

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”  
INSTITUTO DE QUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

**MAÍSA DAVANSO**

**IMOBILIZAÇÃO DE FICINA EM PÓ DE SABUGO DE MILHO E OBTENÇÃO DE  
HIDROLISADOS PROTEICOS**

**ARARAQUARA  
2021**

**MAÍSA DAVANSO**

**IMOBILIZAÇÃO DE FICINA EM PÓ DE SABUGO DE MILHO E OBTENÇÃO  
DE HIDROLISADOS PROTEICOS**

Dissertação apresentada ao Instituto de  
Química, Universidade Estadual Paulista,  
como parte dos requisitos para obtenção  
do título de Mestre em Biotecnologia

**Orientador: Prof. Dr. Luis Henrique Souza Guimarães  
Coorientadora: Profa. Dra. Juliana Cristina Bassan**

**ARARAQUARA  
2021**

FICHA CATALOGRÁFICA

D245i Davanso, Maísa  
Imobilização de ficina em pó de sabugo de milho e  
obtenção de hidrolisados proteicos / Maísa Davanso. –  
Araraquara : [s.n.], 2021  
99 f. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista,  
Instituto de Química

Orientador: Luis Henrique Souza Guimarães

Coorientador: Juliana Cristina Bassan

1. Enzimas proteolíticas. 2. Enzimas imobilizadas.  
3. Peptídeos. 4. Biorreatores. 5. Hidrolisados de proteína.  
I. Título.

**CERTIFICADO DE APROVAÇÃO**

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: Imobilização de Ficina em Pó de Sabugo de Milho e Obtenção de Hidrolisados Proteicos

**AUTORA: MAÍSA DAVANSO**

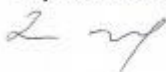
**ORIENTADOR: LUIS HENRIQUE SOUZA GUIMARÃES**

**COORIENTADORA: JULIANA CRISTINA BASSAN**

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em BIOTECNOLOGIA, pela Comissão Examinadora:



Prof. Dr. LUIS HENRIQUE SOUZA GUIMARÃES (Participação Virtual)  
Departamento de Biologia / Faculdade de Filosofia Ciências e Letras - USP - Ribeirão Preto



Profa. Dra. GISELA MARIA DELLAMORA ORTIZ (Participação Virtual)  
Fármacos e Medicamentos / Faculdade de Farmácia - UFRJ - Rio de Janeiro



Profa. Dra. ARIELA VELOSO DE PAULA (Participação Virtual)  
Departamento de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia / Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP - Araraquara

Araraquara, 17 de dezembro de 2021

## DADOS CURRICULARES

### IDENTIFICAÇÃO

Nome: Maísa Davanso

Nome em citações bibliográficas: Davanso, Maísa.

### FORMAÇÃO ACADÊMICA

2013-2018

Bacharelado em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

Trabalho de Conclusão de Curso intitulado: Imobilização Multipontual de Peroxidases de *Sechium edule* L. (Chuchu) em Suporte de Baixo Custo Pó de Sabugo de Milho.

Orientador: Prof. Dr Rubens Monti

### PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA

DAVANSO, Maísa et al. Assessment of pectinase-producing fungi isolated from soil and the use of orange waste as a substrate for pectinase production. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 40, p. 1-5, 2019.

VINUEZA GALARRAGA, Julio Cesar et al. Multipoint immobilization and stabilization of amined peroxidases from soybean hull and chayote employing bacterial cellulose as support. **Cellulose Chemistry and Technology**, v. 54, n. 3-4, p. 275, 2020.

### ***Estágio de docência***

2019

Disciplina: Enzimologia Farmacêutica

Curso: Farmácia-Bioquímica

Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, Araraquara.

Supervisão: Prof<sup>a</sup> Dra. Daniela Cardoso Umbelino Cavallini

## **AGRADECIMENTOS**

A Prof.<sup>a</sup> Dra. Juliana Bassan, pela orientação, por dividir o conhecimento, pela paciência e principalmente pela amizade incomparável todos esses anos.

Ao Prof. Dr. Luis Henrique pela orientação e pela oportunidade de realizar o mestrado.

Ao Prof. Dr. Rubens Monti pelos ensinamentos científicos e de vida.

As amigadas que acompanharam a aventura da pesquisa científica e dividiram as ansiedades, Johana A., Daniela R. e Fernando M.

Ao Cauê, pela paciência e companhia.

A minha família, pelo apoio e por possibilitar as oportunidades que permitiram eu chegar até aqui.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico pelo auxílio financeiro ao processo 132428/2019-9

## RESUMO

Ficina (EC 3.4.22.3) é um grupo de endoproteases extraída a partir do látex de figueira (*Ficus carica*). Para a execução e conclusão desse trabalho, a ficina foi extraída, caracterizada, imobilizada e aplicada na hidrólise de extratos proteicos. Foram testados três diferentes métodos de concentração proteica, precipitação com acetona, liofilização e precipitação com sulfato de amônio. A atividade enzimática do extrato foi avaliada em diferentes valores de pH e temperaturas, usando dois substratos a caseína (macromolecular) e BAPNA (sintético), apresentando picos de atividade em 55°C com o pH 9,0 ( $84,69 \pm 1,21 \text{ U mg}^{-1}$ ) e 6,0 ( $0,202 \pm 0,01 \text{ U mg}^{-1}$ ), respectivamente. A enzima foi imobilizada em dois suportes, agarose e pó de sabugo de milho, com três ativações químicas distintas, imobilizando a enzima de forma covalente e iônica. Foi avaliada a manutenção de atividade dos derivados produzidos em diferentes condições de temperatura (45, 55 e 65°C) e pH (5, 7 e 9). De todos os derivados obtidos por imobilização em pó de sabugo de milho (SM), SM-Glioxil-F e SM-Gluta-F foram selecionados considerando as estabilidades e atividades recuperadas, para serem utilizados na produção de hidrolisados proteicos a partir de extratos de grão-de-bico, ora-pro-nóbis e clara de ovo que também foram submetidos a hidrólise com a ficina na forma solúvel (livre) em um sistema de mistura operado em batelada. Os hidrolisados produzidos foram avaliados através da dosagem de proteínas, SDS-PAGE, atividade antioxidante pelo radical ABTS e atividade quelante de ferro. A partir da análise desses resultados, o derivado enzimático SM-Glioxil-F foi utilizado para hidrólise de extrato de grão de bico em reator de leito fixo operado de forma contínua por até 10h, com tempo espacial de 71 min. Foi possível realizar a imobilização da ficina em suporte alternativo e os derivados utilizados foram capazes de promover a hidrólise de proteínas presentes nos extratos avaliados, em ambas as formas de operação, indicando que a ficina imobilizada apresenta potencial de hidrólise de proteínas e produção de peptídeos bioativos.

**Palavras-chave:** ficina; imobilização de enzimas; peptídeos bioativos.

## ABSTRACT

Ficin (EC 3.4.22.3) is a group of endoproteases extracted from the latex of the fig tree (*Ficus carica*). For the execution and conclusion of this work, ficin was extracted, characterized, immobilized and applied in the hydrolysis of protein extracts. Three different methods of protein concentration were tested, acetone precipitation, lyophilization and ammonium sulfate precipitation. The enzymatic activity of the extract was evaluated at different pH and temperatures, using two substrates, casein (macromolecular) and BAPNA (synthetic), showing activity peaks at 55°C at pH 9.0 ( $84.69 \pm 1.21 \text{ U mg}^{-1}$ ) and 6.0 ( $0.202 \pm 0.01 \text{ U mg}^{-1}$ ), respectively. The enzyme was immobilized on two supports, agarose and corn cob powder, with three different chemical activations, immobilizing the enzyme in a covalent and ionic way. The maintenance of activity of the derivatives produced was evaluated under different conditions of temperature (45, 55 and 65°C) and pH (5, 7 and 9). From all the derivatives obtained by immobilization in corn cob powder (SM), SM-Glyoxyl-F and SM-Gluta-F were selected, considering the stability and activities recovered, to be used in the production of protein hydrolysates from extracts of chickpea, ora-pro-nóbis and egg white that were also subjected to hydrolysis with ficin in soluble form (free) in a mixed system batch-operated. The hydrolysates produced were evaluated through protein dosage, SDS-PAGE, antioxidant activity by ABTS radical and iron chelating activity. From the analysis of these results, the enzymatic derivative SM-Glyoxyl-F was used for hydrolysis of chickpea extract in a fixed-bed reactor operated continuously for up to 10 hours, with residence time of 71 min. It was possible to execute the immobilization of ficin in an alternative support and the derivatives used were able to promote the hydrolysis of proteins present in the extracts evaluated, in both forms of operation, indicating that the immobilized ficin has the potential for protein hydrolysis and production of bioactive peptides.

**Keywords:** ficin; enzyme immobilization; bioactive peptides.



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Ilustração <i>Ficus carica</i> .....	19
Figura 2 - Métodos de imobilização de biomoléculas .....	23
Figura 3 - Preparação de CLEAs. A primeira etapa consiste em precipitação das enzimas, seguida da agregação causada pela adição de reagentes, como glutaraldeído.....	24
Figura 4 – Imobilização por aprisionamento e microencapsulação.....	26
Figura 5 - Imobilização por ligação iônica, onde por exemplo um suporte é carregado em sua superfície com cargas positivas interage com as cargas negativas disponíveis na superfície da enzima. ....	29
Figura 6 - Imobilização de enzimas por ligação covalente. O suporte modificado pela adição de grupos reativos, como por exemplo aldeídos, interagem com a enzima formando ligações covalentes. ....	30
Figura 7 – Estruturas química do glutaraldeído e do glicidol .....	31
Figura 8 – Estrutura química da agarose.....	35
Figura 9 - Pré tratamento de materiais lignocelulósicos. ....	36
Figura 10 - Sequência de reações para obtenção dos suportes glioxil, amino e glutaraldeído.....	44
Figura 11 - Atividade relativa da ficina usando os substratos caseína e BAPNA em função do pH. ....	51
Figura 12 - Atividade relativa da ficina em função da variação de temperatura, utilizando BAPNA e caseína como substratos. ....	52
Figura 13 – Perfil eletroforético em SDS – PAGE (10%) das amostras submetidas aos processos de concentração.....	54
Figura 14 - Representação da estrutura química simplificada da celulose (a) e da agarose (b). ....	55
Figura 15 - Atividade residual de ficina livre em diferentes condições de pH e temperatura. ....	60
Figura 16 - Atividade residual dos derivados enzimáticos e ficina livre em pH 5, 7, e 9. ....	62
Figura 17- Atividade residual dos derivados e ficina livre a temperaturas de 45°C, 55°C e 65°C .....	66

Figura 18 - Atividade residual ficina solúvel e dos derivados SM-Glioxil-F e SM-Gluta-F a 45°C e pH 9.....	68
Figura 19 - Concentração relativa de proteínas em diferentes extratos (grão de bico, ora-pro-nobis e clara de ovo) durante a hidrólise utilizando os derivados SM-Glioxil-F e SM-Gluta-F, e enzima livre. Controle é relativo a concentração de proteínas no extratos em amostra sem a presença de enzima.....	70
Figura 20 – Perfil eletroforético em SDS-PAGE para os extratos hidrolisados de grão de bico utilizando a ficina livre (B) e os derivados SM-Glioxil-F (C) e SM-Gluta-F (D). Em A) controle de hidrólise em função da temperatura. ....	73
Figura 21 – Perfil eletroforético em SDS-PAGE para os extratos hidrolisados de clara de ovo utilizando a ficina livre (B) e os derivados SM-Glioxil-F (C) e SM-Gluta-F (D). Em (A) controle de hidrólise em função da temperatura. ....	74
Figura 22 - Atividade quelante de ferro nos hidrolisados de grão de bico, ora-pro-nobis e clara de ovo, produzidos por ficina livre e imobilizada, SM-Glioxil-F e SM-Gluta-F, e controle de hidrólise em função da temperatura. ....	77
Figura 23 - Atividade antioxidante nos hidrolisados de grão de bico, ora-pró-nobis e clara de ovo, produzidos por ficina livre e imobilizada, SM-Glioxil-F e SM-Gluta-F, e controle de hidrólise em função da temperatura. ....	79
Figura 24 - Teste de traçador. A. Início do ensaio. B e C. Tempos intermediários do ensaio. D. Finalização do ensaio.....	81
Figura 25 - Gráfico resposta obtido pela interferência do tipo pulso, realizado para determinação de tempo médio de retenção em no reator de tipo leito fixo A. Concentração de corante por tempo. B) Função $E(t)*t$ por tempo .....	82
Figura 26 - Concentração de proteína, atividade quelante e antioxidante do hidrolisado produzido em reator de leito fixo .....	83

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Avaliação de processos de concentração da ficina. ....	53
Tabela 2 - Rendimento de imobilização, atividade recuperada e eficiência de imobilização dos derivados obtidos com diferentes suportes usando caseína e BAPNA como substratos. ....	56
Tabela 3 - Atividade residual após 4 ciclos de reuso .....	58
Tabela 4 - Tempo de meia-vida de ficina livre em diferentes condições de pH e temperatura. ....	60

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABTS - 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)

Aga-Amino-F – Derivado de ficina em agarose aminada

Aga-Glioxil-F – Derivado de ficina em agarose com grupos glioxil

Aga-Gluta-F – Derivado de ficina em agarose com grupos glutaraldeído

BAPNA – N $\alpha$ -Benzoyl-L-arginine 4-nitroanilide hydrochloride

CLEAs – *Cross-linked enzymes aggregates*;

CLECs – *Cross-linked enzymes crystals*,

EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético

SDS-Page - Dodecil sulfato de sódio

SM-Amino-F - Derivado de ficina em pó de sabugo de milho aminado

SM-Glioxil-F - Derivado de ficina em pó de sabugo de milho glioxil;

SM-Gluta-F- Derivado de ficina em a pó de sabugo de milho com grupos glutaraldeído;

TCA – Ácido tricloroacético;

Trolox -2,5,7,8-tetrametil-cromano-2-carboxílico

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>13</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>17</b>
<b>3</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	<b>18</b>
<b>3.1</b>	<b>Ficina</b>	<b>18</b>
<b>3.2</b>	<b>Aplicação do látex com atividade de ficina</b>	<b>20</b>
<b>3.3</b>	<b>Imobilização</b>	<b>22</b>
3.3.1	<i>Cross-linked Enzyme (CLE)</i>	24
3.3.2	<i>Aprisionamento e Encapsulação</i>	25
3.3.3	<i>Adsorção</i>	27
3.3.4	<i>Imobilização por ligação iônica</i>	28
3.3.5	<i>Ligação covalente</i>	30
<b>3.4</b>	<b>Suportes</b>	<b>33</b>
<b>3.5</b>	<b>Fontes proteicas</b>	<b>37</b>
3.5.1	<i>Grão de bico</i>	37
3.5.2	<i>Ora-pro-nóbis</i>	38
3.5.3	<i>Clara de ovo</i>	39
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>41</b>
<b>4.1</b>	<b>Obtenção e preparo do extrato enzimático com atividade de ficina</b>	<b>41</b>
<b>4.2</b>	<b>Atividade enzimática</b>	<b>41</b>
<b>4.3</b>	<b>Determinação de concentração proteica</b>	<b>41</b>
<b>4.4</b>	<b>Eletroforese</b>	<b>42</b>
<b>4.5</b>	<b>Concentração das proteínas presentes no látex</b>	<b>42</b>
<b>4.6</b>	<b>Caracterização cinética da enzima livre e dos derivados enzimáticos</b>	<b>42</b>
4.6.1	<i>pH</i>	42
4.6.2	<i>Temperatura</i>	42
4.6.3	<i>Estabilidade térmica e ao pH da enzima livre e derivados enzimáticos</i>	43
<b>4.7</b>	<b>Tratamento do pó de sabugo de milho</b>	<b>43</b>
<b>4.8</b>	<b>Ativação dos suportes</b>	<b>43</b>
<b>4.9</b>	<b>Imobilização do extrato com atividade de ficina.</b>	<b>44</b>
<b>4.10</b>	<b>Avaliação da imobilização</b>	<b>45</b>
<b>4.11</b>	<b>Reuso</b>	<b>45</b>
<b>4.12</b>	<b>Preparo dos substratos proteicos</b>	<b>46</b>
<b>4.13</b>	<b>Hidrólise em reator mistura operada em batelada</b>	<b>46</b>
<b>4.14</b>	<b>Caracterização dos hidrolisados</b>	<b>47</b>
4.14.1	<i>Atividade antioxidante pelo método do radical ABTS (2,2'-azino-bis (3- etilbenzotiazolin) 6-ácido sulfônico)</i>	47
4.14.2	<i>Atividade quelante de íons de ferro</i>	47
<b>4.15</b>	<b>Hidrólise em reator de leito fixo operando em modo contínuo</b>	<b>48</b>
4.15.1	<i>Determinação de umidade do suporte pó de sabugo de milho</i>	48
4.15.2	<i>Determinação da densidade cristalina do suporte pó de sabugo milho</i>	49
4.15.3	<i>Caracterização hidrodinâmica - curva de traçador</i>	49
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>51</b>
<b>5.1</b>	<b>Caracterização do extrato enzimático com atividade de ficina (enzima livre)</b>	<b>51</b>
<b>5.2</b>	<b>Concentração do extrato proteico</b>	<b>53</b>
<b>5.3</b>	<b>Imobilização da ficina</b>	<b>54</b>
5.3.1	<i>Reuso e estabilidade operacional</i>	58
<b>5.4</b>	<b>Hidrólise em sistema de mistura operado em batelada</b>	<b>69</b>

5.4.1	<i>Atividade Quelante</i>	75
5.4.2	<i>Atividade Antioxidante</i>	77
<b>5.5</b>	<b>Hidrólise em reator de leito fixo operando em modo contínuo</b>	<b>80</b>
5.5.1	<i>Teste de traçador</i>	80
5.5.2	<i>Hidrólise em operação contínua</i>	82
<b>6</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b>	<b>85</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSÃO</b>	<b>86</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>87</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Proteases constituem um grupo de enzimas hidrolíticas que promovem a hidrólise de ligações peptídicas em proteínas e peptídeos. Podem ser endo e exopeptidases, sendo que as endopeptidases atuam nas ligações internas das cadeias proteicas, e exopeptidases atuam na região amino ou carboxil terminal das proteínas. Elas são distribuídas universalmente entre microrganismos, animais e plantas. A quimosina é uma protease, reconhecida como umas das primeiras enzimas a serem utilizadas, encontrada em estômagos de bezerros e usada na produção de queijos. Desde então, diversas proteases como alcalase, tripsina, papaína, bromelina, entre outras, são utilizadas em inúmeras aplicações biotecnológicas, como indústria farmacêutica, de cosméticos, de detergentes e de alimentos, produção de cerveja, amaciamento de carnes, na melhora de propriedades nutricionais de alimentos proteicos, produção de ração animal entre outras aplicações (MAZORRA-MANZANO; RAMÍREZ-SUAREZ; YADA, 2018; TAVANO, 2013; TAVANO *et al.*, 2018).

O látex é a mistura de inúmeros metabólitos secundários presentes em diversas espécies vegetais, incluindo as do gênero *Ficus*. Um dos papéis fisiológicos do látex é a de proteção contra entrada de patógenos em regiões do tecido vegetal que foram lesionadas. Um dos componentes do látex de figueiras (*Ficus carica*) é uma fração proteolítica caracterizada pela presença principalmente de proteases cisteínicas, mas também aspárticas e serínicas. O conjunto de proteases cisteínicas (isoformas de endoproteases) é chamado de ficina (EC 3.4.22.3). Atualmente, quatro das suas isoformas foram cristalizadas, A, B, C e D, todas glicoproteínas bastante semelhantes à bromelina (MORELLON-STERLING *et al.*, 2020; RASKOVIC; LAZIC; POLOVIC, 2015).

Em geral, a ficina tende ser utilizada nos mesmos segmentos que a bromelina e a papaína, sendo comum aplicações onde há mistura desses catalisadores. A ficina na sua forma solúvel pode ser utilizada no pré-tratamento de biofilmes de *Staphylococcus aureus* que serão submetidos ao tratamento com antibióticos, permitindo uma redução da concentração necessária de antibióticos para eliminação do microrganismo (BAIDAMSHINA *et al.*, 2017). A ficina também foi utilizada na hidrólise de anticorpos para produção de fragmentos de ligação de antígenos (Fab), promovendo um aprimoramento nas aplicações de anticorpos (MORELLON-STERLING *et al.*, 2020). Também são encontrados usos da ficina na fabricação de

queijos, na indústria farmacêutica e cervejeira, no amaciamento de carnes e na produção de peptídeos bioativos (SIAR *et al.*, 2017).

Um dos obstáculos para o uso da ficina é a sua disponibilidade limitada. Para se obter um rendimento significativo da enzima é necessário realizar o corte dos ramos da figueira, o que acaba interferindo no desenvolvimento da planta, assim como no crescimento de novos galhos, tornando o processo de extração demorado e oneroso. Sattari e colaboradores (2020) conseguiram clonar o gene de *Ficus carica*, figueira iraniana, que expressa as isoformas da ficina em *E. coli* BL21, o que facilita a produção em larga escala da enzima, permitindo o seu uso biotecnológico.

Além do uso de técnicas de engenharia genética para o favorecimento do uso da enzima, também é possível avaliar as tecnologias existentes no âmbito da engenharia enzimática, como as técnicas de imobilização.

As características inerentes às enzimas, como biodegradabilidade, especificidade, funcionamento em condições amenas de operação e altas taxas de conversão, tornam o uso de enzimas favorável comparado a catalisadores químicos, atendendo as demandas do uso de tecnologias mais limpas e mais sustentáveis. Um dos maiores desafios encontrados no uso generalizado de enzimas é sua aplicação industrial devido à dificuldade em manter a estabilidade químico-operacional do catalisador por longo período, a complexidade em recuperar a enzima ao final da reação e em promover seu reuso. Dessa forma a tecnologia de imobilização de enzimas torna-se uma solução para superar as limitações encontradas para o uso de biocatalisadores solúveis (GUISÁN, 2013; SHELDON; VAN PELT, 2013; SIAR *et al.*, 2018a; SIRISHA; JAIN; JAIN, 2016).

A imobilização pode ser definida como o confinamento de enzimas em um suporte sólido ou uma matriz diferente daquela em que o substrato ou o produto se encontram. Diferentes metodologias podem ser empregadas para possibilitar a imobilização dos catalisadores, sendo normalmente divididos em aprisionamento, *cross-linking* e ligação ao suporte. A escolha do melhor método é dependente da natureza da enzima, do suporte e de sua aplicação (SIRISHA; JAIN; JAIN, 2016).

A formação de ligações covalentes é descrita como um método irreversível de imobilização e é um dos mais utilizados devido a sua capacidade estabilizante atribuída a formação das ligações entre os resíduos de aminoácidos localizados na superfície da enzima e grupos funcionais presentes no suporte, evitando a solubilização da proteína. O grande revés dos métodos que empregam a formação de



ligações covalentes é que os resíduos do aminoácido envolvidos na imobilização, não devem estar envolvidos com a atividade catalítica da enzima; caso contrário, esta pode ser prejudicada significativamente devido a desestabilização da estrutura da enzima (CAO, 2006; GUIÁN, 2013).

A imobilização também pode ser realizada através da ligação da enzima ao suporte por ligações iônicas, ligações de hidrogênio e forças de Van der Waals. O uso dessa metodologia de imobilização geralmente tende a garantir a atividade enzimática inicialmente oferecida ao suporte, podendo até aumentar a sua atividade devido a modificações conformacionais da estrutura terciária da enzima. Essas interações são relativamente mais fracas comparadas as ligações covalentes, sofrendo influência das condições do meio, como pH, força iônica e temperatura, podendo ocorrer o fenômeno da dessorção provocado pela variação das condições do meio reacional (GUIÁN, 2013; SIRISHA; JAIN; JAIN, 2016).

Além do método de imobilização, um fator importante na tecnologia de imobilização, é a escolha do suporte a ser utilizado. Este pode ser orgânico, sintético ou natural, ou inorgânico. Suportes ideais devem apresentar as seguintes características: ser de baixo custo; com baixo impacto ambiental; deve ser inerte após a imobilização não interferindo na reação enzimática e na qualidade do produto; deve apresentar resistência mecânica e térmica; ser estável; ser regenerável após a exaustão da atividade enzimática; ser capaz de aumentar a atividade catalítica da enzima; ser capaz de suportar uma grande carga proteica; entre outras características secundárias. Entretanto, a maioria dos suportes não apresenta esse conjunto de propriedades e, portanto, a escolha deve ser avaliada de acordo com a conveniência do processo em que será utilizado (SIRISHA; JAIN; JAIN, 2016).

A agarose é um polissacarídeo oriundo da parede celular de algas marinhas vermelhas, sendo usada amplamente como suporte para imobilização, e possui características como alta porosidade, é hidrofílica, fácil de derivatizar, e não possui grupos carregados, evitando adsorção não específica de produtos ou substratos. A maior limitação do uso da agarose é o seu alto custo, o que torna a sua aplicação em escala industrial limitada (GUIÁN, 2013). Um material que vem sendo usado como alternativa para imobilização é o pó de sabugo de milho, um material lignocelulósico, subproduto do processamento do milho. De acordo com o Acompanhamento da Safra Brasileira realizada pela Companhia Nacional de Abastecimento (Conab) a produção de milho na safra 2018/19 no Brasil foi de 99,9 milhões de toneladas e estima-se que

são produzidos 0,15 kg de sabugo de milho para cada quilograma de milho produzido. O baixo custo e suas propriedades físico-químicas tornam o pó de sabugo de milho um material interessante para o emprego como suporte na imobilização de enzimas (BASSAN *et al.*, 2016).

Uma importante aplicação de proteases vegetais como bromelina e papaína está na produção de hidrolisados proteicos com a finalidade de obtenção de fragmentos como peptídeos e até aminoácidos livres. Algumas sequências proteicas quando processadas e digeridas por proteases podem produzir peptídeos que apresentam funções biológicas específicas diferentes da proteína nativa. Os peptídeos que são biologicamente ativos (bioativos), obtidos a partir de proteínas de grau alimentício, podem prevenir doenças e problemas cardiovasculares, digestivos, endócrinos e relacionados ao sistema imunológico, potencialmente prevenindo o desenvolvimento de hipertensão, diabetes, obesidade e câncer (CHAKRABARTI; GUHA; MAJUMDER, 2018; MAZORRA-MANZANO; RAMÍREZ-SUAREZ; YADA, 2018).

Considerando o exposto, a imobilização da ficina permitiu a exploração da sua capacidade hidrolítica de protease e, assim, o aproveitamento do potencial de produção de peptídeos com atividade biológica em extratos proteicos alternativos.

## 2 OBJETIVOS

O objetivo da investigação realizada foi imobilizar a enzima ficina extraída de látex de figo (*Ficus carica*) em pó de sabugo de milho e aplicar o derivado(s) para hidrólise de extratos proteicos visando a obtenção de hidrolisados proteicos.

Objetivos específicos:

- a) caracterizar cineticamente a enzima ficina extraída de látex de figo;
- b) imobilizar a ficina em pó de sabugo de milho e agarose ativados por três métodos químicos diferentes, através da formação de ligações covalentes (glioxil e glutaraldeído) e iônica (amino);
- c) avaliar o reuso e a estabilidade ao pH e a temperatura dos derivados produzidos.
- d) hidrolisar os extratos proteicos de grão de bico, ora-pro-nóbis e clara de ovo utilizando a enzima na sua forma solúvel e imobilizada;
- e) hidrolisar extrato de grão de bico em reator de leito fixo com operação contínua;
- f) determinar atividade antioxidante e quelante de ferro nos hidrolisados.

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 Ficina

As enzimas são proteínas especializadas que possuem a capacidade de reduzir a energia de ativação de diversas reações, ou seja, são biocatalisadores. Classificadas pelo tipo de reação que catalisam, as enzimas se dividem entre 7 grandes grupos, oxidoredutases, transferases, hidrolases, liases, isomerases, ligases e translocases (TAVANO, 2013).

Dentre as hidrolases, encontram-se as proteases, responsáveis pela quebra de ligações peptídicas presentes entre aminoácidos que constituem proteínas. Distribuídas em subgrupos, as proteases são agrupadas pelo mecanismo de ação catalítica que apresentam pelo aminoácido ou metal presente no seu centro catalítico, sendo peptidases, aspárticas, cisteínicas, metálicas, serínicas, tipo catalítico misto ou desconhecido (TAVANO, 2013).

A ficina (EC 3.4.22.3) é um extrato enzimático composto por diversas proteases e obtido do látex de algumas espécies do gênero *Ficus*. Distribuídas mundialmente, as cerca de 700 espécies incluídas no gênero encontram-se principalmente em regiões próximas aos trópicos e apresentam espécies de árvores caducas ou perenes, arbustos, trepadeiras (LANSKY; PAAVILAINEN, 2010; SHI et al., 2018). Uma característica comum entre as espécies que compõe o gênero é a presença de látex, uma seiva de composição complexa constituída de terpenóides, alcaloides, borracha, proteínas, proteases, quitinases e glicosidases (KONNO, 2011; RASKOVIC; LAZIC; POLOVIC, 2015). Mesmo que seja comum a presença de proteases, a atividade proteolítica não é uma característica universal do látex das espécies que compõe o gênero *Ficus*, sendo que apenas algumas espécies estudadas apresentam maior potencial de aproveitamento, como *Ficus johannis*, *Ficus carica* e *Ficus inspida*, (HANSSON; ZELADA; NORIEGA, 2005; HOMAELI et al., 2017; MORELLON-STERLING et al., 2020).

A figueira comum (*Ficus carica*) é uma das primeiras árvores cultivadas no mundo, principalmente na região mediterrânea, e seus frutos, os figos, apresentam grande importância cultural, tanto pela história vinculada presente na cultura de diversos povos quanto ao seu valor nutricional (BADGUJAR et al., 2014; CRISOSTO et al., 2011). De acordo com as Nações Unidas, a Turquia é o maior produtor de figos, com um cultivo de mais de 300000 toneladas de figos no ano de 2019. O Brasil, no

mesmo período, apresentou uma produção de 22500 toneladas (FAO, 2021). A Figura 1 apresenta a ilustração das folhas e frutos de figueira.

**Figura 1** - Ilustração *Ficus carica*



Fonte: Thomé, 1886.

O látex é produzido e armazenado por células laticíferas, estruturas tubulares distribuídas por toda a planta. Apesar de não apresentar função correlacionada ou tão definida como em outras seivas produzidas pelas plantas, tal como o floema ou xilema, a sua função está associada a uma resposta de defesa, graças a sua presença uniforme pela planta e a sua liberação como resultado a danos físicos causados à planta (KONNO, 2011; RAMOS *et al.*, 2019).

É desconhecido ainda o papel específico de cada um dos componentes do látex, mas é cogitado que a presença de peptidases em abundância nas células laticíferas seja o principal mecanismo de defesa mediada pelas células (RAMOS *et al.*, 2019). O termo “*ficin*” foi estabelecido por Robbins, em 1930, para descrever genericamente as proteínas purificadas com atividade anti-helmíntica, extraídas do látex de árvore conhecida como *higuerón*, pertencente ao gênero *Ficus*. Atualmente,

o termo descreve as cisteínas proteases presentes no látex. É conhecido que diversas isoformas de proteases compõem o látex, sendo relatadas normalmente 5 isoformas por análises cromatográficas, entretanto investigações do transcriptoma indicam a presença de um número maior de proteínas com atividade proteolítica (MILOŠEVIĆ *et al.*, 2020).

### 3.2 Aplicação do látex com atividade de ficina

O uso de látex de espécies de *Ficus* é relatado há anos pela medicina tradicional, incluindo *Ficus insipida* na preparação de *ojé*, que é usado na região amazônica pela população local, como um remédio com ação anti-helmíntica; látex de *Ficus racemosa* é utilizada na Índia juntamente com outras partes da planta no tratamento de diversas doenças incluindo diabetes, problemas respiratórios, urinários e inflamatórios que faz parte do sistema de medicina natural conhecido como Ayurveda; (AHMED; UROOJ, 2010; HANSSON; ZELADA; NORIEGA, 2005). O *Ficus carica* apresenta um número ainda maior de relatos sobre suas aplicações, incluindo atividade anti-helmíntica, uso no tratamento de queimaduras, emoliente, ação contra pedras renais, ação laxativa, problemas de pele, remoção de verrugas e outras aplicações (BADGUJAR *et al.*, 2014). Outras finalidades são dadas às distintas partes da planta, incluindo folhas, frutos, casca e madeira. Os estudos contínuos sobre as espécies possibilitam a validação dos usos pela medicina tradicional através da compreensão de seus componentes individuais (BADGUJAR *et al.*, 2014).

A ficina utilizada diretamente para hidrólise de proteínas, pode gerar produtos em abundância com distintas funcionalidades dependentemente do substrato utilizado. Ficina em conjunto com papaína foram utilizadas por Vatić *et al.* (2020) para aumentar a detecção de *Listeria monocytogenes*, um patógeno intracelular encontrado em carnes fermentadas. A digestão das proteínas da carne pela ação das enzimas expõe a bactéria, que pode ser detectada pelos testes de qualidade. Li *et al.* (2021) utilizaram ficina associada à alta pressão para o tratamento de carne de carneiro, aumentando características de qualidade da carne, como maciez, sabor e textura, tanto da carne crua quanto cozida. O pré-tratamento de biofilmes de *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis* com extratos de ficina facilitou o acesso de antibióticos pela destruição da matriz extracelular, reduzindo a demanda

de antibióticos como ciprofloxacina e cloreto de benzalcônio, necessários para ação bactericida (BAIDAMSHINA et al., 2017).

Além de aplicações que aproveitam a ampla funcionalidade dos extratos de ficina, há situações em que a ficina possibilita a obtenção de produtos graças à sua especificidade hidrolítica. A caracterização de antígenos em hemácias em banco de sangue, pode ser realizada pelo tratamento enzimático com proteases, graças à capacidade de fragmentar ligações peptídicas específicas, sendo a ficina, a papaína e a bromelina as proteases mais comumente utilizadas para essa finalidade (CASTILLO et al., 2018; SANTIS et al., 2019). Outra aplicação clínica relatada é na produção de fragmentos derivados de anticorpos anti-idiotípicos, com o objetivo de interagir com a região idiotípica de anticorpos monoclonais (região variável de um anticorpo, incluindo a região específica que estabelece a ligação com antígenos) (HARTH; FRISCH, 2021). Os anticorpos monoclonais com regiões idiotípicas podem ser utilizados para transporte e depósito *in vivo* de terapias em tumores, como citocinas ou drogas citotóxicas. A permanência desses anticorpos no organismo, após a interação com a célula alvo da terapia, pode ser prejudicial a outros tecidos. A interação de fragmentos de anticorpos anti-idiotípicos, produzidos pela hidrólise com ficina e os idiotípicos residuais pode prevenir efeitos colaterais (ERLANDSSON et al., 2006; MORELLON-STERLING et al., 2020).

Enzimas proteolíticas são utilizadas em inúmeros setores industriais incluindo detergentes, processamento de couro e alimentício, na produção de cervejas e pães, assim como suas aplicações. As fontes dessas proteases são inúmeras, podendo ser microbianas, animais ou vegetais (DA SILVA, 2017; DHILLON et al., 2017).

A ficina, como uma protease de origem vegetal, oferece à indústria alimentícia a garantia de sustentabilidade e uma alternativa às enzimas atualmente utilizadas (AIDER, 2021; MORELLON-STERLING et al., 2020; SHAH; MIR; PARAY, 2014). A produção de coalhada de ovelha foi avaliada utilizando dois diferentes extratos coagulantes, ficina e *Polyporus badius*, um fungo. Os produtos obtidos apresentaram diferentes características reológicas e estruturais de acordo com o grau de hidrólise obtido e retenção de água, ambos apresentaram potencial de serem novas alternativas a coagulantes tradicionais (SHABANI; SHAHIDI; RAFE, 2018). Bornaz et al. (2010) também avaliaram a coagulação de leite de ovelha utilizando extratos vegetais, ficina e alcachofra, em comparação com a quimosina. O uso de extrato de ficina gerou um maior rendimento devido a maior retenção de água. Com exceção da

cor, os outros atributos sensoriais não apresentaram diferenças significativas entre os coagulantes utilizados. Entretanto, devido à alta atividade proteolítica, a ficina e outras proteases vegetais podem apresentar efeito indesejável na produção de queijos, promovendo mais hidrólise do que coagulação, liberando mais peptídeos e aminoácidos e, como consequência, diminuindo o rendimento de produção (AIDER, 2021; LOW et al., 2006). O uso de leites com alto conteúdo proteico, como o de ovelha, o qual apresenta teor proteico quase duas vezes maior que o leite de vaca, mostra-se como uma alternativa mais interessante para o uso da ficina como coagulante (AIDER, 2021).

Outro potencial uso da ficina é na redução de alergenicidade de alguns alimentos, como por exemplo leite e amendoim. A capacidade da ficina de hidrolisar proteínas possibilita a modificação ou remoção dos epítomos presentes nas proteínas que são reconhecidas pelos anticorpos IgE (YU; MIKIASHVILI, 2020). Meng et al. (2020) avaliaram a redução de alérgenos em amendoins pela hidrólise enzimática com diversas proteases. Com unidades enzimáticas equivalentes, as proteases vegetais ficina, bromelina e papaína se destacaram ao reduzir a ligação dos hidrolisados de amendoim à IgE para 0, 1,20 e 2,31%, respectivamente, valores expressivos, quando comparadas a Neutrase, Alcalase, Thermolysin, que reduziram a ligação dos hidrolisados à 25,10, 16,56 e 92,11%, respectivamente. Os hidrolisados produzidos foram modificados com transglutaminase, que catalisa a polimerização dos peptídeos, melhorando as propriedades funcionais dos hidrolisados, como emulsificação e ação espumante. Os resultados obtidos pelos pesquisadores indicam que a ação em sequência das enzimas proteolíticas e transglutaminase proporcionam um aumento de potencial do uso combinado das enzimas pela indústria alimentícia.

Os recentes estudos com ficina realçam o seu potencial de aplicação em diferentes setores e afirmam que estudos contínuos da enzima são fundamentais para melhor compreensão e aproveitamento da sua ação proteolítica (AIDER, 2021; LI et al., 2021; MENG et al., 2020; MORELLON-STERLING et al., 2020; SATTARI; RIGI; GHAEDMOHAMMADI, 2020; SIAR et al., 2020).

### **3.3 Imobilização**

A imobilização de enzimas é um mecanismo que visa potencializar os benefícios que as enzimas apresentam em relação a catalisadores não proteicos. Por definição, imobilizar uma enzima é confiná-la fisicamente em uma região delimitada, com a



retenção da sua atividade catalítica, em um suporte/matriz sólida, a qual é diferente daquela em que o substrato ou produto estão presentes, de modo que esta possa ser utilizada de forma repetida e contínua (BRENA; GONZÁLEZ-POMBO; BATISTA-VIERA, 2013; SIRISHA; JAIN; JAIN, 2016).

As técnicas de imobilização das enzimas em suportes insolúveis garantem inúmeras ganhos em comparação com a sua forma solúvel, incluindo a possibilidade de recuperação do biocatalisador no final do processo e seu reuso, possibilidade de desenvolver sistemas multi-enzimas, maior controle do processo catalítico e aumento da estabilidade contra agentes desnaturantes (GIRELLI; ASTOLFI; SCUTO, 2020; GUIÓSÁN, 2013; SHELDON, 2007; SHELDON; VAN PELT, 2013).

São diversas as variáveis envolvidas nos processos de imobilização, sendo a escolha do suporte e dos métodos de ativação fatores fundamentais para otimização da capacidade catalítica da enzima. A Figura 2 sintetiza as estratégias que podem ser utilizadas para promover a imobilização de enzimas.

**Figura 2 - Métodos de imobilização de biomoléculas**



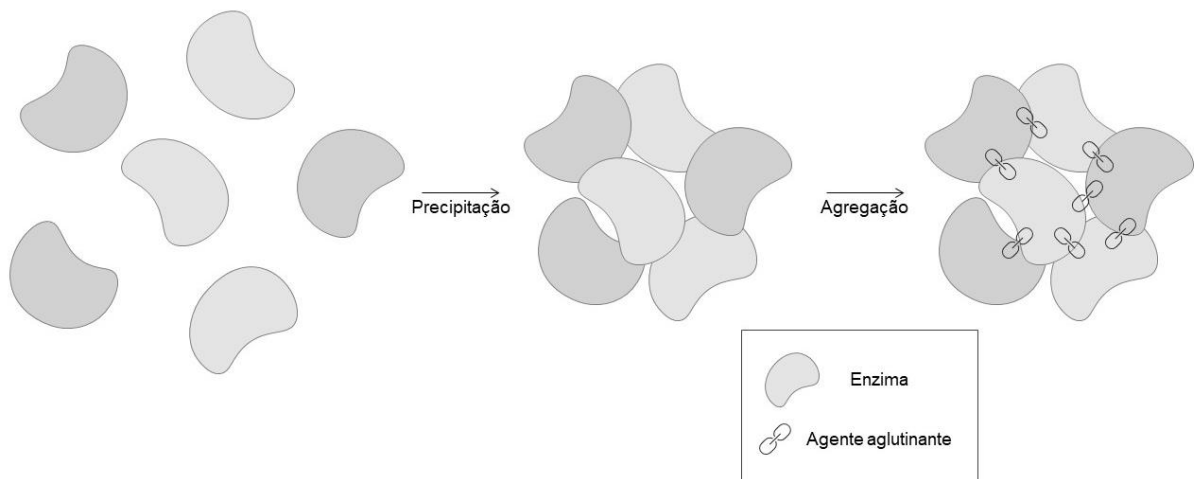
\*CLEAs – Cross-linked enzymes aggregates; \*\*CLECS - Cross-linked enzymes crystals. Adaptado de Cacicedo et al. (2019)

### 3.3.1 Cross-linked Enzyme (CLE)

A imobilização na ausência de suporte é realizada pela formação de ligações intermoleculares, que resultam na redução de sua solubilidade, formando agregados enzimáticos reticulados conhecidos como CLE, para *Cross-Linked Enzyme* (SOUZA *et al.*, 2017). O primeiro registro de formação dessas estruturas data da década de 60, por Quioco e Richards (1964), que ao utilizarem o reagente bifuncional, glutaraldeído, observaram a formação de cristais insolúveis com atividade catalítica quando estudavam sobre síntese de proteínas em fase sólida (SHELDON, 2007; SOUZA *et al.*, 2017; VELASCO-LOZANO *et al.*, 2016).

A formação desses agregados pode ser realizada através de uma mistura de um agente reticulante e soluções enzimáticas, que podem ocorrer em diferentes condições, usando a enzima solubilizada, cristalizada, atomizada ou agregada, resultando em diferentes derivados com distintas denominações (SOUZA *et al.*, 2017). A preparação mais comum de CLEAs segue as etapas ilustradas na Figura 3, a precipitação pode ser realizada com diferentes compostos, incluindo sais, ácidos e solventes, levando em conta a preservação da atividade catalítica da enzima. A formação de agregados normalmente conta com a presença de um reagente bifuncional como o bisdiazobenzidina, diisocianato de hexametileno, e glutaraldeído, este último reage com os grupamentos amino da enzima, formando ligações covalentes (DATTA; CHRISTENA; RAJARAM, 2013; SHELDON; VAN PELT, 2013).

**Figura 3** - Preparação de CLEAs. A primeira etapa consiste em precipitação das enzimas, seguida da agregação causada pela adição de reagentes, como glutaraldeído.



Os melhores aspectos da imobilização de enzimas através da formação de agregados são a simplicidade do preparo, já que dispensa a ativação de suporte, baixo custo de produção, estabilização das estruturas de enzimas multiméricas, entre outras. Entretanto, ainda há alguns aspectos do processo de imobilização que precisam de maior entendimento, para garantir o aumento da flexibilidade da enzima, aperfeiçoando sua estabilidade, seletividade e atividade (VELASCO-LOZANO et al., 2016).

Não foram encontrados relatos de imobilização de ficina por esta metodologia. Porém, a mesma estratégia foi aplicada para outras proteases. Chen et al. (2017) produziram CLEAs que incluíram neutrase e papaína, precipitadas com etanol e com uso do glutaraldeído (1:5 v/v) como agente aglutinante. Os derivados apresentaram maior estabilidade a temperatura e ao pH do que as suas formas livres. CLEAs de proteases produzidas por *Aspergillus* foram otimizadas através da elaboração de um planejamento composto central (80% sulfato de amônio, 65mM glutaraldeído e 0,15mM albumina de soro bovina). Os derivados produzidos apresentaram atividade catalítica em pH mais alcalino e em temperaturas mais altas do que a forma solúvel da enzima; também manteve 66,5% da atividade enzimática inicial após 10 ciclos de uso, de 20 minutos (ASGHER; BASHIR; IQBAL, 2018).

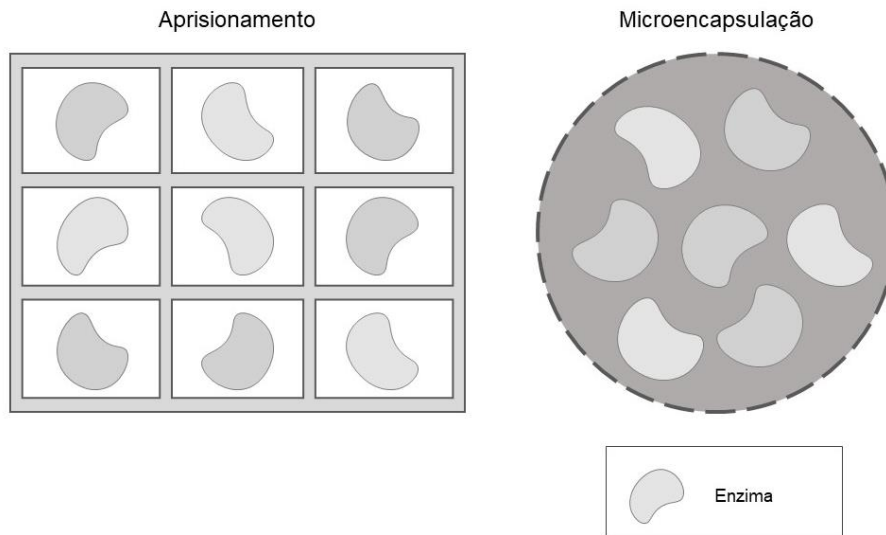
### 3.3.2 *Aprisionamento e Encapsulação*

O uso de suportes insolúveis é outra estratégia para imobilização de enzimas. Os suportes podem ser obtidos de diversas fontes, podendo ser inorgânicos, orgânicos, sintéticos ou naturais (GUISÁN, 2013; SIRISHA; JAIN; JAIN, 2016). A interação entre a enzima e o suporte também pode variar, sendo mais comuns os métodos em que a enzima é encapsulada no interior do suporte ou quando a enzima interage com o suporte por algum tipo de ligação, sendo covalente ou não. Cada estratégia apresenta particularidades que devem ser avaliadas para o melhor aproveitamento da atividade catalítica da enzima e da aplicação a que se destina (SIRISHA; JAIN; JAIN, 2016).

A imobilização através da encapsulação da enzima é um método relativamente simples em relação a outras metodologias. É baseado na restrição da enzima em uma rede polimérica mantendo a passagem de substrato e produtos através do suporte,

sem a liberação do catalisador (GÜR; İDİL; AKSÖZ, 2017). A Figura 4 ilustra a interação entre a enzima e o suporte no caso da imobilização por aprisionamento e microencapsulação.

**Figura 4** – Imobilização por aprisionamento e microencapsulação.



Fonte: Autor, 2021

As etapas envolvidas no processo de imobilização por aprisionamento são duas, homogeneizar a enzima em uma solução de um monômero, para em seguida promover a polimerização desse monômero através de uma reação química ou pela mudança das condições experimentais (NGUYEN; KIM, 2017). Pelo fato de a enzima estar limitada fisicamente pelo suporte e não pela formação de ligações entre ambos, a integridade da estrutura proteica é, geralmente, mais bem preservada, contribuindo, dessa forma, para a maior estabilidade da enzima, principalmente em relação a sua forma solúvel. Outra vantagem da imobilização por aprisionamento é a possibilidade de estabelecer um microambiente com características que favorecem a atividade catalítica. A maior desvantagem da imobilização por aprisionamento está relacionada a problemas de transferência de massa, já que a formação de polímeros no entorno da enzima pode limitar o acesso do substrato ao centro catalítico, assim como, a saída de produtos de catálise para o meio reacional. Além disso, é possível que a enzima migre do suporte caso o diâmetro de poro seja grande, causando redução da atividade enzimática ao longo da operação (BRENA; GONZÁLEZ-POMBO; BATISTA-VIERA, 2013; NGUYEN; KIM, 2017).

O alginato de sódio é um polissacarídeo encontrado naturalmente em algas marinhas que facilmente se aglutina e forma géis na presença de cátions, é um

composto frequentemente utilizado para imobilização de células e proteínas, devido a sua simples aplicação e baixo custo (GÜR; İDİL; AKSÖZ, 2017; HECHT; SREBNIK, 2016). Uma vantagem da imobilização de proteases com alginato de sódio, especialmente sulfridases (proteínas que possuem um grupo tiol em seu centro catalítico) como a ficina, é a remoção de íons metálicos do meio reacional que podem afetar negativamente a atividade da enzima (TACIAS-PASCACIO et al., 2021).

Rojas-Mercado et al. (2018) imobilizaram ficina por encapsulação através da técnica de eletrofiação (*electrospinning*), onde uma solução de polímero (álcool polivinílico-PVA) e a solução contendo a proteína foram ejetados de uma seringa em uma região com alta tensão, formando nanofibras, que, em seguida, foram expostas a vapores de glutaraldeído, para formação de ligações cruzadas entre as moléculas. O derivado obtido apresentou 92% da atividade inicial do extrato, mantendo cerca de 25% de atividade após 5 ciclos de reuso com 1h de duração.

### 3.3.3 Adsorção

A formação de ligações entre o suporte e a enzima é outra estratégia para imobilizar uma proteína. A adsorção de enzimas a um suporte é um método simples e rápido para imobilizar. Com a formação de um conjunto de interações como ligações de hidrogênio, forças de Van der Waals e ligações hidrofóbicas, as enzimas podem ser estabilizadas e adsorvidas a um carreador. Essas ligações enzima-suporte são fracas (reversíveis) e, geralmente, não alteram a estrutura nativa da enzima evitando, assim, interferências no sítio catalítico e conseqüentemente mantendo a atividade das enzimas. Entretanto, as ligações formadas são mais suscetíveis a mudanças provocadas por condições reacionais como, altas temperaturas, alterações no pH e adição de determinados substratos (CACICEDO et al., 2019; JESIONOWSKI; ZDARTA; KRAJEWSKA, 2014; SIRISHA; JAIN; JAIN, 2016).

Inúmeros materiais podem ser utilizados como suportes para imobilização através da adsorção, como materiais orgânicos ou inorgânicos. Carvão ativado, resinas de troca iônica, celulose e caolin, são alguns exemplos de materiais utilizados (LIU; CHEN, 2016; SIRISHA; JAIN; JAIN, 2016). Fadýlođlu (2001) relata a imobilização de ficina em Celite, material derivado de terra diatomácea. O derivado produzido apresentou maior estabilidade à temperatura quando comparado com a forma livre da enzima. Este derivado enzimático foi aplicado na produção de teleme,

queijo tradicional da cultura turca. O emprego da enzima imobilizada resultou em um queijo com melhores características sensoriais e químicas, em comparação ao queijo tradicionalmente produzido com a enzima solúvel.

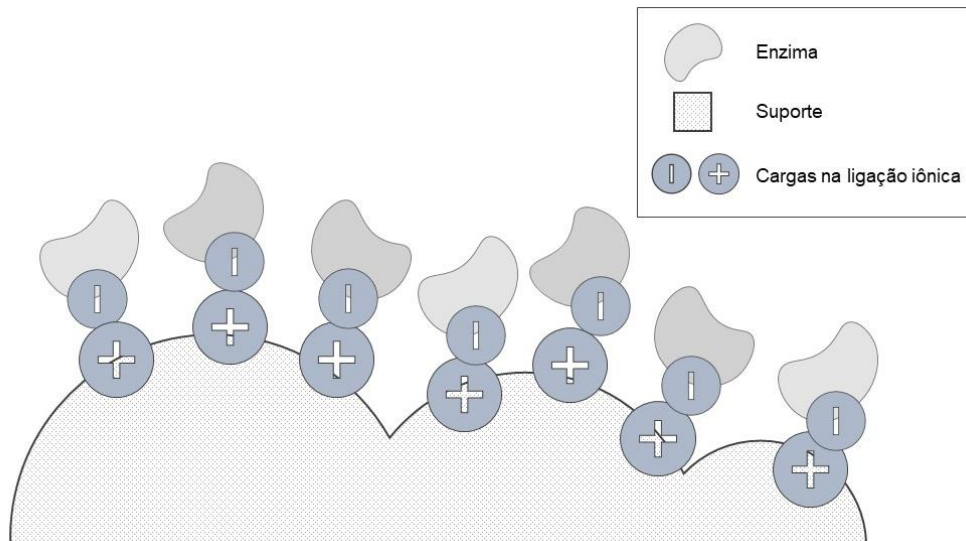
Baidamshina et al. (2020) imobilizaram ficina por adsorção em quitosana, um polímero derivado de quitina extraída de crustáceos (LARANJEIRA; FÁVERE, 2009). A imobilização garantiu 90% de atividade inicial da ficina livre, com um fator de estabilização de 4,9 vezes. A enzima tanto na forma imobilizada como livre, reduziu o tempo necessário para o tratamento tópico com antibióticos, em pele de ratos infectados por *Staphylococcus aureus*.

#### 3.3.4 Imobilização por ligação iônica

A imobilização por ligações iônicas depende, como diz o nome, da interação entre a enzima e suportes insolúveis contendo resíduos de troca iônica. O princípio da metodologia se assemelha ao princípio de interação entre proteínas e ligantes em cromatografia. São interações mais fortes do que a ligação por adsorção, mas não tanto quanto a formação de ligações covalentes. Podem ser afetadas pela força iônica do meio reacional, polaridade e temperatura causando o desligamento da enzima do suporte (SHELDON, 2007; SIRISHA; JAIN; JAIN, 2016).

Esse método é simples e reversível, possibilitando a reutilização do suporte, porém apresenta como desafio conciliar o uso de condições nas quais haja o equilíbrio entre um bom número de interações entre a enzima e o suporte e a manutenção da atividade catalítica. Ainda, é possível, no caso de um suporte altamente carregado, que haja a interação entre substratos e produtos, causando problemas de difusão e entupimento do suporte. Algumas vezes, as ligações formadas permitem a exposição do sítio catalítico, aumentando a atividade da enzima (BRENA; GONZÁLEZ-POMBO; BATISTA-VIERA, 2013; SIRISHA; JAIN; JAIN, 2016). A Figura 5 ilustra a interação entre a enzima e o suporte no caso da imobilização por ligações iônicas.

**Figura 5** - Imobilização por ligação iônica, onde por exemplo um suporte é carregado em sua superfície com cargas positivas interage com as cargas negativas disponíveis na superfície da enzima.



Fonte: Autor, 2021

O preparo de suportes com grupos amino disponíveis em sua superfície é uma estratégia para imobilização de enzimas via interação iônica. Fernandez-Lafuente et al. (1993) relataram um protocolo para formação de grupos amino na superfície de materiais suportes, permitindo a interação iônica entre os grupamentos carboxílicos da enzima e grupos amino do suporte.

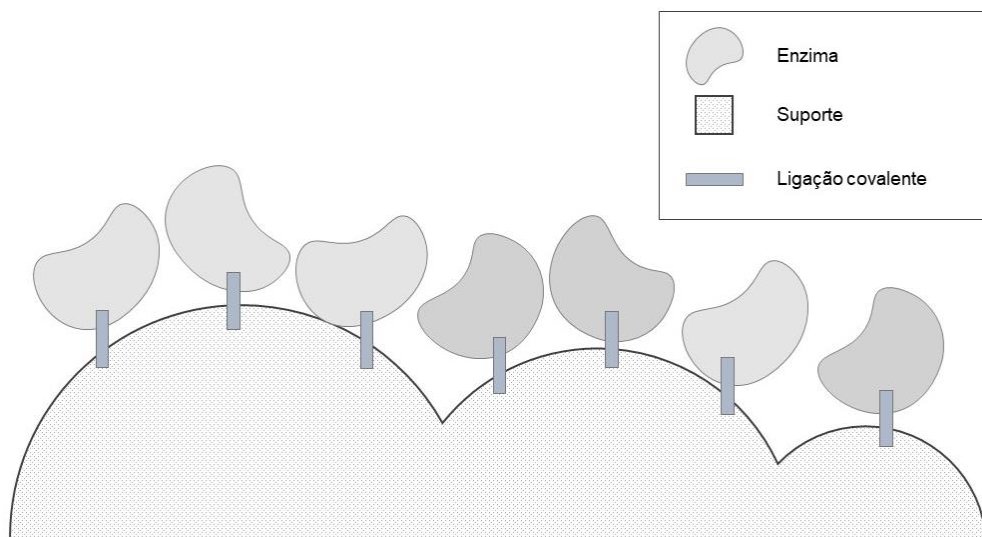
Desde então, diversas enzimas foram imobilizadas utilizando esta metodologia. Brugnari *et al.* (2018) imobilizaram lacase, uma oxidoreductase produzida por *Pleurotus ostreatus*, em agarose-MANAE para degradação de bisfenol A, um contaminante de águas residuais que pode interferir no sistema endócrino, potencialmente afetando o sistema reprodutivo, neurológico e causando efeitos mutagênicos e carcinogênicos. A enzima imobilizada apresentou 90% da capacidade de degradação do contaminante por até 15 ciclos de reuso de 60 minutos.  $\beta$ -galactosidase foi imobilizada em agarose-MANAE em diferentes pH (5, 7 e 9), e os derivados obtidos apresentaram entre 75 e 80% de sua atividade inicial. Os autores também avaliaram a estabilidade da enzima imobilizada após a exposição a diferentes valores de pH e concentração de sais, obtendo resultados de forma ambígua, com a enzima imobilizada apresentando alta estabilidade a pH 5 e 9, mas a pH 7 a enzima livre foi mais estável do que a forma imobilizada. A principal conclusão dos autores com base no estudo realizado é que a

metodologia é mais versátil do que o esperado inicialmente (DE ALBUQUERQUE et al., 2016).

### 3.3.5 Ligação covalente

A imobilização por ligações covalentes é estabelecida pela interação entre as cadeias laterais de certos aminoácidos, como histidina, lisina, cisteína, arginina e ácido aspártico, com grupos funcionais adicionados aos suportes, como grupos carboxílicos, aminos, fenólicos e hidroxílicos. A formação das ligações covalentes garante uma interação estável entre o suporte e a enzima, sendo esta a principal vantagem do método. Entretanto, é fundamental que as ligações envolvidas na imobilização não incluam aminoácidos essenciais na atividade catalítica da enzima. Além disso, outra desvantagem do método é a impossibilidade de restaurar o suporte; caso eventualmente ocorra perda da atividade catalítica da enzima imobilizada não há a possibilidade de se reutilizar o suporte (GUISÁN, 2013; SIRISHA; JAIN; JAIN, 2016). A Figura 6 ilustra a formação de ligações covalentes entre a enzima e o suporte.

**Figura 6** - Imobilização de enzimas por ligação covalente. O suporte modificado pela adição de grupos reativos, como por exemplo aldeídos, interagem com a enzima formando ligações covalentes.



Fonte: Autor, 2021.

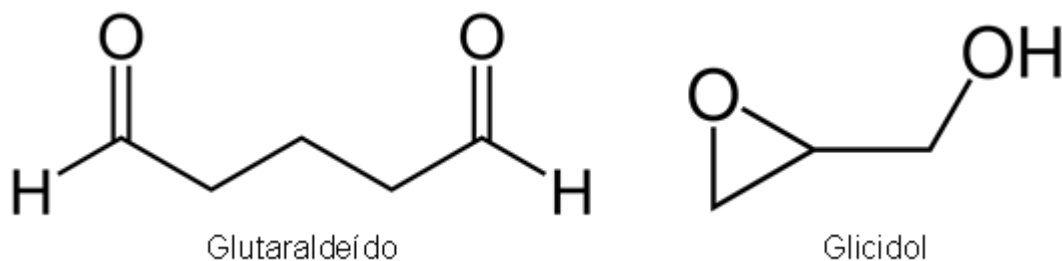
Diferentes estratégias podem ser implementadas para formação de grupos reativos para imobilização, dependendo dos grupos funcionais disponíveis no material. Geralmente, as reações têm como objetivo a formação de grupos eletrofílicos para reagir com grupos nucleofílicos na superfície da proteína (GUISÁN, 2013).



Glutaraldeído (Figura 7) é um reagente com características heterofuncionais frequentemente utilizado para imobilização de enzimas, ainda que seu funcionamento não seja totalmente compreendido. Normalmente, suportes contendo aminas primárias, preexistentes ou adicionadas, são ativados com glutaraldeído permitindo a formação de ligações covalentes entre o suporte e o grupo amino terminal da enzima, quando a imobilização é conduzida em pH na faixa de 7 a 8. Nestas condições a ligação covalente estabelecida forma um braço espaçador longo através de uma ligação pelo grupo amino terminal da enzima. Em condições alcalinas em que grupamentos amino dos resíduos de lisina (pKa 10,7) estão desprotonados, o glutaraldeído não é estável e, portanto, nessas condições não há o favorecimento de formação de ligações covalentes multipontuais entre o suporte e a enzima (RODRIGUES et al., 2021; ZAAK et al., 2017).

Outra tática que pode ser aplicada para imobilizar enzimas com glutaraldeído é a formação de ligações intramoleculares após a interação da enzima com grupamentos aminos do suporte de forma iônica. Neste caso, o glutaraldeído interage simultaneamente com grupos aminos presentes na enzima e no suporte, formando uma rede no entorno da enzima, o que pode, eventualmente, causar uma distorção na estrutura terciária da enzima, mas ao mesmo tempo, a possibilidade de interação multipontual é maior, proporcionando maior estabilidade a proteína (RODRIGUES et al., 2021; TACIAS-PASCACIO et al., 2021; ZAAK et al., 2017).

**Figura 7** – Estruturas química do glutaraldeído e do glicidol



Fonte: Autor, 2021

Com essas estratégias, inúmeras enzimas foram imobilizadas através da interação com glutaraldeído. Incluindo pectina-liases em agarose (DAL MAGRO et al., 2020); neutrase em alginato (ORTEGA et al., 2008); lipases em nanofibras de óxido de grafeno/quitosana/celulose (BADOEI-DALFARD; TAHAMI; KARAMI, 2022); lacase em quitosana (BILAL et al., 2019); tripsina em partículas de álcool polivinílico

magnetizadas (SAHIN; OZMEN, 2020); protease de *Penaeus vannamei* em óxido de grafeno (RANJBARI et al., 2019) e ficina que foi estabilizada em agarose por grupamentos glioxil e em seguida tratada com glutaraldeído para formação de ligações intermoleculares (SIAR et al., 2018b). Neste último, a modificação causou redução na atividade enzimática, mas forneceu um aumento da estabilidade nos pH 5 e 7 devido à rigidificação da estrutura terciária, pela formação de ligações intermoleculares.

O glicidol (Figura 7) é um monômero heterofuncional altamente reativo que possui um grupo epóxi e hidroxila (DIMITROV; TSVETANOV, 2012). A ativação do suporte com o reagente produz grupamentos glioxil, pequenos aldeídos alifáticos, que formam ligações fracas denominadas bases de Schiff, com grupos amino não ionizados. A energia necessária para formação de cada ligação é pequena, com isso há a garantia que a demanda de energia para causar uma distorção na estrutura da proteína seja maior do que para formar as ligações entre a proteína e o suporte. Após o processo de imobilização é necessária uma etapa de redução com borohidreto de sódio, esse transforma as bases de Schiff em ligações amino secundárias estáveis, tornando inerte os grupamentos aldeídos remanescentes no suporte transformando-os em hidroxilas (MATEO et al., 2006).

Em condições alcalinas, os suportes glioxil são capazes de estabelecer a imobilização através da formação de múltiplas ligações covalentes nas regiões da superfície da enzima onde existe alta densidade de lisinas. A imobilização através de múltiplas ligações oferece fatores de estabilização maiores do que métodos anteriormente descritos (RODRIGUES et al., 2021). Mais de 50 referências são apresentadas por Rodrigues et al. (2021) onde se observa o aumento da estabilidade de enzimas após a sua imobilização em suportes ativadas com grupos glioxil, o que evidencia a ampla aplicabilidade e versatilidade desse método.

Bernal et al. (2013a) imobilizaram  $\beta$ -galactosidase por ligações covalentes multipontuais em glioxil Sepharose®, obtendo 82% da atividade inicial da enzima, com um fator de estabilização de 100 vezes em comparação à enzima imobilizada em Sepharose® ativada com brometo de cianogênio, que envolve a formação de uma ligação única entre o suporte e a enzima. Os mesmos autores também avaliaram a imobilização de lipases e  $\beta$ -galactosidase em diferentes suportes com ligações glioxil, agarose e sílica, obtendo derivados muito mais estáveis quando a enzima foi imobilizada em sílica (BERNAL et al., 2013b). Bromelina, papaína, ambas cisteíno-

proteases vegetais também foram imobilizadas em agarose ativada com grupamentos glioxil. Com auxílio do planejamento de experimentos os autores conseguiram produzir derivados mais estáveis que as formas solúveis da enzima (CUTIÑO-AVILA; PRADAS; ABREU, 2014).

Ficina imobilizada em glioxil agarose foi avaliada em relação à sua capacidade de coagular leite. Os autores observaram que o aumento da carga proteica no suporte não resultava em aumento de atividade no derivado produzido. Entretanto, a capacidade coagulante dos derivados foi proporcional ao aumento de proteína oferecida ao suporte (SIAR et al., 2020).

São muitas as estratégias para imobilização de enzimas, cada método possui características distintas de preparo e de possíveis consequências para as enzimas imobilizadas. A escolha entre eles idealmente deve ser feita com base nas singularidades das enzimas, em sua aplicação, nos substratos a serem empregados e, por fim, nos produtos a serem obtidos.

### **3.4 Suportes**

Assim como os métodos de imobilização, a escolha do suporte também é fundamental no processo de imobilização. Os suportes podem ser obtidos de diversas fontes ou sintetizados juntamente ao processo de imobilização. Em geral avalia-se um conjunto de características para facilitar o sucesso do processo de imobilização. Idealmente, um material para ser utilizado como suporte deve apresentar as seguintes características (GUISÁN, 2013; SIRISHA; JAIN; JAIN, 2016; WAHAB et al., 2020):

- a) Ser inerte; principalmente após a imobilização, de forma que não haja interferências na reação a qual será empregada principalmente em relação ao produto formado;
- b) Resistente; incluindo resistência térmica, química e mecânica, permitindo uso da enzima em diferentes condições operacionais;
- c) Ecologicamente favorável; diminuindo o impacto ambiental do processo;
- d) Apresentar hidrofiliabilidade;
- e) Ser de fácil derivatização;
- f) Resistente a ataques microbianos;
- g) Ampla disponibilidade e baixo custo.

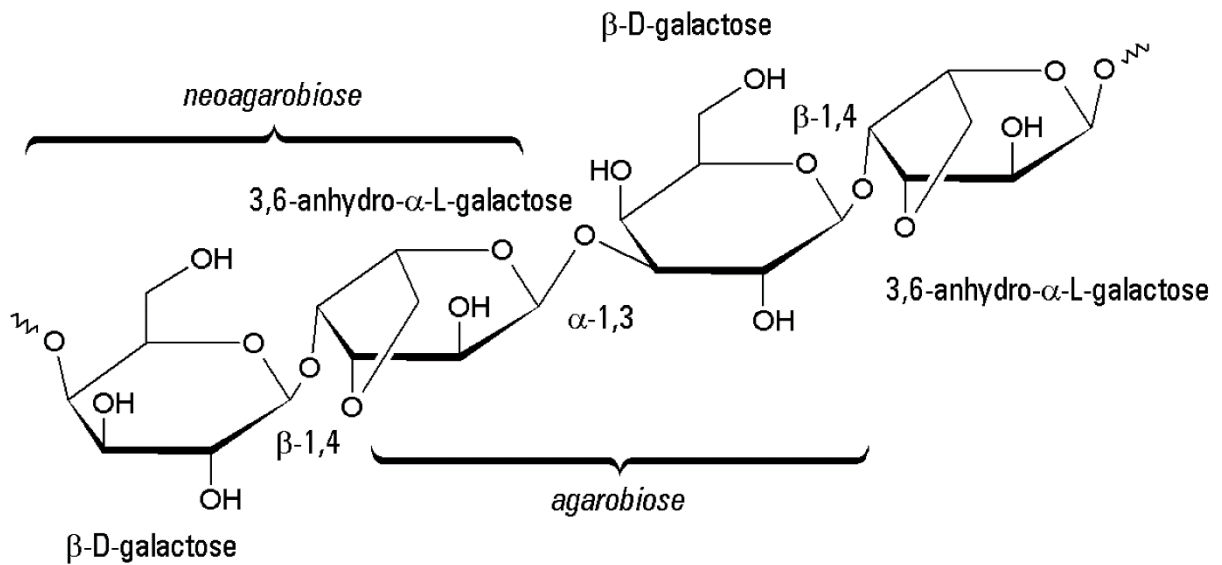
Evidentemente, um material que contempla todas as características citadas é hipotético. Entretanto, alguns materiais são amplamente utilizados por apresentar uma maior fração dos atributos.

Os materiais usados como suportes podem ser categorizados entre orgânicos e inorgânicos de acordo com a composição do material. Alguns exemplos de materiais inorgânicos que podem ser utilizados como suportes são zeólitas, cerâmicas, sílicas, vidro e carbono ativado. Estes materiais podem ser ativados através de modificações químicas para formação de ligações, mas a grande maioria restringe a enzima pela adsorção em poros do material (DATTA; CHRISTENA; RAJARAM, 2013).

Já os materiais orgânicos podem ser polímeros sintéticos e materiais renováveis (biopolímeros). O alginato é um polissacarídeo obtido a partir de parede celular de algas, que permite a imobilização através de reações simples, restringindo a enzima através da técnica de encapsulação. Formado pelos monômeros  $\beta$ -D-manuronila e  $\alpha$ -L-guluronila ligados por ligações glicosídicas. Acredita-se que entre os monômeros, o  $\alpha$ -L-guluronila seja responsável pela formação de hidrogéis quando interage com cátions divalentes como  $\text{Ca}^{+2}$ . É um material de baixo custo, biocompatível, com baixa toxicidade, o que indica a sua relevância como suporte (WAHAB et al., 2020).

A agarose, também um polissacarídeo obtido de algas marinhas, é um material frequentemente utilizado como padrão de imobilização, sendo constituído de repetições de D-galactose e 3,6-anidro-L-galactopirranose, como representado na Figura 8. As hidroxilas livres nos monômeros são obtidas a partir do processo de desesterificação, necessário para a maior parte das aplicações tecnológicas da agarose (ZUCCA; FERNANDEZ-LAFUENTE; SANJUST, 2016).

**Figura 8** – Estrutura química da agarose.



Fonte: ZUCCA; FERNANDEZ-LAFUENTE; SANJUST, 2016.

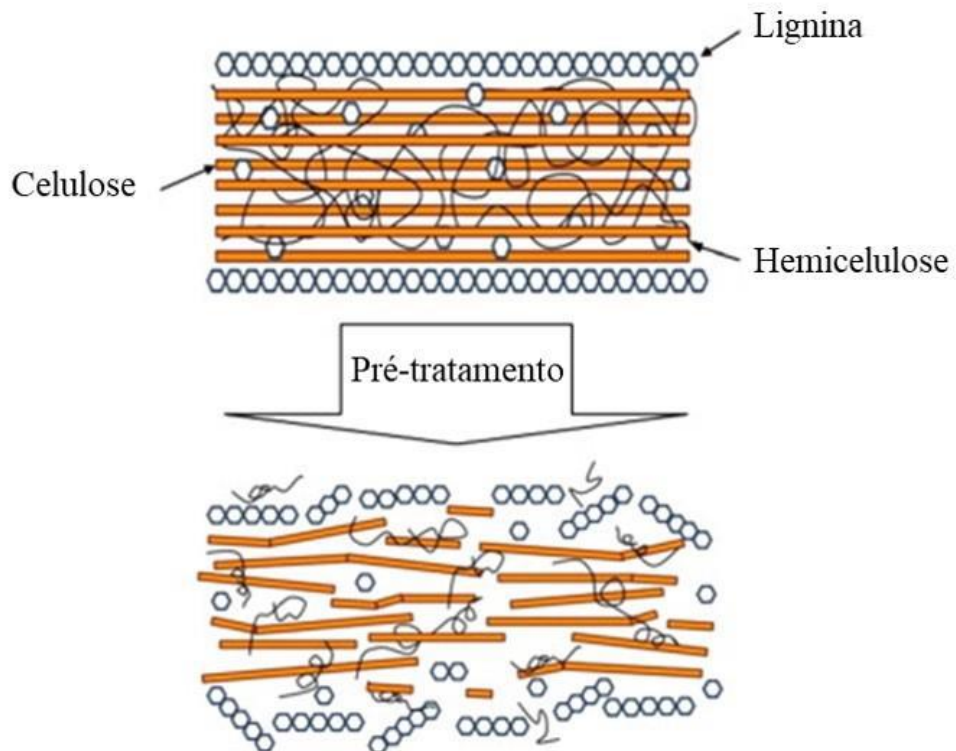
A agarose apresenta dentre as características listadas e que são esperadas de um suporte ideal a alta porosidade, resistência mecânica, química e física, é inerte e altamente hidrofílico. Além destas propriedades, a presença de hidroxilas permite que o material seja modificado quimicamente através de diversos métodos químicos e assim, ser usado como suporte de imobilização para uma vasta gama de enzimas (ZUCCA; FERNANDEZ-LAFUENTE; SANJUST, 2016) A ficina já foi relatada por ser imobilizada em agarose em vários trabalhos (MORELLON-STERLING et al., 2021; SIAR et al., 2019, 2020, 2018a, 2018b, 2017).

Agora, considerando a demanda por novas tecnologias sustentáveis e a possibilidade de expandir a aplicação de enzimas, o uso de materiais alternativos como suporte de imobilização é uma solução. Resíduos agroindustriais vêm sendo explorados cada vez mais com o decorrer dos anos, como fonte energética na produção de combustíveis de segunda geração (DE CORATO et al., 2018), substrato para produção de enzimas (AITA et al., 2019; KHANAHMADI et al., 2018) ou combustíveis avançados (PELLERA; GIDARAKOS, 2018; SARAVANAN et al., 2021). Além dessas vertentes, materiais lignocelulósicos vem sendo explorados como matérias para suporte de imobilização de enzimas (GIRELLI; ASTOLFI; SCUTO, 2020). Fibra de coco, casca de arroz, casca de soja, casca de milho são exemplos de materiais alternativos que foram utilizados para imobilização de enzimas (CORICI et

al., 2016; GIRELLI; ASTOLFI; SCUTO, 2020; NURALIYAH; WIJANARKO; HERMANSYAH, 2018; SAMANTA et al., 2009).

Sabugo de milho representa cerca de 18% da produção de milho (SILVA, 2018), que no Brasil foi estimada para 2020/21 em 81,9 milhões de toneladas (FORBES, 2021). Atualmente, o sabugo é destinado para a produção de ração animal e para produção de fertilizantes orgânicos. Possui uma composição média em massa de 31,7% de celulose, 34,7% de hemicelulose, 20,3% de lignina e 2,3% de cinzas (AGUIAR, 2010). As fibras lignocelulósicas já possuem hidroxilas reativas presentes na sua superfície, entretanto com tratamentos químicos e térmicos, pode-se aumentar a área superficial interna devido a solubilização ou degradação parcial da hemicelulose e da lignina, abrindo a estrutura da celulose como ilustrado na Figura 9 (MOOD et al., 2013).

**Figura 9** - Pré tratamento de materiais lignocelulósicos.



Fonte: MOOD et al., 2013.

Com o pré-tratamento o pó sabugo de milho sofre modificações químicas que garantem ao material características e propriedades desejadas para utilização como material suporte em imobilização, como alta porosidade, área de superfície específica, e disponibilidade de grupos reativos (BASSAN et al., 2016). O conjunto de atributos e qualidades obtidos pelo pré-tratamento do material associada a alta disponibilidade,

faz com que o pó de sabugo de milho seja uma opção viável e vantajosa para ser utilizada como suporte alternativo para imobilização de enzimas.

### 3.5 Fontes proteicas

#### 3.5.1 Grão de bico

Grão de bico (*Cicer arietinum*) é uma das leguminosas mais consumidas no mundo. Com produção concentrada na Índia, cerca de 9,9 milhões de toneladas foram produzidas em 2019 (FAO, 2021). No Brasil a produção é baixa, sendo necessário importar anualmente 8 mil toneladas da Argentina e México (DUTRA, 2021). Com o aumento de pessoas vegetarianas, veganas e redução do consumo de carne em geral a procura por proteínas alternativas vem crescendo e com isso há uma expectativa de que o aumento do consumo de grão de bico também ocorra.

Contendo entre 17-22% de proteína (GHRIBI et al., 2015a), distribuídas principalmente entre albuminas, globulinas, prolaminas e proteínas solúveis em sal. É relatado que as proteínas de grão de bico apresentam altos valores de biodisponibilidade, contendo 8 aminoácidos essenciais dos 18 presentes, menor alergenicidade comparada à soja (BOUKID, 2021; ZIA-UL-HAQ et al., 2007).

Diversas atividades biológicas já são associadas a hidrolisados produzidos de grão de bico, incluindo atividade antioxidante, antifúngica, antigênica, quelante de metais e inibição de enzima conversora da angiotensina I (ECA), (GHRIBI et al., 2015a, 2015b; YUST et al., 2003).

Peptídeos produzidos pela hidrólise com pepsina e pancreatina apresentaram atividade quelante de cobre associada à presença de histidina na sequência obtida (TORRES-FUENTES; ALAIZ; VIOQUE, 2011). A identificação de uma nova sequência peptídica (NF2-4-1) com atividade antioxidante foi obtida a partir da purificação de hidrolisados produzidos por neutrase. Os resultados mostram um potencial no desenvolvimento de alimentos nutracêuticos (WALI et al., 2021). Hidrolisados de grão de bico produzidos por pepsina e pancreatina apresentaram capacidade de inibir o crescimento de células Caco-2 até 45%, indicando condições de inibir crescimento de tumores em células do cólon (GIRÓN-CALLE; ALAIZ; VIOQUE, 2010).

Real Hernandez e Gonzalez de Mejia, (2019) avaliaram teoricamente a capacidade da ficina em produzir peptídeos bioativos a partir da hidrólise de grão de

bico. Pela especificidade da enzima em favorecer a hidrólise em aminoácidos hidrofóbicos e arginina os autores determinaram três sequências de peptídeos teóricas que apresentam atividade biológica, FL, KLSAEFGS e FLKLSAEFGS. As sequências potencialmente apresentam diversas bioatividades incluindo atividade antioxidante; promover a inibição de ECA; inibir dipeptidil peptidase IV (DPP IV), relacionado ao tratamento de diabetes mellitus. Os autores também relatam não haver estudos avaliando experimentalmente o uso da ficina na hidrólise de proteínas de grão de bico.

Além de produção de peptídeos com bioatividade, a hidrólise de proteínas pode ser uma estratégia para produção de aditivos proteicos que permitem a melhora das propriedades funcionais na formulação de alimentos. Aumento de solubilidade, capacidade de absorção de óleo, capacidade de formação de espuma e capacidade de emulsificação são algumas das propriedades que podem ser modificadas pela hidrólise de proteínas (GHRIBI et al., 2015a; YUST et al., 2010). Proteínas de grão de bico hidrolisadas com alcalase imobilizada em agarose-glioxil apresentaram melhora na solubilidade quando comparada a suas formas nativas (YUST et al., 2010).

Os estudos realizados com proteínas de grão de bico indicam um que a leguminosa é uma fonte de potenciais peptídeos bioativos que podem ser aplicados no desenvolvimento de alimentos funcionais, e que a seleção apropriada da enzima envolvida no processo pode garantir uma produção estável (BOUKID, 2021).

### 3.5.2 *Ora-pro-nóbis*

A espécie *Pereskia aculeata* Miller, conhecida popularmente no Brasil como ora-pro-nóbis pertence à família Cactaceae e é considerada uma PANC, planta comestível não-convencional (GARCIA et al., 2019).

Suas folhas verdes são relatadas serem consumidas por populações em áreas subdesenvolvidas (DAYRELL; VIEIRA, 1977; TAKEITI et al., 2009), mas atualmente, pelo aumento dos estudos e pela divulgação através de diversos canais de comunicações a ora-pro-nóbis começa a ser mais reconhecida (NESTLÉ, 2019; VASCONCELLOS, 2020).

As folhas de ora-pro-nóbis possuem alta concentração proteica (26% m/m) superando fontes vegetais de proteínas tradicionais como feijão, couve e milho (GARCIA et al., 2019; SOUZA et al., 2016). A composição de proteínas apresenta



aminoácidos essenciais e não-essenciais, com destaque na alta concentração de lisina encontrada normalmente em proteínas animais (MARTIN et al., 2017).

Garcia et al. (2019) determinaram o perfil fitoquímico de ora-pro-nóbis, identificando dez compostos fenólicos, dois ácidos e oito flavonoides, que apresentaram maior atividade antioxidante do que o padrão Trolox, composto utilizado em metodologias para determinação de atividade antioxidante. Os autores também detectaram nos extratos da folha em atividade antimicrobiana, contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.

Silva et al. (2017) avaliaram a citotoxicidade de extratos etanólicos de ora-pro-nóbis em sementes de alface, e toxicidade aguda em ratos pela administração dos extratos etanólicos secos. Os efeitos detectados em ambas avaliações foram negligenciáveis e juntamente a outras pesquisas validam o potencial da planta ser utilizada como alimento funcional e como uma fonte sustentável de nutraceuticos.

### 3.5.3 Clara de ovo

Clara de ovo representa cerca de 60% de um ovo, sendo o restante dividido entre a casca (9-12%) e a gema (30-33%). Da clara, 11% corresponde a proteínas, consistindo principalmente de ovoalbumina (54%), ovotransferrina, ovomucóide, lisozima e ovomucina (ABEYRATHNE; LEE; AHN, 2013; STRIXNER; KULOZIK, 2011).

Cada uma das proteínas apresenta propriedades funcionais distintas. Ovoalbumina, 44,5 kDa, com 386 aminoácidos, possui ponto isoelétrico em 4,5. Como uma proteína globular, a ovoalbumina pode ser modificada através de diferentes métodos incluindo aquecimento, alta pressão, hidrólise enzimática e agitação (ABD EL-SALAM; EL-SHIBINY, 2016; ABEYRATHNE; LEE; AHN, 2013). Em condições de desnaturação podem ocorrer interações entre regiões hidrofóbicas e formação de pontes dissulfeto levando à agregação da ovoalbumina. (ABD EL-SALAM; EL-SHIBINY, 2016).

A maior parte das proteínas do ovo é bioativa (LIAO et al., 2018). Entretanto, a hidrólise enzimática é a estratégia mais utilizada para produção de peptídeos bioativos a partir de proteínas de ovos. Liao et al. (2018) relataram diversos trabalhos que realizaram a hidrólise de proteínas de ovo com enzimas gastrointestinais, como tripsina e pepsina, para produção de peptídeos bioativos, como inibidores de ECA.

Entretanto essas enzimas apresentam dificuldade em hidrolisar outras proteínas do ovo, como ovotransferina, ovomucina e ovoalbumina. Pela capacidade de atuar de maneira mais ampla na quebra de ligações peptídicas, enzimas de origem vegetal ou microbiana, podem ser melhor aplicadas na produção de peptídeos bioativos derivados de ovos.

Já é relatada atividade biológica em ovoalbumina, incluindo anticancerígena, anti-hipertensivo, antimicrobiana, antioxidante e como imunomodulador (SHARIF; SALEEM; JAVED, 2018). A disponibilidade comercial de produtos como clara de ovo em pó e o histórico de referências que confirmam a atividade biológica em proteínas do ovo, corroboram o emprego da ficina para hidrólise das proteínas da clara de ovo para produção de peptídeos bioativos.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Obtenção e preparo do extrato enzimático com atividade de ficina

O extrato enzimático com atividade de ficina foi obtido através de coleta manual, na cidade de Araraquara, SP, Brasil. O látex foi coletado a partir da recuperação das gotas de látex liberadas no pedúnculo da figueira após a colheita do figo imaturo. O extrato resultante foi centrifugado a 3200 g por 15 min a 4°C. A fração insolúvel foi descartada e a fração solúvel foi utilizada como extrato enzimático com atividade de ficina.

### 4.2 Atividade enzimática

A atividade enzimática da ficina foi avaliada usando dois substratos, caseína e BAPNA (*N $\alpha$ -Benzoyl-L-arginine 4-nitroanilide hydrochloride*). Para o ensaio enzimático utilizando a caseína foi realizada a adição de uma alíquota (10-50 $\mu$ L) do extrato enzimático a 1 mL de solução de substrato (caseína 1% m/v; pH 9; tampão bicarbonato 100 mmol L<sup>-1</sup>; cisteína 5 mmol L<sup>-1</sup> e EDTA 5 mmol L<sup>-1</sup>). A mistura foi incubada por 20 min a 55°C. Em seguida a reação foi interrompida com adição de 1 mL de ácido tricloroacético (TCA) 10% para então ser deixada em repouso por 10 min à temperatura ambiente seguido de centrifugação a 8161 g por 30 min. O sobrenadante foi analisado em espectrofotômetro (Ultrospec 3100-pro, Amersham Biosciences) a 280 nm. Uma unidade enzimática foi definida como a quantidade de enzima que promove o aumento de 0,001 min<sup>-1</sup> de absorbância dentro das condições do ensaio (SIAR *et al.*, 2017). Para o substrato sintético foi utilizada uma solução 0,1 mmol L<sup>-1</sup> de BAPNA solubilizado em 1mL de dimetilsulfóxido e diluído para 100 mL em tampão fosfato de sódio 0,1 mol L<sup>-1</sup>, pH 7, contendo 5 mmol L<sup>-1</sup> de EDTA. A formação de produto foi medida pela leitura da absorbância em espectrofotômetro a 405 nm. Para esse substrato a unidade enzimática foi definida como a quantidade de p-nitroanilina formada por 1 mg de proteína por minuto (SIAR *et al.*, 2017).

### 4.3 Determinação de concentração proteica

A concentração de proteínas totais foi determinada pelo método de Bradford utilizando soroalbumina bovina como padrão (BRADFORD, 1976). Para efeito de cálculo foi construída uma curva analítica, de 0-17,5  $\mu$ g/mL,  $y = 0,026x + 0,0748$ ,  $r^2 = 0,9959$ .

#### **4.4 Eletroforese**

Para análise do perfil proteico do extrato enzimático com atividade de ficina foi realizada eletroforese desnaturante com gel de poliacrilamida a 10%, (15 mA, 3 h) de acordo com Laemmli (1970). Para o método foram aplicados padrões de massa molecular do kit GE Lifesciences®, composto por fosforilase B (97 kDa), BSA (66 kDa), ovoalbumina (45 kDa), anidrase carbônica (30 kDa), inibidor de tripsina (20,1 kDa) e  $\alpha$ -lactoalbumina (14,4 kDa).

#### **4.5 Concentração das proteínas presentes no látex**

Foram avaliados três diferentes métodos de concentração do extrato enzimático. O primeiro foi a precipitação com acetona a frio (2h a  $-10^{\circ}\text{C}$ ) na proporção 1:3 (v/v) extrato:acetona, seguida de centrifugação (20 min, 7552 g a  $4^{\circ}\text{C}$ ), sendo o precipitado suspenso em água ultrapura, em um volume 10 vezes menor que o volume inicial. O segundo método foi a precipitação com sulfato de amônio, que foi realizada pela adição do sal até 60% (m/v) sob agitação suave em uma alíquota de ficina. Em seguida a mistura foi mantida em repouso por 1h antes de ser centrifugada (20 min, 7552 g a  $4^{\circ}\text{C}$ ). O precipitado foi ressuspenso em água ultrapura e dialisado por 8h a  $4^{\circ}\text{C}$ . Foram dosadas atividade enzimática e concentração proteica em ambas as frações. Por fim, o terceiro método avaliado foi a liofilização do extrato enzimático em liofilizador (ModulyoD, Thermo).

#### **4.6 Caracterização cinética da enzima livre e dos derivados enzimáticos**

##### *4.6.1 pH*

Para determinação do pH de melhor atividade foram dosadas atividades enzimáticas 4.2) do extrato em sistemas tamponantes com diferentes valores de pH utilizando o tampão McIlvaine para pH de 5 a 8 e tampão carbonato-bicarbonato para pH 9 e 10.

##### *4.6.2 Temperatura*

Foram dosadas atividades enzimáticas 4.2) do extrato em condições de pH de máxima atividade estabelecida de acordo com o item 4.6.1, com temperaturas variando entre 25 e  $75^{\circ}\text{C}$ .

#### 4.6.3 Estabilidade térmica e ao pH da enzima livre e derivados enzimáticos

Foi avaliada a manutenção da atividade enzimática (estabilidade) do extrato de ficina e dos derivados enzimáticos, quando expostos a diferentes condições de temperatura (45, 55 e 65°C) por diferentes períodos (1, 2, 4, 8, 12, 24 e 48h).

A mesma avaliação foi realizada com variação do pH do meio em que a enzima esteve incubada (pH 5, 7, e 9). O extrato e os derivados foram mantidos a 4°C e amostras de biocatalisador foram retiradas ao longo do período de incubação, nos intervalos descritos acima, para dosagem de atividade enzimática como descrito no item 4.2.

#### 4.7 Tratamento do pó de sabugo de milho

O pó de sabugo de milho (SM), fornecido por SAGRAN, Indústria e Comércio de Ingredientes Para Rações Ltda, (Salto Grande, SP, Brasil), foi autoclavado (120°C/20 min) em solução de etanol 70% (1:10 m/v) e filtrado a vácuo. Em seguida foi hidrolisado com solução de hidróxido de sódio 2 mol L<sup>-1</sup> (1:40 m/v) por 24h à temperatura ambiente. O SM tratado foi filtrado e lavado com água em abundância até a neutralização do pH da solução de filtração. O pó de sabugo tratado foi mantido em solução de etanol (20%) até sua ativação (BASSAN *et al.*, 2016).

#### 4.8 Ativação dos suportes

Os suportes de imobilização foram agarose 6BCL e pó de sabugo de milho tratado.

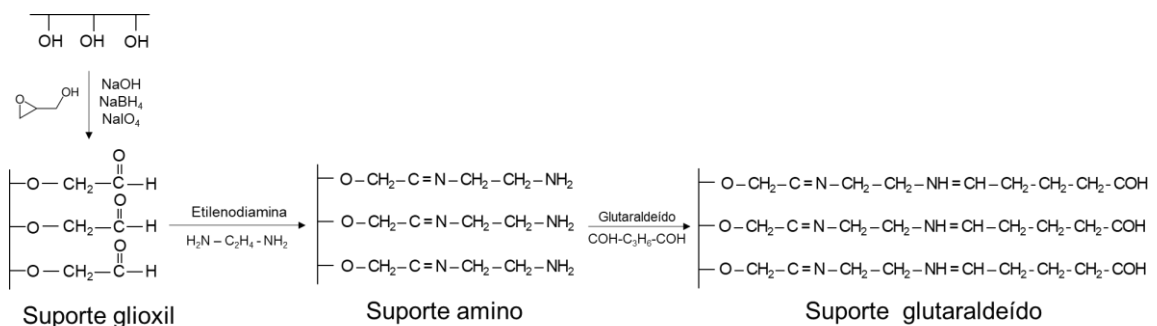
**SM-Glioxil/Aga-Glioxil:** Para cada 20 g de suporte, em constante agitação e submetido a banho de gelo, foram adicionados 6 mL de água deionizada, 9,52 mL de NaOH (1,7 mol L<sup>-1</sup>), 0,2714 g de borohidreto de sódio, e 6,86 mL de glicidol (2,3-epóxi-1-propanol). A mistura foi mantida sob agitação suave e banho de gelo nas primeiras 2 h e após a temperatura ambiente por 18 h, também sob agitação. Depois desse período, os suportes foram filtrados a vácuo e lavados, para em seguida serem oxidados com a adição de periodato de sódio 0,1 mol L<sup>-1</sup>, sob agitação suave por 90 min. Finalmente, os suportes foram novamente filtrados a vácuo e lavados com água deionizada em abundância. Os suportes glioxil foram devidamente armazenados em refrigeração até o momento de se proceder a imobilização da ficina (GUISÁN *et al.*, 1997).

**SM-Amino/Aga-Amino:** Para cada 35 g de suporte SM-Glioxil e Aga-Glioxil foram adicionados 200 mL de solução de etilenodiamina (EDA),  $2 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 10, e as suspensões foram mantidas sob agitação por 2 h. Em seguida foram adicionados 2 g de borohidreto de sódio e agitação por mais 2 h, para em seguida serem filtrados a vácuo e lavados com água deionizada (FERNANDEZ-LAFUENTE *et al.*, 1993).

**SM-Gluta/Aga-Gluta:** Para cada 10 g de suporte SM-Amino e Aga-Amino foram adicionados 11,1 mL de tampão fosfato ( $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7) e 16,75 mL de solução de glutaraldeído 25 %. A mistura foi mantida sob agitação por 14 h à temperatura ambiente. Em seguida, os suportes foram filtrados a vácuo e lavados com tampão fosfato pH 7,  $25 \text{ mmol L}^{-1}$  em abundância. Os suportes ativados com glutaraldeído foram usados para imobilização da ficina no mesmo dia do seu preparo (GUISÁN, 2013).

A Figura 10 ilustra os grupos adicionados às hidroxilas após cada etapa de ativação química nos suportes utilizados.

**Figura 10** - Sequência de reações para obtenção dos suportes glioxil, amino e glutaraldeído



Fonte: Autor, 2021.

#### 4.9 Imobilização do extrato com atividade de ficina.

A imobilização da ficina nos suportes SM-Glioxil e Aga-glioxil foi realizada pelo contato dos suportes com uma solução enzimática ( $1 \text{ mg mL}^{-1}$ ) preparada em tampão bicarbonato de sódio  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 10,0, em uma proporção de 1:10 (m/v) de suporte e solução enzimática. Após a imobilização, aos derivados (enzima ligada ao suporte) foram acrescentados borohidreto de sódio ( $1 \text{ mg mL}^{-1}$  de suspensão) e mantidos em agitação suave por 30 min para redução dos grupos glioxil remanescentes (GUISÁN *et al.*, 1997).

No caso dos suportes SM-Amino e Aga-Amino a imobilização foi realizada nas mesmas condições descritas anteriormente, mas com a enzima diluída em tampão

fosfato de sódio 50 mmol L<sup>-1</sup>, pH 7. Quanto aos suportes SM-Gluta e Aga-Gluta, para obtenção da solução de imobilização, a enzima foi diluída em tampão fosfato de sódio 0,1 mol L<sup>-1</sup>, pH 7.

Em todas as imobilizações uma alíquota de 1 mL da solução enzimática diluída nos respectivos tampões de cada imobilização, foi usada para monitoramento da atividade enzimática (controle) para comparação da atividade enzimática presente no sobrenadante da suspensão de imobilização, ou seja, o processo de imobilização foi acompanhado em intervalos de tempos determinados.

Todas as imobilizações foram realizadas em temperatura ambiente, e os derivados, após seus preparos, foram lavados, filtrados a vácuo e estocados sob refrigeração.

#### 4.10 Avaliação da imobilização

Para avaliar o processo de imobilização foram considerados os seguintes parâmetros: rendimento de imobilização, atividade recuperada e eficiência de imobilização, calculados de acordo com as equações 1, 2 e 3:

$$\text{Rendimento de imobilização (\%)} = \frac{X - \beta}{X} \times 100 \quad (1)$$

$$\text{Atividade Recuperada (\%)} = \frac{Y}{X} \times 100 \quad (2)$$

$$\text{Eficiência de imobilização (\%)} = \frac{Y}{X - \beta} \times 100 \quad (3)$$

Onde:

X: Unidades enzimáticas da enzima livre no controle dosada no tempo final de imobilização ( $U_{\text{total}}$ )

Y: Unidades enzimáticas do derivado após a imobilização ( $U_{\text{total}}$ )

$\beta$ : Unidades enzimáticas do sobrenadante ao final da imobilização ( $U_{\text{total}}$ )

#### 4.11 Reuso

Os derivados obtidos foram utilizados em ciclos sucessivos de catálise tendo caseína como substrato. Uma amostra (SM-Glioxil-F, 22mg; SM-Gluta-F, 15mg; SM-Amino-F, 25mg; Aga-Glioxil-F, 20mg; Aga-Gluta-F, 20mg; Aga-Amino-F, 25mg) de cada um dos derivados foi usada para hidrolisar 1 mL de caseína (1%), por 20 min, a 55°C. Após o tempo decorrido, a suspensão foi filtrada para separação do derivado

do produto de hidrólise. Ao produto de hidrólise foi adicionado 1 mL de TCA (10%) e mantido em repouso por 1h, à temperatura ambiente. Após esse tempo o produto de hidrólise foi centrifugado (8161 g por 30 min), a absorbância do sobrenadante foi mensurada em espectrofotômetro a 280 nm. O derivado retido na filtração foi lavado com água ultrapura, e o procedimento de hidrólise foi repetido

#### **4.12 Preparo dos substratos proteicos**

Para preparo do extrato de grão de bico, os grãos (Siamar, Rocha e Rocha Alimentos Ltda) foram deixados imersos em tampão carbonato-bicarbonato (pH 9,0; 0,1M) por 14h à temperatura ambiente na proporção 1:10 (m/v). Em seguida, os grãos foram triturados por 1 min com auxílio de liquidificador, (Philips Walita, 500W). A mistura foi filtrada em gaze para remoção das partículas maiores e o filtrado resultante foi centrifugado por 20 min, 7552 g a 4°C).

O extrato de folhas de ora-pró-nobis foi preparado através da liquidificação das folhas em tampão carbonato-bicarbonato (pH 9,0; 0,1 mol L<sup>-1</sup>) na proporção 1:5 (m/v). O extrato obtido foi centrifugado (20 min, 7552 g a 4°C).

Clara de ovo desidratada (Dim Alimentos Eireli – Epp) foi dissolvida em tampão carbonato-bicarbonato (pH 9,0; 0,1 mol L<sup>-1</sup>).

Todos substratos proteicos foram preparados no máximo 24h antes da hidrólise e estocados a 4°C.

Foram dosadas concentrações de proteínas de todos os extratos, de acordo com o item 4.3.

#### **4.13 Hidrólise em reator mistura operada em batelada**

Para as hidrólises os extratos proteicos (substratos) foram padronizados pela diluição necessária até atingir a concentração de 1 mg mL<sup>-1</sup> de proteína, com tampão carbonato-bicarbonato, pH 9, 0,1M. Para cada 10 mL de substrato proteico submetido à hidrólise, foi adicionada ficina nas seguintes proporções e condições: 0,4 mL de extrato da enzima livre; ou 0,51 g de SM-Gluta-F ou 1 g de SM-Glioxil-F, separadamente. Essas diferenças entre volume enzima livre e massas de derivado foram para oferecer as mesmas unidades enzimáticas para cada ensaio de hidrólise. Dessa forma foram utilizados 1,84U ao total para cada hidrólise. Os ensaios foram realizados a 45°C com agitação constante (120 rpm). Foram retiradas alíquotas das amostras durante intervalos definidos de tempo, as quais foram submetidas à fervura



por 2 min para inativação da ficina e para padronização nas hidrólises realizadas com derivado.

#### 4.14 Caracterização dos hidrolisados

##### 4.14.1 Atividade antioxidante pelo método do radical ABTS (2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin) 6-ácido sulfônico)

A determinação da atividade antioxidante foi realizada através do método do radical ABTS que está baseado na captura do cátion radical ABTS<sup>•+</sup> (ácido [2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico)]) por antioxidantes, produzindo descoloração da cor verde-escura para verde-clara proporcional à concentração de espécies antioxidantes, acompanhada do decréscimo da absorvância (RUFINO et al., 2007)).

Para o ensaio foi preparada uma solução de ABTS (7mM) 16h antes do seu uso, com a adição de 88 µL de solução de persulfato de potássio (140 mM). A solução oxidada de ABTS foi diluída com etanol até a obtenção de absorvância próxima a 0,7 (λ=734 nm). A reação foi realizada com a adição de 15 µL de amostra e 1,5 mL de solução de ABTS, por 6 min. A atividade antioxidante foi calculada a partir da redução do radical ABTS<sup>•+</sup> e expressa em Equivalentes de Trolox (µM) por mg ou mL de amostra de hidrolisados. Para efeito de cálculo foi construída uma curva analítica utilizando como padrão antioxidante o Ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametil-cromano-2-carboxílico (Trolox) com concentrações de 0 a 2000µM, de acordo com a Equação 4.

$$Y = -ax + b \quad (4)$$

Onde:

Y: absorvância da amostra;

A: coeficiente angular da curva analítica de trolox;

B: coeficiente linear da curva analítica de trolox.

##### 4.14.2 Atividade quelante de íons de ferro

A determinação da atividade quelante de ferro foi realizada de acordo com Kim et al. (2007) com adaptações. A análise foi realizada pela adição de 200 µL de amostra dos hidrolisados proteicos apropriadamente diluídos a 800 µL de água ultrapura e 20

$\mu\text{L}$  de  $\text{FeCl}_2$  (2 mM em água). Após 10 min de incubação, houve a adição de 40  $\mu\text{L}$  de FerroZine (5 mM em água). A absorbância foi medida a 562 nm. A atividade quelante foi calculada com base na absorbância dos controles (200  $\mu\text{L}$  de água ultrapura), sem atividade quelante, de acordo com a Equação 5. O branco utilizado apresentava 200  $\mu\text{L}$  de solução de EDTA 2% no lugar da amostra.

$$QF (\%) = \frac{A_0 - A_1}{A_0} \times 100 \quad (5)$$

Onde:  $A_0$ : absorbância do controle;  $A_1$ : absorbância da amostra.

#### 4.15 Hidrólise em reator de leito fixo operando em modo contínuo

Para hidrólise em reator de leito empacotado foi utilizado um reator encamisado (diâmetro de 2 cm; altura do leito 6,2 cm) no qual o extrato de grão de bico (1 mg mL<sup>-1</sup>) foi bombeado através de uma bomba peristáltica a uma vazão de 0,257 mL min<sup>-1</sup>. Acoplado ao reator, um banho termostático manteve a reação a 45°C, que foi mantida em operação por 10h. Foram coletadas alíquotas em intervalos de tempo regulares. Foram usados 7 g do derivado SM-Glioxil-F (1,32 U g<sup>-1</sup>), com 82,06% umidade e 0,1670 g cm<sup>-3</sup> de densidade cristalina, determinados experimentalmente de acordo com os itens 4.15.1 e 4.15.2, respectivamente. O substrato, grão de bico, foi produzido de acordo com o item 4.12, com concentração ajustada para 1 mg mL<sup>-1</sup>.

##### 4.15.1 Determinação de umidade do suporte pó de sabugo de milho

A determinação de umidade foi feita por método gravimétrico, onde amostras (0,5 g) de pó de sabugo de milho ativadas com grupos glioxil foram pesadas e submetidas à secagem à 105°C em estufa (Fanem, 315 SE) até peso constante. A umidade foi determinada pela Equação 6.

$$U (\%) = \left(1 - \frac{m_{\text{sistema}} - m_{\text{vidraria}}}{m_{\text{SMi}}}\right) \times 100 \quad (6)$$

Onde:  $m_{\text{sistema}}$ : massa da amostra e vidraria após secagem (g);  $m_{\text{vidraria}}$ : massa vidraria (g);  $m_{\text{SMi}}$ : massa inicial da amostra de SM-Glioxil (g).

#### 4.15.2 Determinação da densidade cristalina do suporte pó de sabugo milho

A determinação da densidade cristalina foi realizada por gravimetria. A um balão volumétrico de 1 mL, previamente pesado, foi adicionado água pura até cerca de metade do balão e uma amostra de massa conhecida de pó de sabugo de milho. O ar disponível no balão foi removido com bomba a vácuo. Em seguida água foi adicionada até ajuste do menisco. Foi considerada a densidade da água de acordo com a temperatura da água durante a realização do experimento e a umidade determinada de acordo com o item 4.15.1.

O cálculo de densidade foi realizado de acordo com a Equação 7.

$$d_{sm} = \frac{m_{sm} - m_{sm}U}{vol_{sm}} = \frac{m_{sm} - m_{sm}U}{vol_{sistema} - \frac{m_{água}}{d_{água}}} \quad (7)$$

Onde:  $m_{sm}$ : massa suporte (g);  $U$ : umidade (%);  $vol_{sistema}$ : volume água + volume suporte (mL);  $d_{água}$ : densidade água (g mL<sup>-1</sup>);  $m_{água}$ : massa água (g).

#### 4.15.3 Caracterização hidrodinâmica - curva de traçador

Para realização de curva de traçador foi utilizado o corante vermelho de fenol (0,6 g L<sup>-1</sup>). Uma curva analítica do corante foi construída a partir da diluição seriada do corante e a leitura da absorbância em espectrofotômetro a 431 nm ( $y = 52,773x$ ;  $r^2 = 0,9991$ ).

A determinação do tempo de residência teórico ou espacial ( $\tau$ ) foi feita pela razão entre o volume útil do leito e a vazão utilizada. Para estabelecimento do tempo médio ( $t_m$ ) de residência experimental foi determinada a distribuição do tempo de residência a partir da quantificação do corante vermelho de fenol na saída do reator, após uma perturbação do tipo pulso. A função de distribuição de tempo de residência  $E(t)$  foi definida pela Equação 8:

$$E(t) = \frac{C(t)}{\int_0^{\infty} C(t)dt} \quad (8)$$

Onde  $C(t)$  refere-se à concentração do marcador no tempo  $t$ . A partir da plotagem do gráfico  $C(t)xt$ , foi feita a determinação do tempo médio para uma vazão

constante de acordo com a Equação 9 (AGUIAR; ROCHESTER; GONÇALVES, 2019; FOGLER, 2002).

$$t_m = \int_0^{\infty} t \cdot E(t) \cdot dt = \frac{\sum t_i C_i \Delta t_i}{\sum C_i \Delta t_i} \quad (9)$$

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

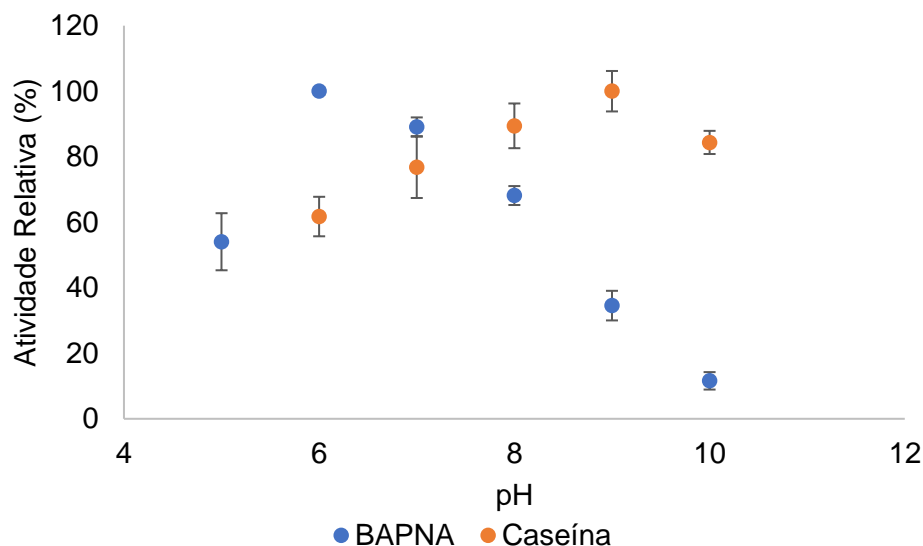
### 5.1 Caracterização do extrato enzimático com atividade de ficina (enzima livre)

Os extratos de ficina foram obtidos pela centrifugação do látex de figo. Nesse extrato foram dosadas a concentração de proteína ( $45,97 \pm 2,80 \text{ mg mL}^{-1}$ ) e a atividade enzimática específica utilizando dois substratos diferentes, caseína e  $N\alpha$ -Benzoil-DL-arginina p-nitroanilida (BAPNA), sendo estimadas em  $84,69 \pm 1,21$  e  $0,202 \pm 0,01 \text{ U mg}^{-1}$ , respectivamente.

A determinação dos parâmetros funcionais de uma enzima é fundamental ao início de seu estudo, ainda mais quando se trata de um extrato vegetal que é suscetível à variação de atividade catalítica devido a diversos fatores como estação do ano, período do dia em que a coleta do látex foi realizada, idade da árvore e estágio de maturação dos frutos (MORELLON-STERLING et al., 2020).

A Figura 11 mostra a variação da atividade do extrato enzimático quando exposto a diferentes valores de pH utilizando ambos os substratos, caseína e BAPNA, separadamente como substratos.

**Figura 11** - Atividade relativa da ficina usando os substratos caseína e BAPNA em função do pH.



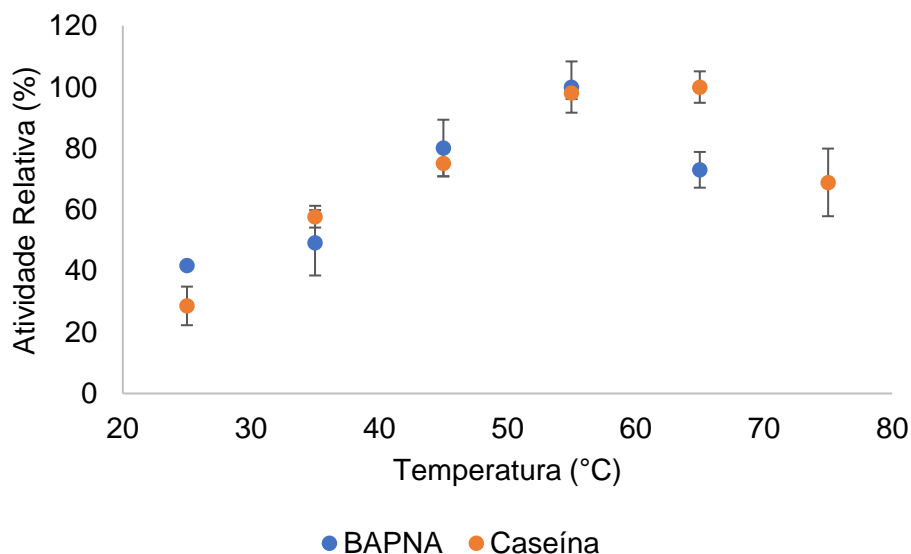
Fonte: Autor (2019)

Os resultados obtidos estão em concordância com o que é apresentado no banco de dados BRENDA - *The Comprehensive Enzyme Information System*. De acordo com as referências que alimentam o banco de dados há uma variação de pH

de máxima atividade em função do substrato utilizado, com uma faixa de operação de 6 a 9. O pH do meio reacional influencia nas cargas líquidas das proteínas, causando repulsão eletrostática, agindo nas ligações de hidrogênio e, portanto, modificando a estrutura terciária da enzima. Conseqüentemente, a interação entre a enzima e o substrato pode ser favorecida ou prejudicada em certas condições, o que pode justificar a diferença de picos de atividade usando os substratos distintos, obtendo máxima atividade com o BAPNA em pH 6 e com caseína em pH 9.

Assim como em diferentes condições de pH, as enzimas sofrem variação da sua atividade catalítica em função da temperatura em que a reação enzimática está sendo conduzida. A Figura 12 mostra a variação da atividade enzimática em diferentes temperaturas utilizando cada substrato, caseína (pH 9) e BAPNA (pH 6).

**Figura 12** - Atividade relativa da ficina em função da variação de temperatura, utilizando BAPNA e caseína como substratos.



Fonte: Autor (2019)

Diferentemente do pH, o comportamento da atividade enzimática em relação à temperatura foi similar para os dois substratos avaliados, com um auge de atividade na faixa de 55 a 65°C ( $3170,66 \pm 65,54$  e  $3230,93 \pm 165,94$  U mL<sup>-1</sup>) para a caseína e 55°C ( $17,55 \pm 1,47$  U mL<sup>-1</sup>) com o BAPNA. Outros trabalhos desenvolvidos com ficina relatam uma maior atividade entre 25 e 60°C com substratos distintos. Gagaoua *et al.* (2014) observaram melhor atividade enzimática em 60°C usando caseína como

substrato. Pela semelhança de atividade residual a 55°C (98% com o substrato caseína e 100% com BAPNA) as análises seguintes foram conduzidas nesta temperatura.

## 5.2 Concentração do extrato proteico

Inicialmente, foi proposta uma etapa de avaliação de concentração do extrato enzimático, com o intuito de avaliar a concentração das proteínas do extrato e uma possível purificação de baixa resolução pela remoção de alguns outros compostos contaminantes, como é comum encontrar no látex de figo (RASKOVIC; LAZIC; POLOVIC, 2015). A Tabela 1 mostra que os processos que permitiram a maior recuperação da atividade do extrato foram o tratamento com sulfato de amônio, sendo que a enzima manteve sua atividade no sobrenadante, e a liofilização. A precipitação com acetona causou redução de cerca de 50% da atividade específica para a hidrólise de ambos os substratos, indicando a susceptibilidade da enzima à exposição a solventes.

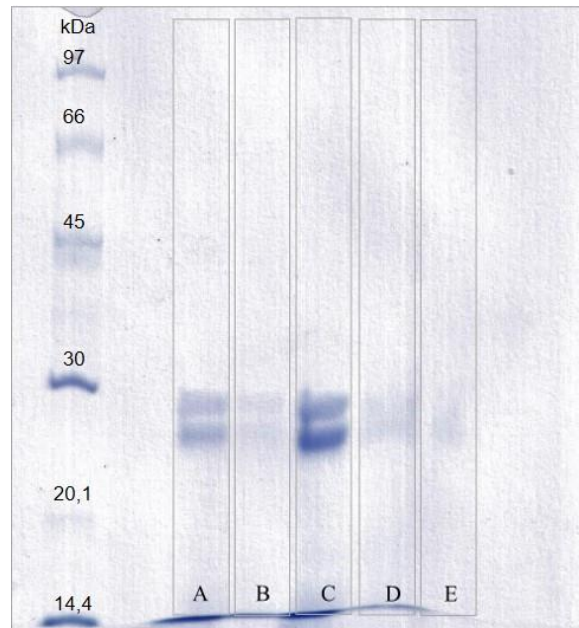
**Tabela 1** - Avaliação de processos de concentração da ficina.

	Atividade Relativa (%)	
	BAPNA	Caseína
<b>Inicial</b>	100 ± 5	100 ± 1
<b>Liofilizada</b>	97 ± 10	76 ± 4
<b>Acetona</b>	52 ± 4	55 ± 19
<b>Sulfato: sobrenadante</b>	110 ± 4	114 ± 9
<b>Sulfato: precipitado</b>	0 ± 0	9 ± 8

Fonte: Autor (2019).

De acordo com o perfil eletroforético (Figura 13) em condição desnaturante (SDS-PAGE), não há seletividade entre os processos de concentração com relação à seleção de proteínas. A intensidade da cor é apenas relativa à concentração proteica da amostra aplicada no gel. A massa molecular da ficina varia entre 23-27 kDa no banco de dados, BRENDA - *The Comprehensive Enzyme Information System*, valores semelhantes às bandas proteicas obtidas no gel de eletroforese, de acordo com os padrões de massas moleculares utilizados.

**Figura 13** – Perfil eletroforético em SDS – PAGE (10%) das amostras submetidas aos processos de concentração.



(A) Extrato inicial (9,2  $\mu\text{g}$ ); (B) Extrato liofilizado (0,2  $\mu\text{g}$ ); (C) Extrato precipitado com acetona (17,3  $\mu\text{g}$ ); (D) Sobrenadante do extrato precipitado com sulfato de amônio (60%) (5,8  $\mu\text{g}$ ); (E) Fração insolúvel da precipitação com sulfato de amônio (0,7 $\mu\text{g}$ ). Fonte: Autor (2019)

Diante dos resultados obtidos, optou-se por trabalhar com o extrato com atividade de ficina sem quaisquer processos de concentração, uma vez que o extrato já possui alta concentração de proteínas e relativa pureza por se observar poucas bandas proteicas em gel de eletroforese (Figura 13). Outra dificuldade em um processo de concentração da ficina, é que a coleta do látex fornece quantidades escassas de extrato, com características já desejáveis, tornando dispensável uma etapa de tratamento que pode tornar o uso da enzima um processo dispendioso.

### 5.3 Imobilização da ficina

A primeira metodologia empregada para imobilização da ficina foi através da formação de ligações multipontuais covalentes entre o suporte e a enzima. O processo de imobilização se dá pela formação em meio alcalino (pH 10,0) de bases de *Schiff* entre os grupamentos glioxil (grupos aldeído alifático) e os grupos aminos presentes em regiões da enzima ricas em aminoácidos lisina. Essa primeira interação é considerada instável, entretanto, a reação com borohidreto de sódio promove a redução dos grupos remanescentes ativos no suporte, tornando-os hidroxilas inertes,



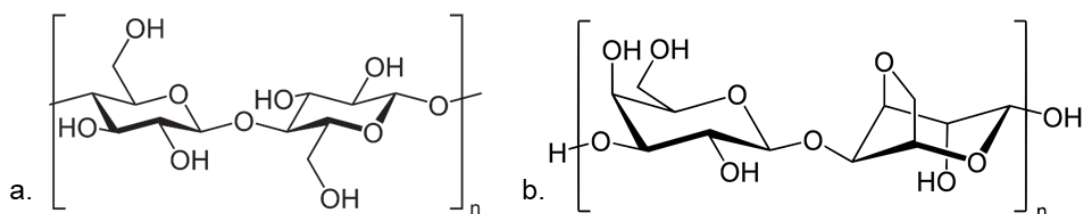
e converte as bases de *Schiff* formadas em ligações amina secundárias muito mais estáveis (GUISÁN, 2013).

A segunda metodologia, com o uso do glutaraldeído, promove a imobilização de enzimas através da ligação do grupamento aldeído do suporte e os grupos amino disponíveis na enzima, que podem ser tanto os resíduos laterais de lisina quanto o grupo amino terminal da proteína. Entretanto em pH neutro, como é realizado o processo de imobilização, o resíduo amino terminal (pK 7,5) é muito mais reativo do que os resíduos de lisina, assim, a imobilização passa ser unipontual (GUISÁN, 2013; SIAR et al., 2018a).

Por fim, a terceira metodologia utilizada para imobilização da enzima, foi com o uso dos suportes modificados pela adição de grupos amino, tornando possível a imobilização através da ligação dos grupos carboxílicos dos resíduos dos ácidos aspártico e glutâmico e os grupos adicionados, permitindo a adsorção iônica da enzima (FERNANDEZ-LAFUENTE *et al.*, 1993).

As três metodologias podem ser empregadas em agarose, que é um suporte frequentemente utilizado para imobilizações de enzimas e, portanto, foi utilizada neste projeto para fins comparativos, já que o pó de sabugo de milho pode também ser utilizado como suporte, pois as ativações ocorrem a partir de hidroxilas livres que estão presentes em ambos os materiais (Figura 14). Os pré-tratamentos impostos ao pó de sabugo de milho descritos no item 4.7 promovem o aumento de hidroxilas disponíveis na superfície das fibras lignocelulósicas do material devido à solubilização ou degradação parcial da hemicelulose e da lignina (MOOD *et al.*, 2013).

**Figura 14** - Representação da estrutura química simplificada da celulose (a) e da agarose (b).



A Tabela 2 mostra os valores obtidos de rendimento de imobilização, atividade recuperada e eficiência de imobilização para os diferentes derivados enzimáticos produzidos. A imobilização foi avaliada usando caseína, substrato macromolecular, e BAPNA, substrato sintético.

**Tabela 2** - Rendimento de imobilização, atividade recuperada e eficiência de imobilização dos derivados obtidos com diferentes suportes usando caseína e BAPNA como substratos.

<b>Caseína</b>						
	<b>Rend. de Imobilização (%)</b>		<b>Atividade Recuperada (%)</b>		<b>Eficiência (%)</b>	
Aga-Glioxil-F	96,74	± 0,69	2,26	± 0,45	2,33	± 0,47
SM-Glioxil-F	86,33	± 1,67	0,39	± 2,81	0,45	± 0,07
Aga-Gluta-F	96,82	± 2,04	0,47	± 0,08	0,49	± 0,09
SM-Gluta-F	97,16	± 0,49	0,53	± 0,06	0,54	± 1,06
Aga-Amino-F	21,98	± 3,32	0,57	± 0,05	2,65	± 0,55
SM - Amino-F	24,17	± 5,56	0,97	± 0,07	4,23	± 1,28
<b>BAPNA</b>						
	<b>Rend. de Imobilização (%)</b>		<b>Atividade Recuperada (%)</b>		<b>Eficiência (%)</b>	
Aga-Glioxil-F	96,78	± 2,91	5,77	± 1,42	5,93	± 1,27
SM-Glioxil-F	88,02	± 2,81	3,87	± 0,61	4,40	± 0,74
Aga-Gluta-F	94,57	± 0,22	2,64	± 0,22	2,79	± 0,23
SM-Gluta-F	100,00	± 0,00	5,46	± 1,06	5,46	± 1,06
Aga-Amino-F	30,87	± 2,22	1,03	± 0,52	3,29	± 1,53
SM - Amino-F	41,83	± 2,41	1,68	± 0,07	4,02	± 0,37

Aga – agarose. SM – Pó de sabugo de milho. Gluta – Glutaraldeído. F – Ficina.

**Fonte:** Autor, 2020

No caso da imobilização através dos grupos glioxil (Aga-Glioxil-F e SM-Glioxil-F), os valores de rendimento de imobilização obtidos foram altos (>86%, com caseína), indicando um resultado satisfatório de ligação da proteína presente em suspensão ao suporte glioxil. Porém, os valores obtidos de atividade recuperada e eficiência, que indicam quanto o derivado possui de atividade catalítica em relação à redução de atividade em suspensão, sugerem que a imobilização da ficina pode ter sido realizada através da interação entre os grupos glioxil e os grupos amino de resíduos de aminoácidos próximos ao sítio catalítico, interferindo na sua estrutura terciária e consequentemente na sua atividade enzimática. Outra hipótese é que a ficina pode ter sido imobilizada de forma em que o sítio catalítico está orientado em direção do suporte dificultando o acesso do substrato. Resultados semelhantes de rendimento de imobilização foram obtidos por Siar *et al.* (2017) na imobilização de ficina em agarose ativada com grupos glioxil. Entretanto os valores de atividade recuperada foram maiores, com 50 e 60% utilizando como substrato caseína e BAPNA, respectivamente.

No caso das imobilizações com os suportes ativadas com grupos glutaraldeído (Aga-Gluta-F e SM-Gluta-F), os valores de rendimento de imobilização também foram altos, chegando a atingir 100% utilizando a agarose como suporte. Porém, assim como na imobilização com glioxil, os valores de atividade recuperada e eficiência foram menores do que o esperado, não atingindo 1% com o uso da caseína e cerca de 5,5% com uso de BAPNA para o derivado SM-Gluta-F. A mesma hipótese levantada anteriormente pode ser considerada para justificar os valores não muito altos de atividade recuperada e eficiência de imobilização, ou seja, a ligação covalente entre enzima e suporte pode estar ocorrendo em uma região muito próxima ao sítio catalítico, comprometendo a atividade do derivado, principalmente quando se utiliza o substrato macromolecular, a caseína. O trabalho de Siar *et al.* (2018) avaliou a imobilização da ficina com agarose pré-ativada com glutaraldeído em pH 5, 7 e 9, obtendo baixa atividade recuperada quando a imobilização foi realizada em pH 5 e 9, equivalendo a 20 e 16% da atividade inicial, respectivamente. Já em pH 7, os autores obtiveram 100% de rendimento de imobilização e atividade recuperada de 40% e 30% com o uso de BAPNA e caseína, respectivamente.

Por fim, a imobilização com os suportes agarose e pó de sabugo de milho aminados, Aga-Amino-F e SM-Amino-F, resultaram nos menores valores de rendimento de imobilização chegando ao máximo de 42% em pó de sabugo de milho quando avaliado utilizando BAPNA. Os valores de eficiência (2,65 e 3,29% para Aga-Amino-F com caseína e BAPNA, respectivamente; 4,23 e 4,02 para SM-Amino-F com caseína e BAPNA, respectivamente) observados indicam que a imobilização através dos resíduos de aminoácidos ácidos da enzima pode estar promovendo uma pequena distorção da sua estrutura terciária na região do sítio catalítico levando a um aumento da atividade esperada do derivado, o que é comum quando há imobilização por ligações iônicas (SIRISHA; JAIN; JAIN, 2016). Semelhantemente, no trabalho de Siar *et al.* (2018), a imobilização da ficina em agarose aminada resultou em atividade recuperada menor que 10%.

Uma observação comum entre as imobilizações é que os resultados de atividade recuperada e eficiência de imobilização, que são relativos à capacidade catalítica dos derivados, são maiores quando há a utilização do substrato BAPNA, o que indica uma maior facilidade de acesso ao sítio catalítico comparado à caseína, um substrato macromolecular mais complexo. Esse efeito é uma consequência comum em processos de imobilização, e em especial na imobilização de proteases com uso de

substratos macromoleculares, o que exige uma imobilização em que a orientação da enzima seja apropriada para garantir a atividade enzimática (GUISÁN, 2013; MORELLON-STERLING *et al.*, 2020).

A imobilização em pó de sabugo de milho mostrou-se possível, proporcionando resultados de rendimento de imobilização, atividade recuperada e eficiência ligeiramente superiores à agarose, com exceção no caso da imobilização em suporte ativado com grupos glioxil.

### 5.3.1 Reuso e estabilidade operacional

Além dos valores de atividade recuperada, rendimento de imobilização e eficiência, um dos parâmetros fundamentais na avaliação de um derivado enzimático é a sua capacidade de reuso. A Tabela 3 apresenta os valores de atividade residual após 4 ciclos de reuso para cada um dos derivados obtidos.

**Tabela 3** - Atividade residual após 4 ciclos de reuso

	<b>Atividade Residual (%)</b>					
	<b>SM-Glioxil-F</b>	<b>Aga-Glioxil-F</b>	<b>SM-Gluta-F</b>	<b>Aga-Gluta-F</b>	<b>SM-Amino-F</b>	<b>Aga-Amino-F</b>
1	100 ± 0	100 ± 0	100 ± 0	100 ± 0	100 ± 0	100 ± 0
2	72 ± 10	79 ± 7	99 ± 13	87 ± 9	81 ± 7	14 ± 6
3	56 ± 6	67 ± 2	102 ± 15	58 ± 9	53 ± 2	8 ± 3
4	52 ± 1	57 ± 4	100 ± 15	46 ± 13	36 ± 2	6 ± 2

Fonte: Autor, 2020

O derivado que se destacou no ensaio de reuso foi o SM-gluta-F, mantendo a atividade inicial durante os quatro ciclos e, nota-se também que seu desempenho foi superior a Aga-Gluta-F. Os resultados obtidos com os derivados SM-Glioxil-F e Aga-Glioxil-F foram muito próximos entre si, mantendo mais do que 50% de atividade enzimática após quatro ciclos de uso. No caso dos derivados aminados houve uma maior susceptibilidade ao uso repetido, causando uma redução mais intensa da atividade. Os resultados indicam que os dois métodos que empregam ligações covalentes para imobilizar a enzima, glioxil e glutaraldeído, produzem derivados mais estáveis, comparados ao método que utiliza interações iônicas para manter a enzima ligada ao suporte, as quais são mais suscetíveis à exposição à temperaturas altas e variação de pH (SHELDON; VAN PELT, 2013; SIRISHA; JAIN;

JAIN, 2016). Além da interação entre a enzima e o suporte, o próprio catalisador pode ser afetado pelo reuso devido à exposição à temperatura, ao meio reacional, incluindo o substrato e os produtos de catálise, interferindo na estrutura terciária da enzima causando a redução de atividade.

Comparativamente, no trabalho realizado por Siar *et al.* (2017) a ficina imobilizada em agarose-glioxil foi reutilizada por cinco ciclos na hidrólise da caseína a pH 7 com redução de 5% de atividade ao final do ensaio. Cinco ciclos de reuso foram realizados, com manutenção da atividade acima de 90% em ficina aminada imobilizada também em agarose-glioxil (SIAR *et al.*, 2019). Com agarose ativada com grupos glutaraldeído, Siar *et al.* (2018) relataram o reuso do derivado por 6 ciclos de hidrólise da caseína a 50°C e pH 7 por 2h sem detectar uma redução significativa na atividade do biocatalisador imobilizado. No caso de imobilização através de encapsulação de ficina foi possível o reuso do derivado por 9 ciclos, reduzindo a 12% da atividade catalítica inicial (ROJAS-MERCADO *et al.*, 2018).

Assim como reuso, a imobilização de uma enzima prevê o aumento da estabilidade do catalisador comparada à sua forma solúvel. Contudo, o inverso também pode ocorrer, levando à redução da capacidade da enzima em conservar a sua atividade catalítica, caso a imobilização não seja devidamente projetada (MATEO *et al.*, 2007). Assim, para avaliar os derivados em comparação com a enzima livre, ambos foram expostos a diferentes condições de pH e temperatura.

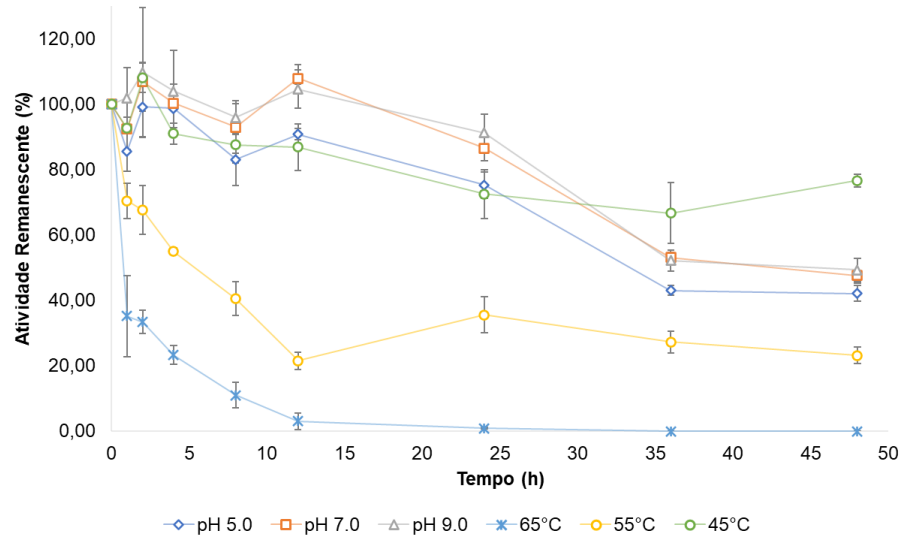
A Figura 15 mostra a atividade residual da ficina na sua forma livre quando exposta a três diferentes temperaturas (45°, 55° e 65°C) e pH (5, 7 e 9). É possível observar que no caso da enzima livre, apesar da atividade enzimática ser maior em temperaturas altas, tendo sua atividade melhor expressa entre 55 e 65°C (Figura 12), quando exposta por períodos muito longos de tempo a estas condições há uma redução considerável da sua atividade. Já em 45°C a atividade enzimática da ficina livre, após 48h de exposição, manteve-se a 76% da atividade inicial.

A papaína e bromelina, que são também cisteíno-proteases vegetais, quando expostas por 2h a temperaturas de 40°, 50° e 60°C tiveram suas atividades reduzidas para cerca de 40, 30 e 20%, respectivamente, da atividade inicial no caso da bromelina, e para 70, 40 e 20%, respectivamente, no caso da papaína (CUTIÑO-AVILA *et al.*, 2014).

Com relação ao pH, a ficina apresentou um desempenho semelhante nas três condições, expressando um padrão de atividade com declínio nos tempos iniciais do

ensaio e em seguida um aumento, para novamente reduzir e aumentar posteriormente após 8h de exposição. Ao final das 48h, a enzima livre manteve 42,1, 47,7 e 49,3% de atividade em meios com o pH 5, 7 e 9, respectivamente.

**Figura 15** - Atividade residual de ficina livre em diferentes condições de pH e temperatura.



Fonte: Autor, 2020

Com o ensaio realizado, é possível estabelecer o tempo de meia-vida do extrato enzimático com atividade de ficina nas condições de temperatura e pH avaliados (Tabela 4).

**Tabela 4** - Tempo de meia-vida de ficina livre em diferentes condições de pH e temperatura.

Condição	45°C	55°C	65°C	pH 5	pH 7	pH 9
$T_{1/2}$ (h)	>48,0	7,5	3,7	36,8	42,8	41,6

Fonte: Autor, 2020

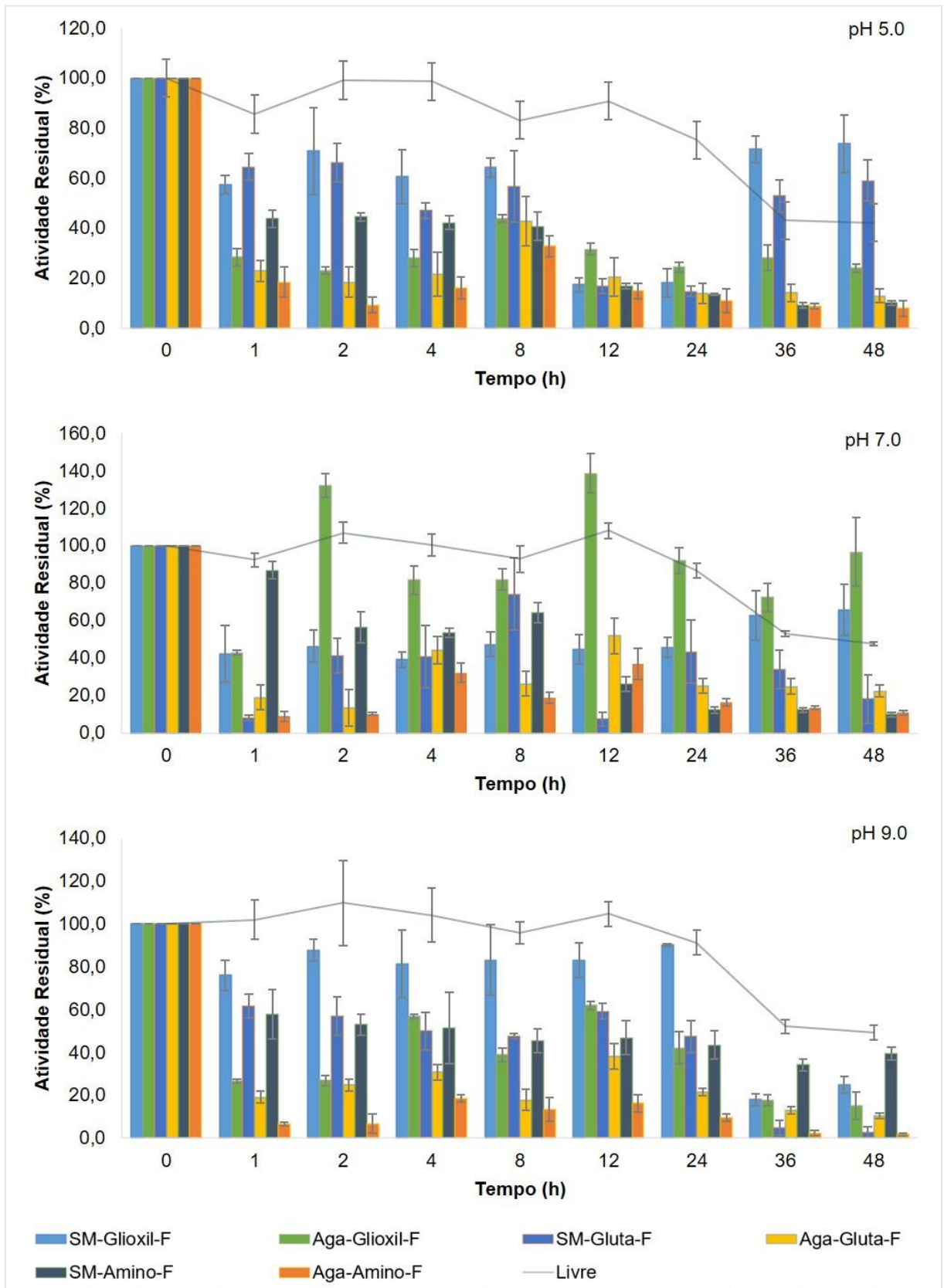
No mesmo estudo de Cutiño-Avila *et al.* (2014), bromelina e papaína quando expostas a pH 5, 7 e 9 por 2h mantiveram cerca de 60, 90 e 80% de atividade residual, respectivamente, no caso da bromelina. Já no caso da papaína, <10, >95 e 30%, respectivamente. Já a ficina foi capaz de manter sua atividade por um maior período nessas condições, o que indica uma vantagem da protease originária de *Ficus sp.*

Um dos benefícios esperados com a imobilização de enzimas é o aumento da estabilidade em função da restrição da estrutura tridimensional da proteína pelas

ligações com o suporte (GUISÁN, 2013; SHELDON, 2007; SIRISHA; JAIN; JAIN, 2016). As Figura 16 e Figura 17 mostram os resultados de atividade residual de todos os derivados produzidos, quando expostos a diferentes valores de pH e diferentes temperaturas por um período de 48h.

O pH é uma variável que influencia nas cargas líquidas das proteínas, causando repulsão eletrostática, podendo romper ligações de hidrogênio causando a desnaturação da enzima. Além disso, no caso da imobilização com o suporte ativado com grupamentos amino, a variação do pH pode também afetar as ligações entre a enzima e o suporte, pelo método de imobilização ser baseado na formação de ligações iônicas.

**Figura 16** - Atividade residual dos derivados enzimáticos e ficina livre em pH 5, 7, e 9.



Fonte: Autor, 2020



Em pH ácido (Figura 16) a ficina na forma livre mostrou-se mais estável do que a maior parte dos derivados produzidos, com exceção dos derivados SM-Glioxil-F e SM-Gluta-F, com exposição de 36 e 48h, apresentando retenção de 73,7 e 59,0% de suas atividades iniciais, respectivamente ao final do ensaio. É importante ressaltar que os derivados produzidos com pó de sabugo de milho mantiveram maior atividade comparada a agarose, em grande parte do ensaio. O derivado SM-amino-F manteve sua atividade próxima a 50% consistentemente durante as primeiras 8h de exposição, mais ativo que Aga-amino-F, que na primeira hora, teve uma redução de 87,7% de sua atividade em relação à atividade inicial.

Em pH neutro, (Figura 16) o derivado Aga-Glioxil-F destacou-se havendo até uma melhoria da atividade enzimática em função do tempo de exposição, chegando a superar a atividade residual da enzima livre em alguns pontos, provavelmente devido a uma distorção da estrutura terciária da enzima causada pela exposição de modo em que houve uma maior facilidade do substrato em acessar o centro catalítico da enzima SM-Glioxil-F apresentou uma atividade constante durante o ensaio apesar da redução inicial para 42,4% da atividade inicial do derivado. SM-Gluta-F e Aga-Gluta-F sofreram maior influência do pH comparados aos outros derivados, exibindo 18,1 e 22,3% de atividade após as 48h. SM-Amino-F e Aga-Amino-F finalizaram ambos com cerca de 10% da atividade inicial, entretanto, o SM-Amino-F durante as primeiras 8h apresentou 64,2% comparada a 18,7% da Aga-Amino-F.

Já em pH 9, (Figura 16), o SM-Glioxil-F foi o derivado que mais destacou-se, aparentando atividade semelhante à da forma livre da enzima, mantendo cerca de 90% da atividade inicial durante 24h de exposição. Os derivados produzidos com pó de sabugo de milho como suportes mostram-se mais estáveis em condição alcalina do que os derivados produzidos com agarose. O Aga-Amino-F teve sua atividade reduzida para 6,6% na primeira hora de exposição enquanto SM-Amino-F manteve 57,7% da atividade enzimática inicial.

Bromelina e papaína imobilizadas em agarose-glioxil tiveram sua estabilidade aumentada no caso de exposição em pH mais extremos, como 4, 10 e 11, passando de uma média de 30% de atividade residual para 70%, para bromelina, e <10% para aproximadamente 60% na papaína, após a exposição por 2h nestas condições (CUTIÑO-AVILA; PRADAS; ABREU, 2014). Já no caso do estudo da ficina realizado por Siar *et al.* (2019), os autores avaliaram a estabilidade de derivados obtidos pela imobilização da ficina com e sem a aminação em suporte agarose-glioxil, utilizando

como substrato BAPNA, expondo-os a pH 5, 7 e 9 a 55°C. Após 24h de exposição, nas três condições de pH o derivado manteve cerca de 30% da atividade inicial e o uso da enzima aminada possibilitou que o derivado apresentasse cerca de 50% da atividade após a exposição às mesmas condições. A inativação da ficina imobilizada em agarose-glutaraldeído também foi analisada a 55°C em pH 5, 7 e 9. No caso, o derivado apresentou uma ligeira vantagem de estabilização comparada à ficina livre, entre 20-40% e 10-20%, respectivamente, de atividade residual após 24h de exposição.

Neste trabalho é importante salientar que o ensaio foi avaliado com uso de caseína e BAPNA como substratos, e, no caso da exposição ao pH 7,0, há uma diferença significativa de atividade entre os substratos, mostrando uma maior estabilidade com o uso de BAPNA (SIAR et al., 2018a). É necessário frisar que os estudos citados anteriormente avaliaram a estabilidade dos derivados e da enzima livre em condições diferentes das que foram utilizadas nesse trabalho, expondo a enzima a vários pH concomitantemente e a altas temperaturas, estas condições promovem resultados distintos de quando avaliados separadamente.

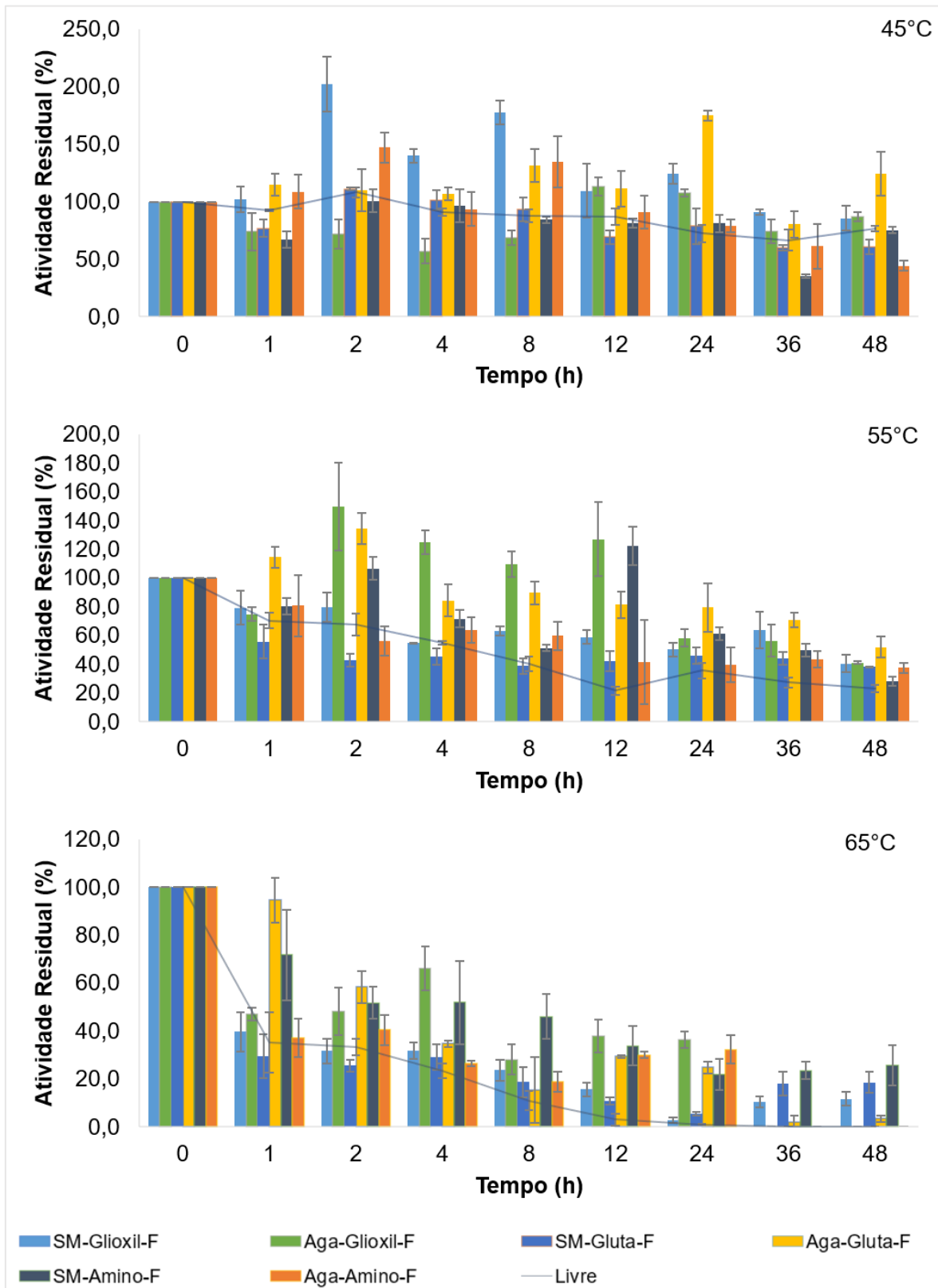
Analisando juntamente as Figuras 15 e 16 é possível observar que os derivados foram mais susceptíveis à exposição a diferentes pH comparados à ficina na sua forma livre, e que quando expostos a diferentes temperaturas, os derivados apresentaram maior estabilidade do que a enzima solúvel.

A 45°C (Figura 17) a enzima livre e os derivados apresentaram certa constância de atividade residual durante o ensaio. Alguns dos derivados, como SM-Glioxil-F, Aga-Gluta-F e Aga-Amino-F tiveram suas atividades aumentadas em função da exposição à temperatura de 45°C, o que é uma resposta frequentemente observada, presumivelmente devido à influência da temperatura nas forças fracas que mantêm a estrutura da proteína e assim a sua função catalítica, facilitando a interação do substrato e a enzima, sem haver a desnaturação da enzima. Com exceção do Aga-Amino-F, todos os derivados mantiveram suas atividades residuais próximas ou superiores a 76,7% que foi a atividade apresentada pela enzima livre após 48h de exposição. Entre os suportes, para a ativação glioxil, o pó de sabugo de milho mostrou um aumento da atividade comparada à agarose; SM-Amino-F após 48h apresentou 75,5%, mais do que os 44,4% de atividade residual observada em Aga-Amino-F; ao contrário, quando ativado com glutaraldeído, a agarose manteve sua atividade mais

estável do que o pó de sabugo de milho, apresentando atividade maior que 100% durante grande parte do ensaio.

Em 55°C (Figura 17), a imobilização garantiu a estabilidade da atividade enzimática durante 12h de exposição, principalmente com os derivados Aga-Glioxil-F, Aga-Gluta-F e SM-Amino-F. O efeito de intensificação da atividade enzimática acima da atividade inicial observado a 45°C repetiu-se em 55°C, particularmente em Aga-Gluta-F, Aga-Glioxil- e SM-Amino-F. O derivado que apresentou atividade mais próxima a enzima livre foi o SM-Gluta-F, porém, ao final das 48h de exposição, apresentou 38,1% da atividade inicial, valor que se encontra na faixa comum aos outros derivados, 28-52%, todos acima da enzima livre que manteve 23,2% da atividade.

**Figura 17-** Atividade residual dos derivados e ficina livre a temperaturas de 45°C, 55°C e 65°C



Fonte: Autor, 2020

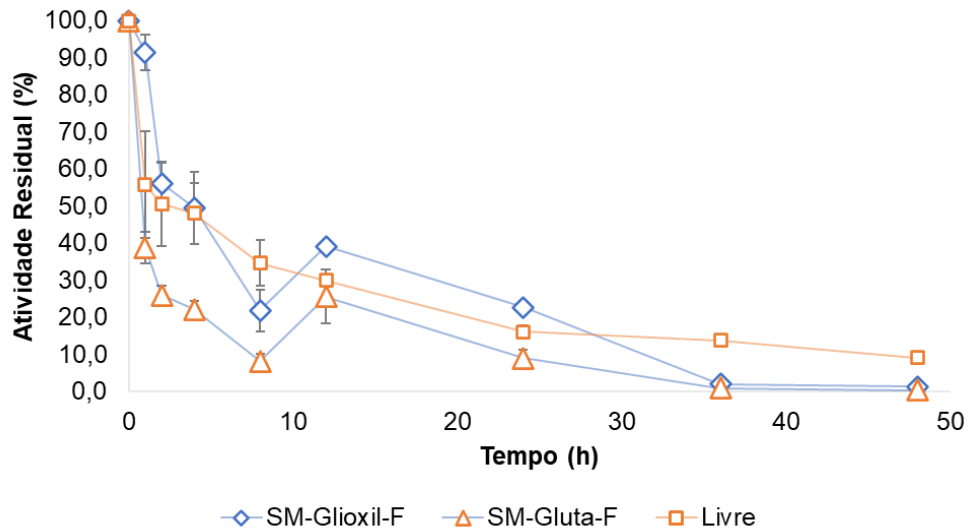
Em 65°C (Figura 17) houve maior perda da atividade enzimática da ficina comparada à estabilidade realizadas nas temperaturas de 45° e 55°C, apenas os derivados SM-Amino-F e Aga-Glioxil-F resistindo melhor à exposição inicial da temperatura. Os derivados de agarose apresentaram atividade até 24h de exposição, entre 24,7 e 36,4%, valores expressivos quando comparados a 0,8% de atividade residual na forma livre da ficina. Após 48h de exposição os derivados produzidos com agarose e a enzima livre já não apresentavam atividade. Ao contrário, os derivados produzidos com pó de sabugo de milho mantiveram a atividade residual entre 11,7 e 25,6%.

A imobilização da ficina mostrou-se um desafio, apresentando resultados de atividade recuperada e eficiência inferiores ao desejado para os parâmetros de imobilização, mas com altos valores de rendimento de imobilização. As análises de reuso e estabilidade auxiliam a avaliar qual dos métodos de ativação química do suporte para imobilização é o melhor para a produção dos derivados.

Os ensaios de estabilidade ao pH (Figura 16) e à temperatura (Figura 17) mostram que entre os derivados produzidos há uma variação de comportamento, devido à exposição à diferentes condições. Considerando os resultados de reuso dos derivados produzidos com pó de sabugo de milho, os derivados SM-Gluta-F e SM-Glioxil-F foram mais satisfatórios, mantendo atividade enzimática por maior tempo na maioria das diferentes condições, de temperatura e pH estudadas. Os ensaios de estabilidade ao pH mostraram que as ativações com glioxil e glutaraldeído foram capazes de gerar derivados mais estáveis, de maneira geral, o mesmo pode ser observado nos ensaios de estabilidade à temperatura.

Dessa forma, um novo ensaio de estabilidade foi realizado para auxiliar na escolha de um derivado para continuação do projeto. Os derivados SM-Glioxil-F e SM-Gluta-F, assim como a ficina na sua forma livre, foram expostos à temperatura de 45°C e pH 9,0 simultaneamente (Figura 18). A escolha destes parâmetros foi feita baseada no fato de que a 45°C e em pH 9,0 as atividades dos derivados e da enzima livre não são afetadas de forma acentuada.

**Figura 18** - Atividade residual ficina solúvel e dos derivados SM-Glioxil-F e SM-Gluta-F a 45°C e pH 9.



Fonte: Autor, 2020

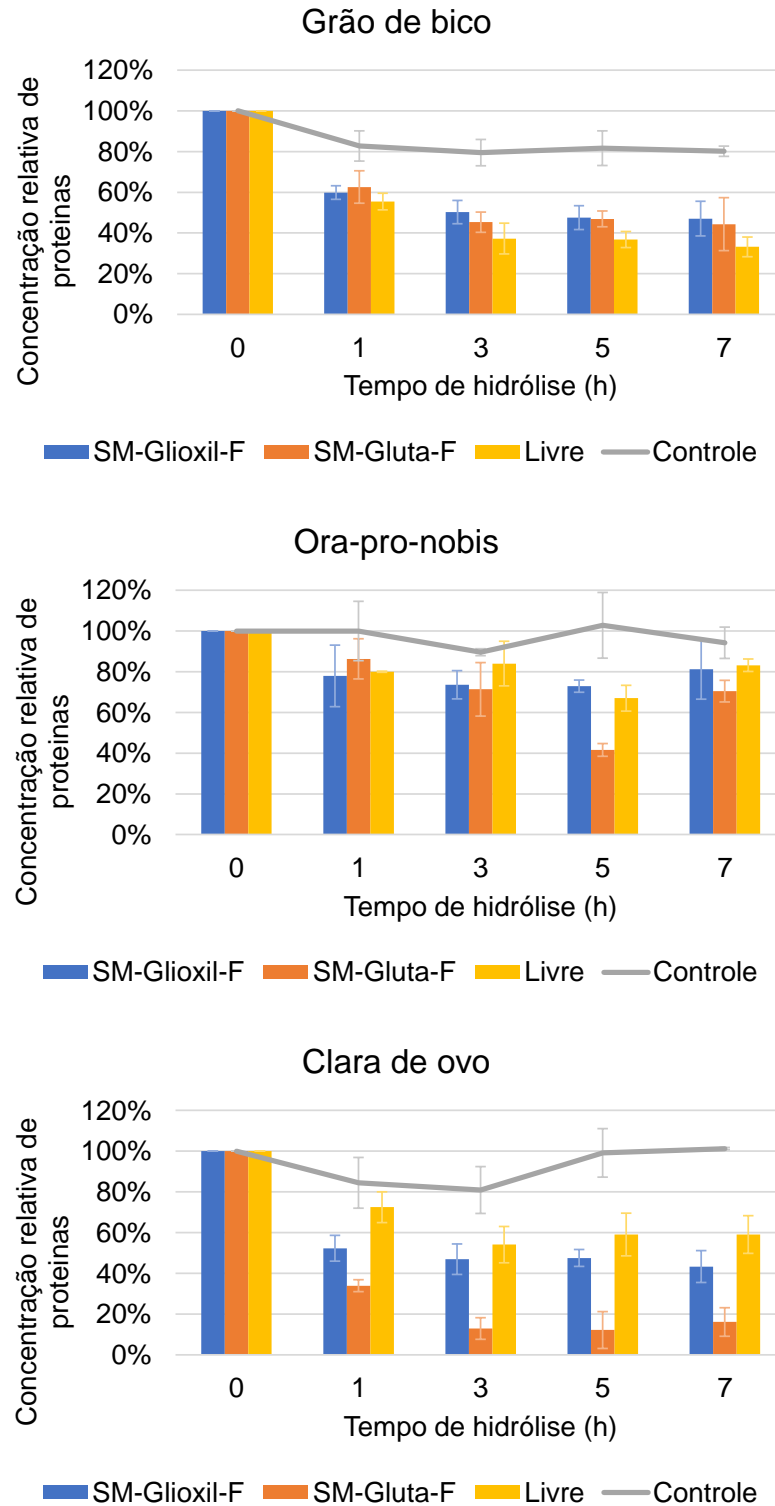
O novo ensaio de estabilidade (Figura 18) mostra que o SM-Glioxil-F e SM-Gluta-F apresentaram o mesmo comportamento, com oscilação de atividade entre 8 e 12 h de exposição a pH 9 e 45° C. Mesmo assim, o SM-Glioxil-F mostrou-se mais estável do que o SM-Gluta-F, principalmente no início da exposição. Quando mantido por 1h, o derivado SM-Gluta-F manteve 38,8% da atividade e o derivado SM-Glioxil-F manteve 91,5%. Em 12h a atividade residual do SM-Gluta-F era menor que a metade da atividade residual de SM-Glioxil-F, que era 22,7%. O uso de suportes ativados com glioxil permite a formação de ligações multipontuais entre a enzima e o suporte, já que a imobilização foi realizada através dos resíduos de lisina presentes na superfície da ficina, ao contrário do uso do suporte ativado com o grupo glutaraldeído, que usa o grupamento amino terminal da enzima para formar a ligação, possibilitando uma imobilização unipontual. A formação de várias ligações entre a enzima e o suporte prevê uma maior estabilização da proteína (GUISÁN, 2013), o que foi confirmada pelo ensaio realizado.

#### **5.4 Hidrólise em sistema de mistura operado em batelada**

Dos derivados produzidos o SM-Glioxil-F e SM-Gluta-F foram os selecionados para a aplicação na hidrólise dos extratos proteicos em tanque agitado em batelada. As hidrólises foram conduzidas por um período de 7h. Alíquotas foram retiradas nos intervalos 1h, 3h, 5h e 7h, e avaliadas através da dosagem de proteínas, eletroforese, atividade quelantes de ferro e atividade antioxidante.

A Figura 19 mostra a variação de concentração de proteína relativa à concentração inicial dos substratos, durante a hidrólise.

**Figura 19** - Concentração relativa de proteínas em diferentes extratos (grão de bico, ora-pro-nobis e clara de ovo) durante a hidrólise utilizando os derivados SM-Glioxil-F e SM-Gluta-F, e enzima livre. Controle é relativo à concentração de proteínas nos extratos em amostra sem a presença de enzima.



Fonte: Autor, 2021



Para cada um dos substratos uma amostra controle, sem presença da enzima, foi analisada para avaliar a ação da temperatura nas proteínas dos substratos. Os que mais sofreram efeito da temperatura, foram o grão de bico e a clara de ovo, sofrendo uma redução de aproximadamente 20% da concentração inicial de proteínas. Apesar do efeito da temperatura alta sobre as proteínas dos extratos, é notável que ocorre a redução de proteínas nas amostras submetidas à hidrólise.

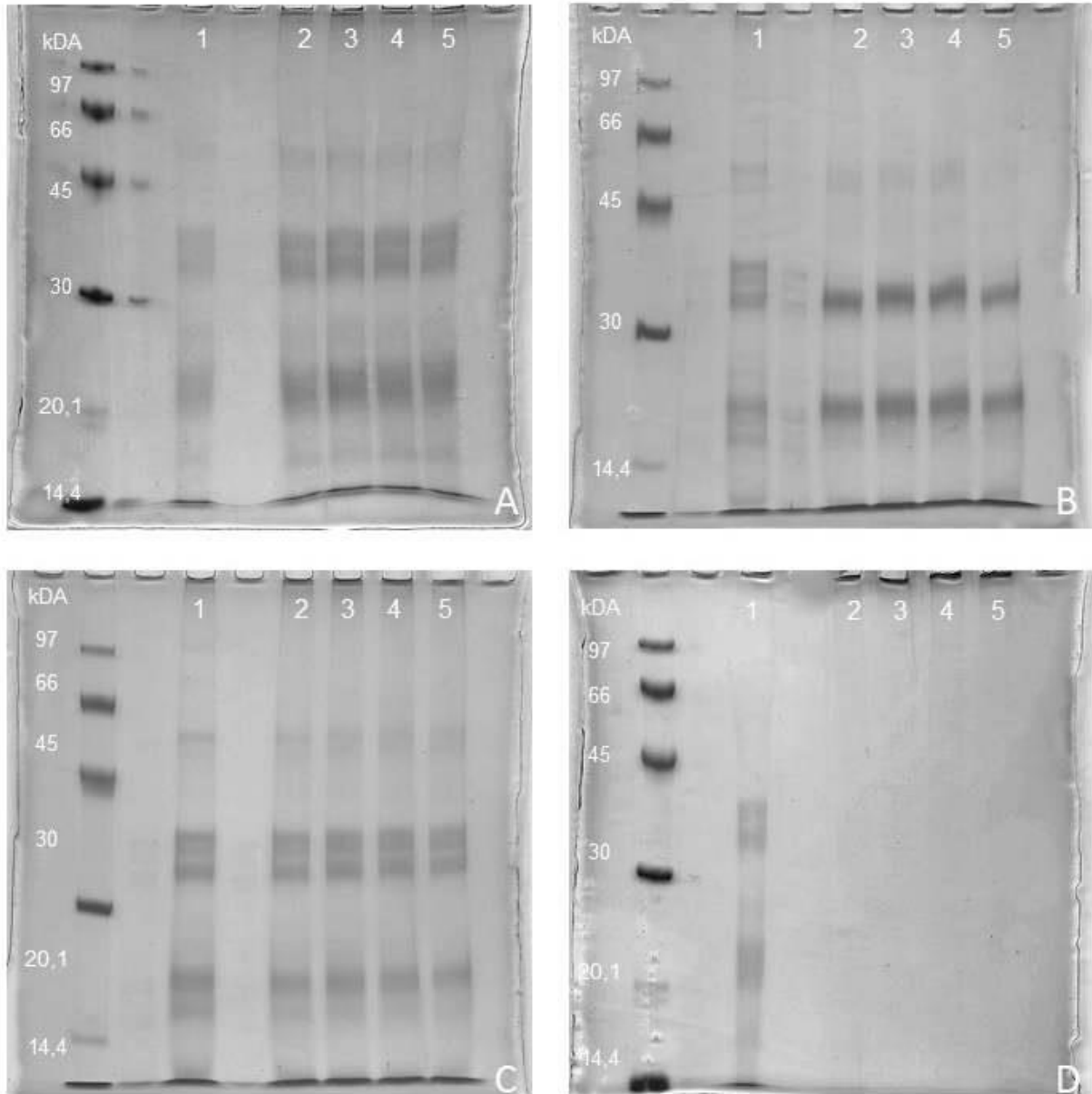
Dentre as hidrólises realizadas com ficina na sua forma livre, a maior redução de concentração de proteínas foi observada com o uso do grão de bico, apresentando 33,2% da concentração inicial, após 7h de hidrólise, valor esse obtido aproximadamente já a partir de 3h de reação. Xu et al. (2020) avaliaram a hidrólise de isolado proteico de grão de bico utilizando alcalase, também uma endoprotease, obtendo cerca de 35% de grau de hidrólise, após 3h de reação. No caso da hidrólise da clara de ovo, houve uma redução da concentração de proteína de cerca de 40% ao final das 7h de reação, e assim como no caso do grão de bico, uma estabilização da concentração de proteína a partir de 3 h de hidrólise. Finalmente, a hidrólise de ora-pro-nóbis com a ficina na forma livre promoveu a redução de proteínas em 17% após as 7h de reação. Até o momento (novembro/2021) não foram encontrados relatos de hidrólise enzimática de extratos de ora-pro-nóbis.

O uso do SM-Glioxil-F não promoveu redução na concentração de proteínas de forma expressiva comparada à observada com o uso da ficina solúvel quando utilizados os substratos grão de bico e ora-pro-nóbis, apresentando 47% e 81% das concentrações iniciais dos respectivos substratos, após as 7h de hidrólise. Com a clara de ovo, o uso do SM-Glioxil-F promoveu uma diferença de redução de proteínas de 21% entre a ficina livre e a imobilizada considerando a primeira hora de hidrólise. Ao final de 7h uma diferença de 16% entre as concentrações de proteína foi observada entre as duas formas da enzima, SM-Glioxil-F e livre, utilizadas para hidrólise da clara de ovo. É importante ressaltar que mesmo apresentando valores de atividade recuperada inferiores ao esperado, o derivado SM-Glioxil-F mostrou resultados semelhantes à enzima solúvel, resultado inesperado, mas satisfatoriamente positivo. Entretanto, ao final das hidrólises, o SM-Glioxil-F apresentou uma redução de atividade expressiva, mantendo 6,6%, 4,7% e 4,8% da atividade inicial do derivado após a hidrólise do grão de bico, ora-pro-nóbis e clara de ovo, respectivamente.

Com o uso de SM-Gluta-F, reduções ligeiramente maiores que SM-Glioxil-F foram observadas na hidrólise de grão de bico e da ora-pro-nóbis, apresentando 44%

e 70% das concentrações iniciais de substratos, respectivamente. Já com a clara de ovo há uma redução expressiva da concentração de proteína após as 7h de hidrólise. Entretanto, analisando os géis de eletroforese (Figura 20, D; Figura 21, D) das amostras hidrolisadas com SM-Gluta-F, a total ausência de bandas proteicas pode indicar que as proteínas dos substratos foram ligadas aos grupos glutaraldeídos remanescentes do derivado, já que no caso desse processo de imobilização não há uma etapa de inativação dos grupos ativos como há após a imobilização em suportes ativados com grupos glioxil, que são reduzidos pela reação com borohidreto de sódio. Após a hidrólise os derivados apresentaram 2,3%, 2,2% e 1,9% da atividade inicial do derivado com o uso dos substratos grão de bico, ora-pro-nóbis e clara de ovo, respectivamente.

**Figura 20** – Perfil eletroforético em SDS-PAGE para os extratos hidrolisados de grão de bico utilizando a ficina livre (B) e os derivados SM-Glioxil-F (C) e SM-Gluta-F (D). Em A) controle de hidrólise em função da temperatura.

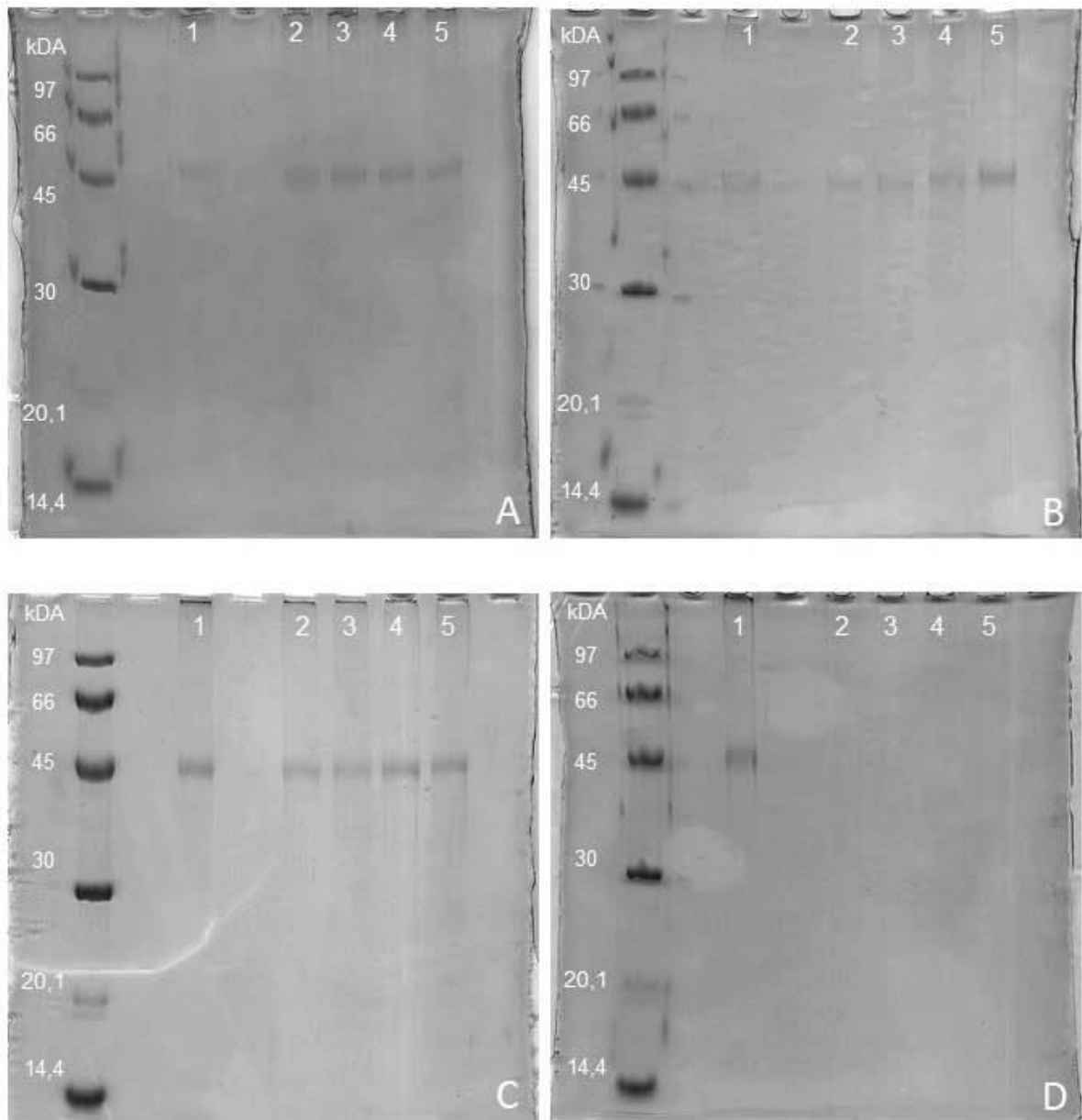


Raias. 1. Extrato inicial; 2. 1h de hidrólise; 3. 3h de hidrólise; 4. 5h de hidrólise; 5. 7h de hidrólise. Amostra proteína da esquerda para direita: A: 13,4; 11,1; 10,6; 10,9; 10,7  $\mu\text{g}$ . B: 13,4; 7,4; 5,0; 4,9; 4,4  $\mu\text{g}$ . C: 13,4; 8,0; 6,7; 6,3; 6,3  $\mu\text{g}$ . D: 13,4; 8,4; 6,1; 6,3; 5,9  $\mu\text{g}$ . Fonte: Autor, 2021.

Analisando as bandas proteicas reveladas nos géis para os produtos de hidrólise do grão de bico (Figura 20), nota-se a manutenção das bandas do gel A, referente ao controle de temperatura, durante as 7h de exposição. No gel B, hidrólise com a enzima livre, nota-se o desaparecimento de algumas bandas na região entre 30 e 45 kDa. No caso da hidrólise com o SM-Glioxil-F, é possível observar a redução

da intensidade das bandas próximas a região de 97kDa. Os futuros resultados de análises em cromatografia líquida de alta eficiência, que ainda estão sendo realizados, proporcionarão mais esclarecimentos e assim, será possível a formação de hipóteses mais concretas sobre a atividade da ficina sobre os substratos.

**Figura 21** – Perfil eletroforético em SDS-PAGE para os extratos hidrolisados de clara de ovo utilizando a ficina livre (B) e os derivados SM-Glioxil-F (C) e SM-Gluta-F (D). Em (A) controle de hidrólise em função da temperatura.



Raias. 1. Extrato inicial; 2. 1h de hidrólise; 3. 3h de hidrólise; 4. 5h de hidrólise; 5. 7h de hidrólise. Amostra proteína da esquerda para direita: A: 5,8; 4,1; 4,7; 5,2; 5,2  $\mu$ g. B: 5,8; 4,2; 3,9; 3,4; 3,4  $\mu$ g. C: 5,8; 3,0; 2,7; 2,8; 2,5  $\mu$ g. D: 5,8; 2,5; 1,3; 0,7; 0,9  $\mu$ g. Fonte: Autor, 2021.

A Figura 21 mostra a banda de proteína encontrada na clara de ovo, ovoalbumina com 45kDa. Não é possível observar uma distinção marcante entre os tempos de hidrólise e nem entre as diferentes formas de ficina utilizadas para hidrólise, com exceção do uso do SM-Gluta-F, que não apresentou nenhuma banda proteica, que pode ainda ser explicado pela mesma hipótese de que as proteínas do substrato se ligaram aos grupos remanescentes do suporte ativado.

As eletroforeses da ora-pro-nóbis, sempre foram um desafio para visualização. Foram feitas diversas tentativas para solução desse desafio, incluindo a concentração de amostras, solubilização em diversos solventes, variação de concentração de acrilamida, entre outros, mas nenhuma das tentativas resultaram em uma solução apropriada. É possível apenas observar o acúmulo de proteínas no início da raia, mas não é possível visualizar diferenças entre os métodos utilizados para hidrólise.

#### *5.4.1 Atividade Quelante*

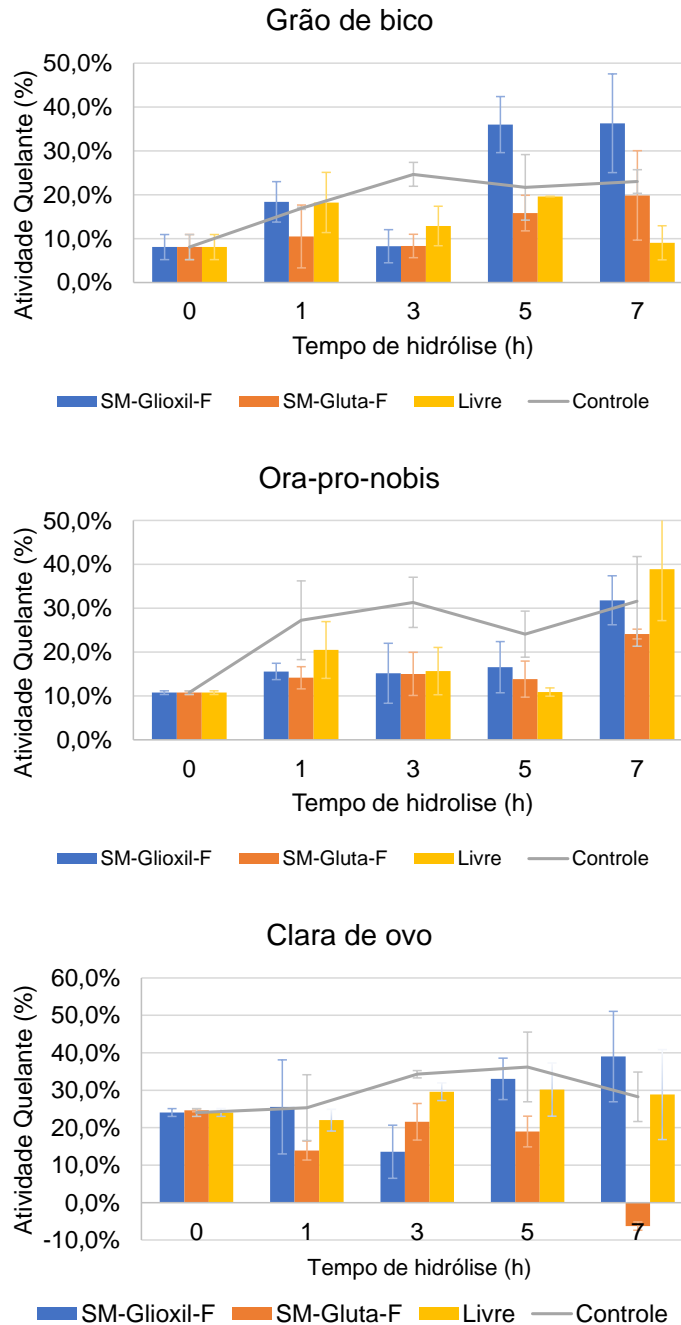
Ferro é um elemento essencial na nutrição humana, fundamental na participação de diversos processos bioquímicos, incluindo transporte de oxigênio, crescimento celular e diferenciação. O déficit desse elemento pode causar problemas de saúde, sendo o efeito mais comum, a anemia. Peptídeos que apresentam propriedades quelantes constituem uma alternativa que proporciona o aumento da biodisponibilidade e absorção de ferro complexado. A atividade quelante de peptídeos pode ser associada à presença de certos aminoácidos específicos, como a histidina e arginina (TORRES-FUENTES; ALAIZ; VIOQUE, 2012; WU et al., 2020).

A Figura 22 mostra a atividade quelante dos substratos antes e durante a hidrólise. A hidrólise do grão de bico permitiu o aumento da atividade quelante de ferro comparada ao controle de temperatura, a partir de 5h de reação. Na literatura já foi relatada a atividade quelante vinculada às proteínas do grão de bico, entretanto a separação das frações de peptídeos por cromatografia de exclusão mostra que as frações obtidas apresentam melhor atividade quelante do que o hidrolisado original (TORRES-FUENTES; ALAIZ; VIOQUE, 2012).

No caso da ora-pro-nóbis, a amostra controle indica que a temperatura afetou significativamente a atividade quelante de ferro, comparada a sua condição inicial.

Apenas ao final das 7h de hidrólise o extrato apresentou um aumento da atividade quando hidrolisado com a ficina livre, com uma diferença de 7,8% entre o controle de temperatura. Com a clara de ovo a mesma tendência foi observada, com a atividade quelante superando o controle apenas após as 7h de hidrólise, com uma diferença de cerca de 10% com a hidrólise utilizando o SM-Glioxil-F.

**Figura 22** - Atividade quelante de ferro nos hidrolisados de grão de bico, ora-pro-nóbis e clara de ovo, produzidos por ficina livre e imobilizada, SM-Glioxil-F e SM-Gluta-F, e controle de hidrólise em função da temperatura.



Fonte: Autor, 2021

#### 5.4.2 Atividade Antioxidante

Moléculas antioxidantes são moléculas suficientemente estáveis que doam elétrons para radicais livres, neutralizando-os e reduzindo a sua capacidade de causar

danos celulares (LOBO et al., 2010). Atualmente, diversas pesquisas estão voltadas para antioxidantes de origem naturais, como proteínas, extratos fenólicos e vitaminas E e C, como alternativa a compostos sintéticos. Atividade antioxidante é reportada em proteínas de diversas origens, incluindo proteínas componentes de leite, soja, lentilhas, ervilha, grão de bico e ovo (ARCAN; YEMENICIOĞLU, 2007; BENEDÉ; MOLINA, 2020; HAN; BAIK, 2008).

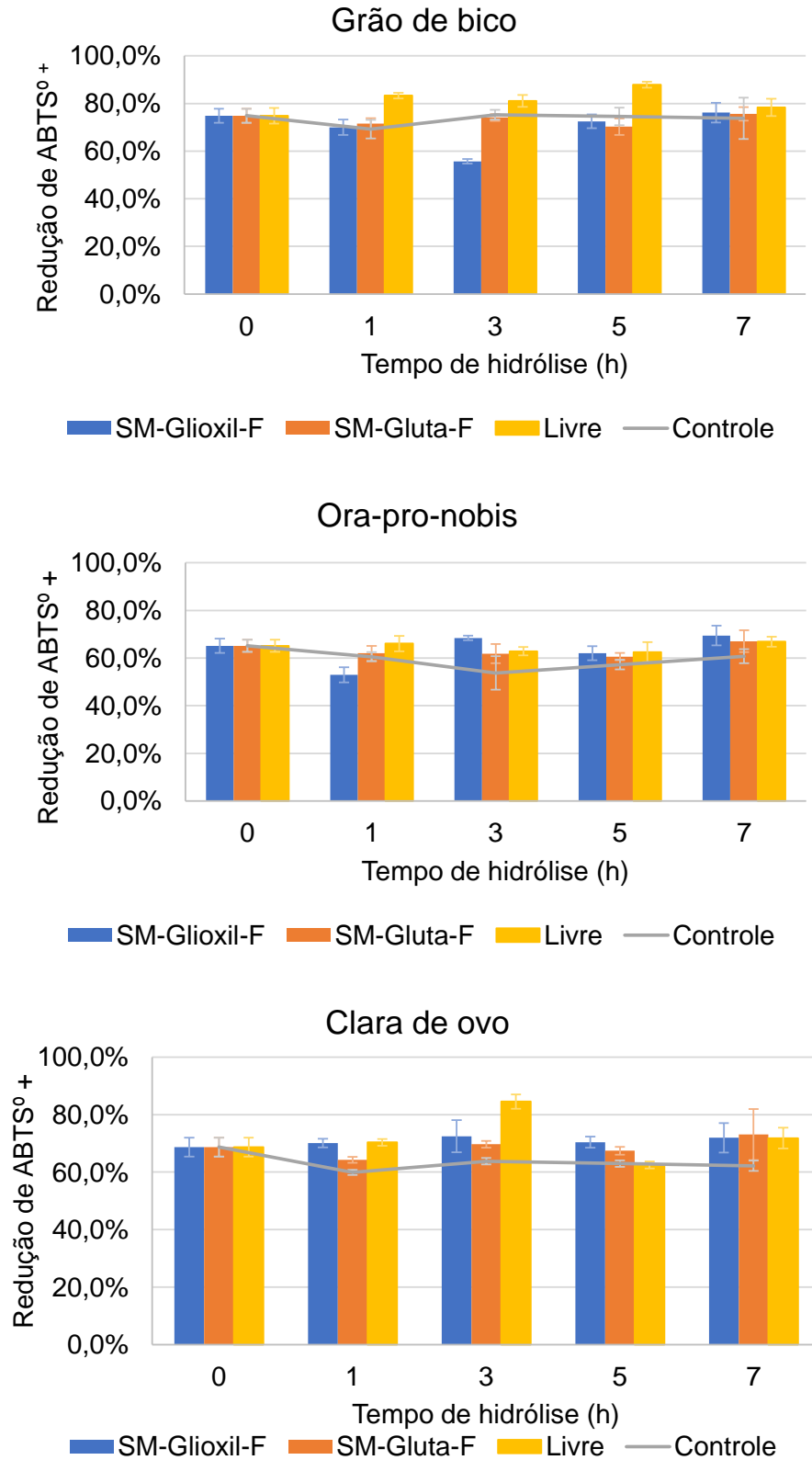
A determinação da atividade antioxidante é baseada na captura do cátion ABTS<sup>+</sup> pelos componentes antioxidantes, promovendo a descoloração da cor verde-escura presente no reagente oxidado para verde-clara, causando um decréscimo da absorbância, proporcional ao aumento da atividade antioxidante. A Figura 23 mostra a atividade antioxidante dos extratos proteicos hidrolisados.

O extrato de grão de bico apresentou maior capacidade antioxidante comparada aos dois outros substratos utilizados. A hidrólise promoveu um ligeiro aumento da atividade após 5h de exposição à ficina na forma livre. Com relação a ora-pro-nóbis, a atividade antioxidante observada permaneceu inalterada durante todo o processo de hidrólise. O mesmo comportamento foi observado na hidrólise da clara de ovo, apresentando um pequeno aumento após 3h de reação, quando hidrolisada com a ficina na forma solúvel.

A interação da ficina com as proteínas dos extratos é singular para cada um dos substratos avaliados. Apesar de já haver a expectativa de obtenção de peptídeos com bioatividade devido à atividade já relacionada aos componentes dos extratos (BOUKID, 2021; LIAO et al., 2018), a hidrólise produz diferentes produtos a partir das diferentes proteínas presentes nos substratos. A avaliação dos diferentes peptídeos produzidos em cada extrato e suas propriedades pode ser foco de diversos estudos para melhor compreensão de cada componente. A avaliação da hidrólise com base na redução de concentração de proteínas, atividade quelante e antioxidante foi necessária para dar seguimento na sequência experimental e avaliar a ação da enzima em diferente modo de operação.



**Figura 23** - Atividade antioxidante nos hidrolisados de grão de bico, ora-pró-nobis e clara de ovo, produzidos por ficina livre e imobilizada, SM-Glioxil-F e SM-Gluta-F, e controle de hidrólise em função da temperatura.



A maior dificuldade de avaliar o verdadeiro resultado da hidrólise em produzir peptídeos que apresentam algum tipo de bioatividade, quelante ou antioxidante, é a análise do extrato produzido na sua forma total, composta de uma mistura de peptídeos ativos e inativos, de diversos tamanhos e sequências de aminoácidos. Dentro da mistura de peptídeos, as sequências que apresentam potencial de características desejadas encontram-se em menor concentração. A separação e concentração dessas amostras poderiam permitir uma melhor conclusão da ação da ficina nos substratos avaliados (NASRI, 2017).

Considerando o conjunto de resultados obtidos, como na redução de proteína, nas bandas observadas nos perfis eletroforéticos, na facilidade de preparo do extrato e no fácil acesso a matéria prima, o extrato de grão de bico foi escolhido como substrato para aplicação na hidrólise em reator de leito fixo operando em modo contínuo. A escolha entre os derivados, foi baseada na atividade final após a hidrólise, melhor resultado de atividade quelante e pela menor incerteza do efeito entre o contato do substrato e o suporte, dessa forma o SM-Glioxil-F foi selecionado para ser utilizado como catalisador na operação do reator de leito fixo.

## **5.5 Hidrólise em reator de leito fixo operando em modo contínuo**

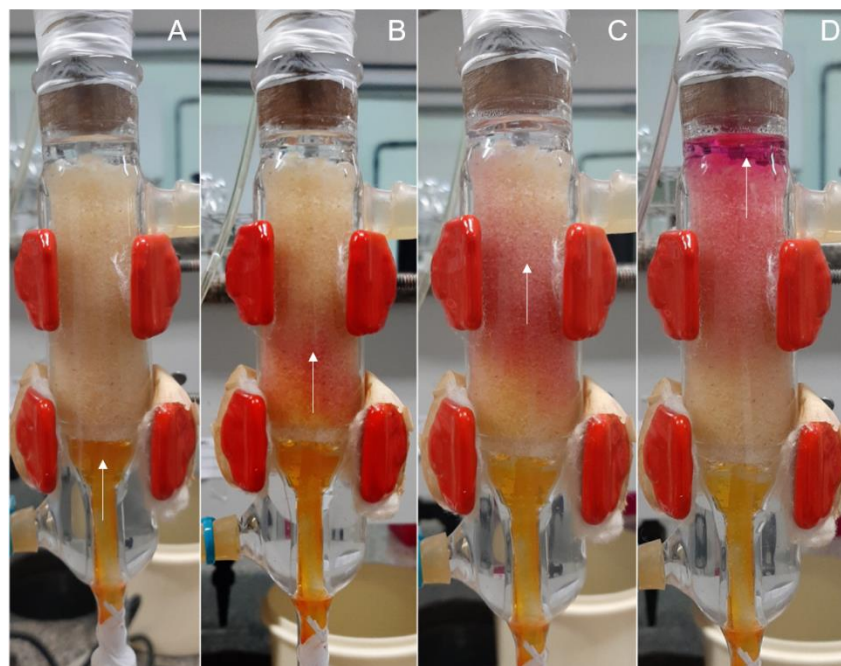
### *5.5.1 Teste de traçador*

O teste de traçador foi realizado permite a determinação da distribuição do tempo de residência (DTR) e conseqüentemente o tempo médio ( $t_m$ ) dos componentes após a entrada no reator. A Figura 24 mostra diferentes períodos do teste de traçador, após a interferência do tipo pulso que inicia o ensaio.

Das alíquotas coletadas durante o teste, foram determinadas as concentrações de corante, através da leitura das amostras em espectrofotômetro a 431 nm, estes resultados foram plotados e se encontram na Figura 25A. Em seguida, foi realizada a determinação da área abaixo do gráfico plotado na Figura 25B, a qual resulta no tempo médio obtido experimentalmente pela variação da concentração do corante ao decorrer do tempo. O tempo médio obtido através do teste foi de 97,2 min. Pela diferença entre o tempo espacial calculado (71 min) é possível dizer que o escoamento dentro do reator não é totalmente ideal e essa diferença de tempos se dá por certo nível de formação de caminhos preferenciais (regiões onde o fluido encontra baixa

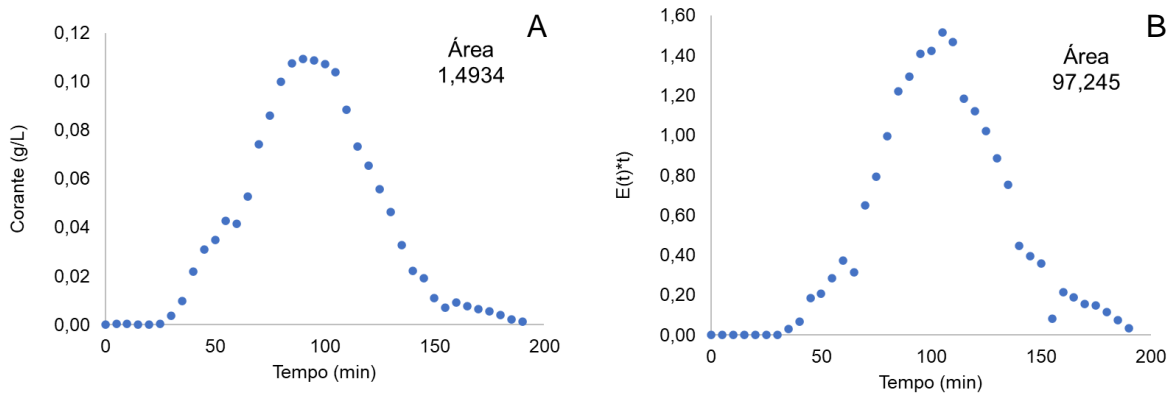
resistência e flui com maior velocidade) devido à distribuição desigual do catalisador no leito ou a formação de zonas mortas (regiões onde o fluido flui com baixa velocidade ou nem flui) (LI, 2017), porém pela ausência de mais de um pico e de uma calda expressiva na Figura 25A, a diferença de tempo está dentro do esperado pelo tipo de suporte utilizado e pela baixa vazão, necessária para manter o substrato em contato com a enzima durante o tempo mínimo estipulado.

**Figura 24** - Teste de traçador. A. Início do ensaio. B e C. Tempos intermediários do ensaio. D. Finalização do ensaio.



Fonte: Autor, 2021

**Figura 25** - Gráfico resposta obtido pela interferência do tipo pulso, realizado para determinação de tempo médio de retenção em no reator de tipo leito fixo A. Concentração de corante por tempo. B) Função  $E(t)*t$  por tempo



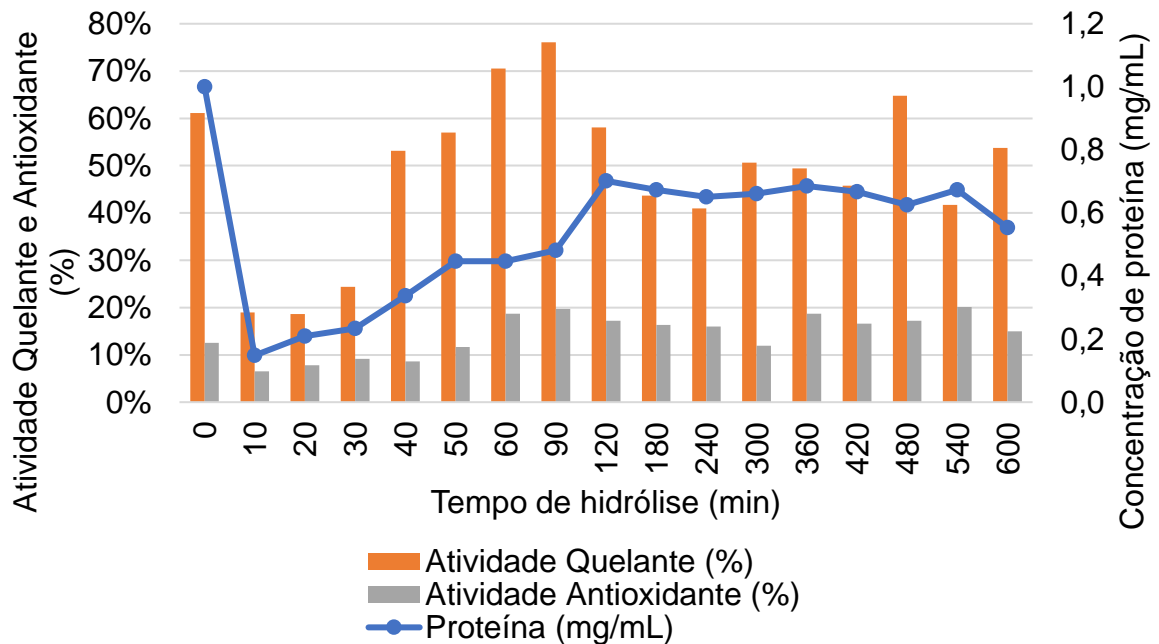
Fonte: Autor, 2021

### 5.5.2 Hidrólise em operação contínua

A Figura 26 apresenta os resultados de concentração de proteínas, atividade quelante e redução de  $ABTS^{0+}$  obtidos a partir da análise das frações coletadas durante as 10h de operação do reator.

O período entre 0 e 180 min de reação corresponde ao período de estabilização do reator, equivalente à cerca de 3 tempos espaciais, após este período é assumido que o reator esteja operando em estado estacionário. A concentração de proteína a partir da terceira hora de operação corresponde a 67,7% da concentração do substrato inicialmente adicionado, valor esse que permaneceu em um mesmo patamar até aproximadamente 10h de operação, produzindo ao final um hidrolisado com 55,3% da concentração inicial de proteínas. O comportamento das atividades quelante e antioxidante determinadas durante a operação mostrou-se relacionado com a variação da concentração de proteína observada.

**Figura 26** - Concentração de proteína, atividade quelante e antioxidante do hidrolisado produzido em reator de leito fixo



Fonte: Autor, 2021

Comparada ao substrato inicial, a atividade quelante apresentou uma pequena redução (em média 79,9% da atividade inicial) após o período de adaptação do reator, mas manteve uma certa estabilidade de valor ao decorrer do tempo, conforme esperado para o estado estacionário do reator. A atividade antioxidante apresentou um aumento relativamente ao substrato inicial (cerca de 31,5% acima da atividade inicial) e, também mostrou uma constância até as 10h de operação.

Ao final da operação o derivado utilizado apresentava 0,54 U/g, correspondente a 41,0% da atividade enzimática inicial. Pela constância da concentração de proteínas obtidas na saída do reator no intervalo entre 3 e 10h de operação, presume-se que a redução da atividade tenha ocorrido durante o período de estabilização do reator, três tempos de residência, redução de acordo com o observado no ensaio de estabilidade anteriormente realizado (Figura 18).

Considerando a vazão de  $0,257 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ , 7g de SM-Glioxil-F e a diferença de concentração de proteínas entre o início da hidrólise (média de  $0,35 \text{ mg mL}^{-1}$  ao decorrer das 10h de hidrólise) o reator apresentou uma produtividade por grama de derivado de  $0,773 \text{ mg g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ . Já no caso da hidrólise em batelada, com uma diferença de proteína de  $0,358 \text{ mg mL}^{-1}$ , 10 mL de extrato, 1g de derivado e 1h de hidrólise,

resultou em uma produtividade de  $3,58 \text{ mg g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ . No entanto, caso seja considerado os valores de concentração ao final das 7h de hidrólise o valor cai para  $0,67 \text{ mg g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ . Apesar do menor valor de produtividade, os valores de atividade quelante obtidos pela hidrólise em reator de leito fixo operado em contínuo foram maiores e mais consistentes com o decorrer do processo.

É difícil fazer a comparação entre os modos de operação do processo de hidrólise já que configurações de um reator e o modo em que ele é operado influenciam fortemente na formação de produto, causando diferenças devido à agitação, transferência de massa e transferência de calor (ATIEMO-OBENG; KRESTA; PAUL, 2004; LUYBEN, 2007).

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados indicam um potencial de uso da enzima ficina. Para continuidade do trabalho e melhor aplicabilidade da enzima, algumas estratégias poderiam ser adicionadas previamente a imobilização. A separação das isoformas da ficina e avaliação das formas isoladas poderiam sanar algumas incertezas sobre os efeitos causados pela mudança de temperatura e pH. Também seria possível imobilizá-las separadamente e avaliar se algumas das isoformas se destacam comparada ao conjunto total de proteínas, permitindo que o processo de imobilização apresente os resultados esperados, com altos valores de atividade recuperada e rendimento de imobilização.

Além disso, a aplicação de planejamento experimental também é uma ferramenta que pode ser implementada para otimizar o processo de imobilização, variando carga proteica, tempo de contato, métodos de ativação e outras inúmeras variáveis que compõe o processo de imobilização.

Com relação à hidrólise, a separação das frações hidrolisadas pode também sanar várias dúvidas com relação à atividade biológica observada até o momento. Com o isolamento de frações que apresentam potencial de bioatividade seria possível otimizar a hidrólise através de condições de operação que garantissem a obtenção de frações específicas com as características desejadas.

Apesar de inúmeras possibilidades de adições ao projeto, é importante reconhecer que os resultados obtidos até o momento constituem uma base para compreensão da enzima ficina e sua aplicação.

## 7 CONCLUSÃO

A enzima ficina extraída do látex de figueira apresentou resultados promissores para sua aplicação, mantendo atividade após sua exposição em condições de pH ácido e alcalinos, assim como em temperaturas altas. Foi possível também imobilizar a enzima em agarose e pó de sabugo de milho, um suporte alternativo de baixo custo, possibilitando avaliar a viabilidade de reuso do catalisador, para aproveitar a sua atividade catalítica e possibilitar a aplicação em biorreatores. O uso do suporte ativado com grupamentos glioxil foi considerado mais apropriado para imobilização da ficina e sua aplicação na hidrólise de extratos proteicos, comparado à outras estratégias implementadas no desenvolver do trabalho. Foram observadas variações de concentrações de proteína nos extratos proteicos utilizados como substratos nas reações de hidrólises utilizando a ficina solúvel e imobilizada, assim como alterações na capacidade quelante dos extratos proteicos proporcionais ao tempo de hidrólise. Através da imobilização foi possível realizar a hidrólise de grão de bico em modo contínuo, que é um dos grandes interesses ao se imobilizar uma enzima. Ainda são necessárias análises complementares para esclarecer a ação da ficina, mas ainda assim, os resultados indicam o potencial de uso da ficina como protease vegetal para produção de hidrolisados proteicos e a suas inúmeras aplicações e o trabalho serve como base para o desenvolvimento de novas investigações.



## REFERÊNCIAS

- ABD EL-SALAM, Mohamed H.; EL-SHIBINY, Safinaz. Natural biopolymers as nanocarriers for bioactive ingredients used in food industries. **Encapsulations**, [S. l.], p. 793–829, 2016. DOI: 10.1016/B978-0-12-804307-3.00019-3.
- ABEYRATHNE, E. D. N. S.; LEE, H. Y.; AHN, D. U. Egg white proteins and their potential use in food processing or as nutraceutical and pharmaceutical agents—A review. **Poultry Science**, [S. l.], v. 92, n. 12, p. 3292–3299, 2013. DOI: 10.3382/PS.2013-03391.
- AGUIAR, Caroline Mariana De. **Hidrólise enzimática de resíduos lignocelulósicos utilizando celulases produzidas pelo fungo *Aspergillus niger***. 2010. Universidade Estadual do Oeste do Parana, [S. l.], 2010. Disponível em: <http://tede.unioeste.br/handle/tede/1886>.
- AGUIAR, P. G.; ROCHESTER, R. L. O.; GONÇALVES, J. C. Estudo da distribuição do tempo de residência no escoamento entre compartimentos de unidade de flotação. In: 2019, Uberlândia. **Anais** [...]. Uberlândia Disponível em: <http://cobeqic2019.com.br/trabalhosfinais/EST7.pdf>. Acesso em: 9 nov. 2021.
- AHMED, Faiyaz; UROOJ, Asna. Traditional uses, medicinal properties, and phytopharmacology of *Ficus racemosa*: A review. <https://doi.org/10.3109/13880200903241861>, [S. l.], v. 48, n. 6, p. 672–681, 2010. DOI: 10.3109/13880200903241861. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.3109/13880200903241861>. Acesso em: 14 out. 2021.
- AIDER, Mohammed. Potential applications of ficin in the production of traditional cheeses and protein hydrolysates. **JDS Communications**, [S. l.], v. 2, n. 5, p. 233–237, 2021. DOI: 10.3168/JDSC.2020-0073.
- AITA, Bruno C.; SPANNEMBERG, Stéfani S.; SCHMALTZ, Silvana; ZABOT, Giovanni L.; TRES, Marcus V.; KUHN, Raquel C.; MAZUTTI, Marcio A. Production of cell-wall degrading enzymes by solid-state fermentation using agroindustrial residues as substrates. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, [S. l.], v. 7, n. 3, p. 103193, 2019. DOI: 10.1016/J.JECE.2019.103193.
- ARCAN, Iskender; YEMENICIOĞLU, Ahmet. Antioxidant activity of protein extracts from heat-treated or thermally processed chickpeas and white beans. **Food Chemistry**, [S. l.], v. 103, n. 2, p. 301–312, 2007. DOI: 10.1016/j.foodchem.2006.07.050. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S030881460600642X>.
- ASGHER, Muhammad; BASHIR, Fareeha; IQBAL, Hafiz M. N. Protease-based cross-linked enzyme aggregates with improved catalytic stability, silver removal, and dehairing potentials. **International Journal of Biological Macromolecules**, [S. l.], v. 118, p. 1247–1256, 2018. DOI: 10.1016/J.IJBIOMAC.2018.06.107.
- ATIEMO-OBENG, Victor A.; KRESTA, Suzanne M.; PAUL, Edward L. **Handbook of Industrial Mixing**. [s.l.] : John Wiley & Sons, Incorporated, 2004.
- BADGUJAR, Shamkant B.; PATEL, Vainav V.; BANDIVDEKAR, Atmaram H.; MAHAJAN, Raghunath T. Traditional uses, phytochemistry and pharmacology of *Ficus carica* : A review. **Pharmaceutical Biology**, [S. l.], v. 52, n. 11, p. 1487–1503, 2014. DOI: 10.3109/13880209.2014.892515. Disponível em: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/13880209.2014.892515>.
- BADOEI-DALFARD, Arastoo; TAHAMI, Arefeh; KARAMI, Zahra. Lipase immobilization on glutaraldehyde activated graphene oxide/chitosan/cellulose acetate

electrospun nanofibrous membranes and its application on the synthesis of benzyl acetate. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, [S. l.], v. 209, p. 112151, 2022. DOI: 10.1016/J.COLSURFB.2021.112151.

BAIDAMSHINA, Diana R. et al. Anti-biofilm and wound-healing activity of chitosan-immobilized Ficin. **International Journal of Biological Macromolecules**, [S. l.], v. 164, p. 4205–4217, 2020. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2020.09.030. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0141813020343841>. Acesso em: 1 nov. 2021.

BAIDAMSHINA, Diana R.; TRIZNA, Elena Y.; HOLYAVKA, Marina G.; BOGACHEV, Mikhail I.; ARTYUKHOV, Valeriy G.; AKHATOVA, Farida S.; ROZHINA, Elvira V.; FAKHRULLIN, Rawil F.; KAYUMOV, Airat R. Targeting microbial biofilms using Ficin, a nonspecific plant protease. **Scientific Reports**, [S. l.], v. 7, n. 1, p. 46068, 2017. DOI: 10.1038/srep46068.

BASSAN, Juliana; DE SOUZA BEZERRA, Thaís; PEIXOTO, Guilherme; DA CRUZ, Clariana; GALÁN, Julián; VAZ, Aline; GARRIDO, Saulo; FILICE, Marco; MONTI, Rubens. Immobilization of Trypsin in Lignocellulosic Waste Material to Produce Peptides with Bioactive Potential from Whey Protein. **Materials**, [S. l.], v. 9, n. 5, p. 357, 2016. DOI: 10.3390/ma9050357. Disponível em: <http://www.mdpi.com/1996-1944/9/5/357>.

BENEDÉ, Sara; MOLINA, Elena. Chicken Egg Proteins and Derived Peptides with Antioxidant Properties. **Foods**, [S. l.], v. 9, n. 6, p. 735, 2020. DOI: 10.3390/foods9060735. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2304-8158/9/6/735>.

BERNAL, Claudia; MARCIELLO, Marzia; MESA, Monica; SIERRA, Ligia; FERNANDEZ-LORENTE, Gloria; MATEO, Cesar; GUIBAN, Jose M. Immobilisation and stabilisation of  $\beta$ -galactosidase from *Kluyveromyces lactis* using a glyoxyl support. **International Dairy Journal**, [S. l.], v. 28, n. 2, p. 76–82, 2013. a. DOI: 10.1016/J.IDAIRYJ.2012.08.009.

BERNAL, Claudia; URRUTIA, Paulina; ILLANES, Andrés; WILSON, Lorena. Hierarchical meso-macroporous silica grafted with glyoxyl groups: Opportunities for covalent immobilization of enzymes. **New Biotechnology**, [S. l.], v. 30, n. 5, p. 500–506, 2013. b. DOI: 10.1016/j.nbt.2013.01.011.

BILAL, Muhammad; JING, Zhang; ZHAO, Yuping; IQBAL, Hafiz M. N. Immobilization of fungal laccase on glutaraldehyde cross-linked chitosan beads and its bio-catalytic potential to degrade bisphenol A. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, [S. l.], v. 19, p. 101174, 2019. DOI: 10.1016/J.BCAB.2019.101174.

BORNAZ, Salwa; GUIZANI, Nejib; FELLAH, Nizar; SAHLI, Ali; SLAMA, Mourad Ben; ATTIA, Hamadi. Effect of Plant Originated Coagulants and Chymosin on Ovine Milk Coagulation. <http://dx.doi.org/10.1080/10942910802144238>, [S. l.], v. 13, n. 1, p. 10–22, 2010. DOI: 10.1080/10942910802144238. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10942910802144238>. Acesso em: 22 out. 2021.

BOUKID, Fatma. Chickpea (*Cicer arietinum* L.) protein as a prospective plant-based ingredient: a review. **International Journal of Food Science & Technology**, [S. l.], v. 56, n. 11, p. 5435–5444, 2021. DOI: 10.1111/IJFS.15046. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/ijfs.15046>. Acesso em: 13 nov. 2021.

BRENA, Beatriz; GONZÁLEZ-POMBO, Paula; BATISTA-VIERA, Francisco. Immobilization of Enzymes: A Literature Survey. *In: Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*. [s.l.] : Methods Mol Biol, 2013. v. 1051p. 15–31. DOI: 10.1007/978-1-62703-550-7\_2. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23934795/>. Acesso em: 25 out. 2021.

BRUGNARI, Tatiane et al. A highly reusable MANAE-agarose-immobilized *Pleurotus ostreatus* laccase for degradation of bisphenol A. **Science of The Total Environment**, [S. l.], v. 634, p. 1346–1351, 2018. DOI: 10.1016/J.SCITOTENV.2018.04.051.

CACICEDO, Maximiliano L.; MANZO, Ricardo M.; MUNICOY, Sofía; BONAZZA, Horacio L.; ISLAN, German A.; DESIMONE, Martín; BELLINO, Martín; MAMMARELLA, Enrique J.; CASTRO, Guillermo R. **Immobilized enzymes and their applications**. [s.l: s.n.]. DOI: 10.1016/B978-0-444-64114-4.00007-8.

CAO, Linqiu. **Carrier-bound Immobilized Enzymes: Principles, Application and Design**. [s.l: s.n.]. DOI: 10.1002/3527607668.

CASTILLO, Brian; DASGUPTA, Amitava; KLEIN, Kimberly; TINT, Hlaing; WAHED, Amer. Blood bank testing. **Transfusion Medicine for Pathologists**, [S. l.], p. 51–68, 2018. DOI: 10.1016/B978-0-12-814313-1.00004-6.

CHAKRABARTI, Subhadeep; GUHA, Snigdha; MAJUMDER, Kaustav. Food-Derived Bioactive Peptides in Human Health: Challenges and Opportunities. **Nutrients**, [S. l.], v. 10, n. 11, p. 1738, 2018. DOI: 10.3390/nu10111738.

CHEN, Zhongqin; WANG, Yanwei; LIU, Wei; WANG, Jingya; CHEN, Haixia. A novel cross-linked enzyme aggregates (CLEAs) of papain and neutrase-production, partial characterization and application. **International Journal of Biological Macromolecules**, [S. l.], v. 95, p. 650–657, 2017. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2016.11.083.

CORICI, L.; FERRARIO, V.; PELLIS, A.; EBERT, C.; LOTTERIA, S.; CANTONE, S.; VOINOVICH, D.; GARDOSI, L. Large scale applications of immobilized enzymes call for sustainable and inexpensive solutions: rice husks as renewable alternatives to fossil-based organic resins. **RSC Advances**, [S. l.], v. 6, n. 68, p. 63256–63270, 2016. DOI: 10.1039/C6RA12065B. Disponível em: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2016/ra/c6ra12065b>. Acesso em: 13 nov. 2021.

CRISOSTO, H.; FERGUSON, L.; BREMER, V.; STOVER, E.; COLELLI, G. Fig (*Ficus carica* L.). **Postharvest Biology and Technology of Tropical and Subtropical Fruits: Cocona to Mango**, [S. l.], p. 134–160e, 2011. DOI: 10.1533/9780857092885.134.

CUTIÑO-AVILA, Bessy et al. Computer-aided design of bromelain and papain covalent immobilization. **Revista Colombiana de Biotecnología**, [S. l.], 2014. DOI: 10.15446/rev.colomb.biote.v16n1.44184.

CUTIÑO-AVILA, Bessy; PRADAS, Dayrom Gil; ABREU, Carlos Aragón. Computer-aided design of bromelain and papain covalent immobilization Diseño asistido por computadora de la inmovilización covalente de bromelina y papaína. [S. l.], v. XVI, n. 1, p. 19–28, 2014.

DA SILVA, Ronivaldo Rodrigues. Bacterial and Fungal Proteolytic Enzymes: Production, Catalysis and Potential Applications. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, [S. l.], v. 183, n. 1, p. 1–19, 2017. DOI: 10.1007/s12010-017-2427-2.

DAL MAGRO, L.; KORNECKI, Jakub F.; KLEIN, Manuela P.; RODRIGUES, Rafael C.; FERNANDEZ-LAFUENTE, Roberto. Pectin lyase immobilization using the glutaraldehyde chemistry increases the enzyme operation range. **Enzyme and Microbial Technology**, [S. l.], v. 132, p. 109397, 2020. DOI: 10.1016/J.ENZMICTEC.2019.109397.

DATTA, Sumitra; CHRISTENA, L. Rene; RAJARAM, Yamuna Rani Sriramulu. Enzyme immobilization: an overview on techniques and support materials. **3 Biotech**, [S. l.], v. 3, n. 1, p. 1–9, 2013. DOI: 10.1007/s13205-012-0071-7. Disponível em:

<http://link.springer.com/10.1007/s13205-012-0071-7>.

DAYRELL, M. de S.; VIEIRA, E. C. Leaf protein concentrate of the cactacea *Pereskia aculeata* Mill. I. Extraction and composition. **Nutrition reports international**, [S. l.], 1977.

DE ALBUQUERQUE, Tiago L.; PEIRCE, Sara; RUEDA, Nazzoly; MARZOCHELLA, Antonio; GONÇALVES, Luciana R. B.; ROCHA, Maria Valderez Ponte; FERNANDEZ-LAFUENTE, Roberto. Ion exchange of  $\beta$ -galactosidase: The effect of the immobilization pH on enzyme stability. **Process Biochemistry**, [S. l.], v. 51, n. 7, p. 875–880, 2016. DOI: 10.1016/J.PROCBIO.2016.03.014.

DE CORATO, Ugo; DE BARI, Isabella; VIOLA, Egidio; PUGLIESE, Massimo. Assessing the main opportunities of integrated biorefining from agro-bioenergy co/by-products and agroindustrial residues into high-value added products associated to some emerging markets: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, [S. l.], v. 88, p. 326–346, 2018. DOI: 10.1016/j.rser.2018.02.041. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1364032118300686>.

DHILLON, A.; SHARMA, K.; RAJULAPATI, V.; GOYAL, A. Proteolytic Enzymes. **Current Developments in Biotechnology and Bioengineering: Production, Isolation and Purification of Industrial Products**, [S. l.], p. 149–173, 2017. DOI: 10.1016/B978-0-444-63662-1.00007-5.

DIMITROV, I.; TSVETANOV, C. B. High-Molecular-Weight Poly(ethylene oxide). **Polymer Science: A Comprehensive Reference, 10 Volume Set**, [S. l.], v. 4, p. 551–569, 2012. DOI: 10.1016/B978-0-444-53349-4.00100-X.

DUTRA, Alice. **Grão-de-bico: baixo custo, fácil adaptação e alta rentabilidade**. 2021. Disponível em: <https://blog.syngentadigital.ag/grao-de-bico-baixo-custo-facil-adaptacao-e-alta-rentabilidade/>. Acesso em: 13 nov. 2021.

ENCYCLOPÆDIA BRITANNICA. **Ripening figs on a common fig tree (*Ficus carica*)**. [s.d.]. Disponível em: <https://www.britannica.com/plant/fig#/media/1/206536/240799>. Acesso em: 31 ago. 2021.

ERLANDSSON, Ann; ERIKSSON, David; JOHANSSON, Lennart; RIKLUND, Katrine; STIGBRAND, Torgny; SUNDSTRÖM, Birgitta Elisabeth. In vivo clearing of idiotypic antibodies with antiidiotypic antibodies and their derivatives. **Molecular Immunology**, [S. l.], v. 43, n. 6, p. 599–606, 2006. DOI: 10.1016/J.MOLIMM.2005.04.019.

FADÝLOĞLU, S. Immobilization and characterization of ficin. **Nahrung - Food**, [S. l.], v. 45, n. 2, p. 143–146, 2001. DOI: 10.1002/1521-3803(20010401)45:2<143::AID-FOOD143>3.0.CO;2-8.

FAO. **FAOSTAT**. 2021. Disponível em: <http://www.fao.org/faostat/en/#data>. Acesso em: 1 set. 2021.

FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; ROSELL, C. M.; RODRIGUEZ, V.; SANTANA, C.; SOLER, G.; BASTIDA, A.; GUISÁN, Jose M. Preparation of activated supports containing low pK amino groups. A new tool for protein immobilization via the carboxyl coupling method. **Enzyme and Microbial Technology**, [S. l.], v. 15, n. 7, p. 546–550, 1993. DOI: 10.1016/0141-0229(93)90016-U.

FOGLER, H. Scott. **Elementos de engenharia das reações químicas**. [s.l.] : LTC, 2002.

FORBES. **Produção total de milho do Brasil em 2020/21 pode recuar em mais de 20 milhões de toneladas ante a safra passada - Forbes Brasil**. 2021. Disponível em: <https://forbes.com.br/forbesagro/2021/09/producao-total-de-milho-do-brasil-em-2020-21-pode-recuar-em-mais-de-20-milhoes-de-toneladas-ante-a-safra>

passada/. Acesso em: 13 nov. 2021.

GAGAOUA, Mohammed; BOUCHERBA, Nawel; BOUANANE-DARENFED, Amel; ZIANE, Ferhat; NAIT-RABAH, Sabrina; HAFID, Kahina; BOUDECHICHA, Hiba-Ryma Ryma. Three-phase partitioning as an efficient method for the purification and recovery of ficin from Mediterranean fig (*Ficus carica* L.) latex. **Separation and Purification Technology**, [S. l.], v. 132, p. 461–467, 2014. DOI: 10.1016/j.seppur.2014.05.050.

GARCIA, Jéssica A. A. et al. Phytochemical profile and biological activities of “Ora-pro-nobis” leaves (*Pereskia aculeata* Miller), an underexploited superfood from the Brazilian Atlantic Forest. **Food Chemistry**, [S. l.], v. 294, p. 302–308, 2019. DOI: 10.1016/J.FOODCHEM.2019.05.074.

GHRIBI, Abir Mokni et al. Effects of enzymatic hydrolysis on conformational and functional properties of chickpea protein isolate. **Food Chemistry**, [S. l.], v. 187, p. 322–330, 2015. a. DOI: 10.1016/j.foodchem.2015.04.109. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.04.109>.

GHRIBI, Abir Mokni et al. Purification and identification of novel antioxidant peptides from enzymatic hydrolysate of chickpea (*Cicer arietinum* L.) protein concentrate. **Journal of Functional Foods**, [S. l.], v. 12, p. 516–525, 2015. b. DOI: 10.1016/j.jff.2014.12.011. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1756464614003909>.

GIRELLI, Anna Maria; ASTOLFI, Maria Luisa; SCUTO, Francesca Romana. Agro-industrial wastes as potential carriers for enzyme immobilization: A review. **Chemosphere**, [S. l.], v. 244, p. 125368, 2020. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2019.125368. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0045653519326086>. Acesso em: 26 out. 2021.

GIRÓN-CALLE, Julio; ALAIZ, Manuel; VIOQUE, Javier. Effect of chickpea protein hydrolysates on cell proliferation and in vitro bioavailability. **Food Research International**, [S. l.], v. 43, n. 5, p. 1365–1370, 2010. DOI: 10.1016/j.foodres.2010.03.020. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0963996910001018>. Acesso em: 17 nov. 2021.

GUISÁN, Jose M. **Immobilization of Enzymes and Cells**. Totowa, NJ: Humana Press, 2013. v. 1051 DOI: 10.1007/978-1-62703-550-7.

GUISÁN, Jose M.; BASTIDA, Agatha; BLANCO, Rosa M.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, Roberto; GARCÍA-JUNCEDA, Eduardo. Immobilization of enzymes on glyoxyl agarose. **Methods in Biotechnology . Immobilization of Enzymes and Cells**, [S. l.], v. 1, p. 277–287, 1997. DOI: 10.1385/0-89603-386-4:277.

GÜR, Sinem Diken; İDİL, Neslihan; AKSÖZ, Nilüfer. Optimization of Enzyme Co-Immobilization with Sodium Alginate and Glutaraldehyde-Activated Chitosan Beads. **Applied Biochemistry and Biotechnology** 2017 **184:2**, [S. l.], v. 184, n. 2, p. 538–552, 2017. DOI: 10.1007/S12010-017-2566-5. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s12010-017-2566-5>. Acesso em: 30 out. 2021.

HAN, Hwa; BAIK, Byung-Kee. Antioxidant activity and phenolic content of lentils (*Lens culinaris*), chickpeas (*Cicer arietinum* L.), peas (*Pisum sativum* L.) and soybeans (*Glycine max*), and their quantitative changes during processing. **International Journal of Food Science & Technology**, [S. l.], v. 43, n. 11, p. 1971–1978, 2008. DOI: 10.1111/j.1365-2621.2008.01800.x. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2621.2008.01800.x>.

HANSSON, Anders; ZELADA, Julio C.; NORIEGA, Hugo P. Reevaluation of risks with the use of *Ficus insipida* latex as a traditional anthelmintic remedy in the Amazon. **Journal of Ethnopharmacology**, [S. l.], v. 98, n. 3, p. 251–257, 2005. DOI: 10.1016/J.JEP.2004.12.029.

HARTH, Stefan; FRISCH, Christian. Recombinant Anti-idiotypic Antibodies in Ligand Binding Assays for Antibody Drug Development. **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**, [S. l.], v. 2261, p. 291–306, 2021. DOI: 10.1007/978-1-0716-1186-9\_18. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33420997/>. Acesso em: 16 nov. 2021.

HECHT, Hadas; SREBNIK, Simcha. Structural Characterization of Sodium Alginate and Calcium Alginate. **Biomacromolecules**, [S. l.], v. 17, n. 6, p. 2160–2167, 2016. DOI: 10.1021/ACS.BIOMAC.6B00378. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/full/10.1021/acs.biomac.6b00378>. Acesso em: 30 out. 2021.

HOMAEI, Ahmad; STEVANATO, Roberto; ETEMADIPOUR, Rasoul; HEMMATI, Roohullah. Purification, catalytic, kinetic and thermodynamic characteristics of a novel ficin from *Ficus johannis*. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, [S. l.], v. 10, n. February, p. 360–366, 2017. DOI: 10.1016/j.bcab.2017.04.008. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1878818117300920>. Acesso em: 31 ago. 2021.

JESIONOWSKI, Teofil; ZDARTA, Jakub; KRAJEWSKA, Barbara. Enzyme immobilization by adsorption: a review. **Adsorption**, [S. l.], v. 20, n. 5–6, p. 801–821, 2014.

KHANAHMADI, Morteza; AREZI, Iman; AMIRI, Motahharez sadat; MIRANZADEH, Mokhtar. Bioprocessing of agro-industrial residues for optimization of xylanase production by solid- state fermentation in flask and tray bioreactor. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, [S. l.], v. 13, p. 272–282, 2018. DOI: 10.1016/J.BCAB.2018.01.005.

KIM, Sang Bum; SEO, Il Seong; KHAN, Muhammad Ajmal; KI, Kwang Seok; NAM, Myoung Soo; KIM, Hyeon Shup. Separation of iron-binding protein from whey through enzymatic hydrolysis. **International Dairy Journal**, [S. l.], v. 17, n. 6, p. 625–631, 2007.

KONNO, Kotaro. Plant latex and other exudates as plant defense systems: Roles of various defense chemicals and proteins contained therein. **Phytochemistry**, [S. l.], v. 72, n. 13, p. 1510–1530, 2011. DOI: 10.1016/j.phytochem.2011.02.016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.phytochem.2011.02.016>.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, [S. l.], 1970. DOI: 10.1038/227680a0.

LANSKY, Ephraim Philip; PAAVILAINEN, Helena Maaria. **Figs**. [s.l.] : CRC Press, 2010. DOI: 10.1201/9781420089677. Disponível em: <https://www.taylorfrancis.com/books/9781420089677>.

LARANJEIRA, Mauro C. M.; FÁVERE, Valfredo T. De. Quitosana: biopolímero funcional com potencial industrial biomédico. **Química Nova**, [S. l.], v. 32, n. 3, p. 672–678, 2009. DOI: 10.1590/S0100-40422009000300011. Disponível em: <http://www.scielo.br/j/qn/a/zMQsDMRnPPXXbBFWbsSspzs/?lang=pt>. Acesso em: 1 nov. 2021.

LI, Dongdong; ZHANG, Haihong; MA, Lu; TAO, Yingmei; LIU, Jun; LIU, Dunhua. Effects of ficin, high pressure and their combination on quality attributes of post-rigor tan mutton. **LWT**, [S. l.], v. 137, p. 110407, 2021. DOI: 10.1016/j.lwt.2020.110407.

LI, Shaofen. Residence Time Distribution and Flow Models for Reactors. *In*: **Chemical Reaction Engineering**. [s.l.] : Elsevier, 2017. p. 213–263. DOI:

10.1016/B978-0-12-410416-7.00005-7. Disponível em:  
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780124104167000057>.

LIAO, Wang; JAHANDIDEH, Forough; FAN, Hongbing; SON, Myoungjin; WU, Jianping. Egg Protein-Derived Bioactive Peptides: Preparation, Efficacy, and Absorption. **Advances in Food and Nutrition Research**, [S. l.], v. 85, p. 1–58, 2018. DOI: 10.1016/BS.AFNR.2018.02.001.

LIU, Yue; CHEN, Jonathan Y. Enzyme immobilization on cellulose matrixes. **Journal of Bioactive and Compatible Polymers**, [S. l.], v. 31, n. 6, p. 553–567, 2016. DOI: 10.1177/0883911516637377. Disponível em:  
<http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/0883911516637377>.

LOBO, V.; PATIL, A.; PHATAK, A.; CHANDRA, N. Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. **Pharmacognosy Reviews**, [S. l.], v. 4, n. 8, p. 118, 2010. DOI: 10.4103/0973-7847.70902. Disponível em:  
<http://www.phcogrev.com/article/2010/4/8/1041030973-784770902>.

LOW, Yit Hwei; AGBOOLA, Samson; ZHAO, Jian; LIM, Mee Yi. Clotting and proteolytic properties of plant coagulants in regular and ultrafiltered bovine skim milk. **International Dairy Journal**, [S. l.], v. 16, n. 4, p. 335–343, 2006. DOI: 10.1016/J.IDAIRYJ.2005.03.013.

LUYBEN, W. L. **Chemical Reactor Design and Control**. [s.l.] : Wiley, 2007. Disponível em: <https://books.google.com.br/books?id=P-zvB8z3djYC>.

MARTIN, Andressa Amado; DE FREITAS, Rilton Alves; SASSAKI, Guilherme Lanzi; EVANGELISTA, Paulo Henrique Labiak; SIERAKOWSKI, Maria Rita. Chemical structure and physical-chemical properties of mucilage from the leaves of *Pereskia aculeata*. **Food Hydrocolloids**, [S. l.], v. 70, p. 20–28, 2017. DOI: 10.1016/J.FOODHYD.2017.03.020.

MATEO, César et al. Glyoxyl agarose: A fully inert and hydrophilic support for immobilization and high stabilization of proteins. **Enzyme and Microbial Technology**, [S. l.], v. 39, n. 2, p. 274–280, 2006. DOI: 10.1016/j.enzmictec.2005.10.014. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0141022905004588>. Acesso em: 7 nov. 2021.

MATEO, Cesar; PALOMO, Jose M.; FERNANDEZ-LORENTE, Gloria; GUIŚÁN, Jose M.; FERNANDEZ-LAFUENTE, Roberto. Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. **Enzyme and Microbial Technology**, [S. l.], v. 40, n. 6, p. 1451–1463, 2007. DOI: 10.1016/j.enzmictec.2007.01.018. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0141022907000506>.

MAZORRA-MANZANO, M. A.; RAMÍREZ-SUAREZ, J. C.; YADA, R. Y. **Plant proteases for bioactive peptides release: A review** **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, 2018. DOI: 10.1080/10408398.2017.1308312.

MENG, Shi; TAN, Yuqing; CHANG, Sam; LI, Jiaxu; MALEKI, Soheila; PUPPALA, Naveen. Peanut allergen reduction and functional property improvement by means of enzymatic hydrolysis and transglutaminase crosslinking. **Food Chemistry**, [S. l.], v. 302, p. 125186, 2020. DOI: 10.1016/j.foodchem.2019.125186.

MILOŠEVIĆ, Jelica; VRHOVAC, Lidija; ĐURKOVIĆ, Filip; JANKOVIĆ, Brankica; MALKOV, Saša; LAH, Jurij; POLOVIĆ, Natalija Đ. D. Isolation, identification, and stability of Ficin 1c isoform from fig latex. **New Journal of Chemistry**, [S. l.], v. 44, n. 36, p. 15716–15723, 2020. DOI: 10.1039/D0NJ02938F. Disponível em: <http://xlink.rsc.org/?DOI=D0NJ02938F>. Acesso em: 15 set. 2021.

MOOD, Sohrab Haghghi; GOLFESHAN, Amir Hossein; TABATABAEI, Meisam; JOUZANI, Gholamreza Salehi; NAJAFI, Gholam Hassan; GHOLAMI, Mehdi; ARDJMAND, Mehdi. Lignocellulosic biomass to bioethanol, a comprehensive review

with a focus on pretreatment. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, [S. l.], v. 27, p. 77–93, 2013. DOI: 10.1016/j.rser.2013.06.033. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1364032113004103>.

MORELLON-STERLING, Roberto; CARBALLARES, Diego; ARANA-PEÑA, Sara; SIAR, El Hocine; BRAHAM, Sabrina Ait; FERNANDEZ-LAFUENTE, Roberto. Advantages of Supports Activated with Divinyl Sulfone in Enzyme Coimmobilization: Possibility of Multipoint Covalent Immobilization of the Most Stable Enzyme and Immobilization via Ion Exchange of the Least Stable Enzyme. **ACS Sustainable Chemistry and Engineering**, [S. l.], v. 9, n. 22, p. 7508–7518, 2021. DOI: 10.1021/ACSSUSCHEMENG.1C01065/SUPPL\_FILE/SC1C01065\_SI\_001.PDF. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/full/10.1021/acssuschemeng.1c01065>. Acesso em: 12 nov. 2021.

MORELLON-STERLING, Roberto; EL-SIAR, Hocine; TAVANO, Olga L.; BERENQUER-MURCIA, Ángel; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, Roberto. Ficin: A protease extract with relevance in biotechnology and biocatalysis. **International Journal of Biological Macromolecules**, [S. l.], v. 162, n. June, p. 394–404, 2020. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2020.06.144.

NASRI, M. Protein Hydrolysates and Biopeptides. *In*: [s.l.: s.n.]. p. 109–159. DOI: 10.1016/bs.afnr.2016.10.003. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1043452616300572>.

NESTLÉ. **Costelinha com Ora-pró-nóbis | Receitas Nestlé**. 2019. Disponível em: [https://www.receitasnestle.com.br/programa/brasil-sabores-mil/costelinha-com-ora-pro-nobis?utm\\_source=youtube&utm\\_medium=portal&utm\\_content=nlab-portal-youtube-Receitas\\_Nestle\\_Receitas-video-233s-receitas-cpc-na18\\_mais-bsmt2ep51411&utm\\_campaign](https://www.receitasnestle.com.br/programa/brasil-sabores-mil/costelinha-com-ora-pro-nobis?utm_source=youtube&utm_medium=portal&utm_content=nlab-portal-youtube-Receitas_Nestle_Receitas-video-233s-receitas-cpc-na18_mais-bsmt2ep51411&utm_campaign). Acesso em: 17 nov. 2021.

NGUYEN, Hoang Hiep; KIM, Moonil. An Overview of Techniques in Enzyme Immobilization. **Applied Science and Convergence Technology**, [S. l.], v. 26, n. 6, p. 157–163, 2017. DOI: 10.5757/asct.2017.26.6.157. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.5757/ASCT.2017.26.6.157>. Acesso em: 28 out. 2021.

NURALIYAH, A.; WIJANARKO, A.; HERMANSYAH, H. Immobilization of *Candida rugosa* lipase by adsorption-crosslinking onto corn husk. **IOP Conference Series: Materials Science and Engineering**, [S. l.], v. 345, n. 1, p. 012042, 2018. DOI: 10.1088/1757-899X/345/1/012042. Disponível em: <https://iopscience.iop.org/article/10.1088/1757-899X/345/1/012042>. Acesso em: 13 nov. 2021.

ORTEGA, Natividad; PEREZ-MATEOS, Manuel; PILAR, María C.; BUSTO, María D. Neutralse Immobilization on Alginate–Glutaraldehyde Beads by Covalent Attachment. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [S. l.], v. 57, n. 1, p. 109–115, 2008. DOI: 10.1021/JF8015738. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf8015738>. Acesso em: 6 nov. 2021.

PELLERA, Frantseska Maria; GIDARAKOS, Evangelos. Chemical pretreatment of lignocellulosic agroindustrial waste for methane production. **Waste Management**, [S. l.], v. 71, p. 689–703, 2018. DOI: 10.1016/J.WASMAN.2017.04.038.

QUIOCHO, Florante A.; RICHARDS, Frederic M. INTERMOLECULAR CROSS LINKING OF A PROTEIN IN THE CRYSTALLINE STATE: CARBOXYPEPTIDASE-A. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [S. l.], v. 52, n. 3, p. 833, 1964. DOI: 10.1073/PNAS.52.3.833. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC300354/>. Acesso em: 26 out. 2021.



RAMOS, Márcio Viana; DEMARCO, Diego; DA COSTA SOUZA, Isabel Cristina; DE FREITAS, Cleverson Diniz Teixeira. Laticifers, Latex, and Their Role in Plant Defense. **Trends in Plant Science**, [S. l.], v. 24, n. 6, p. 553–567, 2019. DOI: 10.1016/j.tplants.2019.03.006. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1360138519300755>. Acesso em: 8 set. 2021.

RANJBARI, Neda; RAZZAGHI, Mozghan; FERNANDEZ-LAFUENTE, Roberto; SHOJAEI, Fozieh; SATARI, Mohammad; HOMAEI, Ahmad. Improved features of a highly stable protease from *Penaeus vannamei* by immobilization on glutaraldehyde activated graphene oxide nanosheets. **International Journal of Biological Macromolecules**, [S. l.], v. 130, p. 564–572, 2019. DOI: 10.1016/J.IJBIOMAC.2019.02.163.

RASKOVIC, Brankica; LAZIC, Jelena; POLOVIC, Natalija. Characterisation of general proteolytic, milk clotting and antifungal activity of *Ficus carica* latex during fruit ripening. [S. l.], n. October 2014, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1002/jsfa.7126>.

REAL HERNANDEZ, Luis M.; GONZALEZ DE MEJIA, Elvira. Enzymatic Production, Bioactivity, and Bitterness of Chickpea (*Cicer arietinum*) Peptides. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, [S. l.], v. 18, n. 6, p. 1913–1946, 2019. DOI: 10.1111/1541-4337.12504.

ROBBINS, Benjamin H. A Proteolytic Enzyme in Ficin, the Anthelmintic Principle of Leche de Higuera. **Journal of Biological Chemistry**, [S. l.], v. 87, n. 2, 1930.

RODRIGUES, Rafael C.; CARBALLARES, Diego; MORELLON-STERLING, Roberto; FERNANDEZ-LAFUENTE, Roberto. Stabilization of enzymes via immobilization: Multipoint covalent attachment and other stabilization strategies. [S. l.], v. 52, n. June, 2021. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2021.107821.

ROJAS-MERCADO, Andrea S.; MORENO-CORTEZ, Iván E.; LUCIO-PORTO, Raúl; PAVÓN, Luis López. Encapsulation and immobilization of ficin extract in electrospun polymeric nanofibers. **International Journal of Biological Macromolecules**, [S. l.], v. 118, p. 2287–2295, 2018. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2018.07.113.

RUFINO, MDSM; ALVES, Ricardo Elesbão; DE BRITO, Edy Sousa; DE MORAIS, Selene Maia; SAMPAIO, C. de G.; PÉREZ-JIMENEZ, Jara; SAURACALIXTO, Fulgencio Diego. Metodologia científica: determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre DPPH. **Embrapa Agroindústria Tropical-Comunicado Técnico (INFOTECA-E)**, [S. l.], 2007.

SAHIN, Selmihan; OZMEN, Ismail. Covalent immobilization of trypsin on polyvinyl alcohol-coated magnetic nanoparticles activated with glutaraldehyde. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, [S. l.], v. 184, p. 113195, 2020. DOI: 10.1016/J.JPBA.2020.113195.

SAMANTA, Saptadip; JANA, Malabendu; MAITY, Chiranjit; KAR, Sanjay; DAS MOHAPATRA, Pradeep K.; PATI, Bikas R.; MONDAL, Keshab C. The potential of immobilized bacterial  $\alpha$ -amylase on coconut coir, a smart carrier for biocatalysts. <http://dx.doi.org/10.1080/10242420802618501>, [S. l.], v. 27, n. 2, p. 131–135, 2009. DOI: 10.1080/10242420802618501. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10242420802618501>. Acesso em: 13 nov. 2021.

SANTIS, Laís Priscila De; GARCIA, Patrícia Carvalho; SECCO, Valéria Nogueira Dias Paes; FERREIRA, Rosana Rossi; DEFFUNE, Elenice. Applicability of papain solutions in immunohematology. **Einstein (São Paulo)**, [S. l.], v. 17, n. 2, 2019. DOI: 10.31744/einstein\_journal/2019AO4328. Disponível em:

<https://journal.einstein.br/article/applicability-of-papain-solutions-in-immunohematology/>.

SARAVANAN, A.; KUMAR, P. Senthil; MAT ARON, Nurul Syahirah; JEEVANANTHAM, S.; KARISHMA, S.; YAASHIKAA, P. R.; CHEW, Kit Wayne; SHOW, Pau Loke. A review on bioconversion processes for hydrogen production from agro-industrial residues. **International Journal of Hydrogen Energy**, [S. l.], 2021. DOI: 10.1016/J.IJHYDENE.2021.08.055.

SATTARI, Farinaz; RIGI, Garshasb; GHAEDMOHAMMADI, Samira. The first report on molecular cloning, functional expression, purification, and statistical optimization of Escherichia coli-derived recombinant Ficin from Iranian fig tree (*Ficus carica* cv.Sabz). **International Journal of Biological Macromolecules**, [S. l.], v. 165, p. 2126–2135, 2020. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2020.10.050.

SHABANI, Reihaneh; SHAHIDI, Seyed-Ahmad; RAFAE, Ali. Rheological and structural properties of enzyme-induced gelation of milk proteins by ficin and *Polyporus badius*. **Food Science & Nutrition**, [S. l.], v. 6, n. 2, p. 287–294, 2018. DOI: 10.1002/FSN3.553.

Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/fsn3.553>. Acesso em: 21 out. 2021.

SHAH, Manzoor Ahmad; MIR, Shabir Ahmad; PARAY, Mohd Amir. Plant proteases as milk-clotting enzymes in cheesemaking: A review. **Dairy Science and Technology**, [S. l.], v. 94, n. 1, p. 5–16, 2014. DOI: 10.1007/s13594-013-0144-3. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s13594-013-0144-3>. Acesso em: 21 out. 2021.

SHARIF, Mian K.; SALEEM, Makkia; JAVED, Komal. Food Materials Science in Egg Powder Industry. **Role of Materials Science in Food Bioengineering**, [S. l.], p. 505–537, 2018. DOI: 10.1016/B978-0-12-811448-3.00015-2.

SHELDON, Roger A. Enzyme immobilization: The quest for optimum performance. **Advanced Synthesis and Catalysis**, [S. l.], v. 349, n. 8–9, p. 1289–1307, 2007. DOI: 10.1002/adsc.200700082.

SHELDON, Roger A.; VAN PELT, Sander. Enzyme immobilisation in biocatalysis: why, what and how. **Chem. Soc. Rev.**, [S. l.], v. 42, n. 15, p. 6223–6235, 2013. DOI: 10.1039/C3CS60075K.

SHI, Yinxian; MON, Aye Mya; FU, Yao; ZHANG, Yu; WANG, Chen; YANG, Xuefei; WANG, Yuhua. **The genus Ficus (Moraceae) used in diet: Its plant diversity, distribution, traditional uses and ethnopharmacological importance** *Journal of Ethnopharmacology* Elsevier, , 2018. DOI: 10.1016/j.jep.2018.07.027.

Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378874118300023>. Acesso em: 31 ago. 2021.

SIAR, El-Hocine Hocine; ARANA-PEÑA, Sara; BARBOSA, Oveimar; ZIDOUNE, Mohammed Nasreddine; FERNANDEZ-LAFUENTE, Roberto. Immobilization/Stabilization of Ficin Extract on Glutaraldehyde-Activated Agarose Beads. Variables That Control the Final Stability and Activity in Protein Hydrolyses. **Catalysts**, [S. l.], v. 8, n. 4, p. 149, 2018. a. DOI: <https://doi.org/10.3390/catal8040149>. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2073-4344/8/4/149/htm>. Acesso em: 12 nov. 2021.

SIAR, El-Hocine Hocine; ARANA-PEÑA, Sara; BARBOSA, Oveimar; ZIDOUNE, Mohammed Nasreddine; FERNANDEZ-LAFUENTE, Roberto. Solid phase chemical modification of agarose glyoxyl-ficin: Improving activity and stability properties by amination and modification with glutaraldehyde. **Process Biochemistry**, [S. l.], v. 73, n. July, p. 109–116, 2018. b. DOI: 10.1016/j.procbio.2018.07.013. Disponível em:

<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1359511318307931>. Acesso em: 6 nov. 2021.

SIAR, El-Hocine; MORELLON-STERLING, Roberto; ZIDOUNE, Mohammed Nasreddine; FERNANDEZ-LAFUENTE, Roberto. Amination of ficin extract to improve its immobilization on glyoxyl-agarose: Improved stability and activity versus casein. **International Journal of Biological Macromolecules**, [S. l.], v. 133, p. 412–419, 2019. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2019.04.123. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.04.123>.

SIAR, El-Hocine; MORELLON-STERLING, Roberto; ZIDOUNE, Mohammed Nasreddine; FERNANDEZ-LAFUENTE, Roberto. Use of glyoxyl-agarose immobilized ficin extract in milk coagulation: Unexpected importance of the ficin loading on the biocatalysts. **International Journal of Biological Macromolecules**, [S. l.], v. 144, p. 419–426, 2020. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2019.12.140. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.12.140>.

SIAR, El Hocine; ZAAK, Hadjer; KORNECKI, Jakub F.; ZIDOUNE, Mohammed Nasreddine; BARBOSA, Oveimar; FERNANDEZ-LAFUENTE, Roberto. Stabilization of ficin extract by immobilization on glyoxyl agarose. Preliminary characterization of the biocatalyst performance in hydrolysis of proteins. **Process Biochemistry**, [S. l.], v. 58, n. February, p. 98–104, 2017. DOI: 10.1016/j.procbio.2017.04.009. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2017.04.009>.

SILVA, Mariane Daniella Da. **Produção de etanol de segunda geração por *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 26602 a partir da hidrólise ácida de sabugo de milho (*Zea mays* L.)**. 2018. Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, [S. l.], 2018. Disponível em: <https://repositorio.unesp.br/handle/11449/153332>.

SILVA, Debora O.; SEIFERT, Mauricio; NORA, Fabiana R.; BOBROWSKI, Vera L.; FREITAG, Rogerio A.; KUCERA, Heidi R.; NORA, Leonardo; GAIKWAD, Nilesh W. Acute Toxicity and Cytotoxicity of *Pereskia aculeata*, a Highly Nutritious Cactaceae Plant. **Journal of Medicinal Food**, [S. l.], v. 20, n. 4, p. 403–409, 2017. DOI: 10.1089/jmf.2016.0133. Disponível em: <http://www.liebertpub.com/doi/10.1089/jmf.2016.0133>.

SIRISHA, V. L.; JAIN, Ankita; JAIN, Amita. Enzyme Immobilization. *In: Advances in Food and Nutrition Research*. 1. ed. [s.l.] : Elsevier Inc., 2016. v. 79p. 179–211. DOI: 10.1016/bs.afnr.2016.07.004.

SOUZA, Livia Tereza de Andrade; VERÍSSIMO, Lizzy Ayra Alcântara; JOÃO, Benevides Costa Pessela; SANTORO, Marcelo Matos; RESENDE, Rodrigo R.; MENDES, Adriano A. Imobilização enzimática: princípios fundamentais e tipos de suporte. *In: Biotecnologia Aplicada à Agro&Indústria - Vol. 4*. [s.l.] : Editora Blucher, 2017. p. 529–568. DOI: 10.5151/9788521211150-15. Disponível em: <http://openaccess.blucher.com.br/article-details/imobilizacao-enzimatica-principios-fundamentais-e-tipos-de-suporte-20266>. Acesso em: 26 out. 2021.

SOUZA, Lucèia Fátima; CAPUTO, Lucia; DE BARROS, Ingrid Bergman Inchausti; FRATIANNI, Florinda; NAZZARO, Filomena; DE FEO, Vincenzo. *Pereskia aculeata* Muller (Cactaceae) Leaves: Chemical Composition and Biological Activities. **International Journal of Molecular Sciences 2016, Vol. 17, Page 1478**, [S. l.], v. 17, n. 9, p. 1478, 2016. DOI: 10.3390/IJMS17091478. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1422-0067/17/9/1478/html>. Acesso em: 17 nov. 2021.

STRIXNER, T.; KULOZIK, U. Egg proteins. **Handbook of Food Proteins**, [S. l.], p. 150–209, 2011. DOI: 10.1533/9780857093639.150.

TACIAS-PASCACIO, Veymar G.; MORELLON-STERLING, Roberto; CASTAÑEDA-VALBUENA, Daniel; BERENQUER-MURCIA, Ángel; KAMLI, Majid

Rasool; TAVANO, Olga; FERNANDEZ-LAFUENTE, Roberto. Immobilization of papain: A review. **International Journal of Biological Macromolecules**, [S. l.], v. 188, p. 94–113, 2021. DOI: 10.1016/J.IJBIOMAC.2021.08.016.

TAKEITI, Cristina Y.; ANTONIO, Graziella C.; MOTTA, Eliana M. P.; COLLARES-QUEIROZ, Fernanda P.; PARK, Kil J. Nutritive evaluation of a non-conventional leafy vegetable ( *Pereskia aculeata* Miller). **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, [S. l.], v. 60, n. sup1, p. 148–160, 2009. DOI: 10.1080/09637480802534509. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/action/journalInformation?journalCode=ijjf20>. Acesso em: 17 nov. 2021.

TAVANO, Olga Luisa. Protein hydrolysis using proteases: An important tool for food biotechnology. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, [S. l.], v. 90, p. 1–11, 2013. DOI: 10.1016/j.molcatb.2013.01.011. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1381117713000192>.

TAVANO, Olga Luisa; BERENGUER-MURCIA, Angel; SECUNDO, Francesco; FERNANDEZ-LAFUENTE, Roberto. Biotechnological Applications of Proteases in Food Technology. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, [S. l.], v. 17, n. 2, p. 412–436, 2018. DOI: 10.1111/1541-4337.12326.

THOMÉ, Otto Wilhelm. Flora von Deutschland, Osterreich und der Schweiz in Wort und Bild fur Schule und Haus. **Gera, Germany**, [S. l.], 1886.

TORRES-FUENTES, Cristina; ALAIZ, Manuel; VIOQUE, Javier. Affinity purification and characterisation of chelating peptides from chickpea protein hydrolysates. **Food Chemistry**, [S. l.], v. 129, n. 2, p. 485–490, 2011. DOI: 10.1016/J.FOODCHEM.2011.04.103.

TORRES-FUENTES, Cristina; ALAIZ, Manuel; VIOQUE, Javier. Iron-chelating activity of chickpea protein hydrolysate peptides. **Food Chemistry**, [S. l.], v. 134, n. 3, p. 1585–1588, 2012. DOI: 10.1016/j.foodchem.2012.03.112. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814612005973>.

VASCONCELLOS, Lucas. **Ora-pro-nóbis: conheça seus benefícios e como consumir**. 2020. Disponível em: <https://www.uol.com.br/vivabem/noticias/redacao/2020/08/31/ora-pro-nobis-e-rica-em-proteinas-e-versatil-nos-preparos-saiba-mais.htm>. Acesso em: 17 nov. 2021.

VATIĆ, Saša; MIRKOVIĆ, Nemanja; MILOŠEVIĆ, Jelica R.; JOVČIĆ, Branko; POLOVIĆ, Natalija. Broad range of substrate specificities in papain and fig latex enzymes preparations improve enumeration of *Listeria monocytogenes*. **International Journal of Food Microbiology**, [S. l.], v. 334, p. 108851, 2020. DOI: 10.1016/J.IJFOODMICRO.2020.108851.

VELASCO-LOZANO, Susana; LÓPEZ-GALLEGO, Fernando; MATEOS-DÍAZ, Juan C.; FAVELA-TORRES, Ernesto. Cross-linked enzyme aggregates (CLEA) in enzyme improvement – a review. **Biocatalysis**, [S. l.], v. 1, n. 1, 2016. DOI: 10.1515/boca-2015-0012. Disponível em: <http://access.portico.org/stable?au=phx1061bghx>.

WAHAB, Roswanira Abdul; ELIAS, Nursyafiqah; ABDULLAH, Faizuan; GHOSHAL, Sib Krishna. On the taught new tricks of enzymes immobilization: An all-inclusive overview. **Reactive and Functional Polymers**, [S. l.], v. 152, p. 104613, 2020. DOI: 10.1016/J.REACTFUNCTPOLYM.2020.104613.

WALI, Ahmidin; MIJITI, Yasen; YANHUA, Gao; YILI, Abulimiti; AISA, Haji Akber; KAWULI, Adilijiang. Isolation and identification of a novel antioxidant peptide from chickpea (*Cicer arietinum* L.) sprout protein hydrolysates. **International Journal of Peptide Research and Therapeutics**, [S. l.], v. 27, p. 219–227, 2021.

WU, Wenfei; YANG, Yiyi; SUN, Na; BAO, Zhijie; LIN, Songyi. Food protein-derived iron-chelating peptides: The binding mode and promotive effects of iron bioavailability. **Food Research International**, [S. l.], v. 131, p. 108976, 2020. DOI: 10.1016/j.foodres.2020.108976. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0963996920300016>.

YU, Jianmei; MIKIASHVILI, Nona. Effectiveness of different proteases in reducing allergen content and IgE-binding of raw peanuts. **Food Chemistry**, [S. l.], v. 307, p. 125565, 2020. DOI: 10.1016/J.FOODCHEM.2019.125565.

YUST, María del Mar; PEDROCHE, Justo; MILLÁN-LINARES, María del Carmen; ALCAIDE-HIDALGO, Juan María; MILLÁN, Francisco. Improvement of functional properties of chickpea proteins by hydrolysis with immobilised Alcalase. **Food Chemistry**, [S. l.], v. 122, n. 4, p. 1212–1217, 2010. DOI: 10.1016/J.FOODCHEM.2010.03.121.

YUST, María M.; PEDROCHE, Justo; GIRÓN-CALLE, Julio; ALAIZ, Manuel; MILLÁN, Francisco; VIOQUE, Javier. Production of ace inhibitory peptides by digestion of chickpea legumin with alcalase. **Food Chemistry**, [S. l.], v. 81, n. 3, p. 363–369, 2003. DOI: 10.1016/S0308-8146(02)00431-4.

ZAAK, Hadjer; PEIRCE, Sara; DE ALBUQUERQUE, Tiago L.; SASSI, Mohamed; FERNANDEZ-LAFUENTE, Roberto. Exploiting the versatility of aminated supports activated with glutaraldehyde to immobilize  $\beta$ -galactosidase from *Aspergillus oryzae*. **Catalysts**, [S. l.], v. 7, n. 9, p. 250, 2017. DOI: <https://doi.org/10.3390/catal7090250>.

ZIA-UL-HAQ, Muhammad; IQBAL, Shahid; AHMAD, Shakeel; IMRAN, Muhammad; NIAZ, Abdul; BHANGER, M. I. Nutritional and compositional study of Desi chickpea (*Cicer arietinum* L.) cultivars grown in Punjab, Pakistan. **Food Chemistry**, [S. l.], v. 105, n. 4, p. 1357–1363, 2007. DOI: 10.1016/J.FOODCHEM.2007.05.004.

ZUCCA, Paolo; FERNANDEZ-LAFUENTE, Roberto; SANJUST, Enrico. Agarose and Its Derivatives as Supports for Enzyme Immobilization. **Molecules** **2016**, Vol. **21**, Page **1577**, [S. l.], v. 21, n. 11, p. 1577, 2016. DOI: 10.3390/MOLECULES21111577. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1420-3049/21/11/1577/htm>. Acesso em: 9 nov. 2021.