

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE QUÍMICA

TAISSA FERREIRA DE OLIVEIRA SOUZA

PRODUÇÃO DE ENZIMAS HIDROLÍTICAS POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO
SÓLIDO PARA UTILIZAÇÃO EM DETERGENTES ENZIMÁTICOS ESPECIAIS

Rio de Janeiro

2017

Taissa Ferreira de Oliveira Souza

PRODUÇÃO DE ENZIMAS HIDROLÍTICAS POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO
SÓLIDO PARA UTILIZAÇÃO EM DETERGENTES ENZIMÁTICOS ESPECIAIS

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Químico com Atribuições Tecnológicas.

Orientador: Denise Maria Guimarães Freire
Anderson Fragoso dos Santos

Rio de Janeiro

2017

Taissa Ferreira de Oliveira Souza

PRODUÇÃO DE ENZIMAS HIDROLÍTICAS POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO
SÓLIDO PARA UTILIZAÇÃO EM DETERGENTES ENZIMÁTICOS ESPECIAIS

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Químico com Atribuições Tecnológicas.

Aprovado por:

Prof.^a Denise Maria Guimarães Freire – IQ-UFRJ (Orientadora)

Dr. Anderson Fragoso dos Santos (Orientador)

Prof. André Luis Souza dos Santos – IMPG-UFRJ

Prof. Cláudio Cerqueira Lopes – IQ-UFRJ

AGRADECIMENTOS

A Deus por todo cuidado e por possibilitar a realização os meus sonhos.

Aos meus pais, pelo amor, apoio, companheirismo, carinho e compreensão. A conclusão desse trabalho é também resultado do esforço de vocês, que sempre me incentivaram a estudar e realizar meus sonhos.

Ao meu irmão Rafael, que chegou no meio dessa trajetória, trazendo alegria e renovando minhas energias para o restante da graduação.

A toda minha família, pelo apoio, carinho e inúmeros momentos de descontração. Todos vocês são incríveis.

À minha orientadora Denise Freire, por proporcionar a realização deste trabalho. Obrigada pela oportunidade, ideias, conselhos e confiança no meu potencial. É uma honra fazer parte da sua equipe.

Ao meu orientador Anderson Fragoso, por tudo que me ensinou, pelo apoio, por todo incentivo, pelos elogios, amizade e ótima convivência.

À professora Flávia do Carmo e à Sabrina Dias, pela orientação no desenvolvimento do monitoramento tecnológico presente neste trabalho, pelo incentivo e amizade.

A todos os integrantes do LaBiM, pelas diversas ajudas neste trabalho e boa convivência. De modo especial, agradeço a Maria Eduarda e Isabella Teixeira pela amizade, ajuda nos experimentos, risadas e companheirismo.

A todos os integrantes da Agência UFRJ de Inovação, pela acolhida, atenção e pelos almoços no RU.

Aos professores Cláudio Lopes e Rosângela Sabbatini, pela parceria neste projeto de pesquisa.

Aos meus amigos do Instituto de Química. De modo particular, agradeço ao Alex, Cíntia, Leina, Michelle, Nádila, Priscila, Rafaela Trindade, Tatiana Abreu e Wagner. Vocês estiveram presentes em todos os momentos dessa trajetória. Obrigada pelos conselhos, pelo companheirismo, pelos inúmeros ataques de riso, pelas comilanças, pelas provas e materiais antigos, pela sinceridade, enfim, obrigada por tudo.

A todos os meus amigos da vida que entenderam minha ausência em diversos momentos e me apoiaram nessa trajetória.

Ao Instituto de Química, pela formação, estrutura e bom ambiente.

RESUMO

SOUZA, Taissa Ferreira de Oliveira. **Produção de enzimas hidrolíticas por fermentação em estado sólido para utilização em detergentes enzimáticos especiais.** Rio de Janeiro, 2017. Trabalho de Conclusão de Curso (Químico com atribuição tecnológica) – Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2017.

A utilização de enzimas em produtos de limpeza e, especificamente, em detergentes enzimáticos é cada vez maior. Desta forma, é cada vez mais importante a busca de enzimas eficientes para esta aplicação e de alternativas para a produção destas enzimas, como a Fermentação em Estado Sólido (FES). Esta forma de fermentação é desenvolvida há séculos e apresenta diversas vantagens, dentre elas esta a possibilidade de utilizar resíduos agroindustriais como meio de cultivo. A utilização da FES para a produção de enzimas se encaixa como uma ótima alternativa ao Brasil, devido à grande produção agroindustrial do país. Neste trabalho foi utilizado o fungo filamentosso *Aspergillus oryzae* para a produção de enzimas hidrolíticas para aplicação em detergentes enzimáticos especiais e o meio de cultivo utilizado foi uma combinação de 70% de torta de dendê e 30% de fibra. Os detergentes enzimáticos são produtos destinados a limpeza hospitalar e devem conter, necessariamente, protease, podendo ser adicionados de outras enzimas hidrolíticas. As enzimas produzidas na FES foram extraídas com água e o extrato enzimático obtido apresentou 11,6 U/mL de atividade proteolítica, 4,6 U/mL de atividade amilolítica, 1,64 U/mL de atividade lipásica e 0,3 U/mL de atividade celulolítica, na temperatura de 50°C e pH 6. A estabilidade térmica das enzimas produzidas na FES também foi avaliada nas temperaturas de 40 e 50°C, por 2 horas e as enzimas hidrolíticas mantiveram sua atividade enzimática nessas temperaturas. Além disso, verificou-se a compatibilidade e estabilidade térmica da protease produzida quando a mesma foi adicionada a formulação de detergentes enzimáticos comerciais. Os resultados obtidos foram promissores para a futura aplicação desse *pool enzimático* de baixo custo na formulação de detergentes enzimáticos especiais. Em paralelo ao trabalho experimental também foi realizado o monitoramento tecnológico da aplicação de proteases em detergentes e composições de limpeza por meio da análise de patentes na plataforma Orbit[®]. As análises indicaram que essa tecnologia é bem estabelecida, devido ao grande número de depósitos e que Japão, Estados Unidos e China são os maiores detentores dessa inovação. A principal empresa depositante no Brasil e no mundo é a Procter & Gamble (EUA).

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Evolução temporal do depósito de patentes de proteases aplicadas em detergentes e composições de limpeza considerando a primeira data de publicação.	28
Figura 2: Número de depósitos por país de pedidos de patente de proteases aplicadas em detergentes e composições de limpeza considerando o pedido de prioridade (Top 10).....	29
Figura 3: Número total de documentos por país de pedidos de patente de proteases aplicadas em detergentes e composições de limpeza (Top 10).....	30
Figura 4: Principais instituições depositantes de pedidos de patente de proteases aplicadas em detergentes e composições de limpeza (Top 10).....	31
Figura 5: Principais instituições depositantes no Brasil de pedidos de patente de proteases aplicadas em detergentes e composições de limpeza (Top 6).	32
Figura 6: Principais subclasses da CIP encontradas nos documentos da aplicação de protease em detergentes e composições de limpeza.	33
Figura 7: Status Legal das patentes analisadas.....	35
Figura 8: Gráfico de Pareto. Variáveis estatisticamente significativas para um intervalo de confiança de 95%.	36
Figura 9: Curva de contorno para atividade proteolítica em função do pH e da temperatura.	37
Figura 10: Estabilidade térmica das proteases (A) do extrato enzimático produzido na FES; (B) do detergente 3M multienzimático; (C) do detergente Lapzyme 4. A atividade proteolítica no tempo 0 minuto foi definida como 100%.....	39
Figura 11: Estabilidade térmica das amilases (A) do extrato enzimático produzido na FES; (B) do detergente 3M multienzimático; (C) do detergente Lapzyme 4. A atividade amilolítica no tempo 0 minuto foi definida como 100%.	40
Figura 12: Estabilidade térmica das celulases (A) do extrato enzimático produzido na FES; (B) do detergente 3M multienzimático; (C) do detergente Lapzyme 4. A atividade celulolítica no tempo 0 minuto foi definida como 100%.....	41
Figura 13: Estabilidade térmica das lipases (A) do extrato enzimático produzido na FES; (B) do detergente 3M multienzimático; (C) do detergente Lapzyme 4. A atividade lipásica no tempo 0 minuto foi definida como 100%.	42

Figura 14: Compatibilidade das proteases do extrato enzimático com diferentes detergentes. A atividade proteolítica do extrato enzimático incubado com água deionizada nas diferentes concentrações foi definida como sendo 100% e as demais atividades foram expressas com relação a ela.....43

Figura 15: Estabilidade térmica das proteases do extrato enzimático produzido na FES em uma concentração 10% v/v (A) no detergente 3M multienzimático; (B) no detergente Lapzyme 4. A atividade proteolítica no tempo 0 minuto foi definida como 100%.44

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Principais micro-organismos produtores de proteases alcalinas de interesse industrial.	15
Tabela 2: Vantagens e desvantagens do uso dos documentos de patente como indicadores tecnológicos. (Fonte: ARCHIBUGI, 1992; ERNST, 1997).....	18
Tabela 3: Descrição dos subgrupos de C11D relacionados ao tema de busca.....	21
Tabela 4: Matriz de planejamento experimental com valores e variáveis codificadas.	26
Tabela 5: Descrição das principais subclasses da CIP encontradas nos documentos analisados (WIPO, 2016).....	33
Tabela 6: Matriz de planejamento experimental (valores e variáveis codificadas) e suas respectivas respostas.....	36
Tabela 7: Atividade das enzimas do extrato enzimático e dos detergentes enzimático comerciais.....	38

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	12
2.1	Fermentação em estado sólido (FES)	12
2.2	Resíduos da Indústria de Dendê	13
2.3	Proteases	14
2.3.1	Proteases em detergentes	15
2.4	Detergentes enzimáticos	16
2.5	Monitoramento tecnológico	17
3	OBJETIVO	19
3.1	Objetivos gerais	19
3.2	Objetivos específicos	19
4	MATERIAIS E MÉTODOS	20
4.1	Monitoramento Tecnológico	20
4.2	Produção de enzimas hidrolíticas por FES	22
4.2.1	Micro-organismo	22
4.2.2	Fermentação em Estado Sólido (FES)	22
4.2.3	Obtenção do extrato enzimático	22
4.2.4	Determinação das atividades enzimáticas	22
4.2.5	Planejamento experimental: estudo da influência do pH e da temperatura na atividade proteolítica do extrato enzimático	26
4.2.6	Estabilidade térmica das enzimas	26
4.2.7	Atividade proteolítica do extrato enzimático frente a diferentes detergentes	26
4.2.8	Estabilidade térmica das proteases do extrato enzimático frente aos detergentes enzimáticos comerciais	27
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	28
5.1	Monitoramento tecnológico	28
5.2	Produção de enzimas hidrolíticas por FES	35
5.2.1	Estudo da influência do pH e da temperatura na atividade enzimática das proteases produzidas na FES	35
5.2.2	Atividade enzimática das enzimas produzidas na FES	38
5.2.3	Estabilidade térmica das enzimas produzidas por FES	38

5.2.4 Atividade proteolítica do extrato enzimático frente à composição de diferentes detergentes comerciais	42
5.2.5 Estabilidade térmica das proteases frente à composição dos detergentes enzimáticos comerciais.....	43
6 CONCLUSÃO.....	45
6.1 Monitoramento Tecnológico	45
6.2 Produção de enzimas hidrolíticas por FES.....	45
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	47

1 INTRODUÇÃO

Detergentes, segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), são substâncias que apresentam como finalidade a limpeza e conservação de superfícies inanimadas. O principal componente dos detergentes são os surfactantes, substâncias orgânicas ou inorgânicas que apresentam a propriedade de diminuir a tensão superficial de um líquido, facilitando a operação de limpeza. As principais características dos detergentes estão relacionadas aos surfactantes, porém a eficiência de limpeza se deve também aos demais componentes da formulação, dentre eles conservantes, espessantes, sequestrantes e, em alguns casos, enzimas.

As enzimas são proteínas com atividade catalítica sobre reações biológicas. Estas são de fundamental importância à existência da vida sob diferentes aspectos, uma vez que desempenham funções centrais em processos metabólicos (LÓPEZ & BOND, 2008). Além disso, as enzimas possuem valor comercial, pois apresentam diversas aplicações em setores industriais, como nas indústrias farmacêuticas, têxteis, de alimentos, cosméticos, detergentes, diagnósticos e química fina (SANTOS *et al.*, 2016).

O uso de enzimas em processos industriais minimiza o impacto ambiental, em comparação com métodos químicos convencionais, já que processos enzimáticos não são tóxicos. A utilização de enzimas apresenta também como vantagens: a economia de água, energia, produtos químicos e redução do custo no tratamento de efluentes (SANTOS *et al.*, 2016). Dentre as enzimas empregadas para fins industriais, 75% pertencem à classe das hidrolases e, neste universo, as proteases representam aproximadamente 60% (RAO *et al.*, 1998; RAY, 2012).

As proteases constituem um grande grupo de enzimas que catalisam a hidrólise de ligações peptídicas em proteínas ou fragmentos de proteínas (peptídeos). Essa classe de enzimas está entre as mais importantes e estudadas devido ao seu potencial biotecnológico e sua principal aplicação é na indústria de detergentes. Em 2010, o setor de detergente representou 34% da venda total de proteases [Freedonia Group Incorporated, “World Enzyme to 2015” – <http://www.freedoniagroup.com/>]. Segundo estudos realizados por analistas de mercado da Freedonia Group Incorporated, “World Enzyme to 2015”, o mercado mundial de proteases em produtos de limpeza foi avaliado em US\$ 600 milhões em

2010 e o valor estimado para 2020 é de cerca de US\$ 940 milhões, com uma projeção de crescimento anual de cerca de 6,5% (SANTOS, 2014).

Os detergentes que contêm proteases são utilizados na limpeza doméstica e também hospitalar. A presença de resíduos de fluidos biológicos como sangue, escarro e urina em superfícies favorece a adesão microbiana sobre estas superfícies, influenciando diretamente na sobrevivência e viabilidade microbiana (SHIOMORI *et. al.*, 2002).

Nesse segmento então, surge a definição de detergente enzimático que, segundo a ANVISA (RDC Nº 55, 2012), é um “produto cuja formulação contém, além de um tensoativo, pelo menos uma enzima hidrolítica da subclasse das proteases EC 3.4, podendo ser acrescida de outra enzima da subclasse das amilases EC 3.2 e de demais componentes complementares da formulação, inclusive de enzimas de outras subclasses, tendo como finalidade remover a sujidade clínica e evitar a formação de componentes insolúveis na superfície desses dispositivos”.

O uso de enzimas em detergentes é um importante aliado no combate à infecção hospitalar, já que facilita a remoção de fluidos biológicos do ambiente. Porém, a produção industrial de enzimas é frequentemente limitada devido aos custos dos substratos utilizados para o cultivo microbiano que leva a produção dessas enzimas. É estimado que 40% do custo da produção de enzimas é devido ao meio de cultura utilizado para o crescimento dos micro-organismos (JOO & CHANG, 2005).

Uma alternativa para a diminuição dos custos da produção industrial de enzimas é a fermentação em estado sólido (FES) que possibilita o uso de resíduos agroindustriais como substrato para o cultivo microbiano. A FES é uma técnica que consiste na utilização de um meio de cultivo sólido como fonte de nutrientes e suporte para o crescimento de micro-organismos (PINTO *et. al.*, 2005).

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Fermentação em estado sólido (FES)

A fermentação em estado sólido (FES) é um processo definido como o cultivo de micro-organismos em um meio de cultivo sólido, o qual é utilizado como fonte de nutrientes e suporte para o crescimento dos mesmos (LONSANE *et al.*, 1985). O crescimento microbiano pode ocorrer tanto na superfície quanto no interior do material sólido. A quantidade de líquido contido na matriz sólida deve ser mantida em um nível tal que a atividade de água resultante assegure o crescimento e metabolismo das células, mas não exceda a capacidade máxima de retenção de água na matriz, ou seja, nesse processo deve haver ausência ou o mínimo possível de água livre (MITCHELL *et al.*, 2000, 2002; RAHARDJO *et al.*, 2006).

Muitas bactérias, leveduras e fungos filamentosos crescem em substratos sólidos, dando origem a diversos produtos de interesse. Porém, dentre esses diferentes micro-organismos, os fungos filamentosos são os mais adaptados a este sistema, devido principalmente ao crescimento em forma de hifas. A penetração de hifas no interior das partículas faz com que os fungos filamentosos tenham uma maior acessibilidade aos nutrientes (MITCHELL *et al.*, 2002). Além disso, a maioria dos fungos tem a capacidade de crescer em meios com baixa atividade de água e baixo pH, e produz enzimas extracelulares hidrolíticas para degradar as macromoléculas presentes no substrato sólido (RAHARDJO *et al.*, 2006).

A FES pode ser influenciada pelos seguintes fatores:

- Atividade de água e teor de umidade do substrato: influencia os processos de biodegradação, biossíntese e produção de metabólitos;
- Temperatura e transferência de calor: afeta diretamente nas propriedades do bioprocessamento, como: germinação dos esporos, crescimento celular e eficiência do processo;
- pH: influencia na atividade enzimática, já que cada enzima possui um determinado pH ótimo;
- Aeração: determina a concentração de O₂ e CO₂ no interior do biorreator, regulando a remoção dos compostos voláteis e de CO₂, a umidade relativa e também melhora a transferência de calor;

- Difusão de nutrientes: afeta a concentração de nutrientes e regula as ações enzimáticas sobre o substrato sólido;
- Mistura: auxilia a remoção de calor, as trocas gasosas, o teor de água e a uniformidade do substrato;
- Condições sépticas: é necessário evitar o crescimento de outros micro-organismos, que possam estar presentes no substrato, assim como a entrada de micro-organismos contaminantes;
- Tamanho de partícula: interfere na utilização do substrato pelo micro-organismo e na área de interface gás-líquido. Conseqüentemente, a utilização do oxigênio é dependente desse parâmetro (um tamanho pequeno de partícula pode interferir na respiração microbiana, causando pouco crescimento) (SANTOS, 2014).

A FES permite a utilização de resíduos agroindustriais, que são ricos em nutrientes, como meio de cultivo, diminuindo possíveis problemas ambientais de disposição desses resíduos, além de agregar valor a essas matérias-primas, por meio da produção de substâncias de interesse econômico, como enzimas, hormônios, pigmentos e agentes de controle biológico de pragas. Esse fato faz com que a FES seja uma promissora estratégia para o reaproveitamento dos resíduos agroindustriais no Brasil, considerando a grande produção agrícola do país (PINTO, 2005).

2.2 Resíduos da Indústria de Dendê

A *Elaeis guineenses* é uma palmeira originária da Costa Ocidental da África (Golfo da Guiné) e é conhecida como palmeira-de-dendê, coqueiro-de-dendê, dendê, palma-de-guimé, dendem, palmeira-dendem e palma (MUSEU NACIONAL, 2016).

O cultivo da *Elaeis guineenses* chega a 19,8 milhões de hectares. O processamento do fruto produz o óleo de palma e o óleo de palmiste, gerando resíduos de fibra e de torta. Para 2015/2016, a produção de óleo de palma e óleo de palmiste foi estimada em 62 milhões e 7 milhões de toneladas, respectivamente. Com relação à produção de resíduos os números são 53 milhões de toneladas para a fibra e 9,9 milhões de toneladas para a torta. Esses resíduos são destinados à incineração, eliminados em aterros, utilizados na produção de vapor e de

eletricidade, utilizados na alimentação de animais ou como substrato para cultivo de fungos. (TSOUKO *et al.*, 2016)

2.3 Proteases

As proteases são enzimas hidrolíticas que catalisam a clivagem de ligações peptídicas em proteínas ou fragmento de proteínas (peptídeos). As proteases são importantes em muitos processos biológicos, incluindo a digestão de proteínas de alimentos, reciclagem de proteínas intracelulares, a cascata de coagulação sanguínea, a apresentação de antígeno e a ativação de uma grande variedade de proteínas, incluindo outras enzimas, hormônios peptídicos e neurotransmissores. Essas enzimas são amplamente aplicadas na indústria alimentícia (exemplos: panificação, bebidas, laticínios, processamento de carne, suplementos dietéticos), farmacêutica (exemplos: produção de trombolíticos, auxiliar em digestão e cicatrização de feridas), cosmética (exemplos: limpeza profunda da pele, cicatrização e tratamento depilatório), têxtil (exemplos: tratamento de couro, lã e seda), fotográfica (exemplo: recuperação de prata), de produtos de limpeza (exemplos: detergentes e soluções de higienização de lentes de contatos, materiais cirúrgicos e membranas filtrantes) e na química fina (exemplos: produção de insulina humana semissintética, síntese de di- e tripeptídeos) (SANTOS *et al.*, 2016).

Os micro-organismos são responsáveis por cerca de dois terços da produção de proteases comerciais no mundo. As proteases microbianas para uso industrial são produzidas, principalmente, por bactérias do gênero *Bacillus* e fungos filamentosos do gênero *Aspergillus* (MOJSOV, 2012). A **Tabela 1** apresenta as principais espécies microbianas reconhecidas como produtoras comerciais de proteases alcalinas.

Tabela 1: Principais micro-organismos produtores de proteases alcalinas de interesse industrial.

GÊNEROS	ESPÉCIES
<i>Bacillus</i>	<i>B. alcalophilus</i> , <i>B. amyloliquefaciens</i> , <i>B. circulans</i> , <i>B. coagulans</i> , <i>B. firmus</i> , <i>B. intermedius</i> , <i>B. lentus</i> , <i>B. licheniformis</i> , <i>B. proteolyticus</i> , <i>B. pumilus</i> , <i>B. sphaericus</i> , <i>B. stearothermophilus</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>B. thuringiensis</i> e diferentes cepas de <i>Bacillus</i> sp.
<i>Aspergillus</i>	<i>A. candidus</i> , <i>A. flavus</i> , <i>A. fumigatus</i> , <i>A. mellius</i> , <i>A. niger</i> , <i>A. oryzae</i> , <i>A. sojae</i> , <i>A. sulphureus</i> , <i>A. sydowi</i> e diferentes cepas de <i>Aspergillus</i> sp.
Outros	<i>Clostridium</i> sp., <i>Cryphonectria parasitica</i> , <i>Kluyveromyces lactis</i> , <i>Mucor michei</i> , <i>Rhizomucor miehei</i> , <i>Rhizopus niveus</i> , <i>Streptococcus</i> sp., <i>Serratia</i> sp.

Fonte: SANTOS *et al.* 2016.

Nos últimos anos, um grande número de fungos tem sido estudado para produção de proteases utilizando diferentes tipos de substratos por meio de fermentação submersa (FS) ou fermentação em estado sólido (FES). Dentre os principais gêneros estudados estão *Penicillium*, *Rhizopus*, *Mucor*, *Humicola*, *Thermoascus*, *Thermomyces* e *Aspergillus*. O gênero *Aspergillus* tem sido estudado para produção de proteases devido a sua capacidade de secretar níveis elevados de enzimas no seu ambiente de crescimento. *Aspergillus oryzae*, por exemplo, é uma espécie interessante para produção de proteases por FES já que é capaz de crescer em diferentes meios sólidos. A produção de proteases por *Aspergillus oryzae* em FES já foi estudada em farelo de trigo, farelo de arroz, farinha de soja e bagaço, dentre outros. Além disso, esse fungo é considerado GRAS (*Generally Recognized as Safe*), sendo este utilizado em diversos processos alimentícios, como na produção de “sake” (HÖLKER & LENZ, 2005; SOUZA *et al.*, 2015).

2.3.1 Proteases em detergentes

O primeiro detergente a utilizar enzimas foi o Burnus[®] (1914), criado por dois pesquisadores alemães, Rohm e Haas, que continha proteases produzidas por pâncreas de animais. Já o primeiro detergente a utilizar enzimas de origem bacteriana surgiu somente 42 anos depois, nomeado Bio-40[®] (GUPTA *et al.*, 2002). Porém, o mercado de detergentes enzimáticos despontou a partir dos anos 1960. As empresas Biotex, Denmarkunder Biotex, Novozymes e Novo Nordisk começaram a comercializar um poderoso detergente contendo em sua composição a alcalase,

uma protease alcalina. Após meados dos anos 1960, o mercado foi impulsionado pelo uso de *pools* de diferentes enzimas na composição de detergentes, tornando estes produtos ainda mais eficientes. Nos últimos 30 anos, as proteases deixaram de ser pequenos aditivos e se tornaram ingredientes chave na composição de detergentes (RAY, 2012).

As enzimas presentes nos detergentes degradam a sujeira, enquanto os surfactantes removem essa sujeira degradada. O uso de enzimas em detergentes possibilita a diminuição do uso de produtos químicos, como solventes e substâncias cáusticas, tornando esses produtos menos agressivos ao usuário e ao meio ambiente. As proteases consideradas ideais para aplicação em detergentes devem possuir uma ampla atuação sobre diversos substratos, facilitando a remoção de resíduos de diferentes tipos de alimentos, sangue e outras secreções corporais (SINHA *et al.*, 2012; RAY, 2012). Além disso, o detergente necessita de proteases com atividade em condições de alcalinidade e em uma ampla faixa de temperatura. A compatibilidade das enzimas com os componentes do detergente (surfactantes, perfumes e branqueadores), a eficiência na remoção das manchas, boa estabilidade para tempo de prateleira e boa atividade na temperatura de lavagem a quente devem ser consideradas na seleção de proteases com possibilidade de aplicação em detergentes (SANTOS *et al.*, 2016).

2.4 Detergentes enzimáticos

O uso de enzimas em produtos de limpeza é cada vez maior. O aumento na eficiência de limpeza desses produtos e a questão da sustentabilidade impulsionam a aplicação de enzimas no nesse setor. Nos últimos 20 anos, o mercado de enzimas em detergentes cresceu quase 10 vezes (RAY, 2012).

Os detergentes contendo enzimas são utilizados na limpeza domiciliar e também hospitalar. Para a aplicação hospitalar, surge a definição de detergente enzimático que, segundo a ANVISA (Resolução da Diretoria Colegiada - RDC Nº 55, 2012), é um “produto cuja formulação contém, além de um tensoativo, pelo menos uma enzima hidrolítica da subclasse das proteases EC 3.4, podendo ser acrescida de outra enzima da subclasse das amilases EC 3.2 e de demais componentes complementares da formulação, inclusive de enzimas de outras subclasses, tendo

como finalidade remover a sujidade clínica e evitar a formação de componentes insolúveis na superfície desses dispositivos”.

Diversos detergentes enzimáticos são encontrados no mercado e a eficácia destes é de grande importância para o combate a contaminação hospitalar. Segundo a ANBIO (Associação Nacional de Biossegurança), a infecção hospitalar é causa de 100 mil mortes por ano no Brasil. Riozyme, Neozime, Cleanzyme, Lapzyme 4, 3M multienzimático e diversos outros são encontrados no mercado brasileiro. Os preços dos detergentes enzimáticos (1L) chegam a variar de 30 reais (Icazyme – Icaraí do Brasil) a 150 reais (3M multienzimático – 3M) (PRIME CIRÚRGICA, 2016).

Os detergentes enzimáticos necessariamente devem conter proteases, porém outras enzimas hidrolíticas como amilases, celulasas e lipases também são encontradas nesses produtos. As amilases (EC 3.2) são enzimas capazes de catalisar a hidrólise do amido. Já as celulasas catalisam a clivagem de celulose. E, por fim, as lipases (EC 3.1) são capazes de catalisar a clivagem de ligações ésteres de lipídeos (BRASIL, 2003).

2.5 Monitoramento tecnológico

O monitoramento tecnológico consiste no acompanhamento da evolução dos fatos e na identificação dos fatores portadores de mudanças, realizados de forma sistemática e contínua. Monitorar significa observar, checar e atualizar-se em relação aos desenvolvimentos numa área de interesse bem definida (OLIVEIRA, 2014).

O monitoramento por meio de patentes tem se tornado uma potente ferramenta para a tomada de decisão da indústria e para o direcionamento de pesquisas acadêmicas. Dados obtidos de documentos de patente permitem: mapear a evolução da tecnologia, identificar novos mercados (protegidos ou não), identificar tecnologias emergentes, prever novos produtos e processos, identificar fontes de licenciamento para a tecnologia, entre outros aspectos (OLIVEIRA, 2014). Entretanto, a utilização de patentes como indicadores tecnológicos apresenta vantagens e desvantagens, sendo apresentadas algumas na **Tabela 2**.

Tabela 2: Vantagens e desvantagens do uso dos documentos de patente como indicadores tecnológicos. (Fonte: ARCHIBUGI, 1992; ERNST, 1997)

VANTAGENS	DESVANTAGENS
Cobertura Mundial	Nem todas as invenções são
	patenteadas
Formato praticamente universal	Somente parte das invenções
	patenteadas se torna inovações
Ampla cobertura temporal	Cada escritório nacional é
	independente em suas decisões
Facilidade de acesso às informações	Processamento demorado e custoso
Separação das invenções em campos	Sigilo de 18 meses entre o depósito e a
tecnológicos	publicação
Fonte exclusiva de divulgação de	Propensão ao patenteamento é
informações tecnológicas	diferente dependendo do setor
	industrial

A utilização de informações de documentos de patentes mede tanto o progresso tecnológico quanto o mercado de uma tecnologia em particular. No caso de empresas de biotecnologia, a proteção à propriedade intelectual ocupa lugar de destaque, já que os investimentos em pesquisa e desenvolvimento (P&D) das indústrias desse seguimento são altos. Em comparação com outras indústrias, como a indústria química e a farmacêutica, as companhias de biotecnologia investem entre 40 e 50% da sua receita em P&D, enquanto as duas primeiras investem em torno de 5% a 13%, respectivamente (BURRONE, 2006; DAIHA, 2015).

3 OBJETIVO

3.1 Objetivos gerais

Investigar o uso de enzimas hidrolíticas, em especial proteases na composição de detergentes enzimáticos especiais e realizar a análise de patentes referentes à aplicação de proteases em detergentes e composições de limpeza utilizando documentos de patente.

3.2 Objetivos específicos

- Monitoramento Tecnológico
 - a. Verificar a evolução temporal do número de documentos de patente relacionados à aplicação de proteases em composições de limpeza;
 - b. Apontar a provável origem da tecnologia em estudo e os principais mercados potencialmente protegidos;
 - c. Mapear as principais instituições depositantes no Brasil e no mundo;
 - d. Verificar os principais aspectos das patentes através das Classificações Internacionais de Patentes (CIP) que mais aparecem nos documentos analisados.

- Produção e caracterização de enzimas hidrolíticas obtidas por FES
 - a. Utilizar resíduos da indústria do dendê para produção de enzimas hidrolíticas para formulação de detergentes enzimáticos especiais por fermentação em estado sólido (FES) usando o fungo filamentoso *Aspergillus oryzae*;
 - b. Determinar as atividades enzimáticas das enzimas hidrolíticas e comparar com as enzimas de detergentes enzimáticos comerciais utilizados em hospitais;
 - c. Determinar a estabilidade térmica das enzimas produzidas e comparar com as enzimas de detergentes enzimáticos comerciais;
 - d. Verificar a compatibilidade das enzimas produzidas com a formulação dos detergentes enzimáticos comerciais e determinar a estabilidade térmica frente a essas formulações.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Monitoramento Tecnológico

Inicialmente, deve-se destacar que o monitoramento tecnológico teve como foco as enzimas proteases aplicadas em detergentes e outras composições de limpeza. Nas buscas de patentes foram utilizadas palavras-chave e a Classificação Internacional de Patentes (CIP) combinadas pelo uso de operadores booleanos, sem nenhuma limitação de período temporal. A CIP classifica os documentos de patente de acordo com seu conteúdo técnico. O sistema consiste na divisão do conhecimento técnico em oito sessões, os quais são subsequentemente divididos em níveis hierárquicos (classes, subclasses, grupos e subgrupos) (WIPO, 2016).

O trabalho se dividiu nas seguintes etapas:

- 1º) Análise da literatura para seleção de palavras-chave;
- 2º) Seleção de códigos da Classificação Internacionais de Patentes (CIP);
- 3º) Elaboração e validação de uma estratégia de busca;
- 4º) Leitura do título e resumo para refino dos resultados;
- 5º) Análises.

O Orbit[®], uma plataforma de busca de patentes privada que cobre mais de 100 autoridades de patentes, foi escolhido para o presente trabalho. A busca de patentes foi realizada entre junho e julho de 2016.

A estratégia de busca foi baseada em códigos da Classificação Internacional de Patentes (CIP) e palavras-chave relacionadas ao campo de interesse, ou seja, aplicação de proteases em composições de limpeza, as quais foram escolhidas através da leitura de artigos científicos da área. As palavras selecionadas foram os sinônimos: *protease*, *peptidase*, *proteinase* e *proteolytic enzyme*; *enzymatic detergent* e *cleaning composition*. A subclasse C11D é a que melhor se relaciona ao tema de busca e refere-se à composição de detergentes, uso de substâncias isoladas como detergentes, sabão ou fabricação do sabão, sabões de resina, recuperação do glicerol (INPI, 2016). Os subgrupos C11D 3/386 e C11D 7/42 foram escolhidos por se referirem a preparações de contendo enzimas. A **Tabela 3** apresenta a descrição desses subgrupos.

Tabela 3: Descrição dos subgrupos de C11D relacionados ao tema de busca.

SUBSEÇÃO	DESCRIÇÃO
C11D 3/00	Outros ingredientes de composição abrangidas no grupo C11D 1/00
.C11D 3/16	Compostos orgânicos
..C11D 3/38	Produtos em que a composição não é bem definida
... C11D 3/386	Preparações contendo enzimas
C11D 7/00	Composição de detergentes baseadas essencialmente em compostos não tensoativos
.C11D 7/22	Compostos orgânicos
..C11D 7/40	Produtos em que a composição não é bem definida
... C11D 7/42	Preparações contendo enzimas

Fonte: WIPO (2016)

A estratégia de busca de patentes utilizada foi a seguinte:

((PROTEASE OR PEPTIDASE OR PROTEINASE OR (PROTEOLYTIC ENZYME))/TI/AB/IW AND (DETERGENT? OR CLEAN+)/TI/AB/IW) AND ((C11D-003/386)/IPC OR (C11D-007/42)/IPC)

Na estratégia foram utilizados os seguintes operadores booleanos, caracteres de truncamento e códigos disponíveis no Orbit[®]:

AND: Ambos os termos de busca presente;

OR: Opcionalmente um ou outro termo de busca presente;

?: Símbolo de truncamento de até mais um caractere;

+: Símbolo de truncamento de qualquer número de caracteres;

TI: Busca dos termos no título das patentes;

AB/IW: Busca dos termos no resumo das patentes.

O operador AND é utilizado para que nos resultados esteja presente um termo e o outro necessariamente. Já com o operador OR, os resultados recuperados devem conter um termo ou o outro. O truncamento com o símbolo “?” na palavra *detergent* foi utilizado para que nos resultados recuperados também fossem incluídos os documentos que continham a palavra no plural (*detergents*). Já o símbolo “+” foi usado para recuperar os documentos que apresentavam a palavra *cleaning*.

Os documentos encontrados tiveram seu título e resumo analisados, a fim de excluir aqueles que não tinham ligação com o escopo da pesquisa. Em seguida, foram realizadas as análises desejadas utilizando ferramentas do próprio Orbit®.

4.2 Produção de enzimas hidrolíticas por FES

4.2.1 Micro-organismo

Foi utilizado o fungo *Aspergillus oryzae*. Para obtenção dos esporos, o fungo foi propagado em estufa por 4 dias a 30°C, em meio PDA (Potato Agar Dextrose). Os esporos foram suspensos em água destilada e Tween 80 (0,1%) com auxílio de agitador magnético. A concentração de esporos foi determinada através de contagem em microscópio óptico utilizando câmara de Neubauer.

4.2.2 Fermentação em Estado Sólido (FES)

Foram utilizados reatores do tipo bandeja (19,6 cm x 30,5 cm x 3 cm) contendo como meio de cultivo 175 g de torta e 75 g de fibra de dendê. Como inóculo foram utilizados 10^7 esporos /g de massa seca de meio, obtidos conforme descrito no item 4.2.1. A fermentação foi conduzida por 72 horas em câmara climática a 30°C e 90% de umidade.

4.2.3 Obtenção do extrato enzimático

Ao final da fermentação, a extração das enzimas foi feita com 10 mL de água destilada para cada grama de PES (produto enzimático sólido) obtido. A extração foi realizada em agitador rotatório a 37°C e 200 rpm por 30 minutos. Posteriormente, o rejeito fermentado foi prensado manualmente para a obtenção do extrato enzimático bruto, o qual foi centrifugado a 8000 rpm por 10 minutos para remoção de sólidos finos. O sobrenadante foi denominado *pool* enzimático e utilizado para determinação das atividades enzimáticas e testes posteriores.

4.2.4 Determinação das atividades enzimáticas

Foi realizada a determinação das atividades enzimáticas das enzimas hidrolíticas obtidas através da FES e de dois detergentes enzimáticos comerciais para comparação, o detergente 3M multienzimático (3M) e o Lapzyme 4 (LGR Indústria e Comércio de Produtos de Limpeza).

- Detergente 3M multienzimático

Fabricação: fevereiro de 2016 (validade: 24 meses)

Composição: xileno sulfonato de sódio, protease, amilase, lipase, celulase, sal de tetrassódio, conservantes, álcool alcoxilado (7,3%), alquil poliglicosídeo (0,03%), pirrolidona (0,1%) e solventes.

Atividade proteolítica mínima: 0,11 U/mL

Atividade amilolítica mínima: 0,09 U/mL

- Lapzyme 4

Fabricação: fevereiro de 2015 (validade: 24 meses)

Composição: Protease, amilase, celulase e lipase, álcool etoxilado (0,4%), alquilpoliglicosídeo (2,1%), estabilizantes, coadjuvantes, conservantes, corantes e água.

Atividade proteolítica mínima: 0,13 U/mL

Atividade amilolítica mínima: 0,02 U/mL

4.2.4.1 Atividade proteolítica

A atividade proteolítica foi determinada incubando-se 0,5 mL de solução de azocaseína com 50 µL de extrato enzimático por 5 minutos a 50°C. Imediatamente após esse tempo, foi adicionado 1 mL de solução HCl 1M a fim de parar a reação enzimática. As amostras foram então centrifugadas por 2 minutos a 10000 rpm e a absorvância dos sobrenadantes lida a 345 nm. A unidade de atividade proteolítica (U) foi definida como o aumento no número de unidades de absorvância por minuto, conforme mostrado pela Equação 4.1.

$$A_P = \frac{Abs \times F_d}{t \times V_a} \quad (\text{Equação 4.1})$$

Onde:

A_P = atividade proteolítica (U/mL)

Abs = absorvância a 345 nm

F_d = fator de diluição

t = tempo (min)

V_a = volume de extrato enzimático (mL)

4.2.4.2 Atividade amilolítica

A atividade amilolítica foi determinada incubando-se 90 µL de solução de amido 1% com 10 µL de extrato enzimático por 5 minutos a 50°C. Imediatamente após esse tempo, foram adicionados 0,3 mL de ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) e as amostras foram levadas a banho-maria a 100°C por 5 minutos. Em seguida, foi adicionado 1 mL de água destilada em cada amostra e a absorvância foi lida a 540 nm. Uma unidade de atividade amilolítica (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1,0 µmol de glicose por minuto nas condições de ensaio. O cálculo da atividade enzimática é feito pela Equação 4.2:

$$A_A = \frac{Abs \times F \times V_f \times F_d}{t \times V_a} \quad (\text{Equação 4.2})$$

Onde:

A_A = atividade amilolítica (U/mL)

Abs = absorvância a 540 nm

F = fator (µmol de glicose / mL)

V_f = volume final do meio reacional (mL)

t = tempo (min)

V_a = volume de extrato enzimático (mL)

F_d = fator de diluição

4.2.4.3 Atividade celulolítica

A atividade celulolítica foi determinada incubando-se 90 µL de solução de carboximetilcelulose (CMC) 2% com 10 µL de extrato enzimático por 5 minutos a 50°C. Imediatamente após esse tempo, a reação foi parada levando o sistema a banho-maria a 100°C por 5 minutos. Em seguida, foram adicionados 1 mL do reativo GOD-POD (glicose oxidase – peroxidase) e o sistema foi levado a banho-maria a 40°C por 10 minutos. Por fim, a absorvância foi lida a 505 nm. Uma unidade de atividade celulolítica (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1,0 µmol de glicose por minuto nas condições de ensaio. O cálculo da atividade enzimática é feito pela Equação 4.3:

$$A_C = \frac{Abs \times F \times V_f \times F_d}{t \times V_a} \quad (\text{Equação 4.3})$$

Onde:

A_C = atividade amilolítica (U/mL)

Abs = absorvância a 505 nm

F = fator (μmol de glicose / mL)

V_f = volume final do meio reacional (mL)

t = tempo (min)

V_a = volume de extrato enzimático (mL)

F_d = fator de diluição

4.2.4.4 Atividade lipásica

A atividade lipásica foi medida pelo método espectrofotométrico, que se baseia na formação de um produto cromóforo (*p*-nitrofenol) a partir da reação de hidrólise do *p*-nitrofenil laurato catalisada por lipases. A solução do substrato foi preparada utilizando-se 0,25 mL de *p*-nitrofenil laurato 2,5 mM em Acetonitrila:DMSO (1:1) e 2,2 mL de tampão acetato de sódio 25 mM pH 6,0. A reação enzimática foi iniciada pela adição de 50 μL do extrato enzimático e conduzida a 50°C. A formação do *p*-nitrofenol foi acompanhada em tempo real em espectrofotômetro a 412 nm. Uma unidade de atividade lipásica (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para hidrolisar 1,0 μmol de *p*-nitrofenol por minuto nas condições de ensaio. O cálculo da atividade enzimática é feito pela Equação 4.4:

$$A_L = \frac{(\alpha \times F \times V_f) \times F_d}{V_a} \quad (\text{Equação 4.4})$$

Onde:

A_L = atividade lipásica (U/mL)

α = coeficiente angular da reta Abs x tempo

F = fator (μmol de *p*-nitrofenol / mL)

V_f = volume final do meio reacional (mL)

V_a = volume de extrato enzimático (mL)

F_d = fator de diluição

4.2.5 Planejamento experimental: estudo da influência do pH e da temperatura na atividade proteolítica do extrato enzimático

Para verificar a influência do pH e da temperatura na atividade proteolítica das enzimas produzidas na FES pelo *Aspergillus oryzae* foi realizado um planejamento experimental, variando o pH de 5,0 a 9,0 e a temperatura de 20 a 60°C, sendo realizados 11 ensaios, como apresentados na **Tabela 4**. Os resultados foram analisados estatisticamente no software Statistica 7.0[®]. O gráfico de pareto e curva de contorno foram construídos neste mesmo software.

Tabela 4: Matriz de planejamento experimental com valores e variáveis codificadas.

Ensaio	Temperatura (°C)	pH
1	26 (-1)	5,6 (-1)
2	54 (1)	5,6 (-1)
3	26 (-1)	8,4 (1)
4	54 (1)	8,4 (1)
5	20 (-1,41)	7,0 (0)
6	60 (1,41)	7,0 (0)
7	40 (0)	5,0 (-1,41)
8	40 (0)	9,0 (1,41)
9	40 (0)	7,0 (0)
10	40 (0)	7,0 (0)
11	40 (0)	7,0 (0)

4.2.6 Estabilidade térmica das enzimas

O efeito da temperatura na atividade das enzimas do extrato enzimático e dos detergentes comerciais foi determinado incubando-os em diferentes temperaturas (30, 40, 50 e 60°C para proteases; 40 e 50°C para amilases, celulasas e lipases) e acompanhando a atividade enzimática com o tempo. A atividade de cada enzima foi determinada conforme descrito no item 4.2.4., sendo a atividade no instante zero definida como sendo 100%. Em intervalos de tempo pré-determinados, a atividade enzimática foi medida e expressa em porcentagens da atividade inicial.

4.2.7 Atividade proteolítica do extrato enzimático frente a diferentes detergentes

Foi investigado o efeito de detergentes enzimáticos (3M e Lapzyme 4), industriais (Tween 80 e Triton X 100) e comerciais (Limpol e Ypê) sobre a atividade proteolítica do extrato enzimático. Inicialmente, as enzimas dos detergentes

enzimáticos e comerciais foram inativadas incubando-os a 100°C por 5 minutos. O extrato enzimático em diferentes concentrações (1, 5, 10 e 20% v/v) foi então incubado com os detergentes por 1h a 37°C e, em seguida, a atividade proteolítica foi determinada como descrito no item 4.2.4.1. A atividade proteolítica do extrato enzimático incubado com água deionizada nas diferentes concentrações foi definida como sendo 100% e as demais atividades foram expressas com relação a ela.

4.2.8 Estabilidade térmica das proteases do extrato enzimático frente aos detergentes enzimáticos comerciais

Foi verificado o efeito da temperatura na atividade das proteases do extrato enzimático frente à composição dos detergentes enzimáticos 3M e Lapzyme 4. Inicialmente, as enzimas dos detergentes enzimáticos foram inativadas incubando-os a 100°C por 5 minutos. O extrato enzimático, em uma concentração 10% v/v, foi então incubado com os detergentes enzimáticos comerciais nas temperaturas 40 e 50°C. A atividade proteolítica foi medida, em intervalos de tempo pré-determinados, como descrito no item 4.2.4.1. A atividade proteolítica no instante zero foi definida como sendo 100% e as demais atividades foram expressas em porcentagens da atividade inicial.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Monitoramento tecnológico

A busca de patentes relacionadas ao uso de proteases em detergentes e produtos de limpeza foi realizada em junho e julho de 2016, na plataforma Orbit[®], sem corte temporal. A estratégia utilizada resultou em 1089 documentos e, após análise de títulos e resumos, foram selecionados 919 documentos relacionados ao escopo da pesquisa. Essas patentes foram analisadas utilizando as ferramentas de análise do próprio Orbit[®] e as informações obtidas foram exportadas para o Excel para a confecção dos gráficos.

A **Figura 1** mostra a evolução temporal do depósito de patentes relacionadas a proteases aplicadas em detergentes e composições de limpeza considerando a primeira data de publicação.

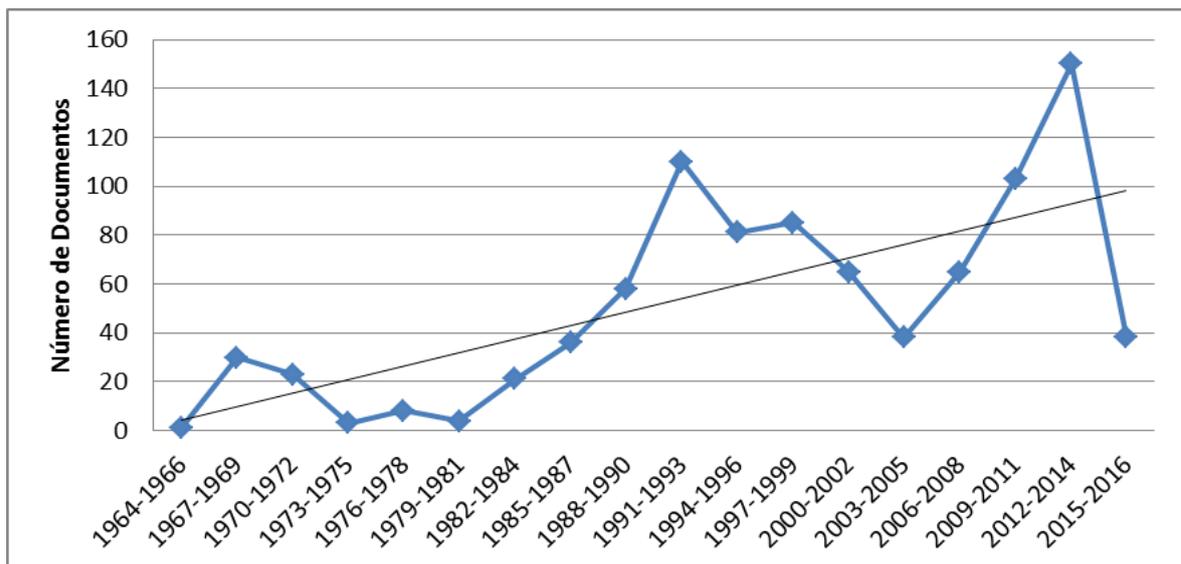


Figura 1: Evolução temporal do depósito de patentes de proteases aplicadas em detergentes e composições de limpeza considerando a primeira data de publicação.

O primeiro depósito encontrado é de 1966 e trata da composição de um detergente contendo 0,005% a 4% de protease, sendo o depositante a Procter & Gamble (P&G), empresa global que oferece produtos de bens de consumo nas áreas de higiene pessoal, beleza e limpeza doméstica (PROCTER & GAMBLE, 2016). Vale relembrar que o primeiro detergente a utilizar enzimas, Burnus[®], é datado do ano de 1914. Por volta dos anos 1970, o mercado retrocedeu um pouco

devido às reações alérgicas que alguns desses produtos provocaram em seus consumidores, problema que foi posteriormente resolvido com a introdução de produtos encapsulados (GUPTA *et al.*, 2002).

Observando ainda a Figura 1, pode-se perceber uma tendência ao aumento do número de depósitos a partir de 1990, impulsionada pelo estudo de proteases mais estáveis e pelo uso de engenharia genética. Há uma queda no número de depósitos entre 2003 e 2005 (38 documentos), sendo o total de depósitos quase a metade do período anterior (65 documentos em 2000-2002). Essa queda pode ser um indicativo do início da crise mundial de 2008, já que em períodos de crise os recursos existentes são destinados aos setores essenciais da economia, diminuindo assim os avanços em tecnologias não essenciais, na qual pode-se incluir o aperfeiçoamento de produtos de limpeza. É importante ressaltar que a queda no número de depósitos no período 2015-2016 pode ser explicada pelo período de sigilo.

Para se verificar a provável origem da tecnologia é utilizado o país onde ocorre o primeiro depósito da patente, denominado pedido de prioridade (OLIVEIRA, 2014). A **Figura 2** apresenta o número de depósitos por país considerando o pedido de prioridade.

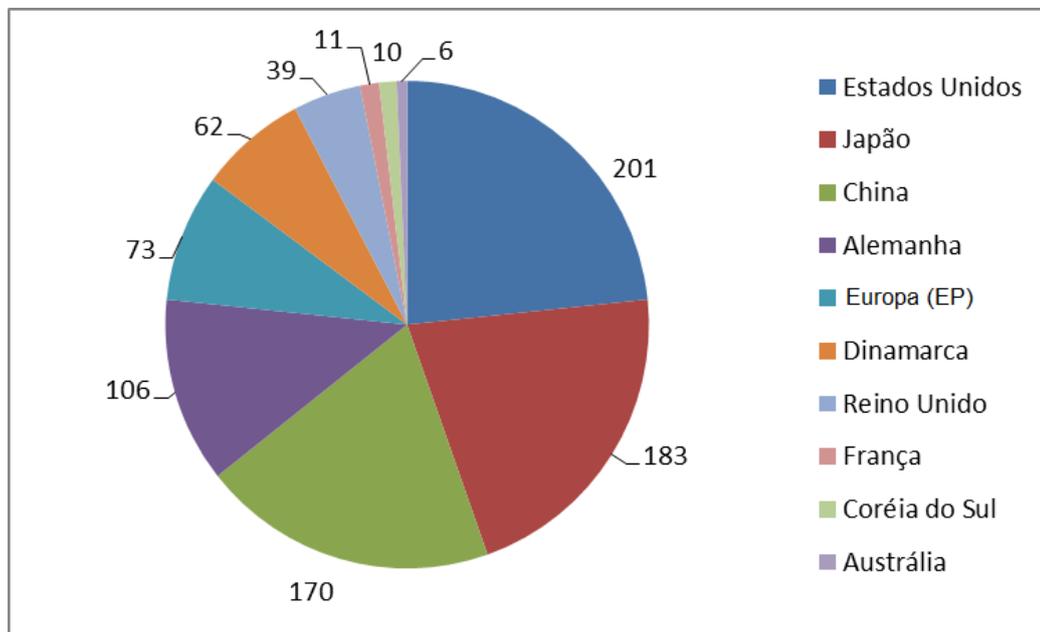


Figura 2: Número de depósitos por país de pedidos de patente de proteases aplicadas em detergentes e composições de limpeza considerando o pedido de prioridade (Top 10).

Analisando a Figura 2, pode-se perceber que a origem da tecnologia de aplicação de proteases em detergentes e composições de limpeza em questão é

dominada por Estados Unidos, Japão e China. Dentre os documentos analisados, foram encontrados somente dois pedidos de prioridade brasileiros, cujos depositantes são a Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) e Godoy Morais Titane, com primeira data de publicação em 2004 e 2009, respectivamente.

Na Figura 2 pode-se observar que há uma divisão dos documentos em países europeus, como Dinamarca, Reino Unido e França, porém também há um grupo de documentos da Europa (EP), esses documentos são os documentos depositados no EPO (*European Patent Office*).

Os principais mercados potencialmente protegidos são apresentados na **Figura 3**. Essa análise foi feita considerando o número total de documentos por país e é possível observar a liderança de Japão, Estados Unidos e China. Estes são os mesmos países responsáveis pela origem da tecnologia em estudo, como visto na Figura 2, porém, é importante ressaltar a inversão de posição entre Japão e Estados Unidos. O Brasil aparece na oitava colocação com 141 documentos. De um total de 919 documentos de patente, 85% não foram depositados no Brasil, até o momento atual.

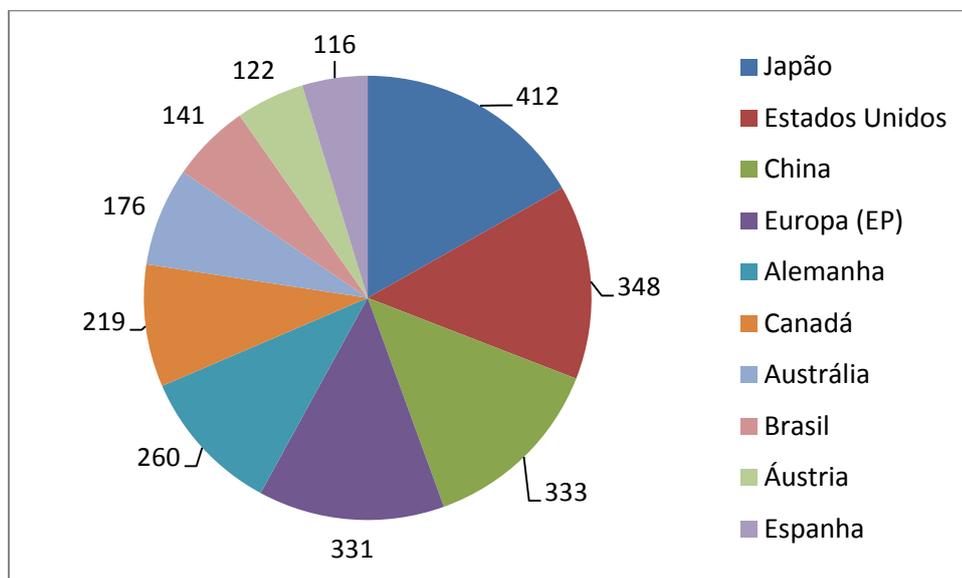


Figura 3: Número total de documentos por país de pedidos de patente de proteases aplicadas em detergentes e composições de limpeza (Top 10).

A análise das principais instituições depositantes também foi realizada, sendo apresentada na **Figura 4**.

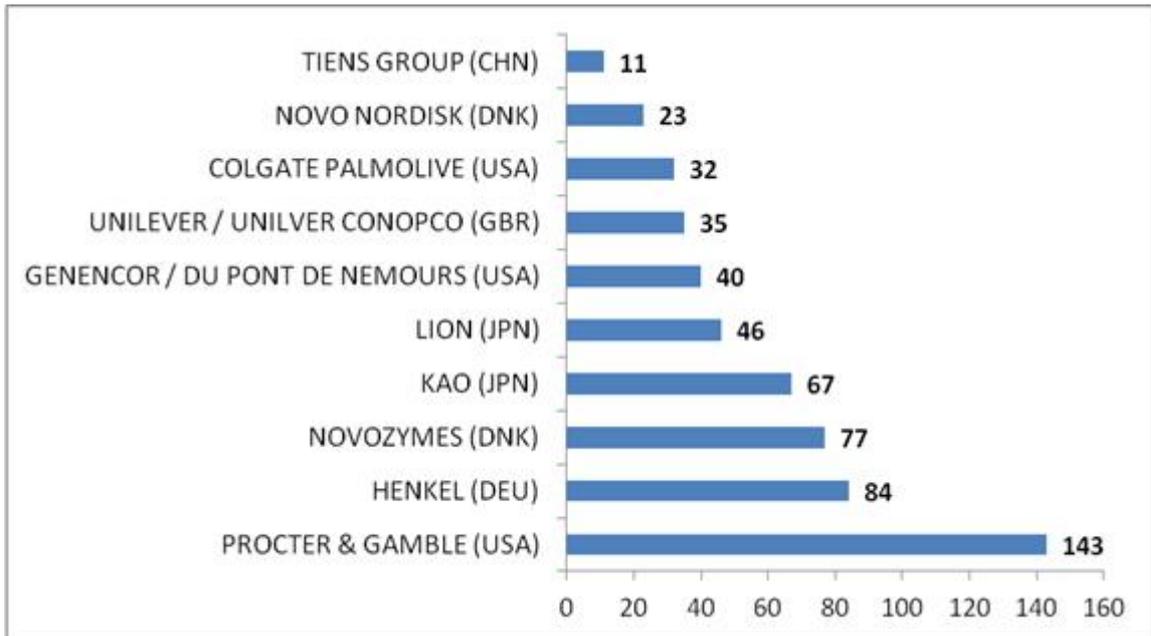


Figura 4: Principais instituições depositantes de pedidos de patente de proteases aplicadas em detergentes e composições de limpeza (Top 10).

As dez empresas que aparecem na Figura 4 são detentoras de 58% dos documentos de patentes relacionados a proteases aplicadas em detergentes e composições de limpeza.

A Procter & Gamble é a empresa com maior número de depósitos, sendo também a empresa responsável pelo primeiro depósito referente a proteases aplicadas em detergentes e composições de limpeza encontrado nessa pesquisa como discutido anteriormente.

A empresa Henkel aparece em segundo lugar com 84 documentos. Esta empresa opera no mundo todo com três áreas de negócio: tecnologia em adesivos, cosméticos e detergentes e produtos de limpeza. No mercado brasileiro, a empresa atua há 60 anos, possui três fábricas e conta com mais de 900 profissionais, sendo a atuação setor de adesivos (HENKEL, 2016).

A terceira empresa com maior número de documentos é a Novozymes, que foi desmembrada da Novo Nordisk, que aparece na oitava posição em número de documentos, em 2000. A Novozymes é líder mundial no segmento de enzimas industriais e bioinovação, detendo mais de 47% do mercado global. A empresa tem produtos comercializados em 130 países e usados por diversas indústrias como a de bebidas, alimentícias, de panificação, de detergentes, têxtil, de biocombustíveis, entre outras. (NOVOZYMES, 2016).

Para os 141 documentos depositados no Brasil também foi realizada a análise dos principais depositantes. A **Figura 5** apresenta os seis principais depositantes no Brasil de patentes relacionadas a proteases aplicadas em detergentes e composições de limpeza.

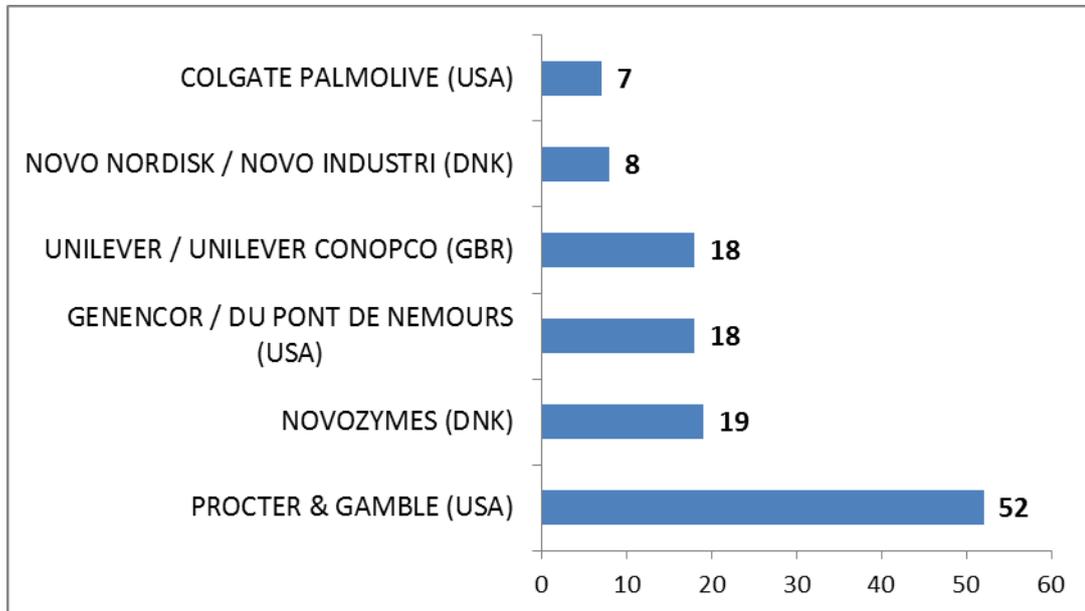


Figura 5: Principais instituições depositantes no Brasil de pedidos de patente de proteases aplicadas em detergentes e composições de limpeza (Top 6).

No Brasil, 37% foram depositados pela empresa Procter & Gamble, que também lidera os depósitos no mundo. A Novozymes aparece em segundo lugar, sendo a terceira em número de documentos no mundo.

Em terceiro lugar no número de depósitos no Brasil estão a Unilever e Genencor - Du Pont, com 18 documentos. A Unilever é uma companhia anglo-holandesa que produz bens de consumo em 190 países, nas categorias de cuidados pessoais, alimentos, limpeza e bebidas de soja e sorvetes e alimentação fora do lar e possui 9 fábricas no Brasil (UNILEVER, 2016). A Genencor - Du Pont desenvolve soluções baseadas em biotecnologia usando enzimas, micro-organismos, peptídeos e proteínas inovadores (DU PONT, 2016).

Uma forma de verificar superficialmente o conteúdo dos documentos de patente analisados consiste na identificação das principais subclasses da Classificação Internacional de Patentes (CIP) relacionadas aos documentos analisados (OLIVEIRA, 2014). As principais subclasses encontradas nos documentos são mostradas na **Figura 6**.

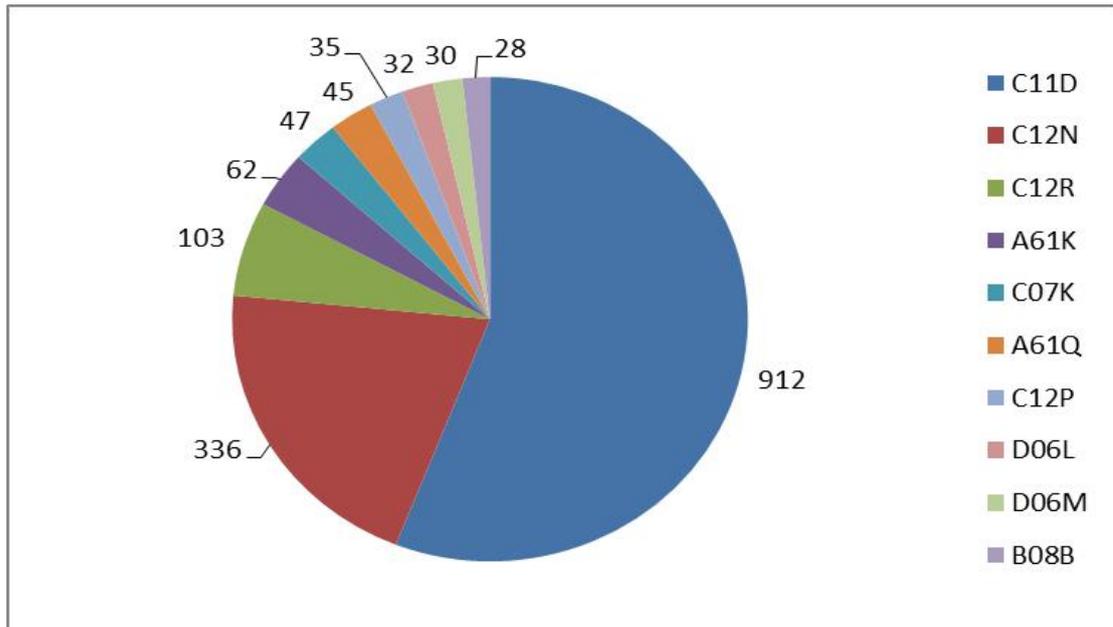


Figura 6: Principais subclasses da CIP encontradas nos documentos da aplicação de protease em detergentes e composições de limpeza.

A **Tabela 5** apresenta a descrição das cinco principais subclasses da CIP encontradas nos documentos analisados.

Tabela 5: Descrição das principais subclasses da CIP encontradas nos documentos analisados (WIPO, 2016).

CIP	DESCRIÇÃO
C11D	<u>Composições de detergentes</u> ; uso de substâncias isoladas como detergentes; sabão ou fabricação do sabão; sabões de resina; recuperação do glicerol.
C12N	<u>Micro-organismo ou enzimas</u> ; suas composições (biocidas, repelentes ou atrativos de pestes, ou reguladores do crescimento de plantas contendo micro-organismos, vírus, fungos microbianos, enzimas, fermentados, ou substâncias produzidas por, ou extraídas de micro-organismos ou material animal A01N 63/00; preparados medicinais A61K; fertilizantes C05F). Propagação, conservação, ou manutenção de micro-organismos; engenharia genética ou de mutações; meios de cultura (meios de ensaio microbiológico C12Q 1/00).
C12R	Esquema de indexação associado às subclasses C12C-C12Q, relativo a micro-organismos.

A61K	<u>Preparações para finalidades médicas, odontológicas ou higiênicas</u> (dispositivos ou métodos especialmente adaptados para dar aos produtos farmacêuticos formas físicas determinadas ou para sua administração A61J 3/00; aspectos químicos de, ou uso de materiais para ataduras, curativos, almofadas absorventes ou artigos cirúrgicos A61L; composições saponáceas C11D).
C07K	<u>Peptídeos</u> (peptídeos contendo anéis de β -lactama C07D; dipeptídeos cíclicos não tendo em sua molécula qualquer outra ligação peptídica que não aquela que forma seu anel, p. ex. piperazina-2,5-dionas, C07D; alcaloides de ergot do tipo peptídeo cíclico C07D 519/02; proteínas de célula simples, enzimas C12N); processos de engenharia genética para obter peptídeos C12N 15/00)

Fonte: WIPO (2016)

A subclasse C11D refere-se à composição de detergentes e, portanto, os subgrupos C11D 3/386 e C11D 7/42 foram utilizados na estratégia de busca do presente trabalho, já que o foco são proteases direcionadas a aplicação em detergentes e composições de limpeza. Dessa maneira, a presença desta como principal CIP na maior parte dos documentos analisados era esperada.

As subclasses C12N e C12R aparecem porque estão relacionadas ao uso de micro-organismos e enzimas, sendo a aplicação de proteases o objetivo do estudo. Para uso industrial, as proteases são produzidas, principalmente, por espécies de bactérias do gênero *Bacillus* e por fungos filamentosos do gênero *Aspergillus* (MOJSOV, 2012). Isto pode ser exemplificado pela ocorrência da CIP C12N-009/54, referente a proteases produzidas por bactérias do gênero *Bacillus*, aparece em 185 dos 919 documentos analisados.

Composições de limpeza contendo proteases são utilizadas em materiais cirúrgicos para remoção de sangue e outros resíduos, isso justifica a subclasse A61K aparecer entre as mais encontradas. Vale destacar que os detergentes enzimáticos especiais têm como um dos setores de aplicação a limpeza hospitalar.

A subclasse C07K refere-se a peptídeos e aparece entre as mais encontradas nos documentos analisados, justamente, porque a enzima protease atua na clivagem de ligações peptídicas.

Na **Figura 7**, é possível observar o status legal dos 919 documentos analisados categorizando as patentes em concedidas, solicitadas, indeferidas, extintas e arquivadas. O número alto de patentes concedidas, 227, indica que a aplicação de proteases em detergentes e composições de limpeza é uma tecnologia consolidada. Ao mesmo tempo, o número de documentos solicitados, 195, indica que o interesse nessa tecnologia se mantém, sendo o foco atual a busca de enzimas mais estáveis e a formulação de produtos cada vez mais eficientes.

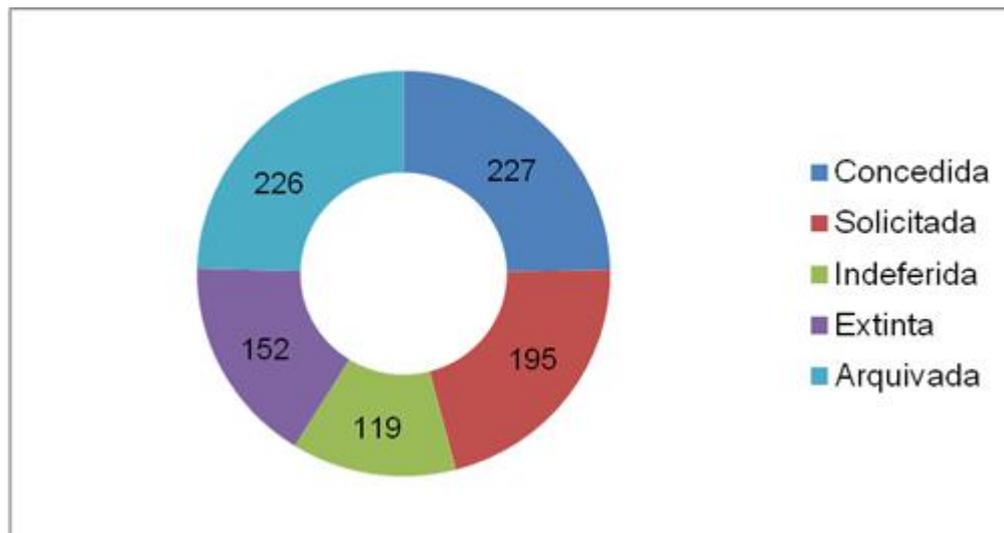


Figura 7: Status Legal das patentes analisadas.

5.2 Produção de enzimas hidrolíticas por FES

5.2.1 Estudo da influência do pH e da temperatura na atividade enzimática das proteases produzidas na FES

A atividade enzimática sofre efeito do pH e da temperatura e para cada enzima há um pH e uma temperatura ótimos. Com a finalidade de verificar em quais condições a atividade proteolítica das enzimas produzidas na FES pelo *Aspergillus oryzae* utilizando resíduos da indústria de dendê era maior, foi realizado um planejamento experimental variando temperatura (20 a 60°C) e pH (5,0 a 9,0), conforme mostrado na **Tabela 6**. A atividade proteolítica foi determinada como descrito no item 4.2.4.1 e as condições do ensaio 2 resultou na maior atividade proteolítica, 154,5 U/g (15,45 U/mL).

Tabela 6: Matriz de planejamento experimental (valores e variáveis codificadas) e suas respectivas respostas.

Ensaio	Temperatura (°C)	pH	Atividade proteolítica (U/g)
1	26 (-1)	5,6 (-1)	30,5
2	54 (1)	5,6 (-1)	154,5
3	26 (-1)	8,4 (1)	36,6
4	54 (1)	8,4 (1)	94,4
5	20 (-1,41)	7,0 (0)	21,4
6	60 (1,41)	7,0 (0)	123,0
7	40 (0)	5,0 (-1,41)	54,7
8	40 (0)	9,0 (1,41)	77,4
9	40 (0)	7,0 (0)	92,8
10	40 (0)	7,0 (0)	91,4
11	40 (0)	7,0 (0)	78,4

Utilizando o software Statistica 7.0[®], foram feitas as análises estatísticas dos resultados. Foram estimados os efeitos das variáveis estudadas assim como a interação entre elas. A **Figura 8** representa a forma gráfica das significâncias das variáveis. Considerando um nível de significância de 5% (valor de $p < 0,05$), é possível observar que a temperatura (termo linear – L) apresenta efeito significativo para a atividade proteolítica.

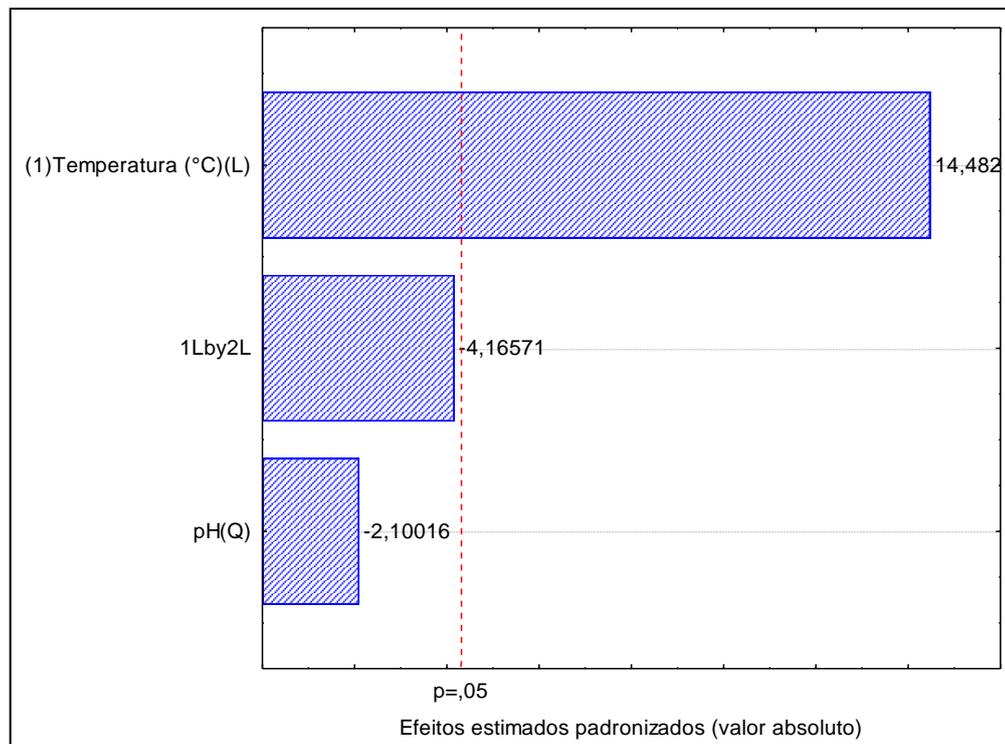


Figura 8: Gráfico de Pareto. Variáveis estatisticamente significativas para um intervalo de confiança de 95%.

Foi então construída uma curva de contorno para atividade proteolítica em função do pH e da temperatura, apresentada na **Figura 9**, a partir do modelo gerado pelo software de coeficiente de determinação (R^2) de 0,89931.

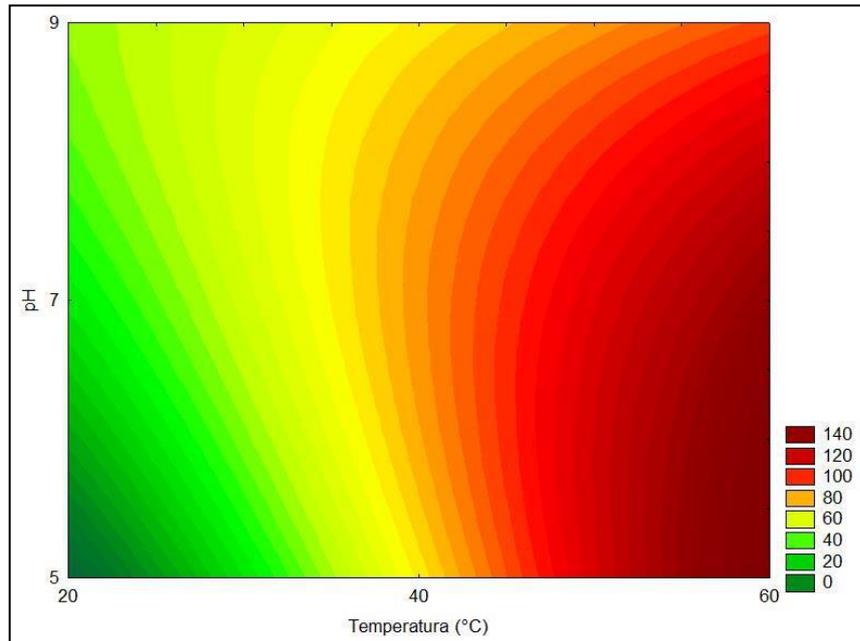


Figura 9: Curva de contorno para atividade proteolítica em função do pH e da temperatura.

Na curva de contorno é possível observar que a região de temperatura mais elevada é a região de maior atividade proteolítica. Já o pH não influencia de forma significativa a atividade proteolítica das enzimas produzidas.

O objetivo desse planejamento experimental foi a escolha do pH e da temperatura em que seriam determinadas as atividades enzimáticas da protease e das demais enzimas. Como a finalidade deste trabalho é produzir enzimas hidrolíticas para a formulação de detergentes enzimáticos, a protease foi escolhida para essa tomada de decisão por ser a enzima essencial a esses produtos (ANVISA - RDC Nº 55, 2012). As atividades enzimáticas foram então determinadas na temperatura de 50°C, pois a faixa de temperatura recomendada dos detergentes enzimáticos comerciais é de 40 a 50°C e, como dito anteriormente, as proteases produzidas nesse trabalho apresentam atividade enzimática maior em temperaturas mais elevadas. Já com a relação ao pH, foi escolhido o valor de pH 6,0, valor este encontrado na medida de pH dos detergentes enzimáticos comerciais usados como parâmetros, o 3M e o Lapzyme 4.

5.2.2 Atividade enzimática das enzimas produzidas na FES

Obtido o extrato enzimático conforme descrito no item 4.2.3, a atividade enzimática das enzimas protease, amilase, celulase e lipase desse extrato e dos detergentes enzimáticos comerciais, 3M multienzimático e Lapzyme 4, foram determinadas de acordo com o item 4.2.4, em 50°C e pH 6. A **Tabela 7** apresenta os valores de atividade enzimática de cada enzima.

Tabela 7: Atividade das enzimas do extrato enzimático e dos detergentes enzimático comerciais.

ENZIMA	ATIVIDADE ENZIMÁTICA (U/mL)		
	Extrato	3M	Lapzyme 4
Protease	11,6 ± 0,7	12,3 ± 0,7	6,0 ± 0,5
Amilase	4,6 ± 0,5	13,5 ± 0,4	3,3 ± 0,3
Celulase	0,30 ± 0,03	0,60 ± 0,02	2,10 ± 0,05
Lipase	1,64 ± 0,07	4,01 ± 0,06	1,26 ± 0,03

A atividade proteolítica do extrato enzimático obtido por FES ficou próxima da atividade do detergente 3M multienzimático e superior a do Lapzyme 4. No caso das enzimas amilase e lipase, as atividades enzimáticas do extrato foram inferiores ao detergente 3M, porém próximas ao Lapzyme 4, sendo para amilase até mesmo superior a este. Já a celulase apresentou o menor valor de atividade enzimática, 0,3 U/mL, valor inferior aos dois detergentes comerciais. Diferentemente de todas as outras enzimas, a atividade celulolítica do Lapzyme 4 foi a de maior valor. De modo geral, as enzimas produzidas por *Aspergillus oryzae* na FES utilizando resíduos da indústria de dendê tiveram atividades enzimáticas satisfatórias em comparação com as enzimas dos detergentes enzimáticos comerciais.

5.2.3 Estabilidade térmica das enzimas produzidas por FES

Os detergentes enzimáticos são utilizados em diferentes temperaturas, geralmente na faixa de 40 a 50°C. O tempo indicado para uso desses produtos é de no mínimo 5 minutos e varia de acordo com o protocolo de limpeza de cada estabelecimento. Por esse motivo, é importante verificar se as enzimas mantêm a

atividade quando submetidas à temperatura de lavagem durante um determinado tempo.

A termoestabilidade de cada enzima produzida por FES e das enzimas dos detergentes enzimáticos comerciais foi avaliada conforme descrito no item 4.2.6.

A **Figura 10** apresenta a estabilidade térmica das proteases produzidas na FES e dos detergentes enzimáticos comerciais 3M multienzimático e Lapzyme 4. De modo geral, as proteases mantiveram suas atividades nas temperaturas de 30, 40 e 50°C, ocorrendo na maioria dos casos o aumento na atividade proteolítica com relação ao tempo de 0 minuto. Já para a temperatura de 60°C, a atividade proteolítica teve uma grande queda já nos primeiros 10 minutos de ensaio, chegando a cerca de 80% no extrato enzimático obtido por FES e no Lapzyme 4.

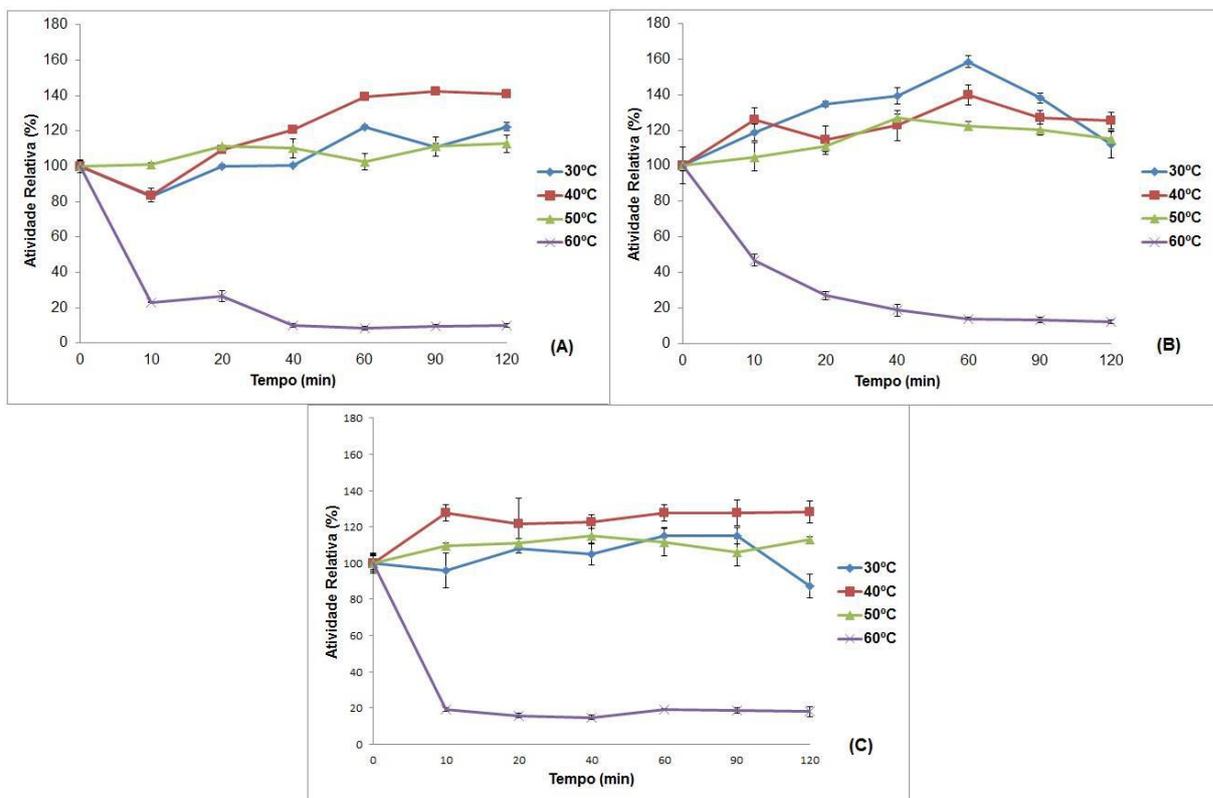


Figura 10: Estabilidade térmica das proteases **(A)** do extrato enzimático produzido na FES; **(B)** do detergente 3M multienzimático; **(C)** do detergente Lapzyme 4. A atividade proteolítica no tempo 0 minuto foi definida como 100%.

A estabilidade térmica das amilases foi testada apenas nas temperaturas de 40 e 50°C, já que geralmente a faixa de temperatura indicada para uso dos detergentes enzimáticos é de 40 a 50°C. A **Figura 11** apresenta os resultados dos testes de termoestabilidade para as amilases do extrato enzimático e dos detergentes 3M e Lapzyme 4. As amilases mantiveram a atividade quando

submetidas a tais temperaturas no período de 2 horas. Para os detergentes enzimáticos comerciais, houve um aumento na atividade amilolítica em torno de 20% da atividade inicial, na temperatura de 50°C a partir de 40 minutos de ensaio. Já para o extrato enzimático, o aumento na atividade das amilases chegou a cerca de 60% em 120 minutos para 50°C.

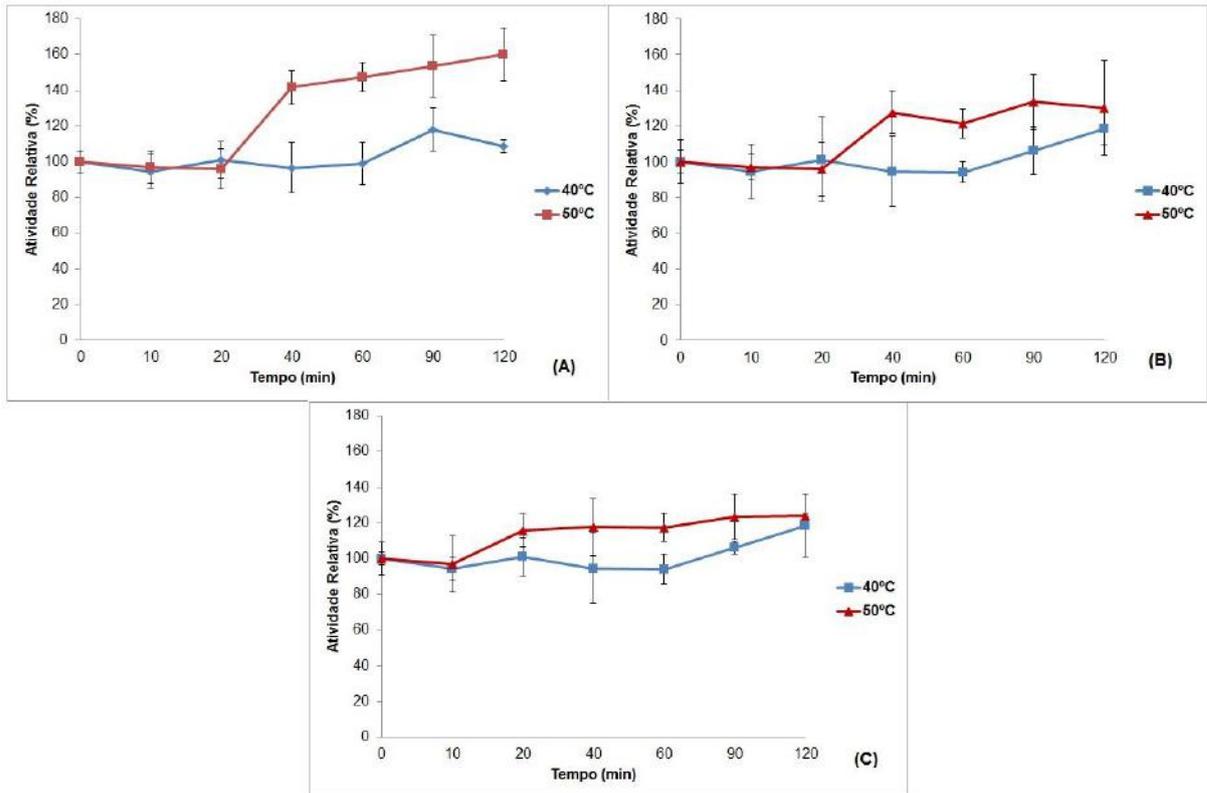


Figura 11: Estabilidade térmica das amilases **(A)** do extrato enzimático produzido na FES; **(B)** do detergente 3M multienzimático; **(C)** do detergente Lapzyme 4. A atividade amilolítica no tempo 0 minuto foi definida como 100%.

O mesmo teste de estabilidade térmica, nas temperaturas de 40 e 50°C, foi realizado para as celulases. Os resultados são mostrados graficamente na **Figura 12**. As celulases do extrato enzimático, do detergente 3M multienzimático e do Lapzyme 4 apresentaram boa estabilidade térmica nas temperaturas às quais foram submetidas. Vale lembrar que a atividade celulolítica foi menor que 1 U/mL para o extrato enzimático e o detergente 3M.

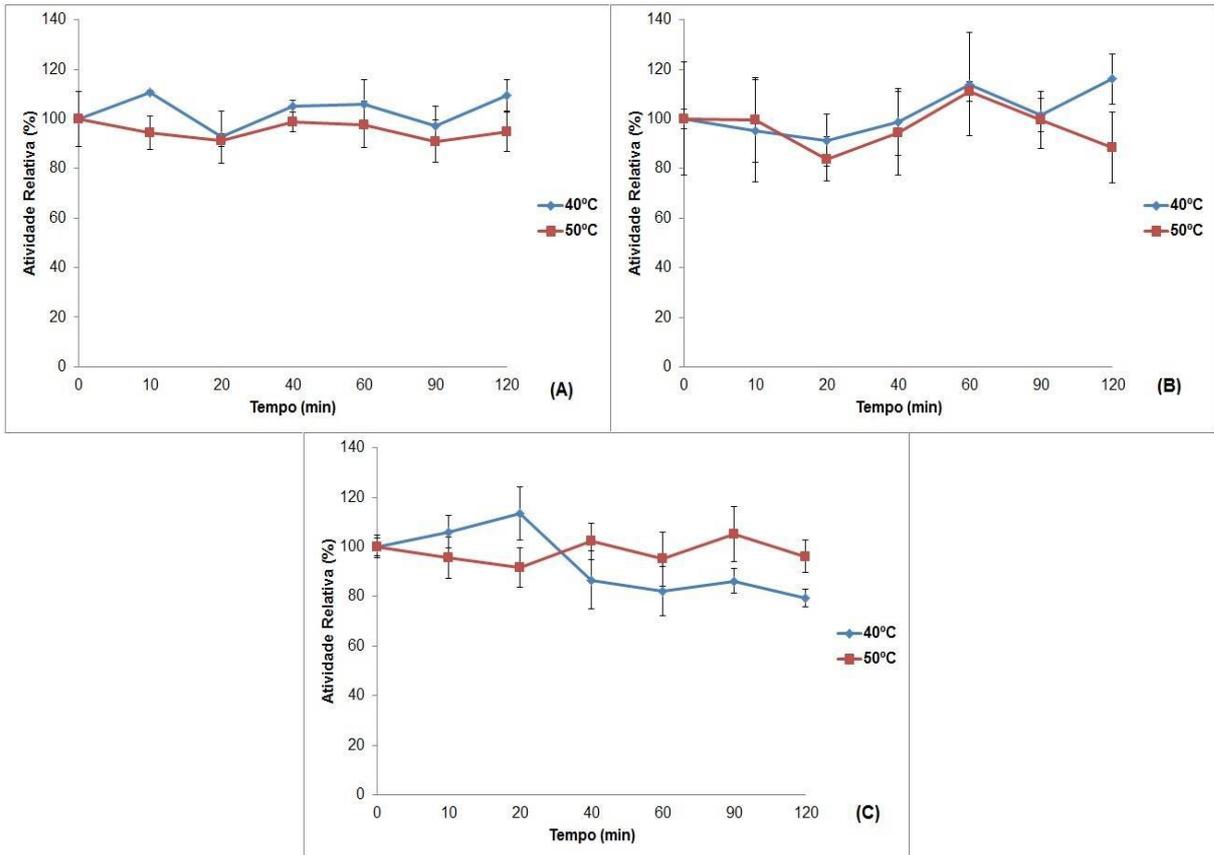


Figura 12: Estabilidade térmica das celulasas **(A)** do extrato enzimático produzido na FES; **(B)** do detergente 3M multienzimático; **(C)** do detergente Lapzyme 4. A atividade celulolítica no tempo 0 minuto foi definida como 100%.

Por fim, o teste de estabilidade térmica foi realizado para as lipases do extrato enzimático e para os detergentes comerciais. Os resultados são apresentados na **Figura 13**. As lipases, assim como as demais enzimas, apresentaram boa termoestabilidade nas temperaturas de 40 e 50°C.

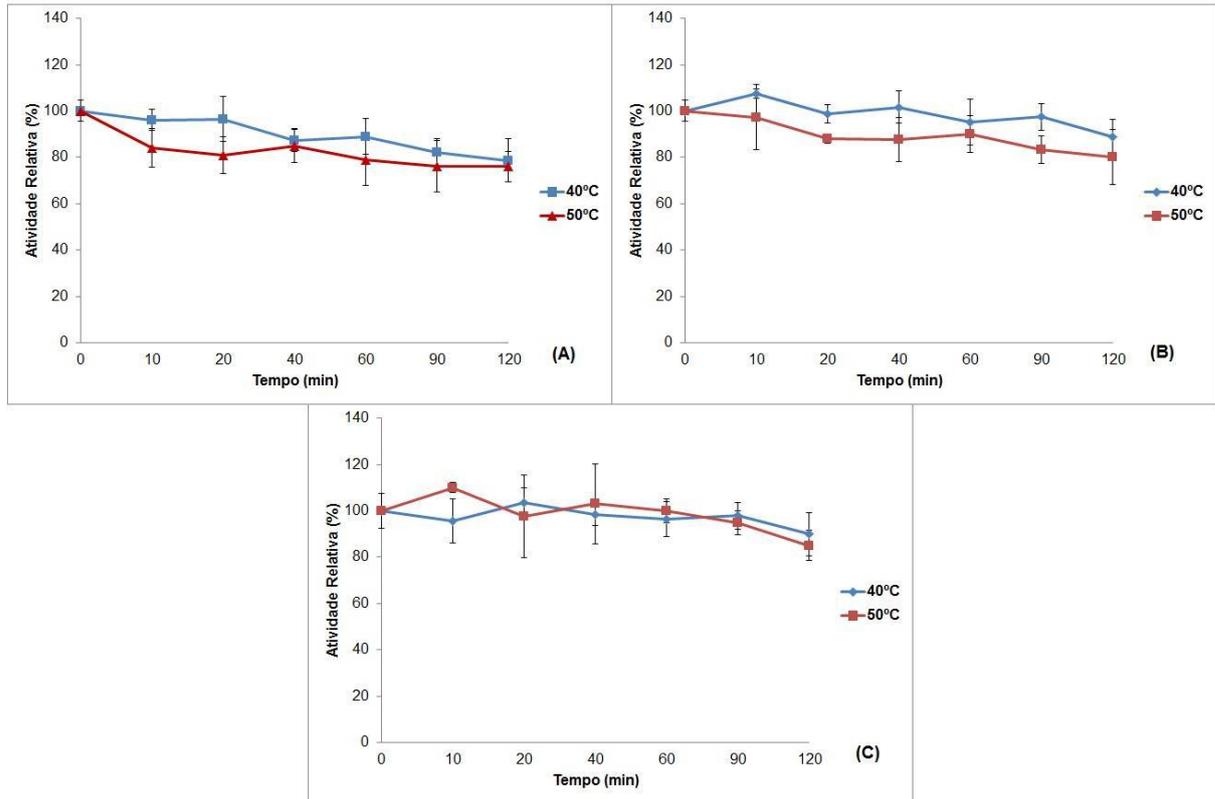


Figura 13: Estabilidade térmica das lipases **(A)** do extrato enzimático produzido na FES; **(B)** do detergente 3M multienzimático; **(C)** do detergente Lapzyme 4. A atividade lipásica no tempo 0 minuto foi definida como 100%.

As enzimas protease, amilase, celulase e lipase produzidas na FES por *Aspergillus oryzae* mantiveram sua atividade enzimática nas temperaturas de 40°C e 50°C no período de 2 horas. A estabilidade térmica nessas temperaturas é uma característica importante, já que o objetivo futuro é utilizar essas enzimas produzidas na FES para formulação de detergentes enzimáticos, para os quais é indicado o uso de 40 a 50°C.

5.2.4 Atividade proteolítica do extrato enzimático frente à composição de diferentes detergentes comerciais

As proteases são enzimas de grande importância na formulação de detergentes, sendo ingredientes chave desses produtos. No mercado, existe a necessidade da busca de novas enzimas com propriedades inovadoras e que possibilitem maior desempenho no processo de lavagem. Os detergentes necessitam de proteases capazes de ter atividade em condições de alcalinidade e

também na presença de sal, surfactantes e ingredientes de detergentes (GUPTA *et al.*, 2002).

A fim de verificar a compatibilidade das proteases produzidas por *Aspergillus oryzae* na FES com a composição detergentes, o extrato enzimático foi incubado em diferentes concentrações por 1 hora com os detergentes enzimáticos 3M e Lapzyme 4, com os detergentes industriais Tween 80 e Triton X-100 e com os detergentes comerciais Limpol e Ypê. O procedimento adotado está descrito no item 4.2.7 e os resultados obtidos se encontram na **Figura 14**. O extrato enzimático manteve em torno de 80% a sua atividade proteolítica quando combinado aos diferentes detergentes e em alguns casos houve até o aumento na atividade das proteases. Somente para o detergente Ypê a perda de atividade foi considerável, chegando a quase 80% na concentração de 5% v/v de extrato enzimático.

Esses resultados preliminares de atividade proteolítica frente a diferentes detergentes demonstram uma boa característica para a possível aplicação dessas enzimas na formulação de detergentes.

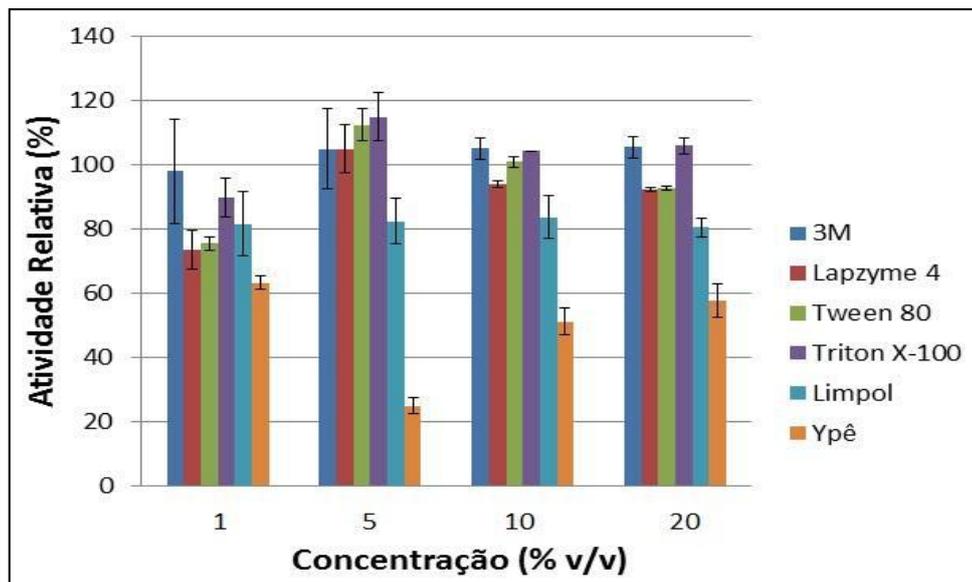


Figura 14: Compatibilidade das proteases do extrato enzimático com diferentes detergentes. A atividade proteolítica do extrato enzimático incubado com água deionizada nas diferentes concentrações foi definida como sendo 100% e as demais atividades foram expressas com relação a ela.

5.2.5 Estabilidade térmica das proteases frente à composição dos detergentes enzimáticos comerciais

Como descrito anteriormente, as proteases produzidas na FES pelo *Aspergillus oryzae* se mostraram compatíveis a composição dos detergentes enzimáticos comerciais (Figura 14). A partir desse resultado, foram realizados

ensaios para verificar a estabilidade térmica das proteases produzidas na FES quando presentes junto à composição dos detergentes enzimáticos comerciais 3M multienzimático e Lapzyme 4. A composição do produto e a compatibilidade entre cada componente da formulação é de grande importância para a eficiência do detergente.

As enzimas dos detergentes enzimáticos comerciais foram inativadas na temperatura de 100°C e então o extrato enzimático foi adicionado a estes produtos numa concentração de 10% v/v. O resultado dos ensaios é apresentado na **Figura 15**.

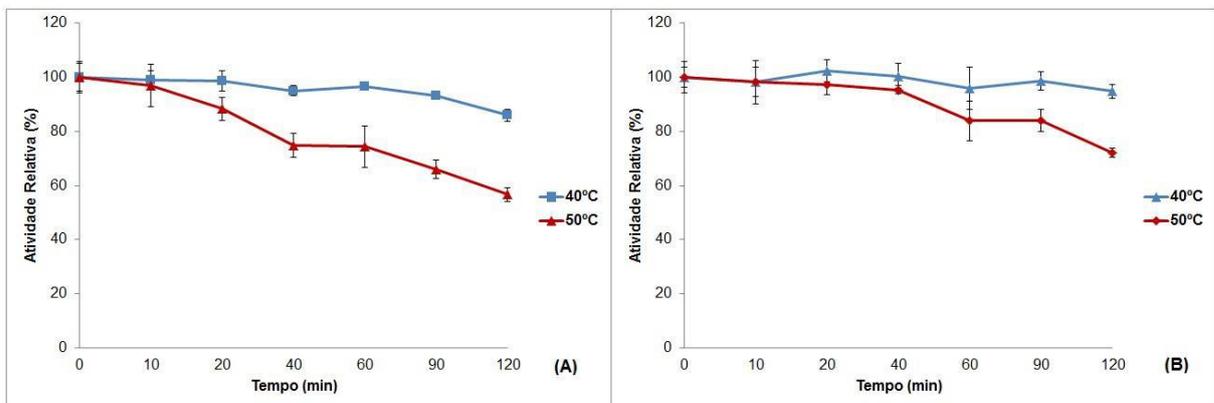


Figura 15: Estabilidade térmica das proteases do extrato enzimático produzido na FES em uma concentração 10% v/v (A) no detergente 3M multienzimático; (B) no detergente Lapzyme 4. A atividade proteolítica no tempo 0 minuto foi definida como 100%.

Na temperatura de 40°C, as proteases mantiveram sua atividade enzimática junto à composição dos dois detergentes enzimáticos comerciais. Já na temperatura de 50°C, houve uma diminuição na atividade proteolítica em função do tempo. Para o ensaio utilizando o Lapzyme 4 essa perda de atividade chegou a cerca de 20% no tempo de 2 horas, já para o 3M multienzimático a perda de atividade foi o dobro, 40% em 2 horas.

6 CONCLUSÃO

6.1 Monitoramento Tecnológico

- O presente trabalho permitiu uma análise global da aplicação de proteases em detergentes e composições de limpeza e tecnologia em estudo se mostrou emergente devido ao crescente número de documentos de patentes e número significativo de patentes solicitadas.
- Japão, Estados Unidos e China se destacam como maiores detentores desta tecnologia.
- Os maiores depositantes são Procter & Gamble, Henkel e Novozymes, empresas de reconhecimento internacional.
- No Brasil o número de depósitos corresponde a 15% do total de documentos analisados, sendo um setor de possível crescimento, onde a Procter & Gamble se destaca como o maior depositante.
- A aplicação de proteases em detergentes e composições de limpeza é promissora já que o aprimoramento na formulação de detergentes e composições de limpeza gera benefícios para o meio ambiente, possibilitando a diminuição na quantidade do produto pelo aumento da eficiência de limpeza.

6.2 Produção de enzimas hidrolíticas por FES

- As proteases produzidas na FES apresentam atividade enzimática ótima na faixa de temperatura indicada para o uso de detergentes enzimáticos comerciais (40-50°C) e em uma ampla faixa de pH (5-9).
- As enzimas protease, amilase e lipase produzidas por fermentação em estado sólido, utilizando o fungo *Aspergillus oryzae* e resíduos da indústria do dendê, apresentaram atividade enzimática próxima às enzimas dos detergentes enzimáticos comerciais, 3M multienzimático e Lapzyme 4.
- A produção de celulase pela FES não foi satisfatória, já que a atividade celulolítica do extrato enzimático foi 0,3 U/mL. Vale destacar que para o

detergente 3M multienzimático a atividade da celulase também foi baixa, 0,6 U/mL.

- Quanto à estabilidade térmica, todas as enzimas produzidas na FES mantiveram sua atividade enzimática nas temperaturas de 40 e 50°C. Este resultado favorece o uso dessas enzimas na formulação de detergentes enzimáticos, já que a faixa de temperatura recomendada para o uso desses produtos é 40-50°C.
- A compatibilidade das proteases produzidas na FES com a formulação dos detergentes comerciais foi verificada e os resultados foram satisfatórios quanto à atividade proteolítica e à estabilidade térmica das proteases quando adicionadas a estas composições. Para o ensaio com o detergente 3M, houve uma perda de atividade de 40% no tempo de 120 minutos, porém, vale ressaltar que o tempo indicado para o uso desse detergente comercial é de apenas 5 minutos.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

3M. **3M multienzimático**. Disponível em: <http://www.3m.com.br/3M/pt_BR/3m-do-brasil/todos-os-produtos-3m-do-brasil/~//Detergente-Enzim%C3%A1tico-5L?N=5002385+3293248441&rt=rud>. Acesso em 22 de dez. 2016.

ANVISA. **Conceitos técnicos**. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/saneantes/conceito.htm#DETERGENTES>>. Acesso em: 14 nov. 2016.

ARCHIBUGI, D. **Patenting as an indicator of technological innovation: a review**. Science and Public Policy, v. 19, p. 357-368, 1992.

BRASIL, G.A.R. **Enzimas em Produtos de Limpeza**. 2003. 32f. Monografia (Biologia). Centro Universitário de Brasília, Brasília, Distrito Federal, 2003.

BURRONE, E. **Patent at the core: the biotech business**. World Intellectual Property Organization. 2006. Disponível em: <http://www.wipo.int/sme/en/documents/patents_biotech_fulltext.html>. Acesso: 14 dez. 2016.

CHANTRE, L. G. F. **Processo de síntese do luminol em uma única etapa de reação. Produção de um kit luminol para ser usado no combate a contaminação hospitalar e na detecção de sangue oculto queimado**. Rio de Janeiro, 2014. 273f. Tese (Doutorado em Ciências – Química), Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2014.

DAIHA, K.G. **Estudo da Aplicação Industrial de Lipases por Meio de Métodos de Análise Tecnológica Orientada para o Futuro**, 2015. 108 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica). Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, UFRJ, Rio de Janeiro, 2015.

DU PONT. **Enzimas industriais e outros bioativos**. Disponível em: <<http://www.dupont.com.br/produtos-e-servicos/industrial-biotechnology/industrial-enzymes-bioactives.html>>. Acesso em: 14 de nov. de 2016.

ERNST, H. **The Use of Patent Data for Technological Forecasting: The Diffusion of CNC-Technology in the Machine Tool Industry.** *Small Business Economics*, v. 9, p. 361-381, 1997.

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

HENKEL. **Henkel.** Disponível em: <<http://www.henkel.com.br/>>. Acesso em: 14 de nov. de 2016.

HÖLKER U., LENZ, J. Solid-state fermentation – are there any biotechnological advantages? **Current Opinion in Microbiology**, v. 8, p. 301-306, 2005.

JOO, H. S., CHANG, C. S. Production of protease from a new alkalophilic *Bacillus* sp. I-312 grown on soybean meal: optimization and some properties. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 1263-1270, 2005.

LONSANE, B. K., GUILDYAL, N. P., BUDIATMAN, S., RAMAKRISHNA, S.V. Engineering aspects of solid state fermentation. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 7, p. 258-265, 1985.

LÓPEZ-OTÍN C., BOND J. S., Proteases: multifunctional enzymes in life and disease. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 283, p. 30433-30437, 2008.

MITCHELL, D. A. et al. New developments in solid-state fermentation II. Rational approaches to the design, operation and scale-up of bioreactors. **Process Biochemistry**, v. 35, n. 10, p. 1211-1225, 2000.

MITCHELL, D. A., BEROVIC, M., KRIEGER, N. Overview of solid state bioprocessing. In: (Ed.). **Biotechnology Annual Review: Elsevier**, v. 8, p.183-225, 2002.

MOJSOV, K. Enzyme scouring of cotton fabrics: a review. **International Journal Market Technology**, v. 2, p. 256-275, 2012.

MUSEU NACIONAL. **Horto Botânico: *Elaeis guineenses***. Disponível em: <<http://www.museunacional.ufrj.br/hortobotanico/paginas/palmeiras/elaeisguineensis.htm>>. Acesso em: 22 de dez. de 2016.

NOVOZYMES. **Novozymes – repensando o amanhã**. Disponível em: <<http://www.novozymes.com/pt/novozymes-in-latinamerica/about-novozymes-latinamerica>>. Acesso em: 14 de nov. de 2016.

OLIVEIRA, S.D. **Prospecção Tecnológica da Produção do Ácido Succínico a Partir de Fontes Renováveis: Perspectivas e Desafios**. 2014. 241 f. Tese (Doutorado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos). Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, UFRJ, Rio de Janeiro, 2014.

PINTO, G. A. S., BRITO, E. S., ANDRADE, A. M. R., FRAGA, S. L. P., TEIXEIRA, R. B. **Fermentação em Estado Sólido: Uma Alternativa para o Aproveitamento e Valorização de Resíduos Agroindustriais Tropicais**. Fortaleza, CE, 2005, 5 p.

PRIME CIRÚRGICA. **Detergente Enzimático**. Disponível em: <<http://www.primecirurgica.com.br/produto/degergente-enzimatico-1-litro-3m-multienzimatico/>>. Acesso em: 22 de dez. 2016.

PROCTER & GAMBLE. **P&G**. Disponível em: <http://www.pg.com/pt_BR/>. Acesso em: 14 de nov. de 2016.

RAHARDJO, Y. S. P., TRAMPER, J., RINZEMA, A. Modeling conversion and transport phenomena in solid-state fermentation: A review and perspectives. **Biotechnology Advances**, v. 24, p. 161-179, 2006.

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

RAY, A. Protease enzyme-potential industrial scope. **International Journal of Technology**, v. 2, p. 1-4, 2012.

SANTOS, A. F. **Prospecção e Produção de proteases bacterianas por fermentação em estado sólido**. Rio de Janeiro, 2014. 136 f. Tese (Doutorado em Ciências – Bioquímica), Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2014.

SANTOS, A. F., GANDRA R. F., OLIVEIRA S. S. C., KNEIPP L. F., D'AVILA-LEVY C. M., CÁTIA LACERDA SODRÉ C. L., BRANQUINHA M. H., SANTOS A. L. S. Peptidases em Biotecnologia: Produção, Aplicações e Mercado. **Biotecnologia Aplicada à Agro & Indústria: Fundamentos e Aplicações**. São Paulo: Editora Blücher, v. 1, Cap. 7, 1 ed., 2016.

SHIOMORI, T., MIYAMOTO, H., MAKISHIMA, K., YOSHIDA, M., UDAKA, T., INABA, T., HIRAKI, N. Evaluations of bedmaking-related airborne and surface methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* contamination. **Journal of Hospital Infection**, v. 50, p.30-35, 2002.

SINHA, R., KHARE, S. K. Isolation of a halophilic *Virgibacillus* sp. Emb13: characterization of its protease for detergent application. **Indian Journal Biotechnology**, v. 11, p. 416-426, 2012.

SOUZA P. M., BITTENCOURT M. L. A., CAPRARA C. C., FREITAS M., ALMEIDA R. P. C., SILVEIRA D., FONSECA Y. M., FILHO E. X. F., JUNIOR A. P., MAGALHÃES P. O. A biotechnology perspective of fungal proteases. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 46, p. 337-346, 2015.

TSOUKO, E., KACHRIMANIDOU, V., SANTOS, A.F., LIMA, M.E.N.V., PAPANIKOLAOU, S., CASTRO, A.M., FREIRE, D.M.G., KOUTINAS, A.A. Valorization of By-Products from Palm Oil Mills for the Production of Generic Fermentation Media for Microbial Oil Synthesis. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. v. 2016, p. 1-16, 2016.

UNILEVER. **Unilever**. Disponível em: <<https://www.unilever.com.br/about/who-we-are/sobre-a-unilever/>>. Acesso em: 14 de nov. de 2016.

WIPO. **International Patent Classification**. Disponível em: <<http://web2.wipo.int/classifications/ipc/ipcpub/#refresh=page>>. Acesso em: 14 de nov. 2016.