando comparado a curva em pH 3,5. Soluções próximas a neutralidade são consideradas mais favoráveis para hidrólise de TC (ZHONG *et al.*, 2022). Kang, Lim e Kwon (2012) ao estudarem a degradação por hidrólise de diversas tetraciclinas observaram que o tempo de meia-vida era mais afetado em pH próximo a neutralidade, mas que ainda ocorria hidrólise em outros valores de pH.

Na Figura 28 observa-se a porcentagem de biotransformação da TC utilizando papaína livre na temperatura de 25 °C para valores de pH em 3,5, 6 e 7 até 10 h de processo em batelada. Nota-se que as curvas têm perfis e porcentagens de biotransformação semelhantes independentes do pH, obtendo máximo de biotransformação de 11,17, 7,82 e 11,64%, respectivamente, com desvio padrão inferior a $\pm 0,01$.

Figura 28 - Biotransformação de tetraciclina (TC) utilizando papaína livre a 25 °C para valores de pH em 3,5, 6 e 7



As amostras denominadas branco são constituídas apenas de fármaco em água (pH 3,5) ou em solução tampão fosfato a 50 mmol (pHs 6 e 7).

Fonte: elaborado pela autora

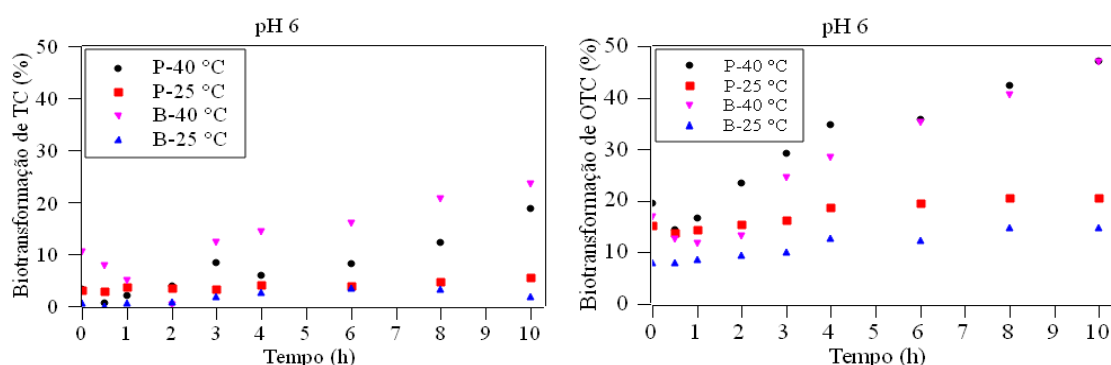
A papaína é uma enzima alcalina com melhor atuação em pH entre 6 e 8,5 (TANTAMACHARIK *et al.*, 2018), porém mesmo para o pH 6 e 7 a porcentagem de biotransformação da TC manteve a mesma grandeza quando comparado ao pH 3,5 condição mais estável do fármaco. A papaína, assim como a bromelina, também são afetadas pelas cargas dos íons hidrogênio e pode variar sua conformação, levando-a a inativação (SANGEETHA; ABRAHAM, 2006). Isso indica que tanto a bromelina quanto a papaína em suas formas livres podem não ter efeito sobre a hidrólise da TC.

4.4.2 Biotransformação de Tetraciclina e Oxitetraciclina via Enzimática em Função da Temperatura

Para avaliar o efeito da temperatura na biotransformação da TC e OCT foram realizados ensaios a 40 °C em pH 6 com ambas as enzimas livres e comparadas às curvas obtidas a 25 °C.

Ao observar a Figura 29 nota-se que as curvas para 40 °C obtêm valores superiores quando comparados com as curvas obtidas a 25 °C, o que indicaria uma maior biotransformação da TC e OCT. Porém ao longo do tempo tanto as soluções de fármacos contendo enzima, quanto as soluções de fármacos sem enzima (branco) escurecem na mesma proporção (Figura 30 e Figura 31).

Figura 29 - Biotransformação de tetraciclina e oxitetraciclina utilizando bromelina (B) e papaína (P) livre à 25 e 40 °C para pH 6

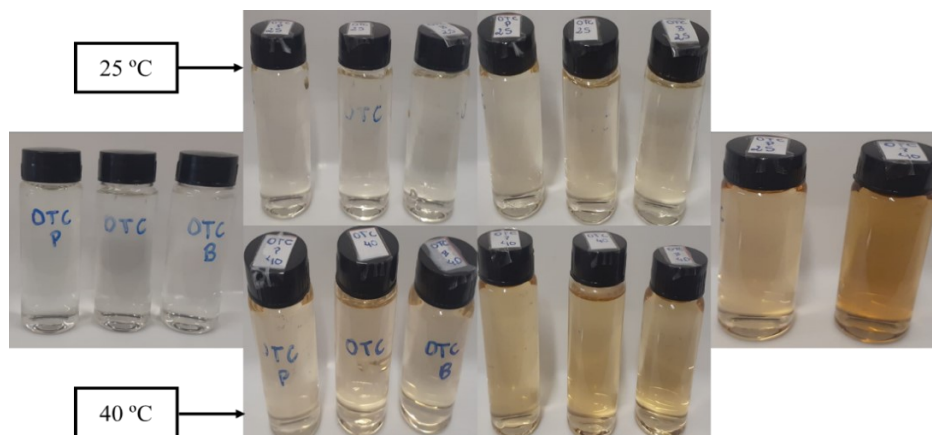


Fonte: elaborado pela autora

Na Figura 30 e Figura 31 é possível visualizar esse escurecimento para OCT e TC, respectivamente. É notório que as soluções a 40 °C se tornam mais escuras do que a 25 °C independente da presença da enzima. As imagens trazem os fármacos no tempo inicial

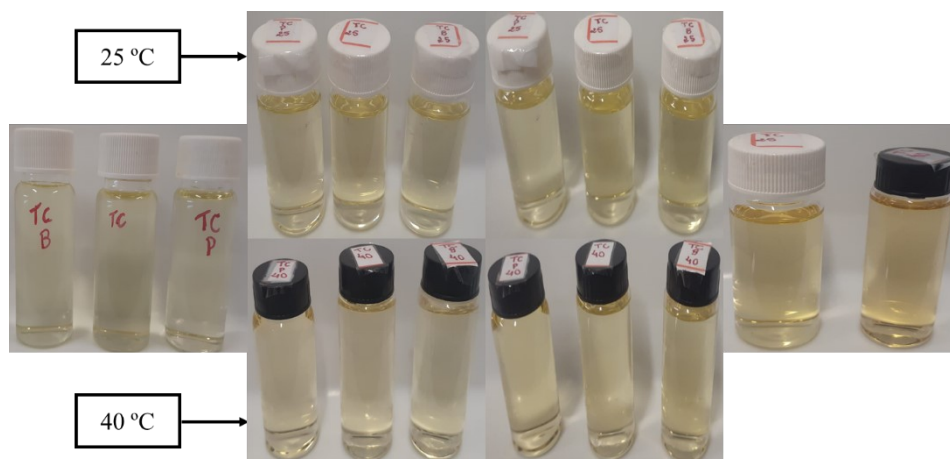
e nos intervalos de 5, 10 e 24 h para amostras sem enzima, com bromelina e com papaína na forma livre.

Figura 30 - Coloração do fármaco oxitetraciclina (OTC) à 25 e 40 °C em pH 7 no início da reação e após 5, 10 e 24 h para amostras com e sem bromelina (B) e papaína (P)



Fonte: elaborado pela autora

Figura 31 - Coloração do fármaco tetraciclina (TC) à 25 e 40 °C em pH 7 ao início da reação e após 5, 10 e 24 horas h para amostras com e sem bromelina (B) e papaína (P)



Fonte: elaborado pela autora

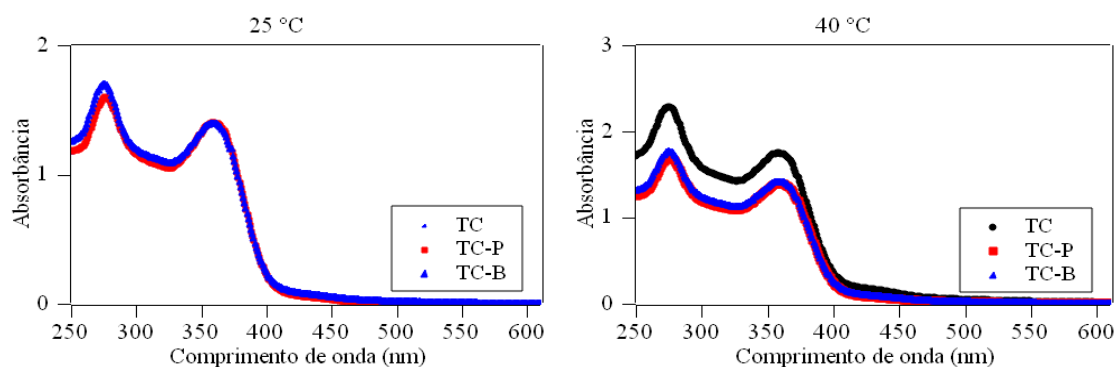
O escurecimento da solução ocorre antes do tempo de meia-vida de cada fármaco e indica que o que está ocorrendo é degradação térmica e hidrólise, sendo o tempo de meia vida da TC de aproximadamente de 12 h e para OTC é de aproximadamente de 10 h (AGWUH, 2006). Um resultado semelhante foi observado por Conde-Cid *et al.* (2018) ao estudarem a dissipação e degradação de tetraciclina, oxitetraciclina e clortetraciclina utilizando luz solar simulada. Os autores determinaram valores de meia-vida de 3,76, 1,68

e 1,73 h, respectivamente, na presença de luz. Tian; Khalil e Bayen (2017) concluíram que em geral o tratamento térmico leva à degradação de antibióticos e seus resíduos, esses fármacos pode sofrer diferentes níveis de degradação dependendo do meio no qual se encontra, por exemplo, água, gordura, carne de diferentes tipos, entre outros. Como também a fonte de calor influencia a geração de resíduos, além da taxa de degradação.

Dentre as tetraciclinas, a OTC é a menos estável ao calor principalmente quando utilizado sistemas tamponados, podendo ser quase completamente degradada durante 30 min de fervura em água. Porém a degradação das tetraciclinas já ocorre a 25 °C e aumenta com o aumento do pH e da temperatura, principalmente para temperaturas maiores de 60 °C (ABOU-RAYA *et al.*, 2013; HASSANI *et al.*, 2008; ROSE *et al.*, 1996; TIAN; KHALIL; BAYEN, 2017; XUAN *et al.*, 2009).

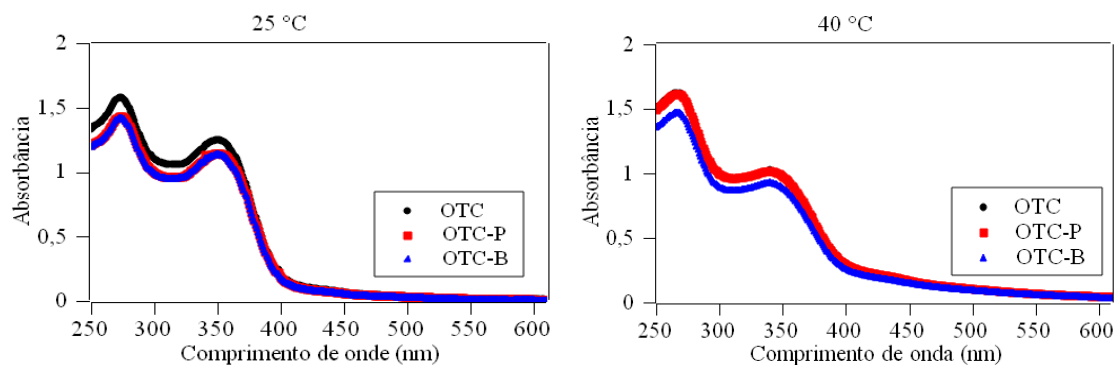
Foi realizada varredura por espectrofotometria UV-visível para avaliar a presença de outros picos devido a degradação térmica dos fármacos. É possível analisar na Figura 32 e Figura 33 que o espectro de cada solução de TC e OTC, respectivamente, não houve formação de picos além dos característicos de cada fármaco.

Figura 32 - Espectros de UV-vis de tetraciclina puro (TC), tetraciclina com papaína (TC-P) e tetraciclina com bromelina (TC-B) para 25 e 40 °C



Fonte: elaborado pela autora

Figura 33 - Espectros de UV-vis de oxitetraciclina puro (OTC), oxitetraciclina com bromelina (OTC-B) e oxitetraciclina com papaína (OTC-P) para 25 e 40 °C

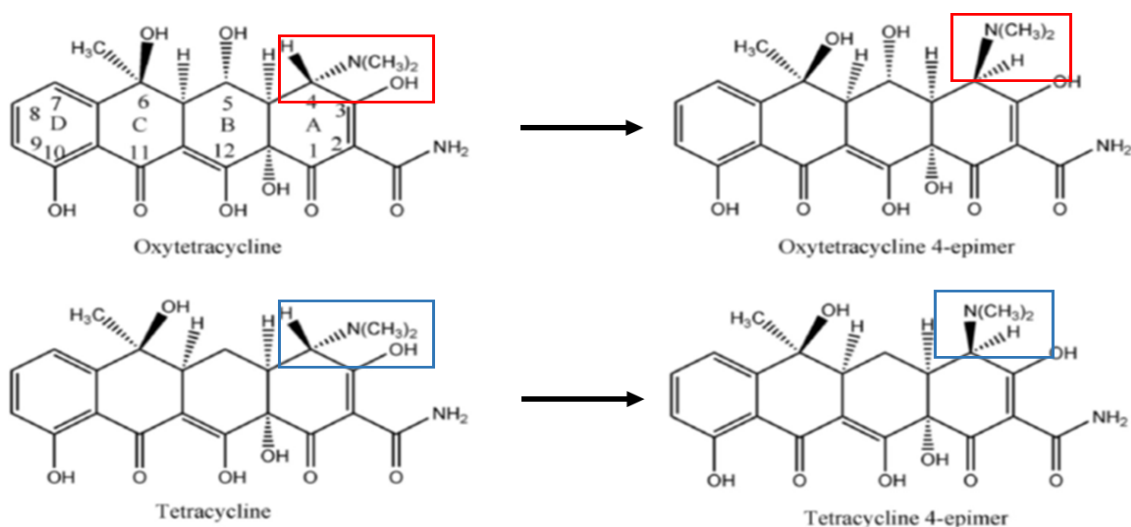


Fonte: elaborado pela autora

Esse comportamento indica que os fármacos devem estar se degradando em alguns de seus epímeros e/ou anidrotetraciclina. Porém o problema na geração dessas substâncias é permanecerem biologicamente ativas, mesmo que em menor nível que o composto original, e apresentarem toxicidade (BLASCO; CORCIA; PICÓ, 2009; FRITZ; ZUO, 2007; HALLING-SØRENSEN *et al.*, 2003; HALLING-SØRENSEN; SENDELØV; TJØRNELUND, 2002). Em geral, os epímeros são obtidos em meios ácidos, porém com aquecimento também pode haver a mudança de posição dos radicais no átomo de carbono quiral 4 (Figura 34) (ZHU *et al.*, 2023).

Dessa forma, não é possível verificar a degradação por espectrofotometria UV-vis devido ao comprimento de onda ser o mesmo do composto original. Normalmente a detecção desses compostos é realizada por cromatografia líquida de alta eficiência com detector de massa acoplado (HPLC-MS) (GAVILÁN *et al.*, 2015, 2016; NEBOT *et al.*, 2014; PANG *et al.*, 2021; ZHENG *et al.*, 2012), porém é sempre relatada a dificuldade em diferenciá-los pois a massa quase não varia entre eles, sendo atualmente sugerido a diferenciação por espectros de dissociação induzida por colisão de íons através da ionização por eletrospray (HPLC-ESI-MS) (ZHU *et al.*, 2023).

Figura 34 - Modificação do carbono quiral da oxitetraciclina e tetraciclina para formação dos epímeros

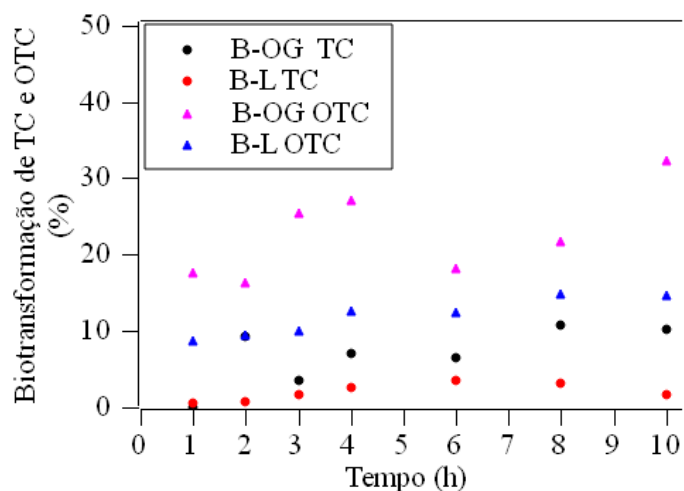


Fonte: ZHU *et al.*, 2023.

4.4.3 Biotransformação de Tetraciclina e Oxitetraciclina via Derivado Enzimático de Bromelina

Também foi analisada a biotransformação utilizando o derivado de bromelina B-OG em pH 7 a 25 °C. A Figura 35 apresenta os perfis de biotransformação para TC e OTC utilizando bromelina livre (B-L) e o derivado por imobilização sem glutaraldeído (B-OG).

Figura 35 - Biotransformação de tetraciclina (TC) e oxitetraciclina (OTC) utilizando o derivado enzimático B-OG à 25 °C e pH 7



Fonte: elaborado pela autora

Tanto para a TC quanto para OTC, os sistemas com o derivado B-OG obtiveram maior porcentagem de biotransformação do que os sistemas com a bromelina livre. Esse resultado pode ter sido obtido por dois fatores. O primeiro seria que a enzima ao ser imobilizada tem maior estabilidade e consegue atuar na biotransformação dos fármacos.

O segundo, seria a adsorção da TC e do OTC pelo OG. Há estudos que utilizam o OG como adsorvente das tetraciclinas e obtém comportamento semelhante ao observado neste trabalho. A exemplo, Dedic *et al.* (2020) avaliaram a remoção de cloridrato de tetraciclina em água por meio da redução da absorvância ao longo do tempo. Os autores notaram que havia uma redução de absorvância acentuada ao início do processo e depois ocorria a variação da absorvância, demonstrando processo de adsorção e dessorção. Outros autores também avaliaram a adsorção de tetraciclinas em água utilizando OG e observaram que a adsorção aumenta com a redução do pH, para valores de pH próximos a neutralidade e alcalinos a interação eletrostática entre o OG e as tetraciclinas é reduzida o que desfavorece a adsorção e favorece a dessorção (BAO *et al.*, 2018; DEDIC *et al.*, 2020; LI *et al.*, 2023).

Os valores determinados neste estudo são menores do que os determinados nos estudos supracitados, isso ocorre, pois, grande parte dos grupos funcionais que fariam adsorção dos fármacos já estão ligados a bromelina. Porém, maiores estudos são necessários para avaliar se houve realmente biotransformação da TC e OTC por meio da presença de metabólitos no meio ou se houve apenas processo de adsorção dos fármacos pelo OG.

5 CONCLUSÕES

O óxido de grafeno (OG) foi sintetizado a partir do método de Hummers modificando-se a na etapa de filtração e secagem por liofilização. Por meio de análises de caracterização química e microestrutural foi possível comprovar que a modificação na síntese não alterou as características do OG obtido. Quanto à estabilização da suspensão de OG a melhor condição foi obtida para o pH 7 e temperatura de 25 °C.

O óxido de grafeno e o óxido de grafeno funcionalizado com glutaraldeído foram utilizados como suporte para estudo da imobilização das enzimas bromelina e papaína. Os processos de imobilização foram bem-sucedidos, atingindo concentrações enzimáticas de até 2,8 g de enzima por grama de suporte. A enzima bromelina possuiu maior interação com o suporte, obtendo concentrações de enzima superiores à papaína para a mesma disponibilidade de enzimas. Utilizando-se a razão mássica 1:1 entre enzima e suporte, toda a massa de enzima disponibilizada é imobilizada, não havendo descarte de enzimas no processo. Foi observado que independentemente da quantidade de enzima, 30 min é suficiente para obter o máximo de imobilização.

Os derivados enzimáticos apresentaram bons resultados quanto à atividade enzimática, rendimento de imobilização, eficiência na retenção da atividade de imobilização, estabilidade térmica e de estocagem. Dentre os derivados enzimáticos obtidos, P-OG-Glu apresentou melhores características quanto atividade enzimática, estabilidade de estocagem e retenção de atividade da enzima livre após o processo de imobilização. Em relação à papaína livre, a imobilização promove uma melhoria no pH de atuação, passando de 6 para 7, e reteve mais de 85% de atividade enzimática em 50 °C. Além da melhoria na estabilidade de estocagem, passando de 13 dias da enzima livre para 25 dias do derivado o P-OG-Glu houve o aumento da afinidade pelo substrato.

As enzimas livres possuem ação antimicrobiana contra a bactéria *E. coli*, e ao serem imobilizadas têm sua ação melhorada. Os derivados enzimáticos B-OG e P-OG obtiveram maior influência na inibição do crescimento bacteriano nas primeiras 8 h do que as enzimas livres para a mesma concentração. Foi observado que o OG apresenta comportamento simbiótico à enzima causando uma fase *lag* inicial que não é observado quando utilizadas as enzimas livres, o que permite que menores concentrações de enzimas possam atuar na inibição dessa bactéria.

A ação das enzimas como agentes biotransformadores dos antibióticos tetraciclina (TC) e oxitetaciclina (OTC) não foi eficiente nas condições avaliadas.

Acredita-se que a biodegradação alcançada em pH 6 e temperatura de 40 °C ocorreu devido à degradação térmica e não por hidrólise enzimática. Mas observou-se que a OTC é mais susceptível a variações do meio ambiente do que a TC, principalmente a temperatura.

Mediante os resultados obtidos, a imobilização de bromelina e papaína em nanofolhas de óxido de grafeno e de óxido de grafeno funcionalizado é viável e satisfatória. Sua aplicação como agente biotransformador dos antibióticos tetraciclina e oxitetraciclina não foi conclusiva, sendo necessário realizar outras análises. Como agente antimicrobiano obtiveram-se resultados promissores.

Faz-se necessário maiores estudos quanto à aplicação desses derivados em outros fármacos e alimentos e explorar outras áreas de aplicação. Esses derivados podem ser aplicados em diversos processos industriais, podem ser incorporados à membranas de filtração de sucos auxiliando nos processos de clarificação e redução de açúcar, incorporados à embalagens de carnes para atuar como amaciante, auxiliar na síntese de medicamentos e suplementos farmacêuticos, para síntese de produtos químicos, modificação de moléculas, branqueamento de tecidos e papel, na remoção de resíduos de celulose e na redução da carga orgânica nos efluentes, entre tantas.

6 SUGESTÕES

A obtenção de novos derivados enzimáticos permite sua aplicação em muitos campos de pesquisa. Com base na literatura e nos resultados obtidos com o desenvolvimento desse trabalho, são feitas as seguintes recomendações para trabalhos futuros:

- Analisar o efluente sintético dos fármacos por espectros de dissociação induzida por colisão de íons através da ionização por eletrospray para confirmar que as enzimas não biotransformam os antibióticos tetraciclina e oxitetraciclina;
- Investigar se a papaína e a bromelina têm atividade de biotransformação em outros fármacos, principalmente aqueles que apresentem cisteína em sua composição, pois estas são enzimas cisteínas vegetais e a presença deste grupo pode atuar como ativador das enzimas;
- Investigar como outros processos inibidores/inativadores atuam contra as células sobreviventes da bactéria *E. coli* no Fenômeno Fênix, principalmente tratamentos a frio como aplicação de plasma para minimizar a degradação nutricional do alimento;
- Investigar o emprego dos derivados enzimáticos como antimicrobianos contra outras bactérias e em diversos alimentos, principalmente produtos cárneos, visto que estas enzimas são utilizadas como amaciantes de carne;
- Explorar outros campos de aplicação para os derivados como o emprego em biossensores, embalagens inteligentes, obtenção de hidrolisados e tantos outros.

REFERÊNCIA

ABOU-RAYA, S. H.; SHALABY, A. R.; SALAMA, N. A.; EMAM, W. H.; MEHAYA, F. M. Effect of ordinary cooking procedures on tetracycline residues in chicken meat. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 21, n. 1, 2013.

AGWUH, K. N. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of the tetracyclines including glycylicyclines. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 58, n. 2, p. 256–265, 30 maio 2006. Disponível em: <<https://academic.oup.com/jac/article-lookup/doi/10.1093/jac/dkl224>>.

ALVARADO-RAMÍREZ, L.; ROSTRO-ALANIS, M.; RODRÍGUEZ-RODRÍGUEZ, J.; CASTILLO-ZACARÍAS, C.; SOSA-HERNÁNDEZ, J. E.; BARCELÓ, D.; IQBAL, H. M. N.; PARRA-SALDÍVAR, R. Exploring current tendencies in techniques and materials for immobilization of laccases – A review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 181, p. 683–696, jun. 2021. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0141813021007212>>.

AMINI, N.; SETIASIH, S.; HANDAYANI, S.; HUDIYONO, S.; SAEPUDIN, E. Potential antibacterial activity of partial purified bromelain from pineapple core extracts using acetone and ammonium sulphate against dental caries-causing bacteria. In: 2018., 2018, [...]. 2018. v. 020014, p. 020071.

AMRI, E.; MAMBOYA, F. Papain , a Plant Enzyme of Biological Importance : A Review. v. 8, n. 2, p. 99–104, 2012.

ANDREOZZI, R.; CAPRIO, V.; MAROTTA, R.; RADOVNIKOVIC, A. Ozonation and H₂O₂/UV treatment of clofibric acid in water: A kinetic investigation. **Journal of Hazardous Materials**, v. 103, n. 3, p. 233–246, 2003.

ANJOS, M. M.; ENDO, E. H.; LEIMANN, F. V.; GONÇALVES, O. H.; DIAS-FILHO, B. P.; ABREU FILHO, B. A. de. Preservation of the antibacterial activity of enzymes against Alicyclobacillus spp. through microencapsulation. **Lwt**, v. 88, p. 18–25, 2018.

ANVISA. Dirceu Raposo de Mello. **Suvisa.Rn.Gov.Br**, p. 2, 2008. Disponível em: <http://www.suvisa.rn.gov.br/contentproducao/aplicacao/sesap_suvisa/arquivos/gerados/nota_tec_infec_multirresist_1_2010.pdf>.

ANWAR, T.; AHMAD, B.; YOUNUS, H. Cross-linked stem bromelain: A more stabilized active preparation. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 25, n. 6, p. 453–458, 11 jan. 2007. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/10242420701568575>>.

APFELBAUM, R. I. **Martindale: The complete drug reference**. 36. ed. London: the Pharmaceutical Press, 2009. v. 33709 p.

ARSHAD, M. S.; KWON, J. H.; IMRAN, M.; SOHAIB, M.; ASLAM, A.; NAWAZ, I.; AMJAD, Z.; KHAN, U.; JAVED, M. Plant and bacterial proteases: A key towards improving meat tenderization, a mini review. **Cogent Food and Agriculture**, v. 2, n. 1, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1080/23311932.2016.1261780>>.

ASIOLI, D.; ASCHEMANN-WITZEL, J.; CAPUTO, V.; VECCHIO, R.; ANNUNZIATA, A.; NÆS, T.; VARELA, P. Making sense of the “clean label” trends: A review of consumer food choice behavior and discussion of industry implications. **Food Research International**, v. 99, n. April, p. 58–71, set. 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2017.07.022>>.

ASPRIDOU, Z.; AKRITIDOU, T.; KOUTSOUMANIS, K. P. Simultaneous growth, survival and death: The trimodal behavior of Salmonella cells under osmotic stress giving rise to “Phoenix phenomenon”. **International Journal of Food Microbiology**, v. 285, n. July, p. 103–109, nov. 2018. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168160518303635>>.

ATAIDE, J. A.; DE CARVALHO, N. M.; REBELO, M. D. A.; CHAUD, M. V.; GROTO, D.; GERENUTTI, M.; RAI, M.; MAZZOLA, P. G.; JOZALA, A. F. Bacterial Nanocellulose Loaded with Bromelain: Assessment of Antimicrobial, Antioxidant and Physical-Chemical Properties. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 2–10, 2017.

ATAIDE, J. A.; GÉRIOS, E. F.; CEFALI, L. C.; FERNANDES, A. R.; TEIXEIRA, M. do C.; FERREIRA, N. R.; TAMBOURGI, E. B.; JOZALA, A. F.; CHAUD, M. V.; OLIVEIRA-NASCIMENTO, L.; MAZZOLA, P. G.; SOUTO, E. B. Effect of Polysaccharide Sources on the Physicochemical Properties of Bromelain–Chitosan Nanoparticles. **Polymers**, v. 11, n. 10, p. 1681, 15 out. 2019. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/2073-4360/11/10/1681>>.

BA, S.; HAROUNE, L.; SOUMANO, L.; BELLENGER, J. P.; JONES, J. P.; CABANA, H. A hybrid bioreactor based on insolubilized tyrosinase and laccase catalysis and microfiltration membrane remove pharmaceuticals from wastewater. **Chemosphere**, v. 201, p. 749–755, 2018.

BALALI, G. I.; YAR, D. D.; AFUA DELA, V. G.; ADJEI-KUSI, P. Microbial Contamination, an Increasing Threat to the Consumption of Fresh Fruits and Vegetables in Today’s World. **International Journal of Microbiology**, v. 2020, p. 1–13, 22 maio 2020. Disponível em: <<https://www.hindawi.com/journals/ijmicro/2020/3029295/>>.

BANERJEE, S.; ARORA, A.; VIJAYARAGHAVAN, R.; PATTI, A. F. Extraction and crosslinking of bromelain aggregates for improved stability and reusability from pineapple processing waste. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 158, p. 318–326, set. 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.04.220>>.

BAO, H.; CHEN, Q.; ZHANG, L.; CHEN, G. Immobilization of trypsin in the layer-by-layer coating of graphene oxide and chitosan on in-channel glass fiber for microfluidic proteolysis. **Analyst**, v. 136, n. 24, p. 5190–5196, 2011.

BAO, J.; ZHU, Y.; YUAN, S.; WANG, F.; TANG, H.; BAO, Z.; ZHOU, H.; CHEN, Y. Adsorption of Tetracycline with Reduced Graphene Oxide Decorated with MnFe₂O₄ Nanoparticles. **Nanoscale Research Letters**, v. 13, n. 1, p. 396, 5 dez. 2018. Disponível em: <<https://link.springer.com/10.1186/s11671-018-2814-9>>.

BARBOZA, G. R.; DE ALMEIDA, J. M.; SILVA, N. C. C. Use of natural substrates as an alternative for the prevention of microbial contamination in the food industry. **Food**

Science and Technology (Brazil), v. 42, p. 1–6, 2022.

BARCELÓ, D. Emerging pollutants in water analysis. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 22, n. 10, 2003.

BAREKAT, S.; SOLTANIZADEH, N. Improvement of meat tenderness by simultaneous application of high-intensity ultrasonic radiation and papain treatment. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 39, p. 223–229, fev. 2017. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1466856416303873>>.

BASU, S.; BHATTACHARYYA, P. Recent developments on graphene and graphene oxide based solid state gas sensors. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 173, p. 1–21, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.snb.2012.07.092>>.

BLASCO, C.; CORCIA, A. Di; PICÓ, Y. Determination of tetracyclines in multi-specie animal tissues by pressurized liquid extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Food Chemistry**, v. 116, n. 4, p. 1005–1012, out. 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.03.055>>.

BORGHI, A. A.; PALMA, M. S. A. Tetracycline: production, waste treatment and environmental impact assessment. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 50, n. 1, p. 25–40, mar. 2014. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1984-82502014000100003&lng=en&tlng=en>.

BORRAJO, P.; PATEIRO, M.; GAGAOUA, M.; FRANCO, D.; ZHANG, W.; LORENZO, J. M. Evaluation of the Antioxidant and Antimicrobial Activities of Porcine Liver Protein Hydrolysates Obtained Using Alcalase, Bromelain, and Papain. **Applied Sciences**, v. 10, n. 7, p. 2290, 27 mar. 2020. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/2076-3417/10/7/2290>>.

BOSS, R.; OVERESCH, G.; BAUMGARTNER, A. Antimicrobial Resistance of Escherichia coli, Enterococci, Pseudomonas aeruginosa, and Staphylococcus aureus from Raw Fish and Seafood Imported into Switzerland. **Journal of Food Protection**, v. 79, n. 7, p. 1240–1246, 1 jul. 2016. Disponível em: <<https://meridian.allenpress.com/jfp/article/79/7/1240/197395/Antimicrobial-Resistance-of-Escherichia-coli>>.

BRADFORD, M. M. Sistema séptico domiciliario | Rotomoldeo en Colombia Tanques Plasticos En Colombia Rotoplast. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248–254, 1976. Disponível em: <<http://www.rotoplast.com.co/sistema-septico-domiciliario/>>.

BRANDT, K. K.; LAWRENCE, J. R.; FINLEY, R.; AMÉZQUITA, A.; ASHBOLT, N. J.; HEBERER, T.; VAN DEN EEDE, C.; SILLEY, P.; SNAPE, J. R.; RYAN, J. J.; TOPP, E.; COORS, A.; BACKHAUS, T.; BORRIELLO, P.; COLLIGNON, P.; LARSSON, D. G. J.; GAZE, W. H.; SCHÖNFELD, J.; MCEWEN, S. A. Human Health Risk Assessment (HHRA) for Environmental Development and Transfer of Antibiotic Resistance. **Environmental Health Perspectives**, v. 121, n. 9, p. 993–1001, 2013.

BRIDIER, A.; SANCHEZ-VIZUETE, P.; GUILBAUD, M.; PIARD, J.-C.; NAÏTALI, M.; BRIANDET, R. Biofilm-associated persistence of food-borne pathogens. **Food Microbiology**, v. 45, n. PB, p. 167–178, fev. 2015. Disponível em:

<<http://dx.doi.org/10.1016/j.fm.2014.04.015>>.

BRITO, A. M. M.; OLIVEIRA, V.; ICIMOTO, M. Y.; NANTES-CARDOSO, I. L. Collagenase activity of bromelain immobilized at gold nanoparticle interfaces for therapeutic applications. **Pharmaceutics**, v. 13, n. 8, p. 1–13, 2021.

CALIFANO, D.; PATENALL, B. L.; KADOWAKI, M. A. S.; MATTIA, D.; SCOTT, J. L.; EDLER, K. J. Enzyme-Functionalized Cellulose Beads as a Promising Antimicrobial Material. **Biomacromolecules**, v. 22, n. 2, p. 754–762, 8 fev. 2021. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.biomac.0c01536>>.

CERRETI, M.; LIBURDI, K.; BENUCCI, I.; ESTI, M. The effect of pectinase and protease treatment on turbidity and on haze active molecules in pomegranate juice. **Lwt**, v. 73, p. 326–333, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2016.06.030>>.

CHAUHAN, H. A.; RAFATULLAH, M.; ALI, K. A.; UMAR, M. F.; KHAN, M. A.; JEON, B. H. Photocatalytic activity of graphene oxide/zinc oxide nanocomposite derived from rice husk for the degradation of phenanthrene under ultraviolet-visible light. **Journal of Water Process Engineering**, v. 47, n. March, p. 102714, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2022.102714>>.

CHEN, Y. A.; HSU, H. Y.; CHAI, H. E.; UKNALIS, J.; SHEEN, S. Combination effect of papaya extract and high pressure processing on Salmonella inactivation on raw chicken breast meat and meat quality assessment. **Food Control**, v. 133, n. PB, p. 108637, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2021.108637>>.

ÇIPLAK, Z.; YILDIZ, N.; ÇALIMLI, A. Investigation of graphene/Ag nanocomposites synthesis parameters for two different synthesis methods. **Fullerenes Nanotubes and Carbon Nanostructures**, v. 23, n. 4, p. 361–370, 2015.

CISZEWSKI, M.; MIANOWSKI, A. Capacitive behavior of highly-oxidized graphite. **Materials Science-Poland**, v. 32, n. 3, p. 307–314, 2014.

COMPTON, O. C.; NGUYEN, S. T. Graphene oxide, highly reduced graphene oxide, and graphene: Versatile building blocks for carbon-based materials. **Small**, v. 6, n. 6, p. 711–723, 2010.

CONDE-CID, M.; FERNÁNDEZ-CALVIÑO, D.; NÓVOA-MUÑOZ, J. C.; ARIAS-ESTÉVEZ, M.; DÍAZ-RAVIÑA, M.; FERNÁNDEZ-SANJURJO, M. J.; NÚÑEZ-DELGADO, A.; ÁLVAREZ-RODRÍGUEZ, E. Biotic and abiotic dissipation of tetracyclines using simulated sunlight and in the dark. **Science of The Total Environment**, v. 635, p. 1520–1529, set. 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.04.233>>.

CORRÊA, B. M.; BALDISSERA, L.; BARBOSA, F. R.; RIBEIRO, E. B.; ANDRIGHETTI, C. R.; AGOSTINI, J. da S.; VALLADÃO, D. M. de S. Centesimal and mineral composition and antioxidant activity of the bacaba fruit peel. **Bioscience Journal**, v. 35, n. 2, p. 509–517, 2019.

COSTA-SILVA, T. A.; CARVALHO, A. K. F.; SOUZA, C. R. F.; DE CASTRO, H. F.; BACHMANN, L.; SAID, S.; OLIVEIRA, W. P. Immobilized enzyme-driven value enhancement of lignocellulosic-based agricultural byproducts: Application in aroma

synthesis. **Journal of Cleaner Production**, v. 284, p. 124728, fev. 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2020.124728>>.

DALLA-VECCHIA, R.; NASCIMENTO, M. D. G.; SOLDI, V. APLICAÇÕES SINTÉTICAS DE LIPASES IMOBILIZADAS EM POLÍMEROS. **Química Nova**, v. 27, n. 4, p. 623–630, 2004.

DAMODARAN, S.; PARKIN, K. L.; FENNEMA, O. R. **Química de Alimentos de Fennema**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010. 900 p.

DASGUPTA, A.; SARKAR, J.; GHOSH, M.; BHATTACHARYA, A.; MUKHERJEE, A.; CHATTOPADHYAY, D.; ACHARYA, K. Green conversion of graphene oxide to graphene nanosheets and its biosafety study. **PLoS ONE**, v. 12, n. 2, p. 1–20, 2017.

DE LENCASTRE NOVAES, L. C.; JOZALA, A. F.; LOPES, A. M.; DE CARVALHO SANTOS-EBINUMA, V.; MAZZOLA, P. G.; PESSOA JUNIOR, A. Stability, purification, and applications of bromelain: A review. **Biotechnology Progress**, v. 32, n. 1, p. 5–13, jan. 2016. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/btpr.2190>>.

DE MELO BRITES, M.; CERÓN, A. A.; COSTA, S. M.; OLIVEIRA, R. C.; FERRAZ, H. G.; CATALANI, L. H.; COSTA, S. A. Bromelain immobilization in cellulose triacetate nanofiber membranes from sugarcane bagasse by electrospinning technique. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 132, n. July 2019, p. 109384, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.enzmtec.2019.109384>>.

DEBNATH, R.; CHATTERJEE, N.; DAS, S.; MISHRA, S.; BOSE, D.; BANERJEE, S.; DAS, S.; SAHA, K. Das; GHOSH, D.; MAITI, D. Bromelain with peroxidase from pineapple are more potent to target leukemia growth inhibition - A comparison with only bromelain. **Toxicology in Vitro**, v. 55, n. October 2018, p. 24–32, mar. 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.tiv.2018.11.004>>.

DEDIC, M.; GUTIC, S.; GICEVIC, A.; BECIC, E.; IMAMOVIC, B.; MARKOVIC, D.; ZIGA-SMAJIC, N. Application of membrane filters in determination of the adsorption of tetracycline hydrochloride on graphene oxide. **Pharmacia**, v. 67, n. 4, p. 339–345, 27 nov. 2020. Disponível em: <<https://pharmacia.pensoft.net/article/57242/>>.

DEVAKATE, R. V.; PATIL, V. V.; WAJE, S. S.; THORAT, B. N. Purification and drying of bromelain. **Separation and Purification Technology**, v. 64, n. 3, p. 259–264, jan. 2009. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1383586608003596>>.

DŁUGOSZ, O.; MATYSIK, J.; MATYJASIK, W.; BANACH, M. Catalytic and antimicrobial properties of α -amylase immobilised on the surface of metal oxide nanoparticles. **Journal of Cluster Science**, v. 32, n. 6, p. 1609–1622, 1 nov. 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s10876-020-01921-5>>.

DOROTÍKOVÁ, K.; KAMENÍK, J.; BOGDANOVIČOVÁ, K.; KŘEPELOVÁ, S.; STREJČEK, J.; HARUŠTIAKOVÁ, D. Microbial contamination and occurrence of *Bacillus cereus sensu lato*, *Staphylococcus aureus*, and *Escherichia coli* on food handlers' hands in mass catering: Comparison of the glove juice and swab methods. **Food Control**, v. 133, n. September 2021, p. 108567, mar. 2022. Disponível em:

<<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0956713521007052>>.

DOS ANJOS, M. M.; DA SILVA, A. A.; DE PASCOLI, I. C.; MIKCHA, J. M. G.; MACHINSKI, M.; PERALTA, R. M.; DE ABREU FILHO, B. A. Antibacterial activity of papain and bromelain on Alicyclobacillus spp. **International Journal of Food Microbiology**, v. 216, p. 121–126, jan. 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.10.007>>.

DUAN, L.; WANG, Y.; ZHANG, Y.; LIU, J. Graphene immobilized enzyme/polyethersulfone mixed matrix membrane: Enhanced antibacterial, permeable and mechanical properties. **Applied Surface Science**, v. 355, p. 436–445, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.apsusc.2015.07.127>>.

DUBEY, R.; REDDY, S.; MURTHY, N. Y. S. Optimization of activity of bromelain. **Asian Journal of Chemistry**, v. 24, n. 4, p. 1429–1431, 2012.

EFREMOVA, L. V.; VASILCHENKO, A. S.; RAKOV, E. G.; DERYABIN, D. G. Toxicity of Graphene Shells, Graphene Oxide, and Graphene Oxide Paper Evaluated with Escherichia coli Biotests. **BioMed Research International**, v. 2015, p. 1–10, 2015. Disponível em: <<http://www.hindawi.com/journals/bmri/2015/869361/>>.

ERIBO, B.; ASHENAFI, M. Behavior of Escherichia coli O157:H7 in tomato and processed tomato products. **Food Research International**, v. 36, n. 8, p. 823–830, 2003.

ERRASTI, M. E.; NATALUCCI, C. L.; CAFFINI, N. O.; ROTELLI, A. E.; BRULLO, A.; MARAS, B.; TREJO, S. A.; LÓPEZ, L. M. I. Structural Properties of Macrodontain I, a Cysteine Protease from Pseudananas macrodontes (Morr.) Harms (Bromeliaceae). **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 186, n. 1, p. 186–198, 15 set. 2018. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s12010-018-2725-3>>.

ESHAMAH, H.; HAN, I.; NAAS, H.; ACTON, J.; DAWSON, P. Antibacterial effects of natural tenderizing enzymes on different strains of Escherichia coli O157:H7 and Listeria monocytogenes on beef. **Meat Science**, v. 96, n. 4, p. 1494–1500, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.meatsci.2013.12.010>>.

ESTI, M.; BENUCCI, I.; LOMBARDELLI, C.; LIBURDI, K.; MARIA, A.; GARZILLO, V. Food and Bioproducts Processing Papain from papaya (Carica papaya L .) fruit and latex : Preliminary characterization in alcoholic – acidic buffer for wine application. **Food and Bioproducts Processing**, v. 91, n. 4, p. 595–598, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.fbp.2013.02.003>>.

FARRÉ, M. I.; PÉREZ, S.; KANTIANI, L.; BARCELÓ, D. Fate and toxicity of emerging pollutants, their metabolites and transformation products in the aquatic environment. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 27, n. 11, p. 991–1007, 2008.

FENT, K.; WESTON, A. A.; CAMINADA, D. Ecotoxicology of human pharmaceuticals. **Aquatic Toxicology**, v. 76, n. 2, p. 122–159, 2006.

FERNANDEZ-LOPEZ, L.; PEDRERO, S. G.; LOPEZ-CARROBLES, N.; GORINES, B. C.; VIRGEN-ORTÍZ, J. J.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Effect of protein load on stability of immobilized enzymes. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 98, p. 18–25, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.enzmictec.2016.12.002>>.

FERNÁNDEZ-LUCAS, J.; CASTAÑEDA, D.; HORMIGO, D. New trends for a classical enzyme: Papain, a biotechnological success story in the food industry. **Trends in Food Science and Technology**, v. 68, n. 2017, p. 91–101, 2017.

FIGUEROA, R. A.; LEONARD, A.; MACKAY, A. A. Modeling Tetracycline Antibiotic Sorption to Clays. **Environmental Science and Technology**, v. 38, n. 2, p. 476–483, 2004.

FRITZ, J.; ZUO, Y. Simultaneous determination of tetracycline, oxytetracycline, and 4-epitetracycline in milk by high-performance liquid chromatography. **Food Chemistry**, v. 105, n. 3, p. 1297–1301, 2007. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814607002646>>.

GAGAOUA, M.; DIB, A. L.; LAKHDARA, N.; LAMRI, M.; BOTINEȘTEAN, C.; LORENZO, J. M. Artificial meat tenderization using plant cysteine proteases. **Current Opinion in Food Science**, v. 38, n. December 2020, p. 177–188, abr. 2021. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S221479932030134X>>.

GAVILÁN, R. E.; NEBOT, C.; VEIGA-GÓMEZ, M.; ROCA-SAAVEDRA, P.; VAZQUEZ BELDA, B.; FRANCO, C. M.; CEPEDA, A. A Confirmatory Method Based on HPLC-MS/MS for the Detection and Quantification of Residue of Tetracyclines in Nonmedicated Feed. **Journal of Analytical Methods in Chemistry**, v. 2016, p. 1–8, 2016. Disponível em: <<http://www.hindawi.com/journals/jamc/2016/1202954/>>.

GAVILÁN, R.; NEBOT, C.; MIRANDA, J.; MARTÍN-GÓMEZ, Y.; VÁZQUEZ-BELDA, B.; FRANCO, C.; CEPEDA, A. Analysis of Tetracyclines in Medicated Feed for Food Animal Production by HPLC-MS/MS. **Antibiotics**, v. 5, n. 1, p. 1, 24 dez. 2015. Disponível em: <<http://www.mdpi.com/2079-6382/5/1/1>>.

GÖKMEN, M.; İLHAN, Z.; TAVŞANLI, H.; ÖNEN, A.; EKTİK, N.; GÖÇMEZ, E. B. Prevalence and molecular characterization of shiga toxin-producing *Escherichia coli* in animal source foods and green leafy vegetables. **Food Science and Technology International**, p. 1–7, 2022.

GU, X.; GAO, J.; LI, X.; WANG, Y. Immobilization of Papain onto Graphene Oxide Nanosheets. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 18, n. 5, p. 3543–3547, 2018.

GUERRA, W.; SILVA-CALDEIRA, P. P.; TERENCE, H.; PEREIRA-MAIA, E. C. Impact of metal coordination on the antibiotic and non-antibiotic activities of tetracycline-based drugs. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 327–328, p. 188–199, nov. 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ccr.2016.04.009>>.

GUPTA, P.; MAQBOOL, T.; SALEEMUDDIN, M. Oriented immobilization of stem bromelain via the lone histidine on a metal affinity support. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 45, n. 3–4, p. 78–83, abr. 2007. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1381117706003420>>.

HAFID, K.; JOHN, J.; SAYAH, T. M.; DOMÍNGUEZ, R.; BECILA, S.; LAMRI, M.; DIB, A. L.; LORENZO, J. M.; GAGAOUA, M. One-step recovery of latex papain from *Carica papaya* using three phase partitioning and its use as milk-clotting and meat-tenderizing agent. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 146, p. 798–

810, mar. 2020. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0141813019357873>>.

HALLING-SØRENSEN, B.; LYKKEBERG, A.; INGERSLEV, F.; BLACKWELL, P.; Tjørnelund, J. Characterisation of the abiotic degradation pathways of oxytetracyclines in soil interstitial water using LC-MS-MS. **Chemosphere**, v. 50, n. 10, p. 1331–1342, 2003.

HALLING-SØRENSEN, B.; SENGELØV, G.; Tjørnelund, J. Toxicity of Tetracyclines and Tetracycline Degradation Products to Environmentally Relevant Bacteria, Including Selected Tetracycline-Resistant Bacteria. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 42, n. 3, p. 263–271, 1 mar. 2002. Disponível em: <<https://link.springer.com/10.1007/s00244-001-0017-2>>.

HASSANI, M.; LÁZARO, R.; PÉREZ, C.; CONDÓN, S.; PAGÁN, R. Thermostability of Oxytetracycline, Tetracycline, and Doxycycline at Ultrahigh Temperatures. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 8, p. 2676–2680, 1 abr. 2008. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jf800008p>>.

HENRIQUES, R. O.; BORK, J. A.; FERNANDEZ-LORENTE, G.; GUISAN, J. M.; FURIGO, A.; DE OLIVEIRA, D.; PESSELA, B. C. Co-immobilization of lipases and B-D-galactosidase onto magnetic nanoparticle supports: Biochemical characterization. **Molecular Catalysis**, v. 453, n. November 2017, p. 12–21, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.mcat.2018.04.022>>.

HOMAEI, A. Enhanced activity and stability of papain immobilized on CNBr-activated sepharose. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 75, p. 373–377, abr. 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.01.055>>.

HU, W.; PENG, C.; LUO, W.; LV, M.; LI, X.; LI, D.; HUANG, Q.; FAN, C. Graphene-Based Antibacterial Paper. **ACS Nano**, v. 4, n. 7, p. 4317–4323, 27 jul. 2010. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/nn101097v>>.

HUMMERS, W. S.; OFFEMAN, R. E. Preparation of Graphitic Oxide. **Journal of the American Chemical Society**, v. 80, n. 6, p. 1339, 1958.

HWANG, D.; KIM, S. M.; KIM, H. J. Transcriptome changes and polymyxin resistance of acid-adapted Escherichia coli O157:H7 ATCC 43889. **Gut Pathogens**, v. 12, n. 1, p. 1–13, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/s13099-020-00390-5>>.

ITURRIZA-GOMARA, M.; O'BRIEN, S. J. Foodborne viral infections. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 29, n. 5, p. 495–501, 2016.

IUMB. **International Union Of Biochemistry And Molecular Biology**. Disponível em: <<https://iubmb.qmul.ac.uk/enzyme/>>. Acesso em: 2 nov. 2022.

JANČIČ, U.; GORGIEVA, S. Bromelain and Nisin: The Natural Antimicrobials with High Potential in Biomedicine. **Pharmaceutics**, v. 14, n. 1, p. 76, 29 dez. 2021. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/1999-4923/14/1/76>>.

JEONG, J.; SONG, W.; COOPER, W. J.; JUNG, J.; GREAVES, J. Degradation of tetracycline antibiotics: Mechanisms and kinetic studies for advanced oxidation/reduction

processes. **Chemosphere**, v. 78, n. 5, p. 533–540, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2009.11.024>>.

JIA, A.; XIAO, Y.; HU, J.; ASAMI, M.; KUNIKANE, S. Simultaneous determination of tetracyclines and their degradation products in environmental waters by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, n. 22, p. 4655–4662, 2009.

JIA, F.; XIAO, X.; NASHALIAN, A.; SHEN, S.; YANG, L.; HAN, Z.; QU, H.; BOE, E.; TFOTPS, H. B. T. Advances in graphene oxide membranes for water treatment. v. 15, n. 7, p. 6636–6654, 2022.

JIRŮČKOVÁ, A.; JANKOVSKÝ, O.; SOFER, Z.; SEDMIDUBSKÝ, D. Synthesis and Applications of Graphene Oxide. **Materials**, v. 15, n. 3, 2022.

JOHRA, F. T.; LEE, J. W.; JUNG, W. G. Facile and safe graphene preparation on solution based platform. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v. 20, n. 5, p. 2883–2887, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jiec.2013.11.022>>.

JUN-HUI, X.; HUI-JUAN, C.; BIN, Z.; HUI, Y. The mechanistic effect of bromelain and papain on tenderization in jumbo squid (*Dosidicus gigas*) muscle. **Food Research International**, v. 131, n. 1, p. 108991, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.108991>>.

KANG, H. J.; LIM, M. Y.; KWON, J. H. Effects of adsorption onto silica sand particles on the hydrolysis of tetracycline antibiotics. **Journal of Environmental Monitoring**, v. 14, n. 7, p. 1853–1859, 2012.

KASHEFI, S.; BORGHEI, S. M.; MAHMOODI, N. M. Covalently immobilized laccase onto graphene oxide nanosheets: Preparation, characterization, and biodegradation of azo dyes in colored wastewater. **Journal of Molecular Liquids**, v. 276, p. 153–162, 2018.

KAUR, M.; KAUR, H.; KUKKAR, D. Synthesis and characterization of graphene oxide using modified Hummer's method. **AIP Conference Proceedings**, v. 1953, 2018.

KAY, P.; BLACKWELL, P. A.; BOXALL, A. B. A. Transport of veterinary antibiotics in overland flow following the application of slurry to arable land. **Chemosphere**, v. 59, n. 7, p. 951–959, 2005.

KELLY, A. F.; MARTÍNEZ-RODRIGUEZ, A.; BOVILL, R. A.; MACKEY, B. M. Description of a “Phoenix” Phenomenon in the Growth of *Campylobacter jejuni* at Temperatures Close to the Minimum for Growth. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 8, p. 4975–4978, ago. 2003. Disponível em: <<https://journals.asm.org/doi/10.1128/AEM.69.8.4975-4978.2003>>.

KEMPER, N. Veterinary antibiotics in the aquatic and terrestrial environment. **Ecological Indicators**, v. 8, n. 1, p. 1–13, 2008.

KETNAWA, S.; CHAIWUT, P.; RAWDKUEN, S. Aqueous two-phase extraction of bromelain from pineapple peels (“Phu Lae” cultiv.) and its biochemical properties. **Food Science and Biotechnology**, v. 20, n. 5, p. 1219–1226, 2011a.

KETNAWA, S.; CHAIWUT, P.; RAWDKUEN, S. Extraction of bromelain from pineapple peels. **Food Science and Technology International**, v. 17, n. 4, p. 395–402, 3 ago. 2011b. Disponível em: <<http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/1082013210387817>>.

KHAIRY, R. M.; MOHAMED, E. S.; GHANY, H. M. A.; ABDELRAHIM, S. S. Phylogenetic classification and virulence genes profiles of uropathogenic E. coli and diarrhegenic E. coli strains isolated from community acquired infections. **PLoS ONE**, v. 14, n. 9, p. 1–10, 2019.

KOCH, N.; ISLAM, N. F.; SONOWAL, S.; PRASAD, R.; SARMA, H. Environmental antibiotics and resistance genes as emerging contaminants: Methods of detection and bioremediation. **Current Research in Microbial Sciences**, v. 2, n. February, p. 100027, dez. 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.crmicr.2021.100027>>.

KRUK, M.; TRZASKOWSKA, M. Analysis of biofilm formation on the surface of organic mung bean seeds, sprouts and in the germination environment. **Foods**, v. 10, n. 3, p. 1–20, 2021.

KUANG, L.; ZHANG, W. Enhanced hydrogen production by carbon-doped TiO₂ decorated with reduced graphene oxide (rGO) under visible light irradiation. **RSC Advances**, v. 6, n. 3, p. 2479–2488, 2016.

KÜMMERER, K. Antibiotics in the aquatic environment - A review - Part I. **Chemosphere**, v. 75, n. 4, p. 417–434, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2008.11.086>>.

LARSSON, D. G. J. Pollution from drug manufacturing: review and perspectives. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 369, n. 1656, 19 nov. 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25405961>>. Acesso em: 28 set. 2018.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica**. 2. ed. São Paulo: Sarvier, 1995. 839 p.

LENG, Y.; BAO, J.; XIAO, H.; SONG, D.; DU, J.; MOHAPATRA, S.; WERNER, D.; WANG, J. Transformation mechanisms of tetracycline by horseradish peroxidase with/without redox mediator ABTS for variable water chemistry. **Chemosphere**, v. 258, p. 127306, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.127306>>.

LI, H.; HOU, J.; DUAN, L.; JI, C.; ZHANG, Y.; CHEN, V. Graphene oxide-enzyme hybrid nanoflowers for efficient water soluble dye removal. **Journal of Hazardous Materials**, v. 338, p. 93–101, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jhazmat.2017.05.014>>.

LI, Q.; YI, L.; MAREK, P.; IVERSON, B. L. Commercial proteases: Present and future. **FEBS Letters**, v. 587, n. 8, p. 1155–1163, 17 abr. 2013. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1016/j.febslet.2012.12.019>>.

LI, Z.; JIANG, H.; WANG, X.; WANG, C.; WEI, X. Effect of pH on Adsorption of Tetracycline Antibiotics on Graphene Oxide. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 20, n. 3, p. 2448, 30 jan. 2023. Disponível em:

<<https://www.mdpi.com/1660-4601/20/3/2448>>.

LIANG, H.; JIANG, S.; YUAN, Q.; LI, G.; WANG, F.; ZHANG, Z.; LIU, J. Co-immobilization of multiple enzymes by metal coordinated nucleotide hydrogel nanofibers: Improved stability and an enzyme cascade for glucose detection. **Nanoscale**, v. 8, n. 11, p. 6071–6078, 2016.

LIN, T. Y.; CHEN, D. H. One-step green synthesis of arginine-capped iron oxide/reduced graphene oxide nanocomposite and its use for acid dye removal. **RSC Advances**, v. 4, n. 56, p. 29357–29364, 2014.

MA, X.; CHEN, Z.; HAN, J.; ZHOU, Y.; LIN, F.; LI, C.; WANG, L.; WANG, Y. Fabrication of immobilized bromelain using cobalt phosphate material prepared in deep eutectic solvent as carrier. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 210, n. August 2021, p. 112251, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2021.112251>>.

MA, Y.; DING, S.; FEI, Y.; LIU, G.; JANG, H.; FANG, J. Antimicrobial activity of anthocyanins and catechins against foodborne pathogens *Escherichia coli* and *Salmonella*. **Food Control**, v. 106, n. June, p. 106712, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2019.106712>>.

MANOHAR, C. M.; PRABHAWATHI, V.; SIVAKUMAR, P. M.; DOBLE, M. Design of a Papain Immobilized Antimicrobial Food Package with Curcumin as a Crosslinker. **PLOS ONE**, v. 10, n. 4, p. e0121665, 23 abr. 2015. Disponível em: <<https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0121665>>.

MANORATNE, C. H.; ROSA, S. R. D.; KOTTEGODA, I. R. M. XRD-HTA, UV Visible, FTIR and SEM Interpretation of Reduced Graphene Oxide Synthesized from High Purity Vein Graphite. **Material Science Research India**, v. 14, n. 1, p. 19–30, 28 jun. 2017. Disponível em: <<http://www.materialsciencejournal.org/vol14no1/xrd-hta-uv-visible-ftir-and-sem-interpretation-of-reduced-graphene-oxide-synthesized-from-high-purity-vein-graphite/>>.

MANZOOR, Z.; NAWAZ, A.; MUKHTAR, H.; HAQ, I. Bromelain: Methods of Extraction, Purification and Therapeutic Applications. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 59, n. December, p. 1–16, 2016. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-89132016000100315&lng=en&tlng=en>.

MAURER, H. R. Bromelain : biochemistry, pharmacology and medical use. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 58, p. 1234–1245, 2001.

MAUTER, M. S.; ELIMELECH, M. Critical Review Environmental Applications of Carbon-Based Nanomaterials. **American Chemical Society**, p. 5843–5859, 2008.

MCDONALD, J. K. An overview of protease specificity and catalytic mechanisms: aspects related to nomenclature and classification. **The Histochemical Journal**, v. 17, n. 7, p. 773–785, 1985.

MELLEFONT, L. A.; KOCHARUNCHITT, C.; ROSS, T. Combined effect of chilling and desiccation on survival of *Escherichia coli* suggests a transient loss of culturability.

International Journal of Food Microbiology, v. 208, p. 1–10, set. 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.04.024>>.

MELO, S. A. S.; TROVÓ, A. G.; BAUTITZ, I. R.; NOGUEIRA, R. F. P. Degradação de fármacos residuais por processos oxidativos avançados. **Química Nova**, v. 32, n. 1, p. 188–197, 2009. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422009000100034&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt>.

MODENEZ, I. A.; SASTRE, D. E.; MORAIS, F. C.; NETTO, C. G. C. M. Influence of Glutaraldehyde Cross-Linking Modes on the Recyclability of Immobilized Lipase B from *Candida antarctica* for Transesterification of Soy Bean Oil. **Molecules**, v. 23, n. 9, p. 2230, 2 set. 2018. Disponível em: <<http://www.mdpi.com/1420-3049/23/9/2230>>.

MOHAMED, S. H.; MOHAMED, M. S. M.; KHALIL, M. S.; AZMY, M.; MABROUK, M. I. Combination of essential oil and ciprofloxacin to inhibit/eradicate biofilms in multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 125, n. 1, p. 84–95, jul. 2018. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/jam.13755>>.

MORENO-CORTEZ, I. E.; ROMERO-GARCÍA, J.; GONZÁLEZ-GONZÁLEZ, V.; GARCÍA-GUTIERREZ, D. I.; GARZA-NAVARRO, M. A.; CRUZ-SILVA, R. Encapsulation and immobilization of papain in electrospun nanofibrous membranes of PVA cross-linked with glutaraldehyde vapor. **Materials Science and Engineering C**, v. 52, p. 306–314, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.msec.2015.03.049>>.

MOSAFÁ, L.; MOGHADAM, M.; SHAHEDI, M. Papain enzyme supported on magnetic nanoparticles: Preparation, characterization and application in the fruit juice clarification. **Cuihua Xuebao/Chinese Journal of Catalysis**, v. 34, n. 10, p. 1897–1904, 2013. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S1872-2067\(12\)60663-9](http://dx.doi.org/10.1016/S1872-2067(12)60663-9)>.

NAHAR, S.; MIZAN, M. F. R.; HA, A. J.; HA, S.-D. Advances and Future Prospects of Enzyme-Based Biofilm Prevention Approaches in the Food Industry. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 17, n. 6, p. 1484–1502, nov. 2018. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/1541-4337.12382>>.

NAIR, R. R.; DEMARCHE, P.; AGATHOS, S. N. Formulation and characterization of an immobilized laccase biocatalyst and its application to eliminate organic micropollutants in wastewater. **New Biotechnology**, v. 30, n. 6, p. 815–823, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.nbt.2012.12.004>>.

NAPOLEÃO, D. C.; ZAIDAN, L. E. M. C.; SALGADO, J. B. de A.; SALES, R. V. de L.; SILVA, V. L. da. Degradação do contaminante emergente paracetamol empregando processos oxidativos avançados. **Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental**, p. 725–734, 2015.

NAVEED, M.; NADEEM, F.; MEHMOOD, T.; BILAL, M.; ANWAR, Z.; AMJAD, F. Protease—A Versatile and Ecofriendly Biocatalyst with Multi-Industrial Applications: An Updated Review. **Catalysis Letters**, v. 151, n. 2, p. 307–323, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s10562-020-03316-7>>.

NEBOT, C.; GUARDDON, M.; SECO, F.; IGLESIAS, A.; MIRANDA, J. M.;

FRANCO, C. M.; CEPEDA, A. Monitoring the presence of residues of tetracyclines in baby food samples by HPLC-MS/MS. **Food Control**, v. 46, p. 495–501, dez. 2014. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0956713514003053>>.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 6. ed. [s.l: s.n.]1250 p.

NGUYEN, U. T.; BURROWS, L. L. DNase I and proteinase K impair *Listeria monocytogenes* biofilm formation and induce dispersal of pre-existing biofilms. **International Journal of Food Microbiology**, v. 187, p. 26–32, set. 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.06.025>>.

NOUR, V.; TRANDAFIR, I.; IONICA, M. E. Compositional characteristics of fruits of several apple (*Malus domestica* Borkh.) cultivars. **Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca**, v. 38, n. 3, p. 228–233, 2010.

NOVOSELOV, K. S.; GEIM, A. K.; MOROZOV, s v; JIANG, D.; ZHANG, Y.; DUBONOS, s v; GRIGORIEVA, i v; FIRSOV, a a. Electric Field Effect in Atomically Thin Carbon Films. **Science**, v. 1906, n. 1, p. 666–669, 2004.

NUNES, P. C.; AQUINO, J. de S.; ROCKENBACH, I. I.; STAMFORD, T. L. M. Physico-Chemical Characterization, Bioactive Compounds and Antioxidant Activity of Malay Apple [*Syzygium malaccense* (L.) Merr. & L.M. Perry]. **PLOS ONE**, v. 11, n. 6, p. e0158134, 28 jun. 2016. Disponível em: <<https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0158134>>.

NWAGU, T. N.; UGWUODO, C. J. Stabilizing bromelain for therapeutic applications by adsorption immobilization on spores of probiotic *Bacillus*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 127, p. 406–414, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.01.061>>.

OLIVEIRA, C. I. S. **Estudo da degradação eletroquímica da oxitetraciclina**. 2013. Universidade da Beira Interior, 2013. Disponível em: <https://ubibliorum.ubi.pt/bitstream/10400.6/3246/1/DISSERTAÇÃO_FINAL.pdf>.

PAGANINI, C. C.; LONGHI, D. A.; DE ARAGÃO, G. M. F.; CARCIOFI, B. A. M. Modelling the inactivation, survival and growth of *Salmonella enterica* under osmotic stress considering inoculum phase and serotype. **Journal of Applied Microbiology**, v. 132, n. 5, p. 3973–3986, 1 maio 2022. Disponível em: <<https://academic.oup.com/jambio/article/132/5/3973/6988675>>.

PANDI, A.; MARICHETTI KUPPUSWAMI, G.; NUMBI RAMUDU, K.; PALANIVEL, S. A sustainable approach for degradation of leather dyes by a new fungal laccase. **Journal of Cleaner Production**, v. 211, p. 590–597, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2018.11.048>>.

PANG, Y.-H.; LV, Z.-Y.; SUN, J.-C.; YANG, C.; SHEN, X.-F. Collaborative compounding of metal–organic frameworks for dispersive solid-phase extraction HPLC–MS/MS determination of tetracyclines in honey. **Food Chemistry**, v. 355, n. November 2020, p. 129411, set. 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.129411>>.

PANKOVA, S. M.; SAKIBAEV, F. A.; HOLYAVKA, M. G.; ARTYUKHOV, V. G. A Possible Role of Charged Amino-Acid Clusters on the Surface of Cysteine Proteases for Preserving Activity when Binding with Polymers. **Biophysics (Russian Federation)**, v. 67, n. 1, p. 8–14, 2022.

PARLAK, O.; TURNER, A. P. F.; TIWARI, A. PH-induced on/off-switchable graphene bioelectronics. **Journal of Materials Chemistry B**, v. 3, n. 37, p. 7434–7439, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1039/C5TB01355K>>.

PENA, A.; LINO, C. M.; ALONSO, R.; BARCELO, D. Determination of tetracycline antibiotic residues in edible swine tissues by liquid chromatography with spectrofluorometric detection and confirmation by mass spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 13, p. 4973–4979, 2007.

POON, L.; WILSON, L. D.; HEADLEY, J. V. Chitosan-glutaraldehyde copolymers and their sorption properties. **Carbohydrate Polymers**, v. 109, p. 92–101, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.02.086>>.

PRESSER, K. A.; ROSS, T.; RATKOWSKY, D. A. Modelling the Growth Limits (Growth/No Growth Interface) of Escherichia coli as a Function of Temperature, pH, Lactic Acid Concentration, and Water Activity. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, n. 5, p. 1773–1779, 1998.

PYRZYNSKA, K. Carbon nanotubes as sorbents in the analysis of pesticides. **Chemosphere**, v. 83, n. 11, p. 1407–1413, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2011.01.057>>.

RAJASHREE, R.; SUSHMA, P.; DIVYA, G.; KANCHAN, I. The Ash and Iron Content in Apple Juice Concentrate Powder. **Research Journal of Recent Sciences**, v. 1, n. 10, p. 59–62, 2012.

RAVEENDRAN, S.; PARAMESWARAN, B.; UMMALYMA, S. B.; ABRAHAM, A.; MATHEW, A. K.; MADHAVAN, A.; REBELLO, S.; PANDEY, A. Applications of Microbial Enzymes in Food Industry. **Food Technology and Biotechnology**, v. 56, n. 1, 2018. Disponível em: <http://www.ftb.com.hr/images/pdfarticles/2018/January-March/FTB-56_016.pdf>.

RAZAQ, A.; BIBI, F.; ZHENG, X.; PAPADAKIS, R.; JAFRI, S. H. M.; LI, H. Review on Graphene-, Graphene Oxide-, Reduced Graphene Oxide-Based Flexible Composites: From Fabrication to Applications. **Materials**, v. 15, n. 3, 2022.

REGITANO, J. B.; LEAL, R. M. P. Comportamento e impacto ambiental de antibióticos usados na produção animal brasileira. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 34, n. 3, p. 601–616, jun. 2010. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-06832010000300002&lng=pt&tlng=pt>.

RODRÍGUEZ-DELGADO, M. M.; ALEMÁN-NAVA, G. S.; RODRÍGUEZ-DELGADO, J. M.; DIECK-ASSAD, G.; MARTÍNEZ-CHAPA, S. O.; BARCELÓ, D.; PARRA, R. Laccase-based biosensors for detection of phenolic compounds. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 74, p. 21–45, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.trac.2015.05.008>>.

ROSE, M. D.; BYGRAVE, J.; FARRINGTON, W. H. H.; SHEARER, G. The effect of cooking on veterinary drug residues in food: 4. Oxytetracycline. **Food Additives and Contaminants**, v. 13, n. 3, p. 275–286, abr. 1996. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/02652039609374409>>.

SAEED, M.; UR RAHMAN, S.; SHABBIR, M. A.; KHAN, N.; SHAKEEL, A. Extraction and utilization of Papaya extract as meat tenderizer and antimicrobial activity against Salmonella typhimurium. **Pakistan Journal of Agricultural Sciences**, v. 54, n. 1, p. 153–159, 2017.

SAENGSUK, N.; LAOHAKUNJIT, N.; SANPORKHA, P.; KAISANGSRI, N.; SELAMASSAKUL, O.; RATANAKHANOKCHAI, K.; UTHAIRATANAKIJ, A. Physicochemical characteristics and textural parameters of restructured pork steaks hydrolysed with bromelain. **Food Chemistry**, v. 361, n. December 2020, p. 130079, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.130079>>.

SANGEETHA, K.; ABRAHAM, T. E. Chemical modification of papain for use in alkaline medium. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 38, n. 3–6, p. 171–177, mar. 2006. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1381117706000142>>.

SÃO JOSÉ, J. F. B. de. Contaminação microbiológica em serviços de alimentação: importância e controle. **Nutrire**, v. 37, n. 1, p. 78–92, 2012. Disponível em: <http://www.sban.org.br/revista_acervo/34/acervo>.

SAPUTRA, N. A.; TRISATYA, D. R.; DARMAWAN, S.; WIBISONO, H. S.; PARI, G. Effect citronella oil against bacteria strains: Escherichia coli ATCC 10536, Staphylococcus aureus ATCC 6538 and Salmonella typhimurium ATCC 14028. **IOP Conference Series: Earth and Environmental Science**, v. 460, n. 1, 2020.

SARKAR, S.; AHMED, M.; MOHAMMAD, H.; SCIENCE, D.; MOZUMDER, R.; SAEID, A. Isolation and characterization of bromelain enzyme from pineapple and its utilization as anti-browning agent. **Process Engineering Journal**, v. 1, n. December 2022, p. 52–58, 2017.

SASSMAN, S. A.; LEE, L. S. Sorption of three tetracyclines by several soils: Assessing the role of pH and cation exchange. **Environmental Science and Technology**, v. 39, n. 19, p. 7452–7459, 2005.

SHAH, R.; KAUSAR, A.; MUHAMMAD, B.; SHAH, S. Progression from Graphene and Graphene Oxide to High Performance Polymer-Based Nanocomposite: A Review. **Polymer - Plastics Technology and Engineering**, v. 54, n. 2, p. 173–183, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1080/03602559.2014.955202>>.

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

SHEN, J.; SHI, M.; YAN, B.; MA, H.; LI, N.; HU, Y.; YE, M. Covalent attaching protein to graphene oxide via diimide-activated amidation. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 81, n. 2, p. 434–438, 2010.

SHENKER, M.; HARUSH, D.; BEN-ARI, J.; CHEFETZ, B. Uptake of carbamazepine

by cucumber plants - A case study related to irrigation with reclaimed wastewater. **Chemosphere**, v. 82, n. 6, p. 905–910, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2010.10.052>>.

SILHAVY, T. J.; KAHNE, D.; WALKER, S. The Bacterial Cell Envelope. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 2, n. 5, p. a000414–a000414, 1 maio 2010. Disponível em: <<http://cshperspectives.cshlp.org/lookup/doi/10.1101/cshperspect.a000414>>.

SILVA, C. J. S. M.; ZHANG, Q.; SHEN, J.; CAVACO-PAULO, A. Immobilization of proteases with a water soluble–insoluble reversible polymer for treatment of wool. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, n. 4, p. 634–640, ago. 2006. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0141022905005004>>.

SINGH, R.; KUMAR, M.; MITTAL, A.; MEHTA, P. K. Microbial enzymes: industrial progress in 21st century. **3 Biotech**, v. 6, n. 2, p. 174, 19 dez. 2016. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s13205-016-0485-8>>.

SIRISHA, V. L.; JAIN, A.; JAIN, A. **Enzyme Immobilization: An Overview on Methods, Support Material, and Applications of Immobilized Enzymes**. 1. ed. [s.l.] Elsevier Inc., 2016. v. 79179–211 p.

SKORONSKI, E.; SOUZA, D. H.; ELY, C.; BROILO, F.; FERNANDES, M.; FÚRIGO, A.; GHISLANDI, M. G. Immobilization of laccase from *Aspergillus oryzae* on graphene nanosheets. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 99, p. 121–127, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.02.076>>.

SOARES, A. M. B. F.; GONÇALVES, L. M. O.; FERREIRA, R. D. S.; DE SOUZA, J. M.; FANGUEIRO, R.; ALVES, M. M. M.; CARVALHO, F. A. A.; MENDES, A. N.; CANTANHÊDE, W. Immobilization of papain enzyme on a hybrid support containing zinc oxide nanoparticles and chitosan for clinical applications. **Carbohydrate Polymers**, v. 243, n. April, 2020.

SU, R.; SHI, P.; ZHU, M.; HONG, F.; LI, D. Studies on the properties of graphene oxide–alkaline protease bio-composites. **Bioresource Technology**, v. 115, p. 136–140, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2011.12.085>>.

SUDESH; KUMAR, N.; DAS, S.; BERNHARD, C.; VARMA, G. D. Effect of graphene oxide doping on superconducting properties of bulk MgB₂. **Superconductor Science and Technology**, v. 26, n. 9, p. 095008, 1 set. 2013. Disponível em: <<https://iopscience.iop.org/article/10.1088/0953-2048/26/9/095008>>.

SUN, H.; YANG, Y.; HUANG, Q. Preparation and structural variation of graphite oxide and graphene oxide. **Integrated Ferroelectrics**, v. 128, n. 1, p. 163–170, 2011.

TACIAS-PASCACIO, V. G.; CASTAÑEDA-VALBUENA, D.; MORELLON-STERLING, R.; TAVANO, O.; BERENGUER-MURCIA, Á.; VELA-GUTIÉRREZ, G.; RATHER, I. A.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Bioactive peptides from fisheries residues: A review of use of papain in proteolysis reactions. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 184, n. June, p. 415–428, 2021a.

TACIAS-PASCACIO, V. G.; MORELLON-STERLING, R.; CASTAÑEDA-

VALBUENA, D.; BERENQUER-MURCIA, Á.; KAMLI, M. R.; TAVANO, O.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Immobilization of papain: A review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 188, n. July, p. 94–113, 2021b.

TANTAMACHARIK, T.; CARNE, A.; AGYEI, D.; BIRCH, J.; BEKHIT, A. E. A. Use of Plant Proteolytic Enzymes for Meat Processing. *In: **Biotechnological Applications of Plant Proteolytic Enzymes***. Cham: Springer International Publishing, 2018. p. 43–67.

TAUXE, R. V.; DOYLE, M. P.; KUCHENMÜLLER, T.; SCHLUNDT, J.; STEIN, C. E. Evolving public health approaches to the global challenge of foodborne infections. **International Journal of Food Microbiology**, v. 139, n. SUPPL. 1, p. S16–S28, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2009.10.014>>.

TIAN, L.; KHALIL, S.; BAYEN, S. Effect of thermal treatments on the degradation of antibiotic residues in food. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 57, n. 17, p. 3760–3770, 22 nov. 2017. Disponível em: <<https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/10408398.2016.1164119>>.

TIDÉN, S.; DIAZ, L. C.; TAHER, M.; JANSSON, U. Synthesis of graphene oxide coated metal powders with improved flowability and reduced reflectance. **Surface and Coatings Technology**, v. 444, n. April, p. 128644, 2022.

TREVISOL, T. C.; HENRIQUES, R. O.; CESCO, K.; SOUZA, A. J. A.; FURIGO, A. In vitro effect on the proteolytic activity of papain with proteins of the skin as substrate. **International Journal of Cosmetic Science**, v. 44, n. 5, p. 542–554, 17 out. 2022. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/ics.12805>>.

TROPEA, A. Microbial Contamination and Public Health: An Overview. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 19, n. 12, p. 7441, 17 jun. 2022. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/1660-4601/19/12/7441>>.

UNESCO. FACTS and FIGURES. **The United Nations World Water Development Report 2017**, p. 1–12, 2017a.

UNESCO. Wastewater: an untapped resource; executive summary; 2017. **The United Nations World Water Development Report 2017**, p. 1–12, 2017b. Disponível em: <<http://unesdoc.unesco.org/images/0024/002475/247552e.pdf>>.

VERMA, S.; DIXIT, R.; PANDEY, K. C. Cysteine proteases: Modes of activation and future prospects as pharmacological targets. **Frontiers in Pharmacology**, v. 7, n. APR, p. 1–12, 2016.

VILLELA, S. M. **Imobilização de Lacase e seu uso na biotransformação de efluentes de indústrias papeleiras**. 2006. UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA, 2006. Disponível em: <<http://medcontent.metapress.com/index/A65RM03P4874243N.pdf>>.

WANG, X.; HE, L.; WEI, B.; YAN, G.; WANG, J.; TANG, R. Bromelain-immobilized and lactobionic acid-modified chitosan nanoparticles for enhanced drug penetration in tumor tissues. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 115, p. 129–142, 2018.

WANG, X.; XU, J.; XU, X.; FANG, Q.; TANG, R. pH-sensitive bromelain nanoparticles by ortho ester crosslinkage for enhanced doxorubicin penetration in solid tumor. **Materials Science and Engineering C**, v. 113, n. January, p. 111004, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.msec.2020.111004>>.

WANG, Y.; LI, Z.; WANG, J.; LI, J.; LIN, Y. Graphene and graphene oxide: Biofunctionalization and applications in biotechnology. **Trends in Biotechnology**, v. 29, n. 5, p. 205–212, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.tibtech.2011.01.008>>.

WEN, X.; JIA, Y.; LI, J. Degradation of tetracycline and oxytetracycline by crude lignin peroxidase prepared from *Phanerochaete chrysosporium* - A white rot fungus. **Chemosphere**, v. 75, n. 8, p. 1003–1007, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2009.01.052>>.

WEN, X.; JIA, Y.; LI, J. Enzymatic degradation of tetracycline and oxytetracycline by crude manganese peroxidase prepared from *Phanerochaete chrysosporium*. **Journal of Hazardous Materials**, v. 177, n. 1–3, p. 924–928, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jhazmat.2010.01.005>>.

WONG, C. H. A.; SOFER, Z.; KUBESOVA, M.; KUCERA, J.; MATJKOVA, S.; PUMERA, M. Synthetic routes contaminate graphene materials with a whole spectrum of unanticipated metallic elements. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 111, n. 38, p. 13774–13779, 2014.

WONGPHAN, P.; KHOWTHONG, M.; SUPATRAWIPORN, T.; HARNKARNSUJARIT, N. Novel edible starch films incorporating papain for meat tenderization. **Food Packaging and Shelf Life**, v. 31, n. July 2021, p. 100787, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2021.100787>>.

XIANG, X.; ZHU, Y.; YIN, M.; XIA, S.; GUO, C. Study of microwave reduction of graphene oxide suspension: structure and functional groups. **Journal of Materials Science**, v. 57, n. 5, p. 3280–3294, 3 fev. 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s10853-021-06748-7>>.

XUAN, R.; ARISI, L.; WANG, Q.; YATES, S. R.; BISWAS, K. C. Hydrolysis and photolysis of oxytetracycline in aqueous solution. **Journal of Environmental Science and Health, Part B**, v. 45, n. 1, p. 73–81, 29 dez. 2009. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/03601230903404556>>.

YANG, D.; WANG, X.; SHI, J.; WANG, X.; ZHANG, S.; HAN, P.; JIANG, Z. In situ synthesized rGO–Fe₃O₄ nanocomposites as enzyme immobilization support for achieving high activity recovery and easy recycling. **Biochemical Engineering Journal**, v. 105, n. 3, p. 273–280, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bej.2015.10.003>>.

YANG, J.; LIN, Y.; YANG, X.; NG, T. B.; YE, X.; LIN, J. Degradation of tetracycline by immobilized laccase and the proposed transformation pathway. **Journal of Hazardous Materials**, v. 322, p. 525–531, jan. 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jhazmat.2016.10.019>>.

YANG, Y.; GHATGE, S.; SONG, W.-Y.; HUR, H.-G.; KIM, T.-Y. Thermoalkaliphilic

laccase treatment for enhanced production of high-value benzaldehyde chemicals from lignin. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 124, p. 200–208, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.11.144>>.

YOO, Y. J.; FENG, Y.; KIM, Y. H.; YAGONIA, C. F. J. **Fundamentals of enzyme engineering**. [s.l: s.n.]1–209 p.

YÜCEL, Y. Optimization of immobilization conditions of *Thermomyces lanuginosus* lipase on olive pomace powder using response surface methodology. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 1, n. 1, p. 39–44, 2012.

ZAHIRINEJAD, S.; HEMMATI, R.; HOMAEI, A.; DINARI, A.; HOSSEINKHANI, S.; MOHAMMADI, S.; VIANELLO, F. Nano-organic supports for enzyme immobilization: Scopes and perspectives. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 204, n. April, p. 111774, ago. 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2021.111774>>.

ZDARTA, J.; FELICZAK-GUZYK, A.; SIWIŃSKA-CIESIELCZYK, K.; NOWAK, I.; JESIONOWSKI, T. Mesostructured cellular foam silica materials for laccase immobilization and tetracycline removal: A comprehensive study. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 291, n. July 2019, p. 109688, jan. 2020. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1387181119305451>>.

ZDARTA, J.; KLAPISZEWSKI, Ł.; WYSOKOWSKI, M.; NORMAN, M.; KOŁODZIEJCZAK-RADZIMSKA, A.; MOSZYŃSKI, D.; EHRlich, H.; MACIEJEWSKI, H.; STELLING, A. L.; JESIONOWSKI, T. Chitin-lignin material as a novel matrix for enzyme immobilization. **Marine Drugs**, v. 13, n. 4, p. 2424–2446, 2015.

ZHANG, D.-H.; YUWEN, L.-X.; PENG, L.-J. Parameters Affecting the Performance of Immobilized Enzyme. **Journal of Chemistry**, v. 2013, p. 1–7, 2013.

ZHANG, J.; YANG, H.; SHEN, G.; CHENG, P.; ZHANG, J.; GUO, S. Reduction of graphene oxide vial-ascorbic acid. **Chemical Communications**, v. 46, n. 7, p. 1112–1114, 2010.

ZHENG, W.; ZHANG, L.; ZHANG, K.; WANG, X.; XUE, F. Determination of Tetracyclines and Their Epimers in Agricultural Soil Fertilized with Swine Manure by Ultra-High-Performance Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry. **Journal of Integrative Agriculture**, v. 11, n. 7, p. 1189–1198, jul. 2012. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2095311912601142>>.

ZHONG, S.-F.; YANG, B.; XIONG, Q.; CAI, W.-W.; LAN, Z.-G.; YING, G.-G. Hydrolytic transformation mechanism of tetracycline antibiotics: Reaction kinetics, products identification and determination in WWTPs. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 229, p. 113063, jan. 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2021.113063>>.

ZHOU, C.; CHEN, S.; LOU, J.; WANG, J.; YANG, Q.; LIU, C.; HUANG, D.; ZHU, T. Graphene's cousin: The present and future of graphene. **Nanoscale Research Letters**, v. 9, n. 1, p. 1–9, 2014.

ZHOU, W.; YE, C.; GENG, L.; CHEN, G.; WANG, X.; CHEN, W.; SA, R.; ZHANG, J.; ZHANG, X. Purification and characterization of bromelain from pineapple (*Ananas*

comosus L .) peel waste. **Journal of Food Science**, v. 86, n. 2, p. 385–393, 7 fev. 2021. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/1750-3841.15563>>.

ZHU, P.; CHEN, D.; JIANG, K.; ZHU, S.; SU, W.; VAN SCHEPDAEL, A.; ADAMS, E. Differentiation of tetracyclines and their 4-epimers by mass spectrometry of the alkali metal adduct ions. **Talanta**, v. 254, n. October 2022, p. 124201, mar. 2023. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.talanta.2022.124201>>.