

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

MATHEUS AUGUSTO DOS SANTOS DA SILVA

**APLICAÇÃO DE BROMELINA IMOBILIZADA EM GLIOXIL-AGAROSE NA
HIDRÓLISE DE SORO ALBUMINA BOVINA**

ALFENAS – MG

2025

MATHEUS AUGUSTO DOS SANTOS DA SILVA

**APLICAÇÃO DE BROMELINA IMOBILIZADA EM GLIOXIL-AGAROSE NA
HIDRÓLISE DE SORO ALBUMINA BOVINA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Alfenas como parte dos requisitos para a integralização do curso de Farmácia da Universidade Federal de Alfenas – MG.
Orientadora: Prof.^a Dra. Olga Luisa Tavano

ALFENAS – MG

2025

Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal de Alfenas
Biblioteca Central

Silva, Matheus Augusto dos Santos da.

Aplicação de bromelina imobilizada em glioxil-agarose na hidrólise de soro albumina bovina / Matheus Augusto dos Santos da Silva. - Alfenas, MG, 2025.

38 f. : il. -

Orientador(a): Olga Luisa Tavano.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia) -
Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG, 2025.

Bibliografia.

1. Bromelina. 2. Imobilização enzimática. 3. Glioxil-agarose. 4. Peptídeos bioativos. 5. Atividade antioxidante. I. Tavano, Olga Luisa, orient. II. Título.

MATHEUS AUGUSTO DOS SANTOS DA SILVA

**APLICAÇÃO DE BROMELINA IMOBILIZADA EM GLIOXIL-AGAROSE NA
HIDRÓLISE DE SORO ALBUMINA BOVINA**

A banca examinadora abaixo-assinada, aprova o Trabalho de Conclusão de Curso, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de bacharel em Ciências Farmacêuticas pela Universidade Federal de Alfenas.

Aprovado em: 16 de dezembro de 2025

Olga Luisa Tavano
Universidade Federal de Alfenas

Rayane Aparecida Vieira de Paula
Universidade Federal de Alfenas

Lara Campos Borim
Universidade Federal de Alfenas

AGRADECIMENTOS

A conclusão deste trabalho representa o resultado de uma trajetória de aprendizados, desafios e conquistas. Gostaria de registrar meus sinceros agradecimentos às pessoas e instituições que, de diferentes formas, contribuíram para a sua realização.

A Deus, pelo amparo constante durante toda a trajetória acadêmica.

À minha família e aos amigos, pelo apoio, incentivo e compreensão, essenciais ao longo da minha formação.

À minha orientadora, Profa. Dra. Olga, agradeço pela paciência, compreensão e incentivo, fundamentais para que eu concluísse esta etapa. Sou grato por todos os ensinamentos compartilhados e pela parceria construída ao longo dos anos, desde as disciplinas e monitorias até a execução deste trabalho. Obrigado pela confiança e por contribuir tanto para o meu crescimento pessoal e profissional.

À Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL-MG), instituição que proporcionou minha formação acadêmica e científica desde as primeiras experiências em pesquisa. Agradeço, em especial, pela possibilidade de participação no programa de Iniciação Científica (BIC-Jr), que ainda durante o ensino médio contribuiu significativamente para o desenvolvimento de meu interesse pela formação acadêmica e científica.

À FAPEMIG (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais), pelo apoio financeiro indispensável, que viabilizou a execução do projeto e a dedicação à pesquisa.

“São as perguntas que não podemos responder que nos ensinam mais. Elas nos ensinam a pensar. Se você dá a um homem uma resposta, tudo o que ele ganha é um pouco de fatos. Mas dê a ele uma pergunta e ele procurará suas próprias respostas.”

(Patrick Rothfuss, 2011)

RESUMO

A bromelina é uma protease de origem vegetal amplamente utilizada em aplicações farmacêuticas, alimentícias e biotecnológicas. Entretanto, sua instabilidade em solução aquosa, decorrente da suscetibilidade à autólise e desnaturação térmica, limita sua aplicação industrial. Este trabalho teve como objetivo desenvolver um biocatalisador de bromelina estabilizado através da imobilização covalente multipontual em glioxil-agarose 4B-CL. A estratégia envolveu a ativação do suporte via eterificação com glicidol seguida de oxidação com periodato, gerando uma matriz com densidade de grupos aldeído adequada para imobilização seletiva. O processo de imobilização foi monitorado em pH 10,2, acompanhando-se a cinética de desaparecimento da atividade e proteína no sobrenadante. Os ensaios de hidrólise foram conduzidos em meio aquoso sem controle de pH, porém quando testados sob controle de pH (tampão fosfato de sódio pH 4,75), o processo de hidrólise de BSA 2% mostrou-se mais ágil e eficiente, ocorrendo com liberação de grupos α -amino em menor tempo relativamente ao meio aquoso sem controle de pH. A aplicação na hidrólise de BSA confirmou a funcionalidade do biocatalisador, gerando hidrolisados com atividade antioxidante aumentada em 48% (método ABTS). Conclui-se que a imobilização em glioxil-agarose é uma estratégia eficaz para estabilização da bromelina, produzindo um biocatalisador robusto e potencialmente aplicável em processos contínuos de produção de peptídeos bioativos.

Palavras-chave: Bromelina; Imobilização enzimática; Glioxil-agarose; Peptídeos bioativos; Atividade antioxidante.

ABSTRACT

Bromelain is a plant-derived protease widely used in pharmaceutical, food, and biotechnological applications. However, its instability in aqueous solution, resulting from susceptibility to autolysis and thermal denaturation, limits its industrial application. This work aimed to develop a stabilized bromelain biocatalyst through multipoint covalent immobilization on glyoxyl-agarose 4B-CL. The strategy involved support activation via etherification with glycidol followed by periodate oxidation, generating a matrix with adequate aldehyde group density for selective immobilization. The immobilization process was monitored at pH 10.2, tracking the kinetics of activity and protein disappearance in the supernatant. Hydrolysis assays were conducted in aqueous medium without pH control; however, when tested under pH control (sodium phosphate buffer pH 4.75), the 2% BSA hydrolysis process proved more agile and efficient, occurring with the release of α -amino groups in less time compared to aqueous medium without pH control. Application to BSA hydrolysis confirmed the biocatalyst functionality, generating hydrolysates with increased antioxidant activity of 48% (ABTS method). It is concluded that immobilization on glyoxyl-agarose is an effective strategy for bromelain stabilization, producing a robust biocatalyst potentially applicable in continuous bioactive peptide production processes.

Keywords: Bromelain; Enzymatic immobilization; Glyoxyl-agarose; Bioactive peptides; Antioxidant activity.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
2	OBJETIVOS	12
2.1	OBJETIVOS GERAIS	12
2.1.1	Objetivos específicos	12
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
3.1	BIOCATALISADORES	13
3.2	IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS	14
3.2.1	Imobilização de enzimas em glioxil-agarose	14
3.2.1.1	Mecanismo físico-químico de imobilização em glioxil-agarose	15
3.3	BROMELINA E CISTEÍNA-PROTEASES	16
3.3.1	Aplicações biotecnológicas	17
4	MATERIAIS E MÉTODOS	19
4.1	PREPARO DO SUPORTE E IMOBILIZAÇÃO ENZIMÁTICA	19
4.1.1	Síntese e ativação do suporte	19
4.1.2	Estabilização estrutural do suporte e término da imobilização	20
4.2	PREPARO E CARACTERIZAÇÃO DA SOLUÇÃO ENZIMÁTICA	21
4.2.1	Determinação de proteínas solúveis ao longo da imobilização	22
4.2.2	Determinação de parâmetros cinéticos de imobilização	22
4.2.3	Determinação da atividade catalítica para o derivado	23
4.2.4	Caracterização do hidrolisado produzido	23
4.2.4.1	Grau de hidrólise (OPA)	23
4.2.4.2	Potencial antioxidante do hidrolisado (ABTS)	24
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	25
5.1	SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DO SUPORTE GLIOXIL-AGAROSE 4B-CL	25
5.2	DINÂMICA E SELETIVIDADE DA IMOBILIZAÇÃO ENZIMÁTICA	25

5.2.1	Seletividade de imobilização como mecanismo de purificação.....	27
5.3	ATIVIDADE CATALÍTICA DO DERIVADO E INFLUÊNCIA DO PH.....	28
5.4	CORRELAÇÃO ENTRE PROTEÓLISE E BIOATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....	30
6	CONCLUSÃO	32
	REFERÊNCIAS.....	33
	APÊNDICES.....	35

1 INTRODUÇÃO

A utilização de enzimas como catalisadores industriais representa uma das bases da biotecnologia moderna, permitindo a condução de reações químicas com maior especificidade, em condições mais brandas de temperatura e pressão, além de gerar menor impacto ambiental em comparação aos catalisadores químicos tradicionais (Sheldon; Van Pelt, 2013; Guisán, 2013). Entre as diversas classes enzimáticas, as proteases se destacam no mercado global, pois podem ser empregadas em diferentes setores como o da produção de alimentos, detergentes, insumos farmacêutico e no tratamento de resíduos (Tavano et al., 2018; Bilal et al., 2019). No entanto, o uso de enzimas solúveis em processos industriais enfrenta barreiras econômicas e técnicas, como a dificuldade de recuperação do biocatalisador a partir do meio reacional, o que dificulta a possibilidade de reuso do catalisador, além da baixa estabilidade sob condições adversas, como elevadas temperaturas e variações de pH (Guisán, 1988; Sheldon; Van Pelt, 2013).

Nesse contexto, a bromelina, um complexo enzimático proteolítico extraído do abacaxizeiro *Ananas comosus*, mostra-se como uma enzima com diversas propriedades. Além de sua tradicional aplicação na maceração de carnes e clarificação de bebidas como vinhos e cervejas, a bromelina também demonstra atividades farmacológicas, incluindo efeitos anti-inflamatórios, antitrombóticos, fibrinolíticos e antitumorais (Maurer, 2001; Tacias-Pascacio et al., 2024; Varilla et al., 2021).

Atualmente, tem crescido o interesse na aplicação desta enzima na produção de hidrolisados proteicos contendo peptídeos bioativos, moléculas que podem apresentar propriedades antioxidantes e anti-hipertensivas (Gouseti et al., 2023; Tacias-Pascacio et al., 2023; Tavano et al., 2018). Entretanto, a aplicação industrial da bromelina é limitada por sua suscetibilidade à autólise e à inativação térmica, o que reduz sua atividade catalítica e vida útil, encarecendo os processos (Novaes, 2013; Tacias-Pascacio et al., 2024; Varilla et al., 2021).

A imobilização de enzimas é a estratégia empregada mais eficaz para superar essas limitações, transformando o catalisador homogêneo em heterogêneo o que lhe garante maior robustez (Furlani et al., 2020; Guisán, 2013). Dentre os métodos de imobilização, a ligação covalente multipontual em suportes ativadas com grupos glioxil

tem se mostrado eficiente para a estabilização de enzimas. Essa técnica baseia-se na reação entre os grupos aldeído do suporte com grupos amino (especialmente resíduos de lisina) da superfície da enzima sob condições de pH alcalino, seguida de um processo de redução irreversível (Guisán et al., 2020; Guisán, 1988). Resultando na formação de uma rede rígida de ligações covalentes capaz de preservar a estrutura da enzima, minimizando mudanças conformacionais induzidas pelo calor ou solventes, aumentando a estabilidade térmica e operacional do biocatalisador (Guisán, 1988; López-Gallego et al., 2013).

Apesar da literatura descrever diversas estratégias para a imobilização de enzimas como a bromelina incluindo o uso de nanopartículas, quitosana e ligação covalente em diferentes suportes (Tacias-Pascacio et al., 2024), o uso da técnica de imobilização multipontual em glioxil-agarose para a estabilização e manutenção da atividade para a hidrólise de proteínas e geração de peptídeos bioativos, ainda é pouco explorada. A imobilização covalente permite controlar a orientação da enzima em relação ao suporte e evitar a autólise, podendo favorecer a obtenção de hidrolisados de forma reprodutível e com perfil específico de bioatividade e capaz de ser caracterizado (Furlani et al., 2020; Tacias-Pascacio et al., 2024).

Diante destas condições, este trabalho se propõe ao estudo da imobilização da bromelina em suporte de glioxil-agarose 4B-CL, visando a obtenção de um derivado estável e ativo, avaliando parâmetros cinéticos de imobilização, influência do pH do meio reacional e sua capacidade catalítica na hidrólise de proteínas (BSA), assim como o potencial antioxidante dos hidrolisados gerados, utilizando métodos analíticos consolidados como a avaliação de proteína solúvel (Bradford), grau de hidrólise (OPA) e o potencial antioxidante (ABTS) (Bradford, 1976; Church et al., 1983; Re et al., 1999).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVOS GERAIS

Desenvolver e caracterizar um biocatalisador de bromelina estabilizado através da imobilização covalente multipontual em glioxil-agarose 4B-CL, visando sua aplicação na produção de hidrolisados proteicos com atividade antioxidante aumentada.

2.1.1 Objetivos específicos

- a) Sintetizar e caracterizar um suporte de glioxil-agarose 4B-CL com densidade de grupos aldeído adequada para imobilização seletiva de bromelina;
- b) Monitorar os parâmetros cinéticos de imobilização (atividade enzimática e proteína solúvel) para avaliação da seletividade e eficiência do processo;
- c) Avaliar a atividade catalítica do derivado imobilizado na hidrólise de soro albumina bovina (BSA), em diferentes condições de pH reacional;
- d) Caracterizar o hidrolisado produzido quanto ao grau de hidrólise (método OPA em nMols de Leucina/mL) e potencial antioxidante (método ABTS em μ M Trolox/mL), correlacionando a extensão da proteólise com a bioatividade dos peptídeos liberados;
- e) Validar a estratégia de imobilização como ferramenta para estabilização de bromelina e geração de peptídeos bioativos de alto valor agregado.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 BIOCATALISADORES

A biocatálise se estabeleceu como uma área fundamental da biotecnologia industrial, inclusive seguindo os princípios de química verde, sendo uma alternativa sustentável aos processos de catálise química convencionais. Os biocatalisadores, que englobam enzimas isoladas e células microbianas inteiras, distinguem-se pela capacidade de operar sob condições reacionais brandas, como pH próximo à neutralidade, temperatura ambiente e pressão atmosférica, minimizando o consumo energético e a geração de subprodutos tóxicos ou indesejáveis (Sheldon; Van Pelt, 2013; Guisán, 2013). A característica mais notável das enzimas é sua elevada especificidade, que se manifesta por meio da quimiosseletividade (atuam sobre um único tipo de grupo funcional), regioseletividade (distinguem a posição do grupo na molécula) e estereosseletividade (diferenciam enantiômeros), permitindo a síntese de moléculas complexas e quirais com alta pureza óptica, essenciais para a indústria farmacêutica (Sheldon; Van Pelt, 2013).

Dentro do grupo de enzimas empregadas industrialmente, as proteases (EC 3.4) representam a classe mais importante economicamente, representando cerca de 60% do mercado global de enzimas (Bilal et al., 2019; Tavano et al., 2018). Essas hidrolases, responsáveis pela clivagem de ligações peptídicas em proteínas, encontram aplicações na formulação de detergentes (remoção de manchas proteicas), processamento de alimentos (modificação de textura, sabor e digestibilidade), indústria de couro e síntese de peptídeos (Tavano et al., 2018). No entanto, a implementação de enzimas em sua forma livre em processos industriais contínuos apresenta instabilidades termodinâmicas e cinéticas. A baixa estabilidade das proteínas fora do ambiente celular (instabilidade operacional), a dificuldade de separação do meio reacional (downstream complexo) e a impossibilidade de recuperação e reuso do biocatalisador impactam negativamente a viabilidade econômica de muitos bioprocessos (Furlani et al., 2020; Guisán, 2013).

3.2 IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS

A imobilização de enzimas é definida como o confinamento físico e espacial de moléculas enzimáticas em uma fase distinta daquela dos substratos e produtos, preservando sua atividade catalítica e permitindo seu reuso ou uso contínuo (Sheldon; Van Pelt, 2013). Mais do que uma simples técnica de recuperação, a imobilização moderna é concebida como uma ferramenta de engenharia bioquímica para a melhoria das propriedades funcionais da enzima. Através da escolha racional do método e do suporte, é possível modular a estabilidade térmica, a tolerância a solventes orgânicos, e diferentes faixas de pH ótimo e até mesmo a especificidade e seletividade do biocatalisador (Guisán, 2013; Guisán et al., 2020).

Algumas das estratégias de imobilização são a adsorção física, encapsulamento e ligação covalente.

O mecanismo de adsorção física é dependente de interações fracas não covalentes como ligações de hidrogênio, interações hidrofóbicas ou forças de Van der Waals entre a enzima e o suporte. Embora simples e pouco agressiva à estrutura proteica, apresenta alta reversibilidade, levando à lixiviação da enzima quando submetida a variações de força iônica ou pH (Sheldon; Van Pelt, 2013).

Durante o processo de imobilização por encapsulamento ocorre a inclusão da enzima em matrizes poliméricas (alginato, poliacrilamida) ou membranas. Protege a enzima do microambiente externo, mas frequentemente impõe severas limitações difusionais ao transporte de substratos e produtos (Tacias-Pascacio et al., 2024).

O processo de ligação covalente envolve a formação de ligações químicas estáveis e irreversíveis entre grupos funcionais da superfície da enzima (amino, carboxila, sulfidrina) e grupos reativos do suporte. É a estratégia mais robusta para prevenir a lixiviação e, quando bem desenhada, promove a rigidificação estrutural da enzima (Guisán, 1988; López-Gallego et al., 2013).

3.2.1 Imobilização de enzimas em glioxil-agarose

A utilização de suportes de glioxil-agarose tem destaque entre os protocolos de ligação covalente entre enzima e suporte por sua capacidade de promover maior estabilidade térmica de enzimas (GUISÁN, 1988). A agarose 4B-CL (*cross-linked*) é

um suporte comumente empregado devido à sua alta porosidade, hidrofiliçidade, estabilidade química e resistência mecânica adequada. A ativação química desses géis envolve uma etapa de eterificação com glicidol (2,3-epoxipropanol) seguida de oxidação com periodato de sódio, gerando uma alta densidade superficial de grupos aldeído alifáticos (glioçil) (Guisán, 1988). A ausência de cargas elétricas e a baixa hidrofobicidade dos grupos glioçil minimizam a adsorção inespecífica, garantindo que a interação enzima-suporte seja dirigida exclusivamente pela formação de ligações covalentes (Guisán, 1988; López-Gallego et al., 2013).

3.2.1.1 Mecanismo físico-químico de imobilização em glioçil-agarose

O sucesso da estabilização via glioçil-agarose é dependente de um mecanismo cinético e termodinâmico conduzido em duas etapas, a adsorção e ligação multipontual, seguida de redução e rigidificação da estrutura (Guisán, 1988; López-Gallego et al., 2020).

Durante a etapa de adsorção e ligação multipontual, a imobilização é conduzida em pH alcalino (pH 10,2). Nessas condições, os grupos amino dos resíduos de lisina da superfície da enzima (pK_a próximo de 10,5) encontram-se na forma não protonada. A interação inicial ocorre entre um resíduo de lisina e um grupo aldeído do suporte, formando uma base de Schiff (imina). Como a constante de equilíbrio para a formação de uma única base de Schiff em meio aquoso é baixa, a imobilização só se torna estável através do estabelecimento de múltiplas ligações simultâneas. A alta densidade de grupos aldeído no suporte e o tempo prolongado de incubação permitem que a enzima estabeleça o maior número possível de ligações covalentes entre seus resíduos de lisina e a superfície ativada (Guisán et al., 2020; Guisán, 1988).

Após o processo de interação multipontual, o sistema é submetido à redução com borohidreto de sódio ($NaBH_4$). Este passo é crítico e cumpre três funções:

- a) Converte as ligações imina ($C=N$), que são hidrolisáveis, em ligações amina secundária ($C-NH$) mais estáveis e quimicamente inertes.

- b) Reduz os grupos aldeído remanescentes no suporte a grupos hidroxila, tornando o suporte menos reativo, prevenindo interações indesejadas com o substrato.
- c) Garante o aprisionamento molecular da enzima na estrutura do suporte. Essa rigidificação multipontual aumenta a energia de ativação necessária para o desenovelamento da proteína, resultando em maior estabilização da enzima (Furlani et al., 2020; López-Gallego et al., 2013).

3.3 BROMELINA E CISTEÍNA-PROTEASES

A bromelina constitui um complexo de diferentes enzimas proteolíticas extraído de tecidos da família Bromeliaceae, sendo o abacaxi *Ananas comosus* a fonte comercial predominante. O extrato bruto, comumente obtido do talo (SBM) ou do fruto (FBM), é uma mistura heterogênea composta majoritariamente por cisteína-proteases (endopeptidases de tiol), mas também contendo fosfatases, glucosidases, peroxidases, celulases, glicoproteínas e inibidores de protease (Maurer, 2001; Varilla et al., 2021).

Do ponto de vista bioquímico a bromelina do caule (EC 3.4.22.32) é uma proteína de caráter básico com ponto isoelétrico próximo a 9,5 e glicosilada, enquanto a bromelina do fruto (EC 3.4.22.33) apresenta caráter ácido de ponto isoelétrico próximo de 4,6. Ambas isoformas possuem um resíduo de cisteína e um resíduo de histidina essenciais no bolsão catalítico responsável pela hidrólise de ligações peptídicas (Maurer, 2001; Tacias-Pascacio et al., 2024).

A aplicação da bromelina livre enfrenta limitações como o fato de a enzima ser suscetível à inativação térmica, degradação por solventes, à autólise em solução aquosa, o que resulta em perda progressiva de atividade durante o armazenamento e o processo catalítico (Novaes, 2013; Varilla et al., 2021).

3.3.1 Aplicações biotecnológicas

A bromelina possui algumas atividades farmacológicas já conhecidas. Atuando como agente anti-inflamatório e antiedematoso (reduzindo níveis de prostaglandinas), antitrombótico e fibrinolítico (impedindo a agregação plaquetária), além de potencializar a absorção de antibióticos (Maurer, 2001; Varilla et al., 2021). Estudos recentes destacam seu potencial antitumoral, modulando vias de sinalização de morte celular, e seu uso no desbridamento enzimático de ferimentos e queimaduras graves (Tacias-Pascacio et al., 2024).

No setor alimentício, a bromelina é amplamente empregada para amaciamento de carnes (hidrólise de proteínas do tecido conjuntivo e miofibrilar), produção de hidrolisados de carne e peixe, e na panificação (redução da força do glúten). Na indústria de bebidas, sua principal aplicação é na clarificação e estabilização de vinhos, onde hidrolisa proteínas termolábeis responsáveis pela turvação, sem alterar as características organolépticas do produto (Tavano et al., 2018; Tacias-Pascacio et al., 2024).

Uma fronteira tecnológica emergente é a utilização da bromelina para a produção controlada de peptídeos bioativos a partir de diferentes matrizes proteicas. A especificidade de clivagem da bromelina (preferencialmente em resíduos de lisina, alanina, tirosina e glicina) favorece a liberação de peptídeos com baixo peso molecular com atividades biológicas específicas, como capacidade antioxidante (sequestro de radicais livres), atividade anti-hipertensiva (inibidores da Enzima Conversora de Angiotensina - ECA) e propriedades antimicrobianas (Gouseti et al., 2023; Tacias-Pascacio et al., 2023). A imobilização da enzima é uma estratégia para esse fim, permitindo o controle do grau de hidrólise e a obtenção de perfis peptídicos passíveis de serem reproduzidos, além de garantir a isenção de enzima residual no produto final (Furlani et al., 2020; Tavano et al., 2018).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 PREPARO DO SUPORTE E IMOBILIZAÇÃO ENZIMÁTICA

A estratégia de imobilização adotada baseou-se no protocolo de ligação covalente multipontual em suportes de agarose ativados com grupos glioxil, conforme os princípios de estabilização enzimática estabelecidos por Guisán (1988). O suporte escolhido foi a agarose 4B-CL (*cross-linked*), uma matriz polissacarídica porosa que oferece alta área superficial interna e resistência mecânica adequada tanto para processos conduzidos em sistemas em batelada, quanto para processos em sistemas contínuos.

4.1.1 Síntese e ativação do suporte

A síntese do suporte glioxil-agarose envolveu duas etapas sequenciais (eterificação e oxidação) conforme descrito na seção 3.1.1. A eterificação com glicidol introduziu grupos gliceril nas posições hidroxila da agarose, aumentando a hidrofobicidade superficial e preparando o gel para a oxidação subsequente. A oxidação com periodato de sódio promoveu a clivagem oxidativa das ligações C-C adjacentes do glicerol, convertendo-as em grupos aldeído (glioxil) termodinamicamente mais estáveis e nucleofílicos.

Inicialmente, uma massa de 34,3 g de gel de agarose 4B-CL, previamente lavada com água destilada para remoção de conservantes, foi suspensa em um meio reacional alcalino composto por 9,75 mL de água destilada e 16,32 mL de solução de NaOH 1,7M, ambas geladas. O sistema foi mantido em banho de gelo para controle térmico e para prevenir a oxidação da matriz polimérica em ambiente alcalino, adicionou-se 465 mg de borohidreto de sódio (NaBH_4), atuando como agente redutor protetor.

A etapa de eterificação foi iniciada pela adição lenta, gota a gota, de 11,75 mL de glicidol. O processo de multi-interação enzima-suporte envolve incubação inicial a 25°C. Durante essa etapa, os grupos hidroxila da agarose reagem com o anel epóxido do glicidol, resultando na introdução de grupos gliceril (di-hidróxi) na estrutura do gel,

gerando a gliceril-agarose. Ao final da reação, a suspensão foi filtrada sob pressão reduzida em um funil de Büchner e o suporte foi lavado com água destilada.

A conversão dos grupos gliceril em grupos aldeído (glioxil) foi realizada por meio da oxidação de Malaprade. O gel de gliceril-agarose (aproximadamente 20 g) foi suspenso em 28,75 mL de solução de periodato de sódio (NaIO_4) 100 mM. A reação foi conduzida sob agitação controlada por 45 minutos à temperatura ambiente. O periodato promove a clivagem oxidativa das ligações carbono-carbono vicinais dos grupos diol, gerando grupos aldeído terminais. O suporte final, glioxil-agarose, foi lavado abundantemente com água destilada para remover o excesso de reagentes e armazenado sob refrigeração até o uso.

4.1.2 Estabilização estrutural do suporte e término da imobilização

A etapa final do processo de imobilização, responsável pela estabilização do derivado, consistiu na redução química das ligações formadas. Após o período de interação enzima-suporte, adicionou-se borohidreto de sódio (NaBH_4) à suspensão na concentração final de 1 mg/mL. A reação foi mantida sob agitação suave por 45 minutos.

A estabilização estrutural do suporte desempenha um importante papel no processo de imobilização, consolidando a ligação de forma covalente e reduzindo a reatividade da superfície do suporte (Guisán, 2013).

Durante a consolidação das ligações covalentes, as bases de Schiff (ligações imina, $\text{C}=\text{N}$), que são menos estáveis termicamente, são convertidas em ligações amina secundária ($\text{C}-\text{NH}$), que são mais estáveis e irreversíveis.

Após a etapa de consolidação das ligações os grupos aldeído da superfície do suporte, que não tenham reagido com a enzima, são reduzidos a grupos hidroxila que são mais quimicamente estáveis e inertes, o que minimiza a possibilidade de interações inespecíficas posteriores com substratos ou produtos, garantindo uma maior estabilidade do suporte.

4.2 PREPARO E CARACTERIZAÇÃO DA SOLUÇÃO ENZIMÁTICA

A solução enzimática foi preparada a partir de bromelina adquirida comercialmente em uma farmácia da cidade de Alfenas, o que limita as informações disponíveis sobre o material empregado. Não foi possível determinar se a preparação contém exclusivamente bromelina do caule (SBM) ou do fruto (FBM), sendo provável que se trate de uma mistura de ambas as isoformas.

Uma massa de 24,1 mg do pó liofilizado contendo bromelina foi solubilizada em 30 mL de tampão carbonato de sódio 5 mM (pH 10,2) para ensaios de caracterização e para o processo de imobilização. A solução foi submetida à centrifugação (10.000 x g, 10 min) para remoção de materiais insolúveis provenientes do liofilizado. O liofilizado contendo bromelina foi previamente caracterizado pelo método de Kjeldahl, para que a partir do teor proteico obtido (25,16%) fosse possível calcular a teor de proteínas ofertado para o processo de imobilização.

Os cálculos de Proteína oferecida ao suporte estão descritos a seguir:

$$\text{Proteína total (mg)} = \text{Massa do liofilizado} \times \frac{\text{Teor proteico}}{100}$$

$$\text{Proteína total} = 24,1 \text{ mg} \times \frac{25,16}{100} = 6,063 \text{ mg}$$

Assim, a partir de 24,1 mg do liofilizado que continha a enzima foram oferecidos 6,063 mg de proteína total ao processo de imobilização, por meio de uma solução 0,2 mg/mL de bromelina:

$$\text{Concentração} \left(\frac{\text{mg}}{\text{mL}} \right) = \frac{\text{Proteína total (mg)}}{\text{Volume (mL)}}$$

$$\text{Concentração} = \frac{6,063 \text{ mg}}{30 \text{ mL}} = 0,202 \text{ mg/mL}$$

4.2.1 Determinação de proteínas solúveis ao longo da imobilização

A concentração de proteínas totais solúveis no extrato e nos sobrenadantes de imobilização foi acompanhada durante o processo por espectrofotometria, utilizando o reagente de Bradford (1976). O método baseia-se na mudança do máximo de absorção do corante Coomassie Brilliant Blue G-250 a 595 nm ao se ligar a resíduos de aminoácidos básicos (arginina, lisina, histidina) e aromáticos da proteína em meio ácido.

Para o ensaio, 50 µL de amostra foram misturados a 1 mL do reagente de Bradford. Após 5 minutos de incubação à temperatura ambiente, a absorbância foi lida a 595 nm. Durante o processo de imobilização foram recolhidas alíquotas do sobrenadante em diferentes intervalos de tempo.

4.2.2 Determinação de parâmetros cinéticos de imobilização

O processo de imobilização foi conduzido a 25 °C sob agitação mecânica suave para evitar danos físicos às partículas do suporte. A solução enzimática foi preparada em tampão carbonato de sódio 5 mM pH 10,2, condição necessária para garantir a desprotonação dos grupos amino dos resíduos de lisina da bromelina (pK_a próximo a 10,5), tornando-os nucleofílicos e reativos em relação aos grupos aldeído do suporte.

A cinética de imobilização foi monitorada através da coleta de alíquotas do sobrenadante em tempos pré-definidos (0, 1, 10, 20, 30, 60 minutos e tempos finais de até 17 horas). Para cada ponto experimental, foram avaliados dois parâmetros, a atividade residual no sobrenadante em conjunto também se determinou a absorbância das alíquotas mediante adição do reagente de Bradford.

E a partir dos valores de absorbância foi calculada a atividade residual do derivado obtido, utilizando-se da seguinte fórmula:

$$\text{Atividade Residual(\%)} = \frac{A_t}{A_c} \times 100$$

Onde:

- A_t = Atividade no tempo t
- A_c = Atividade do controle (tempo 0)
- Cada 0,01 de absorbância equivale a 1 Unidade de Atividade (UA)

4.2.3 Determinação da atividade catalítica para o derivado

A atividade proteolítica do derivado imobilizado e da enzima livre foi determinada utilizando BSA a 2% (p/v) como substrato, preparado em tampão fosfato de sódio 0,2 M com pH 4,75.

O ensaio consistiu na incubação de uma massa conhecida do derivado úmido (aproximadamente 30 mg) ou 50 μ L de enzima livre com 500 μ L da solução de substrato (BSA 2%), sob agitação a 50 °C por 20 minutos. A reação de hidrólise foi interrompida pela adição de 1 mL de ácido tricloroacético (TCA) 5%, seguida de repouso em temperatura ambiente por 15 minutos para precipitação das proteínas íntegras e de alto peso molecular. A mistura foi centrifugada (10.000 x g, 10 min) e a absorbância do sobrenadante, contendo os peptídeos solúveis em TCA, foi medida a 280 nm.

Uma unidade de atividade enzimática (UA) foi definida como a quantidade de enzima capaz de promover um aumento de 0,001 unidade de absorbância a 280 nm por minuto, nas condições do ensaio.

4.2.4 Caracterização do hidrolisado produzido

4.2.4.1 Grau de hidrólise (OPA)

O grau de hidrólise foi monitorado através da quantificação dos α -amino grupos livres, utilizando o método espectrofotométrico do o-ftalaldeído (OPA), conforme descrito por Church et al. (1983). O reagente OPA foi preparado dissolvendo-se 40 mg de o-ftalaldeído em 1 mL de metanol, seguido da adição de 25 mL de tampão

tetraborato de sódio 100 mM (pH 9,5), 2,5 mL de SDS 20% (p/v) e 100 µL de β-mercaptoetanol, completando-se o volume para 50 mL com água destilada.

Para o ensaio, 20 µL da amostra hidrolisada foram misturados a 1 mL do reagente OPA. A mistura foi incubada por 2 minutos à temperatura ambiente e a absorbância foi lida a 340 nm. O reagente OPA reage especificamente com aminas primárias na presença de um tiol reduzido, formando um aduto 1-alquil-2-alquilisoindol que absorve fortemente em 340 nm. Uma curva padrão foi elaborada utilizando L-leucina (0 a 5 mM) para converter os valores de absorbância em concentração de grupos amino livres (nMols de Leucina/mL), a partir desta curva se obteve a seguinte equação de reta: $Y = 0,0061 X$; com um $R^2 = 0,9996$.

4.2.4.2 Potencial antioxidante do hidrolisado (ABTS)

A capacidade antioxidante *in vitro* dos hidrolisados gerados foi avaliada pelo método de captura do radical catiônico ABTS (ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico)), segundo metodologia adaptada de Re et al. (1999). O radical monocatiônico ABTS foi gerado pela reação de uma solução aquosa de ABTS (7 mM) com persulfato de potássio (2,45 mM), mantida ao abrigo da luz por 12-16 horas à temperatura ambiente. Antes do uso, a solução do radical foi diluída em água se obter uma absorbância de $0,70 \pm 0,02$ a 734 nm.

As análises foram realizadas adicionando-se 10 µL de amostra, 240 µL de água e 750 µL da solução diluída do radical ABTS. Após 30 minutos de incubação, a absorbância foi medida a 734 nm. A diminuição da absorbância reflete a redução do radical pelo antioxidante presente na amostra. Os resultados foram expressos em Capacidade Antioxidante Equivalente ao Trolox (TEAC, em µM Trolox/mL), utilizando uma curva padrão construída com Trolox (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-ácido carboxílico). A partir desta curva se obteve a seguinte equação de reta: $Y = 0,0186 X - 0,0094$; com um $R^2 = 0,988$.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DO SUPORTE GLIOXIL-AGAROSE 4B-CL

A ativação química da agarose 4B-CL, conduzida pela eterificação com glicidol seguida de oxidação com periodato, resultou na obtenção de um suporte com grau de ativação suficiente para se conduzir o processo de imobilização. O grau de ativação é crítico para o sucesso do processo de imobilização multipontual. Segundo Guisán (1988) e López-Gallego et al. (2013), densidades de ativação na faixa de 15 a 40 $\mu\text{mol/mL}$ são ideais para garantir que a distância média entre os grupos aldeído na superfície do poro seja suficientemente pequena para permitir a reação simultânea com múltiplos resíduos de lisina (amino) de uma mesma enzima.

A escolha da agarose 4B-CL (cross-linked) é justificada pela sua maior porosidade e estabilidade química. A estrutura de poros maiores da agarose 4B-CL facilita o transporte difusional tanto da bromelina (uma glicoproteína de aproximadamente 33 kDa) durante o processo de imobilização quanto de substratos macromoleculares como soroalbumina bovina (BSA) durante o processo de hidrólise, reduzindo barreiras estéricas capazes de minimizar a atividade do derivado obtido (Guisán, 2013).

5.2 DINÂMICA E SELETIVIDADE DA IMOBILIZAÇÃO ENZIMÁTICA

A cinética de imobilização (Figura 1) mostra um comportamento distinto entre a atividade enzimática e a concentração de proteínas solúveis no sobrenadante da imobilização, podendo o suporte glioxil-agarose ter menor afinidade química com outras proteínas que estejam presentes em solução, como contaminantes. O gráfico exhibe o decaimento da atividade residual (%) e da proteína solúvel residual (%) no sobrenadante em função do tempo de imobilização (0 min a 17 horas).

A curva correspondente à atividade (laranja) apresenta um decaimento rápido, atingindo valores menores que 10% da atividade inicial em 60 minutos. Já o perfil de

proteína solúvel (azul) sofre maiores oscilações durante o processo de imobilização. Onde se observa uma queda inicial nos primeiros minutos, seguido por uma elevação da concentração proteica no sobrenadante entre 20 e 60 minutos, alcançando cerca de 55%. Este fenômeno pode sugerir a ocorrência de dessorção de proteínas que estavam inicialmente adsorvidas ao suporte apenas por interações físicas mais fracas e reversíveis. Entretanto, deve-se considerar também que tais flutuações podem ser decorrentes de oscilações das leituras relacionadas ao método espectrofotométrico ou de variações experimentais pontuais durante a coleta e manipulação das alíquotas do sobrenadante. Independentemente dessa variação intermediária, a eficácia da imobilização é confirmada no tempo final de 17 horas, momento em que o equilíbrio é atingido e a concentração de proteína solúvel se estabiliza em valores próximos a 20%, indicando a fixação da enzima no suporte.

Ao analisar em conjunto o decaimento de atividade residual e proteína solúvel do sobrenadante parece haver uma maior afinidade entre maior parte das proteínas que apresentam atividade catalítica e o suporte. Em pH 10,2, a imobilização em glioxil-agarose é governada pelo comportamento nucleofílicos dos grupos amino não protonados das lisinas. A bromelina, enquanto uma proteína de caráter básico com ponto isoelétrico próximo a 9,5 para a forma obtida do caule, contém uma superfície rica em resíduos de lisina acessíveis e positivamente carregadas ou neutras a depender do meio reacional nessa faixa de pH (Maurer, 2001). Estas condições favorecem uma interação inicial com os grupos aldeído do suporte.

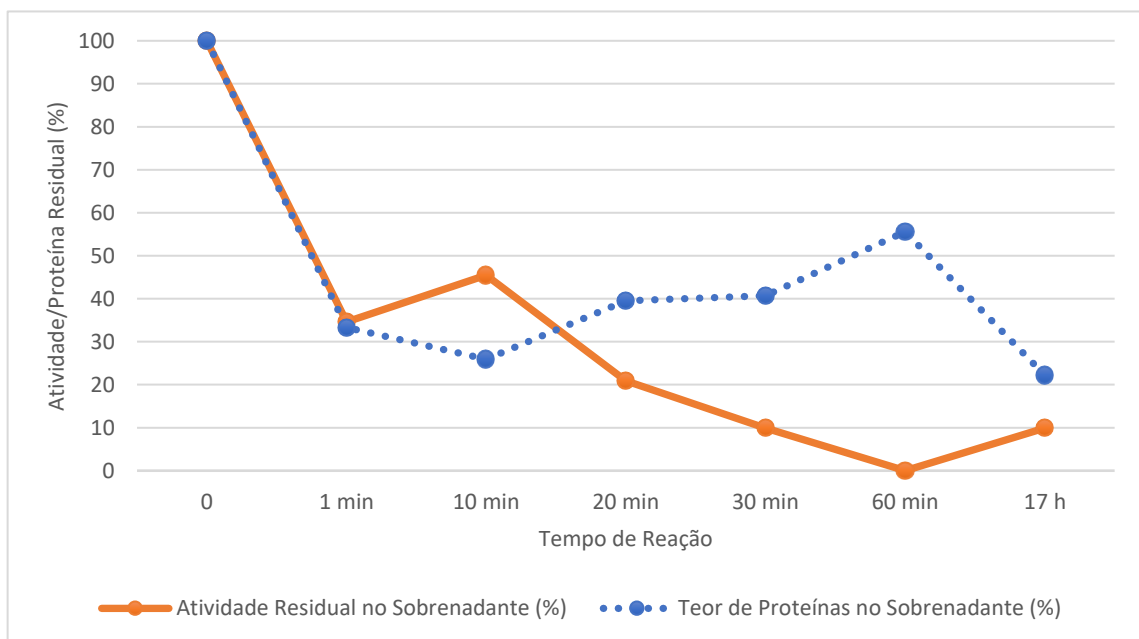
Parte das proteínas presentes na solução enzimática (cerca de 22% ao final de 17h de imobilização) demonstram ter menor afinidade pelo suporte glioxil-agarose, o que pode ser um indício da presença de proteínas contaminantes. A presença de outras proteínas pode ser justificada pela impossibilidade de se trabalhar com a enzima em alto teor de pureza, uma vez que a enzima utilizada se tratava de um insumo farmacêutico e não de uma enzima com grau de pureza analítico. Outra justificativa para este residual de proteínas solúveis pode ser atribuído a um ponto isoelétrico mais ácido ou a uma menor densidade de lisinas acessíveis na superfície das proteínas, o que torna a formação das bases de Schiff cineticamente desfavorável em comparação com a bromelina (Bilal et al., 2019).

O rendimento de imobilização ($Y_{\text{imob}}(\%)$) foi de aproximadamente 90%:

$$Y_{\text{imob}} = \frac{19,1 - 1,9}{19,1} \times 100 = 90,05\%$$

- Atividade inicial (sobrenadante): 19,1 UA/mL
- Atividade final (17 h): 1,9 UA/mL (após o sistema atingir equilíbrio)

Figura 1 – Cinética de imobilização da bromelina (proteína vs. atividade)



Fonte: O autor (2025).

5.2.1 Seletividade de imobilização como mecanismo de purificação

Uma observação relevante dos resultados cinéticos (Figura 1) é a diferença de comportamento entre atividade enzimática e proteína total durante a imobilização. Esta diferença pode sugerir um mecanismo de purificação decorrente do processo de imobilização, onde a bromelina ativa é seletivamente capturada pelo suporte em detrimento de possíveis proteínas contaminantes.

A imobilização em glioxil-agarose em pH 10,2 é possível pela nucleofilicidade dos grupos amino desprotonados de resíduos de lisina. A bromelina, enquanto uma

proteína básica com ponto isoelétrico próximo a 9,5, apresenta superfície com uma quantidade considerável de resíduos de lisina acessíveis, tornando-a especialmente reativa com os grupos aldeído do suporte em condições alcalinas.

No entanto, outras possíveis proteínas contaminantes presentes no insumo farmacêutico podem diferir em ponto isoelétrico, número de resíduos de lisina livres na superfície proteica, ou conformação espacial diferente. Estas características diferentes da enzima ativa podem explicar esta diferença de comportamento, onde supostamente apenas a enzima ativa teria afinidade pelo suporte possibilitando a remoção de outros componentes da estrutura do derivado obtido.

5.3 ATIVIDADE CATALÍTICA DO DERIVADO E INFLUÊNCIA DO PH

Para investigar a influência do pH no processo de hidrólise, os ensaios de atividade catalítica foram inicialmente conduzidos em meio aquoso (apenas com BSA 2% em água destilada). Em paralelo o mesmo ensaio foi conduzido utilizando-se solução tampão fosfato de sódio 0,2 M com pH controlado em 4,75.

A atividade proteolítica da bromelina imobilizada foi determinada sob condições controladas, utilizando BSA a 2% (p/v) como substrato em tampão fosfato de sódio 0,2 M com pH 4,75. Ambos os ensaios (em meio aquoso e em tampão pH 4,75) confirmaram a competência catalítica do derivado. No entanto, quando comparados os dois meios reacionais, a reação conduzida em tampão fosfato pH 4,75 apresentou velocidade de reação superior em relação ao meio aquoso não tamponado, sugerindo que o controle de pH favorece a atividade catalítica da bromelina imobilizada.

Apesar das restrições conformacionais impostas pela ancoragem multipontual ao suporte de glioxil-agarose, o derivado imobilizado manteve competência catalítica. Quando incubado com BSA 2% por 20 minutos a 50 °C com controle do pH de reação, o biocatalisador apresentou atividade mensurável, confirmada pela detecção de peptídeos solúveis em TCA a 280 nm. Este resultado demonstra a preservação de atividade na forma imobilizada validando a hipótese de que a rigidificação multipontual não prejudica a geometria do sítio ativo da enzima.

A conservação da atividade pode ser explicada pela região da enzima em que se estabelece a ligação covalente em glioxil-agarose. Os resíduos de lisina que formam as bases de Schiff reduzidas localizam-se predominantemente na superfície

mais externa da bromelina (Maurer, 2001), enquanto o sítio ativo (formado por resíduos de Cys e His) situam-se no interior da cavidade catalítica. Assim, a ancoragem multipontual estabiliza a enzima sem grandes interferências no sítio catalítico, permitindo o acesso de substratos e mantendo a orientação funcional da díade catalítica (López-Gallego et al., 2013).

A redução dos grupos aldeído residuais (não reagidos com lisinas) a grupos hidroxila inertes também é responsável por minimizar qualquer interferência química posterior com o sítio ativo, como pode ocorrer com suportes onde grupos reativos permanecem na superfície do suporte utilizado (Guisán, 1988).

O pH 4,75 foi selecionado para os ensaios de atividade catalítica como condição representativa de possíveis aplicações industriais. Este pH corresponde ao ótimo de muitas proteases de origem vegetal e reflete condições típicas de hidrólise de proteínas alimentares (Tavano et al., 2018).

Embora a imobilização tenha sido realizada em pH 10,2, condição necessária para a desprotonação dos grupos amino e reação com aldeídos, o derivado mantém sua atividade em pH mais ácido, indicando que a rigidificação conferida não resulta em sensibilidade excessiva às condições do meio reacional.

A capacidade de operar a bromelina imobilizada em pH 4,75 a 50 °C demonstra sua aplicabilidade em processos contínuos. Diferentemente da enzima livre, que requer proteção contra autólise e se deteriora progressivamente, o biocatalisador poderia ser confinado em reatores, permitindo múltiplos ciclos catalíticos sem necessidade de remoção de enzima residual no produto, um fator importante para viabilidade econômica industrial uma vez que processos de separação e purificação de misturas podem encarecer o processo de produção.

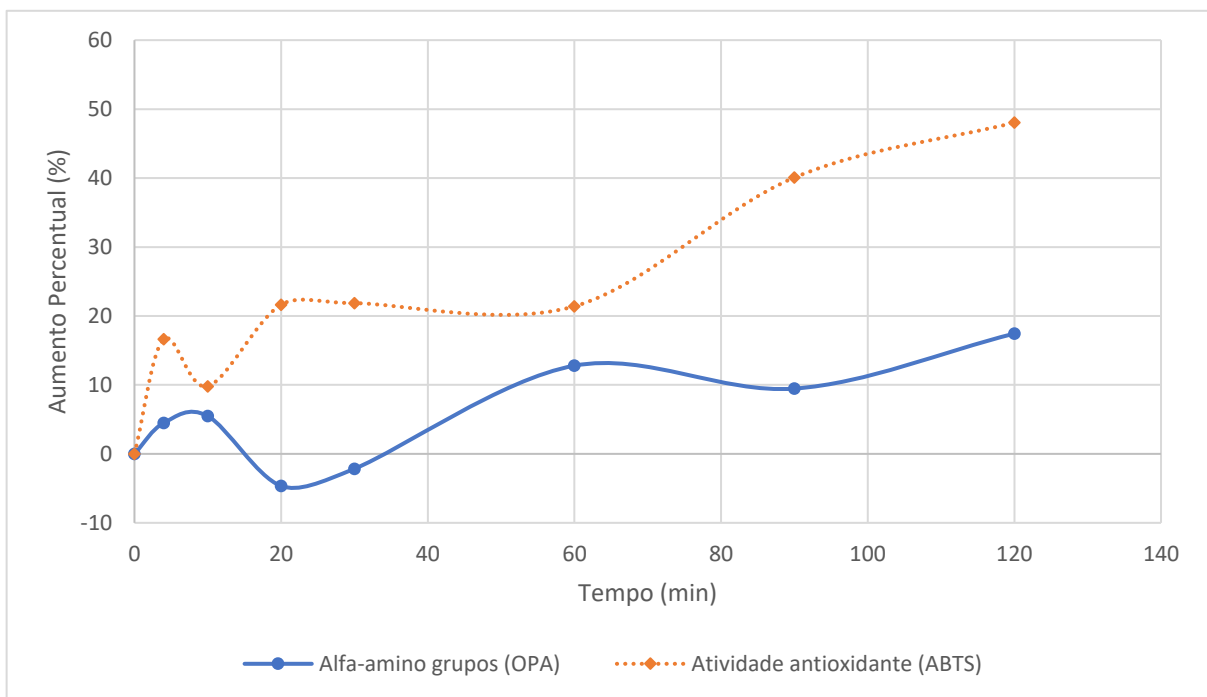
Embora a aplicação do derivado com controle de pH tenha se mostrado mais eficaz em realizar o processo de hidrólise em menor período de tempo o processo de hidrólise para avaliação da capacidade antioxidante dos peptídeos liberados foi conduzido em meio aquoso sem controle do pH do meio.

5.4 CORRELAÇÃO ENTRE PROTEÓLISE E BIOATIVIDADE ANTIOXIDANTE

A aplicação do derivado na hidrólise de BSA permitiu observar alguma relação entre o avanço da proteólise (monitorado por OPA em nMols de Leucina/mL) e o aumento da bioatividade (monitorado por ABTS em μM Trolox/mL).

O método OPA detectou a liberação contínua de grupos α -amino primários, confirmando que a enzima imobilizada manteve sua funcionalidade catalítica frente a um substrato macromolecular. Isso indica que, apesar da rigidificação, o sítio ativo da bromelina permaneceu acessível e competente para acomodar e clivar a proteína empregada como substrato (Church et al., 1983).

Figura 2 – Cinética da liberação de alfa-amino grupos e atividade antioxidante



Fonte: O autor (2025).

Por meio de cálculos (descritos abaixo) foi possível constatar que o hidrolisado de BSA produzido pela bromelina imobilizada apresentou um aumento de 48% na capacidade antioxidante após 120 minutos de reação, correspondendo a um ganho de 378,136 μM Trolox em equivalentes antioxidantes. Esse aumento foi calculado pela diferença entre o valor inicial (787,097 μM Trolox) e o valor ao final de 2 horas de hidrólise (1.165,233 μM Trolox), resultando em uma correlação direta entre o avanço

da hidrólise e a liberação de peptídeos bioativos com atividade antioxidante superior à da proteína nativa.

$$\Delta TEAC = TEAC_{120min} - TEAC_{0min} = 1165,233 - 787,097 = 378,136 \mu M Trolox$$

$$aumento \% TEAC = \frac{\Delta TEAC}{TEAC_0} \times 100 = \frac{378,136}{787,097} \times 100 = 48,04\%$$

O aumento de cerca de 48% na capacidade antioxidante (TEAC) ao longo de 2 horas de hidrólise, demonstrado na Figura 2, sugere a liberação de peptídeos bioativos. Proteínas globulares como a BSA possuem resíduos de aminoácidos com propriedades antioxidantes (Tirosina, Triptofano, Histidina, Cisteína) frequentemente enovelados em porções mais hidrofóbicas, inacessíveis ao solvente e aos radicais livres. A ação proteolítica da bromelina expõe esses resíduos e gera peptídeos de menor peso molecular, onde esses grupos laterais podem interagir de maneira mais efetiva com as espécies reativas (radicais ABTS), atuando como doadores de elétrons ou hidrogênio (Gouseti et al., 2023; Tacias-Pascacio et al., 2023).

Embora o aumento de atividade antioxidante tenha sido quantificado (48% em TEAC), a identidade específica dos resíduos de aminoácidos liberados não foi determinada. Para uma melhor compreensão do mecanismo responsável pelo aumento do potencial antioxidante seria necessário a realização de um aminograma (perfil de aminoácidos) do hidrolisado, por meio de cromatografia de troca iônica ou outros métodos adequados.

Este resultado valida o potencial tecnológico do derivado desenvolvido. Diferentemente da enzima livre, que perderia atividade e contaminaria o produto, a bromelina imobilizada em glioxil-agarose se mostra como um biocatalisador mais robusto, capaz de operar em condições controladas para gerar hidrolisados capazes de exercer bioatividades com alto valor agregado, acompanhando as tendências atuais da biotecnologia de alimentos e nutracêuticos (Tacias-Pascacio et al., 2024).

6 CONCLUSÃO

O presente trabalho alcançou com êxito seu objetivo principal de desenvolver e caracterizar um biocatalisador de bromelina estabilizado através da imobilização covalente multipontual em glioxil-agarose 4B-CL. A partir dos resultados obtidos e análises realizadas, conclui-se que:

A síntese do suporte de glioxil-agarose resultou em uma matriz com densidade de ativação (grupos aldeído) adequada para promover a captura seletiva e eficiente da bromelina. O protocolo de ativação via eterificação com glicidol e oxidação com periodato de sódio produziu um suporte versátil.

A análise da dinâmica de imobilização revelou um comportamento cinético distinto entre a bromelina ativa e as proteínas contaminantes presentes no extrato comercial. Aproximadamente 90% da atividade enzimática foi capturada pelo suporte em 60 minutos, enquanto apenas 80% da proteína total foi imobilizada em 17 horas. Este resultado pode indicar que a imobilização em glioxil-agarose apresenta seletividade pelas proteases ativas, funcionando também como uma etapa de purificação.

O derivado obtido demonstrou atividade catalítica adequada em meio aquoso, ainda que apresente maior atividade quando se controla o pH do meio reacional que contém o substrato BSA. Além disso o uso de tampão fosfato de sódio pH 4,75 possibilita a liberação de um maior número de alfa-amino grupos em um menor tempo de hidrólise sob as mesmas condições de agitação e temperatura.

A atividade catalítica foi mantida após imobilização, confirmada pela capacidade do derivado de hidrolisar o substrato BSA de maneira eficiente, mesmo em meio aquoso. O processo de hidrólise produziu peptídeos com potencial bioativo aumentado, onde a atividade antioxidante dos hidrolisados cresceu 48% em 2 horas de reação. Este aumento correlaciona-se com a liberação de resíduos de aminoácidos com propriedades antioxidantes provenientes da proteína íntegra.

REFERÊNCIAS

- AZARKAN, M. *et al.* **RCSB PDB - 6YCF: Structure the bromelain protease from Ananas comosus in complex with the E64 inhibitor.** Disponível em: <<https://doi.org/10.2210/pdb6YCF/pdb>>. Acesso em: 2 dez. 2025.
- BILAL, Muhammad *et al.* Multi-point enzyme immobilization, surface chemistry, and novel platforms: a paradigm shift in biocatalyst design. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 39, n. 2, p. 202–219, 17 fev. 2019.
- BRADFORD, Marion M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. **Analytical Biochemistry**, 1976.
- CHURCH, Frank C. *et al.* Spectrophotometric Assay Using o-Phthaldialdehyde for Determination of Proteolysis in Milk and Isolated Milk Proteins. **Journal of Dairy Science**, v. 66, n. 6, p. 1219–1227, jun. 1983.
- FURLANI, Izadora *et al.* IMOBILIZAÇÃO ENZIMÁTICA: CONCEITO E EFEITOS NA PROTEÓLISE. **Química Nova**, 2020.
- GOUSETI, Ourania *et al.* Applications of Enzyme Technology to Enhance Transition to Plant Proteins: A Review. **Foods**, v. 12, n. 13, p. 2518, 28 jun. 2023.
- GUISÁN, Jose M. (ORG.). **Immobilization of Enzymes and Cells**. 3. ed. Totowa, NJ: Humana Press, 2013. v. 1051
- GUISÁN, Jose M. *et al.* (ORGS.). **Immobilization of Enzymes and Cells: Methods and Protocols**. New York, NY: Springer US, 2020. v. 2100
- GUISÁN, José M. Aldehyde-agarose gels as activated supports for immobilization-stabilization of enzymes. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 10, n. 6, p. 375–382, jun. 1988.
- LÓPEZ-GALLEGO, Fernando *et al.* Stabilization of enzymes by multipoint covalent immobilization on supports activated with glyoxyl groups. *In: Immobilization of Enzymes and Cells*. Methods in Molecular Biology. 3. ed. Totowa, NJ: Humana Press, 2013. v. 1051 p. 93–107.
- LÓPEZ-GALLEGO, Fernando *et al.* Multi-Point Covalent Immobilization of Enzymes on Glyoxyl Agarose with Minimal Physico-Chemical Modification: Stabilization of Industrial Enzymes. *In: Immobilization of Enzymes and Cells: Methods and Protocols*. Methods in Molecular Biology. New York, NY: Springer US, 2020. v. 2100.
- MAURER, H. R. Bromelain: biochemistry, pharmacology and medical use: **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 58, n. 9, p. 1234–1245, ago. 2001.

NOVAES, Letícia Célia De Lencastre. **Extração de bromelina dos resíduos de abacaxi (*Ananas comosus*) por sistemas de duas fases aquosas e sua aplicação em hidrogel polimérico**. Doutorado em Tecnologia Químico-Farmacêutica—São Paulo: Universidade de São Paulo, 11 nov. 2013.

RE, Roberta *et al.* Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 26, n. 9–10, p. 1231–1237, maio 1999.

SHELDON, Roger A.; VAN PELT, Sander. Enzyme immobilisation in biocatalysis: why, what and how. **Chem. Soc. Rev.**, v. 42, n. 15, p. 6223–6235, 27 mar. 2013.

TACIAS-PASCACIO, Veymar G. *et al.* Peptides with biological and technofunctional properties produced by bromelain hydrolysis of proteins from different sources: A review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 253, p. 127244, dez. 2023.

TACIAS-PASCACIO, Veymar G. *et al.* A review on the immobilization of bromelain. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 273, p. 133089, jul. 2024.

TAVANO, Olga Luisa *et al.* Biotechnological Applications of Proteases in Food Technology. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 17, n. 2, p. 412–436, mar. 2018.

VARILLA, Carolina *et al.* Bromelain, a Group of Pineapple Proteolytic Complex Enzymes (*Ananas comosus*) and Their Possible Therapeutic and Clinical Effects. A Summary. **Foods**, v. 10, n. 10, p. 2249, 23 set. 2021.

ZHAO, X. *et al.* Lipase-catalyzed process for biodiesel production: Enzyme immobilization, process simulation and optimization. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, [S. l.], v. 44, p. 182-197, 2015

APÊNDICES

APÊNDICE A – LEITURA DE ABSORBÂNCIA PARA O COM ADIÇÃO DO REAGENTE DE BRADFORD

Tempo	Abs (595nm)
Controle	0,081
1 min	0,027
10 min	0,021
20 min	0,032
30 min	0,033
60 min	0,045
17 h	0,018

Fonte: O Autor (2025)

APÊNDICE B – ATIVIDADE RESIDUAL SOBRENADANTE DE IMOBILIZAÇÃO

	Abs (280 nm)	Abs Real (280 nm)	Atividade (UA/mL)	Atividade Residual (%)
Branco	0,365	-	-	-
0 min (Controle)	0,556	0,191	19,1	100,0
1 min	0,431	0,066	6,6	34,55497382
10 min	0,452	0,087	8,7	45,549973822
20 min	0,405	0,040	4,0	20,94240838
30 min	0,384	0,019	1,9	9,947643979
60 min	0,350	-0,015	-1,5	-7,853403141
17 h	0,384	0,019	1,9	9,947643979

Fonte: O Autor (2025)

APÊNDICE C – ATIVIDADE DERIVADO - 30 MIN, 50°C – BSA 2% (H₂O)

Amostra	Abs (280nm)	Massa (mg)
Branco	0,111	32,3
Replicata 1	0,137	34,7
Replicata 2	0,126	34,2
Replicata 3	0,132	32,4

Fonte: O Autor (2025)

APÊNDICE D – ATIVIDADE DERIVADO - 20 MIN, 50°C – BSA 2% (PH 4,75)

Amostra	Abs (280nm)	Massa (mg)
Branco	0,137	23,7
Replicata 1	0,171	24,9

Fonte: O Autor (2025)

APÊNDICE E – DETERMINAÇÃO DE ALFA-AMINO GRUPOS PELO MÉTODO DE CHURCH ET AL. (1983)

$$Y = 0,0061 X / R^2 = 0,9996$$

(20 µL amostra + 10 µL H₂O + 1mL OPA (340nm))

Tempo	Abs (340 nm)	nMols de Leucina (FD = 56)	nMols de Leucina	X	S
0 min	0,203	3,328	186,361	184,219	3,710
	0,203	3,328	186,361		
	0,196	3,213	179,934		
4 min	0,207	3,393	190,033	192,481	2,310
	0,210	3,443	192,787		
	0,212	3,475	194,623		
10 min	0,211	3,459	193,705	194,317	1,060
	0,213	3,492	195,541		
	0,211	3,459	193,705		
20 min	0,205	3,361	188,197	175,650	11,105
	0,187	3,066	171,672		
	0,182	2,984	167,082		
30 min	0,213	3,492	195,541	180,240	17,232
	0,176	2,885	161,574		
	0,200	3,279	183,607		
60 min	0,218	3,574	200,131	207,781	6,767
	0,232	3,803	212,984		
	0,229	3,754	210,230		
90 min	0,220	3,607	201,967	201,661	2,310
	0,222	3,639	203,803		
	0,217	3,557	199,213		
120 min	0,235	3,852	215,738	216,350	0,530
	0,236	3,869	216,656		
	0,236	3,869	216,656		

Fonte: O Autor (2025)

APÊNDICE F – DETERMINAÇÃO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE, PELA CAPTURA DO RADICAL ABTS

$$Y = 0,0186 X - 0,0094 / R^2 = 0,988$$

(10 µL amostra + 240 µL H₂O + 750 µL ABTS)

Tempo	Abs (734 nm)	Abs 100% - Abs	nMols de Trolox (FD=100)	nMols de Trolox	X	S
Branco (100%)	0,540	-	-	-	-	-
0 min	0,385	0,155	8,839	883,871	787,097	85,347
	0,415	0,125	7,226	722,581		
	0,409	0,131	7,548	754,839		
4 min	0,383	0,157	8,946	894,624	917,921	35,797
	0,382	0,158	9,000	900,000		
	0,371	0,169	9,591	959,140		
10 min	0,387	0,153	8,731	873,118	864,158	15,520
	0,387	0,153	8,731	873,118		
	0,392	0,148	8,462	846,237		
20 min	0,375	0,165	9,376	937,634	957,348	43,788
	0,362	0,178	10,075	1007,527		
	0,377	0,163	9,269	926,882		
30 min	0,372	0,168	9,538	953,763	959,140	19,385
	0,367	0,173	9,806	980,645		
	0,374	0,166	9,430	943,011		
60 min	0,376	0,164	9,323	932,258	955,556	24,243
	0,372	0,168	9,538	953,763		
	0,367	0,173	9,806	980,645		
90 min	0,355	0,185	10,452	1045,161	1102,509	56,473
	0,334	0,206	11,581	1158,065		
	0,344	0,196	11,043	1104,301		
120 min	0,331	0,209	11,742	1174,194	1165,233	8,213
	0,333	0,207	11,634	1163,441		
	0,334	0,206	11,581	1158,065		

Fonte: O Autor (2025)