



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
LABORATÓRIO DE IMUNOPATOLOGIA KEIZO ASAMI
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA APLICADA À SAÚDE

**Preparação e Caracterização de Compósitos Magnéticos Contendo
Azocaseína para Purificação de Tripsina**

Aluna: Maria Helena Menezes Estevam Alves

Orientador: Prof. Dr. Luiz Bezerra de Carvalho Júnior

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Mariana Paola Cabrera

Co-orientador: Prof. Dr. José António Couto Teixeira

Recife – PE

2017

MARIA HELENA MENEZES ESTEVAM ALVES

**Preparação e Caracterização de Compósitos Magnéticos Contendo
Azocaseína para Purificação de Tripsina**

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Aplicada à Saúde, do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami, Universidade Federal de Pernambuco, como requisito para a obtenção do título de Doutora em Biologia Aplicada à Saúde. Área de Concentração: Biotecnologia.

Orientador:

Prof. Dr. Luiz Bezerra de Carvalho Junior

Departamento de Bioquímica, CCB/UFPE;

Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami – LIKA.

Co-orientadora:

Prof^a Dr^a. Mariana Paola Cabrera

Departamento de Química Fundamental, CCEN/UFPE.

Co-orientador:

Prof. Dr. José António Couto Teixeira

Centro de Engenharia Biológica, Universidade do Minho.

Recife – PE

2017

Catálogo na fonte
Elaine Barroso
CRB 1728

Alves, Maria Helena Menezes Estevam

Preparação e caracterização de compósitos magnéticos contendo Azocaseína para purificação de tripsina / Maria Helena Menezes Estevam Alves - Recife: O Autor, 2017.

197 folhas: il., fig., tab.

Orientador: Luiz Bezerra de Carvalho Junior

Coorientadores: Mariana Paola Cabrera e José António Couto Teixeira

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Biologia Aplicada à Saúde, 2017.

Inclui referências

- 1. Enzimas proteolíticas 2. Visceras 3. Tilápia (peixe) I. Carvalho Júnior, Luiz Bezerra de (orientador) II. Cabrera, Mariana Paola Cabrera (coorientadora) III. Teixeira, José António Couto (coorientador) IV. Título**

MARIA HELENA MENEZES ESTEVAM ALVES

**PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE COMPÓSITOS MAGNÉTICOS
CONTENDO AZOCASEÍNA PARA PURIFICAÇÃO DE TRIPSINA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Aplicada à Saúde, do Centro de Biociências da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de doutor em Biologia Aplicada à Saúde.

Aprovado(a) em: 21/02/2017

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Luiz Bezerra de Carvalho Júnior (Orientador)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. José António Couto Teixeira
Universidade do Minho

Prof. Dr. Ian Porto Gurgel do Amaral
Universidade Federal da Paraíba

Prof. David Fernando Moraes Neri
Universidade Federal do Vale do São Francisco

Prof. Dr. Caio Rodrigo Dias de Assis
Universidade Federal de Pernambuco

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a todos aqueles que de alguma maneira me ajudaram na elaboração deste trabalho.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Luiz Bezerra de Carvalho Júnior, pela paciência e confiança depositados ao longo desses quatro anos.

À minha co-orientadora, Profa. Dra. Mariana Paola Cabrera pelo resgate, a amizade e respeito.

Ao meu co-orientador, Prof. Dr. José António Teixeira pela disponibilidade de me receber em Portugal e por toda ajuda durante o processo final.

A CAPES e FCT pelo apoio financeiro concedido.

Ao Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA) e Centro de Engenharia Biológica da Universidade do Minho, pelas infraestruturas fornecidas para realização dos experimentos.

Aos amigos do Grupo IMOBIO do LF e do LIP pelo clima de amizade e coleguismo sempre presentes, pelas discussões científicas.

Aos meus amigos que foram meus ouvintes nas horas mais difíceis, que davam sua opinião e viam quando eu já não conseguia observar os erros. Por sua amizade, pelos momentos de descontração e por nossas colaborações científicas em todos esses anos.

A Marcela Araújo, Larissa Chaves, Rafaela Ferraz e a todos os colegas do SLC que souberam dividir a Bancada e aos diversos dias bons e difíceis.

A Minhas amigas da Conexão Brasil-Portugal, Thaís, Carol, Livia, Priscilla, vocês me ajudam e me ajudaram diariamente, seja num experimento ou compartilhando momentos muito obrigado por tudo.

A TODOS os meus queridos amigos, pela amizade e bons momentos compartilhados.

A Amélia, Eduardo e Ariel pelo apoio e torcida.

Por ultimo e mais importante, para minha mãe, Maria Helena, Doutora da vida, que me ensinou que a teimosia, resiliência e persistência sempre valem a pena quando realmente acreditamos. Obrigado Mamãe!

“Sejam quais forem os resultados, com êxito ou não, o importante é que no final cada um possa dizer: fiz o que pude”

(Louis Pasteur)

RESUMO

Proteases estão entre as mais produzidas no mundo. Dentre elas a tripsina é a mais utilizada em diversas áreas da biotecnologia. A purificação de biomoléculas por partículas magnéticas baseia-se na interação dos ligantes, componentes químicos presentes na superfície das partículas, com a molécula alvo. Neste trabalho, foram preparados dois compósitos magnéticos: o primeiro a partir de azocaseína e óxido de ferro (mAzo) e o segundo, a partir de partículas de óxido de ferro revestidas com polianilina tratadas com azocaseína (mPANI-Azo). Os novos compósitos foram avaliados como matriz para a purificação de tripsina de extrato bruto de Tilapia (*Oreochromis niloticus*). Uma caracterização físico-química do compósito magnético (mAzo) foi também realizada para descrever as principais características do material sintetizado. Os resultados da purificação mostraram que as partículas mAzo e mPANI-Azo permitiram purificar o extrato bruto de peixe, sem nenhum pré tratamento, 61 vezes e 43 vezes, respectivamente. A eletroforese (SDS-PAGE) da aliquota purificada revelou uma banda a 24 kDa, valor compatível com tripsina obtida de vísceras de tilapia. As análises das técnicas de caracterização (MEV-EDX, DRX, FTIR e medidas de magnetização) evidenciaram o sucesso da síntese do compósito magnético (mAzo). Além disso, foi observado que as partículas mAzo são heterogêneas e apresentam rápida resposta magnética. Por fim, ao purificar a tripsina com precipitação, dialise e mAzo obteve-se um aumento da purificação de até 220 vezes. Concluímos que o compósito magnético mAzo mostrou ser uma matriz eficiente para a purificação de e o reuso do manteve a qualidade da purificação. Nesta pesquisa desenvolvemos uma técnica de purificação simples, eficaz e econômica que pode ser utilizada para a purificação de proteases utilizando as partículas mAzo como matriz.

Palavras Chaves: Purificação de enzimas. Proteases. Compósitos de ferro-azocaseína. Víscera de peixe.

ABSTRACT

Proteases are among the most produced in the world. Among them trypsin is the most used in several areas of biotechnology. The purification of biomolecules by magnetic particles is based on the interaction of the binders, chemical components present on the surface of the particles, with the target molecule. In this work, two magnetic composites were prepared: the first from azocasein and iron oxide (mAzo) and the second from iron oxide particles coated with azacasein-treated polyaniline (mPANI-Azo). The new composites were evaluated as a matrix for the purification of trypsin from *Tilapia* (*Oreochromis niloticus*) crude extract. A physical-chemical characterization of the magnetic composite (mAzo) was also performed to describe the main characteristics of the synthesized material. The results of the purification showed that the mAzo and mPANI-Azo particles allowed to purify the fish crude extract, without any pretreatment, 61 times and 43 times, respectively. Electrophoresis (SDS-PAGE) of the purified aliquot revealed a band at 24 kDa, trypsin compatible value obtained from tilapia viscera. The analysis of the characterization techniques (SEM-EDX, XRD, FTIR and measurements of magnetization) evidenced the success of the synthesis of the magnetic composite (mAzo). In addition, it was observed that the mAzo particles are heterogeneous and have a fast magnetic response. Finally, after precipitation, dialysis and mAzo treatment, a purification increase up to 220 times was obtained. We conclude that the magnetic composite mAzo has proved to be an efficient matrix for the purification and reuse of the quality of the purification. In this research we have developed a simple, efficient and economical purification technique that can be used for the purification of proteases using the mAzo particles as matrix.

Keywords: Purification of enzymes, Proteases, Azocacasein iron composites, Fish viscera.

Lista de Figuras

CAPÍTULO I

Figura 1 Origem e aplicação das proteases.....	13
Figura 2. Ação catalítica da Tripsina	14
Figura 3. Molécula de tripsina	15
Figura 4 Ação da Tripsina e Quimotripsina	16
Figura 5. Solução de azocaseína	18
Figura 6 Estrutura de espinélio inverso da magnetita. (a) Ilustração da célula unitária cúbica; (b) organização ferrimagnética na magnetita.....	19
Figura 7 Esquema da estrutura da polianilina - PANI	20
Figura 8 Esquema de Precipitação por alta concentração de sais	24
Figura 9 Esquema de separação magnética de proteínas por afinidade.....	26

CAPÍTULO II

Figure 1 SDS-PAGE trypsin from tilapia purified after mAzO exposure, compared to standard proteins.....	42
---	----

CAPÍTULO III

Figure 1 SDS-PAGE of purified trypsin after steps of purification with mAzO particles.	48
Figure 2 Magnetic particles with azocasein (A) without magnetic field (B) Particle after applied a magnetic field.	48
Figure 3 Scanning electron microscopy images of magnetite (a)Magnetite (b)Magnetite with azocasein, (c) EDX analysis.	49
Figure 4 EDX map of mAzO: (A) select region zoom 5.000X; (B) select region zoom 15.000X; (C) Fe distribution; (D) O distribution; (E) C distribution, (F) Fe, O and C integrated.	49
Figure 5 XRD of magnetic particles.....	50
Figure 6 FITIR mAzO and azocasein.	50
Figure 7 Magnetization curves of magnetite (Mag) and magnetite with azocasein (mAzO) at 300K..	51

Lista de Tabelas

Capítulo I

Tabela 1 Gradientes de purificação mais utilizados no isolamento de tripsina de subproduto pesqueiro.....23

Tabela 2 Exemplos de purificação de proteínas com compósitos magneticos e método de eluição utilizado27

Capítulo II

Table 1 Purification of trypsin from tilapia with Magnetite, mAzo and mPANI-Azo32

Table 2 Trypsin purification from fish viscera results32

Table 3 Reuse of mAzo particles33

Capítulo III

Table 1 Purification of Trypsin from tilápia intestine with purification gradient (Ammonium precipitation, dialyses and mAzco composite) and reuse52

LISTA DE ABREVIações

mAzo	Compósito de óxido de ferro e Azocaseína
mPANI-Azo	Compósito magnético revestido com PANI e ligado covalentemente a Azocaseína
Tris HCl	Tris HCl 0,1M pH 8,0
BAPNA	<i>N</i> -benzoyl-D-L-arginine- <i>p</i> -nitroanilide
BSA	Bovine Serum Albumine
PANI	Polianilina

Sumário

1 INTRODUÇÃO	9
2 REVISÃO LITERATURA	12
2.1 Enzimas	12
2.1.1 Enzimas proteolíticas	12
2.1.2 Tripsina	13
2.2 Subproduto pesqueiro	16
2.3 Azocaseína.....	17
2.4 Compósitos magnéticos	18
2.5 Sistema de Purificação de Biomoléculas.....	21
2.5.1 Purificação de biomoléculas por gradiente de purificação.....	21
2.5.2 Purificação utilizando partículas magnéticas.....	24
2.6 Aplicações de partículas magnéticas na biotecnologia e biomedicina.....	27
3 OBJETIVOS	29
3.1 Objetivo Geral:	29
3.2 Objetivos Específicos:	29
4 Trypsin purification using magnetic particles of azocasein-iron composite.....	30
5 Preparation and characterization of mAzo composite particles as carriers for protease purification.....	35
6 CONCLUSÕES GERAIS	53
REFERÊNCIAS	54
7 PERSPECTIVAS	63

1 INTRODUÇÃO

A purificação de enzimas para utilização industrial já possui técnicas bastante eficientes e fundamentadas. Porém tais técnicas podem ser muito dispendiosas e demoradas. Diversos tipos de cromatografias associadas a centrifugação, diálise e diversas outras técnicas, vem mostrando a necessidade de se encontrar novos mecanismos mais simples, eficientes e econômicos (SAFARIK & SAFARIKOVA, 2004).

Grande parte das enzimas usadas industrialmente são de origem fúngica, bacteriana ou de grandes mamíferos como porcos e bois. Um mercado em crescimento com grandes perspectivas é o aproveitamento de subprodutos pesqueiros que hoje são descartados ou apenas aproveitados no uso de ração animal. Estes subprodutos que englobam todas as vísceras e partes não consumidas pelo homem produzem enzimas de grande interesse industrial, as vísceras intestinais de peixe por exemplo são ricas em enzimas proteolíticas com características singulares (BALTI et al., 2009).

As enzimas proteolíticas estão entre as mais produzidas no mundo. Dentre elas a tripsina é a mais utilizada graças a sua variabilidade de aplicações nas diversas áreas da biotecnologia (BEZERRA et al., 2001; KLOMKLAO et al., 2005).

Esta enzima pode ser isolada das vísceras de diversos organismos, desde peixes até a porcos. Encontrada no sistema digestivo destes animais, sua principal função nestes sistemas é atuar na digestão e na assimilação da comida ingerida além de ativar todas as enzimas pancreáticas (RYPNIEWAKI et al., 1994; KHANGEMBAM & CHAKRABARTI, 2015).

Dentre os métodos de purificação de tripsina de peixe mais utilizados está a técnica de gradientes de purificação. Esta técnica utiliza várias etapas, iniciando com a precipitação do extrato utilizando grandes concentrações de sais ou acetona seguindo por diálise e finalizando com até duas etapas de cromatografia em coluna. Alguns estudos citam ainda o pré-aquecimento do extrato bruto (BEZERRA et al., 2005). O método de gradiente é eficaz, porém acaba sendo demorado e dispendioso. Como alternativa, o uso das partículas magnéticas apresenta como vantagem um processo de purificação mais eficiente e econômico. CAO et al. (2012) citam duas metodologias de

purificação empregando partículas magnéticas: direta e indireta. Neste trabalho foi utilizada o método direto de purificação, que consiste em adicionar os ligantes (componentes químicos que possuem alguma interação com a molécula alvo) diretamente na síntese da partícula magnética.

Dentre as partículas magnéticas mais utilizadas para purificação de biomoléculas, destacam-se a magnetita (Fe_3O_4) e a maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$). Estes óxidos de ferro são também utilizados para a preparação de compósitos magnéticos com diferentes aplicações biotecnológicas entre elas a purificação de biomoléculas (TUCEK et al., 2006, DRBOHLAVOVA et al., 2009). Ressalta-se que neste trabalho foram preparados compósitos magnéticos a partir de magnetita e azocaseína (ligante) para a purificação de tripsina a partir de extrato bruto de vísceras de peixe.

CAPÍTULO I

2 REVISÃO LITERATURA

2.1 Enzimas

É esperado que a comercialização de enzimas industriais atinja o patamar de US \$7,1 bilhões em 2018 (CUMMNG, 2014, COELHO et al., 2016). O mercado de enzima abrange subáreas como detergentes, indústria têxtil e de couro e de cuidado pessoal que conta com 65% de todo montante arrecadado, aproximadamente 1,5 bilhões de dólares (CHERRY & FIDANTSEF, 2003).

Deste mercado, as proteases destacam-se como a maior e mais importante das enzimas industriais produzidas (WARD, 2011).

2.1.1 Enzimas Proteolíticas

As enzimas proteolíticas constituem um dos grupos mais importantes de enzimas produzidas para fins comerciais. A IUB – União Internacional de Bioquímica classifica as enzimas proteolíticas de acordo com a massa molecular, suas propriedades elétricas e com sua especificidade ao substrato (GIONGO et al., 2006).

As proteases estão entre as enzimas mais estudadas devido as diversas aplicações na indústria como pode ser observado na figura 1. (KLOMKLAO et. al., 2005; KHANGEMBAM & CHAKRABARTI, 2015). Por esse motivo, essas enzimas vêm atraindo cada vez mais o interesse para formulação de novas técnicas de purificação e imobilização para estas biomoléculas (KTARI et al., 2012).

Além disso, as proteases executam uma grande variedade de funções fisiológicas complexas. Atuam na condução do metabolismo essencial e as funções regulatórias a partir da sua ocorrência em todos os organismos existentes. As proteases extracelulares catalisam a hidrólise de proteínas em moléculas menores para consequente absorção pela célula, enquanto as proteases intracelulares possuem um papel vital na regulação do metabolismo (RAO et al., 1998; GIONGO, 2006).

Figura 1 Origem e aplicação das proteases

Fonte de obtenção	Enzima	Aplicação industrial
Animal	Tripsina, Quimotripsina, etc	Indústria farmacêutica, de couro, processamento de alimentos, especialmente hidrólise de proteínas e síntese de peptídeos.
Vegetal	Papaína, Ficina, Bromelaína	Produção de extratos de leveduras, cerveja resistente ao congelamento, panificação, fármacos, amaciamento de carne.
Microrganismos (<i>Aspergillus niger</i>)	Proteases ácidas e neutras	Queijo, carnes, pescado, cereais, bebidas.
Microrganismos (<i>Aspergillus oryzae</i>)		Hidrólise protéica, processamento de carne e pescado, indústria cervejeira e de panificação.
Microrganismos (<i>Aspergillus melleus</i> , <i>Endothia parasítica</i> , <i>Mucor miehei</i> e <i>Mucor pusillus</i>)	Proteases alcalinas	Manufatura de queijo (coagulação do leite).
Microrganismos (<i>Bacillus licheniformis</i> e <i>Bacillus subtilis</i>)		Fabricação de detergentes e indústria de couro, processamento de carnes, pescados e derivados lácteos.
Microrganismos (<i>Bacillus subtilis</i> e <i>Bacillus cereus</i>)	Protease neutra	Produção de bebidas e panificação.

FONTE: WISEMAN, 1991; GIONGO, 2006.

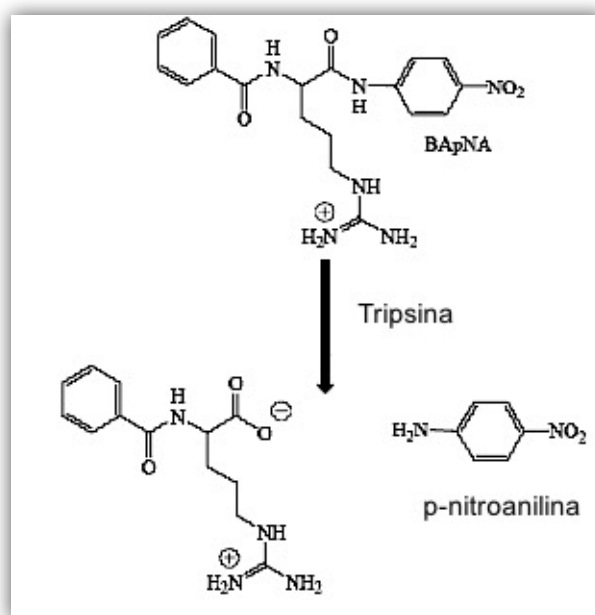
Este grupo, representa cerca de 50% do total de vendas de enzimas no mundo (GUPTA, 2002; SOUZA et. al., 2007; BOUGATEF, 2013). Entre as proteases, a tripsina vem gerando grande interesse industrial e em diversas áreas biotecnológicas devido a sua grande participação na digestão de alimentos e na ativação de diversas enzimas pancreáticas (DITTRICH, 1992; RYPNIEWSKI et. al., 1994; KHANGEMBAM & CHAKRABARTI, 2015).

2.1.2 Tripsina

Tripsina (EC 3.4.21.4) é uma serino protease amplamente encontrada no sistema digestivo de diversos organismos, responsável pela hidrólise de ligações peptídicas no lado carboxílico da lisina e arginina (Figura 2). A partir do momento que uma molécula de tripsina se torna ativa, ela própria pode começar a ativar (clivar proteoliticamente) todos os outros zimogênios, não só da tripsina, mas também da quimiotripsina, carboxipeptidases e aminopeptidases. Portanto, a tripsina tem um papel central na ativação das proteases digestivas, pelo que é indispensável garantir que nenhuma molécula, em condições normais, adquira atividade catalítica no interior das células. A primeira linha de proteção é a síntese da enzima sob a forma de tripsinogênio.

Adicionalmente, as células do pâncreas que produzem a tripsina têm também uma segunda linha de proteção, que envolve a produção de uma proteína inibitória, designada por inibidor pancreático da tripsina. Portanto, mesmo que espontaneamente uma molécula de tripsinogénio adquira atividade no interior das células, a presença deste inibidor vai impedir que o mesmo exerça a sua função e, conseqüentemente, comece a clivar as proteínas celulares e a ativar os outros zimogénios (BAYRAMOGLU et. al., 2014; BKHAIRIA et al., 2016).

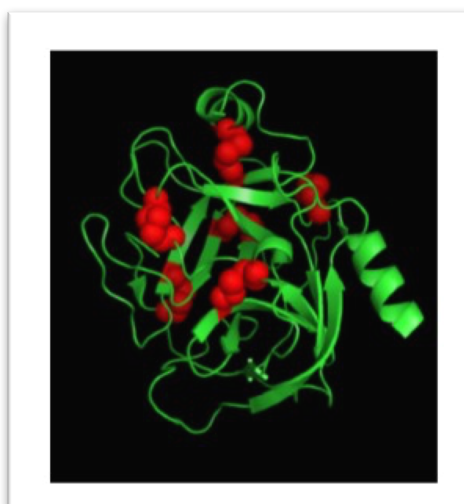
Figura 2. Ação catalítica da Tripsina



Fonte: <http://www2.bioqmed.ufrj.br/enzimas/proteases2.htm>.

Como todas as serino proteases, as tripsinas (Figura 3) possuem uma tríade catalítica, que caracteriza todas as proteínas deste grupo, que consiste em His, Asp, Ser. Sua especificidade para a ligação peptídica formada pelo lado carboxílico Arg e a capacidade de ativar outros zimogénios pancreáticos distinguem esta enzima de outras serino proteases (DE ALBUQUERQUE et al., 2001; KTARI et al., 2012).

Figura 3. Molécula de tripsina. Em vermelho, ligações dissulfetos



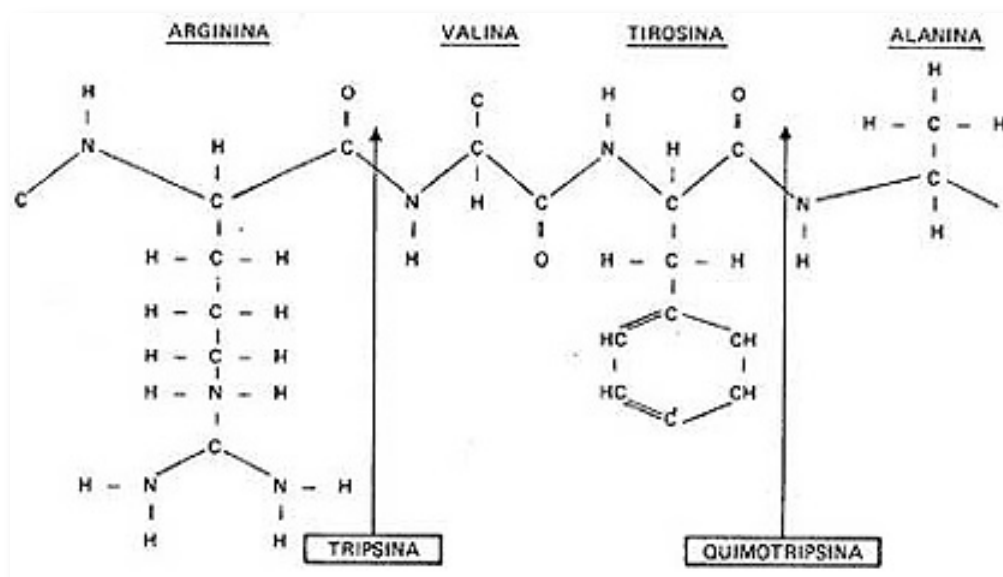
Fonte: <http://prince.openwetware.org/FASP.html>

Utilizada em inúmeros processos biotecnológicos, a tripsina possui um papel primordial na análise de estrutura primária, a quebra da caseína no leite, em cultura de células e tecidos, na identificação de proteínas por meio de técnicas de sequenciamento em vários ramos da indústria alimentícia, na produção de proteínas hidrolisantes entre outros (CHAMRAD ET. AL., 2001; SCHUCHERT-SHI e HAUSER, 2009; ZAMANI & BANJAKUL, 2016).

A recuperação de enzimas proteolíticas originárias de vísceras de peixe vem se tornando uma forma alternativa para aplicação nos mais diferentes setores da indústria, como alimentos, fármacos e em diversas áreas da biotecnologia e biomedicina que utilizam essas enzimas para técnicas laboratoriais (GUPTA et al., 2002; BALTI et al., 2009).

As proteases digestivas estão envolvidas na hidrólise de proteínas da dieta. As enzimas digestivas com maior importância econômica atualmente, originárias de vísceras de peixes são as proteases como as pepsinas e serino proteases: tripsina e quimotripsina (Figura 4) (BALTI et al., 2009).

Figura 4 Ação da Tripsina e Quimotripsina



Fonte: http://web.uchile.cl/vignette/monografiasveterinaria/monografiasveterinaria.uchile.cl/CDA/mon_vet_completa/0,1421,SCID%253D7174%2526ISID%253D358,00.html

2.2 Subproduto pesqueiro

Em países de alta atividade pesqueira, os subprodutos advindos de animais marinhos (vísceras, escamas, etc.), compreendem no mínimo 50% de toda a produção (BALTI et al., 2009). Estes materiais, que representam um problema ambiental para a indústria pesqueira, constituem uma fonte importante de proteínas e enzimas, especialmente proteases digestivas, com aplicações abrangentes como a indústria de detergentes, alimentos, farmacêutica, couro e seda (GUPTA, BEG & LORENZ, 2002).

Nos últimos anos, a recuperação e caracterização de enzimas proteolíticas, provenientes de órgãos internos de peixes e invertebrados aquáticos vem gerando uma nova alternativa para o uso desses efluentes como já observado na tabela 3. As enzimas digestivas mais importantes de peixes e vísceras de invertebrados aquáticos são a protease aspártica pepsina, e serina proteases, tripsina, quimotripsina, Colagenase e elastase. As proteases ácidas dos estômagos dos peixes exibem uma elevada actividade entre pH 2,0 e 4,0, enquanto que as proteínas alcalinas digestivas, tais como a tripsina, são mais ativas entre pH 8,0 e 10,0 (KOSSIAKOF et al., 1977).

A tripsina e as enzimas proteolíticas semelhantes à tripsina de origem marinha são isoladas e caracterizadas a partir das vísceras de alguns invertebrados marinhos e de uma vasta gama de peixes de água fria e água morna, incluindo a glândula digestiva (hepatopâncreas) do camarão branco (*Penaeus setiferus*) (GATES & TRAVIS, 1969) e o lagostão (*Astacus fluviatilis*) (TITANI et al., 1983), o baço do atum de limo (*Katsuwonus pelamis*) (KLOMKLAO et al., 2007) e o atum albacora (*Thunnus albacores*) (KLONKLAO et al., 2006), a caça pilórica do salmão Chinook (*Oncorhynchus tshawytscha*) (KURTOVIC, MARSHALL, & SIMPSON, 2006), tambaqui (*Colossoma macropomum*) (BEZERRA et al., 2001), Tilápia (*Oreochromis niloticus*) (BEZERRA et al., 2005) e sardinha de Monterey (*Sardinops sagax caerulea*) (CASTILLO-YANEZ et al., 2005) e as vísceras inteiras de sardinha verdadeira (*S. melanostictus*) (KISHIMURA et al., 2006), e sardinha (*Sardina pilchardus*) (BOUGATEF et al., 2007). As tripsinas de vertebrados marinhos, especialmente as de peixes já são bem caracterizadas

Tradicionalmente, os subprodutos de processamento de peixe são convertidos em pó para alimentação animal, fertilizantes e silagem de peixes (GILDBERG & ALMAS, 1986). No entanto, a maioria destes produtos têm baixo valor econômico. São necessários novos métodos de transformação para converter os subprodutos de processamento de víscera de peixes em produtos mais rentáveis e comercializáveis.

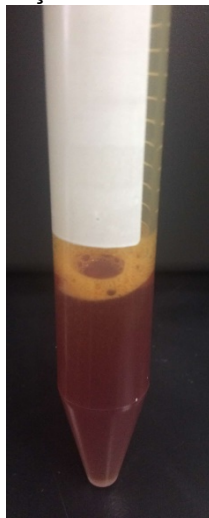
2.3 Azocaseína

Caseínas são proteínas presentes entre 20 a 45% das proteínas totais no leite de vaca, são insolúveis formando precipitados no leite. Sua estrutura aberta e flexível facilita a digestão e hidrólise para liberar uma quantidade considerável de peptídeos com diferentes sequências de aminoácidos. Muitas pesquisas foram realizadas mostrando bioatividade desses peptídeos derivados de caseína (SILVA & MACALTA, 2005).

A azocaseína é um conjugado entre a caseína e um azo corante que apresenta uma cor laranja em solução (Figura 5). Corantes desta classificação são caracterizados por sua ligação covalente azo ($N=N$). Este conjugado é muito utilizado como substrato enzimático de enzimas proteolíticas. Quando digerida, libera o grupo cromofórico produzindo uma solução com coloração

vermelha alaranjada, permitindo assim quantificar a presença de proteases no sobrenadante.

Figura 5. Solução de azocaseína



2.4 Compósitos magnéticos

Os compósitos magnéticos são materiais formados a partir de um componente magnético e outro(s) componentes. A preparação destes materiais traz como vantagem uma melhora nas propriedades do material quando comparado com as propriedades dos componentes individuais.

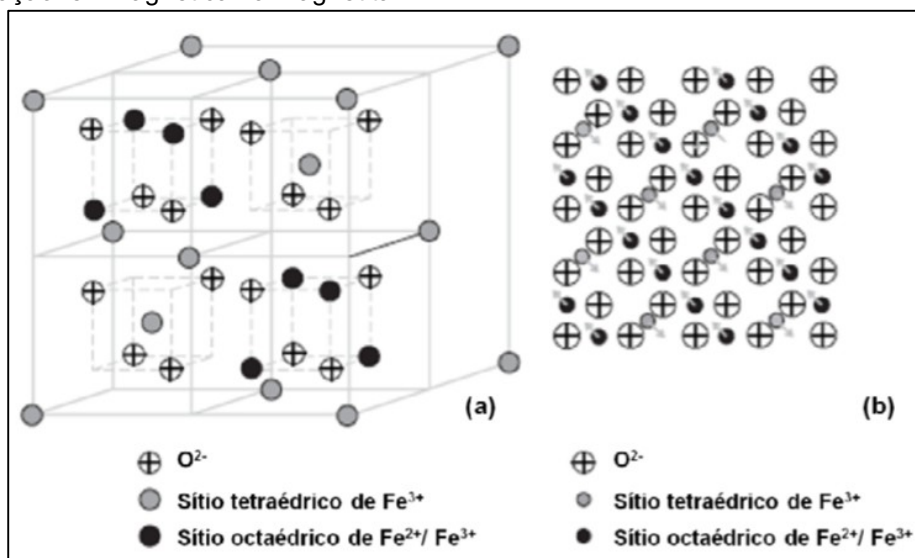
A síntese e a aplicação de óxidos de ferro vem sendo pesquisada para novas funções a nível biotecnológico (biomédico) e industrial (têxtil, alimentos). Características como inércia química, elevada área de superfície, supermagnetismo, e baixa toxicidade e alta biocompatibilidade (quando revestidos com um polímero, por exemplo) tornam os óxidos de ferro partículas promissoras para as diferentes aplicações (MCHENRY & LAUGHLIN, 2000; AFKHAMI et al., 2010; PAN et al., 2010; BOYER et al., 2010; DIAS et al., 2011; MUNOZ et al., 2015).

Existem varias formas cristalinas conhecidas das partículas magnéticas utilizadas na biotecnologia. Dentre as mais importantes pelo seu uso estão a magnetita (Fe_3O_4), maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) e hematita ($\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$), que podem ser usadas para composição do núcleo magnético. A magnetita e a maghemita vem se tornando uma alternativa para diversas aplicações

biotecnológicas, tais como a imobilização e purificação de biomoléculas para dinamizar processos (ZBORIL et al., 2002; TUCEK, 2006; DRBOHLAVOVA et al., 2009; MUNOZ et al., 2015).

Por sua biocompatibilidade, a magnetita e outras formas de compósitos de óxido de ferro, tem sido ressaltada para aplicações biomédicas (HUBER, 2005). A magnetita é um óxido de ferro, de cor preta encontrado em rochas que apresenta propriedade magnética (ferrimagnético). Possui tanto o íon Fe^{2+} quanto o Fe^{3+} em uma estrutura de espinélio inversa (Figura 6a, 6b). Já a maghemita é um mineral magnético castanho avermelhado (ferrimagnético), com estrutura e propriedades globais semelhante à magnetita, o que torna muito difícil distinguir entre elas (CORNELL e SCHWERTMANN, 2003).

Figura 6 Estrutura de espinélio inverso da magnetita. (a) Ilustração da célula unitária cúbica; (b) organização ferrimagnética na magnetita.



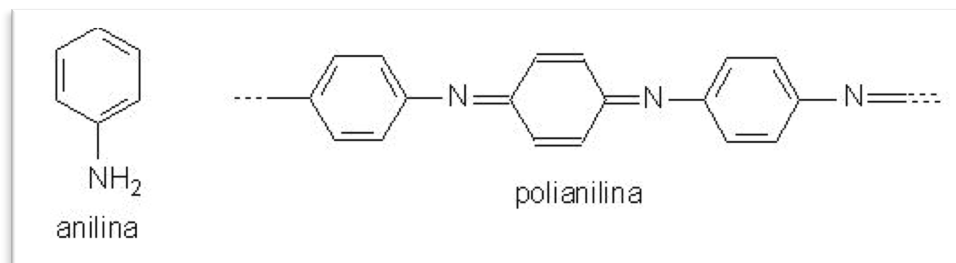
Fonte: CORNELL & SCHWERTMANN, 2003

As partículas magnéticas com estrutura core/shell consistem num núcleo magnético (core) e um revestimento (shell) que pode ser um polímero. O revestimento polimérico garante a estabilidade das partículas magnéticas, e permite a modificação química para ligar componentes biologicamente ativos.

Entre os polímeros mais utilizados no revestimento de partículas magnéticas está a polianilina - PANI (Figura 7). Os polímeros que apresentam propriedade elétrica são chamados de “polímeros condutores” ou “metais sintéticos”, pois possuem propriedades elétricas, magnéticas e ópticas de

metais e semicondutores. Entre os principais polímeros condutores, estão o poliacetileno, polianilina e polipirrol (MACIEL, 2012).

Figura 7 Esquema da estrutura da polianilina - PANI



Fonte: Maciel et al., 2012.

A polianilina (PANI) é um dos polímeros condutores mais estudados devido às suas propriedades eletrônica e óptica, excelente estabilidade ambiental (JARAMILLO-TABARES et al., 2012), fácil polimerização por síntese química (NERI et al., 2011), eletroquímica (TAKASHIMA et al., 1995), fotoquímica (ARAÚJO et al., 2010) e mais recentemente através de condições extremas ou não clássicas (AZEVEDO et al., 2008; BARROS e AZEVEDO, 2008) e baixo custo do monômero (UMARE et al., 2010). A PANI pode ocorrer em diferentes estados de oxidação, dos quais a forma sal de esmeraldina, 50% oxidada, é a mais estável (FAEZ et al., 2000).

A escolha da matriz (propriedades químicas e magnéticas, tamanho da partícula e distribuição, porosidade) é um fator chave que influencia na qualidade da imobilização do ligante e na conquista das aplicações finais (BÍLKOVÁ et al., 2002). Matrizes (suportes) convencionais podem ser magnetizadas pelo tratamento com materiais magnéticos sem qualquer perda de atividade da ligação subsequente (AMARAL et al., 2006; ANGELI et al., 2009; NERI et al., 2011; MACIEL, 2012). Maciel, (2012) que imobilizou a tripsina em suportes revestidos com polianilina (PANI) ou levana, obtendo satisfatórios resultados da enzima imobilizada. Já Neri et al., (2009 e 2011) imobilizou a enzima β -galactosidase em diversos suportes como POS e sílica. Com a enzima imobilizada com sucesso o autor conseguiu produção de prebióticos (Galacto Oligossacarídeos) de maneira mais rápida e eficiente.

2.5 Sistema de purificação de biomoléculas

O uso da purificação é extremamente necessário na biotecnologia para desenvolvimento de diversos produtos de importância econômica e social. Um bom exemplo é a indústria alimentícia na produção de probióticos, no processamento e armazenamento de alimentos e até no amaciamento de carnes. O desenvolvimento de novas técnicas de purificação que possuam a capacidade de separar uma molécula específica em uma solução contendo diversas moléculas ou purificar uma molécula alvo contida em quantidades mínimas numa solução, seria uma mais valia para os diversos ramos da indústria biotecnológica (SAFARIK & SAFAROKOVA, 2004).

As técnicas mais utilizadas na purificação de proteínas utilizam um gradiente de purificação, que consiste no uso de vários procedimentos em diversas etapas para obter uma biomolécula mais pura de acordo com a aplicação. Quanto mais pura a proteína, por exemplo, mais cara ela é, porém ela pode ser utilizada em processos biotecnológicos mais delicados. Assim, para a purificação das biomoléculas o gradiente de purificação consiste no uso de diferentes tipos de cromatografia, eletroforese, ultrafiltração, precipitação, diálise e outros procedimentos. Esses processos, possuem algumas limitações, tais como instrumentação dispendiosa e delicada, pré-tratamentos demorados além de dificuldade de encontrar mão de obra qualificada para realizar estas etapas. No final do processo obtém-se uma molécula nem sempre tão pura e de alto custo (CAO et al., 2012).

Partículas magnéticas têm sido desenvolvidas em processos de separação incluindo purificação e imunoensaios (HUBER, 2005). Adsorventes de afinidade têm sido usados para a separação de proteínas por exemplo (enzimas, anticorpos, antígenos, receptores, etc.). O uso de colunas cromatográficas convencionais pode consumir muito tempo e é neste campo que o uso de adsorventes magnéticos ou magnetizáveis ganha importância (MACIEL, 2012).

2.5.1 Purificação de biomoléculas por gradientes de purificação

Na purificação de proteínas o gradiente de purificação são as técnicas mais abrangentemente estudadas. A purificação de tripsina utilizando esta técnica consiste em precipitar o extrato bruto com elevada concentração de

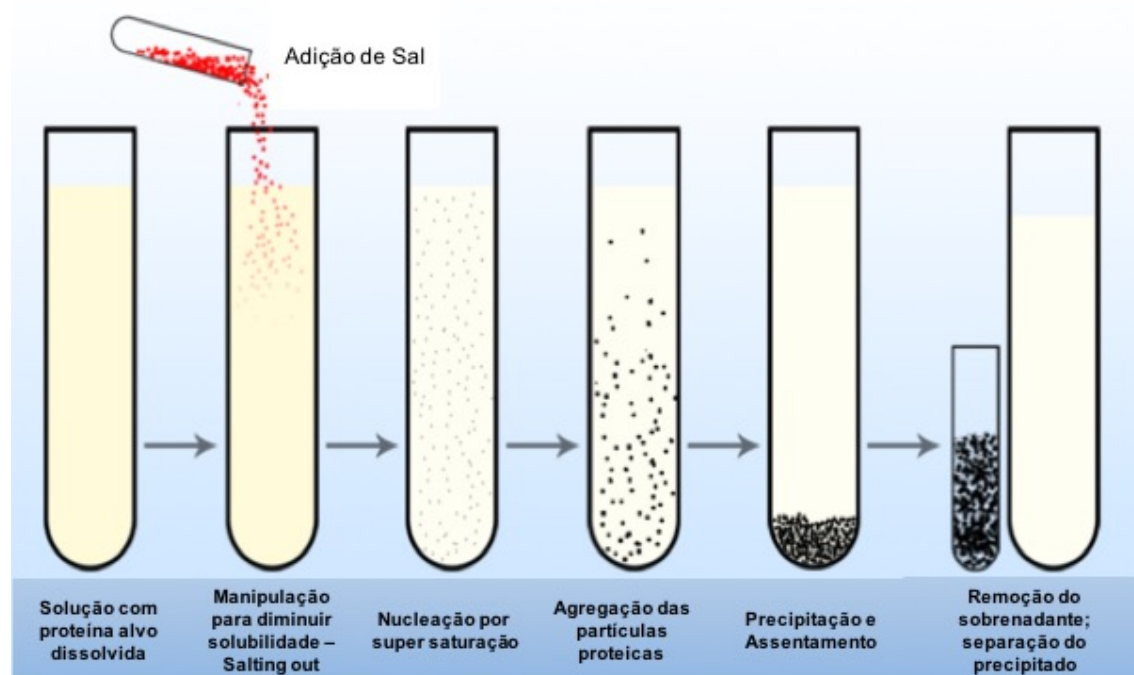
sulfato de amônio, dialisar e aplicar dois tipos de cromatografias de coluna. Existem estudos utilizando também um pré-aquecimento deste extrato para retirar parte da gordura antes da precipitação. A seguir, a tabela 1 apresenta os diferentes tipos de gradientes de purificação empregados para obtenção de tripsina pura.

Tabela 1 Gradientes de purificação mais utilizados no isolamento de tripsina de subproduto pesqueiro.

Enzima	Métodos de Purificação Utilizados	Origem da Molécula	Referência
Tripsina	Aquecimento + Sultato de Amônio + Sephadex G75	<i>Colossoma macropomum</i>	BEZERRA et al., 2001
Tripsina	Aquecimento + Sultato de Amônio + Sephadex G75	<i>Oreochromis niloticus</i>	BEZERRA et al., 2005
Tripsina	Sulfato de Amônio + DEAE sephacel + Sephacryl S-200	<i>Sardinops sagax caerulea</i>	CASTILLO-YAÑEZ et al., 2005
Tripsina	Sephacryl S-200 + Sephadex G-50 + DEAE cellulose	<i>Thunnus albacores</i>	KLOMKLAO et al., 2006
Tripsina	Sulfato de Amônio + SBTI-Sepharose 4B	<i>Prichanthus macracanthus</i>	VAN HAU & BENJAKUL, 2006
Tripsina	Sulfato de Amônio + Aquecimento + Sephadex G-100	<i>Sardina pilchardus</i>	BOUGATEF et al., 2007
Tripsina	Sulfato de Amônio + Acetona + SBTI-Sepharose 4B	<i>Pomatomus saltatrix</i>	KLOMKLAO et al., 2007
Tripsina	Sephacryl S-200 + Sephadex G-50	<i>Sebastes schlegelii</i>	KISHIMURA et al., 2007
Tripsina	Sephacryl S-200 + Sephadex G-50	<i>Alcichthys alcicornis</i>	KISHIMURA et. al., 2007
Tripsina	Aquecimento + Sultato de Amônio + Sephadex G75	<i>Pseudupneus maculatus</i>	SOUZA et al., 2007
Tripsina	Sulfato de Amônio + DEAE sephacel + Sephacryl S-200 + Q-Sepharose	<i>Siniperca chuatsi</i>	BAO-JU LU et al., 2008
Tripsina	Sephacryl S-200 + Sephadex G-50	<i>Theragra chalcogramma</i>	KISHIMURA et. al., 2008
Tripsina	Sephacryl S-200 + Sephadex G-50	<i>Gadus macrocephalus</i>	TOMOYOSHI FUCHISE et al., 2009
Tripsina	Sephacryl S-200 + Sephadex G-50	<i>Eleginus gracilis</i>	TOMOYOSHI FUCHISE et al., 2009
Tripsina	Sephacryl S-200 + Sephadex G-50 + DEAE cellulose	<i>Katsuwonus pelamis</i>	KLOMKLAO et al., 2009
Tripsina	Acetona + Sephadex G-100 + Mono Q	<i>Balistes capriscus</i>	JELLOULI et al., 2009
Tripsina	Sulfato de Amônio + Sephadex G-100 + DEAE cellulose + Sephadex G-75 + Q-Sepharose	<i>Sepia officinalis</i>	BALTI et al., 2009
Tripsina	Sulfato de Amônio + Sephadex G-100 + Mono Q Sepharose + Ultrafiltração	<i>Salaria basilisca</i>	KTARI et al., 2012
Tripsina	Sulfato de Amônio + Sephadex G-100 + Mono Q	<i>Barbus callensis</i>	SILA et al., 2012
Tripsina	Sulfato de Amônio + SBTI-Sepharose 4B	<i>Aluterus monóceros</i>	ZAMANI & BENJAKUL, 2015

Dentre todas as etapas do gradiente de purificação, a técnica de precipitação é utilizada em todos os estudos. Esta técnica consiste em adicionar sais neutros a uma solução ocorrendo um aumento da força iônica do sistema. Assim, quando adicionamos pequenas quantidades de sal a uma solução contendo proteínas, as cargas provenientes da dissociação do sal passam a interagir com as moléculas protéicas, diminuindo a interação entre elas. Consequentemente, temos um aumento da solubilidade da proteína no meio aquoso (BEZERRA et al., 2001). A esse fenômeno dá-se o nome de "*salting-in*". Esse efeito, porém, não se estende indefinidamente. Em condições de elevada força iônica, decorrente da adição de grandes quantidades de sal, temos o efeito contrário. A precipitação com o sulfato de amônio não desnatura as proteínas (Figura 8).

Figura 8 Esquema de Precipitação por alta concentração de sais



FONTE: http://en.citizendium.org/wiki/File:Precipitation_outline.png

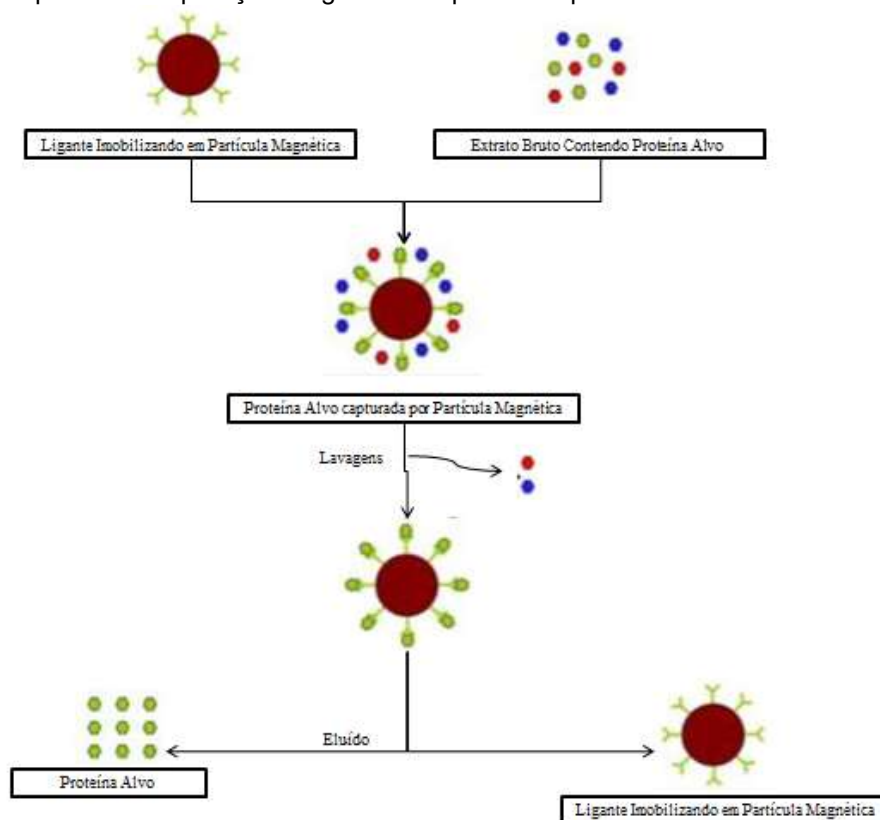
2.5.2 Purificação utilizando partículas magnéticas

Separação de proteínas por partículas magnéticas geralmente são menos danosas com a proteína alvo. Proteínas complexas que tendem a quebrar quando separadas por técnicas cromatográficas se mantêm intactas quando usada a purificação magnética (SAFARIK & SAFARIKOVA, 2004). Utilizar esta técnica elimina a necessidade de utilizar sistemas de

cromatografia, centrifugação, filtros ou outros equipamentos. O processo de separação pode ser realizado diretamente em amostras brutas que contêm sólidos em suspensão, tornando o processo eficiente e muito mais rápido (CAO et al., 2012). Partículas magnéticas para purificação de proteínas são geralmente preparadas com ligantes que possuem alguma afinidade com a biomolécula a ser purificada (CAO et al., 2012).

O princípio básico para a purificação utilizando partículas magnéticas é simples (Figura 9). A preparação do compósito magnético pode ser pela imobilização covalente de uma substância que possua afinidade com a molécula alvo, ou pela preparação de um compósito onde um dos componentes é o ligante que possua também afinidade com o isolado. Uma vez preparado o compósito magnético, este é misturado com uma alíquota da amostra contendo a proteína a ser purificada. As amostras podem ser extratos brutos de diferentes origens como células, sangue total, plasma, fluído ascítico, leite, soro de leite, tecidos animais, urina, meios de cultivo, resíduos de alimentos etc. Após um período de incubação quando o composto alvo se liga à partícula magnética, o complexo magnético é facilmente removido aplicando um campo magnético externo (ímã). Depois de eliminada as impurezas com diversas lavagens, o alvo composto é eluído, isolado, caracterizado e quantificado (SAFARIK & SAFARIKOVA, 2004; CAO et al., 2012).

Figura 9 Esquema de separação magnética de proteínas por afinidade



Fonte: CAO et al., 2012

As técnicas mais comuns para eluição da molécula alvo é utilizar mudanças no pH ou força iônica utilizando tampões contendo algum tipo de sal (Tabela 2). A mudança de pH altera a carga elétrica da superfície da proteína e do suporte o que pode diminuir a interação entre a proteína e o ligante presente na partícula magnética. O uso de faixas de pH extremas (<4 e >10) pode ter um significativo impacto na bioatividade das proteínas purificadas (Peng et al., 2004; Quian et al., 2009; Cao, 2012).

Tabela 2 Exemplos de purificação de proteínas com compósitos magnéticos e método de eluição utilizado

Proteína	Suporte Magnético	Ligante	Capacidade de Ligação	Método de Eluição	Referências
Lysoenzima	$\text{Fe}^2\text{O}^4@\text{PEG}@\text{CM-CTS}$	-COOH	256,4 mg/g	PBS contendo NaCl	SUN et al., 2011
	$\text{Fe}^2\text{O}^4@\text{SiO}^2@\text{GPS}@\text{Tris}$	Tris	108,6 mg/g	Não informado	ZHANG et al., 2011
	$\text{Fe}^2\text{O}^4@\text{PAA}$	-COOH	224 mg/g	Tampão fosfato contendo NaSCN	LIAO & CHEN, 2002
SOD	$\text{Fe}^2\text{O}^4@\text{IDA}-\text{Cu}^{2+}$	IDA- Cu^{2+}	Não informado	Tampão fosfato de potássio na presença de NH_4Cl	Meyer et al., 2005
Lipase	$\text{Fe}^2\text{O}^4@\text{PAA}$	-COOH	605,5 mg/g	Tampão Fosfato (pH 9)	HUANG et al., 2006
Proteínas HIS – TAG	$\text{Fe}^2\text{O}^4@\text{PMDA}-\text{Ni}^{2+}$	PMDA- Ni^{2+}	Não informado	Tampão Sódio fosfato e Inidazol	SAHU et al., 2011
SOD = Superóxido dismutase, PAA = Ácido poliacrílico, PEG = Polietileno glicol, CM-CTS = Carboximetil quitosana, IDA = Ácido Iminodiacético N-Fosfonometil, GPS = 3-glycidoxypyrimethoxysilane.					

(Fonte: CAO et al., 2012 Adaptado)

A concentração de sal para eluição pode melhorar a força iônica o que reduziria a reação eletroestática entre a proteína e o ligante imobilizado em partícula magnética. Estudos mostram que a utilização de sais para a separação da partícula magnética e a biomolécula purificada é o método mais eficiente (SAFARIK & SAFARIKOVA, 2004; CAO et al., 2012). É preciso, porém, utilizar o sal na concentração correta para a conclusão com sucesso do processo de eluição entre a partícula e a proteína alvo (CAO et al., 2012).

2.6 Aplicações de partículas magnéticas na biotecnologia e biomedicina

As partículas magnéticas podem ser utilizadas como adsorventes de bioafinidade, no tratamento de efluentes, como suportes para imobilização de enzimas e outras diversas proteínas, em diagnósticos médicos, pesquisa genética e nas diversas tecnologias para separação de células, proteínas, ácidos nucleicos, bactérias, vírus e outras biomoléculas (HALLING & DUNNILL, 1980; MOFFAT et al., 1994; ANSELL e MOSBACH, 1998; MACIEL, J. C., 2012, XU et al., 2012, MUNOZ et al., 2015).

Em biomedicina, utilizam-se partículas magnéticas com a estrutura core/shell. O revestimento polimérico torna as partículas mais estáveis em meio

fisiológico e menos tóxicas (MACIEL, J. C., 2012). Entre as principais aplicações biomédicas das partículas magnéticas encontra-se a hipertermia magnética. Esta técnica consiste na destruição de tumores sem danificar os tecidos normais através do aquecimento seletivo das células tumorais sendo, portanto, uma terapia promissora contra o câncer (HAYASHI et al., 2009). Para uso clínico desta técnica é necessário que as partículas magnéticas apresentem baixos níveis de toxicidade, assim como um elevado momento de saturação magnética que permita minimizar as doses eletromagnéticas requeridas quando a radioterapia é utilizada (CASTRO et al., 2010). Outros exemplos de sucesso do uso de partículas magnéticas estão no carregamento de fármacos e na imagem por ressonância magnética. A liberação controlada de drogas torna este sistema capaz de promover o controle terapêutico. O sistema de liberação de drogas, seja de natureza temporal ou espacial, oferece inúmeras vantagens quando comparados aos sistemas convencionais. Entre elas podemos citar a maior eficácia terapêutica, a possibilidade da libertação progressiva e controlada do medicamento, além da possibilidade de atuação do medicamento em alvos específicos, permitindo a diminuição de efeitos colaterais e da toxicidade no paciente. (DURÁN e AZEVEDO, 2003, MACIEL, 2012). A imagem por ressonância magnética é baseada em sinal de ressonância magnética nuclear de prótons através do efeito combinado de um forte campo magnético e um campo de radiofrequência (PANKHURST et al., 2003). As partículas magnéticas melhoram o contraste das imagens obtidas por ressonância magnética (WEISSLEDER et al., 1991; WEISSLEDER et al., 1992; KRESSE et al., 1998; BACHGANSMO, 1993).

3 Objetivos

3.1 Objetivo Geral

Purificar tripsina obtida de vísceras de peixe utilizando compósitos magnéticos contendo azocaseína e caracterizar o material sintetizado.

3.2 Objetivos Específicos

- Sintetizar compósitos magnéticos a partir de óxido de ferro e azocaseína (mAzo e mPANI-Azo);
- Purificar Tripsina a partir de extrato bruto de intestino de Tilápia utilizando os compósitos magnéticos: mAzo e mPANI-Azo;
- Purificar Tripsina de tilápia através de gradiente de purificação: precipitação com sulfato de amônio, diálise e compósito magnético - mAzo;
- Caracterizar físico e quimicamente a partícula magnética mAzo.

CAPÍTULO II

Aceito no periódico FOOD CHEMISTRY.

Fator de Impacto: 4.052



ISSN: 0308-8146

Trypsin purification using magnetic particles of azocasein-iron composite

Autores: Maria Helena Menezes Estevam Alves, Gabriela Ayres Fragoso Nascimento, Mariana Paola Cabrera, Sara Isabel C. Silvério, Clarisse Nobre, José António Couto Teixeira, Luiz Bezerra de Carvalho Júnior.



Contents lists available at ScienceDirect

Food Chemistry

journal homepage: www.elsevier.com/locate/foodchem

Short communication

Trypsin purification using magnetic particles of azocasein-iron composite



Maria Helena Menezes Estevam Alves^a, Gabriela Ayres Nascimento^a, Mariana Paola Cabrera^a, Sara Isabel da Cruz Silvério^b, Clarisse Nobre^b, José Antônio Teixeira^b, Luiz Bezerra de Carvalho Júnior^{a,*}

^a Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA) and Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil

^b Centre of Biological Engineering, University of Minho, Braga, Portugal

ARTICLE INFO

Article history:

Received 18 August 2016

Received in revised form 6 December 2016

Accepted 27 December 2016

Available online 28 December 2016

Keywords:

Enzyme purification

Proteases

Fish viscera

Azocasein iron oxides

ABSTRACT

This work presents an inexpensive, simple and fast procedure to purify trypsin based on affinity binding with ferromagnetic particles of azocasein composite (mAzo). Crude extract was obtained from intestines of fish Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) homogenized in buffer (01 g tissue/ml). This extract was exposed to 100 mg of mAzo and washed to remove unbound proteins by magnetic field. Trypsin was leached off under high ionic strength (3 M NaCl). Preparation was achieved containing specific activity about 60 times higher than that of the crude extract. SDS-PAGE showed that the purified protein had molecular weight (24 kDa) in concordance with the literature for the Nile tilapia trypsin. The mAzo composite can be reused and applied to purify trypsin from other sources.

© 2016 Published by Elsevier Ltd.

1. Introduction

The use of magnetic particles in biotechnology has been widely used as a result of their applications in various fields in biomedicine, diagnostic and as the food industry. This technique is an alternative for the immobilization and purification of biomolecules, making the process more economical, fast, stable and creating a high quality product (Cao et al., 2012; Coelho et al., 2016; Maciel et al., 2012).

Fish viscera contain a variety of applicable enzymes, especially proteases that are about 50% of total enzymes sold worldwide (Khngembam & Chakrabarti, 2015; Klomklao, Benjakul, Visessanguan, Kishimura, & Simpson, 2007). Among them trypsin stands out for its importance in biotechnology (Khngembam & Chakrabarti, 2015).

Here it is presented a simple, fast and low cost process to purify trypsin based on magnetic particles of azocasein-iron composite. Trypsin purification from fish viscera was used as a purification example. Precisely, trypsin from tilapia (*Oreochromis niloticus*) viscera was purified. Azocasein is a nonspecific substrate of the proteases that consists of casein conjugated to an azo dye. This substrate is used for proteases assays because it is capable to be degraded under enzyme catalysis releasing soluble dye (peptide

derivative) into the supernatant that can be quantitatively analyzed.

2. Material and methods

2.1. Reagents

Trypsin (E.C.3.4.21.4) from porcine pancreas, bovine serum albumin (BSA), *N*-benzoyl-D-L-arginine-*p*-nitroanilide (BAPNA), aniline (ACS agent), glutaraldehyde (25%) and azocasein were purchased from Sigma-Aldrich (USA). Dimethylsulfoxide (DMSO) was acquired from Vetec chemical (Brazil). Ferric chloride hexahydrate and ferrous chloride tetrahydrate were obtained from Merck (Germany). All other reagents were of analytical grade.

2.2. Preparation of magnetic composites

The procedure to obtain the magnetic particles of azocasein-iron composite (mAzo) was adapted from the protocol based on Carneiro Leão, Oliveira, and Carvalho (1991). Briefly, an aqueous mixture containing 10 mL of FeCl₃·6H₂O (1.1 M) and 10 mL of FeCl₂·4H₂O (0.6 M) was added to 100 mg of azocasein solution (prepared in 5 mL of Tris-HCl 0.1 M, pH 8.0). Ammonium hydroxide 28.0–30.0% was then added to achieve a pH of 11. The mixture was then heated up to 50 °C and kept for 30 min under vigorous stirring. The magnetic particles synthesized were thoroughly

* Corresponding author.

E-mail address: lbcj.br@gmail.com (L.B. de Carvalho Júnior).

washed with distilled water to pH 7.0. The material was dried at 50 °C and kept at 25 °C for later use. Alternatively, magnetic particles were coated with polyaniline (mPANI), activated with glutaraldehyde and afterwards azocasein was covalent linked (mPANI-Azo) according to Neri et al. (2009).

2.3. Fish crude extract

Specimens of Tilapia (*Oreochromis niloticus*) were captured from the fishpond facilities at the Departamento de Pesca, Universidade Federal Rural de Pernambuco (Brazil). The fish intestines were collected and homogenized (1 mg of tissue mL⁻¹, w/v, in 5 mL of 0.01 M Tris-HCl buffer, pH 8.0) by using a tissue homogenizer (COLE-PARMER Model 04369-15). The resulting preparation was centrifuged at 10,000g for 25 min at 4 °C to remove fat. The supernatant (crude extract) was frozen at -20 °C and used for further purification steps.

2.4. Trypsin purification

Fish crude extract (2 mL) was incubated with either mAzo or mPANI-Azo (both 0.1 g) for 2 h at 4 °C under mild stirring. After this time, the particles were washed with 0.1 M Tris-HCl buffer, pH 8.0 seven times and 3 M NaCl three times. The first supernatant and washings were collected for protein (Bradford, 1976) and enzymatic activity (Amaral, Carneiro-da-Cunha, Carvalho Jr, & Bezerra, 2006) determinations.

2.5. Reuse of mAzo

The purification procedure above described was carried out four times using the same mAzo preparation. Supernatants and washings were also collected for protein and enzymatic activity determinations.

2.6. Electrophoresis (SDS-PAGE)

Polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) was carried out according to the method of Laemmli (1970), using a 6% (w/v) stacking gel and a 12.5% (w/v) separating gel. The gels were stained for protein in 0.01% (w/v) Coomassie Brilliant Blue (overnight). The background of the gel was destained by washing with hot distilled water.

3. Results and discussion

Firstly, mAzo (10 mg) was incubated with a commercial trypsin from porcine pancreas (1 mL containing 2 mg) and the purification procedure was carried out. A preparation containing 1.85 mg of protein and 1.24 U (0.067 U/mg), which was 4.53-fold purified compared to the commercial trypsin. These results demonstrated that mAzo was capable to bind the enzyme (affinity) and to release it under 3 M NaCl.

Table 1 shows the fish crude extract purification using mAzo (100 mg). A preparation of trypsin was obtained containing

Table 1
Purification of trypsin from tilapia with magnetite, mAzo and mPANI-Azo.

Sample	Total protein (mg)	Total activity (U)	Specific activity (U mg ⁻¹ protein)	Yield (%)	Purification fold
Crude extract	11.81	2.20	0.2	100.0	1
Magnetite	0.10	0.04	0.4	1.8	2
mAzo	0.03	0.37	12.3	16.8	61.5
mPANI-Azo	0.04	0.35	8.7	15.9	43.5

All operations were carried out at 4 °C.

Table 2
Trypsin purification from fish viscera results.

Purification Method	Purification Fold	Source	Reference
Heating + (NH ₄) ₂ SO ₄ + Sephadex G75	51.1	<i>Colossoma macropomum</i>	Bezerra et al. (2001)
Heating + (NH ₄) ₂ SO ₄ + Sephadex G75	21.6	<i>Oreochromis niloticus</i>	Bezerra et al. (2005)
(NH ₄) ₂ SO ₄ + DEAE Sephacel + Sephacryl S-200	13	<i>Sardinops sagax caerulea</i>	Castillo-Yáñez, Pacheco-Aguilar, García-Carreño, and Navarrete-Del Toro (2005)
(NH ₄) ₂ SO ₄ + SBTI-Sepharose 4B	34	<i>Priacanthus macracanthus</i>	Van Hau and Benjakul (2006)
(NH ₄) ₂ SO ₄ + Heated + Sephadex G-100	9.2	<i>Sardina pilchardus</i>	Bougatef, Souissi, Fakhfakh, Ellouz-Triki, and Nasri (2007)
(NH ₄) ₂ SO ₄ + Acetone + SBTI-Sepharose 4B	40.6	<i>Pomatomus saltatrix</i>	Klomklao et al. (2007)
Sephacryl S-200 + Sephadex G-50	59	<i>Sebastes schlegelii</i>	Kishimura et al. (2007)
Sephacryl S-200 + Sephadex G-50	32	<i>Alcichthys alcicornis</i>	Kishimura et al. (2007)
Sephacryl S-200 + Sephadex G-50	33	<i>Gadus macrocephalus</i>	Tomoyoshi Fuchise et al. (2009)
Sephacryl S-200 + Sephadex G-50	28	<i>Eleginus gracilis</i>	Tomoyoshi Fuchise et al. (2009)
Acetone + Sephadex G-100 + Mono Q	13.9	<i>Balistes capricus</i>	Jellouli et al. (2009)
(NH ₄) ₂ SO ₄ + Sephadex G-100 + DEAE cellulose + Sephadex G-75 + Q-Sepharose	26.7	<i>Sepia officinalis</i>	Balti, Barkia, Bougatef, Ktari, and Nasri (2009)
Acetone + (NH ₄) ₂ SO ₄ + Sephacryl S-200 + DEAE-Sephacel	11.2	<i>Oreochromis niloticus</i> X <i>O. aureus</i>	Wang et al. (2010)
(NH ₄) ₂ SO ₄ + Sephadex G-100 + Mono Q Sepharose + Ultrafiltration	4.2	<i>Salarias basilisca</i>	Ktari et al. (2012)
(NH ₄) ₂ SO ₄ + Sephadex G-100 + Mono Q	27.1	<i>Barbus callensis</i>	Sila et al. (2012)
(NH ₄) ₂ SO ₄ + SBTI-Sepharose 4B	26.4	<i>Aluterus monóceros</i>	Zamani and Benjakul (2016)
(NH ₄) ₂ SO ₄ + Dialysis + DEAE cellulose + Benzamidine column	35.6	<i>Cirrinus mrigala</i>	Khangembam and Chakrabarti (2015)
mAzo	61.5	<i>Oreochromis niloticus</i>	This work
mPANI-Azo	43.5	<i>Oreochromis niloticus</i>	This work

Table 3
Reuse of mAzo particles.

Use	Total protein (mg)	Total activity (U)	Specific activity (U mg ⁻¹ protein)	Yield (%)	Purification fold
Crude extract	11.81	2.20	0.2	100	1
1st	0.02	0.23	11.5	10.45	57
2nd	0.02	0.22	11	10	55
3rd	0.02	0.23	11.5	10.45	57
4th	0.02	0.20	10	9.10	50

All operations were carried out at 4 °C.

0.03 mg of protein with 0.37 U (12.3 U/mg), which was 61.5-fold purified compared to the crude extract. It is also shows that the magnetic particles without azocasein (Magnetite) yield a preparation 2 times purified, namely, negligible purification was achieved. The mPANI-Azo demonstrated that trypsin was also purified from fish crude extract resulting a preparation containing specific activity similar to that attained using mAzo. However, the synthesis of mPANI-Azo involves more steps than mAzo.

The theoretical basis of the present procedure is the presence of azocasein on the surface of the magnetite that would allow the affinity bind trypsin molecules presents in the crude extract. The attraction of the particles (mAzo-trypsin complex) by magnetic field would remove it from the mixture. Finally the high ionic strength (3 M NaCl), would disrupt the complex releasing the soluble trypsin and insoluble mAzo that is attracted by the magnetic field. This collected mAzo could be reused. The decrease of azocasein degree freedom attached to magnetic particles would allow the complex formation with trypsin but not the substrate hydrolysis. It is important to register that no colored product (azopeptides) was detected from the mAzo-Trypsin complex even after 24 h of incubation. The covalent azocasein magnetite derivative (mPANI-Azo) would act in the same way, but its synthesis involves four steps.

Table 2 shows methods for trypsin purification from fish viscera reported in the literature. The present method showed better performance than those reported for tilapia (Bezerra et al., 2005; Wang et al., 2010) with the advantage of involving one step only. Furthermore, the purification fold showed to be higher than those reported for other fish species.

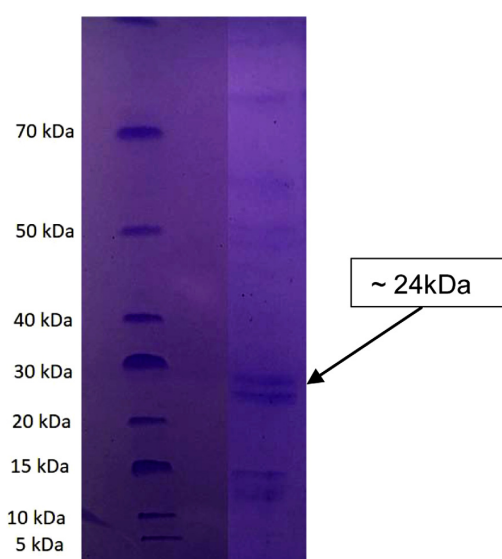


Fig. 1. SDS-PAGE trypsin from tilapia purified after mAzo exposure, compared to standard proteins.

Table 3 shows the reuse of the same mAzo preparation to purify trypsin from fish crude extract four times. A small decrease of efficiency was observed either expressed in terms of yield or purification fold, respectively, from 10.45% to 9.1% and from 57-fold to 50-fold. It is worthwhile to register that mAzo showed to stable at 25 °C for one year.

SDS-PAGE of the purified enzyme by the mAzo procedure showed two bands of protein (Fig. 1) with molecular weight about 24 kDa, value reported for tilapia trypsin (Bezerra et al., 2005). The molecular weight of trypsin from other fish viscera has been reported inside the range of 20.0–30.0 kDa (Khangembam & Chakrabarti, 2015).

4. Conclusion

This contribution presents an inexpensive, simple and fast one step procedure to purify trypsin from fish viscera based on affinity binding onto ferromagnetic azocasein composite. Azocasein covalently linked to ferromagnetic particles coated with polyaniline also showed to be capable to bind trypsin. However, this last composite has the disadvantage of involving four steps during the synthesis. The reuse of the ferromagnetic azocasein composite is another advantage of this proposal that showed promising application compared to the methods reported in the literature. This procedure can be applied for trypsin purification from other sources.

Acknowledgements

Authors are thankful to CNPq (grant 307273/2013-0) and CAPES (Scholarship to MHMEA) Brazil agencies as well as FCT (Scholarship to SICS and CN) Portugal Agencie.

There is no conflict of interest.

References

- Amaral, I. P. G., Carneiro-da-Cunha, M. G., Carvalho, L. B., Jr, & Bezerra, R. S. (2006). Fish trypsin immobilized on ferromagnetic Dacron. *Process Biochemistry*, 41(5), 1213–1216.
- Balti, R., Barkia, A., Bougatef, A., Ktari, N., & Nasri, M. (2009). A heat-stable trypsin from the hepatopancreas of the cuttlefish (*Sepia officinalis*): Purification and characterisation. *Food Chemistry*, 113(1), 146–154.
- Bezerra, R. S., Lins, E. J. F., Alencar, R. B., Paiva, P. M. G., Chaves, M. E. C., Coelho, L. C. B. B., & Carvalho, L. B. Jr, (2005). Alkaline proteinase from intestine of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Process Biochemistry*, 40(5), 1829–1834.
- Bezerra, R. S., Santos, J. F., Paiva, P. M. G., Correia, M. T. S., Coelho, L. C. B. B., Vieira, V. L. A., & Carvalho, L. B. (2001). Partial purification and characterization of a thermostable trypsin from pyloric caeca of tambaqui (*Colossoma macropomum*). *Journal of Food Biochemistry*, 25(3), 199–210.
- Bougatef, A., Souissi, N., Fakhfakh, N., Ellouz-Triki, Y., & Nasri, M. (2007). Purification and characterization of trypsin from the viscera of sardine (*Sardina pilchardus*). *Food Chemistry*, 102(1), 343–350.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1), 248–254.
- Cao, M., Li, Z., Wang, J., Ge, W., Yue, T., Li, R., et al. & Yu, W. W. (2012). Food related applications of magnetic iron oxide nanoparticles: Enzyme immobilization, protein purification, and food analysis. *Trends in Food Science & Technology*, 27(1), 47–56.
- Carneiro Leão, A. M. A., Oliveira, E. A., & Carvalho, L. B. (1991). Immobilization of protein on ferromagnetic Dacron. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 31(1), 53–58.

- Castillo-Yáñez, F. J., Pacheco-Aguilar, R., García-Carreño, F. L., & Navarrete-Del Toro, M. d. I. Á. (2005). Isolation and characterization of trypsin from pyloric caeca of Monterey sardine *Sardinops sagax caerulea*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 140(1), 91–98.
- Coelho, J. A., Ribeiro, A. M., Ferreira, A. F. P., Lucena, S. M. P., Rodrigues, A. E., & Azevedo, D. C. S. d. (2016). Stability of an Al-fumarate MOF and its potential for CO₂ capture from wet stream. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 55(7), 2134–2143.
- Fuchise, T., Kishimura, H., Sekizaki, H., Nonami, Y., Kanno, G., Klomklao, S., ... Chun, B. (2009). Purification and characteristics of trypsins from cold-zone fish, Pacific cod (*Gadus macrocephalus*) and saffron cod (*Eleginus gracilis*). *Food Chemistry*, 115, 611–616.
- Jellouli, K., Bougatef, A., Daassi, D., Balti, R., Barkia, A., & Nasri, M. (2009). New alkaline trypsin from the intestine of Grey triggerfish (*Balistes caprisus*) with high activity at low temperature: Purification and characterisation. *Food Chemistry*, 116(3), 644–650.
- Khangembam, B. K., & Chakrabarti, R. (2015). Trypsin from the digestive system of carp *Cirrhinus mrigala*: Purification, characterization and its potential application. *Food Chemistry*, 175, 386–394.
- Kishimura, H., Tokuda, Y., Yabe, M., Klomklao, S., Benjakul, S., & Ando, S. (2007). Trypsins from the pyloric ceca of jacopecover (*Sebastes schlegelii*) and elkhorn sculpin (*Alcichthys alcicornis*): Isolation and characterization. *Food Chemistry*, 100(4), 1490–1495.
- Klomklao, S., Benjakul, S., Visessanguan, W., Kishimura, H., & Simpson, B. K. (2007). Trypsin from the pyloric caeca of bluefish (*Pomatomus saltatrix*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 148(4), 382–389.
- Ktari, N., Ben Khaled, H., Nasri, R., Jellouli, K., Ghorbel, S., & Nasri, M. (2012). Trypsin from zebra blenny (*Salaria basilisca*) viscera: Purification, characterisation and potential application as a detergent additive. *Food Chemistry*, 130(3), 467–474.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680–685.
- Maciel, J. C., Andrad, P. L., Neri, D. F. M., Carvalho, L. B., Jr., Cardoso, C. A., Calazans, G. M. T., et al. & Silva, M. P. C. (2012). Preparation and characterization of magnetic levan particles as matrix for trypsin immobilization. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 324(7), 1312–1316.
- Neri, D. F. M., Balcão, V. M., Dourado, F. O. Q., Oliveira, J. M. B., Carvalho, L. B., Jr. & Teixeira, J. A. (2009). Galactooligosaccharides production by β -galactosidase immobilized onto magnetic polysiloxane–polyaniline particles. *Reactive and Functional Polymers*, 69(4), 246–251.
- Sila, A., Nasri, R., Jridi, M., Balti, R., Nasri, M., & Bougatef, A. (2012). Characterisation of trypsin purified from the viscera of Tunisian barbel (*Barbus callensis*) and its application for recovery of carotenoproteins from shrimp wastes. *Food Chemistry*, 132(3), 1287–1295.
- Van Hau, P., & Benjakul, S. (2006). Purification and characterization of trypsin from pyloric caeca of bigeye snapper (*Priganthus macracanthus*). *Journal of Food Biochemistry*, 30(4), 478–495.
- Wang, Q., Gao, Z.-X., Zhang, N., Shi, Y., Xie, X.-L., & Chen, Q.-X. (2010). Purification and characterization of trypsin from the intestine of hybrid tilapia (*Oreochromis niloticus* $\times$ *O. aureus*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(1), 655–659.
- Zamani, A., & Benjakul, S. (2016). Trypsin from Unicorn leatherjacket (*Aluterus monoceros*) pyloric caeca: Purification and its use for preparation of fish protein hydrolysate with antioxidative activity. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 96(3), 962–969.

CAPÍTULO III

Artigo a ser submetido no periódico JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY.

Fator de Impacto: 2.667



Preparation and characterization of mAzO composite particles as carriers for protease purification

Autores: Maria Helena Menezes Estevam Alves, Mariana Paola Cabrera, Sara Isabel C. Silvério, Clarisse Nobre, Cristina M. R. Rocha, João Pedro Esteves Araujo, José António Couto Teixeira, Luiz Bezerra de Carvalho Júnior.

Preparation and characterization of mAzo composite particles as carriers for protease purification

Maria Helena Alves¹, Mariana Cabrera¹, Sara Silvério², Clarisse Nobre²,
Cristina M. R. Rocha³, João Pedro Esteves Araújo⁴, José A. Teixeira², Luiz
Bezerra de Carvalho Júnior^{1*}

¹Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA), Universidade Federal de Pernambuco, Cidade Universitária, 50030 Recife, Pernambuco, Brasil.

²Centre of Biological Engineering, Minho University, Campus de Gualtar, P-4710-057 Braga, Portugal.

³REQUIMTE, Chemistry Engineering Department, Faculty of engineering, Porto University, P - 4200-465, Porto, Portugal.

⁴Department of physics and astronomy, Faculty of science, Porto University, P-4169-007, Porto, Portugal.

*Corresponding author. Fone: +55 81 21268484 Fax: +55 81 21268485.
Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, Cidade Universitária, Recife 50030, Pernambuco, Brasil. E-mail address: lbcj.br@gmail.com (Luiz B. de Carvalho Júnior).

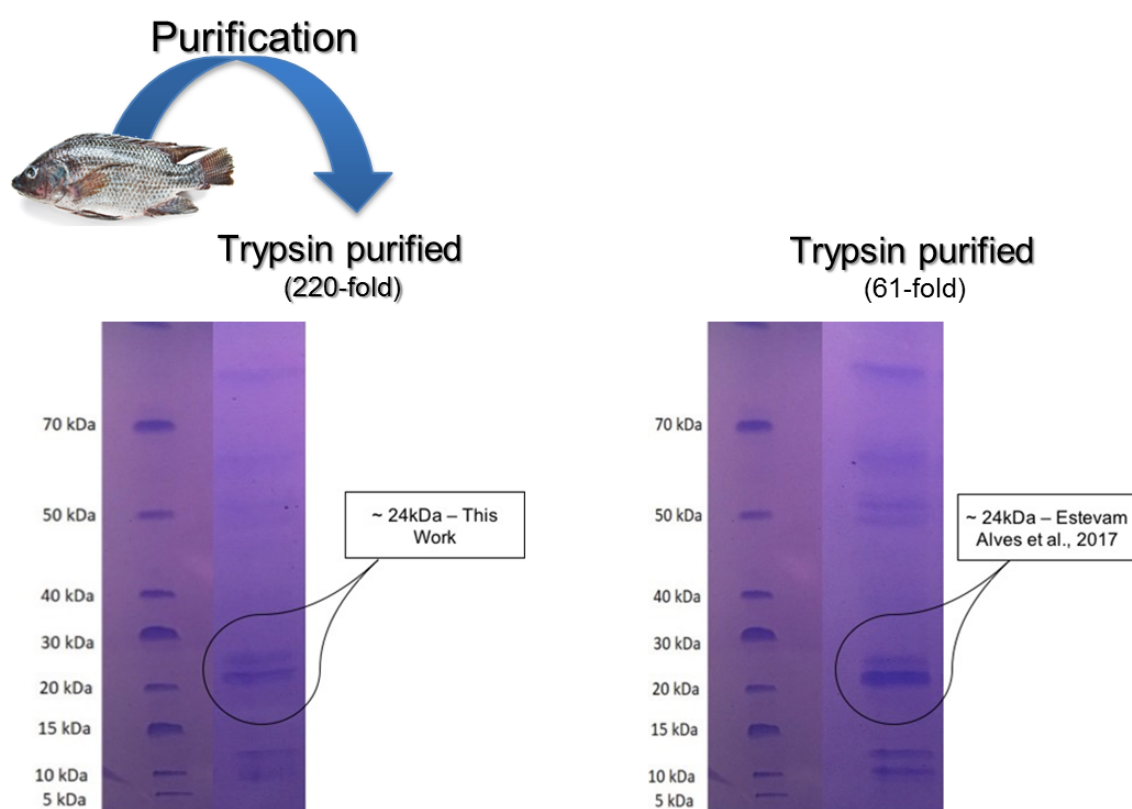
Abstract

Trypsin is one of the most widely used enzymes in various industrial sectors and their known purification techniques include different steps. This work proposes a simple and fast procedure to purify trypsin from fish viscera based on affinity binding onto magnetic particles of azocasein-iron composite (mAzo) and the characterization of this composite. Visceras of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) was partially purified with ammonium sulfate, dialyzed and then incubated with mAzo. The specific activity of the protein collected (41.82 unit/mg) was 220-fold higher than that found for the crude extract (0.19 unit/mg) a reuse of the composite was tested with a minimal lost of the purification efficiency. To understand how these particles act in the purification a series of

experiments were carried out for its characterization. The scanning electron microscopy and the EDX show microparticles of varied sizes. With the distribution of carbon, iron and oxygen throughout its surface. The X-ray diffraction corroborates that magnetite is the dominant element and the infrared shows that part of the binder was incorporated during its synthesis.

Keywords: magnetic composite; azocasein; proteases; enzyme purification.

Graphic Abstract



1. Introduction

As techniques used to protein purification usually involves a chromatography diversity, ultrafiltration, electrophoresis, precipitation and other procedures (SAFARIK & SAFARIKOVA, 2004). More economical, fast, stable

and creating a high-quality product the use of magnetic particles is not a new tool in biotechnology. But the use of these magnetic composites linked with elements that interact with the target enzyme to be purified, brings to this technique multiple possibilities using in the purification of these biomolecules (Pan et al., 2010).

The development of magnetic particles (MPs) is becoming increasingly important in the different branches of biomedicine and biotechnology. The precise control of the conditions of synthesis is essential in the production of functional magnetic composites. In addition to the applicability it is becoming indispensable to understand how it works with the structure of these new synthesized MPs (Munoz et al., 2015).

The market for enzymes yields millions of dollars every year. It is targeting this market that new techniques for purification of these molecules has been developed. Purify enzymes more simply, economically and with high quality is a constant challenge. The use of MPs in the purification of these, can bring a new alternative to the sector, besides helping in various laboratory processes saving time and money creating a high quality and stable product (Cao et al. 2012; Maciel et al, 2012; Khangembam & Chakrabarti, 2015).

This technique is an alternative for the immobilization and purification of biomolecules, making the process more economical, fast, stable and creating a high-quality product (Cao et al. 2012; Maciel et al, 2012). Here it is presented a simple, fast and low cost process to purify trypsin based on magnetic particles of azocasein- iron composite. Trypsin purification from fish viscera from fish viscera (tilapia, *Oreochromis niloticus*) was used as a purification example.

The synthesis of particles with a binder adsorbed during the process becomes a way for enzyme purification. The ligand-target enzyme interaction can allow purification of commercially important enzymes without requiring prior treatment or the crude extract using chromatographic techniques (Estevam Alves et al., 2017).

Azocasein is a nonspecific protease substrate that consists of casein conjugated to an azo dye. Degradation of the casein liberates free dye into the supernatant that can be quantitatively analyzed. (SILVA & MACALTA, 2005).

This study aims to characterize iron oxides azocasein composites and purify trypsin from fish viscera with the magnetic particle synthesized.

2. Material and Methods

Azocasein, from Sigma-Aldrich (USA), Ferric chloride hexahydrate and ferrous chloride tetrahydrate were from Merck (Germany). All other reagents were of analytical grade.

2.1 Magnetite synthesis with azocasein

This procedure was according to Estevam Alves et al., 2017. The material was dried at 50 °C and kept at 25°C.

2.2 Trypsin purification

The precipitation occurred in two steps: 0-20 % ammonium sulfate under stirring for 1 hour, thereafter the material was centrifuged and the supernatant was added an equivalent amount of the salt to 20-40 % for an additional 60 minutes. The material was centrifuged again and re-suspended in 0.1M Tris-HCl pH 8.0 buffer. For sample removal of all salt was subjected to dialysis for 18 h at room temperature.

The mAzo particles were incubated with fish crude extract for 2h at 4°C under mild stirring. After this time, the supernatant and washings (Tris-HCl buffer 0,1M, pH 8,0 and NaCl 3M) were collected for protein and enzymatic activity determination.

2.3 Fish Crude Extract

Specimens of Tilapia (*Oreochromis niloticus*) were captured from the fish pond facilities at the 'Departamento de Pesca, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Northeast, Brazil'. Intestines were collected and homogenized 1g of tissue/mL (w/v) in 5ml (w/v) of Tris-HCl buffer 0,01M pH 8.0 by using a tissue homogenizer (COLE-PARMER Model 04369-15). The resulting preparation was centrifuged at 10.000 g for 25 min at 4°C to remove fat. The

supernatant (crude extract) was frozen at -20°C and used for further purification steps.

2.4 Activity assay and protein determination

Amidase activity of trypsin was measured by using the artificial substrate BAPNA (4.0mM BAPNA in DMSO) at 440nm. The specific activity was calculated by dividing the enzymatic activity (U) by the amount of protein (mg). The amount of purified protein was estimated by the difference between the offered protein and that found in the supernatant and washing solutions measured according to the Bradford (1976) using bovine serum albumin (BSA) as a standard.

2.5 Yield determination and purification fold

The yield was determined by the rate between the enzymatic activity obtained after the purification method and the enzymatic activity of the hypothetical protein in the crude extract or in the previous purification step, depending on the steps quantity that were used.

2.6 Particles Reuse

After the first purification, the magnetic particles were constantly washed with Tris HCl 1M pH 8.0 buffer to remove other proteins material particle and maintained in the same buffer at 4°C for new purifications.

2.7 Eletrophoresis (SDS-PAGE)

Polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) was carried out according to the method of Laemmli (1970), using a 6% (w/v) stack- ing gel and a 12.5% (w/v) separating gel. The gels were stained for protein in 0.01% (w/v) Coomassie Brilliant Blue (overnight). The background of the gel was destained by washing with hot distilled water.

2.8 Magnetic Particle Characterization

2.8.1 Scanning electron microscopy

To understand the behavior and characterize the synthesized particles were performed using scanning electron microscopy analysis (scanning

electron microscopy), dispersion Energy X-ray (EDX) and dispersion energy map. For the analysis was used Electron Microscope SEM (FEG / SEM) FEI Nova 200 with EDAX EDS / EBSD, STEM.

2.8.2 *The X-ray diffraction*

The structural properties of the magnetic particles were characterized by X-ray powder diffraction, which was carried out in an X-ray diffractometer Siemens D5000. Representative powder samples were analyzed in the range $10^\circ < 2\theta < 90^\circ$ using CuK α radiation ($\lambda = 1.5406 \text{ \AA}$), in steps of 0.02° , and with a counting time of 1.0 s per step.

2.8.3 *FTIR analysis*

The Fourier transform infrared (FTIR) spectra were obtained on an IFS-66 FTIR spectrometer (Bruker, Billerica, MA, USA) in the range of 4000-600 cm^{-1} using KBr pellets. Typically, 100 scans were recorded with a 4 cm^{-1} resolution.

2.8.4 *Magnetic Properties*

The magnetic properties of the samples were studied using a commercial Quantum Design superconducting quantum interference device (SQUID) magnetometer. The isothermal magnetization (M) versus applied magnetic field (H), measurements were performed over the temperature range 5–370 K with H up to 30 kOe.

3 Results and Discussion

3.1 *Trypsin purification and reuse*

According to bruct extract purification (table 1) we can observe that mAzo particles showed higher specific activity after dialysis. In purification processes with several stages it is expected that each purification process, the specific activity of the enzyme is higher. WANG et al. 2010 showed 11.2-fold yield of trypsin compared to the crude extract of hybrid tilapia fish viscera using ammonium sulphate precipitation (30-70%) and columns of Sephacryl and Sephacel to purify trypsin. ZAMANI & BENJAKUL (2016) purified trypsin from *Aluterus monoceros* pyloric caeca using as precipitation ammonium sulphate

(40-60%) and Sepharose-4B-SBTI. At the end of the process the specific activity obtained was 6.08 U/mg, the purification fold of 26.43 times greater than the initial one. In the present study, the specific activity obtained at the end of the process used mAzo particles was 41.82 U/mg and the purification fold was 220.1 times superior to crude extract.

New purification procedures using the mAzo particle were carried out to assess the efficiency of reuse of the particles. Table 1 shows that the magnetic composite is stable and there is no break in the link between magnetite and ligand (azocasein) and reuse does not interfere with new purifications of the crude extract. During the purification process, no change was observed in the solution coloration indicating that there was no loss of azocasein and the decrease of the efficiency was minimum. Estevam Alves et al., (2017) presented the similar result when reutilizing the mAzo particles to purify trypsin directly on the bruct extract.

3.2 Eletrophoresis (SDS-PAGE)

SDS-PAGE (Figure 1) purified with mAzo particles after protein precipitation and dialysis shows a clear band. A similar result was reported from KHANGEMBAN & CHAKRABARTI (2015) and ZAMANI & BENJAKUL (2016), indicated that the purified protein was homogenous and pure to significant extent. The molecular mass of this band was about 24 kDa, which is the range of 20.0-30.0 kDa for purified trypsin from other fish species (SIMPSON, 2000; KHANGEMBAM et al., 2012).

3.3 Magnetic particles characterization

The co-precipitation process to obtain magnetic particles with azocasein was carried out in an alkaline aqueous medium and the final product was a dense, brown and magnetic powder. The magnetic composite (mAzo) exhibited a good magnetic response (30 sec) when an external magnetic field was applied (Figure 2). This interesting feature could make the mAzo an attractive material for magnetic bioseparation.

3.4 Scanning electron microscopy

SEM images (Figure 3a, b) shown in a heterogenous morphology without porosity in all the particles. Iron oxide and mAzo composite were observed as agglomerates. The average particle size for mAzo composite was near to 170 micrometers. Our research group was the first to publish the direct synthesis of iron oxide azocasein composite (Estevam Alves et al., 2017).

To understand how the azocasein was distributed on magnetic particle surface, the quantification of the main chemical elements present in mAzo composite was carried out by a map EDX (energy dispersive X-ray). According to EDX spectro (Figura 3c), the element with a higher difference between the components was the carbon. Their presence on mAzo particles suggests that the composite was successfully synthesized. The azocasein contains a complex structure of carbons. EDX elements maps (Figure 4) clearly showed the presence of iron (Fe), oxygen (O), carbon (C) and all elements integrated. Through the elements map can be concluded that the components are distributed homogeneously in the particle.

3.5 X-ray analysis

Figure 5 shows the XRD diffractograms for iron oxide and mAzo particles. In both diffractograms it is possible to observe five prominent peaks. The peaks for iron oxide particles were found at the angle 2θ equal to 30.1; 35.5; 43.3; 57.3 and 62.8 (Chakrapani et al., 2014; Atacan et al., 2017). For mAzo composite, the peaks obtained presented as angle 2θ of 30; 35.5; 43.4; 57.1 and 62.9. A slight angular displacement and a decrease of the intensity for mAzo particles was observed.

Chen and Hu (2003) obtained similar results with levan magnetic particles. Showed small peaks dislocations as compared to magnetite patterns, probably happened due to tensions in the crystalline structure of magnetite occurred during the synthesis of the material. These small natural offsets when Fe_3O_4 are synthesized with other elements. These differences in iron oxides particles synthesized with copper, gold and argon have also been observed by Kalska-Szostko et al. (2014), and the concentration of these components also influences the displacements and the intensity of their appearance in the

diffractogram. Similar results were also observed by Theivasanthi et al., (2010) and Zhang et al., (1996).

3.6 FTIR analysis

Azocasein is used almost specifically in the quantification of enzymatic activity of non-specific proteases. In order to better understand how this component was distributed on magnetic particle surface, we compare the main peaks presents in azocasein spectrum with the peaks in the mAzo composite (Figure 6). The 1641 cm^{-1} and 1528 cm^{-1} are the characteristic peaks of the casein representing respectively Amide I and Amide II (Chakrapani et al., 2014). The N-H bonds present in azocasein could be observed at 3285 cm^{-1} and 2962 cm^{-1} (Kalska-Szostko et al., 2014). Moreover, characteristics peaks for the sulphonamide group were also revealed by FTIR in azocasein at 1445 cm^{-1} , 1395 cm^{-1} , 972 cm^{-1} and 840 cm^{-1} (Cross & Jones, 1969). It is important to mention, that similar peaks were also observed for mAzo particles. Due to low quantity of azocasein (2% w/v) used in the magnetic composite preparation, the peaks appeared in lower intensity.

3.7 Magnetic Properties

The magnetization of iron oxide and mAzo particles (Fig 7) indicated a coercitivity field of 0.3 emu/g for iron oxide and 0.1 emu/g for mAzo. The Saturation magnetization (M_s) for iron oxide was 34 emu/g and for mAzo 20.1 emu/g. these results corroborate to Maciel et al., (2012) and Neri et al., (2009), the autors, Using Levan and magnetic composite of polysiloxane coated with polyaniline respectively also found the saturation magnetization lesser than magnetite and suggested that the presence of cations vacancy in maghemite could be responsible for this decrease. The remanescant magnetization (M_r) for iron oxide was 10.2 emu/g and to mAzo 6.8 emu/g. The reduction in the saturation magnetization values signifies the decrease in the particles size and can be attributed to surface effects such as may containing spins that not collinear with the magnetic field as observed by XU et al., (2007).

Conclusion

From the above displayed results one can conclude that magnetic

particles with azocasein presented larger size variation than iron oxide magnetite particles due to the changes produced when synthesized. The presence of azocasein in the magnetic particles is suggested by FTIR characteristic absorption bands and by a broad band in each spectrum obtained from XRD diffractograms. The utilization of mAzo was shown to be efficacious in trypsin purification and that can be reused several times without marked activity lost. Therefore, the mAzo particles can be proposed as alternative for proteases purification.

Acknowledgements

Authors are thankful to CNPq and CAPES (Brazil agencies) as well as FCT (Portugal agency).

References

- Bradford, MM. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dyebinding. *Anal. Biochem.*, 1975, 72: 234-254.
- Cao, M., Li, Z., Wang, J., Ge, W., Yue, T., Li, R., Colvin, V. L., Yu, W. W., Food Related applications of magnetic iron oxide nanoparticles: Enzyme immobilization, protein purification and food analysis, *Trends in Food Science & Technology*, 2012, 27, 47-56.
- Chakrapani, V., Behlol K. A. A., Kumar, Ganapathy, V., Anthony, S. P., Veerappan A., A facile route to synthesize casein capped copper nanoparticles: an effective antibacterial agent and selective colorimetric sensor for mercury and tryptophan, *RSC Adv.*, 2014, 4, 33215
- Chen, J. C., Hu, C. C., Quantitative analysis of YIG, YFeO₃ and Fe₃O₄ in LHPG- grown YIG rods, *Journal of Crystal Growth*. 249, 2003, 245–250.
- Cross, A. D., Jones, A. R., *An Introduction to Practical Infra-Red Spectroscopy*, London Bytterworths, 1969.
- Estevam Alves, M. H. M., Nascimento, G. A. F., Cabrera, M. P., Silverio, S. I. C., Nobre, C., Teixeira, J. A. C., Carvalho Jr., L. B., Trypsin purification using

magnetic particles of azocasein-iron composite, *Food Chemistry*, 2017, 223, 75-78.

Grigorova M, Blythe HJ, Blaskov V, Rusanov V, Petkov V, Masheva V, Nihtianova D, Martinez LM, Muñoz JS, Mikhov M. Magnetic properties and Mössbauer spectra of nanosized CoFe₂O₄ powders. *J Magn Magn Mater* 1998; 183: 163–172.

Guo S, Li D, Zhang L, Li J, Wang E. Monodisperse mesoporous superparamagnetic singlecrystal magnetite nanoparticles for drug delivery. *Biomaterials* 2009; 30: 1881–1889.

Khangembam, B. K., Chakrabarti, R., Trypsin from the digestive system of carp *Cirrhinus mrigala*: Purification, characterization and its potential application, *Food Chemistry*, 2015, 175, 386–394.

Kalska-Szostko, B., Wykowska, U., Satuła, D., Core-shell and multilayered magnetite nanoparticles—Structural and Mössbauer studies, *Applied Surface Science* 306 (2014) 7–15

Maciel, J. C., Andrade, P. L., Neri, D. F. M., Carvalho JR., L. B., Cardoso, C. A., Calazans, G. M. T., Albino Aguiar, J., Silva, M. P. C. (2012). Preparation and characterization of magnetic levan particles as matrix for trypsin immobilization, *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 324, 1312–1316.

Munoz, M., De Pedro, Z. M., Casas, J. A., Rodriguez, J. J., Preparation of magnetite-based catalysts and their application in heterogeneous Fenton oxidation – A review, *Applied Catalysis B: Environmental*, 2015, 176–177, 249–265.

Neri, D.F.M., Balcão, V.M., Dourado, F.O.Q., Oliveira, J.M.B., Carvalho JR., L.B., Teixeira, J.A. Immobilized β -galactosidase onto magnetic particles coated with polyaniline: support characterization and galactooligosaccharides production. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2011, 70, 74–80.

Pan B.J., Qiu, H., Pan B.C., Nie, G. Z., Xiao L.L., et al. Highly efficient removal of heavy metals by polymer-supported nanosized hydrated Fe(III) oxides: behavior and XPS study. *Water Res*, 2010, 44(3), 815–24

Safarik, I., Safarikova, M., Magnetic techniques for the isolation and purification of proteins and peptides, 2004, *BioMagnetic Research and Technology*, v: 2, p 1-17.

Silva, S. V., Macalta, F. X., Caseins as source of bioactive peptides, *International Dairy Journal*, 2005, 15, 1–15.

Theivasanthi, T., Alagar, M., X-ray diffraction studies of copper nanopowder, *Arch. Phys. Res.* 1 (2) (2010) 112–117.

Wang, Q., Gao, Z. H., Zhang, N., Shi, Y., Xie, X. L., Chen, Q. C., Purification and Characterization of Trypsin from the Intestine of Hybrid Tilapia (*Oreochromis niloticus* X *O. aureus*), *J. Agric. Food Chem.* 2010, 58, 655–659.

Xu, H., Tong, N., Cui, L., Lu, Y., Gu, H., Preparation of hydrophilic magnetic nanospheres with high saturation magnetization, *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*. 331, 2007, 125–150.

Zamani, A., Benjakul, S., Trypsin from unicorn leatherjacket (*Aluterus monoceros*) pyloric caeca: purification and its use for preparation of fish protein hydrolysate with antioxidative activity, *J Sci Food Agric*, 2016; 96: 962

Zhang, K. I. V., Alexandrov, R. Z., Valiev, K. L, Structural characterization of nanocrystalline copper by means of X-ray diffraction, *J. Appl. Phys.* 80 (10) (1996) 5617–5624.

Figure 1 SDS-PAGE of purified trypsin after steps of purification with mAzo particles

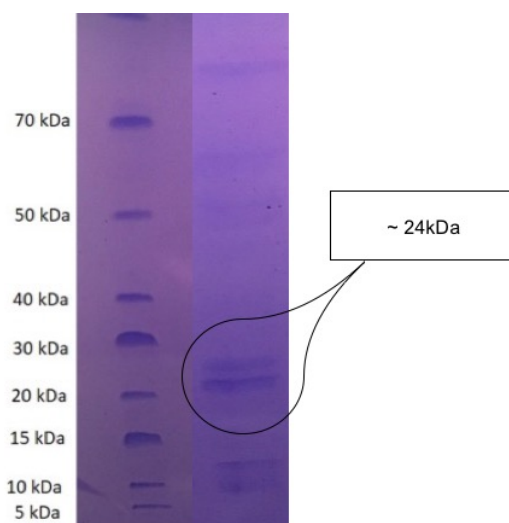


Figure 2 Magnetic particles with azocasein (A) without magnetic field (B) Particle after applied a magnetic field.

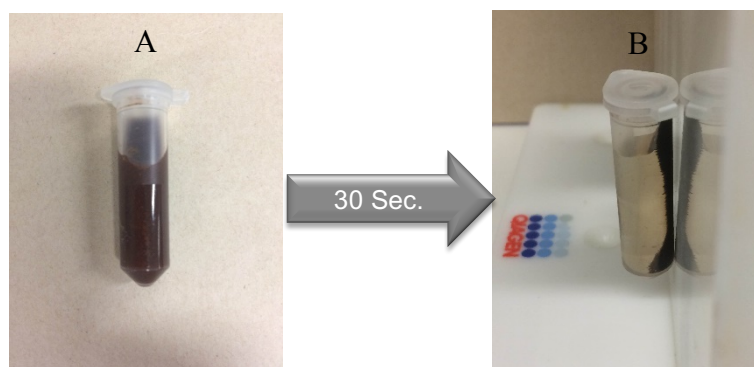


Figure 3 Scanning electron microscopy images of magnetite (a)Magnetite (b)Magnetite with azocasein, (c) EDX analysis.

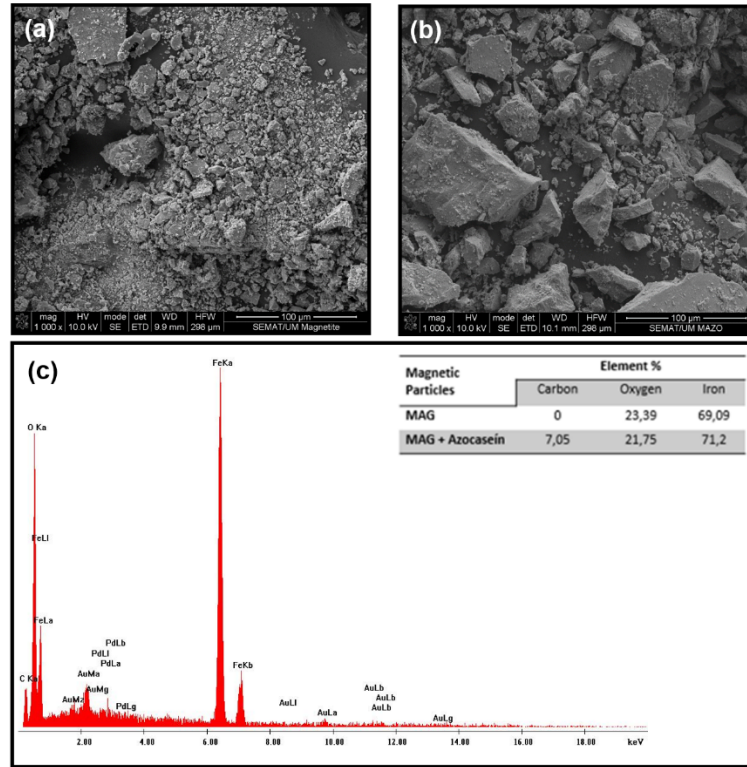


Figure 4 EDX map of mAzO: (A) select region zoom 5.000X; (B) select region zoom 15.000X; (C) Fe distribution; (D) O distribution; (E) C distribution, (F) Fe, O and C integrated.

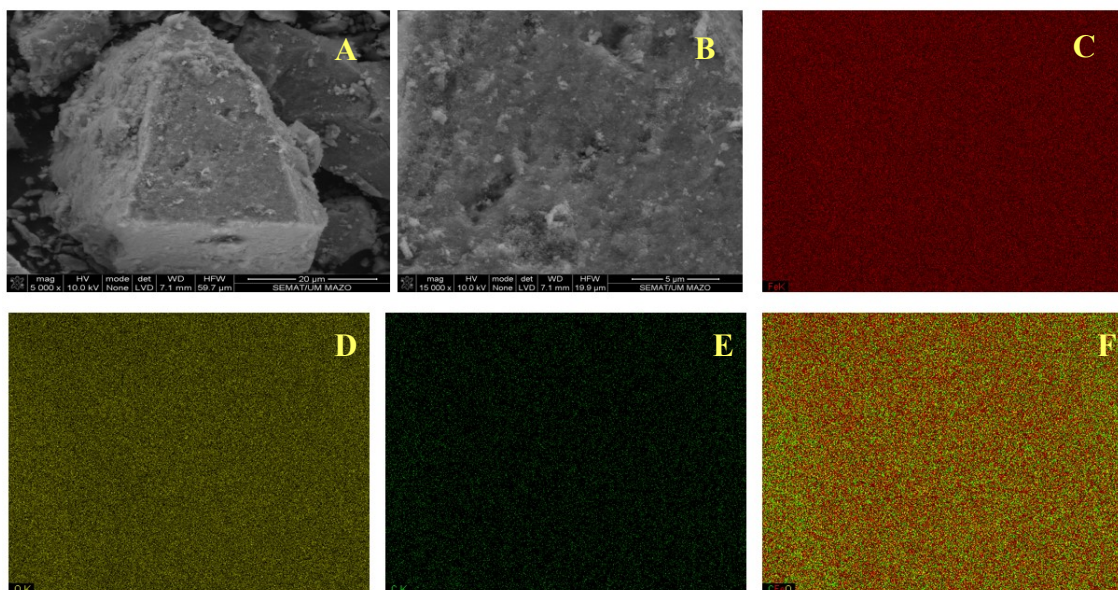


Figure 5 XRD of magnetic particles

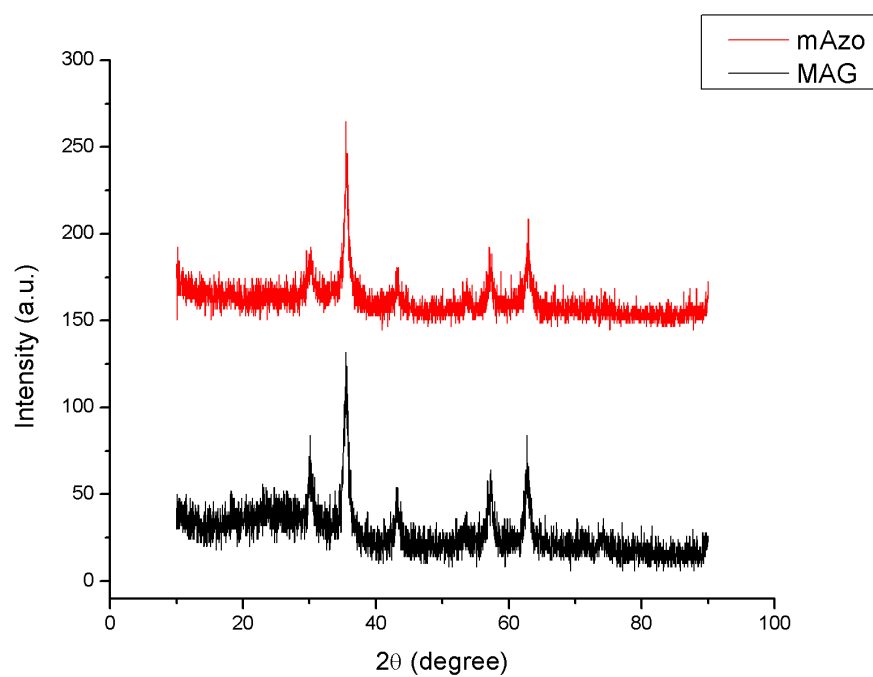


Figure 6 FITIR mAzo and azocasein

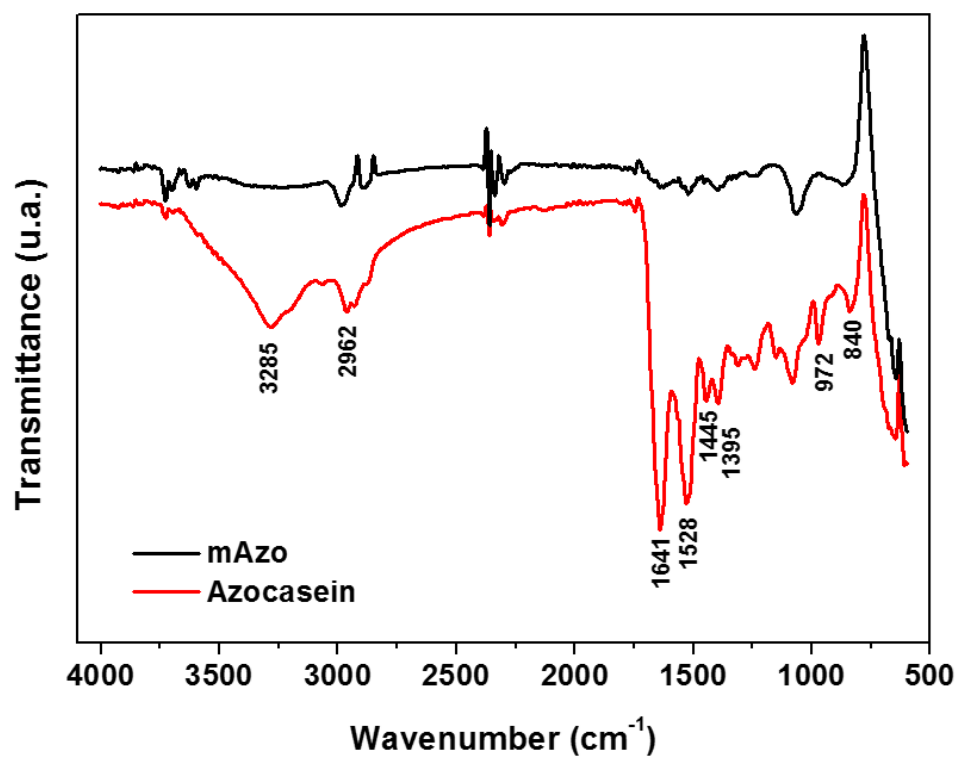


Figure 7 Magnetization curves of magnetite (Mag) and magnetite with azocasein (mAzo) at 300K.

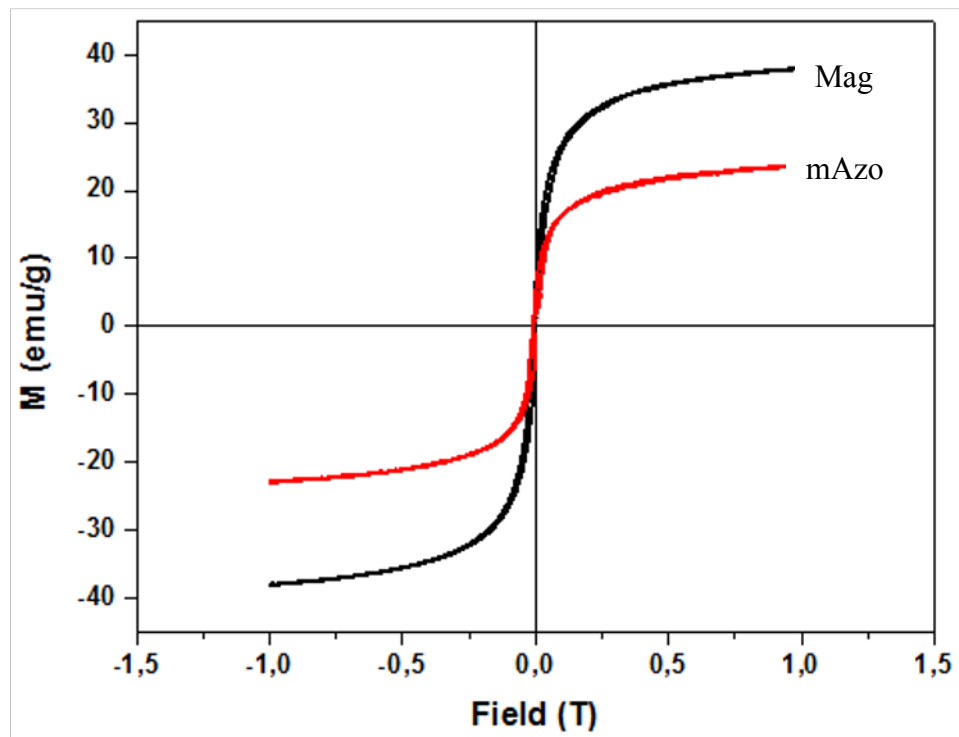


Table 1 Purification of Trypsin from tilapia intestine with purification gradient (Ammonium precipitation, dialysis and mAzo composite) and reuse

Steps	Proteins (mg)	Total activity (U)	Specific activity (U/mg protein)	Yield (%)	Purification fold
Step 1: Crude extract	11.806	2.204	0.19	100	1
Step 2: Ammonium sulphate (20-40%)	2.210	13.064	5.91	593	31.10
Step 3: Dialysis	0.013	0.466	35.85	21.1	188.68
Step 4: mAzo	0.0012	0.052	43.33	2.36	228.05
1st Reuse mAzo	0.0011	0.048	43.63	2.17	229.63
2nd Reuse mAzo	0.0011	0.046	41.81	2.08	220.05
3rd Reuse mAzo	0.0011	0.043	39.09	1.95	205.73

All operations were carried out at 4°C. Only precipitate formed between 20-40% saturation with ammonium sulphate was subjected to the mAzo particles.

6 CONCLUSÕES

- Foram sintetizados compósitos magnéticos a partir de óxido de ferro e azocaseína (mAzo e mPANI-Azo);
- Purificou-se tripsina a partir de extrato bruto de intestino de tilápia utilizando os compósitos magnéticos: mAzo e mPANI-Azo obtendo uma purificação até 68 vezes maior comparado ao extrato antes da purificação;
- O Extrato foi purificado utilizando o seguinte gradiente de purificação: precipitação com sulfato de amônio, diálise e compósito magnético – mAzo, como resultado tripsina 220 vezes mais pura que inicialmente;
- A partícula mAzo foi caracterizada por microscopia eletrônica de varredura, EDX e mapa de EDX, FTIR, difração de raio X e por propriedades magnéticas. Os resultados corroboram a presença de azocaseína na partícula, um tamanho variado do aglomerado e um compósito supermagnético.

REFERÊNCIAS

- AMARAL, I.P.G., CARNEIRO-DA-CUNHA, M.G., CARVALHO JR., L.B., BEZERRA, R.S. Fish trypsin immobilized on ferromagnetic Dacron. **Process Biochemistry**, 41, 1213–1216, 2006.
- AFKHAMI A, SABER-TEHRANI M, BAGHERI H., Modified maghemite nanoparticles as an efficient adsorbent for removing some cationic dyes from aqueous solution. **Desalination**, 2010, 263(1–3), 240–8.
- ANGELI, R., DA PAZ, N.V. N., MACIEL, J.C., ARAÚJO, F.F.B., PAIVA, P.M.G., CALAZANS, G.M.T., VALENTE, A.P., ALMEIDA, F.C.L., COELHO, L.C.B.B., CARVALHO JR., L.B., SILVA, M.P.C., CORREIA, M.T.S. Ferromagnetic Levam Composite: An Affinity Matrix to Purify Lectin. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, 200, 1-7, 2009.
- ANSELL, R.J., MOSBACH, K. Magnetic molecularly imprinted polymer beads for drug radioligand binding assay. **Analyst**, 123, 1611–1616, 1998.
- ARAÚJO, A.C.V., OLIVEIRA, R.J., ALVES JÚNIOR, S., RODRIGUES, A.R., MACHADO, F.L.A., CABRAL, F.A.O., AZEVEDO, W.M. Synthesis, characterization and magnetic properties of polyaniline-magnetite nanocomposites. **Synthetic Metals**, 160, 685–690, 2010.
- AZEVEDO, W.M., BARROS, R.A., DA SILVA JR., E.F. Conductive polymer preparation under extreme or non-classical conditions. **Journal of Materials Science**, 43, 1400–1405, 2008.
- BABINCOVA, M., LESZCZYNSKA, D., SOURIVONG, P., BABINEC, P. Selective treatment of neoplastic cells using ferritin-mediated electromagnetic hyperthermia. **Medical Hypotheses**, 2000, 54, 177–179.
- BACHGANSMO, T. Ferrimagnetic Susceptibility Contrast Agents. **Acta Radiologica**, 34, 1–13, 1993.
- BALTI, R., BARKIA, A., BOUGATEF, A., KTARI, N., NASRI, M., A heat-stable trypsin from the hepatopancreas of the cuttlefish (*Sepia officinalis*): Purification and characterisation, **Food chemistry**, 2009, 113, 146-154.
- BARROS, R.A., AZEVEDO, W.M. Polyaniline/silver nanocomposite preparation under extreme or non-classical conditions. **Synthetic Metals**, 2008, 158, 922–926.
- BAYRAMOGLU, G., Preparation and characterization of mixed-mode magnetic adsorbent with p-amino-benzamidine ligand: Operated in a magnetically stabilized fluidized bed reactor for purification of trypsin from bovine pâncreas, **Process Biochemistry**, 2014, 49, 520–528.
- BEZERRA, R. S., SANTOS, J. F., PAIVA, P. M. G., CORREIA, M. T. S., COELHO, L. C. B. B., VIEIRA, V. L. A., CARVALHO JR., L. B., Partial

purification and characterization of a thermostable trypsin from pyloric caeca of tambaqui (*Colossoma macropomum*), **Journal of Food Biochemistry**, 2001, 25, 199-210.

BEZERRA, R. S., LINS, E. J. F., ALENCAR, R. B., PAIVA, P. M. G., CHAVES, M. E. C., COELHO, L. C. B. B., CARVALHO JR., L. B., Alkaline proteinase from intestine of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*), **Process Biochemistry**, 2005, 40 (5), 1829–1834.

BKHAIRIA, I., KHALED, H. B., KTARI, N., MILED, B., NASRI, M., GHORBEL, S., Biochemical and molecular characterisation of a new alkaline trypsin from *Liza aurata*: Structural features explaining thermal stability, *Food Chemistry* 196, 2016, 1346–1354.

BOUGATEF, A., SOUISSI, N., FAKHFAKH, N., ELLOUZ-TRIKI, Y., NASRI, M., Purification and characterisation of trypsin from the viscera of sardine (*Sardina pilchardus*), **Food Chem**, 2007, 102, 343–350.

BOUGATEF, A., Trypsins from fish processing waste: characteristics and biotechnological applications e comprehensive review, **Journal of Cleaner Production**, 2013, 57, 257-265.

BOYER C, WHITTAKER MR, BULMUS V, LIU JQ, DAVIS TP., The design and utility of polymerstabilized iron-oxide nanoparticles for nanomedicine applications. **NPG Asia Mater**, 2010, 2, 23–30.

BÍLKOVÁ, Z., SLOVÁKOVÁ, M., LYČKA, A., HORAK, D., LENFELD, J., TURKOVA, J., CHURACEK, J. Oriented immobilization of galactose oxidase to bead and magnetic bead cellulose and poly (HEMA-co-EDMA) and magnetic poly(HEMA-co-EDMA) microspheres. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, 2002, 770, 25–34.

CAO, M., LI, Z., WANG, J., GE, W., YUE, T., LI, R., COLVIN, V. L., YU, W. W., Food Related applications of magnetic iron oxide nanoparticles: Enzyme immobilization, protein purification and food analysis, **Trends in Food Science & Technology**, 2012, 27, 47-56.

CASTILLO-YÁÑEZ, F. J., PACHECO-AGUILAR, R., GARCIA-CARREÑO, F. L., NAVARRETE-DEL TORO, M. LA., Isolation and characterization of trypsin from pyloric caeca of Monterey sardine *Sardinops sagax caerulea*, **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, 2005, 140 (1), 91–98.

CASTRO, V.F., CELESTINO, J., DE QUEIROZ, A.A.A., GARCIA, F.G. Propriedades magnéticas e biocompatíveis de nanocompósitos para utilização em magneto-hipertermia. **Revista Brasileira de Física Médica**, 2010, 4, 79–82.

CHAMRAD I, STROUHAL O, REHULKA P, LENOBEL R, SEBELA M., Microscale affinity purification of trypsin reduces background peptides in matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of protein digests, **J Proteom**, 2001, 74, 948–57.

CHERRY, J. R. and FIDANTSEF, A. L., Directed evolution of industrial enzymes: an update, **Current Opinion in Biotechnology**, 2003, vol. 14, no. 4, pp. 438–443.

COELHO, D. F., SATURNINO, T. P., FERNANDES, F. F., MAZZOLA, P. G., SILVEIRA, E., TAMBOURGI, E. B., Azocasein Substrate for Determination of Proteolytic Activity: Reexamining a Traditional Method Using Bromelain Samples, **BioMed Research International**, 2016, V. 2016, 6 Pages.

CORNELL, R. M., SCHWERTMANN, U., **The iron oxides: structure, properties, reactions, occurrences and uses**, Weinheim: Wiley-VCH, 2003.

CUMMING, S., **Global Market for Industrial Enzymes to Reach Nearly \$7.1 Billion by 2018; Detergent Enzyme Market to Record Maximum Growth**, BIO030H, PRWeb, 2014, <http://www.bccresearch.com/market-research/biotechnology/enzymes-in-industrial-applications-bio030h.html>.

DE ALBUQUERQUE, C., MUHLIA-ALMAZÁN, A., HERNÁNDEZ-CORTES, P., & GARCIA-CARREÑO, F. L., Proteinases from marine organisms. In M. Fingerman & R. Nagabhushanam (Eds.), Recent advances in marine biotechnology, **Plymouth: Science Publishers**, 2001, pp. 209–238.

DIAS AMGC, HUSSAIN A, MARCOS AS, ROQUE ACA., A biotechnological perspective on the application of iron oxide magnetic colloids modified with polysaccharides, **Biotechnol Adv**, 2011, 29(1), 142–55.

DITTRICH, B. U., Life under extreme conditions: Aspects of evolutionary adaptation to temperature in crustacean proteases. **Polar Biology**, 1992, 12, 269–274.

DRBOHLAVOVA, J., HRDY, R., ADAM, V., KIZEK, R., SCHNEEWEISS, O., HUBALEK, J., Preparation and properties of various magnetic nanoparticles. **Sensors**, 2009, 9, 2352–2362.

DURÁN, N., AZEVEDO, M.M.M. O que é nanotecnologia? Atualidades e perspectivas. **Instituto de Química, UNICAMP**, 2003 em: RUTH LUQUEZE CAMILO, Síntese e caracterização de nanopartículas magnéticas de ferrita de cobalto recobertas por 3-aminopropiltriethoxissilano para uso como material híbrido em nanotecnologia. Tese (Doutorado em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear – Materiais), **Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares/ Universidade de São Paulo**, SP, 2006.

FAEZ, R., REIS, C., FREITAS, P.S. DE, KOSIMA, O.K., RUGGERI, G., DE PAOLI, M.-A. Polímeros condutores. **Química Nova na Escola**, 11, 13–18, 2000.

GATES, B. J., & TRAVIS, J., Isolation and comparative properties of shrimp trypsin. **Biochemistry**, 8, 4483–4489, 1969.

GILDBERG, A., & ALMAS, K. A., Utilization of fish viscera. In M. L. Maguer & P. Jelen (Eds.), **Food engineering and process applications**, 1986 Vol: 2. unit operations (pp. 383–393). London, UK: Elsevier.

GIONGO, J. L., 2006, **Caracterização e aplicação de proteases produzidas por linhagens de *Bacillus sp.***, 2006.

GUPTA, R., BEG, Q. K., Bacterid alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 2002, 59, 15–32.

GUPTA AK, GUPTA M., Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications. **Biomaterials** 2005, 26(18), 3995–4021.

HALLING, P.J., DUNNILL, P. Magnetic supports for immobilized enzymes and bioaffinity adsorbents. **Enzyme and Microbial Technology**, 1980, 2, 2–10.

HAYASHI, K., MORIYA, M., SAKAMOTO, W., YOGO, T. Chemoselective synthesis of folic acid functionalized magnetite nanoparticles via click chemistry for magnetic hyperthermia. **Chemistry of Materials**, 2009, 21, 1318–1325.

HORÁK, D., PETROVSKÝ, E., KAPIČKA, A., FREDERICH, T. Synthesis and characterization of magnetic poly (glycidyl methacrylate) microspheres. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, 2007, 311, 500–506.

HUANG SH, LIAO MH, CHEN DH. Direct binding and characterization of lipase onto magnetic nanoparticles. **Biotechnol Prog**, 2003, 19(3):1095–100.

HUANG, S., LIAO, M., & CHEN, D., Fast and efficient recovery of lipase by polyacrylic acid-coated magnetic nano-adsorbent with high activity retention. Separation and **Purification Technology**, 2006, 51, 113–117.

HUBER, D.L. Synthesis, properties, and applications of iron nanoparticles. **Small**, 2005, 1, 482–501.

JARAMILLO-TABARES, B.E., JARAMILO, F.I, TORRESI, S.I.C. Stabilization of polyaniline by the incorporation of magnetite nanoparticles. **Materials Chemistry and Physics**, 132, 529–533, 2012.

JELLOULI, K., BOUGATEF, A., DAASSI, D., BALTI, R., BARKIA, A., NASRI, M., New alkaline trypsin from the intestine of Grey triggerfish (*Balistes capricornus*) with high activity at low temperature: purification and characterisation, **Food Chem**, 2009, 116:644–650.

KHANGEMBAM, B. K., CHAKRABARTI, R., Trypsin from the digestive system of carp *Cirrhinus mrigala*: Purification, characterization and its potential application, **Food Chemistry**, 2015, 175, 386–394.

KISHIMURA, H., HAYASHI, K., MIYASHITA, Y., & NONAMI, Y., Characteristics of trypsins from the viscera of true sardine (*Sardinops melanostictus*) and the pyloric ceca of arabesque greenling (*Pleuroprammus azonus*). **Food Chemistry**, 2006, 97, 65–70.

KISHIMURA, H., TOKUDA, Y., YABE, M., KLOMKLAO, S., BENJAKUL, S., ANDO, S., Trypsins from the pyloric ceca of jacobever (*Sebastes schlegelii*) and elkhorn sculpin (*Alcichthys alcicornis*): Isolation and characterization, **Food Chemistry**, 2007, 100 (4), 1490–1495.

KISHIMURA, H., KLOMKLAO, S., BENJAKUL, S., CHUN, BS., Characteristics of trypsin from the pyloric ceca of walleye pollock (*Theragra chalcogramma*), **Food Chemistry**, 2008, 106 (1), 194–199.

KLOMKLAO, S., BENJAKUL, S., VISESSANGUAN, W., SIMPSON, B. K., & KISHIMURA, H., Partitioning and recovery of proteinase from tuna spleen by aqueous two-phase systems. **Process Biochemistry**, 2005, 40, 3061–3067.

KLOMKLAO, S., BENJAKUL, S., VISESSANGUAN, W., KISHIMURA, H., SIMPSON, BK., SAEKI, H., Trypsins from yellowfin tuna (*Thunnus albacores*) spleen: Purification and characterization, **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, 2006, 144 (1), 47–56.

KLOMKLAO, S., BENJAKUL, S., VISESSANGUAN, W., KISHIMURA, H., SIMPSON, BK., Trypsin from the pyloric caeca of bluefish (*Pomatomus saltatrix*). **Comp Biochem Physiol B**, 2007, 148:382–389.

KLOMKLAO, S., KISHIMURA, H., NONAMI, Y., BENJAKUL, S., Biochemical properties of two isoforms of trypsin purified from the intestine of skipjack tuna (*Katsuwonus pelamis*), **Food Chem**, 2009, 115, 155–162.

KOSSIAKOFF, A. A., CHAMBERS, J. L., KAY, L. M., & STROUD, R. M., Structure of bovine trypsinogen at 1.9 Å resolution. **Biochemistry**, 1977, 16, 654–664.

KRESSE, M., WAGNER, S., PFEFFERER, D., LAWACZECK, R., ELSTE, V., SEMMLER, D.W. Targeting of ultrasmall superparamagnetic iron oxide (uspio) particles to tumor cells *in vivo* by using transferrin receptor pathways. **Magnetic Resonance in Medicine**, 1998, 40, 236–242.

KTARI, N., KHALED, H. B., NASRI, R., JELLOULI, K., GHORBEL, S., NASRI, M., Trypsin from zebra blenny (*Salaria basilisca*) viscera: Purification, characterisation and potential application as a detergent additive, **Food Chemistry**, 2012, 130, 467–474.

LIAO, M., & CHEN, Fast and efficient adsorption/desorption of protein by a novel magnetic nano-adsorbent. **Biotechnology Letters**, 2002, 24, 1913-917.

LU, BJ., ZHOU, L. G., CAI, QF., HARA, K., MAEDA, A., SU, WJ., CAO, MJ., Purification and characterisation of trypsins from the pyloric caeca of mandarin fish (*Siniperca chuatsi*), **Food Chemistry**, 2008, 110 (2), 352–360.

MACIEL, J. C., **Compósitos de Partículas Magnéticas e Polímeros Para Imobilização de Tripsina**, Tese de Doutorado, 2012, 118pages.

MCHENRY ME, LAUGHLIN DE., Nano-scale materials development for future magnetic applications. **Acta Mater**, 2000, 48(1), 223–38.

MEYER, A., HANSEN, D. B., GOMES, C. S. G., HOBLEY, T. J., THOMAS, O. R. T., & FRANZREB, M., Demonstration of a strategy for product purification by high-gradient magnetic fishing: recovery of superoxide dismutase from unconditioned whey. **Biotechnology Progress**, 2005, 21, 244-254.

MOFFAT, G., WILLIAMS, R.A., WEBB, C., STIRLING, R. Selective separations in environmental and industrial processes using magnetic carrier technology. **Minerals Engineering**, 1994, 7, 1039–1056.

MUNOZ, M., DE PEDRO, Z. M., CASAS, J. A., RODRIGUEZ, J. J., Preparation of magnetite-based catalysts and their application in heterogeneous Fenton oxidation – A review, **Applied Catalysis B: Environmental**, 2015, 176–177, 249–265.

NERI, D. F. M., BALCÃO, V. M., DOURADO, F. O. Q., OLIVEIRA, J. M. B., CARVALHO, L. B., JR, & TEIXEIRA, J. A. (2009). Galactooligosaccharides production by b-galactosidase immobilized onto magnetic polysiloxane–polyaniline particles. **Reactive and Functional Polymers**, 69(4), 246–251.

NERI, D.F.M., BALCÃO, V.M., DOURADO, F.O.Q., OLIVEIRA, J.M.B., CARVALHO JR., L.B., TEIXEIRA, J.A. Immobilized β -galactosidase onto magnetic particles coated with polyaniline: support characterization and galactooligosaccharides production. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, 2011, 70, 74–80.

PAN BJ, QIU H, PAN BC, NIE GZ, XIAO LL, LV L, et al. Highly efficient removal of heavy metals by polymer-supported nanosized hydrated Fe(III) oxides: behavior and XPS study. **Water Res** 2010, 44(3), 815–24.

PANKHURST, Q.A., CONNOLLY, J., JONES, S.K., DOBSON, J. The underlying physics of biomedical applications of magnetic nanoparticles. **Journal of Physics D: Applied Physics**, 2003, 36, 167–181.

PENG, Z. G., HIDAJAT, K., & UDDIN, M. S., Conformational change of adsorbed and desorbed bovine serum albumin on nanosized magnetic particles. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, 2004, 33, 15-21.

QIAN, H., LIN, Z., XU, H., & CHEN, M., The efficient and specific isolation of the antibodies from human serum by thiophilic paramagnetic polymer nanospheres, **Biotechnology Progress**, 2009, 25, 376-383.

RAO, M. B. et al., Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, 1998, Washington, 62, 597-635.

ROCO MC., Nanotechnology: convergence with modern biology and medicine, **Curr Opin Biotechnol**, 2003, 14(3), 337–46.

RYPNIEWSKI, W., PERRAKIS, A., VORGIAS, C. E., & WILSON, K., Evolutionary divergence and conservation of trypsin. **Protein Engineering**, 1994, 7, 57–64.

SAFARIK, I., SAFARIKOVA, M., Magnetic techniques for the isolation and purification of proteins and peptides, 2004, **BioMagnetic Research and Technology**, v: 2, p 1-17.

SAHU, S. K., CHAKRABARTY, A., BHATTACHARYA, D., GHOSH, S. K., & PRAMANIK, P., Single step surface modification of highly stable magnetic nanoparticles for purification of His-tag proteins. **Journal of Nanoparticle Research**, 2011, 13, 2475-2484.

SAIYED, Z.M., TELANG, S.D., RACNCHAND, C.N. Application of magnetic techniques in the field of drug discovery and biomedicine. **BioMagnetic Research and Technology**, 1, 23–33, 2003.

SCHERER, F., ANTON, M., SCHILLINGER, U., HENKE J., BERGEMANN C., KRÜGER A., GÄNSBACHER B., PLANK C. Magnetofection: enhancing and targeting gene delivery by magnetic force in vitro and in vivo. **Gene Therapy**, 9, 102–109, 2002.

SCHUCHERT-SHI, A., HAUSER, P.C. Peptic and tryptic digestion of peptides and proteins monitored by capillary electrophoresis with contactless conductivity detection. **Analytical Biochemistry: Methods in the Biological Sciences**, 387, 202–207, 2009.

SELVAN ST., TAN TTY., YI DK., JANA NR., Functional and multifunctional nanoparticles for bioimaging and biosensing, **Langmuir**, 2010, 26(14), 11631–41.

SHAHIDI, F., KAMIL, Y. V. A. J., Enzymes from fish and aquatic invertebrates and their application in the food industry, **Trends in Food Science & Technology**, 2001, 12 (12), 435–464.

SILA, A., NASRI R., JRIDI, M., BALTI, R., NASRI, M., BOUGATEF, A., Characterisation of trypsin purified from the viscera of Tunisian barbel (*Barbus*

callensis) and its application for recovery of carotenoproteins from shrimp wastes, **Food Chemistry**, 2012, 132 (3), 1287–1295.

SILVA, S. V., MACALTA, F. X., Caseins as source of bioactive peptides, **International Dairy Journal**, 2005, 15, 1–15.

SOUZA, A. A. G., AMARAL, I. P. G., SANTO, A. R. E., CARVALHO, L. B., JR., & BEZERRA, R. S., Trypsin-like enzyme from intestine and pyloric caeca of spotted goatfish (*Pseudupeneus maculatus*). **Food Chemistry**, 2007, 100, 1429–1434.

SUN, S., MA, M., QIU, N., HUANG, X., CAI, Z., HUANG, Q., et al., Affinity adsorption and separation behaviors of avidin on biofunctional magnetic nanoparticles binding to iminobiotin. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, 2011, 88, 246–253.

TAKASHIMA, W., KANEKO, M., KANETO, K., MACDIARMID, A.G. The electrochemical actuator using electrochemically-deposited polyaniline film. **Synthetic Metals**, 71, 1995, 2265–2266.

TITANI, K., SASAGAWA, T., WOODBURG, R. G., ERICSSON, L. H., DÖRSAM, H., KRAEMER, M., NEURATH, H., & ZWILLING, R., Amino acid sequence of crayfish (*Astacus fluviatilis*) trypsin. *Biochemistry*, 22, 1459–1465, 1983.

TOMOYOSHI FUCHISE, HIDEKI KISHIMURA, HARUO SEKIZAKI, YOSHIYUKI NONAMI, GAKU KANNO, SAPPASITH KLOMKLAO, SOOTTAWAT BENJAKUL, BYUNG-SOO CHUN, Purification and characteristics of trypsins from cold-zone fish, Pacific cod (*Gadus macrocephalus*) and saffron cod (*Eleginus gracilis*), **Food Chemistry**, 2009, 116 (3), 611–616.

TUCEK, J., ZBORIL, R., PETRIDIS, D., Maghemite nanoparticles by view of Mossbauer spectroscopy. **Journal of Nanoscience Nanotechnol**, 2006, 6, 926–947.

UMARE, S.S., SHAMBHARKAR, B.H., NINGTHOUJAM, R.S. Synthesis and characterization of polyaniline-Fe₃O₄ nanocomposite: electrical conductivity, magnetic, electrochemical studies. **Synthetic Metals**, 160, 2010, 1815–1821, 2010.

WARD, O. P., 3.49—proteases, in *Comprehensive Biotechnology*, M.-Y. Murray, Ed., **Academic Press**, 2011, Burlington, Mass, USA, 2nd edition, pp. 571–582.

WEISSLEDER, R., LEE, A.S., FISCHMAN, A.J., REIMER, P., SHEN, T., WILKINSON, R., CALLAHAN, R.J., BRADY, T.J. Polyclonal human immunoglobulin-G labeled with polymeric iron oxide antibody MR imaging. **Radiology**, 181, 245–249, 1991.

WEISSLEDER, R., LEE, A.S., KHAW, B.A., SHEN, T., BRADY, T.J. Antimyosin-labeled monocrystalline iron-oxide allows detection of myocardial infarct – MR antibody imaging. **Radiology**, 182, 381-385, 1992.

WISEMAN, A., **Manual de biotecnología de las enzimas**, Zaragoza, Acribia, 1991, 444p.

VAN HAU, P., BENJAKUL, S., Purification and Characterization of Trypsin from Pyloric Caeca of Bigeye Snapper (*Pracanthus macracanthus*), **Journal of Food Biochemistry**, 2006, 30 (4), 478–495.

XU, P., ZENG, G. M., HUANG, D. L., FENG, C. L., HU, S., ZHAO, M. H., LAI, C., WEI, Z., HUANG, C., XIE, G. X., LIU, Z. F., Use of iron oxide nanomaterials in wastewater treatment: A review, **Science of the Total Environment**, 2012, 424, 1–10.

ZHANG, G., CAO, Q., LI, N., LI, K., & LIU, F., Tris (hydroxymethyl) aminomethane-modified magnetic microspheres for rapid affinity purification of lysozyme. **Talanta**, 2011, 83, 1515-1520.

ZAMANI, A., BENJAKUL, S., Trypsin from unicorn leatherjacket (*Aluterus monoceros*) pyloric caeca: purification and its use for preparation of fish protein hydrolysate with antioxidative activity, **J Sci Food Agric**, 2016; 96: 962–969.

ZBORIL, R., MASHLAN, M., PETRIDIS, D., Iron(iii) oxides from termal processes-synthesis, structural and magnetic properties, Mossbauer spectroscopy characterization, and applications. *Chemistry of Materials*, 2002, 12, 969-982.

7 PERSPECTIVAS

Os Resultados obtidos nesta pesquisa nos permitirão estender esta técnica não só para a purificação de tripsina, mas diversos tipos enzimas. O projeto de Pós-Doutorado que se iniciará a seguir intitulado “PURIFICAÇÃO DE ENZIMAS DE INTERESSE COMERCIAL UTILIZANDO COMPÓSITOS MAGNÉTICOS”, tem como objetivo Purificar enzimas comerciais (Proteases, Collagenase, β -galactosidase, Amilase e β -glucosidase) utilizando micropartículas de compósitos magnéticos adsorvidas ligantes que possuem afinidade com as proteínas alvo (Azocaseína, Amylose Azure, Colageno, Galactooligossacarídeos – GOS e Celulose).

A publicação artigo II desta tese e ainda uma revisão bibliográfica da purificação de tripsina de subprodutos pesqueiros estão entre os objetivos do nosso grupo de pesquisa para o primeiro semestre de 2016.