



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Curso de Graduação Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia

LUCAS BUTRICO BARBOSA

Estudo da Imobilização de proteases extraídas da *Bromelia*

***fastuosa* (Gravatá)**

Araraquara, SP

2025

LUCAS BUTRICO BARBOSA

Estudo da Imobilização de proteases extraídas da *Bromelia fastuosa* (Gravatá)

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, para obtenção do grau de Engenheiro de Bioprocessos e Biotecnologia.

Orientadora: Profa. Dra. Ariela Veloso de Paula

Coorientadora: Dra. Juliana Cristina Bassan

Araraquara, SP

2025

B238e Barbosa, Lucas Butrico.
Estudo da Imobilização de proteases extraídas da *Bromelia fastuosa* (Gravatá) / Lucas Butrico Barbosa. – Araraquara, 2025.
110 f. : il.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação – Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Ariela Veloso de Paula.
Coorientadora: Juliana Cristina Bassan.

1. Proteases. 2. *Bromelia fastuosa*. 3. Diaion. 4. Agarose. 5. Soro do leite. I. Paula, Ariela Veloso de, orient. II. Bassan, Juliana Cristina, coorient. III. Título.

LUCAS BUTRICO BARBOSA

Estudo da Imobilização de proteases extraídas da *Bromelia fastuosa* (Gravatá)

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Araraquara, para obtenção do título de Bacharel em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia.

Data da defesa: 06/03/2025

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Ariela Veloso de Paula
UNESP – Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Campus de Araraquara

Prof. Dr. Álvaro de Baptista Neto
UNESP – Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Campus de Araraquara

Eng. João Francisco Cabral do Nascimento
UNESP – Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Campus de Araraquara

Prof. Dr. Heitor Buzetti Simões Bento
UNESP – Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Campus de Araraquara

Prof. Dr. Daniela Remonatto
IFSP – Campus de Matão

Dedicatória

Dedico este trabalho à Deus e a minha família, que sempre me apoiaram e me deram forças para continuar, mesmo nos momentos mais difíceis.

À minha orientadora e minha coorientadora, que me acolheram e me orientou com paciência e confiança, sempre acreditando no meu potencial.

Aos meus amigos, que compartilharam comigo os desafios e conquistas ao longo dessa jornada, sendo fontes constantes de apoio e crescimento.

E aos meus colegas de graduação e de laboratório, que estiveram ao meu lado nos momentos de dificuldades, tornando essa trajetória mais leve e significativa.

A todos vocês, minha eterna gratidão.

Agradecimentos

A jornada até aqui não foi fácil, e, por isso, tenho imensa gratidão a todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho e para o meu crescimento pessoal e profissional.

Agradeço, em primeiro lugar, à minha família, por todo o apoio incondicional, incentivo e força nos momentos difíceis. Sem vocês, eu não teria chegado até aqui.

À minha orientadora, Profa. Dra. Ariela Veloso de Paula, por me acolher em seu laboratório e grupo de pesquisa, pela orientação dedicada e por sempre acreditar no meu potencial em cada etapa dessa jornada acadêmica.

À minha coorientadora, Profa. Dra. Juliana Cristina Bassan, que esteve comigo desde o primeiro dia no laboratório.

Aos meus amigos de infância, Juninho, Secco, Yuri e todos os outros, que compartilharam comigo não apenas desafios, mas também aprendizados e crescimento, sendo muitas vezes meu porto seguro junto à minha família.

Aos amigos da graduação e do laboratório, Enzo, Luíza, Lelis, Marianne, Danielle Gonçalves, Daniela Remonato, João Francisco, Heloísa e Amanda Noli, que estiveram ao meu lado nos momentos mais desafiadores, tornando essa caminhada mais leve ao compartilharmos dificuldades, conquistas e aprendizados. A amizade e o companheirismo de vocês tornaram essa experiência ainda mais significativa.

E a todas as pessoas que passaram pela minha vida durante essa fase de grande aprendizado.

A todos vocês, minha eterna gratidão e respeito.

"A ciência é muito mais que um corpo de conhecimentos. É uma maneira de pensar."

— Carl Sagan

RESUMO

Proteases são enzimas que catalisam a quebra de proteínas, hidrolisando ligações peptídicas. Grande parte das proteases são de origem vegetal e são do tipo cisteíno-proteases, como as papaínas proveniente do mamão (*Carica papaya*) e as bromelinas do abacaxi (*Ananas comosus*), que são amplamente empregadas nos setores alimentícios. Dentre as possíveis fontes vegetais de proteases, tem-se o gravatá (*Bromelia fastuosa*), um fruto presente na flora brasileira, da família *Bromeliaceae*. Entretanto, a aplicabilidade das proteases presentes no gravatá é ainda pouco explorada devido, principalmente, aos poucos estudos sobre essas enzimas, além da ausência de trabalhos relacionados à sua imobilização, o que caracteriza uma lacuna sobre o potencial de aplicações desses catalisadores tanto livres, quanto imobilizados. Além disso, a fim de garantir uma maior viabilidade aos processos catalisados por essas enzimas, imobilizar o biocatalisador em um suporte sólido torna-se uma boa alternativa. A imobilização tem como outros objetivos, melhorar a estabilidade da enzima ao processo e sua fácil separação do meio reacional para o seu reuso por mais ciclos de produção, gerando assim economia no processo. Com isso, após o estudo do extrato proveniente da *Bromelia fastuosa* observou-se que o processo de extração das proteases foi eficaz, e a caracterização de suas proteases apresentou alta estabilidade ao pH. Quanto à imobilização das enzimas presentes no extrato, para os suportes avaliados obteve-se 74% de rendimento de imobilização com a agarose 6BCL modificada com glutaraldeído, o que se mostrou acima do esperado quando comparado a imobilização de proteases de extratos vegetais que alcançaram 30% e próximo a rendimentos de imobilizações de proteases comerciais. Para o outro suporte, o poli(estireno-co-divinilbenzeno) (Diaion HP-20), a imobilização alcançou resultados inéditos de 89%, já que não se possui estudos com este suporte para imobilização de proteases, destacando o potencial desse estudo. Para ambas as imobilizações se observaram melhorias em seus parâmetros ótimos de operação (pH e temperatura) e resultados interessantes de seus parâmetros cinéticos. No entanto, destaca-se o Diaion®, uma vez que este suporte forneceu resultados semelhantes à Agarose, que é bastante empregada para imobilização de proteases. O Diaion® não necessita de modificações para a imobilização das proteases, além de não ser relatado nenhum estudo com este suporte para esse grupo de enzimas. Por fim, as proteases do gravatá, tanto no extrato enzimático, quanto imobilizadas, se mostraram promissoras na hidrólise de substratos proteicos como o soro do leite.

Palavras-chaves: proteases; *Bromelia fastuosa*; Diaion; Agarose; soro do leite.

Abstract

Proteases are enzymes that catalyze the breakdown of proteins by hydrolyzing peptide bonds. Most proteases are of plant origin and are cysteine-proteases, such as papain from papaya (*Carica papaya*) and bromelain from pineapple (*Ananas comosus*), which are widely used in the food industry. Among the potential plant sources of proteases is gravatá (*Bromelia fastuosa*), a fruit native to the Brazilian flora and belonging to the *Bromeliaceae* family. However, the applicability of the proteases present in gravatá is still underexplored, primarily due to the limited studies on these enzymes, as well as the lack of research on their immobilization, which highlights a gap in understanding the potential applications of these catalysts, both free and immobilized. Moreover, to ensure greater viability for the processes catalyzed by these enzymes, immobilizing the biocatalyst on a solid support is a promising alternative. Immobilization aims to enhance enzyme stability during the process and facilitate its separation from the reaction medium for reuse in multiple production cycles, thus providing economic benefits. The study of the extract from *Bromelia fastuosa* revealed that the extraction process was effective, and the characterization of its proteases showed high stability at different pH levels. Regarding the immobilization of the enzymes in the extract, 74% immobilization yield was achieved with 6BCL agarose modified with glutaraldehyde, which was higher than expected compared to the immobilization of proteases from other plant extracts, which typically achieve around 30%, and close to yields for commercial protease immobilizations. For the other support, poly(styrene-co-divinylbenzene), immobilization reached unprecedented results of 89%, as there are no studies available for protease immobilization on this support, highlighting the potential of this study. For both immobilization methods, improvements in optimal operational parameters (pH and temperature) and interesting kinetic results were observed. However, Diaion® stands out, as this support provided results similar to agarose, which is widely used for protease immobilization. Diaion® does not require modifications for protease immobilization, and no studies have been reported using this support for this group of enzymes. Finally, the proteases from gravatá, both in the enzymatic extract and when immobilized, showed promising results for the hydrolysis of protein substrates such as whey.

Keywords: proteases; *Bromelia fastuosa*; Diaion; Agarose; whey.

Lista de figuras

Figura 1. Métodos de imobilização de enzimas.....	22
Figura 2. Etapas de preparo dos extratos enzimáticos.....	30
Figura 3. Esquema do protocolo modificado para ensaio proteolítico.....	31
Figura 4. Esquema do protocolo para imobilização em Agarose 6BCL ativada com glutaraldeído.....	34
Figura 5. Esquema do protocolo para imobilização no copolímero de estireno-divinilbenzeno.....	36
Figura 6. Curva analítica de soro albumina bovina para determinação do teor de proteínas totais.....	41
Figura 7. Curva analítica de tirosina para determinação de atividade proteolítica.....	41
Figura 8. Fruto da Bromelia fastuosa (Gravatá) antes da extração.....	42
Figura 9. Eletroforese do extrato enzimático extraído da B. fastuosa.....	44
Figura 10. Atividade do sobrenadante do extrato imobilizado em relação ao extrato submetido as mesmas condições.....	47
Figura 11. Gráfico da atividade do sobrenadante do extrato imobilizado em relação ao extrato submetido as mesmas condições.....	48
Figura 12. Comparativo entre as etapas de imobilização nos dois suportes.....	51
Figura 13. pH ótimos das proteases no extrato enzimático e nos derivados imobilizados... 53	53
Figura 14. Temperaturas ótimas das proteases no extrato enzimático e nos derivados imobilizados.....	55
Figura 15. Estabilidade ao pH das proteases presentes no extrato enzimático e dos derivados imobilizados.....	57
Figura 16. Estabilidade térmica das proteases presentes no extrato enzimático e dos derivados imobilizados.....	59
Figura 17. Gráfico do modelo cinético das proteases no extrato enzimático e dos derivados imobilizados para determinação de Km e Vmax.....	61
Figura 18. Eletroforese do soro do leite e dos hidrolisados obtidos das reações com o extrato enzimático e as proteases imobilizadas.....	63

Lista de tabelas

Tabela 1. Protocolo modificado para ensaio proteolítico.....	32
Tabela 2. Metodologia para o ensaio proteolítico das proteases imobilizadas.	35
Tabela 3. Determinação do teor de proteínas e da atividade enzimática presente nos frutos do Gravatá.	42
Tabela 4. Rendimento de imobilização de proteases em Agarose ativada com Glutaraldeído e Diaion® HP-20 antes e após modificação na agitação durante os processos de imobilização.	49
Tabela 5. Parâmetros cinéticos das proteases presentes no extrato enzimático e derivados imobilizados.	61

Lista de Símbolos

®	Marca registrada
pH	Potencial hidrogeniônico
M	Molar (mol por litro)
g	Gramma
ml	Mililitro
L	Litro
NaOH	Hidróxido de sódio
NaCl	Cloreto de sódio
µl	Microlitro
H ₂ O	Água
°C	Graus Celsius
mM	Milimolar
HCl	Ácido clorídrico
Na ₂ CO ₃	Carbonato de sódio
Nm	Nanômetros
KNaC ₄ H ₄ O ₆ ·4H ₂ O	Tartarato de sódio e potássio
U	Unidade internacional de atividade enzimática
t	Tempo
V	Velocidade da reação
V ₀	Velocidade inicial

$V_{\text{máx}}$	Velocidade máxima
μmol	Micromol
K_m	Constante de Michaelis-Menten
λ	Comprimento de onda (nm)
x g	Força centrífuga
NaBH_4	Borohidreto de sódio
m/m	Massa por massa

Sumário

1.Introdução	14
2.Revisão Bibliográfica.....	17
2.1.Proteases.....	17
2.2.Fruto Gravatá.....	20
2.3.Imobilização	21
2.4.Suportes de imobilização	24
2.5.Aplicações de enzimas imobilizadas	27
3. Objetivos.....	28
3.1.Objetivos específicos	28
4.MATERIAL E MÉTODOS	29
4.1.Coleta dos frutos	29
4.2.Extração e Preparo dos Extratos Enzimáticos.....	29
4.3.Quantificação do Teor de Proteínas dos extratos enzimáticos.....	30
4.4.Determinação da Atividade Proteolítica dos extratos enzimáticos	31
4.5.Determinação do Perfil Proteico dos extratos enzimáticos	33
4.6.1.Imobilização em Agarose 6BCL ativada por glutaraldeído.....	33
4.6.2.Imobilização em partículas de copolímero de estireno-divinilbenzeno (Diaion®).....	35
4.6.3.Determinação do rendimento de imobilização	37

4.7.Caracterização enzimática do extrato bruto e derivados imobilizados	37
4.8.Determinação dos parâmetros cinéticos (K_m e V_{max})	38
4.9.Hidrólise do soro do leite	39
4.9.1.Obtenção do soro do leite	39
4.9.2.Reação de hidrólise	39
5.RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
5.1.Curvas analíticas.....	40
5.2.Extração e preparo dos extratos enzimáticos.....	42
5.3.Perfil Proteico do Extrato Enzimático	43
5.4.Imobilização das proteases dos extratos enzimáticos.....	46
5.4.1.Avaliação da Influência da Agitação e do Tempo na Imobilização de Proteases	46
5.5.Caracterização do extrato enzimático	52
5.5.1.Determinação do pH ótimo.....	53
5.5.2.Determinação da temperatura ótima	55
5.5.3.Estabilidade ao pH	57
5.5.4.Estabilidade Térmica.....	58
5.5.5.Determinação dos parâmetros cinéticos (K_m e $V_{máx}$)	60
5.6.Hidrólise do soro do leite.....	62
6.CONCLUSÃO	65

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	66
ANEXO A – Artigo desenvolvido a partir do trabalho de conclusão de curso	74

1. Introdução

As proteases são enzimas responsáveis pela catálise da hidrólise das ligações peptídicas em proteínas, promovendo a liberação de peptídeos e aminoácidos. Essas enzimas representam aproximadamente 60% do mercado global de biocatalisadores (Sebastián et al., 2018; Troncoso; Sánchez; Ferreira, 2022). Essa importância se deve à sua ampla aplicabilidade em diversos setores, incluindo nas indústrias médica e farmacêutica, onde são empregadas no tratamento de patologias como diabetes, glaucoma e lesões cartilaginosas (Dhillon *et al.*, 2017; Gurumallesh *et al.*, 2019).

Dentre as subclasses de proteases de interesse industrial, destacam-se as cisteíno proteases, que são predominantemente de origem vegetal (Bolivar *et al.*, 2023). Dois exemplos amplamente empregados são a papaína, extraída do mamão (*Carica papaya*), e a bromelina, obtida do abacaxi (*Ananas comosus*), ambas com aplicações consolidadas na indústria alimentícia (Troncoso; Sánchez; Ferreira, 2022; Hassan; Haque; Rahman, 2022).

A família *Bromeliaceae*, da qual são extraídas as bromelinas, constitui uma fonte relevante de proteases com potencial industrial. Essa família botânica apresenta ampla distribuição em regiões tropicais, como o Brasil, e inclui uma diversidade de gêneros e espécies conhecidas popularmente como bromélias, caraguatás e gravatás (Krumreich *et al.*, 2015; Eguiluz *et al.*, 2019).

Uma espécie pertencente a essa família, *Bromelia fastuosa*, popularmente denominado gravatá, é tradicionalmente empregada na medicina popular na formulação de xaropes para o tratamento de bronquite e asma, além de ser utilizada como agente vermífugo. Essa espécie contém a fastuosaina, uma cisteíno protease caracterizada por elevada atividade catalítica, pH ótimo próximo à neutralidade e resistência a condições moderadas de temperatura (Cabral *et al.*, 2006; Gurumallesh *et al.*, 2019).

No entanto, embora a *fastuosaina* apresente características comparáveis às proteases comerciais, a investigação sobre suas capacidades e características ainda é muito superficial. O único estudo disponível de aplicação dessa protease, conduzido por Garcia *et al.* (2009), demonstrou seu potencial na aceleração do processo de maturação do queijo Prato, resultando em um produto com menor teor de gordura e aprimoramento das propriedades físico-químicas do laticínio, evidenciando sua aplicabilidade na indústria de alimentos.

No setor alimentício, a aplicação dessas cisteino proteases na hidrólise de proteínas e na modificação de matrizes alimentares ainda é pouco explorada, sendo um exemplo notável a produção de peptídeos bioativos, cujos efeitos benéficos à saúde são descritos na literatura. No entanto, a viabilidade econômica da síntese enzimática desses compostos ainda enfrenta desafios, principalmente devido aos altos custos envolvidos (Tavano *et al.*, 2018; Gurumalles *et al.*, 2019).

Uma estratégia amplamente adotada para viabilizar economicamente essas reações enzimáticas é a imobilização das enzimas em suportes adequados. Esse processo consiste na fixação das biomoléculas em uma matriz física ou química, conferindo maior estabilidade estrutural e resistência a condições operacionais adversas. Além disso, a imobilização facilita a recuperação e reutilização do biocatalisador, podendo reduzir significativamente os custos do processo industrial (Lyu *et al.*, 2021; Basso; Serban, 2019; Tacias-Pascacio *et al.*, 2021).

No caso das proteases, a imobilização não apenas viabiliza a hidrólise de substratos líquidos, mas também minimiza a possibilidade de ocorrer autólise, um problema intrínseco a essa classe enzimática. Dessa forma, proteases imobilizadas têm sido aplicadas com sucesso na obtenção de hidrolisados proteicos a partir de subprodutos da indústria alimentícia, conferindo propriedades bioativas de interesse para a saúde (Tavano *et al.*, 2018; Bilal *et al.*, 2024; Morellon-Sterling *et al.*, 2022). E, assim, faz-se necessário mais estudos referentes a esses derivados imobilizados para viabilizar ainda mais suas aplicações.

Diante disso, o presente estudo teve como objetivo avaliar o potencial da *B. fastuosa* como uma nova fonte de proteases. Além disso, os extratos enzimáticos dessa espécie foram imobilizados em dois suportes distintos: a agarose 6BCL,

amplamente empregada na imobilização de proteases, e o Diaion® HP-20, um copolímero ainda pouco explorado para essa classe de enzimas.

2. Revisão Bibliográfica

2.1. Proteases

As proteases são uma classe de enzimas que catalisam reações de degradação de proteínas através da hidrólise de ligações peptídicas. A enzima favorece a polarização no grupo carbonila que participa da ligação entre os aminoácidos, resultando em uma estabilização do oxigênio deste grupo que consequentemente, propicia um ataque nucleofílico ao átomo de carbono e a quebra da ligação (Balakireva *et al.*, 2017). Como essas ligações são responsáveis pela manutenção da estrutura nativa das proteínas, ao serem hidrolisadas são liberados peptídeos ou aminoácidos livres (Sebastián *et al.*, 2018).

As proteases apresentam diferentes especificidades, ou seja, são classificadas de acordo com as características catalíticas que possuem, como: a região das proteínas em que as ligações peptídicas são clivadas, sejam na parte interna (endopeptidases) ou na extremidades da proteína (exopeptidases), o tipo de resíduo de aminoácido catalítico presente no sítio ativo da enzima e de acordo com o tipo de resíduos de aminoácidos envolvidos da ligação peptídica (Sebastián *et al.*, 2018; Gurumallesh *et al.*, 2019).

Em relação a classificação de acordo com o resíduo de aminoácido presente no sítio catalítico da enzima, as endopeptidases, podem conter resíduos de serina, treonina, ácido glutâmico, ácido aspártico e cisteína (Balakireva *et al.*, 2017). Para as cisteino-proteases, os resíduos presentes são os de cisteína e histidina em seus sítios ativos, e podem ser subdivididas em famílias, de acordo com as semelhanças entre as estruturas das enzimas e suas atividades proteolíticas (Verma; Dixit; Pandey, 2016).

As proteases têm grande aplicabilidade nos setores industriais, e por isso, representam em torno de 60% das enzimas comercializadas no mundo (Sebastián *et al.*, 2018; Troncoso; Sánchez; Ferreira, 2022). Suas aplicações nos setores médicos

e farmacêuticos, vão desde auxiliar no tratamento de diabetes e glaucoma até no reparo cartilaginoso (Dhillon *et al.*, 2016; Gurumallesh *et al.*, 2019). Já na indústria alimentícia, o emprego de proteases para hidrolisar as proteínas presentes na matriz dos alimentos, possui um efeito muito positivo também. Tais modificações permitem que esses alimentos possuam novas características, como qualidade sensorial melhorada nos atributos de textura e sabor, uma melhoria na sua digestão, além de diminuir a sua capacidade alérgica. Sendo assim, as proteases atuam desde a produção de produtos livres de glúten, até no amaciamento de carnes, hidrolisando proteínas facilitando a mastigabilidade do alimento (Gurumallesh *et al.*, 2019; Tavano *et al.*, 2018).

Outra aplicação destas enzimas no setor alimentício e farmacêutico é na produção de peptídeos bioativos, cuja ingestão está associada a diversas propriedades benéficas à saúde, como antioxidantes, anti-hipertensivos, antibacterianos, entre outras (Tavano *et al.*, 2018). Esses peptídeos são obtidos de proteínas presentes em matrizes alimentares de origem animal e vegetal, como restos de carne da indústria e o soro do leite e derivados e grãos como o arroz, a soja, o milho, respectivamente (Martínez-Medina *et al.*, 2019). Em relação ao soro, sua constituição é de lactose, vitaminas, sais minerais e de diversas proteínas, entre elas estão a β -lactoglobulina, α -lactalbumina, algumas imunoglobulinas e a albumina, e por isso, é uma boa alternativa como substrato para a produção de peptídeos, pois em muitos países ainda é considerado um resíduo industrial abundante que pode ser transformado em produtos de alto valor agregado reduzindo concomitantemente o impacto ambiental (Bustamante *et al.*, 2021).

Na literatura já existem diversos trabalhos em que é feita a produção desses hidrolisados proteicos a partir do soro de queijo com a utilização de proteases, mostrando o quanto a aplicabilidade desses peptídeos a partir dos resíduos da indústria de laticínios é viável. Um exemplo é o apresentado por Bustamante (2021), que hidrolisou o soro do queijo, obtendo peptídeos com boas propriedades antioxidantes e inibitórias à Enzima Conversora de Angiotensina (ECA). Outro exemplo de aplicação bem-sucedida é o demonstrado por Bassan (2015), que avaliou o emprego das proteases tripsina e pepsina imobilizadas para a hidrólise do soro de leite. Foi empregado o sabugo de milho modificado como suporte para a imobilização,

obtendo rendimentos de imobilização superiores a 80%, além de manter a atividade também superior a 80%, em relação a enzima livre. A hidrólise parcial das proteínas presentes no soro do leite bovino e bubalino utilizando os derivados imobilizados, também forneceu resultados interessantes, como atividade relativa alta e grau de hidrólise superior a 12% para reações em batelada.

Quanto à origem das proteases que são empregadas nesses bioprocessos, podem ser originárias de fonte animal, microbiana ou vegetal (Chinnadurai; Krishnan; Perumal, 2018). Em relação às proteases de origem vegetal, biologicamente, elas desempenham desde funções simples, como degradar proteínas mal enoveladas, até processos mais complexos, como apoptose e defesa celular (Sebastián *et al*, 2018; Balakireva *et al.*, 2017). Porém, suas aplicações não ficam restritas às suas funções biológicas, sendo também aplicadas em processos industriais, devido às características que estas enzimas podem atribuir aos produtos de hidrólise (Gagaoua *et al.*, 2021). Entre as proteases vegetais, destacam-se a papaína e a bromelina, provenientes do mamão (*Carica papaya*) e do abacaxi (*Ananas comosus*), respectivamente, que são utilizadas no setor alimentício (Bolívar *et al.*, 2023; Chinnadurai; Krishnan; Perumal, 2018; David Troncoso; Alberto Sánchez; Luján Ferreira, 2022; Hassan, Haque; Rahman, 2022).

Um dos processos no setor alimentício que estas enzimas atuam é no amaciamento de cortes de carne que naturalmente são mais rígidas. As proteases provocam a degradação das proteínas presentes nas estruturas da carne, e consequentemente, proporcionam um produto com maior maciez (Madhusankha; Thilakarathna, 2021). Um exemplo dessa aplicação é o proposto por Ribeiro *et al* (2021), que utilizaram a papaína aliada para amaciar hambúrgueres bovinos e de frangos, obtendo com sucesso produtos com maior maciez, o que demonstra a importância dessa classe de enzimas para aplicação em processos industriais.

2.2. Fruto Gravatá

Entre as fontes vegetais, uma família que já é conhecida por ter proteases empregadas em diversos processos (bromelinas) é a *Bromeliaceae*. Esta família é típica de países tropicais, como o Brasil, porém, também são conhecidas pela sua capacidade de adaptação em diversos ambientes. Isso faz com que as plantas dessa família sejam umas das mais variadas morfologicamente e ecologicamente diversas, com vários gêneros e espécies dessa família, como as bromélias, caraguatás e os gravatás (Eguiluz *et al.*, 2019; Krumreich *et al.*, 2015).

Os gravatás são frutos presentes na flora brasileira, desde o estado do Rio de Janeiro, até países como o Uruguai, sendo característicos do cerrado e matas como mesófilas, atlântica e de restinga (Wanderley; Martins, 2007). Além disso, são conhecidos por suas propriedades químicas ligadas aos efeitos proteolíticos, devido à presença de proteases em seu meio biológico (Texeira *et al.*, 2019; Vallés; Cantera, 2018).

Entre os tipos de gravatás, pode-se citar a *Bromelia fastuosa*, que é popularmente utilizada em xaropes para tratar de doenças como bronquite e asma e até em vermífugos (Cabral *et al.*, 2006). Porém, na literatura se encontram poucos trabalhos que utilizam este fruto como fontes de enzimas proteolíticas, somente o apresentado por Cabral (2005), que relata níveis altos de atividade proteolítica quando comparada a outras enzimas, como a papaína e algumas bromelinas.

Além disso, também pela falta de estudos sobre o gravatá, se sabe ainda menos sobre as enzimas presentes no fruto. Cabral (2005) também realizou uma análise estrutural e funcional de uma de suas proteases, a fastuosaína. A enzima foi classificada como uma cisteino-protease, o que é confirmado por Gurumalles (2019), que afirma que a maioria das proteases vegetais são endopeptidases com resíduos de cisteína presente em seu sítio catalítico. No estudo também foi determinado seus parâmetros ótimos de operação: sua temperatura de atuação, de 55°C; e pH, em torno de 7,5. E por fim, através da técnica de modelagem molecular, foi possível

confirmar que a protease é pertencente à família da papaína, por apresentar semelhanças em sua estrutura e propriedades físico-químicas.

Porém, mesmo com características semelhantes a de enzimas utilizadas comercialmente, a única aplicação relatada foi em trabalho realizado por Garcia *et al.* (2009), que extraiu, purificou e a utilizou para alterar o tempo de maturação do queijo Prato, produzindo um produto com teor reduzido de gordura. O emprego da fastuosaína não só reduziu o tempo de maturação, como também melhorou as características físico-químicas do queijo, demonstrando o seu potencial de aplicação na indústria de laticínios.

Outro estudo que mostra uma possível aplicação é no setor medicinal, onde foi avaliado *in vivo* os possíveis efeitos antitumorais da fastuosaína, sobre a expressão de CD44, que são moléculas diretamente relacionadas ao desenvolvimento de tumores. Os resultados foram promissores, a injeção da protease em camundongos resultou em uma diminuição dos nódulos de células de melanomas (Guimarães-Ferreira *et al.*, 2007).

2.3. Imobilização

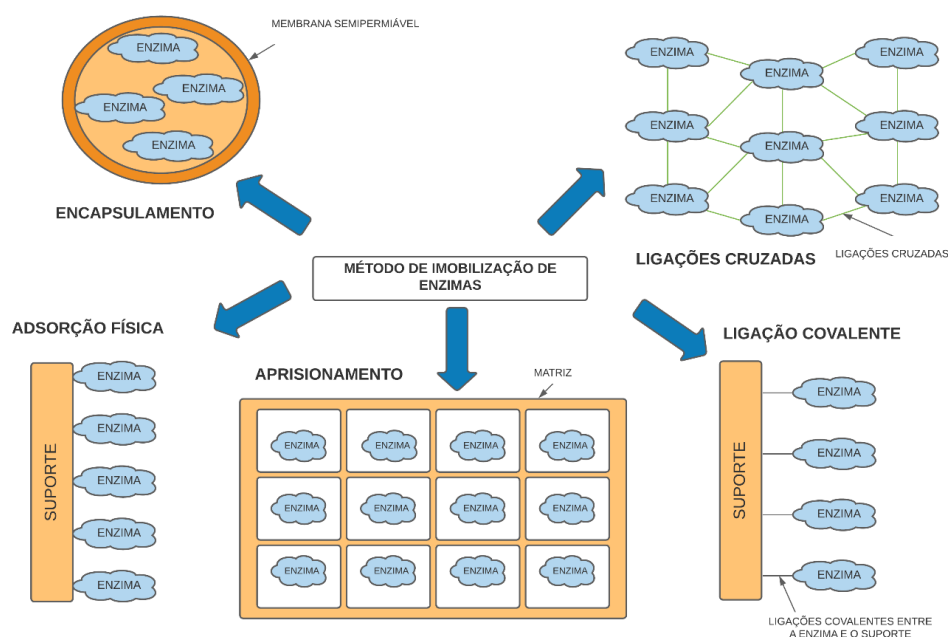
Assim, para que essas reações sejam economicamente viável, a enzima pode ser reutilizada em vários ciclos, gerando economia de custos (Basso; Serban, 2019; Lyu *et al.*, 2021; Tacias-Pascacio *et al.*, 2021). No caso das proteases, a imobilização possibilita a hidrólise de substratos líquidos e minimiza um problema intrínseco dessa classe, a autólise. As proteases imobilizadas têm sido aplicadas para a produção de hidrolisados de proteínas com propriedades benéficas à saúde a partir de subprodutos da indústria alimentícia (Bilal *et al.*, 2024; Morellon-Sterling *et al.*, 2022; Tavano *et al.*, 2018).

A imobilização de enzimas em suportes sólidos tem como objetivo garantir uma maior estabilidade aumentando a resistência mecânica dos catalisadores e sua estabilidade térmica, além de permitir a fácil separação do catalisador imobilizado do

meio reacional durante o processo catalítico (Basso; Serban, 2019; Lyu *et al.*, 2021; Tacias-Pascacio *et al.*, 2021). A tecnologia de imobilização também permite que a enzima seja reutilizada por mais ciclos de produção, mesmo que tenha uma queda na sua atividade, podendo gerar economia ao processo (Guisán, 1988; Basso; Serban, 2019).

De forma geral, a imobilização de enzimas é o confinamento da enzima, seja por uma matriz ou um suporte físico ou localizada em certa região definida do espaço, com retenção de sua atividade catalítica (Guisan, 2006; Sirisha; Jain; Jain, 2016). Há diferentes métodos de imobilização de enzimas, como demonstrado na figura 1.

Figura 1 - Métodos de imobilização de enzimas.



Fonte: Modificado e traduzido de Sirisha *et al.* (2016).

Entre os métodos de imobilização citados na figura 1, existe aquele que não necessita de um suporte sólido para imobilizar a enzima denominado como *cross-linking*. Trata-se de uma técnica irreversível que consiste na formação de ligações cruzadas entre as enzimas utilizando agentes funcionais. Estes agentes podem ser

bi ou multifuncionais e são capazes de se ligar a dois ou mais grupos dos aminoácidos das enzimas, formando uma estrutura tridimensional. Porém, ainda é uma técnica que causa uma perda considerável na atividade catalítica, além de ter baixa estabilidade mecânica pela falta de um suporte físico (Furlani *et al.*, 2020; Mohamad *et al.*, 2015).

Já entre os métodos que utilizam uma matriz polimérica para imobilizar a enzima, tem-se o aprisionamento (*entrapment*), em que a enzima fica retida em uma rede polimérica. Diferentemente de outros métodos, neste a enzima não está ligada quimicamente ao suporte. Outra técnica semelhante ao aprisionamento, é o encapsulamento, que por sua vez, utiliza membranas semipermeáveis para encapsular uma ou mais enzimas (Sirisha; Jain; Jain, 2016). A vantagem desses dois métodos é a proteção que a enzima tem por estar envolta pelo suporte, diminuindo os efeitos causados pelos compostos presentes no meio reacional. Porém, do mesmo modo que essas técnicas protegem a enzima, também criam problemas de transferência de massa, já que o substrato necessita adentrar na matriz polimérica para ter contato com a enzima (Furlani *et al.*, 2020; Liu; Chen; Shi, 2018).

No entanto, os métodos mais empregados para imobilização de enzimas, são os por adsorção física e ligação covalente. Em relação a técnica de adsorção física, consiste em interações fracas como ligações iônicas, forças de *Van der Waals* e ligações de hidrogênio entre a enzima e os grupos funcionais da superfície do suporte (Furlani *et al.*, 2020; Mohamad *et al.*, 2015). Por isso, trata-se de uma técnica simples e reversível, já que é realizada por interações fracas, no entanto, quaisquer mudanças nas condições do meio reacional (pH e temperatura) podem resultar na dessorção dessas interações enzimas (Sirisha; Jain; Jain, 2016). Além disso, devido a sua simplicidade, não se tem controle das formas como as interações irão ocorrer, acarretando uma possível queda em sua atividade, principalmente quando as interações ocorrem próximas ao sítio catalítico (Furlani *et al.*, 2020).

Para o método de ligação covalente, a interação é feita por ligações covalentes entre os resíduos de aminoácidos e os grupos funcionais presentes no suporte (Furlani *et al.*, 2020). Por se tratar de um método irreversível, a retenção da enzima

no suporte permite o seu reuso por um período mais prolongado que o de outros métodos. Além disso, o método normalmente proporciona um aumento no tempo de meia vida da enzima e na sua estabilidade térmica (Mohamad *et al.*, 2015). Em geral, os resíduos de aminoácidos mais comuns na participação dessas ligações são de lisina e arginina, que possuem grupos $(-NH)_2$, mas os de ácido glutâmico e aspártico $(-COOH)$, serina e treonina $(-OH)$ e de cisteína $(-SH)$ também podem interagir com os grupos químicos na superfície do suporte (Yushkova *et al.*, 2019).

No entanto, a escolha do método de imobilização também depende das características físicas e químicas do suporte, como tamanho e natureza de seus grupos superficiais (Mohamad *et al.*, 2015). Por isso, em determinadas condições, é necessário a utilização de um grupo funcionalizador para ativar o suporte. Isso ocorre, pois, a ligação covalente direta pode ocorrer de forma com que a enzima sofra uma modificação, acarretando um impedimento estérico do substrato até o sítio catalítico, ou acarretando em um baixo grau de imobilização (Furlani *et al.*, 2020; Henriques, 2016).

2.4. Suportes de imobilização

Um dos principais pontos a serem considerados para uma imobilização bem-sucedida, é a seleção do suporte em que a enzima irá ser imobilizada. A escolha do suporte afeta diversos outros parâmetros da imobilização, como o método que será empregado e até mesmo algumas propriedades das enzimas (Furlani *et al.*, 2020; Zdarta *et al.*, 2018). Por isso, há algumas características, referentes ao material suporte que será selecionado, que devem ser considerados, como: a superfície, se será adequada para o processo de imobilização, ou se terá que sofrer modificações químicas; a porosidade do material, dependendo da aplicação; se haverá problemas de difusão, podendo resultar na perda das enzimas e na queda da atividade catalítica; a solubilidade do material no meio reacional; a sua estabilidade mecânica e microbiana; sua toxicidade; e se o seu reuso será viável (Furlani *et al.*, 2020).

Em relação aos tipos de suportes que são empregados, podem ser classificados de acordo com sua composição química, em orgânicos ou inorgânicos (Mohamad *et al.*, 2015). Os suportes orgânicos, tem a vantagem de serem mais biocompatíveis e menos tóxicos. Em geral, são polímeros de origem sintética ou natural. Os polímeros que são sintetizados permitem escolher a composição de seus monômeros, garantindo que o suporte possa interagir de forma mais efetiva com a enzima. Já os biopolímeros naturais, devido a sua origem, sua biocompatibilidade é ainda maior, afetando menos a estrutura da enzima e permitindo que o derivado imobilizado tenha atividades catalíticas altas. Além disso, em geral, esse tipo de material não necessita de agentes funcionais, já que possuem muitos grupos reativos que interagem fortemente com a enzima. Entre eles, destacam-se como suportes a quitosana, o alginato, o colágeno, a celulose e a agarose (Zdarta *et al.*, 2018). Um suporte polimérico, não poroso, de origem natural bem consolidado para as imobilizações de proteases é a Agarose. Este polissacarídeo é amplamente utilizado para imobilização covalente devido à sua facilidade de ativação, apoiada por inúmeros protocolos de modificação baseados em diferentes grupos de funcionalização (Antunes Lopes *et al.*, 2020; Bassan *et al.*, 2016; Tacias-Pascacio *et al.*, 2021).

Já entre os materiais inorgânicos, tem-se os minerais, óxidos metálicos, os cerâmicos, as partículas magnéticas, compostos de carbono, como os nanotubos e os grafenos, e outros polímeros. Em geral, esse tipo de suporte possui ótimas propriedades mecânicas, resistência química, térmica e microbiana e a capacidade de se obter diversos formatos e composições, desde géis a coloides, como no caso dos compostos a base de sílica (Sirisha; Jain; Jain, 2016; Zdarta *et al.*, 2018).

Outros materiais inorgânicos que vêm ganhando espaço como suportes para imobilização, são os magnéticos, entre eles, os nano magnéticos. As propriedades magnéticas permitem, que com um campo magnético, a recuperação das enzimas imobilizadas seja otimizada, em menos etapas e com um menor custo das etapas de purificação. Além disso, quando se utiliza suportes nano magnéticos, devido ao seu tamanho, sua área superficial é maior, ou seja, a área de contato do suporte com a enzima é maior. Isto permite a imobilização de uma maior carga de enzima quando

comparada com outros tipos de suporte com o mesmo volume (Darwesh *et al.*, 2020; Liu; Chen; Shi, 2018; Henriques, 2016; Zdarta *et al.*, 2018).

As nanopartículas magnéticas que mais são empregadas para imobilização são as de óxidos de ferro (Fe_xO_y). Dentre elas, a magnetita (Fe_3O_4), a maguemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) e a hematita ($\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$), são as mais utilizadas, pois mesmo que possuam propriedades magnéticas menores que outros materiais, outras propriedades como estabilidade oxidativa e baixa toxicidade fazem com que sejam mais interessantes para utilizar como suportes em meios reacionais (Domingues *et al.*, 2019; Henriques, 2016). Muitas vezes esse tipo de nanopartícula magnética necessita de um grupo ativador, pois a ligação direta com a enzima não é tão estável. Um exemplo é o uso do APTS (3- aminopropiltietoxisilano), glutaraldeído, tanino, entre outros compostos (Furlani *et al.*, 2020; Darwesh *et al.*, 2020).

Outro material inorgânico empregado para imobilizações é o estireno-divinilbenzeno (Diaion® HP-20). Esse copolímero foi originalmente desenvolvido como uma matriz porosa para purificação cromatográfica (Chou *et al.*, 2015), mas também é um material avaliado em imobilizações enzimáticas. Há relatos de seu uso para imobilização de enzimas que atuam em substratos hidrofóbicos, como lipases (Freitas *et al.*, 2024; Miotti *et al.*, 2024). Entretanto, até o momento, nenhum estudo avaliou o potencial do Diaion® HP-20 como suporte de imobilização para outras classes de enzimas, como proteases, embora um estudo tenha utilizado o copolímero para purificação por adsorção de proteases de culturas microbianas (Joo e Choi, 2012).

Além disso, uma forma de tentar ampliar as opções de suportes e otimizar as reações de imobilização, é combinar diferentes materiais, com o intuito de maximizar os benefícios que ambos os materiais podem garantir para o derivado imobilizado (Zdarta *et al.*, 2018). Entre esses tipos de combinações, tem-se a de materiais orgânicos com inorgânicos, como no trabalho de Cao (2015), em que celulose nanocristalina foi combinada com óxidos de ferro para ganharem propriedades magnéticas e permitir sua recuperação para seu reuso no processo.

2.5. Aplicações de enzimas imobilizadas

Todas essas opções de imobilização fornecem várias vantagens para aplicação industrial de derivados enzimáticos. Uma das principais aplicações, como já dito anteriormente, é no setor alimentício para a produção de xaropes de açúcares, alimentos e bebidas lácteas, bebidas alcoólicas e de hidrolisados do soro do leite. Outras aplicações de enzimas imobilizadas no setor alimentício, é na produção de produtos sem lactose e na clarificação de bebidas à base de frutas, para modificação de compostos que causam sabores amargos. Um exemplo de aplicações de derivados imobilizados no setor alimentício é o emprego de proteases imobilizadas na produção de hidrolisados de proteínas com propriedades benéficas à saúde a partir de subprodutos da indústria alimentícia (Tavano *et al.*, 2018; Bilal *et al.*, 2024; Morellon-Sterling *et al.*, 2022).

Além da indústria alimentícia, as enzimas imobilizadas são empregadas na produção de diversos compostos, como biodiesel e polímeros, como o poliéster (Yushkova *et al.*, 2019). Já em relação a indústria farmacêutica, enzimas imobilizadas podem atuar como biossensores, para a detecção de diversos metabólitos que podem estar relacionados com problemas de saúde (Sirisha; Jain; Jain, 2016).

No entanto, como também já mencionado, devido à falta de estudos com proteases oriundas da *Bromelia fastuosa*, também não há trabalhos sobre a imobilização dessas enzimas. O que destaca a falta de estudos sobre o potencial dessas enzimas tanto livres, quanto imobilizadas. Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi a extração e imobilização de proteases provenientes do fruto do Gravatá (*Bromelia fastuosa*), uma fonte alternativa e pouco explorada de enzimas para aplicação em reações de hidrólise de substratos proteicos. Assim, espera-se que este trabalho reforce o potencial das proteases de *B. fastuosa* para futuras aplicações em hidrólise de proteínas.

3. Objetivos

O objetivo deste trabalho foi a extração e imobilização das proteases provenientes do fruto do Gravatá para o emprego como fonte alternativa de enzimas para reações de hidrólise de substratos proteicos.

3.1. Objetivos específicos

- Extração e preparo do extrato enzimático com atividade proteolítica obtido a partir do fruto do Gravatá;
- Análise da atividade proteolítica relativa e determinação de pH e temperatura de máxima atividade do extrato bruto escolhido;
- Screening e seleção do suporte de imobilização através da avaliação do rendimento da imobilização e das atividades dos derivados imobilizados;
- Caracterização do derivado imobilizado quanto ao pH ótimo, temperatura ótima, estabilidade operacional, e propriedades cinéticas (K_m e $V_{máx}$);
- Avaliação do potencial hidrolítico do biocatalisador, tanto na forma livre quanto imobilizada, em reações de hidrólise de soro de leite.

4. MATERIAL E MÉTODOS

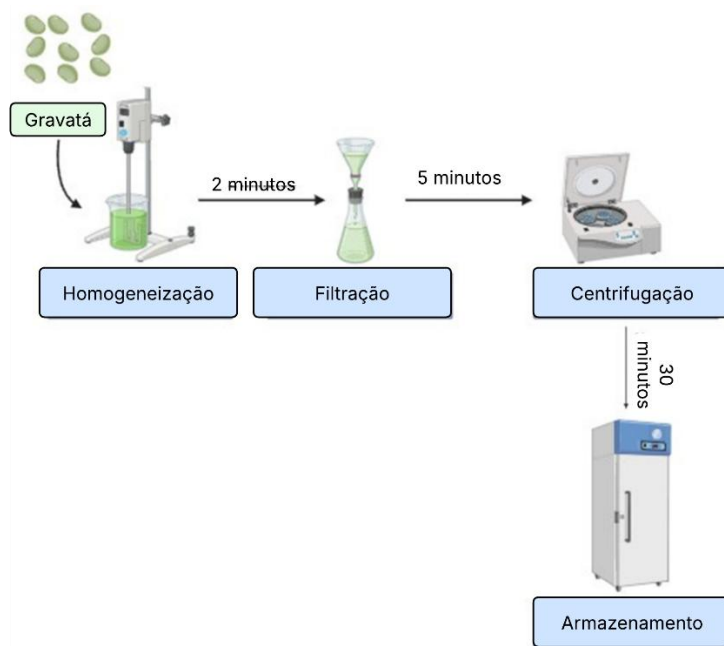
4.1. Coleta dos frutos

Os frutos de Gravatá (*Bromelia fastuosa*) foram colhidos ainda imaturos em uma fazenda na região de Araraquara – SP. Em seguida foram lavados e higienizados para retirada de possíveis contaminantes, embalados em sacos plásticos e mantidos em congelamento a -20°C até serem utilizados nos experimentos de obtenção do extrato vegetal com atividade proteolítica.

4.2. Extração e Preparo dos Extratos Enzimáticos

A fim de avaliar qual parte do fruto possuía maior atividade catalítica, os frutos foram divididos em grupos para o preparo de 3 extratos: i) fruto inteiro, ii) polpa do fruto, iii) cascas. Em ambos os casos, os frutos congelados foram cortados e homogeneizados em um liquidificador da marca Arno por 2 minutos, no meio tampão de extração McIlVaine pH 4,5 0,2 M, contendo 5 mM de EDTA e 5 mM de cisteína na proporção de 1 grama de fruto para 5 mL de tampão (1:5; m:v). As suspensões obtidas foram filtradas utilizando gaze, e os filtrados coletados foram transferidos para tubos Falcon e centrifugados à 9000 x g por 30 min a 4°C. Os sobrenadantes de centrifugação foram congelados a -20°C (Cabral *et al.*, 2005). O procedimento de extração é ilustrado na Figura 2.

Figura 2 - Etapas de preparo dos extratos enzimáticos.



Fonte: próprio autor.

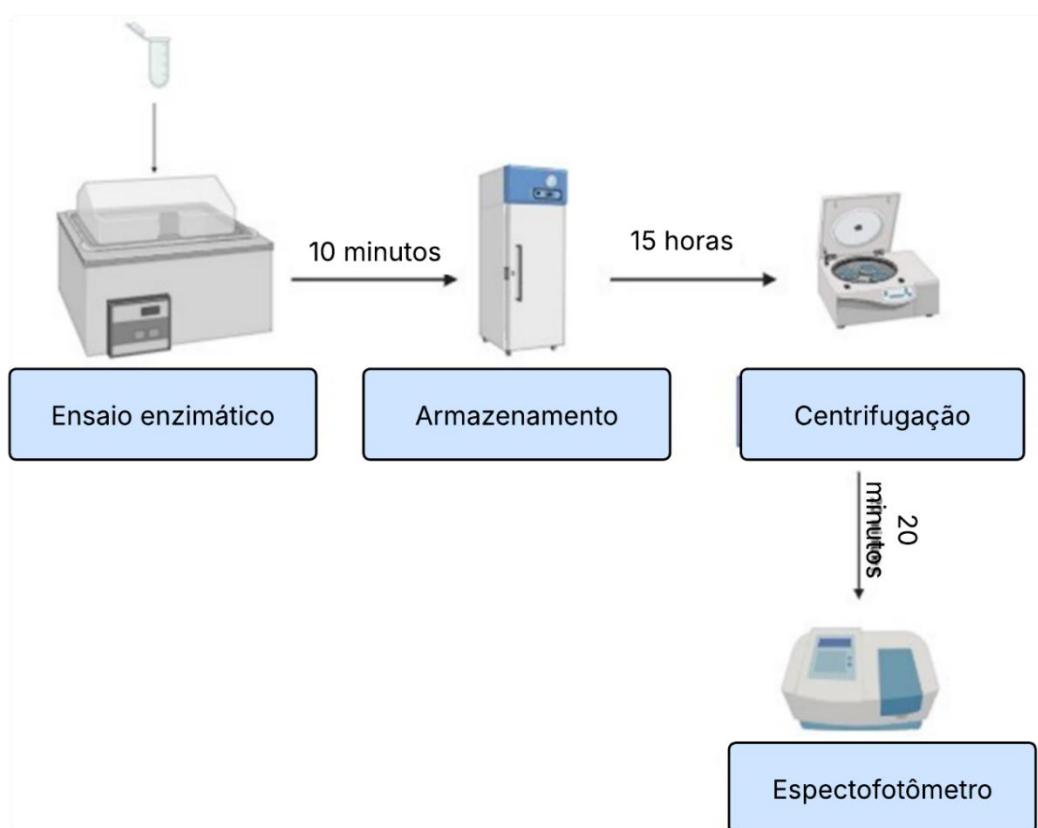
4.3. Quantificação do Teor de Proteínas dos extratos enzimáticos

Para determinar o teor de proteínas nos extratos enzimáticos foi empregado o método de Bradford (1976). Inicialmente foi construída uma curva padrão utilizando uma solução padrão de soroalbumina bovina (0,03 mM a 0,5 mM) e a leitura de absorbância foi realizada em $\lambda = 595$ nm. Para a quantificação de proteínas totais das amostras foram retirados 100 μ L dos extratos enzimáticos e homogeneizados em 700 μ L de água ultrapura (Milli-Q). Em seguida, 800 μ L do reagente de Bradford foram adicionados e após 5 min. de reação, as amostras foram submetidas a leitura no espectrofotômetro a $\lambda = 595$ nm (Bradford, 1976).

4.4. Determinação da Atividade Proteolítica dos extratos enzimáticos

Para determinar a capacidade proteolítica de todos os extratos, foi realizado o ensaio da atividade proteolítica seguindo o protocolo de Sarath *et al* (2001) utilizando como substrato uma solução de caseína 1% como proposto por Cabral (2005) e Garcia *et al* (2009) com algumas modificações (Figura 3).

Figura 3 - Esquema do protocolo modificado para ensaio proteolítico.



Fonte: próprio autor.

Inicialmente foram preparados microtubos de 2 mL contendo 800 μ L de caseína 1% com 50 μ L de tampão McIlVaine 0,2 M pH 7, que após a incubação a 37°C por 10 min, foi adicionado o extrato enzimático. Esses ensaios enzimáticos foram mantidos

em incubação por 10 min a 37°C sob agitação no banho termostatzado. Ao final dos 10 minutos foi adicionado 600 µL de solução de TCA 10% (ácido tricloroacético) para interromper a reação, sendo que para o branco a solução de TCA 10% foi adicionada imediatamente após a adição do extrato extratos enzimáticos. Todos os extratos enzimáticos foram armazenados em geladeira a 1°C overnight.

Após a período de refrigeração, as amostras foram centrifugadas por 20 minutos a 5000 x g na centrífuga 5415 D da Eppendorf. O sobrenadante resultante foi filtrado e submetido a leitura de absorbância em espectrofotômetro em $\lambda=280$ nm. Com o auxílio de uma curva de calibração de tirosina, previamente construída, foi determinado a atividade proteolítica total utilizando a equação 1 e a atividade proteolítica específica utilizando a equação 2 (Cabral, 2005; Garcia *et al.*,2009). Os volumes empregados e o processo do protocolo modificado estão resumidamente descritos na tabela 1.

$$U = \frac{\mu\text{mol de produto formado}}{\text{tempo de reação}} \quad (1)$$

$$U/mg = \frac{U}{\text{Concentração de proteínas no extrato}} \quad (2)$$

Em que: o µmol de produto formado é obtido pela curva de calibração e o tempo de reação é o tempo (min) em que o substrato esteve em contato com as enzimas.

Tabela 1 - Protocolo modificado para ensaio proteolítico.

Soluções	Tubo Teste	Tubo Branco
Caseína 1%	800 µL	800 µL
Tampão pH 7,0	50 µL	50 µL
Incubar por 10 min a 37°C		
Extrato do Gravatá	15 µL	15 µL
Incubar por 10 min a 37°C		

TCA 10%

600 µL

600 µL

Fonte: próprio autor.

4.5. Determinação do Perfil Proteico dos extratos enzimáticos

Por fim, para confirmar o sucesso da extração das proteases da *Bromelia fastuosa* e garantir que para as etapas de imobilização foi fornecido principalmente a proteína de interesse para o suporte, foi realizado uma Eletroforese SDS-PAGE com os extratos enzimáticos obtidos do fruto do gravatá (Laemmli, 1970). Para isso, foram utilizados géis de poliacrilamida a 5% e 12% para empilhamento e separação, respectivamente. O tamanho das bandas foi identificado por comparação com a escala BLUEye da Sigma–Aldrich®.

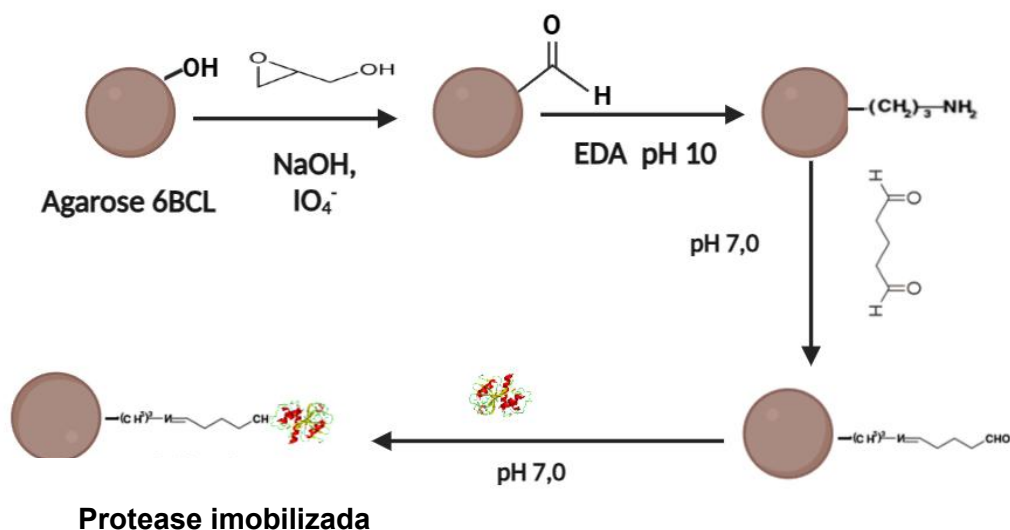
4.6. Imobilização das Proteases do Extrato Enzimático da Polpa

Após a escolha do extrato enzimático com maior potencial, a etapa seguinte foi a de imobilização das proteases do fruto nos seguintes suportes: Agarose 6BCL ativada por glutaraldeído e estireno-divinilbenzeno (Diaion®).

4.6.1. Imobilização em Agarose 6BCL ativada por glutaraldeído

O primeiro suporte avaliado foi a Agarose 6BCL ativada com glutaraldeído. A metodologia empregada para a imobilização via ligação covalente unipontual foi a descrita por Bassan (2015). O esquema do processo de imobilização está representado na Figura 4.

Figura 4 - Esquema do protocolo para imobilização em Agarose 6BCL ativada com glutaraldeído.



Fonte: próprio autor.

Inicialmente 5 gramas de agarose 6BCL foram lavadas com água deionizada e misturadas com 7,25 mL de água deionizada, 11,9 mL de NaOH 1,7 M contendo 0,34 gramas de NaBH_4 . Em seguida, a mistura foi mantida sob agitação para adição de 8,5 mL gota a gota de glicidol. A mistura continuou sob agitação leve por 18 horas em banho de gelo pelas primeiras 2 horas e as 16 horas restantes em temperatura ambiente. A suspensão foi filtrada e lavada com água ultrapura em abundância. A agarose modificada com grupos gliceril foi misturada com 10 mL de NaIO_4 100 mM e 40 mL de água deionizada para obtenção do suporte glioxil-agarose. Essa nova mistura, foi mantida sob agitação por 2 horas em temperatura ambiente e filtrada e lavada novamente com água ultrapura.

Após a ativação com grupos glioxil, 2,5 gramas de glioxil-agarose, foi adicionado em 14,275 mL de uma solução de etilenodiamina 2 M pH 10. A mistura foi mantida sob agitação por 2 horas em temperatura ambiente. Em seguida, foi adicionado 14,275 mg de NaBH_4 para redução de grupos aldeídos remanescentes em hidroxilas. O suporte amino-agarose obtido nessa reação foi filtrado e lavado com

tampão acetato de sódio 100 mM em pH 4 e água deionizada em abundância. Por fim, 1 grama do suporte amino-agarose foi homogeneizado em 2 mL de tampão fosfato 200 mM em pH 7 contendo glutaraldeído 3 mM por 15 horas. A suspensão foi filtrada e o suporte glutaraldeído-agarose foi abundantemente lavado tampão fosfato de sódio 25 mM em pH 7,0. 1 grama da agarose ativada com glutaraldeído foi adicionada em um volume de 84 mL do extrato contendo 10 miligrama de proteínas. Essa mistura foi mantida em agitação suave por 2 horas.

Para determinar se a imobilização foi bem-sucedida, em intervalos de 30 minutos ao longo da etapa de imobilização, foram retirados 15 µL do sobrenadante para avaliar sua atividade hidrolítica.

Por fim, também foi determinada a atividade do derivado imobilizado seguindo uma adaptação do protocolo do ensaio proteolítico modificado apresentado no item 3.4. Os volumes e as massas empregadas e o processo do protocolo modificado estão resumidamente descritos na tabela 2.

Tabela 2 - Metodologia para o ensaio proteolítico das proteases imobilizadas.

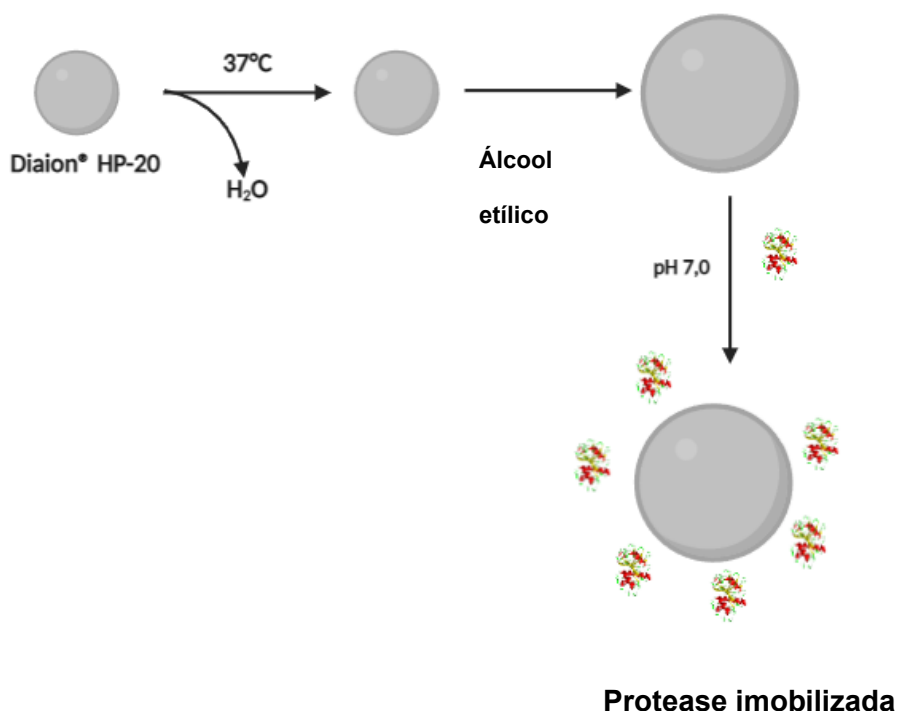
Soluções	Tubo Teste	Tubo Branco
Caseína 1%	865 µL	865 µL
Incubar por 10 min a 37°C		
Derivado Imobilizado	50 mg	50 mg
Incubar por 10 min a 37°C		
TCA 10%	600 µL	600 µL

Fonte: próprio autor.

4.6.2. Imobilização em partículas de copolímero de estireno-divinilbenzeno (Diaion®)

O segundo suporte de imobilização avaliado foi o copolímero de estireno-divinilbenzeno (sty-dvb), apresentado na Figura 5.

Figura 5 - Esquema do protocolo para imobilização no copolímero de estireno-divinilbenzeno.



Fonte: próprio autor.

A metodologia empregada consistiu em secar o suporte por no mínimo 12 horas em estufa de secagem a 100°C. O material suporte seco foi homogeneizado em etanol 95% (m/m) e incubado por 18 horas a temperatura ambiente em uma proporção de 1 grama de suporte seco para cada 5 mL de álcool. Em seguida a suspensão foi filtrada e lavada em abundância com água deionizada. O suporte obtido desse processo hidroalcólico foi utilizado para na etapa de a imobilização. A imobilização das proteases por adsorção física consistiu em homogeneizar 1 grama do suporte foi adicionada em um volume de 84 mL do extrato contendo 10 mg de proteínas. Essa mistura foi mantida sob agitação por um período de 15 horas.

Para determinar se a imobilização foi bem-sucedida, também foram retiradas alíquotas de 15 µL do sobrenadante para avaliar sua atividade hidrolítica e determinar o rendimento de imobilização. Além disso, a atividade do derivado imobilizado também foi determinada seguindo o protocolo apresentado no item 3.6.1.

4.6.3. Determinação do rendimento de imobilização

Para avaliar os processos de imobilização ao longo do tempo, alíquotas do sobrenadante foram coletadas em intervalos predeterminados e analisadas quanto à atividade hidrolítica, conforme descrito no item 3.4. Um controle negativo foi incluído em todas as reações de imobilização. Esse controle consistiu no extrato enzimático sem a adição do suporte, sendo submetido às mesmas condições do sistema de imobilização (extrato enzimático + suporte avaliado).

Além disso, considerando que a imobilização envolve proteases de um extrato bruto, um extrato enzimático contendo diversas proteínas em seu meio, o rendimento foi calculado apenas com base na atividade proteolítica do sobrenadante da imobilização e do controle (extrato enzimático sem adição do suporte), sem considerar o teor proteico. Isso ocorre porque outras proteínas podem migrar para o suporte, resultando em uma superestimação do rendimento (Bassan *et al.*, 2016). Assim, o rendimento de imobilização foi calculado utilizando a Eq. (3).

$$R(\%) = \frac{(U_{\text{Extrato bruto}} - U_{\text{sobrenadante}})}{U_{\text{Extrato bruto}}} * 100 \quad (3)$$

Em que R é o rendimento de imobilização (%), $U_{\text{Extrato bruto}}$ é a atividade hidrolítica do extrato enzimático bruto, e $U_{\text{sobrenadante}}$ é a atividade hidrolítica do sobrenadante do processo de imobilização. As atividades hidrolíticas são expressas em $\mu\text{mol de produto} \cdot \text{min}^{-1}$.

4.7. Caracterização enzimática do extrato bruto e derivados imobilizados

Após a determinação do extrato empregado nas etapas de imobilização e o preparo dos dois derivados imobilizados, a etapa seguinte foi a caracterização de todos os biocatalisadores avaliados.

Tanto o extrato enzimático da polpa contendo as proteases quanto os derivados imobilizados foram inicialmente caracterizados quanto ao pH ótimo (faixa de pH de 5,5 a 8, tampão McIlvaine) e temperatura (35 a 70 °C), usando o ensaio de atividade hidrolítica proposto por Sarath (2001), com modificações (item 3.4). A quantidade de amostra usada foi de 15 µL para o extrato enzimático e 10 mg para os derivados imobilizados.

Além disso, também foram avaliadas as estabilidades térmicas e ao pH dos biocatalisadores. Para avaliar a estabilidade ao pH, foram preparadas as soluções do tampão McIlVaine nos pHs selecionados (6, 6,5 e 7). Em seguida, em microtubos de 2 mL foi adicionado o tampão e incubado o extrato e mantidos a temperatura ambiente. A atividade desse extrato foi avaliada ao longo de 8 horas, em intervalos de 2 horas seguindo o ensaio descrito no item 3.4.

Para a estabilidade térmica, com o pH fixado, em microtubos de 2 mL foram incubados o extrato enzimático em banhos termostatizados nas temperaturas pré-determinadas (50°C, 60°C e 65°C). A estabilidade foi avaliada ao longo de 1 hora, com a atividade do extrato determinada em intervalos de 15 minutos, seguindo o ensaio descrito no item 3.4.

4.8. Determinação dos parâmetros cinéticos (K_m e V_{max})

Foram preparadas soluções de diferentes concentrações de caseína (0,05 mM; 0,1 mM; 0,15 mM; 0,2 mM; 0,25 mM; 0,3 mM; 0,35 mM; 0,4 mM; 0,45 mM; 0,5 mM) no tampão McIlVaine pH 7. Em seguida, foi realizado o protocolo de Sarath (2001) para determinação da atividade do extrato empregando as soluções de caseína, seguindo o ensaio descrito no item 3.4. e dos derivados imobilizados, descrito no item 3.6.1.

4.9. Hidrólise do soro do leite

Por fim, foi realizada a hidrólise do soro do leite com as proteases imobilizadas seguindo a metodologia proposta por Bassan (2015).

4.9.1. Obtenção do soro do leite

O soro do leite foi obtido a partir do leite integral pasteurizado. No leite foi adicionado a enzima renina de *Aspergillus niger* e CaCl_2 , nas proporções 0,6% (v/v) e 0,5% (m/v), respectivamente. Essa mistura foi mantida durante uma hora a 35°C em banho-maria. Após a coagulação, o soro foi separado do sólido resultante por filtração com gaze. Em seguida, o soro foi dialisado em membrana celulósica Trip-Fort (Hoechst) por 24 horas a 8°C em constante agitação. Decorrido a diálise para a remoção da lactose, foi adicionado caulim para a adsorção da gordura presente. Foi empregado uma proporção de 0,02 g de caulim para cada 1 mL de soro. Essa mistura foi então centrifugada a 7400 x g por 30 min a 4°C. Após a separação do caulim, o soro do leite foi armazenado em frascos e congelados até o seu uso.

4.9.2. Reação de hidrólise

O soro do leite já tratado (item 1.8.1) foi submetido a reação por 24 horas a 45°C (banho termostaticado) empregando-se 0,5 g do derivado imobilizado ou 15 µL de extrato para cada 1mL do substrato. Ao fim dessa reação, o produto formado foi filtrado e submetido uma eletroforese para uma análise qualitativa para avaliar a se houve a hidrólise (Bassan, 2015).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

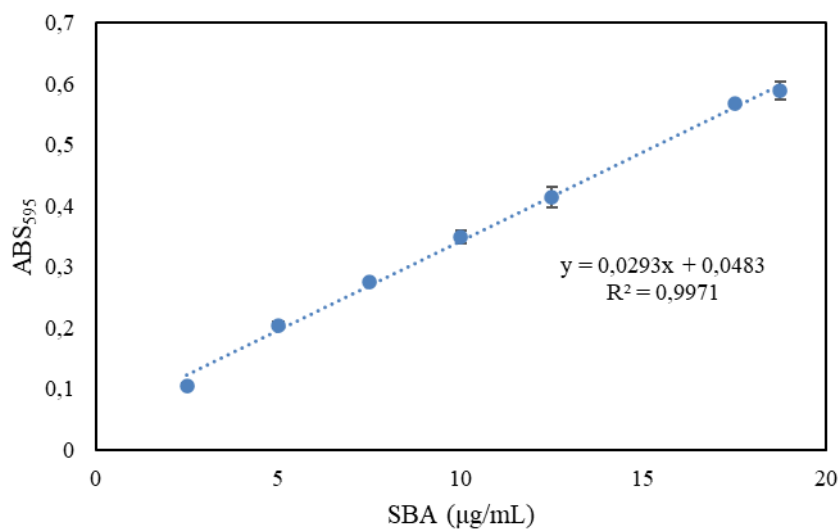
Para o presente estudo, foi realizada a extração, imobilização e caracterização das proteases presentes no fruto do Gravatá (*B. fastuosa*) para avaliar se essa fonte pouco explorada é uma alternativa viável para a obtenção de proteases para a aplicação em reações de hidrólise de substratos proteicos.

5.1. Curvas analíticas

Para determinar o teor de proteínas presente nos extratos foi construída uma curva analítica utilizando soro albumina bovina (SBA) como padrão de proteína (Figura 6) e para determinação da atividade enzimática total e específica foi construída uma curva utilizando o aminoácido tirosina como padrão (Figura 7).

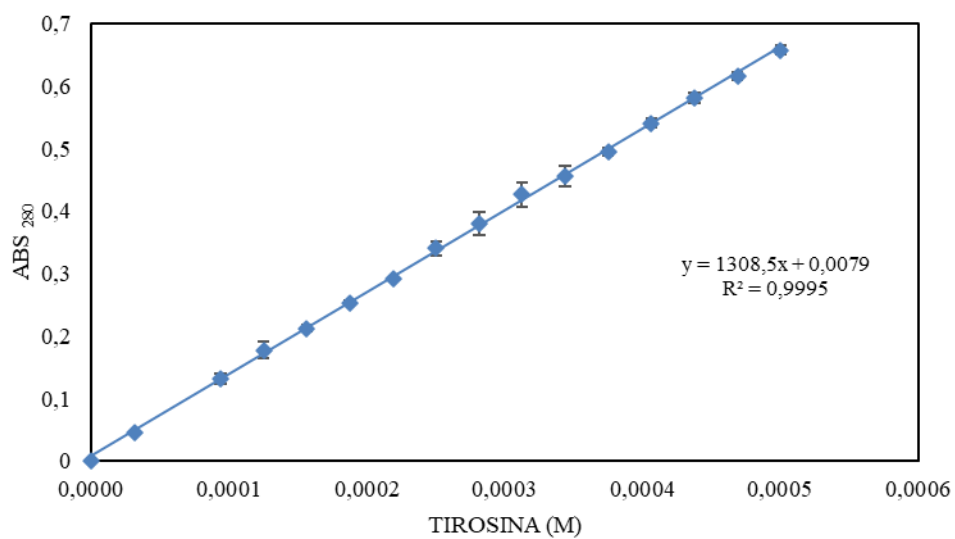
A partir da construção das curvas analíticas, os coeficientes de determinação (R^2) de 0,9971 (Figura 6) e de 0,9995 (Figura 7) comprovam que o modelo se ajustou aos dados experimentais, garantido que todos os cálculos realizados com as respectivas equações são adequados.

Figura 6 - Curva analítica de soro albumina bovina para determinação do teor de proteínas totais.



Fonte: próprio autor.

Figura 7 - Curva analítica de tirosina para determinação de atividade proteolítica.



Fonte: próprio autor.

5.2. Extração e preparo dos extratos enzimáticos

Após o preparo dos extratos de acordo com o item 3.2, partindo-se dos frutos apresentados na Figura 8, foram realizadas a quantificação das proteínas presentes no meio e o ensaio de atividade enzimática. Assim, foi possível confirmar a existência de proteases presentes no fruto, além do fato de que a metodologia empregada para o preparo do extrato mostrou-se bem-sucedida. Ademais, a partir desses experimentos foi possível determinar qual parte do fruto possuía maior potencial catalítico. Portanto, os resultados apresentados na Tabela 3, mostram que o preparo do extrato somente com a polpa mostrou-se mais vantajoso do que o preparo com o fruto inteiro.

Figura 8 - Fruto da Bromelia fastuosa (Gravatá) antes da extração.



Fonte: Próprio Autor.

Tabela 3 - Determinação do teor de proteínas e da atividade enzimática presente nos frutos do Gravatá.

Extrato	Teor de Proteínas ($\mu\text{g/mL}$)	Atividade (U/mL)	Atividade Específica (U/mg)
Polpa	$163,60 \pm 5,60$	$17,98 \pm 1,29$	$109,92 \pm 7,86$

Casca	110,09 ± 3,28	4,69 ± 0,65	42,62 ± 5,90
Fruto Inteiro	119,87 ± 0,42	10,11 ± 0,27	84,34 ± 2,22

Fonte: próprio autor.

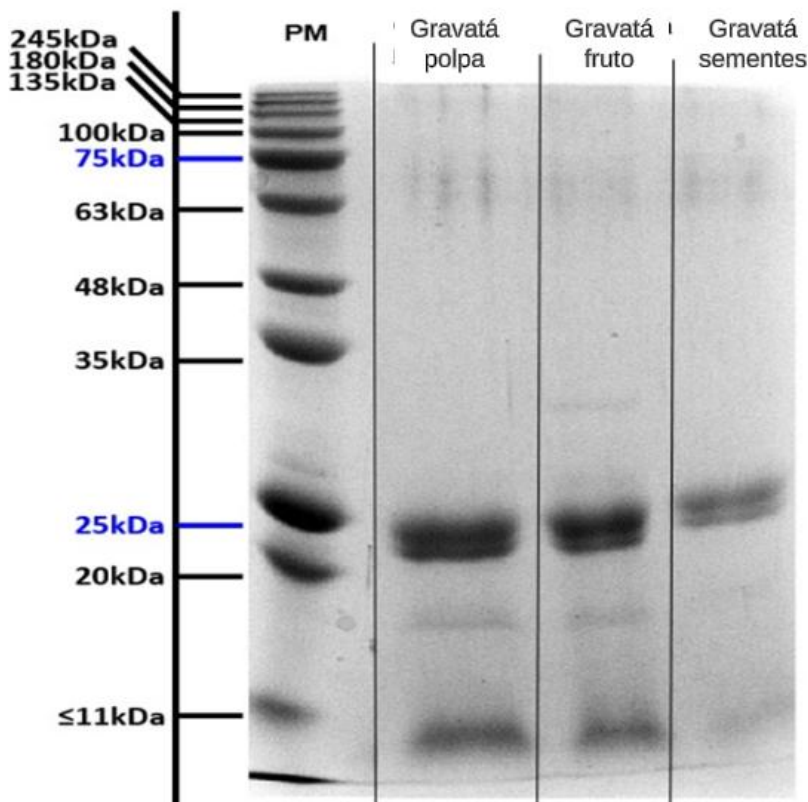
Assim, pode-se observar pelos dados da Tabela 3 que o extrato da polpa apresentou o maior teor de proteína. Esse resultado contradiz a expectativa de que o teor de proteína do extrato da fruta inteira seria maior do que o do extrato da polpa (apenas uma parte do fruto). Uma possível explicação para esse resultado é a ligação de compostos encontrados na casca da fruta com proteínas durante a extração e sua subsequente separação do sobrenadante após a etapa de centrifugação. Vale ressaltar que o sobrenadante é a fração onde as proteínas de interesse são encontradas. Essa hipótese é reforçada pelos resultados da atividade proteolítica. A atividade do extrato da polpa foi 23,27% maior do que a do extrato da fruta inteira e 61,23% maior do que a do extrato da casca. Assim, a baixa atividade dos outros extratos sugere a presença de compostos interferentes que podem ter reagido com proteínas de interesse (proteases) e inativando ou inibindo sua atividade.

Ao avaliar tanto a concentração de proteínas, quanto a atividade específica, observou-se que os mais elevados valores de atividade e atividade específica foram obtidos empregando-se o extrato contendo a polpa do Gravatá. Isto sugere uma maior concentração das proteases na polpa do fruto, corroborando o estudo de Cabral (2005) que também realizou seus experimentos com o fruto sem casca e semente, somente a polpa. Dessa forma, optou-se por dar continuidade ao trabalho utilizando apenas o extrato contendo a polpa do Gravatá, sem a casca e as sementes.

5.3. Perfil Proteico do Extrato Enzimático

Assim, a SDS-PAGE foi realizada para identificar as proteínas de interesse (proteases) e confirmar qual extrato apresentou o maior potencial para as próximas etapas. Os perfis proteicos dos 3 extratos avaliados, na eletroforese realizada, estão apresentados na figura 9.

Figura 9 - Eletroforese do extrato enzimático extraído da *B. fastuosa*.



Fonte: Próprio autor.

Dessa forma, como pode ser visto na figura 9, o perfil proteico dos extratos é caracterizado pela presença de três bandas mais visíveis, duas em cerca de 25 kDa e uma logo abaixo de 11 kDa. A presença de grandes quantidades de proteínas na faixa de 25 kDa está de acordo com os resultados de Cabral (2005), que extraiu e caracterizou a cisteino protease, fastuosaína, de 25 kDa de frutos de *B. fastuosa*. Com isso, a presença desta enzima nos extratos preparados é uma descoberta interessante, visto que a fastuosaína é uma protease com características semelhantes às proteases comerciais, como alta atividade proteolítica em temperaturas amenas e pH ótimo próximo ao neutro (Gurumallesh *et al.*, 2019).

A presença dessa protease na banda de 25 KDa reforça que o processo de obtenção dos extratos enzimáticos com as proteínas de interesse foi bem sucedido.

Ademais, a presença de apenas essas bandas é outro indicativo de que outras proteínas e compostos foram removidos durante a extração. Com isso, as proteases têm maiores chances de se ligar ao suporte na reação de imobilização. Assim, como os extratos brutos tinham baixas concentrações de proteínas indesejadas, a reação de imobilização pode contribuir para aumentar a purificação parcial desse enzimas, possivelmente resultando em maiores rendimentos após o processo de imobilização (Remonatto *et al.*, 2022a; Morellon-Sterling *et al.*, 2022).

Além disso, comparando os perfis proteicos dos extratos enzimáticos brutos, observa-se visualmente uma diferença nas concentrações proteicas nas bandas de 25 KDa e 11 KDa entre os extratos. Com isso, é perceptível que os extratos provenientes do fruto inteiro e da polpa, apresentaram uma maior quantidade da proteína de interesse.

Essa afirmação vai de encontro com os valores de teor proteicos dos extratos apresentados na tabela 3. Portanto, o extrato enzimático da polpa de *B. fastuosa* foi selecionado para as próximas etapas de imobilização, dada sua maior concentração de protease, maior atividade proteolítica e menores níveis de contaminantes. Uma vez que a presença de casca e sementes nos extratos pode resultar em contaminantes que interferem na atividade catalítica, como observado em outros extratos proteolíticos de origem vegetal (Chaiwut; Pintathonga; Rawdkuen, 2010). O que pode ser observado no extrato enzimático proveniente da fruta inteira. Embora contivesse todas as partes dos outros extratos, o extrato da fruta inteira apresentou a menor atividade e concentração de proteína. Pois, como já mencionado anteriormente, é possível que alguns compostos tenham interagido com as proteínas de interesse. Dessa forma, seriam necessárias etapas adicionais para remover impurezas, o que poderia aumentar o custo e o tempo de produção do extrato (Atsakou *et al.*, 2023). Diferente do extrato proveniente da polpa, em que uma única etapa de separação física das sementes e casca foi suficiente para eliminar esses contaminantes, reduzindo a quantidade de interferentes durante a imobilização e, conseqüentemente, proporcionando uma maior porcentagem de proteases com atividade catalítica (Morellon-Sterling *et al.*, 2022).

5.4. Imobilização das proteases dos extratos enzimáticos

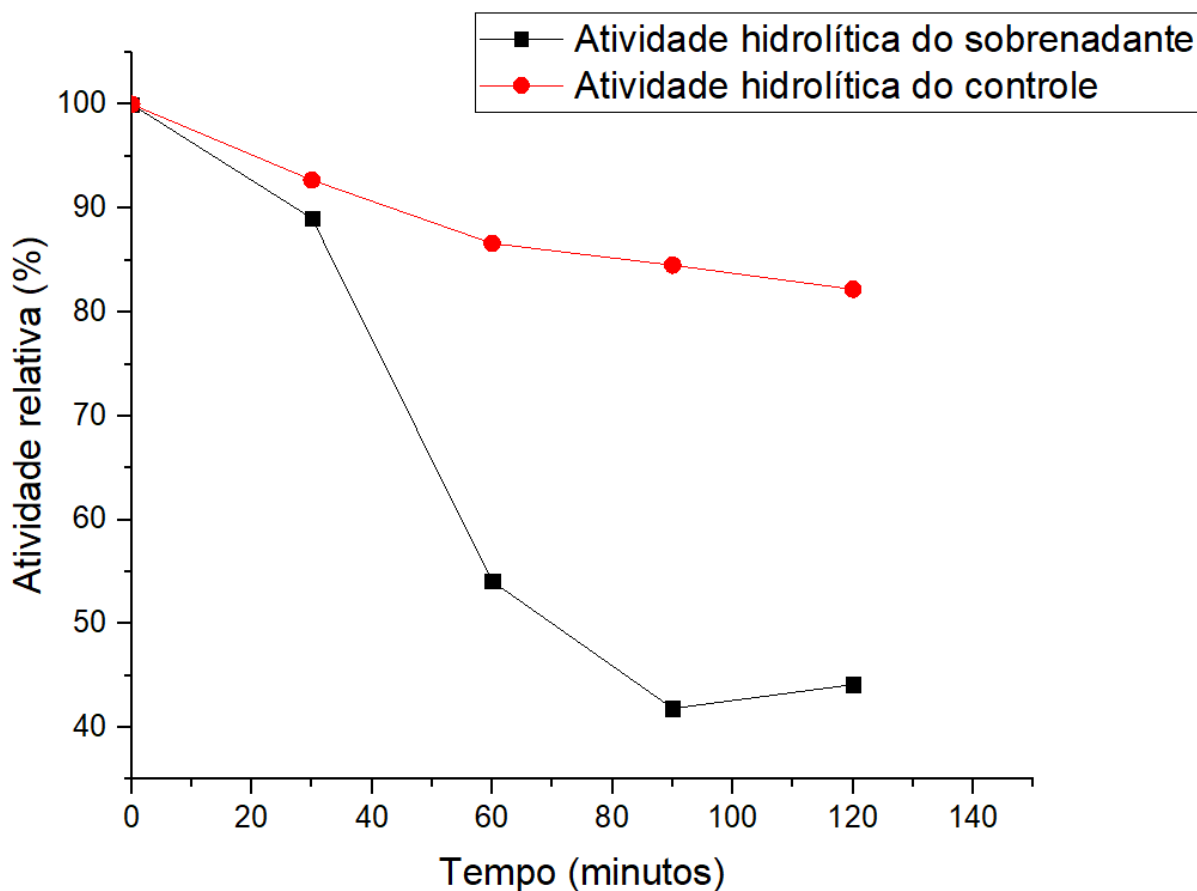
Após a escolha do extrato com maior potencial catalítico para imobilização, dois suportes foram testados: um consolidado para proteases (agarose 6BCL) e outro que ainda não havia sido aplicado para essa classe de enzimas (Diaion® HP-20) (Braham *et al.*, 2021). Para a imobilização na agarose, o glutaraldeído foi utilizado como agente funcionalizante para a ligação covalente da enzima. Já a imobilização no Diaion® HP-20 ocorreu por adsorção física, sem necessidade de etapas de ativação (Bassan *et al.*, 2016; dos Freitas *et al.*, 2024).

5.4.1. Avaliação da Influência da Agitação e do Tempo na Imobilização de Proteases

Inicialmente, foram avaliados os fatores da agitação e do tempo de imobilização das proteases em ambos os suportes. Em relação ao tempo de imobilização, para isso, foi avaliado o rendimento de imobilização, acompanhando-se os valores de atividade do sobrenadante do extrato imobilizado em relação ao extrato submetido as mesmas condições.

Assim, para o processo de imobilização na agarose 6BCL, o resultado está apresentado na Figura 10.

Figura 10 - Atividade do sobrenadante do extrato imobilizado em relação ao extrato submetido as mesmas condições.



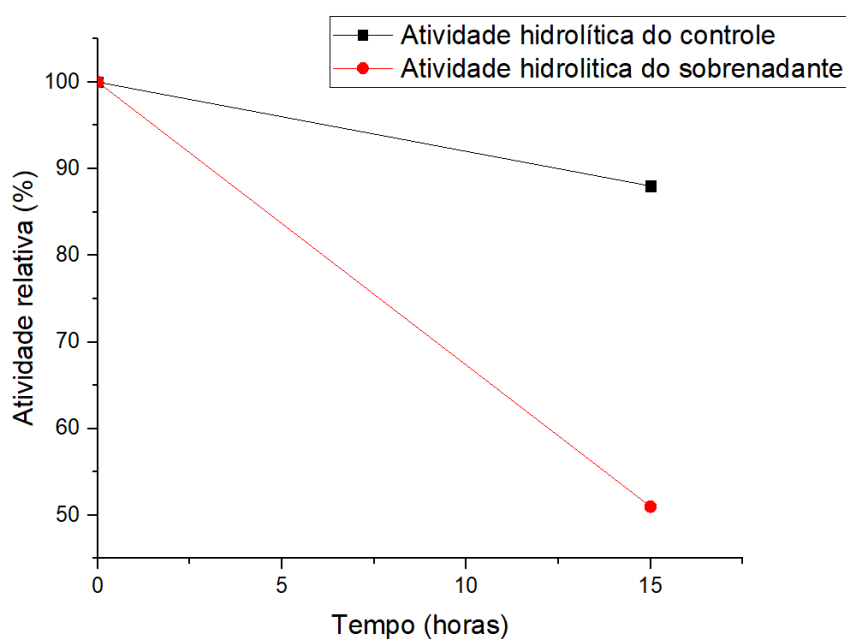
Fonte: próprio autor.

Observando a figura 10 nota-se uma queda na atividade do extrato presente na imobilização (sobrenadante), o que indica uma migração das enzimas do meio líquido para o suporte sólido. O extrato utilizado como comparativo (controle) manteve sua atividade, sem muita variação ao longo processo de imobilização, o que indica a não ocorrência de uma reação de autólise degradando as enzimas presentes no meio.

Além disso, é possível afirmar que após o tempo de 90 min não houve uma variação significativa da atividade do sobrenadante, indicando que o máximo de proteínas foram imobilizadas, resultando em 46% de rendimento de imobilização das proteases na agarose modificada com glutaraldeído.

Para o outro suporte avaliado (Figura 11), o poli(estireno-co-divinilbenzeno), obtiveram-se resultados semelhantes da agarose quanto ao rendimento de imobilização, alcançando após 15 horas um total de 49% de migração para o suporte. Nesse caso também não há uma queda considerável na atividade do controle após as 15 horas, indicando que não houve perda na atividade do sobrenadante durante a imobilização também.

Figura 11 - Gráfico da atividade do sobrenadante do extrato imobilizado em relação ao extrato submetido as mesmas condições.



Fonte: próprio autor.

Além do tempo da etapa de imobilização, como comentado, outro fator avaliado foi a agitação durante essa etapa. Portanto, com o tempo do processo de imobilização definido para cada etapa, foi avaliado duas condições de agitação: uma mais suave, a 80 RPM; e outra maior, a 190 RPM. Esse aumento na agitação teve como objetivo promover a interação entre as proteínas e os suportes.

Como resultado, observou-se um aumento significativo na migração da enzima para a agarose e para o Diaion® HP-20, conforme mostrado na Tabela 4. Esse aumento na migração foi avaliado pela determinação do rendimento de imobilização (item 3.6.3), que considera a atividade proteolítica do extrato enzimático antes e após a imobilização. A redução da atividade durante a reação de imobilização indica que as proteínas de interesse migraram para o suporte. O maior rendimento de imobilização obtido a 190 rpm pode ser atribuído ao aumento na velocidade de agitação, levando a uma interação mais intensa entre as enzimas e o suporte.

Tabela 4 - Rendimento de imobilização de proteases em Agarose ativada com Glutaraldeído e Diaion® HP-20 antes e após modificação na agitação durante os processos de imobilização.

Suporte	Rendimento de imobilização (%)	
	80 RPM	190 RPM
Agarose	46	74
6BCL		
Diaion® HP-	49	89
20		

Fonte: próprio autor.

No primeiro teste de imobilização (80 rpm), o rendimento foi superior a 40% para ambos os suportes. Esse valor foi inferior ao obtido com enzimas comerciais, conforme relatado por Bassan *et al.* (2016), que alcançaram rendimentos superiores a 80% na imobilização da protease tripsina na agarose 6BCL. No entanto, esses baixos rendimentos já eram esperados, pois extratos vegetais são conhecidos por conter outros compostos, como proteínas, que podem dificultar a migração das enzimas de interesse para o suporte (Patil e Rathod, 2021). Porém, quando comparado com rendimentos obtidos de imobilizações de proteases de outros extratos vegetais, os rendimentos iniciais de imobilização foram superiores. Lamas *et al.* (2001), ao imobilizar proteases derivadas de *Cynara cardunculus* em agarose 6BCL modificada com glutaraldeído, obtiveram um rendimento de apenas 30%.

Esse rendimento maior observado para a imobilização proposta neste trabalho pode indicar uma maior interação entre as proteases de *B. fastuosa* e o polissacarídeo, demonstrando o seu potencial para aplicações industriais, já que quanto maior for o rendimento de imobilização, provavelmente maior será a atividade desse derivado imobilizado.

Outra possível explicação dos rendimentos obtidos pode estar associada ao método de extração das enzimas de interesse. O extrato de *C. cardunculus* foi obtido por meio de um sistema aquoso bifásico, resultando na presença de contaminantes no meio, o que pode ter dificultado a migração das proteases para o suporte (Lamas *et al.*, 2001). Como no presente trabalho, o extrato enzimático apresentou baixa concentração de proteínas contaminantes, conforme confirmado pela eletroforese, pode ter ocorrido uma maior migração das proteases para os suportes, sem a concorrência com outras proteínas.

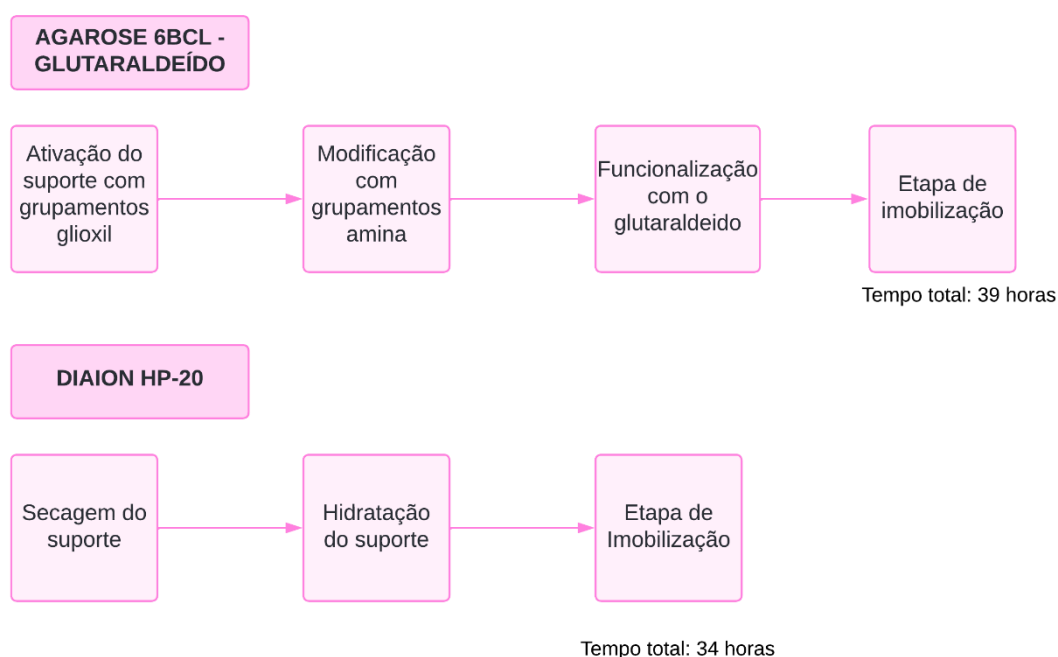
Além disso, para ambos os suportes, o aumento da velocidade de agitação durante a imobilização foi favorável, resultando em um rendimento de 74% para a agarose 6BCL ativada com glutaraldeído e 89% para o Diaion® HP-20. Esses resultados demonstram que tanto os materiais quanto os processos de imobilização foram adequados e eficazes. Com o aumento da velocidade de agitação, foi possível alcançar um rendimento semelhante ao obtido por Bassan (2016), que imobilizou uma protease comercial na agarose 6BCL. Esse resultado é relevante, pois, como já mencionado, enzimas obtidas de fontes não comerciais, como vegetais ou microrganismos, geralmente contêm proteínas contaminantes, que podem competir com as enzimas de interesse durante a imobilização (Brígida *et al.*, 2023). Essa competição não ocorre com extratos enzimáticos comerciais, que não apresentam outras proteínas ou contaminantes. Dessa forma, alcançar rendimentos de imobilização próximos aos obtidos com enzimas comerciais, reforçam ainda mais o potencial desses biocatalisadores.

Por fim, comparando os dois derivados imobilizados e seus processos de obtenção, nota-se que o Diaion® HP-20, neste estudo, ele proporcionou um

rendimento de imobilização 16% superior ao da agarose (Tabela 4), que já é amplamente utilizada para imobilização de proteases em estudos anteriores (Tacias-Pascacio *et al.*, 2021). Esses resultados demonstram o potencial do Diaion® HP-20 como suporte para enzimas hidrofílicas, com uma afinidade superior à esperada.

Comparado à agarose, o Diaion® HP-20 não requer múltiplas etapas para modificação de seus grupos reativos, pois a imobilização ocorre por adsorção física (Fig. 12). Na adsorção física, as enzimas interagem principalmente por ligações fracas com os grupos químicos presentes na superfície do suporte (Freitas *et al.*, 2024). Já na imobilização em agarose, o polissacarídeo passa por diversas etapas complexas de ativação, e as enzimas são ligadas covalentemente ao suporte (Bassan *et al.*, 2016). Assim, considerando que o Diaion® HP-20 não passou por modificações na superfície, pode-se afirmar que seu maior rendimento está relacionado à sua maior afinidade com proteases.

Figura 12 - Comparativo entre as etapas de imobilização nos dois suportes.



Fonte: próprio autor.

Outra vantagem do Diaion® HP-20 é que o derivado imobilizado apresentou maior atividade em comparação à agarose ativada com glutaraldeído. Os derivados obtidos com o polissacarídeo apresentaram uma atividade hidrolítica de 2,9 U/g, enquanto aqueles obtidos com o copolímero atingiram 3,9 U/g, representando um aumento de 25%. Essa diferença significativa pode estar relacionada ao tipo de interação entre as enzimas e o suporte, conforme mencionado anteriormente. Como o Diaion® HP-20 não passa por nenhuma modificação superficial, as interações entre enzimas e suporte são fracas. Consequentemente, não há ligações fortes que possam alterar a conformação ou o sítio ativo da enzima (Boudrant *et al.*, 2020; Remonatto *et al.*, 2018).

De forma geral, o maior rendimento de imobilização e a maior atividade hidrolítica obtidos com o uso do Diaion® HP-20 destacam o potencial inédito desse suporte na imobilização de proteases e, possivelmente, de outras enzimas hidrofílicas. Com poucos testes, foi possível imobilizar com sucesso o catalisador e obter resultados similares aos da agarose, que é amplamente utilizada para a imobilização de proteases.

Em relação a esse suporte, é importante destacar que não são encontrados na literatura trabalhos de imobilização de proteases. Assim, a obtenção de tais resultados de rendimento e de atividade proteolítica quando comparados a da Agarose, demonstram o grande potencial do poli(estireno-co-divinilbenzeno) para imobilização de enzimas.

5.5. Caracterização do extrato enzimático

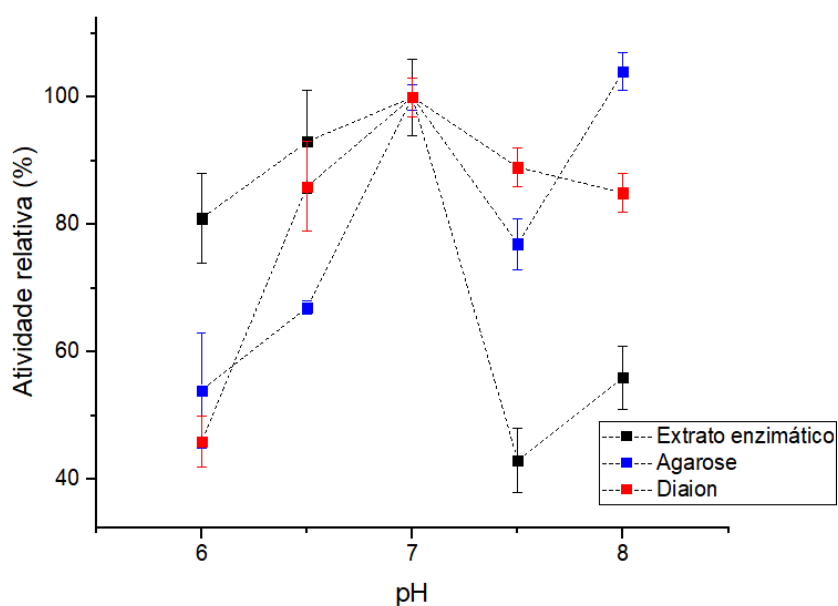
Os parâmetros de atuação das enzimas podem mudar com a imobilização. Pois esses parâmetros estão associados às condições ambientais nas quais as enzimas são aplicadas, possivelmente afetando a estrutura da enzima e a capacidade catalítica (Remonatto *et al.*, 2021). Assim, a etapa seguinte foi a caracterização das

proteases presentes no extrato enzimático proveniente da polpa do gravatá e dos derivados imobilizados obtidos.

5.5.1. Determinação do pH ótimo

O primeiro parâmetro avaliado foi o pH. Não foi possível avaliar o comportamento do extrato em uma faixa de pH maior devido à desnaturação do substrato. Tal desnaturação foi evidenciada pela formação de agregados e precipitação (Dalglish, 1982), não permitindo sua solubilização no tampão para a realização dos experimentos.

Figura 13 - pH ótimos das proteases no extrato enzimático e nos derivados imobilizados.



Fonte: próprio autor.

Conforme ilustrado na figura 13, houve um pico de atividade catalítica próximo ao pH 7,0, com uma redução acentuada em níveis de pH mais altos tanto no extrato enzimático quanto nos derivados imobilizados. Os resultados do extrato bruto estão de acordo com os de Cabral *et al.* (2006), que, ao extrair e caracterizar a fastuosaína,

observaram atividade proteolítica máxima próximo ao pH 7,0. Esse comportamento é semelhante ao observado para cisteíno proteases comerciais de origem vegetal, como a bromelaína e a papaína, que apresentam alta atividade próxima ao pH neutro. Essas proteases também apresentam semelhanças às de *B. fastuosa* em relação à estrutura e sequência de aminoácidos (Cabral *et al.*, 2006; Gurumalles *et al.*, 2019; Gagaoua *et al.*, 2021).

Os derivados imobilizados apresentaram comportamento semelhante às proteases presentes nos extratos enzimáticos, atingindo atividade máxima em pH 7 (figura 13). Esse resultado confirma que a imobilização não resultou em alterações conformacionais que pudessem ter alterado o ponto de conversão máxima do substrato em produto. Entretanto, em valores de pH mais altos, a diminuição da atividade foi menos acentuada. Em pH 7,5, a atividade catalítica dos derivados foi superior a 70% daquela obtida no pH ótimo (pH 7,0). Esse comportamento é esperado para enzimas imobilizadas, visto que a imobilização diminui o acesso dos componentes do meio à enzima, aumentando os problemas associados à transferência de massa (Bilal *et al.*, 2019; Zdarta *et al.*, 2018; Tacias-Pascacio *et al.*, 2021). Como resultado, o impacto desses compostos nas enzimas é minimizado, permitindo que as proteases imobilizadas resistam e permaneçam ativas em condições mais alcalinas. Em meio ácido, a atividade dos derivados imobilizados foi menor que a das proteases solúveis. Esse fato pode ser atribuído ao processo de imobilização: o confinamento do catalisador ao suporte pode modificar a conformação da enzima, prejudicando o desempenho nessa faixa de pH (Tavano *et al.*, 2018). Entretanto, para o derivado de Agarose, foi observado um aumento no pH 8,0. Esse comportamento pode estar associado à desnaturação do substrato devido ao pH avaliado, indicando que houve degradação da caseína e liberação de aminoácidos no meio, o que pode ter resultado em um falso aumento da atividade neste ponto (Dalglish, 1982).

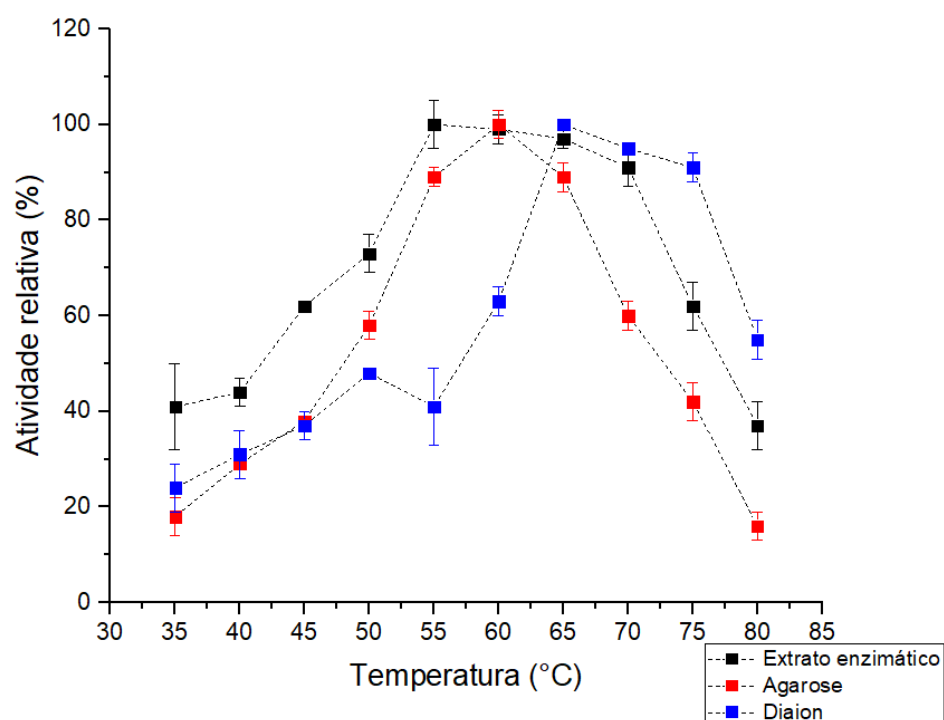
Por fim, comparando o comportamento dos derivados imobilizados nos diversos valores de pH, nota-se novamente que as proteases associadas ao Diaion® se destacam. Em condições alcalinas, as enzimas imobilizadas no copolímero apresentaram 90% da atividade máxima. Comportamento semelhante foi observado

nas condições mais ácidas. As proteases imobilizadas em Diaion® HP-20 mantiveram 21% mais atividade do que aquelas imobilizadas em agarose. Esses resultados são ainda mais relevantes, dado que o copolímero ainda não havia sido aplicado na imobilização de proteases. Não apenas a imobilização foi bem-sucedida, mas a capacidade catalítica dos derivados também foi superior à observada ao usar agarose como suporte.

5.5.2. Determinação da temperatura ótima

A análise seguinte teve como objetivo determinar a faixa de temperatura ótima dos derivados imobilizados. Os resultados são mostrados na figura 14.

Figura 14 - Temperaturas ótimas das proteases no extrato enzimático e nos derivados imobilizados.



Fonte: próprio autor.

Assim, a atividade máxima foi alcançada a 55 °C para proteases presentes no extrato enzimático e em temperaturas ainda mais altas para derivados imobilizados. Na faixa de 55 a 70 °C, houve uma variação mínima na atividade enzimática do extrato, permanecendo alta. Esta descoberta demonstra o potencial do extrato de *B. fastuosa* para aplicações em altas temperaturas.

Ademais, as cisteino proteases possuem a capacidade de manter a atividade proteolítica em altas temperaturas, como a bromelaína e a papaína, que também apresentam atividade em temperaturas de até 80 °C (Gurumallesh *et al.*, 2019).

Com isso, ao comparar os resultados ao estudo realizado por Cabral (2005), observa-se uma semelhança na temperatura ótima, uma vez que este autor também obteve a atividade máxima em 55°C para a fastuosaína, que como mencionado, possui características semelhantes ao relatado para outras proteases vegetais como bromelinas. No estudo realizado por Vallés e colaboradores (2018), por exemplo, as peptidases presentes na *Bromelia antiacantha* também forneceram valores de pH ótimo próximo ao neutro e temperatura ótima próximo ao das proteases presentes no extrato enzimático.

No geral, os resultados também demonstram o potencial dos derivados imobilizados para aplicações catalíticas. Já que é esperado que o processo de imobilização reduza o impacto das condições de reação, como o efeito da temperatura, na atividade enzimática (Remonatto *et al.*, 2022a; do Nascimento *et al.*, 2024). Assim, foi observado que a imobilização deslocou a faixa ótima das proteases avaliadas para temperaturas mais altas. A temperatura ótima das proteases foi de 55 °C e a do derivado de agarose foi de 65 °C, com atividade se mantendo próxima de 90% até 75 °C e reduzindo para 50% ao alcançar 80 °C.

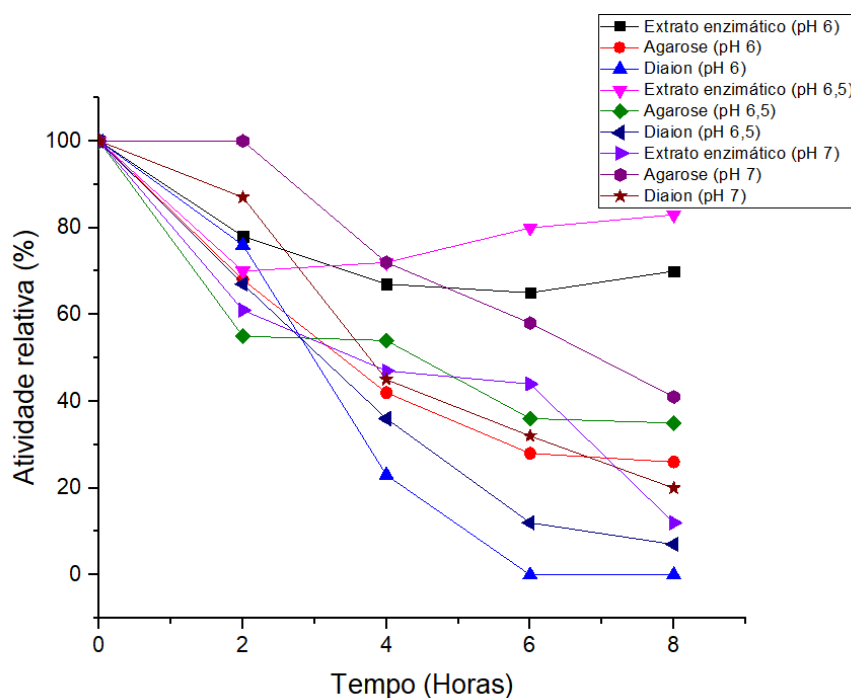
Já o derivado imobilizado do Diaion® HP-20 teve uma temperatura ótima em 60 °C, mas mostrou uma redução acentuada na atividade em temperaturas mais altas (12% a 65 °C) e mais baixas (10% a 55 °C), sendo menor do que a das proteases solúveis. Essa mudança no comportamento do catalisador em temperaturas mais

altas pode ser atribuída ao método de imobilização, já que a adsorção física resulta em interações fracas entre a enzima e o suporte em comparação com a ligação covalente. Assim, em condições extremas de temperatura, o derivado pode sofrer dissociação, dadas as ligações mais fracas entre os componentes (Furlani *et al.*, 2020).

5.5.3. Estabilidade ao pH

A partir da determinação do pH ótimo, foram escolhidos os 3 valores de pH em que a atividade foi superior a 80% para avaliar os efeitos do pH nas proteases presentes no extrato e nos derivados imobilizados ao longo do tempo. após a realização do experimento, foi construído o gráfico apresentado na figura 15 que apresenta a relação da atividade das proteases do extrato e dos derivados imobilizados nos valores de pH de 6, 6,5 e 7 ao longo de 8 horas.

Figura 15 - Estabilidade ao pH das proteases presentes no extrato enzimático e dos derivados imobilizados.



Fonte: Próprio autor.

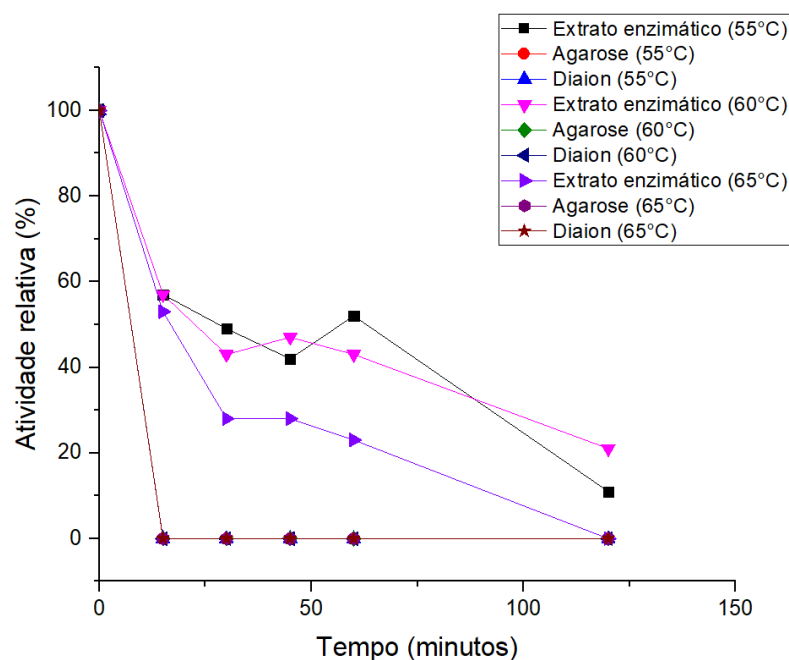
Inicialmente é perceptível que tanto para os valores de 6 e 6,5, mesmo não representando a atividade máxima das proteases presentes no extrato enzimático, a estabilidade dos catalisadores se manteve elevada, com 72% para o pH 6 e 83% para o 6,5 após o experimento. Tal efeito não é observado no ensaio com o pH 7, que resultou em uma queda de mais de 50 % em metade do tempo (4 horas), atingindo 12% da atividade inicial ao fim das 8 horas, mesmo sendo o valor de pH com máxima atividade da enzima. Isso indica que para a sua aplicação em reações de longa duração, o seu emprego possa ser em condições mais ácidas, já que ainda sim apresentam atividades elevadas e conseguem mantê-las.

No entanto, para ambos os suportes empregados, observa-se que a imobilização não resultou em uma melhora na estabilidade em relação a faixa de pH testada, causando até uma queda mais rápida da atividade proteolítica.

5.5.4. Estabilidade Térmica

Quanto à estabilidade térmica das proteases presentes no extrato enzimático, o gráfico na figura 16 apresenta os resultados obtidos. Assim como na estabilidade ao pH, foram selecionados os valores de temperatura que mantiveram a atividade acima de 80%, sendo os valores de 55°C, 60°C e 65°C.

Figura 16 - Estabilidade térmica das proteases presentes no extrato enzimático e dos derivados imobilizados.



Fonte: Próprio autor.

Neste caso, os resultados apontam uma maior influência da temperatura nas proteases presentes no extrato proveniente da polpa do Gravatá, já que o tempo total do ensaio foi de apenas 2 horas, promovendo quase a total inativação das enzimas. Também se observaram quedas maiores na atividade, resultando em uma perda de quase 50% em apenas 15 minutos de exposição nas diferentes temperaturas. Isso sugere que tais temperaturas, mesmo que representem maiores conversões do substrato (máxima atividade proteolítica), não são indicadas para reações de longa duração. O mesmo efeito é observado para os derivados imobilizados, no entanto, nesse caso, a queda foi de 100% da atividade.

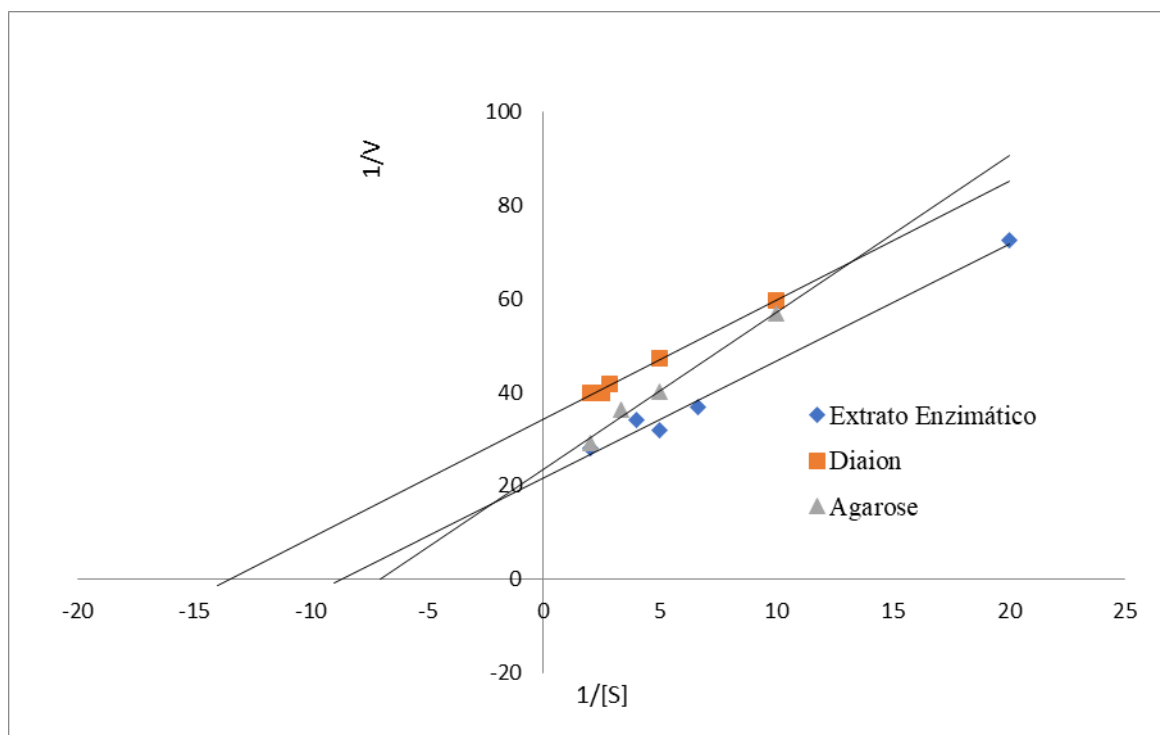
Para os derivados imobilizados, observou-se que após os primeiros 15 minutos, a atividade também caiu para 0. Dessa forma, tal problemática indica que para manter a estabilidade do extrato enzimático e para os derivados imobilizados, é interessante que sejam empregadas menores faixas de temperatura para a realização

do estudo, como no realizado por Cabral (2005). Este autor observou que para valores menores de temperatura (25°C, 37°C e 45°C) a atividade se manteve estável acima de 80% por até 3 horas. Além disso, comparando-se os dados obtidos neste trabalho ao de Cabral (2005), também nota-se que a estabilidade térmica (65°C) da fastuosaína forneceu comportamento semelhante, uma vez que após 2 horas de exposição nesta temperatura, a atividade proteolítica atingiu valores extremamente baixos. Assim, tanto para as proteases presentes no extrato, quanto para os derivados imobilizados, avaliar sua estabilidade em condições mais brandas, como as apresentadas por Cabral (2005), pode resultar em um melhor entendimento dos comportamentos desses biocatalisadores.

5.5.5. Determinação dos parâmetros cinéticos (K_m e $V_{máx}$)

O K_m e $V_{máx}$ do extrato bruto e derivados imobilizados foram determinados para entender melhor os efeitos da imobilização na atividade proteolítica. A cinética da reação é descrita na figura 17.

Figura 17 - Gráfico do modelo cinético das proteases no extrato enzimático e dos derivados imobilizados para determinação de K_m e V_{max} .



Fonte: próprio autor.

O ajuste do modelo cinético (modelo *lineweaver-burk*) aos dados experimentais (figura 17) forneceu coeficientes de determinação (R^2) de 0,9877 para enzimas solúveis, 0,9974 para enzimas imobilizadas em Diaion® HP-20 e 0,9921 para enzimas imobilizadas em agarose. Os parâmetros cinéticos K_m e V_{max} para proteases solúveis e imobilizadas foram determinados usando o modelo (Tabela 5).

Tabela 5 - Parâmetros cinéticos das proteases presentes no extrato enzimático e derivados imobilizados.

	K_m (μmol)	V_{max} (μmol.min ⁻¹)
Extrato enzimático	0,115	0,046
Agarose 6BCL	0,143	0,043
Diaion® HP-20	0,074	0,029

Fonte: próprio autor.

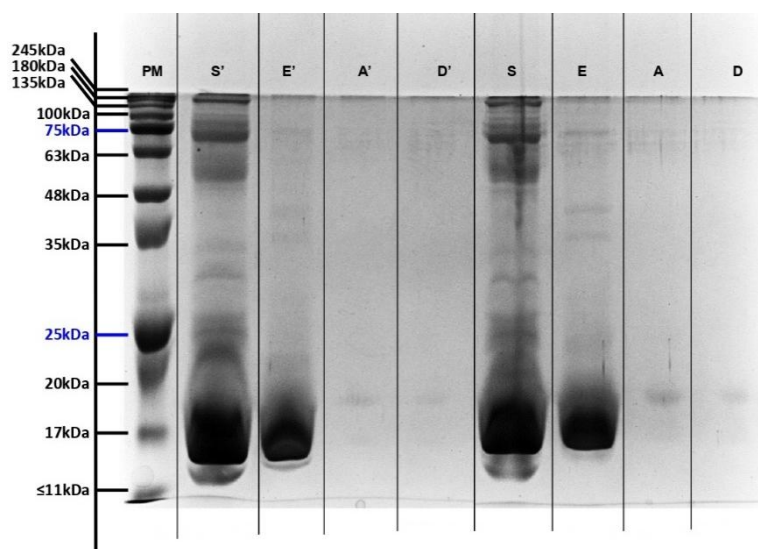
O uso de agarose ativada por glutaraldeído não forneceu mudanças consideráveis nos parâmetros cinéticos, indicando nenhuma mudança na conformação da enzima ou no sítio catalítico durante o processo de imobilização. Tal resultado é interessante, já que demonstra que o processo de imobilização não afetou a enzima e sua capacidade catalítica, que continua atuando de forma semelhante de quando está no extrato enzimático, sofrendo apenas dos efeitos de transferência de massa e de energia, característicos de derivados imobilizados, que foram apresentados na caracterização dos parâmetros ótimos nos itens 4.5.1 e 4.5.2.

Em contraste, a imobilização no Diaion® HP-20 resultou em uma diminuição em K_m e V_{max} em comparação com o extrato enzimático. Um K_m menor indica que as proteases imobilizadas requerem uma concentração menor de substrato para atingir metade de sua velocidade máxima, representando uma maior afinidade com o substrato (Remonatto *et al.*, 2021; Abdella; Ahmed; Hassan, 2023). Uma hipótese para essa maior afinidade é que a imobilização serviu como uma etapa de purificação, separando e concentrando as enzimas de interesse enquanto eliminava contaminantes que poderiam interromper a interação do substrato com o biocatalisador (Troncoso; Sánchez; Ferreira, 2022).

5.6. Hidrólise do soro do leite

Por fim, para confirmar o potencial para hidrolisar substratos proteicos, as proteases do Gravatá foram empregadas como catalisadores na reação de hidrólise do soro do leite. O perfil proteico dos produtos formados pode ser visualizado na eletroforese (Figura 18), em que S é o soro do leite antes da reação, E é o produto da reação empregando o extrato enzimático, A é o produto da reação com o derivado imobilizado da Agarose e D o produto usando o derivado com Diaion®. Além disso, as análises apresentadas em S', E', A' e D' representam as amostras concentradas (4x) com um corte em 10 kDa.

Figura 18 - Eletroforese do soro do leite e dos hidrolisados obtidos das reações com o extrato enzimático e as proteases imobilizadas.



Fonte: Próprio autor.

Sendo assim, ao observar os resultados obtidos, é possível concluir que as proteases estudadas nesse projeto foram capazes de hidrolisar o substrato ofertado (soro de leite bovino). Isso se deve ao fato de que quando comparado o perfil do substrato (S e S') com os outros perfis, nota-se que o primeiro possui diversas bandas ao longo de todo o gel, o que é esperado, já que é conhecido diversas proteínas presentes no leite que se encontram nessas bandas, como a soro albumina entre os 75 e 63 kDa, α -lactoalbumina e β -lactoglobulina entre 20 e 11 kDa (Bassan, 2015; Mazorra – Manzano *et al.*, 2020). Tais bandas não aparecem ou apresentam-se menores nos perfis com os produtos hidrolisados (E, A, D, E', A' e D'), indicando que sim a hidrólise dessas proteínas.

Esse resultado é mais perceptível em E e E', em que nota-se um clareamento das bandas das proteínas com maior peso molecular e um acúmulo de proteínas na parte do gel em que encontram-se proteínas de menor peso molecular. Entretanto, ao avaliar os perfis A, D, A' e D, referentes aos derivados imobilizados, percebe-se o desaparecimento de quase todas as bandas proteicas quando comparados ao soro

bovino antes da reação (S ou S'). Isso indica que houve a hidrólise das proteínas do soro do leite, sendo possível visualizar apenas uma pequena banda na faixa de 20 a 11 kDa. Este resultado está de acordo com literatura, que prevê uma resistência das proteínas nessa faixa de serem hidrolisadas (Mazorra – Manzano *et al.*, 2020).

6. CONCLUSÃO

Ao fim do estudo, foi possível confirmar o potencial da *Bromelia fastuosa* como fonte de proteases. Os resultados demonstraram que o extrato enzimático obtido da polpa do fruto apresentou a maior atividade proteolítica e concentração de proteínas, além da menor quantidade de contaminantes em comparação aos demais extratos avaliados. A caracterização enzimática revelou que as proteases presentes nesse extrato exibiram propriedades térmicas, de pH e parâmetros cinéticos compatíveis com proteases amplamente utilizadas comercialmente. A avaliação dos suportes empregados para imobilização (agarose e Diaion® HP-20) indicou que ambas as metodologias foram eficazes, resultando em derivados imobilizados com atividade hidrolítica semelhante à das proteases na forma livre. Destaca-se que o Diaion® HP-20 apresentou desempenho superior, principalmente por ser sua primeira aplicação na imobilização de proteases. Esse suporte demonstrou alta eficiência na imobilização e manteve boa atividade catalítica em comparação à agarose 6BCL, amplamente utilizada para esse fim. Além disso, o Diaion® HP-20 exigiu menos etapas e reagentes para a imobilização por adsorção física e apresentou maior afinidade com o substrato, ressaltando seu potencial como suporte promissor para outras enzimas. Ademais, tanto as proteases no extrato enzimático quanto na forma imobilizada mostraram-se promissoras na hidrólise de substratos proteicos, como o soro de leite. Assim, os resultados obtidos evidenciam o potencial biotecnológico do fruto de *B. fastuosa* e de suas proteases, bem como a viabilidade dos suportes avaliados, para aplicações industriais, especialmente na hidrólise de proteínas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDELLA, M. A. A.; AHMED, S. A.; HASSAN, M. E. Protease immobilization on a novel activated carrier alginate/dextrose beads: Improved stability and catalytic activity via covalent binding. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 230, p. 123-139, 2023.

ABOUSAWAY, O. *et al.* Noninvasive imaging of cancer immunotherapy. **Nanotheranostics**, v.5, 90, 2021.

LOPES, LAIANE *et al.* Glyoxyl-activated agarose as support for covalently link novoprod: Biocatalysts performance in the hydrolysis of casein. **Catalysts**, [s. l.], v. 10, n. 5, 2020.

ATSAKOU, A. E. *et al.* Synthesis of dietary lipids from pumpkin (*Cucurbita pepo*. L) oil obtained by enzymatic extraction: a sustainable approach. **3 Biotech**, v. 13, n. 11, p. 1–14, 2023.

AZMI, M.S.I. *et al.* Application of Plant Proteases in Meat Tenderization: Recent Trends and Future Prospects. **Foods**, v.12, 1336, 2023.

BALAKIREVA, Anastasia V. *et al.* Trends and Prospects of Plant Proteases in Therapeutics. **Current Medicinal Chemistry**, [s. l.], v. 26, n. 3, p. 465–486, 2017.

BANERJEE, S. *et al.* Extraction and crosslinking of bromelain aggregates for improved stability and reusability from pineapple processing waste. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 158, p. 318–326, 1 set. 2020.

BASSAN, J *et al.* Immobilization of Trypsin in Lignocellulosic Waste Material to Produce Peptides with Bioactive Potential from Whey Protein. **Materials**, v. 9, p. 357, 2016.

BASSAN, J. **Hidrolisados parciais de soro proteínas lácteas bovina e bubalina obtidos com proteases imobilizadas: ensaios de transporte e absorção de peptídeos através das técnicas da dialisabilidade e cultura de células Caco-2.**

2015. 144f. Tese de doutorado – Universidade Estadual Paulista “Júlio Mesquita Filho”, Araraquara, 2015.

BASSO, A.; SERBAN, S. Industrial applications of immobilized enzymes—A review, **Molecular Catalysis**, 2019.

BENUCCI, I. *et al.* Pineapple stem bromelain immobilized on different supports: Catalytic properties in model wine. **Biotechnology Progress**, v. 28, n. 6, p. 1472–1477, nov. 2012.

BILAL, M. *et al.* Multi-point enzyme immobilization, surface chemistry, and novel platforms: a paradigm shift in biocatalyst design. **Critical Reviews in Biotechnology**, v.39, n.2, p.202-219, 2019.

BOLÍVAR, M. S. B. Future Perspective and Technological Innovation in Cheese Making Using Artichoke (*Cynara scolymus*) as Vegetable Rennet: A Review. **Foods**, v.12, 2023.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248 – 254, 1976.

BUSTAMANTE, Z. *et al.* Bioactivity and peptide profile of whey protein hydrolysates obtained from Colombian double-cream cheese production and their products after gastrointestinal digestion. **LWT**, [s. l.], v. 145, 2021.

CABRAL, H. **Análise funcional e estrutural comparativa da fastuosaina com papaínas e bromelinas**. 2005. 170f. Tese de doutorado – Universidade Estadual Paulista “Júlio Mesquita Filho”, São José do Rio Preto, 2005.

CABRAL, H. *et al.* Preliminary Functional Characterization, Cloning and Primary Sequence of Fastuosain, a Cysteine Peptidase Isolated from Fruits of *Bromelia fastuosa*. **Protein & Peptide Letters**, v. 13, p. 83-89, 2006.

CHAIWUTA, P.; PINTATHONGA, P.; RAWDKUENB, S. Extraction and three-phase partitioning behavior of proteases from papaya peels. **Process Biochemistry**, v.45, p.1172–1175, 2010.

CHINNADURAI, G. *et al.* Studies on detection and analysis of proteases in leaf extract of medicinally important plants. **Phytomedicine**, [s. l.], v. 40, p. 176–188, 2018.

DALGLEISH, P. G. Milk proteins, chemistry and physics In: FOX P. F.; CONDON, J. J.; (Ed) **Food Proteins London**; Applied science publisher; 1982.

DARWESH, O. *et al.* Enzymes immobilization onto magnetic nanoparticles to improve industrial and environmental applications. In: **methods in enzymology**. [S. l.]: Academic Press Inc., 2020. v. 630, p. 481–502.

TRONCOSO, D.; SÁNCHEZ, D.; FERREIRA, M. Production of Plant Proteases and New Biotechnological Applications: An Updated Review. [S. l.]: **John Wiley and Sons Inc**, 2022.

DHILLON, A. *et al.* Proteolytic Enzymes. **Current Developments In Biotechnology And Bioengineering**. Indian Institute Of Technology Guwahati, Guwahati, India, p. 149 – 173, 2017.

DO NASCIMENTO, J. F. C. *et al.* Comparing a polynomial DOE model and an ANN model for enhanced geranyl cinnamate biosynthesis with Novozym® 435 lipase. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 58, p. 103240, 2024.

DOMINGUES, O. *et al.* Evaluation of Candida rugosa Lipase Immobilized on Magnetic Nanoparticles in Enzymatic/Chemical Hydroesterification for Biodiesel Production. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 194, n. 11, p. 5419–5442, 2022.

SANTOS *et al.* Application of lipase immobilized on a hydrophobic support for the synthesis of aromatic esters. **Biotechnology and Applied Biochemistry**. 2021.

EGUILUZ, M. *et al.* De novo assembly of *Vriesea carinata* leaf transcriptome to identify candidate cysteine-proteases. **Gene**, [s. l.], v. 691, p. 96–105, 2019.

FREITAS, A. N. *et al.* Adsorption of extracellular lipase in a packed-bed reactor: an alternative immobilization approach. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 47, n. 10, p. 1735–1749, 2024.

FURLANI, I.; *et al.* Enzyme immobilization: Concepts and effects on proteolysis. [S. l.]: **Sociedade Brasileira de Quimica**, 2020.

GAGAOUA, M. *et al.* Artificial meat tenderization using plant cysteine proteases. **Current Opinion in Food Science**, v. 38, p.177–188, 2021.

GARCIA, G. *et al.* Composição de macronutrientes e evolução da maturação de queijo Prato com teor reduzido de gordura adicionado de enzima proteolítica *fastuosaina*. **Brazilian Journal Food Technology**. 2009.

GIMENES, N. C. *et al.* An Overview of Proteases: Production, Downstream Processes and Industrial Applications, **Separation & Purification Reviews**. 2019.

GUIMARÃES-FERREIRA, C. *et al.* Antitumor effects in vitro and in vivo and mechanisms of protection against melanoma B16F10-Nex2 cells by *fastuosain*, a cysteine proteinase from *Bromelia fastuosa*. **Neoplasia**, [s. l.], v. 9, n. 9, p. 723–733, 2007.

GURUMALLESH, P. *et al.* A systematic reconsideration on proteases. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 128, p. 254-267, 2019.

HASAN, M.J.; HAQUE, P.; RAHMAN, M. M. Protease enzyme based cleaner leather processing: A review. **Journal of Cleaner Production**, v.365, 2022.

JOO, H. S.; CHOI, J. W. Purification and Characterization of a Novel Alkaline Protease from *Bacillus horikoshii*. **J. Microbiol. Biotechnol**, v. 22, p.58–68, 2012.

KOROLEVA, V. A. *et al.* Thermal Inactivation of Cysteine Proteases: The Key Stages. **Biophysics** (Russian Federation), v. 66, n. 3, p. 364–372, 1 maio 2021.

KRUMREICH, F. *et al.* Physical and chemical composition and bioactive compounds in bromelia antiacantha bertol. Fruits. **Revista Brasileira de Fruticultura**, [s. l.], v. 37, n. 2, p. 450–456, 2015.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970.

LAMAS, E.M. *et al.* Hydrolysis of whey proteins by proteases extracted from *Cynara cardunculus* and immobilized onto highly activated supports. **Enzyme and Microbial Technology**, v.28, p. 642– 652, 2001.

LIU, D-M; CHEN J.; SHI, Y. P. Advances on methods and easy separated support materials for enzymes immobilization. **Trends in Analytical Chemistry**, v.102, p.332-342, 2018.

LOPES, L. A. *et al.* Glyoxyl-Activated Agarose as Support for Covalently Link Novo-Pro D: Biocatalysts Performance in the Hydrolysis of Casein. **Catalysts**, v.10, 2020.

LYU, X.; GONZALEZ, R.; HORTON, A.; LI, T. Immobilization of Enzymes by Polymeric Materials. **Catalysts**, v.11, 2021.

LYU, X. *et al.* Immobilization of enzymes by polymeric materials. [S. l.]: **MDPI**, 2021.

MA, X. *et al.* Fabrication of immobilized bromelain using cobalt phosphate material prepared in deep eutectic solvent as carrier. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 210, 1 fev. 2022.

MADHUSANKHA, G. D.M.P.; THILAKARATHNA, R. C.N. Meat tenderization mechanism and the impact of plant exogenous proteases: A review. [S. l.]: **Elsevier B.V.**, 2021.

MAGHRABY, Y. R. *et al.* Enzyme Immobilization Technologies and Industrial Applications, **ACS Omega**, v.8, p.5184–5196, 2023.

MAZORRA – MANZANO, M. A. *et al.* Production of whey protein hydrolysates with angiotensin - converting enzyme - inhibitory activity using three new sources of plant proteases. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v.28, 2020.

MIOTTI, R. H. *et al.* Enzymatic production process of capric acid-rich structured lipids: Development of formulation as a new therapeutic approach. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 257, p. 128641, 2024.

MOHAMAD, N. *et al.* An overview of technologies for immobilization of enzymes and surface analysis techniques for immobilized enzymes. [S. I.]: **Diagnosis Press Limited.**, 2015.

MOKHTAR, N. F. *et al.* The Immobilization of Lipases on Porous Support by Adsorption and Hydrophobic Interaction Method. **Catalysts**, v.10, 2020.

MORELLON-STERLING, R. *et al.* A review on the immobilization of pepsin: A Lys-poor enzyme that is unstable at alkaline pH values. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.210, p. 682-702, 2022.

NAVEED, M. *et al.* Protease—A Versatile and Ecofriendly Biocatalyst with Multi-Industrial Applications: An Updated Review, **Catalysis Letters**, v.151, p.307–323, 2021.

NWAGU, T. N.; UGWUODO, C. J. Stabilizing bromelain for therapeutic applications by adsorption immobilization on spores of probiotic *Bacillus*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 127, p. 406–414, 15 abr. 2019.

PATIL, S. S.; RATHOD, V. K. Combined effect of enzyme co-immobilized magnetic nanoparticles (MNPs) and ultrasound for effective extraction and purification of curcuminoids from *Curcuma longa*. **Industrial Crops & Products**, v.177, 2022.

PETKAR. *et al.* Immobilization of lipases for non-aqueous synthesis. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.39, p.83–90, 2006.

PIMCHAROEN, K. *et al.* Bromelain Immobilized onto Clay-Carboxymethylcellulose Composites for Improving Nutritive Value of Soybean Meal. **ACS Applied Bio Materials**, v. 7, n. 8, p. 5211–5221, 19 ago. 2024.

REMONATTO, D. *et al.* Immobilization of Eversa Lipases on Hydrophobic Supports for Ethanolysis of Sunflower Oil Solvent-Free. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, p. 1–17, 2022a.

REMONATTO, D. *et al.* Applications of immobilized lipases in enzymatic reactors: A review. **Process Biochemistry**, v. 114, p. 1–20, 2022b.

REMONATTO, D. *et al.* Production of FAME and FAEE via Alcoholysis of Sunflower Oil by Eversa Lipases Immobilized on Hydrophobic Supports. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 185, n. 3, p. 705–716, 2018.

REMONATTO, D. *et al.* Utilization of Clay Materials as Support for *Aspergillus japonicus* Lipase: An Eco-Friendly Approach. **Catalysts** **2021**, v. 11, n. 10, p. 1173, 2021.

SARATH, G. *et al.* **Protease assay methods**. In: BEYNON, R. J., BOND, J. S. Proteolytic enzymes a practical approach.:New York Oxford University Press, cap. 3, p. 25-55, 2001.

SEBASTIÁN, D. An Overview of Plant Proteolytic Enzymes. In: GUEVARA, M. G. (ed.). **Biotechnological Applications of Plant Proteolytic Enzymes**. Springer Nature Switzerland AG, 2018. c. 1, p. 1-20. 2018.

SIRISHA, V.; JAIN, A.; JAIN, A. **Enzyme Immobilization: An Overview on Methods, Support Material, and Applications of Immobilized Enzymes**. In: *Advances in Food and Nutrition Research*. v. 79, c. 9, p. 180–203. 2016.

SOLANKI, P. *et al.* Microbial proteases: ubiquitous enzymes with innumerable uses. **3 Biotech**, v.11, 2021.

TACIAS-PASCACIO, V. G. *et al.* Immobilization of papain: A review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.188, p. 94-113, 2021.

TAVANO, O. *et al.* Biotechnological Applications of Proteases in Food Technology. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 17, n. 2, p. 412–436, 2018.

TRONCOSO, F. D.; SÁNCHEZ, D. A.; FERREIRA, M.L. Production of Plant Proteases and New Biotechnological Applications: Na Updated Review. **Chemistry Open**, v.11, 2022.

VALLÉS, D.; CANTERA, A. Antiacanthain A: New proteases isolated from *Bromelia antiacantha* Bertol. (Bromeliaceae). **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 113, p. 916–923, 2018.

VERMA, S; DIXIT, R; PANDEY, K. Cysteine proteases: Modes of activation and future prospects as pharmacological targets. [S. l.]: **Frontiers Media S.A.**, 2016.

YUSHKOVA, E. *et al.* Application of Immobilized Enzymes in Food Industry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [s. l.], v. 67, n. 42, p. 11553–11567, 2019.

ZDARTA, J. *et al.* A general overview of support materials for enzyme immobilization: Characteristics, properties, practical utility, **MDPI AG**, v. 92, n. 8, 2018.

ANEXO A – Artigo desenvolvido a partir do trabalho de conclusão de curso

A partir do trabalho realizado nesse estudo, desenvolvemos um artigo acadêmico que está em processo de submissão para publicação em periódico científico (*Biocatalyst and Biotransformation*). Esse artigo (manuscrito anexado abaixo) apresenta e discute os principais resultados obtidos, destacando a relevância e o potencial das proteases provenientes da *Bromelia fastuosa* e de seus derivados imobilizados, contribuindo para o avanço do conhecimento na enzimologia industrial.

**Assessment of the proteolytic potential of *Bromelia fastuosa* enzymatic extracts
and immobilization on polymer supports**

highlighting Diaion® HP-20 as a promising support

Lucas Butrico Barbosa¹, Rhyan Lelis Nubile Gonçalves¹, Rubens Monti¹, Heitor Buzetti Simões Bento¹, Juliana Cristina Bassan², Ariela Veloso De Paula^{1,*}

¹Department of Bioprocess Engineering and Biotechnology, São Paulo State University, Araraquara, Brazil

²Faculty of Technology (FATEC), Paula Souza State Center for Technological Education, Barretos, Brazil

* Corresponding author: ariela.veloso@unesp.br

Abstract

Proteases catalyze protein cleavage by hydrolyzing peptide bonds, releasing peptides and amino acids. Plant-derived cysteine proteases, such as papain, are commonly used in the food and pharmaceutical industries for applications like bioactive peptide production and food supplementation. This study investigated *Bromelia fastuosa* fruit as a potential source of proteases for enzyme immobilization. Enzymatic extracts were prepared from different parts of the fruit, with the pulp extract demonstrating the highest enzymatic activity (23% higher than other extracts), protein concentration, and lower contaminant levels, making it suitable for further experiments. Two enzyme supports were evaluated: agarose 6BCL and a styrene–divinylbenzene copolymer (Diaion® HP-20). Both supports successfully immobilized proteases, achieving yields comparable to those of commercial enzymes (74% for agarose 6BCL and 89% for Diaion® HP-20). Diaion® HP-20 stood out for its superior performance, providing higher immobilization yield and catalytic activity compared to agarose 6BCL, a widely used support system for enzyme immobilization. Additionally, immobilization with the copolymer required fewer steps and reagents, highlighting its potential as a superior support for enzymes like proteases. Overall, the findings suggest that *B. fastuosa* is a promising source of proteases for industrial applications and that Diaion® HP-20 is a viable immobilization support for its proteases. The copolymer demonstrated significant advantages over a well-established support system, particularly in terms of preparation simplicity and immobilization efficiency.

Keywords: Proteases; *Bromelia fastuosa*; immobilization; Diaion® HP-20; agarose 6BCL.

1. Introduction

Proteases are enzymes that catalyze protein cleavage reactions *via* hydrolysis of peptide bonds, resulting in the release of peptides and amino acids. This class of enzymes accounts for approximately 60% of the global enzyme market (Sebastián et al., 2018; Troncoso, Sánchez, and Ferreira, 2022). Such representativeness stems from their broad range of applications in various industries, including medical and pharmaceutical sectors, where proteases find use in the treatment of diabetes, glaucoma, and cartilage lesions (Dhillon et al., 2017; Gurumallesh et al., 2019).

Cysteine proteases, enzymes primarily of plant origin (Bolívar et al., 2023), constitute one of the most important subclasses of proteases in industrial settings. Two renowned examples of plant-derived proteases are papain and bromelain, the former derived from papaya (*Carica papaya*) and the latter from pineapple (*Ananas comosus*). Both enzymes have multiple applications in the food industry (Troncoso, Sánchez, and Ferreira, 2022; Hassan, Haque, and Rahman, 2022). The family Bromeliaceae, from which bromelains are extracted, is a well-known source of industrially relevant proteases. Widely distributed in tropical countries, such as Brazil, this family is characterized by ample variation of morphological characters, encompassing several genera and species commonly known as bromeliads, *caraguatás*, and *gravatás* (Krumreich et al., 2015; Eguiluz et al., 2019). *B. fastuosa* is one of the members of the family *Bromeliaceae* known in Brazil as *gravatá*. It is used in traditional medicine in the preparation of syrups for the treatment of bronchitis and asthma and as a vermifuge. This species contains fastuosain, a cysteine protease that exhibits several interesting characteristics, such as high catalytic activity, optimal pH close to neutral (between 6.5 and 7), and tolerance to mild temperature conditions (Cabral et al., 2006; Gurumallesh et al., 2019). Despite sharing these key characteristics with commercial enzymes, fastuosain has been the subject of a single

scientific investigation to date. Garcia et al. (2009) extracted, purified, and used the enzyme to modify the maturation time of Prato cheese, which resulted in a product with reduced fat content. The authors reported that fastuosain not only reduced maturation time but also improved the physicochemical properties of Prato cheese, demonstrating great potential in the dairy industry.

Even within the food industry, the use of cysteine proteases for protein hydrolysis and modification of the properties of food matrices remains confined to a few products of interest. One example is the production of bioactive peptides, which have been demonstrated to offer health benefits. However, synthesis via enzymatic routes is often expensive (Tavano et al., 2018; Gurumallesh et al., 2019). For enzymatic reactions to become economically viable, it is often necessary to immobilize enzymes on an adequate support. Immobilization consists of confining enzymes within a physical matrix or onto a support material. The main objectives of the process are to enhance enzyme stability by improving mechanical strength and thermal resistance. Another notable advantage is that immobilization allows for easy separation of the catalyst from the reaction medium. Thus, the enzyme can be reused over several cycles, generating cost savings (Lyu et al., 2021; Basso and Serban, 2019; Tacias-Pascacio et al., 2021). In the case of proteases, immobilization makes it possible to hydrolyze liquid substrates and minimizes an intrinsic problem of this class, namely autolysis. Immobilized proteases have been applied for the production of protein hydrolysates with beneficial health properties from by-products of the food industry (Tavano et al., 2018; Bilal et al., 2024; Morellon-Sterling et al., 2022).

A crucial factor influencing the success of enzyme immobilization is the choice of support material. Understanding its physical, chemical, and morphological properties is essential to prevent problems related to poor enzyme adhesion and potential conformational changes, which

could lead to decreased catalytic activity (Zdarta et al., 2018; Furlani et al., 2020). Agarose is a well-consolidated non-porous support for protease immobilization. This polysaccharide is widely used for covalent immobilization due to its ease of activation, supported by numerous modification protocols based on different functionalization groups (Lopes et al., 2020; Bassan et al., 2016; Tacias-Pascacio et al., 2021). This type of immobilization employed (covalent bonds) consists of a reaction between functional groups, such as amino and carboxyl groups, present on the surface of the support and the amino acids of the proteins. Thus, these bonds between the support and the catalyst can provide greater stability to the molecule, making its dissociation from the material more difficult and facilitating its reuse (Remonatto et al., 2021, 2022a). However, this method can lead to a decrease in the enzyme's catalytic activity when the covalent bond results in some modification of its catalytic site or increases the difficulty for the substrate to access it (Liu; Chen; Shi, 2019; Domingues et al., 2022).

Styrene–divinylbenzene (Diaion[®] HP-20), originally developed as a porous matrix for chromatographic purification (Chou et al., 2015), is also an interesting material for enzyme immobilization. There are reports of its use for the immobilization of enzymes that act on hydrophobic substrates, such as lipases (Freitas et al., 2024; Miotti et al., 2024). However, to date, no study has assessed the suitability of Diaion[®] HP-20 as an immobilization support for other classes of enzymes, such as proteases, although one study used the copolymer for adsorption purification of proteases from microbial cultures (Joo and Choi, 2012). Thus, for this type of immobilization (physical adsorption), the association of the enzyme with the support is achieved through weaker interactions than covalent bonds, such as electrostatic, hydrophobic interactions, hydrogen bonds, and van der Waals forces (Remonatto et al., 2022b). This type of immobilization, as it does not require activation steps for the support, is generally faster and less costly to execute, and it does not significantly affect the enzyme's catalytic

capacity, although it may result in lower enzyme stability on the support (Freitas et al., 2024; Mokhtar et al., 2020).

In view of the foregoing, this study aiming to assessed the potential of *B. fastuosa* as a novel source of proteases with similar characteristics to commercial enzymes used in industrial applications, such as bromelains and papain. Additionally, *B. fastuosa* enzymatic extract was immobilized on two supports, including a well-consolidated immobilization platform for proteases (agarose) and a little-explored material in the field of protease immobilization (Diaion[®] HP-20). The latter stands out for its well-established use in the immobilization of enzymes through physical adsorption, resulting in a more cost-effective process due to fewer steps required for obtaining the immobilized derivative, and consequently, lower costs. These research efforts are expected to shed light on the potential of *B. fastuosa* proteases for future applications in protein hydrolysis.

2. Materials and methods

2.1. Collection of B. fastuosa fruits

B. fastuosa fruits were collected in Araraquara, São Paulo State, Brazil. The plant material was washed, sanitized, placed in plastic bags, and stored at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

2.2. Enzyme extraction

Frozen fruits were cut and ground for 2 min in a blender in 0.2 M McIlvaine buffer (pH 4.5) containing 5 mM EDTA and 5 mM cysteine. The sample/solution ratio was 1 g to 5 mL. The resulting mixture was filtered through gauze. Subsequently, the filtrates were transferred to Falcon tubes and centrifuged at $9000 \times g$ and $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 30 min. The supernatant (enzymatic extracts) was frozen at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Cabral et al., 2006). The extraction procedure is illustrated in Fig. 1.

Fig. 1

2.3. Determination of protein content

The protein content of enzymatic extracts was determined by the Bradford method (1976).

2.4. Determination of proteolytic activity

Proteolytic activity was measured following the protocol of Sarath et al. (2001) but using 1% casein solution as substrate, as proposed by Cabral (2005), with some modifications (Fig. 2). First, 800 μ L of 1% casein and 50 μ L of 0.2 M McIlvaine buffer, pH 7, were pipetted into 2 mL microtubes and incubated at 37 °C for 10 min. The enzyme extract was added, and tubes were incubated at 37 °C under stirring in a thermostatic bath for 10 min. At the end of incubation, 600 μ L of 10% trichloroacetic acid solution was added to stop the reaction. A blank was prepared by adding 10% trichloroacetic acid solution immediately after the addition of the enzyme extract. All enzyme assays were stored overnight in a refrigerator at 1 °C. Then, samples were centrifuged (Eppendorf 5415 D) at $5000 \times g$ for 20 min. The supernatant was filtered and subjected to absorbance reading at 280 nm on a spectrophotometer. Total proteolytic activity was quantified by comparison against a standard curve of tyrosine ($y = 1308.5x + 0.0079$, $R^2 = 0.9995$) (Cabral, 2005; Garcia et al., 2009).

Fig. 2

2.5. Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)

The protein profile of the enzyme extract selected for immobilization was evaluated by SDS-PAGE (Laemmli, 1970). For this, 5% and 12% polyacrylamide gels were used for stacking

and separation, respectively. Band sizes were identified by comparison against the Sigma–Aldrich® BLUeye ladder.

2.6. Protease immobilization

2.6.1. Protease immobilization on glutaraldehyde-activated agarose 6BCL

Agarose was activated with glutaraldehyde according to the one-point covalent immobilization method described by Bassan (2016), depicted in Fig. 3. The first step was to wash the agarose with deionized water at a ratio of 1 g of support to 1.45 mL of deionized water. Then, 2.38 mL of 1.7 M sodium hydroxide (NaOH) solution containing 0.068 g of sodium boron hydride (NaBH_4) was added. The mixture was kept under stirring while 1.7 mL of glycidol was slowly added dropwise. The mixture was placed under gentle stirring for 18 h, being the first 2 h in an ice bath and the remaining 16 h at room temperature. The suspension was filtered and washed with plenty of ultrapure water. Glyceryl-agarose was reacted with 100 mM sodium periodate (NaIO_4) in deionized water (2 mL and 8 mL, respectively, for every 1 g of support) to obtain glyoxyl-agarose. This new mixture was placed under stirring for 2 h at room temperature, filtered, and washed with ultrapure water.

After activation of agarose with glyoxyl groups, 5.71 mL of a 2 M ethylenediamine solution, pH 10, was added for every 1 g of support. The mixture was kept under stirring for 2 h at room temperature. Then, 5.71 mg of NaBH_4 was added to reduce the remaining aldehyde groups to hydroxyls. The amino-agarose support obtained from this reaction was filtered and washed with 100 mM sodium acetate buffer, pH 4, and plenty of deionized water. Finally, 1 g of amino-agarose was homogenized in 2 mL of 200 mM phosphate buffer, pH 7, containing 3 mM glutaraldehyde for 15 h. The suspension was filtered, and the glutaraldehyde-agarose support was abundantly washed with 25 mM sodium phosphate buffer, pH 7.0. Immobilization

was performed using an enzyme loading of 10 mg of protein for every 1 g of support. The enzyme + protein mixture was placed under gentle stirring for 2 h. At the end of the incubation period, the mixture was filtered, and the immobilized derivative was stored in a capped flask under refrigeration (4 °C) until use.

Fig. 3

2.6.2. Protease immobilization on Diaion[®] HP-20

Extract proteases were immobilized on the styrene–divinylbenzene copolymer (Diaion[®] HP-20) by physical adsorption, as shown in Fig. 4. According to the manufacturer, the polymer has an average pore diameter of 290.00 Å, a pore volume of 1.3 cm³ g⁻¹ and a specific surface area of 590.00 m² g⁻¹. First, the support was oven-dried at ~100 °C for a minimum of 10 h. The dry support was homogenized in 95% (w/w) ethanol at a ratio of 1 g of support to 5 mL of alcohol. The suspension was incubated for 12 h at room temperature, filtered, and washed with abundant deionized water. The particles resulting from this hydroalcoholic process were used for enzyme immobilization. Protease immobilization by physical adsorption was performed using the same enzymatic loading of 10 mg of protein for every 1 g of support. The mixture was kept under stirring for 15 h and filtered. The immobilized derivative was stored in a capped flask under refrigeration (4 °C) until use.

Fig. 4

2.6.3. Determination of immobilization yield

For assessment of the temporal evolution of immobilization processes, aliquots of the supernatant were collected at predetermined intervals and evaluated for hydrolytic activity as described in Section 2.4. A negative control was included in every immobilization reaction. The negative control consisted of the enzyme solution without the addition of the support and was subjected to the same conditions as the immobilization system. Furthermore, since this involves the immobilization of proteases from a crude extract—an enzymatic extract containing several proteins in its environment—the yield was calculated only by the proteolytic activity of the supernatant and the control, without considering the protein content. This is because other proteins may migrate to the support, leading to an overestimation of the yield (Bassan et al., 2016). The immobilization yield was calculated using Eq. (1).

$$Y = \frac{A_{\text{extract}} - A_{\text{supernatant}}}{A_{\text{extract}}} \times 100$$

(1)

where Y is the immobilization yield (%), A_{extract} is the hydrolytic activity of the enzyme extract at a given time, and $A_{\text{supernatant}}$ is the hydrolytic activity of the reaction supernatant. Hydrolytic activities are expressed in $\mu\text{mol product min}^{-1} \text{ g}^{-1}$ catalyst.

2.7. Enzymatic characterization of crude extract and immobilized derivatives

2.7.1. Determination of optimal conditions

The protease extract and immobilized derivatives were characterized for optimal pH (pH range from 5.5 to 8, McIlvaine buffer) and temperature (35 to 70 °C), using the hydrolytic activity assay proposed by Sarath (2001), with modifications (Section 2.4). The amount of sample used was 15 μL for the enzymatic extract and 10 mg for immobilized derivatives.

2.7.2. Assessment of kinetic parameters

The kinetic parameters (K_M and V_{max}) of protease extract and immobilized derivatives were investigated using casein solutions at different concentrations (0.05 to 0.5 mM) prepared in McIlvaine buffer, pH 7. Hydrolysate concentration was determined based on the hydrolytic activity assay proposed by Sarath (2001), with modifications (Section 2.4). Finally, the Lineweaver–Burk plot was used to linearize the data and estimate K_M and V_{max} .

3. Results and discussion

3.1. Selection of the best enzyme extract for immobilization

Initially, a study was carried out to determine which part of the fruit had the highest concentration of proteases and define which extract should be subjected to immobilization. Three extracts were prepared, one from the whole fruit, one from fruit peels, and one from the pulp (Section 2.2). The protein content and enzymatic activity of each extract are presented in Table 1.

Table 1.

It can be seen from the data in Table 1 that the pulp extract had the highest protein content. This finding contrasts with the expectation that the protein content of the whole fruit extract would be higher than that of the pulp extract. A possible explanation for this result is the binding of compounds found in the fruit peel with proteins during extraction and their subsequent separation from the supernatant after the centrifugation step. Of note, the supernatant is the fraction where the proteins of interest are found. This hypothesis is reinforced by the results of proteolytic activity. The activity of the pulp extract was 23.27% higher than that of the whole fruit extract and 61.23% higher than of the peel extract. Thus, the low activity of the other

extracts suggests the presence of interfering compounds that might have reacted with proteins of interest (proteases).

SDS-PAGE was conducted to identify proteins of interest and confirm which extract had the greatest proteolytic potential. As can be seen from Fig. 5, the protein profile of extracts is characterized by three clearly visible bands, two at about 25 kDa and one just below 11 kDa. The presence of large quantities of proteins in the 25 kDa range is in line with the results of Cabral (2005), who extracted and characterized the 25 kDa protease fastuosain from *B. fastuosa* fruits. The presence of this enzyme in the extracts prepared here is a promising finding, given that fastuosain possesses similar characteristics to commercial proteases, such as high proteolytic activity, tolerance to mild temperatures, and optimal pH close to neutral (Gurumallesha et al., 2019).

Comparison of protein profiles between extracts revealed differences in protein concentration for the 25 and 11 kDa bands, in agreement with the protein contents presented in Table 1. The presence of only a few bands is another indication that other proteins and compounds were removed during extraction. With this, proteases have greater chances of binding to the support in the immobilization reaction. The protein profile of crude extracts is advantageous for downstream steps. Extract preparation separated enzymes from contaminants, even without specific purification procedures. As the crude extracts had low concentrations of unwanted proteins, the immobilization reaction might contribute to enhancing purification, possibly resulting in higher immobilization yields (Remonato et al., 2022a; Morellon-Sterling et al., 2022).

Therefore, the enzyme extract from *B. fastuosa* pulp was the most viable for use in immobilization, given its higher protease concentration, greater proteolytic activity, and lower contaminant levels. The presence of peel and seeds in extracts may result in contaminants that

interfere with catalytic activity, as observed in other proteolytic extracts of plant origin (Chaiwut; Pintathonga; Rawdkuen, 2010). Here, this effect was observed in the whole fruit extract. Even though it contained all parts of the other extracts, the whole fruit extract had the lowest activity and protein concentration. It is possible that some compounds interacted with the proteins of interest. As such, further steps would be necessary to remove impurities, which could increase the cost and time of extract production (Atsakou et al., 2023). The single step of physically separating the pulp from the seeds and peel was sufficient to eliminate these contaminants, reducing the amount of interferents during immobilization and, consequently, providing a higher percentage of proteases with catalytic activity (Morellon-Sterling et al., 2022).

Fig. 5

*3.2. Immobilization of *B. fastuosa* proteases*

The extract with the highest catalytic potential was chosen for immobilization to assess its industrial potential. Two supports were tested, one that is widely used for proteases (agarose 6BCL) and one that has not yet been applied for this class of enzymes (Diaion® HP-20) (Braham et al., 2021). For immobilization on agarose, glutaraldehyde was used as a functionalizing agent to covalently bind the enzyme. Immobilization on Diaion® HP-20 occurred by physical adsorption, without the need for activation steps (Bassan et al., 2016; dos Freitas et al., 2024).

After preliminary immobilization tests conducted at 80 rpm, it was proposed to increase the agitation speed to 190 rpm. This modification was intended to promote interaction between proteins and the supports. With this, there was a significant increase in enzyme migration to agarose and Diaion® HP-20, as shown in Table 2. This increase in migration was assessed by determining the immobilization yield (Section 2.6.3), which takes into account the proteolytic

activity of the enzyme extract before and after immobilization. The decrease in activity during the immobilization reaction is an indication that the proteins of interest migrated to the support. The higher immobilization yield obtained at 190 rpm can be attributed to the increase in agitation speed, leading to a greater interaction between enzymes and the support.

Table 2.

In the first immobilization test (80 rpm), the immobilization yield was greater than 40% for both supports. This yield was lower than that obtained with commercial enzymes, as reported by Bassan et al (2016), who obtained yields greater than 80% in the immobilization of the protease trypsin on agarose 6BCL. Such low yields were expected, given that plant extracts are known to contain other compounds, such as proteins, which may hinder the migration of enzymes of interest onto the support (Patil and Rathod, 2021). Nevertheless, the initial immobilization yields were found to be higher than those obtained for proteases from other plant extracts. Lamas et al. (2001), in immobilizing proteases derived from *Cynara cardunculus* on agarose 6BCL modified with glutaraldehyde, achieved a yield of only 30%. The findings may indicate a greater interaction between *B. fastuosa* proteases and the polysaccharide. The obtained yields may also be associated with the extraction method. The *C. cardunculus* extract was obtained by using a two-phase aqueous system, causing other contaminants to be present in the medium, thereby hindering the migration of proteases onto the support (Lamas et al., 2001). In the current study, the enzyme extract had a low concentration of contaminating proteins, as confirmed by electrophoresis (Section 3.1).

For both supports, the increase in agitation speed during immobilization was favorable, resulting in a yield of 74% for agarose 6BCL activated with glutaraldehyde and 89% for Diaion® HP-20. These findings demonstrate that both the materials and the immobilization processes were adequate and effective. By increasing the agitation speed, it was possible to

achieve a yield similar to that obtained by Bassan (2016), who immobilized a commercial protease on agarose. This result is interesting, given that enzymes obtained from non-commercial sources, such as plant or microbial sources, generally contain contaminating proteins, which can compete with enzymes of interest during immobilization (Brígida et al., 2023). Such competition does not occur with commercial enzyme extracts, as they lack other proteins or contaminants.

Diaion® HP-20, given its hydrophobic nature, is used for a variety of applications (Chou et al., 2015) but has been little investigated as a support for the immobilization of hydrophilic enzymes. Here, it afforded a 16% higher immobilization yield than agarose (Table 2), which has been successfully used for protease immobilization in previous studies (Tacias-Pascacio et al., 2021). These results demonstrate the potential of Diaion® HP-20 as a support for hydrophilic enzymes, with a higher-than-expected affinity.

Compared with agarose, Diaion® HP-20 does not require several steps to modify its reactive groups, as immobilization is achieved by physical adsorption (Fig. 6). In physical adsorption, enzymes are associated mainly via weak interactions with chemical groups present on the support surface (Freitas et al., 2024). For immobilization on agarose, the polysaccharide is subjected to several complex steps for activation, and the enzymes are covalently bound to the support (Bassan et al., 2016). Thus, given that Diaion® HP-20 was not subject to surface modifications, it can be said that the higher yield is related to its higher affinity with proteases.

Fig. 6

Another advantage of Diaion® HP-20 is that the immobilized derivative had a higher activity than that obtained with glutaraldehyde-activated agarose. Derivatives obtained with the

polysaccharide had a hydrolytic activity of 2.9 U/g, whereas those obtained with the copolymer had an activity of 3.9 U/g, representing a 25% improvement. This significant difference can be related to the type of interaction between enzymes and the support, as previously mentioned. As Diaion[®] HP-20 is not subject to any surface modification, the interactions between enzymes and the support are weak. Consequently, there are no strong bonds that could alter the enzyme's conformation or active site (Boudrant et al., 2020; Remonatto et al., 2018).

Overall, the higher immobilization yield and hydrolytic activity obtained by using Diaion[®] HP-20 underscores the unprecedented potential of the support in the immobilization of proteases and possibly other hydrophilic enzymes. With few tests, it was possible to successfully immobilize the catalyst and achieve results similar to those of agarose, which is widely used for protease immobilization.

3.3. Characterization of immobilized derivatives

The pH and temperature ranges of enzymes may change with immobilization. These parameters are associated with the environmental conditions in which enzymes are applied, possibly affecting enzyme structure and catalytic capacity (Remonatto et al., 2021).

3.3.1. Determination of optimal pH

The first parameter evaluated was pH. It was not possible to assess the behavior of the extract at a higher pH range because of substrate denaturation. Such denaturation was evidenced by the formation of aggregates and precipitation (Dalglish, 1982), not allowing its solubilization in the buffer to perform the experiments.

As depicted in Fig. 7, there was a peak of catalytic activity near pH 7.0, with a sharp reduction at higher pH levels in both the enzyme extract and the immobilized derivatives. The results of the crude extract are in agreement with those of Cabral et al. (2006), who, when

extracting and characterizing fastuosain, observed maximum proteolytic activity near pH 7.0. This behavior is similar to that observed for commercial cysteine proteases of plant origin, such as bromelain and papain, which have high activity close to neutral pH. These proteases are similar to those from *B. fastuosa* with regard to structure and amino acid sequence (Cabral et al., 2006; Gurumallesha et al., 2019; Gagaoua et al., 2021).

Fig. 7

The immobilized derivatives had a similar behavior to soluble proteases, reaching maximum activity at pH 7 (Fig. 7 - A). This finding confirms that immobilization did not result in conformational changes that might have altered the point of maximum conversion of substrate into product. However, at higher pH values, the decrease in activity was less pronounced. At pH 7.5, the catalytic activity of the derivatives was more than 70% of that obtained at the optimal pH (pH 7.0). This behavior is expected for immobilized enzymes, given that immobilization decreases the access of medium components to the enzyme, increasing problems associated with mass transfer (Bilal et al., 2019; Zdarta et al., 2018; Tacias-Pascacio et al., 2021). As a result, the impact of such compounds on enzymes is minimized, allowing immobilized proteases to resist and remain active under more alkaline conditions. In acidic medium, the activity of immobilized derivatives was lower than that of soluble proteases. This finding may be attributed to the immobilization process: confinement of the catalyst to the support can modify enzyme conformation, hindering performance in this pH range (Tavano et al., 2018). However, for the Agarose derivative, an increase in pH 8.0 was observed. This behavior can be associated with denaturation of the substrate due to the pH evaluated, indicating that there was degradation of casein and the release of amino acids into the medium, which may have resulted in a false increase in activity at this point (Dalglish, 1982).

Derivatives prepared with Diaion[®] HP-20 exhibited excellent performance at different pH ranges. Under alkaline conditions, enzymes immobilized on the copolymer exhibited 90% of the maximum activity. Similar behavior was observed under the most acidic conditions. Proteases immobilized on Diaion[®] HP-20 retained 21% more activity than those immobilized on agarose. These results are relevant, given that the copolymer had not yet been applied in protease immobilization. Not only was the immobilization successful, but the catalytic capacity of the derivatives was also superior to that observed when using agarose as a support.

3.3.2. Determination of optimal temperature

The subsequent analysis aimed to determine the optimal temperature range of immobilized derivatives. The results are shown in Fig. 7 - B. Maximum activity was achieved at 55 °C for soluble proteases and at even higher temperatures for immobilized derivatives. In the range of 55 to 70 °C, there was minimal variation in the enzymatic activity of the extract, which remained high. This finding demonstrates the potential of *B. fastuosa* extract for applications at high temperatures.

Cysteine proteases can maintain proteolytic activity at high temperatures, such as bromelain and papain, which have been reported to be active at temperatures of up to 80 °C (Gurumallesha et al., 2019). Cabral (2005) reported a similar optimal temperature for fastuosain (55 °C), in line with the results observed for other plant proteases such as bromelain. Vallés and collaborators (2018) showed that the optimal pH of peptidases from *Bromelia antiacantha* was neutral, and the optimal temperature range was the same as that observed here.

Overall, the findings demonstrate the potential of the immobilized derivatives for catalytic applications. Immobilization is expected to reduce the impact of reaction conditions, such as temperature, on enzyme activity (Remonato et al., 2022a; do Nascimento et al., 2024).

With regard to temperature, it was shown that immobilization shifted the optimum range of the evaluated proteases to higher temperatures. The optimal temperature of soluble proteases was 55 °C and that of the agarose derivative was 65 °C, with an activity of $\geq 90\%$ up to 75 °C and 50% up to 80 °C. The Diaion® HP-20 derivative had an optimal operating temperature of 60 °C but showed a marked reduction in activity at higher (12% at 65 °C) and lower (10% at 55 °C) temperatures, being lower than that of soluble proteases. This change in catalyst behavior at higher temperatures can be attributed to the immobilization method. Physical adsorption results in weak interactions between the enzyme and the support compared with covalent binding (Furlani et al., 2020). Thus, under extreme temperature conditions, the derivative may undergo dissociation, given the weaker bonds between components (do Nascimento et al., 2024).

3.3.3. Determination of kinetic parameters

The K_m and V_{max} of the crude extract and immobilized derivatives were determined to further understand the effects of immobilization on proteolytic activity. The reaction kinetics are depicted in Fig. 8 – A and B.

Fig. 8

The fit of the kinetic model (Michaelis-Menten model) to experimental data (Fig. 8 – A and B) provided coefficients of determination (R^2) of 0.9877 for soluble enzymes, 0.9974 for enzymes immobilized on Diaion® HP-20, and 0.9921 for enzymes immobilized on agarose. The kinetic parameters K_m and V_{max} for soluble and immobilized proteases were determined using the model (Table 3).

Table 3

The use of glutaraldehyde-activated agarose did not provide marked alterations in kinetic parameters, indicating no change in enzyme conformation or catalytic site. This result is

interesting, as it demonstrates that immobilization did not affect the enzyme or its catalytic capacity, not differing from soluble enzymes. Immobilization exerted effects on mass and energy transfer, typical of immobilized derivatives, as discussed in Sections 3.3.1 and 3.3.2.

By contrast, immobilization on Diaion® HP-20 resulted in a decrease in K_m and V_{max} compared with the soluble enzyme extract. A lower K_m indicates that immobilized proteases require a lower substrate concentration to reach half of their maximal velocity, representing a higher affinity to the substrate (Remonatto et al., 2021; Abdella, Ahmed, and Hassan, 2023). One hypothesis for this higher affinity is that immobilization served as a purification step, separating and concentrating the enzymes of interest while eliminating contaminants that could disrupt the interaction of the substrate with the biocatalyst. In the soluble enzyme extract, the presence of other compounds might have affected the activity of proteases (Troncoso, Sánchez, and Ferreira, 2022).

A decrease in V_{max} indicates that the derivative needs more time for substrate conversion. Such behavior was expected, given that the type of immobilization and support used may result in mass transfer problems. These issues may hinder or limit the enzyme's access to the substrate, consequently reducing the reaction velocity, regardless of the lower K_m (Abdella, Ahmed, and Hassan, 2023).

After discussing the kinetic parameters described above, Table 4 presents a comparative analysis between the results obtained in this study and those reported by authors who investigated the immobilization of bromelain protease.

The comparative analysis between free and immobilized bromelain and our study was conducted due to bromelain being a cysteine protease found in plants of the *Bromeliaceae* family. Within this family, *Bromelia fastuosa* has demonstrated potential for protease

extraction, particularly fastuosain, which exhibits structural and amino acid sequence similarities to the cysteine proteases bromelain and papain (Cabral et al., 2006; Gurumalles et al., 2019; Gagaoua et al., 2021).

Table

4.

Table 4 compiles studies with experimental data most comparable to those obtained in this study, particularly regarding kinetic parameters, immobilization mechanisms, and/or the substrates used to determine the activity of free and immobilized enzymes on different supports.

Regarding pH, plant-derived cysteine proteases typically exhibit a broad optimal pH range, varying from 5.0 to 7.0 for papain and from 6.0 to 8.5 for bromelain, depending on the substrate used (Koroleva et al., 2021). For immobilized enzymes, in addition to the substrate type, variations in optimal pH—whether increasing or decreasing—also depend on the immobilization technique and the interaction mechanism with the support material (Banerjee et al., 2020). As shown in Table 4, all values obtained in this study align with those reported in the literature, indicating that despite differences in supports and enzyme-support interactions, the optimal pH of immobilized proteases was maintained or even increased compared to free enzymes. The only exception was the study by Pimcharoen et al. (2024), in which bromelain immobilized on bentonite (Bt)-carboxymethylcellulose via ionotropic gelation exhibited a reduced optimal pH of 5.0, compared to 7.0 for the free enzyme. Nonetheless, most optimal pH values were found to be close to neutrality.

Regarding optimal temperatures, irrespective of the immobilization mechanism, the enzymatic derivatives exhibited an increase in optimal activity temperature, ranging from 60°C to 80°C. These findings support one of the expected benefits of enzyme immobilization, which is to enhance the rigidity of the enzyme's tertiary structure, thereby improving its conformational stability and preserving its activity—provided that immobilization does not

negatively affect the catalytic site. According to Table 4, the optimal temperature results obtained in this study closely resemble those reported for free bromelain or bromelain immobilized via physical adsorption or covalent binding.

In terms of immobilization yield, considerable variation was observed among the reported data, likely due to the physicochemical properties of the immobilization supports, which influence the type and extent of enzyme-support interactions. Notably, among all reported immobilization yields, the value obtained in this study for immobilization on Diaion HP-20 was particularly high (89%), surpassed only by bromelain immobilized on bentonite (Bt)-carboxymethylcellulose (CMC), which exhibited a yield exceeding 95%. In both cases, the immobilization techniques employed were not only highly efficient but also simpler and faster compared to other methods. Additionally, it was observed that adsorption-based immobilization generally resulted in higher yields than covalent binding when applied to cysteine proteases.

Finally, regarding the kinetic constants K_m and V_{max} , direct comparison between our results and those in the literature is challenging due to differences in measurement units. However, it is evident that, similar to our findings for immobilization on Diaion HP-20, studies conducted by Banerjee et al. (2020), Ilaria et al. (2012), and Nwagu & Ugwuodo (2019) reported lower K_m values for immobilized proteases compared to their respective free enzymes. This suggests that immobilization, in these cases, improved the affinity of the enzymatic derivatives for their respective substrates. Regarding V_{max} , with the exception of the study by Ma et al. (2022), all other studies, including ours, reported lower V_{max} values for immobilized enzymes compared to free enzymes. This indicates that immobilization, in these cases, reduced the maximum catalytic capacity of the enzymatic derivatives in hydrolysis reactions.

4. Current and future applications

Proteases account for about 60% of the global enzyme market, having a compound annual growth rate of 6.1% in 2024. These data demonstrate the importance of proteases in the industrial sector (Maghraby et al., 2023; Naveed et al., 2021). These versatile biocatalysts are expected to find increasing applications in industrial processes, owing to their multifunctional biotechnological and physiological properties. They may be used in areas that require enzyme-aided digestion of proteins, such as the pharmaceutical, food, leather, dairy, textile, and other industries (Maghraby et al., 2023; Solanki et al., 2021). Emerging potential applications in medicine and biomedical areas, and in other omics sciences, deserve attention. Proteases have been studied for the treatment of cancer, AIDS, and malaria, as well as for site-specific or targeted drug delivery systems and imaging technology in cancer diagnostics (Abousaway et al., 2021; Solanki et al., 2021).

Proteases have high specificity, biodegradability, and fast action under mild operating conditions for both degradative and synthetic reactions. As a complement to such excellent properties, their economic feasibility can be increased by techniques such as immobilization. Immobilization technology has been extensively used to provide cost-effective enzymatic bioprocesses. However, the selection and optimization of adequate support and immobilization protocol are crucial to the development of effective green industrial processes (Bilal et al., 2024).

5. Conclusion

B. fastuosa pulp extract had the highest activity and protein concentration and the lowest contaminant concentration. Both supports were effective in the immobilization of proteases from plant extracts, achieving similar yields to those of commercial enzymes. Diaion® HP-20 provided excellent results, particularly considering this was its first application in protease immobilization. The support provided good immobilization performance and catalytic activity compared with agarose 6BCL, which is widely used for protease immobilization. Furthermore,

Diaion[®] HP-20 required fewer steps and reagents for protease immobilization by physical adsorption and exhibited greater affinity with the substrate, demonstrating the potential of this copolymer as a support for other enzymes. Finally, these findings support the potential application of these immobilized derivatives across various fields, including the modification of final product properties in sectors such as food and textiles, as well as in medicine, where they can generate bioactive peptides or antibody fragments.

Acknowledgments

This study was financed in part by the São Paulo State Research Support Foundation (FAPESP, grant n° 2021/11384-0), National Council for Scientific and Technological Development (CNPq, process n° 304399/2022-1).

Statements and Declarations

The authors declare that they have no interest in conflict with the work described in this paper.

Author Contributions: Lucas B. Barbosa: Writing – original draft, Formal analysis, Methodology, Software. Rhyan L. N. Gonçalves: Writing - original draft, Formal analysis, Methodology, Validation. Rubens Monti: Writing - original draft, Formal analysis, Methodology, Validation and Conceptualization. Juliana Bassan: Writing - original draft, Formal analysis, Methodology, Validation, Supervision and editing. Heitor B. S. Bento: Writing – original draft, Conceptualization, Supervision and editing. Ariela V. de Paula: Conceptualization, Funding acquisition, Project administration, Resources, Supervision, Review and editing.

References

- ABDELLA, M. A. A.; AHMED, S. A.; HASSAN, M. E. Protease immobilization on a novel activated carrier alginate/dextrose bead: Improved stability and catalytic activity via covalent binding. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 230, p. 123-139, 2023.
- ABOUSAWAY, O. et al. Noninvasive imaging of cancer immunotherapy. *Nanotheranostics*, 5(1), 90, 2021.
- ATSAKOU, A. E. et al. Synthesis of dietary lipids from pumpkin (*Cucurbita pepo*. L) oil obtained by enzymatic extraction: a sustainable approach. *3 Biotech*, v. 13, n. 11, p. 1–14, 2023.
- AZMI, M.S.I. et al. Application of Plant Proteases in Meat Tenderization: Recent Trends and Future Prospects. *Foods*, v.12, 1336, 2023.
- BANERJEE, S. et al. Extraction and crosslinking of bromelain aggregates for improved stability and reusability from pineapple processing waste. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 158, p. 318–326, 1 set. 2020.
- BASSAN, J et al. Immobilization of Trypsin in Lignocellulosic Waste Material to Produce Peptides with Bioactive Potential from Whey Protein. *Materials*, v. 9, p. 357, 2016.
- BASSO, A.; SERBAN, S. Industrial applications of immobilized enzymes—A review, *Molecular Catalysis*, 2019.
- BENUCCI, I. et al. Pineapple stem bromelain immobilized on different supports: Catalytic properties in model wine. *Biotechnology Progress*, v. 28, n. 6, p. 1472–1477, nov. 2012.

- BILAL, M. et al. Proteases immobilized on nanomaterials for biocatalytic, environmental and biomedical applications: Advantages and drawbacks. *Biotechnology Advances*, v.70, 2024.
- BOLÍVAR, M. S. B. Future Perspective and Technological Innovation in Cheese Making Using Artichoke (*Cynara scolymus*) as Vegetable Rennet: A Review. *Foods*, v.12, 2023.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, v. 72, p. 248 – 254, 1976.
- CABRAL, H. et al. Preliminary Functional Characterization, Cloning and Primary Sequence of Fastuosain, a Cysteine Peptidase Isolated from Fruits of *Bromelia fastuosa*. *Protein & Peptide Letters*, v. 13, p. 83-89, 2006.
- CHAIWUTA, P.; PINTATHONGA, P.; RAWDKUENB, S. Extraction and three-phase partitioning behavior of proteases from papaya peels. *Process Biochemistry*, v.45, p.1172–1175, 2010.
- DALGLEISH, P. G. Milk proteins, chemistry and physics In: FOX P. F.; CONDON, J. J.; (Ed) *Food Proteins* London; Applied science publisher; 1982.
- DHILLON, A. et al. Proteolytic Enzymes. *Current Developments In Biotechnology And Bioengineering*. Indian Institute Of Technology Guwahati, Guwahati, India, p. 149 – 173, 2017.
- DO NASCIMENTO, J. F. C. et al. Comparing a polynomial DOE model and an ANN model for enhanced geranyl cinnamate biosynthesis with Novozym® 435 lipase. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, v. 58, p. 103240, 2024.

- DOMINGUES, O. et al. Evaluation of *Candida rugosa* Lipase Immobilized on Magnetic Nanoparticles in Enzymatic/Chemical Hydroesterification for Biodiesel Production. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 194, n. 11, p. 5419–5442, 2022.
- EGUILUZ, M. et al. De novo assembly of *Vriesea carinata* leaf transcriptome to identify candidate cysteine-proteases. *Gene*, v. 691, p. 96–105, 2019.
- FREITAS, A. N. et al. Adsorption of extracellular lipase in a packed-bed reactor: an alternative immobilization approach. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, v. 47, n. 10, p. 1735–1749, 2024.
- FURLANI, I. et al. Imobilização Enzimática: Conceito e Efeitos na Proteólise. *Química Nova*, v. 43, n. 4, p. 463–473, 2020.
- GAGAOUA, M. et al. Artificial meat tenderization using plant cysteine proteases. *Current Opinion in Food Science*, v. 38:177–188, 2021.
- GARCIA, G. et al. Composição de macronutrientes e evolução da maturação de queijo Prato com teor reduzido de gordura adicionado de enzima proteolítica *fastuosaína*. *Brazilian Journal Food Technology*. 2009.
- GIMENES, N. C. et al. An Overview of Proteases: Production, Downstream Processes and Industrial Applications, *Separation & Purification Reviews*. 2019.
- GURUMALLESH, P. et al. A systematic reconsideration on proteases. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 128, p. 254-267, 2019.
- HASAN, M.J.; HAQUE, P.; RAHMAN, M. M. Protease enzyme based cleaner leather processing: A review. *Journal of Cleaner Production*, v.365, 2022.

- JOO, H. S.; CHOI, J. W. Purification and Characterization of a Novel Alkaline Protease from *Bacillus horikoshii*. J. Microbiol. Biotechnol, v. 22, p.58–68, 2012.
- KOROLEVA, V. A. et al. Thermal Inactivation of Cysteine Proteases: The Key Stages. Biophysics (Russian Federation), v. 66, n. 3, p. 364–372, 1 maio 2021.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of head of bacteriophage T4. Nature, v. 227, p. 680-685, 1970.
- LAMAS, E.M. et al. Hydrolysis of whey proteins by proteases extracted from *Cynara cardunculus* and immobilized onto highly activated supports. Enzyme and Microbial Technology, v.28, p. 642– 652, 2001.
- LIU, D-M; CHEN J.; SHI, Y. P. Advances on methods and easy separated support materials for enzymes immobilization. Trends in Analytical Chemistry, v.102, p.332-342, 2018.
- LOPES, L. A. et al. Glyoxyl-Activated Agarose as Support for Covalently Link Novo-Pro D: Biocatalysts Performance in the Hydrolysis of Casein. Catalysts, v.10, 2020.
- LYU, X.; GONZALEZ, R.; HORTON, A.; LI, T. Immobilization of Enzymes by Polymeric Materials. Catalysts, v.11, 2021.
- MA, X. et al. Fabrication of immobilized bromelain using cobalt phosphate material prepared in deep eutectic solvent as carrier. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, v. 210, 1 fev. 2022.
- MAGHRABY, Y. R. et al. Enzyme Immobilization Technologies and Industrial Applications, ACS Omega, v.8, p.5184–5196, 2023.

- MIOTTI, R. H. et al. Enzymatic production process of capric acid-rich structured lipids: Development of formulation as a new therapeutic approach. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 257, p. 128641, 2024.
- MOKHTAR, N. F. et al. The Immobilization of Lipases on Porous Support by Adsorption and Hydrophobic Interaction Method. *Catalysts*, v.10, 2020.
- MORELLON-STERLING, R. et al. A review on the immobilization of pepsin: A Lys-poor enzyme that is unstable at alkaline pH values. *International Journal of Biological Macromolecules*, v.210, p. 682-702, 2022.
- NAVEED, M. et al. Protease—A Versatile and Ecofriendly Biocatalyst with Multi-Industrial Applications: An Updated Review, *Catalysis Letters*, v.151, p.307–323, 2021.
- NWAGU, T. N.; UGWUODO, C. J. Stabilizing bromelain for therapeutic applications by adsorption immobilization on spores of probiotic *Bacillus*. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 127, p. 406–414, 15 abr. 2019.
- PATIL, S. S.; RATHOD, V. K. Combined effect of enzyme co-immobilized magnetic nanoparticles (MNPs) and ultrasound for effective extraction and purification of curcuminoids from *Curcuma longa*. *Industrial Crops & Products*, v.177, 2022.
- PIMCHAROEN, K. et al. Bromelain Immobilized onto Clay-Carboxymethylcellulose Composites for Improving Nutritive Value of Soybean Meal. *ACS Applied Bio Materials*, v. 7, n. 8, p. 5211–5221, 19 ago. 2024.
- REMONATTO, D. et al. Applications of immobilized lipases in enzymatic reactors: A review. *Process Biochemistry*, v. 114, p. 1–20, 2022b.

- REMONATTO, D. et al. Immobilization of Eversa Lipases on Hydrophobic Supports for Ethanolysis of Sunflower Oil Solvent-Free. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, p. 1–17, 2022a.
- REMONATTO, D. et al. Production of FAME and FAEE via Alcoholysis of Sunflower Oil by Eversa Lipases Immobilized on Hydrophobic Supports. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 185, n. 3, p. 705–716, 2018.
- REMONATTO, D. et al. Utilization of Clay Materials as Support for *Aspergillus japonicus* Lipase: An Eco-Friendly Approach. *Catalysts* 2021, Vol. 11, Page 1173, v. 11, n. 10, p. 1173, 2021.
- SARATH, G. et al. Protease assay methods. In: BEYNON, R. J., BOND, J. S. *Proteolytic enzymes a practical approach.*:New York Oxford University Press, cap. 3, p. 25-55, 2001.
- SEBASTIÁN, D. An Overview of Plant Proteolytic Enzymes. In: GUEVARA, M. G. (ed.). *Biotechnological Applications of Plant Proteolytic Enzymes*. Springer Nature Switzerland AG, 2018. cap. 1, p. 1-20. 2018.
- SIRISHA, V.; JAIN, A.; JAIN, A. Enzyme Immobilization: An Overview on Methods, Support Material, and Applications of Immobilized Enzymes. In: *Advances in Food and Nutrition Research*. v. 79, cap. 9, p. 180–203. 2016.
- SOLANKI, P. et al. Microbial proteases: ubiquitous enzymes with innumerable uses. *3 Biotech*, 11(10), 428, 2021.
- TACIAS-PASCACIO, V. G. et al. Immobilization of papain: A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, v.188, p. 94-113, 2021.

- TAVANO, O. et al. Biotechnological Applications of Proteases in Food Technology. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, v. 17, n. 2, p. 412–436, 2018.
- TRONCOSO, F. D.; SÁNCHEZ, D. A.; FERREIRA, M.L. Production of Plant Proteases and New Biotechnological Applications: Na Updated Review. ChemistryOpen, v.11, 2022.
- VALLÉS, D.; CANTERA, A. Antiacanthain A: New proteases isolated from *Bromelia antiacantha* Bertol. (Bromeliaceae). International Journal of Biological Macromolecules, v. 113, p. 916–923, 2018.
- YUSHKOVA, E. et al. Application of Immobilized Enzymes in Food Industry. J. Agric. Food Chem., v. 67, p. 11553–11567, 2019.
- ZDARTA, J. et al. A general overview of support materials for enzyme immobilization: Characteristics, properties, practical utility, MDPI AG, v. 92, n. 8, 2018.

Table 1. Determination of protein concentration and enzymatic activity present in enzyme extracts prepared with Gravatá fruits.

Extract	Protein Concentration	Activity	Specific Activity
	($\mu\text{g/mL}$)	(U)	(U/mg)
Pulp	163.60 ± 5.59	17.98 ± 1.29	109.92 ± 7.86
Peels	110.09 ± 3.28	4.69 ± 0.65	42.62 ± 5.89
Fruit	119.87 ± 0.42	10.11 ± 0.27	84.34 ± 2.22

Table 2. Immobilization yield of proteases in Agarose activated with Glutaraldehyde and Diaion® HP-20 before and after modification in agitation during the immobilization processes.

Support	Immobilization yield (%)	
	80 RPM	190 RPM
Agarose 6BCL	46	74
Diaion® HP-20	49	89

Table 3. Kinetic parameters of the proteases present in the enzyme extract and immobilized derivatives.

	Km (μmol)	Vmax ($\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}$)
Enzyme Extract	0.115	0.046
Agarose 6BCL	0.143	0.043
Diaion® HP-20	0.074	0.029

Table 4. Comparative analysis of the kinetic parameters of the enzymatic extract of *Bromelia fastuosa* pulp with the literature.

Free Enzyme	Immobilization Support	Immobilization Mechanism	Substrate	Optimal temperature	Optimal pH	K _m	V _{max}	Yield immobilization (%)	Reference
Enzymatic extract of <i>Bromelia fastuosa</i> pulp	-	-	casein	55	7.0	0.115 $\mu\text{mol l}^{-1}$	0.046 $\mu\text{mol. min}^{-1}$	-	This work
Enzymatic extract of <i>Bromelia fastuosa</i> pulp	Agarose - glutaraldehyde	covalent	casein	65	7.0	0.143 $\mu\text{mol l}^{-1}$	0.043 $\mu\text{mol. min}^{-1}$	74	This work
Enzymatic extract of <i>Bromelia fastuosa</i> pulp	Styrene-divinylbenzene copolymer (Diaion® HP-20)	Physical adsorption	casein	60	7.0	0.074 $\mu\text{mol l}^{-1}$	0.029 $\mu\text{mol. min}^{-1}$	89	This work
Bromelain (pineapple core waste)	-	-	casein	50	7.0	5.04 mM	12.89 $\mu\text{mol. min}^{-1}$	-	Banerjee et al., 2020
Bromelain (pineapple core waste)	-	Cross-linking-CLEAS (Glutaraldehyde as the cross-linking agent)	casein	60	8.0	5.45 mM	12.72 $\mu\text{mol. min}^{-1}$	-	Banerjee et al., 2020
Bromelain® (pineapple stem)	-	-	Bz-Phe-Val-Arg-pNA®	-	-	249.7 μM	0.46 $\mu\text{mol. min}^{-1}$	-	Ilaria et al., 2012

Bromelain® (pineapple stem)	Prosep®-9CHO	covalent	Bz-Phe-Val-Arg-pNA®	-	-	74.4 µM	0.0073 µmol. min ⁻¹	57	Ilaria et al., 2012
Free Enzyme	Immobilization Support	Immobilization Mechanism	Substrate	Optimal temperature	Optimal pH	K _m	V _{max}	Yield immobilization (%)	Reference
Bromelain® (pineapple stem)	Eupergit®-250L	Physical adsorption	Bz-Phe-Val-Arg-pNA®	-	-	111 µM	0.072 µmol. min ⁻¹	81	Ilaria et al., 2012
Bromelain® (pineapple stem)	Chitopearl BCW®-3010	covalent	Bz-Phe-Val-Arg-pNA®	-	-	48.45 µM	0.066 µmol. min ⁻¹	70	Ilaria et al., 2012
Bromelain® (pineapple stem)	-	-	casein	55	7.0	0.55 mg mL ⁻¹	0.00357 mg mL ⁻¹ min ⁻¹	-	Ma et al., 2022
Bromelain® (pineapple stem)	Cobalt phosphate material (Co-P)	Coordination adsorption	casein	60	7.5	0.78 mg mL ⁻¹	0.00612 mg mL ⁻¹ min ⁻¹	65.3	Ma et al., 2022
Bromelain® (pineapple stem)	-	-	casein	-	7.0	-	-	-	Pimchaoen et al., 2024
Bromelain® (pineapple stem)	Bentonite (Bt)-carboxymethylcellulose (CMC)	Ionotropic gelation	casein	-	5.0	-	-	>95	Pimchaoen et al., 2024
Bromelain (pineapple peels)	-	-	casein	60	5.0	0.08320 mM	0.330 mol min ⁻¹ mL ⁻¹	-	Nwagu; Ugwuodo, 2019
Bromelain (pineapple peels)	Bacillus sp. spores	Physical adsorption	casein	80	6.0	0.03456 mM	0.1061 mol min ⁻¹ mL ⁻¹	50,6	Nwagu; Ugwuodo, 2019

Figure captions

Fig. 1 Steps for preparing enzyme extracts.

Fig. 2 Schematic of the modified protocol for proteolytic assay.

Fig. 3 Scheme of the protocol for immobilization on Agarose 6BCL activated with glutaraldehyde.

Fig. 4 Scheme of the protocol for immobilization in the styrene-divinylbenzene copolymer.

Fig. 5 Protein profile of enzyme extracts extracted from *Bromelia fastuosa*.

Fig. 6 Comparison between the number of immobilization steps on both supports tested.

Fig. 7A Comparison of the optimum pH of the proteases present in the enzymatic extract with those immobilized on the evaluated supports.

Fig. 7B Comparison of the optimum temperature of the proteases present in the enzymatic extract with those immobilized on the evaluated supports.

Fig. 8A Graph of the kinetic model of the proteases present in the enzyme extract to determine K_m and V_{max} .

Fig. 8B Graph of the kinetic model of derivatives immobilized in the enzyme extract to determine K_m and V_{max} .