

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 17/12/2023.

**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

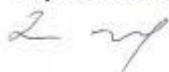
ORIENTADOR: LUIS HENRIQUE SOUZA GUIMARÃES

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 Peroxidasas 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^a Dra. Daniela Cardoso Umbelino Cavallini

AGRADECIMENTOS

A Prof.^a 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 amigas 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' - azinobis (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 α -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

1	INTRODUÇÃO	13
2	OBJETIVOS	17
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
3.1	Ficina	18
3.2	Aplicação do látex com atividade de ficina	20
3.3	Imobilização	22
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
3.4	Suportes	33
3.5	Fontes proteicas	37
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
4	MATERIAL E MÉTODOS	41
4.1	Obtenção e preparo do extrato enzimático com atividade de ficina	41
4.2	Atividade enzimática	41
4.3	Determinação de concentração proteica	41
4.4	Eletroforese	42
4.5	Concentração das proteínas presentes no látex	42
4.6	Caracterização cinética da enzima livre e dos derivados enzimáticos	42
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
4.7	Tratamento do pó de sabugo de milho	43
4.8	Ativação dos suportes	43
4.9	Imobilização do extrato com atividade de ficina.	44
4.10	Avaliação da imobilização	45
4.11	Reuso	45
4.12	Preparo dos substratos proteicos	46
4.13	Hidrólise em reator mistura operada em batelada	46
4.14	Caracterização dos hidrolisados	47
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
4.15	Hidrólise em reator de leito fixo operando em modo contínuo	48
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
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	51
5.1	Caracterização do extrato enzimático com atividade de ficina (enzima livre)	51
5.2	Concentração do extrato proteico	53
5.3	Imobilização da ficina	54
5.3.1	<i>Reuso e estabilidade operacional</i>	58
5.4	Hidrólise em sistema de mistura operado em batelada	69

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

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 uma 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.

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 celulasas 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/trabalhos finais/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, Giovani 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 β -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.; GARDOSSE, 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 β -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-DARENED, 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, Motahharezah 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; GUISÁN, 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 Haghighi; 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.; BERENGUER-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. 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. Neutrased 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 α -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; RAFE, 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, Lívia 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/htm>. 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; BERENGUER-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=ijf20>. 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-GALLEGU, 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, Yassen; 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, Yiyang; 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 β -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.