



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO SUDOESTE DA BAHIA – UESB**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E CIÊNCIA DE**  
**ALIMENTOS**

**CAMPUS JUVINO OLIVEIRA**

**ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: ENGENHARIA DE ALIMENTOS**

**BIOCATALISADORES PRODUZIDOS PELA IMOBILIZAÇÃO DE PROTEASES**  
**EM CARVÕES ATIVADOS E SUA APLICAÇÃO NA HIDRÓLISE DE CASEÍNA**  
**PARA OBTENÇÃO DE PEPTÍDEOS COM PROPRIEDADES ANTI-**  
**HIPERTENSIVAS**

**EVALDO CARDOZO DE SOUZA JÚNIOR**

**ITAPETINGA – BA**

**JULHO 2019**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO SUDOESTE DA BAHIA - UESB**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E CIÊNCIA DE**  
**ALIMENTOS**

**BIOCATALISADORES PRODUZIDOS PELA IMOBILIZAÇÃO DE PROTEASES**  
**EM CARVÕES ATIVADOS E SUA APLICAÇÃO NA HIDRÓLISE DE CASEÍNA**  
**PARA OBTENÇÃO DE PEPTÍDEOS COM PROPRIEDADES ANTI-**  
**HIPERTENSIVAS**

**IVALDO CARDOZO DE SOUZA JÚNIOR**

Tese apresentada como parte das exigências para obtenção do grau de Doutor em Engenharia e Ciência de Alimentos, área de concentração em Engenharia de Alimentos, da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia – UESB.

**ORIENTADORA:**

Prof<sup>ª</sup>. DSc. Cristiane Martins Veloso

**CO-ORIENTADORES:**

Prof<sup>ª</sup>. DSc. Renata Cristina Ferreira Bonomo

Prof<sup>ª</sup>. DSc. Sibelli Passini Barbosa Ferrão

**ITAPETINGA – BA**

**JULHO 2019**

660.634 Souza Júnior, Evaldo Cardozo de.

S715b Biocatalisadores produzidos pela imobilização de proteases em carvões ativados e sua aplicação na hidrólise de caseína para obtenção de peptídeos com propriedades anti-hipertensivas. / Evaldo Cardozo de Souza Júnior. – Itapetinga-BA: UESB, 2019.

135f.

Tese apresentada como parte das exigências para obtenção do grau de Doutor em Engenharia e Ciências de Alimentos, área de concentração em Engenharia de Alimentos, da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia – UESB. Sob a orientação da Profª. D. Sc. Cristiane Martins Veloso e coorientação da Profª. D. Sc. Renata Cristina Ferreira Bonomo e Profª. D. Sc. Sibelli Passini Barbosa Ferrão.

1. Enzimas imobilizadas. 2. Carvão Ativado. 3. Biocatalisadores. I. Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia - Programa de Pós-Graduação de Doutorado em Engenharia e Ciências de Alimentos, *Campus* de Itapetinga. II. Veloso, Cristiane Martins. III. Bonomo, Renata Cristina Ferreira. IV. Ferrão, Sibelli Passini Barbosa. V. Título.

**CDD(21): 660.634**

Catálogo na Fonte:

Adalice Gustavo da Silva – CRB 535-5ª Região  
Bibliotecária – UESB – Campus de Itapetinga-BA

Índice Sistemático para desdobramentos por Assunto:

1. Enzimas imobilizadas
2. Carvão Ativado
3. Biocatalisadores



**Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia**  
 Recredenciada pelo decreto estadual nº 16.825 de 04.07.2016  
 Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos  
 PPG-ECAL / UESB



Áreas de Concentração: Engenharia de Alimentos  
 Ciência de Alimentos

### DECLARAÇÃO DE APROVAÇÃO

**Título:** BIOCATALISADORES PRODUZIDOS PELA IMOBILIZAÇÃO DE PROTEASES EM CARVÕES ATIVADOS E SUA APLICAÇÃO NA HIDRÓLISE DE CASEÍNA PARA OBTENÇÃO DE PEPTÍDEOS COM PROPRIEDADES ANTI-HIPERTENSIVAS.

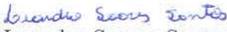
**Autor (a):** EVALDO CARDOZO DE SOUZA JUNIOR

**Orientador (a):** Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Cristiane Martins Veloso

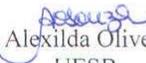
**Coorientador (a):** Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Renata Cristina Ferreira Bonomo

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Sibelli Passini Barbosa Ferrão

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de **DOUTOR EM ENGENHARIA E CIÊNCIA DE ALIMENTOS, ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: ENGENHARIA DE ALIMENTOS**, pela Banca Examinadora.

  
 Prof. Dr. Leandro Soares Santos  
 UESB

  
 Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Renata Cristina Ferreira Bonomo  
 UESB

  
 Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Alexilda Oliveira de Souza  
 UESB

  
 Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Elizama Aguiar de Oliveira  
 Membro Externo - UESC

  
 Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Cristiane Martins Veloso  
 Orientadora - UESB  
 Presidente da Banca

Itapetinga-BA, 31 de julho de 2019.

*“Talvez não tenha conseguido fazer  
o melhor, mas lutei para que o  
melhor fosse feito. Não sou o que  
deveria ser, mas Graças a Deus, não  
sou o que era antes”.*

Marthin Luther King.

*Dedico este trabalho a Vanessa, pelo carinho e companheirismo de sempre; por estar sempre torcendo pelas minhas conquistas. Pelo apoio e incentivo incondicional. E ao meu filho (Henrique), que surgiu na minha vida como um presente de Deus para eu cuidar, amar e proteger durante toda minha existência.*

*Chega um momento em sua vida, que você sabe:  
Quem é imprescindível para você,  
quem nunca foi,  
quem não é mais,  
quem será sempre!*

**Charles Chaplin**

## AGRADECIMENTO

Agradeço, primeiramente, a Deus que está presente, sendo companhia constante em todos os momentos da minha vida e grande responsável pelas minhas conquistas;

Aos meus pais (Evaldo e Iolanda) que muitas vezes se doaram e renunciaram aos seus sonhos, para que eu pudesse realizar os meus. Quero dizer que essa conquista não é só minha, mas nossa. À minha irmã (Itana) aos meus sobrinhos (Isabella e Wellisinho);

À minha esposa (Vanessa) e meu filho (Henrique), que me apoiam em tudo que faço com dedicação, determinação e muito amor;

À Professora Cristiane Martins Veloso, pela orientação, auxílio e atenção durante a realização deste trabalho;

À Professora Renata Cristina Ferreira Bonomo, pela amizade e pelos valiosos ensinamentos durante toda minha caminhada;

Ao Professora Sibelli Passini Barbosa Ferrão, pela atenção, disposição e toda ajuda durante o desenvolvimento do meu doutorado;

Aos meus amigos e colegas do LEP pelo incentivo, apoio e compartilhamento de conhecimento, em especial, a Mateus;

À UESB, pela oportunidade e condições de realizar meu trabalho;

A todas as pessoas que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste objetivo.

**MUITO OBRIGADO!**

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS .....	X
LISTA DE TABELAS .....	xi
RESUMO .....	xii
1. INTRODUÇÃO .....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA .....	3
2.1. Peptídeos Bioativos .....	3
2.2. Peptídeos com atividade anti-hipertensiva .....	4
2.3. Caseína .....	8
2.3.1. Micelas de caseína .....	12
2.3.2. Caseína Caprina .....	14
2.3.3. Caseína bubalina .....	15
2.4. Hidrólise de proteínas .....	15
2.4.1. Fatores relacionados com a hidrólise enzimática .....	18
2.4.2. pH .....	18
2.4.3. Temperatura .....	19
2.4.4. Concentração enzimática versus concentração de substrato .....	19
2.4.5. Proteases .....	20
2.4.5.1. Pepsina .....	22
2.4.5.2. Tripsina .....	23
2.5. Imobilização de enzimas .....	25
2.6. Carvão ativado .....	30
2.6.1. Materiais precursores utilizados na produção do carvão ativado .....	33
2.6.2. Resíduo precursor para produção do carvão ativado – caroço do cajá (Spondias mombin L.) .....	37
2.6.3. Produção do carvão ativado .....	38
2.6.4. Métodos de caracterização de carvão ativado .....	42
2.6.4.1. Isotermas de adsorção/dessorção de N <sub>2</sub> .....	42
2.6.4.2. Microscopia eletrônica de varredura .....	45
2.6.4.3. pH do Ponto de Carga Zero .....	45
2.6.4.4. Teor de cinzas .....	46
2.6.4.5. Espectroscopia no infravermelho com transformada de fourier(FTIR) .....	46
2.6.5. Aplicação do carvão ativado na imobilização de enzimas .....	47
3. OBJETIVOS .....	49
3.1. Objetivo geral .....	49

3.2. Objetivos específicos .....	49
4. REFERÊNCIAS .....	50
<b>CAPÍTULO 2</b> .....	74
<b>Artigo 1: Biocatalysts produced by immobilization of trypsin on biochar by adsorption and covalent binding, and application in the hydrolysis of casein from different sources</b> .....	74
1. INTRODUCTION.....	75
2. METHODS.....	77
2.1 Materials.....	77
2.2 Processing and characterization of the precursor material.....	77
2.3 Synthesis, functionalization, and characterization of the supports .....	78
<b>2.4 Trypsin immobilization assays</b> .....	79
<b>2.4.1 Effect of the immobilization method</b> .....	79
<b>2.4.2 Stability of the derivatives in high salt concentration</b> .....	79
<b>2.4.3 Reuse of the biocatalysts</b> .....	80
<b>2.5 ACE inhibitory activity of casein hydrolysates</b> .....	81
<b>2.6 Statistical analysis</b> .....	81
3. RESULTS AND DISCUSSION.....	82
3.1 Characterization of the precursor material and supports.....	82
3.2 Fourier Transform Infrared Absorption Spectrophotometry (FTIR) .....	83
3.3 Porosity and specific surface area.....	84
3.4 Scanning Electron Microscopy (SEM).....	86
3.5 Immobilization of trypsin on biochar before and after functionalization.....	86
3.6 Hydrolysis capacity of trypsin in caseins from different sources.....	90
3.7 ACE inhibition percentage of goat casein hydrolysate.....	93
4. CONCLUSIONS.....	94
5. REFERENCES .....	95
<b>CAPÍTULO 3</b> .....	99
<b>Artigo 2: Produção de peptídeos com atividade anti-hipertensiva a partir da hidrólise de caseínas com protease imobilizada</b> .....	99
1. INTRODUÇÃO.....	100
2. METODOLOGIA .....	101
2.1 Obtenção das caseínas.....	102
2.2 Síntese e funcionalização do carvão ativado .....	102
2.3 Caracterização do carvão ativado antes e após funcionalização .....	103

2.4	Ensaio de imobilização da Pepsina.....	103
2.4.1	Estudo da influência do método de imobilização .....	103
2.4.2	Determinação da atividade enzimática .....	104
2.4.3	Determinação dos ciclos de reuso dos biocatalisadores imobilizados.....	105
2.5	Atividade inibitória da ECA dos hidrolisados de caseína .....	105
2.6	Análise estatística .....	106
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	106
3.1	Caracterização do suporte (área superficial e porosidade, MEV e $\text{pH}_{\text{PCZ}}$ ) .....	106
3.2	Ensaio de imobilização da pepsina nos carvões ativados .....	108
3.3	Hidrólise das caseínas bovina, caprina e bubalina para produção de peptídeos bioativos .....	111
3.4	Porcentagem de inibição da ECA do hidrolisado de caseína de cabra.....	115
4	CONCLUSÃO .....	117
5	REFERÊNCIAS .....	117

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Efeitos funcionais dos peptídeos bioativos. ....	4
<b>Figura 2.</b> O mecanismo de ação dos anti-hipertensivos sobre a inibição da enzima conversora de angiotensina pelo sistema renina-angiotensina. ....	6
<b>Figura 3.</b> Estrutura primária da caseína $\alpha_{s1}$ , $\alpha_{s2}$ , $\beta$ -caseína e caseína $\kappa$ (Fonte: FARRELL et al., 2004). ....	10
<b>Figura 4.</b> a) Modelo das micelas de caseína proposto por Waugh (1958); b) Modelo das micelas de caseína proposto por Schmidt e Fox (1982); c) Modelo das micelas de caseína proposto por Walstra (1990) e novamente por Walstra (1999), sendo observada a mudança na escala e posição do fosfato de cálcio coloidal; d) Modelo proposto por Horne (2003), demonstrando a dupla ligação, e a interpretação do modelo de Schmidt e Fox descrito em uma revisão científica de Horne (2006); e) Modelo da micela de caseína proposto por De Kruif e Holt (2003), e com uma ilustração tridimensional sobre a estrutura micelar da caseína; f) Modelo da estrutura da micela de caseína proposto por Horne (2006). ....	13
<b>Figura 5.</b> Ilustração da formação da ligação peptídica. ....	16
<b>Figura 6.</b> Representação tridimensional da Pepsina. ....	23
<b>Figura 7.</b> Ilustração da especificidade enzima-substrato. Tripsina Asp: aspartato; His: histidina; Ser: serina. – Local de clivagem. ....	24
<b>Figura 8.</b> Esquema de métodos de imobilização de enzimas. ....	26
<b>Figura 9.</b> Imobilização de enzimas por formação de ligação covalente. ....	28
<b>Figura 10.</b> Imobilização de enzimas por adsorção. ....	28
<b>Figura 11.</b> a) Estrutura física (Fonte: SANTOS, 2017) e b) estrutura química do carvão ativado (Fonte: BLANCO, 2001). ....	31
<b>Figura 12.</b> Principais constituintes da biomassa lignocelulósica. ....	33
<b>Figura 13.</b> Estrutura química da celulose. ....	34
<b>Figura 14.</b> Estrutura química da lignina. ....	35
<b>Figura 15.</b> Estrutura química da hemicelulose. ....	35
<b>Figura 16.</b> a) Cajazeira e b) o fruto cajá. ....	37
<b>Figura 17.</b> Esquema das etapas de preparação de carvões ativados. ....	39
<b>Figura 18.</b> Classificação das isotermas de fisissorção. ....	44

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Composição de resíduos lignocelulósicos empregados na síntese de carvão ativado. ....	36
<b>Tabela 2.</b> Tipo de ativação para síntese de Carvão Ativado.....	41
<b>Tabela 3.</b> Classificação dos poros segundo seu diâmetro.....	44
<b>Tabela 4.</b> Atribuição das bandas apresentadas nos espectros FTIR para o material precursor e carvões ativados.....	47

## RESUMO

SOUZA JUNIOR, E. C. **Biocatalisadores produzidos pela imobilização de proteases em carvões ativados e sua aplicação na hidrólise de caseína para obtenção de peptídeos com propriedades anti-hipertensivas.** Itapetinga – BA: UESB, 2019.62p. (Tese – Doutorado em Engenharia de Alimentos – Engenharia de Alimentos)<sup>1</sup>

Enzimas imobilizadas são usadas como biocatalisadores para fins analíticos em diagnósticos e para fins preparativos em processos industriais de larga escala. A imobilização enzimática permite reduzir os custos operacionais, sendo possível a recuperação mais eficiente da enzima do meio reacional, além de possibilitar a reutilização da mesma. Enzimas podem ser imobilizadas por diferentes métodos, sendo por adsorção e formação de ligações covalentes os mais utilizados. O objetivo do presente trabalho foi avaliar o efeito do método de imobilização da tripsina e pepsina em carvão ativado na hidrólise de diferentes fontes de caseína. Além disso, foi avaliado o efeito inibidor do hidrolisado obtido sobre a enzima conversora da angiotensina (ECA). Tanto o carvão ativado quanto o funcionalizado apresentaram alta eficiência de imobilização (> 87%) e alta capacidade de ligação enzimática (> 91 mg/g). Durante a hidrólise o biocatalisador obtido pela imobilização das enzimas no carvão funcionalizado apresentou maior eficiência de hidrólise para as diferentes caseínas quando comparado à enzima imobilizada por adsorção, com valores de 97% e 95% para caseína de cabra, 92% e 87% para caseína de búfala, 90% e 70% para caseína bovina com tripsina imobilizada, respectivamente, e aproximadamente 70% e 22% para caseína de cabra, 55% e 35% para caseína de búfala, 65% e 25% para caseína bovina com pepsina imobilizada, respectivamente, com 60 min de reação, tendo eficiência de hidrólise da enzima livre como 100%. Desta forma, o carvão funcionalizado pode ser considerado como um suporte em potencial para imobilização de enzimas, podendo o biocatalisador obtido ser reutilizado por mais de 4 ciclos. A atividade inibitória da ECA foi determinada para hidrolisados derivados da caseína de cabra com as frações coletadas 2 horas após o início da hidrólise, usando a pepsina e tripsina na sua forma livre e imobilizada no carvão ativado funcionalizado. Os resultados da atividade inibitória neste estudo variaram de 94,3% e 55,2% para a pepsina na sua forma livre e imobilizada no carvão ativado funcionalizado respectivamente, e de 93,5% e 25,5% para a tripsina na sua forma livre e imobilizada em carvão ativado funcionalizado, respectivamente, nas mesmas condições reacionais. É importante notar que esta diferença na inibição da ECA pode corresponder a quantidade de peptídeo gerados na hidrólise, uma vez que, a capacidade hidrolítica da enzima livre é maior que da enzima imobilizada. Apesar de menores valores de inibição da ECA para as enzimas imobilizadas em comparação com a enzimas livre, os biocatalisadores mostram vantagem devido a possibilidade de reutilização.

**Palavras-chave:** Imobilização, Carvão Ativado, Proteases, Caseínas.

---

<sup>1</sup> Orientadora: Cristiane Martins Veloso, Dsc-UESB e Co-orientadoras: Renata C. F. Bonomo, Dsc-UESB e Sibelli P. B. Ferrão, Dsc-UESB.

## 1. INTRODUÇÃO

As doenças cardiovasculares são umas das principais causadoras de óbito na população brasileira há mais de 30 anos. Dentre essas doenças, a hipertensão é comum em todo o mundo, sendo responsável por altos índices de morbimortalidade. Hipertensão é uma condição médica crônica na qual os vasos sanguíneos são persistentemente submetidos a pressões maiores à medida que o sangue flui dentro deles. Formalmente, caracteriza-se por pressão arterial sistólica  $\geq 140$  mmHg e/ou pressão arterial diastólica  $\geq 90$  mmHg, em repouso (KRAKOFF et al., 2014). Estima-se que mais de 20% dos adultos, 6% a 8% das crianças e 65% dos idosos em todo o mundo são hipertensos (WHO, 2013).

Trata-se, portanto, de um problema de saúde pública, muitas vezes, assintomático, o que faz com que as pessoas não procurem o tratamento necessário. No entanto, uma vez estabelecido o diagnóstico de hipertensão, as mudanças no estilo de vida não são suficientes para controlá-lo, e o uso de drogas anti-hipertensivas é frequentemente necessário (WILLIAMS et al., 2004). Vários efeitos colaterais são associados ao uso de anti-hipertensivos típicos, como aumento dos níveis de potássio no sangue, comprometimento da função renal, tosse, angioedema, erupções cutâneas e até anormalidades fetais (FITZGERALD et al., 2004). Esta é uma das razões pelas quais a busca por compostos naturais (como peptídeos) capazes de auxiliar o controle da hipertensão, com menos ou nenhum efeito secundário indesejável, tem sido reconhecida como um campo de pesquisa cada vez mais relevante. Vários estudos relataram que as caseínas, que compreendem aproximadamente 80 a 85% das proteínas do leite, constituem uma fonte importante de peptídeos biologicamente ativos (JIANG et al., 2007; CONTRERAS et al., 2011; SOUZA JÚNIOR et al., 2014; IBRAHIM et al., 2017). Esses peptídeos são inativos dentro da sequência da proteína original e podem ser obtidos por hidrólise com enzimas digestivas como: pepsina, tripsina e papaína.

Apesar da alta eficiência catalítica das enzimas digestivas, fatores ligados ao custo e a estabilidade limitam a utilização destes biocatalisadores. Uma alternativa para solucionar essas dificuldades é a utilização da enzima em sua forma imobilizada. A imobilização possibilita a reutilização do biocatalisador, permite a separação dos produtos do meio reacional de forma fácil e muitas vezes melhoram a eficiência catalítica da enzima (GHATTASA et al., 2014; KULKARNI, 2016).

As enzimas podem ser imobilizadas por uma variedade de métodos, tais como encapsulamento (GUPTA, BHATTACHARYA & MURTHY, 2013) por ligação cruzada (KATO et al., 2011), ligação covalente (MELLO et al., 2006; KHOABI et al., 2014) ou adsorção (MOTEEVALIZADEH et al., 2015; BRITO et al., 2017). A imobilização de biomoléculas por adsorção e formação de ligação covalente, utilizando carvão ativado como suporte (BRITO et al, 2017; SANTOS et al., 2019), vem atraindo muita atenção devido as suas características deste suporte como: a elevada área superficial, boa estabilidade química, mecânica e térmica, hidrofobicidade e insolubilidade (BASSAN et al., 2016).

No presente estudo, foi avaliada a eficiência dos métodos de imobilização de enzimas digestivas (pepsina e tripsina) por adsorção e ligação covalente em carvão ativado. Os biocatalisadores obtidos e as enzimas em sua forma livre foram empregadas na hidrólise de caseínas do leite de cabra, vaca e búfala para obtenção de hidrolisados com propriedade anti-hipertensiva, que foi determinada através da inibição da enzima conversora da angiotensina (ECA).

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. Peptídeos Bioativos

O ser humano, preocupado com a manutenção da sua saúde, vem buscando fontes naturais alternativas para a prevenção ou combate a doenças. Assim, estudos e pesquisas vêm sendo desenvolvidos com foco na alimentação, buscando os alimentos funcionais (TIMÓN et al., 2014; MOHANTY et al., 2015).

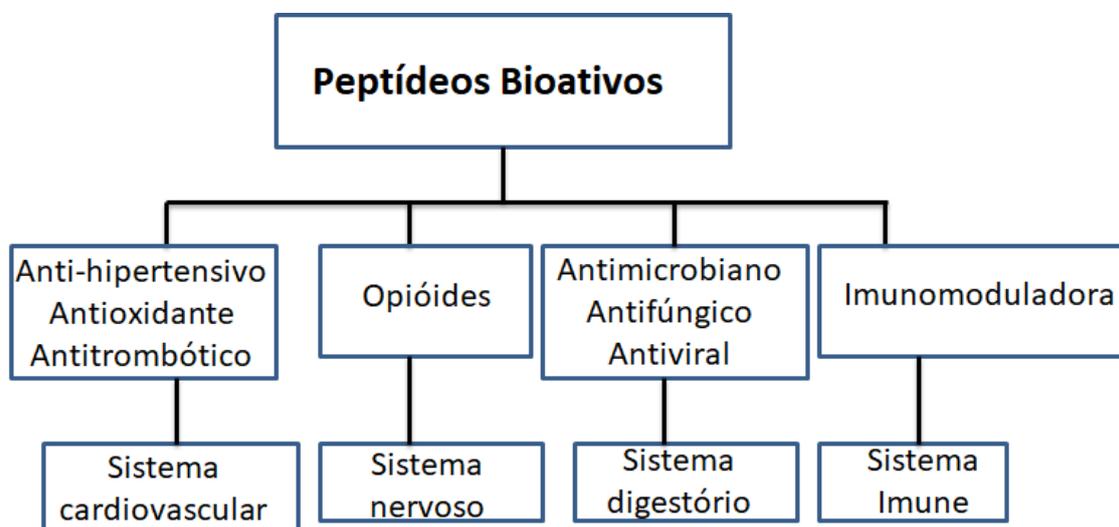
Um hidrolisado contendo peptídeos bioativos pode ser considerado um alimento funcional, uma vez que fornece benefícios para a saúde, além da nutrição básica e, sendo similar em aparência aos alimentos convencionais, é adequado para o consumo como parte de uma dieta normal (CORRONS et al., 2017).

Os peptídeos bioativos são derivados de proteínas alimentares e exercem um efeito positivo em humanos devido às suas propriedades promotoras de saúde. Os peptídeos bioativos podem exercer vários efeitos benéficos, como prevenir doenças ou modular os sistemas fisiológicos, uma vez absorvidos no corpo humano (TOLDRA et al., 2018). Contêm normalmente entre 3 e 20 resíduos de aminoácidos e permanecem inativos enquanto as sequências são mantidas dentro da proteína parental. Eles são ativos uma vez liberados por hidrólise enzimática por peptidases durante o processamento de alimentos e / ou durante a digestão gastrointestinal. Para exercer um efeito positivo sobre a saúde, os peptídeos bioativos devem atravessar a barreira gastrointestinal e sobreviver à degradação enzimática (BHAT et al., 2017). Eles modulam eventos fisiológicos como a saúde digestiva, imunomodulação, alterações de humor, memória e controle do estresse.

Nos últimos anos, houve um aumento crescente no interesse comercial da produção de peptídeos bioativos a partir de várias fontes para utilizá-los como ingredientes em alimentos funcionais, cosméticos ou medicamentos; com promoção da saúde ou prevenção de doenças (OLIVEIRA et al., 2018). Imunomoduladora, antimicrobiana, opióide, anti-hipertensiva (inibição da enzima conversora de angiotensina-ECA), ligação de minerais, antitrombótica, osteoprotetora, hipocolesterolêmica, regulação hormonal e antialérgica são algumas das bioatividades descritas (PIHLANTO, 2013; BOUTRO et al., 2015). Na Figura 1 são apresentados os efeitos funcionais dos peptídeos.

Numerosos peptídeos bioativos têm sido relatados nos últimos anos como naturalmente presentes ou gerados a partir de proteínas alimentares de diferentes origens, como leite, ovos, soja, peixe e carne (FUJITA et al.,1995; KIM et al.,2001; GIBBS et al., 2004; PIHLANTO, 2013; BOUTROU et al., 2015). Nesse sentido, a bioatividade mais extensamente estudada durante a última década tem sido a atividade hipertensiva através da mensuração da atividade inibitória da enzima conversora da angiotensina I (ECA). A razão para este interesse é principalmente porque a hipertensão arterial é um dos principais fatores de risco independente para doenças cardiovasculares e o principal motivo de morte nos países desenvolvidos (GALLEGO et al., 2018).

**Figura 1.** Efeitos funcionais dos peptídeos bioativos.



Fonte: Autor 2019

## 2.2. Peptídeos com atividade anti-hipertensiva

A hipertensão arterial é importante problema de saúde pública devido à alta prevalência e ao seu papel em doenças cardiovasculares como doença coronária, insuficiência cardíaca congestiva e acidente vascular cerebral. O ser humano, preocupado com a manutenção da sua saúde, vem buscando fontes naturais alternativas para a prevenção ou combate a doenças. Assim, estudos e pesquisas vêm sendo desenvolvidos com foco na alimentação, buscando os alimentos funcionais, principalmente os provenientes de hidrólise das proteínas do leite (peptídeos bioativos) (TIMÓN et al., 2014; MOHANTY et al., 2015).

Os peptídeos bioativos encontram-se encriptados dentro de muitas sequências de proteínas da dieta e, quando liberados por várias proteases, podem exercer as funções fisiológicas em diversos locais no corpo humano, como no coração, nos ossos e dentes. (PIHLANTO, 2013; BOUTRO et al., 2015). Nos últimos anos houve um aumento crescente no interesse comercial da produção de peptídeos bioativos a partir de várias fontes, para utilizá-los como ingredientes em alimentos funcionais, cosméticos ou medicamentos com promoção da saúde ou prevenção de doenças, sendo a inibição da enzima conversora de angiotensina (ECA) uma das atividades mais estudadas (OLIVEIRA et al., 2018).

A enzima conversora de angiotensina (ECA) tem sido associada com o sistema renina-angiotensina, que regula a pressão sanguínea arterial. O emprego de peptídeos inibidores da ECA tem despertado o interesse de muitos pesquisadores, pois há evidências que a ingestão desses peptídeos, presentes em alimentos formulados, possa auxiliar na prevenção e no tratamento não medicamentoso da hipertensão (LIN et al. 2017; IBRAHIM et al. 2017; OLIVEIRA et al., 2018).

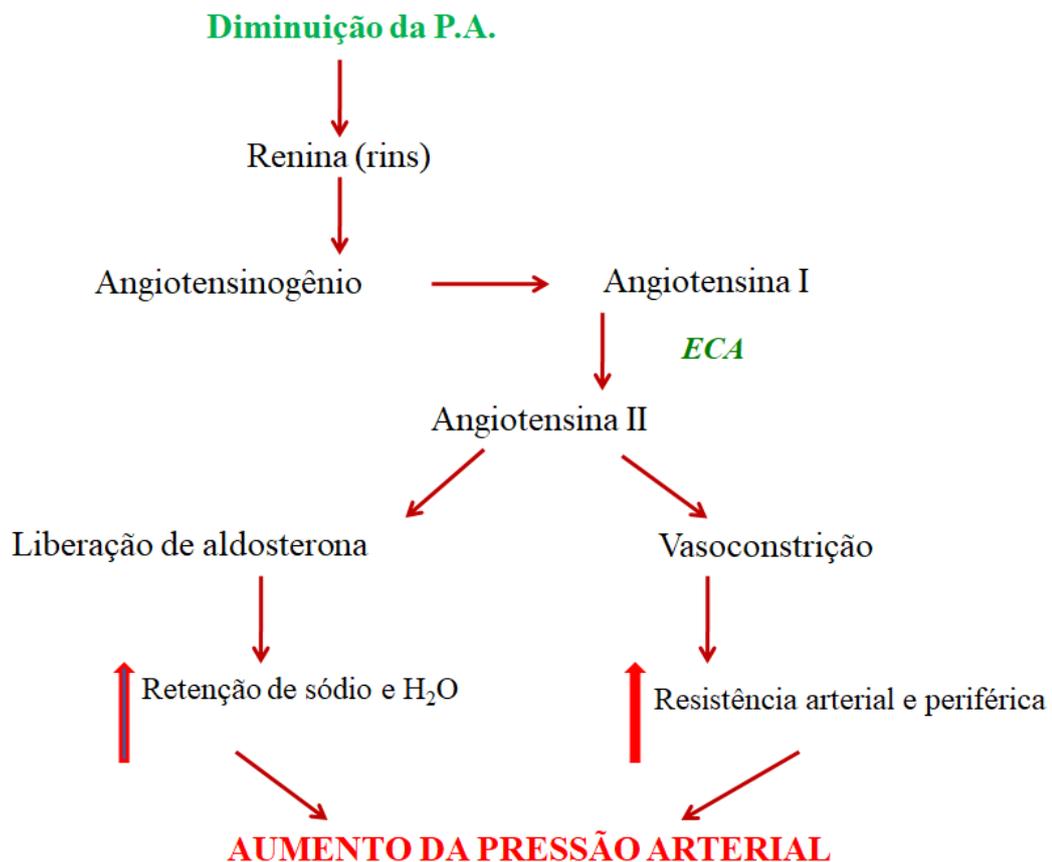
O mecanismo de ação dos anti-hipertensivos mais estudado é a inibição da enzima conversora de angiotensina pelo sistema renina-angiotensina (Figura 2). O sistema renina-angiotensina desempenha papel importante no controle da pressão arterial e no equilíbrio dos eletrólitos corporais.

A ECA é uma enzima multifuncional que exerce importante papel na regulação da pressão sanguínea pela transformação da forma inativa do decapeptídeo angiotensina I, em um potente vasoconstritor, octapeptídeo angiotensina II, e pela inativação catalítica da bradicinina, a qual tem ação depressora (DASKAYA-DIKMEN, et al., 2017).

O sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA) tem um papel importante na regulação da pressão arterial e função cardiovascular. Quando há queda na pressão arterial, o angiotensinogênio, uma glicoproteína secretada pelo fígado, é clivado pela renina, glicoproteína secretada pelos rins, liberando um decapeptídeo inativo denominado angiotensina I (Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe-His-Leu). Então, a enzima conversora de angiotensina I (ECA) converte a angiotensina I, pela liberação de dois aminoácidos da porção C-terminal, em um octapeptídeo vasoativo, a angiotensina II (Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe) que atua no aumento da pressão arterial. A

angiotensina II possui efeito vasoconstritor, estimula a liberação da aldosterona (hormônio que atua nos rins aumentando a retenção de sódio, a reabsorção de água e a excreção de potássio) (DASKAYA-DIKMEN, et al., 2017).

**Figura 2.** O mecanismo de ação dos anti-hipertensivos sobre a inibição da enzima conversora de angiotensina pelo sistema renina-angiotensina.



Fonte: O autor 2019

O tratamento é realizado com diversos medicamentos sintéticos:  $\beta$ -bloqueadores, diuréticos, inibidores da enzima conversora de angiotensina (ECA) e bloqueadores de receptores da angiotensina II (DASKAYA-DIKMEN et al., 2017). A inibição desta enzima pode exercer efeito anti-hipertensivo. Muitos peptídeos inibidores da ECA têm sido isolados através da digestão enzimática de várias proteínas do leite e são atualmente um grupo de peptídeos bioativos bastante estudados (LIN et al. 2017; IBRAHIM et al. 2017; OLIVEIRA et al., 2018).

Peptídeos inibidores de ECA atuam no controle da pressão arterial alta por meio da dilatação dos vasos sanguíneos e de seu efeito sobre o volume de sangue. Sendo que os primeiros derivados de proteínas alimentares foram descritos por Oshima et al(1979)

que os isolaram a partir da gelatina hidrolisada com colagenase (Clostridiopeptidase A, EC 3.4.24.3). A partir de então, houve um crescente interesse no desenvolvimento de métodos para isolar peptídeos com atividade anti-hipertensiva, derivados de proteínas alimentares, como Maruyama e Suzuki (1982) que testaram caseína intacta e seu hidrolisado trípico, entretanto, apenas este último inibiu a ECA.

Alguns autores relatam em estudos *in vitro* (CONTERAS et al. 2011; CONTERAS et al. 2013; LIN et al. 2017) e *in vivo* (COSTA et al. 2007; BOUTROU et al. 2013), a capacidade inibitória sobre a ECA e o efeito hipotensor de hidrolisados enzimáticos proteicos. No primeiro caso, essa atividade é expressa em percentual de inibição ou como valor  $IC_{50}$ , sendo este último definido como a concentração de hidrolisado ( $mg.mL^{-1}$ ) necessária para reduzir a atividade desta enzima em 50% (CONTERAS et al. 2013). Assim, Jiang et al. (2007) empregaram seis enzimas proteolíticas disponíveis comercialmente (alcalase, flavourzima, neutrase, papaína, pepsina e tripsina) para a obtenção de hidrolisados de caseína, proveniente do leite de Iaque. A atividade inibitória da ECA destes hidrolisados foi, então, determinada *in vitro*, por método espectrofotométrico, sendo expressa como valor  $IC_{50}$ , que variou de  $0,384 mg.mL^{-1}$  para o hidrolisado de neutrase, a  $2,115 mg.mL^{-1}$  para o hidrolisado de flavourzima. Os autores concluíram que a caseína do leite de Iaque poderia ser uma fonte de peptídeos anti-hipertensivos, os quais podem ser usados como ingredientes funcionais de diferentes alimentos.

Jiang et al. (2010) avaliaram a atividade hipotensora de hidrolisados derivados da caseína bovina. Para tanto, as soluções de caseína, foram hidrolisadas usando a enzima AS1.398 proteases neutra. Os hidrolisados, assim obtidos, foram caracterizados com relação às suas atividades inibitórias da ECA, determinada por eletroforese capilar e expressa como valor  $IC_{50}$ , bem como pela medida da atividade hipotensora, *in vivo*, em ratos espontaneamente hipertensos, após administração oral dos hidrolisados. Os autores observaram que os valores de  $IC_{50}$  variaram de 21 a  $54 \mu g.mL^{-1}$ .

Em outro estudo Contreraset al. (2011) desenvolveram e caracterizaram um ingrediente de grau alimentício com atividade anti-hipertensiva demonstrada em animais modelo, contendo, como moléculas ativas, as novas sequências peptídicas Arg-Tyr-Leu-Gly-Tyr e Ala-Tyr-Phe-Tyr-Pro-Glu-Leu. A atividade inibitória da enzima conversora da angiotensina (ECA) foi avaliada *in vitro*, pelo método de fluorescência,

cujo valor de  $IC_{50}$  variou de 58 a 77  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . Após este teste, os peptídeos foram incorporados em iogurte líquido e administrados a ratos hipertensos via oral (200 e 800 mg/kg de peso corporal), sendo observada uma redução significativa da pressão arterial, sistólica e diastólica.

Souza Júnior et al. (2014) estudaram a o efeito de hidrolisados inibidores da atividade da enzima conversora de angiotensina (ECA) obtidos por hidrólise catalisada por tripsina na caseína bovina, realizada a 37 °C, durante 1, 2, 5, 8 e 24 h. Os resultados da atividade inibitória *in vitro* variaram entre 13,4% e 78,5%. A maior atividade inibitória da ECA foi evidenciada para os hidrolisados obtidos após 2 horas de reação.

Lin et al. (2017) avaliaram o efeito de diferentes enzimas sobre a obtenção de hidrolisados e sua atividade inibitória da ECA de leite de iaque, a qual foi, igualmente, determinada pelo método espectrofotométrico, sendo expressa em percentual de inibição. Para isso, empregou-se diferentes enzimas, alcalase, quimitripsina, termolisina, tripsina e papaína, variando-se a o pH, a relação enzima: substrato e o tempo de reação. O efeito dos parâmetros testados foi variado, tendo sido obtido hidrolisado cuja atividade inibitória da ECA variou de 35% a 80%.

Mais recentemente, Ibrahim et al. (2017) investigaram a atividade anti-hipertensiva de peptídeos da caseína e das proteínas do soro de leite de cabra hidrolisados por pepsina. Após 2 horas de hidrólise a 37 °C foi caracterizada a atividade inibitória da ECA, determinada pelo método espectrofotométrico. Observou-se que o valor  $IC_{50}$  foi de 40 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ .

### **2.3. Caseína**

As proteínas do leite podem ser divididas em duas grandes classes, caseínas e proteínas do soro. Os dois grupos de proteínas diferem química e fisicamente e estão presentes no leite quase que em diferentes fases. A caseína é encontrada como um agregado coloidal, contendo várias moléculas de proteínas, enquanto que as proteínas do soro apresentam-se em solução (MADENDE et al., 2018).

As caseínas representam aproximadamente 80 a 85% das proteínas do leite (28 g/ L), sendo um grupo heterogêneo de fosfoproteínas presentes como complexos estáveis de cálcio e fosfato que precipitam em pH 4,6 (MADENDE et al., 2018). Cerca de 95% das caseínas estão presentes em forma de micelas, formadas por subunidades de

caseínas, conhecidas como submicelas, com tamanho uniforme e diâmetro entre 10 e 20 nm. As variações do tamanho, composição e massa molar da partícula das submicelas são determinadas por fatores como concentração do tipo de caseína, pH e temperatura (CHEEMA et al., 2015).

Há dois processos básicos de produção de caseínas em escala industrial: a precipitação isoeletrica e a coagulação enzimática. O coágulo de caseína, obtido por enzimas, é usado principalmente na elaboração de queijos. A caseína isoeletrica, obtida pela precipitação no ponto isoeletrico (pH 4,6 a 20 °C), geralmente, é convertida para a forma de sal (caseinato). Neste caso, um álcali (sódio, cálcio ou potássio) é adicionado ao produto, que então é desidratado, e compreendem cerca de 80% das proteínas totais do leite (OLIVEIRA et al., 2018). As caseínas são classificadas em quatro subgrupos: caseínas  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\kappa$  e  $\gamma$ , (Figura 3) sendo que as caseínas  $\alpha$  formam uma família de proteínas com características diferentes ( $\alpha_{S0}$  a  $\alpha_{S5}$ ). Dentro de cada grupo de caseínas aparecem ainda variantes genéticas. As variantes genéticas são mutações que ocorreram na estrutura primária das caseínas em que um ou mais aminoácidos foram substituídos por outros, na sequência primária da cadeia polipeptídica (SGARBIERI, 2005; LAM & MICKERSON, 2013; INGHAM et al., 2018).

Em razão da composição e da sequência de aminoácidos característicos, as caseínas  $\alpha$  e  $\beta$  apresentam estruturas flexíveis com baixíssimo grau de estrutura secundária, estruturas em  $\alpha$ -hélice e em conformação  $\beta$  (folhas  $\beta$ ). Essa característica estrutural da caseína, estrutura relativamente aberta e flexível, deve-se ao elevado teor de prolina (Pro), uniformemente distribuída ao longo da cadeia polipeptídica. A prolina tem a propriedade de interromper a continuidade da estrutura secundária, particularmente a  $\alpha$ -hélice, promovendo uma estrutura bastante randomizada e com baixo grau de estrutura secundária. Em contrapartida, as estruturas terciárias das moléculas de caseína ainda não foram suficientemente esclarecidas. Cálculos teóricos mostram que metade C-terminal de  $\alpha_{S2}$ -caseína, provavelmente, tem uma conformação globular (isto é, uma estrutura compacta contendo algumas  $\alpha$ -hélices e folhas- $\beta$ ), enquanto que a região N-terminal, provavelmente, constitui uma estrutura randômica. Cálculos teóricos sugerem que  $\alpha\beta$ -caseína poderia ter 10% de seus resíduos em hélices, 17% em folhas- $\beta$  e 70% em estruturas desordenadas. A  $\kappa$ -caseína parece ser a mais bem estruturada das caseínas, provavelmente com 23% de seus resíduos em  $\alpha$ -hélices, 31%

em folhas- $\beta$ e 24% em  $\beta$ -curvas (SGARBIERI, 2005; DALGLEISH, 2011; PEREIRA, 2014).

**Figura 3.** Estrutura primária da caseína  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\beta$ -caseína e caseína  $\kappa$  (Fonte: FARRELL et al., 2004).

**$\alpha_1$**

H-Arg-Pro-Lys-His-Pro-Ile-Lys-His-Gln-Gly-Leu-Pro-Gln-Glu-Val-Leu-Asn-Glu-Asn-Leu-  
 21 30 40  
 Leu-Arg-Phe-Phe-Val-Ala-Pro-Phe-Pro-Glu-Val-Phe-Gly-Lys-Glu-Lys-Val-Asn-Glu-Leu-  
 41 50 60  
 Ser-Lys-Asp-Ile-Gly-**SeP**-Glu-**SeP**-Thr-Glu-Asp-Gln-Ala-Met-Glu-Asp-Ile-Lys-Gln-Met-  
 61 70 80  
 Glu-Ala-Glu-**SeP**-Ile-**SeP-SeP-SeP**-Glu-Glu-Ile-Val-Pro-Asn-**SeP**-Val-Glu-Gln-Lys-His-  
 81 90 100  
 Ile-Gln-Lys-Glu-Asp-Val-Pro-Ser-Glu-Arg-Tyr-Leu-Gly-Tyr-Leu-Glu-Gln-Leu-Leu-Arg-  
 101 110 120  
 Leu-Lys-Lys-Tyr-Lys-Val-Pro-Gln-Leu-Glu-Ile-Val-Pro-Asn-**SeP**-Ala-Glu-Glu-Arg-Leu-  
 121 130 140  
 His-Ser-Met-Lys-Glu-Gly-Ile-His-Ala-Gln-Gln-Lys-Glu-Pro-Met-Ile-Gly-Val-Asn-Gln-  
 141 150 160  
 Glu-Leu-Ala-Tyr-Phe-Tyr-Pro-Glu-Leu-Phe-Arg-Gln-Phe-Tyr-Gln-Leu-Asp-Ala-Tyr-Pro-  
 161 170 180  
 Ser-Gly-Ala-Trp-Tyr-Tyr-Val-Pro-Leu-Gly-Thr-Gln-Tyr-Thr-Asp-Ala-Pro-Ser-Phe-Ser-  
 181 190 199  
 Asp-Ile-Pro-Asn-Pro-Ile-Gly-Ser-Glu-Asn-Ser-Glu-Lys-Thr-Thr-Met-Pro-Leu-Trp-OH

**$\alpha_2$**

1 10 20  
 H-Lys-Asn-Thr-Met-Glu-His-Val-**SeP-SeP-SeP**-Glu-Glu-Ser-Ile-Ile-**SeP**-Gln-Glu-Thr-Tyr-  
 21 30 40  
 Lys-Gln-Glu-Lys-Asn-Met-Ala-Ile-Asn-Pro-**SeP**-Lys-Glu-Asn-Leu-Cys-Ser-Thr-Phe-Cys-  
 41 50 60  
 Lys-Glu-Val-Val-Arg-Asn-Ala-Asn-Glu-Glu-Glu-Tyr-Ser-Ile-Gly-**SeP-SeP-SeP**-Glu-Glu-  
 61 70 80  
**SeP**-Ala-Glu-Val-Ala-Thr-Glu-Glu-Val-Lys-Ile-Thr-Val-Asp-Asp-Lys-His-Tyr-Gln-Lys-  
 81 90 100  
 Ala-Leu-Asn-Glu-Ile-Asn-Gln-Phe-Tyr-Gln-Lys-Phe-Pro-Gln-Tyr-Leu-Gln-Tyr-Leu-Tyr-  
 101 110 120  
 Gln-Gly-Pro-Ile-Val-Leu-Asn-Pro-Trp-Asp-Gln-Val-Lys-Arg-Asn-Ala-Val-Pro-Ile-Thr-  
 121 130 140  
 Pro-Thr-Leu-Asn-Arg-Glu-Gln-Leu-**SeP-Thr-SeP**-Glu-Glu-Asn-Ser-Lys-Lys-Thr-Val-Asp-  
 141 150 160  
 Met-Glu-**SeP**-Thr-Glu-Val-Phe-Thr-Lys-Lys-Thr-Lys-Leu-Thr-Glu-Glu-Glu-Lys-Asn-Arg-  
 161 170 180  
 Leu-Asn-Phe-Leu-Lys-Lys-Ile-Ser-Gln-Arg-Tyr-Gln-Lys-Phe-Ala-Leu-Pro-Gln-Tyr-Leu-  
 181 190 200  
 Lys-Thr-Val-Tyr-Gln-His-Gln-Lys-Ala-Met-Lys-Pro-Trp-Ile-Gln-Pro-Lys-Thr-Lys-Val-  
 201 207  
 Ile-Pro-Tyr-Val-Arg-Tyr-Leu-OH

	1	10	20
<b>β</b>	H-Arg-Glu-Leu-Glu-Glu-Leu-Asn-Val-Pro-Gly-Glu-Ile-Val-Glu- <u>SeP</u> -Leu- <u>SeP</u> - <u>SeP</u> - <u>SeP</u> -Glu-		
	21	↓ 30	40
	Glu-Ser-Ile-Thr-Arg-Ile-Asn-Lys-Lys-Ile-Glu-Lys-Phe-Gln- <u>SeP</u> -Glu-Glu-Gln-Gln-Gln-		
	41	50	60
	Thr-Glu-Asp-Glu-Leu-Gln-Asp-Lys-Ile-His-Pro-Phe-Ala-Gln-Thr-Gln-Ser-Leu-Val-Tyr-		
	61	70	80
	Pro-Phe-Pro-Gly-Pro-Ile-Pro-Asn-Ser-Leu-Pro-Gln-Asn-Ile-Pro-Pro-Leu-Thr-Gln-Thr-		
	81	90	100
	Pro-Val-Val-Val-Pro-Pro-Phe-Leu-Gln-Pro-Glu-Val-Met-Gly-Val-Ser-Lys-Val-Lys-Glu-		
	101	↓ ↓ 110	120
	Ala-Met-Ala-Pro-Lys-His-Lys-Glu-Met-Pro-Phe-Pro-Lys-Tyr-Pro-Val-Glu-Pro-Phe-Thr-		
	121	130	140
	Glu-Ser-Gln-Ser-Leu-Thr-Leu-Thr-Asp-Val-Glu-Asn-Leu-His-Leu-Pro-Leu-Pro-Leu-Leu-		
	141	150	160
	Gln-Ser-Trp-Met-His-Gln-Pro-His-Gln-Pro-Leu-Pro-Pro-Thr-Val-Met-Phe-Pro-Pro-Gln-		
	161	170	180
	Ser-Val-Leu-Ser-Leu-Ser-Gln-Ser-Lys-Val-Leu-Pro-Val-Pro-Gln-Lys-Ala-Val-Pro-Tyr-		
	181	190	200
	Pro-Gln-Arg-Asp-Met-Pro-Ile-Gln-Ala-Phe-Leu-Leu-Tyr-Gln-Glu-Pro-Val-Leu-Gly-Pro-		
	201	209	
Val-Arg-Gly-Pro-Phe-Pro-Ile-Ile-Val-OH			
	*1	10	20
<b>κ</b>	H-Glu-Glu-Gln-Asn-Gln-Glu-Gln-Pro-Ile-Arg-Cys-Glu-Lys-Asp-Glu-Arg-Phe-Phe-Ser-Asp-		
	21	30	40
	Lys-Ile-Ala-Lys-Tyr-Ile-Pro-Ile-Gln-Tyr-Val-Leu-Ser-Arg-Tyr-Pro-Ser-Tyr-Gly-Leu-		
	41	50	60
	Asn-Tyr-Tyr-Gln-Gln-Lys-Pro-Val-Ala-Leu-Ile-Asn-Asn-Gln-Phe-Leu-Pro-Tyr-Pro-Tyr-		
	61	70	80
	Tyr-Ala-Lys-Pro-Ala-Ala-Val-Arg-Ser-Pro-Ala-Gln-Ile-Leu-Gln-Trp-Gln-Val-Leu-Ser-		
	81	90	100
	Asn-Thr-Val-Pro-Ala-Lys-Ser-Cys-Gln-Ala-Gln-Pro-Thr-Thr-Met-Ala-Arg-His-Pro-His-		
	101	↓ 110	120
	Pro-His-Leu-Ser-Phe-Met-Ala-Ile-Pro-Pro-Lys-Lys-Asn-Gln-Asp-Lys-Thr-Glu-Ile-Pro-		
	121	130	140
	Thr-Ile-Asn-Thr-Ile-Ala- <u>Ser</u> -Gly-Glu-Pro-Thr-Ser-Thr-Pro- <u>Thr</u> -Thr-Glu-Ala-Val-Glu-		
	141	150	160
	Ser-Thr-Val-Ala- <u>Thr</u> -Leu-Glu-Asp- <u>SeP</u> -Pro-Glu-Val-Ile-Glu-Ser-Pro-Pro-Glu-Ile-Asn-		
	161	169	
Thr-Val-Gln-Val-Thr-Ser-Thr-Ala-Val-OH			

Como citado anteriormente, as caseínas são fosfoproteínas contendo número variável de radicais fosfato ligados à serina (P-Ser), concentrados em diferentes regiões das cadeias polipeptídicas, originando nas moléculas regiões mais hidrofílicas ou mais hidrofóbicas (caráter anfifílico). Como resultado, as caseínas são mais suscetíveis à proteólise e difundem-se mais rápida e fortemente em interfaces do que as proteínas do soro de leite. A caseína  $\kappa$  apresenta-se mais hidrofílica, apesar de apresentar apenas um radical fosforilserina, por possuir carboidrato na molécula (glicopeptídeo), caracterizando-se como uma P-glicoproteína (SGARBIERI, 2005; HOLT et al., 2013; HALILOGLU & BAHAR, 2015).

A  $\kappa$ -caseína, em virtude de suas características estruturais e da localização de suas moléculas na superfície das micelas, atua como estabilizadora dessas partículas, não permitindo a precipitação das caseínas sensíveis ao  $\text{Ca}^{2+}$  por ação dos sais de cálcio do leite. A solubilidade da caseína  $\kappa$  não é afetada pela presença do  $\text{Ca}^{2+}$ . A região da sequência primária da para- $\kappa$ -caseína, por ser de natureza apolar, orienta-se para o

interior das micelas e interage, por meio de grupos hidrofóbicos, com as caseínas  $\alpha_s$  e  $\beta$ , dispostas no núcleo da micela, ao passo que o glicomacropéptido (GMP), em virtude de sua polaridade, orienta-se para a fase soro, interagindo com a água. Essas interações da sequência primária da  $\kappa$ -caseína estabilizam as micelas no leite (FARRELL et al., 2004; SGARBIERI, 2005; YOUNES, 2017).

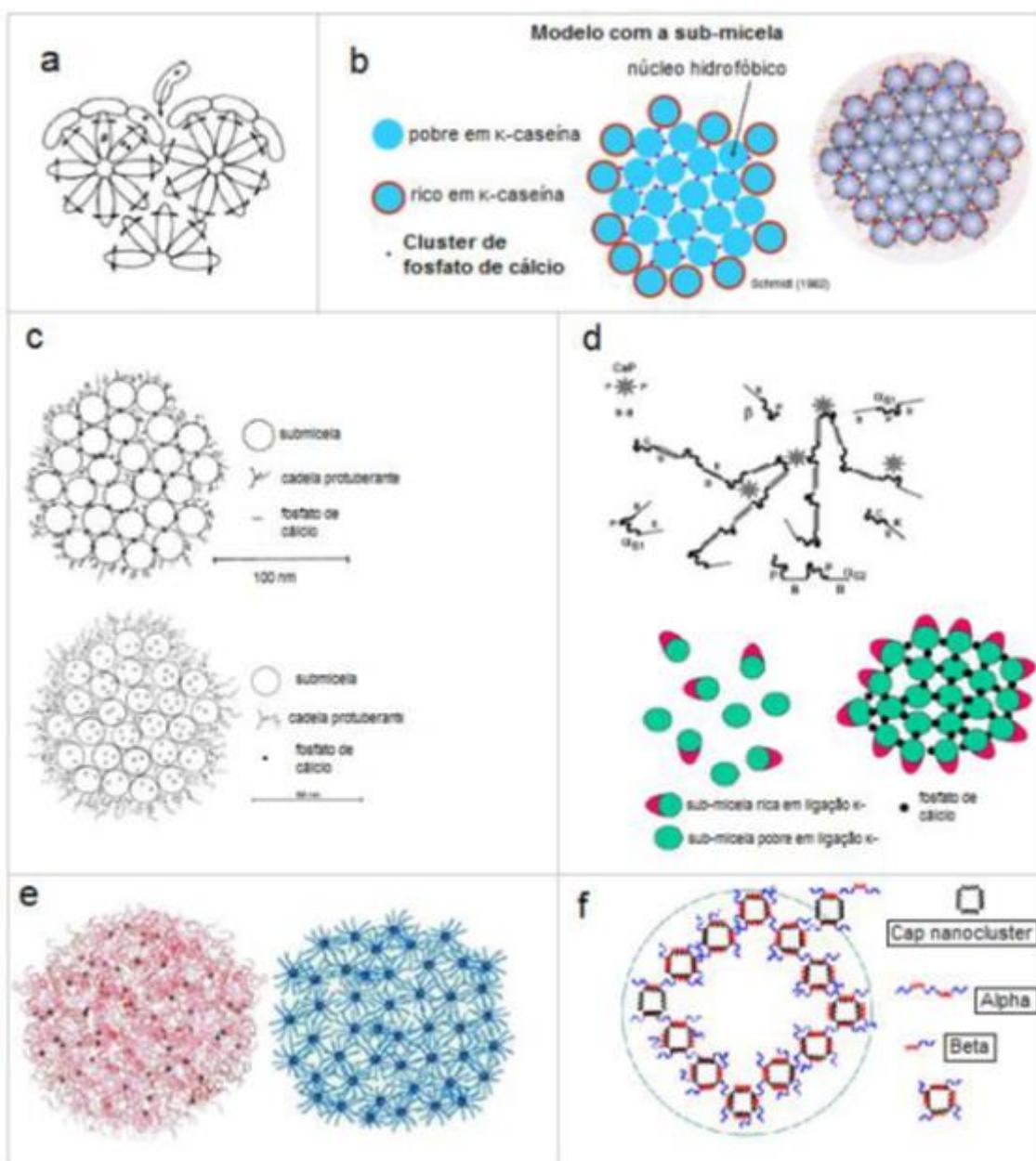
A hidrólise enzimática que ocorre na manufatura do queijo ou o tratamento térmico em temperaturas elevadas resulta na remoção ou dissociação da  $\kappa$ -caseína da superfície das micelas, eliminando a estabilização eletrostática e estérica da superfície micelar e aumentando a hidrofobicidade de superfície, o que resulta em agregação das micelas e formação de coágulo (SGARBIERI, 2005; CORREDIGet al., 2019).

### **2.3.1. Micelas de caseína**

No leite, as caseínas existem como grandes partículas coloidais, com diâmetro de 50-600nm (média de aproximadamente 150 nm), chamadas micelas de caseína. Muitas das importantes propriedades tecnológicas do leite, por exemplo, sua cor branca, estabilidade térmica e coagulação, são devidas às propriedades das micelas. No leite, as micelas de caseína apresentam-se altamente hidratadas (3,7 g ou 4,4 mL de água) por grama de caseína. As micelas apresentam massa molecular da ordem de  $2,5 \times 10^8$  Da. São formadas de aproximadamente 94% (p/p) de caseínas e 6% de minerais, referido coletivamente como fosfato de cálcio coloidal (KETHIREDDIPALLI & HILL, 2015; CORREDIGet al., 2019).

Muitos modelos para a estrutura das micelas de caseína têm sido propostos e ainda, no que diz respeito às interações envolvidas na sua montagem e manutenção da integridade destas partículas, controvérsia entre os pesquisadores permanece. No entanto, há um consenso geral de que as caseínas são mantidas por um equilíbrio entre interações eletrostáticas e hidrofóbicas. A partir dessas e outras observações e considerações, resultou no modelo ilustrado na Figura 4. Um elemento importante é que a micela é construída de submicelas de composição mista, cada uma com um tamanho de 12-15 nm, contendo cerca de 20 a 25 moléculas de caseína. Alguns destas submicelas contêm um ou dois polímeros de  $\kappa$ -caseína e estão do lado de fora das micelas. As outras submicelas deverão conter nenhum ou muito pouco  $\kappa$ -caseína (HORNE, 2016).

**Figura 4.** a) Modelo das micelas de caseína proposto por Waugh (1958); b) Modelo das micelas de caseína proposto por Schmidt e Fox (1982); c) Modelo das micelas de caseína proposto por Walstra (1990) e novamente por Walstra (1999), sendo observada a mudança na escala e posição do fosfato de cálcio coloidal; d) Modelo proposto por Horne (2003), demonstrando a dupla ligação, e a interpretação do modelo de Schmidt e Fox descrito em uma revisão científica de Horne (2006); e) Modelo da micela de caseína proposto por De Kruif e Holt (2003), e com uma ilustração tridimensional sobre a estrutura micelar da caseína; f) Modelo da estrutura da micela de caseína proposto por Horne (2006).



Devido ao seu processamento simples, de um ponto de vista industrial, tecnológico e de produtos lácteos, as caseínas são, de longe, o componente mais importante e valioso do leite. Os principais produtos lácteos como leite líquido, queijo e iogurte derivam suas propriedades texturais, sensoriais e nutricionais das caseínas (LIU et al., 2014). Para o recém-nascido, elas são facilmente metabolizadas e carregam substâncias importantes na nutrição, como: cálcio, magnésio e fósforo (como fosfato). A sua hidratação e fortes interações entre elas e com vários outros componentes, tornaram-nas valorizados ingredientes em alimentos (Farrell, 2011). Além da sua utilização óbvia na indústria alimentar, a caseína é também aplicada noutros campos, incluindo a utilização de seus peptídeos no tratamento não medicamentoso da hipertensão (GŁAB & BORATYNSKI, 2017).

### **2.3.2. Caseína Caprina**

Em relação ao teor de proteína, como no leite de vaca, as caseínas são classificadas como  $\kappa$ -,  $\beta$ -,  $\alpha_{S1}$ -,  $\alpha_{S2}$ - e  $\gamma$ -caseínas. A principal proteína no leite de vaca é caseína  $\alpha_{S1}$ , enquanto que no leite de cabra é  $\beta$ -caseína. O conteúdo de caseína no leite de cabra representa 74% do total de proteínas do leite, as proteínas do soro chegam a quase 17% e a proporção de compostos nitrogenados não proteicos é de 9% (CLARK & GARCÍA, 2017). As diferenças entre as proteínas dentre as espécies estão relacionadas a polimorfismos genéticos e suas frequências em populações de caprinos, principalmente em relação à  $\alpha_1$ -caseína (PULINA et al., 2018). Portanto, a proporção de micelas de caseína de pequeno tamanho é maior no leite de cabra do que no leite de vaca, o que explica a melhor digestibilidade do leite de cabra e seus derivados. Além disto as micelas de caseína do leite de cabra contêm mais cálcio e fósforo inorgânico, são menos solvatadas e menos estáveis ao calor, e perdem mais  $\beta$ -caseína do que as micelas de bovino (PULINA et al., 2018).

A análise do proteoma do leite de cabra mostrou que algumas proteínas presentes não foram encontradas no leite de vaca. Estas proteínas são constituídas por componentes que são precursores de peptídeos envolvidos em potenciais efeitos hipotensores (isto é, angiotensinogénio); estão envolvidos no desenvolvimento da glândula mamária normal (isto é, distroglicana); contribuir para a proteção imunológica fetal (fator H); ou podem ser classificados como fatores de defesa (componentes do complemento C2 e C6) (VERRUCK et al., 2019).

### 2.3.3. Caseína bubalina

O leite de búfala possui acentuadas diferenças físico-químicas, em comparação ao leite de outros animais, com grandes micelas de caseína, proporcionando rápida coagulação no processamento; menos água e, conseqüentemente, produtos mais firmes; sua gordura é constituída de glóbulos maiores e de coloração clara; os ácidos graxos capríco, caprílico e cáprico são encontrados em menor quantidade e, quando liberados nos derivados lácteos, contribuem para o sabor e aroma característicos (NGUYENA et al., 2017). É um líquido de coloração branca, devido à ausência de pigmentos carotenoides (provitamina A) e sabor levemente adocicado. Além disso, a hidrólise durante a maturação dos seus derivados é mais lenta, no que se refere às atividades lipolíticas e proteolíticas (HUSSAIN et al., 2012).

As micelas de caseína do leite bubalino, subdivididas nas frações  $\alpha_1$ -caseína,  $\alpha_2$ -caseína,  $\beta$ -caseína e  $\kappa$ -caseína, constituem em média, respectivamente, 35%, 15%, 32% e 5% do total. No leite bovino, a fração  $\alpha_1$ -caseína constitui 40%,  $\alpha_2$ -caseína 10%,  $\beta$ -caseína 45% e a  $\kappa$ -caseína representada por 10%. Estudos mostraram que a caseína do leite de búfala possui uma quantidade 25,5% superior de aminoácidos essenciais que o leite bovino (RONCADA et al., 2012).

As Caseínas geralmente contêm vários peptídeos biologicamente ativos. No entanto, esses peptídeos permanecem inativos desde que permaneçam ligados a outros aminoácidos na estrutura primária (DALIRI et al., 2017). Na última década diversas pesquisas têm sido realizadas em busca de novos métodos de hidrólise para a obtenção e o isolamento de peptídeos bioativos a partir de proteínas de baixo custo, sobretudo caseínas. A preparação de hidrolisados ricos em peptídeos bioativos, a partir do tratamento enzimático de proteínas originais, tem ganhado destaque devido ao aumento no valor agregado e menor eliminação de resíduos (ZAMBROWICZ et al., 2015). A hidrólise enzimática de moléculas de proteínas inteiras é a forma mais comum de produzir peptídeos bioativos.

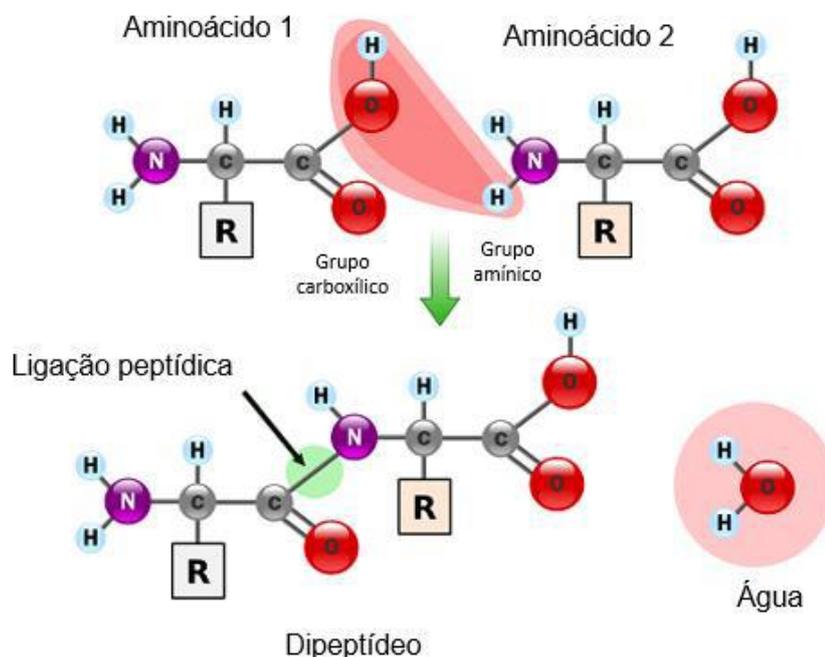
## 2.4. Hidrólise de proteínas

Os hidrolisados podem ser definidos como proteínas que são clivadas química ou enzimaticamente em peptídeos de vários tamanhos. A hidrólise proteica tem importância em diversos processos industriais e na alteração das propriedades

funcionais das proteínas, sendo utilizada para diminuir alergenicidade, obter suplementos proteicos, melhorar a formação de espumas, estabilidade de produtos além de ajudar na conservação de valor nutricional (AMBROSI et al, 2016).

A hidrólise química é realizada pela quebra de ligações peptídicas com ácidos(ex: ácido clorídrico sulfúrico e trifluoroacético) ou bases(ex: hidróxido de sódio e de bário). O rendimento dos dois processos é dependente do tipo de álcali ou ácido utilizado, a temperatura e tempo de reação. Apesar dos dois processos apresentarem altos rendimentos de hidrólise apresentam algumas limitações, como: destruição de alguns aminoácidos, comprometendo o valor nutricional das proteínas do leite e dificuldade de controle de processo, gerando quase sempre produtos com composição química e propriedades funcionais variáveis (SGARBIERI, 1996; BHAT et al., 2015). Na Figura 5 é representada a formação de um peptídeo pela ligação covalente de aminoácidos.

**Figura 5.** Ilustração da formação da ligação peptídica.



Fonte: <http://mundodabioquimica.blogspot.com.br/2015/01/ligacao-peptidica.html>

A substituição de catalisadores químicos em processos industriais por enzimas, deve-se principalmente às condições brandas de pH e temperatura que estas atuam. A utilização de enzimas pode reverter em benefícios econômicos do processo, como consequência da redução de tempo e de energia elétrica gastos. Além disso, devido à sua

biodegradabilidade, com a utilização de enzimas há uma redução na quantidade de rejeitos industriais, os quais comprometem o meio ambiente. Estas macromoléculas, por serem mais específicas em suas reações comparadas aos catalisadores sintéticos, proporcionam poucas reações secundárias e menor formação de resíduos no produto final, aumentando a qualidade de produção e reduzindo a poluição (SZALAPATA et al., 2016).

A hidrólise enzimática é aplicada quando se deseja melhorar a disponibilidade dos peptídeos biologicamente ativos presentes nas moléculas de proteínas. Segundo Parkin (2010) os fatores mais importantes na escolha de uma proteína que será fonte de um hidrolisado são: baixo custo, propriedades funcionais intrínsecas, composição de aminoácidos. Todos estes fatores devem ser contextualizados com o tipo de enzima a ser utilizada, assim como temperatura e pH. Conforme se eleva o grau de hidrólise (GH) das caseínas, aumenta-se também sua solubilidade, facilitando a absorção e conseqüentemente a biodisponibilidade desses aminoácidos, tornando os produtos hidrolisados importantes para a nutrição de pacientes hospitalizados e desportistas (POULSEN et al, 2016; ROCHA et al, 2017).

De acordo com o grau de hidrólise alcançado, obtêm-se peptídeos de diferentes massas moleculares e responsáveis por inúmeras características funcionais. Dentre as faixas de peptídeos e sua funcionalidade tem-se (PARKIN, FENNEMA e DAMODARAN, 2010):

- GH 3 - 6% - Peptídeos de 2 a 5 kDa em média. Importantes na funcionalidade do hidrolisado.
- GH 8% - Peptídeos de 1 a 2 kDa em média. Com solubilidade ótima e indicado para uso em nutrição clínica e esportiva.
- GH 50 - 70% - Gera pequenos peptídeos e aminoácidos, menores que 1kDa em média e utilizados em alimentos infantis, como hipoalergênicos e ingredientes saborizantes para sopas e molhos.
- GH > 70% - Acima deste valor observa-se acúmulo de peptídeos amargos devido ao reduzido tamanho e hidrofobicidade, sendo necessária a utilização de medidas que controlem estes efeitos, não apresentando ação bioativa.

Para atender aos requisitos nutricionais, além de manter próximas às características da proteína original, os hidrolisados devem reunir as seguintes propriedades: sabor aceitável, com o menor amargor possível, equilíbrio osmótico e hipoalergenicidade (TAMM & DRUSCH 2017).

A qualidade e as características finais do hidrolisado proteico dependem de vários fatores que devem ser controlados no processo para se alcançar os resultados desejados, entre eles encontram-se, a composição e o pré-tratamento aplicado ao substrato, o pH do meio reacional, a temperatura, e a especificidade da enzima aplicada (LIN et al. 2017).

#### **2.4.1. Fatores relacionados com a hidrólise enzimática**

O processo hidrolítico e as condições de reação diferem entre diferentes enzimas e substratos utilizados e também depende das propriedades desejadas para o hidrolisado. A temperatura e o pH do processo são normalmente ajustados para otimizar a cinética da enzima ou mistura de enzimas selecionadas. Uma protease comercial é adicionada em variadas concentrações dependendo da taxa de hidrólise necessária. Dada uma determinada enzima e um substrato em particular, qualquer processo de hidrólise envolve ao menos 3 variáveis independentes. Estas são, pH, temperatura, proporção enzima-substrato e tipo de protease (FICILE et al., 2017).

#### **2.4.2. pH**

O pH do meio da reação é um fator importante na hidrólise enzimática. A importância deste fator está relacionada à natureza dos grupos funcionais da enzima, principalmente os grupos dos sítios ativos da enzima, que sofre também influência da temperatura, pois afeta o grau de associação/dissociação dos grupos funcionais. A força iônica do meio é outro fator que pode influir no pH em função da atividade iônica desse meio (TAVANO, 2016). A inativação química pode se dar tanto pela diminuição ou aumento do pH do meio, até um ponto onde as enzimas forem inativadas. Algumas enzimas são mais sensíveis para mudanças de pH do que para mudanças na temperatura. Extremos de pH podem também, assim como temperaturas elevadas, ter efeitos negativos nas proteínas e peptídeos. Muitas proteínas se desdobram em valores de pH menores que 5 e maiores que 10 (SIAR et al., 2017).

### **2.4.3. Temperatura**

A temperatura é um dos fatores mais estudados na reação enzimática, e verifica-se que a temperatura da reação de hidrólise determina a atividade enzimática, portanto, recomenda-se utilizar temperaturas para máxima atividade das enzimas, ou utilizar um intervalo de temperatura em que a estabilidade das enzimas e dos substratos não seja comprometida (TAVANO et al., 2018).

A temperatura na qual várias proteínas desnaturam e desdobram-se varia enormemente. A desnaturação é normalmente indesejada porque resulta na alteração das propriedades físico-químicas, particularmente na perda de solubilidade e funcionalidade da proteína(SINGH et al., 2016).

A influência da temperatura na hidrólise enzimática pode ser observada em três etapas distintas, a saber: no pré-tratamento do substrato, durante a reação hidrolítica e na interrupção desta reação (BKHAIRIA et al., 2016).

O pré-tratamento do substrato pelo calor pode influenciar no grau de hidrólise devido à desnaturação proteica. Este procedimento provoca uma modificação da estrutura tridimensional da proteína, agindo sobre suas ligações fracas, as quais são responsáveis pela conformação nativa, aumentando a exposição das ligações peptídicas (estrutura primária), melhorando, assim, a acessibilidade do substrato às enzimas. Entretanto, é interessante ressaltar que o tratamento térmico dos substratos nem sempre apresenta efeitos benéficos sobre as reações enzimáticas. A desnaturação proteica provocada pelo calor poderá, por sua vez, influenciar o pH ótimo de algumas enzimas. A pepsina, por exemplo, apresenta atividade máxima em pH 2,0 ao atuar sobre a hemoglobina. Após este substrato proteico ter sido desnaturado por tratamento térmico, este valor passa para 3,5. Com relação ao efeito da temperatura durante a reação enzimática, sabe-se que cada enzima apresenta o seu valor ótimo de atuação, o qual é interpretado pela avaliação da curva de atividade versus temperatura, sendo dependente da duração da reação(CUI et al., 2009).

### **2.4.4. Concentração enzimática versus concentração de substrato**

A relação enzima/substrato (E:S) é um fator importante na cinética da reação e influencia também na recuperação do produto. A relação enzima substrato (E:S) exerce influência na velocidade da reação e no tamanho dos peptídeos produzidos no final do

processo de hidrólise (RAGHAVAN & KRISTINSSON, 2009). A especificidade da enzima determina principalmente a natureza do produto, podendo resultar frações de diferentes pesos moleculares e conseqüentemente diferentes características funcionais. A natureza e o estado de desnaturação das proteínas do substrato são fatores determinantes na taxa de conversão da enzima, influenciando na natureza do produto. Assim, podem resultar peptídeos de diferentes tamanhos ou, até mesmo, aminoácidos livres em função da natureza e do estado do substrato (RAGHAVAN & KRISTINSSON, 2009).

Comparando dois hidrolisados pancreáticos de caseína Silvestre et al. (1994a,b) mostraram que uma redução na relação E:S de 1:25 para 1:20 levou a um maior conteúdo de peptídeos com massa molar elevada (> 7 resíduos de aminoácidos) e a uma menor proporção de peptídeos médios (4 a 7 resíduos de aminoácidos) e aminoácidos livres. Por outro lado, o teor de di- e tripeptídeos permaneceu inalterado.

#### **2.4.5. Proteases**

As proteases são enzimas hidrolíticas que catalisam a clivagem de ligações peptídicas em proteínas ou fragmento de proteínas (peptídeos). A ligação peptídica é a ligação covalente mais importante que une os aminoácidos para formar peptídeos e proteínas. A hidrólise das ligações peptídicas é, portanto, um passo necessário na determinação da composição em aminoácidos das proteínas. As enzimas proteolíticas (EC 3.4, são classificadas no grupo 3 das hidrolases, subgrupo 4) são divididas em endopeptidases e exopeptidase, de acordo com sua ação nas ligações peptídicas, agindo nas ligações internas ou clivando ligações peptídicas amino ou carboxitermina. As endopeptidases são subdivididas de acordo com o mecanismo catalítico (grupo funcional no local de ação), em serina proteases, proteases aspárticas, cisteína proteases e metaloproteases. Uma das outras formas de serem classificadas é de acordo com o seu pH, sendo ácidas, neutras e alcalinas. Proteases ácidas são constituídas principalmente de aspártico-proteases, serino-proteases e metaloproteases; proteases neutras são fracamente alcalinas e fracamente ácidas e constituídas por cisteína-proteases, serino-proteases e metaloproteases (LEHNINGER, 1995; VERMELHO et al., 2008; SOUZA et al., 2015).

Enzimas proteolíticas estão entre as de maior importância no mercado industrial, sendo responsáveis por grande parte da movimentação financeira nesse setor, em

virtude do seu extenso uso em diversos setores industriais. A enorme diversidade de proteases, somada à especificidade de sua ação, atraiu a atenção mundial em tentativas de explorar suas aplicações fisiológicas e biotecnológicas (FOX et al., 1991; POLDERMANS, 1990). São importantes em muitos processos biológicos, incluindo a digestão de proteínas de alimentos, reciclagem de proteínas intracelulares, a apresentação de antígeno e a ativação de uma grande variedade de proteínas, incluindo outras enzimas, hormônios peptídicos e neurotransmissores. Essas enzimas são amplamente aplicadas na indústria alimentícia (panificação, bebidas, laticínios, processamento de carne e suplementos dietéticos), farmacêutica (produção de trombolíticos, auxiliar em digestão e cicatrização de feridas), cosmética (limpeza profunda da pele, cicatrização e tratamento depilatório), têxtil (tratamento de couro, lã e seda), fotográfica (recuperação de prata), de produtos de limpeza (detergentes e soluções de higienização de lentes de contatos, materiais cirúrgicos e membranas filtrantes) e na química fina (produção de insulina humana semissintética, síntese de di- e tripeptídeos) (SANTOS et al., 2016).

Nos anos 90, o valor estimado das vendas mundiais de enzimas industriais era de US\$1 bilhão (GODFREY, 1996). Em 2004, o mercado enzimático mundial faturou um total de US\$3,7 bilhões e tinha uma previsão de crescimento da demanda mundial de 6,5% ao ano até 2009 (MONTEIRO; SILVA, 2009). Em 2010, o mercado global de enzimas industriais foi estimado em US\$3,3 bilhões (ABIDI et al., 2011). Em 2014, estimou-se em cerca de US\$ 4,2 bilhões (SINGH et al., 2016), e acredita-se desenvolver, até 2022, cerca de US\$ 6,3 bilhões (INDUSTRIAL ENZYME MARKET, 2016).

A capacidade de uma enzima catalisar uma reação específica é talvez sua propriedade mais significativa. A atividade catalítica de uma enzima proporciona um meio sensível e específico para sua própria mensuração. Sob condições apropriadas, a velocidade de uma reação enzimática depende das concentrações de enzima e de substrato. Os resultados são expressos em unidades (U) enzimáticas: 1 U é a quantidade de enzima que catalisa a formação de 1 mmol de produto por minuto sob condições definidas.

A reação enzimática pode ser expressa pela seguinte equação:



Onde E: enzima; S: substrato; P: produto.

O principal papel das enzimas proteolíticas é nutricional, onde estas hidrolisam grandes cadeias polipeptídicas em pequenas moléculas que a célula possa absorver. Estão envolvidas em outros processos biológicos, como formação e germinação de esporos e ciclo celular, sendo estas enzimas geralmente sintetizadas junto à membrana celular, numa forma precursora e depois liberadas na forma final ativa por proteólise. A extensão peptídica que é removida nesse processo parece ser de natureza hidrofóbica o que facilita a passagem da enzima através da membrana (SOGART, 1983).

A escolha da enzima deve basear-se no produto que se deseja obter, cada enzima apresenta sua especificidade e capacidade de interação com o substrato. Existem diferentes enzimas que podem ser usadas para a hidrólise das caseínas do leite, sendo que cada uma apresenta diferentes características e por isso é importante conhecê-las para fazer a escolha correta. A maioria dos peptídeos derivados de caseína que apresentam atividade biológica é produzida *in vitro* pelo uso de proteinases pancreáticas, especialmente tripsina. Combinações de endo-proteinases também podem ser utilizadas, incluindo quimotripsina, pepsina, termolisina, pancreatina, carboxipeptidase, entre outras (OLIVEIRA et al., 2018).

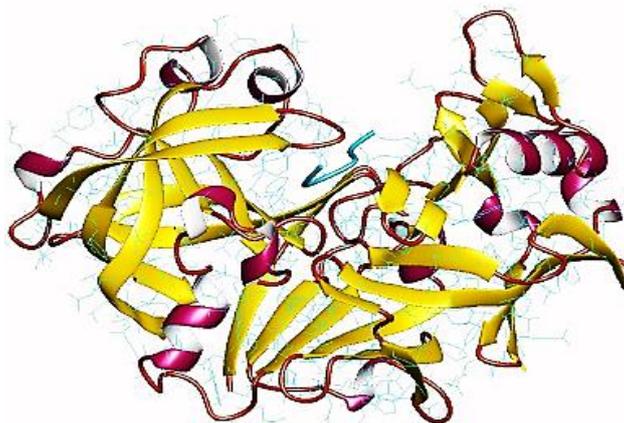
A pepsina e a tripsina estão entre as enzimas proteolíticas mais eficiente e ajudam a decompor grandes macromoléculas encontradas nos alimentos em moléculas menores de mais fácil absorção no intestino, apoiando assim a saúde intestinal e garantindo que os nutrientes sejam absorvidos pelo corpo. Além disso, as reações de hidrólise de caseínas de diferentes fontes auxiliam na liberação de uma série de peptídeos anti-hipertensivos, fosfopeptídeos ligantes de cálcio (CPPs), peptídeos antibióticos, imunomoduladores e opióides (BHAT et al., 2015).

#### **2.4.5.1.Pepsina**

A pepsina (EC. 3.4.23.1) (Figura 6), constituída por 44 aminoácidos, é uma enzima digestiva, encontrada na maioria dos organismos conhecidos, tais como vírus, protozoários, plantas, invertebrados e vertebrados que tem como função a digestão das proteínas ingeridas. A pepsina também atua na ligação de seu sítio ativo às cadeias de proteínas, dividindo-se em frações menores (SZALAPATA et al., 2016).

A pepsina é uma proteína monomérica, com alta porcentagem de resíduos ácidos, justificando seu baixo ponto isoelétrico, favorecendo, assim, a hidrólise de ligações peptídicas entre dois aminoácidos hidrofóbicos. O sítio catalítico da pepsina é formado por dois resíduos de aspartato, um dos quais deve ser protonado e o outro desprotonado, para que a proteína seja ativa. Isso ocorre quando o pH varia entre 1 e 5. A atividade proteolítica da pepsina é afetada pelas condições do meio de dissolução. Em meios de dissolução ácida, simulando o fluido gástrico (pH 1-3; 37 °C), a pepsina mostra a sua máxima atividade. A pepsina é uma das enzimas utilizadas para análise de outras proteínas devido a sua eficiência em quebrar pontes envolvendo aminoácidos aromáticos, fenilalanina, triptofano e tripsina (GUZMAN, 2016).

**Figura 6.** Representação tridimensional da Pepsina



Fonte: Adaptado de Melo (2009).

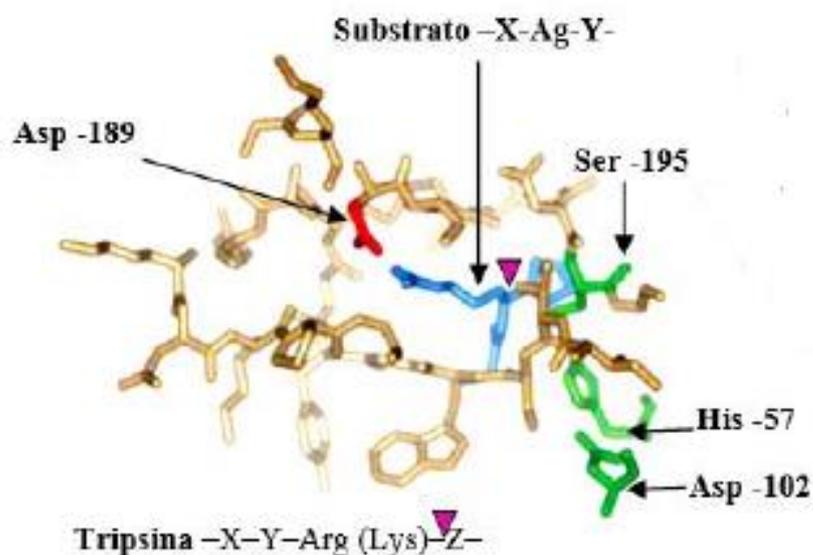
#### **2.4.5.2. Tripsina**

Tripsina (EC 3.4.21.4) é uma serino protease amplamente encontrada no sistema digestivo de diversos organismos, responsável pela hidrólise de ligações peptídicas no lado carboxílico da lisina e arginina (Figura 7). A partir do momento que uma molécula de tripsina se torna ativa, ela própria pode começar a ativar (clivar proteoliticamente) todos os outros zimogênios, não só da tripsina, mas também da quimiotripsina, carboxipeptidases e aminopeptidases. Portanto, a tripsina tem um papel central na ativação das proteases digestivas, pelo que é indispensável garantir que nenhuma molécula, em condições normais, adquira atividade catalítica no interior das células. A

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

Como todas as serino proteases, as tripsinas possuem uma tríade catalítica, que caracteriza todas as proteínas deste grupo, que consiste em His, Asp, Ser. Sua especificidade para a ligação peptídica formada pelo lado carboxílico Arg e a capacidade de ativar outros zimogênios pancreáticos distinguem esta enzima de outras serino proteases (KTARI et al., 2012; ATACAN et al., 2017).

**Figura 7.** Ilustração da especificidade enzima-substrato. Tripsina Asp: aspartato; His: histidina; Ser: serina. – Local de clivagem.



Fonte: Adaptado de Koolman e Roehm (2005).

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

Devido à alta sensibilidade, a impossibilidade de reuso e dos custos elevados, a aplicação industrial de enzimas solúveis em larga escala é onerosa. Assim, a imobilização em suportes inertes se apresenta como o método mais atrativo para reutilização e estabilização enzimática (RUEDA et al., 2016; BILAL et al., 2017).

## **2.5. Imobilização de enzimas**

Embora as enzimas apresentem muitas vantagens em relação aos catalisadores químicos, como elevada atividade catalítica, especificidade por determinado substrato e elevada atividade em condições brandas de reação, sua utilização em alguns processos industriais tem sido limitada, devido ao custo. Isto se deve a baixa estabilidade operacional e à dificuldade de separação do produto final, que são consideradas como barreiras para o seu uso em processos contínuos e aplicações em larga escala. Contudo, uma das formas de aproveitar as vantagens da catálise enzimática e superar as deficiências deste processo, tem sido a utilização da enzima em sua forma imobilizada (GUPTA, BHATTACHARYA & MURTHY, 2013; GHATTASA et al., 2014; NGUYENA & KIM, 2017).

Enzimas imobilizadas estão fisicamente confinadas ou localizadas em uma região definida do espaço, com manutenção de suas atividades catalíticas e podem ser utilizadas repetidas vezes ou continuamente (KHAN et al., 2017). O principal interesse em imobilizar uma enzima é obter um biocatalisador com atividade e estabilidade que não sejam afetadas durante o processo, poder conferir a enzima uma melhoria do seu desempenho catalítico e reduzir a sua inativação por distorção de sua estrutura nativa pela influência da temperatura, do pH e de solventes orgânicos, em comparação à sua forma livre (MOTEEVALIZADEH et al., 2015; KULKARNI, 2016). A imobilização evita problemas dos reatores em batelada que são principalmente: custos operacionais; baixa produtividade; problemas de remoção da enzima e variação na qualidade dos produtos (NGUYENA & KIM, 2017; ATACAN et al., 2017). Além disso, apresenta as seguintes vantagens:

- As enzimas podem ser reutilizadas;
- Os processos químicos podem ser continuamente operados e prontamente controlados;
- Os produtos podem ser facilmente separados;

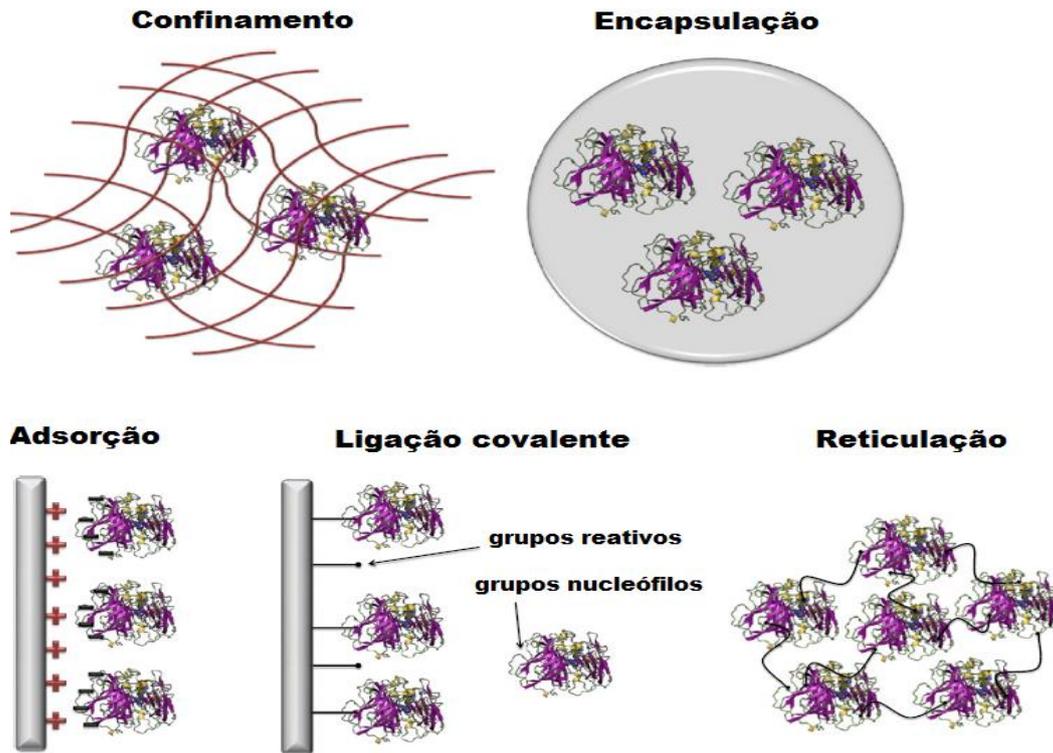
- Os problemas de efluentes são minimizados;
- A repetibilidade do processo pode ser aumentada;
- Alta estabilidade;
- Baixos custos.

Entretanto, existe algumas desvantagens em relação aos procedimentos de imobilização como: possível perda da atividade enzimática durante o processo de imobilização e os efeitos difusionais devido ao transporte do substrato e do produto ao sítio ativo da enzima imobilizada, além de muitas vezes, dependendo do tipo de imobilização, os métodos serem trabalhosos e demorados, acarretando custos adicionais na produção de um biocatalisador. Para que estas desvantagens sejam minimizadas é necessário conhecer a natureza da enzima, do material usado como suporte para a imobilização e a técnica de imobilização (SHELDON & VAN PELT, 2013; FERNANDEZ-LOPEZ et al., 2017).

As enzimas podem ser imobilizadas por uma variedade de métodos (Figura 8), tais como encapsulamento (ZANETTE, AWADALLAK & FILHO, 2014; NAWONG et al., 2016) por ligação cruzada (KATO et al., 2011; WEN-QIONG et al., 2017), ligação covalente (GHATTASA et al., 2014; VESCOVI et al., 2017) ou adsorção (ITTRAT et al., 2014; MOTEVALIZADEH et al., 2015; SHULER & KARGI, 2017).

Os métodos utilizados para a imobilização de enzimas baseiam-se nas ligações químicas e físicas entre a enzima e o suporte.

**Figura 8.** Esquema de métodos de imobilização de enzimas



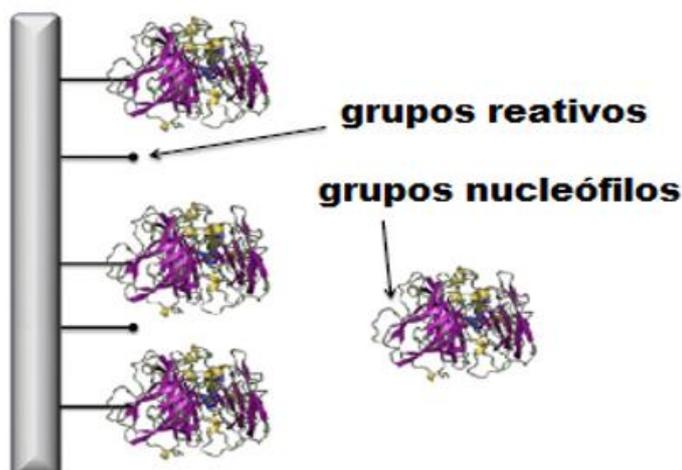
Fonte: FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ; SANROMÁN; MOLDES, 2012.

A seleção do método de imobilização deve ser baseada em parâmetros como: na eficácia da utilização da enzima, os custos do procedimento de imobilização, a toxicidade dos reagentes de imobilização e as propriedades finais desejadas do biocatalisador imobilizado (CHOI et al., 2015; FERNANDEZ-LOPEZ et al., 2017).

Na imobilização por formação de uma ligação covalente (Figura 9) a enzima é ligada ao suporte inerte mediante ligações químicas covalentes, que são, normalmente, estabelecidas entre os grupos-amino primários e o anel fenólico dos aminoácidos constituintes da enzima com os grupos reativos do suporte (-CHO; -NCS, dentre outros). A escolha das condições irá depender da estabilidade da enzima e do suporte frente ao pH de formação das ligações covalentes, assim como a estabilidade das ligações suporte-enzima frente ao pH de utilização do sistema imobilizado. As vantagens desta técnica de imobilização são: maior eficiência e estabilidade; os complexos formados não são tão suscetíveis ao pH, força iônica, solventes e temperatura (KHOABI et al., 2014; ZAAK et al., 2017). Dentro deste contexto Singh et al. (2012) imobilizaram por formação de ligação covalente, alfa-amilase produzida por *Bacillus acidocaldarius*, em esferas de vidro. Atacan et al. (2017) estudaram a imobilização de tripsina por formação

de ligação covalente em nanopartículas de magnetita modificadas com ácido tânico e aplicaram na digestão da caseína.

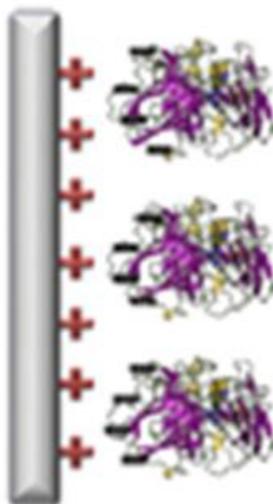
**Figura 9.** Imobilização de enzimas por formação de ligação covalente



Fonte: FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ; SANROMÁN; MOLDES, 2012.

Outro método de imobilização é a ligação ao suporte por adsorção (Figura 10). Neste método, grupos superficiais do suporte interagem com grupos de superfície da enzima, através de atrações eletrostáticas ou dipolares (forças de van der Waals) ou ainda por ligações de hidrogênio. O tipo predominante de interação depende da natureza química e propriedades superficiais do suporte e da enzima em questão (KHAN et al., 2017). A técnica, relativamente simples, consiste basicamente na mistura do suporte insolúvel à solução de enzima, sob condições apropriadas, seguida da separação do suporte contendo a enzima adsorvida do meio de reação.

**Figura 10.** Imobilização de enzimas por adsorção.



Fonte: FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ; SANROMÁN; MOLDES, 2012.

Considerando as forças envolvidas no processo de adsorção, diferentes parâmetros vão influenciar na quantidade de enzima fixada e força das ligações:

- OpH do meio influencia no número e a natureza das cargas do suporte;
- Sais em menor concentração aumentam a solubilidade das enzimas;
- Com o aumento da temperatura existe a probabilidade de se aumentar o número de ligações.

Desta forma, a eficiência deste método depende de variáveis tais como pH, força iônica do meio e a natureza do solvente empregado, bem como da relação entre a concentração da enzima e do suporte. Além disso, pode-se utilizar substâncias protetoras com o intuito de evitar a perda da atividade da enzima imobilizada. Assim sendo, após imobilização é necessário um cuidado especial para que as condições ótimas de imobilização sejam mantidas, para que o sistema se mantenha inalterado(FERNANDEZ-LOPEZ et al., 2017). Apesar disto, a simplicidade e rapidez desta técnica justifica seu uso, com muitos exemplos de enzimas imobilizadas por adsorção, como: Homaei et al. (2014) imobilizaram papaína em nanopartículas de ouro, pela técnica de adsorção e observou que a enzima imobilizada exibiu maior atividade em uma faixa de pH mais ampla, retendo 80% de atividade residual a 90 ° C.Vescovi et al. (2017), trabalharam com lipases imobilizadas por adsorção em partículas de sílica funcionalizadas e apresentaram maior potencial para a síntese de oleato de frutose em um sistema solvente orgânico/água.

Os principais suportes utilizados no processo de imobilização são o carvão ativado, óxidos metálicos, vidros, resinas poliméricas, sílicas mesoporosas, carvões mesoporosos e nanotubos de carbono (DALLA-VECCHIA et al., 2004). Na seleção de um suporte devem ser analisadas suas propriedades físicas e químicas, bem como as relativas à possibilidade de regeneração do material. O processo de imobilização e o uso repetido e contínuo do derivado, algumas vezes requerem o uso de operações como filtração, centrifugação e agitação, portanto, o suporte deve ter boa resistência mecânica. Outra característica importante é a estabilidade térmica do suporte, pois dependendo do seu coeficiente de expansão, podem sofrer distorção ou destruir o sítio ativo da enzima sob expansão ou contração, quando submetido a variações de temperatura (ZAAKet al., 2017).

O suporte deve ser quimicamente resistente nas condições de ativação, durante o processo de imobilização e nas condições em que se processa a reação. Além disso, devem possuir grupos químicos que podem ser ativados ou modificados de modo a permitir a ligação da enzima sem desnaturá-la (ZAAKet al., 2017).

Na última década, os carvões ativados produzidos a partir de material lignocelulósicos vêm sendo utilizados de forma eficiente como suporte para imobilização de enzimas (GANESH et al., 2009; BRITO et al., 2017; SANTOS et al., 2019).

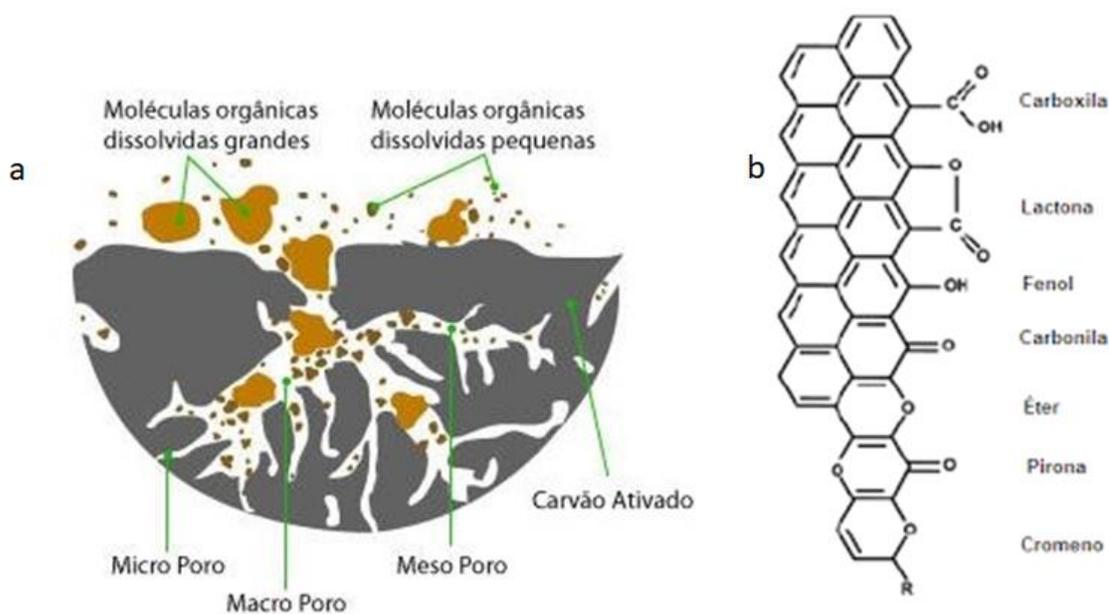
## **2.6. Carvão ativado**

O carvão ativado (CA) é um material carbonáceo de estrutura porosa, possuindo heteroátomos, principalmente oxigênio, ligados aos átomos de carbono. É caracterizado por possuir uma elevada área superficial específica e porosidade altamente desenvolvida, o que lhe confere a capacidade de adsorver moléculas presentes tanto em fase líquida quanto gasosa (MASOUD et al., 2012).

A estrutura do carvão ativado (Figura 11a) é basicamente constituída por uma base grafítica, em que os vértices e as bordas podem acomodar uma série de elementos, tais quais, oxigênio, nitrogênio e hidrogênio, que se apresentam como grupos funcionais (Figura 11b). A estrutura de um carvão ativado pode ser visualizada como faixas de compostos aromáticos, ligadas entre si, assemelhando-se a uma mistura de “raspas de madeira” com espaços vazios de dimensões variáveis entre as camadas, constituindo os

poros. Os poros que formam a estrutura porosa do carvão ativado são classificados de acordo com seu tamanho e com base nos princípios físico-químicos que regem o processo de adsorção, sendo classificados em relação ao seu tamanho em microporos com poros com diâmetros menores que 2 nm; mesoporos com poros com diâmetros entre 2 e 50 nm; e macroporos com poros com diâmetros maiores que 50 nm. Uma das vantagens do CA é que ele apresenta faixa ampla de distribuição de tamanho e forma dos poros (LI et al., 2018; DANISH et al., 2018).

**Figura 11.** a) Estrutura física (Fonte: SANTOS, 2017) e b) estrutura química do carvão ativado (Fonte: BLANCO, 2001).



O carvão ativado tem sua aplicação datada de 2000 a.c., quando os egípcios passaram a utilizá-lo para purificar a água. Posteriormente, a maior utilidade do carvão ativado foi na I Guerra Mundial, obtidos na forma granular para produzir máscaras de gás. Após a década de 50, foi desenvolvida a manufatura de carvão ativado em pó e o seu uso foi amplamente estendido para a purificação de água e no controle na emissão de poluentes (BUBANALE & SHIVASHANKAR, 2017).

A primeira aplicação do carvão ativado no setor comercial ocorreu na Inglaterra, em 1974, como agente de descoloração na indústria de produção do açúcar. Sendo aplicado em larga escala pela primeira vez em 1854, quando o prefeito de Londres ordenou a instalação de filtros de carvão vegetal em todos os sistemas de ventilação de esgotos para eliminar os odores desagradáveis. Em 1872, máscaras gasosas com filtros

de carvão foram usadas em indústrias químicas para impedir a inalação de vapores de mercúrio (BUBANALE & SHIVASHANKAR, 2017).

O carvão ativado é obtido pelo processo de ativação, que pode ser física, química ou físico-química, transformando-se em um material com elevada porosidade (CASCO, 2015). O desenvolvimento da porosidade do carvão ativado devido sua estrutura microcristalina, não grafitica, é consequente do processo de ativação empregado e da natureza do material precursor (carbonáceo) (RECOBERT, 2015).

Esses materiais carbonáceos têm grande versatilidade industrial associada a um baixo custo de produção, o que os torna uma opção importante e mais vantajosa para uma grande classe de aplicações, se comparados com outros materiais porosos. Podem ser do tipo granular ou em pó, de acordo com o tamanho e a forma, e cada um tem uma aplicação específica. Ambos são utilizados no tratamento de água e efluentes, especialmente na remoção de moléculas de alto peso molecular. No entanto, muitas vezes surgem dificuldades no processo de adsorção devido à baixa difusão das partículas nos poros, principalmente no caso de adsorventes granulares (PHAN et al., 2006).

Mais de 30% da pesquisa sobre materiais carbonáceos, realizadas no início dos anos 2000, estavam voltados para o carvão ativado, tratando de temas como novos processos de desenvolvimento, compreensão do mecanismo de ativação, caracterização, novos precursores e métodos de ativação e suas aplicações em processo de purificação (DANISH et al., 2018). Atualmente, os carvões ativados são utilizados em tratamentos como purificação, desodorização, desintoxicação, filtração, descoloração, desclorificação, remoção de substâncias orgânicas e inorgânicas, além de suporte para imobilização de substâncias biológicas, atuando como catalisadores biológicos (SANTOS et al., 2019). Essas aplicações fazem do carvão ativado um produto de grande interesse para muitos setores econômicos nas mais diversas áreas, como alimentícia, farmacêutica, química, petrolífera, nuclear, automobilística, mineração, tratamento de água potável, água industrial e do ar atmosférico (FRANK et al., 2015; RANGABHASHIYAM e BALASUBRAMANIAN, 2019).

Quase todos compostos que possuem um alto teor de carbono podem ser utilizados na produção de carvão ativados, tais como: ossos de animais, serragem, algas, turfa, casca de coco, casca de babaçu, diversas madeiras, caroço de frutas, carvões

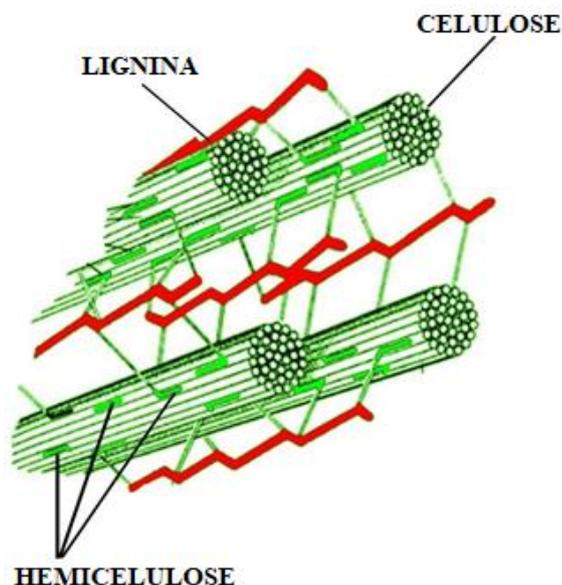
minerais, resíduos de petróleo, dentre outros materiais carbonáceos. A escolha do material a ser ativado depende da sua pureza, preço, e seu potencial de ativação (MASOUD et al., 2012; BUBANALE & SHIVASHANKAR, 2017).

### **2.6.1. Materiais precursores utilizados na produção do carvão ativado**

Na última década pesquisas têm sido focadas na busca e desenvolvimento de materiais de carbono a partir de diversos subprodutos agroindustriais, com atenção especial para aqueles que possam ser produzidos a partir da reutilização dos resíduos, gerando assim matérias com baixos custos. Uma vez que a maior parte dos carvões ativados utilizados atualmente são produzidos a partir de combustíveis fósseis, estes materiais apresentem um custo mais elevado. Portanto, diversos estudos vêm sendo feitos para assegurar menores custos de produção, como a utilização de materiais precursores provenientes de biomassa (ABIOYE e ANI, 2015; GONZÁLEZ-GARCÍA, 2018). Os resíduos agroindustriais, como cascas e caroços, são considerados insumos importantes para a preparação de carvões ativados, pois além de apresentarem em sua composição um elevado teor de matérias voláteis, característica essa que permite a obtenção de um adsorvente com uma estrutura altamente porosa, são matérias primas de baixo custo e renováveis (DJILANI et al., 2015).

Os precursores provenientes de biomassa utilizados na produção do CA são materiais que possuem altos teores de materiais lignocelulósicos (Figura 12), composta principalmente por: celulose (20 % a 60 %), lignina (10 % a 40 %) e hemicelulose (10 % a 35 %), sendo a concentração de cada um desses elementos variável de acordo com o tipo de matéria-prima em questão, estágio vegetativo, condições de cultivo, além de baixo teor de compostos inorgânicos em sua composição, características essas presentes em vários resíduos agroindustriais (OKMAN et al., 2014; YU et al., 2017; GONZÁLEZ-GARCÍA, 2018).

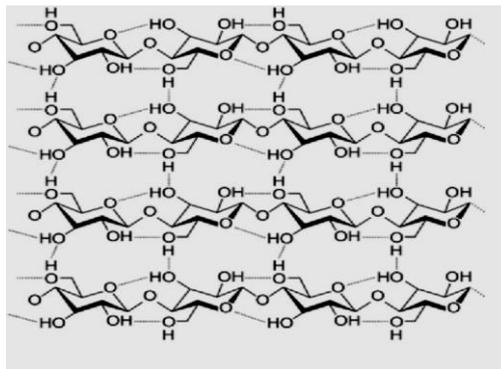
**Figura 12.** Principais constituintes da biomassa lignocelulósica.



Adaptada de MOHAMMAD et al., 2016

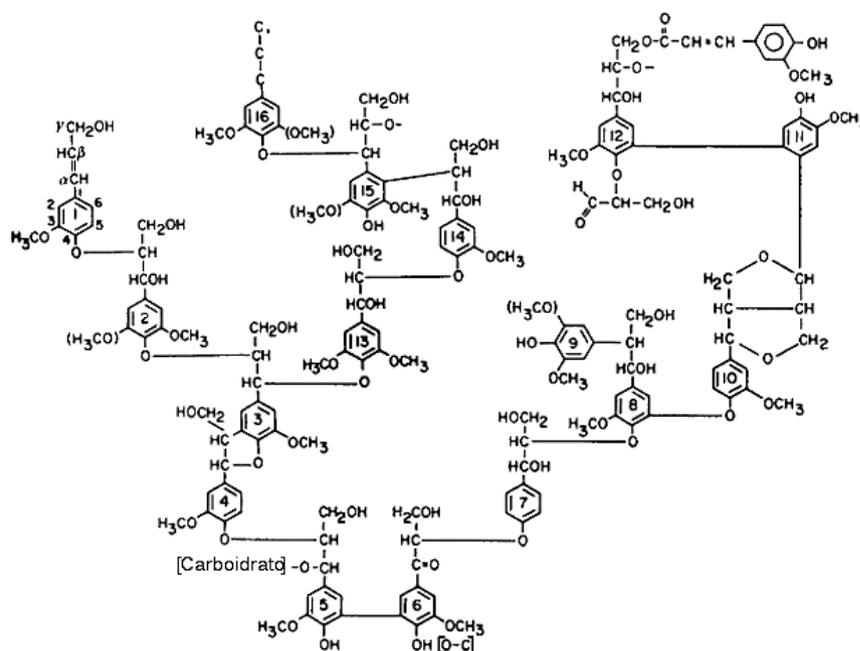
A celulose ( $C_6H_{10}O_5$ ) (Figura 13) corresponde a macromolécula orgânica de maior abundância presente nas paredes celulares das células vegetais (40-45%). É um polímero natural de unidades repetitivas de D-glucose (um anel de seis carbonos também conhecido como piranose). Em cada anel de piranose, observa-se três grupos hidroxila, que podem interagir uns com os outros formando ligações de hidrogênio intra e intermoleculares, dando assim uma estrutura cristalina a celulose, além de conferir propriedades únicas de resistência mecânica e estabilidade química. (HARMSSEN et al., 2010; DHYANI & BHASKAR, 2017). Esta fração encontra-se envolvida pela lignina ( $C_9H_{10}O_2$ ,  $C_{10}H_{12}O_3$ ,  $C_{11}H_{14}O_4$ ) (Figura 14) uma macromolécula amorfa de estrutura tridimensional, hidrofóbica altamente ramificada, sendo classificada como polímero fenólico aromático reticulado, constituído por um arranjo irregular de diversas unidades de fenilpropano, que podem conter grupos hidroxila e metoxila, como substituintes do grupo fenil (OLIVEIRA, 2015; KAN et al., 2016). A terceira e última fração principal, hemiceluloses ( $C_5H_8O_4$ ) (Figura 15) são carboidratos responsáveis por envolver as fibras de celulose, além de permanecer como um elo de ligação entre a celulose e a lignina. Apresenta estrutura amorfa, sendo considerada um grupo heterogêneo de polissacarídeos ramificados, compostos por diferentes monômeros em sua estrutura, tais como glicose, galactose, manose, xilose, arabinose e ácido glicurônico (DHYANI & BHASKAR, 2017).

**Figura 13.** Estrutura química da celulose.



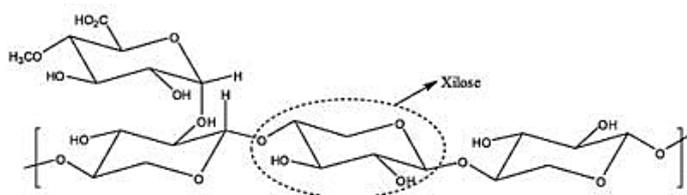
Fonte: Adaptado de Dhyani e Bhaskar (2017).

**Figura 14.** Estrutura química da lignina.



Fonte: Adaptado de Kirk e Farrell, 1987.

**Figura 15.** Estrutura química da hemicelulose



Fonte: Adaptado de Santos et al. (2012).

Em alguns trabalhos foram encontrados dados sobre a composição dos três componentes principais dos resíduos lignocelulósicos (Tabela 1). As diferenças de composição entre diferentes materiais precursores podem estar relacionadas com algumas características dos carvões sintetizados, como rendimento, distribuição e tamanho de poros.

**Tabela 1.** Composição de resíduos lignocelulósicos empregados na síntese de carvão ativado.

<b>Amostra</b>	<b>%Lignina</b>	<b>%Celulose</b>	<b>%Hemicelulose</b>	<b>Referência</b>
Sabugo de milho	16,57%	40,32%	28,66%	JENKINS, 1990
Engaço de uva	26,5%	31%	17,5%	KAYNAK <i>et al.</i> 2005
Malte	26,13%	12,29%	23,41%	DRAGONE, 2007
Bainha pupunha	9,53%	30,02%	18,24%	FARIAS <i>et al.</i> 2009
Casca da amêndoa	32,5	25,5	24,8	GONZALEZ <i>et al.</i> , 2009
Bamboo	26%	34,5%	20,5%	SAIDUR <i>et al.</i> 2011
Bagaço da cana de açúcar	42,2	36,0	19,3	CHEN <i>et al.</i> , 2012
Casca de café	28,3%	43,0%	7,0%	GOUVEA <i>et al.</i> 2012
Casca de cacau	13,2	10,8	16,4	PEREIRA <i>et al.</i> , 2014
Bagaço do sorgo	45,0	25,0	18,0	ABDOLALI <i>et al.</i> , 2014
Casca do coco	29,0	15,0	31,0	VAIBHAV e THALLADA, 2017
Pinheiro	46,0	24,0	27,0	YU <i>et al.</i> , 2017

Fonte: Do Autor, 2019.

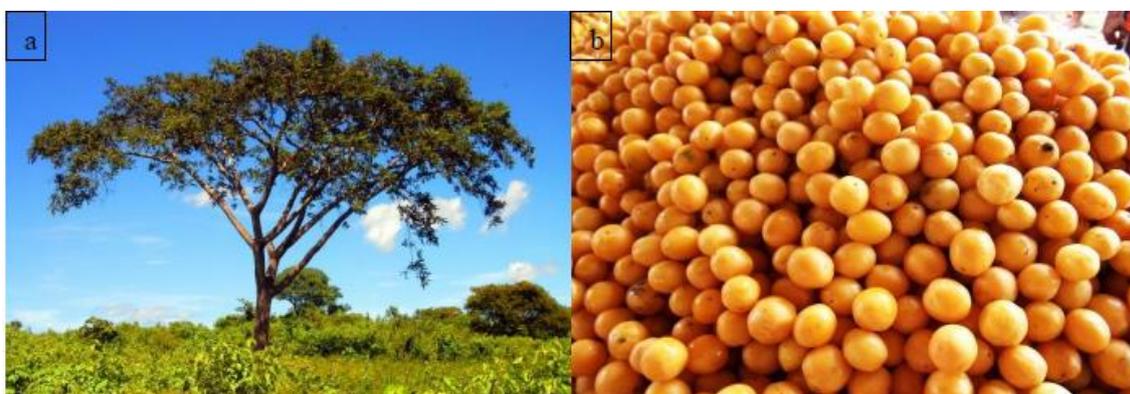
As propriedades do texturais do carvão ativado são influenciadas, principalmente, pela composição do material lignocelulósico empregado como precursor de carbono, uma vez que esses componentes tendem a sofrer decomposição em diferentes etapas durante a ativação e processo de pirólise. No intervalo de temperatura entre 150 °C e 275 °C ocorre maior degradação da hemicelulose e menor degradação da celulose e lignina (NABAISA *et al.*, 2013). As ramificações presentes na hemicelulose são facilmente removidas da cadeia principal do resíduo e degradam-se em compostos voláteis, como CO, CO<sub>2</sub> e alguns hidrocarbonetos, em baixas temperaturas (NABAISA *et al.*, 2013). Posteriormente a celulose é degradada, de modo

que sua quebra ocorre na faixa de temperatura de 260 °C a 350 °C, havendo elevada liberação de CO, CO<sub>2</sub> e CH<sub>4</sub>. Pôr fim, a lignina se degrada na faixa de 280 °C a 500 °C, caracterizando-se por ser o componente que apresenta maior resistência à degradação térmica, além disso, esta fração é a principal responsável pela massa de carbono fixa, conferindo assim, dureza e durabilidade ao material, evitando o rompimento das partículas do carvão (NABAISA et al., 2013; JAIN & TRIPATHI, 2014; SILVA et al., 2016). Vale ressaltar que além da composição lignocelulósico do precursor e da temperatura de pirólise, as transformações térmicas de celulose, hemicelulose e lignina dependerão também das condições da síntese de carvão, tais como: tipo de ativação, natureza química do agente ativante, os gases atmosféricos presentes, entre outros (NAN et al., 2017).

#### 2.6.2. Resíduo precursor para produção do carvão ativado – caroço do cajá (*Spondias mombin* L.)

O cajá é o fruto da cajazeira, árvore frutífera que faz parte da família *Anacardiaceae* e tem nome científico de *Spondias mombin* L. (Figura 16), é uma fruta tipo drupa, ovoide, de até 6 cm de comprimento, casca lisa e fina, de cor alaranjada muito aromática e de polpa succulenta, de sabor agridoce, além disso, apresenta boas características agroindustriais como o rendimento de polpa por volta de 63%, sendo assim excelente para o preparo de refrescos, batidas, licores e sorvetes. É originária da região tropical do continente americano. Na região sudeste da Bahia, a árvore é utilizada também como sombreamento permanente do cacaueteiro (SOUZA & ARAUJO, 2000; SOUZA et al., 2010; CARVALHO et al., 2017).

**Figura 16.** a) Cajazeira e b) o fruto cajá.



Fonte: CARVALHO et al., (2017)

Nos frutos do cajá provenientes do nordeste brasileiro, a polpa contribui 62,95%, a casca representa 18,7% e a semente outros 18,34% do peso da fruta no estágio maduro. Mas são escassos os relatos na literatura sobre a quantidade de caroços que é descartada em todo o Brasil e das formas de reaproveitamento desse resíduo (TIBURSKI et al., 2011; OLIVEIRA, COSTA & AFONSO, 2014; CARVALHO et al., 2015).

Os caroços de cajá, ainda não apresentam aplicabilidade, em especial na área de alimentos. Estes resíduos lignocelulósicos podem caracterizar-se como mais uma alternativa de matéria-prima de grande potencial para a produção de carvão ativado, pois o setor agroindustrial tem crescido nos últimos anos, gerando grandes quantidades de resíduos.

### **2.6.3. Produção do carvão ativado**

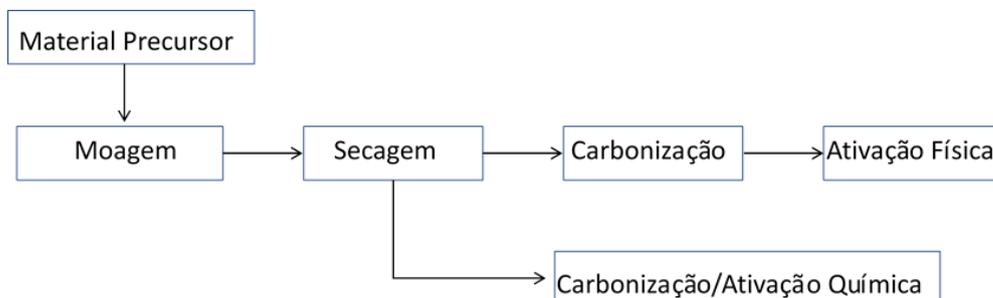
Uma vez determinada a fonte precursora de carbono, os carvões ativados são obtidos por processos que contam com a carbonização, através da queima (pirólise), do material precursor e sua ativação (KETCHA et al., 2012). A carbonização é usualmente feita em atmosferas inertes, ou seja, atmosferas compostas por  $N_2$ , e em temperaturas compreendidas entre 500-800°C. Nesta etapa são removidos componentes voláteis e gases leves ( $CO$ ,  $H_2$ ,  $CO_2$  e  $CH_4$ ), produzindo uma massa de carbono fixo e uma estrutura porosa primária que favorece a ativação posterior (KETCH et al., 2012).

Durante a carbonização os biopolímeros do material precursor, como a celulose, se decompõem e perdem constituintes como nitrogênio, oxigênio e hidrogênio, os quais escapam como produtos voláteis. Há também a perda de moléculas orgânicas de diferentes tamanhos de cadeia (alcoóis, ácidos, cetonas, etc). O carvão obtido pela carbonização do material celulósico é essencialmente microporoso, mas essa microporosidade pode tornar-se preenchida ou parcialmente bloqueada pelos produtos de decomposição. Então, para aumentar o volume dos microporos torna-se necessário fazer a ativação (YAHYA et al., 2015; DANISH&AHMAD, 2018).

A ativação pode ser realizada por processos físicos ou químicos. Os processos de ativação visam à obtenção de um carvão microporoso, pela retirada de componentes orgânicos como o alcatrão, creosoto e naftas, além de outros resíduos que possam obstruir os poros. Estas técnicas levam a formação de sítios eletricamente instaurados, com intensificada capacidade adsortiva (DANISH&AHMAD, 2018). Na Figura 17 são

apresentadas as etapas envolvidas nos processos de obtenção de carvões ativados, via ativação química e via ativação física.

**Figura 17.** Esquema das etapas de preparação de carvões ativados.



Fonte: Do Autor,2019

A ativação física, ou também conhecida como ativação térmica, é o processo mais utilizado comercialmente, no qual o material carbonizado é submetido a altas temperaturas, entre 800 a 1200 °C, sob fluxo de um gás oxidante, que pode ser o vapor de água ou gás carbônico (HORIKAWA et al., 2010). Segundo Gómez, Klose e Rincón (2010) as principais variáveis desse processo são: i) a temperatura do processo; ii) a concentração do gás da reação; iii) o tempo de permanência do material sólido na temperatura de ativação.

O processo de ativação física pode ser dividido em uma ou duas etapas. O processo em uma etapa ou mais conhecido como ativação direta, consiste na introdução do material precursor no forno adequado onde a carbonização e a ativação ocorrem de forma sequencial no mesmo forno. Na ativação em duas etapas, como já relatado, o material é carbonizado primeiramente em um equipamento e logo em seguida levado a um reator onde ocorrerá a ativação. O uso do vapor de água como agente ativante no material carbonizado tem como objetivo o incremento dos poros ou a ampliação da largura dos poros já existentes. O material quando apenas carbonizado apresenta uma estrutura porosa pouco desenvolvida que está parcialmente ocupada por alcatrões condensados e outros materiais derivados do processo de carbonização. Com a ativação esse material é retirado da estrutura porosa permitindo a reação do gás com a estrutura carbonácea e o desenvolvimento da porosidade (HORIKAWA et al., 2010). O rendimento total em carvão ativado no processo de ativação física para alguns materiais é considerado baixo, no entanto sua vantagem é que este processo é isento de aditivos

químicos (CASCO, 2015), diferentemente da ativação química que consiste na impregnação do material precursor com um agente ativante químico.

Na ativação química é realizada a impregnação antes da carbonização, onde ocorre a ação desidratante do agente ativante sobre o precursor ainda não carbonizado, causando a degradação dos constituintes lignocelulósicos, juntamente com outros componentes presentes e, durante a carbonização, acontece a desidratação que resulta na queima e aromatização do esqueleto do carvão com consequente formação da estrutura porosa (SELVARAJU & BAKAR, 2017). Nesse processo, não se realiza primeiramente a carbonização e posteriormente a ativação como na ativação física, a carbonização e ativação ocorrem juntas, além de se utilizar temperaturas mais baixas de 500 a 600 °C (SELVARAJU & BAKAR, 2017).

Os agentes ativantes comumente utilizados na ativação química são o cloreto de zinco ( $ZnCl_2$ ), ácido fosfórico ( $H_3PO_4$ ), hidróxidos de sódio (NaOH) e de potássio (KOH), e as temperaturas empregadas neste processo tendem a ser menor, em torno de 500 °C. A estrutura dos poros, área superficial e o rendimento em carvão ativado na ativação química são regidos pela temperatura, tempo e grau de impregnação do material, bem como a temperatura e o tempo de carbonização (BRITO et al., 2018; SARTOVA et al., 2019).

A ativação química tem vantagens e algumas desvantagens em relação à ativação física. Estas vantagens podem ser descritas sumariamente como: temperaturas mais baixas para pirólise, menores tempo de ativação, maior rendimento, possibilita o controle e manutenção de uma melhor distribuição das dimensões dos poros e incorporação de grupos funcionais. Uma das principais desvantagens é que o carvão ativado produzido deve ser lavado para a retirada do produto químico utilizado, o que acrescenta mais uma etapa ao processo. Essa lavagem pode ser feita com água destilada, podendo ser acidificada/basificada caso seja usado hidróxidos ou ácidos como agentes ativantes (SHAH et al., 2014; ZUBRIK et al., 2016; MAHMOOD et al., 2017).

Por ser um aditivo alimentício autorizado pela FDA (U.S. Food and Drug Administration) e amplamente empregado, o ácido fosfórico, é o agente mais recomendado no processo de ativação de carvões com aplicação em alimentos. Aliado a este fato, o emprego desse agente ativante permite a eliminação de compostos de lixiviação por simples lavagens com água, requer temperaturas mais brandas de ativação

(em torno de 400 °C a 500°C), o que gera um maior rendimento do produto final (JIANZHONG et al., 2014; LIM, SRINIVASAKANNAN & SHOAIBI, 2015).

Segundo Yahya et al. (2015), rendimentos de síntese, além de estarem relacionados ao componente lignocelulósicos, estão relacionados ao tipo de ativação e ao agente ativante utilizado. A ativação química utilizando ácido fosfórico promove a despolimerização, desidratação e redistribuição dos biopolímeros constituintes, favorecendo também a conversão de compostos alifáticos em compostos aromáticos. Além disso, o mesmo interage com a biomassa formando as ligações de fosfato entre os fragmentos presentes na biomassa, aumentando assim o rendimento final do processo. Entre as etapas reacionais promovidos pelo ácido fosfórico, tem-se como destaque as reações de clivagem de ligações do constituinte dos biopolímeros e a formação de novo grupos fosfato, propiciando ligações cruzadas dentro da estrutura precursora, gerando uma matriz interna que restringe o encolhimento dos materiais precursores e as perdas de material volátil durante o aquecimento (BRITO et al., 2017).

Neste sentido muitas pesquisas têm sido realizadas visando avaliar o potencial demateriais lignocelulósicos como precursores de carbono na produção de CA empregando diferentes metodologias de ativação, alguns exemplos apresentados na Tabela 2.

**Tabela 2.** Tipo de ativação para síntese de Carvão Ativado.

Material Precursor	Tipo de Ativação/Agente de ativação	Referência
Fibra de coco	Química/Ácido Fosfórico	PHAN et al (2006)
Erva mate	Física	GONÇALVES et al (2007)
Grão de café	Química/Cloreto de Zinco	BRUM et al (2008)
Casca de arroz	Química/ Ácido orto-fosfórico	KUMAR et al (2009)
Casca de palma	Química/Ácido Fosfórico	LIM et al (2010)
Bagaço da azeitona	Física	DEMERAL et al (2011)
Casca de cacau e semente de seriguela	Química/Ácido Fosfórico e Cloreto de Zinco	PEREIRA et al (2014)
Resíduo de abacaxi	Química/ Cloreto de Zinco	MAHAMAD, ZAINI & ZAKARIA (2015)
Resíduo da casca de acácia negra	Química/Ácido Fosfórico	LINHARES et al (2016)
Caroço de cajá	Química/Ácido	BRITO et al (2017)

---

Fonte: Do Autor, 2019.

#### **2.6.4. Métodos de caracterização de carvão ativado**

O uso de métodos para caracterizações de carvões ativados e avaliação de suas propriedades sejam elas químicas, físicas e estruturais tem uma significativa importância prática, pois propriedades como o tamanho das partículas e a porosidade, por exemplo, podem influenciar diretamente sobre os sítios ativos do carvão ativado (SANTOS et al., 2019).

##### **2.6.4.1. Isotermas de adsorção/dessorção de N<sub>2</sub>**

As isotermas de adsorção/dessorção, baseadas em um sistema gás-sólido, podem ser utilizadas para entender a natureza do processo de adsorção: monocamada, multicamada, preenchimento de microporos, condensação capilar. Assim como são base para a obtenção de dados para cálculo das propriedades texturais. Nas recomendações da IUPAC (União Internacional de Química Pura e Aplicada) de 1985, as isotermas de fisissorção foram agrupadas em seis tipos. No entanto, ao longo dos últimos 30 anos, vários novos tipos característicos de isotermas foram identificados e mostraram estar intimamente relacionados com estruturas de poros particulares. Portanto, foi feito um refinamento das classificações originais IUPAC de isotermas de fisissorção e curvas de histerese associados (THOMMSEt al., 2015). A classificação atualizada proposta para as isotermas de fisissorção é mostrada na Figura 18.

A isoterma tipo I é característica de sólidos microporosos e área superficial externa relativamente baixa. Para a adsorção de nitrogênio e argônio a 77 K e 87 K, as isotermas do Tipo I (a) são típicas de materiais microporosos que têm principalmente microporos estreitos (de largura <1 nm). As isotermas Tipo I (b) são encontradas para materiais com distribuição do tamanho dos poros em uma faixa mais ampla, incluindo microporos mais largos e possivelmente mesoporos estreitos (<~ 2.5 nm). A adsorção é limitada pelo volume de microporos (THOMMSEt al., 2015). A isoterma Tipo II é característica de materiais macroporosos. O ponto indicado pela seta (B) representa o estágio onde a monocamada é completada e inicia a adsorção multicamada (THOMMSEt al., 2015). A isoterma Tipo III não é muito comum, representando uma

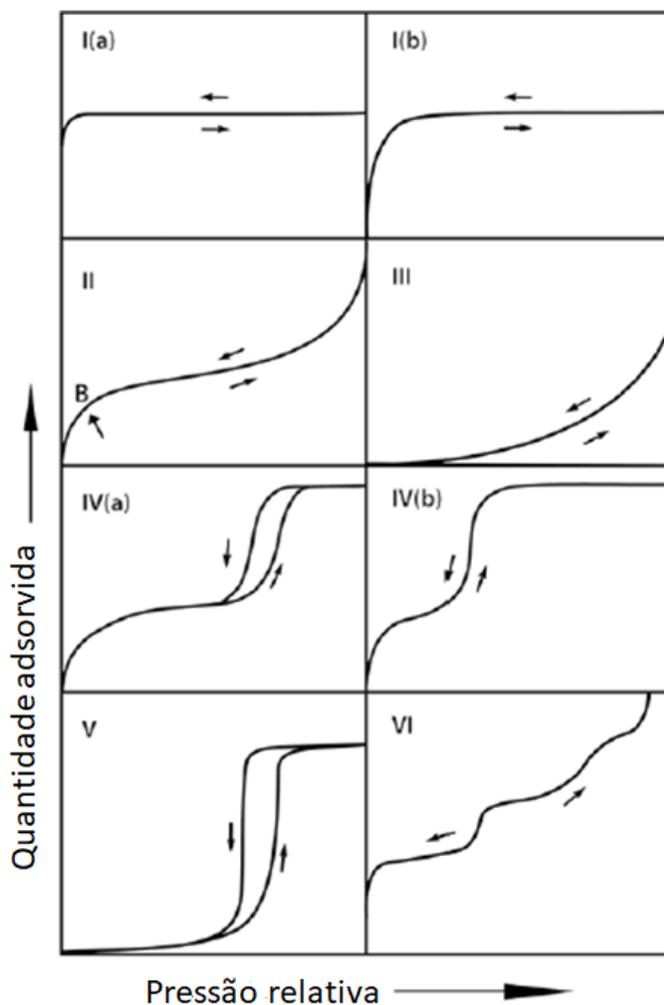
interação fraca entre adsorvente e adsorbato e as moléculas adsorvidas são agrupadas em torno dos locais mais favoráveis na superfície de um sólido não poroso ou macroporoso (THOMMES et al., 2015). A isoterma Tipo IV apresenta histerese, que é associada a condensação capilar que ocorre em poros entre 2 e 50 nm. São dadas por adsorventes mesoporosos. O comportamento de adsorção em mesoporos é determinado pelas interações adsorventes e adsorvivas e também pelas interações entre as moléculas no estado condensado. No caso de uma isoterma do Tipo IVa, a condensação capilar é acompanhada por histerese. Isso ocorre quando a largura do poro excede uma certa largura crítica, que é dependente do sistema de adsorção e temperatura (por exemplo, para adsorção de nitrogênio e argônio em poros cilíndricos a 77 K e 87 K, respectivamente, histerese começa a ocorrer para poros mais largos que  $\sim 4$  nm) (THOMMES & CYCHOSZ, 2014; LANDERS et al., 2013). Com adsorventes com mesoporos de menor largura, isotermas do Tipo IVb completamente reversíveis são observadas. Em princípio, as isotermas do Tipo IVb também são dadas por mesoporos cônicos e cilíndricos que são fechados na extremidade cônica.

A Isoterma Tipo V é muito semelhante à do Tipo III e isso pode ser atribuído a interações adsorvente-adsorvente relativamente fracas. Por exemplo, isotermas Tipo V são observadas para adsorção de água em adsorventes microporosos e mesoporosos hidrofóbicos (THOMMES et al., 2015). A isoterma reversível do Tipo VI é representativa da adsorção camada por camada em uma superfície não porosa altamente uniforme. A altura do passo agora representa a capacidade de cada camada adsorvida, enquanto a nitidez do passo depende do sistema e da temperatura (THOMMES et al., 2015).

A determinação da área superficial específica ( $S$ ) é feita através da adsorção de um gás em equilíbrio, em condições isotérmicas, normalmente  $N_2$  a 77 K. O método de Brunauer Emmett e Teller (BET) é o mais aplicado em carvão ativado, sendo possível determinar, também o volume de microporos ( $V_M$ ) e mesoporos ( $V_{MS}$ ), volume total de poro ( $V_P$ ), a Área de Microporos ( $S_M$ ), distribuição do tamanho do poro e diâmetro médio do poro ( $D$ ). A área superficial específica do CA é um dos parâmetros mais importantes na determinação de sua capacidade adsorviva. Geralmente, quanto maior seu valor, maior será a capacidade de adsorção (JUNIOR, 2014). Outro fator fundamental na adsorção é a distribuição do tamanho do poro. De acordo com o seu

tamanho, os poros de um CA podem ser classificados em microporos, mesoporos ou macroporos. O carvão ativado pode apresentar poros dos três tipos e a sua distribuição no produto final depende do tipo de matéria-prima, tipo de ativação e outros parâmetros operacionais utilizados em sua fabricação. Na Tabela 3 são apresentadas as classificações dos materiais porosos de acordo com as faixas de diâmetros de poros dos mesmos (LINHARES et al., 2016).

**Figura 18.** Classificação das isotermas de fisissorção.



Fonte: Adaptado de THOMMES et al, (2015)

**Tabela 3.** Classificação dos poros segundo seu diâmetro.

Classificação	Diâmetro de poros (nm)
Microporoso	$\phi < 20$
Mesoporoso	$20 < \phi < 50$

#### **2.6.4.2. Microscopia eletrônica de varredura**

A Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) é uma técnica que possibilita obter informações a respeito da forma das partículas e tamanho dos poros. Este método de caracterização utiliza feixes de elétrons para formação de imagens tridimensionais, e para isso é necessário que haja interação entre os feixes de elétrons com a amostra, o que ocorre apenas quando a amostra é condutora. Para amostras não condutoras é preciso realizar uma etapa de recobrimento da amostra com material condutor. Os materiais condutores mais utilizados são os íons metálicos tais como o ouro (Au) e platina (Pt). Os microscópios modernos permitem aumentos maiores que 300.000 vezes para a maioria dos materiais sólidos, fornecendo informações da amostra sólida, tais como, composição, textura, topografia e características da superfície (NASCIMENTO et al., 2014).

A técnica é utilizada em várias áreas de conhecimento, inclusive no estudo de carvões ativados, possibilitando a detecção da existência e do tamanho de poros no carvão.

#### **2.6.4.3. pH do Ponto de Carga Zero**

O pH é um parâmetro fundamental no processo de adsorção em solução, pois determina a carga da superfície do carvão ativado e governa as interações eletrostáticas entre o adsorvente e o adsorbato (BRITO et al., 2017). O pH ao qual a carga superficial do carvão ativado é nula é definido como o ponto de carga zero ( $\text{pH}_{\text{PCZ}}$ ), ou seja, para valores de pH abaixo do ponto de carga zero a superfície do carvão ativado é positiva, enquanto que acima deste valor é negativa. A interação entre o adsorbato e o adsorvente ocorre da seguinte maneira: quando o pH da solução é maior do que o  $\text{pH}_{\text{PCZ}}$ , a superfície do adsorvente é carregada negativamente e pode interagir com espécies positivas, e quando o pH da solução for menor que o  $\text{pH}_{\text{PCZ}}$ , a superfície sólida é carregada positivamente e pode interagir com espécies negativas (SILVA et al., 2016).

#### **2.6.4.4. Teor de cinzas**

Cinzas são aditivos minerais não carbônicos acrescentadas à massa do carvão por intermédio das ações da ativação e pirólise, através da combinação entre materiais orgânicos e inorgânicos e suas presenças em carvões ativados são prejudiciais no processo de adsorção, já que modificam a interação entre a superfície do carvão e a espécie a ser adsorvida (BOUALEM et al., 2014). As cinzas reduzem a adsorção por bloquear a porosidade da matriz carbônica e adsorver preferencialmente água, devido a seu caráter hidrofílico (BOUALEM et al., 2014). A composição das cinzas varia com a matéria-prima utilizada durante a produção do carvão ativado. Quando o carvão deriva de materiais lignocelulósicos (madeira, endocarpo de coco, caroço de cajá etc.), gera cinzas compostas por silicatos, alumino-silicatos e por baixas concentrações de cálcio, magnésio, ferro, potássio, sódio, zinco, chumbo, cobre etc. O conteúdo de cinzas poderá atingir valor superior a 10% em peso, quando originário de materiais lignocelulósicos, ou ser inferior a 1% em peso para carvões preparados a partir de precursores relativamente puros, tipo a sacarose (MAHAMAD et al., 2015).

#### **2.6.4.5. Espectroscopia no infravermelho com transformada de fourier (FTIR)**

Os espectrômetros de Transformada de Fourier (FTIR) permitem colher o espectro infravermelho mais rapidamente por serem guiados através de um interferômetro que produz um padrão do traçado do caminho óptico em forma de ondas contendo todas as frequências que formam o espectro. O interferograma é um espectro no domínio temporal, mas com o auxílio da Transformada de Fourier é possível separar as frequências em absorções individuais e produzir um espectro no domínio frequência, virtualmente idêntico ao obtido com um espectrômetro de sistema dispersivo (PAVIA et al., 2010). É uma técnica rápida e eficiente com diversos campos de aplicação

Este método espectroanalítico pode ser aplicado em carvões ativados para identificar os grupos funcionais presentes e ajudar na melhor compreensão do efeito de agentes químicos na superfície de carvão (PEREIRA et al., 2014).

Normalmente, a interpretação do espectro não é simples pelo fato de que cada grupo origina várias bandas a diferentes comprimentos de onda, então cada banda inclui vários grupos funcionais. Portanto, a análise do espectro torna-se mais eficiente em carvões fortemente oxidados, caso contrário, resulta em uma banda de absorção fraca

dificultando a análise (KAN et al., 2017; SUN et al., 2016). Na Tabela 4 são apresentadas bandas características mais comuns dos espectros de materiais precursores e carvões ativados.

**Tabela 4.** Atribuição das bandas apresentadas nos espectros FTIR para o material precursor e carvões ativados.

Nº onda (cm <sup>-1</sup> )	Atribuição
3303	Hidroxila (-OH) pertencente à estrutura de celulose;
2888	Grupo -C-H;
2660	Característica da banda do grupo metilo (C-H);
2345	Atribuída ao grupo metil (C-H);
2108	Estiramento do grupo carbono-oxigênio, derivados do grupo cetona;
1990	Estiramento de grupos simétricos e assimétricos para o ácido carboxílico derivado de anidridos (C=O; C-O-C);
1860	Alongamento das vibrações do grupo carbonila (C=O);
1733	As vibrações C=O das cetonas, aldeídos, lactonas ou grupos carboxílicos;
1602	Atribuídos ao C=O no carboximetil celulose;
1560	Alongamento C=O e C=C, comuns em superfícies de carbono;
1370	Observam-se as ligações C-H do grupo do acetil (CH <sub>3</sub> );
1235	Vibração dos anéis guaiacólicos;
1070	Pode ser atribuído a ligação iônica P <sup>+</sup> -O <sup>-</sup> em ésteres de fosfato; Vibração simétrica na cadeia de P-O-P;
1028	Estiramentos do grupo C-O ou C-O-C da Lignina, celulose e hemicelulose;
875	Corresponde ao grupo C-H fora do plano em -CHO aldeídos, compostos de piranose e outros derivados de benzeno;
806	Deformação de C-H para diferentes derivados de anéis de benzeno;

Fonte: Santos et al.(2019)

### 2.6.5. Aplicação do carvão ativado na imobilização de enzimas

Carvões ativados são adsorventes versáteis e bastante utilizados para a remoção de cor, odor, gosto e outras substâncias orgânicas e inorgânicas que poluem a água potável; no tratamento de águas residuais industriais; purificação do ar em ambientes

residenciais ou industriais; aplicações na indústria química, farmacêutica e alimentícia (MENONCIN et al., 2009; BASSAN et al., 2016). Além das aplicações tradicionais os carvões ativados têm sido empregados também como suporte catalítico e em processos de imobilização de enzimas.

Assim sendo, Silva et al. (2005) imobilizaram pancreatina em carvão ativado pelo método de adsorção física, sendo o mesmo utilizado na hidrólise de soro de leite em pó com teor reduzido de fenilalanina. Similarmente, Dutta et al. (2009) imobilizaram papaína em carvão ativado (MERCK) pelo método de adsorção física e aplicaram na remoção de mercúrio de sua solução aquosa. Enquanto, Ganesh et al. (2009) avaliaram a viabilidade de imobilização de protease ácida em matriz de carvão ativado altamente poroso, proveniente de farelo de arroz. Alkan et al. (2009) realizaram a imobilização da catalase em carvão ativo natural e carvão ativado modificado por ácido clorídrico, sendo avaliados o armazenamento e estabilidades operacionais da enzima após imobilização. Sob o mesmo ponto de vista, Ramani et al. (2012) também sintetizaram carvão ativado a partir da casca de arroz, e utilizaram o material como suporte para imobilização da lipase, empregando o biocatalisador na hidrólise de resíduos lipídicos presentes em efluente de matadouro. Brito et al. (2017) produziram carvões ativados de caroço de cajá usando como agentes ativadores o ácido fosfórico ou hidróxido de potássio, e posteriormente empregaram como suporte para imobilização de lipase. Mais recentemente, Santos et al. (2019) produziram carvão ativado de balsa de palmito de pupunha, usando como agente ativador o ácido fosfórico, o material obtido foi utilizado na imobilização de pepsina pelos métodos de adsorção física e ligação covalente, sendo o biocatalisador aplicado na hidrólise da caseína bovina.

Como relatado, vários estudos foram e estão sendo realizados com foco principal no desenvolvimento de enzimas imobilizadas, viabilizando a reutilização do biocatalisador, permitindo a separação dos produtos do meio reacional de forma fácil e muitas vezes melhorando a eficiência catalítica da enzima. Enzimas imobilizadas podem ser utilizadas na hidrólise de proteínas do leite para produção de peptídeos bioativos, que podem ser empregados na obtenção de novas drogas para o tratamento de doenças cardiovasculares. Estes peptídeos atuam na inibição da enzima conversora de angiotensina I (ECA), uma enzima envolvida na hipertensão (SOUZA JÚNIOR et al., 2014; OLIVEIRA et al., 2018).

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. Objetivo geral

Obtenção de biocatalisadores com tripsina e pepsina imobilizadas em carvão ativado e avaliar a atividade das enzimas imobilizadas, comparativamente à obtida com as enzimas livre, em hidrólise de caseínas de diferentes fontes para obtenção de peptídeos bioativos com função anti-hipertensiva

#### 3.2. Objetivos específicos

- Síntese de carvão ativado utilizando como material precursor o caroço de cajá;
- Funcionalizar a superfície do carvão ativado obtido e utilizá-lo como suporte para imobilização da pepsina e tripsina por ligação covalente;
- Utilizar o carvão ativado obtido como suporte para imobilização da pepsina e tripsina por adsorção;
- Obtenção de caseína do leite de cabra e búfala;
- Avaliar a atividade das enzimas na forma livre, imobilizada por adsorção e imobilizada por ligação covalente na hidrólise da caseína bovina, de cabra e búfala.
- Selecionar o biocatalisador e a enzima a partir dos resultados da hidrólise e testar a propriedade anti-hipertensiva dos hidrolisados obtidos.

#### 4. REFERÊNCIAS

- ABIOYE, A. M. and ANI, F. N. Recent development in the production of activated carbon electrodes from agricultural waste biomass for supercapacitors: A review, **Renewable and Sustainable Energy Reviews**. V. 52, P. 1282–1293. 2015.
- ABIDI, F., et al. Purification and biochemical characterization of stable alkaline protease Prot-2 from *Botrytis cinerea*. **Process Biochem**, v. 46, p. 2301-2310. 2011.
- ALBENZIO, M., SANTILLO, A., Biochemical characteristics of ewe and goat milk: Effect on the quality of dairy products, **Small Ruminant Research** 101, 33– 40, 2011.
- ALKAN S, GÜR A, MERTANT, SAVRAN A, GUR T, GENEL Y Imobilização de catalase via adsorção em carbono ativo natural e modificado obtido a partir de noqueira em vários métodos. **Afr J Biotechnol** 8: 2631–2635, 2009.
- ATACAN, A, K., ÇAKIROGLU, B., ÖZACAR, M., Covalent immobilization of trypsin onto modified magnetite nanoparticles and its application for casein digestion, **International Journal of Biological Macromolecules** 97, 148–155, 2017.
- AMBROSI, V.; POLENTA, G.; GONZALEZ, C.; FERRARI, G.; MARESCA, P. High hydrostatic pressure assisted enzymatic hydrolysis of whey proteins. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*. Volume 38, Part B, December 2016, Pages 294-301. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2016.05.009>
- BRITO, M.J.P.; VELOSO, C.M.; SANTOS, L.S.; BONOMO, R.C.F.; FONTAN, R.C.I. Adsorption of the textile dye Dianix® royal blue CC onto carbons obtained from yellow mombin fruit stones and activated with KOH and H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>: kinetics, adsorption equilibrium and thermodynamic studies. **Powder Technology**.v.339, p.334-343, 2018.
- BOUALEM, T.; DEBAB, A.; YUSO, A. M.; IZQUIERDO, M.T. Activated carbons obtained from sewage sludge by chemical activation: Gas-phase environmental applications. *Journal of Environmental Management*, v. 140, p. 145-151. 2014.
- BKHAIRIA, I, KHALED, H. B., KTARI, N., MILED, N., NASRI, M., & GHORBEL, S. Biochemical and molecular characterisation of a new alkaline trypsin from *Liza aurata*: Structural features explaining thermal stability. **Food Chemistry**, 196, 1346–1354, 2016.

BASSAN, J., DE SOUZA BEZERRA, T., PEIXOTO, G., DA CRUZ, C., GALÁN, J., VAZ, A., GARRIDO, S., FILICE, M. AND MONTI, R. Immobilization of Trypsin in Lignocellulosic Waste Material to Produce Peptides with Bioactive Potential from Whey Protein, **Materials**, v. 9, ed. 5, p. 357, 2016.

BAYRAMOGLU, G., Preparation and characterization of mixed-mode magnética dsorbent with p-amino-benzamidine ligand: Operated in a magnetically stabilized fluidized bed reactor for purification of trypsin from bovine pancreas, **Process Biochemistry**, 49, 520–528, 2014.

BILAL, M. et al. Development of horseradish peroxidase-based cross-linked enzyme aggregates and their environmental exploitation for bioremediation purposes. **Journal of Environmental Management**, DeLand, v. 188, p. 137-143, March 2017.

BOUTROU R, GAUDICHON C, DUPONT D, JARDIN J, AIRINEI G, MARSSET-BAGLIERI A, BENAMOUZIG R, TOMÉ D, LÉONIL J Sequential release of milk protein-derived bioactive peptides in the jejunum in healthy humans. **AmJ. Clin.Nutr.** 19:1314–1323, 2013.

BOUTROU, R., HENRY, G., & RIVERA, L. S. On the trail of milk bioactive peptides in human and animal intestinal tracts during digestion: a review. **Dairy Science & Technology**, 95(6), 815–829, 2015.

BLANCO, SOELI FRANCISCA MAZZINI MONTE. Remoção de Fenol em Solução Aquosa com Carvão Mineral. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2001.

BHAT, Z. F., KUMAR, BHAT, S.H.F., Antihypertensive Peptides of Animal Origin μ A Review, **Crit. Rev. Food. Sci. Nutr.** 57, 566–578, 2015.

BHAT, Z.F.; KUMAR, S.; BHAT, H.F. Antihypertensive peptides of animalorigin: a review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.57, p.566-558, 2017.

BRITO, M.J.P., VELOSO, C.M., BONOMO, R.C.F., FONTAN, R. DA C.I., SANTOS, L.S. and MONTEIRO, K.A. Activated carbons preparation from yellow mombin fruit stones for lipase immobilization, **Fuel Processing Technology**. V. 156, P. 421–428, 2017.

BRADFORD MM, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem**72:248–254 1976.

BRUM, S. S. *et al.* “Preparação e caracterização de carvão ativado produzido a partir de resíduos do beneficiamento do café”, **Revista Química Nova**. v. 31. p. 1048-1052. 2008.

BUBANALE, S., SHIVASHANKAR, M., History, method of production, structure and applications of activated carbon, **International Journal of Engineering Research & Technology** Vol. 6, 2017.

CARVALHO, A. V.; CHAVES, R. P. F.; ALVES, R. M. Caracterização físico-química de frutos em matrizes de cajazeira no estado do Pará. **Boletim de pesquisa e desenvolvimento**, Belém - PA, p. 1-22, 2017. ISSN 1983-0483.

CARVALHO, J. M. *et al.* Effect of processing on physicochemical composition, bioactive compounds and enzymatic activity of yellow mombin (*Spondias mombin L.*) tropical juice. **Journal of Food Science and Technology**, v. 52, n. 2, p. 1182-1187, 2015.

CASCO, M. E. **Carbones nanoporosos para la captura / almacenamiento de CO<sub>2</sub> y CH<sub>4</sub>**, 2015.183p. Tese de Doutorado - (Doutorado em Ciências de Materiais ). Universidade de Alicante, Alicante, 2015.

CUI, C. *et al.* Effect of thermal treatment on the enzymatic hydrolysis of chicken proteins. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, [S.l.], v. 10, p. 37-41, 2009

CHEEMA, M., MOHAN, M. S., CAMPAGNA, S. R., JURAT-FUENTES, J. L., & HARTE, F. M. The association of low-molecular-weight hydrophobic compounds with native casein micelles in bovine milk. **Journal of Dairy Science**, 98(8), 5155–5163, 2015.

CHEN, C.X.; HUANG, B.; LI, T.; WU, G.F. Preparation of phosphoric acid activated carbon from sugarcane bagasse by mechanochemical processing. **BioResources**.v.7, p.5109-5116, 2012.

CONTRERAS, M. M., CARRÓN, R., MONTERO, M. J., RAMOS, M., RECIO, I. Novel casein-derived peptides with antihypertensive activity. *International Dairy Journal*, 19, 566-573, 2009.

CONTRERAS, M. D. M., SEVILLA, M. A., MONROY-RUIZ, J., AMIGO, L., GÓMEZ-SALA, B., MOLINA, E., et al. Food-grade production of an anti-hypertensive casein hydrolysate and resistance of active peptides to drying and storage. *International Dairy Journal*, 21(7), 470–476, 2011.

CONTRERAS, M. D. M., SANCHEZ, D., SEVILLA, M. Á., RECIO, I., & AMIGO, L. Resistance of casein derived bioactive peptides to simulated gastrointestinal digestion. *International Dairy Journal*, 32(2), 71–78, 2013.

COSTA, E.L.; GONTIJO, J.A.R.; NETTO, F.M. Effect of heat and enzymatic treatment on the antihypertensive activity of whey protein hydrolysates. *Int. Dairy J.*, v. 17, p. 632-640, 2007.

CORRONS, M. A., LIGGIERI, C. S., TREJO, S. A., & BRUNO, M. A. ACE-inhibitory peptides from bovine caseins released with peptidases from *Maclurapomifera latex*. *Food Research International*, 93, 8–15, 2017.

CHOI, J. M.; HAN, S. S.; KIM, H. S. Industrial applications of enzyme biocatalysis: current status and future aspect. *Biotechnol Adv*, 33 (7), p. 1443-1454, 2015.

CLARK, S., & GARCÍA, M. B., A 100-year review: Advances in goat milk research *Journal of Dairy Science*, 100(12), 10026–10044, 2017.

CORREDIG, M., NAIR, P. K., LI, Y., ESHPARI, H., ZHAO, Z., Invited review: Understanding the behavior of caseins in milk concentrates, *J. Dairy Sci.* 102:4772–4782, 2019.

CUSHMAN, D. W., & CHEUNG, H. S. Spectrophotometric assay and properties of the angiotensin I converting enzyme of rabbit lung. *Biochemical Pharmacology*, 20(7), 1637–1648, 1971.

DALLA-VECCHIA, R.; NASCIMENTO, M. G.; SOLDI, V. Aplicações sintéticas de lipases imobilizadas em polímeros. *Química Nova*, v.27, p.623-630, 2004.

DALIRI EB-M, OH DH, LEE BH. Bioactive peptides. *Foods* 6:32–42 (2017)

DASKAYA-DIKMEN, C. YUCETEPE, A. KARBANCIOGLU-GULER, F. DASKAYA, H. OZCELIK, B. Angiotensin-I-Converting Enzyme (ACE)-Inhibitory Peptides from Plants, **Nutrients**, 9, 316, 2017.

DANISH.M.; AHMAD, T.A review on utilization of wood biomass as a sustainable precursor for activated carbon production and application. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**.v.87, p.1-21, 2018.

DALGLEISH, D. G. (2011). On the structural models of bovine casein micelles—review and possible improvements. *Soft Matter*, 7(6), 2265–2272. <https://doi.org/10.1039/C0SM00806K>.

DHYANI, V., BHASKAR, T.A comprehensive review on the pyrolysis of lignocellulosic biomass, **Renewable Energy**, 2017.

DEMERAL, H. *et al.* “Production of activated carbon from olive bagasse by physical activation”, **Chemical Engineering Research and Design**. n. 89. p. 206-213. 2011.

De KRUIF, C.G.; HOLT, C. Casein micelle structure, functions and interactions. In: FOX, P.F.; McSWEENEY, P.L.H. **Advanced Dairy Chemistry**. 3.ed. New York, Kluwer: Academic/Plenum Publisher, v.1, p.233-276. 2003.

DJILANI, C.; ZAGHDOUDI, R.; DJAZI, F.; BOUCHEKIMA, B.; LALLAM, A.; MODARRESSI, A.; ROGALSKI, M. Adsorption of dyes on activated carbon prepared from apricot stones and commercial activated carbon. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v.53, p.112–121, 2015.

DRAGONE, S.I.M. Aproveitamento Integral De Subproduto Da Indústria Cervejeira em Processos Químicos e Biotecnológicos. Tese (Doutorado – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial) – Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo, 2007.

DWEVEDI, A. Enzyme Immobilization: Advances in Industry, **Agriculture Medicine and the Environment**. Springer, 2016.

DUTTA, S., BHATTACHARYYA, A., DE, P., RAY, P., & BASU, S. Removal of Mercury From its Aqueous Solution Using Charcoal-Immobilized Papain (CIP). **Journal of Hazardous Materials**, v. 172, p. 888–896, 2009.

EGITO, A. S.; ROSINHA, G. M. S.; LAGUNA, L. E.; MICLO, L.; GIRARDER, J. M.; GAILLARD, J. L. Método eletroforético para detecção da adulteração do leite caprino com leite bovino. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 58, n. 5, p. 932- 939 2006.

FARRELL, H. M. Milk Proteins | Casein Nomenclature, Structure, and Association. *Encyclopedia of Dairy Sciences (Second Edition)*, 3, 765-771, 2011. <http://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-374407-4.00430-1>

FARRELL HM, JR., JIMENEZ-FLORES R, BLECK GT, Nomenclature of proteins of cow's milk: Sixth revision. *Journal of Dairy Science* 87: 1641–1674, 2004.

FARIAS, M.A.; FARINA, M.Z.; PEZZIN, A.P.T.; SILVA, D.A.K. Unsaturated Polyester Composites Reinforced With Fiber And Power Of Peach Palm: Mechanical Characterization And Water Absorption Profile. **Materials Science & Engineering. C: Biomimetic Materials, Sensors and Systems**, v. 29, p. 510-513, 2009.

FERNANDEZ-LOPEZ, L., PEDRERO, S. G., LOPEZ-CARROBLES, N., GORINES, B.C., VIRGEN- ORTÍZ, J.J., FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Effect of protein load on stability of immobilized enzymes, **Enzyme Microb. Technol.** 98 18–25, 2017.

FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ, M.; SANROMÁN, M. Á.; MOLDES, D. Recent developments and applications of immobilized laccase. **Biotechnology Advances**, v., n. in press, p., 2012.

FILICE M., ARAGON C. C., MATEO C., PALOMO J.M., Enzymatic transformations in food chemistry. **Curr Org Chem**, 21:139–48, 2017.

FITZGERALD, R. J., MURRAY, B. A., & WALSH, D. J. Hypotensive peptides from milk proteins. *Journal of Nutrition*, 134(4), 980–988, 2004.

FRANK, J.; RUHL, A.S.; JEKEL, M. Impacts of backwashing on granular activated carbon filters for advanced waste water treatment. **Water Res.**, 87, 166–174, **2015**.

FOX, P. F. MCSWEENEY, P. L. H. **Dairy Chemistry and Biochemistry**, Ireland: Blackie Academic & Professional, 478p., 1998.

FOX J W, SHANNON J D, BJARNASON J B. Proteinases and their inhibitors in biotechnology. *Enzymes in biomass conversion. ACS Symp Ser*, 460:62–79. 1991.

FUJITA H. YOKOYAMA. K. YASUMOTO R. YOSHIKAWA, M. Antihypertensive effect of thermolysin digest of dried bonito in spontaneously hypertensive rat. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, suppl.1, p.304-305, 1995.

GALLEGO, M.; MORA, L.; TOLDRÁ, F. Health relevance of antihypertensive peptides in foods. **Current Opinion in Food Science**, v.9, p. 8-14, 2018.

GIBBS, B. F. ZOUGMAN, A. MASSE, R. MULLIGAN, C. Production and characterization of bioactive peptides from soy hydrolysate and soy-fermented food. **Food Research International**, v.37, n.2, p.123-131, 2004.

GONZÁLEZ-GARCÍA, P. Activated carbon from lignocellulosics precursors: A review of the synthesis methods, characterization techniques and applications. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**.v.82, p.1393-1414, 2018.

GONÇALVES, M. et al. “Produção de carvão a partir de resíduo de erva-mate para a remoção de contaminantes orgânicos de meio aquoso”, **Revista Ciência Agrotécnica**.v. 31. p. 1386-1391. set-out. 2007.

GÓMEZ, A.; KLOSE, W.; RINCÓN, S. **Carbón activado de cuesco de palma. Estudio de la termogravimetría y estructura**.Kassel: kassel university press GmbH, 105p. 2010.

GODFREY, T.; WEST S. **Industrial enzymology**, 2nd ed. New York, N.Y: Macmillan Publishers Inc. p 609. 1996.

GHATTASA, N.; FILICEB, M.; ABIDIA, F.; GUISANB, J.M.; SALAH, A.B. Purification and improvement of the functional properties of *Rhizopusoryzae* lipase using immobilization techniques. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.110, p.111–116, 2014.

GŁAB, T. K., BORATYNSKI, J., Potential of Casein as a Carrier for Biologically Active Agents, *Top Curr Chem (Z)* 375:71, 2017.

GOBBA, C., TOMPA, G., & OTTE, J. Bioactive peptides from caseins released by cold active proteolytic enzymes from *Arsuki* bacterium *ikkense*. **Food Chemistry**, 165, 205–215, 2014.

GONZALEZ, J.F.; ROMAN, S.; ENCINAR, J.M.; MARTINEZ, G. Pyrolysis of various biomass residues and char utilization for the production of activated carbons. [Journal of Analytical and Applied Pyrolysis](#).v.85, p.134-41, 2009.

GOUVEA, B. M.; TORRES, C.; FRANCA, A. S.; OLIVEIRA, L. S.; OLIVEIRA, E. S. Feasibility of ethanol production from coffee husks. **Biotechnology Letters**, v. 31, p. 1315, 2012.

GUPTA, S.; BHATTACHARYA, A.; MURTHY, C.N. Tune to immobilize lipases on polymer membranes: Techniques, factors and prospects. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v.2, p.171–190, 2013.

GUZMAN, M. L.; MARQUES, M. R.; OLIVERA, M. E.; STIPPLER, E., Enzymatic activity in the presence of surfactants commonly used in dissolution media, Part 1: Pepsin. *Results in Pharma Sciences* 6 (2016) 15–19.

HARMSSEN, P.F.H., HUIJGEN, W., BERMUDEZ, L., BAKKER, R. Literature Review of Physical and Chemical Pretreatment Processes for Lignocellulosic Biomass, **Wageningen UR Food & Biobased Research**, 2010.

HALILOGLU, T., & BAHAR, I. Adaptability of protein structures to enable functional interactions and evolutionary implications. **Current Opinion in Structural Biology**, 35, 17–23, 2015.

HORIKAWA, T.; KITAKAZE, Y.; SEKIDA, T.; HAYASHI, J.; KATOH, M. Characteristics and humidity control capacity of activated carbon from bamboo. **Bioresource Technology**. v.101, p.3964-3969, 2010.

HOLT, C., CARVER, J. A., ECROYD, H., & THORN, D. C. Invited review: caseins and the casein micelle: their biological functions, structures, and behavior in foods. **Journal of Dairy Science**, 96(10), 6127–6146, 2013.

HORNE, D. S. Casein micelles as hard spheres: limitations of the model in acidified gel formation. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 213, n. 2, p. 255-263, 2003.

HORNE, D. S. Casein micelle structure: models and muddles. **Current opinion in colloid & interface science**, v. 11, n. 2, p. 148-153, 2006.

HORNE, D.S., Casein: Micellar Structure (Dual-Binding Model), Reference Module in Food Science, 2016.

HORNE, D.S., A balanced view of casein interactions, *Current Opinion in Colloid & Interface Science* 28 74–86, 2017.

HUSSAIN, I.; YAN, J.; GRANDISON, A. S.; BELL, A. E. Effects of gelation temperature on Mozzarella-type curd made from buffalo and cows' milk: 2. Curd yield, overall quality, and casein fractions. *Food Chemistry*, v. 135, p. 1404-1410, 2012.

IBRAHIM, H. R., AHMED, A. S., & MIYATA, T. Novel angiotensin-converting enzyme inhibitory peptides from caseins and whey proteins of goat milk. **Journal of Advanced Research**, 8(1), 63–71, 2017.

INGHAM, B., SMIALOWSKA, A., KIRBY, N. M., WANG, C., CARR, A. J., A structural comparison of casein micelles in cow, goat and sheep milk using X-ray scattering. *Soft Matter*, 14, 3336—3343, 2018.

ITTRAT, P.; CHACHO, T.; PHOLPRAYOON, J.; SUTTIWARAYANON, N.; CHAROENPANICH, J. Application of agriculture waste as a support for lipase immobilization. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v.3, p.77–82, 2014.

Industrial Enzymes Market worth 6.30 Billion USD by 2022.2016. Disponível em: <http://www.marketsandmarkets.com/PressReleases/industrial-enzymes.asp>. Acesso em: 18 ago. 2019.

JAIN, A.; TRIPATHI, S.K. Fabrication and characterization of energy storing supercapacitor devices using coconut shell based activated charcoal electrode. **Materials Science and Engineering B**, v.183, p.54–60, 2014.

JENKINS, B. M. Fuel Properties for Biomass Materials. In: International Symposium on Application and Management of Energy in Agriculture: The Role of Biomass Fuels. May, Delhi, India, p. 21-23, 1990.

JIANG, J.; CHEN, S.; REN, F.; LUO, Z.; ZENG, S.S. Yak milk casein as a functional ingredient: Preparation and identification of angiotensin-I-converting enzyme inhibitory peptides. **J. Dairy Res.**, v. 74, p. 18-25, 2007.

- JIANG, Z., TIAN, B., BRODKORB, A., & HUO, G. Production, analysis and in vivo evaluation of novel angiotensin-I-converting enzyme inhibitory peptides from bovine casein. **Food Chemistry**, 123(3), 779–786. 75, 2010.
- JAIN, A.; TRIPATHI, S.K. Fabrication and characterization of energy storing supercapacitor devices using coconut shell based activated charcoal electrode. **Materials Science and Engineering B**. v.183, p.54-60, 2014.
- JIANZHONG, X.; LINGZHI, C.; HONGQIANG, Q.; YUNHONG, J.; JIXING, X.; GUANGEN, X. Preparation and characterization of activated carbon from reedy grass leaves by chemical activation with H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>. **Applied Surface Science**. v.320, p.674-680, 2014.
- JUNIOR, S. S. C. **Carvão ativado produzido a partir do endocarpo de coco da baía (*Coccus nucifera*) aplicado no tratamento de efluente têxtil**. 2014. 108p. Dissertação. (Mestrado em Química) – Universidade de Évora, Évora, 2014.
- KAN, T., STREZOV, V., EVANS, T. J. Lignocellulosic biomass pyrolysis: a review of product properties and effects of pyrolysis parameters. **Renew Sustain Energy Reviews**. V.57, P.1126–1140, 2016.
- KAN, Y., YUE, Q., LI, D., WU, Y., & GAO, B. Preparation and characterization of activated carbons from waste tea by H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> activation in different atmospheres for oxytetracycline removal. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v. 71, p. 494–500, 2017.
- KIRK, T.K.; FARELL, R.L. Enzymatic ‘combustion’: the microbial degradation of lignin. **Annual Review of Microbiology**, v. 41, p. 465-505, 1987.
- KOOLMAN, J.; ROHEM, K.H. **Bioquímica: texto e atlas**. 3ed. Porto Alegre. 478 p., 2005.
- KRAKOFF, L. R., GILLESPIE, R. L., FERDINAND, K. C., FERGUS, I. V., AKINBOBOYE, O., WILLIAMS, K. A., WALSH, M. N., BAIREYMERZ, C. N., & PEPINE, C. J. Hypertension recommendations from the eighth joint national committee panel members raise concerns for elderly black and female populations. **Journal of the American College of Cardiology**, 64(4), 394–402, 2014.

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

KATO, K.; NAKAGAKI, S.; NISHIDA, M.; HIRAO, K. Enzyme encapsulation in silica particles prepared using enzyme-assisted sol–gel reactions in ionic liquids. **J.Ceram.Soc.**.v.119, p.140, 2011.

KETCHA, J.M; DINA, D.J.D.; NGOMO, H.M. Preparation and characterization of activated carbons obtained from maize cobs by zinc chloride activation. **Am Chem Sci J.**, v.4, p.1360, 2012.

KIM, S. K. BYUN, H. G. PARK, P. J. SHAHIDI, F. Angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides purified from bovine skim gelatin hydrolysate. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 49, n.6, p.2992–2997, 2001.

KHOABI, M.; MOTEVALIZADEH, S.F.; ASADGOL, Z.; FOROOTANFAR, H.; SHAFIEE, H.; FARAMARZI, M.A. Synthesis of functionalized polyethylenimine-grafted mesoporous silica spheres and the effect of side arms on lipase immobilization and application. **Biochemical Engineering Journal**, v.88, p.131–141, 2014.

KUMAR, S., CHOUHAN, V. S., SANGHI, A., TEOTIA, U. V. S., Antioxidative effect of yak milk caseinates hydrolyzed with three different proteases **Veterinary World**, EISSN: 2231-0916, 2013.

KUMAR, G. A., SWARNALATHA, P.; KAMATCHI, G.; SEKARAN. Immobilization of high catalytic acid protease on functionalized mesoporous activated carbon particles. **Biochemical Engineering Journal**, v.43, p. 185-190, 2009.

KETHIREDDIPALLI, P.; HILL, A. R. Rennet Coagulation and Cheesemaking Properties of Thermally Processed Milk: Overview and Recent Developments. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. Volume 63, p. 9389–9403. 2015.

KHAN, M., HUSAIN, Q., BUSHRA, R. Immobilization of  $\beta$ -galactosidase on surface modified cobalt/multiwalled carbon nanotube nanocomposite improves enzyme stability and resistance to inhibitor. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 105, p. 693-701, 2017.

KULKARNI, S., J. Enzyme Immobilization: **Research and Studies International Journal of Research & Review** 32 Vol.3; Issue: 7; 2016.

LAM, R. S. H., & NICKERSON, M. T. Food proteins: A review on their emulsifying properties using a structure–function approach. **Food Chemistry**, 141(2), 975–984, 2013.

LANDERS, J., YU. GOR, G., NEIMARK, A. V., Density functional theory methods for characterization of porous materials, *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects* 437 3–32, 2013.

LI, K., WANG, J., HE, Y., CUI, G., ABDULRAZAQ, M.A., YAN, Y., Enhancing enzyme activity and enantioselectivity of Burkholderia cepacia lipase via immobilization on melamine-glutaraldehyde dendrimer modified magnetic nanoparticles, **Chemical Engineering Journal** 351 258-268, 2018.

LI, W., LIU, J., ZHAO, D., Mesoporous materials for energy conversion and storage devices **Nat. Rev. Mater**, 1(6), p.16023, 2016.

LIN, K., ZHANG, L., HAN, X., & CHENG, D. Novel angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides from protease hydrolysates of Qula casein: quantitative structure-activity relationship modeling and molecular docking study. **Journal of Functional Foods**, 32, 266–277, 2017.

LIN, K., ZHANG, L., HAN, X., & CHENG, D. Novel angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides from protease hydrolysates of Qula casein: quantitative structure-activity relationship modeling and molecular docking study. **Journal of Functional Foods**, 32, 266–277, 2017.

LIM, W.C.; SRINIVASAKANNAN, C.; BALASUBRAMANIAN, N. Activation of palm shells by phosphoric acid impregnation for high yielding activated carbon. **Journal of Analytical and Applied Pyrolysis**, v. 88, p.181–186, 2010.

LINHARES, F. A., MARCÍLIO, N. R., MELO, P. J., Estudo da produção de carvão ativado a partir do resíduo de casca da acácia negra com e sem ativação química *SCIENTIA CUM INDUSTRIA (SCI. CUM IND.)*, V.4, N. 2, 74—79, 2016.

LIM, W.C.; SRINIVASAKANNAN, C.; SHOAI, A.A. Cleaner production of porous carbon from palm shells through recovery and reuse of phosphoric acid. **Journal of Cleaner Production**.v.102, p.501-511, 2015.

MAHMOOD, T., ALI, R., NAEEM, A., HAMAYUN, M., ASLAM, M., Potential of used *Camellia sinensis* leaves as precursor for activated carbon preparation by chemical activation with  $H_3PO_4$ : optimization using response surface methodology, [Process Safety and Environmental Protection](#)109 548-563, 2017.

MADENDE, M., KEMP, G., STOYCHEV, S., OSTHOFF, G., Characterisation of African elephant beta casein and its relevance to the chemistry of caseins and casein micelles, *International Dairy Journal* 85, 112-120, 2018.

MAHAMAD, M.N.; ZAINI, M.A.A.; ZAKARIA, Z.A. Preparation and characterization of activated carbon from pineapple waste biomass for dye removal. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v.102, p.274-280, 2015.

MAGNER, E.: Immobilisation of enzymes on mesoporous silicate materials. **Chem. Soc. Rev.** 42, 6213–6222, 2013.

MASOUD, M.S.; EL-SARAF, W.M.; ABDEL - HALIM, A.M.; ALI, A.E.; MOHAMED, E.A.; HASAN, H.M.I. Rice husk and activated carbon for waste water treatment of El-Mex Bay, Alexandria Coast, Egypt. **Arabian Journal of Chemistry**, 2012.

MARUYAMA, S. SUZUKI, H. A peptide Inhibitor of angiotensin I converting enzyme in the tryptic hydrolysate of casein. **Agricultural and Biological Chemistry**, v.46, n.5, p.1393-1394, 1982.

MELLO, K. G. P. C.; BERNUSSO, L. C.; PITOMBO, R. N. M.; POLAKIEWICZ, B. Synthesis and Physicochemical Characterization of Chemically Modified Chitosan by Succinic Anhydride. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 49, n.1, p. 665-667, 2006.

MENONCIN, S., DOMINGUES, N. M., FREIRE, D. M. G., OLIVEIRA, J. V., DI LUCCIO, M., TREICHEL, H. AND OLIVEIRA, D. Imobilização de lipases produzidas por fermentação em estado sólido utilizando *Penicillium verrucosum* em suportes hidrofóbicos, **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 29, ed. 2, p. 440–443, 2009.

MOHANTY, D. P., MOHAPATRA, S., MISRA, MS., SAHU, P. S., Milk derived bioactive peptides and their impact on human health – A review, **Saudi Journal of Biological Sciences**, 23, 577-593, 2015.

MORETTI, M.M.S.; BOCCHINI-MARTINS, D.A.; NUNES, C.C.C.; VILLENA, M.A.; PERRONE, O.M.; SILVA, R.; BOSCOLO, M.; GOMES, E. Pretreatment of sugarcane bagasse with microwaves irradiation and its effects on the structure and on enzymatic hydrolysis. **Applied Energy**.v.122, p.189 -195, 2014.

MOTEVALIZADEH, S.F.; KHOOBI, M.; SADIGHI, A.; KHALILVAND-SEDAGHEH, M.; PAZHOUHANDEH, M.; RAMAZANI, A.; FARAMARZI, M.A.; SHAFIEE, A. Lipase immobilization onto polyethylenimine coated magnetic nanoparticles assisted by divalent metal chelated ions. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.120, p.75–83, 2015.

MOHAMMAD, S., BEHNAM, N., ALI, H., AHMAD, T., Hydrothermal Gasification Performance of Iranian Rice Straw in Supercritical Water Media for Hydrogen-Rich Gas Production. *BioResources*. 11. 10.15376/biores.11.3.6362-6377, 2016.

MONTEIRO, V. N.; SILVA, R. N. Aplicações Industriais da Biotecnologia Enzimática. **Revista Processos Químicos**, Jan – Jun. v 3. p. 9-23. SENAI. 2009.

NABAISA, J.M.V.; LAGINHAS, C.; CARROTT, M.M.L.R.; CARROTT, P.J.M.; AMOROS, J.E.C.; GISBERT, A.V.N. Surface and porous characterization of activated carbons made from a novel biomass precursor, the esparto grass. *Appl. Surf. Sci.*, v.265, p.919-924, 2013.

NAN, Z.; HONGGANG, C.; JUNTING, X.; DENGHUI, Y.; ZHI, Z.; YUN, T.; XIANGYANG, L. Biochars with excellent Pb(II) adsorption property produced from fresh and dehydrated banana peels via hydrothermal carbonization. **Bioresource Technology**. v.232, p.204-210, 2017.

NASCIMENTO, R. F. et al. **Adsorção: Aspectos teóricos e aplicações ambientais**. **Biblioteca de Ciências e Tecnologia**. Fortaleza: Imprensa Universitária, 2014. 256p.

NELSON, D.L.; COX, M.M. **Lehninger Principles of Biochemistry**. 3.ed. New York: W. Publishers, 2000. p. 243-288, 2000.

NAWONG, S., OONSIVILAI, R., BOONKERD, B., HANSEN, L.T.S., Entrapment in food-grade transglutaminase crosslinked gelatin-maltodextrin microspheres protects *Lactobacillus* spp. during exposure to simulated gastro-intestinal juices. **Food Res. Int.** 85, 191–199, 2016.

NGUYENA, H. H., KIM, M., An Overview of Techniques in Enzyme Immobilization, **Appl. Sci. Converg. Technol.** Vol. 26, 6, 2017.

NGUYENA, H. T. H., ONGA, L., LOPEZE, C., KENTISHA, E. K., GRAS, S. L., Microstructure and physicochemical properties reveal differences between high moisture buffalo and bovine Mozzarella cheeses, *Food Research International* 102, 458–467, 2017.

AOAC (Association of Official Analytical Chemists). Official Methods of Analysis, 17th ed. **Association of Official Analytical Chemists**, Gaithersburg, MD. 2000.

OLIVEIRA, M. R. SILVA, T. J. BARROS, E. GUIMARÃES, V. M. BARACAT-PEREIRA, M. C. ELLER, M.R. COIMBRA, J. S. R. OLIVEIRA, E. B. Anti-Hypertensive Peptides Derived from Caseins: Mechanism of Physiological Action, Production Bioprocesses, and Challenges for Food Applications. **Appl Biochem Biotechnol**, 2018.

OLIVEIRA, G. S.; COSTA, J. M. C.; AFONSO, M. R. A. Caracterização e comportamento higroscópico do pó da polpa de cajá liofilizada. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 18, p.1059-1064, 2014.

OLIVEIRA, F. de C. Oxidação de lignina proveniente de resíduos lignocelulósicos agroindustriais para obtenção de compostos químicos aromáticos de maior valor agregado. Tese de Doutorado em Ciências. Escola de Engenharia de Lorena, USP, SP 2015.

OKMAN, I.; KARAGÖZ, S.; TAY, T.; ERDEM, M. Activated Carbons From Grape Seeds By Chemical Activation With Potassium Carbonate And Potassium Hydroxide. **Applied Surface Science**, v.293, p.138–142, 2014.

OSHIMA, G. SHIMABUKURO, H. NAGASAWA, K. Peptide inhibitors of angiotensin converting enzyme in digests of gelatin by bacterial collagenase. **Biochimica Biophysiology Acta**, v. 566, p.128-137, 1979.

PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S.; VYVYAN, J. R. Introdução à Espectroscopia. 4. ed. São Paulo: Cengage Learning, 692 p. 2010.

PANT G, PRAKASH A, PAVANI JVP, BERA S, DEVIRAM GVNS, KUMAR A, PANCHPURI M, PRASUNA RG. Production, optimization and partial purification of protease from *Bacillus subtilis*. Journal of Taibah University for Science. 2015; 9:50-55.

PARKIN, K. L., DAMODARAN, S., FENNEMA, O. R. **Química de Alimentos de Fennema**. 4<sup>a</sup> ed. Artmed, Porto Alegre, 900p, 2010.

PEREIRA, R. G., VELOSO, C. M., DA SILVA, N. M., DE SOUSA, L. F., BONOMO, R. C. F., DE SOUZA, A. O., DA GUARDA, M. O & FONTAN, R. D. C. I. Preparation of activated carbons from cocoa shells and siriguela seeds using H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> and ZnCl<sub>2</sub> as activating agents for BSA and  $\alpha$ -lactalbumin adsorption. **Fuel Processing Technology**, 126, 476-486. 2014.

PEREIRA, P. C. (2014). Milk nutritional composition and its role in human health. *Nutrition*, 30(6), 619–627. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2013.10.011>.

PIHLANTO A. **Lactic Fermentation and Bioactive Peptides**. *Lact. Acid Bact.* – R D Food, Heal. Livest. Purp, 2013.

PIHLANTO-LEPPA, A., ROKKA, T., KORHONEN, H., Angiotensin I Converting Enzyme Inhibitory Peptides Derived from Bovine Milk Proteins, **Int. Dairy Journal** 8 1998.

PINTO, M. V. D. S., SILVA, D. L. D., & SARAIVA, A. C. F. Production and characterization of the activated carbon from buriti stone (*Mauritia flexuosa* L. f.) to evaluate the adsorption's process of copper (II). **Acta Amazonica**, 43(1), 73-80, 2013.

POLDERMANS, B. Proteolytic enzymes. In: Gerhartz W, editor. Proteolytic enzymes in industry: production and applications. **VCH Publishers**, pp. 108–123. 1990.

POULSEN, Nina A.; ESKILDSEN, Carl E.; AKKERMAN, Marije; JOHANSEN, Lene B.; HANSEN, Mikka S.; HANSEN, Per W.; SKOV, Thomas; LARSEN, Lotte B. Predicting hydrolysis of whey protein by mid-infrared spectroscopy. *International Dairy Journal*. V61. 2016. pg44-50. DOI: 10.1016/j.idairyj.2016.04.002.

PHAN, N. H. *et al.* "Production of fibrous activated carbons from natural cellulose (jute, coconut) fibers for water treatment applications", **Carbon**. v. 44. p. 2569-2577. 2006.

PRAHAS, D.; KARTIKA, Y.; INDRASWATI, N.; ISMADJI, S. Activated carbon from Jack fruit peel waste by H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> chemical activation: pore structure and surface chemistry characterization. **Chem. Eng. J**, v.140, p.32–42, 2008.

PULINA, G., MILÁN, M. J., LAVÍN, M. P., THEODORIDIS, A., MORIN, E., CAPOTE, J., ... CAJA, G., Invited review: Current production trends, farm structures, and economics of the dairy sheep and goat sectors. *Journal of Dairy Science*, 101(8), 6715–6729, 2018.

RAMANI, K.; KARTHIKEYAN, S.; BOOPATHY, R.; KENNEDY, L.; MANDAL, A.B.; SEKARAN, G. Mesoporous activated carbon surface functionalized for the immobilization of lipase and its application acidic hydrolysis waste oil prepared: Isotherm and kinetic studies. **Process Biochemistry**.v.47, p.435-445, 2012.

RANGABHASHIYAM, S.; BALASUBRAMANIAN, P. The potential of lignocellulosic biomass precursors for biochar production: Performance, mechanism and wastewater application - A review. **Industrial Crops & Products**.v.128, p.405-423, 2019.

RAGHAVAN, S. KRISTINSSON, H. G. ACE-inhibitory activity of tilapia protein hydrolysates.**Food Chemistry**. v. 117, p. 582-588, 2009.

RAWLINGS, N.D.; WALLER, M.; BARRETT, A.J.; BATEMAN, A. MEROPS: the database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors. *Nucleic Acids Research*. 2014. doi: 10.1093/nar/gkt953.

RECOBERT, M. P. **Carbón activado evaluación de nuevos precursores y del proceso de activación con dióxido de carbono**. 2015. 233p. Tese - (Doctorado em Química) - Universidade de Alicante, Alicante, 2015.

REGALBUTO, J. R.; ROBLES, J. **The engineering of Pt/Carbon Catalyst Preparation**, University of Illinois: Chicago, 2004.

REZAKHANI, N. RAD, A. M. PARIVAR, K. KHAYATI, M. ETEMADZADE, S. Immobilization of protease in biopolymers (mixture of alginate-chitosan) **Journal of Paramedical Sciences (JPS)** Autumn Vol.5, No.4, 2014.

RONCADA, P.; PIRAS, C.; SOGGIU, A.; TURK, R.; URBANI, A.; BONIZZI, L. Farm animal milk proteomics. *Journal of Proteomics*, v. 75, n. 14, p. 4259-4274, 2012.

ROCHA, G. F., KISE, F., ROSSO, A. M., PARISI, M. G., Potential antioxidant peptides produced from whey hydrolysis with an immobilized aspartic protease from *Salpichroa organifolia* fruits. *Food Chemistry*. Volume 237, 15 December 2017, Pages 350-355. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.05.112>

RUEDA, N. et al. Chemical Modification in the Design of Immobilized Enzyme Biocatalysts: Drawbacks and Opportunities. **The Chemical Record**, Chicago, v. 16, n. 3, p. 1436-1455, June 2016.

SACRAMENTO, C. K.; SOUZA, F. X. D. Cajá (*Spondias mombin L.*). **Funep**, Jaboticabal, v. 42, p. (Séries Frutas Nativas, 4), 2000.

SANCHO, S. D. O. et al. Characterization of the industrial residues of seven fruits and prospection of their potential application as food supplements. **Journal of Chemistry**, v. 2015, p. 1-8, 2015.

SANTOS, F. A., QUEIRÓZ, J. H. DE, COLODETTE, J. L., FERNANDES, S. A., GUIMARÃES, V. M., & REZENDE, S. T. Potencial da palha de cana-de-açúcar para produção de etanol. **Química Nova**, v. 35, ed. 5, p. 1004-1010, 2012.

SANTOS, M. P. F. **Carvão ativado: influência das características químicas do precursor de carbono nas suas propriedades e aplicação na imobilização da pepsina**. Itapetinga – BA: UESB, 2017. 94 p. (Dissertação – Mestrado em Engenharia de Alimentos e Ciência de Alimentos; Área de concentração: Engenharia de Alimentos).

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

SARTOVA, K. OMURZAK, E.; KAMBAROVA, G.; DZHUMAEV, I.; BORKOEV, B.; ABDULLAEVA, V. Activated carbon obtained from the cotton processing wastes, **Diamond and Related Materials**. v.91, p.90-97, 2019.

SANTOS, M. P. F., BRITO, M. J. P., JUNIOR, E. C.S., BONOMO, R. C.F., VELOSO, C. M., Pepsin immobilization on biochar by adsorption and covalent binding, and its application for hydrolysis of bovine casein, **J Chem Technol Biotechnol**; **94**: 1982–1990, 2019.

SAIDUR, R., ABDELAZIZ, E.A., DEMIRBAS, A., HOSSAIN, M.S., MEKHILEF, S. A review on biomass as a fuel for boilers. **Renewable Sustainable Energy Rev.**, v.15, p.2262–89, 2011.

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

SELVARAJU, G.; BAKAR, N. K. A. Production of a new industrially viable green-activated carbon from Artocarpus integer fruit processing waste and evaluation of its chemical, morphological and adsorption properties. **Journal of Cleaner Production**, v. 141, p. 989-999, 2017.

SGARBIERI, V.C. Proteínas em alimentos proteicos: Propriedades – degradações – modificações. São Paulo: Varela, 1996

SGARBIERI, V. C. Revisão: Propriedades estruturais e físico-químicas das proteínas do leite. **Brazilian Journal of Food Technology**, 8(1), 43–56, (2005).

SHAH, I. K.; PRE, P.; ALAPPAT, B. J. Effect of thermal regeneration of spent activated carbon on volatile organic compound adsorption performances. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v. 45, n. 4, p. 1733–1738, 2014.

SILVA, V. D. M. DE MARCO, L. M.; DELVIVO, F. M. AGUIAR, M. Jb; COELHO, J.V.; SILVESTRE, M.P.C. Emprego da pancreatina imobilizada no preparo de hidrolisados de soro de leite com teor reduzido de fenilalanina. **Alimentos & Nutrição.**, v. 16, n.1, p. 21-31, 2005.

SIAR E, ZAAK H, KORNECKI JF, ZIDOUNE MN, BARBOSA O, FERNANDEZ-LAFUENTE R. Stabilization of ficin extract by immobilization on glyoxyl-agarose. Preliminary characterization of the biocatalyst performance in hydrolysis of proteins. **Process Biochem** 58:98–104, 2017.

SILVA, T.L.; RONIX, A.; PEZOTI, O.; SOUZA, L.S.; LEANDRO, P.K.T.; BEDIN, K.C.; BELTRAME, K.K.; CAZETTA, A.L.; ALMEIDA, V.C. Mesoporous activated carbon from industrial laundry sewage sludge: Adsorption studies of reactive dye Remazol Brilliant Blue R. [Chemical Engineering Journal](#). v.303, p.467-476, 2016.

SILVESTRE, M. P. C. HAMON, M. YVON, M. Analyses of protein hydrolysates. 1. Use of poly (2-hydroxyethyl-aspartamide)-silica column in size-exclusion chromatography for the fractionation of casein hydrolysates. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 42, p. 2778-2782, 1994a.

SILVESTRE, M. P. C. HAMON, M. YVON, M. Analyses of protein hydrolysates. 2. Characterization of casein hydrolysates by a rapid peptide quantification method. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.42, n.12, p.2783-2789, 1994b.

SOUZA JÚNIOR, E. C., COIMBRA, J. S. D. R., DE OLIVEIRA, E. B., & BONOMO, R. C. F. Recovery of casein derived peptides with in vitro inhibitory activity of angiotensin converting enzyme (ACE) using aqueous two-phase systems. **Journal of Chromatography B**, 973, 84–88, 2014.

SOUZA *et al.*, A biotechnology perspective of fungal proteases. **Braz J Microbiol**, Jun; 46 (2): 337–346. 2015.

SOUZA, F. X.; ARAUJO, C. A. T. Avaliação dos métodos de propagação de algumas Spondias agroindustriais. Fortaleza: **Embrapa-CNPAT**. p. 1-4, 2000.

SOUZA, E. P. et al. Enxertia da Cajazeira. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 32, n. 1, p. 316-320, 2010.

SUN, J., YANGA, L., JIANGB, M., SHIA, Y., XUA, B., MAA, H., Stability and activity of immobilized trypsin on carboxymethyl chitosan functionalized magnetic nanoparticles cross-linked with carbodiimide and glutaraldehyde, **Journal of Chromatography B**, 1054, 57–63, 2017.

SINGH et al., **Microbial enzymes**: industrial progress in 21st century. 3 Biotech, Dec. 6(2): 174, 2016.

SINGH, P., GUPTA, P., SINGH, R., SHARMA, R., “Activity And Stability Of Immobilized Alpha-Amylase Produced By Bacillus Acidocaldarius”, *Int. J. Of Pharm. & Life Sci.*, 3(12), 2247-2253, 2012.

SHULER, L.M., KARGI, F., Immobilized enzyme system. In: **Bioprocess Engineering Basic Concepts**. Prentice Hall,NJ, pp. 57–104, 2017.

SHELDON, R.A., VAN PELT, S., Enzyme immobilisation in biocatalysis: why, what and how, **Chem. Soc. Rev.** 426223–6235, 2013.

SCHMIDT, D.G.; FOX P. F. Association of caseins and casein micelle structure.**Developments in dairy chemistry**, v. 1, p. 61-86, 1982.

SVANBORG, S., JOHANSEN, A. G., ABRAHAMSEN, R. K., SCHÜLLER, R. B., SKEIE, S. B., Caseinomacropeptide influences the functional properties of a wheyprotein concentrate, *International Dairy Journal* 60 14-23, 2016.

SZAŁAPATA, K. OSIŃSKA-JAROSZUK, M. BRYJAK,J. JASZEK,M. JAROSZ-WILKOŁAZKA, A. Novel application of porous and cellular materials for covalent immobilization of pepsin, **Brazilian Journal of Chemical Engineering** v.33, pp. 251 - 260, 2016.

SUN, Y., LI, H., LI, G., GAO, B., YUE, Q., & LI, X. Characterization and ciprofloxacin adsorption properties of activated carbons prepared from biomass wastes by H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> activation. **Bioresource Technology**, v. 217, p. 239–244, 2016.

TAVANO, O. L., BERENQUER-MURCIA, A., SECUNDO, F., FERNANDEZ-LAFUENTE, R., Biotechnological Applications of Proteases in Food Technology, **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety** Vol.17, 2018.

TAVANO OL. Proteases. In: Ray RC, Rosell CM, editors. *Microbial enzyme technology in food applications*. Boca Raton: Taylor & Francis Group, CRC Press. p 162–79, 2016.

TAMM F., DRUSCH S. **Impact of enzymatic hydrolysis on the interfacial rheology of whey protein/pectin interfacial layers at the oil/water-interface**.*Food Hydrocolloids*, 63 (2017), pp. 8-18. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.08.013>

THOMMES, M., KANEKO, K., NEIMARK, A. V., OLIVIER, J. P., RODRIGUEZ-REINOSO, F., ROUQUEROL, J., SING, K. S. W., Physisorption of gases, with special reference to the evaluation of surface area and pore size distribution (IUPAC Technical Report), *Pure Appl. Chem.* 87(9-10): 1051–1069, 2015.

THOMMES, M., CYCHOSZ, K. A., Physical adsorption characterization of nanoporous materials: progress and challenges *Adsorption* **20**, 233, 2014.

TIBURSKI, JÚLIA HAUCK; ROSENTHAL, AMAURI.; DELIZA, ROSIRES.; GODOY, R.L.O.; PACHECO, SIDNEY. Nutritional properties of yellow mombin (*Spondiasmombin L.*) pulp. *Food Research International*, v. 44. p. 2326–2331. 2011.

TIMÓN, M. L. et al. Identification of radical scavenging peptides (<3kDa) from Burgos-type cheese. *Food Science and Technology*, London, v.57, p. 359-365, 2014.

TOLDRÁ, F., REIG, M., ARISTOY, M. C., MORA, L., Generation of bioactive peptides during food processing, *Food Chemistry* **267** 395–404, 2018.

VAN SOEST, P.J., ROBERTSON, J.B., LEWIS, B.A., Symposium: carbohydrate methodology, metabolism, and nutritional implications in dairy cattle. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition, *Journal of Dairy Science* **74** 3583-3597, 1991.

VAIBHAV, D.; THALLADA, B.A. Comprehensive review on the pyrolysis of lignocellulosic biomass. *Renewable Energy*.v.129, p.695-716, 2017.

VERRUCK, S., DANTAS, A., PRUDENCIO, E. S., Functionality of the components from goat's milk, recent advances for functional dairy products development and its implications on human health, *Journal of Functional Foods* **52**, 243–257, 2019.

VESCOVI, V., GIORDANO, R.L., MENDES, A.A., TARDIOLI, P.W., Immobilized lipases on functionalized silica particles as potential biocatalysts for the synthesis of fructose oleate in an organic solvent/water system. *Molecules* **22**, 212, 2017.

VERMELHO *et al.*, **Enzimas proteolíticas**: Aplicações biotecnológicas. Enzimas em biotecnologia produção, aplicações e mercado, Ed 1, C 11. Editora Interciência, p 273-287.2008.

VOLKANDARI, S. D., INDRIAWATI, MARGAWATI, E. T., Genetic polymorphism of kappa-casein gene in Friesian Holstein: a basic selection of dairy cattle superiority *Journal of the Indonesian Tropical Animal Agriculture*, **42**(4):213-219, 2017.

WAUGH, D. F. The interactions of  $\alpha$ s- $\beta$ -and  $\kappa$ -caseins in micelle formation. *Discussions of the Faraday Society*, v. 25, p. 186-192, 1958.

WALSTRA, P. On the stability of casein micelles. **Journal of Dairy Science**, v. 73, n. 8, p. 1965-1979, 1990.

WALSTRA, P. Casein sub-micelles: do they exist?. **International Dairy Journal**, v. 9, n. 3, p. 189-192, 1999.

WEN-QIONG, W., LAN-WEI, Z., XUE, H., YI, L., Cheese whey protein recovery by ultrafiltration through transglutaminase (TG) catalysis whey protein cross-linking. **Food Chem.** 215, 31–40, 2017.

WILLIAMS, B., POULTER, N. R., BROWN, M. J., DAVIS, M., MCINNES, G. T., POTTER, J. F., Guidelines for management of hypertension: report of the fourth working party of the British Hypertension Society,—BHS IV. **Journal of Human Hypertension**, 18(3), 139–185, 2004.

WHO: World Health Organization (2013). **A global brief on hypertension**. Available from: [http://www.who.int/cardiovascular\\_diseases/publications/global\\_brief\\_hypertension/en/](http://www.who.int/cardiovascular_diseases/publications/global_brief_hypertension/en/). Accessed 14 August 2019.

YE, R., HARTE, F., Casein maps: effect of ethanol, pH, temperature, and CaCl<sub>2</sub> on the particle size of reconstituted casein micelles. **J Dairy Sci**, 2013. 96:799–805. doi:[10.3168/jds.2012-5838](https://doi.org/10.3168/jds.2012-5838)

YU ZL, ZENG WC, ZHANG WH, LIAO XP and SHI B, Effect of ultrasound on the activity and conformation of  $\alpha$ -amylase, papain and pepsin. **Ultrason Sonochem** 21:930–936 2014.

YAHYA, M. A., AL-QODAH, Z., & NGAH, C. W. Z. Agricultural bio-waste materials as potential sustainable precursors used for activated carbon production: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 46, p. 218–235, 2015.

YU, J.; PATERSON, N.; BLAMEY, J.; MILLAN, M. Cellulose, xylan and lignin interactions during pyrolysis of lignocellulosic biomass. **Fuel**. v.191, p.140-149, 2017.

YOUNES, E., Structural Properties of Casein Micelles in Milk, the effect of salt, temperature, and pH. **Int J Biotech & Bioeng**.3:6, 204- 220, 2017. DOI: 10.25141/2475-3432-2017-6.0202

ZAAK, H., FERNANDEZ-LOPEZ, L., OTERO, C., SASSI, C., FERNANDEZ-LAFUENTE, R., Improved stability of immobilized lipases via modification with

polyethylenimine and glutaraldehyde, **Enzyme and Microbial Technology** 106 67–74, 2017.

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

ZANETTE, A.F.; AWADALLAK, J.; FILHO, L.C. Immobilization of lipases regioselectivas dies in sol-gel and partial hydrolysis reaction. **Journal of Exact Sciences**, v.3, p.05-08, 2014.

ZAMBROWICZ, A. et al. Antioxidant and antidiabetic activities of peptides isolated from a hydrolysate of an egg-yolk protein by-product prepared with a proteinase from Asian pumpkin (*Cucurbita ficifolia*). **RSC Advances**, v. 5, n. 14, p. 10460-10467, 2015.

ZHAO, H., ZHOU, F., WANG, L., FENGLING, B., DZIUGAN, P., WALCZAK, P., & ZHANG, B. Characterization of a bioactive peptide with cytomodulatory effect released from casein. **European Food Research and Technology**, 238(2), 315–322, 2014.

ZUBRIK, A.; MATIK, M.; HREDZÁK, S.; LOVÁS, M.; DANKOVÁ, Z.; KOVÁČOVÁ, M.; BRIANČIN, J. Preparation of chemically activated carbon from waste biomass by single-stage and two-stage pyrolysis. **Journal of Cleaner Production**. v. 143, p. 643-653, 2016.

## CAPÍTULO 2

---

**Artigo 1: Biocatalysts produced by immobilization of trypsin on biochar by adsorption and covalent binding, and application in the hydrolysis of casein from different sources**

---

\*Este artigo será submetido à revista Journal Chemical Technology and Biotechnology (INSS:1097-4660), classificação A1 (área-Ciência de Alimentos), Qualis-Capes 2013-2016, Fator de impacto: 2.659.

## ABSTRACT

**OBJECTIVE:** The present study aimed to evaluate the effect of the immobilization method of trypsin on biochar on the hydrolysis of casein from different sources, when compared to the process using trypsin in native form, to obtain bioactive peptides.

**RESULTS:** The modification of the surface of biochar with glutaraldehyde was effective, as shown by the results of FTIR assay and the texture profile of the materials. Both activated and functionalized biochar showed high immobilization efficiency (> 87%) and high binding capacity (> 91 mg/g). During hydrolysis, the biocatalyst obtained by enzyme immobilization on the functionalized biochar presented a higher hydrolysis capacity for the different caseins when compared to the enzyme immobilized by adsorption, with values of 3.05 and 2.73 for goat casein, 2.36 and 1.85 for bovine casein, and 2.60 and 2.37 U/mg for buffalo, casein, respectively, with 60 min of reaction. The results of inhibitory activity in this study ranged from 93.5% and 25.5% for trypsin in its free form and immobilized on functionalized activated carbon, respectively, under the same reaction conditions.

**CONCLUSION:** The immobilization methods were efficient, presenting high immobilization capacity. The proteolytic activity of trypsin immobilized via covalent binding was higher when compared the immobilization by adsorption. Thus, the functionalized biochar has proven to be potential support for enzyme immobilization, and the biocatalyst can be reused for more than 4 cycles. Despite lower ACE inhibition values of hydrolyzed obtained with the immobilized enzymes compared to free enzymes, biocatalysts present advantage due to the possibility of reuse.

## 1. INTRODUCTION

Digestive enzymes are proteins functioning as biological catalysts, which accelerate chemical and biological reactions in a highly specific manner. In the last decades, biocatalysts have been used in many industrial applications as a replacement for conventional chemical catalysts. The enzymes, when used as catalysts, exhibit high catalytic efficiency, specificity, and selectivity under mild reaction conditions, and low energy requirements. Due to their specificity, the multiple steps of a process can be reduced to only one stage, resulting in a reduced by-product formation and lower energy

consumption (CHENG, 2018; BERNAL et al., 2018). In spite of these advantages, the use of enzymes in industrial applications is limited since most of the enzymes are relatively unstable, with a high cost of isolation, purification, and recovery of the active enzymes after the catalytic process (HOMAEI et al., 2013; CHOI et al., 2015).

Several factors impair the large-scale application of soluble enzymes, including its high sensitivity, the difficulty of reuse, and high costs. Thus, immobilization on inert support may be the most attractive method for enzyme reuse and stabilization. The immobilization of biocatalysts consists of the restriction of the enzyme within a confined region, ensuring the retention of their catalytic activity by mass transfer, high stability, greater specificity, and control of side reactions, ensuring the repeated and continuous use (RUEDA et al., 2016; BILAL et al., 2017; BERNAL et al., 2017).

Factors that determine the success of the immobilization process include the choice of support and the immobilization method. Adsorption is the oldest and preferred physical method for the immobilization of biocatalysts because it is a simpler and less denaturing method. The enzyme is immobilized on solid support by low energy bonds, such as Van der Waals or hydrophobic interactions, hydrogen and ion bonds, among others. The success and efficiency of the enzyme adsorption onto a support, which is generally on the surface, depends on several parameters, such as size of the protein molecule to be adsorbed, surface area, porosity, and pore size of the adsorbent (MOHAMAD et al., 2015; ABUSSAUD et al., 2016).

In the chemical method, the formation of covalent bonds is much stronger and more stable than the physical interactions occurring during the adsorption (ATACAN et al., 2017). The formation of covalent bonds between the enzyme and the support is one of the most popular methods for enzyme immobilization and involves the formation of bonds between the amino acids side chains of the enzyme and the reactive groups of the support. A large number of existing processes aiming at surface activation and the formation of covalent bonds allows its application to a wide range of systems without removal of the immobilized enzyme (SUN et al., 2017). In most substrates, it is first necessary to activate the functional groups of the support, using a reactive compound, called activating agent, so that the support can react with the enzyme molecules. A method commonly used is the use of glutaraldehyde (GA) to conjugate amino groups on the surface of the membrane and enzymes, through Schiff's base formation (LIU et al., 2017).

The physical and chemical properties of support and the possibility of regeneration of the material should also be investigated. In recent years, biochar produced from lignocellulosic materials has been used efficiently as a support for enzyme immobilization (BRITO et al., 2017).

The main objective of the present study was to select the best immobilization method of trypsin on biochar and to evaluate the activity of the immobilized trypsin, when compared to that obtained using trypsin in native form, on hydrolysis of casein from different sources to obtain antihypertensive hydrolysates. Some peptides released from milk casein by proteolytic enzymes may act as physiological regulators, with inhibitory action of angiotensin converting enzyme (ACE). Proteolytic enzymes have stood out for their important role in research, wide commercial application, and participation in several industrial processes (ESPEJO-CARPIO et al., 2016). Trypsin (EC 3.4.21.4) is a digestive protease produced in the pancreas (it is a component of pancreatic juice, which is released into the duodenum during digestion), which is capable to cleavage dietary proteins and peptide bonds, and recognize amino acids with basic side chains (lysine and arginine) (ATACAN et al., 2017).

## 2. METHODS

### 2.1 Materials

Casein from goat milk and buffalo milk was obtained according to Egito et al. (2006). Bovine casein (90% Minimum Purity, Sigma, USA) and trypsin (E.C.: 3.4.21.4, bovine pancreas, 10,000 U / mg, 118 Sigma, USA) were purchased from Sigma. All reagents were of analytical grade. To synthesize the biochar, cajá seeds (*Spondias mombin* L.) purchased from the fruit pulp industry located in the city of Coaracé - Ba was used.

### 2.2 Processing and characterization of the precursor material

Caja seeds were washed, dried in an oven at 105 °C for 24 h, milled in a knife mill, and sieved to 20 mesh. Ash and moisture contents were determined using AOAC methodologies 920.03 and 925.45 (AOAC, 2000). The contents of cellulose, hemicellulose, and lignin were determined using neutral detergent fiber and acid detergent fiber (NDF and ADF) analyses, as described by Van Soest et al. (1991).

Fourier transform infrared attenuated total reflectance spectrometry (FTIR-ATR) was used in the infrared region of 4000-500  $\text{cm}^{-1}$  in an Agilent spectrophotometer (Cary 630 FTIR, Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA, USA) to evaluate the functional groups of precursor material.

### 2.3 Synthesis, functionalization, and characterization of the supports

For the synthesis of biochar, the chemical activation method with phosphoric acid as an activating agent was used. The precursor material was impregnated with phosphoric acid (85% PA-CAS: 7664-38-2) in a mass ratio of 1.5: 1 (activating agent/precursor) and dried in an oven at 105 °C for 48 h. Then, the material was incinerated in a muffle (Vulcan 3-550, Pirassununga - SP) at 500 °C (heating rate of 5 °C.min<sup>-1</sup>), under nitrogen flow (50 mL.min<sup>-1</sup>) for 1 h. After carbonization, the biochar (BC) was washed with water at 60 °C until pH ~7.0 of the washing water. The sample was dried at 105 °C for 24 h and packed in airtight packaging.

The functionalization of biochar was performed using glutaraldehyde as suggested by Ramani et al. (2012), with modifications by Santos et al (2019).

The methodology of AOAC (920.03) was used to determine the ash content of biochar. The functional groups of biochar (BC) were evaluated before and after functionalization with glutaraldehyde by ATR-FTIR, as previously described. The point of zero charge (pH<sub>pzc</sub>) was determined according to the methodology described by Regalbuto and Robles (2004). The adsorption and desorption isotherms of the supports were determined at 77 K in a Micrometrics ASAP 2420 (Micrometrics Instrument Corporation, Norcross, GA, USA). Before the measurements, the samples were subjected to a pretreatment consisting of heating at 353 K. The specific surface area was calculated using the Brunauer-Elmett-Teller (BET) equation. The pore distribution was obtained from the desorption isotherm using the BJH method, and the volume of the micropores was determined by t-plot analysis. The morphology of the supports was determined by scanning electron microscopy (SEM). For that, the samples were fixed on stubs, and the analysis was carried out in a scanning electron microscope QUANTA 250 (FEI COMPANY, Waltham, Massachusetts, EUA).

## 2.4 Trypsin immobilization assays

### 2.4.1 Effect of the immobilization method

Two methods for trypsin immobilization were evaluated: adsorption using biochar (BC), and covalent bonding using the functionalized biochar (BCF).

For both immobilization methods, an enzyme solution with an initial concentration of  $1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  in disodium phosphate buffer ( $0.2 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) at pH 8.0 was used. The pH value was chosen based on the optimum activity of trypsin and pHpcz of biochar. For that, 5.0 mL aliquots of the enzyme solution were added to tubes containing 0.05 g of each support and stirred (0.046 g) in an orbital shaker at room temperature ( $25 \text{ }^\circ\text{C}$ ). After 2 h, the tubes were centrifuged at 1500 g for 10 min, and the supernatant was collected for quantification of non-adsorbed proteins by the Bradford method (1976). Thereafter, successive washing cycles were performed to remove and quantify the non-immobilized enzymes. Washing was discontinued when the protein concentration values in the supernatant were zero. The biocatalysts were stored in buffer solution at  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  until analysis.

The immobilization capacity of the enzyme on each support was calculated by the difference between the initial and final protein concentrations, using Equation 1.

$$C_{Im} = \frac{V(C_{in} - C)}{m_s} \quad (1)$$

where:  $C_{Im}$  is the immobilization capacity ( $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ );  $V$  is the volume of solution (mL);  $C_{in}$  is the initial solution concentration ( $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ );  $C$  is the concentration of the solution ( $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) at equilibrium;  $m_s$  is the mass of the support (g).

### 2.4.2 Stability of the derivatives in high salt concentration

To confirm the stability of enzyme binding onto the support, the biocatalysts were incubated in  $0.2 \text{ mol L}^{-1}$  disodium phosphate buffer pH 8, and  $1.5 \text{ mol L}^{-1}$  NaCl. After 2 h, the supernatant was collected for protein quantification by the Bradford method (1976). The supernatant was also characterized by SDS-PAGE (HOEFER PS300B, Holliston, MA, USA).

### 2.4.3 Hydrolysis capacity of the enzyme by quantification of tyrosine equivalents

The hydrolysis capacity of the native and immobilized enzyme was determined according to the methodology described by Yu et al. (2014) with modifications, through the quantification of tyrosine equivalents release from caseins. For that, 1.5% w/v casein solution (goat, buffalo, and bovine) was used as the substrate for the enzyme, in disodium phosphate buffer pH 8 (0.2 mol/L) to determine the hydrolysis capacity of native protease. In a centrifuge tube, 5 ml of the substrate and 1 ml of enzyme solution was incubated at 37 °C for 30, 45, 60, 75, and 120 min. Thereafter, 2 ml of trichloroacetic acid (6.5% w/v) was added and the tubes were centrifuged at 4100 g for 6 min. After that, 1 mL of supernatant was sampled and mixed with a solution containing 5 mL of sodium carbonate (4% w/v) and 1 mL of Folin-Ciocalteu reagent (20% v/v). The mixture was maintained at 37 °C for 20 min, and the absorbance readings were performed at 660 nm in a spectrophotometer (UV-Vis Quimis, Diadema, SP, Brazil).

To determine the hydrolysis capacity of the immobilized enzyme, the methodology previously described was used, with minor modifications. For that, 5 mL of casein solution (1.5% w/v) was placed in centrifuge tubes containing 50 mg of the biocatalyst. The tubes were incubated at 37 °C for a predetermined hydrolysis time (30, 45, 60, 75, and 120 min), and then centrifuged at 1020 g for 3 min. Then, the supernatant was transferred to another centrifuge tube containing 2 mL of trichloroacetic acid (6.5% w/v), and centrifuged at 4100 g for 6 min. After that, 1 mL of the supernatant was mixed with 5 mL of sodium carbonate (4% w/v) and 1 mL of Folin-Ciocalteu reagent (20% v/v). The mixture was incubated at 37 °C for 20 min, and the absorbance readings were performed at 660 nm. One unit of protease activity was defined as the amount of enzyme required to liberate 100 µg of tyrosine equivalents.

### **2.4.3 Reuse of the biocatalysts**

After selecting the optimum hydrolysis time of the immobilized enzymes, cycles of reuse were performed to determine how many cycles the enzymes would maintain the hydrolysis capacity, using the methodology described in Section 2.4.3. After each cycle of hydrolysis, 5 ml of disodium phosphate buffer (0.2 mol.L<sup>-1</sup>) at pH 8.0 was added to the tubes containing the trypsin biocatalysts, which were stirred (0.046 g/5min) and centrifuged (1020 g/3 min) for removal of casein residues, thus leaving the biocatalysts suitable for use in a new hydrolysis event.

## 2.5 ACE inhibitory activity of casein hydrolysates

ACE-inhibitory activity was assessed by a spectrophotometric method, based on the work of Cushman and Cheung : each sample (40  $\mu\text{L}$ ) was incubated with 100  $\mu\text{L}$  of potassium phosphate buffer (0.1 mol L<sup>-1</sup>; pH 8.3), also containing NaCl (0.3 mol L<sup>-1</sup>) and hippuryl–histidyl–leucine (5 mM). 5 mU of ACE was added and the reaction mixture was incubated at 37 °C for 30 min in a thermostatic bath (Tecnal, TE-184, Brazil; precision  $\pm 0.1$  K). The reaction was stopped by adding 150  $\mu\text{L}$  of HCl (1 mol L<sup>-1</sup>). The hippuric acid formed was extracted with ethyl acetate (1000  $\mu\text{L}$ ). After removing the ethyl acetate by heat evaporation, hippuric acid was dissolved in distilled water (800  $\mu\text{L}$ ) and spectrophotometrically analyzed at 228 nm. The activity of each sample was tested in triplicate. Inhibitory activity (%IACE) was expressed in terms of percentage of reduction of the original ACE activity within the medium, as given by Equation 2.

$$\%IACE = \frac{A_{control} - A_{sample}}{A_{control} - A_{white}} \times 100\% \quad (2)$$

in which:  $A_{control}$  = absorbance of hippuric acid formed by ACE activity in the reaction media that did not contain casein hydrolysate (containing only trypsin);  $A_{sample}$  = absorbance of hippuric acid formed by ACE activity in the reaction media that contained casein hydrolysate and trypsin;  $A_{white}$  = absorbance of HHL (hippuryl–histidyl–leucine) reacted and extracted with ethyl acetate.

## 2.6 Statistical analysis

Data were analysed using the software SAS STUDIO, student version (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) to evaluate the effect of the biocatalysts in the hydrolysis of different casein sources at different times. The results were expressed as mean  $\pm$  standard deviation (SD), in triplicate. Means were compared by ANOVA and Tukey's honest significant difference test ( $P < 0.05$ ).

### 3. RESULTS AND DISCUSSION

#### 3.1 Characterization of the precursor material and supports

Caja seeds presented 42.27% of cellulose, 30.96% of lignin, 11.99% of hemicellulose (cellulose and lignin ratio of 1.37), and 1.96% ash. The low ash content, as well as the lignocellulosic fraction, makes this residue a precursor material with great potential for the preparation of the activated carbon, once it is known that the composition of the lignocellulosic material directly affects the porosity of biochar (BRITO et al., 2017).

The biochar yield was 34.42%, which is high when compared to the results found in the literature for other agroindustrial precursors, such as buriti with 22.32% (PINTO, SILVA & SARAIVA, 2013) and cocoa shells and siriguela seeds with 20% to 30% (PEREIRA et al., 2014). This result is due to the lignocellulosic composition of the precursor material, once materials with a close cellulose/lignin ratio can provide higher yields. In addition, according to Brito et al. (2017), the activation with phosphoric acid promotes the formation of phosphate ester bonds between the lignocellulosic biopolymers, forming a protective layer in the inner structure around the pores due to the presence of phosphate and polyphosphate esters. This event leads to the formation of a rigid matrix, which prevents excessive burning of the precursor and limits the loss of volatile matter during heating, thus resulting in a higher yield.

Regarding the ash content, the biochar presented 7.4%, which was higher than that found for the precursor material. The higher ash levels may be due to the formation of phosphate groups, originating from the chemical reactions between the precursor material and  $H_3PO_4$ , which was not effectively removed during the washing cycles. Lower ash contents in the precursor material give a favorable process yield, as observed in the biochar yield of this study. A content of 10% ash is the maximum acceptable value for carbonaceous supports, once higher values can negatively affect the adsorption process since they modify the interaction between the biochar surface and the species to be adsorbed (MAHAMAD et al., 2015).

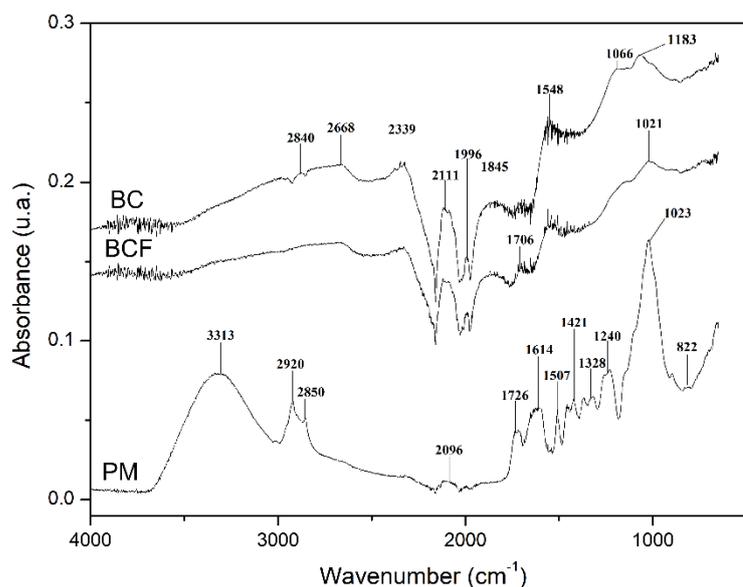
The surface charge of the synthesized carbons was evaluated by determining the point of zero charge (pH<sub>pzc</sub>). The pH<sub>pzc</sub> can be defined as the pH value at which the solid surface charge is zero. The samples BC and BCF showed zero charge at pH 5.2 and pH 5.5, respectively.

### 3.2 Fourier Transform Infrared Absorption Spectrophotometry (FTIR)

Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) was used to characterize the precursor material and the supports, aiming to evaluate the presence of functional groups. All spectra are shown in Figure 1.

As can be seen in the spectrum of the precursor material, the intense band at  $3313\text{ cm}^{-1}$  is attributed to the symmetrical and asymmetrical link stretches of the hydroxyl functional groups (-OH) belonging to the cellulose structure, the main lignocellulosic component of the precursor (PEREIRA et al. al., 2014). In addition, it is worth mentioning the band in the  $1023\text{ cm}^{-1}$  region, attributed to stretching of glycosidic linkage (C-O-C) present in cellulose and hemicellulose (MORETTI et al. 2014). The band in  $1240\text{ cm}^{-1}$ , and  $1600\text{ cm}^{-1}$  may be assigned to phenol (C-O) stretches, and the vibrations characteristic of carbonyl (C = O or / and C = C), respectively. Low intensity bands at  $2920\text{ cm}^{-1}$  and  $2850\text{ cm}^{-1}$  indicating aliphatic C-H strains ( $\text{CH}_2$  or  $\text{CH}_3$ ) of lignin.

**Figure 1.** FTIR of precursor material (PM), biochar (BC) and functionalized carbon (BCF).



After chemical activation and carbonization, there is a reduction of various peaks of greater intensity, characteristic of the lignocellulosic compounds ( $2920\text{ cm}^{-1}$  and  $2850\text{ cm}^{-1}$ ), and the appearance of bands referring to the functional groups of biochar. The bands at  $1845\text{ cm}^{-1}$  and  $1548\text{ cm}^{-1}$  can be attributed to stretching of C = O and C = C of the carbonaceous materials, while the bands at  $1175\text{ cm}^{-1}$  and  $1066\text{ cm}^{-1}$

<sup>1</sup>corresponded to the phosphate esters, due to the chemical activation with phosphoric acid (PRAHAS et al., 2008).

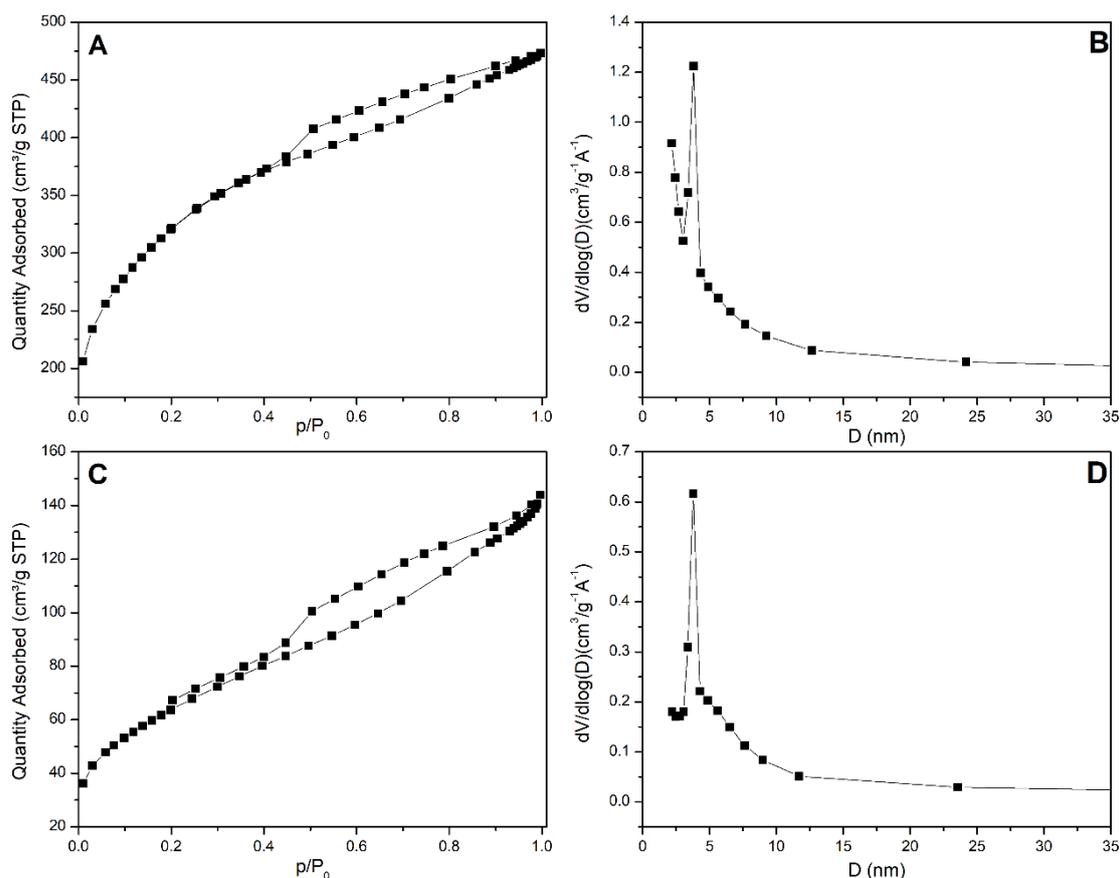
When comparing the spectra of both biochar (BC) and the functionalized biochar (BCF), a reduction of band intensity and a shift to lower wavelength was observed, which may be indicative of the chemical modification of the biochar surface by the glutaraldehyde (RAMANI et al., 2012).

### 3.3 Porosity and specific surface area

Figure 2 shows the nitrogen adsorption and desorption isotherms, and the pore size distribution of the supports. According to the IUPAC classification (1982), adsorption/desorption isotherms resemble those of type IV and represent porous solids with micro and mesopores. The nitrogen adsorption at low relative pressures evidences the formation of micropores, and the slope portion characterizes the filling of larger pores. The hysteresis cycle observed in the isotherms is due to the nitrogen capillary condensation in the mesopores (LIM; SRINIVASAKANNAN & BALASUBRAMANIAN, 2010; JAIN & TRIPATHI, 2014). The hysteresis curves are Type I, often associated with porous materials consisting of agglomerates of regular structure with a narrow pore size distribution, presenting a hysteresis curve closer to the adsorption curve.

The pore distribution can be seen in Figures 2b and 2d. A reduction of pore volume in the range of 0 to 5 nm was observed for the functionalized carbon when compared to the non-functionalized carbon. The BC showed a larger pore volume from 3 to 4 nm, with a tendency to form pores smaller than 2 nm, classifying the material as micro-mesoporous. In contrast, a reduction of pore volume was observed for BCF, when compared to BC, with no formation of micropores. This result was probably due to the pore obstruction by the insertion of aminoaldehyde spacer arms (Am-Al) after functionalization, leading to a reduction in the carbon surface area.

**Figure 2.** Nitrogen adsorption/desorption isotherms and pore distribution of biochar (A and B) and functionalized carbon (C and D).



The results of the textural properties of the supports are shown in Table 1, with differences in the pore distribution and surface area of both biochar (BC) and functionalized biochar (BCF). The BCF presented a lower surface area, micropore and mesopore volume, and higher pore diameter when compared to BC, due to the insertion of spacing arms into the pores of the material during functionalization, obstructing the micropores and some mesopores, leading to a marked reduction of surface area and pore volume. The slight increase in pore diameter was probably due to the obstruction of the smaller pores, leading to a narrower pore distribution (Figure 2d).

**Table 1.** Textural properties of biochar (BC) and functionalized carbon (BCF) determined by  $N_2$  adsorption/desorption

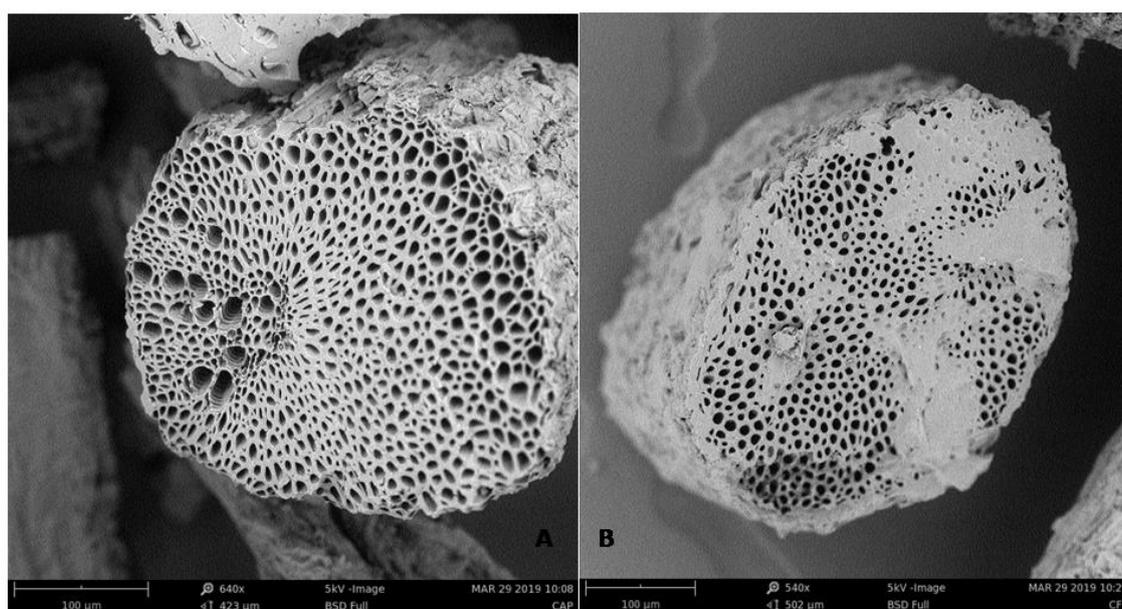
Sample	$S_g$ ( $m^2/g$ ) <sup>a</sup>	$D_p$ (nm) <sup>b</sup>	$V_{meso}$ ( $cm^3/g$ ) <sup>c</sup>	$V_{micro}$ ( $cm^3/g$ ) <sup>d</sup>
BC	1147	3,69	0,388	0,1030
BCF	232	4,43	0,172	0,0000

<sup>a</sup> Specific surface area. <sup>b</sup> Maximum pore size distribution. <sup>c</sup> micropore volume. <sup>d</sup> mesopore volume.

### 3.4 Scanning Electron Microscopy (SEM)

Figures 3a and 3b show the scanning electron microscopy of the support surface before and after functionalization with glutaraldehyde, respectively. A well developed porous structure that extends to the inside of the material was observed on the surface of BC, with access channels to the micropores and mesopores, which may favor the adsorption processes. The BCF surface showed a pore reduction due to the pore obstruction by the insertion of spacer arms, as evidenced in the analysis of the surface area. Slit-shaped pores were also observed, which led to an increase in pore diameter. This phenomenon also led to a reduction of the surface area and pore volume of BCF due to restricting access to the inner channels of the material.

**Figure 3.** Scanning Electron Micrographs (SEM) of biochar (a) and functionalized carbon (b).



### 3.5 Immobilization of trypsin on biochar before and after functionalization

After trypsin immobilization on biochar by adsorption and covalent binding, using the functionalized biochar, the unbound enzymes were removed by successive washes, thus demonstrating the efficiency of the immobilization process, mainly by covalent binding, once less washing steps were required. This behavior is associated with the forces involved in the binding between the enzyme and the support. A high immobilization capacity (Table 2) was observed for both supports. Other studies have

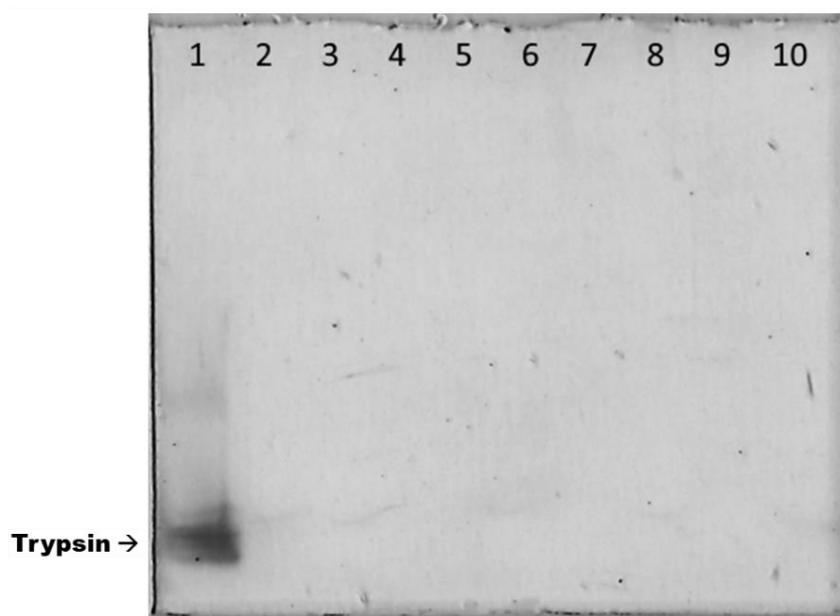
observed similar behavior when using enzyme immobilization by adsorption and covalent bonding. Vescosi et al. (2017) immobilized lipases from *Thermomyces lanuginosus* (TLL) and *Pseudomonas fluorescens* (PFL) on functionalized silica particles, with adsorptive capacity above 90%. Santos et al. (2019), studying the immobilization of pepsin in activated and functionalized carbon also obtained adsorptive capacity above 90% for both methods.

**Table 2.** Immobilization Capacity ( $C_{Im}$ ) and Efficiency of Trypsin Immobilization (Efic) by adsorption (BC) and covalent binding (BCF).

Sample	$C_{Im}$ (mg/g)	Efic (%)
BC	87.54 ± 0.41	91.42%
BCF	91.02 ± 1.04	92.00%

The results of Bradford analyses of the supernatants in the stability tests were null, indicating no enzyme desorption, and the electrophoretic analysis (Figure 4) showed only a band corresponding to the trypsin pattern (Lane 1). These results confirm that the enzymes were immobilized on the supports by strong interactions, such as covalent bonds and/or interactions between ions.

**Figure 4.** SDS-PAGE of the solution obtained after the test of derivatives stability in high salt concentration. Trypsin in native form: Lane 1; solution obtained using BCF: lanes 3 and 4; solution obtained using BC: lanes 6 and 7.



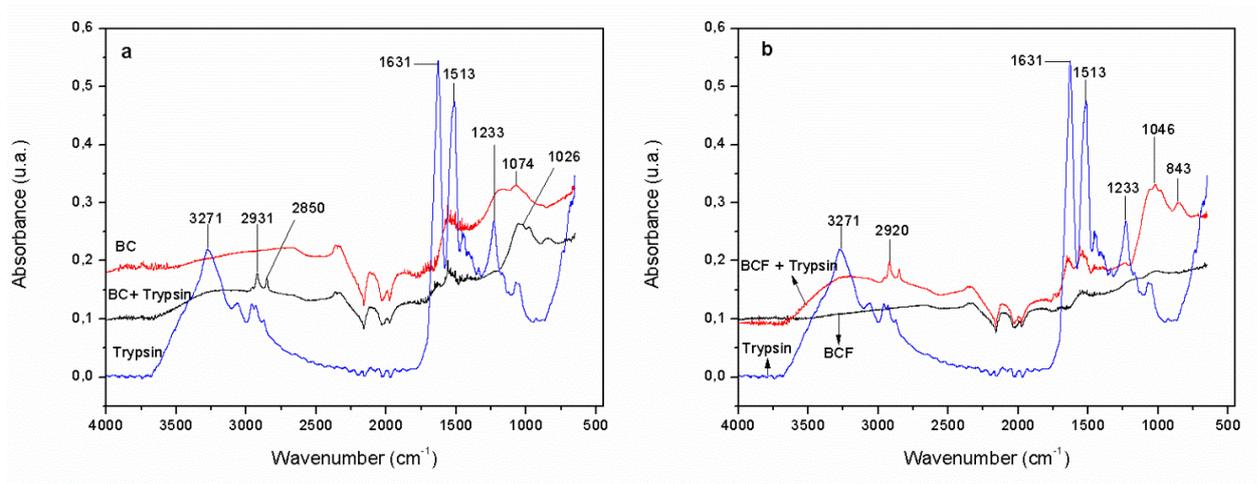
The high efficiency and immobilization capacity observed for the adsorption method is related to several factors including the porosity, pore diameter, high surface area, and the presence of functional groups on the biochar surface. In the immobilization by adsorption, there are physical interactions between biochar and the enzyme, which include van der Waals forces, ionic interactions, and hydrogen bonding, which leaves the structure of the enzymes intact and allows the retention of activity, besides facilitating the transport of the substrates to the active center of the enzyme.

Trypsin was irreversibly immobilized on the functionalized biochar by covalent binding with glutaraldehyde, with high immobilization efficiency. Glutaraldehyde acted as an amino-linker arm, reacting with amine groups present on both the surface of the support and trypsin, thereby attaching trypsin on the surface of the functionalized material through covalent bonds, which are very stable and irreversible (SUN et al., 2017). This behavior was observed in other studies. Jain et al. (2016) has been investigated in this study covalent immobilization of horseradish peroxidase (HRP) on surface-modified mesoporous activated carbon (SMAC) in combination with supercritical carbon dioxide (scCO<sub>2</sub>). The supercritical medium achieved higher enzyme loading of 83.5%. Rocha et al. (2011) immobilized trypsin onto spent grain or modified spent grain, through adsorption and covalent attachment. The efficiency of immobilization and operation and storage stabilities of free and immobilized enzyme on the supports were studied. The best activity retention was achieved with the immobilization on spent grains through multipoint covalent attachment using glycidol. This carrier showed also very good storage and operational stability (above 90%).

Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) was also used to evaluate the immobilization of trypsin on the supports (Figure 5). Bands characteristic of functional groups of the native trypsin were observed at 3271 cm<sup>-1</sup> assigned to hydroxyl (OH); the bands at 2920 cm<sup>-1</sup> corresponded to hydrogen carbon groups (CH-CH<sub>2</sub>); bands at 1631 cm<sup>-1</sup> corresponded to amine group (NH<sub>2</sub>), bands at 1513 cm<sup>-1</sup> referred to aromatic ring and amine groups, and finally those at 1233 cm<sup>-1</sup> assigned to CCH. After immobilization of the enzyme onto biochar (Figure 5a), bands at 2850 cm<sup>-1</sup> and 1026 cm<sup>-1</sup> were observed, corresponding to the C-H bonds and amine and ester groups. In the functionalized biochar (Figure 5b), the bands at 2920 cm<sup>-1</sup> and 1631 cm<sup>-1</sup> were attributed to the amine group (NH<sub>2</sub>); bands at 1513 cm<sup>-1</sup> corresponded to the aromatic ring and amine groups; bands at 1046 cm<sup>-1</sup> corresponded to amine group and ester, and

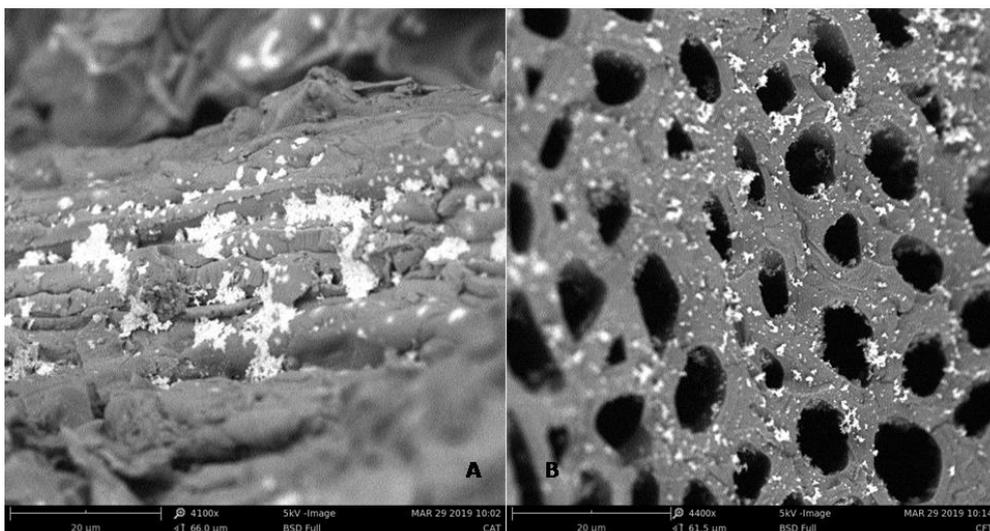
the bands at  $843\text{ cm}^{-1}$  were related to C-N-C. When compared with the spectra of the immobilized enzymes, little peak intensity was observed for the immobilization by adsorption, once the enzyme was adsorbed mainly into the pores.

**Figure 5.** FTIR of Trypsin, biochar (BC), and Trypsin immobilized on biochar (a) Trypsin, functionalized carbon (BCF) and Trypsin immobilized on functionalized carbon (BCF) (b).



After enzyme immobilization, the formation of protein aggregates was observed in the access to the inner pores of BC (Figure 6a), confirming the presence of the immobilized enzyme. For BCF (Figure 6b), it is possible to observe bound enzymes on the surface, due to the presence of spacer arms providing the covalent bonding

**Figure 6.** Scanning Electron Micrographs (SEM) of trypsin adsorbed on biochar (a) and immobilized on functionalized carbon (b).



### 3.6 Hydrolysis capacity of trypsin in caseins from different sources

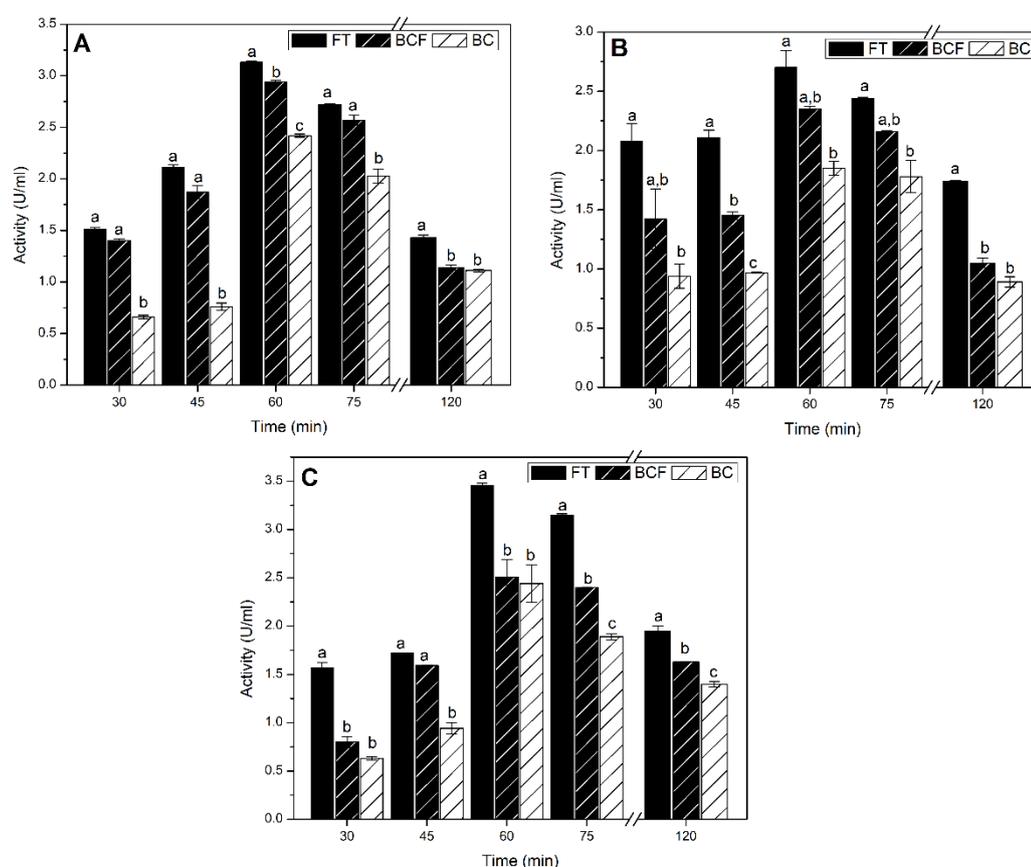
The possibility to reuse the enzyme is one of the major advantages of immobilization. The hydrolysis (specific activity) of trypsin in native and immobilized form at different times (30, 45, 60, 75 and 120 minutes) for all sources of casein (goat, buffalo, and bovine) on the carbonaceous supports can be seen in Figure 7.

The enzyme in native form showed a higher hydrolysis capacity for all periods evaluated, with a greater hydrolysis capacity at 60 min. The support and the enzyme are not complementary and soon after the first bond between them, the enzyme loses flexibility, diminishing the conformational effects. When the enzyme is in solution, it behaves like any other molecule dispersed in the medium and has complete freedom of movement and access to the substrate, which is not possible when this enzyme is immobilized on a physical medium.

Concerning the immobilized enzymes, an increase in hydrolysis capacity was observed at 45, 60, 75 and 120 minutes when compared to 30 minutes, with a maximum capacity at 60 min, for caseins from different sources. No significant differences were observed in the hydrolysis capacity of the immobilized enzymes in BCF at 60 minutes when compared to the native enzyme, for goat and bovine casein. When the enzyme is immobilized, the substrate must be transferred (by convection and/or diffusion) from the solution to the catalytic sites, thus passing through a stationary liquid film surrounding the surface of the support; in the case of porous matrices, the substrate must diffuse in the pores until reaching the active site of the enzyme. As a consequence, the diffusion mechanisms will govern the mass transfer. This is due to difficulty of substrate access to the active site of the enzyme due to the way the enzyme is bound to the support. Regarding the observed reaction kinetics of the immobilized enzyme may not be governed only by interactions between enzyme and substrate but may also be limited by the rate of substrate diffusion to the support surface or internally between the support pores. In this case the actual substrate concentration that is in equilibrium with the immobilized enzyme (heterogeneous system) is lower than what would have been the case if reagent and biocatalyst were soluble (homogeneous system). As a result, the rate of immobilized enzyme reaction (actual, apparent or observed velocity) is lower than that obtained for the same bulk reagent concentration (SIRISHA et al., 2016). Thus, the

increase in the time of contact of the substrate with the biocatalyst leads to an increase in hydrolysis rate.

**Figure 7.**Hydrolysis capacity of casein for Trypsin in the native form (FT) and immobilized by adsorption (BC) or by covalent binding (BCF) as a function of time, (A) Goat Casein; (B) Bovine Casein; (C) Buffalo Casein. Means followed by the same letter for each time interval did not differ significantly between them at  $p < 0.05$  by the Tukey's test.



The immobilization of enzymes by covalent binding showed a better hydrolysis capacity for all caseins when compared to the immobilization by adsorption. This behavior is due to the enzymes immobilized on the functionalized carbon are on the surface of the support, bound by spacer arms, leaving the catalytic site more exposed, thus facilitating its access to the substrate. In the immobilization by adsorption, the enzymes are on the surface and confined within the pores, thus making the contact with the substrate molecules difficult. A reduction and stabilization of the hydrolysis capacity were observed at 75 minutes when compared to the findings at 60 min, probably due to a molecular rearrangement of the free amino acids, once the hydrolysis

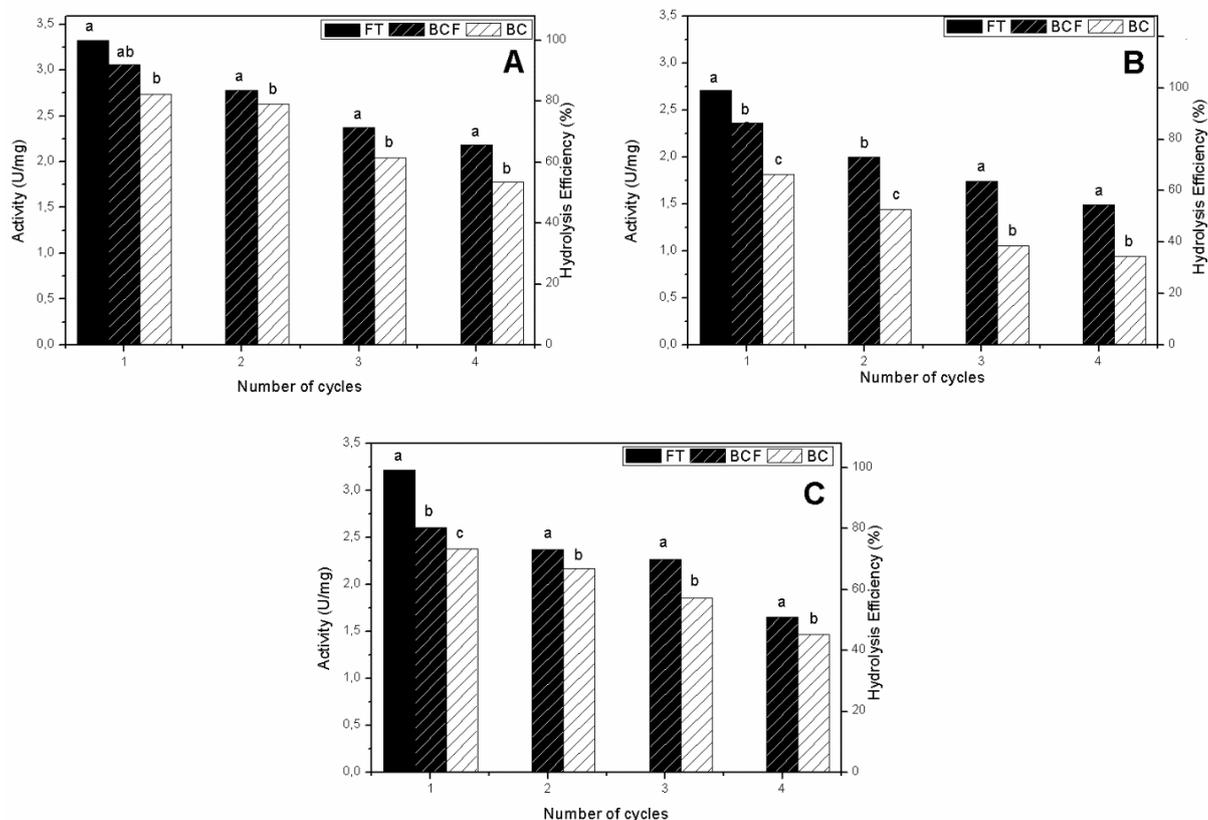
capacity is determined by the amount of tyrosine equivalents released. This behavior was evidenced in the hydrolysis of goat, buffalo, and bovine caseins for both the immobilized enzymes and enzymes in solution.

When comparing the hydrolysis capacity of the immobilized enzymes and the type of casein employed (Figure 7), a lower hydrolysis capacity was observed for the native enzyme, with no significant differences up to 60 min for bovine and buffalo caseins, whereas a significant difference was observed for goat casein. At 60 min, values close to those found for the native enzyme were observed for BC and BCF, especially for goat and bovine caseins, with no significant differences between them. At 75 min, no significant difference was observed between the native and immobilized enzyme by covalent binding for goat and bovine caseins, which potentiated the hydrolysis capacity, even with a lower number of active enzymes. Goat casein presented higher hydrolysis capacity when compared to buffalo and bovine caseins for all the periods studied. Although the chemical composition of goat casein is similar to cow milk and buffalo milk, goat milk exhibits greater digestibility, ie higher degree of hydrolysis, which is related to the smaller size and molecular arrangement of casein micelles. (ALBENZIO & SANTILLO, 2011).

The results of the specific activity for the 4 cycles of reuse at 60 minutes are shown in Figure 8. A small reduction of the hydrolysis capacity was observed for all biocatalysts. The BCF showed a total activity close to that of the native enzyme after one cycle of reuse, with no significant differences, whereas two cycles were required for the BC, showing the viability of the enzyme in the immobilized form.

The enzyme immobilized by covalent binding showed lower reduction in activity and hydrolysis efficiency when compared to the enzyme immobilized by adsorption, for all the conditions studied, this behavior can be observed in the figure 8. In the first cycle of use, the hydrolysis efficiencies of the biocatalysts BCF and BC were 97% and 95% for goat casein, 92% and 87% for buffalo casein, and 90% and 70% for bovine casein, respectively, which reduced to 62% and 50%, 79% and 58%, and 50% and 40%, concerning the enzyme in solution, in the last cycle of use, respectively. The possibility of reuse of use biocatalyst for 4 cycles can compensate the production costs of the immobilized enzyme.

**Figure 8.**Hydrolysis capacity for the cycles of reuse of Trypsin immobilized by adsorption (BC) and by covalent binding (BCF) at 60 min (A) Goat Casein; (B) Bovine Casein; (C) Buffalo Casein.



### 3.7 ACE inhibition percentage of goat casein hydrolysate

The literature describes the production of casein enzymatic hydrolysates with angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitory activity close to 70% with hydrolysis time from 2 hours, when proteolytic enzymes such as pepsin and trypsin were used for protein hydrolysis (PIHLANTO-LEPPALA et al., 1998; CONTRERAS et al., 2009; SOUZA JÚNIOR et al., 2014; IBRAHIM et al., 2017). Thus, ACE inhibitory activity was determined for goat casein-derived hydrolysates with fractions collected 2 hours after the start of hydrolysis using pepsin and trypsin in their free form and immobilized on functionalized biochar.

In vitro ACE inhibition activities of approximately 95% have been reported by Ibrahim et al. (2017) studying the hydrolysis of goat casein with proteolytic enzyme in its free form. The results of inhibitory activity in this study ranged from 93.5% and 25.5% for trypsin in its free form and immobilized on functionalized activated carbon,

respectively, under the same reaction conditions. It is important to note that this difference in ACE inhibition may correspond to the amount and type of peptide generated in hydrolysis and, since the hydrolytic capacity of the free enzyme is greater than that of the immobilized enzyme. To test this, complete purification and identification of the peptides would be required. However, it was beyond the specific objective of the present work, which aimed to evaluate the hydrolytic capacity of free enzymes compared to that immobilized on covalently bonded activated carbon in casein hydrolysis, and to test for the existence of the anti-hypertension of the obtained hydrolysates. ACE inhibition values for immobilized enzymes, although lower than free enzymes, show an advantage due to the possibility of reuse of the biocatalyst.

#### **4. CONCLUSIONS**

Caja seeds have the potential to be used as a carbon precursor material for the production of biochar, once it presented a high surface area and pore diameter in the mesopore range. The functionalization of biochar using glutaraldehyde led to the modification of the carbon surface by the insertion of amine-aldehyde groups.

Both immobilization methods were effective, presenting high immobilization capacity. The proteolytic activity of trypsin immobilized by covalent binding was greater than that of the enzyme immobilized by adsorption. Thus, the functionalized biochar can be considered as potential support for enzyme immobilization, and the biocatalyst obtained can be reused for more than 4 cycles, with a potential application in a wide range of industrial processes.

Goat casein presented higher values of hydrolytic capacity when compared to buffalo and bovine caseins, it is supposed to be due to its higher digestibility. Thus, goat casein hydrolysates were obtained, capable of inhibiting ACE activity *in vitro* by trypsin catalyzed hydrolysis in its free form and immobilized on functionalized carbon on goat casein for 2 h. Despite lower ACE inhibition values for immobilized enzymes compared to free enzymes, biocatalysts show advantage due to the possibility of reuse.

## 5. REFERENCES

- ABUSSAUD, B. et al. Sorption of phenol from waters on activated carbon impregnated with iron oxide, aluminum oxide, and titanium oxide. **Journal of Molecular Liquids**, Bremen, v. 213, p. 351–359, Jan. 2016.
- ATACAN, A. K., ÇAKIROGLU, B., ÖZACAR, M., Covalent immobilization of trypsin onto modified magnetite nanoparticles and its application for casein digestion, **International Journal of Biological Macromolecules** 97, 148–155, 2017.
- ALBENZIO, M., SANTILLO, A., Biochemical characteristics of ewe and goat milk: Effect on the quality of dairy products, **Small Ruminant Research** 101, 33–40, 2011.
- BILAL, M. et al. Development of horseradish peroxidase-based cross-linked enzyme aggregates and their environmental exploitation for bioremediation purposes. **Journal of Environmental Management**, DeLand, v. 188, p. 137–143, March 2017.
- BRITO, M.J.P., VELOSO, C.M., BONOMO, R.C.F., FONTAN, R. DA C.I., SANTOS, L.S. and MONTEIRO, K.A. Activated carbons preparation from yellow mombin fruit stones for lipase immobilization, **Fuel Processing Technology**. V. 156, P. 421–428, 2017.
- BRADFORD MM, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem** 72:248–254 1976.
- BERNAL, C., GUZMAN, F., ILLANES, A., WILSON, L., Selective and eco-friendly synthesis of lipoaminoacid-based surfactants for food, using immobilized lipase and protease biocatalysts *Food Chem.*, 239, 189–195, (2018).
- BERNAL, C., RAMIREZ, F., POVEDA-JARAMILLO, J.C., MESA, M., New non-covalent functionalized phenyl-methyl-silica for biomolecules immobilization: experimental and theoretical insights of interactions *Microporous Mesoporous Mater.*, 242, 152–159, (2017).
- CUSHMAN, D. W., & CHEUNG, H. S. Spectrophotometric assay and properties of the angiotensin I converting enzyme of rabbit lung. **Biochemical Pharmacology**, 20(7), 1637–1648, 1971.
- CHENG, M., CHEN, Z., Recent advances in screening of enzymes inhibitors based on capillary electrophoresis *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 8, 226–233, (2018).

- CHOI, J. M., HAN, S.S., KIM, H.S., Industrial applications of enzyme biocatalysis: Current status and future aspects, *Biotechnology Advances* 33, 1443–1454, (2015).
- CONTRERAS, M. M., CARRÓN, R., MONTERO, M. J., RAMOS, M., RECIO, I. Novel casein-derived peptides with antihypertensive activity. *International Dairy Journal*, 19, 566-573, 2009.
- EGITO, A. S.; ROSINHA, G. M. S.; LAGUNA, L. E.; MICLO, L.; GIRARDER, J. M.; GAILLARD, J. L. Método eletroforético para detecção da adulteração do leite caprino com leite bovino. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 58, n. 5, p. 932- 939 2006.
- ESPEJO-CARPIO, F. J., GARCÍA-MORENO, P. J., PÉREZ-GÁLVEZ, R., MORALES-MEDINA, R., GUADIX, A., GUADIX, E. M., Effect of digestive enzymes on the bioactive properties of goat milk protein hydrolysates, *International Dairy Journal* 54, 21-28, (2016).
- HOMAEI, A.A.; SARIRI, R.; VIANELLO, F.; STEVANATO, R. Enzyme immobilization: An update. *J. Chem. Biol.* **2013**, 6, 185–205.
- IBRAHIM, H. R., AHMED, A. S., & MIYATA, T. Novel angiotensin-converting enzyme inhibitory peptides from caseins and whey proteins of goat milk. **Journal of Advanced Research**, 8(1), 63–71, 2017.
- JAIN, A.; TRIPATHI, S.K. Fabrication and characterization of energy storing supercapacitor devices using coconut shell based activated charcoal electrode. **Materials Science and Engineering B**, v.183, p.54–60, 2014.
- JAIN, A., ONG, V., JAYARAMAN, S., BALASUBRAMANIAN, R., SRINIVASAN, M. P., Supercritical fluid immobilization of horseradish peroxidase on high surface area mesoporous activated carbon, *J. of Supercritical Fluids* 107 513–518 (2016).
- LIM, W.C.; SRINIVASAKANNAN, C.; BALASUBRAMANIAN, N. Activation of palm shells by phosphoric acid impregnation for high yielding activated carbon. **Journal of Analytical and Applied Pyrolysis**, v. 88, p.181–186, 2010.
- LIU, C., SAEKI, D., MATSUYAMA, H., A novel strategy to immobilize enzymes on microporous membranes via dicarboxylic acid halides, *RSC Adv.*, 7, 48199–48207, 2017.

MOHAMAD, N. R. et al. An overview of technologies for immobilization of enzymes and surface analysis techniques for immobilized enzymes. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, London, v. 29, n. 2, p. 205-220, Feb. 2015.

MORETTI, M.M.S.; BOCCHINI-MARTINS, D.A.; NUNES, C.C.C.; VILLENA, M.A.; PERRONE, O.M.; SILVA, R.; BOSCOLO, M.; GOMES, E. Pretreatment of sugarcane bagasse with microwaves irradiation and its effects on the structure and on enzymatic hydrolysis. **Applied Energy**.v.122, p.189 -195, 2014.

RUEDA, N. et al. Chemical Modification in the Design of Immobilized Enzyme Biocatalysts: Drawbacks and Opportunities. **The Chemical Record**, Chicago, v. 16, n. 3, p. 1436-1455, June 2016.

SUN, J., XU, B., SHI, Y., YANG, L., MA, H., L., “Activity and Stability of Trypsin Immobilized onto Chitosan Magnetic Nanoparticles,” *Advances in Materials Science and Engineering*, vol. 2017, Article ID 1457072, p:10, 2017.

PEREIRA, R. G., VELOSO, C. M., DA SILVA, N. M., DE SOUSA, L. F., BONOMO, R. C. F., DE SOUZA, A. O., DA GUARDA, M. O & FONTAN, R. D. C. I. Preparation of activated carbons from cocoa shells and siriguela seeds using H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> and ZnCl<sub>2</sub> as activating agents for BSA and  $\alpha$ -lactalbumin adsorption. **Fuel Processing Technology**, 126, 476-486. 2014.

PIHLANTO-LEPPA, A., ROKKA, T., KORHONEN, H., Angiotensin I Converting Enzyme Inhibitory Peptides Derived from Bovine Milk Proteins, **Int. Dairy Journal** 8 1998.

PINTO, M. V. D. S., SILVA, D. L. D., & SARAIVA, A. C. F. Production and characterization of the activated carbon from buriti stone (*Mauritia flexuosa* L. f.) to evaluate the adsorption's process of copper (II). **Acta Amazonica**, 43(1), 73-80, 2013.

PRAHAS, D.; KARTIKA, Y.; INDRASWATI, N.; ISMADJI, S. Activated carbon from Jack fruit peel waste by H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> chemical activation: pore structure and surface chemistry characterization. **Chem. Eng. J**, v.140, p.32–42, 2008.

RAMANI, K.; KARTHIKEYAN, S.; BOOPATHY, R.; KENNEDY, L.; MANDAL, A.B.; SEKARAN, G. Mesoporous activated carbon surface functionalized for the immobilization of lipase and its application acidic hydrolysis waste oil prepared: Isotherm and kinetic studies. **Process Biochemistry**.v.47, p.435-445, 2012.

REGALBUTO, J. R.; ROBLES, J. **The engineering of Pt/Carbon Catalyst Preparation**, University of Illinois: Chicago, 2004.

ROCHA, C., GONÇALVES, M. P., TEIXEIRA, J. A., Immobilization of trypsin on spent grains for whey protein hydrolysis, *Process Biochemistry* 46 505–511, 2011.

SANTOS, M. P. F., BRITO, M. J. P., JUNIOR, E. C.S., BONOMO, R. C.F., VELOSO, C. M., Pepsin immobilization on biochar by adsorption and covalent binding, and its application for hydrolysis of bovine casein, **J Chem Technol Biotechnol**; **94**: 1982–1990, 2019.

SIRISHA, V.L; ANKITA JAIN; AMITA JAIN. Enzyme Immobilization: Na Overview on Methods, Support Material, and Applications of Immobilized Enzymes. *Advances in Food and Nutrition Research*. 2016.

SOUZA JÚNIOR, E. C., COIMBRA, J. S. D. R., DE OLIVEIRA, E. B., & BONOMO, R. C. F. Recovery of casein-derived peptides with in vitro inhibitory activity of angiotensin converting enzyme (ACE) using aqueous two-phase systems. **Journal of Chromatography B**, 973, 84–88, 2014.

SUN, J., YANG, L., JIANG, M., SHIA, Y., XUA, B., MAA, H., Stability and activity of immobilized trypsin on carboxymethyl chitosan functionalized magnetic nanoparticles cross-linked with carbodiimide and glutaraldehyde, **Journal of Chromatography B**, 1054, 57–63, 2017.

VAN SOEST, P.J., ROBERTSON, J.B., LEWIS, B.A., Symposium: carbohydrate methodology, metabolism, and nutritional implications in dairy cattle. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition, *Journal of Dairy Science* 74 3583-3597, 1991.

VESCOVI, V., GIORDANO, R.L., MENDES, A.A., TARDIOLI, P.W., Immobilized lipases on functionalized silica particles as potential biocatalysts for the synthesis of fructose oleate in an organic solvent/water system. **Molecules** 22, 212, 2017.

YU ZL, ZENG WC, ZHANG WH, LIAO XP and SHI B, Effect of ultrasound on the activity and conformation of  $\alpha$ -amylase, papain and pepsin. **Ultrason Sonochem** 21:930–936 2014.

### **CAPÍTULO 3**

---

#### **Artigo 2: Produção de peptídeos com atividade anti-hipertensiva a partir da hidrólise de caseínas com protease imobilizada**

---

\*Este artigo será submetido a revista XXXXX (INSS:XXX), classificação A1 (área-Ciência de Alimentos), Qualis-Capes 2013-2016, fator de impacto: XX.

## 1. INTRODUÇÃO

As caseínas são as principais proteínas do leite (das quais existem três classes principais:  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\kappa$ ) e se agrupam em estruturas supramoleculares da ordem de 100 nm de tamanho. Eles são chamados de 'micelas de caseína, embora sua estrutura interna seja mais complicada do que uma micela convencional (INGHAM et al., 2018). O leite de diferentes espécies contém caseína, com pequenas variações nas sequências de aminoácidos e nas proporções relativas das diferentes caseínas. O tamanho médio da micela, que geralmente está relacionado com a quantidade de  $\kappa$ -caseína presente na mesma, também pode variar significativamente de uma espécie para outra, sendo as micelas obtidas do leite de cabra consideravelmente maiores, em média, do que as de vaca ou búfala (INGHAM et al., 2018). Dentro das espécies, também pode haver variações nas proporções de caseína e tamanhos das micelas. Alguns peptídeos bioativos derivados da caseína, através da hidrólise com enzimas digestivas ou proteolíticas como: pepsina, tripsina e papaína, têm sido apresentados como potenciais agentes anti-hipertensivos (JIANG et al., 2007; SOUZA JÚNIOR et al., 2014; CONTRERAS et al., 2011; IBRAHIM et al., 2017).

Os peptídeos bioativos são derivados de proteínas alimentares e exercem um efeito positivo em humanos devido às suas propriedades promotoras de saúde. Os peptídeos bioativos podem exercer vários efeitos benéficos, como prevenir doenças ou modular os sistemas fisiológicos, uma vez absorvidos no corpo humano (TOLDRA et al., 2018). O emprego de peptídeos inibidores da ECA (enzima conversora da angiotensina) tem despertado o interesse de muitos pesquisadores, pois há evidências que a ingestão desses peptídeos, presentes em alimentos formulados, possa auxiliar na prevenção e no tratamento não medicamentoso da hipertensão (OLIVEIRA et al., 2018). A ECA é uma enzima multifuncional que exerce importante papel na regulação da pressão sanguínea pela transformação da forma inativa do decapeptídeo angiotensina I, em um potente vasoconstritor, octapeptídeo angiotensina II, e pela inativação catalítica da bradicinina, a qual tem ação depressora (DASKAYA-DIKMEN et al., 2017). Os peptídeos são ativos uma vez liberados por hidrólise enzimática por peptidases durante o processamento de alimentos e/ou durante a digestão gastrointestinal.

As peptidases, peptídeo hidrolases ou proteases são enzimas hidrolíticas que clivam ligações peptídicas nas proteínas e fragmentos de proteínas. A pepsina (EC 3.4.23.1) é

uma das principais enzimas do sistema digestivo do grupo das proteases aspárticas. Como endopeptidase, a pepsina decompõe a maioria das proteínas e peptídeos em oligopeptídeos, e tem atividade de coagulação do leite, bem como produção de peptídeos bioativos. Especialmente na última aplicação prática da pepsina, a imobilização é um pré-requisito que permite aumentar a estabilidade dos biocatalisadores a fim de obter maior lucratividade (SZALAPATA et al., 2016).

A imobilização de enzimas em suportes sólidos é uma estratégia potencial para o aumento da estabilidade do biocatalisador, permite seu reuso e uma fácil separação dos produtos finais, minimizando ou eliminando a contaminação do biocatalisador. Isso significa que a imobilização não é uma etapa adicional na biocatálise, mas sim um passo necessário (RUEDA et al., 2016; BILAL et al., 2017). Os diferentes métodos de imobilização exploram o fato de que as proteínas possuem vários aminoácidos com características distintas, nos quais seus grupos funcionais das cadeias laterais podem estar diretamente envolvidos nas ligações e interações com o suporte. Sendo os métodos por adsorção e formação de ligações covalentes os mais utilizados (MOHAMAD et al., 2015; ATACAN et al., 2016).

Atualmente muitos estudos vêm sendo direcionados para a produção de matrizes para serem empregados na imobilização de enzimas (GAO et al., 2018; JOSHI et al., 2019; ZHONG et al., 2019). Como exemplo, tem-se o carvão ativado (CA), que tem se destacado como suporte para imobilização enzimática, no entanto seu uso para imobilização de proteases (pepsina) ainda é pouco explorado (DHAWANE et al., 2018; SANTOS et al., 2019). O carvão ativado é um material carbonáceo caracterizados por possuir uma elevada área superficial, porosidade altamente desenvolvida, elevada estabilidade química, e vários grupos funcionais sobre a superfície, características essas que favorecem o processo de imobilização (LACERDA et al., 2015; GONZÁLEZ-GARCÍA, 2018).

Diante do exposto, este trabalho teve como objetivo investigar a atividade inibidora da ECA (*in vitro*) de hidrolisados de diferentes fontes de caseína, obtidos pela utilização da pepsina na sua forma livre e imobilizada em carvão ativado e funcionalizado.

## **2. METODOLOGIA**

## 2.1 Obtenção das caseínas

As caseínas do leite de cabra e búfala foram obtidas segundo metodologia utilizada por Egito et al. (2006). Amostras de leite, após coletadas, foram imediatamente acondicionadas e mantidas a  $-20^{\circ}\text{C}$  até o momento do uso. O leite foi desnatado por centrifugação (Centrífuga MPW-350) a 2100 g por 30 min a  $32^{\circ}\text{C}$ . A caseína total foi preparada mediante precipitação isoelétrica em pH 4,6 com solução  $1\text{ mol.L}^{-1}$  de HCl, sendo o precipitado obtido pela centrifugação (Centrífuga MPW-350) a 1100 g por 20 min a  $32^{\circ}\text{C}$ . O precipitado de caseína foi solubilizado em pH 7,0, com solução de  $1\text{ mol.L}^{-1}$  de NaOH e dialisado com água deionizada a  $4^{\circ}\text{C}$ . As soluções de caseína foram liofilizadas e estocada a  $4^{\circ}\text{C}$ . A caseína bovina foi obtida da Sigma (pureza mínima de 90%, Sigma, EUA).

## 2.2 Síntese e funcionalização do carvão ativado

Os caroços de cajá foram lavados em água corrente, secas em estufa a  $105^{\circ}\text{C}$  por 24 h, triturados em moinho e peneirados em uma peneira de  $420\ \mu\text{m}$ . O material particulado (precursor de carbono) apresentou em sua composição mássica (base seca) 1,96 % de cinzas, 30,96 % de lignina, 42,27 % de celulose 11,99 % de hemicelulose.

O precursor de carbono foi impregnado com ácido fosfórico (Synth, 85% m/m) na razão mássica de impregnação 3:1 (massa de ativante/massa do precursor) e seco em estufa (TECNAL, modelo: 393-1) a  $105^{\circ}\text{C}$  por 24 h. Em seguida o material foi carbonizado em forno mufla (EDG 3P-S, modelo 3000), sob fluxo de nitrogênio ( $50\text{ mL min}^{-1}$ ) com taxa de aquecimento de  $5^{\circ}\text{C min}^{-1}$ , até a temperatura final de  $500^{\circ}\text{C}$ , mantida constante por 60 min. O carvão ativado (CA) obtido foi lavado com água quente até que o pH 7,0 do filtrado fosse alcançado. Em seguida, foi seco em estufa a  $105^{\circ}\text{C}$  por 24 h e peneirados em uma peneira de  $420\ \mu\text{m}$ .

A modificação da superfície foi feita utilizando o método do glutaraldeído (Ramani et al., 2012). Primeiramente foi preparada uma solução de amina (2,5% v/v) através da mistura de 0,85 mL de etilenodiamina (99 % P.S - CAS: 107-15-3) em 32,5 mL de acetona (P.A - CAS: 67-64-1). Após o preparo foram adicionados 10,0 g do AC seco a solução, deixando a mistura sob agitação por 10 min para obter AC amino funcionalizado. Em seguida o AC amino funcionalizado foi ativado com o grupo aldeído por adição de glutaraldeído, de modo a facilitar a imobilização de enzima

através de formação de ligações covalente. A solução de aldeído foi preparada por mistura de 33,5 mL de glutaraldeído (25%, P.S – CAS: 111-30-8) em 33,5 mL de acetona (P.A - CAS: 67-64-1) e, em seguida, a mistura foi adicionada ao AC sob agitação suave durante 30 min utilizando um agitador magnético. O material foi seco a 70 °C durante 24 h. Após a evaporação do solvente o carbono funcionalizado foi lavado com água destilada para remover os produtos químicos não ligados e secos a 110 °C durante 6 h em estufa (TECNAL, modelo: 393/1). Em seguida o carbono funcionalizado foi peneirado (420 µm) e armazenado em recipiente hermético.

### **2.3 Caracterização do carvão ativado antes e após funcionalização**

As isotermas de adsorção e dessorção dos carvões ativados foram obtidas em um equipamento Micromeritics modelo ASAP 2420 (Micromeritics Instrument Corporation, Norcross, GA 30093 USA), utilizando aproximadamente 0.20 g de amostra, Antes das medidas as amostras foram submetidas a uma etapa de pré-tratamento que consistiu no aquecimento a 120 °C. Em seguida as amostras foram submetidas a uma evacuação a 30 °C por 30 min, seguida de um aquecimento com taxa de 10 °C.min<sup>-1</sup>, até 200 °C, permanecendo nesta temperatura por 300 min. Posteriormente foram obtidas isotermas de adsorção e dessorção de nitrogênio a 77 K. A área superficial específica foi determinada pela equação de BET, a distribuição de poros foi obtida a partir da isoterma de dessorção utilizando o método BJH, enquanto que o volume dos microporos foi determinado pela análise t-plot a partir da isoterma de adsorção. O ponto de carga zero foi determinada através do método denominado “experimento dos 11 pontos” (REGALBUTO & ROBLES, 2004).

## **2.4 Ensaios de imobilização da Pepsina**

### **2.4.1 Estudo da influência do método de imobilização**

Foram avaliados dois métodos de imobilização da pepsina (*Pepsin from porcine gastric mucosa sigma* 3200 – 4500 U/mg, CAS: 9001-75-6): o método de imobilização por adsorção, utilizando o carvão ativado (CA), e o método de formação de ligações covalentes, utilizando o carvão ativado funcionalizado (CAF).

Em ambos os métodos de imobilização foi utilizada uma solução enzimática com concentração inicial de 1 mg.mL<sup>-1</sup>, solubilizada em tampão ácido láctico/lactato de

sódio  $0.05 \text{ mol.L}^{-1}$  em pH 3.0. Este valor de pH foi escolhido levando-se em conta a atividade máxima de pepsina e o pH<sub>pcz</sub> do carvão ativado. Alíquotas de 5.0 mL da solução enzimática foram adicionadas em tubos contendo 0.05 g de cada suporte, mantidos sob agitação constante (0,046 g) em um agitador orbital à temperatura ambiente (25 °C). Após 2 h os tubos foram centrifugados a 1500 g por 10 min, e o sobrenadante coletado para ser feita a quantificação de proteínas não adsorvidas utilizando o método de Bradford (1976). Em seguida, foram feitas lavagens sucessivas nas amostras com a finalidade de remover e quantificar as enzimas não imobilizadas. As lavagens foram interrompidas quando os valores da concentração de proteína no sobrenadante foram nulos. Os biocatalisadores foram armazenados em solução tampão sob refrigeração a 4 °C até o momento da análise da sua atividade. A partir da diferença entre a quantidade inicial e final de proteínas determinou-se a capacidade de imobilização da enzima em cada um dos suportes, utilizando-se a Equação 1.

$$C_{Im} = \frac{V(C_{in} - C)}{m_s} \quad (1)$$

Em que:  $C_{Im}$  é a capacidade de imobilização ( $\text{mg.g}^{-1}$ );  $V$  é o volume de solução (mL);  $C_{in}$  concentração inicial da solução ( $\text{mg.L}^{-1}$ );  $C$  é a concentração da solução ( $\text{mg.L}^{-1}$ ) no equilíbrio;  $m_s$  é a massa do suporte (g).

Para confirmar a estabilidade da ligação da enzima nos suportes, as amostras dos biocatalisadores imobilizados foram incubadas em solução preparada a partir de ácido láctico  $0.05 \text{ mol.L}^{-1}$ / tampão lactato a pH 3.0 e NaCl  $1.5 \text{ mol.L}^{-1}$ . Após 2 h, o sobrenadante foi coletado para quantificação das proteínas, de acordo com o método de Bradford e pelo SDS-Page (HOEFER PS300B, Holliston, MA, EUA).

#### 2.4.2 Determinação da atividade enzimática

A capacidade hidrolítica, tanto para a enzima na sua forma livre quanto para as enzimas imobilizadas, foi determinada através da quantificação de equivalente tirosina produzida pela enzima após a hidrólise das diferentes caseínas, seguindo a metodologia descrita por Yu et al. (2014). Para determinar a atividade da protease na sua forma livre, utilizou-se uma solução 1.5% w/v de cada caseína como substrato para a enzima, preparada em tampão ácido láctico/lactato de sódio  $0.05 \text{ mol.L}^{-1}$  em pH 3.0. Em um tubo de centrifuga, 5 mL do substrato e 1 mL de solução enzimática foram incubados a 37 °C

durante os tempos de hidrólise de 30, 60, 90 e 120 min. Em seguida, adicionou-se 2 mL de ácido tricloroacético (6.5% w/v) ao conteúdo dos tubos, que foram agitados e centrifugados a 4100 g durante 6 min. Após esta etapa, retirou-se 1 mL do sobrenadante e misturou em uma solução de 5 mL de carbonato de sódio (4% m/v) e em 1 mL de solução de Folin-Ciocalteu (20%, v/v). A mistura foi mantida a uma temperatura de 37°C por 20 min, e em seguida foi feita a leitura de absorvância a 660 nm em espectrofotômetro (UV-Vis Quimis, Diadema, SP, Brasil).

Para os biocatalisadores imobilizados, 5mL da solução de cada caseína (1.5% w/v) foram adicionados aos tubos de centrifuga contendo 50 mg dos mesmos. Os tubos foram encubados a 37°C para os tempos de hidrólise de 30, 60, 90 e 120 min, e ao final dos da reação foi feita a centrifugação (1020 g/3min). Em seguida todo o sobrenadante foi transferido para outro tubo de centrífuga contendo 2 mL de ácido tricloroacético (6.5% m/v), sendo estes agitados e centrifugados a 4100 g durante 6 min. Após esta etapa, retirou-se 1mL do sobrenadante e adicionou a 5 mL de uma solução de carbonato de sódio (4% w/v) e 1 mL de solução de Folin-Ciocalteu (20% v/v). A mistura foi mantida a uma temperatura de 37°C durante 20 min, sendo feita a leitura em 660nm. Uma unidade de atividade de protease foi definida como 100 µg de equivalente de tirosina liberado pela hidrólise enzimática.

### **2.4.3 Determinação dos ciclos de reuso dos biocatalisadores imobilizados**

Após a escolha do tempo de hidrólise com maior atividade das enzimas imobilizadas foram feitos ciclos de reutilização da mesma com a finalidade de observar por quantos ciclos de hidrólise as enzimas manteriam sua atividade. Para isto seguiu-se a metodologia descrita no item anterior. Sendo que após cada ciclo de hidrólise foram adicionados 5 ml do tampão ácido láctico/lactato de sódio 0.05 mol.L<sup>-1</sup>, nos tubos contendo os biocatalisadores com pepsina, os quais passaram por um processo de agitação (0,046 g/5min) e centrifugação (1020 g/3min), para retirar quaisquer resíduos de caseína presente no meio, deixando os biocatalisadores aptos para uma nova hidrólise.

### **2.5 Atividade inibitória da ECA dos hidrolisados de caseína**

A atividade inibidora da ECA foi avaliada por um método espectrofotométrico, com base no trabalho de Cushman e Cheung, (1971): cada amostra (40 µL) foi incubada

com 100  $\mu\text{L}$  de tampão fosfato de potássio (0,1 mol  $\text{L}^{-1}$ ; pH 8,3), também contendo NaCl (0,3 mol  $\text{L}^{-1}$  e hipuril-histidil-leucina (5 mM). Foram adicionados 5 mU de ECA e a mistura de reação foi incubada a 37 ° C por 30 min (Tecnal, TE-184, Brasil; precisão  $\pm 0,1$  K). A reação foi parada pela adição de 150  $\mu\text{L}$  de HCl (1 M). O ácido hipúrico formado foi extraído com acetato de etila (1000  $\mu\text{L}$ ). Após remoção do acetato de etila por evaporação pelo calor, o ácido hipúrico foi dissolvido em água destilada (800  $\mu\text{L}$ ) e analisado espectrofotometricamente a 228 nm. A atividade de cada amostra foi testada em triplicata. A atividade inibitória (% IECA) foi expressa em termos de porcentagem de redução da atividade original da ECA dentro do meio, conforme indicado pela Eq. (2)

$$\%IECA = \frac{A_{controle} - A_{amostra}}{A_{controle} - A_{branco}} \times 100\% \quad (2)$$

$A_{controle}$ : Absorbância do ácido hipúrico formado pela ação da ECA sem inibidor.

$A_{branco}$ : Absorbância do HHL que reagiu e foi extraído com acetato de etila.

$A_{amostra}$ : Absorbância do ácido hipúrico formado pela ação da ECA na presença das substâncias inibidoras.

## 2.6 Análise estatística

Todos os experimentos e análises foram feitos em triplicata. Os dados foram submetidos à análise de variância e, para a avaliação das diferenças entre as médias da capacidade hidrolítica nos tempos em estudo, foi utilizado o Teste de Tukey ( $p < 0,05$ ), utilizando o software SAS STUDIO, versão do aluno (SAS Institute Inc., Cary, NC, EUA).

## 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

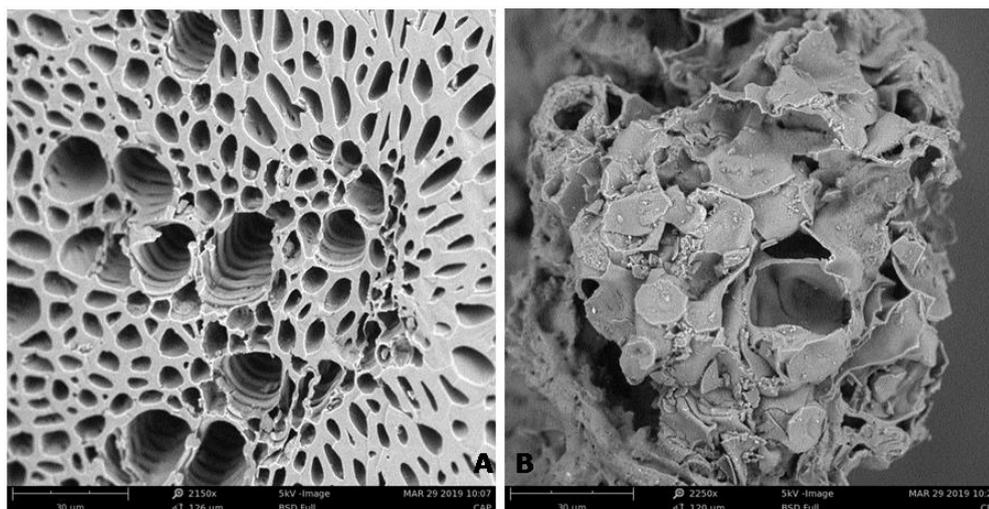
### 3.1 Caracterização do suporte (área superficial e porosidade, MEV e $\text{pH}_{\text{PCZ}}$ )

O carvão ativado (CA) apresentou área superficial de 1147  $\text{m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$ , volume de microporos de 0,10  $\text{cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$  e 0,38  $\text{cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$  de mesoporose diâmetro médio dos poros na ordem de 3,69 nm. A elevada área superficial pode ser atribuída tanto a natureza do material precursor de carbono quanto ao mecanismo de ativação do ácido fosfórico (FUJISHIGE et al., 2017). Essa é uma característica desejável para o emprego desse suporte no processo de imobilização de enzimas pelo método de adsorção, uma vez que

quanto maior a área superficial do adsorvente maior será a área disponível para que ocorra a ligação da proteína a matriz. Além de que uma elevada área superficial permitirá que uma maior quantidade de braços espaçadores se liguem à superfície do suporte durante o processo de funcionalização (CARLSSON et al., 2014; TORRES et al., 2018). O carvão ativado funcionalizado (CAF) apresentou uma menor área superficial ( $232 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$ ), volume de micro ( $0,00 \text{ cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$ ) e mesoporos ( $0,17 \text{ cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$ ) e maior diâmetro médio dos poros (4,43 nm), quando comparado com o CA. Isso ocorre pela inserção de braços espaçadores nos poros do material durante a funcionalização, obstruindo os microporos e alguns mesoporos, levando a uma redução acentuada da área superficial e do volume de poros. O aumento no diâmetro médio dos poros pode estar relacionado com a obstrução dos microporos durante o processo de funcionalização (RAMANI et al., 2012).

As modificações químicas promovidas no carvão ativado após o processo de funcionalização podem ainda serem confirmadas através dos resultados obtidos na análise por microscopia eletrônica de varredura, como pode ser observado nas Figuras 1a e 1b, respectivamente. Uma estrutura porosa bem desenvolvida com uma combinação de microporoso e mesoporoso é claramente observada na superfície do CA, que se estende até a parte interna do material, com canais de acesso que podem favorecer os processos de adsorção. A superfície do carvão ativado funcionalizado (CAF) apresentou redução de poros, área superficial e do volume de poros, devido à obstrução dos mesmos pela inserção dos braços espaçadores de amino-aldeído, como evidenciado na análise de área e nas imagens de MEV.

**Figura 1:** Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) de carvão ativado (a) e carvão funcionalizado (b).



As amostras CA e CAF apresentaram carga superficial zero em pH 5,2 e pH 5,5, respectivamente, determinados pelo ponto de carga zero (pH<sub>PCZ</sub>). Em valores de pH abaixo do ponto de carga zero, a superfície é protonada, favorecendo a adsorção de compostos com carga negativa; por outro lado, é desprotonado em valores mais altos de pH, favorecendo um comportamento oposto (VIEIRA et al., 2010). Conforme relatado por Santos et al. (2019) o pH<sub>PCZ</sub> de carvões ativados está diretamente relacionado ao tipo de agente ativador, temperatura de carbonização e atmosfera utilizada na síntese, portanto, os carvões produzidos com agentes ácidos exibem neutralidade em pH <7,0. O processo de funcionalização também foi responsável por um leve aumento no pH<sub>PCZ</sub>, provavelmente devido à aaminação superficial do carbono (RAMANI et al., 2012).

### 3.2 Ensaios de imobilização da pepsina nos carvões ativados

Para avaliar a influência do método de imobilização na atividade da enzima duas técnicas foram empregadas: por adsorção, utilizando o carvão ativado (CA), e a segunda por formação de ligação covalente, utilizando carvão ativado funcionalizado (CAF). Mesmo com as sucessivas lavagens realizadas após a etapa de imobilização, ocorreu pouca remoção das enzimas, principalmente da enzima imobilizada por ligação covalente, devido à maior força de ligação associada ao processo de imobilização que é a forma mais efetiva de prevenir sua dessorção.

Analisando a capacidade de imobilização de ambos os materiais (Tabela 1), observa-se que para os dois suportes foi possível obter uma capacidade de imobilização superior à 85 (mg.g<sup>-1</sup>). Os valores elevados de eficiência e capacidade de imobilização pelo método de adsorção estão relacionados à porosidade, diâmetro de poros, elevada

área superficial e pH do sistema. O processo de adsorção é dependente do pH da solução, uma vez que o mesmo tem efeito sobre ascargas superficiais do material adsorvente, a estrutura conformacional da enzima, o estado de ionização do sítio ativo e a dissociação enzimática, apresentando assim um efeito significativo sobre a atividade hidrolítica após o processo de imobilização (MAGNER, 2013). O CA apresentou um  $pH_{PCZ}$  de 5,2, enquanto a pepsina possui ponto isoelétrico (pI) próximo a 1,0 (IBRAHIM et al., 2017). Como a imobilização desta enzima foi conduzida em meio ácido (pH 3,0), a superfície do carvão ativado apresentou cargas superficiais positivas enquanto que a enzima apresentou cargas negativas em sua superfície, favorecendo o processo de imobilização através da atração de cargas opostas, podendo inferir que a adsorção tenha sido governada por interações eletrostáticas. Em geral, a imobilização enzimática através da técnica de adsorção física é bastante simples e pode ter um potencial comercial devido à sua simplicidade, baixo custo e retenção de alta atividade enzimática, bem como uma ligação enzimática relativamente livre de produtos químicos (MOHAMAD et al., 2015).

**Tabela 1.** Capacidade de Imobilização ( $C_{Im}$ ) e Eficiência de Imobilização da pepsina (Efic) por adsorção (CA) e ligação covalente (CAF).

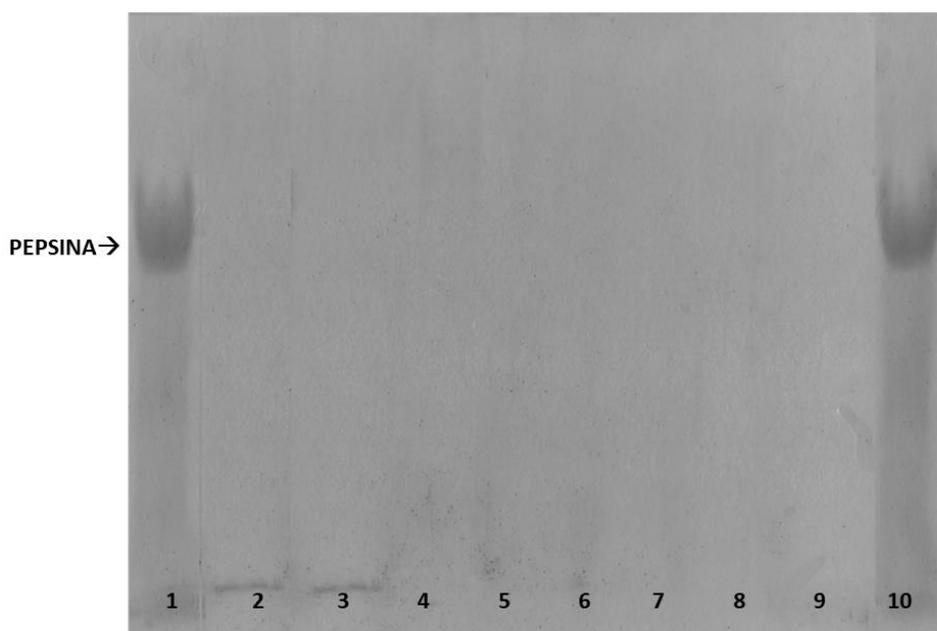
Amostra	$C_{Im}(mg/g)$	Efic (%)
CA	$87,54 \pm 0,41$	91,42%
CAF	$91,02 \pm 1,04$	92,00%

A ligação covalente é um dos métodos mais amplamente utilizados para imobilização irreversível de enzimas. Os grupos funcionais reativos podem ser adicionados ao suporte por modificação da superfície para gerar grupos ativados. Santos et al. (2019) imobilizaram covalentemente pepsina na superfície de carvão ativado pelo método do glutaraldeído, que resultaram em alta capacidade de imobilização, fácil recuperação e reutilização da enzima para hidrólise de caseína bovina. Narwal et al. (2014), utilizaram a lipase comercial de *Himedia Mumbai* na imobilização em matriz de sílica gel em presença do glutaraldeído. A eficiência de ligação da lipase na matriz funcionalizada leva à uma interação forte entre a enzima e sua matriz transportadora, permite sua reutilização com mais frequência do que com outros métodos de

imobilização disponíveis e impedem a liberação de enzimas no ambiente de reação (OVSEJEVI et al., 2013). Quando a enzima se encontra ligada a superfície do suporte o método de ligação e carregamento de enzimas são melhorados (MOHAMAD et al., 2015).

A estabilidade da ligada da enzima ao suporte, avaliada após incubação dos biocatalisadores em solução salina, foi comprovada através os resultados das análises de Bradford dos sobrenadantes e da análise por eletroforese. Os teores de enzimas nos sobrenadantes foram nulos, indicando nenhuma dessorção enzimática, e não foram observadas bandas equivalentes ao padrão de pepsina (Pista 1) nos resultados de eletroforese (Figura 2). Estes resultados podem ser um indicativo de que as enzimas foram imobilizadas nos suportes por fortes interações, como ligações covalentes e/ou interações entre íons.

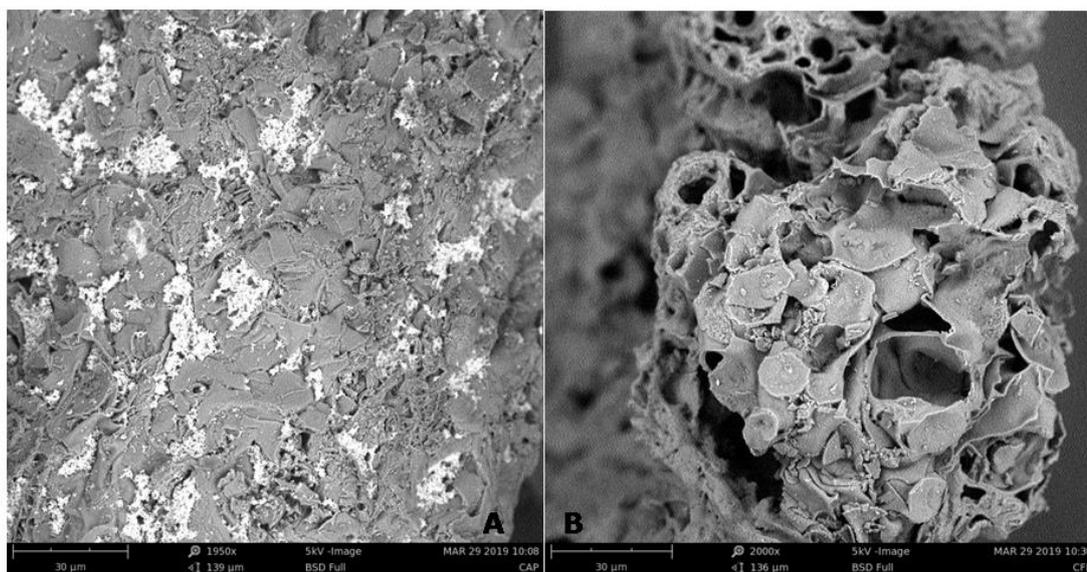
**Figura 2:** SDS-PAGE da solução obtida após o teste de estabilidade de derivados em alta concentração salina. (a) Pepsina livre: pistas 1 e 10, solução obtida usando CAF: pistas 3 e 4; solução obtida usando CA: pistas 6 e 7.



Após a imobilização enzimática, observou-se a formação de agregados proteicos na superfície do carvão ativado (Figura 3a), confirmando a presença da enzima no acesso aos poros do suporte. Para o CAF (Figura 3b), é possível observar enzimas pontuais na superfície, sem formação de aglomerados, o que pode indicar que realmente

houve a formação de ligações preferenciais na superfície devido à presença de braços espaçadores do glutaraldeído.

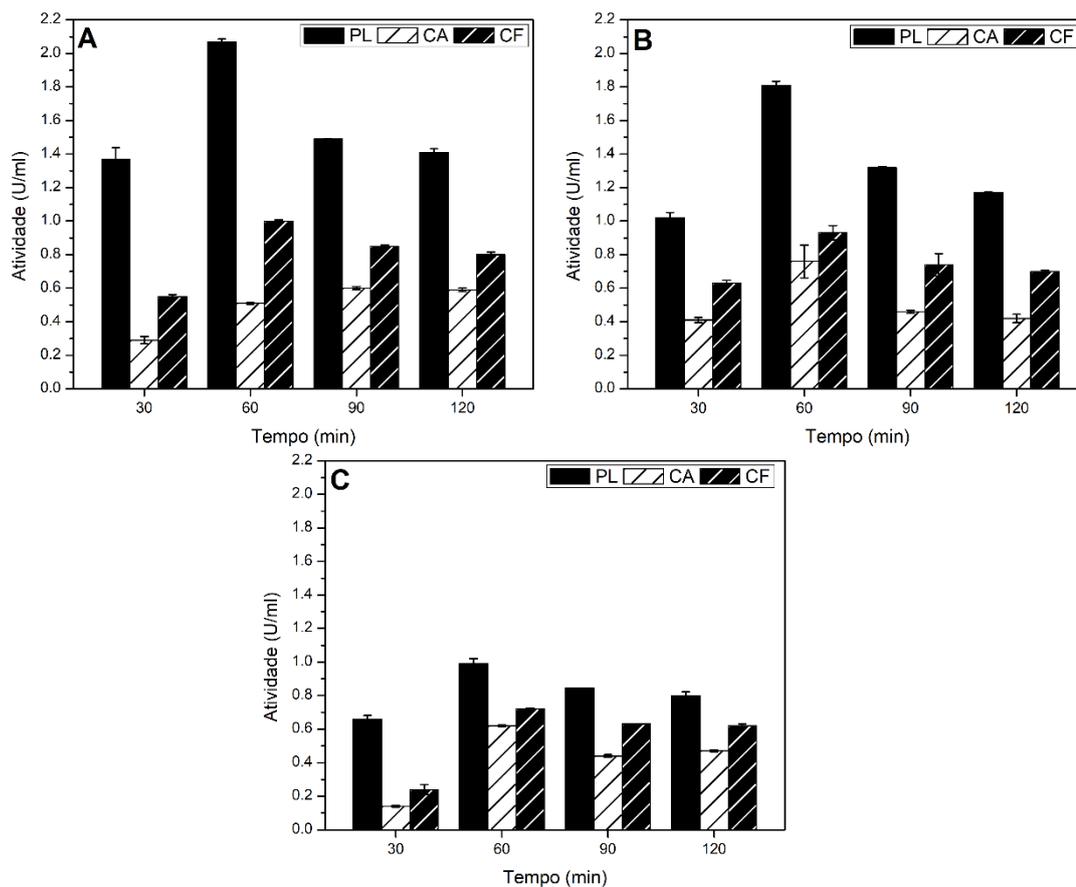
**Figura 3:** Microscopia eletrônica de varredura (MEV) da pepsina (a) adsorvida em carvão ativado (b) e imobilizada em carvão funcionalizado.



### 3.3 Hidrólise das caseínas bovina, caprina e bubalina para produção de peptídeos bioativos

Na Figura 4 são apresentados os resultados da atividade específica da pepsina na forma nativa e imobilizada nos carvões na hidrólise das caseínas em diferentes tempos de (30, 60, 90 e 120 minutos).

**Figura 4:** Capacidade de hidrólise de caseína pela pepsina na forma nativa (PL) e imobilizada por adsorção (CA) ou por ligação covalente (CAF) em função do tempo, (A) Caseína Bovina; (B) Caseína de Cabra; (C) Caseína de búfalo. As médias seguidas da mesma letra para cada intervalo de tempo não diferiram significativamente entre elas em  $p < 0,05$  pelo teste de Tukey.



Os biocatalisadores imobilizados apresentaram menores valores de capacidade de hidrólise em todos os tempos avaliados, quando comparado à enzima na forma nativa. Os maiores valores de capacidade de hidrólise foram observados para o tempo de reação de 60 min. Quando a enzima é ligada ao suporte, ela pode sofrer alguma mudança na conformação, o que pode afetar sua eficiência catalítica. Além disso, como o processo de interação enzima-suporte é quase sempre aleatório, a região do sítio ativo poderá ficar menos acessível ao substrato (impedimento estérico), o que acarreta, também, uma queda na atividade (KULKARNI, 2016). Apesar da menor eficiência na hidrólise em relação à sua forma livre, enzimas imobilizadas permitem uma melhor recuperação tanto da enzima como dos seus produtos, múltiplo reuso, podem operar continuamente em processos enzimáticos industriais e reações onde estes biocatalisadores estão presentes podem ser facilmente controladas e finalizadas.

Avaliando a capacidade hidrolítica da pepsina em relação ao tempo de reação, observa-se, que no tempo de 30 minutos são alcançados os menores valores de atividade em relação ao demais tempos (60, 90 e 120). Quando a enzima é imobilizada sobre ou nos poros de um suporte sólido, o substrato tem que difundir na solução através de um

filme líquido estacionário presente nas superfícies do suporte e, se este é poroso, através dos poros até alcançar o sítio ativo das enzimas, o que pode restringir a taxa de reação, ou seja, a velocidade de difusão do substrato é menor do que a velocidade de reação catalisada pela enzima. Isso ocorre devido as resistências difusionais externas e efeitos difusionais internos. As resistências difusionais externas surgem devido ao fato de que o substrato deve ser transportado do seio da solução até a superfície catalítica, devendo, por conseguinte, atravessar uma camada líquida. A difusão do substrato e produtos dos centros ativos para a solução (ou vice-versa) ocorre através de mecanismos de difusão molecular e convectiva. Os efeitos de difusão externa afetarão o transporte de massa e podem ser minimizados tanto pelo aumento da agitação, quanto pelo aumento do fluxo de substrato. Efeitos difusionais internos surgem devido à movimentação do substrato no interior do meio catalítico: os caminhos de difusão são tortuosos (canais irregulares) e o fluxo é menor do que se os poros fossem uniformes. Nos poros a reação catalítica é considerada pseudo-homogênea, ou seja, difusão e reação ocorrem simultaneamente. Em outras palavras, a catálise enzimática nos poros dos suportes é fortemente influenciada pela transferência de massa e governada pelas restrições à difusão (LI et al., 2010). Como consequência das restrições impostas pela transferência de massa em suportes porosos, com o aumento do tempo reacional a atividade hidrolítica aumenta.

A imobilização por formação de ligação covalente foi mais eficaz quando comparada ao método de adsorção, para todas as condições de estudo. Enzimas imobilizadas em suportes carbonáceos funcionalizados pelo método do glutaraldeído se ligam aos braços espaçadores, deixando seus sítios ativos mais expostos e facilitando o acesso ao substrato. Por outro lado, em suportes porosos a imobilização por adsorção ocorre preferencialmente no interior dos poros. Desta forma, a resistência à transferência de massa por difusão governa o processo, levando a diminuição da atividade da enzima, em consequência da menor acessibilidade do substrato ao sítio ativo da enzima imobilizada em uma conformação desfavorável nas porções mais internas do poro.

A capacidade hidrolítica da pepsina em solução (Figura 4) diferiu significativamente da pepsina imobilizada (CA e CAF) para todos os tempos estudados (30, 60, 90 e 120 min). Para a caseína bovina e de cabra o biocatalisador obtido com o CAF apresentou maiores valores de hidrólise quando comparados ao CA, enquanto para

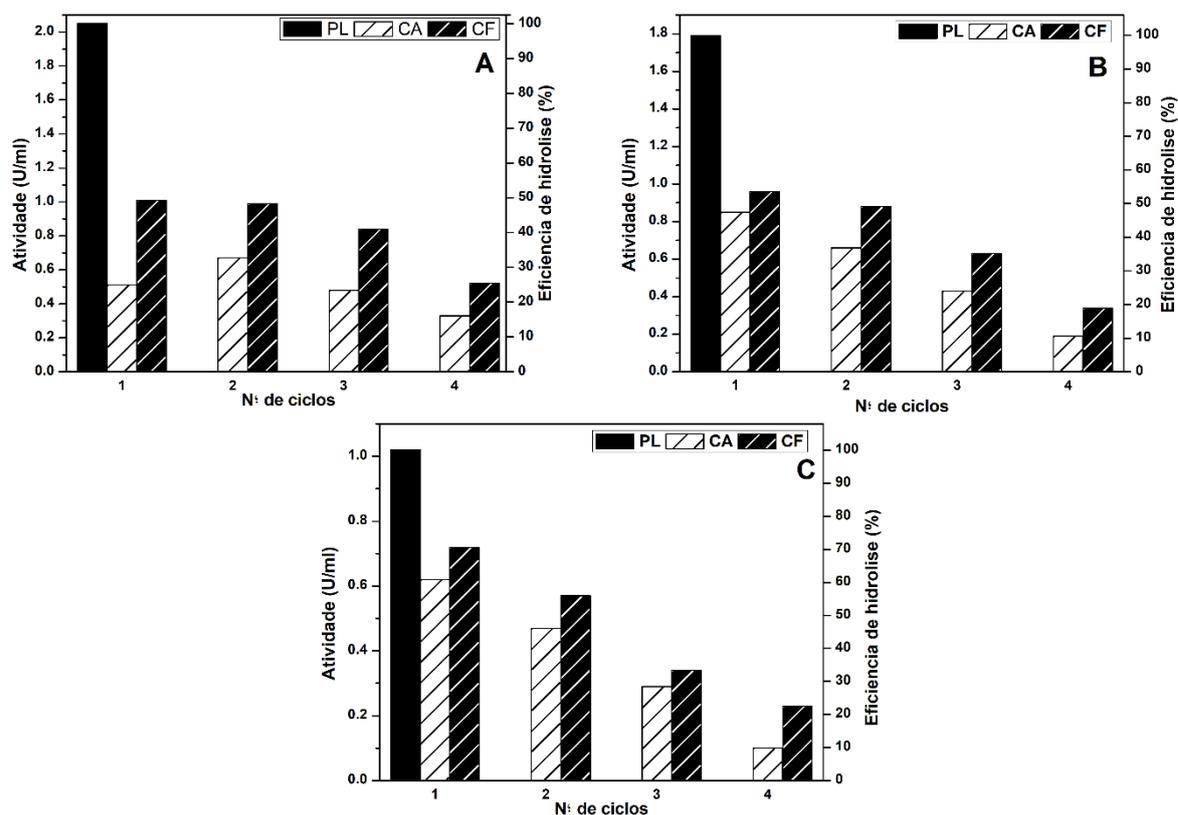
caseína de búfala não houve diferenças significativas no tempo de 60 min. Para os tempos de 30, 90 e 120 min, não houve diferenças significativas para as diferentes caseínas em estudo. Existem diferenças físico-químicas, de composição e principalmente nas concentrações das frações de caseínas, quando se comprara o leite de diferentes animais. As micelas de caseína do leite são subdivididas nas frações  $\alpha_1$ -caseína,  $\alpha_2$ -caseína,  $\beta$ -caseína e  $\kappa$ -caseína, sendo que no leite bubalino, estas frações representam em média, respectivamente, 35 %, 15 %, 32 % e 5 % do total (RONCADA et al., 2012). No leite bovino, a fração  $\alpha_1$ -caseína representa 40 %,  $\alpha_2$ -caseína 10 %,  $\beta$ -caseína 45 % e a  $\kappa$ -caseína representa 4 %, enquanto no leite caprino tem-se 19 % de  $\alpha_1$ -caseína, 10 % de  $\alpha_2$ -caseína, 60 % de  $\beta$ -caseína e 3 % de  $\kappa$ -caseína (LAD et al., 2017). Sendo, que a proporção de micelas de caseína de pequeno tamanho é maior no leite de cabra do que no leite de vaca e de búfala, facilitando a acesso da enzima ao substrato, o que explica a melhor digestibilidade do leite de cabra e seus derivados (PULINA et al., 2018). A análise do proteoma do leite de cabra mostrou que algumas proteínas presentes não foram encontradas no leite de vaca e búfala. Estas proteínas são constituídas por componentes que são precursores de peptídeos envolvidos em potenciais efeitos hipotensores (isto é, angiotensinogênio) (VERRUCK et al., 2019). A caseína de cabra apresentou maior valores de capacidade hidrolítica quando comparado as caseínas de búfala e bovina para todos os tempos em estudo.

Os resultados da atividade enzimática para os 4 ciclos de reutilização, no tempo de 60 minutos, estão apresentados na Figuras 5. Avaliando os dois biocatalisadores (CA e CAF), observa-se uma pequena redução da capacidade hidrolítica nos três primeiros ciclos e uma redução mais acentuada no último ciclo. Para o CAF após dois ciclos de reutilização foi obtido uma hidrólise total próxima à da enzima livre, enquanto para CA foram necessários três ciclos. Estes resultados demonstram a viabilidade da utilização do biocatalisador imobilizado em carvão ativado.

A eficiência enzimática dos biocatalisadores imobilizados no primeiro ciclo de utilização foram aproximadamente iguais a 65% e 25% para caseína bovina, 70% e 22% para a caseína de cabra e de 55% e 35% caseína de búfala, na imobilização por formação de ligação covalente e por adsorção, da eficiência enzimática em solução. No último ciclo a eficiência de hidrólise foi de aproximadamente 25% e 22% para caseína bovina, de 35% e 15% para caseína de cabra e 25% e 22% para caseína de búfala na imobilização por ligação covalente e por adsorção, respectivamente, da eficiência

enzimática em solução. Os custos de envolvidos no processo de produção da enzima na forma imobilizada podem ser compensados pela possibilidade de reutilização do biocatalisador em 4 ciclos de reuso.

**Figura 5:** Atividade enzimática para os ciclos de reutilização de pepsina imobilizada por adsorção (CA) e por ligação covalente (CAF) no tempo de 60 min. (A) Caseína Bovina; (B) caseína de cabra; (C) Caseína de búfala.



### 3.4 Percentagem de inibição da ECA do hidrolisado de caseína de cabra

A maioria dos trabalhos publicados na literatura mostra que o maior índice de inibição da enzima conversora da angiotensina (ECA) é obtido com tempo de 120 minutos de hidrólise, utilizando enzimas proteolíticas em solução. Jiang et al. (2007) empregaram seis enzimas proteolíticas disponíveis comercialmente (alcalase, flavourzima, neutrase, papaína, pepsina e tripsina) para a obtenção de hidrolisados de caseína, proveniente do leite de Iaque. A atividade inibitória da ECA destes hidrolisados foi superior a 65 %. Souza Júnior et al. (2014) estudaram o efeito de hidrolisados inibidores da atividade da enzima conversora de angiotensina (ECA) obtidos por

hidrólise catalisada por tripsina na caseína bovina com a atividade inibitória *in vitro* de aproximadamente 78,5%. Similarmente, Lin et al. (2017) avaliaram o efeito de diferentes enzimas sobre a obtenção de hidrolisados e sua atividade inibitória da ECA de leite de iaque e foi obtido um hidrolisado cuja atividade inibitória da ECA variou de 35% a 80%. Mais recentemente, Ibrahim et al. (2017) investigaram a atividade anti-hipertensiva de peptídeos da caseína e das proteínas do soro de leite de cabra hidrolisados por pepsina. Após 120 minutos de hidrólise a 37 °C observou-se que o valor foi superior a 70 %.

Seguindo a tendência observada em outros estudos, a atividade inibitória da ECA foi determinada para hidrolisados derivados de caseína de cabra com frações coletadas 120 minutos após o início da hidrólise, usando pepsina em sua forma livre e imobilizadas em carvão ativado funcionalizado. Os resultados da atividade inibitória neste estudo variaram de 94,3% e 55,2% para a pepsina na sua forma livre e imobilizada no carvão ativado funcionalizado, respectivamente.

Conteras et al. (2009) relataram novas sequências peptídicas derivadas de caseína, pela hidrólise com pepsina, com 50 %a de atividade inibidora da enzima de conversão da angiotensina (ECA) e atividade anti-hipertensiva demonstradas em ratos hipertensos espontaneamente (SHR). Sob o mesmo ponto de vista, Esperjo-carpio et al. (2013) obtiveram entre 30 e 65% de inibição da enzima conversora de angiotensina ao submeter a caseína e as proteínas do soro de leite de cabra a ação individual e simultânea das enzimas subtilisina e tripsina. Além destes estudos, Luo et al. (2014) hidrolisaram a caseína pela ação proteolítica de três enzimas e obtiveram inibição de ECA máxima de 65%, sendo comparáveis à atividade anti-hipertensiva encontrada em hidrolisados derivados da caseína.

Como observado, os valores de inibição da ECA obtidos neste estudo para as enzimas imobilizadas foram menores que os das enzimas livre, mas similar a outros trabalhos relatados na literatura, demonstrando a vantagem desse biocatalisador devido a possibilidade de reutilização. Os resultados de inibição poderiam ser melhorados se fosse realizada uma etapa de pré-concentração e/ou padronização dos hidrolisados, tendo em vista que, em todos os tempos avaliados a capacidade hidrolítica do biocatalisador imobilizado foi inferior à da enzima livre e, por conseguinte, na solução

avaliada nos testes de inibição a concentração de peptídeos bioativos, provavelmente, era inferior a encontrada no hidrolisado obtido com a enzima na sua forma livre.

#### 4. CONCLUSÃO

Ambos os métodos de imobilização testados foram eficientes, apresentando alta capacidade de imobilização da pepsina, sendo a atividade proteolítica da pepsina imobilizadas por ligação covalente superior à da imobilizada por adsorção. Desta forma, o carvão ativado funcionalizado pode ser considerado como um suporte em potencial para imobilização de enzimas, podendo o biocatalisador obtido ser reutilizada por mais de 4 ciclos, apresentando potencial para ser empregado em ampla gama de processos industriais.

As micelas de caseína no leite de vaca, cabra e búfala têm diferentes propriedades físico-químicas, composições e frações de caseína, mas apresentam fortes semelhanças em sua estrutura interna. A utilização da caseína de cabra levou a maiores valores de capacidade hidrolítica dos biocatalisadores quando comparado as demais caseínas estudadas, em virtude da estrutura de suas micelas e sua maior digestibilidade. Foram obtidos hidrolisados da caseína de cabra capazes de inibir a atividade *in vitro* da ECA. Apesar de menores valores de inibição da ECA para as enzimas imobilizadas em comparação com a enzimas livre, os biocatalisadores mostram vantagem devido a possibilidade de reutilização. Estudos adicionais verificando o mecanismo de transporte e a capacidade desses peptídeos na redução da hipertensão *in vivo* forneceriam uma melhor compreensão do seu potencial no tratamento da hipertensão. Sendo assim, os resultados deste estudo comprovam o potencial de utilização de biocatalisadores imobilizados em processos de obtenção de peptídeos bioativos que podem ser empregados como alternativas terapêuticas no tratamento da hipertensão.

#### 5. REFERÊNCIAS

ATACAN, A, K., ÇAKIROGLU, B., ÖZACAR, M., Covalent immobilization of trypsin onto modified magnetite nanoparticles and its application for casein digestion, **International Journal of Biological Macromolecules** 97, 148–155, 2017.

BILAL, M. et al. Development of horseradish peroxidase-based cross-linked enzyme aggregates and their environmental exploitation for bioremediation purposes. **Journal of Environmental Management**, DeLand, v. 188, p. 137-143, March 2017.

BRITO, M.J.P., VELOSO, C.M., BONOMO, R.C.F., FONTAN, R. DA C.I., SANTOS, L.S. and MONTEIRO, K.A. Activated carbons preparation from yellow mombin fruit stones for lipase immobilization, **Fuel Processing Technology**. V. 156, P. 421–428, 2017.

BRADFORD MM, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem** 72:248–254 1976.

CARLSSON, N.; GUSTAFSSON, H.; THÖRN, C.; OLSSON, L.; HOLMBERG, K.; ÅKERMAN, B. Enzymes immobilized in mesoporous silica: A physical–chemical perspective. **Advances in Colloid and Interface Science**.v.205, p.339-360, 2014.

CONTRERAS, M. M., CARRÓN, R., MONTERO, M. J., RAMOS, M., RECIO, I. Novel casein-derived peptides with antihypertensive activity. *International Dairy Journal*, 19, 566-573, 2009.

CONTRERAS, M. D. M., SEVILLA, M. A., MONROY-RUIZ, J., AMIGO, L., GÓMEZ-SALA, B., MOLINA, E., et al. Food-grade production of an anti-hypertensive casein hydrolysate and resistance of active peptides to drying and storage. **International Dairy Journal**, 21(7), 470–476, 2011.

CUSHMAN, D. W., & CHEUNG, H. S. Spectrophotometric assay and properties of the angiotensin I-converting enzyme of rabbit lung. **Biochemical Pharmacology**, 20(7), 1637–1648, 1971.

DASKAYA-DIKMEN, C. YUCETEPE, A. KARBANCIOGLU-GULER, F. DASKAYA, H. OZCELIK, B. Angiotensin-I-Converting Enzyme (ACE)-Inhibitory Peptides from Plants, **Nutrients**, 9, 316, 2017.

DHAWANE, S.H., KUMAR, T., HALDER, G., Process optimisation and parametric effects on synthesis of lipase immobilised carbonaceous catalyst for conversion of rubber seed oil to biodiesel, *Energy Conversion and Management* 176 55-68, 2018.

EGITO, A. S.; ROSINHA, G. M. S.; LAGUNA, L. E.; MICLO, L.; GIRARDER, J. M.; GAILLARD, J. L. Método eletroforético para detecção da adulteração do leite caprino com leite bovino. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 58, n. 5, p. 932- 939 2006.

ESPEJO-CARPIO, F. J. et al. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity of enzymatic hydrolysates of goat milk protein fractions. **International Dairy Journal**, v. 32, p. 175-183. 2013.

FUJISHIGE, M., YOSHIDA, I., TOYA, Y., BANBA, Y., OSHIDA, K., TANAKA, Y., DULYASEREE, P., WONGWIRIYAPAN, W., TAKEUCHI, K., Preparation of Activated Carbon from Bamboo-Cellulose Fiber and Its Use for EDLC Electrode Material, *Biochemical Pharmacology* 5 1801-1808, (2017).

GAO, Z., CHU, J., JIANG, T., XU, T., WU, B., HE, B., Lipase immobilization on functionalized mesoporous TiO<sub>2</sub>: Specific adsorption, hyperactivation and application in cinnamyl acetate synthesis, [Process Biochemistry](#)64 152-159, (2018) .

GONZÁLEZ-GARCÍA, P. Activated carbon from lignocellulosics precursors: A review of the synthesis methods, characterization techniques and applications. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**.v.82, p.1393-1414, 2018.

INGHAM, B., SMIALOWSKA, A., KIRBY, N. M., WANG, C., CARR, A. J., A structural comparison of casein micelles in cow, goat and sheep milk using X-ray scattering. *Soft Matter*, 14, 3336—3343, 2018.

IBRAHIM, H. R., AHMED, A. S., & MIYATA, T. Novel angiotensin-converting enzyme inhibitory peptides from caseins and whey proteins of goat milk. **Journal of Advanced Research**, 8(1), 63–71, 2017.

JIANG, J.; CHEN, S.; REN, F.; LUO, Z.; ZENG, S.S. Yak milk casein as a functional ingredient: Preparation and identification of angiotensin-I-converting enzyme inhibitory peptides. **J. Dairy Res.**, v. 74, p. 18-25, 2007.

JOSHI, R., SHARMA, R., KUILA, A., Lipase production from *Fusarium incarnatum* KU377454 and its immobilization using Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> NPs for application in waste cooking oil degradation, *Bioresource Technology Reports* 5 134-140, 2019.

KULKARNI, S., J. Enzyme Immobilization: **Research and Studies International Journal of Research & Review** 32 Vol.3; Issue: 7; 2016.

LACERDA, S.V., JUAN, B.L.S., GUIMARAES, A.C., NAVARRO, S.H., MERCEDES, S.B., GRACIA, L.M.N., RAMOS, R.M., GIL, J.M., Rhodamine B removal with activated carbons obtained from lignocellulosic waste, *Journal of Environmental Management* 155 (2015) 67-76.

LAD, S. S., APARNATHI, K. D., MEHTA, B., VELPULA, S., Goat Milk in Human Nutrition and Health – A Review, *Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci*6(5): 1781-1792, 2017.

LI, Y.; GAO, F.; WEI, W.; QU, J.; MA, G.; ZHOU, W. Pore size of macroporous polystyrene microspheres affects lipase immobilization. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 66, p. 182-189, 2010.

LIN, K., ZHANG, L., HAN, X., & CHENG, D. Novel angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides from protease hydrolysates of Qula casein: quantitative structure-activity relationship modeling and molecular docking study. **Journal of Functional Foods**, 32, 266–277, 2017.

LUO, Y. et al. Physical, chemical and biochemical properties of casein hydrolyzed by three proteases: Partial characterizations. **Food Chemistry**, v. 155, p. 146-154. 2014.

MAGNER, E.: Immobilisation of enzymes on mesoporous silicate materials. **Chem. Soc. Rev.** 42, 6213–6222, 2013.

MOHAMAD, N. R., MARZUKI, N. H., BUANG, N. A., HUYOP, F., & WAHAB, R. A. An overview of technologies for immobilization of enzymes and surface analysis techniques for immobilized enzymes. *Biotechnology, biotechnological equipment*, 29(2), 205–220, (2015). doi:10.1080/13102818.2015.1008192

NARWAL, S. K., SAUN, N. K., GUPTA, R., Characterization and catalytic properties of free and silica-bound lipase: a comparative study. *J Oleo Sci.* ;63(6):599-605, 2014.

OLIVEIRA, M. R. SILVA, T. J. BARROS, E. GUIMARÃES, V. M. BARACAT-PEREIRA, M. C. ELLER, M.R. COIMBRA, J. S. R. OLIVEIRA, E. B. Anti-Hypertensive Peptides Derived from Caseins: Mechanism of Physiological Action, Production Bioprocesses, and Challenges for Food Applications. **Appl Biochem Biotechnol**, 2018.

OVSEJEVI, K., MANTA, C., BATTISTA-VIERA, F., Reversible covalente immobilization of enzymes via disulphide bonds. *Methods Mol Biol.*;1051:89-116, 2013.

PULINA, G., MILÁN, M. J., LAVÍN, M. P., THEODORIDIS, A., MORIN, E., CAPOTE, J., ... CAJA, G., Invited review: Current production trends, farm structures, and economics of the dairy sheep and goat sectors. *Journal of Dairy Science*, 101(8), 6715–6729, 2018.

RAMANI, K.; KARTHIKEYAN, S.; BOOPATHY, R.; KENNEDY, L.; MANDAL, A.B.; SEKARAN, G. Mesoporous activated carbon surface functionalized for the immobilization of lipase and its application acidic hydrolysis waste oil prepared: Isotherm and kinetic studies. **Process Biochemistry**. v.47, p.435-445, 2012.

REGALBUTO, J. R.; ROBLES, J. **The engineering of Pt/Carbon Catalyst Preparation**, University of Illinois: Chicago, 2004.

RONCADA, P.; PIRAS, C.; SOGGIU, A.; TURK, R.; URBANI, A.; BONIZZI, L. Farm animal milk proteomics. *Journal of Proteomics*, v. 75, n. 14, p. 4259-4274, 2012.

RUEDA, N. et al. Chemical Modification in the Design of Immobilized Enzyme Biocatalysts: Drawbacks and Opportunities. **The Chemical Record**, Chicago, v. 16, n. 3, p. 1436-1455, June 2016.

SANTOS, M. P. F., BRITO, M. J. P., JUNIOR, E. C.S., BONOMO, R. C.F., VELOSO, C. M., Pepsin immobilization on biochar by adsorption and covalent binding, and its application for hydrolysis of bovine casein, **J Chem Technol Biotechnol**; **94**: 1982–1990, 2019.

SOUZA JÚNIOR, E. C., COIMBRA, J. S. D. R., DE OLIVEIRA, E. B., & BONOMO, R. C. F. Recovery of casein derived peptides with in vitro inhibitory activity of angiotensin converting enzyme (ACE) using aqueous two-phase systems. **Journal of Chromatography B**, 973, 84–88, 2014.

SZAŁAPATA, K. OSIŃSKA-JAROSZUK, M. BRYJAK, J. JASZEK, M. JAROSZ-WILKOŁAZKA, A. Novel application of porous and cellular materials for covalent immobilization of pepsin, **Brazilian Journal of Chemical Engineering** v.33, pp. 251 - 260, 2016.

TORRES, J.A., SILVA, M.C., LOPES, J.H., NOGUEIRA, A.E., NOGUEIRA, F.G.E., CORRÊA, A.D., Development of a reusable and sustainable biocatalyst by immobilization of soybean peroxidase onto magnetic adsorbent, *International Journal of Biological Macromolecules* 114 1279-1287, (2018).

TOLDRÁ, F., REIG, M., ARISTOY, M. C., MORA, L., Generation of bioactive peptides during food processing, *Food Chemistry* 267 395–404, 2018.

VERRUCK, S., DANTAS, A., PRUDENCIO, E. S., Functionality of the components from goat's milk, recent advances for functional dairy products development and its implications on human health, *Journal of Functional Foods* 52, 243–257, 2019.

VIEIRA, A. P., SANTANA, S. A. A., BEZERRA, C. W. B., SILVA, H. A. S., DE MELO, J. C. P., DA SILVA FILHO, E. C., AIROLDI, C., Copper sorption from aqueous solutions and sugar cane spirits by chemically modified babassu coconut (*Orbignya speciosa*) mesocarp, *Chem. Eng. J.* 161 99–105, (2010).

YU ZL, ZENG WC, ZHANG WH, LIAO XP and SHI B, Effect of ultrasound on the activity and conformation of  $\alpha$ -amylase, papain and pepsin. *Ultrason Sonochem* 21:930–936 2014.

ZHONG, N., CHEN, W., LIU, L., CHEN, H., Immobilization of Rhizomucor miehei lipase onto the organic functionalized SBA-15: Their enzymatic properties and glycerolysis efficiencies for diacylglycerols production, [Food Chemistry](#) 271 (2019) 739-746.