



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO TOCANTINS
CAMPUS UNIVERSITÁRIO DE PALMAS
CURSO DE GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE ALIMENTOS**

ENYLSO XAVIER RAMALHO

**IMOBILIZAÇÃO DE TRIPSINA EM FIBRAS DE CELULOSE DE
TALOS DO MARACUJAZEIRO E SUA APLICAÇÃO NA HIDRÓLISE DE
CONCENTRADO PROTEICO DE FARELO DE ARROZ**

Palmas/TO

2019

ENYLSO N XAVIER RAMALHO

IMOBILIZAÇÃO DE TRIPSINA EM FIBRAS DE CELULOSE DE
TALOS DO MARACUJAZEIRO E SUA APLICAÇÃO NA HIDRÓLISE DE
CONCENTRADO PROTEICO DE FARELO DE ARROZ

Monografia apresentada à UFT – Universidade Federal do Tocantins – Campus Universitário de Palmas, Curso de Engenharia de Alimentos foi avaliada para a obtenção do título de Bacharel em Engenharia de Alimentos, sob orientação da Profa. Dra. Lina María Grajales Agudelo.

Orientadora: Professora Dra. Lina María Grajales Agudelo
Coorientadora: Profa. Dra. Yeimy Alejandra Rodriguez Restrepo

Palmas/TO

2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Tocantins

- R165i Ramalho, Enylson Xavier.
IMOBILIZAÇÃO DE TRIPSINA EM FIBRAS DE CELULOSE DE TALOS DO MARACUJAZEIRO E SUA APLICAÇÃO NA HIDRÓLISE DE CONCENTRADO PROTEICO DE FARELO DE ARROZ. / Enylson Xavier Ramalho. – Palmas, TO, 2019.
50 f.

Monografia Graduação - Universidade Federal do Tocantins – Câmpus Universitário de Palmas - Curso de Engenharia de Alimentos, 2019.
Orientadora : Lina Maria Grajales Agudelo
Coorientadora : Yeimy Alejandra Rodriguez Restrepo

1. Imobilização da enzima tripsina. 2. Fibras de celulose de talos do maracujazeiro. 3. Concentrado proteico de farelo de arroz. 4. Reaproveitamento de resíduos. I. Título

CDD 664

TODOS OS DIREITOS RESERVADOS – A reprodução total ou parcial, de qualquer forma ou por qualquer meio deste documento é autorizado desde que citada a fonte. A violação dos direitos do autor (Lei nº 9.610/98) é crime estabelecido pelo artigo 184 do Código Penal.

Elaborado pelo sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFT com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

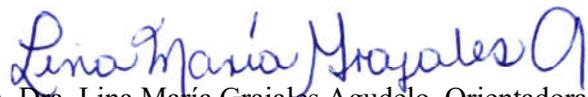
ENYLSO XAVIER RAMALHO

IMOBILIZAÇÃO DE TRIPSINA EM FIBRAS DE CELULOSE DE
TALOS DO MARACUJAZEIRO E SUA APLICAÇÃO NA HIDRÓLISE DE
CONCENTRADO PROTEICO DE FARELO DE ARROZ

Monografia apresentada à UFT – Universidade Federal do Tocantins – Campus Universitário de Palmas, Curso de Engenharia de Alimentos foi avaliada para a obtenção do título de Bacharel em Engenharia de Alimentos e aprovada em sua forma final pela Orientadora, pela Coorientadora e pela Banca Examinadora.

Data de Aprovação: 08/07/2019

Banca examinadora:



Prof. Dra. Lina María Grajales Agudelo, Orientadora, UFT



Prof. Dra. Yeimy Alejandra Rodriguez Restrepo, Coorientadora, UNAL



Prof. Dr. Carlos Eduardo Orrego Alzate, Examinador, UNAL



Prof. Dra. Solange Cristina Carreiro, Examinadora, UFT

*“Ohana quer dizer família. Família quer
dizer nunca abandonar ou esquecer.”*

Lilo e Stitch

RESUMO

O presente estudo teve por objetivo imobilizar a enzima tripsina em fibras de celulose extraídas de talos do maracujazeiro visando sua aplicação na hidrólise de um concentrado proteico de farelo de arroz. Para a obtenção das fibras de celulose, os talos de maracujazeiro foram submetidos a processos de polpação, branqueamento e secagem. Para utilização das fibras como suporte, estas foram ativadas com dois agentes diferentes: glicidol (GLI) e glutaraldeído e etilenodiamina (GLU-EDA). Como parâmetros de monitoramento, o rendimento da imobilização, a atividade enzimática e a estabilidade operacional foram determinados. Os resultados mostraram que o sistema que apresentou o maior rendimento de imobilização foi o GLI-1 (ensaio 1), com um valor de $49,98\% \pm 5,23\%$. O sistema de enzima imobilizada que mais reteve atividade e que apresentou melhor estabilidade operacional foi GLI-2 (ensaio 2), obtendo os valores de 63,91% e 78,6%, respectivamente. Elegeu-se o sistema GLI-2 para conduzir a hidrólise do Concentrado Proteico de Farelo de Arroz (CPFA). O CPFA foi preparado por extração da gordura, solubilização e precipitação da proteína. O resultado mostrou um concentrado de 44% de proteína. A hidrólise do CPFA foi realizada a 37° C e pH 8 durante 4 h utilizando a enzima imobilizada em uma proporção de 1:100 enzima:substrato (p/p). O monitoramento foi realizado por determinação do Grau de Hidrólise (GH). Experimentos com enzima livre foram realizados como referência. O GH da enzima livre foi de $7,95\% \pm 0,23$. O último ciclo realizado com a tripsina imobilizada obteve um GH relativo de 27,4%. Esse resultado evidencia que, mesmo sendo uma técnica promissora, estudos de otimização dos processos anteriores devem ser realizados para que a hidrólise realizada pela enzima imobilizada seja mais eficiente.

Palavras-Chave: Tripsina. Imobilização. Celulose. Talos de maracujazeiro. Hidrólise. Farelo de arroz.

RESUMEN

El objetivo del presente trabajo fue inmovilizar la enzima tripsina sobre fibras de celulosa extraídas de los tallos del árbol de maracuyá y aplicarla en la hidrólisis de un concentrado de proteína de salvado de arroz. Para obtener las fibras de celulosa, los tallos de maracuyá se sometieron a procesos de pulpado, blanqueamiento y secado. Para utilizar las fibras como soporte, éstas se activaron con dos agentes diferentes: glicidol (GLI) y glutaraldehído y etilendiamina (GLU-EDA). Como parámetros de monitoreo se determinó el rendimiento de inmovilización, la actividad enzimática y la estabilidad operacional. Los resultados mostraron que el sistema con el mayor rendimiento de inmovilización fue GLI-1 (ensayo 1), con un valor de $49.98\% \pm 5.23\%$. El sistema enzimático inmovilizado que tuvo la mayor retención de actividad y que presentó una mayor estabilidad operacional fue GLI-2 (ensayo 2), obteniendo valores de 63.91% y 78.6% , respectivamente. Así, el sistema GLI-2 se eligió para realizar la hidrólisis del Concentrado de Proteína de Salvado de Arroz (CPFA). El CPFA se preparó mediante extracción de la grasa, solubilización y precipitación de la proteína. El resultado mostró un 44% de concentrado de proteína. La hidrólisis del CPFA se realizó a 37°C y pH 8 durante 4 h usando la enzima inmovilizada en una proporción de 1:100 enzima:sustrato (p/p). El monitoreo se realizó mediante determinación del grado de hidrólisis (GH). Experimentos con enzimas libres se realizaron como referencia. El GH de la enzima libre fue de $7.95\% \pm 0.23$. El último ciclo realizado con tripsina inmovilizada obtuvo un GH relativo de 27.4% . Este resultado muestra que, aunque es una técnica prometedora, estudios de optimización de este proceso deben realizarse para que su aplicación en la hidrólisis del CPFA sea más eficiente.

Palabras Clave: Tripsina. Inmovilización. Celulosa. Tallos de maracuyá. Hidrólisis. Salvado de arroz.

ABSTRACT

The main objective of this work was to immobilize the trypsin enzyme on cellulose fibers extracted from passion fruit stalks, aiming to apply in the hydrolysis of rice bran protein concentrate. In order to obtain the cellulose fibers, the passion fruit stalks were submitted to pulping, bleaching and drying processes. Fibers were activated with glycidol (GLI) and glutaraldehyde- ethylenediamine (GLU-EDA). Monitoring parameters were immobilization yield, enzymatic activity, and operational stability. The results showed that the highest yield system of immobilization was GLI-1 (test 1), with $49.98\% \pm 5.23\%$. The most activity retained and the better operational stability was GLI-2 (test 2) system, obtaining values of 63.91% and 78.6%, respectively. The GLI-2 system was chosen to conduct hydrolysis of Rice Bran Protein Concentrate (CPFA). The CPFA was prepared by fat extraction, solubilization and protein precipitation. The result showed a 44% protein concentrate. The hydrolysis of the CPFA was carried out at 37°C and pH 8 for 4 h using the enzyme immobilized at a ratio of 1:100 enzyme: substrate (w/w). Monitoring tests were carried out by determination of the Degree of Hydrolysis (GH). Free enzyme experiments were conducted as reference. The free enzyme GH was $7.95\% \pm 0.23$. The last cycle performed with immobilized trypsin obtained a relative GH of 27.4%. Even though it is a promising technique, this result shows that optimization studies should be performed in order to hydrolysis system will be more efficient.

Keywords: Trypsin. Immobilization. Cellulose. Passion fruit stalks. Hydrolysis. Rice bran.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Reação de hidrólise do BAPNA catalisada pela tripsina, originando benzoil-L-arginina e p-nitroanilina.....	16
Figura 2 – Esquema dos três métodos mais comuns de imobilização enzimática.	18
Figura 3 – Esquema demonstrativo da reação de hidrólise e síntese de proteínas.	21
Figura 4 – Morfologia do grão de arroz	23
Figura 5 – Proporções aproximadas dos produtos e subprodutos do beneficiamento do arroz.	24
Figura 6 – Pré-tratamento dos TM.	26
Figura 7 – Polpação dos TM.	27
Figura 8 – Branqueamento das fibras de TM.	28
Figura 9 – Agitador rotativo com as amostras.	29
Figura 10 – Amostras de Trip-CTM em solução de BAPNA	32
Figura 11 – Extração de gordura do FA.	33
Figura 12 – Solubilização alcalina, precipitação ácida e liofilização do CPFA.....	34
Figura 13 – Sistema de monitoramento da hidrólise enzimática pela ação da tripsina livre e imobilizada.	36
Figura 14 – Estabilidade operacional relativa ao ciclo 2.....	39
Figura 15 – Grau de Hidrólise dos ciclos da tripsina imobilizada relativo ao da enzima livre.	42

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1 – Sistemas de tripsina imobilizada testados.	30
Tabela 1 – Rendimento de imobilização.	37
Tabela 2 – Eficiência da enzima imobilizada.	39

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	OBJETIVOS.....	14
2.1	OBJETIVO GERAL.....	14
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	14
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	15
3.1	ENZIMAS	15
3.1.1	TRIPSINA	15
3.2	IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS.....	17
3.3	FIBRAS LIGNOCELULÓSICOS	20
3.4	HIDRÓLISE ENZIMÁTICA	21
3.5	VALORIZAÇÃO DO FARELO DE ARROZ.....	23
4	METODOLOGIA	26
4.1	FABRICAÇÃO DO SUPORTE DE CELULOSE.....	26
4.2	IMOBILIZAÇÃO DA TRIPSINA NO SUPORTE	29
4.3	RENDIMENTO DA IMOBILIZAÇÃO	30
4.4	RETENÇÃO DE ATIVIDADE ENZIMÁTICA E ESTABILIDADE OPERACIONAL	31
4.5	CONCENTRADO PROTEICO DE FARELO DE ARROZ	32
4.6	HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DO CPFA	35
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
5.1	RENDIMENTO DA IMOBILIZAÇÃO	37
5.2	RETENÇÃO DE ATIVIDADE E ESTABILIDADE OPERACIONAL.....	38
5.3	RENDIMENTO DA EXTRAÇÃO DE PROTEÍNA DO FA	41
5.4	AVALIAÇÃO DO GRAU DE HIDRÓLISE.....	41
6	CONCLUSÕES.....	42
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	43

1 INTRODUÇÃO

Devido a seu alto grau de especificidade e eficiência, as enzimas possuem diversas aplicações industriais na síntese de fármacos, produção de tecidos, processamento de alimentos e bebidas, fabricação de biossensores, biorremediação e na digestão de proteínas (WANG *et al.*, 2009). Particularmente, a tripsina, uma protease do pâncreas de animais que atua no processo de digestão no duodeno, tem sido muito estudada no âmbito farmacêutico, bioquímico e alimentício visando, dentre outras finalidades, a produção de hidrolisados proteicos (LACERDA, 2014). Esse potencial de aplicação das enzimas esbarra no alto custo de produção e purificação, na instabilidade da enzima livre e sua difícil recuperação (SOUZA *et al.*, 2017). Entretanto, o processo de imobilização de enzimas visa compensar esse custo ao manter a estabilidade da enzima e viabilizar sua recuperação para reutilização (SPAHN e MINTEER, 2008).

O processo de imobilização consiste em ligar a enzima, química ou fisicamente, a um suporte sólido, conferindo assim uma estrutura mais rígida (SILVA, 2014). Um dos métodos mais utilizados consiste na formação de ligações covalentes entre as moléculas do suporte e da enzima e, por ser uma ligação mais forte, este método promove uma fixação duradoura (SPAHN e MINTEER, 2008).

Os suportes utilizados na imobilização de enzimas podem ser orgânicos ou inorgânicos (DATTA *et al.*, 2013). Geralmente, os suportes orgânicos são elegidos por já possuírem ou por serem relativamente fáceis de colocar grupos funcionais reativos à sua superfície, além de serem de baixo custo e ambientalmente sustentáveis (CABRAL *et al.*, 2003).

Um dos suportes orgânicos mais utilizados como suporte para imobilização por ligação covalente é a celulose. Para tanto, ela deve ser extraída de fibras lignocelulósicas que podem ser obtidas a partir de resíduos agroindustriais, como por exemplo, os talos do maracujazeiro, que são resíduos que ainda não têm valor comercial por não possuírem aplicação tecnológica (ZILLY, 2012).

Devido às vantagens das enzimas imobilizadas em suportes orgânicos, a tripsina imobilizada pode ser utilizada para catalisar reações de hidrólise na obtenção de concentrados proteicos que permitam obter peptídeos bioativos com potenciais efeitos nutricionais e terapêuticos como anti-hipertensivo, antioxidante, hipocolesterolêmico, antitrombótico, imunomodulatório e antimicrobiano (SINGH *et al.*, 2014; RIZZELLO *et al.*, 2016; CAVALLARO, 2019).

Os subprodutos do beneficiamento do arroz, em particular o farelo de arroz, podem ser utilizados na obtenção de peptídeos bioativos (PIOTROWICZ, 2016). O farelo de arroz é rico em proteínas e quando desengordurado contém em torno de 15% de proteínas, por isso é muito utilizado na formulação de rações para animais (PESTANA *et al.*, 2008). Devido a suas proteínas serem de qualidade superior às do trigo e a do milho por ter um maior perfil de aminoácidos essenciais, é interessante a utilização de concentrados proteicos oriundos desse resíduo para a produção de produtos funcionais e nutracêuticos (WANG *et al.*, 1999; VIEIRA *et al.*, 2008).

Por estes motivos, o presente trabalho propõe imobilizar a enzima tripsina em fibras de celulose extraídas de talos do maracujazeiro e aplicá-la na hidrólise de um concentrado proteico de farelo de arroz.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Imobilizar a enzima tripsina em fibras de celulose extraídas de talos do maracujazeiro visando sua aplicação na hidrólise de um concentrado proteico de farelo de arroz.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Fabricar um suporte orgânico de fibras de celulose de talos do maracujazeiro para imobilização da enzima tripsina;
- Imobilizar a tripsina no suporte obtido por ligação covalente;
- Avaliar o rendimento da imobilização, a retenção de atividade enzimática e a estabilidade operacional;
- Obter um concentrado proteico a partir de farelo de arroz;
- Hidrolisar o concentrado proteico de farelo de arroz com tripsina livre e imobilizada.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 ENZIMAS

As enzimas são macromoléculas, geralmente proteínas, que possuem propriedades biocatalíticas, pois aceleram ou viabilizam reações do metabolismo dos seres vivos (MARZZOCO, 2007). Ao final da catálise, a enzima se restaura e está disponível para catalisar outra molécula de substrato (LEHNINGER *et al.*, 2014). As enzimas não poluem o meio ambiente, sendo consideradas catalisadores verdes, por serem prontamente biodegradáveis e geralmente apresentam ausência ou toxicidade reduzida quando atingem o meio ambiente após o uso na indústria (SOETAERT e VANDAMME, 2010).

Algumas das aplicações mais comuns, devido ao seu alto grau de especificidade e eficiência, estão na síntese de fármacos, produção de tecidos, processamento de alimentos, fabricação de biossensores, biorremediação e na digestão de proteínas (WANG *et al.*, 2009).

Para a indústria, configuram uma alternativa à catálise química, já que as enzimas exigem condições de reação próximas às do ambiente (SOETAERT e VANDAMME, 2010). Devido à sua alta seletividade, as enzimas quase não geram subprodutos indesejáveis, e, por isso, requerem menos etapas de purificação do produto obtido e, conseqüentemente, menor consumo energético, de matérias-primas e ou insumos (JEGANNATHAN e NIELSEN, 2013).

Em contrapartida, a produção e purificação de enzimas, na maioria das vezes é um processo demorado e bastante custoso. Além disso, a instabilidade da estrutura tridimensional quando isoladas do seu ambiente natural e a perda de atividade devido às condições do processo ou inibição pelo substrato ou produto resultam em um tempo de meia-vida operacional curto e, conseqüentemente, um custo elevado (SOUZA *et al.*, 2017).

Quando livres no meio reacional apresentam grande instabilidade em determinadas condições. Entretanto, quando imobilizadas, as enzimas podem ser recuperadas e reutilizadas, assim, o processo de imobilização poderia compensar o alto custo da enzima, visto que é de grande interesse a manutenção da estabilidade das enzimas, bem como sua recuperação visando reutilizá-las em sucessivos ciclos reacionais (SPAHN e MINTEER, 2008).

3.1.1 TRIPSINA

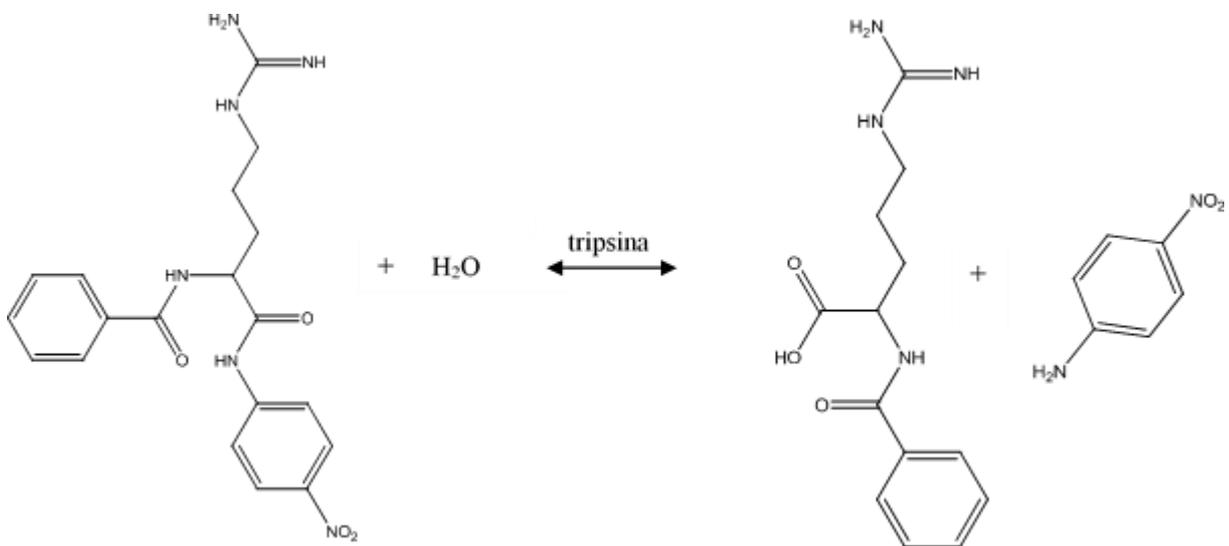
A tripsina (EC 3.4.21.4) é uma protease serínica do pâncreas de animais responsável pela quebra de ligações peptídicas de proteínas, através de uma reação de hidrólise. Trata-se de uma endopeptidase, que hidrolisa especificamente ligações peptídicas entre o grupo carbonila

de uma arginina ou lisina e o grupo amina de um outro aminoácido (SMITH *et al.*, 1988). No entanto, se existir prolina no lado do grupo carbonilo, a hidrólise não ocorre e, se existir um aminoácido ácido, quer no lado carbonílico, quer no lado amínico, esta ocorre mais lentamente (RODRIGUEZ *et al.*, 2008). Também catalisa a hidrólise de ligações éster e amida de diversos substratos sintéticos (MARKWARDT *et al.*, 1968).

O pH ótimo da tripsina de origem bovina encontra-se entre 7 e 9,5 e a temperatura ótima situa-se entre os 33 e os 38 °C (SIPOS e MERKEL, 1970; WU e JIANG, 2008).

Uma forma de determinar sua atividade é usando o substrato sintético, N-benzoil-L-arginina-p-nitroanilida (BAPNA). Trata-se de um substrato cromogênico, que libera um produto corado após a ação da enzima. O BAPNA é constituído por um corante sintético, p-nitroanilina (pNA), ligado covalentemente a um aminoácido. Em solução é incolor, mas, quando hidrolisado, a solução torna-se amarela devido à liberação da p-nitroanilina, indicando a quebra da ligação entre o corante e o aminoácido, como ilustrado na Figura 1. A formação da p-nitroanilina é monitorada a 410 nm (ERLANGER *et al.*, 1961).

Figura 1 - Reação de hidrólise do BAPNA catalisada pela tripsina, originando benzoil-L-arginina e p-nitroanilina



Fonte: Marten *et al.* (2010).

Tem sido estudada a aplicação da tripsina no âmbito farmacêutico, com ênfase no uso como droga de ação anti-inflamatória; no bioquímico, em protocolos de sequenciamento de peptídeos; e no industrial, principalmente nas indústrias de alimentos e bebidas, visando, dentre outras finalidades, a produção de hidrolisados proteicos (LACERDA, 2014).

Quando se usa a tripsina livre, a hidrólise requer tempos muito longos (tipicamente superiores a 5 h), a temperaturas elevadas e há uma perda muito rápida da atividade enzimática (FREIJE *et al.*, 2005; MIGNEAULT *et al.*, 2004). Além desses fatores, como a tripsina é uma protease, esta tem a capacidade de se auto-hidrolisar, impossibilitando a sua utilização em concentrações elevadas, de modo a evitar a geração de fragmentos da auto-proteólise no meio reacional (SOUZA, 2017; STROUD, 1974). A presença de íons de cálcio no meio reacional estabiliza a tripsina contra a auto-proteólise e aumenta ligeiramente a sua atividade proteolítica (SILVA, 2014; SIPOS e MERKEL, 1970; BODE e SCHWAGER, 1975).

Visando contornar essas adversidades, as técnicas de imobilização de enzimas a um suporte sólido e insolúvel no meio reacional têm sido bastante difundidas (SOUZA *et al.*, 2017).

3.2 IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS

A imobilização de enzimas é uma importante técnica biotecnológica que visa proteger, estabilizar, separar, reciclar e purificar as enzimas, dentre outras finalidades, como iniciar e interromper uma reação e inibir contaminação microbiana (NISHA *et al.*, 2012). O processo consiste em ligar a enzima, química ou fisicamente, a um suporte sólido (SILVA, 2014).

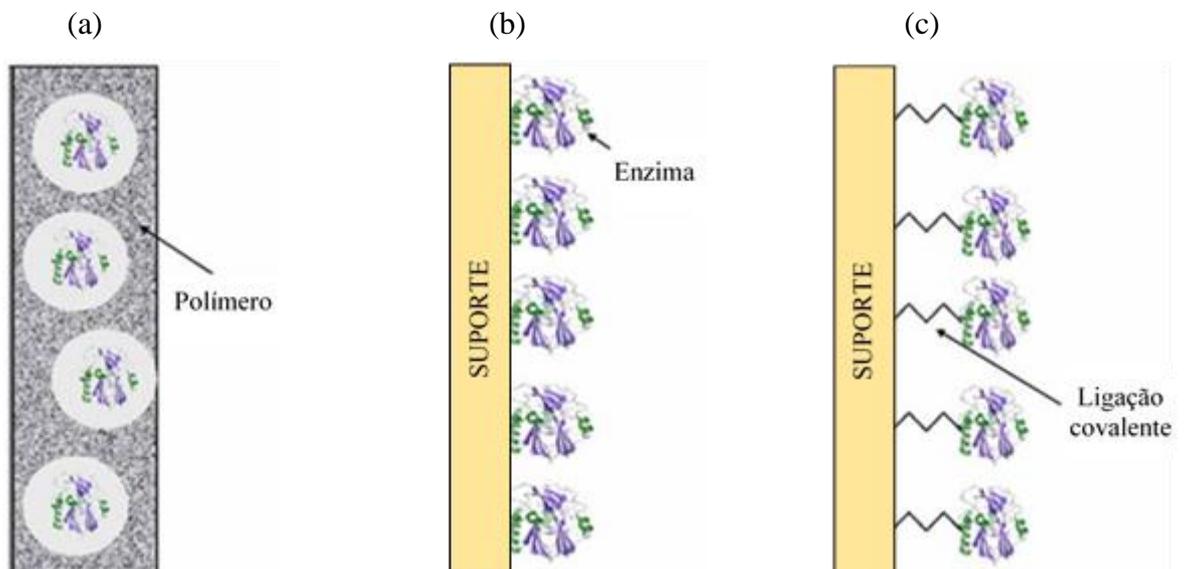
A imobilização melhora também a estabilidade operacional e de armazenamento e o tempo de meia-vida das enzimas, permitindo que operem em uma maior variedade de processos e permanecendo ativas a valores de temperatura e pH que estando livres não seria possível (SPAHN e MINTEER, 2008). Não obstante, há desvantagens, pois durante as etapas desse processo há a possibilidade de ocorrerem alterações conformacionais ou desnaturação irreversível de parte da enzima, diminuindo significativamente a sua atividade catalítica e a sua estabilidade (KHAN e ALZOHAIKY, 2010).

Diversos métodos de imobilização de enzimas têm sido estudados e revisados por vários autores como Mosbach (1976), Sheldon (2007), Hanefeld *et al.* (2009), Khan e Alzohairy, (2010), Nisha *et al.* (2012). Os métodos de imobilização de enzimas podem ser por aprisionamento (físico) ou por formação de ligação (químico). Alguns desses métodos estão representados na Figura 2.

Dentre os métodos por aprisionamento destaca-se o encapsulamento (Figura 2.a) e o enredamento. Nestes casos, não há ligação entre o suporte e a enzima, mas estas ficam aprisionadas no interior do suporte e este permite a troca de substrato e produto com o meio reacional (SOUZA *et al.*, 2017). Dentre os métodos por formação de ligação destaca-se a adsorção, a ligação covalente e a ligação cruzada. A adsorção (Figura 2.b) envolve a interação

física entre enzima-suporte através das interações de Van der Waals. A imobilização por ligação cruzada envolve a ligação intermolecular das enzimas sem presença de uma matriz formando uma estrutura tridimensional insolúvel no meio reacional (SPAHN e MINTEER, 2008). Por fim, têm-se a imobilização de enzimas por ligação covalente ao suporte (Figura 2.c), onde este, em relação ao meio reacional, deve ser insolúvel e inerte. Diversos grupos funcionais são utilizados para ligação, como sulfidrilas, aminos, carboxílicos, hidroxílicos, imidazólicos, fenólicos, tiólicos. Esse último método promove uma ligação mais estável com o suporte, entretanto, pode alterar a conformação da enzima ocasionando perda de atividade e alteração da afinidade pelo substrato (SILVA, 2014).

Figura 2 – Esquema dos três métodos mais comuns de imobilização enzimática.



(a) encapsulamento; (b) adsorção física; (c) ligação covalente.

Fonte: Adaptado de SPAHN e MINTEER (2008).

A imobilização por ligação covalente entre a enzima e o suporte é um dos métodos mais estudados, devido à fixação duradoura da enzima, pois a ligação covalente é forte, não havendo libertação da enzima para uma vasta gama de condições operacionais. As ligações ocorrem entre as cadeias laterais dos aminoácidos das enzimas e os grupos funcionais reativos do material do suporte (SPAHN e MINTEER, 2008). A formação da ligação covalente apenas deve envolver os grupos funcionais da enzima que não são essenciais para a sua ação catalítica, ou seja, grupos que não fazem parte do sítio ativo. Também não deve haver alteração significativa quer da conformação nativa da proteína, quer da sua flexibilidade (KENNEDY e CABRAL, 1983; CABRAL *et al.*, 2003).

Tão importante quanto a escolha do método de imobilização, a seleção do suporte adequado, é um parâmetro crucial na obtenção de um sistema catalítico eficaz e o material a ser utilizado deve atender a uma série de critérios. Este deve apresentar estabilidade química, física e biológica perante as condições da reação. Além disso, especialmente visando aplicações industriais, deve apresentar resistência mecânica suficiente. Deve também ter grupos funcionais adequados para possibilitar a ligação covalente com a enzima e uma estrutura que permita uma elevada capacidade de carga de enzima (BRENA *et al.*, 2006; GÓRECKA e JASTRZEBSKA, 2011). Geralmente, para que a ligação aconteça é necessária uma ativação prévia dos grupos funcionais do suporte através de um agente ativador (KENNEDY e CABRAL, 1983; CABRAL *et al.*, 2003). A solubilidade e a toxicidade do suporte não devem afetar a atividade da enzima e nem comprometer os produtos gerados (BRENA *et al.*, 2006; GÓRECKA e JASTRZEBSKA, 2011).

Os suportes utilizados na imobilização de enzimas podem ser orgânicos ou inorgânicos. Os suportes orgânicos podem ser polímeros naturais ou sintéticos (DATTA *et al.*, 2013). Por norma, os suportes orgânicos são elegidos por já possuírem ou por serem relativamente fáceis de colocar grupos funcionais reativos à sua superfície (CABRAL *et al.*, 2003). Os polímeros sintéticos exibem variedades de formas físicas e estruturas químicas que podem ser combinadas para formar um suporte de acordo com as características desejadas, porém os polímeros naturais apresentam algumas vantagens quando comparados aos sintéticos, pois geralmente têm baixo custo e são renováveis, abundantes e facilmente biodegradáveis, não causando danos ao meio ambiente (DALLA-VECCHIA, 2004).

Particularmente, o caso da imobilização da tripsina tem sido bastante estudado. Ela pode ser realizada por adsorção (KOTEL'NIKOVA *et al.*, 2007), aprisionamento (MONTEIRO *et al.*, 2007) e ligação covalente (KUMAR e GUPTA, 1998; CAVALCANTE *et al.*, 2006). O método mais utilizado é a ligação covalente, pois, como já citado, leva a ligações mais fortes e, portanto, a complexos enzima-suporte muito mais estáveis. Uma das reações frequentemente usadas para a imobilização da tripsina envolve o grupo ativo de resíduos de lisina (grupo ϵ -amino). A tripsina contém 14 resíduos de lisina (MIKEŠ *et al.*, 1966), e uma vez que nenhum desses grupos ϵ -amino de resíduos de lisina é essencial para a atividade catalítica da tripsina (KEIL, 1971), eles podem ser usados para ligação aos suportes através da formação da base de Schiff que são compostos que contêm um grupo funcional com uma ligação dupla carbonila, estando o nitrogênio ligado a uma arila ou alquila. Dentre os materiais já utilizados como suportes na imobilização da tripsina estão a sílica porosa, vidro poroso, derivados de celulose, algodão, poliésteres, nylon, poliestireno (PS), policloreto de vinilo (PVC), entre outros

(MASSOLINI e CALLERI, 2005; NOUAIMI *et al.*, 2001; SEABRA e GIL, 2007; VICENTE, 2007; LI *et al.*, 2013).

3.3 FIBRAS LIGNOCELULÓSICOS

A celulose (C₆H₁₀O₅)_n é um material comumente utilizado para imobilização de enzimas por ligação covalente. Ela é o biopolímero mais abundante e importante do planeta, sendo sintetizada por meio do processo de fotossíntese (ROSA *et al.*, 2012; MANDAL e CHAKRABARTY; 2011).

A extração da celulose consiste em separá-la dos outros componentes das fibras lignocelulósicas (hemicelulose, lignina e pequenas quantidades de outros compostos). A proporção destes constituintes depende da origem botânica e das condições de crescimento da planta (CERQUEIRA *et al.*, 2011; WALLEMBERGER e WESTON, 2004; ROSA *et al.*, 2012; MORÁN *et al.*, 2008).

Visando viabilizar a imobilização de enzimas, as fibras de celulose podem ser ativadas por uma variedade de agentes para produzir centros reativos para a ligação covalente com as enzimas. Os procedimentos apropriados de ativação da celulose para a imobilização da tripsina podem ser aqueles que introduzem grupos aldeídos reativos. Entre eles, os mais úteis são os procedimentos de oxidação, especialmente aqueles que usam agentes oxidantes altamente seletivos (SATHISHKUMAR *et al.*, 2014; KOTEL'NIKOVA *et al.*, 2007).

Os grupos aldeído de fibras de celulose oxidada com periodato são capazes de reagir com grupos amino de proteínas para formar a base de Schiff correspondente. Devido ao grande número de grupos amino e sua localização na superfície da molécula de tripsina, existe a possibilidade de ligação multiponto entre a enzima e a oxixelulose (VILLALONGA et al. 2000; XI et al. 2005).

A celulose pode ser obtida a partir de resíduos agroindustriais minimizando o impacto ambiental negativo oriundo do descarte inadequado e gerando ganhos econômicos ao agregar valor a estes materiais (SEBEN, 2011).

Diversos autores já imobilizaram a tripsina em suportes celulósicos e derivados, como Sun *et al.* (2015) que utilizaram como suporte nanopartículas de sílica revestidas por celulose, Nikolic *et al.* (2010) que imobilizaram a enzima em fios de algodão e Kotel'nikova *et al.* (2007) que utilizaram como suporte celulose microcristalina em pó.

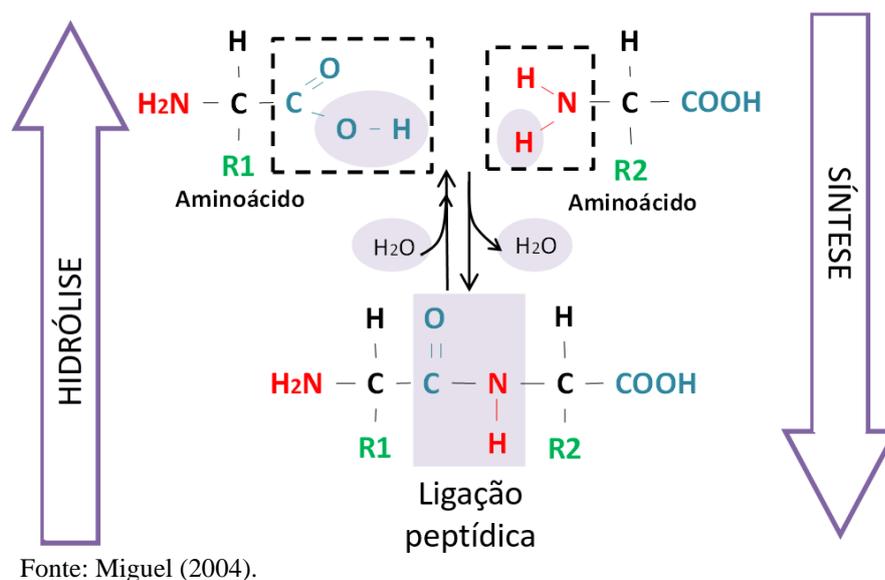
Os resíduos do maracujá (*Passiflora edulis*) ainda são pouco utilizados, mesmo o Brasil sendo o maior produtor e consumidor de maracujá do mundo e detentor de uma cadeia industrial

dessa fruta muito bem estruturada (DHAWAN *et al.*, 2004; ZILLY, 2012; EMBRAPA, 2016). Tendo isso em vista, a extração de celulose dos talos do maracujazeiro visando aplicação como suporte na imobilização de enzimas é uma alternativa para agregar valor a este resíduo.

3.4 HIDRÓLISE ENZIMÁTICA

Dentre as aplicações das enzimas, livres ou imobilizadas, tem-se o processo de hidrólise (CAVALLARO, 2019) que consiste na reação de quebra de ligação de uma molécula com adição de uma molécula de água, conforme apresentado no esquema da Figura 3. A água efetua uma dupla troca com outro composto, através da qual um dos produtos da reação receberá um ânion hidroxila (OH^-), enquanto o outro produto receberá um cátion de hidrogênio (H^+). A hidrólise enzimática é a mesma reação de hidrólise, porém catalisada por enzimas (MIGUEL, 2004).

Figura 3 – Esquema demonstrativo da reação de hidrólise e síntese de proteínas.



A hidrólise enzimática de proteínas, para obtenção de peptídeos de vários tamanhos e aminoácidos é de grande importância na área biotecnológica, sendo muito mais suave do que a hidrólise química, além de ser muito mais específica, uma vez que é possível escolher as peptidases que hidrolisam ligações peptídicas específicas (KUNST, 2003; PERICIN *et al.*, 2009).

Na hidrólise enzimática, devem ser levados em consideração alguns parâmetros, como o tipo de substrato e enzima, a concentração de ambos, o tempo de hidrólise, a temperatura e o pH de reação (DOS SANTOS *et al.*, 2011).

A hidrólise enzimática produz alterações das propriedades moleculares das proteínas, conduzindo à diminuição do peso molecular, ao aumento do número de grupos ionizáveis e à exposição de grupos hidrofóbicos e dos aminoácidos de cadeias laterais (PANYAM e KILARA, 1996). Além disso, produz alterações nas propriedades físicas e químicas, tais como, solubilidade, viscosidade, emulsificação, formação de espuma e propriedades sensoriais (KUNST, 2003; VAN DER VEN *et al.*, 2001). Assim, as propriedades dos hidrolisados diferem muito das propriedades da proteína original (BENITEZ *et al.*, 2008; KUNST, 2003).

Os hidrolisados de proteínas têm inúmeras aplicações nas indústrias alimentícia e farmacêutica, como emulsificação, alteração benéfica de propriedades sensoriais e peptídeos bioativos com efeitos anti-hipertensivo, antioxidante, anti-inflamatório, hipocolesterolêmico, antitrombótico, imunomodulatório e antimicrobianos (SINGH *et al.*, 2014; RIZZELLO *et al.*, 2016; CAVALLARO, 2019). Além disso, a hidrólise enzimática melhora a digestibilidade das proteínas e permite obter hidrolisados com uma determinada composição em aminoácidos, como, por exemplo, hidrolisados com elevado conteúdo em glutamina, necessária em períodos de estresse físico (RUTHERFURD, 2010).

Os hidrolisados podem ser classificados de acordo com o grau de hidrólise (GH), sendo parciais (GH<10%) ou extensivos (GH>10%) e cada um possui características específicas que podem afetar a sua utilização (TORRUCO-UCO *et al.*, 2008). O GH é definido basicamente como a porcentagem de ligações peptídicas quebradas e é usado como parâmetro para monitorar a reação (NIELSEN *et al.*, 2001).

Existem diversas técnicas que permitem determinar o GH de proteínas, tais como, a quantificação espectrofotométrica de peptídeos e aminoácidos solúveis em ácido tricloroacético, a quantificação dos grupos amina liberados durante a hidrólise, com a utilização de reagentes, como o ácido trinitrobenzenossulfônico (TNBS) e a quantificação de prótons liberados durante a hidrólise pela técnica pH-stat (TEIXEIRA, 2011). A técnica pH-sat é realizada em condições neutras ou alcalinas, pois a liberação de prótons conduz à diminuição do pH da mistura de reação. O número de ligações peptídicas clivadas pode ser estimado a partir da quantidade de base necessária para manter um determinado pH constante durante a reação (ADLER-NISSEN, 1986).

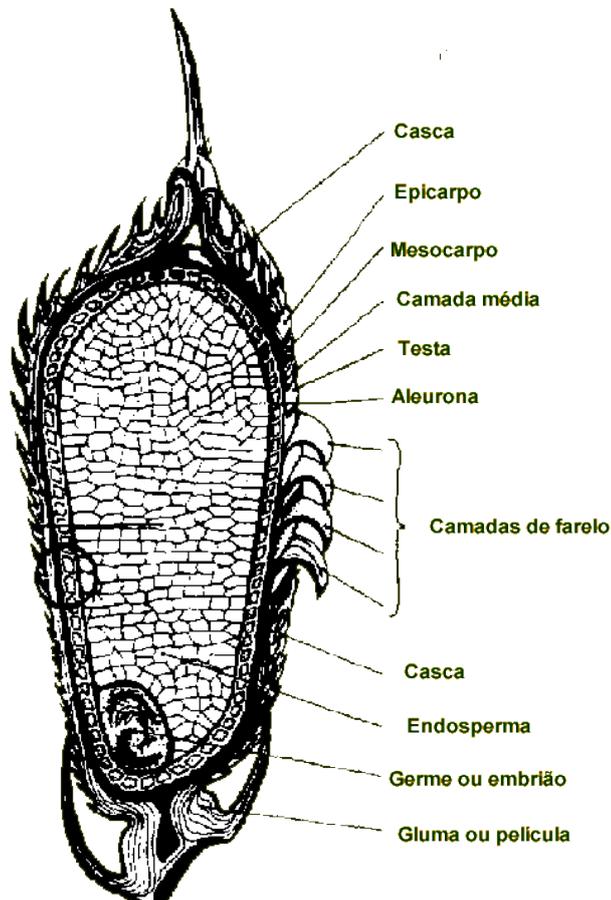
A obtenção de peptídeos bioativos através de hidrólise enzimática pode ser realizada utilizando diversos subprodutos, dentre os quais pode-se destacar aqueles oriundos do beneficiamento do arroz, como o farelo (PIOTROWICZ, 2016).

3.5 VALORIZAÇÃO DO FARELO DE ARROZ

O arroz (*Oryza sativa* L.) é uma das principais fontes de carboidratos para o ser humano e, por isso, é um dos cereais mais cultivados no mundo (FUNGUETTO *et al.*, 2010). É considerado alimento de primeira necessidade, principalmente para povos asiáticos, continente que detém mais de 90% da produção e consumo mundial (FERREIRA *et al.*, 2013). Atualmente, no Brasil, o arroz ocupa o terceiro lugar em área cultivada com culturas anuais. Dessa forma, o país se destaca como o único país não asiático entre os dez maiores produtores de arroz (CONAB, 2015; EMBRAPA, 2005).

O arroz é composto morfológicamente pela casca, o farelo e o grão, como mostrado na Figura 4. Ele é consumido principalmente após seu beneficiamento, nas formas integral, branco e parboilizado, sendo o branco, obtido a partir da brunição e polimento do grão integral, a forma mais consumida no Brasil (FERREIRA e PINHEIRO, 2003; VIEIRA, 2006). Além da casca, o processo de obtenção do arroz branco resulta em uma proporção variável de resíduos em forma de grãos quebrados e farelo (CASTRO, *et al.*, 1999).

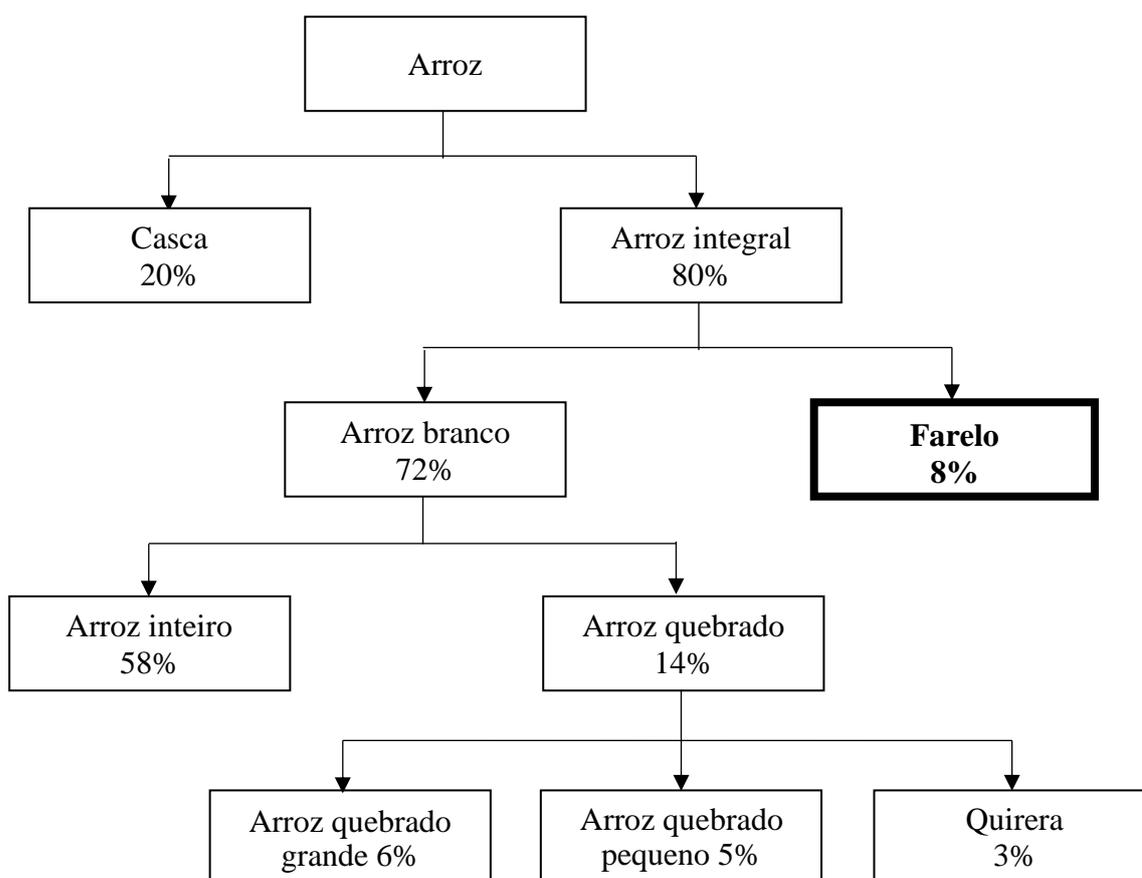
Figura 4 – Morfologia do grão de arroz



No beneficiamento do arroz (Figura 5), durante as etapas de brunição e polimento, são retirados o embrião (gérmen), total ou parcialmente, e a maior parte da película que recobre o grão (pericarpo, tegumento, aleurona). O subproduto resultante é o farelo que representa aproximadamente 8% da massa do grão completo (PESTANA *et al.*, 2008).

O aproveitamento de resíduos é de suma importância para o meio ambiente, pois evita o descarte inadequado. Além disso, transformá-los em subprodutos de alto valor agregado gera impactos econômicos positivos.

Figura 5 – Proporções aproximadas dos produtos e subprodutos do beneficiamento do arroz.



Fonte: CASTRO *et al.* (1999).

O farelo de arroz (FA) apresenta aspecto farináceo, fibroso e suave ao tato e é rico em minerais, proteínas e óleo. O FA desengordurado contém cerca de 15% de proteínas e por isso é muito utilizado na formulação de rações para animais (PESTANA *et al.*, 2008).

A qualidade da proteína do FA supera a do trigo e a do milho, ficando atrás apenas da aveia. Essa proteína hipoalergênica contém quantidades apreciáveis de lisina. Seu perfil de

aminoácidos a torna ingrediente apropriado para formulações de alimentos infantis (WANG , 1999). As proteínas do FA são estáveis termicamente, outro fator que corrobora seu uso como ingrediente nutracêutico (TANG *et al.*, 2003).

Considerando a qualidade das proteínas do farelo de arroz, é de grande interesse a utilização de concentrados proteicos oriundos desse resíduo para a produção de peptídeos bioativos através do processo de hidrólise enzimática (VIEIRA *et al.*, 2008).

4 METODOLOGIA

O presente trabalho foi realizado no Instituto de Biotecnologia e Agroindústria da Universidad Nacional de Colombia Sede Manizales e dá suporte ao projeto “Obtención de péptidos bioactivos del salvado de arroz mediante proteasas inmovilizadas en residuos lignocelulósicos”, atualmente desenvolvido pelo grupo de pesquisa “Alimentos: Frutales”, coordenado pelo Professor Dr. Carlos Eduardo Orrego Alzate.

4.1 FABRICAÇÃO DO SUPORTE DE CELULOSE

Inicialmente, os talos de maracujazeiro, cedidos por um produtor local, foram submetidos a um pré-tratamento de secagem a 35°C por 48 h em estufa Binder Modelo ED, para remoção do excesso de umidade. Posteriormente, foram moídos em moinho de facas, para redução do tamanho de partícula até a obtenção de fibras menores conforme a Figura 6.f.

Figura 6 – Pré-tratamento dos TM.



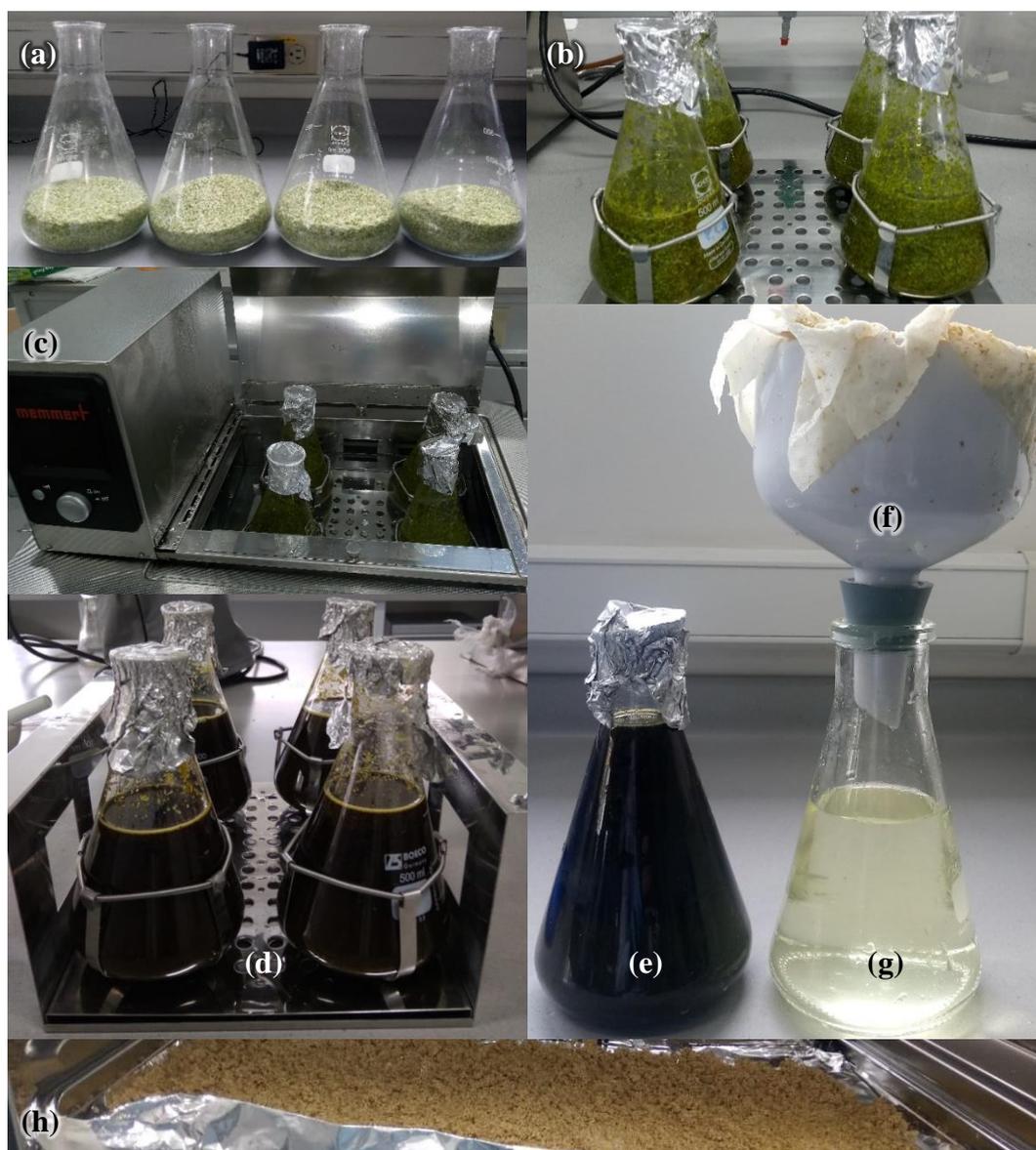
(a) Ramas do maracujazeiro (talos e folhas); (b) Talos do maracujazeiro (TM); (c) TM secos; (d) Moinho de facas; (e) TM secos e moídos.

Fonte: O autor.

Em seguida, os talos do maracujazeiro secos e moídos (TM) foram tratados física e quimicamente através dos processos de polpação e branqueamento para a remoção da lignina.

A polpação (Figura 7) foi realizada em erlenmeyers, onde, aos TM, foi adicionada uma solução de 15% (p/v) de NaOH na proporção 1:5 (p/v). O sistema foi agitado em *shaker* Memmert Modelo Waterbath WNB14 a 70°C durante 3 h e, em seguida, foi filtrado sobre tecido descartável, lavado com água destilada e refiltrado sucessivas vezes até a água de lavagem resultar límpida. Para remover o excesso de umidade, as amostras foram secas a 35°C durante 24 h (EL-SAKHAWY e HASSAN, 2007).

Figura 7 – Polpação dos TM.

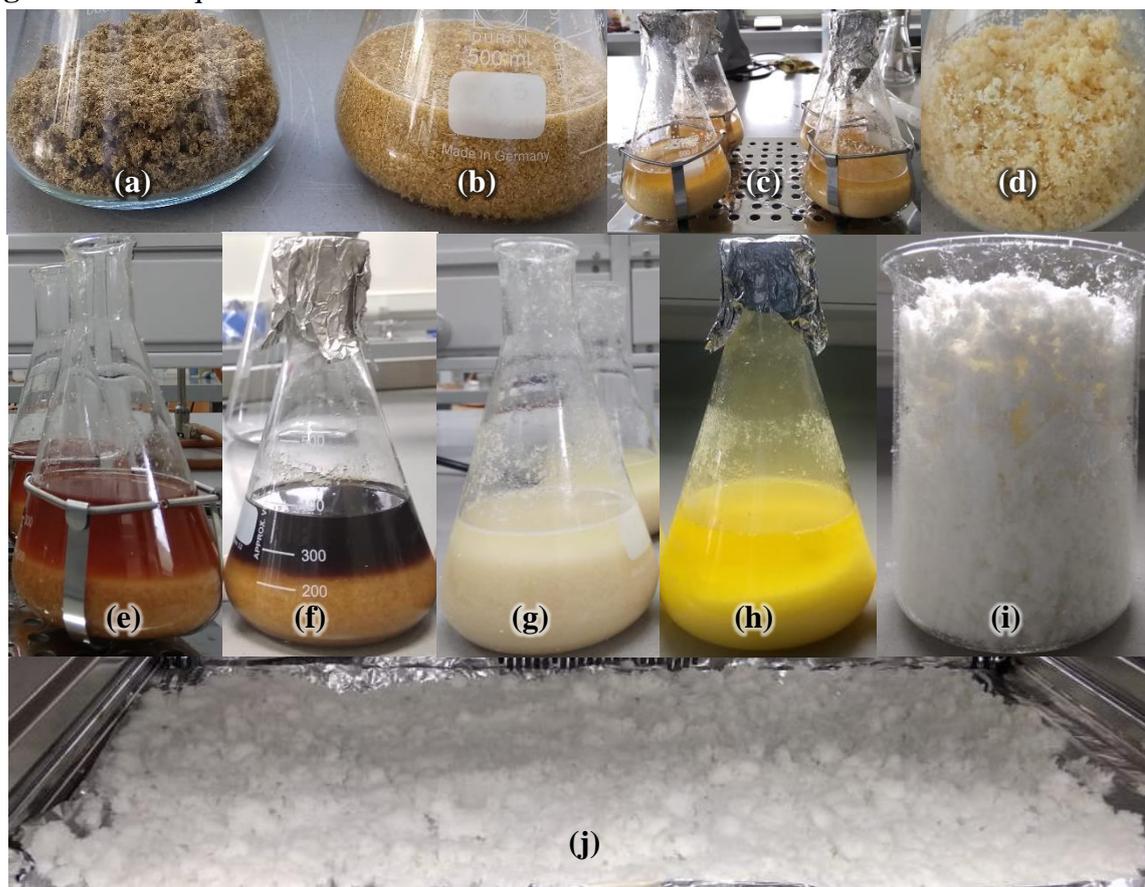


(a) TM; (b) TM suspensos em solução alcalina; (c) TM em solução alcalina sob agitação a quente em *shaker*; (d) e (e) TM após polpação; (f) Filtro para filtração e lavagem; (g) Água de lavagem límpida; (h) TM após polpação e secagem em estufa.

Fonte: O autor.

O branqueamento foi realizado em três etapas, segundo a Figura 8. Primeiramente, em erlenmeyers, uma solução de 2% (p/v) de cloreto de sódio e 3% (v/v) de ácido acético foi adicionada à amostra obtida no processo anterior. Esse sistema foi agitado em *shaker* Memmert Modelo Waterbath WNB14 a 70° C durante 3 h e os procedimentos de filtração e lavagem com água destilada foram realizados sucessivas vezes até a água de lavagem resultar límpida. Em seguida, em erlenmeyers, à amostra obtida foi adicionada uma solução de 1,5% (p/v) de NaOH. Esse sistema foi agitado em *shaker*, a 70° C durante 90 min, e os processos de filtração e lavagem com água destilada também foram realizados sucessivas vezes até a água de lavagem resultar límpida. Finalmente, à amostra obtida adicionou-se uma solução de 1,25% (p/v) de cloreto de sódio e 3% (v/v) de ácido acético. O sistema foi agitado em *shaker*, a 70° C durante 90 min, e os procedimentos de filtração e lavagem foram realizados conforme descrito anteriormente. Para remover o excesso de umidade, as fibras de celulose (CTM) obtidas foram secas em estufa a 55° C durante 24 h (JONOBI, *et al.*, 2009).

Figura 8 – Branqueamento das fibras de TM.



(a) TM antes do branqueamento; (b) TM suspensos em solução ácida e salina; (c) TM após primeira etapa de branqueamento; (d) TM lavados e filtrados; (e) TM suspensos em solução básica; (f) TM após segunda etapa de branqueamento; (g) Após lavagem e filtração, TM suspensos em solução ácida e salina; (h) TM após terceira etapa de branqueamento; (i) TM após lavagem e filtração: fibras de celulose; (j) CTM secas.

Fonte: O autor.

4.2 IMOBILIZAÇÃO DA TRIPSINA NO SUPORTE

A tripsina, oriunda do pâncreas bovino, adquirida da Sigma-Aldrich, foi imobilizada nas CTM por ligação covalente. Para isto, o suporte foi ativado conforme a metodologia descrita por Rocha (2008), Machado *et al.* (2012) e Bezerra *et al.* (2015) com algumas modificações. Duzentos miligramas de CTM foram ressuspensas em 3 mL de água ultrapura, em seguida adicionou-se 0,476 mL de NaOH 1,7 M com 0,0136 g de NaBH₄.

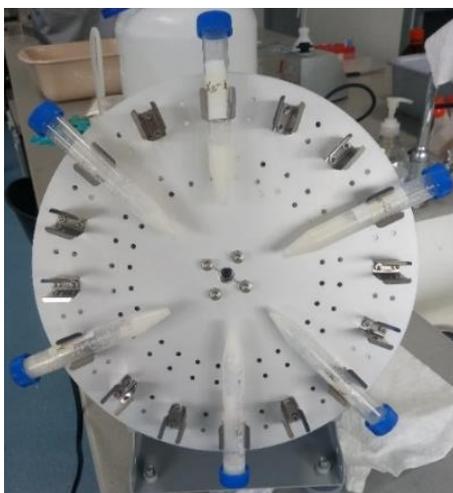
Os experimentos foram realizados utilizando agentes ativadores diferentes: glicidol, glutaraldeído e etilenodiamina.

Para a ativação com glicidol (2,3-epoxipropanol), em tubos tipo falcon de 15 mL, mantidos em banho frio a aproximadamente 4° C, adicionou-se suavemente 0,5 mL de glicidol gota a gota à suspensão de CTM e a mistura foi mantida sob agitação suave em agitador de tubos rotativo SCIOLOGEX Modelo MX-RD-Pro LCD Digital (Figura 9) durante 18 horas a 4° C. Posteriormente, lavaram-se as fibras com 10 volumes de água e, em seguida, adicionou-se NaIO₄ até uma concentração final de 0,1 M e deixou-se sob agitação por mais 2h.

Para a ativação com etilenodiamina (EDA) e glutaraldeído uma parte das fibras ativadas com glicidol foram ressuspensas em tubos tipo falcon de 15 mL e adicionou-se 2,5 mL de EDA a 2 M e, em seguida, adicionou-se NaBH₄ e manteve-se a mistura sob agitação suave durante 2 h a temperatura ambiente ($\pm 25^{\circ}$ C). Posteriormente, adicionou-se 3,5 mL de uma solução tampão fosfato de sódio 0,05 M e pH 7 com glutaraldeído a 3 mM.

As CTM ativadas foram novamente lavadas com água destilada e filtradas e armazenadas a 4° C.

Figura 9 – Agitador rotativo com as amostras.



Fonte: O autor.

Uma vez ativados os suportes, procedeu-se ao processo de imobilização, o qual foi conduzido conforme descrito por Rocha (2008). Para a imobilização de 20 mg de tripsina, os suportes celulósicos ativados com glicidol foram suspensos em 5 mL de tampão bicarbonato de sódio 0,05 M e pH 10 e os ativados com glicidol, glutaraldeído e etilenodiamina foram suspensos em 5 mL de tampão fosfato de sódio pH 7.

Ambos os sistemas foram montados em duas proporções de fibras de celulose ativadas: 1:9 e 1:15 enzima:suporte (p/p), denominadas P1 e P2, respectivamente.

Dessa forma, os sistemas de tripsina imobilizada nas fibras de celulose de talo do maracujazeiro (Trip-CTM) desse estudo estão discriminados no Quadro 1.

Quadro 1 – Sistemas de tripsina imobilizada testados.

Ativadores	Ensaio	Código
Glicidol	1	Trip-CTM-GLI-1
Glicidol	2	Trip-CTM-GLI-2
Glicidol, Etilenodiamina e Glutaraldeído	1	Trip-CTM-GEG-1
Glicidol, Etilenodiamina e Glutaraldeído	2	Trip-CTM-GEG-2

O sistema foi agitado suavemente em agitador rotativo, durante 24 horas a 4° C. Para remover a tripsina ligada não covalentemente, os sistemas Trip-CTM obtidos foram lavados duas vezes em solução tampão tris-HCl 0,05 M e filtrados. As soluções de cada lavagem foram coletadas para medições de carga proteica.

Todos os experimentos de imobilização foram realizados em duplicata.

4.3 RENDIMENTO DA IMOBILIZAÇÃO

A quantidade de tripsina imobilizada por ligação covalente às CTM foi estimada a partir de um balanço de massa pela diferença entre a carga proteica em solução antes da imobilização e a soma da carga proteica em solução após a imobilização e nas lavagens combinadas, determinada de acordo com o método de Bradford (KRUGER, 2002).

As amostras foram lavadas três vezes com 5 mL de solução tampão tris-HCl 0,05 M com CaCl₂ 0,02 M a pH 8. Esta solução de lavagem foi utilizada para a quantificação da carga proteica após a imobilização.

A quantificação da carga proteica foi realizada conforme descrito por Orrego e Valencia (2009) através da quantificação de absorbância em espectrofotômetro a 550 nm, usando um

espectrofotômetro Mapada V-1200. A solução proteica inicial ou a solução de lavagem foram misturadas ao reagente de biureto. Este reagente de coloração azul torna-se violeta na presença de proteínas, ao reagir com íons cúpricos (ZAIA *et al.*, 1998). A intensidade da coloração violeta varia de acordo com a concentração de proteínas na amostra analisada. A carga proteica foi determinada utilizando uma curva de calibração de albumina de soro bovino.

O rendimento do processo de imobilização foi avaliado em termos de ligação de proteína e foi obtido pela razão entre o total de enzima imobilizada (diferença entre a carga proteica em solução inicial e final) e o total de enzima introduzida (carga proteica em solução inicial).

4.4 RETENÇÃO DE ATIVIDADE ENZIMÁTICA E ESTABILIDADE OPERACIONAL

A avaliação da atividade enzimática (AE) da enzima livre e do sistema imobilizado foi realizada através do monitoramento da hidrólise do substrato N- α -benzoyl-L-arginina-p-nitroanilida (BAPNA) conforme descrito por Rocha *et al.* (2011). Uma unidade de atividade foi expressa como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 μ mol de p-nitroanilina por min.

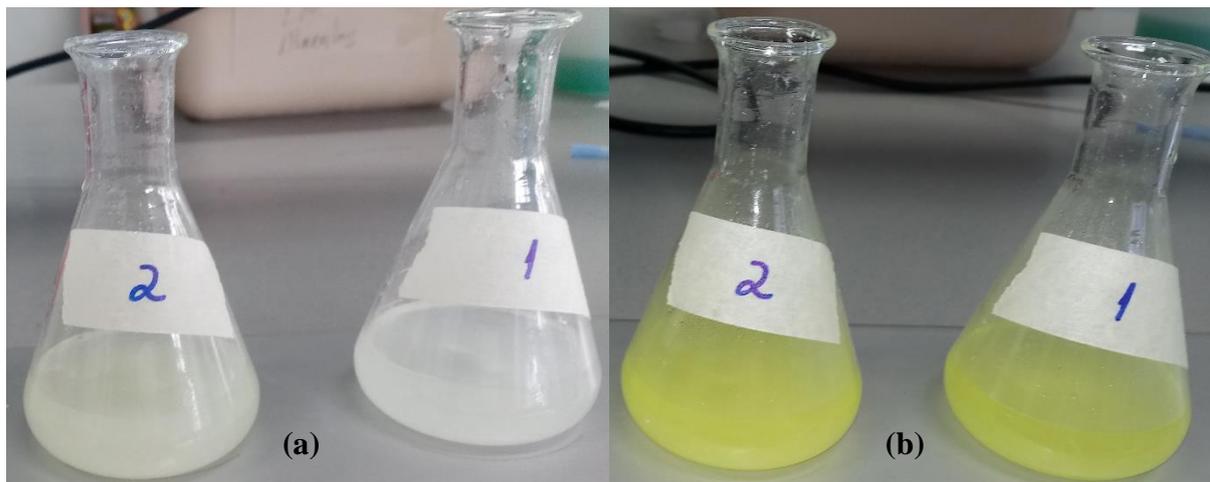
O BAPNA foi diluído a 1 mM em uma solução tampão tris-HCl 0,05 M com CaCl₂ 0,02 M a pH 8. Ao diluir o BAPNA, a solução foi utilizada imediatamente.

Para a enzima livre, o monitoramento da reação foi realizado em espectrofotômetro Perkin-Elmer Lambda 20 a 25° C em cubas de 3 mL a 595 nm.

Para a enzima imobilizada, realizou-se a reação em erlenmeyers com 200 mg de Trip-CTM e 40 ml de solução de BAPNA mantidos sob agitação em placas magnéticas a 25°C durante 1 h (Figura 10). Amostras de 0,5 mL foram coletadas durante a reação em diferentes tempos (0, 2, 4, 6, 8, 10, 20, 30, 40, 50 e 60 min) e esta foi interrompida com a adição de 0,25 mL de ácido acético a 30% (v/v) e a diminuição da temperatura em um banho de água e gelo. as amostras foram centrifugadas para medição de absorbância e a parte sólida foi devolvida ao sistema original. Em seguida, os sistemas foram lavados com água destilada e filtrados quatro vezes para serem reutilizados em mais quatro ciclos. A absorbância foi determinada em um espectrofotômetro Mapada V-1200 a 410 nm.

Todos os experimentos de atividade enzimática foram realizados em duplicata.

Figura 10 – Amostras de Trip-CTM em solução de BAPNA



(a) Início da reação; (b) Após 60 min de reação.

Fonte: O autor.

A retenção de atividade enzimática da enzima imobilizada foi definida como a razão entre a atividade da enzima imobilizada e a atividade de quantidade similar de enzima livre.

A estabilidade operacional dos sistemas de enzima imobilizada foi determinada a partir da capacidade de reutilização da enzima imobilizada em termos de atividade enzimática residual dos sistemas após serem reutilizados, conforme descrito por Rocha (2008). Comparou-se a atividade residual após cinco ciclos operacionais com a atividade enzimática dos ciclos iniciais nas reações com a solução de BAPNA.

4.5 CONCENTRADO PROTEICO DE FARELO DE ARROZ

O processo de concentração da proteína do Farelo de Arroz (FA) consistiu em duas etapas: extração da gordura e solubilização alcalina e precipitação isoelétrica da proteína. O FA foi adquirido de um cerealista local.

Primeiramente, extraiu-se gordura do farelo de arroz por um protocolo adaptado de Wang *et al.* (1999). Realizou-se procedimento de desengorduramento duas vezes utilizando etanol 96% na proporção 1:3 (p/v) FA:etanol. Esse sistema foi acondicionado em erlenmeyers e agitado em placas de agitação magnética durante 2,5 h à temperatura ambiente (Figura 11). Em seguida, o sistema foi centrifugado a 5000 rpm por 10 min. Separou-se o FA parcialmente desengordurado do solvente com gordura, que foi descartado e repetiu-se o processo de extração. Após a segunda extração de gordura, o FA úmido desengordurado foi seco em estufa a 30° C durante 12 h.

Figura 11 – Extração de gordura do FA.

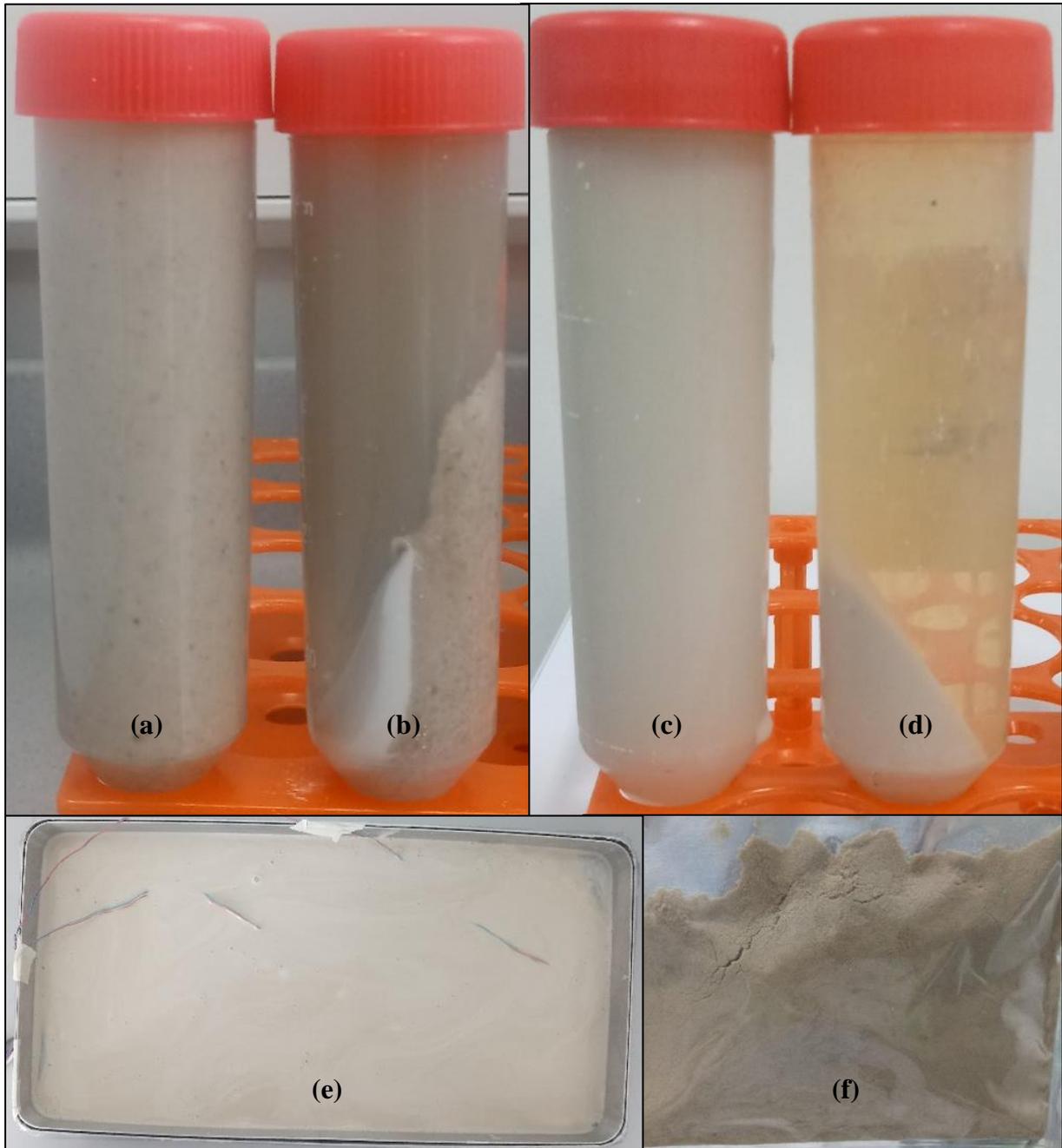


(a) Sistema de extração de gordura do FA por etanol à temperatura ambiente sob agitação em placas magnéticas; (b) FA desengordurado suspenso no solvente.

Fonte: O autor.

Posteriormente, para solubilizar a proteína, em erlenmeyers, foi adicionado ao FA desengordurado e seco: água destilada 1:5 (p/v) FA:água e o pH da solução foi elevado a 9 com HCl 1 M, conforme protocolo descrito por Silva (2012) com algumas modificações. O sistema foi agitado em placas de agitação magnética durante 2,5 h a temperatura ambiente. Em seguida, a suspensão foi centrifugada a 3000 rpm durante 15 min (Figuras 12.a e 12.b). A solução alcalina com a proteína solubilizada foi recolhida e acondicionada em erlenmeyers e o FA restante foi descartado. Em seguida, a proteína foi precipitada adicionando a solução HCl 1 M até a mistura atingir pH 4. O sistema foi submetido às mesmas condições de centrifugação descritas acima (Figuras 12.c e 12.d). A solução ácida foi descartada e o concentrado proteico de FA (CPFA) obtido foi ressuspensionado em água ultrapura e liofilizado (Figuras 12.e e 12.f). O CPFA foi embalado em sacos de alumínio selados e mantido a temperatura ambiente até o uso.

Figura 12 – Solubilização alcalina, precipitação ácida e liofilização do CPFA.



(a) FA desengordurado e desproteíno suspenso em solução aquosa pH 9 com a proteína solubilizada e (b) após centrifugação; (c) Proteína do FA precipitada suspensa em solução aquosa pH 4 e (d) após centrifugação; (e) CPFA antes e (f) depois de liofilizado.

Fonte: O autor.

4.6 HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DO CPFA

A hidrólise enzimática do CPFA seguiu o método descrito por Wang e Wang (2004) com modificações. Realizou-se a hidrólise somente com a enzima livre e com o sistema de enzima imobilizada que apresentou a máxima retenção de atividade enzimática e estabilidade operacional nas etapas anteriores. Todos os experimentos foram realizados em duplicata.

A hidrólise foi realizada a 37° C e pH 8 durante 4 h utilizando a enzima imobilizada e a enzima livre, em uma proporção de 1:100 enzima:substrato (p/p).

Para isto, o CPFA foi suspenso em água ultrapura a uma concentração de 24 mg de proteína de arroz/mL de solução. O pH foi controlado pela adição de NaOH 0,1 N usando um titulador automático TitroLine® TL 7000 SI ANALYTICS (Figura 13).

A hidrólise com a enzima imobilizada foi conduzida em 3 ciclos, sendo os sistemas Trip-CTM recuperados por filtração e lavagem com água ultrapura.

O grau de hidrólise (DH), definido como a razão percentual entre o número de ligações peptídicas quebradas (h) e o número total de ligações por unidade de massa (h_{tot}), foi determinado pelo método pH-stat (ADLER-NISSEN, 1986) e calculado pela Equação 1 (ZHAO et al., 2012).

$$DH = \frac{A \cdot N_a}{\alpha \cdot h_{tot} \cdot M_p} \cdot 100 \quad (1)$$

onde A é a quantidade de solução alcalina gasta, em mL; N_a é a concentração normal da solução alcalina utilizada; α é o grau médio de dissociação dos grupos α -NH₂; M_p é a massa de proteína em g ($N \cdot 5,95$); e h_{tot} é o número total de ligações peptídicas no substrato proteico (7,40 meq/g de proteína de arroz). O valor de α é calculado a partir da Equação 2.

$$\alpha = \frac{10^{\text{pH}-\text{pK}_a}}{1 + 10^{\text{pH}-\text{pK}_a}} \quad (2)$$

onde pH é o valor no qual a hidrólise da enzima foi realizada, e pK_a é o pK_a médio para α -NH₃⁺.

O concentrado proteico hidrolisado foi liofilizado e armazenado para posteriores estudos de purificação e identificação.

Figura 13 – Sistema de monitoramento da hidrólise enzimática pela ação da tripsina livre e imobilizada.



(a) Titulador automático TitroLine® TL 7000 SI ANALYTICS; (b) Placa aquecedora; (c) Amostra em banho maria; (d) Eletrodo de medição de pH; (e) Titulação com NaOH 0,1 N; (f) Termopar; (g) Amostra em hidrólise. Fonte: O autor.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 RENDIMENTO DA IMOBILIZAÇÃO

Os resultados do rendimento da imobilização da tripsina nos suportes de fibras de celulose são apresentados na Tabela 1. Através de uma planilha de Excel executável, elaborada pelo Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de São Carlos, disponível gratuitamente no site <https://www.cca.ufscar.br/pt-br/servicos/teste-de-tukey>, foi feita uma avaliação da diferença das médias mediante o teste de Tukey ao nível de significância de 5%. A análise mostrou que as amostras imobilizadas nas fibras de celulose ativadas com glicidol no ensaio 1 e as amostras ativadas com Glutaraldeído-EDA nos dois ensaios não apresentaram diferença estatisticamente significativa nos valores de rendimento da imobilização, com valor máximo de 49,94%.

Tabela 1 – Rendimento de imobilização.

Sistema de enzima imobilizada	Rendimento da imobilização (%)
Trip-CTM-GLI-1	49,94 ± 5,23 a
Trip-CTM-GLI-2	26,00 ± 0,70 b
Trip-CTM-GEG-1	37,70 ± 3,26 ab
Trip-CTM-GEG-2	39,35 ± 5,59 ab

* Médias seguidas por letras diferentes diferem entre si ao nível de 5% de significância pelo teste de Tukey.

A literatura reporta valores de rendimento de imobilização em suportes celulósicos tanto de tripsina quanto de outras enzimas entre 30 e 80% (CRUZ, 2017). Esta grande variação deve-se a natureza dos sistemas analisados. Ferreira *et al.* (2018) obtiveram, ao imobilizarem β -glicosidase de soja em bucha vegetal, um rendimento máximo de imobilização de 28%. A imobilização de lacase em nanofibras de celulose, realizada por Magalhães *et al.* (2018), apresentou rendimento de até 83%, sendo próximo ao rendimento de 88% encontrado por Sathishkumar *et al.* (2014).

Especificamente, para sistemas que imobilizam tripsina em suportes orgânicos têm se encontrado rendimentos superiores a 80%, como no caso de Bassan *et al.* (2016), que

imobilizaram tripsina em pó de sabugo de milho. Os rendimentos obtidos neste estudo foram inferiores possivelmente devido ao processo de ativação não ter gerado grupos aldeídos suficientes para a ligação com os grupos amino da quantidade de enzima que estava disponível nos sistemas testados (SATHISHKUMAR *et al.*, 2014).

As fibras obtidas a partir dos talos do maracujazeiro empregadas como suporte não foram caracterizadas em relação a sua composição. Outra possibilidade para o rendimento de imobilização não ter sido tão elevado poderia ser explicado no caso dessas fibras não estarem completamente compostas de celulose. Isso evidencia a necessidade de se estudar o sistema de maneira mais aprofundada e otimizar o processo de imobilização com o objetivo de evitar desperdício de enzima, suporte e reagentes.

Além do rendimento de imobilização, outros parâmetros igualmente relevantes, como atividade enzimática e manutenção da estabilidade operacional, devem ser analisados para ter um posicionamento conclusivo sobre quais os melhores resultados em função das condições de operação que permitam ter um sistema mais estável, conforme discutido nas seções subsequentes.

5.2 RETENÇÃO DE ATIVIDADE E ESTABILIDADE OPERACIONAL

A Tabela 2 expressa os resultados da atividade enzimática dos sistemas estudados, bem como a retenção de atividade e a estabilidade operacional. O primeiro ciclo de todos os sistemas enzima-suporte testados apresentou atividade enzimática muito superior à da enzima livre. Isso era previsível, embora o procedimento visar imobilizar a enzima por ligação covalente, inevitavelmente parte dela é fisicamente retida por adsorção, aprisionamento, ligações de hidrogênio e outras ligações fracas. A tripsina não acoplada por ligações covalentes atua no primeiro ciclo, mas é lixiviada durante as primeiras lavagens, não estando presente nos ciclos subsequentes. Como a partir do segundo ciclo a enzima presente no sistema imobilizado é toda ou na maior parte ligada covalentemente, a Figura 14 mostra gráficos que expressam a relação entre a estabilidade do ciclo 2 e os demais.

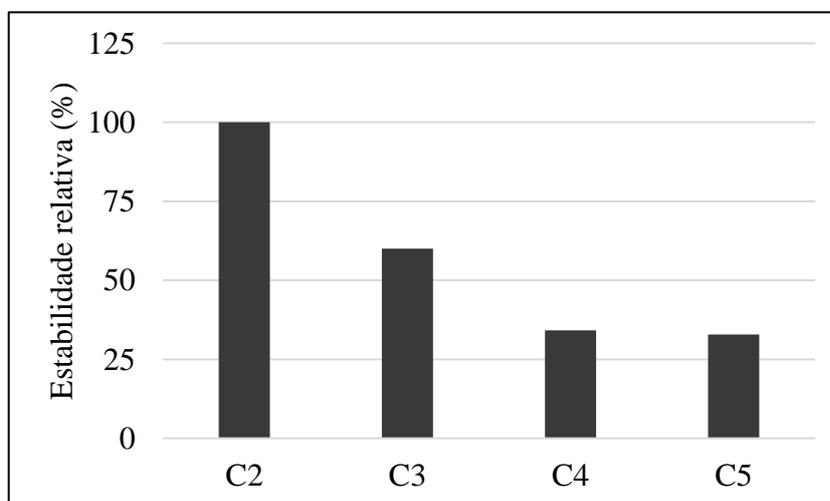
Após cinco ciclos de reação, o sistema de enzima imobilizada que mais reteve atividade e que apresentou melhor estabilidade operacional foi o Trip-CTM-GLI-2, obtendo os valores de 63,91% e 78,6%, respectivamente. Elegeu-se esse sistema para conduzir a hidrólise do CPFA. A boa estabilidade entre os ciclos, sobretudo considerando o sistema Trip-CTM-GLI-2, pode ser atribuída a ligações em múltiplos pontos na superfície das moléculas de tripsina, o que previne a autólise e a desnaturação da enzima (VILLALONGA *et al.* 2000; XI *et al.* 2005).

Tabela 2 – Eficiência da enzima imobilizada.

Ciclo	Sistema de enzima imobilizada	AE (U/mg de proteína)	Retenção de atividade (%)
1	Trip-CTM-GLI-1	0,93	133,99
	Trip-CTM-GLI-2	2,10	245,38
	Trip-CTM-GEG-1	3,06	419,94
	Trip-CTM-GEG-2	2,60	383,15
2	Trip-CTM-GLI-1	0,69	98,82
	Trip-CTM-GLI-2	0,70	82,22
	Trip-CTM-GEG-1	0,36	49,37
	Trip-CTM-GEG-2	0,50	73,94
3	Trip-CTM-GLI-1	0,41	59,17
	Trip-CTM-GLI-2	0,86	100,08
	Trip-CTM-GEG-1	0,34	46,01
	Trip-CTM-GEG-2	0,27	39,13
4	Trip-CTM-GLI-1	0,23	33,78
	Trip-CTM-GLI-2	0,57	66,14
	Trip-CTM-GEG-1	0,24	32,89
	Trip-CTM-GEG-2	0,16	24,12
5	Trip-CTM-GLI-1	0,22	32,37
	Trip-CTM-GLI-2	0,55	63,91
	Trip-CTM-GEG-1	0,24	32,39
	Trip-CTM-GEG-2	0,13	18,82

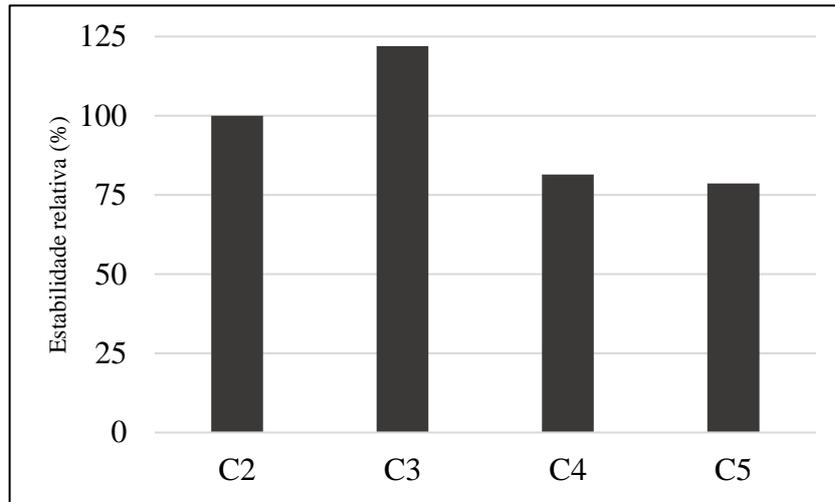
Figura 14 – Estabilidade operacional relativa ao ciclo 2.

(a) Trip-CTM-GLI-1

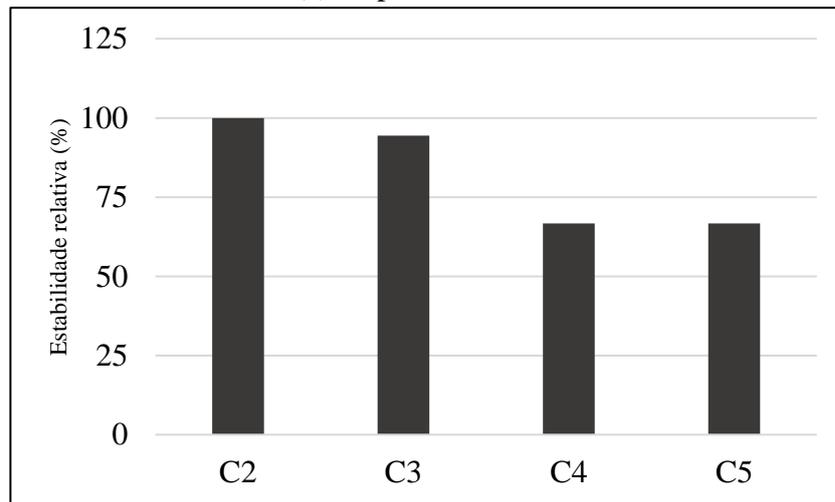


C2: 2º ciclo; C3: 3º ciclo; C4: 4º ciclo; C5: 5º ciclo. (Tripsina Imobilizada).

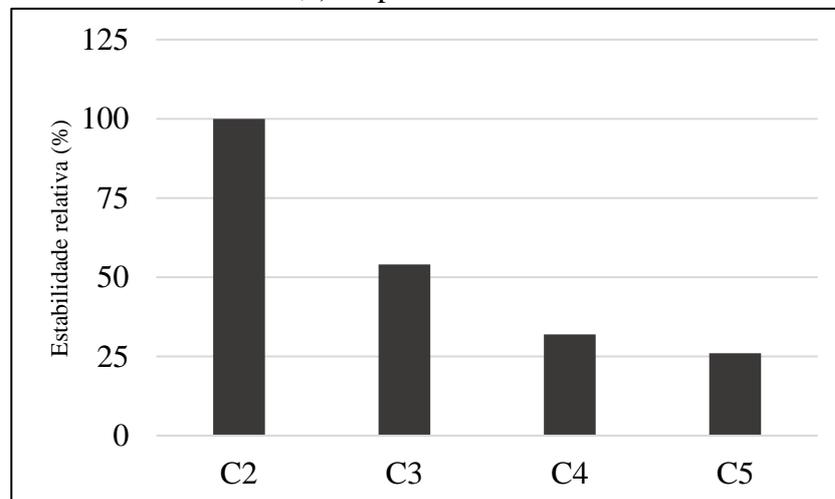
(b) Trip-CTM-GLI-2



(c) Trip-CTM-GEG-1



(d) Trip-CTM-GEG-2



5.3 RENDIMENTO DA EXTRAÇÃO DE PROTEÍNA DO FA

A massa de FA desengordurado, em relação ao FA inicial, foi de $0,86 \pm 0,77$ g/g, atingindo um rendimento de remoção de gordura de $70,78\% \pm 2,03\%$.

O concentrado proteico obtido do FA desengordurado contém 44% de proteína. Rendimentos de extração de 30-80% usando solução alcalina em pH 7-12 foram relatados (BETSCHART *et al.*, 1977; CHEN e HOUSTON, 1970; GUPTA *et al.*, 2008; LEW *et al.*, 1975). Esta quantidade de proteína foi considerada suficiente para o prosseguimento desse estudo e dispensou-se o uso de técnicas de purificação que são extremamente caras.

O rendimento da extração poderia ser aumentado com o aumento do pH (Barber e de Barber, 1980). No entanto, a exposição de proteínas a condições alcalinas severas, pH acima de 10, altera as características nutricionais das proteínas e produz produtos tóxicos (OTTERBURN, 1989; CHEFTEL *et al.*, 1985; KELLY E BALLEW, 1982).

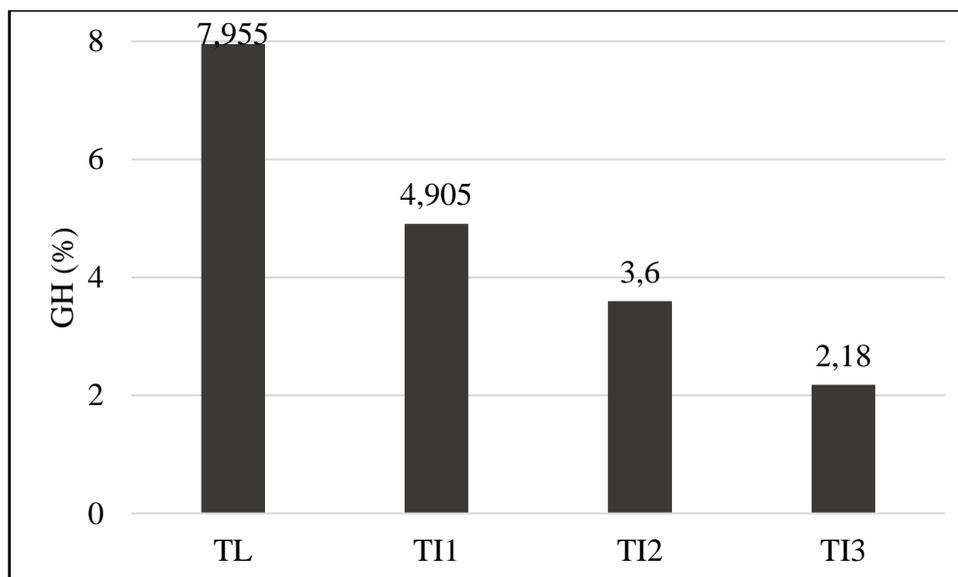
Tendo isso em vista, as extrações alcalinas foram feitas por Gupta *et al.* (2008) a um pH alcalino inferior e outros parâmetros, como temperatura, foram manipulados para aumentar o rendimento de proteína. Seus resultados mostram que em pH 9,5, à medida que a temperatura de extração foi aumentada de 30° para 75° C, o rendimento da proteína do farelo de arroz aumentou de 21% para 48%.

5.4 AVALIAÇÃO DO GRAU DE HIDRÓLISE

Na hidrólise com a tripsina livre obteve-se um grau de hidrólise do CPFA de $7,95\% \pm 0,23$. Este valor relativamente baixo pode ser atribuído ao fato de o CPFA ser uma matriz composta por outras substâncias além da proteína. Todavia, este dado é suficiente para este estudo que visa comparar a ação das enzimas imobilizadas com a livre.

No gráfico da Figura 15 estão expressos os graus de hidrólise obtidos em cada ciclo de reação. O GH sofreu considerável redução com a enzima imobilizada, chegando a 27,4% do grau da enzima livre. Esse resultado evidencia que, mesmo sendo uma técnica promissora, estudos de otimização dos processos anteriores devem ser realizados para que a hidrólise realizada pela enzima imobilizada seja mais eficiente

Figura 15 – Grau de Hidrólise dos ciclos da tripsina imobilizada relativo ao da enzima livre.



TL: Tripsina Livre; TI1: 1º ciclo; TI2: 2º ciclo; TI3: 3º ciclo (Tripsina Imobilizada).

6 CONCLUSÕES

- Os rendimentos da imobilização dos sistemas estudados não apresentaram diferença estatisticamente significativa. O sistema Trip-CTM-GLI-1 obteve o rendimento máximo, atingindo 49,94% de tripsina imobilizada.
- Após cinco ciclos de reação, o sistema de enzima imobilizada que mais reteve atividade e que apresentou melhor estabilidade operacional foi o ensaio 1 do sistema ativado com glicidol, obtendo os valores de 63,91% e 78,6%, respectivamente. Elegeu-se esse sistema para conduzir a hidrólise do CPFA.
- A massa de FA desengordurado, em relação ao FA inicial, foi de $0,86 \pm 0,77$ g/g, atingindo um rendimento de remoção de gordura de $70,78\% \pm 2,03\%$. Foi obtido um concentrado de 44% de proteína.
- O GH sofreu considerável redução com a enzima imobilizada, chegando a 27,4% respeito da enzima livre.
- Este estudo demonstra que é possível imobilizar tripsina em fibras de celulose extraídas de talos de maracujá e utilizar a enzima imobilizada para hidrolisar um concentrado proteico de farelo de arroz. Contudo, deve-se buscar otimizar a metodologia realizada com o objetivo de viabilizar a aplicação da técnica desenvolvida.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADLER-NISSEN, J. *Enzymic hydrolysis of food proteins*. Elsevier Applied Science Publisher. New York, 1986.

BASSAN, J. C.; BEZERRA, T. M. S.; PEIXOTO, G.; CRUZ, C. Z. P.; GALÁN, J. P. M.; VAZ, A. B. S.; GARRIDO, S. S.; FILICE, M.; MONTI R. *Immobilization of trypsin in lignocellulosic waste material to produce peptides with bioactive potential from whey protein*. *Materials*. 9,357, 2016. DOI: 10.3390/ma9050357.

BENITEZ, R., IBARZ, A. e PAGAN, J. *Protein hydrolysates: processes and applications*. *Acta Biochim Clin L*. 42(2), 227-236, 2008.

BETSCHART, A. A.; FONG, R.Y.; SAUNDERS, R. M. *Rice byproducts: Comparative extraction and precipitation of nitrogen from U.S. and Spanish bran and germ*. *J Food Sci*. 42: 1088–1093, 1977.

BEZERRA, T. M. D. S.; BASSAN, J. C.; SANTOS, V. T. D. O.; FERRAZ, A.; MONTI, R. *Covalent immobilization of laccase in green coconut fiber and use in clarification of apple juice*. *Process Biochem*. 50, 417–423, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2014.12.009>.

BODE, W.; SCHWAGER, P. *Refined crystal-structure of bovine beta-trypsin at 1.8 Å resolution. II. Crystallographic refinement, calcium binding site, benzamidine binding site and active site at pH 7.0*. *Journal of Molecular Biology*, 98, 693–717, 1975.

BRENA, B.; GONZÁLEZ-POMBO, P.; BATISTA-VIERA, F. *Immobilization of enzymes: A literature survey*. *Methods in Biotechnology*, 1051, 15–31, 2009.

CABRAL, J. M. S.; AIRES-BARROS, M. R.; GAMA, M. *Engenharia Enzimática*. Lisboa. Lidel - Edições Técnicas. Coleção Biotec., 2003.

CASTRO, E. M.; VIEIRA, N. R. A.; RABELO, R. R.; SILVA, S. A. *Qualidade de grãos em arroz*. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, 1999. 30p. (Embrapa Arroz e Feijão. Circular Técnica, 34). ISSN 1516-8476

CAVALLARO, G. *Estudo da hidrólise enzimática da proteína concentrada de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) para obtenção de peptídeos bioativos*. Dissertação de Mestrado (Programa de Pós-Graduação em Ciências de Alimentos). Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2019.

CAVALCANTE, A. H. M.; CARVALHO, L. B. Jr.; CARNEIRO-DA-CUNHA, M. G. *Cellulosic exopolysaccharide produced by *Zoogloea* sp. as a film support for trypsin immobilization*. *Biochem Eng J* 29:258–26, 2006.

- CERQUEIRA, E. F.; BAPTISTA, C. A. R. P.; MULINARI, D. R. *Mechanical behaviour of polypropylene reinforced sugarcane bagasse fibers composites*. *Procedia Engineering*, vol. 10, pp. 2046-2051, 2011.
- CHEFTEL, J. C.; CUQ, J. L.; LORIENT, D. *Amino acids, peptides and proteins*. In: *Food Chemistry*. p. 245. Fennema, O.R., Ed., Marcel Dekker, New York, 1985.
- CHEN, L.; HOUSTON, D. F. *Solubilization and recovery of proteins from defatted rice bran*. *Cereal Chem.* 47: 72–791, 1970.
- COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. *Acompanhamento da Safra Brasileira de Grãos*, Brasília, v. 2, Safra 2014/15, n.8, nono levantamento, 2015.
- CRUZ, C. Z. P. *Imobilização de alcalase® em pó de sabugo de milho: hidrólise das proteínas do soro de queijo bovino e obtenção de peptídeos bioativos*. Tese de Doutorado - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Araraquara, 2017.
- DATTA, S.; CHRISTENA, L. R.; RAJARAM, Y. R. S. *Enzyme immobilization: an overview on techniques and support materials*. 3 *Biotech*, v.3, p.1-9, 2013.
- DALLA-VECCHIA R, NASCIMENTO MD, Soldi V. *Synthetic applications of immobilized lipases in polymers*. *Química Nova*. 2004;27(4):623-30.
- DHAWAN, K.; DHAWAN, S.; SHARMA, A. *Passiflora: a review update*. *J Ethnopharmacol* 94: 1-23, 2004.
- DOS SANTOS, S. D. A.; MARTINS, V. G.; SALAS-MELLADO, M. PRENTICE, C. *Evaluation of functional properties in protein hydrolysates from bluewing searobin (*Prionotus punctatus*) obtained with different microbial enzymes*. *Food and Bioprocess Technology*, v. 4, n. 8, p. 1399–1406, 2011.
- EMBRAPA. *Maracujá: o produtor pergunta, a Embrapa responde*. Brasília: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, 2016. ISBN 978-85-7035-617-8.
- ERLANGER, B., KOKOWSKY, N., COHEN, W. *The Preparation and Properties of Two New Chromogenic Substrates of Trypsin*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 95, 271–278, 1961.
- EL-SAKHAWY, M., HASSAN, M.L. *Physical and mechanical properties of microcrystalline cellulose prepared from agricultural residues*. *Carbohydr. Polym.* 67, 1–10., 2007. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2006.04.009>.
- FERREIRA, C. M; PINHEIRO, B. S. *Possíveis cenários de produção de arroz no Brasil e no MERCOSUL*. In: CONGRESSO DA CADEIA PRODUTIVA DE ARROZ, 1, REUNIÃO NACIONAL DE PESQUISA DE ARROZ – RENAPA, 7, v.2, , p.169–185. Florianópolis. Anais, 2003.

FERREIRA, E. P. B.; KNUPP, A. M.; MARTIN-DIDONET, C. C. G. *Crescimento de cultivares de arroz (*Oryza sativa* L.) influenciado pela inoculação com bactérias promotoras de crescimento de plantas*. Bioscience Journal, v. 30, n. 3, 2013.

FERREIRA; A. C. V.; MOREIRA, A. A.; SILVA, J. B.; RIBEIRO, M. L.L. *Imobilização de β -glicosidase de soja em bucha vegetal (*Luffa cylindrica*) utilizando trimetafosfato de sódio como ativador*. Evidência, Joaçaba v. 18, n. 2, p. 177-197, 2018.

FREIJE, J. R.; MULDER, P. P.; WERKMAN, W.; RIEUX, L.; NIEDERLANDER, H.; VERPOORT, E.; BISCHOFF, R. *Chemically Modified, Immobilized Trypsin Reactor with Improved Digestion Efficiency*. Journal of Proteome Research, 4, 1805–1813, 2005.

FUNGUETTO, C. I.; PINTO, J. F.; BAUDET, L.; PESKE, S. T. *Desempenho de sementes de arroz irrigado recobertas com zinco*. Rev. bras. sementes, Londrina, v. 32, n. 2, p. 117-123, 2010. DOI:dx.doi.org/10.1590/S0101-31222010000200014.

GÓRECKA, E.; JASTRZEBSKA, M. *Immobilization techniques and biopolymer carriers*. Biotechnology and Food Science, 75, 65–85, 2011.

GUPTA, S.; CHANDI, G. K.; SOGI, D. S. *Effect of extraction temperature on functional properties of rice bran protein concentrates*. Int J Food Eng. 4: 2–19, 2008.

HANEFELD, U.; GARDOSSI, L.; MAGNER, E. *Understanding enzyme immobilisation*. Chemical Society Reviews, 38, 453–468, 2009.

JEGANNATHAN, K. R.; NIELSEN, P. H. *Environmental assessment of enzyme use in industrial production – a literature review*. Journal of Cleaner Production, v.42, p.228-240, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2012.11.005>.

JONOBI, M.; HARUN, J.; SHAKERI, A.; MISRA, M.; OKSMAND, K. *Chemical composition, crystallinity, and thermal degradation of bleached and unbleached kenaf bast (*Hibiscus cannabinus*) pulp and nanofibers*. BioResources 4, 626–639, 2009. <https://doi.org/10.15376/biores.4.2.626-639>.

KEIL, B. Trypsin. In: BOYER, P. D. (Ed.). *The enzymes*. 3. ed. New York e London: Academic Press, 1971. p. 257.

KELLY, R. BALLEW, J. E. *Effect of alkaline treatment of soy protein on sulfur amino acid bioavailability*. J Food Sci. 47: 2070–2071, 1982.

KENNEDY, J. F.; CABRAL, J. M. S. *Immobilized enzymes*. Em W. H. Scouten, *Solid Phase Biochemistry: Analytical Synthetic Aspects*. Nova Iorque. John Wiley & Sons, Inc., 253–391, 1983.

KHAN, A.; ALZOHAIRY, M. *Recent Advances and Applications of Immobilized Enzyme Technologies: A Review*. Research Journal of Biological Sciences, 5, 565–575, 2010.

- KOTEL'NIKOVA, N. E.; MIKHAILOVA, S. A. VLASOVA, E. N. *Immobilization of proteolytic enzymes trypsin and α -chymotrypsin to cellulose matrix*. Rus J Appl Chem 80:322–329, 2007.
- KRUGER, N. J. *The Bradford method for protein quantitation*. In: Walker JM (ed) *The protein protocols handbook*. Humana Press, Totowa NJ, pp 15–21, 2002.
- KUMAR, A.; GUPTA; M. N. *Immobilization of trypsin on an enteric polymer Eudragit S-100 for the biocatalysis of macromolecular substrate*. J Mol Catal B Enzym 5:289–294, 1998.
- KUNST, T. *Protein Modification to Optimize Functionality Protein Hydrolysates*. In *Handbook of Food Enzymology*, 2003.
- LACERDA, C. D. *Caracterização físico-química da isoforma γ -tripsina bovina*. Dissertação (Mestrado em Bioquímica e Farmacologia) – Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências da Saúde, 2014.
- LEHNINGER, T. M.; NELSON, D. L.; COX, M. M. *Princípios de Bioquímica*. 6ª Edição, Ed. Artmed, 2014.
- LEW, E. J-L.; HOUSTON, D. F.; FELLERS, D. A. *A note on protein concentrate from full-fat rice bran*. Cereal Chem. 52: 748–749, 1975.
- LI, Q.; YI, L.; MAREK, P.; IVERSON, L. B. *Commercial proteases: presnet and future*. FEBS Letters, 587, 1155-1163, 2013.
- MACHADO, A.; TAVARES, A. P. M.; ROCHA, C. M. R.; CRISTÓVÃO, R. O.; TEIXEIRA, J. A.; MACEDO, E. A. *Immobilization of commercial laccase on spent grain*. Process Biochem. 47, 1095–1101, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2012.03.021>.
- MAGALHÃES, W. L. E.; ZANONI, P. R. S.; CLARO, F. C.; MACIEL, G. M. *Imobilização de lacase em nanofibrilas de celulose para aplicação em biorrefinaria de lignina*. Comunicado Técnico 424, Embrapa, 2018.
- MANDAL, A; CHAKRABARTY, D. *Isolation of nanocellulose from waste sugarcane bagasse (SCB) and its characterization*. Carbohydrate Polymers, v.86, p.1291-1299, 2011.
- MARKWARDT, F., LANDMANN, H.; WALSMANN, P. *Comparative Studies on the Inhibition of Trypsin, Plasmin, and Thrombin by Dervatives of Benzylamine and Benzamidine*. European Journal of Biochemistry, 6, 502–506, 1968.
- MARTEN, G. U.; GELBRICH, T.; SCHMIDT, A. M. *Hybrid biofunctional nanostructures as stimuli-responsive catalytic systems*. Beilstein J. Org. Chem. 2010, 6, 922–931. DOI:10.3762/bjoc.6.98
- MARZZOCO, A. *Bioquímica básica*. 3. ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 386p, 2007.

MASSOLINI, G.; CALLERI, E. *Immobilized trypsin systems coupled on-line to separation methods: recent developments and analytical applications*. Journal of Separation Science, 28, 7–21, 2005.

MIGNEAULT, I.; DARTIGUENAVE, C.; VINH, J.; BERTRAND, M. J.; E WALDRON, K. C. *Comparison of two glutaraldehyde immobilization techniques for solid-phase tryptic peptide mapping of human hemoglobin by capillary zone electrophoresis and mass spectrometry*. Electrophoresis, 25, 1367–78, 2004.

MIGUEL, M. *Actividad antihipertensiva y antioxidante de péptidos derivados de proteínas de huevo*. Tese (Doutorado em Ciências) Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, 2004.

MIKEŠ, O.; HOLEYŠOVSKÝ, V.; TOMÁŠEK, V.; ŠORM, F. *Covalent structure of bovine trypsinogen. The position of the remaining amides*. Biochemical and biophysical research communications, v.24, n. 3, p. 346–352, 1966.

MONTEIRO, F. M. F.; SILVA, G. M. M.; SILVA, J. B. R.; PORTO, C. S.; CARVALHO, L. B. Jr.; MOSBACH, K. *Immobilized Enzymes. Methods in Enzymology*. Nova Iorque, Academic Press, Inc. v.44, 1976.

MORÁN, J. I.; ALVAREZ, V. A.; CYRAS, V. P.; VÁZQUEZ. *Extraction of cellulose and preparation of nanocellulose from sisal fibers*. Cellulose, vol. 15, pp. 149-159, 2008.

MOSBACH, K. *Immobilized Enzymes. Methods in Enzymology*. Nova Iorque, Academic Press, Inc, v.44, 1976.

NIELSEN, P. M.; PETERSEN, D.; DAMBMANN, C. *Improved Method for Determining Food Protein Degree of Hydrolysis*. Journal of Food Science, v. 66, n. 5, p. 642–646, 2001.

NIKOLIC, T.; KOSTIC, M.; PRASKALO, J.; PEJIC, B.; PETRONIJEVIC, Z.; SKUNDRIC, P. *Sodium periodate oxidized cotton yarn as carrier for immobilization of trypsin*, Carbohydrate Polymers, v.82, 3, p.976-981, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.06.028>.

NISHA, S.; KARTHICK S, A.; E GOBI, N. *A Review on Methods , Application and Properties of Immobilized Enzyme*. Chemical Science Review and Letters, 1, 148–155, 2012.

NOUAIMI, M.; MO, K.; BISSWANGER, H. *Immobilization of trypsin on polyester fleece via different spacers*. Enzyme and Microbial Technology, 29, 567–574, 2001.

ORREGO, C. E.; VALENCIA, J. S. *Preparation and characterization of chitosan membranes by using a combined freeze gelation and mild crosslinking method*. Bioprocess Biosyst. Eng. 32, 197–206, 2009. <https://doi.org/10.1007/s00449-008-0237-1>.

OTTERBURN, M. S. *Protein Crosslinking*. In: *Protein Quality and the Effects of Processing*. Phillips, R.D. and Finley, J.W., Eds., Marcel Dekker, New York, 1989.

PANYAM, D., KILARA, A. *Enchanting the functionality of food proteins by enzymatic modification*. Trends in Food Science & Technology. Cambridge, v.7, n.4, p.120-125, 1996.

PERICIN, D.; RADULOVIC-POPOVIC, L.; VASTAG, Z.; MADAREV-POPOVIC, S.; TRIVIC, S. *Enzymatic hydrolysis of protein isolate from hull-less pumpkin oil cake: Application of response surface methodology*. Food Chem 115(2), 753-757, 2009.

PESTANA, V. R.; MENDONÇA, C. R. B.; ZAMBIAZI, R. C. *Farelo de arroz: características, benefícios à saúde e aplicações*. B.CEPPA, Curitiba, v. 26, n. 1, p. 29-40, 2008.

PIOTROWICZ, I. *Avaliação das propriedades antioxidante e anti-hipertensiva de peptídeos derivados do concentrado proteico de farelo de arroz (*Oryza sativa* L.)*. Tese de Doutorado (PPG em Engenharia e Ciência de Alimentos). Universidade do Rio Grande, Porto Alegre, 2016.

RIZZELLO, C. G.; TAGLIAZUCCHI, D.; BABINI, E., SEFORA, G.; TANEYO, D. L.; GIANOTTI, A. *Bioactive peptides from vegetable food matrices : Research trends and novel biotechnologies for synthesis and recovery*. Journal of Functional Foods, v. 27, p. 549–569, 2016.

RODRIGUEZ, J.; GUPTA, N.; SMITH, R. D.; PEVZNER, P. *Does trypsin cut before proline?* Journal of Proteome Research, 7, 300–305, 2008.

ROCHA, C. *Valorization of the peptidic fraction of cheese whey*. University of Minho, 2008.

ROCHA, C.; GONCALVES, M. P.; TEIXEIRA, J. A. *Immobilization of trypsin on spent grains for whey protein hydrolysis*. Process Biochem. 46, 505–511, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2010.10.001>.

ROSA, S. M. L.; REHMAN, N.; MIRANDA, M. I. G.; NACHTIGALL, S. M. B.; DICA, C. I. D. *Chlorine-free extraction of cellulose from rice husk and whisker isolation*. Carbohydrate Polymers, v.87, p.1131-1138, 2012.

RUTHERFURD, S. M. *Methodology for Determining Degree of Hydrolysis of Proteins in Hydrolysates: A Review*. J Aoac Int 93(5), 1515-1522, 2010.

SATHISHKUMAR, P.; KAMALA-KANNAN, S.; CHO, M.; KIM, J. S.; HADIBARATA, T.; SALIM, M. R.; OH, B.-T. *Laccase immobilization on cellulose nanofiber: the catalytic efficiency and recyclic application for simulated dye effluent treatment*. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, v. 100, p. 111-120, 2014. DOI: 0.1016/j.molcatb.2013.12.008.

SEABRA, I.; GIL, M. H. *Cotton gauze bandage: a support for protease immobilization for use in biomedical applications*. Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences, 43, 535–542, 2007.

SEBEN, L. L. *Estudo exploratório de extração de celulose a partir de resíduos vegetais do processo produtivo de conserva de palmito (*Archontophoenix alexandrae*)*. Dissertação. (PPG de Engenharia de Produção). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2011.

SHELDON, R. A. *Enzyme Immobilization: The Quest for Optimum Performance*. Advanced Synthesis & Catalysis, 349, 1289–1307, 2007.

SILVA, T. R. F. *Imobilização covalente de tripsina em membranas de nanofibras poliméricas obtidas por electrofiação*. Dissertação. Universidade de Coimbra, 2014.

SMITH, E. L.; HILL, R. L.; LEHMAN, I. R.; LEFKOWITZ, R. J.; HANDLER, P.; WHITE., A. *Bioquímica de mamíferos*. 7.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1988.

SINGH, B. P., VIJ, S., HATI, S. *Functional significance of bioactive peptides derived from soybean*. Peptides, v. 54, p. 171–179, 2014.

SIPOS, T., e MERKEL, J. R. *Effect of calcium ions on the activity, heat stability, and structure of trypsin*. Biochemistry, 9, 2766–2775, 1970.

SOUZA, L. T. A.; VERÍSSIMO, L. A. A.; JOÃO, B. C. P.; SANTORO, M. M.; RESENDE, R. R.; MENDES, A. A. *Imobilização enzimática: princípios fundamentais e tipos de suporte*. p. 529 -568. In: Biotecnologia Aplicada à Agro&Indústria - Vol. 4. São Paulo: Blucher, 2017. ISBN: 9788521211150, DOI 10.5151/9788521211150-15.

SOETAERT, W.; VANDAMME, E. J. *The scope and impact of industrial biotechnology*. Industrial Biotechnology, p.1-16., 2010.

SPAHN, C.; MINTEER, S. *Enzyme Immobilization in Biotechnology*. Recent Patents on Engineering. 200, 2008. DOI 10.2174/187221208786306333.

STROUD, M. A *Farnily ofprotein-Cutting Proteins*, Sei. Arner., 231, 74-88, 1974.

SUN, X.; CAI, X.; WANG, R.; XIAO, J. *Immobilized trypsin on hydrophobic cellulose decorated nanoparticles shows good stability and reusability for protein digestion*. Analytical Biochemistry. v.477, p.21-27, 2015. DOI 10.1016/j.ab.2015.02.009.

TANG, S.; HETTIARACHCHY, N. S.; HORAX, R.; ESWARANANDAM, S. *Physicochemical properties and functionality of rice bran protein hydrolyzate prepared from heat-stabilized defatted rice bran with the aid of enzymes*. Journal of Food Science. v. 68, p. 152–157, 2003.

TEIXEIRA, S. J. V. *Hidrólise Enzimática das Proteínas da Dreche*. Dissertação (Mestrado em Controlo de Qualidade na Especialidade de Água e Alimentos). Universidade do Porto, 2011.

TORRUCO-UCO, J. G.; DOMINGUÉZ-MAGAÑA, M. A.; MARTÍNEZ-AYALA, A.; CHEL-GUERRERO, L. A.; BETANCUR-ANCONA, D. A.. *Péptidos antihipertensivos, una alternativa de tratamiento de origen natural: una revisión*. Ciencia y Tecnología Alimentaria, v. 6, n. 2, p. 158–168, 2008.

VAN DER VEN, C., GRUPPEN, H., DE BONT, D.B.A. e VORAGEN, A.G.J. *Emulsion properties of casein and whey protein hydrolysates and the relation with other hydrolysate characteristics*. J Agr Food Chem 49(10), 5005-5012, 2001.

VICENTE, C. *Valorisation of the Peptidic Fraction of Cheese Whey*. Tese (Doutorado em Engenharia Química e Biologia). Universidade do Minho, 2007.

VIEIRA, C. R.; LOPES JR, C. O.; RAMOS, C. S.; CAPOBIANGO, M; SILVESTRE, M. P. C. *Extração enzimática das proteínas da farinha de arroz*. Ciência e Tecnologia de Alimentos, v.28, n.3, p.599-606, Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos Campinas, Brasil, 2008.

VILLALONGA, R.; VILLALONGA, M. L. GÓMEZ, L. *Preparation and functional properties of trypsin modified by carboxymethylcellulose*. J Mol Catal B Enzym 10:483–490, 2000.

WALLENBERGER, F. T; WESTON, N. *Natural fibers, plastics and composites*. Kluwer Academic Publishers, 2004.

WANG, M.; HETTIARACHCHY, N. S.; QI, M.; BURKS, W.; SIEBENMORGEN, T. *Preparation and functional properties of rice bran protein isolate*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 47, p. 411-416, 1999.

WANG, Z.-G.; WAN, L.-S.; LIU, Z.-M.; HUANG, X.-J.; XU, Z.-K. *Enzyme immobilization on electrospun polymer nanofibers: An overview*. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 56, 189–195, 2009.

WU, Z.; JIANG, G. *Purification and Characterization of Trypsin-like Enzymes from Neomysis japonica Using BAPNA as Substrate*. International Journal of Peptide Research and Therapeutics, 14, 75–80, 2008.

XI, F.; WU, J.; JIA, Z.; LIN, X. *Preparation and characterization of trypsin immobilized on silica gel supported macroporous chitosan bead*. Process Biochem 40:2833–2840, 2005.

ZAIA, D.; ZAIA, C.; LICHTIG, J. *Determinação de proteínas totais via espectrofotometria: vantagens e desvantagens dos métodos existentes*. Scielo. Química Nova, 1998.

ZILLY, A.; BAZANELLA, G. C. S.; HELM, C. V.; ARAÚJO, C. A. V.; SOUZA, C. G. M.; ROSANE, A. B.; PERALTA, M. *Solid-state bioconversion of passion fruit waste by white-rot fungi for production of oxidative and hydrolytic enzymes*. Food Bioprocess Technol., 5, 1573, 2012.

ZHAO, Q.; XIONG, H.; SELOMULYA, C.; DONG, X.; ZHONG, H.; WANG, S.; SUN, W.; ZHOU, Q. *Enzymatic hydrolysis of rice dreg protein : Effects of enzyme type on the functional properties and antioxidant activities of recovered proteins*. Food Chem. 134, 1360–1367, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.03.033>.