



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



Área de concentração: Ciência de Alimentos

IMOBILIZAÇÃO DE PEPSINA EM DIFERENTES SUPORTES MODIFICADOS (À
BASE DE CARVÃO ATIVADO) E O POTENCIAL USO PARA OBTENÇÃO DE
PEPTÍDEOS ANTIOXIDANTES A PARTIR DA HIDRÓLISE DA CASEÍNA
CAPRINA.

Autora: Núbina Fernanda Carvalho Sousa

Orientador: Prof. Dr. Evaldo Cardozo de Souza Júnior

Coorientadores: Prof^ª. Dra. Renata Cristina Ferreira Bonomo

Prof^ª. Dra. Cristiane Martins Veloso

ITAPETINGA
BAHIA-BRASIL

2023

NÚBINA FERNANDA CARVALHO SOUSA

**IMOBILIZAÇÃO DE PEPSINA EM DIFERENTES SUPORTES MODIFICADOS (À
BASE DE CARVÃO ATIVADO) E O POTENCIAL USO PARA OBTENÇÃO DE
PEPTÍDEOS ANTIOXIDANTES A PARTIR DA HIDRÓLISE DA CASEÍNA
CAPRINA.**

Dissertação apresentada como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Engenharia e Ciência de Alimentos, no Programa de Pós-graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia – UESB.

ORIENTADOR:

Prof. Dr. Evaldo Cardozo de Souza Júnior

COORIENTADORES:

Prof^a. Dra. Renata Cristina Ferreira Bonomo

Prof^a. Dra. Cristiane Martins Veloso

ITAPETINGA
BAHIA-BRASIL

2023

660.634
S697i

Sousa, Núbina Fernanda Carvalho.

Imobilização de pepsina em diferentes suportes modificados (à base de carvão ativado) e o potencial uso para obtenção de peptídeos antioxidantes a partir da hidrólise da caseína caprina. / Núbina Fernanda Carvalho Sousa. – Itapetinga-BA: UESB, 2023.

95f.

Dissertação apresentada como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Engenharia e Ciência de Alimentos, no Programa de Pós-graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia – UESB. Sob a orientação do Prof. D. Sc. Evaldo Cardozo de Souza Júnior e coorientação da Prof.^a D. Sc. Renata Cristina Ferreira Bonomo e Prof.^a D. Sc. Cristiane Martins Veloso.

1. Pepsina – Imobilização - Carvão ativado. 2. Caseína caprina - Hidrólise - Peptídeos antioxidantes. 3. Carvão ativado – Carvão de umbu. I. Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia - Programa de Pós-Graduação de Mestrado em Engenharia e Ciências de Alimentos, *Campus* de Itapetinga. II. Souza Júnior, Evaldo Cardozo de. III. Bonomo, Renata Cristina Ferreira. IV. Veloso, Cristiane Martins. 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. Carvão ativado – Aplicação - Hidrólise da caseína caprina
2. Peptídeos bioativos
3. Enzimas imobilizadas

DECLARAÇÃO DE APROVAÇÃO

Título: “IMOBILIZAÇÃO DE PEPSINA EM DIFERENTES SUPORTES MODIFICADOS (À BASE DE CARVÃO ATIVADO) E O POTENCIAL USO PARA A OBTENÇÃO DE PEPTÍDEOS ANTIOXIDANTES A PARTIR DA HIDRÓLISE DA CASEÍNA CAPRINA.”

Autor (a): NÚBINA FERNANDA CARVALHO SOUSA

Orientador (a): Prof. Dr. Evaldo Cardozo de Souza Júnior

Coorientador (a): Prof.^a Dr.^a Renata Cristina Ferreira Bonomo

Prof.^a Dr.^a Cristiane Martins Veloso

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



Dr. Mateus Pereira Flores Santos
Pós-Doc/UESC



Prof. Dr. Rafael da Costa Ilhéu Fontan
UESB



Prof. Dr. Evaldo Cardozo de Souza Júnior
Orientador - UESB
Presidente da Banca

Itapetinga-BA, 08 de março de 2023.

Então Samuel pegou uma pedra e a colocou entre Masfa e Sen; deu-lhe o nome de Ebenezer, explicando: “Até aqui o senhor nos socorreu”.

I Samuel 7:12, Bíblia sagrada

Dedico

A Deus

Aos meus pais

Aos meus irmãos

A todos que acreditaram no meu potencial e me apoiaram durante toda caminhada

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, pois é meu escudo e fortaleza, sem ele jamais teria concluído mais esta etapa da minha vida e vivido essa incrível experiência. Obrigada senhor, por permitir que tudo desse certo.

Aos meus queridos e amados pais Maria de Jesus e José Reinaldo e aos meus irmãos Marcos e Flávia. Estas pessoas foram a minha rede principal de apoio e incentivo, sempre lembrando que através da educação podemos realizar nossos sonhos e que, para quem vem de família humilde é a única riqueza. Certezas que me fizeram persistir no caminho com muita coragem, fé e determinação. De maneira especial, agradeço a minha irmã Flávia por ter me substituído no trabalho todas as vezes que precisei me deslocar de Codó/MA para Itapetinga/BA, sem esta ajuda, jamais teria chegado ao fim dessa jornada.

Ao meu orientador, professor Dr. Evaldo Cardozo pela excelente orientação, compreensão, ensinamentos, paciência e por estar sempre presente durante todo o período de desenvolvimento da pesquisa. Agradeço também pela convivência agradável e pela confiança que foi em mim depositada. Aproveito ainda, para agradecer às minhas coorientadoras, professora Dr^a. Renata Bonomo e Dr^a. Cristiane Veloso que juntamente com o professor Evaldo serviram uma excelente orientação, de maneira que foi possível concluir todas as etapas do experimento dentro do prazo.

Aos demais professores do Programa de Pós-graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos (PPGECAL), pela contribuição direta e indireta no desenvolvimento da minha pesquisa e além de tudo, por cada ensinamento adquirido através dos conteúdos das disciplinas ministradas.

Aos meus companheiros de pesquisa, os IC's Mário, Raiza e Alesson, que estiveram comigo nos dias de laboratório e dedicaram seu tempo e paciência. Agradeço também ao pesquisador Dr. Mateus Santos por ter prestado assistência necessária, tirando dúvidas, informando, orientando e fornecendo materiais que foram importantes no desenvolvimento da pesquisa.

À minha querida amiga Lorena que me apresentou o PPGECAL e me incentivou a viver essa experiência, por acreditar e me fazer acreditar no meu potencial. Agradeço pela amizade e companheirismo desde sempre.

Às minhas queridas amigas, que me abrigaram no período em que estive em Itapetinga: Sylvania, Jéssica, Karine e Roberta. Sou grata pela convivência incrível, pelas brincadeiras e aventuras na Carlota's Home.

A todos os colegas do Laboratório de Engenharia de Processos (LEP) pela companhia diária, ajuda e momentos de confraternização. E à Amanda, Thinara e Josane, pertencentes aos demais laboratórios, que também se prontificaram a ajudar-me todas as vezes que as solicitei.

Aos integrantes da banca examinadora, por aceitarem o convite e contribuir significativamente com o aperfeiçoamento deste trabalho.

À Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia e ao Programa de Pós-graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos pelo aprendizado ao longo do curso e por disponibilizar os equipamentos e reagentes que foram necessários para a execução das análises.

Muito Obrigada!

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS	XI
LISTA DE TABELAS	XIII
RESUMO	XIV
ABSTRACT	XV
CAPÍTULO 1.	XVI
1. INTRODUÇÃO GERAL	17
2.REFERENCIAL TEÓRICO.	20
2.1 Peptídeos bioativos.....	20
2.2 Peptídeos antioxidantes	21
2.2.1 Métodos de determinação da capacidade antioxidante.....	23
2.3 Caseína do leite de cabra	25
2.4 Enzimas	27
2.4.1 Enzimas proteolíticas.....	28
2.4.1.1 Pepsina	29
2.5 Imobilização de enzimas	31
2.5.1 Métodos de imobilização	33
2.5.1.1 Métodos físicos	33
2.5.1.1.1 Adsorção	33
2.5.1.1.2 Confinamento	33
2.5.1.2 Métodos químicos	34
2.5.1.2.1 Ligação covalente	34
2.5.1.2.2 Ligação cruzada (Cross-linking)	35
2.6. Imobilização de pepsina: métodos e suportes utilizados	35
2.7. Carvão ativado	39
2.8 Modificações no carvão ativado	40
3. OBJETIVOS	43
3.1 Geral	43
3.2 Específicos.....	43
4. REFERÊNCIAS	44
CAPÍTULO 2.	62
Imobilização da pepsina em carvão ativado e funcionalizado com glutaraldeído e genipina para síntese de peptídeos antioxidantes.	62
Resumo	63
1. INTRODUÇÃO	63

2. MATERIAL E MÉTODOS	65
2.1 Obtenção da caseína do leite de cabra	65
2.2 Caracterização do material precursor do carvão ativado.....	65
2.3 Síntese e modificações do carvão ativado	65
2.4 Caracterização dos carvões.....	66
2.4.1 Medidas de porosidade, área superficial específica (BET), FTIR, MEV e pH do Ponto de Carga Zero (pH _{PCZ})	66
2.5 Ensaio de imobilização da pepsina	67
2.5.1 Determinação da atividade enzimática	68
2.5.2 Determinação dos ciclos de reuso dos biocatalisadores	69
2.6 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).....	69
2.7 Perfil cromatográfico dos peptídeos obtidos a partir da hidrólise da caseína do leite caprino.....	70
2.8 Determinação do potencial antioxidante <i>in vitro</i> dos peptídeos obtidos da hidrólise da caseína caprina.....	70
2.8.1 Capacidade de sequestro do radical DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl)	70
2.8.2 Potencial antioxidante de redução férrica (FRAP).....	70
2.8.3 Inibição da oxidação do β -caroteno:ácido linoleico.....	71
2.9 Análise estatística.....	72
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	72
3.1 Caracterização do material precursor	72
3.2 Caracterização dos suportes.....	72
3.2.1 Medidas de porosidade, área superficial específica (BET), MEV, FTIR e pH do Ponto de Carga Zero (pH _{PCZ})	73
3.3 Ensaio de imobilização da pepsina	76
3.3.1 Efeito do tipo de modificação no carvão ativado na imobilização e capacidade de hidrólise da enzima livre e imobilizada em tempos diferentes	76
3.3.2 Ciclos de reutilização	79
3.4 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) dos hidrolisados.....	81
3.5 Perfil cromatográfico dos peptídeos obtidos a partir da hidrólise da caseína do leite caprino....	82
3.6 Potencial antioxidante <i>in vitro</i> dos peptídeos obtidos da hidrólise da caseína caprina.....	83
4. CONCLUSÕES	86
5. REFERÊNCIAS	87

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

Figura 1 - Redução do complexo Fe ³⁺⁺ - TPTZ a Fe ²⁺ - TPTZ por meio de um antioxidante.....	24
Figura 2 - Reação entre DPPH e um antioxidante para formar DPPH• reduzido.....	25
Figura 3 - Representação da estrutura da pepsina.....	30
Figura 4 - Representação das estruturas químicas do geniposídeo e da genipina.....	42

CAPÍTULO 2

Figura 1. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) do carvão ativado (CA) e após funcionalização com extrato de genipina 50% e 100% (CAG 50% e CAG 100%) (fig. A, B e C, respectivamente).....	74
Figura 2. FTIR do carvão ativado (CA) e dos carvões modificados com Glutaraldeído (CF), Genipina 50% e 100% (CG 50% e CG 100%, respectivamente).....	74
Figura 3. Capacidade de hidrólise da pepsina livre e imobilizada no carvão ativado (CA), carvão funcionalizado (CAF), carvão com extrato de genipina 50% e 100% (CAG 50% e CAG 100%) nos tempos de 60min, 90min e 120min.....	78
Figura 4. Capacidade de hidrólise e eficiência da hidrólise para os ciclos de reutilização dos biocatalisadores nos tempos de 60 min (A), 90 min (B) e 120 min (C).....	80
Figura 5. Imagem do gel de eletroforese SDS-PAGE e bandas formadas a partir do peso molecular de amostras do leite caprino (L1) e dos hidrolisados obtidos com a enzima livre e imobilizada após 60 minutos reacionais (L2, L3, L4, L5 e L6).....	81
Figura 6. Cromatograma da caseína caprina (a) e dos peptídeos obtidos a partir da hidrólise com a pepsina livre (EL) e imobilizada no carvão ativado (CA) e modificado (CAF, CAG 50% e CAG 100%) a 60 min (b), 90 min (c) e 120 min (d).....	82
Figura 7. Atividade antioxidante de inibição do radical DPPH dos peptídeos gerados pela hidrólise da caseína do leite de cabra com a enzima livre (EL) e imobilizada nos carvões (CA, CAF, CAG 50% e CAG 100%) em diferentes tempos de hidrólise (60 min, 90 min e 120 min).....	83
Figura 8. Atividade antioxidante pela inibição da oxidação do sistema β-caroteno-ácido linoleico dos peptídeos gerados pela hidrólise da caseína do leite de cabra com a enzima livre (EL) e imobilizada nos carvões (CA, CAF, CAG 50% e CAG 100%) em diferentes tempos de hidrólise (60 min, 90 min e 120 min).....	84

Figura 9. Atividade antioxidante pelo método FRAP dos peptídeos gerados pela hidrólise da caseína do leite de cabra com a enzima livre (EL) e imobilizada nos carvões (CA, CAF, CAG 50% e CAG 100%) em diferentes tempos de hidrólise (60 min, 90 min e 120 min).....85

LISTA DE TABELAS**CAPÍTULO 1**

Tabela 1 - Desempenho da pepsina imobilizada em diferentes métodos e suportes.....	36
---	----

CAPÍTULO 2

Tabela 1 - Propriedades texturais do carvão ativado (CA) e funcionalizado com glutaraldeído (CAF) e solução de extrato de genipina (CAG 50 e CAG 100) determinadas por adsorção/dessorção de N ₂	73
--	----

Tabela 2 - Ponto de Carga Zero (pH _{pcz}) do carvão ativado (CA) e dos carvões modificados com Glutaraldeído (CAF) e Genipina (CAG 50 e CAG 100).....	76
--	----

Tabela 3 - Efeito da funcionalização do carvão ativado na imobilização da enzima em pH 3,0.....	77
--	----

RESUMO

SOUSA, N. F. C. **Imobilização de pepsina em diferentes suportes modificados (à base de carvão ativado) e o potencial uso para obtenção de peptídeos antioxidantes a partir da hidrólise da caseína caprina.** Itapetinga – BA: UESB, 2023. 94P. (Dissertação – Mestrado em Engenharia e Ciências de Alimentos) *.

A imobilização de enzimas é uma técnica que vem sendo bastante utilizada com o intuito de melhorar o desempenho e a seletividade destes catalisadores naturais, além de permitir a reutilização e a fácil separação do meio reacional. Dentre os suportes estudados, os carvões ativados destacam-se por possuírem características físico-químicas importantes para o processo e por serem materiais com baixo custo de produção. As modificações químicas em sua superfície contribuem para a formação de ligações mais resistentes e estáveis como as ligações covalentes e por isso são bastante visadas. Os biocatalisadores produzidos pela imobilização de enzimas proteolíticas em carvão modificado, podem ser utilizados na obtenção de peptídeos bioativos, estes podem desempenhar vários benefícios para a saúde, incluindo a ação antioxidante. O objetivo deste estudo foi imobilizar a pepsina em carvão ativado sintetizado a partir do caroço de umbu e funcionalizado com glutaraldeído e/ou extrato de genipina, e aplicá-lo na hidrólise da caseína caprina para a obtenção de peptídeos com atividade antioxidante. Foram realizadas as modificações com glutaraldeído e/ou genipina (50 % e 100 % da solução de extrato) na superfície dos carvões. O uso do carvão ativado e modificado resultou numa alta eficiência de imobilização da pepsina, destacando-se o CAG 50 que apresentou 99 % de massa adsorvida, além disso, obteve maior atividade em comparação às demais modificações. Verificou-se que o tempo de hidrólise influenciou na produção de tirosina, sendo os maiores picos de produção aos 60 min para a EL, CA, e CAF, enquanto que o CAG 50 e CAG 100 manteve a produção até os 90 min. Os biocatalisadores mostraram atividade residual por 8 ciclos de uso, contudo, o CAG 50 obteve maior eficiência por 7 ciclos. A síntese de peptídeos através da hidrólise da caseína caprina foi alcançada pelos biocatalisadores e pela enzima livre, como mostram os resultados da cromatografia e eletroforese (SDS-PAGE). Os peptídeos apresentaram potencial como agente antioxidante, com uma atividade de captura do radical DPPH variando entre 29,8 % a 65,2 %, porcentagem de proteção contra a oxidação do β -caroteno/ácido linoleico variando entre 25,4 % a 62,61 % e potencial de redução férrica (FRAP), variando entre 456,1 μM Fe (II) a 601,6 μM Fe (II). Os melhores resultados foram obtidos com a enzima imobilizada no CAG 50 em combinação com tempos maiores de hidrólise (90 e 120 min). Conclui-se que a modificação química em carvão ativado com extrato de genipina proporcionou melhores efeitos na atividade catalítica da pepsina, em comparação aos métodos usuais, podendo ser uma possível alternativa para substituição do glutaraldeído. Os biocatalisadores produzidos a partir da imobilização da pepsina no CAG 50, foram capazes de produzir peptídeos com melhor potencial antioxidante do que a enzima livre, sendo resultados bastantes promissores.

Palavras-chave: Carvão ativado; Genipina; Imobilização; Pepsina; Peptídeos.

***Orientador:** DSc. UESB. Evaldo Cardozo de Souza Júnior; Co-orientadores: Dra. Renata Cristina Ferreira Bonomo e Dra. Cristiane Martins Veloso.

ABSTRACT

SOUSA, N. F. C. **Pepsin immobilization on different modified supports (based on activated carbon) and the potential use for obtaining antioxidant peptides from the hydrolysis of goat casein.** Itapetinga – BA: UESB, 2023. 94P. (Dissertation – Master in Food Engineering and Science) *.

Enzyme immobilization is a technique that has been widely used in order to improve the performance and selectivity of these natural catalysts, in addition to allowing reuse and easy separation of the reaction medium. Among the supports studied, activated carbons stand out because they have important physicochemical characteristics for the process and because they are materials with low production cost. Chemical modifications on its surface contribute to the formation of more resistant and stable bonds, such as covalent bonds, and are therefore highly sought after. The biocatalysts produced by the immobilization of proteolytic enzymes in modified charcoal can be used to obtain bioactive peptides, which can have several health benefits, including antioxidant action. The aim of this study was to immobilize pepsin on activated charcoal synthesized from umbu seeds and functionalized with glutaraldehyde and/or genipin extract, and apply it in the hydrolysis of goat casein to obtain peptides with antioxidant activity. Modifications were carried out with glutaraldehyde and/or genipin (50 % and 100 % of the extract solution) on the surface of the coals. The use of activated and modified charcoal resulted in a high efficiency of pepsin immobilization, highlighting the CAG 50 that presented 99 % of adsorbed mass, in addition, it obtained greater activity compared to the other modifications. It was found that the hydrolysis time influenced the production of tyrosine, with the highest production peaks at 60 min for EL, CA, and CAF, while CAG 50 and CAG 100 maintained production up to 90 min. The biocatalysts showed residual activity for 8 cycles of use, however, CAG 50 obtained greater efficiency for 7 cycles. The synthesis of peptides through hydrolysis of goat casein was achieved by biocatalysts and free enzyme, as shown by the results of chromatography and electrophoresis (SDS-PAGE). The peptides showed potential as an antioxidant agent, with a DPPH radical scavenging activity ranging from 29.8 % to 65.2 %, percentage of protection against β -carotene/linoleic acid oxidation ranging from 25.4 % to 62, 61 % and ferric reduction potential (FRAP), ranging from 456.1 μ M Fe (II) to 601.6 μ M Fe (II). The best results were obtained with the enzyme immobilized on CAG 50 in combination with longer hydrolysis times (90 and 120 min). It is concluded that the chemical modification of activated carbon with genipin extract provided better effects on the catalytic activity of pepsin, compared to the usual methods, and may be a possible alternative for glutaraldehyde replacement. The biocatalysts produced from the immobilization of pepsin in CAG 50 were able to produce peptides with better antioxidant potential than the free enzyme, with very promising results.

Key words: Biocatalyst; Activated charcoal; Genipin; immobilization; Pepsin.

*Advisor: DSc. UESB. Evaldo Cardozo de Souza Júnior; Co-advisors: Dr. Renata Cristina Ferreira Bonomo and Dr. Cristiane Martins Veloso.

CAPÍTULO 1.

INTRODUÇÃO GERAL

REFERENCIAL TEÓRICO

OBJETIVOS

REFERÊNCIAS

1. INTRODUÇÃO GERAL

A hidrólise enzimática de proteínas é uma estratégia amplamente difundida para melhorar suas propriedades químicas, funcionais e nutricionais. Durante a hidrólise as proteínas são quebradas em moléculas de menor tamanho, dando origem aos peptídeos e aminoácidos. Os peptídeos bioativos têm ganhado bastante atenção nos últimos anos por conferir benefícios para saúde e nutrição humana. As pesquisas mostram que várias fontes de proteínas alimentares, como ovos, carne, peixes e vegetais, são capazes de originar peptídeos bioativos, contudo, as proteínas derivadas do leite são as mais mencionadas (MAZLOOMI-KIYAPEY et al., 2019; FILHO et al., 2019).

Os peptídeos derivados da caseína, apresentam diversas atividades biológicas e auxiliam em várias funções fisiológicas do organismo, das atividades descritas, incluem a antimicrobiana, antioxidante, anticoagulante, anti-hipertensiva e imunomoduladora. Dentre as atividades citadas, os peptídeos antioxidantes vêm ganhando bastante atenção devido a capacidade de substituir antioxidantes sintéticos que podem apresentar toxicidade e efeito cancerígeno. As funções dos antioxidantes são voltadas para o combate aos radicais livre, prevenindo o estresse oxidativo e o surgimento de enfermidades, assim como relacionadas à proteção do processo oxidativo, inibindo ou atrasando a deterioração de alimentos (BERNADO, 2018; OLAGUNJU et al., 2018; FILHO et al., 2019; GOMES et al., 2022).

As enzimas responsáveis por catalisarem a hidrólise das ligações peptídicas em proteínas são as proteases. Elas representam um dos grupos mais importantes de enzimas comerciais e industriais. As proteases têm importância particular na ciência e tecnologia de alimentos, sendo bastante utilizadas no preparo de hidrolisados protéicos, os quais podem conter peptídeos com diversas funcionalidades (MUTHU et al., 2017; SANTOS et al., 2022). Devido à sua enorme diversidade, a classificação das proteases é baseada principalmente no tipo de reação catalisada, em sua estrutura e em seu sítio ativo. De acordo com seu local de ação, são divididas em: exopeptidases quando clivam ligações peptídicas nas extremidades N ou C terminais e as endopeptidases quando clivam ligações peptídicas preferencialmente nas cadeias internas. Com base no seu sítio ativo, as proteases são chamadas de aspárticas, cisteína, serina e metalo proteases. As proteases também podem ser nomeadas de acordo com a faixa de pH em que atuam, sendo em ácidas, neutras ou alcalinas (AGUILAR; SATO, 2018; TAVANO et al., 2018).

A pepsina é uma protease aspártica, e juntamente com a tripsina está entre as de maior importância, em virtude de sua alta eficiência. Estas, são liberadas pelo estômago e pâncreas, respectivamente, e atuam em conjunto com a quimiotripsina no processamento de transformação das proteínas em peptídeos e aminoácidos essenciais, que irão desempenhar funções no organismo,

como crescimento muscular e produção hormonal (MORAN, 2016; SOUZA Jr et al., 2020). A pepsina de origem suína, bovina e microbiana representa 60 % das enzimas comercializadas no mercado mundial, e são destinadas para indústrias de couro, agroquímica, farmacêutica, de alimentos e etc. Ultimamente as pesquisas têm mostrado o potencial da pepsina na produção de peptídeos bioativos com diversas funcionalidades, tais como antioxidante, anti-hipertensiva, e antimicrobiana, o que aumenta ainda mais o interesse na busca por técnicas que visem melhorar as funções catalíticas da pepsina e desta forma, expandir suas aplicações (KOIRALA et al., 2021; BABA et al., 2021; SANCHEZ-REINOSO et al. 2021; SANTOS et al., 2022).

Apesar das excelentes perspectivas, as enzimas em sua forma nativa, apresentam algumas características que limitam a sua utilização em escala industrial como a solubilidade no meio reacional e a instabilidade operacional. Conforme mencionado por Petersohn Junior (2019) as enzimas apresentam baixa estabilidade térmica, atuam sob uma faixa estreita de pH e frequentemente possuem sensibilidade a solventes orgânicos, o que as tornam propensas a desnaturação e consequente inativação. Além disso, as enzimas estão na forma solubilizada no meio reacional, o que torna sua recuperação e reutilização problemática, podendo inclusive resultar na contaminação do produto.

Dos vários métodos desenvolvidos para sanar estes problemas, o mais difundido e amplamente utilizado é o método de imobilização de enzimas. A técnica de imobilização enzimática tem grande importância por permitir a reutilização de biocatalisadores, além de viabilizar uma fácil e eficiente separação destas moléculas do meio reacional. Com a imobilização, ainda é possível obter uma enzima com maior estabilidade operacional, maior especificidade e atividade, em comparação à sua forma livre (GONÇALVES, 2018; PETERSOHN JUNIOR, 2019; FICANHA et al., 2021). As técnicas empregadas para imobilizar enzimas em suportes sólidos são baseadas em mecanismos físicos e químicos. Nos métodos físicos há presença de interações fracas (ligações de hidrogênio, hidrofóbicas, interações eletrostáticas e forças de van der Waals), que tendem a ser reversíveis, entre a superfície do suporte e as moléculas da enzima, ao contrário dos métodos químicos, onde a enzima se fixa no suporte de forma irreversível por meio de ligações covalentes ou reticulação entre diferentes polímeros. Os principais métodos utilizados são a adsorção física, ligações covalentes, confinamento/encapsulação e reticulação (PETERSOHN JUNIOR et al., 2019).

Uma das grandes questões do processo de imobilização é a escolha do suporte. Esta depende das propriedades do material como: força mecânica, estabilidade física e química, caráter hidrofílico/hidrofóbico, capacidade da enzima de adsorção e o custo. Além disso, deve possuir uma quantidade suficiente de grupos funcionais na superfície que possam interagir com a enzima; apresentar propriedades mecânicas e dimensões que devem permitir seu desempenho estável e a

possibilidade de utilização repetida por muitos ciclos, ou aplicação de um processo contínuo (ZDARTA et al., 2018; FURLANI et al., 2020). A imobilização de biomoléculas por adsorção e formação de ligação covalente, utilizando carvão ativado como suporte (BRITO et al., 2017; SANTOS et al., 2019; SOUZA JUNIOR et al., 2020), vem atraindo muita atenção devido as características deste material como: a elevada área superficial, boa estabilidade química, mecânica e térmica, hidrofobicidade e insolubilidade (BASSAN et al., 2016).

As modificações químicas na superfície de carvões ativados surgem como uma alternativa para solucionar alguns entraves da imobilização por adsorção, visto que esse é um dos métodos mais empregado em carvões ativados. As modificações químicas possuem o objetivo de melhorarem o processo de fixação da enzima no suporte, favorecendo as ligações mais estáveis e irreversíveis como as ligações covalentes, sendo o método mais empregado o do glutaraldeído (SANTOS et al., 2022). O uso do glutaraldeído se deve à sua alta versatilidade, é simples, eficiente e pode melhorar a estabilidade de uma enzima por imobilização multiponto ou multisubunidade. O glutaraldeído tem a capacidade de reagir com os grupos amino primários da enzima e do suporte, resultando em um suporte heterofuncional, com capacidade de interação física e química (MO; QIU, 2020; ANDRADES et al., 2019). No entanto, pesquisas mostram que do ponto de vista da segurança, o glutaraldeído mostrou-se corrosivo, irritante, tóxico para os seres humanos e perigoso para os organismos aquáticos. Por essas razões, a busca por outros agentes mais seguros e eficazes continua sendo um desafio contínuo (WANG et al., 2021).

É nesse contexto, que surge a genipina, que é sintetizada a partir do geniposídeo, mais comumente encontrado em frutos das plantas *Genipa americana L.* (jenipapo) e da *Gardenia jasminoides J. Ellis* (gardênia). Uma de suas características estruturais é a possibilidade de reagir com grupos amina primários de aminoácidos, peptídeos ou proteínas. Por ser um composto de origem natural, apresentar baixa toxicidade e sua afinidade por proteínas torna-se um agente de ativação ideal para a preparação de biocatalisadores a serem aplicados em alimentos e na área biomédica, podendo inclusive substituir outros agentes, como o glutaraldeído (FLORES et al., 2019; NEVES et al., 2022; ALBUQUERQUE et al., 2022).

Assim sendo, é importante realizar um estudo que avalia o efeito da modificação na superfície de carvões ativados com extrato de genipina, comparando com métodos já difundidos, como o método do glutaraldeído, na imobilização da pepsina por adsorção física e ligação covalente, e o estudo do desempenho destes biocatalisadores na hidrólise da caseína caprina para síntese de peptídeos com propriedades antioxidante.

2. REFERÊNCIAL TEÓRICO

2.1. Peptídeos bioativos

O aumento da conscientização dos consumidores sobre os benefícios de uma alimentação saudável tem impulsionado estudos para o desenvolvimento de produtos funcionais que possam promover a prevenção de doenças. Dentre os alimentos considerados funcionais, os peptídeos bioativos, são cada vez mais reconhecidos como ferramentas úteis para melhorar a saúde e prevenir doenças crônicas, e por esse motivo, a busca por peptídeos bioativos derivados de alimentos tem aumentado exponencialmente (DALIRI et al., 2017; DE LIMA et al., 2020).

Os peptídeos bioativos são definidos como fragmentos de proteínas contendo de 2 a 20 aminoácidos e peso molecular de 10 kDa, que quando ingeridos apresentam efeitos positivos sobre a saúde dos consumidores (CHALAMAIAH et al., 2018). Estas moléculas são inativas enquanto criptografada na sequência nativa da proteína, mas podem ser liberados através da (a) hidrólise por enzimas digestivas, (b) micro-organismos proteolíticos e/ou (c) ação de proteases vegetais, animais ou microbianas. A forma mais utilizada para obtenção de peptídeos bioativos *in vitro* é através da hidrólise enzimática de moléculas de proteína (BRANDELLI et al., 2017).

Atualmente já foram identificados peptídeos bioativos a partir de hidrolisados de inúmeras proteínas de origem alimentar, especialmente derivadas do leite. No entanto, proteínas que exibem essas atividades biológicas também podem ser encontradas em ovos, na carne e em peixes, assim como em diferentes fontes vegetais de proteínas, como soja, trigo, entre outras (DE LIMA et al., 2020).

A atividade dos peptídeos bioativos depende de sua composição e da sequência de resíduos de aminoácidos, e alguns deles são conhecidos por exibir propriedades multifuncionais. Estas moléculas podem exibir, entre outras, propriedades antimicrobiana, antioxidantes, hipotensivas, imunomoduladoras, antitrombóticas ou opióides e, conseqüentemente, exercer efeitos, atuando nos sistemas nervoso, digestivo, cardiovascular e imunológico. Alguns peptídeos na fase de ensaios clínicos mostraram resultados muito promissores para o tratamento de doenças cardiovasculares, infecciosas e metabólicas (HAFEEZ et al., 2014; DE CASTRO; SATO, 2015; DE LIMA et al., 2020).

Em relação aos medicamentos tradicionais, os peptídeos bioativos possuem importantes vantagens competitivas devido as seguintes razões: 1) Eles têm alta especificidade para os seus tecidos alvo, resultando em pouca ou nenhuma toxicidade, e mesmo baixas concentrações podem ser efetivas. Esta característica é extremamente importante para o tratamento de doenças crônicas; 2) compostos químicos sintéticos que normalmente são usados como as drogas geralmente têm um

efeito cumulativo sobre o organismo. As substâncias sintéticas podem representar um problema ambiental devido à sua excreção, ainda na forma ativa. Em contraste, os peptídeos bioativos possuem pouca ou nenhuma acumulação no organismo e são facilmente degradados (DE CASTRO; SATO, 2015).

A crescente preocupação sobre a geração excessiva de radicais livres que podem estar envolvidos em muitos transtornos de saúde como diabetes mellitus, câncer, doenças neurodegenerativas e inflamatórias, além de estarem envolvidos com a deterioração de alguns alimentos através da oxidação de lipídios e pela formação de produtos secundários de peroxidação lipídica, tem aumentado o interesse nas substâncias antioxidantes. Os antioxidantes podem agir controlando os radicais livres, como também inibindo a deterioração dos alimentos. Os peptídeos bioativos são considerados como fonte natural para obtenção de peptídeos com atividade antioxidante e podem ser utilizados tanto na área farmacológica como na indústria de alimentos (OLIVEIRA FILHO et al., 2019).

2.2 Peptídeos antioxidantes

Os peptídeos antioxidantes são o segundo grupo mais estudado de peptídeos derivados de alimentos com atividade biológica, ficando atrás apenas dos anti-hipertensivos. Os peptídeos antioxidantes podem ser utilizados como aditivos em alimentos, protegendo naturalmente contra a oxidação, evitando defeitos sensoriais e nutricionais frequentemente associados aos padrões oxidativos. Também podem exercer sua função após a ingestão no organismo humano, diminuindo efeitos das espécies reativas de oxigênio e o risco de desenvolvimento de algumas doenças degenerativas, como doenças cardiovasculares, aterosclerose, neurodegenerativas ou certos tipos de câncer (NWACHUKWU; ALUKO, 2019; TOLDRÁ et al., 2020). Os antioxidantes agem inibindo ou retardando esses efeitos devido aos mecanismos de atuação sobre a reação de oxidação e o estresse oxidativo, neutralizando os radicais livres ao doar um átomo de hidrogênio ou um elétron, neutralizando os catalisadores pró-oxidantes, desativando as espécies reativadas de oxigênio e quelando metais de transição (SHAHIDI, 2015).

Devido ao potencial dos peptídeos antioxidantes, cresceu o interesse no seu uso em substituição aos antioxidantes sintéticos comumente utilizados na indústria de alimentos. Entre os antioxidantes sintéticos mais conhecidos e utilizados estão o butil-hidroxianisol (BHA), butil-hidroxi-tolueno (BHT) e butil-hidroxi-quinona (TBHQ) que, embora sejam eficazes, apresentam problemas de solubilidade, sabores residuais, potencial tóxico e efeitos cancerígenos (OLIVEIRA FILHO et al., 2019). Estudos realizados com diferentes alimentos, como ovos (YUAN et al., 2019; BENEDÉ; MOLINA, 2020), leite e seus derivados (MILLÁN, 2021; DIAS et al., 2019; DOS SANTOS et al., 2019; COSTA, 2021; MAGALHÃES et al., 2022), produtos cárneos

(O'SULLIVAN et al., 2017; WANG et al., 2018; GALLEGO et al., 2018; CHIANG et al., 2019), peixes (ABUINE et al., 2019; BORDBAR et al., 2019) soja (WANG et al., 2019; ZHANG et al., 2019), milho (REN et al., 2018; CHAI et al., 2020) farelo de arroz (LIU et al., 2019; PHONGTHAI; RAWDKUEN, 2020; ZAKY et al., 2022) e sementes (YE et al., 2018; MAZLOOMI-KIYAPEY et al., 2019; KIM et al., 2019), foram capazes de gerar hidrolisados com excelente potencial antioxidante.

Esta ação antioxidante dos hidrolisados proteicos é dependente da fonte das proteínas, do pré-tratamento do substrato proteico, do tipo de proteases utilizadas e das condições de hidrólise aplicada, que podem influenciar nas propriedades estruturais dos peptídeos como composição de aminoácidos, peso molecular e tamanho. A digestão enzimática é o método mais eficiente e confiável para produzir peptídeos com atividade antioxidante, sendo algumas das enzimas mais utilizadas: pepsina, tripsina, alcalase, papaína, bromelina, termolisina, promatex e aromazina, que podem ser aplicadas sozinhas ou em combinação (BORRAJO et al., 2019; NWACHUKWU; ALUKO 2019, WEN et al., 2020). Por exemplo, peptídeos com alta capacidade antioxidante foram obtidos através da hidrólise enzimática com pepsina de proteína extraída da semente de abóbora, por Mazloomi-Kiyapey et al., (2019). O hidrolisado com concentração enzimática de 1 % a 30 °C por 2 h apresentou a maior capacidade de captura do radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) com 82,07 %. A pepsina e a Tripsina foram aplicadas na hidrólise de ovas de peixe subutilizadas para produção de peptídeos antioxidantes por Chalamaiah et al., (2013). Os hidrolisados apresentaram excelentes atividades de captura do radical ABTS⁺ (ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolona-6)-sulfônico) variando de 32 a 97 % para hidrolisados com tripsina e 37 a 80 % para os hidrolisados com pepsina em diferentes concentrações. A hidrólise enzimática para produção de peptídeos pode ser potencializada através da combinação com outros tratamentos como relatado por Bamdad et al. (2017). Os autores obtiveram peptídeos com alta capacidade antioxidante nos ensaios de DPPH (captura do radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil) e FRAP (poder de redução férrica), utilizando proteases (tripsina, savinase, aromazina, termolisina, elastase) combinadas com Alta Pressão Hidrostática (HHP).

Com relação a sequência de aminoácidos, em uma revisão recente realizada por Wen et al., (2020), foi constatado que a quantidade e a posição dos aminoácidos hidrofóbicos (Leu, Val, Ala, Pro), aromáticos (Tyr, Trp, Phe, His), sulfurados (Cys, Met), ácidos (Glu, Asp) e básicos (Lys) contribuem para as atividades dos peptídeos antioxidantes. Os resíduos de aminoácidos hidrofóbicos podem melhorar a solubilidade dos peptídeos na fase lipídica e facilitar as interações entre o peptídeo e os radicais livres, melhorando assim a capacidade de inibir a peroxidação lipídica e capturar os radicais livres. Os aminoácidos aromáticos podem atuar diretamente como doadores

de hidrogênio e também estão associados a atividade antioxidante de combate aos radicais livres. De modo específico, as enzimas com capacidade de hidrolisar as ligações peptídicas próximas à leucina e aos aminoácidos aromáticos (fenilalanina, triptofano e tirosina), e o grupo fenil terminal na cadeia peptídica resultante, possuem melhor atividade de eliminação de radicais livres.

Os hidrolisados com resíduos de aminoácidos ácidos (Asp, Glu), também podem exibir boa interação com os radicais livres ou atividade de redução de cátions metálicos devido ao excesso de elétrons que podem ser facilmente doados (NWACHUCKWU; ALUKO, 2019). Peptídeos com a presença histidina e lisina também podem possuir a capacidade de interagir com íons metálicos (PHONGTHAI et al., 2018). O grupo tiol da cadeia lateral de Cys pode eliminar os radicais livres fornecendo átomos de hidrogênio, enquanto o átomo de S presente no resíduo de aminoácido Met é oxidado fornecendo elétrons (WEN et al., 2020).

A mudança no comprimento da cadeia peptídica durante a hidrólise tem um efeito importante na atividade antioxidante, e os peptídeos com menor peso molecular têm atividades antioxidantes mais fortes (WEN et al., 2020). Bamdad et al., (2017) ressalta que os peptídeos de menor tamanho, além de apresentarem melhor capacidade de captura de radicais livres, também podem apresentar melhor capacidade de redução de íons férricos, suprimindo seus efeitos pró-oxidantes. Isto relaciona-se com a densidade de carga, ou seja, peptídeos pequenos têm uma densidade de carga mais alta (razão carga/massa) do que peptídeos maiores, uma vez que os elétrons de suas cadeias laterais se tornam mais expostos.

2.2.1. Métodos de determinação da capacidade antioxidante

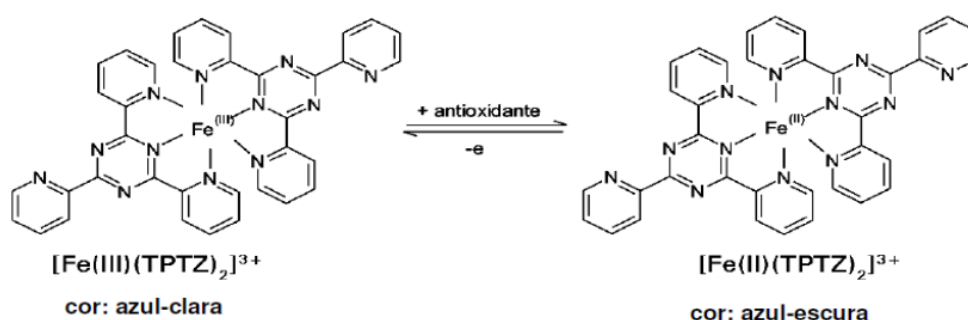
Os métodos de determinação da capacidade antioxidante são divididos de acordo com o mecanismo de atuação do antioxidante, que agem principalmente através da transferência de átomos de hidrogênio (TAH) em que será medida a capacidade direta de um antioxidante para extinguir os radicais livres por doação de hidrogênio. As reações de TAH são independentes do solvente e do pH e geralmente são bastante rápidas. E através da transferência de elétrons simples (TES), em que será detectada a capacidade de uma substância de transferir um elétron, reduzindo qualquer composto, incluindo metais, carbonilas e radicais. A reação é observada por meio de uma mudança na cor à medida que o oxidante é reduzido (APAK et al., 2016; GULCIN, 2020).

Dentre os diversos ensaios de determinação da capacidade antioxidante *in vitro* aplicados em hidrolisados e peptídeos de diversas fontes de proteínas, destacam-se: ORAC (Capacidade de Absorção de Radicais de Oxigênio), sistema β -caroteno:ácido linoleico, ABTS (captura do radical ácido 2,2'-azino-bis 3-etilbenzotiazolino-6-sulfônico), DPPH (captura do radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil) e FRAP (Poder redutor de íons férrico). Recomenda-se que pelo menos três, e de

preferência, que sejam combinados, de modo a proporcionar informação abrangente sobre a capacidade antioxidante (GULCIN, 2020; BENEDÉ et al., 2020).

O método de FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*) visa determinar a redução do ferro em fluidos biológicos e soluções aquosas de compostos puros. Neste método, o complexo férrico-tripiridiltriazina ($\text{Fe}^{\text{III}}\text{-TPZ}$) é reduzido ao complexo ferroso ($\text{Fe}^{\text{II}}\text{-TPZ}$), na presença de um antioxidante e em condições ácidas, como mostra Figura 1. O complexo formado por esta reação possui uma coloração azul intensa, com absorção máxima a 593 nm. Outro ensaio deste mesmo método, baseia-se na capacidade do antioxidante reduzir o íon ferrocianeto ($[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$) a ferrocianato ($[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$) que na presença do íon férrico (FeCl_3) forma um composto azul, devido a habilidade do antioxidante de transferir um elétron para a redução de radicais. O aumento da absorbância indica um maior poder redutor do antioxidante (PULIDO et al., 2000; BIBI SADEER et al., 2020).

Figura 1 - Redução do complexo $\text{Fe}^{3+} - \text{TPTZ}$ a $\text{Fe}^{2+} - \text{TPTZ}$ por meio de um antioxidante.



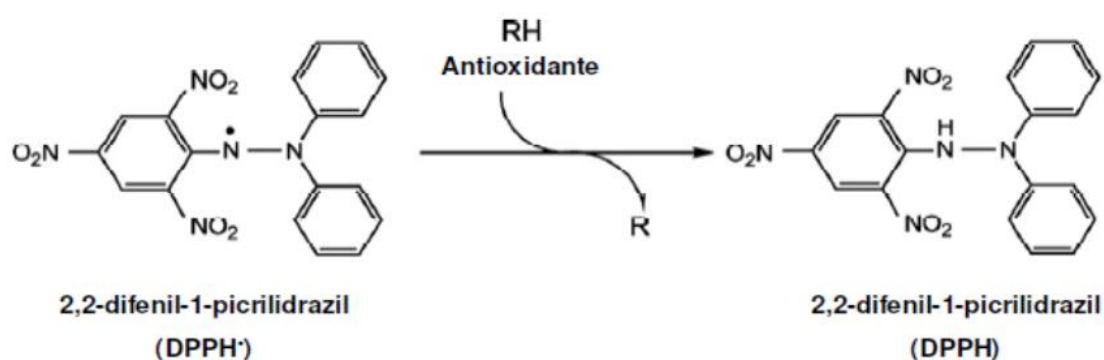
Fonte: RUFINO et al., (2006).

O DPPH é um método químico, aplicado para determinar a capacidade antioxidante de um composto em sequestrar radicais livres, sendo um dos mais utilizados, pois ele é considerado um método rápido, prático e com boa estabilidade. O DPPH (2,2-difenil-1-picrilidrazil) é um radical de nitrogênio orgânico, estável, de cor violeta, que possui absorção na faixa de 512-520 nm com absorção máxima em 517 nm. Na presença de um doador de hidrogênio ou elétron a intensidade de absorção diminui e a solução com o radical perde cor, tornando-se amarela, de acordo com o número de elétrons capturados, ou seja, quando o elétron desemparelhado do átomo de nitrogênio no DPPH recebe um átomo de hidrogênio proveniente de compostos antioxidantes, ocorre a mudança de cor. Quanto maior a descoloração, maior a capacidade redutora. A reação pode ser visualizada na Figura 2 (BIBI SADEER et al., 2020).

Quanto ao método de co-oxidação do sistema β -caroteno:ácido linoléico, esse é realizado em meio emulsionado, pela técnica de co-oxidação de substratos, sendo descrito inicialmente por Miller (1971). É um método colorimétrico, realizado em comprimento de onda de 470 nm, baseado na

leitura referente à descoloração da solução preparada com β -caroteno e ácido linoléico, em meio aquoso. A descoloração ocorre em função das estruturas radiculares formadas pela oxidação do ácido linoléico, que atacam as duplas ligações do β -caroteno, perdendo seu cromóforo, resultando na descoloração do pigmento alaranjado, característico da solução. A presença de antioxidantes no sistema protege o ácido linoléico, prolongando o período de formação dos radicais, desta forma, o método avalia a atividade de inibição de radicais livres gerados durante a peroxidação do ácido linoléico (DUARTE, et al., 2006; GUPTA, 2015).

Figura 2 - Reação entre DPPH e um antioxidante para formar DPPH• reduzido.



Fonte: SALVADOR, 2011.

2.3 Caseína do leite de cabra

O leite de cabra e seus derivados possuem propriedades benéficas para a saúde humana, e este é um dos fatores que tem impulsionado o seu consumo. O leite de cabra pode apresentar propriedades, como: (a) altos teores de determinados ácidos graxos benéficos ao organismo; (b) maior qualidade nutricional e terapêutica em comparação ao leite de vaca e humano; e (c) melhor digestibilidade, alcalinidade, teor de proteínas de alto valor nutritivo, hipoalergenicidade. Outro fator marcante, está relacionado às características sensoriais, especialmente o sabor e aroma típicos, que podem ser responsáveis pela aceitação ou rejeição dos produtos por parte dos consumidores. Além disso, a rusticidade do animal que facilita seu manejo, fazem desta atividade uma excelente opção para melhoria do nível nutricional da população e também para gerar emprego e renda para a sociedade (RISKÓ; CSAPÓ, 2019; DELGADO JÚNIOR et al., 2020).

O leite contém aproximadamente 3,5 % de proteína, que são divididas em caseínas e proteínas do soro do leite. As caseínas são os principais componentes (70-80 %) da proteína do leite de cabra e podem fornecer aminoácidos abundantes e peptídeos ativos, incluindo nanocristais de fosfato de cálcio, que contribuem para várias funções biológicas. A expressão genética da caseína na glândula mamária pode influenciar na síntese do conteúdo proteico e na qualidade do leite. As caseínas são classificadas como α , β , κ e γ -caseína, e no soro do leite, que correspondem a 20-30 %, e no soro do leite, que correspondem a 20-30 %, e no soro do leite, que correspondem a 20-30 %.

são encontradas a α -lactoglobulina, β -lactoglobulina e α -lactoalbumina e várias proteínas menores com diferentes tipos de atividades como enzimas, propriedades de ligação mineral e imunoglobulinas (DELGADO JÚNIOR et al., 2020; SUN et al., 2023).

Cerca de 95 % das caseínas no leite estão presentes na forma de partículas coloidais, conhecidas como micelas, que são as responsáveis pela estabilidade térmica do leite. A estrutura interna da micela de caseína é constituída predominantemente por α s1-, α s2-, β -caseína e de nanopartículas de fosfato de cálcio coloidal, enquanto que a κ -caseína está localizada preferencialmente na superfície da micela (FOX; BRODKORB, 2008; DALGLEISH, 2011).

O leite de cabra possui um conteúdo total proteico de 3,1 %, que geralmente é menor do que no leite de vaca (3,4 %). No entanto, as micelas de caseína do leite de cabra são formadas principalmente pela β -caseína, que representam 53 % do total de caseínas, enquanto no leite de vaca não chega a 40 %. O leite de cabra possui quantidades de α s2-caseína e κ -caseína semelhantes ao leite bovino, mas a fração α s1-caseína é muito menor no leite caprino (15 % do total de caseína) do que no leite de vaca (38 % do total de caseína) (CRUZ et al., 2016; DELGADO JÚNIOR et al., 2020). Assim, 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 β -caseína do que as micelas de bovino (PULINA et al., 2018).

A baixa concentração da fração α s1- da caseína caprina, em comparação à fração similar da caseína bovina, corresponde ao principal fator pelo qual o leite de cabra vem sendo um potencial substituto do leite de vaca em lactantes e pacientes alérgicos. Embora esta seja uma das características do leite caprino mais explorada pelo comércio, as pesquisas mostram que a caseína de cabra também possui potencial para ser aplicada na produção de peptídeos bioativos (YUE et al., 2023; BARBOSA et al., 2020).

Carneiro et al., (2018), conseguiram obter peptídeos com atividade antimicrobiana sobre diferentes bactérias (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*) a partir da hidrólise da caseína do leite de cabra utilizando as enzimas pepsina e tripsina. Magalhães et al., (2022) obtiveram peptídeos com ação antioxidante em hidrolisados obtidos da caseína do leite de cabra. Os hidrolisados gerados pela alcalase apresentaram excelente capacidade de captura do radical DPPH e ABTS. Ibrahim et al., (2017) obtiveram peptídeos com alto potencial de inibição da enzima conversora de angiotensina (ECA) a partir da hidrólise da caseína e do soro do leite de cabra utilizando a pepsina. Em outro estudo, a hidrólise da caseína do leite de cabra com pepsina foi

capaz de originar peptídeos com potencial anticarcinogênico contra as células do carcinoma colorretal humano (80,92 % de morte celular) (CAKIR; AKBAY, 2021).

De forma geral, as caseínas possuem vários peptídeos biologicamente ativos. No entanto, esses peptídeos permanecem inativos desde que permaneçam ligados a outros aminoácidos na estrutura primária. 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, tem ganhado destaque devido ao aumento no valor agregado e menor eliminação de resíduos. A hidrólise enzimática de moléculas de proteínas é a forma mais comum de produzir peptídeos bioativos (DALIRI et al., 2017; TOLDRÁ et al., 2020).

2.4 Enzimas

Enzimas são moléculas orgânicas que realizam reações de catalisação, aumentando a velocidade de uma reação pela redução da energia de ativação. Elas são essenciais ao funcionamento dos organismos vivos, estão envolvidas em atividades que mantêm o equilíbrio do indivíduo tais como a digestão, produção e gasto de energia, crescimento celular, equilíbrio hormonal e outros. Possuem vantagens em relação aos catalisadores inorgânicos ou sintéticos por atuarem em condições brandas de pH e temperatura, conseguirem atuar em ambiente aquoso, além de serem altamente específicas. Com isso, as enzimas podem reduzir o número de etapas de reação e as quantidades de solventes perigosos necessários e, assim, tornar um processo mais barato e ecologicamente correto (SHELDON; WOODLEY, 2018; MAMO; ASSEFA et al., 2018; NASCIMENTO et al., 2021).

As enzimas possuem condições ótimas de pH, força iônica, temperatura, concentração de substrato, composição do solvente etc., que irão favorecer a sua máxima atividade enzimática, porém alterações desses parâmetros ótimos podem levar a desnaturação enzimática, que corresponde a mudanças estruturais e perda da sua função catalítica (DE OLIVEIRA et al., 2022).

As enzimas destacam-se pela sua especificidade enzimática que é a capacidade de reagir com apenas um tipo específico de substrato, devido à disposição tridimensional de resíduos de aminoácidos específicos que formam seu sítio ativo. Esta atividade biológica particular, baseia-se nas interações entre o sítio ativo da enzima com a molécula do substrato/inibidor, chamados de reação enzima-substrato ou teoria do encaixe induzido. Já a condição de alta seletividade enzimática ao substrato está relacionada com a natureza quiral do sítio ativo, que é capaz de executar diversos tipos de interações não covalentes específicas, como: ligações de hidrogênio, interações de Van der Waals, interações eletrostáticas entre outras (BEZERRA et al, 2015; BILAL; IQBAL, 2019).

Devido a estas especificidades, as enzimas possuem diversas aplicações, como nas indústrias têxtil, farmacêutica, de alimentos e de papel e celulose. Com a popularidade, aumentou o interesse na obtenção de enzimas a partir de outras fontes, como vegetais, animais e microbiológicas. Assim, cada biocatalisador acaba possuindo um caráter bastante específico, agindo em um substrato particular para produzir um determinado produto a partir da reação catalisada (ANTUNES et al., 2017; TARAFDAR et al., 2021; DE OLIVEIRA et al., 2022).

Dentre a categoria de enzimas, as proteolíticas ganham destaque, sendo a classe com uma das maiores aplicações comerciais e responsáveis por movimentar grande parte do comércio internacional de enzimas (SANTOS et al., 2022; BARBOSA et al., 2020).

2.4.1 Enzimas proteolíticas

As enzimas responsáveis pela clivagem das ligações peptídicas de proteínas, convertendo-as em menores unidades, como peptídeos e aminoácidos, são conhecidas como peptidases, proteases ou enzimas proteolíticas. As proteases pertencem à classe 3 das hidrolases e subclasse 3.4 que corresponde às peptídeo-hidrolases ou peptidases. As enzimas da subclasse EC 3.4 são subsequentemente classificadas como exopeptidases (EC 3.4.11-19) e endopeptidases (EC 3.4.21-99) (FERNANDES et al., 2018; ALVES, 2020).

As exopeptidases catalisam a hidrólise das ligações peptídicas nas extremidades N ou C terminal das cadeias polipeptídicas, sendo assim denominadas de aminopeptidases e carboxipeptidases, respectivamente. As endopeptidases atuam preferencialmente nas regiões internas das cadeias polipeptídicas (CHANDRAWANSHI et al., 2022). Outra classificação, diz respeito à natureza química do seu sítio catalítico ou mecanismo de ação, em que cada classe de protease apresentará um conjunto particular de aminoácidos no seu sítio ativo. Sendo assim classificadas em 4 grupos: (i) serino proteases (EC 3.4.21), que apresentam a tríade catalítica composta por Ser, His e Asp; (ii) cisteíno proteases (EC 3.4.22), apresentam os aminoácidos Cys, Asp e His; (iii) asparticoproteases (EC 3.4.23), possuem dois aminoácidos de Asp; e (iv) metaloproteinases ou metaloproteases (EC 3.4.24), responsáveis por apresentar um íon metálico no sítio ativo (DORNELLES et al., 2018).

As proteases desempenham um papel importante na indústria da biotecnologia, uma vez que a hidrólise pode alterar as propriedades químicas, físicas e imunológicas das proteínas. Elas correspondem a aproximadamente 25 % das biomoléculas produzidas para fins industriais e 60 % do comércio mundial de enzimas (FERNÁNDEZ-LUCAS et al., 2017; LIU et al. 2018; ALVES, 2020). Dados do mercado global mostram que em 2019 houve um faturamento de US\$ 5,6 bilhões e

deve crescer a uma taxa composta de crescimento anual (CAGR) de 6,4 % de 2020 a 2027 (MARKET ANALYSIS REPORT, 2020).

Essas enzimas são amplamente destinadas para as indústrias farmacêuticas (produção de trombolíticos, auxiliar em digestão e cicatrização de feridas), de cosméticos (limpeza profunda da pele, cicatrização e tratamento depilatório), têxteis (tratamento de couro, lã e seda), fotográficas (recuperação de prata), de produtos de limpeza (detergentes e soluções de higienização de lentes de contatos, materiais cirúrgicos e membranas filtrantes), para química fina (produção de insulina humana semissintética, síntese de di- e tripeptídeos) (SANTOS et al., 2016).

Na indústria de alimentos, as proteases atuam nos processos de tenderização de carnes, clarificação de bebidas, indústria de panificação, produção de xaropes de alta maltose, realçar o sabor, tratamento de resíduos, preparo de hidrolisados proteicos, entre outros. As enzimas digestivas, como pepsina e tripsina estão entre as de maior importância, em virtude de sua alta eficiência (SOUZA JÚNIOR et al., 2020; SANTOS, 2022).

2.4.1.1 Pepsina

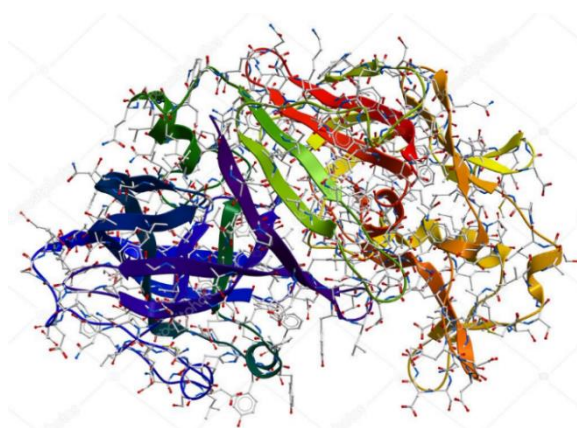
A pepsina (EC 3.4.23.1) (Figura 3) é uma das principais enzimas digestivas encontradas no organismo humano, onde desempenha a importante função de decompor as macromoléculas encontradas nos alimentos e favorecer a fácil absorção desses nutrientes pelo intestino. Também pode ser encontrada em outros organismos, tais como vírus, protozoários, plantas, invertebrados e vertebrados. A enzima ativa é derivada de sua pró-enzima pepsinogênio, que é secretada no lúmen das glândulas gástricas pelas células principais. O pepsinogênio é uma molécula que possui dois lóbulos terminais (N e C), que são estáveis em pH alcalino, no entanto, quando ocorre a diminuição no pH para valores abaixo de 5, observado no início do processo digestivo, o lóbulo N-terminal é removido, liberando pepsina ativa com peso molecular entre 34 e 37 kDa (STANFORTH et al., 2022).

A pepsina é classificada como uma endopeptidase aspártica, com alta porcentagem de resíduos ácidos. Possui a especificidade de clivar as ligações peptídicas entre aminoácidos hidrofóbicos, como fenilalanina, triptofano ou tirosina. A atividade da pepsina, pode ser afetada pelas condições do meio de dissolução, sendo os meios ácidos, simulando o fluido gástrico (pH 1-3), sua atividade máxima (MORELLON-STERLING et al., 2022).

A pepsina, principalmente de origem suína, bovina e microbiana, é uma das enzimas industriais mais importantes. Possui aplicação em múltiplas indústrias como curtimento de couro, detergente, agroquímica, indústria alimentícia e farmacêutica. Além disso, estudos apontam que a pepsina pode ser utilizada na produção de peptídeos bioativos com atividade antioxidante

(SANTOS et al., 2022; KOIRALA et al., 2021; ZAKY et al., 2020) anti-hipertensiva (BABA et al. 2021; HAN et al. 2021), antimicrobiana (CHOYAM et al., 2021; SANCHEZ-REINOSO et al. 2021) e muitas outras atividades biológicas e propriedades funcionais, como por exemplo, o observado em um trabalho realizado por Mazloomi e seus colaboradores (2021), no qual foi obtido peptídeos com capacidade antidiabéticas, além de atividade antimicrobiana e anti-hipertensiva, todas com propriedades gastrointestinais resistentes. Outro exemplo, foi observado em um trabalho realizado por Hsieh et al., (2022), onde a pepsina foi utilizada para produzir hidrolisados de extrato de soja com capacidade imunomoduladora, enquanto que Qian et al., (2020), utilizaram pepsina para produzir hidrolisados do tecido mole de ostras, no qual foi obtido peptídeos com atividade anti-inflamatória.

Figura 3. Representação da estrutura da pepsina.



Fonte: SCIENCESTRUCK, (2022). Disponível em: <https://sciencestruck.com/pepsin-enzyme-structure-function-important-facts>.

Outros trabalhos com pepsina, mostram a capacidade de redução da alergenicidade de certas proteínas, e isso está intimamente relacionado com uma das funções indicadas para esta enzima no sistema digestivo humano, uma vez que, ela tem um papel importante na redução do risco de peptídeos alergênicos atingirem o lúmen intestinal. Desta forma, a pepsina pode ser utilizada na produção de hidrolisados ou peptídeos, que além de possuírem atividades biológicas, apresentam alergenicidade reduzida (AZDAD et al., 2018; ZHANG et al. 2020; HE et al. 2021).

A produção de peptídeos bioativos pode ser alcançada utilizando muitas proteases diferentes, sozinhas ou em combinação. No entanto, é possível destacar que a pepsina apresenta algumas vantagens em relação as demais, em virtude de sua seletividade. Devido a sua afinidade em clivar as ligações envolvendo aminoácidos hidrofóbicos, os peptídeos liberados terão aminoácidos hidrofóbicos em sua posição final como leucina, isoleucina ou valina. Esses peptídeos têm melhor atividade antioxidante e atividade inibidora da ECA do que peptídeos sem esses grupos terminais

hidrofóbicos. Isso faz com que a pepsina seja uma protease de grande interesse para a obtenção de peptídeos com fortes atividades biológicas (TEJPAL et al., 2017; NWACHUKWU; ALUKO, 2019; COTABARREN et al., 2019; TACIAS-PASCACIO et al., 2020).

2.5 Imobilização de enzimas

Enzimas são biocatalisadores amplamente utilizados em diferentes processos industriais devido à sua alta atividade, seletividade e especificidade em relação aos catalisadores químicos. São capazes de produzir compostos complexos sob condições de reação muito suaves, o que permite o desenvolvimento de processos mais sustentáveis (SHELDON; WOODLEY, 2018). Apesar disso, sua utilização em alguns processos industriais tem sido limitada, devido ao seu alto custo associado a utilização de enzima com elevada pureza, pela sua baixa estabilidade operacional em determinadas condições operacionais, e ainda pela dificuldade de separação da enzima do produto final, impedindo sua reutilização, tornando assim difícil sua utilização em processos contínuos e aplicações em larga escala (NGUYENA; KIM, 2017). Contudo, a imobilização enzimática é uma das estratégias mais úteis para superar estas limitações, favorecendo o uso da enzima em diversos processos tecnológicos (ANDRADES et al. 2019).

Uma das definições mais abrangentes define o termo “enzima imobilizada” como enzimas fisicamente confinadas ou localizadas em uma determinada região de espaço definida, com retenção da sua atividade catalítica, que pode ser utilizado várias vezes e continuamente (BRENA et al., 2013). Tendo seu primeiro relato em 1916, por Nelson e Griffin, quando verificaram que a invertase adsorvida em carvão ativado mantinha sua atividade e não era retirada com as lavagens, a partir dessa época vários métodos de imobilização foram desenvolvidos (CALIFANO; COSTANTINI, 2020).

Ao imobilizar uma enzima é possível obter um biocatalisador com atividade e estabilidade que não sejam afetadas durante o processo, em comparação à sua forma nativa. A utilização de suportes e/ou técnicas que evitem as alterações estruturais no sítio ativo deve ser favorecida, de modo a evitar perdas de atividade catalítica durante sua utilização. As vantagens conferidas são a reutilização das enzimas; os processos químicos podem ser continuamente operados e controlados; facilidade na separação dos produto-substrato; perdas de enzimas por dessorção minimizadas; repetibilidade do processo e a alta estabilidade (REIS et al., 2019; TACIAS-PASCACIO et al., 2020). Apesar das vantagens, existe algumas desvantagens associadas aos procedimentos de imobilização como: mudanças conformacionais da estrutura da enzima, devido ao tipo de imobilização, levando a imobilização numa forma inativa; possível perda da atividade enzimática durante o processo de imobilização; e os efeitos difusionais causados pelo baixo transporte do substrato e do produto em decorrência de limitações do acesso do substrato ao sítio ativo da enzima.

De modo que o custo da imobilização, bem como os métodos a serem utilizados devem ser compensados pela vida útil do 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 (FERNANDEZ-LOPEZ et al., 2017).

A escolha do suporte onde a enzima será imobilizada representa uma decisão crucial para o sucesso do método. Um suporte adequado para imobilização enzimática deve apresentar características como: ser inerte, estável, não possuir interações com o sítio da enzima que dificulte sua atuação, possuir resistência mecânica para permitir múltiplos ciclos de uso, rentável, não apresentar toxicidade, deve possuir ainda grande área superficial específica, carga superficial e porosidade. Nos últimos anos, vários novos suportes foram desenvolvidos e modificados para possuir características benéficas para imobilizar enzimas alimentares, que são classificados orgânicos e inorgânicos (BILAL et al., 2019; KAUR et al., 2021; MORELLON-STERLING, 2022; XIE et al., 2022). Os orgânicos são preparados usando biopolímeros como alginato, carragenina, quitosana e poliacrilamida. As vantagens desses materiais são a biocompatibilidade, biodegradabilidade, bioestabilidade e biofuncionalidade. Além disso, os biopolímeros estão disponíveis em abundância e podem ser facilmente recuperados de fontes naturais sob condições de reação brandas (HORUE et al. 2021). Já os materiais inorgânicos usados na imobilização incluem sílica, silicatos, alumina, titânia, borossilicatos, aluminossilicatos e outros óxidos. As características dos inorgânicos incluem insolubilidade em água, alta resistência mecânica, resistência química, capacidade de formar alta área superficial e reatividade a agentes derivatizantes (YUSHKOVA et al. 2019).

A imobilização de proteínas pode ser subdividida em métodos químicos e físicos. Os métodos químicos envolvem a formação de ligações covalentes obtidas pela ligação de éter, tio-éter, amida ou carbonato entre a enzima e o suporte ou ainda por meio de ligações cruzadas, a qual as proteínas são imobilizadas a partir da reação direta com um agente reticulante. Os métodos físicos são caracterizados por ligações mais fracas, como ligações de hidrogênio, ligação por afinidade, forças de Van der Waals, interações hidrofóbicas e ligação iônica entre a enzima e o suporte. As proteínas podem também ser encapsuladas/aprisionadas no suporte. É importante ressaltar que o método de imobilização deve garantir a estabilidade enzimática durante longos períodos, evitar sua dessorção, torná-la reutilizável e permitir a livre difusão de substratos e produtos da reação (FERNANDEZ-LOPEZ et al., 2017; GONÇALVES et al., 2019; FURLANI et al., 2020).

2.5.1 Métodos de imobilização

2.5.1.1 Métodos físicos

2.5.1.1.1 Adsorção

A imobilização de enzimas por meio do método de adsorção física foi uma das primeiras técnicas reportadas. Trata-se de um método simples e reversível de imobilização, podendo ocorrer por meio de interações hidrofóbicas, ligações de hidrogênio e forças de Van der Waals. As vantagens da imobilização por adsorção estão na facilidade e simplicidade da técnica que permite a imobilização sob condições brandas, a possibilidade de alta retenção da atividade enzimática visto que não há grandes modificações estruturais na biomolécula, uma vez que a enzima pode ser imobilizada em uma orientação que lhe é preferencial e energeticamente favorável e, a reversibilidade que permite a reutilização dos suportes. Além disso, possui baixo custo e de fácil execução (TORRES et al. 2017; FURLANI et al. 2020).

No entanto, o método apresenta algumas desvantagens como a aleatoriedade da interação enzima-suporte e a possibilidade de dessorção por meio de variações de temperatura, pH e força iônica. Como alternativa para contornar essas desvantagens, diversos métodos foram desenvolvidos nos últimos anos, como por exemplo a modificação química do suporte e a utilização de agentes reticulantes (FURLANI et al., 2020).

2.5.1.1.2 Confinamento

A imobilização por confinamento (aprisionamento ou encapsulação) é definida como um método físico e irreversível de imobilização onde a enzima ficará confinada na estrutura do suporte. Este método envolve a polimerização *in situ* da matriz porosa em torno das enzimas a serem imobilizadas sem a ocorrência de reação entre enzima e suporte, por tanto, ocorre a incorporação da enzima como parte da mistura reativa a ser polimerizada e à medida que a polimerização prossegue a matriz é formada em torno da enzima com tamanho de poros a permitir que as moléculas de substratos e produtos de pesos moleculares adequados possam se difundir através e dentro da rede polimérica (GONÇALVES, 2018; FURLANI et al. 2020; BILAL; IQBAL, 2019). Diversas matrizes são comumente utilizadas para aprisionamento de enzimas, como as a base de quitosana, alginato, sílica mesoporosa, colágeno, poliuretano, triacetato de celulose, poliacrilamida, gelatina, ágar, borracha de silicone e álcool polivinílico (LIU et al., 2018; RICARDI, 2021; BENIWAL et al. 2018).

As vantagens desse método são: a redução da perda de atividade devido à inativação ou distorção do sítio ativo, uma vez que não há formação de interações químicas com o suporte, evitando problemas conformacionais; minimiza a inativação da enzima por solventes orgânicos e pode ser utilizado para imobilizar uma ampla variedade de enzimas (GONÇALVES, 2018). As

limitações deste método estão associadas especialmente aos problemas relacionados ao controle da porosidade do suporte, dificultando a transferência de massa do substrato para o sítio ativo da enzima, bem como perdas da enzima por dessorção através da matriz. Além disso, muitos precursores utilizados na polimerização das matrizes podem resultar na desnaturação das enzimas (CAO et al., 2016; LIU et al., 2018).

2.5.1.2 Métodos químicos

2.5.1.2.1 Ligação covalente

A ligação covalente é o método mais convencional e eficaz para a imobilização de enzimas. Nessa técnica, ligações covalentes são formadas por meio de ligações químicas entre a superfície funcionalizada do suporte e aminoácidos da cadeia lateral de enzimas, como lisina, cisteína ou resíduos de ácido aspártico e glutâmico. Os grupos funcionais expostos nas superfícies dos suportes e que são favoráveis à formação de ligações covalentes incluem grupos amino, ácido carboxílico, fenol, imidazol, indolil, tiol, entre outros. Trata-se de um processo irreversível e, portanto, não há como reutilizar o suporte quando a enzima imobilizada perder sua atividade (LIU et al., 2018). Para eficiência do método, é importante que o grupo funcional presente na enzima seja não essencial para a sua atividade enzimática (NGUYEN; KIM, 2017). Geralmente, é realizada em três etapas sucessivas: a ativação inicial do suporte, a modificação e a ligação da enzima com o suporte. O glutaraldeído e o glioxil são dois dos reagentes mais utilizados na ativação de suportes e/ou como braço espaçador (REIS, et al. 2019).

Um dos principais benefícios obtidos com a imobilização covalente é o potencial para melhorar a vida útil do catalisador devido à estabilidade da ligação e consequente a diminuição da dessorção enzimática (BRITTON et al., 2018; LIU et al., 2018). Os benefícios podem ser conferidos devido a formação de múltiplas ligações covalentes entre a enzima e o suporte que reduz a flexibilidade conformacional e as vibrações térmicas, evitando assim o desdobramento e desnaturação da proteína. Entretanto, como a imobilização não ocorre de maneira uniforme para todas as moléculas de enzimas, a orientação indesejada do sítio ativo da enzima pode dificultar o reconhecimento do substrato, diminuindo a atividade catalítica, ou então pode levar a uma orientação que inative a enzima, (HACKENHAAR et al., 2022).

Com intuito de melhorar a reatividade e a interação enzima-suporte, é importante considerar os seguintes fatores: o tempo de reação para que haja uma interação efetiva entre a enzima e o suporte; a temperatura moderadamente elevada para favorecer a interação enzima-suporte e aumentar a possibilidade de ligações entre eles; a escolha da solução tampão, de modo que não venha a interferir na etapa de imobilização; e a presença de inibidores ou outros protetores de

proteína que possam minimizar a perda de atividade enzimática com a imobilização e na incubação com o suporte durante o processo de imobilização em pH alcalino (FURLANI et al. 2020).

2.5.1.2.2 Ligação cruzada (Cross-linking)

A ligação cruzada foi desenvolvida inicialmente com o objetivo de desenvolver cristais de proteínas a fim de se realizar estudos estruturais por raio-X. É um método de imobilização irreversível que não requer o uso de suporte. As enzimas são ligadas umas às outras, ou às proteínas inativas, formando uma estrutura tridimensional complexa. Na técnica há a formação de ligações cruzadas intermoleculares entre a enzima e reagentes bi- ou multifuncionais com finalidade de torná-las insolúvel ao meio reacional. Os agentes de reticulação são moléculas que possuem ao menos duas extremidades reativas que se ligam a grupos específicos de aminoácidos da enzima. Um dos reagentes mais utilizados para aplicação desta técnica é o glutaraldeído, por ser econômico e facilmente obtido em grandes volumes (MOHAMAD et al., 2015; EŞ et al., 2015).

O método tem a vantagem de melhorar a estabilidade da enzima durante a sua imobilização, possibilitando a sua reutilização. No entanto, é uma técnica trabalhosa e lenta que gera um alto custo, além disso, pode ocorrer uma perda de 50 % da atividade enzimática, devido a possibilidade de formação de grandes aglomerados durante o processo de reticulação, ocasionando limitações difusionais do substrato até o sítio catalítico enzimático. Pode ainda apresentar alterações na estrutura da enzima, devido ao grande número de ligações que são formadas, apresenta baixa estabilidade mecânica e pouca reprodutibilidade, especialmente quando utilizada uma grande quantidade de enzima e, apresenta dificuldade do manuseio devido ao seu aspecto gelatinoso (LIU et al., 2018; FURLANI et al., 2020).

2.6 Imobilização de pepsina: métodos e suportes utilizados

As vantagens de imobilizar proteases estão relacionadas ao aumento da sua vida útil, à facilidade de separação da enzima dos produtos da reação, à possibilidade da utilização em condições que normalmente na sua forma nativa esta não teria tanta eficiência, à possibilidade de evitar perdas da atividade catalítica associadas a modificação estrutural e estabilidade à diferentes meios reacionais ou ataques de agentes desnaturantes e microbiano (DEMIRKAN et al., 2017). A adequação específica e as vantagens advindas do uso prático da imobilização enzimática, dependem de variáveis como o material do suporte, a química do método de imobilização e do conhecimento específico das características da enzima (BASSO; SERBAN, 2019; SHELDON et al., 2021).

Ao imobilizar a pepsina, é preciso considerar que ela possui uma superfície rica em Asp e Glu, alguns resíduos de Tyr, Cis e His, e apenas um resíduo de Lis, isto é importante visto que a maioria dos protocolos de imobilização que permitem a melhoria da estabilidade da enzima via

imobilização covalente multiponto, são baseados na reação dos grupos amino primários da enzima e do suporte, e desta forma, na pepsina existem apenas dois resíduos disponíveis para reagir covalentemente com suportes (BARBOSA et al., 2014; RODRIGUES et al., 2021). A enzima possui ponto isoelétrico em torno de 1 a 2, enquanto outras proteases como ficina, tripsina ou quimotripsina possuem ponto isoelétrico acima de 9, fazendo com que sua capacidade de interação com trocadores iônicos seja totalmente diferente. Por tanto, a pepsina possui baixa estabilidade em valores de pH neutros ou alcalinos, isso torna necessário empregar valores de pH ácido durante seu manuseio em processos de imobilização (RODRIGUES et al., 2021; MORELLON-STERLING et al., 2022).

Contudo, vários métodos têm sido empregados com eficiência na imobilização da pepsina, como pode ser visualizado na tabela 1. Apesar da diversidade de métodos existentes, os mais utilizados para imobilizar a pepsina são adsorção física, cross-linking (ligação cruzada) e a ligação covalente, sendo o glutaraldeído o principal agente modificador ou ativador de suportes.

Tabela 1. Desempenho da pepsina imobilizada em diferentes métodos e suportes.

Suporte	Método	Resultados alcançados	Referência
Copolímero de acrilamida e 2-hidroxiethyl metacrilato ativado com p-tolil sulfonil ou p-benzoquinona e glutaraldeído.	Ligação covalente	Retenção de mais de 50 % da sua atividade após 6 ciclos nos ensaios utilizando hemoglobina. A estabilidade de armazenamento da enzima ligada covalentemente foi de 60 % após armazenamento por 1 mês. Maior estabilidade ao pH e térmica. Em condições otimizadas, 90 % de hidrólise de caseína foi alcançada com pepsina imobilizada em um reator de leito fixo.	SHUKLA; DEVI, 2005
Esferas de quitosana	Cross-link	Houve o melhoramento da resistência térmica. Não houve perda da atividade até 30 dias de armazenamento. A enzima imobilizada manteve uma atividade específica de 95 % após três reutilizações nos ensaios com hemoglobina.	ALTUN; CETINUS, 2007
Sílica mesoporosa SBA-15	Adsorção física	A enzima imobilizada obteve atividade relativa de 98 %. O biocatalisador manteve 95 % da atividade inicial após 4 ciclos de reutilização nos ensaios com Z-Glu-Tyr (Z-L-glutamyl-L-tyrosine dipeptide)	MANYAR et al., 2008
Membranas liofilizadas	Cross-link	Nos ensaios com hemoglobina	DE MELLO, 2009

de quitosana e O-carboximetilquitosana reticuladas ou não com glutaraldeído		desnaturada, a pepsina (5,0 mg/ml) imobilizada com glutaraldeído apresentou maior conversão de tirosina (~50mM Tirosina) do que a sem, em 60 minutos de reação.	
Elastômero de silicone reticulado com Tetraetil ortossilicato (TEOS)	Cross-link	A enzima imobilizada apresentou 70 % de sua atividade máxima em solução tampão pH 7, enquanto a livre não mostrou atividade nestas condições. A pepsina imobilizada manteve sua atividade por até 6 meses.	POOJARI et a., 2009
Nanoesferas de quitosana-sílica reticuladas com glutaraldeído	Cross-link	A pepsina imobilizada apresentou maior faixa de pH, melhor capacidade, desempenho e estabilidade a altas temperaturas em comparação com a pepsina livre. Pode ser usada de 8 a 10 vezes com 20 % da atividade inicial, nos ensaios com caseína bovina.	CAHYANINGRUM; SIANITA, 2014
Microesferas de quitosana e Pst-GMA poli(estireno-co-glicidil metacrilato) com ou sem glutaraldeído	Ligação covalente; adsorção	A atividade relativa da enzima imobilizada via ligação covalente (70 %) foi maior que a adsorção (50,14 %). No armazenamento, a ligação covalente reteve 70 % adsorção 58 % e a enzima livre 30 % após 30 dias a 4 °C.	PENG et al., 2014
Nanopartículas magnéticas de quitosana	Ligação covalente	A enzima imobilizada obteve uma capacidade de imobilização de 99 mg/g com uma atividade de 85% nos ensaios de hidrólise de amidas.	LAKOURAJ et al., 2015
Quitosana modificada com glutaraldeído	Ligação covalente	A enzima imobilizada apresentou melhor estabilidade a temperatura e pH. Atividade relativa de 74%. A enzima permaneceu ativa após 5 semanas de armazenamento a 4°C.	HUANG et al., 2017
Membrana porosa revestida com polidopamina (PDA) e ativada com glutaraldeído ou polyethyleneimine (PEI)	Ligação covalente; atração eletrostática e adsorção	A imobilização via atração eletrostática mostrou melhor atividade. A ligação covalente proporcionou maior capacidade de imobilização.	ZHANG et al., 2018
Carvão ativado	Ligação	Aumento da eficiência de	SANTOS et al., 2019

modificado com glutaraldeído	covalente	imobilização em 95%, maior atividade de hidrólise da caseína bovina, mantendo a atividade por mais de 7 ciclos de reutilização.	
Nanofibras eletrofiadas de poli(álcool vinílico) PVA com Glutaraldeído	Encapsulação	A enzima imobilizada obteve atividade enzimática de 96 % nos ensaios com BSA, alcançando 4 ciclos de reutilização e até 10 dias de armazenamento.	LOREDO-LAREJOS et al., 2022
Carvão funcionalizado (Glutaraldeído, Genipina e íons metálicos)	Ligação covalente	A pepsina imobilizada em íons de ferro permitiu uma capacidade de imobilização 98,93 mg·g ⁻¹ , com eficiência de imobilização superior a 99 % e maior atividade enzimática na hidrólise da caseína bovina. Em geral todas as funcionalizações permitiram boa atividade enzimática, estabilidade e ciclos de reutilização.	SANTOS et al., 2022

Fonte: Próprio autor, 2022.

É possível observar, com base na tabela 1, que os principais suportes utilizados na imobilização de pepsina são os suportes a base de quitosana e sílica. Para a imobilização de enzimas, de modo geral, um suporte adequado deve possuir as seguintes características: grande área superficial específica, estabilidade durante a imobilização e catálise, boa resistência mecânica para permitir múltiplos ciclos de uso, inércia para não reagir com sítio ativo da enzima, disponibilidade, sustentabilidade e não toxicidade. Nos últimos anos, vários suportes foram desenvolvidos e modificados para possuir características ideais para imobilizar enzimas, sendo estes classificados em orgânicos, inorgânicos ou híbridos (XIE et al., 2022).

Os principais suportes utilizados no processo de imobilização são: quitosanas, carvões ativados; resinas poliméricas e sílicas, já que estes materiais apresentam características como volume de poros e elevada área de superfície BET que favorecem a imobilização (SANTOS et al., 2022). Morellon-Sterling et al., (2022), mencionam que a imobilização de proteases em materiais porosos confere uma série de vantagens uma vez que, reduz a possibilidade indesejada de autólise, pois as moléculas de proteína não conseguem interagir umas com as outras, impedindo ainda efeitos indesejados devido à interação proteína-proteína (por exemplo, agregação na presença de solventes orgânicos) ou interação com interfaces externas. Além de possuir vantagens como a alta área superficial, grupos carregados na superfície e a possibilidade de controle do tamanho dos poros.

Dentre os suportes citados o carvão ativado vem mostrando resultados bastantes promissores na imobilização na pepsina. O material possui várias características ideais para um suporte, apresentando ainda hidrofobicidade, resistência térmica, química e mecânica, assim como, permite a inserção de grupos funcionais em sua superfície através de modificações químicas, favorecendo o processo de imobilização de enzimas (SANTOS et al., 2019; SOUZA JÚNIOR et al., 2020).

2.7 Carvão ativado

O carvão ativado é um material carbonáceo apresentando elevada porosidade, que pode ser classificada de acordo com seu tamanho em microporos (poros < 2 nm), mesoporos (poros variando de 2 a 50 nm) e macroporos (poros > 50 nm). Apresenta elevada área superficial específica BET, composta por heteroátomos de oxigênio, nitrogênio e hidrogênio ligados aos átomos de carbono. Apresenta ainda resistência mecânica, com uma alta estabilidade química e é considerado um material amorfo, não grafítico, devido a presença de uma estrutura micro cristalina que difere da estrutura do grafite (SANTOS et al., 2022). Os grupos funcionais de sua superfície, são bastante importantes no processo de adsorção, e podem ser afetados pelas propriedades físicas e químicas do precursor, pelo método de preparação e pelas condições de ativação (BRITO et al., 2018).

Possui 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, em comparação a 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 (SOUZA JÚNIOR et al., 2020).

Quase todos compostos que possuem um alto teor de carbono podem ser utilizados na produção de carvão ativado, tais como: ossos de animais, serragem, algas, 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 (BUBANALE; SHIVASHANKAR, 2017). Resíduos agroindústrias são amplamente utilizados para esse fim e mostraram ser precursores promissores para tal produção por apresentar baixo custo e ser uma fonte renovável (GONZÁLEZ-GARCÍA, 2017; BRANDÃO et al., 2020; SANTOS et al., 2020; SOUZA JÚNIOR et al., 2020).

A biomassa lignocelulósica é constituída principalmente por celulose, hemicelulose e lignina. As proporções de cada um desses compostos podem variar de acordo com a espécie da biomassa, a região de plantio e diversos fatores no cultivo. Geralmente, o teor de celulose varia de

40 a 80 %, o de hemicelulose entre 15 e 30 %, enquanto que o valor de lignina permanece entre 10 e 25 %. Além disso, as biomassas herbáceas e as agroindustriais possuem maior variação desses conteúdos, uma vez que elas apresentam um maior teor de extrativos e cinzas (WANG et al., 2017; BITENCOURT, 2021). Segundo González-García (2017), materiais precursores oriundo da biomassa, como núcleos, caules, fibras, cascas, flores, frutas, sementes, folhas, madeiras, sabugos de milho e raízes são alguns dos mais utilizados em pesquisas para produção de carvões ativados.

Os carvões ativados são sintetizados por processos que contam com a carbonização, através da queima (pirólise) do material precursor, e sua ativação. A carbonização é usualmente feita em atmosferas inertes, ou seja, atmosferas compostas por N₂, e em temperaturas compreendidas entre 500-800 °C. Nesta etapa são removidos componentes voláteis e gases leves (CO, H₂, CO₂ e CH₄), produzindo uma massa de carbono fixo e uma estrutura porosa primária que favorece a ativação posterior. O processo de ativação dos carvões, tem a importância de conferir ao material as características ideais para serem usados como suporte de imobilização, desta forma, o processo resulta no aumento da área de superfície específica, da fração de poros e a formação dos grupos funcionais reativos. Os métodos empregados são divididos em ativação física e química (DANISH; AHMAD, 2018; PANDEY et al., 2020).

Atualmente, os carvões ativados são utilizados em tratamentos como purificação, desodorização, desintoxicação, filtração, descoloração, desclorificação, remoção de substâncias orgânicas e inorgânicas, voltados para a indústria de alimentos, produtos químicos, petrolífera, farmacêutica, automobilística, no tratamento de águas residuárias e etc. (SANTOS et al., 2019).

Cresce também, as pesquisas com intuito de avaliar o potencial uso do carvão ativado para imobilização de enzimas (BRITO et al., 2017; BORGES, 2022; SOUZA JÚNIOR et al., 2020; PANDEY et al., 2020). Segundo Santos et al., (2022) as principais justificativas de utilização desta matriz são suas características físicas e químicas (elevada resistência mecânica, alta estabilidade química, resistência a ataques microbianos, inércia química, biocompatibilidade, área superficial elevada, porosidade definida, presença de grupos funcionais superficiais, etc.), além de ser um suporte de baixo custo de síntese, promovem a reutilização dos biocatalisadores e consegue manter a atividade das enzimas imobilizadas.

2.8 Modificações no carvão ativado

Com o crescente interesse em utilizar o carvão ativado como suporte para imobilizar enzimas, tendo em vista suas características químicas e físicas que os tornam excelentes suportes, cresce também as pesquisas para o seu aprimoramento, com o objetivo de melhorar os processos de imobilização. Uma técnica que vem sendo comum, é a modificação da superfície, que tem o

objetivo de inserir grupos químicos que vão aumentar a possibilidade de interações entre a enzima e o suporte, através da formação de ligações mais estáveis e irreversíveis, como as ligações químicas covalentes. Estas ligações são normalmente estabelecidas entre os grupos amino, grupos amino residuais, grupos sulfidríla e grupo hidroxila do anel fenólico dos aminoácidos constituintes da enzima com os grupos reativos presentes na estrutura do suporte (SANTOS et al., 2022). No carvão ativado, este processo ocorre na estrutura superficial, onde são adicionados os componentes químicos, que podem ser inseridos durante o processo de ativação ou em etapas posteriores (ZDARTA et al., 2018).

O aumento de grupos reativos na superfície de matrizes sólidas por modificações físicas, químicas e morfológicas dos suportes, podem conferir aos biocatalisadores o aumento na eficiência catalítica devido à minimização dos efeitos difusionais de substratos e produtos durante a reação e podem melhorar a estabilidade operacional em processos contínuos e descontínuos (RAMANI et al., 2012; BEZERRA et al., 2015). O glutaraldeído é um dos reagentes mais empregados na ativação de suportes e/ou como braço espaçador, por propiciar a obtenção de preparações enzimáticas ativas e estáveis. Também é o principal método utilizado para modificar carvão ativado e favorecer a formação de ligações mais resistentes e irreversível entre o suporte e a enzima (BARBOSA et al., 2012; SOUZA et al., 2017; SANTOS et al., 2019).

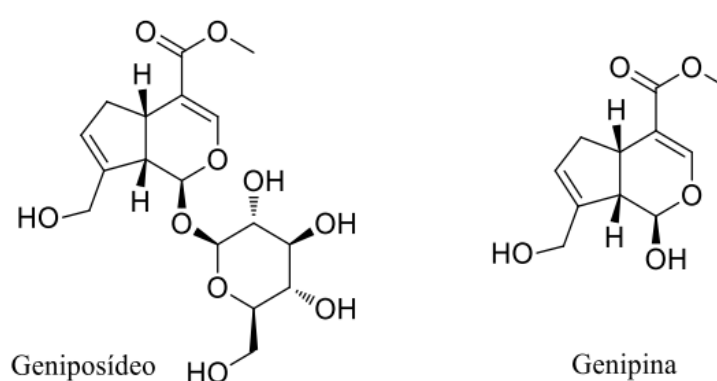
O método se destaca por melhorar a estabilidade enzimática devido às ligações multipontuais ou ligações entre as subunidades da enzima na imobilização, age como molécula espaçadora fazendo a ponte enzima-suporte, que também auxilia na fixação e estabilidade da enzima no suporte, apresenta eficiência e versatilidade, visto que pode ser utilizado para imobilizar uma série de enzimas e em suportes de diversas matrizes. Além disso, soluções comerciais de glutaraldeído apresentam custo relativamente baixo e o protocolo de síntese é consideravelmente simples. A imobilização ocorre pela reação simultânea dos grupos funcionais aldeído (-CHO) do glutaraldeído com os sítios de ligação amino (-NH₂) ou outros grupos funcionais ativados da superfície do suporte, e os grupos amino (-NH₂) terminais da enzima. Como essa reação ocorre entre um aldeído bifuncional e moléculas contendo grupo amino, é formada uma base de Schiff entre o glutaraldeído e o suporte (SIAR et al., 2018; SANTOS et al., 2022).

Apesar das vantagens, o glutaraldeído apresenta uma elevada toxicidade, o que pode dificultar ou impedir sua utilização em aplicações farmacêuticas, biomédicas e em alimentos. Portanto, pesquisas tem se voltado para a busca de novos compostos com potencial para substituí-lo. A genipina é uma molécula que tem sido bastante apontada como possível substituto ao glutaraldeído. Além de demonstrar bons resultados em estudos (BELLÉ et al., 2018; SANTOS et al., 2022) em

comparação com o glutaraldeído, a genipina é um composto natural que apresenta uma toxicidade cerca de 10000 vezes menor que o glutaraldeído (DU et al., 2020).

A genipina (Figura 4) é um produto obtido a partir da hidrólise do geniposídeo, que é um iridóide natural, e o composto majoritário do jenipapo (*Genipa americana* Linnaeus), estando presente tanto no endocarpo quanto no mesocarpo do fruto, representando mais de 70% de seus iridóides totais. Também pode ser encontrado em outros frutos como da *Gardenia jasminoides*, *Castilleja tenuiflora*, *Bellardia trixago* e *Eucommia ulmoides*, bem como nas folhas e caules de *Tocoyena formosa* e *Randia spinose* (BENTES; MERCADANTE, 2014; LEE et al., 2014).

Figura 4. Representação das estruturas químicas do geniposídeo e da genipina



Fonte: RICARDI (2021).

Ultimamente, pesquisas vêm utilizando a genipina como agente ativante e/ou reticulante em matrizes de quitosana, gelatina, colágenos entre outros, para a aplicações em diversos segmentos, principalmente na biotecnologia (DU et al., 2020). O uso da genipina em protocolos de imobilização de enzimas, também tem sido bastante explorada devido a capacidade da genipina reagir espontaneamente com grupos amina primários de aminoácidos e proteínas, podendo inclusive substituir agentes convencionais como o glutaraldeído que apresenta alta toxicidade (KLEIN et al., 2016; BELLÉ et al., 2018).

Flores et al., (2019) imobilizou a enzima β -D-galactosidase de *A. oryzae* em suportes de quitosana e genipina de diferentes estruturas em virtude da possibilidade de variações na forma de polimerização da genipina, alterando a conformação da rede de reticulação. O biocatalisador preparado apresentou elevada estabilidade térmica e operacional em batelada, mantendo 100% de atividade relativa durante 40 bateladas. Cavello et al., (2014) imobilizaram uma protease queratinolítica de *Purpureocillium lilacinum* em esferas de quitosana ativadas por genipina e testaram a atividade enzimática na hidrólise da azocaseína, os resultados mostraram que nas melhores condições a imobilização enzimática resultou em 96 e 92,8 % para glutaraldeído e

genipina, respectivamente, com recuperação de atividade de até 81 % quando a genipina foi utilizada. A queratinase imobilizada apresentou melhor estabilidade térmica e de pH em relação à forma solúvel, retendo mais de 85 % de sua atividade em pH 11 e 74 % a 50 °C após 1 h de incubação. A atividade residual da queratinase imobilizada permaneceu mais de 60 % do seu valor inicial após cinco ciclos de hidrólise. Hackenhaar et al., (2022) desenvolveram um biocomposito de alginato e gelatina reticulados com genipina com o objetivo de utilizá-lo como suporte para a imobilização da β -galactosidase, os resultados mostraram que a enzima imobilizada pôde ser armazenada por 175 dias sob refrigeração mantendo 80 % de sua atividade inicial. Além disso, 90 % de sua atividade relativa foi mantida após 11 reutilizações em um processo descontínuo de hidrólise da lactose.

Observar-se que a maioria dos estudos realizados com genipina em protocolos de imobilização, são voltados para o aprimoramento da quitosana como suporte. Um dos poucos estudos em suportes carbonáceos foi realizado por Santos et al., (2022) ao utilizarem a genipina para funcionalizar o carvão ativado do caroço de tamarindo, para a imobilização da pepsina. Após avaliar a eficiência da imobilização na hidrólise da caseína bovina, o biocatalisador obtido conferiu maior capacidade de imobilização e atividade hidrolítica em comparação ao carvão funcionalizado com glutaraldeído, comprovando que a genipina pode ser utilizada em substituição ao glutaraldeído.

3. OBJETIVOS

3.1 Geral

Este trabalho tem o objetivo de obter biocatalisadores a partir da imobilização de pepsina em carvão ativado sintetizado a partir do caroço de umbu e funcionalizado com glutaraldeído e extrato de genipina, avaliando os efeitos do tipo de modificação na capacidade hidrolítica da enzima e aplica-los na hidrólise da caseína caprina para obter de peptídeos com atividade antioxidante.

3.2. Específicos

- Produção do carvão ativado utilizando o caroço de umbu, como material precursor, e usá-lo como suporte na imobilização por adsorção;
- Funcionalizar o carvão ativado com glutaraldeído e extrato de genipina, e utilizá-los como suporte na imobilização por ligação covalente;
- Caracterizar os carvões obtidos;
- Realizar os ensaios de imobilização com a pepsina;
- Obter a caseína do leite de cabra;

- Avaliar a atividade enzimática das enzimas imobilizadas e comparar com as mesmas na forma livre, na hidrólise da caseína caprina;
- Avaliar a reutilização dos biocatalisadores;
- Avaliar o perfil dos peptídeos através das análises de cromatografia e eletroforese;
- Avaliar a capacidade antioxidante dos hidrolisados obtidos.

4. REFERÊNCIAS

ABUINE, R., RATHNAYAKE, A. U., BYUN, H-G. Biological activity of peptides purified from fish skin hydrolysates. **Fisheries and aquatic sciences**, v. 22, n. 1, p. 1-14, 2019.

AGUILAR, J. G. dos S., SATO, H. H. Microbial proteases: Production and application in obtaining protein hydrolysates. **Food Research International**, v. 103, n. September 2017, p. 253–262, 2018.

ALBUQUERQUE, T. L. de., SOUSA, M. de., SILVA, N. C. G., GIRÃO NETO, C. A. C., GONÇALVES, L. R. B., FERNANDEZ LAFUENTE, R., ROCHA, M. V. P. B-Galactosidase from *Kluyveromyces lactis*: characterization, production, immobilization and applications - a review. **International Journal Of Biological Macromolecules**, v. 191, p. 881-898, nov. 2021. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.09.133>.

ALTUN, B. G. D., CETINUS, S. Immobilization of pepsin on chitosan beads. **Food Chemistry**, volume 100, Issue 3, 2007, Pages 964-971. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.11.005>.

ALVES, A. N. **Extração de proteases de ora-pro-nóbis (*Pereskia aculeata* Miller) e purificação parcial em sistemas aquosos bifásicos formados por peg+ fosfato de sódio+água**. 65f. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-graduação em Engenharia e Ciências de Alimentos. Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Itapetinga-BA. 2020.

ANDRADES, A de., GRAEBIN, N. G., KADOWAKI, M. K., AYUB, M. A. Z., FERNANDEZ-LAFUENTE, R., RODRIGUES, R. C. Immobilization and stabilization of different β -glucosidases using the glutaraldehyde chemistry: Optimal protocol depends on the enzyme. **International Journal of Biological Macromolecules** 129 (2019) 672–678. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.02.057>.

ANTUNES, R. S., LOPES, F. M., BRITO, A. O., GARCIA, L. F., FERRAZ, D. F., GIL, E. S. Enzimas vegetais: extração e aplicações biotecnológicas. **Infarma – Ciências Farmacêuticas**, v. 29, p.181-198, 2017.

APAK, R., OZYUREK, M., GÜÇLÜ, K., CAPANOĞLU, E. Antioxidant activity/capacity measurement. 1. Classification, physicochemical principles, mechanisms, and electron transfer (ET)-based assays. **J Agric Food Chem** 64:997–1027, 2016.

AZDAD, O., MEJRHIT, N., AARAB, L. Reduction of the allergenicity of cow's milk α -lactalbumin under heat-treatment and enzymatic hydrolysis in Moroccan population, **Eur. Ann. Allergy Clin. Immunol.** 50 (2018) 177–183, <https://doi.org/10.23822/EurAnnACI.1764-1489.60>.

BABA, W. N., BABY, B., MUDGIL, P., GAN, C.-Y., VIJAYAN, R., MAQSOOD, S. Pepsin generated camel whey protein hydrolysates with potential antihypertensive properties: Identification and molecular docking of antihypertensive peptides, **LWT** 143 (2021), 111135, <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.111135>.

BADGUJAR, K. C.; DHAKE, K. P.; BHANAGE, B. M. Immobilization of *Candida cylindracea* lipase on poly lactic acid, polyvinyl alcohol and chitosan based ternary blend film: Characterization, activity, stability and its application for N-a. **Process Biochemistry**, v. 48, n. 9, p. 1335-1347, 2013.

BAMDAD, F., SHIN, S. H., SUH, J. W., NIMALARATNE, C., SUNWOO, H. Anti-inflammatory and antioxidant properties of casein hydrolysate produced using high hydrostatic pressure combined with proteolytic enzymes. **Molecules**, 22(4), 609. 2017.

BARBOSA, E. E. P., PIMENTA, L., BRITO, A. K. P., MARTIM, S. R., TEIXEIRA, M. F. S. Mushroom cultivation edible in lignocellulosic residues from rainforest for protease production. **Brazilian Journal of Development**. 6:92475–92485. 2020.

BARBOSA, O., ORTIZ, C., BERENGUER-MURCIA, A., TORRES, R., RODRIGUES, R. C., FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Glutaraldehyde in bio-catalysts design: a useful crosslinker and a versatile tool in enzyme immobilization. **RSC Adv.** 4 (2014) 1583–1600, <https://doi.org/10.1039/c3ra45991h>.

BARBOSA, O., TORRES, R., ORTIZ, C., FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Versatility of glutaraldehyde to immobilize lipases: Effect of the immobilization protocol on the properties of lipase B from *Candida antarctica*. **Process Biochem.** 2012;47(8):1220-7.

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**. 9 (5): 357, 2016.

BASSO, A., SERBAN, S., Industrial applications of immobilized enzymes—a review, **Mol. Catal.** 479 (2019), 110607, <https://doi.org/10.1016/j.mcat.2019.110607>.

BELLÉ, A. S., HACKENNHAAR, C. R., SPOLIDORO, L. S., RODRIGUES, E., KLEIN, M. P., HERTZ, P. F. Efficient enzyme-assisted extraction of genipin from genipap (*Genipa americana* L.) and its application as a crosslinker for chitosan gels, **Food Chemistry**. 246 (2018) 266–274. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.11.028>.

BENIWAL, A., SAINI, P., KOKKILIGADDA, A., VIJ, S. Use of silicon dioxide nanoparticles for b-galactosidase immobilization and modulated ethanol production by co-immobilized *K. marxianus* and *S. cerevisiae* in deproteinized cheese whey. **LWT - Food Science and Technology**, 2018, 87, 553. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.09.028>.

BENEDÉ, S., MOLINA, E. Chicken Egg Proteins and Derived Peptides with Antioxidant Properties. **Foods**, 2020, 9(6), 735. <https://doi.org/10.3390/foods9060735>.

BENTES, ÁDE. S., & MERCADANTE, A. Z. Influence of the stage of ripeness on the composition of iridoids and phenolic compounds in genipap (*Genipa Americana* L.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 62(44), 10800–10808. 2014. <http://dx.doi.org/10.1021/jf503378k>.

BERNARDO, B. da S. **Produção de proteases e hidrolisados proteicos bioativos através da bioconversão de farinha de penas**. 33f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação), Licenciatura em Ciências Biológicas da Universidade Federal da Fronteira Sul, Cerro-largo - RS, 2018.

BEZERRA, C. S., LEMOS, C. M. G. F., SOUSA, M., GONÇALVES, L. R. B. Enzyme immobilization onto renewable polymeric matrixes: Past, present, and future trends. **Journal of Applied Polymer Science**. 132 (26): 4215, 2015.

BIBI SADEER, N., MONTESANO, D., ALBRIZIO, S., ZENGIN, G., MAHOMOODALLY, M. F. The versatility of antioxidant assays in food science and safety-chemistry, applications, strengths, and limitations. **Antioxidants**, 9 (2020), <https://doi.org/10.3390/antiox9080709>.

BILAL, M., ASGHER, M., CHENG, H., YAN, Y., IQBAL, H. M. N. Multi-point enzyme immobilization, surface chemistry, and novel platforms: a paradigm shift biocatalyst design. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 39, p.202-219, 2019.

BILAL, M., IQBAL, H. M. N. Chemical, physical, and biological coordination: An interplay between materials and enzymes as potential platforms for immobilization. **Coordination Chemistry Reviews**. 388:1–23. 2019.

BITENCOURT, G. F. **Produção de biocarvões de biomassas lignocelulósicas através de pirólise lenta e sua aplicabilidade como combustível sólido renovável**. 80 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Química Industrial) - Instituto de Química, Universidade Federal Fluminense, Niterói, 2021. Disponível em:< <https://app.uff.br/riuff/handle/1/23041>>.

BORDBAR, S., EBRAHIMPOUR, A., ZAREI, M., ABDUL HAMID, A., SAARI, N. Alcalase-generated proteolysates of stone fish (*Actinopyga lecanora*) flesh as a new source of antioxidant peptides. **International Journal of Food Properties**, v. 21, n. 1, p. 1541-1559, 2018.

BORRAJO, P., PATEIRO, M., BARBA, F. J., MORA, L., FRANCO, D., TOLDRÁ, F., LORENZO, J. M. Antioxidant and Antimicrobial Activity of Peptides Extracted from Meat By-products: a Review. Antioxidant and antimicrobial activity of peptides extracted from meat by-products: a review. **Food Analytical Methods**, v. 12, p. 2401-2415, 2019.

BRANDÃO, A. C. T., QUEIROZ, V., SILVA, R. G. C. Síntese e caracterização de carvão ativado quimicamente com H₃PO₄ e NaOH a partir da casca de pequi (*Caryocar brasiliense*). **Braz. J. of Develop.**, Curitiba, v. 6, n. 8, p. 60945-60962 aug. 2020. DOI:10.34117/bjdv6n8-493.

BRANDELLI, A., DAROIT, D. J., CORRÊA, A. P. F. Whey as a Source of Peptides with Remarkable Biological Activities. **Food Research International**, v. 73, p. 149–161, 2015.

BRENA, B., GONZÁLEZ-POMBO, P., BATISTA-VIERA, F. Immobilization of enzymes: a literature survey. In: Immobilization of enzymes and cells. **Humana Press**, Totowa, NJ, p. 15-31, 2013.

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.

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 H₃PO₄: kinetics, adsorption equilibrium and thermodynamic studies. **Powder Technol.** 339, 334-343, 2018.

BRITTON, J., MAJUMDAR, S., WEISS, G. A. Continuous flow biocatalysis. **Chemical Society Reviews**, v. 47, n. 15, p. 5891-5918, 2018.

BORGES, J. F. **Imobilização de lacase em carvão ativado obtido a partir de resíduo de sabugo de milho submetido ao tratamento hidrotérmico**. 90f. Dissertação. Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência dos Alimentos. Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Itapetinga/BA. 2022.

BUBANALE, S., SHIVASHANKAR, M. History, method of production, structure and applications of activated carbon. **International Journal of Engineering Research & Technology**. 6, 495-498, 2017.

CAHYANINGRUM, S. E., SIANITA, M. M. Immobilization of pepsin onto chitosan silica nanobeads with glutaraldehyde as crosslink agent. **Bull. Chem. React. Eng. Catal.** 9 (2014) 263–269, <https://doi.org/10.9767/bcrec.9.3.7060.263-269>.

CAKIR, B., AKBAY, T. T-. Potential anticarcinogenic effect of goat milk-derived bioactive peptides on HCT-116 human colorectal carcinoma cell line. **Analytical Biochemistry**, v 622, 1 June 2021, 114166.

CALIFANO, V.; COSTANTINI, A. Immobilization of cellulolytic enzymes in mesostructured silica materials. **Catalysts**, 10 (6), 706, 2020.

CAO, Y., WEN, L., SVEC, F., TAN, T., LV, Y. Magnetic AuNP@ Fe₃O₄ nanoparticles as reusable carriers for reversible enzyme immobilization. **Chemical Engineering Journal**. 286, 272–281. 2016.

CARNEIRO, T. S. M., BARBOSA, P. P. de S., GADELHA, T. S. Identificação de peptídeos bioativos presentes no leite de cabra. In.: **70^a Reunião Anual da SBPC** - 22 a 28 de julho de 2018 - UFAL - Maceió / AL. Disponível em: <http://www.sbpcnet.org.br/livro/70ra/trabalhos/resumos/2530_1c63d2668e871695cb78672b2b6aec09d.pdf>. Acesso em: 24 de Jan. de 2023.

CAVELLO, I. A., CONTRERAS-ESQUIVEL, J. C., CAVALITTO, S. F. Immobilization of a keratinolytic protease from *Purpureocillium lilacinum* on genipin activated-chitosan beads. **Process Biochemistry**, Vol 49, Issue 8, August 2014, Pages 1332-1336. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2014.04.016>.

CHAI, T. T., ANG, S. Y., GOH, K., LEE, Y. H., NGOO, J. M., TEH, L. K., WONG, F. C. Trypsin-hydrolyzed Corn Silk Proteins: Antioxidant Activities, in vitro Gastrointestinal and Thermal Stability, and Hematoprotective Effects. **eFood**, v. 1, n. 2, p. 156-164, 2020.

CHALAMAIAH, M., JYOTHIRMAYI, T., BHASKARACHARY, K., VAJRESWARI, A., HEMALATHA, R., DINESH KUMAR, B. Chemical composition, molecular mass distribution and antioxidant capacity of rohu (*Labeo rohita*) roe (egg) protein hydrolysates prepared by gastrointestinal proteases. **Food Res. Int.** 52 (2013) 221–229, <https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2013.03.020>.

- CHANDRAWANSHI, N. K., KORETI, D., KOSRE, A., KUMAR, A. Proteolytic Enzymes Derived from a Macro Fungus and Their Industrial Application. **Hydrolases**. 2022.
- CHIANG, J. H., LOVEDAY, S. M., HARDACRE, A. K., PARKER, M. E. Effects of enzymatic hydrolysis treatments on the physicochemical properties of beef bone extract using endo-and exoproteases. **Int. J. Food Sci. Technol**, 54(1):111–120. 2019.
- CHOYAM, S., JAIN, P. M., KAMMARA, R., Characterization of a potent new-generation antimicrobial peptide of bacillus. **Front. Microbiol.** 12 (2021), <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.710741>.
- COSTA, L. F. S. **Bioatividade de peptídeos do soro de leite obtidos por hidrólise e ultrafiltração em condições gastrointestinais simuladas**. 96f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade de Passo Fundo, 2021. Disponível em: <<http://tede.upf.br:8080/jspui/handle/tede/2152>>. Acesso em: 13 abr. 2023.
- COTABARREN, J., ROSSO, A. M., TELLECHEA, M., GARCÍA-PARDO, J., RIVERA, J. L., OBREGON, W. D., PARISI, M. G. Adding value to the chia (*Salvia hispanica L.*) expeller: Production of bioactive peptides with antioxidant properties by enzymatic hydrolysis with Papain, **Food Chem.** 274 (2019) 848–856, <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.09.061>.
- CRUZ, G., ZACARCHENCO, P. B., OLIVEIRA, C. A. F., CORASSIN, C. H. Química, Bioquímica, Análise Sensorial e Nutrição no Processamento de Leite e Derivados. 1º ed. Rio de Janeiro: **Elsevier**, 2016.
- 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**. 87: 1–21, 2018.
- DALGLEISH, D. G. On the structural models of bovine casein micelles – Review and possible improvements. **Soft Matter**, v. 7, p. 2265–2272, 2011.
- DALIRI, EB-M., OH, D. H., LEE, B. H. Bioactive peptides. **Foods** 6:32–42 (2017).
- DARIFFE, A. P., ORO, C. E. D., GONÇALVES, T. dos S., DENTI, A. F., TRES, B. P., DALLAGO, R. M., MIGNONI, M. L. Produção e funcionalização de suporte de parafina para imobilização enzimática. **Perspectiva**, Erechim. v. 45, n. 171, p. 73-83, setembro/2021 / DOI: 10.31512/persp.v.45.n.171.2021.161. p. 73-83.
- DE CASTRO, R. J. S.; SATO, H. H. Biologically Active Peptides: Processes for Their Generation, Purification and Identification and Applications as Natural Additives in the Food and Pharmaceutical Industries. **Food Research International**, v. 74, p. 185–198, 2015.

DELGADO JÚNIOR, I. J., SIQUEIRA, K. B., STOCK, L. A. **Produção, composição e processamento de leite de cabra no Brasil**. EMBRAPA - Circular técnica 122, Juiz de Fora/MG, ago 2020. Disponível em <infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/1126798/1/CT-122-Leite-de-Cabra.pdf>. Acesso em: 20 abr. 2023.

DE LIMA, M. dos S. F., GUEIROS, A. L., SÁTIRO, G. C., DA SILVA, G. N. A., DE SOUZA, K. M. S., PORTO, A. L. F., CAVALCANTI, M. T. H. Peptídeos bioativos obtidos de produtos lácteos: Uma revisão narrativa. In.: **Processos Químicos e Biotecnológicos** –Volume 6: Editora Poisson – Belo Horizonte, MG:Poisson, 2020. Doi: 10.36229/978-65-5866-009-5.CAP.04.

DE MELLO, K. G. P. C. **Imobilização da pepsina em membranas liofilizadas de quitonasa e 0-carboximetilquitosana**. 99f. (TESE), Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Pós-graduação em Tecnologia Bioquímica-Farmacêutica. 2009.

DEMIRKAN, E., AVCI, T., AYKUT, Y. Protease immobilization on cellulose monoacetate/chitosan-blended nanofibers. **Journal of Industrial Textiles**. 47:2092–2111. 2018.

DE OLIVEIRA, T. P., SANTOS, M. P. F., BRITO, M. J. P., VELOSO, C. M. Incorporation of metallic particles in activated carbon used in lipase immobilization for production of isoamyl acetate. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 97, n. 7, p. 1736-1746, 2022.

DIAS, G. M. P., DE OLIVEIRA SILVA, F., PORTO, T. S., HOLANDA, M. T. C., PORTO, A. L. F. Perfil dos peptídeos bioativos obtidos de queijos de coalho com potencial antimicrobiano. **Pesquisa Agropecuária Pernambucana**, 24(1). 2019.

DORNELLES, L. P., DE SOUZA, M. D. D., DA SILVA, P. M., PROCOPIO, T. F., ROLDAN, R. S., LIMA, T. D., DE OLIVEIRA, A. P. S., ZINGALI, R. B., PAIVA, P. M. G., PONTUAL, E. V., NAPOLEAO, T. H. Purification and Characterization of a Protease from the Visceral Mass of Mytella Charruana and Its Evaluation to Obtain Antimicrobial Peptides. **Food Chemistry**. 245, 1169–1175. 2018.

DOS SANTOS, W. L., DA SILVA, E. G., DA SILVA, M. E. B., DA SILVA, E. F. T., MOREIRA, K. A. Potencial biológico e estudo in vitro da digestão de peptídeos solúveis obtidos de diferentes variedades de queijo. **Pubvet**, 13, 148. 2019.

DU, J. R., HSU, L. H., XIAO, E. S., GUO, X., ZHANG, Y., FENG, X. Using genipin as a “green” crosslinker to fabricate chitosan membranes for pervaporative dehydration of isopropanol. **Separation and Purification Technology**. 244, 116843. 2020.

DUARTE-ALMEIDA, J. M., SANTOS, R. J., GENOVESE, M. I., LAJOLO, F. M. Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema β -caroteno/ácido linoléico e método de seqüestro de radicais DPPH•. **Ciênc. Tecnol. Aliment.** 2006; 26(2):446-52.

EŞ, I., VIEIRA, J. D. G., AMARAL, A. C. Principles, techniques, and applications of biocatalyst immobilization for industrial application. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 99, n. 5, p. 2065-2082, 2015.

GALLEGRO, M., MORA, L., TOLDRÁ, F. Characterisation of the antioxidant peptide AEEEEYPDL and its quantification in Spanish dry-cured ham. **Food Chem**, 258:8–15, 2018.

GONÇALVES, M. C. P., KIECKBUSCH, T. G., PERNA, R. F., FUJIMOTO, J. T., MORALES, S. A. V., ROMANELLI, J. P. Trends on enzyme immobilization researches based on bibliometric analysis. **Process biochemistry**. 76, 95-110. 2019.

GONZÁLEZ-GARCÍA, P. Activated carbon from lignocellulosics precursors: A review of the synthesis methods, characterization techniques and applications. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, 2017. <http://dx.doi.org/10.1016/j.rser.2017.04.117>.

GULCIN, İ. Antioxidants and antioxidant methods: an updated overview. **Arch Toxicol**, 94, 651–715 (2020). <https://doi.org/10.1007/s00204-020-02689-3>.

GUPTA, D. Methods for determination of antioxidant capacity: a review, **Int. J. Pharm. Sci. Res.** 6 (2015) 546.

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 and Microbial Technology**. 98, 18-25. 2017.

FERNÁNDEZ-LUCAS, J.; CASTAÑEDA, D.; HORMIGO, D. New trends for a classical enzyme: Papain, a biotechnological success story in the food industry. **Trends in Food Science & Technology**, 2017.

FERNANDES, P., TECNICO, I. S., LISBOA, U. DE. Enzymatic Processing in the Food Industry. **Elsevier**, 2018.

FICANHA, A. M. M.; ANTUNES, A.; ORO, C. E. D.; FRANCESCHI, E.; DALLAGO, R. M.; MIGNONI, M. L. Immobilization of Lipase CALB in Organically Modified Silica. *Biointerface research in applied chemistry*, v. 11, n. 1, p. 7814-7825, 2021.

FILHO, J. G. O., SOUSA, H. A. de F., DA SILVA, E. R., EGEEA, M. B. Peptídeos bioativos no desenvolvimento de filmes ativos e biodegradáveis para alimentos. In: *Inovação em ciência e*

tecnologia de alimentos 3. Org.: VIEIRA, V. B & PIOVESAN, N. Ponta Grossa, PR: Editora Atena, 2019. ISBN: 978-85-7247-698-0.

FLORES, E. E. E., CARDOSO, F. D., SIQUEIRA, L. B., RICARDI, N. C., COSTA, T. H., RODRIGUES, R. C., KLEIN, M. P., HERTZ, P. F. Influence of reaction parameters in the polymerization between genipin and chitosan for enzyme immobilization. **Process Biochemistry**. 84: 73-80, 2019.

FOX, P. F., BRODKORB, A. The casein micelle: Historical aspects, current concepts and significance. **International Dairy Journal**, Canada, v. 18, p. 677-684, 2008.

FURLANI, I. L., AMARAL, B. S., OLIVEIRA, R. V., CASS, Q. B. Imobilização enzimática: conceito e efeitos na proteólise. **Quim. Nova**, Vol. 43, No. 4, 463-473, 2020 <http://dx.doi.org/10.21577/0100-4042.20170525>.

GOMES, J. E. G. **Avaliação das atividades biológicas de peptídeos liberados a partir da hidrólise da caseína caprina por proteases sintetizadas por fungos filamentosos**. 240f. Tese (Doutorado). Universidade Estadual Paulista- Campus Júlio de Mesquita Filho, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto, 2018.

GONÇALVES, T. dos S. **Produção e funcionalização “in situ” de espuma de poliuretano sintetizado na presença de glutaraldeído**. 128f. Dissertação (Mestrado). Programa de pós-graduação em Engenharia de Alimentos, Universidade Regional Integrada do alto Uruguai e das Missões, Erechin, 2018.

HACKENHAAR, C. R., ROSA, C. F., FLORES, E. E. E., SANTAGAPITA, P. R., KLEIN, M. P., HERTZ, P. F. Development of a biocomposite based on alginate/gelatin crosslinked with genipin for β -galactosidase immobilization: Performance and characteristics. **Carbohydrate Polymers**, vol 291, 1 September 2022, 119483. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2022.119483>.

HAFEEZ, Z., CAKIR-KIEFER, C., ROUX, E., PERRIN, C., MICLO, L., DARY-MOUROT, A. Strategies of Producing Bioactive Peptides from Milk Proteins to Functionalize Fermented Milk Products. **Food Research International**, v. 63, p. 71–80, 2014.

HAN, R., ÁLVAREZ, A. J. H., MAYCOCK, J., MURRAY, B. S., BOESCH, C. Comparison of alcalase- and pepsin-treated oilseed protein hydrolysates – Experimental validation of predicted antioxidant, antihypertensive and antidiabetic properties, **Current Research in Food Science**, volume 4, 2021, pages 141-149, <https://doi.org/10.1016/j.crfs.2021.03.001>.

HE, W., HE, K., SUN, F., MU, L., LIAO, S., LI, Q., YI, J., LIU, Z., WU, X. Effect of heat, enzymatic hydrolysis and acid-alkali treatment on the allergenicity of silkworm pupa protein extract, **Food Chem.** 343 (2021), 128461, <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128461>.

HORUE, M., RIVERO, B. I., CACICEDO, M. L., CASTRO, G. R. Microbial production and recovery of hybrid biopolymers from wastes for industrial applications - a review. **Bioresour Technol** 2021, 340:125671.

HUANG, C., CAI, L., TONG, X., SHI, Q., LUO, H. Research on process optimization and stability of immobilized pepsin by chitosan, **J. Chin. Inst. Food Sci. Technol.** 17 (2017) 118–125, <https://doi.org/10.16429/j.1009-7848.2017.01.015>.

HSIEH, L. S., LU, M. S., CHIANG, W. D. Identification and characterization of immunomodulatory peptides from pepsin–soy protein hydrolysates. **Bioresources and Bioprocessing.** 9, 39 (2022). <https://doi.org/10.1186/s40643-022-00526-2>.

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**, vol 8, Issue 1, Jan. 2017, p 63-71.

KAUR, N.; BHARDWAJ, P.; SINGH, G.; ARYA, S. K. Applicative insights on nascent role of biochar production, tailoring and immobilization in enzyme industry- A review. **Process Biochemistry**, v. 107, p. 153-163, 2021.

KIM, J. M., LICEAGA, A. M., YOON, K. Y. Purification and identification of an antioxidant peptide from perilla seed (*Perilla frutescens*) meal protein hydrolysate. **Food Science & Nutrition**, 7(5), 1645-1655. 2019.

KLEIN, M. P., HACKENHAAR, C. R., LORENZONI, A. S. G., RODRIGUES, R. C., COSTA, T. M. H., NINOW, J. L., HERTZ, P.F. Chitosan crosslinked with genipin as support matrix for application in food process: Support characterization and β -Dgalactosidase immobilization. **Carbohydrate Polymers.** 10 (137) :184-190, 2016.

KOIRALA, S., PRATHUMPAI, W., ANAL, A. K. Effect of ultrasonication pretreatment followed by enzymatic hydrolysis of caprine milk proteins and on antioxidant and angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitory activity of peptides thus produced. **Jornal Internacional de Laticínios**, volume 118, julho de 2021, 105026. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2021.105026>.

LAKOURAJ, M. M., MAASHANI, A., NOROUZIAN, R. S., MOHADJERANI, M. Immobilization of pepsin on chitosan magnetic nanoparticles and its application in deacetylation of amides. **Journal of Carbohydrate Chemistry.** 34(2), 103-119. 2015.

LEE, G.-H., LEE, M.-R., LEE, H.-Y., KIM, S. H., KIM, H.-K., KIM, H.-R., CHAE, H.-J. *Eucommia ulmoides* cortex, geniposide and aucubin regulate lipotoxicity through the inhibition of lysosomal BAX. **PLoS ONE**, 9(2), e88017. 2014. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0088017>.

LIU, D. M., CHEN, JUAN., SHI, Y. P. Advances on methods and easy separated support materials for enzymes immobilization. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, Volume 102, May 2018, Pages 332-342.

LIU, Y. Q., STRAPPE, P., SHANG, W. T., ZHOU, Z. K. Functional peptides derived from rice bran proteins. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, 59(2), 349-356. 2019.

LOREDO-LAREJOS, J. M., PORTO, R. L., PAVÓN, L. L., MORENO-CORTEZ, I. E. Pepsin immobilization by electrospinning of poly (vinyl alcohol) nanofibers. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 139, n. 9, p. 51700, 2022. <https://doi.org/10.1002/app.51700>.

MAGALHÃES, I. S., GUIMARÃES, A. D. B., TRIBST, A. A. L., DE OLIVEIRA, E. B., JÚNIOR, B. R. D. C. L. Ultrasound-assisted enzymatic hydrolysis of goat milk casein: Effects on hydrolysis kinetics and on the solubility and antioxidant activity of hydrolysates. **Food Research International**, 157, 111310. 2022.

MAMO, J., ASSEFA, F. The role of microbial aspartic protease enzyme in food and beverage industries. **Journal of Food Quality**, v. 2018, 2018.

MANYAR, H. G., GIANOTTI, E., SAKAMOTO, Y., TERASAKI, O., COLUCCIA, S., TUMBIOLO, S. Active Biocatalysts Based on Pepsin Immobilized in Mesoporous SBA-15. **J. Phys. Chem. C** 2008, 112, 18110–18116.

MARKET ANALYSIS REPORT. **Industrial Enzymes Market Size, Share & Trends Analysis Report By Product (Carbohydrases, Proteases, Lipases, Polymerases& Nucleases), By Source, By Application, By Region, And Segment Forecasts, 2020 – 2027**. Disponível em: <<https://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/industrial-enzymes-market#>>. Acesso em: 03/10/2021.

MAZLOOMI, S. N., MAHOONAK, A. S., MORA, L., GHORBANI, M., HOUSHMAND, G., TOLDRÁ, F. Pepsin Hydrolysis of Orange By-Products for the Production of Bioactive Peptides with Gastrointestinal Resistant Properties. **Foods** 2021, 10, 679. <https://doi.org/10.3390/foods10030679>.

MAZLOOMI-KIYAPEY, S. N., SADEGHI-MAHOONAK, A., RANJBAR-NEDAMANI, E., NOURMOHAMMADI, E. Production of antioxidant peptides through hydrolysis of medicinal

pumpkin seed protein using pepsin enzyme and the evaluation of their functional and nutritional properties. **ARYA Atheroscler**, 2019; 15(5): 218-27.

MILLÁN, G. C. L. **Peptídeos bioativos obtidos por hidrólise de proteína do soro de leite bovino mediada por proteases de *Lysobacter* sp. A03**. 62f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Porto Alegre/RS, 2021. Disponível em: <<https://www.lume.ufrgs.br/handle/10183/235942>>. Acesso em: 13 abr. 2023.

MO, H., QIU, J. Preparation of Chitosan/Magnetic Porous Biochar as Support for Cellulase Immobilization by Using Glutaraldehyde. **Polymers**, 12(11), 2672. 2020 doi:10.3390/polym12112672.

MOHAMAD, N. R., MARZUKI, N. H. C., BUANG, N. A., HUYOP, F., WAHAB, R. A., An overview of technologies for immobilization of enzymes and surface analysis techniques for immobilized enzymes. **Biotechnol. Equip.** 2015, 29, 205.

MORELLON-STERLING, R., TAVANO, O., BOLIVAR, J. M., BERENGUER-MURCIA, A., VELAGUTI ERREZ, G., SABIR, J. S. M., TACIAS-PASCACIO, V. G., FERNANDEZ-LAFUENTE, R. A review on the immobilization of pepsin: a Lys-poor enzyme that is unstable at alkaline pH values, **Int. J. Biol. Macromol.** (2022), <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.04.224>.

MUTHU, S., GOPAL, V. B., SOUNDARARAJAN, S., NATTARAYAN K., NARAYAN, K. S., LAKSHMIKANTHAN, M., MALAIRAJ, S., PERUMAL P. Antibacterial serine protease from *Wrightia tinctoria*: Purification and Characterization. **Plant Physiology and Biochemistry**. v. 112, p. 161 - 172, 2017.

NASCIMENTO, M. C. do., ALENCAR, V. do N. S., NASCIMENTO, T. P., BATISTA, J. M. da S. B., PORTO, A. L. F. Proteases e suas aplicações biotecnológicas nas indústrias alimentícias. In: **Congresso Internacional da Agroindústria**, 2021. Inovação, Gestão e Sustentabilidade na Agroindústria. p1-19.

NEVES, M. I. L., VALDÉS, A., SILVA, E. K., MEIRELES, M. A. A., IBÁÑEZ, E., CIFUENTES, A. Study of the reaction between genipin and amino acids, dairy proteins, and milk to form a blue colorant ingredient. **Food Research International**, v. 157, p. 111240, jul. 2022. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2022.111240>.

NGUYENA, H. H., KIM, M. An Overview of Techniques in Enzyme Immobilization. **Applied Science and Convergence Technology**. 26 (6): 157-163, 2017.

NWACHUKWU, I. D., ALUKO, R. E. Structural and functional properties of food protein-derived antioxidant peptides. **J. Food Biochem.** 2019, 43 (1), e12761.

OLAGUNJU, A. I., OMOBA, O. S., ENUJIUGHA, V. N., ALASHI, A. M., ALUKO, R. E. Pigeon pea enzymatic protein hydrolysates and ultrafiltration peptide fractions as potential sources of antioxidant peptides: an in vitro study. **LWT - Food Science and Technology**, v. 97, p. 269-278, 2018. 10.1016/j.lwt.2018.07.003.

OLIVEIRA FILHO, J. G. de., SOUSA, H. A. de F., DA SILVA, E. R., EGEEA, M. B. Peptídeos bioativos no desenvolvimento de filmes ativos e biodegradáveis para alimentos, In: **Inovação em ciência e tecnologia de alimentos 3** [online]/Org. VIEIRA, V. B., PIOVESAN, N. – Ponta Grossa, Ed.: Atena, 2019.

O’SULLIVAN, S. M., LAFARGA, T., HAYES, M., O’BRIEN, N. M. Bioactivity of bovine lung hydrolysates prepared using papain, pepsin, and Alcalase. **J. Food Biochem**, 41(6):e12406. 2017.

PANDEY, D., DAVEREY, A., ARUNACHALAM, K. Biochar: Production, properties and emerging role as a support for enzyme immobilization. **Journal of Cleaner Production**. 255, 120267, 2020.

PENG, G., MENG, X., WANG, B., LIU, B., & CHEN, H. The Surface Characteristics of Chitosan Modified PSt-GMA Microspheres Influenced the Interactions and Properties of Immobilized Pepsin. **Journal of Macromolecular Science, Part A**, 2014, 52(1), 20–29. doi:10.1080/10601325.2014.976745.

PETERSOHN JUNIOR, E. **Imobilização de papaína em membranas de nanocelulose bacteriana**. 121f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Programa de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental, Curitiba, 2019.

PHONGTHAI, S., RAWDKUEN, S. Fractionation and characterization of antioxidant peptides from rice bran protein hydrolysates stimulated by in vitro gastrointestinal digestion. **Cereal Chemistry**, 97(2), 316-325. 2020.

POOJARI, Y., PALSULE, A. S, CLARSON, S. J., GROSS, R. A. Immobilization and Activity of Pepsin in Silicone Elastomers. **Silicon** 1, 37–45 (2009). <https://doi.org/10.1007/s12633-009-9002-6>.

PULIDO, R., BRAVO, L., SAURA-CALIXTO, F. Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by a modified ferric reducing/antioxidant power assay. **J. Agric. Food Chem.**, v. 48, n. 8, p. 3396–3402, 2000.

QIAN, B.; ZHAO, X.; YANG, Y.; TIAN, C. Antioxidant and anti-inflammatory peptide fraction from oyster soft tissue by enzymatic hydrolysis. **Food Science & Nutrition**, July 2020, vol 8, issue 7, pages 3947-3956. <https://doi.org/10.1002/fsn3.1710>.

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.

RAVEENDRAN, S., PARAMESWARAN, B., UMMALYMA, S. B., ABRAHAM, A., MATHEW, A. K., MADHAVAN, A., REBELLO, S., PANDEY, A. Applications of microbial enzymes in food industry. **Food Technology and Biotechnology**. 56:16–30. 2018.

REIS, C. L. B., DE SOUSA, E. Y. A., SERPA, J. de F., OLIVEIRA, R. C., DOS SANTOS, J. C. S. Design of immobilized enzyme biocatalysts: drawbacks and opportunities. **Quim. Nova**, Vol. 42, No. 7, 768-783, 2019. <http://dx.doi.org/10.21577/0100-4042.20170381>.

REN, X., LIANG, Q., ZHANG, X., HOU, T., LI, S., MA, H. Stability and antioxidant activities of corn protein hydrolysates under simulated gastrointestinal digestion. **Cereal Chemistry**, 95(6), 760-769. 2018.

RICARDI, N. C. **Desenvolvimento de biocatalisadores enzimáticos utilizando suportes porosos de óxidos mistos de sílica/titânia contendo quitosana**. 98f. Tese (Doutorado). Programa de pós-graduação em química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre/RS. 2021.

RISKÓ, T. C., CSAPÓ, Z. Goat keeping and goat milk products in human nutrition—Review. **Apstract Appl. Stud. Agribus. Commer.**, 13 (2019), pp. 24-36. <https://doi.org/10.19041/APSTRACT/2019/1-2/3>.

RODRIGUES, R. C., BERENQUER-MURCIA, A., CARBALLARES, D., MORELLON-STERLING, R., FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Stabilization of enzymes via immobilization: multipoint covalent attachment and other stabilization strategies. **Biotechnol. Adv.** 52 (2021), 107821, <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2021.107821>.

SALVADOR, I. **Atividade antioxidante e teor de resveratrol em cacau, chocolates, achocolatados em pó e bebidas lácteas achocolatadas**. 90f. Dissertação de Mestrado. Centro de Energia Nuclear na Agricultura - Universidade de São Paulo. Piracicaba, 2011. Disponível: < <https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/64/64134/tde-08022012-100355/pt-br.php> >.

SANCHEZ-REINOSO, Z.; COURNOYER, A.; THIBODEAU, J.; SAID, B. L.; FLISS, I.; BAZINET, L.; MIKHAYLIN, S. Effect of pH on the Antimicrobial Activity and Peptide Population

of Pepsin Hydrolysates Derived from Bovine and Porcine Hemoglobins. **Food Science & Technology**, 2021, 1, 1687-1701. <https://doi.org/10.1021/acsfoodscitech.1c00141>.

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.

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.

SANTOS, M. P. F., PORFÍRIO, M. C. P., JÚNIOR, E. C. S., BONOMO, R. C. F., VELOSO, C. M. Pepsin immobilization: Influence of carbon support functionalize. **International Journal of Biological Macromolecules**. 203 (2022) 67 -79. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.01.135>.

SHAHIDI, F. Antioxidants: Principles and applications. [s. 1.] **Elsevier Ltda**, 2015.

SHELDON, R. A., BASSO, A., BRADY, D. New frontiers in enzyme immobilisation: robust biocatalysts for a circular bio-based economy. **Chem. Soc. Rev.** 50 (2021) 5850–5862, <https://doi.org/10.1039/D1CS00015B>.

SHELDON, R. A., WOODLEY, J. M., Role of biocatalysis in sustainable chemistry, **Chem. Rev.** 118 (2018) 801–838.

SHUKLA, S. P., DEVI, S. Immobilization of pepsin on an acrylamide/2-hydroxyethyl methacrylate copolymer and its use in casein hydrolysis. **Journal of Applied Polymer Science**, Vol. 96, 1544–1549, 2005.

SIAR, E. H., ARANA-PEÑA, S., BARBOSA, O., ZIDOUNE, M. N., FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Immobilization/stabilization of ficin extract on glutaraldehyde-activated agarose beads. Variables that control the final stability and activity in protein hydrolyses. **Catalysts**. 8(4), 149. 2018.

SOUZA JÚNIOR, E. C., SANTOS, M. P., SAMPAIO, V. S., FERRÃO, S. P., FONTAN, R. C., BONOMO, R. C., VELOSO, C. M. Hydrolysis of casein from different sources by immobilized trypsin on biochar: Effect of immobilization method. **Journal of Chromatography B**, 1146, 122124. 2020.

SOUZA, L. T., VERÍSSIMO, L. A., PESSELA, B. C., SANTORO, R. R., RESENDE, R. R., MENDES, A. A. Imobilização enzimática: princípios fundamentais e tipos de suporte. In:

Biotecnologia Aplicada a Agro&indústria, cap 13, 2017. Disponível em: <
<https://digital.csic.es/handle/10261/196198>>.

STANFORTH, K. J., WILCOX, M. D., CHATER, P. I., BROWNLEE, I. A., ZAKHOUR, M. I., BANECKI, K. M. R. M., PEARSON, J. P. Pepsin properties, structure, and its accurate measurement: a narrative review. **Ann Esophagus**, 2022; 5:31. <http://dx.doi.org/10.21037/aoe-20-95>.

SUN, X., YU, Z., LIANG, C., XIE, S., WEN, J., WANG, H., WANG, J., YANG, Y., HAN, R. Developmental changes in proteins of casein micelles in goat milk using data-independent acquisition-based proteomics methods during the lactation cycle. **Journal of Dairy Science**, vol 106, Issue 1, 2023, p 47-60.

TACIAS-PASCACIO, V. G., MORELLON-STERLING, R., SIAR, E. H., TAVANO, O., BERENGUER-MURCIA, Á., FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Use of Alcalase in the production of bioactive peptides: a review, **Int. J. Biol. Macromol.** 165 (2020) 2143–2196, <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.10.060>.

TARAFDAR, A., SIROHI, R., GAUR, V. K., KUMAR, S., SHARMA, P., VARJANI, S., PANDEY, H. O., SINDHU, R., MADHAVAN, A., RAJASEKHARAN, R., SIM, S. J. Engineering interventions in enzyme production: Lab to industrial scale. **Bioresource Technology**, v. 326, 2021.

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

TEJPAL, C. S., VIJAYAGOPAL, P., ELAVARASAN, K., LINGA PRABU, D., LEKSHMI, R. G. K., ASHA, K. K., ANANDAN, R., CHATTERJEE, N. S., MATHEW, S. Antioxidant, functional properties and amino acid composition of pepsin-derived protein hydrolysates from whole tilapia waste as influenced by preprocessing ice storage, **J. Food Sci. Technol.** 54 (2017) 4257–4267, <https://doi.org/10.1007/s13197-017-2897-9>.

TOLDRÁ, F., GALLEGO, M., REIG, M., ARISTOY, M.-C., MORA, L. (2020). Recent progress in enzymatic release of peptides in foods of animal origin and assessment of bioactivity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 2020, 68, 46, p12842–12855.

TORRES, J. A., NOGUEIRA, F. G. E., SILVA, M. C., LOPES, J. H., TAVARES, T. S., RAMALHO, T. C., CORRÊA, A. D. Novel eco-friendly biocatalyst: soybean peroxidase immobilized onto activated carbon obtained from agricultural waste. **RSC Advances**. 7(27), 16460–16466. 2017.

WANG, C., CHEN, P. X., XIAO, Q., YANG, Q. M., WENG, H. F., ZHANG, Y. H., XIAO, A. F. Chitosan Activated with Genipin: A Nontoxic Natural Carrier for Tannase Immobilization and Its Application in Enhancing Biological Activities of Tea Extract. *Mar. Drugs*, 2021, 19, 166. <https://doi.org/10.3390/md190310166>.

WANG, D., ZHANG, M., ZOU, Y., SUN, Z., XU, W. Optimization of flavourzyme hydrolysis condition for the preparation of antioxidant peptides from duck meat using response surface methodology. *The Journal of Poultry Science*, v. 55, n. 3, p. 217-223, 2018.

WANG, R., ZTHAO, H., PAN, X., ORFILA, C., LU, W., MA, Y. Preparation of bioactive peptides with anidiabetic, antihypertensive, and antioxidant activities and identification of a-glucosidase inhibitory peptides from soy protein. *Food Sci. Nutr.*, 2019,7:1848-1856.

WANG, S. et al. Lignocellulosic biomass pyrolysis mechanism: A state-of-the-art review. *Progress in Energy and Combustion Science*, v. 62, p. 33–86, 2017.

WEN, C., ZHANG, J., ZHANG, H., DUAN, Y., MA, H. (2020). Plant protein-derived antioxidant peptides: Isolation, identification, mechanism of action and application in food systems: A review. *Trends in Food Science & Technology*, vol. 105, nov. 2020, p 308-322. Doi:10.1016/j.tifs.2020.09.01910.1016.

XIE, J., ZHANG, YI., SIMPSON, B. Food enzymes immobilization: novel carriers, techniques and applications. *Current Opinion in Food Science*, v. 43, p. 27-35, 2022.

YE, N., HU, P., XU, S., CHEN, M., WANG, S., HONG, J., CHEN T., CAI, T. Preparation and characterization of antioxidant peptides from carrot seed protein. *Journal of Food Quality*, v 2018, 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/8579094>.

YUAN, J., ZHENG, Y., WU, Y., CHEN, H., TONG, P., GAO, J. Double enzyme hydrolysis for producing antioxidant peptide from egg white: Optimization, evaluation, and potential allergenicity. *J. Food Biochem.* 2019, 44, 12.

YUE, M., JINZHE, L., YUXUAN, H., XI, L., NIANXU, D., XUEWEI, Z., JUNCAI, H., JIAGE, M. Physicochemical stability and in vitro digestibility of goat milk affected by freeze-thaw cycles. *Food Chemistry*, Vol 404, Part B, 2023.

YUSHKOVA, E. D., NAZAROVA, E. A., MATYUHINA, A. V., NOSKOVA, A. O., SHAVRONSKAYA, D. O., VINOGRADOV, V. V., SKVORTSOVA N. N., KRIVOSHAPKINA E.F. Application of immobilized enzymes in food industry. *J Agric Food Chem*, 2019, 67:11553-11567.

ZAKY, A. A., ABD EL-ATY, A. M., MA, A., & JIA, Y. An overview on antioxidant peptides from rice bran proteins: extraction, identification, and applications. **Critical reviews in food science and nutrition**, 62(5), 1350-1362. 2022.

ZDARTA, J., MEYER, A. S., JESIONOWSK, T., PINELO., M. A general overview of support materials for enzyme immobilization: Characteristics, properties, practical utility. **Catalysts**, v. 8, n. 2, 2018.

ZHANG, Q., TONG, X., LI, Y., WANG, H., WANG, Z., QI, B., ... & JIANG, L. Purification and characterization of antioxidant peptides from alcalase-hydrolyzed soybean (*Glycine max* L.) hydrolysate and their cytoprotective effects in human intestinal Caco-2 cells. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 67(20), 5772-5781. 2019.

ZHANG, H., LUO, J., LI, S., WEI, Y., WAN, Y. Biocatalytic Membrane Based on Polydopamine Coating: A Platform for Studying Immobilization Mechanisms. **Langmuir**, 2018, 34(8), 2585–2594. doi:10.1021/acs.langmuir.7b02860.

ZHANG, J., LIU, W., FANG, L., GU, R., LU, J., LI, G., Effect of acid and in vitro digestion on conformation and IgE binding capacity of major oyster allergen Cra g 1 (tropomyosin), **Allergol. Immunopathol.** 48 (2020) 26–33, <https://doi.org/10.1016/j.aller.2019.08.001>.

CAPÍTULO 2.

Imobilização da pepsina em carvão ativado e funcionalizado com glutaraldeído e genipina para síntese de peptídeos antioxidantes.

Resumo

A pepsina é uma protease bastante utilizada na indústria alimentícia. Os biocatalisadores produzidos a partir da sua imobilização em carvões ativados e modificados podem ser aplicados na síntese de peptídeos bioativos. Diante disto, objetivou-se avaliar os efeitos da imobilização da pepsina em carvão ativado modificado com glutaraldeído e genipina em soluções de extrato diferentes (50 % e 100 %), e a capacidade dos biocatalisadores de produzirem peptídeos com atividade antioxidante. A partir dos resultados, observou-se que as modificações com glutaraldeído (CAF) e/ou soluções de extrato de genipina 50 % e 100% (CAG 50 e CAG 100, respectivamente), foram realizadas na superfície dos carvões. O uso de carvão ativado e modificado proporcionou uma alta eficiência de imobilização da pepsina, destacando-se o CAG 50 que apresentou 99 % de massa adsorvida, além disso, obteve maior atividade em comparação às demais modificações. Os biocatalisadores mostraram atividade residual por 8 ciclos de uso, contudo, o CAG 50 obteve maior eficiência por 7 ciclos. A síntese de peptídeos através da hidrólise da caseína caprina foi alcançada pelos biocatalisadores e pela enzima livre, como mostram os resultados da cromatografia. Os peptídeos apresentaram potencial como agente antioxidante, com uma atividade de captura do radical DPPH variando entre 29,8 % a 65,2 %, porcentagem de proteção contra a oxidação do β -caroteno/ácido linoleico variando entre 25,4 % a 62,61 % e potencial de redução férrica (FRAP), variaram entre 456,1 $\mu\text{M Fe (II)}$ a 601,6 $\mu\text{M Fe (II)}$. Para todas as condições estudadas os melhores resultados foram obtidos com a enzima imobilizada no CAG 50. Conclui-se que a modificação em carvão ativado com extrato de genipina proporcionou melhores efeitos na atividade da pepsina podendo ser utilizada em substituição ao glutaraldeído. Além disso, mostrou potencial para aplicação na síntese de peptídeos com atividade antioxidante.

Palavras-chave: Carvão ativado, Imobilização, Genipina, Pepsina, Peptídeos.

1. INTRODUÇÃO

As enzimas proteolíticas são as responsáveis pela hidrólise de ligações peptídicas das proteínas e um dos grupos de grande importância para o comércio global de enzimas, estando a pepsina entre as mais eficientes (BHAT et al., 2017; SOUZA JÚNIOR et al., 2020; BARBOSA et al., 2020). A pepsina (EC 3.4.23.1) é uma endopeptidase aspártica, produzida na mucosa gástrica na forma de pepsinogênio (inativa), sendo ativada durante o processo digestivo com a diminuição do pH do meio. Possui a especificidade em degradar as proteínas preferencialmente no lado carboxílico da fenilalanina (Phe), leucina (Leu), ácido glutâmico (Glu) e tirosina (Tyr) (ZHANG et al., 2019). As aplicações abrangem diversos setores industriais, tais como curtimento de couro, detergente, agroquímica, farmacêutica e alimentícia. Na indústria alimentícia, vem aumentando o interesse em seu uso para produção de hidrolisados proteicos com capacidade bioativa. Esta capacidade bioativa diz respeito aos peptídeos que são produtos da reação hidrolítica de proteínas (MORELLON-STERLING, et al., 2022; CASTANEDA-VALBUENA, et al., 2022).

O leite e seus derivados são as principais fontes de proteínas utilizadas para produção de peptídeos bioativos. A partir da hidrólise da caseína do leite de diversas espécies, foram descritos

peptídeos bioativos com atividades antimicrobianas, antioxidantes, antidiabéticas, anticoagulantes, anti-hipertensivas e imunomoduladoras (JAN et al., 2016; ABDEL-HAMID et al., 2017; CARNEIRO et al., 2018; REYES-DÍAZ et al., 2018; FAN et al., 2019; TU et al., 2021; MUDGIL et al., 2021; SHANMUGAM et al., 2021; IRAM et al., 2022). Dentre as diferentes funções que os peptídeos podem desempenhar, a atividade antioxidante tem ganhado bastante destaque. Os peptídeos antioxidantes são capazes de inativar espécies reativas de oxigênio, eliminar os radicais livres, quelar metais, reduzir hidroperóxidos e eliminar oxidantes específicos dos alimentos, por isso, possuem larga aplicação nos setores farmacêutico, cosmético e nutricional, além de servirem como aditivos naturais em alimentos, atribuição que tem ganhado importância crescente (BASHIR et al., 2017; TADESSE; EMIRE et al., 2020; GOMES et al., 2022).

Devido as funções que os peptídeos bioativos podem desempenhar para o benefício da saúde humana, assim como o uso de enzimas para obtenção dos mesmos, tem crescido as pesquisas com foco em estratégias para obtenção de peptídeos com maior rendimento e funções potencializadas, e isto encontra-se estritamente relacionado com o desempenho catalítico da enzima utilizada (TOLDRÁ; MORA, 2023). Apesar das vantagens em utilizar enzimas em uma gama de aplicações, o seu emprego em processos pode apresentar algumas limitações, sendo necessário empregar estratégias que visem a otimização das funções catalíticas da enzima. Estas limitações estão associadas ao uso de enzimas com elevada pureza, altos custos, baixa estabilidade operacional, dificuldade de separação e reutilização (SANTOS et al., 2022).

A imobilização de enzimas tem sido uma das estratégias eficientes utilizadas para superar essas limitações. Além de oferecer as vantagens de fácil recuperação e reutilização, a imobilização enzimática pode ser uma ferramenta poderosa para melhorar muitas outras características da enzima, como a estabilidade a alterações de pH ou temperatura no meio reacional, expandindo ainda mais a possibilidade de emprego em diversos setores, bem como, o aumento da atividade enzimática e seletividade (DAL MAGRO, et al., 2020; RODRIGUES, et al., 2021).

Os carvões ativados podem ser empregados como suporte na imobilização de biomoléculas e conferir efeitos positivos à enzima imobilizada (SANTOS et al., 2019; SOUZA JUNIOR et al., 2020; DE OLIVEIRA, 2021). Os carvões ativados possuem propriedades importantes, tais como porosidade definida, elevada área superficial, resistência mecânica e química, e grupos funcionais reativos. As modificações químicas propiciam um aumento nas interações entre a enzima e o suporte tornando a imobilização mais eficiente. O glutaraldeído é o principal agente modificador, no entanto, devido a sua alta toxicidade, outros agentes naturais e não tóxicos, como a genipina, estão sendo estudados com o intuito de substituí-lo (RAMANI et al., 2012; DANISH; AHMAD, 2018; SANTOS et al., 2022). Os biocatalisadores obtidos pela imobilização de enzimas

proteolíticas em carvão ativado podem ser utilizados na hidrólise de caseína de diferentes fontes para a produção de peptídeos bioativos (SOUZA JÚNIOR et al., 2014; SANTOS et al., 2022). Portanto, a imobilização de protease em carvões ativados parece ser uma abordagem interessante para produzir peptídeos bioativos.

Diante do exposto, este trabalho teve o objetivo de produzir peptídeos com capacidade antioxidante utilizando a pepsina imobilizada em carvão ativado, sintetizado a partir do caroço de umbu e modificado com glutaraldeído e genipina em soluções de 50 % e 100 % de extrato, através dos ensaios da hidrólise da caseína caprina, comparando os efeitos com a enzima livre.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Obtenção da caseína do leite de cabra

A caseína do leite de cabra foi obtida conforme a metodologia de Egito et al., (2006). Para isso, utilizou-se amostras de leite de cabra, acondicionadas e congeladas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, estas amostras foram previamente desnatadas em centrífuga a 2100 g por 30 minutos a $32\text{ }^{\circ}\text{C}$. Posteriormente, a caseína foi obtida por precipitação isoelétrica em pH 4,6 com solução de 1 mol.L^{-1} de HCl, sendo o precipitado recuperado pela centrifugação a 1100 g por 20 minutos a $32\text{ }^{\circ}\text{C}$, em seguida, o precipitado foi solubilizado em pH 7,0, com solução de 1 mol.L^{-1} de NaOH, dialisado com água deionizada a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, liofilizado e estocado a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$.

2.2 Caracterização do material precursor do carvão ativado

O material precursor foi caracterizado quanto ao teor de cinzas de acordo com a metodologia 920.03, descrita pela AOAC (1995). Os teores de lignina, celulose e hemicelulose foram determinados usando as metodologias de fibra em detergente neutro e fibra em detergente ácido (FDN e ADF), descritas por VAN SOEST et al., (1991).

2.3 Síntese e modificações do carvão ativado

Inicialmente, os caroços de umbu foram limpos e secos em estufa a $105\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 24 h, em seguida foram triturados em moinho de faca e peneirados até a granulometria de 20 mesh. Para a síntese do carvão ativado quimicamente, foi adicionado ao material precursor, ácido fosfórico (VETEC 85 % P.A.) na razão mássica de impregnação 3:1 (massa de ativante/massa do precursor) e seco em estufa (TECNAL, modelo: 393-1) a $105\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 24 h. Em seguida, realizou-se a carbonização. Utilizou-se um forno mufla (EDG 3P-S, modelo 3000), sob fluxo de nitrogênio (50 mL.min^{-1}) com taxa de aquecimento de $5\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$, até a temperatura final de $500\text{ }^{\circ}\text{C}$, que foi mantida constante por 60 min. O carvão ativado obtido foi lavado com água quente até a neutralização da água de lavagem, e após isso, o material foi seco em estufa a $105\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 24 h e peneirado em uma peneira de $420\text{ }\mu\text{m}$.

Para a modificação da superfície do carvão ativado, utilizou-se o glutaraldeído e o extrato líquido concentrado de genipina obtido a partir do mesocarpo do jenipapo verde (6,46 mg/mL), que foi obtido anteriormente por Santos et al., (2022). A modificação com glutaraldeído (CAF) seguiu conforme metodologia descrita por Ramani et al., (2012). Foi preparado 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), em seguida, foram adicionados 10,0 g do carvão ativado seco à solução, deixando a mistura sob agitação por 10 min, desta forma, foi obtido o carvão ativado amino funcionalizado, em seguida realizou-se a inserção do grupo aldeído por adição de glutaraldeído. Para isso, foi preparada uma solução de 1:1 (v/v) contendo glutaraldeído (25 %, P.S – CAS: 111-30-8) e acetona (P.A - CAS: 67-64-1) e, em seguida, a mistura foi adicionada ao carvão funcionalizado sob agitação suave durante 30 min utilizando um agitador magnético. Ao final, o material foi seco a 70 °C durante 24 h, lavado com água destilada para remover os produtos químicos não ligados, seco a 110 °C durante 6 h em estufa (TECNAL, modelo: 393/1), peneirado (40 mesh) e armazenado em recipiente hermético.

Para a modificação com genipina, seguiu-se a metodologia descrita por Santos et al., (2022). Para tanto, utilizou-se soluções de 50 % e 100 % do extrato de genipina. A solução de extrato de genipina 100 % e acetona (P.A - CAS: 67-64-1), foi preparada na proporção de 1:1 (v/v), posteriormente a mistura foi adicionada ao carvão aminofuncionalizado sob agitação suave durante 30 minutos utilizando um agitador magnético. O material foi seco a 60 °C durante 24 h. Após a evaporação do solvente o carvão funcionalizado foi lavado com água destilada para remover os produtos químicos não ligados e secos a 60 °C durante 6 h em estufa (Tecnal, modelo: 393/1). Em seguida o carvão funcionalizado com genipina (CAG 100) foi peneirado (40 mesh) e armazenado em recipiente hermético. Para a modificação com extrato de genipina 50 %, preparou-se uma solução com a mistura de extrato de genipina (16,75 mL), acetona (P.A - CAS: 67-64-1) (33,5 mL) e água destilada (16,75 mL), que foi adicionada ao carvão aminofuncionalizado, permanecendo sob agitação suave com o auxílio de um agitador magnético durante 30 minutos. Posteriormente o material foi seco a 60 °C durante 24 h, ao término, o carvão funcionalizado com extrato de genipina 50 % (CAG 50) foi peneirado (40 mesh) e armazenado em recipiente hermético.

2.4 Caracterização dos carvões

2.4.1 Medidas de porosidade, área superficial específica (BET), FTIR, MEV e pH do Ponto de Carga Zero (pH_{PCZ})

As isotermas de adsorção e dessorção dos carvões ativados foram obtidas em um equipamento Micromeritics modelo ASAP 2420, utilizando aproximadamente 0,20 g de amostra. A princípio as amostras foram submetidas à um pré-tratamento, em que foram aquecidas a 60 °C por 2

h. Posteriormente foram obtidas isotermas de adsorção e dessorção de nitrogênio a 77 K. A área superficial específica foi determinada pela equação de BET (BRUNAUER, 1938), a distribuição de poros foi obtida a partir da isoterma de dessorção utilizando o método BJH (BARRET, 1951), enquanto que o volume dos microporos foi determinado pela análise t-plot a partir da isoterma de adsorção (LIPPENS, 1964).

Os grupos funcionais das amostras de carvões foram avaliados através da espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), utilizando a técnica de refletância total atenuada (ATR), em que as amostras são analisadas de forma direta no aparelho. Utilizou-se a região do infravermelho de 4000 a 500 cm^{-1} , sendo as leituras realizadas em absorbância no espectrofotômetro Agilent Cary 360 FTIR (Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA, USA).

A microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) foi utilizada com o intuito de determinar a morfologia dos suportes, e foi aplicada nas amostras de carvão ativado (CA) e carvão ativado funcionalizado com extrato de genipina 50 % e 100 % (CAG 50 e CAG 100) antes e após a imobilização. Para isso, as amostras foram fixadas em stubs, e a análise foi realizada em microscópio eletrônico de varredura QUANTA 250 (FEI COMPANY, Waltham, Massachusetts, EUA).

O pH_{PCZ} foi determinado de acordo com o experimento dos 11 pontos conforme realizado por Santos et al., (2022). O procedimento consistiu em colocar 50 mg da amostra de cada carvão em contato com 50 mL de solução de cloreto de sódio 0,10 mol.L^{-1} em diferentes valores de pH (1-11), mantidas sobre agitação constante durante 24 h. O pH de cada solução foi ajustado com solução 0,50 mol.L^{-1} de hidróxido de sódio ou ácido clorídrico 0,50 mol.L^{-1} . Ao final de 24 h, o pH foi medido e a partir dos valores, foi construído um gráfico, do pH final versus o pH inicial. O pH_{PCZ} corresponde à faixa onde o pH final se mantém constante independentemente do pH inicial, ou seja, a superfície comporta-se como um tampão.

2.5 Ensaios de imobilização da pepsina

A pepsina (E.C 3.4.23.1, mucosa gástrica suína, CAS: 9001-75-6), utilizada no presente estudo, foi obtida da empresa Sigma-Aldrich. Para a imobilização da pepsina, foi empregado o método da adsorção utilizando carvão ativado (CA) como suporte, e o método de imobilização por ligação covalente, utilizando os carvões modificados com glutaraldeído (CAF) e soluções de genipina preparadas com 50 % e 100 % do extrato (CAG 50 e CAG 100).

Os ensaios iniciaram com a elaboração de uma solução enzimática com concentração inicial de 1 mg.mL^{-1} , solubilizada em tampão ácido láctico/lactato de sódio 0.05 mol.L^{-1} em pH 3.0. Em seguida, em tubos de ensaio contendo 0.05 g de cada suporte, foram adicionadas alíquotas de 5.0

mL da solução enzimática, sendo os tubos mantidos sob agitação constante (20 rpm) em um agitador orbital à temperatura ambiente, durante 2 h. Passadas as 2 h, os tubos foram centrifugados a 3500 rpm por 5 min, e a partir do sobrenadante coletado foi realizada a quantificação de proteínas não adsorvidas utilizando o método de Bradford (1976). Foram realizadas lavagens sucessivas nas amostras com o intuito de remover e quantificar as enzimas não imobilizadas, até ser observado valores nulos de concentração de proteína no sobrenadante. O procedimento de lavagem consistia em adicionar 5 mL do respectivo tampão das amostras, deixar sob agitação a 20 rpm por 10 min, centrifugar a 3500 rpm por 5 min, retirar o sobrenadante e realizar a quantificação.

Após a obtenção dos biocatalisadores, os mesmos foram armazenados em solução tampão (pH 3,0) 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 foi possível determinar a capacidade de imobilização da enzima em cada um dos suportes, utilizando-se a Equação 1.

$$C_{im} \frac{V (C_{in} - C)}{m_s} \quad \text{Equação 1}$$

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

2.5.1 Determinação da atividade enzimática

A atividade enzimática da pepsina na forma livre e imobilizada, foi determinada com base na sua capacidade hidrolítica, a partir da quantificação de equivalente tirosina, que é produzida pela enzima após a hidrólise da caseína. O equivalente tirosina foi calculado através da curva de tirosina (0,01 a 0,01 mg/mL). Para tanto, seguiu-se a metodologia para determinação da atividade enzimática descrita por Yu et al., 2014.

Para determinação da atividade enzimática da pepsina em sua forma livre, foi elaborada inicialmente uma solução 2 % m/v de caseína de cabra como substrato para a enzima, que foi preparada em solução tampão ácido láctico/lactato de sódio 0.05 mol.L^{-1} em pH 3.0. Posteriormente, em tubos de centrifuga, foram adicionadas 5 mL do substrato e 1 mL de solução enzimática, que foram levados a um banho termostático a 40 °C durante tempos diferentes de hidrólise (60, 90 e 120 min). Ao final de cada tempo, foram adicionadas 2 mL de ácido tricloroacético (6.5 % m/v) ao conteúdo dos tubos, que foram agitados e centrifugados a 6000 rpm durante 6 min a 4 °C. Após esta etapa, foi retirado 1 mL do sobrenadante, que foi misturado em 5 mL de uma solução de carbonato de sódio (4 % m/v) e em 1 mL de solução de Folin-Ciocalteu (20 %, v/v) em tubos de ensaio. Os tubos foram levados a um banho termostático à temperatura de 37 °C por 20 min, e ao final, foi realizada a leitura de absorbância a 660 nm em espectrofotômetro (UV-Vis Quimis).

Para avaliação da atividade da pepsina imobilizada nos biocatalisadores, foram adicionadas 5 mL da solução de caseína de cabra (2 % m/v) em tubos de centrífuga contendo 50 mg dos biocatalisadores. Os tubos foram encubados a 40 °C em diferentes tempos de hidrólise (60, 90 e 120 min), ao término, os tubos foram centrifugados a 3000 rpm por 5 min, em seguida, o sobrenadante foi coletado e transferido para outro tubo de centrífuga contendo 2 mL de ácido tricloroacético (6.5 % m/v), sendo estes agitados e centrifugados a 6000 rpm durante 6 min, ao final, retirou-se 1 mL do sobrenadante, que foi misturado em 5 mL de solução de carbonato de sódio (4 % m/v) e a 1 mL de solução de Folin-Ciocalteu (20 % v/v), em tubos de ensaio, que foram mantidos a uma temperatura de 37 °C durante 20 min em banho termostático, posteriormente, foi realizado a leitura em espectrofotômetro (UV -Vis Quimis) em 660 nm.

2.5.2 Determinação dos ciclos de reuso dos biocatalisadores

Os biocatalisadores também foram avaliados quanto à quantidade de ciclos de reutilização, em cada tempo de hidrólise estudado, com intuito de observar por quantos ciclos de hidrólise a enzima imobilizada mantém sua atividade. Para isto, foi seguida a metodologia descrita anteriormente para determinação da atividade enzimática. Ao final de cada ciclo de hidrólise foram adicionadas 5 mL do tampão ácido láctico/lactato de sódio 0.05 mol.L⁻¹ nos tubos contendo os biocatalisadores com pepsina, os quais passaram por um processo de agitação (20 rpm/5 min) e centrifugação 3000 rpm/3 min), com o intuito de remover quaisquer resíduos de caseína presente no meio, deixando os biocatalisadores aptos para uma nova hidrólise.

2.6 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

A eletroforese foi realizada conforme metodologia descrita por Abeyrathne et al., (2016) com modificações. Foram analisados os hidrolisados obtidos pela enzima livre e imobilizada nos carvões (CA, CAF, CAG 50 e CAG 100) após 60 minutos, que foi o melhor tempo de hidrólise observado. As amostras foram misturadas com tampão contendo azul de bromofenol na proporção de 1:4, em seguida, foram fervidas por 5 min. Foi preparado o gel inferior de poliacrilamida na concentração de 13 % e o gel de empilhamento na concentração de 4 % e, após o preparo, foi injetado nas placas de vidro. Depois que o gel de empilhamento endureceu, a quantidade de 20 µl de cada amostra foi despejada nos poços do gel. Primeiramente, ajustou-se a voltagem de 70 V, permanecendo por 20 min. Em seguida, a voltagem do aparelho foi ajustada para 120 V e a corrida foi realizada em 110 minutos.

Após o final da corrida, o gel foi colocado em uma solução fixadora durante 2 h, ao final, procedeu-se com a coloração com nitrato de prata. Para isso, o gel permaneceu numa solução de tiosulfato de sódio (0,02 %) durante 1 min, em seguida, foi adicionado à solução de nitrato de prata (0,1 %) ao gel, que foi incubado em um local escuro por 30 minutos. Passados os 30 minutos, a

solução foi retirada e logo em seguida foi adicionado à solução reveladora, permanecendo o gel sob agitação por 3 min. Por fim, foi retirada a solução reveladora e adicionado ácido acético (1 %).

2.7 Perfil cromatográfico dos peptídeos obtidos a partir da hidrólise da caseína do leite caprino

Foram analisados os peptídeos obtidos da hidrólise enzimática da caseína caprina, utilizando a enzima livre e imobilizada nos carvões modificados. Utilizou-se a cromatografia líquida de fase reversa (RP-HPLC), no qual foi usada uma coluna C18 (250x4, 6mm de diâmetro interno, 5 mm de tamanho de partícula; ZORBAX Eclipse Plus C18), acoplada a uma pré-coluna (ZORBAX SB-C 18, 4,6mm ID x 12,5mm, 5 µm), conectada ao sistema HP Agilent 1260 Infinity II.

Foram empregadas duas fases móveis, a primeira (A) composta de uma solução de acetonitrila (5 %, v/v) e ácido trifluoroacético (0,1 %, v/v) e a segunda fase (B) formada por acetonitrila (50 %, v/v) e ácido trifluoroacético (0,1 %, v/v). Uma alíquota de 20 µL da amostra foi injetada automaticamente na coluna a um fluxo de 1mL/min das fases móveis A e B durante 70 minutos. A análise iniciou com o fluxo de 100 % da fase móvel A e decresceu linearmente durante 60 minutos até que 100 % do fluxo fosse representado pela fase B, de 60 a 65 minutos um novo gradiente linear foi realizado de maneira a estabelecer o fluxo a 100 % de A que foi mantido até o final da análise (70 minutos). A temperatura da corrida foi mantida a 30 °C, a detecção dos peptídeos foi realizada a 280 nm em um detector UV-Vis e a identificação foi realizada comparando os tempos de retenção dos picos separados e seus espectros de UV.

2.8 Determinação do potencial antioxidante *in vitro* dos peptídeos obtidos da hidrólise da caseína caprina

Os peptídeos obtidos da caseína caprina através da hidrólise enzimática com os biocatalisadores em 60 min, 90 min e 120 min de reação, foram testados quanto a seu potencial antioxidante *in vitro*, para isso, aplicou-se os métodos a baixo.

2.8.1 Capacidade de sequestro do radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil)

A capacidade de sequestro do radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) foi determinada de acordo com Li et al., (2013), com modificações. Inicialmente, preparou-se uma solução etanólica do radical DPPH (0,2 mM) que foi posteriormente ajustada em espectrofotômetro para uma faixa de absorbância inicial de 0,6 a 0,7 a 515 nm. Para a análise, 500 µL da solução de DPPH foram adicionados a 500 µL da amostra em tubos de ensaio previamente enrolados com papel alumínio, em seguida, a mistura foi homogeneizada e mantida por 30 min em um local escuro. A absorbância das amostras foi medida a 515 nm. A atividade antioxidante foi determinada através da inibição do radical DPPH utilizando a Equação 3.

$$\% \text{ de inibição do DPPH} = \left[\frac{(A_c - A_a)}{A_c} \right] \times 100 \quad \text{Equação 3}$$

Em que A_c corresponde a leitura de absorvância da amostra controle e A_a a absorvância da amostra.

2.8.2 Potencial antioxidante de redução férrica (FRAP)

Para determinação do potencial antioxidante pelo método FRAP, seguiu-se a metodologia descrita por Liu et al., (2019), com modificações. A solução de FRAP foi preparada usando tampão de acetato 0,3 M (pH 3,6), hexa-hidrato de cloreto férrico 20 mM ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) e TPTZ 10 mM (2,4,6-Tris(2-piridil)-s-triazina) na proporção de 10:1:1 (v/v/v), respectivamente. Em seguida, em tubos de ensaio previamente enrolados com papel alumínio, foram misturados 50 μL da amostra com 150 μL de água destilada e 1500 μL da solução de FRAP, posteriormente agitados em vórtex e mantidos em banho-maria a 37 °C por 30 min. Após este tempo, as leituras de absorvância foram realizadas a 595 nm. O reagente FRAP foi usado como branco para calibrar o espectrofotômetro. Uma curva padrão de sulfato ferroso hepta-hidratado ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) foi preparada em concentrações variadas na faixa de 500-2000 μM . Os valores de FRAP das amostras foram determinados usando a curva padrão e expressos como μM de Fe (II) equivalente por μL de amostra.

2.8.3 Inibição da oxidação do β -caroteno:ácido linoleico

Para determinação da atividade antioxidante através deste método, seguiu-se a metodologia descrita por Miller (1971). Inicialmente, preparou-se a mistura reativa adicionando-se 50 μg de ácido linoléico, 200 mg de Tween 40 e 1 mL de solução de β -caroteno (1 mg. mL^{-1} em clorofórmio). Posteriormente, a mistura foi submetida a um rotaevaporador (IKA®HB Digital, RV8, USA) a 50°C por 10 minutos para a completa evaporação do clorofórmio. Após a evaporação, adicionou-se aos poucos 50 mL de água previamente saturada com oxigênio durante 30 minutos agitando-se vigorosamente em agitador magnético, até formar uma emulsão. Em seguida, leu-se a absorvância da mistura em 470 nm que apresentou absorvância entre 0,6 e 0,7. Outra mistura reativa foi preparada de forma semelhante com exceção da adição da solução de β -caroteno para o branco. Em tubos de ensaio, previamente enrolados em papel alumínio, foram adicionados 500 μL da amostra e 5 mL da emulsão que foram ligeiramente agitados. Os tubos foram levados ao banho-maria a 50°C e as leituras a 470 nm foram realizadas antes e após 2 h de incubação. Os resultados foram expressos em porcentagem de proteção contra oxidação. A redução da absorvância do sistema sem amostra (Equação 4) é considerada como como 100% da oxidação.

$$\text{Redução da absorvância} = Abs_{inicial} - Abs_{final} \quad \text{Equação 4}$$

O decréscimo da leitura da absorvância das amostras é correlacionado com o sistema e estabelece a percentagem de oxidação (Equação 5), subtraindo-se a percentagem de oxidação de cada amostra de 100 (Equação 6).

$$\%Oxidação = \frac{[(Redução\ de\ Abs)amostra \times 100]}{(Redução\ Abs) sistema} \quad \text{Equação 5}$$

$$\%Proteção = 100 - (\%Oxidação) \quad \text{Equação 6}$$

2.9 Análise estatística

Os experimentos foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizados, com três repetições. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e, para avaliar as diferenças entre as médias, foi aplicado o Teste de Tukey ($p < 0,05$), através do software ASSISTAT versão 7.7 (SILVA, 2015). Os gráficos foram montados com auxílio do software Origin versão 2018 64Bit (OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Caracterização do material precursor

O material precursor obtido do caroço de umbu apresentou 52,51 % de celulose, 19,76 % de lignina e 9,90 % de hemicelulose. Conforme mencionado por Antero et al., (2020) a biomassa lignocelulósica é constituída predominantemente por celulose, hemicelulose e lignina, além de uma pequena quantidade de extrativos e cinzas (SANTOS, et al., 2019; GULEÇ et al., 2021). O resíduo obtido do caroço de umbu apresentou elevado teor de celulose, isto pode propiciar a formação de carvões ativados com maior área superficial e porosidade bem desenvolvida (ABUELNOOR et al., 2021). Altos teores também foi encontrado para lignina, ela influencia diretamente no rendimento dos materiais carbonáceos, uma vez que apresenta maior resistência térmica, sendo decomposta em temperaturas de 200 a 250 °C, que pode favorecer a produtos com maior rendimento (SHEN et al., 2021).

Segundo Zeng et al., (2019) os materiais lignocelulósicos possuem um teor de cinzas que varia de 0,8 e 15 %, neste estudo, o material precursor apresentou teor de cinzas de 0,7 %. O teor de cinza influencia no rendimento dos materiais carbonáceos, uma vez que precursores ricos em materiais inorgânicos levam a redução de compostos carbonáceos em sua estrutura e consequentemente a rendimentos menores (SANTOS et al., 2022). Após síntese do carvão ativado, o rendimento observado foi 43,40 %, desta forma, o caroço de umbu tem potencial como material precursor por apresentar alta porcentagem de componentes lignocelulósicos, favorecendo o bom desenvolvimento das características texturais do carvão ativado, como também no rendimento.

3.2 Caracterização dos suportes

3.2.1 Medidas de porosidade, área superficial específica (BET), MEV, FTIR e pH do Ponto de Carga Zero (pH_{PCZ})

Os resultados das propriedades texturais dos carvões avaliados podem ser visualizados na tabela 1. Todos os carvões funcionalizados apresentaram diminuição no tamanho da área superficial e volume de micro e mesoporos em comparação com o CA. A diminuição da área superficial dos carvões funcionalizados evidencia as mudanças estruturais ocasionadas pela inserção dos agentes modificadores. E esta diminuição é devido a obstrução dos poros causada pela alta densidade dos grupos introduzidos na superfície do suporte, como a etilenodiamina, o glutaraldeído e a genipina, que possuem alto poder de reticulação propiciando a formação de um carbono reticulado revestido. A redução da área superficial desses materiais está relacionada ao volume dos poros, ou seja, quanto maior a redução do volume dos poros, menor a área superficial (SANTOS et al., 2022).

Tabela 1. Propriedades texturais do carvão ativado (CA) e funcionalizado com glutaraldeído (CAF) e solução de extrato de genipina (CAG 50 e CAG 100) determinadas por adsorção/dessorção de N₂.

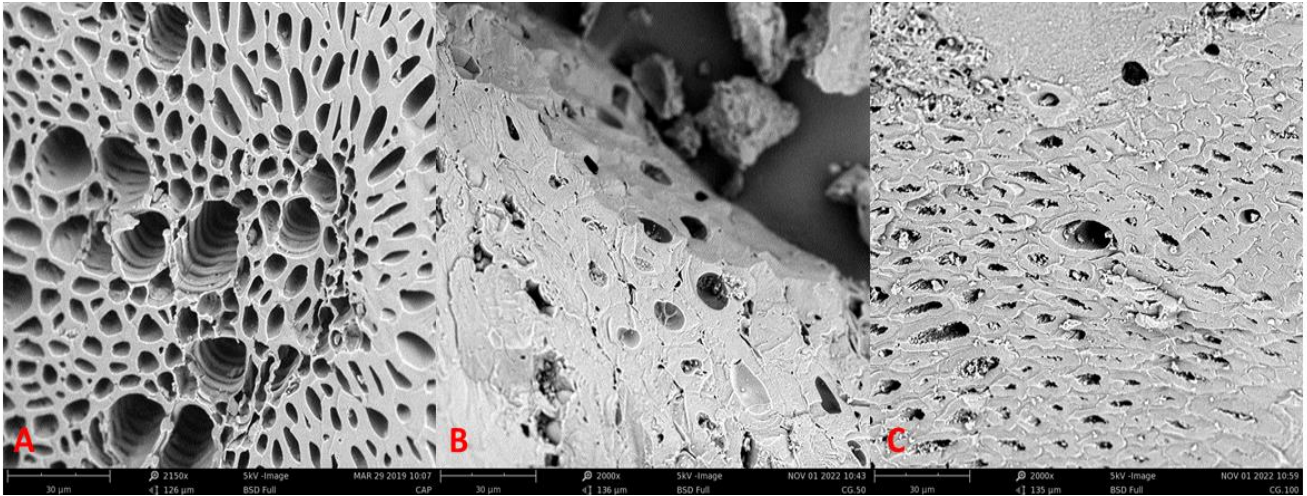
Amostra	Área (m ² /g) ^a	Dp (nm) ^b	Vmeso (cm ³ /g) ^c	Vmicro (cm ³ /g) ^d
CA	837	5,18	0,479	0,128
CAF	340	4,43	0,172	0,056
CAG 50	452	4,89	0,339	0,045
CAG 100	221	5,94	0,262	0,004

^a Área específica da superfície. ^b Distribuição média do diâmetro dos poros. ^c Volume de microporos. ^d Volume de mesoporos.

Quanto ao diâmetro dos poros, o CAF e CAG 50 apresentaram uma leve diminuição em comparação ao CA, esta diminuição pode ser consequência do recobrimento dos poros pelas moléculas de glutaraldeído ou genipina, que vão estar na superfície do carvão formando os braços espaçadores. Já o CAG 100, apresentou um aumento no diâmetro dos poros em comparação ao CA, este resultado também foi observado por Santos et al., (2019), Gonçalves et al., (2021) e Souza Júnior et al., (2020) em trabalhos com carvão ativado funcionalizado, relacionando o aumento do diâmetro à distância entre as moléculas dos funcionalizantes inseridas na superfície e a obstrução dos microporos.

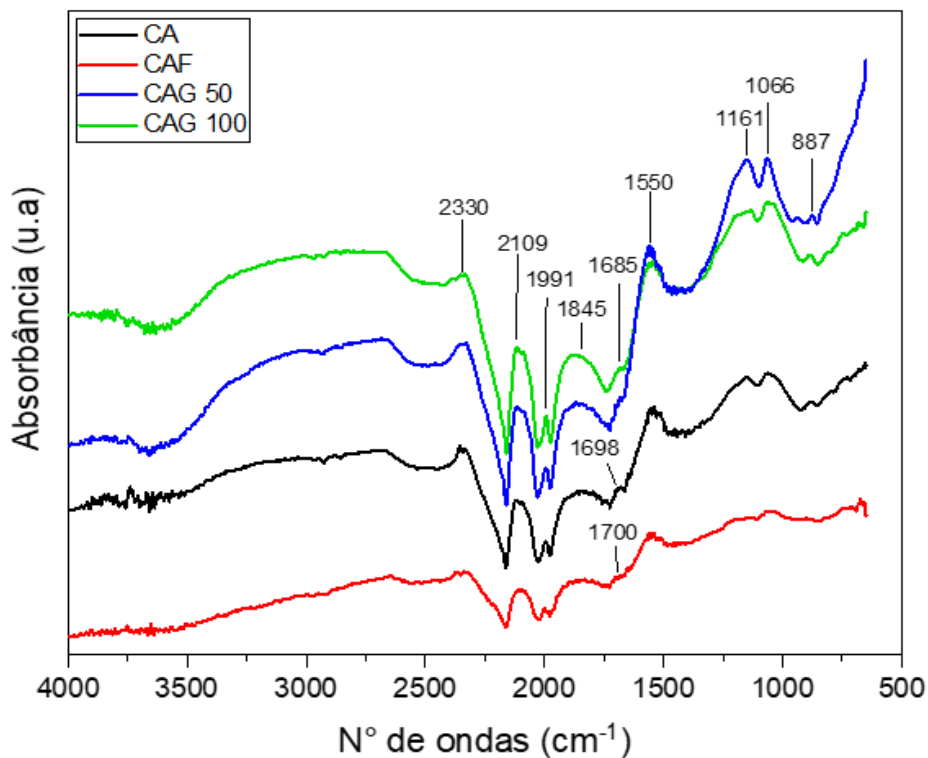
Em especial, o efeito da funcionalização com extrato de genipina na estrutura do carvão ativado, pôde ser visualizado nas imagens obtidas através do MEV (Figura 1). As imagens corroboram com os resultados das propriedades texturais dos carvões em que é possível identificar uma elevada área superficial com poros bem desenvolvidos na estrutura do CA (Fig 1A), estes poros estendem-se para o interior do material permitindo o acesso aos microporos e mesoporos. Já no CAG 50 (Fig 1B) e CAG 100 (Fig 1C), observa-se a obstrução dos poros pela inserção da molécula de genipina que formam braços espaçadores na superfície do material, com isso há a diminuição da área superficial e do volume de poros.

Figura 1. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) do carvão ativado (CA) e após funcionalização com extrato de genipina (CAG 50 e CAG 100) (fig. A, B e C, respectivamente).



Através da espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) foi possível avaliar os grupos funcionais presentes nas amostras de carvões analisadas (Figura 2). Os espectros dos carvões (Carvão ativado e carvão com a superfície modificada com glutaraldeído e genipina) mostraram diferenças na intensidade dos picos e surgimento de grupos funcionais relacionados ao tipo de modificação da superfície.

Figura 2. FTIR do carvão ativado (CA) e dos carvões modificados com Glutaraldeído (CAF), Genipina 50% e 100% (CAG 50 e CAG 100, respectivamente.).



Os espectros do carvão funcionalizado pelo método do glutaraldeído (CAF), em relação ao carvão ativado (CA), mostrou diferença na intensidade das bandas e a diminuição das mesmas

devido a modificação com o glutaraldeído nos comprimentos de ondas 1400 a 1000 cm^{-1} , que estão relacionados a vibrações de C–O de álcoois, ésteres, éteres, anidridos e ácidos carboxílicos. Os comprimentos de onda 1698 cm^{-1} e 1700 cm^{-1} observados nos espectros, podem estar relacionados a vibrações de C=O do grupo aldeído, no carvão funcionalizado pode ser um indicativo da modificação química com o glutaraldeído, visto que o mesmo apresenta em sua estrutura duas moléculas de aldeído, enquanto que no CA a presença de vibrações de C=O nesta região pode estar relacionado a amidas livres. Nos espectros dos carvões modificados com genipina, também é possível observar uma banda próxima a esta região (1685 cm^{-1}), que pode ser indicativo de vibrações de C=O do grupo aldeído presente na molécula de genipina (PAVIA, et al., 2010; SEGNEANU, et al., 2012; SANTOS, et al., 2022).

Desta forma, é possível deduzir que houve a modificação química da superfície dos carvões pelos respectivos métodos, e que segundo Santos et al., (2022) a presença de vibrações de C=O nos carvões modificados com genipina, na mesma faixa observada nos carvões funcionalizados com glutaraldeído, pode tornar a genipina um possível substituto ao glutaraldeído, uma vez que ambas as modificações estão presentes o grupo responsável pela ligação covalente entre a enzima e o suporte.

Destacam-se ainda, as bandas em comprimentos de ondas característicos presentes nas amostras em 1845 cm^{-1} e 1550 cm^{-1} correspondente ao estiramento C=O e C=C de materiais carbonáceos, em 1161 cm^{-1} que pode ser atribuída ao alongamento do hidrogênio ligado P=O em um éster de fosfato, ou ligação O–H em P–O–C, ou ligações P=O–O–H, advindo do processo de ativação química dos carvões com ácido fosfático, em 2109 cm^{-1} relacionado ao estiramento do grupo carbono-oxigênio derivado do grupo cetona, em 1991 cm^{-1} ao estiramento de grupos simétricos e assimétricos para o ácido carboxílico derivado de anidridos (C=O; C–O–C), em 2330 cm^{-1} banda relacionada a vibrações do grupo metil C–H e em 888 cm^{-1} correspondente a C–H fora do plano (PEREIRA et al., 2014; PAVIA et al., 2010; SANTOS et al., 2019). Os espectros obtidos nos carvões modificados com genipina (CAG 50 e CAG 100) também apresentaram maior intensidade nos comprimentos de ondas em 1550 cm^{-1} referente a vibrações do grupo amina (N–H), e em 1066 cm^{-1} relacionado ao álcool secundário (C–O) (ALDANA, et al., 2012; NGUYEN, et al., 2016).

Os resultados obtidos para ponto de carga zero (pH_{pcz}) podem ser visualizados na tabela 2. Os carvões modificados com glutaraldeído e extrato de genipina obtiveram pontos de carga zero maiores do que o carvão ativado. Valores de pH_{pcz} mais baixos estão relacionados com a maior quantidade de grupos ácidos presentes na superfície do carvão, como grupos carboxílicos e fenólicos. A ativação química com ácido fosfórico também resulta em menores valores de pH_{pcz}, uma vez que, ocasiona a inserção de grupos ácidos na superfície. Estes grupos funcionais, podem

ser observados a partir dos resultados de FTIR dos carvões nos comprimentos de ondas 1161 cm⁻¹ (P=O; P=O–OH), 1550 cm⁻¹ (C=O) e 1991 cm⁻¹ (C=O; C–O–C) (BRANDÃO et al., 2020).

Tabela 2. Ponto de Carga Zero (pH_{pcz}) do carvão ativado (CA) e dos carvões modificados com Glutaraldeído (CAF) e Genipina (CAG 50 e CAG 100).

Amostra	CA	CAF	CAG 50	CAG 100
pH _{pcz}	4,07	5,32	6,27	5,97

O aumento nos valores de pH_{pcz} observados nos carvões modificados em relação ao carvão ativado (CA), são indicativos do processo de aminação da superfície com a molécula de etilenodiamina para a inserção do glutaraldeído ou extrato de genipina. Este resultado é semelhante aos encontrados por Santos et al., (2022) ao modificarem a superfície do carvão ativado do caroço de tamarindo com extrato de genipina, obtendo o valor de pH_{pcz} 6,35 e por Souza Júnior et al., (2020) que observou um aumento no valor de pH_{pcz} do carvão funcionalizado com glutaraldeído em relação ao carvão ativado, atribuindo este aumento ao processo de aminação da superfície. De acordo com os autores De Yuso et al., (2014), o pH_{pcz} de carbonos está diretamente relacionado ao tipo de agente ativante, temperatura de carbonização e atmosfera do processo. Contudo, os resultados de pH_{pcz} também evidenciaram as alterações químicas realizadas na superfície dos carvões.

3.3 Ensaio de imobilização da pepsina

3.3.1 Efeito do tipo de modificação no carvão ativado na imobilização e capacidade de hidrólise da enzima livre e imobilizada em tempos diferentes

Avaliando o efeito da modificação na superfície do carvão ativado na imobilização da pepsina (Tabela 3), todos os carvões obtiveram médias de eficiência de imobilização superiores a 97 %, com destaque para o CAG 50 que alcançou média superior a 99 %.

Em relação à capacidade de imobilização dos suportes, todos obtiveram valores superiores a 96 (mg/g). Comparando os resultados dos carvões modificados com genipina, embora não tenha diferença entre eles, observa-se que a modificação com solução de extrato de genipina 50 % (CAG 50) proporcionou o melhor resultado, diferindo do carvão com glutaraldeído (CAF) e do carvão ativado (CA), enquanto que o carvão com extrato de genipina 100 % (CAG 100) obteve semelhança estatística do carvão com glutaraldeído (CAF) e ativado (CA). Estes resultados são bastante satisfatórios, significando que o uso de extrato de genipina em ambas as soluções estudadas, como ligante no processo de imobilização, obtém capacidade superior ou equivalente ao glutaraldeído. Os resultados mostram ainda, que é possível utilizar uma menor quantidade do extrato e obter com

eficiência uma maior capacidade de imobilização, assim, trazendo maior rentabilidade aos processos.

Tabela 3. Efeito da funcionalização do carvão ativado na imobilização da enzima em pH 3,0.

Amostra	M_{Lig} (mg)	C_{im} (mg/g)	Efic (%)
CAG 50	4,96 ± 0,03	99,01 ± 0,68 a	99,34 ± 0,77 %
CAG 100	4,94 ± 0,01	97,74 ± 0,42 ab	98,91 ± 0,43 %
CA	4,89 ± 0,02	97,47 ± 0,70 b	98,06 ± 0,52 %
CAF	4,88 ± 0,01	96,34 ± 0,30 b	97,66 ± 0,28 %

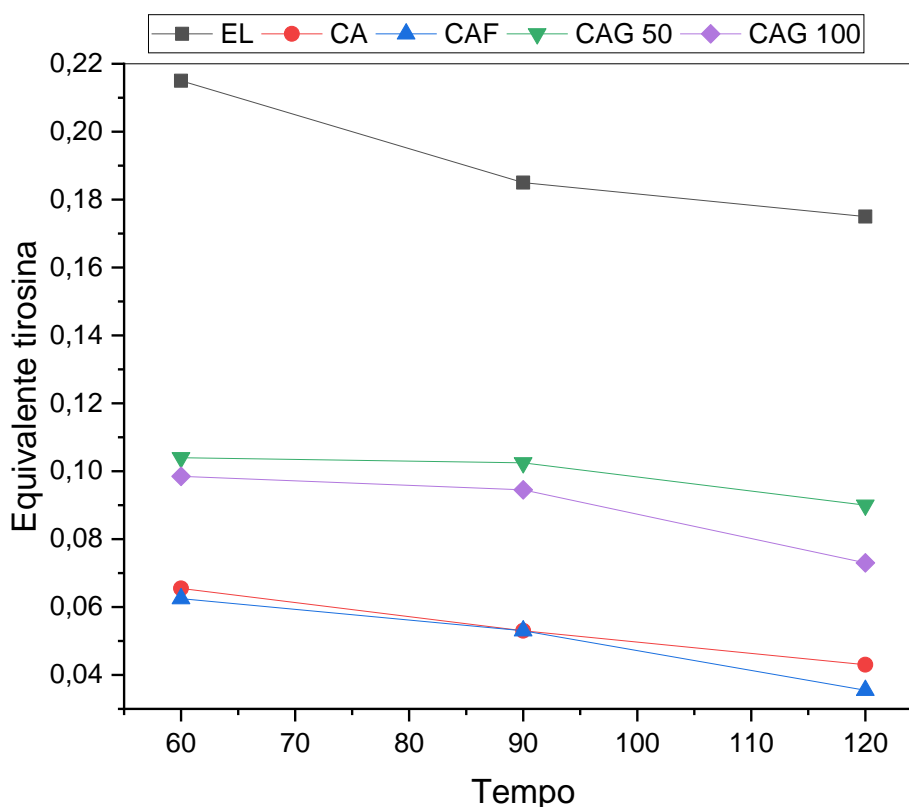
Massa de Enzima Ligada (M_{Lig}), Capacidade de Imobilização (C_{im}), Eficiência de imobilização (Efic). Médias seguidas de mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste Tukey (p < 0,05).

Embora o glutaraldeído tenha sido usado largamente como o principal agente reticulante, cresce a procura por substitutos devido a sua alta toxicidade. A genipina é um composto natural e com baixo risco biológico e por isso, atrai muito interesse como agente de reticulação na indústria de alimentos ou para usos biomédicos, em substituição ao glutaraldeído (DU et al., 2020). Segundo Flores et al., (2019), a alta capacidade de imobilização da genipina ocorre devido a troca iônica seguida da provável formação de ligações covalentes entre os grupos amino presentes na enzima com os grupos aldeídos da genipina. Em condições ácidas os grupos amino fazem um ataque nucleofílico ao átomo de carbono número 3 (C-3), seguido pela abertura do anel dihidropirano que interage com grupo amino secundário no grupo aldeído recém formado, ou seja, a genipina atua como um dialdeído apresentando dois grupos aldeídos disponíveis para ligação, tornando-a mais estável quando comparada com glutaraldeído.

Os resultados da atividade enzimática da pepsina livre e imobilizada em função do tempo de hidrólise, podem ser visualizados na figura 3. Os resultados mostram que a enzima livre (EL) obteve maior capacidade de hidrólise produzindo maior quantidade de tirosina em todos os tempos avaliados, este resultado também foi observado em trabalhos realizados por Souza Júnior et al., (2020) ao estudarem a atividade enzima proteolítica livre e imobilizada em carvões na hidrólise da caseína caprina, e por Santos et al., (2022) ao avaliar a atividade hidrolítica da pepsina livre e imobilizada em carvões modificados na hidrólise da caseína bovina, sendo este comportamento atribuído à maior mobilidade da enzima livre, o que facilita um maior acesso ao substrato, enquanto que a enzima imobilizada nos carvões apresenta perda na flexibilidade, consequência da formação de ligações com o suporte, o que pode justificar a redução na atividade enzimática dos biocatalisadores. Mesmo com a redução da atividade, a enzima imobilizada apresentou capacidade de hidrólise durante todos os tempos avaliados, com destaque para os carvões modificados com

genipina (CAG 50 e CAG 100) que apresentaram melhor desempenho em comparação ao CA e CAF.

Figura 3. Capacidade de hidrólise da pepsina livre e imobilizada no carvão ativado (CA), carvão funcionalizado (CAF), carvão com extrato de genipina (CAG 50 e CAG 100) nos tempos de 60 min, 90 min e 120 min.



Avaliando a capacidade hidrolítica em função do tempo, observa-se que tanto a pepsina livre como imobilizada no CA e CAF obtiveram maior pico de hidrólise aos 60 min. Já os carvões com genipina (CAG 50 e CAG 100) permaneceram com a mesma atividade até os 90 min, posteriormente, observou-se um declínio na produção de tirosina. A queda da produção de tirosina para a enzima livre, CA e CAF, é observada logo após os 60 min. A diminuição da atividade ao longo do tempo pode ser decorrente da escassez de substrato que desacelera a reação de hidrólise.

Por tanto, a modificação do carvão ativado com soluções de extrato de genipina foi bastante eficiente e manteve a atividade durante todos os tempos de hidrólise avaliados, demonstrando melhores resultados em comparação ao carvão ativado (CA) e funcionalizado com glutaraldeído (CAF).

Embora os carvões ativados sejam considerados suportes eficazes na imobilização de enzimas, o método de imobilização por adsorção física possui algumas limitações devido a formação de uma ligação menos estável entre o suporte e a enzima que tem por consequência a vulnerabilidade a parâmetros físicos, como mudanças de temperatura, pH ou força iônica que

podem causar a dessorção e a lixiviação da enzima. (ZDARTA et al., 2018; PANDEY et al., 2020). Além disso, na imobilização de enzimas em carvões ativados, ou seja, em materiais porosos, as enzimas encontram-se aprisionadas no interior dos poros, isto dificulta o acesso ao substrato, e portanto leva a diminuição da atividade enzimática (SOUZA JÚNIOR, et al., 2020). Em relação ao carvão funcionalizado (CAF), a funcionalização com glutaraldeído, resulta numa reticulação bastante forte, devido a formação de ligações multipontuais com uma única enzima, no entanto, este tipo de ligação pode envolver sítios ativos importantes para atividade enzimática, bem como ocasionar a deformação na estrutura, resultando na diminuição da atividade (SANTOS et al., 2022).

A maior eficiência da genipina em relação ao carvão ativado (CA) e o glutaraldeído (CAF), pode ser atribuída a sua capacidade de permitir maior manutenção da atividade enzimática, maior flexibilidade ao sistema de reticulação devido ao arranjo de seus anéis cíclicos, e ao local onde as enzimas encontram-se aprisionadas, ou seja, na superfície do suporte, onde vão estar ligadas aos grupos funcionais da genipina, que facilita o acesso ao substrato, diminuindo problemas relacionados à impedimentos estéricos (KLEIN et al., 2016; BELLÉ et al., 2018; SANTOS et al., 2022).

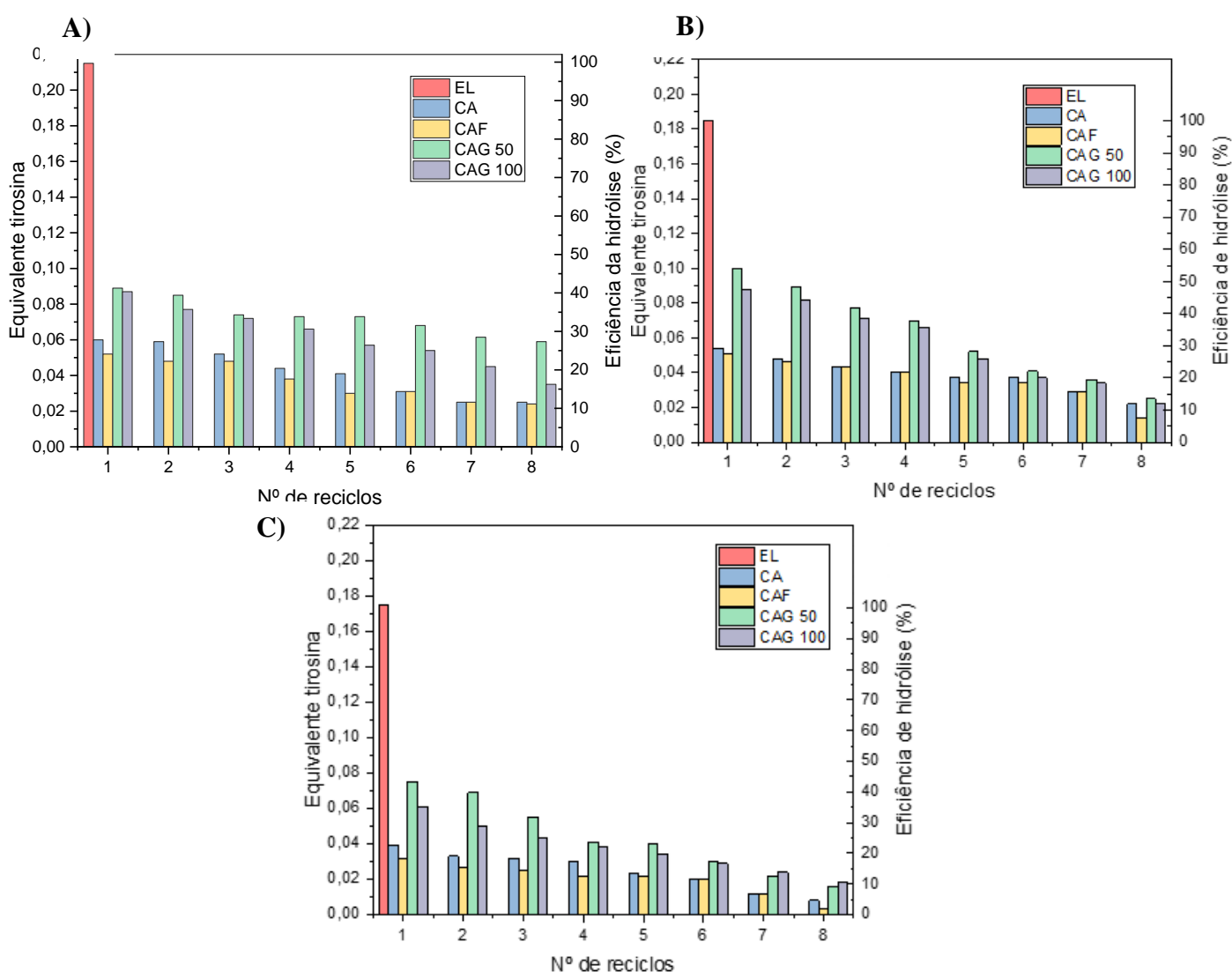
3.3.2 Ciclos de reutilização

Os resultados para os ciclos de reutilização e eficiência de hidrólise dos biocatalisadores nos tempos estudados (60 min, 90 min e 120 min), podem ser visualizados na Figura 4. Os biocatalisadores mostraram atividade residual durante 8 ciclos com melhor desempenho observado para o CAG 50, seguido pelo CAG 100, CA e CAF. Aos 60 minutos, o CAG 50 manteve a eficiência de hidrólise entre 30 e 40 % durante 7 ciclos, o CAG 100 manteve eficiência entre 30 e 40 % durante 4 ciclos, o CA obteve durante 4 ciclos eficiência de hidrólise entre 30 e 20 %, o CAF obteve eficiência entre 25 e 20 % durante 3 ciclos. Utilizando o tempo de 90 minutos de hidrólise, a eficiência do CAG 50 esteve entre 55 e 39 % durante 4 ciclos, o CAG 100 manteve eficiência entre 50 e 35 % durante 4 ciclos, já o CA e CAF obtiveram eficiência a baixo de 30 % durante os ciclos. Com 120 minutos, o CAG 50 e CAG 100 obtiveram eficiência de hidrólise entorno de 40 % e 30 %, respectivamente, enquanto que o CA e CAF obtiveram eficiências menores de 22 %.

A diminuição da atividade observada ao longo dos ciclos pode ser decorrente da dessorção enzimática no suporte, mencionado anteriormente em um trabalho realizado por Santos et al., (2022) analisando os ciclos de reutilização da pepsina imobilizada em carvão modificado. Além disso, alterações conformacionais e a obstrução dos poros do suporte, seja pelo acúmulo de substrato ou produtos, também são apontadas como causas da redução da atividade enzimática nos ciclos de reutilização (KUMAR et al., 2020). Comparando os suportes usais, verifica-se que o CA e CAF mostraram maiores reduções na atividade. Já entre os carvões com extrato de genipina, o CAG

50 foi capaz de proporcionar uma melhor retenção da atividade. Com isso, a enzima imobilizada em carvão modificado com solução de extrato de genipina 50 %, apresentou melhor resistência a dessorção enzimática, isto pode indicar que a enzima foi ligada fortemente ao suporte através de ligações covalentes e/ou eletrostática. Além disso, embora a enzima livre possua maior capacidade hidrolítica, sua utilização é de apenas um ciclo, a imobilização em suporte modificado com genipina (CAG 50) permitiu a sua reutilização por até 7 ciclos. Segundo Souza Júnior et al., (2020) os custos envolvidos no processo da enzima na forma imobilizada podem ser compensados pela possibilidade de reutilização do biocatalisador.

Figura 4. Capacidade de hidrólise e eficiência da hidrólise para os ciclos de reutilização dos biocatalisadores nos tempos de 60 min (A), 90 min (B) e 120 min (C).

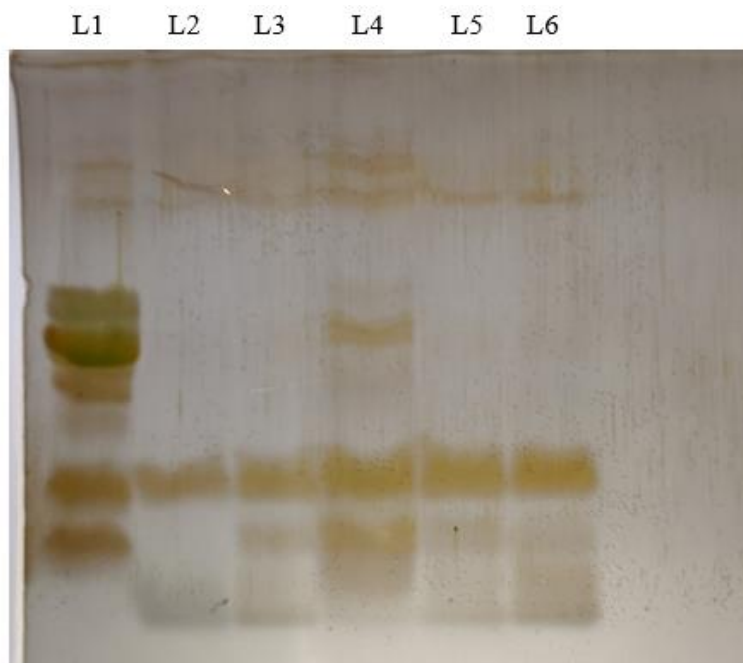


3.4 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) dos hidrolisados

De acordo com os resultados da atividade enzimática, aos 60 minutos houve uma maior quantidade de tirosina produzida pela EL, CA e CAF, enquanto que o CAG 50, produziu quantidade semelhante aos 60 e 90 minutos, com isso, escolheu-se os hidrolisados obtidos aos 60 minutos para

verificar o perfil de hidrólise através da eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) (Figura 5).

Figura 5. Imagem do gel de eletroforese SDS-PAGE e bandas formadas a partir do peso molecular de amostras do leite caprino (L1) e dos hidrolisados obtidos com a enzima livre (L2) e imobilizada no CA, CAF, CAG 50 e CAG 100 (L2, L3, L4, L5 e L6, respectivamente) após 60 minutos reacionais.



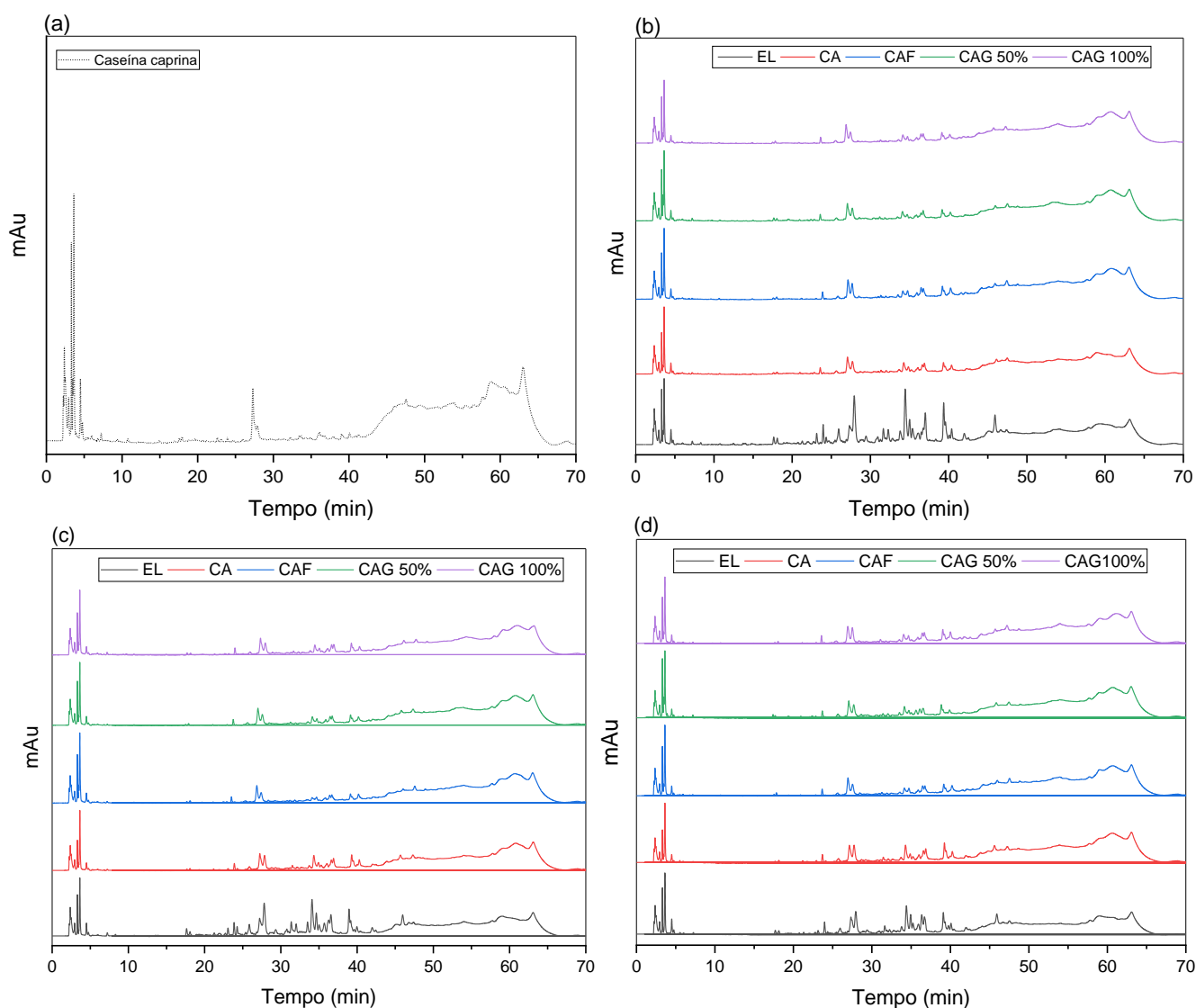
Com a análise, foi possível observar o perfil de hidrólise da enzima livre e imobilizada através do surgimento de bandas fortes e fracas ao longo do gel. A enzima livre (L2) hidrolisou mais fortemente a caseína do leite de cabra mostrando menor quantidade de bandas, enquanto que os hidrolisados obtidos do CA (L3), CAG 50 (L5) e CAG 100 (L6) apresentaram redução das bandas de modo semelhante, já o CAF (L4) mostrou maior quantidade de bandas visíveis, indicando menor eficiência na quebra da caseína do leite de cabra. Conforme mencionado por Shahi et al., (2020), em hidrolisados proteicos a ausência e/ou diminuição de bandas são indicativos da redução significativa do peso molecular e quebra das cadeias peptídicas de proteínas em peptídeos e aminoácidos. Em estudo realizado por Lira et al., (2010), verificou-se as variáveis que influenciam na hidrólise enzimática do leite de cabra, neste estudo, a imagem do gel de eletroforese do hidrolisado obtido pela pepsina, mostrou o surgimento de bandas pálidas com tamanho molecular abaixo de 14,4 kDa, indicando a eficiência dessa enzima para hidrólise da α s1, β e κ -caseína.

3.5 Perfil cromatográfico dos peptídeos obtidos a partir da hidrólise da caseína do leite caprino

Os cromatogramas podem ser visualizados na Figura 6. Para o comportamento da caseína do leite caprino (pH 3,0), é possível observar picos distribuídos ao longo dos 70 min analisados, com maior intensidade entre 0 e 10 min, seguido por um isolado entre 20 min e 30 min (a). Após a

hidrólise, nota-se o surgimento de novos picos (b, c, d), indicando que houve a clivagem das cadeias peptídicas da proteína dando origem a peptídeos, que são moléculas de baixo peso molecular.

Figura 6. Cromatograma da caseína caprina (a) e dos peptídeos obtidos a partir da hidrólise com a pepsina livre (EL) e imobilizada no carvão ativado (CA) e modificado (CAF, CAG 50% e CAG 100%) a 60 min (b), 90 min (c) e 120 min (d).



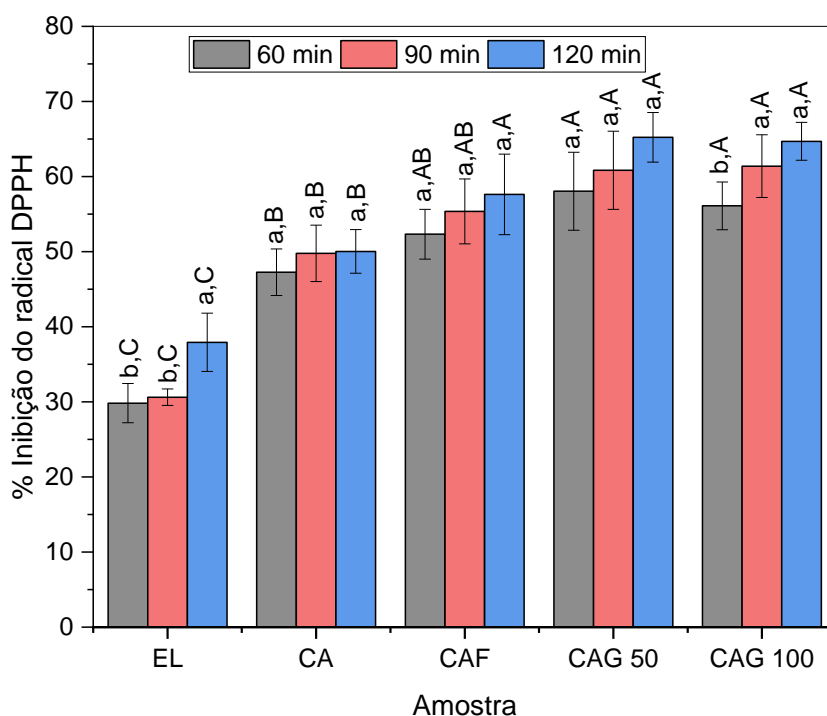
Observou-se que a enzima livre produziu maior quantidade e intensidade de picos em relação a enzima imobilizada nos carvões em todos os tempos avaliados, isto está de acordo com os resultados da capacidade de hidrólise, sendo este resultado associado a maior mobilidade da enzima em solução. No entanto, é observado que em todos os tempos, os biocatalisadores obtiveram comportamento semelhante ao da enzima livre (b, c, d), ou seja, a enzima imobilizada, independentemente do tipo de imobilização, manteve sua atividade específica, hidrolisando a caseína nos mesmos sítios. Segundo Santos et al., (2019) a obtenção do mesmo perfil peptídico está relacionada com a especificidade da pepsina em quebrar ligações envolvendo aminoácidos aromáticos fenilalanina, triptofano e tirosina. Contudo, entre 20 e 40 min foi observada a maior

presença de peptídeos, sendo a intensidade dos picos, correspondente a sua concentração no hidrolisado. Em relação ao tempo de hidrólise, poucas alterações foram observadas no perfil dos peptídeos gerados entre 60 e 120 min.

3.6 Potencial antioxidante *in vitro* dos peptídeos obtidos da hidrólise da caseína caprina

A atividade antioxidante de inibição do radical DPPH dos peptídeos gerados nos tempos de hidrólise de 60, 90 e 120 min, variaram de 29,8 a 65,2% (Figura 7), sendo as maiores porcentagens obtidas pelo CAG 50 e CAG 100. Avaliando o efeito do tempo dentro dos suportes, verifica-se que não houve diferença significativa para o potencial de inibição do radical DPPH dos peptídeos obtidos com a enzima imobilizada no CA, CAF e CAG 50, enquanto que, com a enzima livre (EL) e o CAG 100 os tempos maiores de hidrólise (90 min e 120 min) foram melhores para produzir peptídeos com atividade de inibição do radical DPPH.

Figura 7. Atividade antioxidante de inibição do radical DPPH dos peptídeos gerados pela hidrólise da caseína do leite de cabra com a enzima livre (EL) e imobilizada nos carvões (CA, CAF, CAG 50 e CAG 100) em diferentes tempos de hidrólise (60 min, 90 min e 120 min).

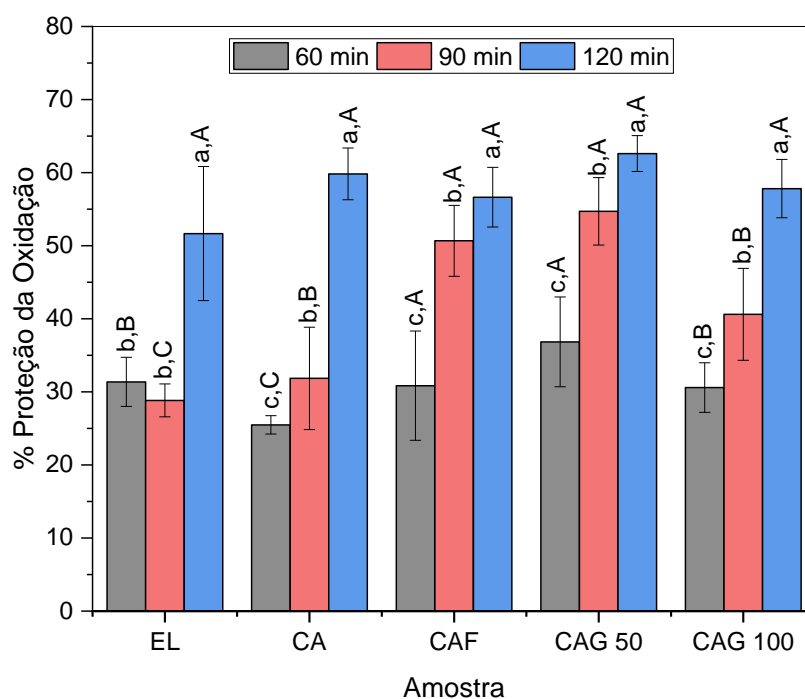


*Médias seguidas das mesmas letras minúsculas para amostras e maiúsculas para o tempo, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Avaliando-se o efeito do suporte em cada tempo, verifica-se que após 60 e 90 min de hidrólise, a pepsina imobilizada nos suportes CAG 100 e CAG 50, apresentou peptídeos com melhores percentuais de inibição, seguidos pelo CAF, CA e EL. Utilizando o tempo de 120 min, os carvões modificados (CAG 100, CAG 50 e CAF) obtiveram um melhor desempenho.

A figura 8 mostra o resultado obtido para atividade antioxidante medida pela proteção da oxidação do sistema β -caroteno-ácido linoleico. As amostras de peptídeos obtiveram porcentagem de proteção variando entre 25,4 a 62,61%, sendo a melhor porcentagem atribuída ao CAG 50. Avaliando o tempo em cada suporte, observa-se que todos obtiveram melhor resultado após 120 min de hidrólise. Com relação ao efeito do suporte em cada tempo, aos 60 e 90 min, foi possível obter melhores resultados para a enzima imobilizada no CAF e CAG 50, seguidos pelo CAG 100, CA e EL. Aos 120 min, verificou-se que todos os suportes, inclusive a enzima livre, foram capazes de produzir peptídeos com potencial de proteção da oxidação do sistema β -caroteno-ácido linoleico de forma semelhante.

Figura 8. Atividade antioxidante pela inibição da oxidação do sistema β -caroteno-ácido linoleico dos peptídeos gerados pela hidrólise da caseína do leite de cabra com a enzima livre (EL) e imobilizada nos carvões (CA, CAF, CAG 50 e CAG 100) em diferentes tempos de hidrólise (60 min, 90 min e 120 min).

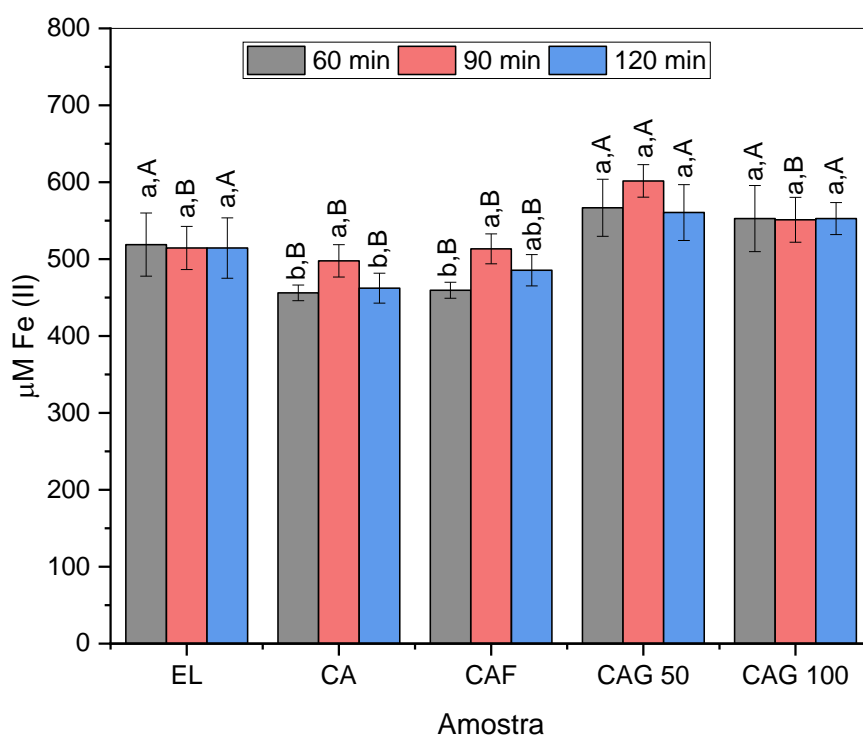


*Médias seguidas das mesmas letras minúsculas para amostras, e maiúsculas para o tempo, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Os resultados da atividade antioxidante medida pelo método FRAP podem ser visualizados na Figura 9. Os hidrolisados obtiveram potencial de redução férrica variando entre 456,1 a 601,6 $\mu\text{M Fe (II)}$, com o melhor resultado obtido pelo CAG 50. Avaliando o tempo em cada suporte, a enzima livre e os carvões funcionalizados com genipina (CAG 50 e CAG 100) mostraram efeito semelhante em todos os tempos avaliados. Já o CA e CAF mostraram melhores resultados aos 90 min de hidrólise. Quanto ao efeito do suporte em cada tempo, aos 60 e 120 minutos a enzima livre e

os carvões com genipina (CAG 50 e CAG 100) obtiveram o melhor desempenho, seguidos pelo CA e CAF. Utilizando o tempo de hidrólise de 90 min, o CAG 50 mostrou o melhor resultado diferindo dos demais suportes.

Figura 9. Atividade antioxidante pelo método FRAP dos peptídeos gerados pela hidrólise da caseína do leite de cabra com a enzima livre (EL) e imobilizada nos carvões (CA, CAF, CAG 50% e CAG 100%) em diferentes tempos de hidrólise (60 min, 90 min e 120 min).



*Médias seguidas das mesmas letras minúsculas para amostras, e maiúsculas para o tempo, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

De acordo com os resultados das análises, o uso da pepsina imobilizada em suportes modificados com soluções de extrato de genipina, em especial o CAG 50, proporcionou a formação de peptídeos com atividade antioxidante melhor do que os peptídeos gerados pela enzima livre, ou seja, mesmo que a atividade enzimática da pepsina livre tenha sido superior à imobilizada, os peptídeos gerados pelo CAG 50 e CAG 100, apresentaram atividade antioxidante melhor ou igual, o que pode justificar o processo de imobilização e acrescentar vantagens da genipina em comparação aos métodos usuais de imobilização (CA e CAF). Além disso, observou-se que a utilização de tempos maiores pode potencializar a formação de peptídeos com melhor atividade antioxidante. Tempos maiores de hidrólise pode contribuir com o aumento do grau de hidrólise, potencializando a reação de quebra das cadeias peptídicas das proteínas, com isso, é possível obter peptídeos de baixo peso molecular (ABEYRATHNE et al., 2016; TOLDRÁ et al., 2018; OLAGUNJU et al., 2018). Conforme mencionado por Bamdad et al., (2017) os peptídeos de baixo peso molecular possuem

melhor atividade antioxidante capazes de capturar os radicais livres e reduzir íons férricos, suprimindo seus efeitos pró-oxidantes.

A hidrofobicidade dos resíduos de aminoácidos também é um fator importante para atividade antioxidante dos peptídeos. Neste sentido, a pepsina se destaca devido a sua especificidade durante a hidrólise. Durante a hidrólise da pepsina, as ligações peptídicas entre os aminoácidos hidrofóbicos (preferencialmente Phe, Trp e Tyr) são clivadas, resultando em maior hidrofobicidade, fazendo com que os peptídeos gerados reajam adequadamente com os radicais livres (PHONGTHAI, et al., 2018). Além disso, os resíduos de aminoácidos hidrofóbicos também estão associados a capacidade de inibir a peroxidação lipídica, uma vez que, podem melhorar a solubilidade dos peptídeos na fase lipídica e facilitar as interações entre o peptídeo e os radicais livres, melhorando assim a capacidade de inibir a peroxidação lipídica. A presença de histidina e cisteína podem contribuir com a inibição da peroxidação lipídica devido a capacidade de doar hidrogênio de seu anel imidazólico (TOLDRÁ et al., 2020; WEN et al., 2020).

4. CONCLUSÕES

As modificações realizadas no carvão ativado ocasionaram em mudanças químicas e físicas na sua estrutura que favoreceram a imobilização enzimática. O uso de carvão ativado e modificado contribuiu para uma alta eficiência de imobilização da pepsina, com destaque para o CAG 50 que apresentou 99 % de massa adsorvida, com isso, soluções reduzidas de extrato de genipina podem ser utilizadas como braço-espaçador em substituição ao glutaraldeído.

Os biocatalisadores apresentaram atividade enzimática durante todos os tempos avaliados, mesmo havendo redução na atividade em comparação à enzima livre. A atividade da enzima imobilizada nos carvões com genipina foi superior à imobilizada no carvão ativado e funcionalizado com glutaraldeído. A variação do tempo de hidrólise influenciou na atividade enzimática. Aos 60 minutos houve uma maior produção de tirosina para o CA, CAF e enzima livre, enquanto que o CAG 50 manteve a produção nos dois primeiros tempos (60 e 90 min). Aos 120 minutos houve uma desaceleração na produção de tirosina para a enzima livre e imobilizada. O CAG 50 mostrou melhor desempenho durante os ciclos de reutilização, alcançando 7 ciclos com eficiência de hidrólise variando entre 30 e 40 %, utilizando o tempo de 60 min para hidrólise.

Todos os hidrolisados apresentaram potencial antioxidante medidos pelos métodos DPPH, FRAP e β -caroteno-ácido linoleico. No entanto, a melhor atividade antioxidante foi obtida pela enzima imobilizada no CAG 50 e tempos maiores de hidrólise (90 e 120 min) foram melhores para produzir peptídeos antioxidantes.

5. REFERÊNCIAS

- ABDEL-HAMID, M., OTTE, J., DE GOBBA, C., OSMAN, A., HAMAD, E. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity and antioxidant capacity of bioactive peptides derived from enzymatic hydrolysis of buffalo milk proteins. **International Dairy Journal**, 66, 2017, p 91–98. doi:10.1016/j.idairyj.2016.11.006.
- ABEYRATHNE, E. D. N. S., LEE, H. Y., JO, C., SUH, J. W., AHN, D. U. Enzymatic hydrolysis of ovomucin and the functional and structural characteristics of peptides in the hydrolysates. **Food Chemistry**, 192 (2016) 107-113.
- ALDANA, A. A., GONZÁLEZ, A., STRUMIA, M. C., MARTINELLI, M., Preparation and characterization of chitosan/genipin/poly(N-vinyl-2- pyrrolidone) films for controlled release drugs, **Mater. Chem. Phys.** 134 (2012) 317–324, <https://doi.org/10.1016/j.matchemphys.2012.02.071>.
- BAMDAD, F., SHIN, S. H., SUH, J. W., NIMALARATNE, C., SUNWOO, H. Anti-inflammatory and antioxidant properties of casein hydrolysate produced using high hydrostatic pressure combined with proteolytic enzymes. **Molecules**, 22(4), 609. 2017.
- BARBOSA, E. E. P., PIMENTA, L., BRITO, A. K. P., MARTIM, S. R., TEIXEIRA, M. F. S. Mushroom cultivation edible in lignocellulosic residues from rainforest for protease production. **Brazilian Journal of Development**. 6:92475–92485. 2020.
- BARRET, E. P., JOYNER, L. G., HALENDA, P. P. The determination of pore volume and area distributions in porous substances. I. Computations from nitrogen isotherms. **Journal of The American Chemical Society**. 73: 373-380, 1951.
- BASHIR., K. M. I., PARK, Y. J., AN, J. H., CHOI, S. J., KIM, J. H., BAEK, M. K., KIM, A., SOHN, J. H., CHOI, J.-S. Antioxidant properties of *Scomber Japonicus* hydrolysates prepared by enzymatic hydrolysis. **J. Aquat.. Food Prod. Technol.** 22 (1), 2017, 107—121.
- BELLÉ, A. S., HACKENNHAAR, C. R., SPOLIDORO, L. S., RODRIGUES, E., KLEIN, M. P., HERTZ, P. F. Efficient enzyme-assisted extraction of genipin from genipap (*Genipa americana* L.) and its application as a crosslinker for chitosan gels **Food Chemistry**. 246 (2018) 266–274. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.11.028>.
- BERNARDO, B. da S. **Produção de proteases e hidrolisados proteicos bioativos através da bioconversão de farinha de penas**. 33f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação), Licenciatura em Ciências Biológicas da Universidade Federal da Fronteira Sul, Cerro-largo - RS, 2018.

BHAT, Z. F., KUMAR, S., BHAT, H. F. Antihypertensive peptides of animal origin: A review. **Critical reviews in food science and nutrition**, v. 57, n. 3, p. 566-578, 2017.

BILAL, M., ZHAO, Y., NOREEN, S., SHAH, S. Z. H., BHARAGAVA, R. N., IQBAL, H. M. N. Modifying bio-catalytic properties of enzymes for efficient biocatalysis: a review from immobilization strategies viewpoint. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 37, n. 3, p. 159–182, 2019.

BRADFORD, M. M. 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.

BRANDÃO, A. C. T., QUEIROZ, V., SILVA, R. G. C. Síntese e caracterização de carvão ativado quimicamente com H₃PO₄ e NaOH a partir da casca de pequi (*Caryocar brasiliense*). **Braz. J. of Develop.**, Curitiba, v. 6, n. 8, p. 60945-60962 aug. 2020. DOI:10.34117/bjdv6n8-493.

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 H₃PO₄: kinetics, adsorption equilibrium and thermodynamic studies. **Powder Technol.** 339, 334-343, 2018.

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.

BRUNAUER, S., EMMET, P. H., TELLER, E. Adsorption of Gases in multimolecular layers. **Journal of The American Chemical Society**. 60: 309-319, 1938.

CARNEIRO, T. S. M., BARBOSA, P. P. de S., GADELHA, T. S. Identificação de peptídeos bioativos presentes no leite de cabra. In.: **70ª Reunião Anual da SBPC** - 22 a 28 de julho de 2018 - UFAL - Maceió / AL. Disponível em: <http://www.sbpcnet.org.br/livro/70ra/trabalhos/resumos/2530_1c63d2668e871695cb78672b2b6aec09d.pdf>. Acesso em: 24 de Jan. de 2023.

CASTAÑEDA-VALBUENA, D., BERENGUER-MURCIA, A., LAFUENTE, R. F., STERLING, R. M., PASCACIO, V. G. T. Biological activities of peptides obtained by pepsin hydrolysis of fishery products. **Process Biochemistry**, 120 (2022), 53-63. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2022.05.029>.

CORRONS, M. A., LIGGIERI, C. S., TREJO, S. A., & BRUNO, M. A. ACE-inhibitory peptides from bovine caseins released with peptidases from *Maclurapomiferalatex*. **Food Research International**, 93, 8–15, 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**. 87: 1–21, 2018.

DARIFFE, A. P., ORO, C. E. D., GONÇALVES, T. dos S., DENTI, A. F., TRES, B. P., DALLAGO, R. M., MIGNONI, M. L. Produção e funcionalização de suporte de parafina para imobilização enzimática. **Perspectiva**, Erechim. v. 45, n. 171, p. 73-83, setembro/2021 / DOI: 10.31512/persp.v.45.n.171.2021.161. p. 73-83.

DAL MAGRO, L., KORNECKI, J. F., KLEIN, M. P., RODRIGUES, R. C., FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Pectin lyase immobilization using the glutaraldehyde chemistry increases the enzyme operation range, **Enzym. Microb. Technol.** 132 (2020), 109397, <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2019.109397>.

DE OLIVEIRA, T. P. **Inserção de partículas metálicas em carvão ativado obtido do resíduo de sabugo de milho: aplicação como suporte para imobilização de lipase e sua utilização na síntese de aroma**. 72f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia – Itapetinga/BA. 2021.

DE YUSO, A. M., RUBIO, B., IZQUIERDO, M. T. Influence of activation atmosphere used in the chemical activation of almond shell on the characteristics and adsorption performance of activated carbons. **Fuel Process Technol** 119:74–80, 2014.

DIAS JÚNIOR, A. F., OLIVEIRA, R. N., DEGLISE, X. DE SOUZA, N. D., BRITO, J. O. Infrared spectroscopy analysis on charcoal generated by the pyrolysis of *Corymbia citriodora* wood. **Revista Matéria**, vol. 24, n. 03, ISSN 1517-7076 artigos e-12387, 2019.

DORNELLES, L. P., SOUZA, M. F. D., SILVA, P. M., PROCÓPIO, T. F., FILHO, R. S. R., LIMA, T. A., OLIVEIRA, A. P. S., ZINGALI, R. B., PAIVA, P. M. G., PONTUAL, E. V., NAPOLEÃO, T. H. Purification and characterization of a protease from the visceral mass of *Mytella charruana* and its evaluation to obtain antimicrobial peptides. **Food Chemistry**. 245: 1169-1175, 2018.

DU, J. R., HSU, L. H., XIAO, E. S., GUO, X., ZHANG, Y. Using genipin as a “green” crosslinker to fabricate chitosan membranes for pervaporative dehydration of isopropanol. **Separation and Purification Technology**, 244 (2020) 116843. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2020.116843>.

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.

FAN, M., GUO, T., LI, W., CHEN, J., LI, F., WANG, C., SHI, Y., LI, D. X-an., ZHANG, S. Isolation and identification of novel casein-derived bioactive peptides and potential functions in fermented casein with *Lactobacillus helveticus*, **Food Science and Human Wellness**, vol 8, Issue 2, 2019, p156-176.

FLORES, E. E. E., CARDOSO, F. D., SIQUEIRA, L. B., RICARDI, N. C., COSTA, T. H., RODRIGUES, R. C., KLEIN, M. P., HERTZ, P. F. Influence of reaction parameters in the polymerization between genipin and chitosan for enzyme immobilization. **Process Biochemistry**. 84: 73-80, 2019.

GOMES, J. E. G., NASCIMENTO, T. C. E. DA S., DE SOUZA-MOTTA, C. M., MONTALVO, G. S. A., BOSCOLO, M., GOMES, E., MOREIRA, K. A., PINTADO, M. P., DA SILVA, R. Screening and application of fungal proteases for goat casein hydrolysis towards the development of bioactive hydrolysates. **Journal of Food Measurement and Characterization**, 16(6), 4650-4664. 2022.

GONÇALVES, G. R. F., GANDOLFI, O. R. R., BRITO, M. J. P., BONOMO, R. C. F., FONTAN, R. da C. I., VELOSO, C. M. Immobilization of porcine pancreatic lipase on activated carbon by adsorption and covalent bonding and its application in the synthesis of butyl butyrate. **Process Biochemistry** 111, (2021) 114 – 123.

GONÇALVES, T. DOS S. **Produção e funcionalização “in situ” de espuma de poliuretano sintetizado na presença de glutaraldeído**. 2018. 128f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – URI Câmpus Erechim, Erechim, RS, 2018.

GULEÇ, F., RIESCO, L. M. G., WILLIAMS, O., KOSTAS, E. T., SAMSON, A., LESTER, E. Hydrothermal conversion of different lignocellulosic biomass feeds to chars- Effect of the process conditions on hydrochar structures, v. 302, p. 121-166, 2021.

HETTIARACHCHY, N. S., FELIZ, D. J., EDWARDS, J. S., HORAX, R. The use of immobilized enzymes to improve functionality. *Proteins in Food Processing*, **Woodhead Publishing**. 2: 569-597, 2018.

IRAM, D., SANSE, M. S., ZANAB, S., VIJ, S., MEENA, S. In silico identification of antidiabetic and hypotensive potential bioactive peptides from the sheep milk proteins—a molecular docking study. **Journal of Food Biochemistry**, p. e14137, 2022.

JIAN, X., ZHUANG, X., LI, B., XU, X., WEI, Z., SONG, Y., JIANG, E. Comparison of characterization and adsorption of biochars produced from hydrothermal carbonization and pyrolysis. **Environmental Technology & Innovation**, v. 10, p. 27–35, 2018.

KLEIN, M. P., HACKENHAAR, C. R., LORENZONI, A. S. G., RODRIGUES, R. C., COSTA, T. M. H., NINOW, J. L., HERTZ, P.F. Chitosan crosslinked with genipin as support matrix for application in food process: Support characterization and β -Dgalactosidase immobilization. **Carbohydrate Polymers**. 10 (137) :184-190, 2016.

KUMAR, A.; SAINI, K.; BHASKAR, T. Hydrochar and biochar: Production, physico chemical properties and techno economic analysis. **Bioresource Technology**, v. 310:123442,2020.

LI, Z., JIANG, A., YUE, T., WANG, J., WANG, Y., SU, J. Purification and identification of five novel antioxidant peptides from goat milk casein hydrolysates, **J. Dairy Sci.** 96 (2013) 4242–4251. doi:10.3168/jds.2012-6511.

LIU, D., CHEN, X., HUANG, M., ZHOU, G. Antioxidant activity of peptides in postmortem aged duck meat as affected by cooking and in vitro digestion, **Int. J. Food Prop.** 22 (2019) 727–736. doi:10.1080/10942912.2019.1605374.

LIPPENS, B. C., LINSEN, B. G., BÔER, J. H. Studies on pore systems in catalysts I. The adsorption of nitrogen; apparatus and calculation. **Journal of Catalysis**. 3: 32-37, 1964.

LIRA, T. B. F., BEZERRA, V. S., SILVA, F. de O., DIAS, G. M. P., FILHO, J. L. de L., PORTO, T. S., PORTO, A. L. F. Avaliação de variáveis que influenciam a hidrólise enzimática da caseína do leite de cabra Moxotó. **Pesq. Agropec. Bras.**, Brasília, v.45, n.9, p.1036-1043, 2010.

MILLER, H. E. A Simplified Method for the Evaluation of Antioxidants. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v. 48, n. 2, p. 91, 1971.

MORELLON-STARLING, R., TAVANO, O., BOLIVAR, J. M., BERENGUER-MURCIA, A., VELA-GUTIÉRREZ, G., SABIR, J. S. M., PASCACIO, V. G. T., LAFUENTE, R. F. A review on the immobilization of pepsin: A Lys-poor enzyme that is unstable at alkaline pH values. **International Journal of Biological Macromolecules**, 210 (2022) 682–702. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.04.224>.

MUDGIL, P., KAMAL, H., PRIYA KILARI, B., MOHD SALIM, M. A. S., GAN, C.-Y., & MAQSOOD, S. Simulated gastrointestinal digestion of camel and bovine casein hydrolysates: Identification and characterization of novel anti-diabetic bioactive peptides. **Food Chemistry**, 353, 2021, 129374. doi:10.1016/j.foodchem.2021.129374.

MUTHU, S., GOPAL, V. B., SOUNDARARAJAN, S., NATTARAYAN K., NARAYAN, K. S., LAKSHMIKANTHAN, M., MALAIRAJ, S., PERUMAL P. Antibacterial serine protease from *Wrightia tinctoria*: Purification and Characterization. **Plant Physiology and Biochemistry**. v. 112, p. 161 - 172, 2017.

NGUYEN, T. H., VENTURA, R., MIN, Y. K., LEE, B. T. Genipin Cross-Linked Polyvinyl Alcohol Gelatin Hydrogel for Bone Regeneration. **J. Biomedical Science and Engineering**, 9, 419-429. 2016. <http://dx.doi.org/10.4236/jbise.2016.99037>.

OLAGUNJU, A. I., OMOBA, O. S., ENUJIUGHA, V. N., ALASHI, A. M., ALUKO, R. E. Pigeon pea enzymatic protein hydrolysates and ultrafiltration peptide fractions as potential sources of antioxidant peptides: An in vitro study. **LWT - Food Science and Technology** (2018), doi: 10.1016/j.lwt.2018.07.003.

PANDEY, D., DAVEREY, A., ARUNACHALAM, K. Biochar: Production, properties and emerging role as a support for enzyme immobilization. **Journal of Cleaner Production**. 255, 120267, 2020.

PAVIA, D. L., LAMPMAN, G. M., KRIZ, G. S., VYVYAN, J. R. **Introdução à Espectroscopia**. Editora Cegance Laerning, 4^o Ed., 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 H₃PO₄ and ZnCl₂ as activating agents for BSA and α -lactalbumin adsorption. **Fuel Processing Technology**, 126, 476-486. 2014.

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.

REYES-DÍAZ, A., GONZÁLEZ-CÓRDOVA, A. F., HERNÁNDEZ-MENDOZA, A., REYES-DÍAZ, R., VALLEJO-CORDOBA, B. Immunomodulation by hydrolysates and peptides derived from milk proteins. **International Journal of Dairy Technology**, v. 71, n. 1, p. 1-9, 2018.

RODRIGUES, R. C., BERENQUER-MURCIA, A., CARBALLARES, D., MORELLON-STERLING, R., FERNANDEZ LAFUENTE, R. Stabilization of enzymes via immobilization: multipoint covalent attachment and other stabilization strategies, **Biotechnol. Adv.** 52 (2021), 107821, <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2021.107821>.

RODRIGUES, R. C., VIRGEN-ORTÍZ, J. J., DOS SANTOS, J. C. S., BERENQUER-MURCIA, A., ALCANTARA, A. R., BARBOSA, O., ORTIZ, C., FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Immobilization of lipases on hydrophobic supports: immobilization mechanism, advantages, problems, and solutions, **Biotechnol. Adv.** 37 (2019) 746-770, <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2019.04.003>.

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.

SANTOS, M. P. F., PORFÍRIO, M. C. P., JÚNIOR, E. C. S., BONOMO, R. C. F. Pepsin immobilization: Influence of carbon support functionalization. **International Journal of Biological Macromolecules**, 203 (2022), 67–79.

SIEBENEICHLER, E. A. **Características químicas e físicas de carvão de eucalipto (Eucalyptus cloeziana)**. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Viçosa. Programa de Pós-Graduação em Solos e Nutrição de Plantas. Viçosa, 2011.

SHAHI, Z., SAYYED-ALANGI, S. Z., NAJAFIFIAN, L. Effects of enzyme type and process time on hydrolysis degree, electrophoresis bands and antioxidant properties of hydrolyzed proteins derived from defatted *Bunium persicum* Bioss. press cake. **Heliyon** 6 (2020) e03365. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e03365>.

SHANMUGAM, V. P., KAPILA, S., KEMGANG, T. S., REDDI, S., KAPILA, R., MUTHUKUMAR, S., RAJESH, D. Isolation and Characterization of Angiotensin Converting Enzyme Inhibitory Peptide from Buffalo Casein. **International Journal of Peptide Research and Therapeutics**, 27(2), 2021, 1481–1491. doi:10.1007/s10989-021-10185-0.

SHEN, R., LU, J., YAO, Z., ZHAO, L., WU, Y. The hydrochar activation and biocrude upgrading from hydrothermal treatment of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, v. 342, 2021.

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

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 JÚNIOR, E. C., SANTOS, M. P., SAMPAIO, V. S., FERRÃO, S. P., FONTAN, R. C., BONOMO, R. C., VELOSO, C. M. Hydrolysis of casein from different sources by immobilized trypsin on biochar: Effect of immobilization method. **Journal of Chromatography B**, 1146, 122124. 2020.

SOUZA, P. M. P., CARBALLARES, D., LOPEZ-CARROBLES, N., GONÇALVES, L. R. B., LOPEZ-GALLEGO, F., RODRIGUES, S., FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Enzyme-support interactions and inactivation conditions determine *Thermomyces lanuginosus* lipase inactivation

pathways: functional and fluorescence studies, **Int. J. Biol. Macromol.** 191 (2021) 79–91, <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.09.061>.

TADESSE, S. A., EMIRE, S. A. Production and processing of antioxidant bioactive peptides: A driving force for the functional food market. **Heliyon**, 6 (2020) e04765.

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.

TOLDRÁ, F. MORA, L. Advanced enzymatic hydrolysis of food proteins for the production of bioactive peptides. **Current Opinion in Food Science**, 2023, 49:100973.

TOLDRÁ, F., REIG, M., ARISTOY, M. C., MORA, L. Generation of bioactive food peptides during food processing. **Food Chemistry**. v. 267, p. 395-404, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.06.119>.

TU, M., LIU, H., CHENG, S., MAO, F., CHEN, H., FAN, F., LU, W., DU, M. (2019). Identification and characterization of a novel casein anticoagulant peptide derived from in vivo digestion. **Food & Function**, 2019. doi:10.1039/c8fo02546k.

VAN SOEST, P. J., ROBERTSON, J. B., LEWIS, B. A. Methods for Dietary Fiber, Neutral Detergent Fiber, and Nonstarch Polysaccharides in Relation to Animal Nutrition. **J. Dairy Sci.** 74 (1991) 3583–3597. doi:10.3168/jds.S0022-0302(91)78551-2.

VIEIRA, E. F., FERREIRA, I. M. Antioxidant and antihypertensive hydrolysates obtained from by-products of cannery sardine and brewing industries. **International Journal of Food Properties**, 20(3), 662-673. 2017.

WANG, S. et al. Lignocellulosic biomass pyrolysis mechanism: A state-of-the-art review. **Progress in Energy and Combustion Science**, v. 62, p. 33–86, 2017.

WEN, C., ZHANG, J., ZHANG, H., DUAN, Y., MA, H. Plant protein-derived antioxidant peptides: Isolation, identification, mechanism of action and application in food systems: A review. **Trends in Food Science & Technology**, vol. 105, nov. 2020, p 308-322. Doi:10.1016/j.tifs.2020.09.01910.1016.

YU, Z. L., ZENG, W. C., ZHANG, W. H., LIAO, X. P., SHI, B. Effect of ultrasound on the activity and conformation of α -amylase, papain and pepsin. **Ultrason Sonochem.** 21:930–936 2014.

ZDARTA, J., MEYER, A. S., JESIONOWSK, T., PINELO., M. A general overview of support materials for enzyme immobilization: Characteristics, properties, practical utility. **Catalysts**, v. 8, n. 2, 2018.

ZHANG, Y., WANG, Y., TANG, Y., LI, R., JI, Y. An online immobilized pepsin microreactor based on polymer monoliths for screening inhibitors from natural products. **Analytical Methods**. 11 (18): 2465-2472, 2019.