



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIA ANIMAL

ANNA CAROLINA DA SILVA

ATIVIDADE BIOLÓGICA DE HIDROLISADOS ORIGINADOS DE PROTEÍNAS DA
CLARA DE OVOS DE GALINHA DE CAPOEIRA

RECIFE – PE
2017

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIA ANIMAL

ANNA CAROLINA DA SILVA

ATIVIDADE BIOLÓGICA DE HIDROLISADOS ORIGINADOS DE PROTEÍNAS
DA CLARA DE OVOS DE GALINHA DE CAPOEIRA

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Biociência Animal da Universidade Federal Rural de
Pernambuco, como pré-requisito necessário para a
obtenção do grau de Doutor em Biociência Animal.

Orientadora: Dr^a. Keila Aparecida Moreira – UAG/UFRPE
Co-orientadora: Dr^a. Erika Valente de Medeiros – UAG/UFRPE

RECIFE – PE
2017

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIA ANIMAL

Parecer da comissão examinadora da defesa de tese de doutorado de

ANNA CAROLINA DA SILVA

ATIVIDADE BIOLÓGICA DE HIDROLISADOS ORIGINADOS DE PROTEÍNAS DA
CLARA DE OVOS DE GALINHA DE CAPOEIRA

Área de concentração: Biotecnologia

Recife, 21 de fevereiro de 2017

Comissão examinadora, composta pelos seguintes professores:

Prof^a. Dr^a. Keila Aparecida Moreira - (Presidente)
Unidade Acadêmica de Garanhuns - Universidade Federal Rural de Pernambuco

Prof^a. Dr^a Cristina Maria de Souza Motta - (Membro externo)
Departamento de Micologia - Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Adalberto Pessoa Júnior - (Membro externo)
Departamento de Tecnologia Bioquímica-Farmacêutica - Universidade de São Paulo

Prof^a Dr^a. Ana Lúcia Figueiredo Porto - (Membro interno)
Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal - Universidade Federal Rural de
Pernambuco

Profa. Dra. Maria Taciana Cavalcanti Vieira Soares - (Membro Interno)
Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal - Universidade Federal Rural de
Pernambuco

A todas as vítimas da intolerância e maldade humanas, em especial às de atentados terroristas, aos refugiados de guerra e às que foram submetidas à negligência humana. Que o conhecimento seja apenas uma porta para se amar e respeitar mais ao próximo.

Dedico

AGRADECIMENTOS

Ao meu Deus, Senhor da minha vida e dono de toda sabedoria; por ter me concedido entendimento, paciência e grandes oportunidades e me capacitado a cada momento para enfrentá-las e conquistá-las; por sempre cuidar tão bem de mim, como pai zeloso que é! Por ter me dado a vida e ter permitido que eu a vivesse debaixo da sua graça.

Aos meus pais Betânia e Carlos Alberto, que me deram amor e educação na medida certa e que sempre me incentivaram e me ajudaram a traçar o caminho por onde estou, ainda, passando. Exemplos sempre lembrados e repetidos. A eles meus agradecimentos, respeito e amor eternos.

Ao meu irmão Bebeto, por ter tido sempre tanta paciência com minhas ideias e pedidos, por sempre ter acreditado em mim e por sempre participar dos melhores momentos da minha vida: quando estou louvando a Deus.

A Pedro, por sempre ser tão presente e companheiro. Por ter me ajudado com as soluções dos problemas. Por ter sorrido, chorado e sonhado comigo. Por me incentivar tanto e ter acreditado em mim!

Às minhas avós Maria José (*in memoriam*) e Helena Alexandre por terem me amado tanto e me ensinado muito, mas principalmente o que é amar ao próximo. Muitas saudades, vó Zezé!

À professora Keila Moreira pela orientação, cuidado e acompanhamento desde a iniciação científica em 2006. Pela grande colaboração em meu crescimento profissional e pessoal.

À professora Erika Valente Medeiros pela co-orientação e presença tão amigável.

Ao Tony Picoli e ao professor Geferson Fischer, Universidade Federal de Pelotas, por me receberem em sua instituição e colaborarem com o nosso trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal pela oportunidade oferecida para pesquisa, à CAPES pela bolsa concedida que muito ajudou na realização do projeto, a Facepe pelo apoio financeiro concedido pelo Auxílio a Projetos de Pesquisa (APQ 2015) e pela Unidade Acadêmica de Garanhuns da UFRPE pela infraestrutura disponibilizada para realização do projeto e por ter me acolhido e instruído desde a graduação.

Às minhas grandes companheiros de laboratório CENLAG/Bioativos: Alana Soares, Sheylla Silva, Amanda Reges, Daniele Ribeiro e Wellington Leal pela paciência, companheirismo e disposição em me ajudar sempre que necessário.

Aos estagiários do Laboratório de Microbiologia, Tecnologia Enzimática e Bioprodutos - CENLAG, em especial a Edson Silva pela ajuda imensurável! Aos demais colegas pelo envolvimento e pela ajuda nas mais diversas situações vividas: Gilvannya Sobral, Natália Oliveira, Talita Camila, Gean Santos, Osmar Soares, Matheus Gouveia, Rodrigo Lira e Jônatas Silva.

Às minhas queridas amigas, Ávylla Nascimento e Jessica Maria, por estarem sempre presentes desde o início da graduação e por torcerem por mim.

A Igreja Batista Filadélfia, representada pelo Pastor Abel Santos, por sua torcida e orações constantes.

Obrigada!

“Melhor é o fim das coisas do
que o seu princípio; melhor é o
paciente do que o arrogante.”

Eclesiastes 7:8. 2:3-5

RESUMO

Por meio da hidrólise enzimática de fontes proteicas de origem alimentar, podem ser liberados peptídeos com atividades biológicas que beneficiam o organismo daqueles que os consomem. Diante disso, objetivou-se com o presente trabalho avaliar atividades biológicas de hidrolisados proteicos obtidos pela da hidrólise da clara de ovo de galinha de capoeira por proteases produzidas por *Aspergillus avenaceus* URM 6706. Para isto, a protease foi produzida por fermentação submersa realizada de acordo com planejamentos estatísticos; em seguida, foi purificada por precipitação com etanol e cromatografia de troca iônica, e caracterizada parcialmente. O extrato purificado foi utilizado na hidrólise da clara do ovo de galinha de capoeira, em que a influência da variação do tempo de hidrólise foi averiguada, sob o grau de hidrólise. Os hidrolisados obtidos foram avaliados quanto ao potencial antioxidante, por meio da captura dos radicais ABTS⁺ e DPPH, e da determinação da atividade quelante de Cu²⁺ e Fe²⁺, quanto ao potencial anti-hipertensivo por inibição da enzima conversora de angiotensina, antidiabético pela inibição das enzimas α -glicosidase e α -amilase, antibacteriano frente a isolados de mastite bovina subclínica e antiviral contra o Herpes vírus bovino tipo 1 e Vírus da diarreia viral bovina. A protease produzida por *Aspergillus avenaceus* URM 6706 teve como temperatura e pH ótimos 50 °C e 10,0, respectivamente; parâmetros empregados durante a hidrólise da clara do ovo de galinha de capoeira. O grau de hidrólise foi diretamente proporcional ao tempo de exposição da protease com a clara do ovo de galinha de capoeira. Os hidrolisados estudados apresentaram todas as atividades biológicas avaliadas, com atividade antioxidante de 99 e 27% de eliminação dos radicais ABTS⁺ e DPPH, respectivamente; 62 e 55% de atividade quelantes de Cu²⁺ e Fe²⁺, respectivamente; por volta de 80% de atividade anti-hipertensiva, 57% de inibição da α -glicosidase e 94% da α -amilase, atividade antiestafilocócica que chegou até 88% e antiviral de até 90%. Os hidrolisados gerados pela hidrólise da clara de ovo de galinha de capoeira apresentaram atividade biológica satisfatória, com possíveis aplicações na formulação de alimentos funcionais e no desenvolvimento de fármacos.

Palavras-chave: fermentação submersa, *Aspergillus*, protease, biopeptídeos e proteína animal.

ABSTRACT

Through the enzymatic hydrolysis of protein sources of food origin, it can be released with peptides with biological activities that benefit the body of those who consume them. In view of this, the present work was carried out with biological activities of protein hydrolysates obtained by hydrolysis of egg white hick by proteases produced by *Aspergillus avenaceus* URM 6706. For this, a protease was produced by submerged fermentation carried out according to legal statistical design. It was then purified by precipitation with ethanol and ion exchange chromatography, and partially characterized. The purified extract was used in the hydrolysis of the egg white hick, where an influence of the variation of the hydrolysis time was verified, under the degree of hydrolysis. The hydrolysates obtained were evaluated for antioxidant potential by capturing the ABTS^{•+} and DPPH radicals and determining the chelating activity of Cu²⁺ and Fe²⁺, as well as the antihypertensive potential through the inhibition of the angiotensin converting enzyme, antidiabetic enzyme Inhibition of β -glucosidase and α -amylase enzymes, antibacterial against subclinical bovine mastitis isolates and antiviral against bovine herpes virus type 1 and viral bovine diarrhea virus. A protease produced by *Aspergillus avenaceus* URM 6706 had a temperature and pH of 50 °C and 10.0, respectively; parameters used in the hydrolysis of egg white hick. The degree of hydrolysis was directly proportional to the exposure time of the protease with the egg white hick. The studied hydrolysates presented all the biological activities evaluated, with antioxidant activity of 99 and 27% of elimination of the radicals ABTS^{•+} and DPPH, respectively; 62 and 55% of chelating activity of Cu²⁺ and Fe²⁺, respectively. About 80% of antihypertensive activity, 57% inhibition of α -glycosidase and 94% of α -amylase, antibacterial activity that reached up to 88% and antiviral up to 90%. The hydrolysates generated by the hydrolysis of egg white hick presented satisfactory biological activity, with possible applications in the formulation of functional foods and the development of drugs.

Key words: submerged fermentation, *Aspergillus*, protease, biopeptides and animal protein.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	12
LISTA DE TABELAS	14
1. INTRODUÇÃO	17
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
2.1. Proteases.....	18
2.2. Produção de proteases por espécies de <i>Aspergillus</i>	24
2.3. Aplicação das proteases na indústria.....	26
2.4. Peptídeos bioativos.....	27
2.4.1. Peptídeos com atividade antioxidante.....	31
2.4.2. Peptídeos com atividade anti-hipertensiva.....	34
2.4.3. Peptídeos com atividade antibacteriana e antiviral.....	35
2.4.4. Peptídeos com atividade antidiabética.....	38
2.5. Clara de ovo de galinha de capoeira e obtenção de peptídeos bioativos.....	40
3. OBJETIVOS	42
3.1. Objetivo Geral	42
3.2. Objetivos Específicos	42
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	43
CAPITULO I	62
RESUMO	63
INTRODUÇÃO	63
MATERIAIS E MÉTODOS	65
RESULTADOS E DISCUSSÃO	68
CONCLUSÃO.....	79
AGRADECIMENTOS.....	79
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	79
CAPITULO II	93
RESUMO	95
INTRODUÇÃO	96
MATERIAIS E MÉTODOS	97
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	102
CONCLUSÃO.....	115

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	115
CAPITULO III	122
RESUMO	124
INTRODUÇÃO	125
MATERIAIS E MÉTODOS	126
RESULTADOS E DISCUSSÃO	136
CONCLUSÃO.....	137
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	137
CAPITULO IV	141
RESUMO	143
INTRODUÇÃO	144
MATERIAIS E MÉTODOS	145
RESULTADOS E DISCUSSÃO	148
CONCLUSÃO.....	162
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	162
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	168

LISTA DE FIGURA

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Figura 1. Classificação das proteases.....	20
---	----

CAPITULO I

Figura 1. Superfície resposta da produção de protease por <i>A. avenaceus</i> URM 6706 mostrando a interação entre as variáveis temperatura, rotação e extrato de levedura.....	83
Figura 2. Curva de pH ótimo e estabilidade ao pH aos 180 minutos da protease produzida por <i>A. avenaceus</i> URM 6706.....	84
Figura 3. Curva de temperatura ótima e estabilidade à temperature aos180 minutos da protease produzida por <i>A. avenaceus</i> URM 6706.....	84
Figura 4. Curva de Arrhenius da atividade inicial da protease produzida por <i>A. avenaceus</i> URM 6706.....	85
Figura 5. Gráfico semi-log da desnaturação irreversível da protease produzida por <i>A. avenaceus</i> URM 6706.....	85
Figura 6. Curva da resistência térmica da protease produzida por <i>A. avenaceus</i> URM 6706 em função da temperatura de inativação.....	86
Figura 7. Atividade proteásica integral (PmM) versus tempo (<i>t</i> , min) da protease produzida por <i>A. avenaceus</i> URM 6706 em diferentes temperaturas.....	86

CAPITULO II

Figura 1. Cromatograma de troca iônica em coluna Q Sepharose FF da protease produzida por <i>A. avenaceus</i> URM 6706. Linha cinza: Atividade Proteásica Total; Linha preta: Proteína a 280 nm.....	106
Figura 2. Análise de pureza da protease produzida por <i>A. avenaceus</i> URM 6706 por cromatografia líquida de alta eficiência.....	106
Figura 3. Eletroforese SDS-PAGE e zimograma da protease produzida por <i>A.</i>	

<i>avenaceus</i> URM 6706.....	107
Figura 4. Curva de pH ótimo da protease purificada produzida por <i>A. avenaceus</i> URM 6706.....	107
Figura 5. Curva de temperatura da protease purificada produzida por <i>A. avenaceus</i> URM 6706.....	108

CAPÍTULO IV

Figura 1. Análise de pureza da protease produzida por <i>A. avenaceus</i> URM 6706 por cromatografia líquida de alta eficiência.....	149
---	-----

LISTA DE TABELAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Tabela 1. Classificação das proteases em famílias de acordo com o sítio catalítico.....	22
--	----

CAPITULO I

Tabela 1. Valores reais das variáveis utilizadas no planejamento estatístico Plackett-Burman para a produção de protease por <i>A. avenaceus</i> URM 6706.....	87
Tabela 2. Análise de variância dos dados obtidos no planejamento estatístico Plackett-Burman para a protease produzida por <i>A. avenaceus</i> URM 6706.....	88
Tabela 3. Efeitos estimados das variáveis sobre a produção de protease por <i>A. avenaceus</i> URM 6706 usando resultados experimentais do planejamento estatístico Plackett-Burman.....	88
Tabela 4. Matriz do Delineamento composto central (DCC) e experimentos correspondentes com os respectivos valores de produção de protease por <i>A. avenaceus</i> URM 6706.....	89
Tabela 5. Análise de variância dos dados obtidos pelo Delineamento composto central para a protease produzida por <i>A. avenaceus</i> URM 6706.....	90
Tabela 6. Efeitos estimados das variáveis na produção de protease por <i>A. avenaceus</i> URM 6706 baseados Delineamento composto central.....	90
Tabela 7. Efeito de íons metálicos e de inibidores na atividade da protease produzida por <i>A. avenaceus</i> URM 6706.....	91
Tabela 8. Parâmetros da termodinâmica e da cinética da desnaturação térmica da protease produzida por <i>A. avenaceus</i> URM 6706.....	92

CAPITULO II

Tabela 1. Purificação da protease produzida por <i>A. avenaceus</i> URM	
--	--

6706.....	105
Tabela 2. Relação do grau de hidrólise da clara de ovo de galinha de capoeira com atividades antioxidantes.....	114
Tabela 3. Correlação entre o grau de hidrólise e as diferentes atividades antioxidantes do hidrolisado proteico da clara de ovo de galinha de capoeira.....	114

CAPÍTULO III

Tabela 1. Viabilidade de células MDBK e Vero após 24 horas de exposição aos hidrolisados da clara de ovo de galinha de capoeira.....	135
Tabela 2. Atividade inibitória das enzimas ECA, α -glicosidase e α -amilase dos hidrolisados de diferentes faixas de massa molecular obtidos pela hidrólise da clara de ovo de galinha de capoeira.....	136
Tabela 3. Atividade inibitória da enzimas ECA, α -glicosidase e para a α -amilase dos hidrolisados de diferentes concentrações obtidos pela hidrólise da clara de ovo de galinha de capoeira.....	136

CAPÍTULO IV

Tabela 1. Viabilidade de células MDBK e Vero após 24 horas de exposição aos hidrolisados da clara de ovo de galinha de capoeira.....	151
Tabela 2. Atividade antiestafilocócica de hidrolisados da clara de ovo de galinha de capoeira contra isolados recentes de <i>Staphylococcus aureus</i> de vacas com mastite subclínica.....	157
Tabela 3. Atividade antiestafilocócica de hidrolisados da clara de ovo de galinha de capoeira contra isolados persistentes de <i>S. aureus</i> de vacas com mastite subclínica.....	158
Tabela 4. Viabilidade de células MDBK (%) tratadas com os hidrolisados da clara de ovo de galinha de capoeira após infecção com os BoVH-1 e BVDV (0,1 MOI).....	159
Tabela 5. Viabilidade de células MDBK (%) tratadas com os hidrolisados da clara de	

ovo de galinha de capoeira antes da infecção com os BoVH-1 e BVDV (0,1 MOI).....	160
Tabela 6. Atividade virucida dos hidrolisados da clara de ovo de galinha de capoeira frente os BoHV-1 e BVDV até 4 horas de exposição. Títulos virais em CCID 50.100µL ⁻¹	161

1. INTRODUÇÃO

Peptídeos bioativos são fragmentos específicos de proteínas que possuem um efeito positivo sobre as funções ou condições corporais, podendo influenciar a saúde (KITTS; WEILER, 2003). Essas moléculas, no entanto, não possuem atividade quando estão dentro da cadeia das proteínas precursoras; sendo necessária a sua hidrólise, seja ela *in vitro* ou *in vivo*, para que haja a liberação dos peptídeos bioativos (MEISEL; FITZGERALD, 2003).

Existem vários métodos que podem ser aplicados para a hidrólise de proteínas e, conseqüente, produção de peptídeos; sendo os mais comuns: hidrólise por enzimas digestivas, hidrólise como consequência da atividade microbiana nos alimentos fermentados e hidrólise por proteases microbianas produzidas por processos fermentativos) produção industrial para produção de enzimas) (KORHONEN; PIHLANTO, 2003); destas, a hidrólise enzimática por proteases produzidas industrialmente para este fim é a mais empregada (KORHONEN, 2009a).

Muitas proteases comerciais, como a pepsina e a tripsina, têm sido empregadas para este fim (BHAT; KUMAR; LIN et al., 2003; BHAT, 2015; GARCÉS-RIMÓN et al., 2016). Entretanto, há o interesse na descoberta de novas proteases microbianas produzidas por processos fermentativos, inclusive por espécies de *Aspergillus* (CASTRO; SATO, 2015), o que pode culminar no surgimento de diferentes peptídeos com diversas atividades biológicas a partir da hidrólise seletiva.

A atividade destes peptídeos se baseia principalmente na composição de aminoácidos e na sequência destes, inerente a cada peptídeo funcional. O tamanho das sequências ativas pode variar de 2 a 20 resíduos de aminoácidos (KORHONEN, 2009b) e seus efeitos benéficos à saúde podem ser desempenhados como antioxidante (MENDIS et al., 2005), antitrombótico (SHIMIZU et al., 2008), anti-hipertensivo (JIA et al., 2010), antimicrobiana (MCCANN et al., 2006) ou imunomodulador (GAUTHIER; POULIOT; SAINT-SAUVEUR, 2006), dentre outros.

Outro fator que influencia diretamente na composição desses peptídeos e, por conseguinte, na sua atividade biológica é a fonte proteica; dentro desse contexto, as proteínas do ovo são componentes importantes para o desenvolvimento de alimentos funcionais. E muitos estudos têm reportado a produção de peptídeos e hidrolisados proteicos originados de proteínas do ovo, com maior frequência da clara (ERDMANN; CHEUNG; SCHRÖDER,

2008), porém não há relato de hidrolisados proteicos originados do ovo de galinha de capoeira.

Portanto, objetiva-se com este trabalho avaliar a presença de atividades biológicas de peptídeos obtidos por meio da hidrólise da clara de ovos de galinha de capoeira por proteases produzidas por *Aspergillus avenaceus* URM 6706.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Proteases

Enzimas podem ser definidas como catalisadores biológicos, que em sua maioria são proteínas que catalisam a maior parte das reações nos mais diversos organismos (MONTEIRO; SILVA, 2009). Assim como, os demais catalisadores, as enzimas aumentam a velocidade das reações ocasionando a diminuição da barreira energética entre os reagentes e o produto, entretanto as enzimas são consideradas muito mais eficientes, pois conseguem acelerar a reação em uma ordem de 10^{17} vezes (BOMMARIUS; RIEBEL, 2004). De acordo com a União Internacional de Bioquímica, as enzimas estão divididas em seis classes: oxidorredutases, transferases, hidrolases, liases, isomerases e ligases (SANCHEZ; DEMAN, 2011).

Dentro do grupo das hidrolases estão as proteases, que são definidas como enzimas multifuncionais que catalisam a hidrólise de proteínas em polipeptídeos e de oligopeptídeos em aminoácidos (CASTRO et al., 2015). Como já mencionado, a clivagem das ligações peptídicas pela atividade da protease, pode levar à degradação dos substratos proteicos até seu constituinte de aminoácidos, ou ainda pode ser específica, levando à clivagem seletiva das ligações da proteína para que ocorra uma modificação pós-traducionais (SOUZA et al., 2015).

As proteases também conhecidas como hidrolases peptídicas ou peptidases (EC 3.4), constituem uma extensa família de enzimas que pode ser dividida em endopeptidases (EC 3.4.21-99) e exopeptidases (EC 3.4.11-19), a depender da posição da ligação peptídica hidrolisada (GUPTA; BEG; LORENZ, 2002; SABOTIC; KOS, 2012).

De forma mais específica, as exopeptidases clivam um ou alguns ligações peptídicas da extremidade N ou C-terminal; quando na extremidade C-terminal, liberam apenas um único resíduo de aminoácidos (são as carboxipeptidases) ou dipeptídeos (as peptidildipeptidases). Enquanto, aquelas que atuam na extremidade N-terminal da cadeia

proteica podem liberar um único resíduo de aminoácidos, dipeptídeos ou ainda tripeptídeos e são comumente chamadas de aminopeptidases, dipeptidil-peptidases e tripeptidil-peptidases, respectivamente. Por outro lado, as endopeptidases clivam as ligações encontradas internamente na cadeia da proteína. Ainda existe outro grupo de proteases conhecido como peptidases ômega, essas enzimas clivam as ligações que estão próximas a uma das extremidades terminais, no entanto sem exigência quanto ao grupo terminal carregado (THERON; DIVOL, 2014).

As exopeptidases podem ainda ser divididas em três grupos: serino peptidases (EC 2.4.16), metalopeptidases (EC 2.4.17) e cisteíno peptidases (EC 2.4.18), baseado na natureza dos resíduos de aminoácidos existentes no sítio ativo da enzima (RAO et al., 1998).

De modo geral, as endopeptidases são mais importantes do ponto de vista industrial do que as exopeptidases e são classificadas de acordo com o tamanho, a carga, o substrato específico, o mecanismo catalítico, a estrutura tridimensional e com o resíduo aminoácido presente em seu sítio catalítico (SUMANTHA et al., 2006; THERON; DIVOL, 2014).

De fato, cada tipo de protease apresenta um conjunto de resíduos de aminoácidos arranjados numa configuração específica de forma a produzir seu sítio catalítico. Por esta razão, a quebra das ligações peptídicas se dá de forma específica (BARRETT et al., 2004; TYNDALL et al., 2005). Finalmente, um grupo específico de endoproteases, denominado oligopeptidases, atua apenas sobre substratos menores do que as proteínas. A Figura 1 apresenta de forma resumida a classificação das proteases e os seus modos de ação.

Baseado em seu mecanismo catalítico, as proteases podem ser classificadas em serino proteases (EC 2.4.21), cisteíno proteases (EC 2.4.22), aspártico proteases (EC 2.4.23) e metalo proteases (EC 2.4.24) (SOUZA et al., 2015), como apresentado na Tabela 1. Serino proteases são caracterizadas pela presença de um grupo serino no seu sítio ativo, são geralmente ativas em pH entre 7 e 11, com baixa massa molecular (18-35 kDa) e com inúmeras aplicações industriais (GUPTA; BEG; LORENZ, 2002). As aspártico-proteases, também conhecidas como proteases ácidas, são endopeptidases que dependem de resíduos de ácido aspártico para sua atividade catalítica. Já a atividade das cisteíno proteases depende de uma díade catalítica que consiste na presença de cisteína e histidina. Geralmente, as cisteíno proteases são ativas somente na presença de agentes redutores como a própria cisteína; a cisteíno protease mais conhecida é a papaína. As metalo proteases consistem no mais diverso

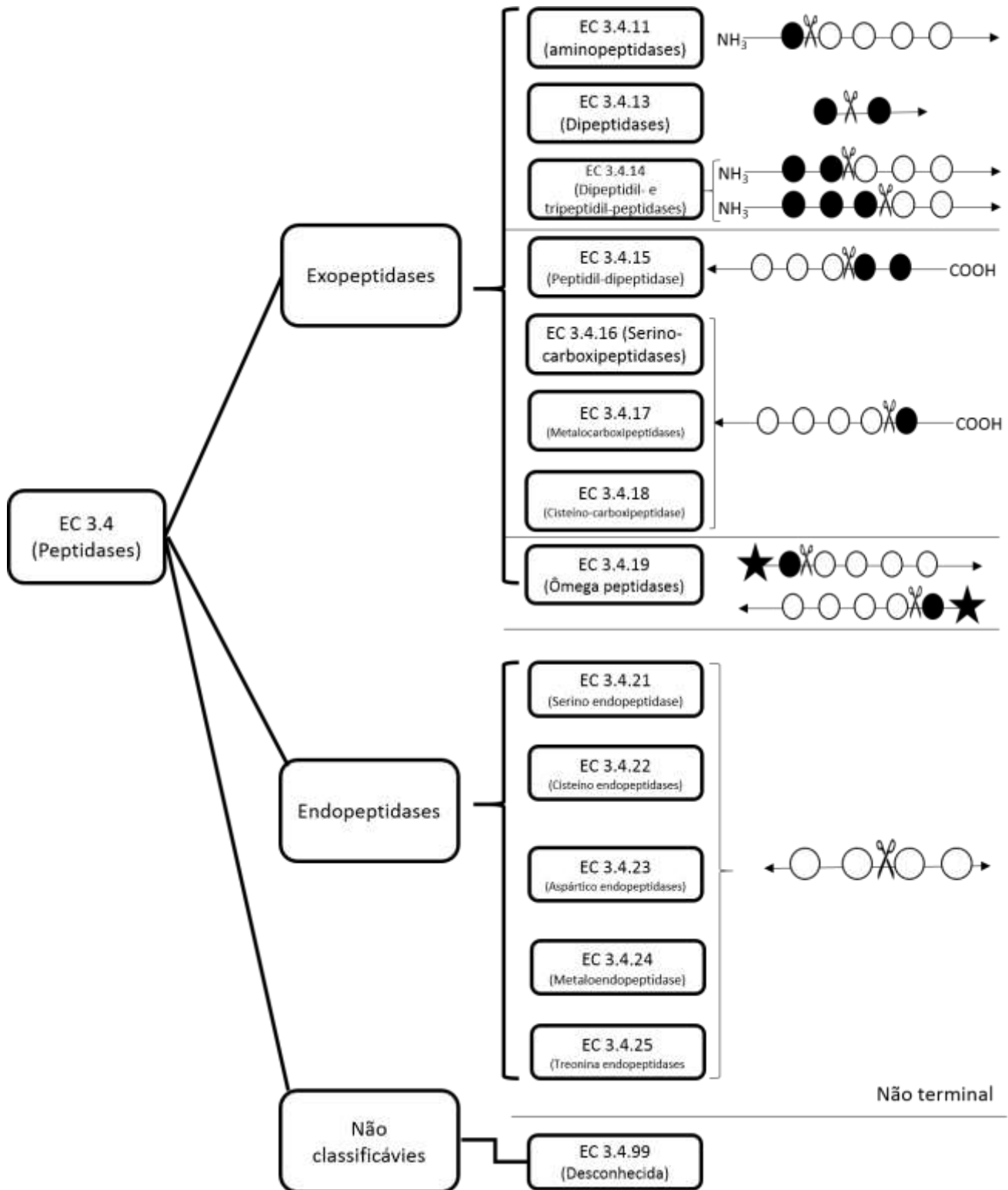


Figura 1. Classificação das proteases: local onde de ocorre hidrólise enzimática (tesoura); aminoácidos terminais (círculo preenchido); resíduos de aminoácidos na cadeia polipeptídica (círculo sem preenchimento); terminais bloqueados (estrelas). Fonte: Adaptado de Theron & Benoit Divol (2014).

grupo catalítico de proteases e são caracterizadas pelo requerimento de um íon metálico bivalente para desempenhar sua atividade (RAO et al., 1998; VRANOVA et al., 2013).

As proteases ainda podem ser classificadas de acordo com o pH que são otimamente ativas em ácidas, neutras ou alcalinas (SANDHYA et al., 2005; LÓPEZ, 2010). A classificação e nomenclatura de todas as proteases podem ser encontradas no banco de dados MEROPS (acessível em www.merops.sanger.ac.uk/).

Quanto à função, as proteases possuem aplicações importantes tanto no âmbito fisiológico, quanto comercial. Em termos fisiológicos, essas enzimas são responsáveis por processos como divisão celular, transdução de sinal, digestão de proteínas presentes em alimentos, coagulação sanguínea, regulação da pressão arterial, formação de tecidos, a morfogênese em desenvolvimento, processos inflamatórios e crescimento de tumores, síntese de proteínas virais, apoptose, ativação de hormônios de natureza peptídica, degradação de proteínas dobradas incorretamente, autólise, proteção contra peptídeos e enzimas prejudiciais, entre outros (RAO et al., 1998, BARRETT et al., 2004; SANDHYA et al., 2005; TYNDALL et al., 2005).

No que diz respeito às proteases extracelulares, suas atividades estão vinculadas à hidrólise de grandes proteínas em moléculas menores para subsequente absorção pela célula, desempenhando papel importantíssimo na hidrólise e adsorção de nutrientes proteicos (KALISZ, 1988; RAO et al., 1998). À medida que esta última função pode ser desempenhada numa variedade de ambientes, não se limitando apenas ao interior da célula, as proteases extracelulares são de grande importância comercial, e extratos de proteínas preparados a partir de culturas de crescimento de micro-organismos produtores de proteases são vastamente utilizados como ferramentas de degradar proteínas durante vários processos industriais (KUMAR; TAKAGI, 1999).

Além disso, as proteases têm uma função importante na reciclagem mundial de carbono e nitrogênio, em que as proteínas de organismos mortos são eventualmente hidrolisadas por micro-organismos durante o processo de decomposição, e assim transformadas em peptídeos e aminoácidos. Estes produtos resultantes da proteólise podem ser assimilados pelos próprios micro-organismos que produziram as proteases ou por outros organismos que se encontram na proximidade (THERON; DIVOL, 2014).

Tabela 1. Classificação das proteases em famílias de acordo com o sítio catalítico.

FAMÍLIA	PROTEASE (S) REPRESENTATIVA (S)	SÍTIOS ATIVOS
SERINO PROTEASES		
Serino Proteases I	Quimiotripsina, Tripsina, Elastase e Calicreína pancreática,	Asp, Ser, His
Serino Proteases II	Subtilisina	
CISTEÍNO PROTEASES		
Cisteíno Proteases	Papaína, Actinidina e Catepsina	Cis, His, Asp
ASPÁRTICO PROTEASES		
Aspártico Proteases	Penicilopepsina e Renina	Asp
METALO PROTEASES		
Metalo Proteases I	Carboxipeptidase A	Zn, Glu, Try
Metalo Proteases II	Termolisina	Zn, Glu, His

FONTE: Adaptada de Neurath (1986)

Quanto às aplicações comerciais, essas enzimas compõem um grande grupo que lideram o mercado industrial dessas moléculas, representando cerca de 60% do total de enzimas comercializadas mundialmente (SAVITHA et al., 2011; SOUZA et al., 2015). Sendo que, em 2010, o mercado mundial de enzimas industriais foi estimado em US\$ 3,3 bilhões, e com expectativa de US\$ 4,4 bilhões em 2015 (ABIDI et al., 2011). Têm sido utilizadas numa larga variedade de aplicações em diferentes indústrias tais como de produtos farmacêuticos, detergentes, fertilizantes ou na indústria têxtil e no processamento do couro, de alimentos, dentre outras (RAMAKRISHNA et al., 2010; YIN; HSU; JIANG, 2013; ABRAHAM; GEA; SÁNCHEZ, 2014).

Como já mencionado, as proteases desempenham funções fisiológicas que as tornam importantes para a vida dos organismos, podendo ser encontradas em vegetais, animais e em micro-organismos (KUMARI; SHARMA; JAGANNADHAM, 2012). De todas essas fontes de proteases, os micro-organismos possuem grande potencial para a produção dessas enzimas,

devido a sua grande diversidade bioquímica e sua susceptibilidade à manipulação genética, além de serem facilmente cultivados em larga escala e proporcionarem altos rendimentos (KUMAR et al., 2005, CASTRO et al., 2015). Muitos micro-organismos secretam proteases extracelulares, para que no ambiente externo degradem as proteínas ali disponíveis, utilizando, dessa forma, os produtos resultantes da hidrólise como fontes de carbono e nitrogênio para o crescimento celular (ZANPHORLIN et al., 2011).

Desta forma, as proteases microbianas podem ser extracelulares ou intracelulares e sua produção é influenciada pela espécie empregada na produção, fatores nutricionais e físico-químicos, como temperatura, pH, fonte de carbono e nitrogênio, presença de sais, rotação e concentração de oxigênio dissolvido (KUDDUS; RAMTEKE, 2008; WANG et al., 2008; KASANA; SALWAN; YADAV, 2011).

Para que haja a detecção do micro-organismo produtor de proteases, é importante que o mesmo cresça em meio de triagem e que consigam produzir a enzima nas condições de crescimento empregadas, ao mesmo tempo que o ensaio para a detecção deverá ser sensível e específico o suficiente (KASANA; SALWAN; YADAV, 2011).

As proteases microbianas têm sido bastante estudadas para a sua aplicação na indústria. Um dos primeiros relatos sobre esta aplicação remota a 1894, por Jhokichi Takamine que foi pioneiro na produção industrial de enzimas proteolíticas preparadas a partir de *Aspergillus oryzae* para o tratamento de distúrbios digestivos. Como aditivos em detergentes, proteases microbianas foram, pela primeira vez, utilizadas em 1914 (WARD; RAO; KULKARNI, 2009; KHAN, 2013), e, desde então, esta indústria tem crescido e se desenvolvido grandemente. Além disso, as proteases provenientes de fontes vegetais não conseguem atender a atual demanda mundial por estas enzimas e não são diversificadas o suficiente para atender aos requisitos industriais criando, assim, um interesse crescente em proteases microbianas (THERON; DIVOL, 2014).

Uma grande quantidade de micro-organismos é conhecida como produtores de proteases, como muitas espécies de bactérias, dentre elas actinomicetos, fungos filamentosos e leveduras (KASANA, 2010). No entanto, a utilização de micro-organismos para este fim é limitada apenas aqueles que produzem em quantidades suficiente da enzima e com propriedades desejadas, como não ser tóxico e nem patogênico (KASANA; SALWAN; YADAV, 2011). Desta forma, as enzimas produzidas por fungos são mais vantajosas, uma

vez que sua produção é geralmente extracelular, tornando mais fácil a recuperação da enzima (GERMANOA et al., 2003).

Por esta razão, os fungos filamentosos são de interesse industrial principalmente espécie do gênero *Aspergillus* (VAN DER HOMBERGH et al., 1997), devido sua grande capacidade de adaptação ao substrato e produção de diversos metabólitos com aplicação biológica.

Muitos trabalhos relatam a biossíntese de proteases pelos gêneros *Penicillium* (DURAND-POUSSEREAU; FEVRE, 1996; GERMANO et al., 2003; NOVELLI; BARROS; FLEURI, 2016); *Rhizopus* (FARLEY; IKASARI, 1992; KUMAR et al., 2005; VÁSQUEZ, et al, 2008; LI; LI, 2013), *Humicola* (ALEKSIEVA e PEEVA, 2000); *Mucor* (ANDRADE et al., 2002); *Thermomyces* (LI; YANG; SHEN, 1997; JENSEN; NEBELONG; REESLEV, 2002); *Thermoascus* (MERHEB et al., 2007; BOYCE; WALSH, 2012); *Fusarium* (PEKKARINEN et al., 2000; BARATA et al., 2002) e *Aspergillus* (YANG; LIN, 1998; KITANO et al., 2002; TUNGA; SHRIVASTAVA; BANERJEE, 2003; SHATA, 2005; HERNANDEZ-MARTINEZ et al., 2011; ANITHA; PALANIVELU, 2013; CASTRO et al., 2015; NOVELLI et al. 2016).

2.2 Produção de Proteases por espécies de *Aspergillus*

Aspergillus é um gênero anamorfo, que compreende cerca de 339 espécies (SAMSON et al., 2014, 2011). Essas espécies são classificadas em aproximadamente 10 teleomorfos diferentes (GEISER, 2009). É o gênero fúngico mais abundante no mundo e pouco seletivos quanto às condições abióticas de crescimento. Por exemplo, as espécies pertencentes a esse grupo conseguem sobreviver numa ampla faixa de temperatura (6 - 55 °C) e em atividade água baixa (0,65 a 0,8). Essas espécies se alimentam dos mais variados substratos, incluindo até fezes e tecidos animais. Não obstante, eles são predominantemente encontrados em polímeros vegetais complexos e são considerados como os fungos deterioradores de alimentos. O sucesso desse gênero também pode ser atribuído a sua dispersão eficaz, seus esporos estão entre as mais dominantes estruturas fúngicas no ar, podendo ser dispersos, a curtas e longas distâncias (BENNETT, 2010).

Esses micro-organismos são pertencentes ao reino Fungi que contribui significativamente para a vida. Podendo ser parte da dieta pelo consumo direto na alimentação humana ou pela aplicação na tecnologia de alimentos como um componente no processamento. Além disso, eles desempenham importante papel no campo da biotecnologia

na produção de biomoléculas de interesse biológico e industrial. Em seu habitat natural, são importantes devido às relações ecológicas porque desempenham simbiose, parasitismo ou atuam como decompositores primários de matéria orgânica (KAVANAGH, 2005).

Particularmente, fungos sapróbios como os do gênero *Aspergillus* são capazes de produzir enzimas extracelulares diversas, que lhes permitem adaptar seu metabolismo às variadas fontes de carbono e nitrogênio (KNIMEYER, 2011). Esse gênero é rico em espécies, e são hábeis para a produção de vários compostos extracelulares, incluindo metabólitos secundários, peptídeos e proteínas bioativos, lectinas e enzimas (FRISVAD; LARSEN, 2015).

A capacidade dos fungos pertencentes a esse gênero de secretar grandes quantidades de proteínas e outros metabólitos, em combinação com a tecnologia de fermentações e com a biologia molecular estabelecida tornou as espécies de *Aspergillus*, dentre outras, muito atraentes para a produção de proteínas homólogas e heterólogas (MEYER; WU; RAM, 2011). Como exemplo, Sanchez e Demain (2011) relataram a produção de diversas enzimas a partir de *Aspergillus sp.*, como α -amilase, catalase, xilanase, fitase, dextranase, glicose oxidase, lactase, destacando-se as proteases, amilases e celulasas.

As proteases de origem microbiana são preferíveis às de origem vegetal e animal, uma vez que possuem a maioria das características desejáveis para aplicação biotecnológica e são responsáveis por 60% da venda total mundial de enzimas (ZAMBARE; NILEGAONKAR; KANEKAR, 2011). De uma forma geral, proteases microbianas são extracelulares *in natura* e são diretamente secretadas no meio de fermentação, o que simplifica os processos de purificação dessas enzimas quando comparadas às obtidas de plantas e animais (LAGEIRO et al., 2007). No entanto, o emprego de fungos na produção de proteases apresenta vantagens devido a sua atividade sobre uma vasta faixa de pH (RANI et al., 2012); podendo ser utilizados em diferentes aplicações industriais (MURTHY; NAIDU, 2010), por possuírem uma maior variedade de proteases do que as bactérias e pela facilidade desses micro-organismos de crescer em substratos de baixo custo (ANITHA; PALANIVELU, 2013).

O gênero *Aspergillus* tem se destacado como o mais importante para a produção comercial de enzimas extracelulares (NOVAKI, 2009), sendo as espécies mais utilizadas para a produção de biomoléculas: *Aspergillus flavus*, *A. niger*, *A. awamori*, *A. oryzae*, *A. nidulans*, *A. fumigatus*, *A. clavatus*, *A. glaucus*, *A. ustus* e *A. versicolor* (SLIVINSKI, 2007) e muitos trabalhos têm relatado a produção de proteases por espécies de *Aspergillus* com as mais diversas características e aplicações: *A. fumigatus* na produção de serino proteases

(HERNÁNDEZ-MARTÍNEZ et al., 2011); *A. oryzae* na produção de proteases neutras (BELMESSIKH et al., 2013); *A. parasiticus* na produção de protease com atividade queratinolítica (ANITHA; PALANIVELU, 2013); *A. niger* (KALASKAR et al., 2014) e *A. oryzae* (MURTHY; KUSUMOTO, 2015) na produção de protease ácida com aplicação na indústria de alimentos; dentre outras.

2.3 Aplicação das Proteases na Indústria

As proteases microbianas são líderes do mercado industrial de enzimas e corresponde a aproximadamente 60% do total de enzimas vendidas mundialmente (SAVITHA et al., 2011). O mercado industrial de enzimas foi estimado em \$ 3,3 bilhões em 2010, com expectativa de ter atingido \$ 4,4 bilhões em 2015 (ABIDI et al., 2011). De todas as enzimas comercializadas mundialmente, 75% são enzimas hidrolíticas, dos quais dois terços são de enzimas proteolíticas (SAVITHA et al., 2011).

A reação de hidrólise das proteases, assim como as outras enzimas, é específica; no entanto existem proteases peculiares para cada substrato proteico; por esta razão, as proteases podem ser aplicadas em diferentes indústrias, como as de alimentos, detergentes, couro, farmacêutica e têxtil (RAO et al., 1998; GUPTA; BEG; LORENZ, 2002; ABIDI et al., 2011; SAVITHA et al., 2011).

No processamento de alimentos, suas principais aplicações estão relacionadas à fabricação e clarificação de cerveja, trituração de cereais, coagulação do leite para a fabricação de queijos, na panificação e na produção de hidrolisados proteicos (WARD, 2011). A qualidade hidrolíticas das proteases é explorada na degradação do complexo proteico que causa turbidez no suco de frutas e em bebidas alcólicas, no aumento da qualidade dos alimentos ricos em proteínas, na hidrólise das proteínas da soja e da gelatina, hidrólise da caseína e do soro do leite, recuperação e amaciamento das proteínas da carne (KUMARI et al., 2012).

Nas indústrias farmacêutica e de cosméticos, as proteases podem ser utilizadas na remoção de queratina na acne ou psoríase, na eliminação de calos e na degradação da pele humana queratinizada, na depilação, na preparação de vacinas para o tratamento de dermatofitose e no aumento da absorção de drogas ungueais (BRANDELLI; DAROIT; RIFFEL, 2010).

Proteases de todas as categorias também são amplamente aplicadas em diversas pesquisas, como na síntese e sequenciamento de peptídeos, digestão de proteínas indesejadas em amostras purificadas (por exemplo, na purificação de ácidos nucleicos), preparação de anticorpos, na produção de fragmentos de Klenow e remoção de marcadores de afinidade de proteínas (MÓTYÁN; TÓTH; TÖZSÉR, 2013).

Quanto à obtenção de hidrolisados proteicos, a hidrólise enzimática, a partir de proteases, é uma das formas empregadas. Este método consiste em submeter materiais ricos em proteína à hidrólise de uma ou mais enzimas proteolíticas, normalmente à temperatura e pH ótimos de atuação para cada protease empregada (GHASSEM et al., 2014, MORAIS et al. 2014).

Quando a hidrólise ocorre pela associação de mais de uma enzima para o mesmo extrato proteico, a reação das enzimas pode ocorrer de forma simultânea caso elas possuam condições ótimas de trabalho semelhantes (MEMARPOOR-YAZDI; ASOODEH; CHAMANI, 2012; YAMADA et al., 2013); ou sequencialmente se esta semelhança não existir (YANG et al., 2003; RAO et al., 2012). A hidrólise pode ser realizada por proteases puras comerciais (HE et al., 2013a; RUIZ-RUIZ et al., 2013) ou por proteases em extratos brutos (GARCÍA-TEJEDOR et al., 2014; KTARI et al., 2014).

A hidrólise enzimática é considerada como uma das abordagens mais seguras e convenientes para produzir hidrolisados e peptídeos bioativos a partir das mais diversas fontes de proteína (BOLSCHER et al., 2006; NAJAFIAN; BABJI, 2012). Por sua vez, as proteínas utilizadas para este fim podem ser obtidas de diferentes fontes e os seus produtos podem apresentar as mais diversificadas atividades biológicas, como antimicrobiana, imunomodulatória e citomodulatória, atividade ligante de minerais, anti-hipertensiva, antitrombótica, antioxidante; e no sistema nervoso, como peptídeos opioides (HARTMANN; MEISEL, 2007; MADUREIRA et al., 2010).

2.4 Peptídeos Bioativos

De forma geral, as substâncias bioativas de origem alimentar são aquelas que fazem parte da composição dos alimentos consumidos e que podem vir a exercer atividades regulatórias no organismo, independentemente de suas características nutricionais. Neste tipo de classificação, alguns peptídeos podem se enquadrar por apresentarem atividades biológicas

e, quando apresentam, passam a ser denominados de peptídeos bioativos (MEISEL, 1999; SÁNCHEZ-RIVERA, 2014).

Por sua vez, os peptídeos bioativos podem ser considerados como protetores naturais da saúde, podendo ser formados por uma quantidade variável de resíduos de aminoácidos com comprimentos de cadeia variáveis e massa molecular inferior ao da proteína de origem. Esses peptídeos são inertes quando encontrados dentro da cadeia molecular de origem (proteína); no entanto, quando a proteína nativa é submetida à digestão enzimática se inicia a produção, ou liberação, de fragmentos ativos denominados biopeptídeos ou peptídeos bioativos. A atenção que tem sido dada aos peptídeos bioativos dentre outras moléculas ativas como os compostos fenólicos e flavanóides é devido ao seu potencial terapêutico e medicinal e, especialmente, na regulação da ingestão de alimentos (DOUGKAS et al., 2011).

Sabe-se que a nutrição exerce um grande impacto no tempo de vida humana, uma vez que a relação entre ela e a saúde é conhecida, e tem sido aplicada por séculos (KUSSMANN; PANCHAUD; AFFOLTER, 2010). De uma forma mais específica, a qualidade da fonte proteica na alimentação não depende somente de sua composição aminoácida, mas também das transformações que estas proteínas sofrem durante a digestão, sua absorção e disponibilidade para anabolismo subsequente, como também da função que os peptídeos que são liberados podem exercer (AWATI et al., 2009).

Nos últimos anos, a dieta e um estilo de vida saudável desempenham um papel significativo na qualidade de vida. A crescente consciência da importância de uma dieta saudável leva ao desenvolvimento de alimentos “novos”, seguros e saudáveis. Portanto, os peptídeos ativos derivados de alimentos são aplicados neste sentido, uma vez que possuem propriedades farmacológicas benéficas ao corpo humano para além da nutrição normal e adequada (HARTMANN; MEISEL, 2007).

Muitas funções biológicas no organismo são mediadas por peptídeos, que podem agir como neurotransmissores, hormônios ou antibióticos (HRUBY; BALSE, 2000). Como os peptídeos originados na dieta podem ser estruturalmente semelhantes aos peptídeos endógenos, eles acabam interagindo com os mesmos receptores e desempenham as mais diversas funções como modificadores dos alimentos ingeridos, fator de crescimento, reguladores imunológicos ou antimicrobianos no organismo de quem os consome (KAMAU et al., 2010).

Os peptídeos com atividade biológica podem ser obtidos *in vivo*, durante a digestão gastrointestinal pela ação de enzimas microbianas ou do próprio organismo que os ingere; mas também podem ser obtidos *in vitro*, por meio da maturação dos alimentos, da fermentação, em que reações enzimáticas ocorrem naturalmente; ou pela hidrólise do alimento, como fonte proteica, por enzimas selecionadas. Mas também, a preparação de peptídeos bioativos pode ser por meio da tecnologia de DNA recombinante ou por síntese química (HERNÁNDEZ-LEDESMA; CONTRERAS; RECIO, 2011). Quando originados no organismo do hospedeiro, esses peptídeos podem agir como componentes regulatórios, tais como hormônios, exibindo uma grande variação de atividades biológicas, incluindo anti-hipertensiva, antioxidante, opioide, antimicrobiana e imunoestimulador (HARTMANN; MEISEL, 2007).

Quando a hidrólise proteica é realizada *in vitro*, as principais metodologias empregadas são a hidrólise alcalina, a hidrólise ácida e a hidrólise enzimática ou a combinação de duas ou mais metodologias (ADLER-NISSEN, 1986; LAHL; BRAUN, 1994). No método enzimático, o princípio básico para a obtenção do hidrolisado proteico envolve a quebra hidrolítica das longas cadeias de moléculas proteicas pela adição de enzimas vegetais ou microbianas. A catálise enzimática possui benefícios, como o aumento da qualidade do produto obtido e a redução dos custos de laboratório e de maquinário, o que permite a obtenção de produtos diferenciados na indústria alimentícia (MUSSATTO et al., 2007). Este tipo de hidrólise tem sido aplicado industrialmente para a produção de alimentos com propriedades funcionais aprimoradas (KRISTINSSON; RASCO, 2000).

Quanto à comercialização, os peptídeos bioativos podem ser diversamente apresentados como emulsões, lipossomos, nutracêuticos e complexados com outros biopolímeros comestíveis para ganhar a sua ótima funcionalidade, biodisponibilidade, estabilidade e eficácia da função alvo (PATEL; VELIKOV, 2011; ELZOGHBY et al., 2012). Na verdade, essas estratégias são empregadas a fim de se proteger a funcionalidade biológica dos peptídeos bioativos durante o seu transporte a partir do domínio de enterócitos ou quando em circulação portal sem que haja qualquer prejuízo em sua funcionalidade devido à desnaturação ou à deformação física (GARDNER, 1988).

Durante o processo de digestão, o nutriente ingerido, dentre eles os próprios peptídeos, são hidrolisados por diferentes proteases como: pepsina, tripsina, quimiotripsina e pancreatina; como consequência dessa hidrólise fragmentos ativos podem ser liberados dos

substratos de proteínas degradados. Sendo compostos biologicamente ativos, esses peptídeos começam a interagir com seus agentes transportadores definidos por parâmetros de afinidade, por exemplo o tamanho, a estrutura estereoquímica, o grupo funcional e a carga elétrica. Sob estas interações, os peptídeos são reconhecidos e facilmente mantidos em sua forma intacta na circulação portal pela intervenção de agentes transportadores específicos. Os peptídeos também podem ser transportados para dentro das células por difusão passiva, por endocitose e pelo sistema linfático (SAADI et al., 2015).

Devido as suas características estruturais e os seus resíduos de aminoácidos posicionados nos fragmentos N-terminal e C-terminal, os peptídeos podem apresentar uma resistência natural aos agentes modificadores encontrados no trato gastrointestinal, como ácidos e enzimas (BELL, 1997). Esta resistência é particularmente importante, pois garante ao peptídeo uma biodisponibilidade máxima ao chegar na circulação sanguínea, podendo assim executar suas diversas funções (JIA et al., 2010).

Os peptídeos bioativos que estão recebendo muita atenção entre os pesquisadores, devido aos seus compostos de alto valor nutricional, tornaram-se como substâncias intermediárias em diferentes setores como nas indústrias de laticínios e nutracêuticos, como também em setores de terapêuticos e de vacinação. Atualmente, os peptídeos bioativos de origem alimentar empregados como um ingrediente alternativo natural e como um regulador chave do organismo humano são cada vez mais pesquisados devido a sua capacidade de agir da mesma forma que drogas sintéticas. Portanto, existe a necessidade real de se apresentar uma relação visível entre a estrutura dos peptídeos bioativos e suas funções biológicas (SAADI et al., 2015).

Mellander e colaboradores (1950) foram os primeiros a descrever peptídeos bioativos derivados de alimentos, relatando que a ingestão de peptídeos fosforilados derivados da caseína levou a uma maior absorção da vitamina D em crianças raquíticas. Desde então, os peptídeos com numerosas atividades biológicas foram identificados. Mais de 1500 peptídeos bioativos diferentes foram relatados no banco de dados 'Biopep' (DZIUBA; IWANIAK; MINKIEWICZ, 2003); enquanto que no BioPD (banco de dados de polipeptídeo bioativo) constam mais de 1250.

Embora já tenham sido citadas algumas funções biológicas destas moléculas, agora de uma forma mais detalhada, os peptídeos bioativos, dependendo da sua sequência de aminoácidos, podem influenciar os principais sistemas do corpo (cardiovascular, digestório,

nervoso e imunológico) (SINGH; VIJ; HATI, 2014) por meio das mais diversas funções biológicas: análogos a opioides (SIENKIEWICZ-SZLAPKA et al., 2008), anti-hipertensiva (JIA et al., 2010), antimicrobiana (MCCANN et al., 2006; ARRUDA et al., 2012), quelante de mineral (CROSS et al., 2005), antitrombótica (SHIMIZU et al., 2008), anti-inflamatória (HARTMANN; MEISEL, 2007), imunomodulador (GAUTHIER; POULIOT; SAINT-SAUVEUR, 2006), hipocolesterolêmica (ZHONG et al., 2007) e antioxidantes (MENDIS et al., 2005), e ainda alguns fragmentos peptídicos podem exibir mais de uma atividade biológica. O tamanho da sequência do peptídeo pode variar de resíduos de dois a vinte resíduos de aminoácidos, sendo alguns peptídeos especificamente maiores, por exemplo, o peptídeo denominado por Lunasin que contém 43 aminoácidos (MEISEL; FITZGERALD, 2003).

Na última década, foi reconhecido que a proteína dietética é uma boa fonte de peptídeos bioativos com um espectro amplo de atividades biológicas (HARTMANN; MEISEL, 2007). Os precursores dos peptídeos bioativos podem ser classificados de acordo com sua origem: animal (havendo ainda dentro deste uma separação para os marinhos) e vegetal. São fontes de peptídeos bioativos de origem animal: leite, ovos e carne; de fonte marinha: peixe (destacando-se o salmão), ostras e cavalo marinho; e de origem vegetal: arroz, trigo, soja, cevada e milho (SINGH; VIJ; HATI, 2014); todas estas já foram investigadas em associação com suas propriedades farmacológicas (UDENIGWE; ALUKO, 2012).

Das fontes proteicas mencionadas, muitos trabalhos têm reportado a clara de ovo, das mais diversas espécies de ave, como fonte de peptídeos bioativos ou de hidrolisados proteicos com função antioxidante (LIN et al., 2013; REN et al., 2014 e LIU et al., 2015), anti-hipertensiva (MAJUMDER et al., 2010; RAO et al., 2012 e POKORA et al., 2014), anti-inflamatória e regulatória do metabolismo de lipídeos (GARCÉS-RIMÓN et al., 2016), antimicrobiana (MEMARPOOR-YAZDI; ASODEH; CHAMANI; 2012), inibitória da α -glicosidase (YU et al., 2011).

2.4.1 Peptídeos com Atividade Antioxidante

Os mais diversos organismos estão vulneráveis ao estresse oxidativo devido a exposição constante a vários agentes oxidantes, como poluentes atmosféricos, luz ultravioleta, radiações ionizantes, íons de metais pesados e de H_2O_2 , dentre outros (BIRBEN et al., 2012). No entanto, as espécies reativas de oxigênio e os radicais livres (ânion superóxido $O_2^{\bullet-}$,

radicais hidroxila •HO), são mediadores do estresse oxidativo e estão fortemente relacionadas com doenças crônicas, como câncer (VALKO et al., 2006), doenças inflamatórias (THOMSON; HEMPHILL; JEEJEEBHOY, 1998) e a doença de Alzheimer (BUTTERFIELD et al., 2001; NGO et al., 2010).

O estresse oxidativo ocorre quando há um desequilíbrio entre as espécies reativas de oxigênio e os antioxidantes; situação que pode ser devido ao acúmulo das espécies reativas de oxigênio ou pela depleção dos antioxidantes. Como consequência deste desequilíbrio, quatro principais eventos ocorrem: (1) a peroxidação lipídica e rearranjo da bicamada lipídica da membrana celular, (2) modificações na cadeia peptídica (fragmentação da cadeia de peptídeo, a alternância de carga elétrica de proteínas, ligação cruzada entre proteínas e oxidação de aminoácidos específicos), (3) modificações do DNA - degradação de bases, deleções, mutações ou translocações, e quebra da cadeia de DNA, e (4) a ativação de vários fatores de transcrição NF- κ B (fator nuclear kappa B) e AP-1 (proteína ativadora 1), que são regulados por alterações do estado redox da célula e que estão envolvidos na resposta inflamatória.

O sistema antioxidante integrado das células contribui para contrabalancear os efeitos prejudiciais das espécies reativas de oxigênio e sua contribuição se dá por antioxidantes enzimáticos (catalase, glutathione peroxidase, glutathione S-transferase) que são responsáveis pela inibição do H₂O₂ e/ou dos hidroperóxidos lipídicos, e não enzimáticas (peptídeos, compostos fenólicos e outros) (SHI et al., 2014).

Antioxidantes são, portanto, substâncias que atuam sob essas espécies reativas, impedindo a ação destas, e são definidos como compostos que quando presentes em baixas concentrações em relação ao substrato oxidável são capazes de inibir ou retardar a sua oxidação (CORRÊA, 2013).

O interesse em encontrar substâncias antioxidantes vem aumentando ao longo dos anos, principalmente aqueles de origem alimentar, pois estes podem proteger o corpo humano contra o estresse oxidativo causado pelos radicais livres e, assim, atrasar o surgimento ou progressão de muitas doenças crônicas, bem como impedir a oxidação lipídica em alimentos ajudando em sua preservação (KADRI et al., 2011).

Como exemplo podemos citar alguns antioxidantes naturais, incluindo o ácido rosmarínico, catequina, tocoferóis, ácido ascórbico, entre vários extratos fenólicos de origem vegetal, que são muito utilizados em alimentos processados. Contudo, a busca por antioxidantes naturais tem se estendido além dessas fontes já utilizadas e vários estudos tem

mostrados que peptídeos e hidrolisados de proteínas de origem vegetal e animal podem possuir atividade antioxidante significativa (XUE et al., 2009).

Muitos peptídeos, que contêm tirosina, metionina, histidina, lisina ou triptofano, são geralmente aceitos como antioxidantes. Esta atividade vinculada a peptídeos bioativos pode ser atribuída ao seu potencial sequestrador de radicais, à inibição da peroxidação dos lipídios e de íons metálicos pela quelação desses últimos (SINGH; VIJ; HATI, 2014) e está intimamente relacionada com os aminoácidos constituintes, a estrutura da cadeia e posicionamento correto desses aminoácidos (SARMADIA; ISMAILA, 2010).

A inibição da oxidação lipídica pelos peptídeos antioxidantes pode ser realizada por múltiplas vias incluindo a inativação das espécies reativas de oxigênio, a eliminação de radicais livres, quelação de metais de transição pro-oxidativos, redução de hidroperóxidos e pela aumento da capacidade antioxidante endógena de alimentos (ELIAS; KELLERBY; DECKER, 2008).

Os métodos empregados para se avaliar os efeitos antioxidantes desses peptídeos, incluem ensaios de eliminação de superóxido, peróxido de hidrogênio, hidroxila, oxigênio livre de peroxinitrito; podendo-se destacar os de eliminação do 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH), o ácido 3-etilbenzotiazolína-6-sulfônico (ABTS) e da capacidade de absorção do radical oxigênio (ORAC) (MCDONALD-WICKS; MADEIRA; GARG, 2006).

Peptídeos com atividade antioxidante podem ser obtidos pela hidrólise proteica e são afetados diretamente pelo tipo de hidrólise pela qual a proteína precursora passou. Esta hidrólise pode ser realizada das seguintes formas: (a) hidrólise enzimática por enzimas digestivas; (b) fermentação de leite, ou outras bebidas como o molho de soja, com culturas proteolíticas iniciadoras e; (c) proteólise por meio de enzimas produzidas por micro-organismos ou plantas (KORHONEN, 2009a).

Quanto à proteína precursora, muitos estudos têm demonstrado peptídeos de origem animal e vegetal com ação antioxidante; como peptídeos derivados das proteínas do ovo, proteínas de soro e da caseína do leite, proteínas de soja (PENG; XIONG; KONG, de 2009; TANZADEHPANAH; ASOODEH; CHAMANI, 2012; JI et al., 2014; CASTRO; SATO, 2015; LIU et al., 2015). De forma mais específica, as proteínas presentes no ovo são componentes importantes no desenvolvimento de alimentos funcionais e nutracêuticos e muitos estudos relataram que hidrolisados proteicos ou peptídeos derivados do ovo podem exercer atividades biológicas diferentes, incluindo a atividade antioxidante (LIU et al., 2015).

2.4.2 Peptídeos com Atividade Anti-hipertensiva

A hipertensão é reconhecida como um fator de risco grave, ainda que controlável, para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares (COLLINS; MACMAHON, 1994), incluindo arteriosclerose, acidente vascular cerebral e infarto do miocárdio (SHEIH; FANG; WU, 2009); ela afeta de 20 a 45% da população ativa e de 50 a 60% da população idosa (GOKCE, 2004).

A enzima conversora de angiotensina (ECA) é um dos principais reguladores da pressão arterial por meio de duas diferentes reações no sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA). A inibição da ECA, portanto, resulta numa diminuição da pressão arterial, uma vez que a ECA atua como um catalisador para a conversão da angiotensina I em angiotensina II, um potente vasoconstritor. A ECA também atua como um catalisador na inativação da bradicinina, um vasodilatador que regula a liberação do óxido nítrico endotelial vascular (ON). Por sua vez, o ON promove o relaxamento vascular e angiogênese tendo um papel importante na regulação da pressão arterial (GOKCE, 2004; FLEMING, 2007).

Muitos inibidores de ECA sintéticos (captopril, enalapril, lisinopril e ramipril) são utilizados no tratamento da hipertensão, no entanto apresentam efeitos colaterais: tosse seca, perda do paladar, hipercalemia, erupções cutâneas, distúrbios hematológicos (ANTONIOS; MACGREGOR, 1995; TENENBAUM et al., 2000) e angioedema (AGOSTONI; CICARDI, 2001), fazendo com que haja uma redução da adesão ao tratamento medicamentoso prescrito, para alguns pacientes (BREMNER, 2003).

Devido a estes efeitos adversos, existe grande interesse em identificar e extrair inibidores de ECA, a partir de fontes naturais de alimentos que podem ser empregados como substitutos de compostos sintéticos. Neste contexto, alguns alimentos podem liberar peptídeos com atividades biológicas durante o processamento ou durante a digestão enzimática (SHAHIDI; ZHONG, 2008). A utilização desses peptídeos estaria associada a uma menor incidência de efeitos secundários negativos; além de que, os peptídeos naturais possuem as vantagens de serem específicos (o que limita os efeitos secundários negativos), potentes (possuem alta eficiência terapêutica) e de possuírem baixa toxicidade (THAYER, 2011).

Peptídeos anti-hipertensivos são os peptídeos bioativos mais estudados em alimentos; eles exibem a sua atividade pela inibição da ECA; sendo essa atividade inibitória comprovada pela diminuição da pressão arterial em ratos espontaneamente hipertensos: valil-prolil-prolina

(Val-Pro-Pro), isoleucil-prolil-prolina (Ile-Pro-Pro) e tirosina-prolina (Tir-Pro) (SEPPO, et al., 2003).

Teoricamente, esses peptídeos podem ser liberados a partir de proteínas da dieta pela digestão no intestino; no entanto a quantidade de peptídeos assim gerados não é suficiente para induzir quaisquer efeitos significativos. Em contraste, a hidrólise enzimática de proteínas dietéticas oferece um método rápido e reprodutível para a produção de frações de peptídeos bioativos suficientes (HARTMANN; MEISEL, 2007).

Muitas fontes proteicas alimentares têm sido empregadas e estudadas quanto à produção de peptídeos inibidores da ECA, como de arraia (*Raja kenoei*), de peles de animais (bovinos, peixes, rãs, dentre outros) (LEE; JEON; BYUN, 2011), de peixes como a Pescada do pacífico (SAMARANAYAKA; KITTS; LI-CHAN, 2010), proteínas de arroz (CHEN et al., 2013); de feijão (RUI et al., 2013) e proteínas do ovo de diversas espécies (MAJUMDER; WU, 2010; LIU et al., 2010; RAO et al., 2012; POKORA et al., 2014 e MAJUMDER et al., 2015).

2.4.3. Peptídeos com Atividade Antibacteriana e Antiviral

Ao longo dos anos o surgimento de bactérias resistentes a antibióticos tem ameaçado a saúde humana e é consequência da mutação de um ou mais genes que estão associados com desintoxicação de uma ou mais substâncias nocivas à bactéria. Consequentemente, as bactérias mutantes tornam-se resistentes a agentes quimioterápicos convencionais e sua sobrevivência é física e geneticamente aprimorada (SILA et al., 2014). Um exemplo clássico de resistência bacteriana é a cepa *Staphylococcus aureus* MRSA, do inglês *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus*. A meticiclina foi introduzida na intenção de combater cepas de *S. aureus* que apresentaram resistência à penicilina. Após dois anos de sua utilização, o *S. aureus* já se mostrou resistente também a esta droga, tornando-se o principal agente infeccioso envolvido em infecções hospitalares (ENRIGHT et al., 2002).

Outro fator que contribuiu para a falta de opções terapêuticas de combate a estes micro-organismos foi o surgimento de bactérias produtoras de carbapenemases (HIRSCH; TAM, 2010). Essas enzimas são capazes de hidrolisar antibióticos carbapenêmicos, tornando as bactérias que as produzem resistentes a essa classe de antibióticos. As carbapenemases são predominantemente encontradas em *Klebsiella pneumoniae*, contudo pode ser produzida por várias enterobactérias, incluindo *Enterobacter* sp., *Escherichia coli*, *Salmonella enterica*,

dentre outras, além de bactérias Gram-negativas como *Pseudomonas aeruginosa* (QUEENAN; BUSH, 2007).

A resistência antimicrobiana foi estabelecida devido ao mau uso de antibióticos nas últimas décadas e resultou no surgimento de cepas resistentes a diversas drogas, as cepas multirresistentes (HEYMANN, 2006; PARK et al., 2011). Este problema tem criado uma necessidade urgente de desenvolver novas classes de agentes antimicrobianos com mecanismos de ação diferentes dos antibióticos convencionalmente empregados (PARK et al., 2011; PAPHITOU, 2013). Por esta razão, peptídeos que desempenham atividade antimicrobiana são cada vez mais estudados para este fim. Existem propriedades intrínsecas e únicas dos peptídeos bioativos que os tornam agentes terapêuticos atraentes para esta aplicação, como o fato de mostrarem alta atividade biológica associada à baixa toxicidade e alta especificidade; aliados à rara indução à resistência microbiana e à capacidade de sinergia com antibióticos (PALUMBO et al., 2010; SILA et al., 2014).

Peptídeos antimicrobianos (PAMs), portanto, constituem a primeira linha de defesa contra micro-organismos invasores; formando um mecanismo de defesa antigo contra micro-organismos patogênicos que entram facilmente em contato com o hospedeiro através do ambiente (SUGIARTO; YU, 2004). São moléculas relativamente pequenas, com menos de 100 aminoácidos de comprimento, e que possuem um amplo espectro de atividade antimicrobiana e são considerados um componente fundamental do sistema imune inato (RADEK; GALLO, 2007) e podem ser classificados de acordo com seu desdobramento estrutural como α -hélice, folha- β , estendido e alça; e caracterizados de acordo com suas propriedades físico-químicas tais como carga, hidrofobicidade, sequência de aminoácidos e anfipaticidade (PETERS et al., 2010).

Geralmente, os PAMs são moléculas catiônicas que interagem com os fosfolípidios aniônicos da membrana microbiana, conferindo seletividade aos mesmos (PALUMBO et al., 2010); adotando uma estrutura anfipática, em que suas subunidades hidrofóbicas são organizadas lado a lado. Então, quando catiônicos e hidrofóbicos, os PAMs têm maior facilidade em interagir e se inserir em paredes celulares aniônicas ou nas membranas fosfolípídicas dos micro-organismos (BROWN; HANCOCK, 2006).

Alguns estudos levantam a hipótese de que os PAMs agem por diferentes mecanismos, dentre os quais, o modo de ação na membrana plasmática tem sido intensivamente investigado (CHEN; MARK, 2011; TEIXEIRA; FEIO; BASTOS, 2012). Embora este

mecanismo não esteja totalmente elucidado, acredita-se que o processo de ligação à membrana seja a etapa inicial da ação antimicrobiana exercida pelos PAMs (PAPO; SHAI, 2003).

Acredita-se que mais de 1600 peptídeos antimicrobianos catiônicos têm sido purificados a partir de uma vasta gama de organismos ou de síntese química baseada na sequência de peptídeos purificados (WANG; WANG, 2004). No entanto, os PAMs também podem ser derivados da hidrólise de proteínas dietéticas e igualmente possuem propriedades biológicas específicas, o que os tornam potenciais ingredientes funcionais ou alimentos promotores de saúde. Neste contexto, os PAMs não são obtidos por síntese de um organismo, mas sim pela degradação proteolítica de algumas proteínas; que pode ocorrer dentro ou fora do organismo (SILA et al., 2014).

A maioria dos PAMs produzidos pela hidrólise enzimática de proteínas foi isolada a partir de proteínas do leite (PELLEGRINI, 2003). Porém, vários estudos relataram a obtenção de peptídeos antibacterianos por hidrólise enzimática de hemoglobina (CATIAU et al., 2011; YABA ADJE et al., 2011), de organismos marinhos (DOYEN et al., 2012; BEAULIEUA et al., 2013) e da clara de ovo (BHAT et al., 2015).

Esses PAMs podem ser encontrados nos mais diversos organismos, como linha primária de defesa (imunidade inata) e possuem atividade antimicrobiana de amplo espectro utilizada para defender-se de uma gama de micro-organismos, que além das bactérias podem ser citados os fungos, vírus e protozoários (BATISTA et al, 1999).

Como exemplo, podem ser citados os peptídeos obtidos em secreções de pele de rã que têm demonstrado potente atividade antiviral, quer por inativação direta das partículas de vírus, quer por interferência do ciclo de reprodução viral. Estas propriedades, combinadas com o curto tempo de contato necessário para induzir a morte, incentivaram o desenvolvimento de novos agentes antivirais. Ainda mais porque, o mesmo problema causado pela resistência a múltiplos fármacos no tratamento de infecções bacterianas também é encontrado na quimioterapia viral (LORD; ASHWORTH, 2013). Devido ao seu mecanismo de ação não específico e destrutivo, os peptídeos que penetram nas células mostram potencial terapêutico contra a infecção viral não encontrada na terapia convencional (CONLON et al., 2014).

Tem sido relatada atividade antiviral de peptídeos humanos, insetos e vegetais, contra diversos vírus: herpes vírus tipo 1 e 2, vírus da imunodeficiência humana tipo 1, vírus da

estomatite vesicular, influenzavírus e citomegalovírus (MATANIC; CASTILLA, 2004). No entanto, trabalhos que demonstram atividade de peptídeos ou hidrolisados proteicos contra vírus obtidos por ação enzimática são escassos, demonstrando a necessidade de estudos que busquem peptídeos de diferentes fontes (mais baratas) para serem aplicados na terapia antiviral.

2.4.4 Peptídeos com Atividade Antidiabética

Diabetes é uma condição patológica que ocorre quando o pâncreas não produz insulina suficiente ou quando o organismo não consegue utilizar efetivamente a insulina que produz. A insulina é um importante hormônio anabólico que regula o metabolismo de carboidratos e gorduras. A captação de glicose pelos órgãos como os músculos e tecido adiposo é devido à ação da insulina, que quando ausente ou não atuante causa a hiperglicemia (REKHA; SHARMA, 2013).

De forma geral, existem duas formas básicas de diabetes, a tipo 1 e tipo 2. Na diabetes tipo 1 há muito pouca ou nenhuma produção de insulina; já no tipo 2 haverá produção de insulina, no entanto as células não conseguem utilizar a insulina eficazmente. A maioria da população diabética tem diabetes tipo 2. Porém, um terceiro tipo de diabetes pode ser citado, o diabetes mellitus gestacional (GDM), que pode se desenvolver durante a gravidez, mas geralmente desaparece após a mesma (WILD et al., 2004; REKHA; SHARMA, 2013).

A prevalência de diabetes mellitus aumentou consideravelmente em todo o mundo (GORELICK et al., 2011). Ainda sendo esperado que esta doença afete 438 milhões de pessoas em 2030, com 70% dos casos ocorrendo na população de baixa-média renda em países em desenvolvimento. É uma doença que se desenvolve com um aumento da obesidade e com o envelhecimento na população em geral e que na ausência de tratamento adequado e em tempo oportuno, a diabetes mellitus pode causar complicações cardiovasculares, sendo a principal causa de morbidade e mortalidade da doença (YU et al., 2011a e 2011b).

Durante o desenvolvimento da diabetes tipo 2, a capacidade da insulina para estimular a captação celular de glicose do sangue é comprometida (ORME; BOGAN, 2009). Sendo a terapia desejada aquela capaz de regular a concentração de glicose no sangue a nível ideal pós-prandial. Assim, os inibidores das enzimas α -amilase (que hidrolisa carboidratos de cadeia longa) e da α -glicosidase (que hidrolisa a glicose), são eficazes no atraso da absorção de glicose pela inibição da hidrólise dos carboidratos que liberariam glicose no sangue (YU et

al., 2012) evitando, assim, grandes picos nos níveis de glicose no sangue após uma refeição, minimizando os períodos de hiperglicemia para o paciente (CHIN 2015 et al., 2015).

Existem inibidores de α -glicosidase de origem microbiana já estabelecidos como acarbose e voglibose, e de origem vegetal como nojirimicina e 1-desoxinojirimicina (KIM et al., 2004). Esses inibidores podem ser categorizados em três tipos: compostos heterocíclicos N-substituídos polihidroxilados, cicloalcanos polihidroxilados e oligômeros de pseudoaçúcares (CHIN et al., 2015). No entanto, muitos pesquisadores têm se concentrado na busca de compostos antidiabéticos a partir de materiais naturais (LIU et al., 2011), tais como polissacarídeos contidos em folhas utilizadas em chá (XIAO et al., 2011), hidrolisado de músculo de peixes, como a sardinha (MATSUI et al., 1996) e isoflavonas de soja (NIAMNUY et al., 2011).

Com a introdução recente da ByettaTM, VictozaTM, Lyxumia[®] e BydureonTM, a classe de fármacos baseada em GLP-1 (peptídeo semelhante ao glicagon 1) emergiu como terapêutica importante para o tratamento de diabéticos e o desenvolvimento de drogas peptídicas derivadas de somatostatina, calcitonina, hormônio paratireóide (PTH), vasopressina e peptídeo semelhante ao glucagon 2 (GLP-2) tornou-se importante opção no tratamento para as indicações metabólicas. Estes agentes antidiabéticos ilustram a diferenciação de produtos com base nas diferenças de eficácia, tolerabilidade, frequência da administração e apresentação (LEVY et al., 2014). No entanto, é importante explorar os componentes alimentares, tais como hidrolisados de proteínas que possuem atividade inibidora dessas enzimas como alternativas potenciais de nutracêuticos (URAIPOONG; ZHAO, 2015).

Alguns medicamentos populares e alimentos funcionais naturais, como folhas de goiaba (WANG; DU; SONG, 2010), sorgo (KIM; HYUN; KIM, 2011), soja fermentada (CHEN et al., 2007) e *Kaempferia parviflora* (AZUMA et al., 2011), têm sido apontados quanto à sua atividade antidiabética na supressão da produção de glicose e/ou sua absorção no intestino. Porém, hidrolisados de proteínas têm atraído atenções (YU et al., 2011).

Peptídeos ou hidrolisados proteicos de origem alimentar têm sido analisados quanto à ação inibitória das α -amilase e α -glicosidase, como os hidrolisados de proteína de farelo de arroz (URAIPOONG; ZHAO, 2015) peptídeos originados do músculo de sardinha (MATSUI et al., 1996) e peptídeos da clara de ovo (YU et al., 2012).

2.5 Clara de Ovo De galinha de capoeira e Obtenção de Peptídeos Bioativos

Entende-se por ovo, sem outra especificação, o ovo de galinha em casca (BRASIL, 1990). Sendo considerado um alimento natural, equilibrado e de baixo custo, que contém grande teor de proteína de alta qualidade biológica, gorduras, vitaminas e minerais (OLIVEIRA, 1999).

Por esta razão, o ovo é um dos alimentos mais completos da dieta humana (RÊGO et al., 2012), representando um ingrediente essencial em muitos produtos alimentares, com alta importância na culinária brasileira, ao combinar propriedades nutricionais e funcionais. Ademais, os ovos representam um produto nutritivo de fácil acesso para população, devido seu baixo custo; sendo importantes constituintes da alimentação, ao contribuir com o enriquecimento nutricional da dieta de pessoas de baixa renda (LOT et al., 2005; PASCOAL et al., 2008).

Quanto à constituição, o ovo pode ser dividido em quatro partes principais: casca, membrana da casca, gema e clara ou albúmen; e cinco partes em menor proporção: o disco germinativo, a calaza, a câmara de ar, a cutícula e as membranas da casca. De todos os constituintes do ovo, a clara corresponde a dois terços do volume do ovo sem casca (SARCINELLI; VENTURINI; SILVA, 2007), e é composta principalmente por água (88,5%) e proteínas (13,5%), além de vitaminas do complexo B (riboflavina – B2) e traços de gorduras (FAO, 2010). As principais proteínas presentes na clara são a ovoalbumina, conalbumina, ovomucóide, ovomucina e lisozima. Dentre estas proteínas a ovoalbumina e a conalbumina representam a maior parte, 70%, do total de proteínas que são encontradas na clara e são responsáveis pela gelatinização do albúmen (RAMOS, 2008).

A proteína do ovo pode ser considerada padrão quando se compara às outras fontes protéicas com 93,7% em valor biológico e são consideradas de alto valor biológico porque contêm os nove aminoácidos essenciais da dieta humana: lisina, metionina, triptofano, valina, histidina, fenilalanina, leucina, isoleucina e treonina. Esses aminoácidos estão distribuídos em todos os componentes do ovo, sendo a maioria, encontrados na clara (USDA, 2012).

Porém, a composição do ovo pode variar a depender de fatores como espécie, idade, tamanho, nutrição, genética, manejo e estado sanitário das aves (AUSTIC; NESHEIM, 1990); por exemplo, sabe-se que os ovos de galinhas criadas soltas (caipiras ou de capoeira) possuem cerca de quatro vezes mais vitamina A que os ovos de granja. Além dessa vantagem, determinada pela presença de maiores teores de carotenóides totais e retinol, o ovo de galinha

criada em sistema orgânico, não contém resíduos de antibióticos uma vez que essas aves não recebem rações comerciais. Já as galinhas de granja, de criação convencional, tanto as criadas em galpões como em gaiolas, em sua maioria, são alimentadas com rações comerciais que apresentam antimicrobianos e aditivos químicos (SARCINELLI; VENTURINI; SILVA, 2007). Por esta razão, os ovos de galinha de capoeira e orgânicos podem ser considerados mais benéficos para a saúde.

O uso de drogas antimicrobianas em animais de produção tornou-se um importante problema de saúde pública. O aumento do uso de tais compostos tem causado muitos efeitos nocivos sobre o consumidor como estimulação da resistência microbiana (CERNIGLIA; KOTARSKI, 2005), reações de hipersensibilidade e alteração da microflora intestinal (ANTUNES et al., 2005). Alguns estudos têm relatado a estabilidade dos resíduos de fármacos após o processamento alimentar de ovos, como a cozedura (OKERMAN et al., 2007).

No entanto, a cocção do ovo pode causar a perda de algumas funções de seus compostos, afetando principalmente a ação de vitaminas (SEIBEL, 2005). Além disso, algumas proteínas do ovo, especificamente da clara de ovo, ao serem desnaturadas pela ação térmica perdem algumas atividades biológicas que a possuem, como antimicrobiana, imunomoduladoras, anticancerígenas, anti-hipertensivas e antioxidantes (KOVACS-NOLAN; PHILLIPS; MINE, 2005); e sua ingestão *in natura* não é indicada, uma vez que algumas dessas características são consideradas antinutricionais (SEIBEL, 2005).

Assim, uma extensa pesquisa tem sido conduzida a fim de se identificar e caracterizar novos componentes biologicamente ativos e melhorar o valor agregado dos ovos como fonte rotineira e barata de compostos biologicamente ativos (YU et al., 2011b). Desta forma, a hidrólise enzimática das proteínas da clara de ovo para a liberação de peptídeos com atividades biológicas seria uma forma de se aproveitar todo o valor nutricional e funcional da clara de ovo. Muitos trabalhos têm mostrado peptídeos derivados da clara de ovo com atividades biológicas: inibidora da enzima de conversão da angiotensina (ECA) (FUJITA, et al., 1995), antioxidante (DAVALOS et al., 2004), quelantes de minerais (SAMARAWEERA et al., 2011), anti-inflamatória (HUANG et al., 2010), antimicrobiana (GONG et al., 2009), anticoagulante (YU et al., 2011a, 2011b), anticancerígena (YI et al., 2003) e antidiabética (YU et al., 2011a, 2011b).

3. OBJETIVOS

a. Objetivo geral

Avaliar *in vitro* o potencial de atividades biológicas dos hidrolisados obtidos a partir da hidrólise das proteínas da clara de ovos de galinha de capoeira pela ação de proteases produzidas por *Aspergillus avenaceus* URM 6706.

b. Objetivos específicos

- Avaliar a influência de variáveis na produção de proteases por *Aspergillus avenaceus* URM 6706;
- Otimizar a produção de protease por meio de planejamento estatístico;
- Caracterizar a protease produzida por *Aspergillus avenaceus* URM 6706 quanto ao pH e temperatura ótimos, estabilidade ao pH e à temperatura e a ação de inibidores;
- Purificar a protease produzida por *Aspergillus avenaceus* URM 6706;
- Hidrolisar as proteínas contidas na clara de ovos de galinha de capoeiras para a produção de peptídeos bioativos;
- Avaliar *in vitro* as atividades antiestafilocócica, antioxidante, inibidora da enzima conversora de angiotensina (ECA), antidiabética e antiviral dos hidrolisados proteicos da clara de ovo de galinha de capoeira.

4. REFERÊNCIAS

- ABIDI, F.; CHOBERT, J.; HAERTLÉ, T.; MARZOUKIA, M. N. Purification and biochemical characterization of stable alkaline protease Prot-2 from *Botrytis cinerea*. **Process Biochem**, v. 46, p. 2301-2310, 2011.
- ABRAHAM, J.; GEA, T.; SÁNCHEZ, A. Substitution of chemical dehairing by proteases from solid-state fermentation of hair wastes. **Journal of Cleaner Production**, v. 74, p. 191–198, 2014.
- ADLER-NISSEN, J. Enzymatic hydrolysis of food proteins. **Elsevier Applied Science. Baking: Elsevier Applied Science**, p. 427, 1986.
- AGOSTONI, A.; CICARDI, M. Drug-induced angioedema without urticaria. **Drug Safety**, v. 24, p. 599 - 606, 2001.
- ALEKSIEVA, P.; PEEVA, L. Investigation of acid proteinase biosynthesis by the fungus *Humicola lutea* 120-5 in an airlift bioreactor. **Enzyme Microbiology and Technology**, v. 26, p. 402–405, 2000.
- ANDRADE, V. S.; SARUBBO, L. A.; FUKUSHIMA, K.; MIYAJI, M.; NISHIMURA, K.; CAMPOS-TAKAKI, G. M. Production of extracellular proteases by *Mucor circinelloides* using D-glucose as carbon source / substrate. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 33, p. 106-110, 2002.
- ANITHA, T. S.; PALANIVELU, P. Purification and characterization of an extracellular keratinolytic protease from a new isolate of *Aspergillus parasiticus*, **Protein Expression and Purification**, v. 88, p. 214–220, 2013.
- ANTONIOS, T. F.T.; MACGREGOR, G. A. Angiotensin converting enzyme inhibitors in hypertension: potential problems. **Journal of Hypertension**, v. 13, p. 11–16, 1995.
- ANTUNES, P.; MACHADO, J.; SOUSA, J. C.; PEIXE, L. Dissemination of sulphonamides residues genes (sul1, sul2, and sul3) in Portuguese Salmonella enterica strains and relation with integrons. **Journal of Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, p. 836 - 839, 2005.
- ARRUDA, M. S.; SILVA, F. O.; EGITO, A. S.; SILVA, T. M. S.; LIMA-FILHO, J. L.; PORTO, A. L. F.; MOREIRA, K. A. New peptides obtained by hydrolysis of caseins from bovine milk by protease extracted from the latex *Jacaratia corumbensis*. **LWT - Food Science and Technology**, v. 49, p. 73-79, 2012.
- AUSTIC, R. E., NESHEIM, M. C. **Poultry production**. 13 ed. Philadelphia, Estados Unidos: Lea & Febiger, 1990. 325p.

AWATI, A.; RUTHERFURD, S. M.; PLUGGE, W.; REYNOLDS, G. W.; MARRANT, H.; KIES, A. K.; MOUGHAN, P. J. Ussing chamber results for amino acid absorption of protein hydrolysates in porcine jejunum must be corrected for endogenous protein. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 89, p. 1857–1861, 2009.

AZUMA, T.; KAYANO, S.; MATSUMURA, Y.; KONISHI, Y.; TANAKA, Y.; KIKUZAKI, H. Antimutagenic and alpha-glucosidase inhibitory effects of constituents from *Kaempferia parviflora*. **Food Chemistry**, v. 125, p. 471–475, 2011.

BARATA, R. A.; ANDRADE, M. H. G.; RODRIGUES, R. D.; CASTRO, I. M. Purification and characterization of an extracellular trypsin-like protease of *Fusarium oxysporum* var. lini. **Journal of Bioscience and Bioengineer**, v. 94, n. 4, p. 304-308, 2002.

BARRETT, A. J.; RAWLINGS, N. D.; WOESSNER, J. F. **Handbook of proteolytic enzymes**. Academic, London, 2004.

BATISTA, C.; ROSENDO DA SILVA, L.; SEBEN, A.; SCALONI, A.; FERRARA, L.;

PAIVA, G.; OLAMENDI-PORTUGAL, T.; POSSANI, L.; BLOCH, C. Antimicrobial peptides from the Brazilian frog - *Phyllomedusa distincta* sup. **Peptides**, v. 20, p. 679-686, 1999.

BEAULIEUA, L.; THIBODEAUA, J.; BONNET, C.; BRYL, P.; CARBONNEAUC, M. E. Detection of antibacterial activity in an enzymatic hydrolysate fraction obtained from processing of Atlantic rock crab (*Cancer irroratus*) by-products. **PharmaNutrition**, v. 1, p. 149–157, 2013.

BELMESSIKH, A.; BOUKHALFA, H.; MECHAKRA-MAZA, A.; GHERIBI-AOULMI, Z.; AMRANE, A. Statistical optimization of culture medium for neutral protease production by *Aspergillus oryzae*. Comparative study between solid and submerged fermentations on tomato pomace. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v. 44, p. 377–385, 2013.

BELL, L. N. Peptide stability in solids and solutions. **Biotechnology Progress**, v. 13, p. 342–346, 1997.

BENNETT, J. W. An overview of the genus *Aspergillus*. In: **Aspergillus: Molecular Biology and Genomics**. (Machida M, Gomi K, eds) Caizer Academic Press, Portland: 1–17, 2010.

BHAT, Z. F.; KUMAR, S. K.; BHAT, H. F. Bioactive peptides of animal origin: a review. **Journal of Food Science Technology**, v. 52, p. 5377–5392, 2015.

BIRBEN, E.; SAHINER, U. M.; SACKESSEN, C.; ERZURUM, S.; KALAYCI, O. Oxidative stress and antioxidant defense. **World Allergy Organization Journal**, v. 5, p. 9–19, 2012.

BOLSCHER, J. G. M.; VAN DER KRAAN, M. I. A.; NAZMI, K.; KALAY, H.; GRÜN, C. H.; VAN'T HOF, W.; VEERMAN, E. C.; NIEUW AMERONGEN, A. V. A one-enzyme

strategy to release an antimicrobial peptide from the LFampin-domain of bovine lactoferrin. **Peptides**, v. 27, p.1-9, 2006.

BOMMARIUS, A. S.; RIEBEL, B. R., **Biocatalysis - Fundamentals and Applications**; WILEY-VHC, Weinhein, 2004.

BOYCE, A.; WALSH, G. Identification of fungal proteases potentially suitable for environmentally friendly cleaning-in-place in the dairy industry. **Chemosphere**, v. 88, n. 2, p. 211-8, 2012.

BRANDELLI, A.; DAROIT, D. J.; RIFFEL, A. Biochemical features of microbial keratinases and their production and applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 85, p.1735-1750, 2010.

BRASIL, Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Secretaria de inspeção de produto de origem animal. Portaria nº 01 de 21 de fevereiro de 1990. Normas Gerais de Inspeção de Ovos e Derivados. Diário Oficial da República Federativa do Brasil. Brasília, 1990. Disponível em: <http://sistemasweb.agricultura.gov.br/sislegis>. Acesso em: 10 de janeiro de 2012.

BREMMER, A. D. Antihypertensive medication and quality of life-silente treatment of a silent killer? **Cardiovascular Drugs and Therapy**, v. 16, p. 353–64, 2003.

BROWN, K. L.; HANCOCK, R. E. Cationic host defense (antimicrobial) peptides. **Current Opinion in Immunology**, v. 18, p. 24-36, 2006.

BUTTERFIELD, D. A.; DRAKE, J.; POCERNICH, C.; CASTEGNA, A. Evidence of oxidative damage in Alzheimer's disease brain: Central role for amyloid β -peptide. **Trends in Molecular Medicine**, v. 7, p. 548–554, 2001.

CASTRO, R. J. S.; OHARA, A.; NISHIDE, T. G.; BAGAGLI, M. P.; DIAS, F. F. G.; SATO, H. H. A versatile system based on substrate formulation using agroindustrial wastes for protease production by *Aspergillus niger* under solid state fermentation. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 4, p.678–684, 2015.

CASTRO, R. J. S; SATO, H. H. A response surface approach on optimization of hydrolysis parameters for the production of egg White protein hydrolysates with antioxidante activities. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 4, p. 55–62, 2015.

CATIAU, L.; TRAISNEL, J.; DELVAL-DUBOIS, V.; CHIHIB, N. E.; GUILLOCHON, D.; NEDJAR-ARROUME, N. Minimal antimicrobial peptidic sequence from hemoglobin alphachain: KYR. **Peptides**, v. 32, p. 633–638, 2011.

CERNIGLIA, C. E.; KOTARSKI, S. Approaches in the safety evaluations of veterinary antimicrobial agents in the food to determine the effects on human intestinal micro flora. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, v. 28, p. 3-20, 2005.

- CHEN, J.; CHENG, Y. Q.; YAMAKI, K.; LI, L. T. Anti-alpha-glucosidase activity of Chinese traditionally fermented soybean (douchi). **Food Chemistry**, v. 103, p. 1091–1096, 2007.
- CHEN, R.; MARK, A. E. The effect of membrane curvature on the conformation of antimicrobial peptides: implications for binding and the mechanism of action. **European Biophysics Journal**, v. 40, p. 545e553, 2011.
- CHEN, J. W.; LIU, S. S.; YE, R.; CAI, G. X.; JI, B.; WU, Y. N. Angiotensin-I converting enzyme (ACE) inhibitory tripeptides from rice protein hydrolysate: Purification and characterization. **Journal of Functional Foods**, v. 5, p. 1684–1692, 2013.
- CHIN, Y. X.; LIM, P. E.; MAGGS, C. A.; PHANG, S. M.; SHARIFUDDIN, Y.; GREEN, B. D. Anti-diabetic potential of selected Malaysian seaweeds. **Journal of Applied Phycology**, v. 27, p.2137–2148, 2015.
- COLLINS, R.; MACMAHON, S. Blood pressure, antihypertensive drug treatment and the risks of stroke and of coronary heart disease. **British Medical Bulletin**, v. 50, p. 272 – 298, 1994.
- CONLON, J. M.; MECHKARSKA, M.; LUKIC, M. L.; FLATT, P. R.. Potential therapeutic applications of multifunctional host-defense peptides from frog skin as anti-cancer, anti-viral, immunomodulatory, and anti-diabetic agentes. **Peptides**, v. 57, p. 67–77, 2014.
- CORRÊA, A. P. F. **Obtenção de peptídeos bioativos a partir da hidrólise enzimática de caseinato ovino e soro de queijo ovino**. 2013. 103 f. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente) Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul -RS.
- CROSS, K. J.; HUQ, N. L.; PALAMARA, J. E.; PERICH, J. W.; REYNOLDS, E. C. Physicochemical characterization of casein phosphopeptideamorphous calcium phosphate nanocomplexes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, p. 15362–15369, 2005.
- DAVALOS, A.; MIGUEL, M.; BARTOLOMÉ, B.; LÓPEZ-FANDIÑO, R. Antioxidant activity of peptides derived from egg white proteins by enzymatic hydrolysis. **Journal of Food Protection**, 67(9), 1939–1944, 2004.
- DOUGKAS A, REYNOLDS CK, GIVENS ID, ELWOOD PC, MINIHANE AM. Associations between dairy consumption and body weight: a review of the evidence and underlying mechanisms. **Nutrition Research Reviews**, v. 24, p. 72–95, 2011.
- DOYEN, A.; SAUCIER, L.; BEAULIEU, L.; POULIOT, Y.; BAZINET, L. Electroseparation of an antibacterial peptide fraction from snow crab by-products hydrolysate by electrodialysis with ultrafiltration membranes. **Food Chemistry**, v. 132, p. 1177–1184, 2012.

- DURAND-POUSSEREAU, N.; FEVRE, M. Characterization of a protease deficient strain of *Penicillium roqueforti* generated by heterologous plasmid integration: potential use for protein production. **Journal of Biotechnology**, v. 51, n. 1, p. 97-105, 1996.
- DZIUBA, J.; IWANIAK, A.; MINKIEWICZ, P. Computer-aided characteristics of proteins as potential precursors of bioactive peptides. **Polimery**, v. 48, p. 50–53, 2003.
- ELIAS, R.J.; KELLERBY, S. S.; DECKER, E. A. Antioxidant activity of proteins and peptides. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 48, p. 430–441, 2008.
- ELZOGHBY; A. O.; SAMY, W. M.; ELGINDY, N. A. Albumin-based nanoparticles as potential controlled release drug delivery systems. **Journal of Controlled Release**, v.157, p. 168–82, 2012.
- ENRIGHT, M. C.; ROBINSON, D. A.; RANDLE, G.; FEIL, E. J.; GRUNDMANN, H.; SPRATT, B. G. The evolutionary history of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 99, p. 7687-7692, 2002.
- ERDMANN, K.; CHEUNG, B. W. Y.; SCHRÖDER, H. The possible roles of food derived bioactive peptides in reducing the risk of cardiovascular disease. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 19, p. 643–654, 2008.
- FAO. AGRIBUSINESS HANDBOOK - Poultry Meat & eggs, 2010 [online], 2010.
- FARLEY, P. C.; IKASARI, L. Regulation of the secretion of *Rhizopus oligosporus* extracellular carboxyl proteinase. **Journal of General Microbiology**, v. 138, p. 2539-44, 1992.
- FLEMING, I. Signaling by the angiotensin-converting enzyme. **Circulation Research**, v. 98, p. 887 -896, 2007.
- FRISVAD, J. C.; LARSEN, T. O. Chemodiversity in the genus *Aspergillus*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 99, p. 7859–7877, 2015.
- FUJITA, H.; SASAKI, R.; YOSHIKAWA, M. Potentiation of the antihypertensive activity of orally administered ovokinin, a vasorelaxing peptide derived from ovalbumin, by emulsification in egg phosphatidylcholine. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, v. 59, p. 2344–2345, 1995.
- GARCÉS-RIMÓN, M.; GONZÁLEZ, C.; URANGA, J. A.; LÓPEZ-MIRANDA, V.; LÓPEZ-FANDIÑO, R.; MIGUEL, M. Pepsin egg white hydrolysate ameliorates obesity-related oxidative stress, inflammation and steatosis in zucker fatty rats. **PLoS ONE**, v. 11, p.1-15, 2016.
- GARCÍA-TEJEDOR, A.; SÁNCHEZ-RIVERA, L.; CASTELLÓ-RUIZ, M.; RECIO, I.; SALOM, J. B.; MANZANARES, P. Novel antihypertensive lactoferrin-derived peptides

produced by *Kluyveromyces marxianus*: gastrointestinal stability profile and *in vivo* angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibition. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, p. 1609–16, 2014.

GARDNER, M. L. G. Gastrointestinal absorption of intact proteins. *Annu Rev Nutr* 1988;8: 329–50.

GAUTHIER, S. F.; POULIOT, Y.; SAINT-SAUVEUR, D. Immunomodulatory peptides obtained by the enzymatic hydrolysis of whey proteins. **International Dairy Journal**, v. 16, p. 1315–1323, 2006.

GEISER, D. M. Sexual structures in *Aspergillus*: morphology, importance and genomics. **Medical Mycology**, v. 47, p. S21–S26, 2009.

GERMANO, S.; PANDEY, A.; OSAKU, C. A.; ROCHA, S. N.; SOCCOL, C. R. Characterization and stability of proteases from *Penicillium* sp. produced by solid-state fermentation. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 32, n. 2, p. 246–251, 2003.

GHASSEM, M.; BABJI, A. S.; SAID, M.; MAHMOODANI, F.; ARIHARA, K. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides from snakehead fish sarcoplasmic protein hydrolysate. **Journal of Food Biochemistry**, v. 38, p.140–49, 2014.

GOKCE, N. L-arginine and hypertension. **Journal of Nutrition**, v. 134, p. 2807Se 2811S, 2004.

GONG, D.; KALINA, J.; BAIN, M. M.; WILSON, P. W.; DUNN, I. C. Gallin: A new antimicrobial peptide from egg white. **British Poultry Abstracts**, n. 5, p. 8–9, 2009.

GORELICK, J.; KITRON, A.; KITRON, A.; PEN, S.; ROSENZWEIG, T.; MADAR, Z. Anti-diabetic activity of *Chiliadenus iphionoides*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 137, p. 1245–1249, 2011.

GUPTA, R.; BEG, Q.K.; LORENZ, P. Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 59, p. 15-32, 2002.

HARTMANN, R.; MEISEL, H. Food-derived peptides with biological activity: from research to food applications. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 18, p. 163-169, 2007.

HE, R.; ALASHI, A.; MALOMO, S. A.; GIRGIH, A. T.; CHAO, D.; JU, X.; ALUKO, R. E. Antihypertensive and free radical scavenging properties of enzymatic rapeseed protein hydrolysates. **Food Chemistry**, v. 141, p. 153–59, 2013.

HERNÁNDEZ-LEDESMA, B.; CONTRERAS, M. D. M.; RECIO, I. Antihypertensive peptides: Production, bioavailability and incorporation into foods. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 165, p. 23–35, 2011.

HERNÁNDEZ-MARTÍNEZ, R.; GUTIÉRREZ-SÁNCHEZ, G.; BERGMANN, C. W.; LOERA-CORRAL, O.; ROJO-DOMÍNGUEZ, A.; HUERTA-OCHOA, S.; REGALADO-GONZÁLEZ, C.; PRADO-BARRAGÁN, L. A. Purification and characterization of a thermodynamic stable serine protease from *Aspergillus fumigatus*. **Process Biochemistry**, v. 46, p. 2001–2006, 2011.

HEYMANN, D. L. Resistance to anti-infective drugs and the threat to public health. **Cell**, 124, 671–675, 2006.

HIRSCH, E. B.; TAM, V. H. Detection and treatment options for Klebsiella pneumonia carbapenemases (KPCs): an emerging cause of multidrug-resistant infection. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 65, p. 1119-1125, 2010.

HMIDET, N.; ALI, N. E-H; HADDAR, A.; KANOUN, S.; ALYA, S-K.; NASRI, M. HRUBY, V. J.; BALSE, P. M. Conformational and topographical considerations in designing agonist peptidomimetics from peptide leads. **Current Medicinal Chemistry**, v. 7, p. 945–970, 2000.

HUANG, W.; CHAKRABARTI, S.; MAJUMDER, K.; JIANG, Y.; DAVIDGE, S. T.; WU, J. Egg-derived peptide IRW Inhibits TNF α - induced inflammatory response and oxidative stress in endothelial cells. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, n. 58, p. 10840–10846, 2010.

JENSEN, B.; NEBELONG, J. O.; REESLEV, M. Enzymes production in continuous cultivation by the thermophilic fungus, *Thermomyces lanuginosus*. **Biotechnology Letters**, v. 24, p. 41-45, 2002.

JIA, J.; MAA, H.; ZHAO, W.; WANG, Z.; TIAN, W.; LUO, L.; He, R. The use of ultrasound for enzymatic preparation of ACE-inhibitory peptides from wheat germ protein. **Food Chemistry**, v. 119, p. 336–342, 2010.

KADRI, A.; CHOBBA, I. B.; ZARAI, Z.; BÉKIR, A.; GHARSALLAH, N.; DAMAK, M.; GDOURA, R. Chemical constituents and antioxidant activity of the essential oil from aerial parts of *Artemisia herba-alba* grown in Tunisian semi-arid region. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, p. 2923–2929, 2011.

KALASKAR, V. V.; KASINATHAN, N.; SUBRAHMANYAM, V. M.; RAO, J. V. Optimization of extracellular acid protease production from *Aspergillus niger* by factorial design. **Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Science**, v. 4, p.132-136, 2014.

KALISZ, H. M. **Microbial proteinases**. Springer, Berlin Heidelberg. In: Fiechter A (ed) *Advances in biochemical engineering/biotechnology*, vol 36 (enzyme studies). pp 3–61, 1988.

KAMAU, S. M.; LU, R. R.; CHEN, W.; LIU, X. M.; TIAN, F. W.; SHEN, Y.; GAO, T. Functional significance of bioactive peptides derived from milk proteins. **Food Reviews International**, v. 26, 386–401, 2010.

KASANA, R. C. Proteases from psychrotrophs: an overview. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 36, p. 134–45, 2010

KASANA, R. C.; SALWAN, R.; YADAV, S. K. Microbial proteases: Detection, production, and genetic improvement. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 37, p. 262–276, 2011.

KAVANAGH, K. **Fungi – Biology and Applications**, Wiley, Chichester, 2005.

KHAN, F. New microbial proteases in leather and detergent industries. **Innovative Research in Chemistry**, v. 1, p. 1–6, 2013.

KIM, Y. M.; WANG, M. H.; RHEE, H. I. A novel α -glucosidase inhibitor from pine bark. **Carbohydrate Research**, v. 339, p. 715–717, 2004.

KIM, J. S.; HYUN, T. K.; KIM, M. J. The inhibitory effects of ethanol extracts from sorghum, foxtail millet and proso millet on α -glucosidase and α -amylase activities. **Food Chemistry**, v. 124, p. 1647–1651, 2011.

KITANO, H.; Kataoka, K.; Furukawa, K.; Hara, S. Specific expression and temperature-dependent expression of the acid protease-encoding gene (*pepA*) in *Aspergillus oryzae* in solid-state culture (Rice-Koji). **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 93, n. 6, p. 563-7, 2002.

KITTS, D. D.; WEILER, K. Bioactive proteins and peptides from food sources: application of bioprocesses used in isolation and recovery. **Current Pharmaceutical Design**, v. 9, p. 1309 - 1323, 2003.

KNIEMEYER, O. Proteomics of eukaryotic microorganisms: The medically and biotechnologically important fungal genus *Aspergillus*. **Proteomics**, v.11, p. 3232–3243, 2011.

KORHONEN, H.; PIHLANTO, A. Food-derived bioactive peptides opportunities for designing future foods. **Current Pharmaceutical Design**, v. 9, p.1297–1308, 2003.

KORHONEN, H. Milk-derived bioactive peptides: From science to applications. **Journal of Functional Foods**, p. 177-187, 2009a.

KORHONEN, H. J. **Bioactive Components in Bovine Milk**. In: Park, Y. W. Bioactive Components in Milk and Dairy Products. Iowa: Wiley-Blackwell, p. 15-42, 2009b.

KOVACS-NOLAN, J.; PHILLIPS, M.; MINE, Y. Advances in the value of eggs and egg components for human health. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 8421–8431, 2005.

KRISTINSSON, H. G.; RASCO, B. A. Fish protein hydrolysates: production, biochemical and functional properties. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 40, p. 43–81, 2000.

KTARI, N.; NASRI, R.; MNAFGUI, K.; HAMDEN, K.; BELGUITH, O. BOUDAOUARA, T.; FEKI, A. E.; NASRI, M. Antioxidative and ACE inhibitory activities of protein hydrolysates from zebra blenny (*Salaria basilisca*) in alloxan-induced diabetic rats. **Process Biochemistry**, v. 49, p. 890–97, 2014.

KUDDUS, M.; RAMTEKE, P. W. A cold-active extracellular metalloprotease from *Curtobacterium luteum* (MTCC 7529): enzyme production and characterization. **Journal of General and Applied Microbiology**, v. 54, p. 385–392, 2008.

KUMAR, C.G.; TAKAGI, H. Microbial alkaline proteases: from a bioindustrial viewpoint. **Biotechnology Advances**, v.17, p. 561–594, 1999.

KUMAR, S.; SHARMA, N. S.; SAHARAN, M. R.; SINGH, R. Extracellular acid protease from *Rhizopus oryzae*: purification and characterization. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 1701–1705, 2005.

KUMARI, M.; SHARMA, A.; JAGANNADHAM, M. V. Religiosin B, a milk-clotting serine protease from *Ficus religiosa*. **Food Chemistry**, v. 131, p. 1295–1303, 2012.

KUSSMANN, M.; PANCHAUD, A.; AFFOLTER, M. Proteomics in nutrition: Status quo and outlook for biomarkers and bioactives. **Journal of Proteome Research**, v. 9, p. 4876–4887, 2010.

LAGEIRO, M. M.; MOURA, M. J.; REIS, A.; COSTA-FERREIRA, M. J. ‘Microbial proteases application in leather industry’. **Journal of Biotechnology**, v. 131, p. 239, 2007.

LEE, J. K.; JEON, J. K.; BYUN, H. G. Effect of angiotensin I converting enzyme inhibitory peptide purified from skate skin hydrolysate. **Food Chemistry**, v. 125, p. 495–499, 2011.

LEVY, O. E.; JODKA, C. M.; REN, S. S.; MAMEDOVA, L.; SHARMA, A.; SAMANT, M.; D’SOUZA, L. J.; SOARES, C. J.; YUSKIN, D. R.; JIN, L. J.; PARKES, D. G.; TATARKIEWICZ, K.; GHOSH, S. S. Novel Exenatide Analogs with Peptidic Albumin Binding Domains: Potent Anti-Diabetic Agents with Extended Duration of Action. **PLoS One**, v. 4, p. 1-9, 2014.

LI, D.; YANG, Y.; SHEN, C. Protease production by the thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus*. **Mycological Research**, v. 101, n. 1, p. 18-22, 1997.

LI, J.; LI, L. Proteolysis characteristics of *Actinomucor elegans* and *Rhizopus oligosporus* extracellular proteases under acidic conditions. **International Journal of Food Science and Technology**, v.48, p. 512–518, 2013.

LIN, S.; JIN, Y.; LIU, M.; YANG, Y.; ZHANG, M.; GUO, Y.; JONES, G.; LIU, J.; YIN, Y. Research on the preparation of antioxidant peptides derived from egg White with assisting of high-intensity pulsed electric field. **Food Chemistry**, v.139, p. 300–306, 2013.

- LIU, J. B.; YU, Z. P.; ZHAO, W. Z.; LIN, S. Y.; WANG, E. L.; ZHANG, Y.; YUAN, X. et al. Isolation and identification of angiotensin-converting enzyme inhibitory peptides from egg white protein hydrolysates. **Food Chemistry**, v. 122, 1159–1163, 2010.
- LIU, I. M.; TZENG, T. F.; LIOU, S. S.; CHANGET, C. J. Angelica acutiloba root alleviates advanced glycation end-product-mediated renal injury in streptozotocin-diabetic rats. **Journal of Food Science**, v. 76, p. H165–H174, 2011.
- LIU, J.; JIN, Y.; LIN, S.; JONES, G. S.; CHEN, F. Purification and identification of novel antioxidant peptides from egg white protein and their antioxidant activities. **Food Chemistry**, v.175, p. 258–266, 2015.
- LÓPEZ, R. E. S; Proteases de Leishmania: Novos alvos para o desenvolvimento racional de fármacos. **Química Nova**, v. 33, n.7, p. 1541-1547, 2010.
- LORD, C. J.; ASHWORTH, A. Mechanisms of resistance to therapies targeting BRCA-mutant cancers. **Nature Medicine**, v. 9, p. 1381–8, 2013.
- LOT, L.R.T.; BROEK, L.V.D.; MONTEBELLO, P.C.B.; CARVALHO, T.B. de. Mercado de ovos: panorama do setor e perspectivas. **XLIII CONGRESSO DA SOBER** “Instituições, Eficiência, Gestão e Contratos no Sistema Agroindustrial”, Ribeirão Preto, 24 a 27 de Julho de 2005.
- MCCANN, K. B.; SHIELL, B. J.; MICHALSKI, W. P.; LEE, A.; WAN, J.; ROGINSKI, H.; COVENTRY, M. J. Isolation and characterisation of a novel antibacterial peptide from bovine α S1-casein. **International Dairy Journal**, v. 16, p. 316–23, 2006.
- MCDONALD-WICKS, L. K.; WOOD, L. G.; GARG, M. L. Methodology for the determination of biological antioxidant capacity in vitro: a review. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 86, p. 2046–2056, 2006.
- MADUREIRA, A. R.; TAVARES, T.; GOMES, A. M. P.; PINTADO, M. E.; MALCATA, F. X. Physiological properties of bioactive peptides obtained from whey proteins. **Journal of Dairy Science**, v. 93, p. 437-455, 2010.
- MAJUMDER, K.; WU, J. A new approach for identification of novel antihypertensive peptides from egg proteins by QSAR and bioinformatics. **Food Research International**, v. 43, p. 1371–1378, 2010.
- MAJUMDER, R.; BANIK, S. P.; KHOWALA, S. Purification and characterisation of κ -casein specific milk-clotting metalloprotease from *Termitomyces clypeatus* MTCC 5091. **Food Chemistry**, v. 173, p. 441–448, 2015.
- MATANIC, A. V. C.; CASTILLA, C. Antiviral activity of antimicrobial cationic peptides against Junin virus and herpes simplex vírus. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 23, p. 382–389, 2004.

- MATSUI, T.; YOSHIMOTO, C.; OSAJIMA, K.; OKI, T.; OSAJIMA, Y. *In vitro* survey of alpha-glucosidase inhibitory food components. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 60, 2019–2022, 1996.
- MEISEL, H. Bioactive substances of food origin: a challenge for food and nutrition science. **Nahrung, Weinheim**, v. 43, p. 147, 1999.
- MEISEL, H.; FITZGERALD, R. J. Biofunctional peptides from milk proteins: mineral binding and cytomodulatory effects. **Current Pharmaceutical Design**, v. 9, p. 1289–1295, 2003.
- MELLANDER, O. The physiological importance of the casein phosphopeptidecalcium salts. II. Per oral calcium dosage of infants. **Acta Societatis Medicorum Uppsalienses**, v. 55, p. 247–255, 1950.
- MEMARPOOR-YAZDI, M.; ASOODEH, A.; CHAMANI, J. K. Structure and ACE-inhibitory activity of peptides derived from hen egg white lysozyme. **International Journal of Peptide Research and Therapeutics**, v.18, p. 353–60, 2012.
- MENDIS, E.; RAJAPAKSE, N.; BYUN, H. G.; KIM, S. K. Investigation of jumbo squid (*Dosidicus gigas*) skin gelatin peptides for their in vitro antioxidant effects. **Life Sciences**, 70:651–6, 2005.
- MERHEB-DINI, C.; GOMES, E.; BOSCOLO, M.; SILVA, R. Production and characterization of a milk-clotting protease in the crude enzymatic extract from the newly isolated *Thermomucor indicae-seudaticae* N31. **Food Chemistry**, v. 120, p. 87-93, 2010.
- MEROPS – the peptidase database. Disponível em: < <http://merops.sanger.ac.uk/>>. Acesso em: 23 de agosto de 2016.
- MEYER, V.; WU, B.; RAM, A. F. J. *Aspergillus* as a multi-purpose cell factory: current status and perspectives. **Biotechnology Letters**, v. 33, p. 469–476, 2011.
- MONTEIRO, V. N.; SILVA, R. N. Aplicações Industriais da Biotecnologia Enzimática. **Revista Processos Químicos**, p. 9-23, 2009.
- MORAIS, H. A.; SILVESTRE, M. P. C.; AMORIN, L. L.; SILVA, V. D. M.; SILVA, M. R.; SIMÕES E SILVA, A. C.; SILVEIRA, J. N. Use of different proteases to obtain whey protein concentrate hydrolysates with inhibitory activity toward angiotensin-converting enzyme. **Journal of Food and Biochemistry**, v. 38, p. 102–9, 2014.
- MÓTYÁN, J.A.; TÓTH, F.; TÖZSÉR, J. Research applications of proteolytic enzymes in molecular biology. **Biomolecules**, v. 3, p. 923–942, 2013.

MURTHY, S. P.; NAIDU, M. M. Protease production by *Aspergillus oryzae* in solid-state fermentation utilizing coffee by-products. **World Applied Sciences Journal**, v. 8, p. 199–205, 2010.

MURTHY, P. S.; KUSUMOTO, K-I. Acid protease production by *Aspergillus oryzae* on potato pulp powder with emphasis on glycinereleasing activity: A benefit to the food industry. **Food and Bioproducts Processing**, v. 96, p. 180–188, 2015.

MUSSATTO, S. I.; FERNANDES, M.; MILAGRES, A. M. F. Biotecnologia - enzimas ferramentas na indústria. **Ciência Hoje**, Rio de Janeiro, v. 41, n. 242, out. 2007.

NAJAFIAN, L.; BABJI, A. S. A review of fish-derived antioxidant and antimicrobial peptides: their production, assessment, and applications. **Peptides**, v. 33, p. 178 -185, 2012.

NEURATH, H. The versatility of proteolytic enzymes. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 32, p. 35-49, 1986.

NGO, D.; QIAN, Z.; RYU, B.; PARK, J.W.; KIM, S. In vitro antioxidant activity of a peptide isolated from Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) scale gelatin in free radical-mediated oxidative systems. **Journal of Functional Foods**, v. 2, p. 107 -117, 2010.

NIAMNUY, C.; NACHAISIN, M.; LAOHAVANICHB, J.; DEVAHASTIN, S. Evaluation of bioactive compounds and bioactivities of soybean dried by different methods and conditions. **Food Chemistry**, p. 129, p. 899–906, 2011.

NOVAKI, L. **Produção, purificação e caracterização parcial da invertase obtida por fermentação em estado sólido de soja com *Aspergillus caseiellus***. 2009. 56p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Centro de Engenharia e Ciências Exatas, Paraná.

NOVELLI, P. K.; BARROS, M. M.; FLEURI, L. F. Novel inexpensive fungi proteases: Production by solid state fermentation and characterization. **Food Chemistry**, v. 198, p. 119–124, 2016.

OKERMAN, L.; VAN HENDE, J.; DE ZUTTER, L. Stability of frozen stock solutions of beta-lactam antibiotics, cephalosporins, tetracyclines and quinolones used in antibiotic residue screening and antibiotic susceptibility testing. **Analytica Chimica Acta**, v. 586, p. 284-288, 2007.

OLIVEIRA, B.L. Ovo – Qualidade e Importância, Março de 1999. ano 102, n.628. Disponível em <<http://www.sna.agr.br/artigos/artitec-ovos.htm>>, acessado em 25/09/2016.

ORME, C. M.; BOGAN, J. S. Sorting out diabetes. **Science**, v. 324, p. 1155–1156, 2009.

- PALUMBO, D.; IANNACCONE, M.; PORTA, A.; CAPPARELLI, R. Experimental antibacterial therapy with puriindolines, lactoferrin and lysozyme in *Listeria monocytogenes*-infected mice. **Microbes and Infection**, v. 12, p. 538-545, 2010.
- PAPHITOU, N. I. Antimicrobial resistance: Action to combat the rising microbial challenges. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 42, p. 25–28, 2013.
- PAPO, N.; SHAI, Y. Can we predict biological activity of antimicrobial peptides from their interactions with model phospholipid membranes? **Peptides**, v. 24, p.1693e1703, 2003.
- PARK, S. C.; PARK, Y.; HAHM, K. S. The role of antimicrobial peptides in preventing multidrug-resistant bacterial infections and biofilm formation. **International of Molecular Sciences**, v. 12, p. 5971-5992, 2011.
- PASCOAL, L.A.F.; BENTO JUNIOR, B.A.; SANTOS, W.S.; SILVA, L.S.; DOURADO, L.R.B.; BEZERRA, A.B.A. Qualidade dos ovos comercializados em diferentes estabelecimentos na cidade de Imperatriz-MA. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v.9, p.150-157; 2008.
- PATEL, A. R.; VELIKOV, K. P. Colloidal delivery systems in foods: a general comparison with oral drug delivery. **LWT-Food Science Technology**, v. 44, p. 1958–64, 2011.
- PEKKARINEN, A.; MANNONEN, L.; JONES, B. L.; NIKU-PAAVOLA, M-L. Production of proteases by *Fusarium* species grown on barley grains and in media containing cereal proteins. **Journal of Cereal Science**, v. 31, p. 253–261, 2000.
- PELLEGRINI, A. Antimicrobial peptides from food protein. **Current Pharmaceutical Design**, v. 9, p. 1225–1238, 2003.
- PETERS, B. M.; SHIRTLIFF, M. E.; JABRA-RIZK, M. A. Antimicrobial peptides: primeval molecules or future drugs? **PLoS Pathogens**, v. 6, p. 1-4, 2010.
- POKORA, M.; ZAMBROWICZ, A.; DABROWSKA, A.; ECKERT, E.; SETNER, B.; SZOŁTYSIK, M.; SZEWCZUK, Z.; ZABŁOCKA, A.; POLANOWSKI, A.; TRZISZKA, T.; CHRZANOWSKA, J. An attractive way of egg white protein by-product use for producing of novel anti-hypertensive peptides. **Food Chemistry**, v. 151, p. 500–505, 2014.
- QUEENAN, A. M.; BUSH, K. Carbanepemases: the versatile elactamases. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 20, p. 440-458, 2007.
- RADEK, K.; GALLO, R. Antimicrobial peptides: Natural effectors of the innate immune system. **Seminars in Immunopathology**, 29, 27–43, 2007.
- RAMAKRISHNA, V.; RAJASEKHAR, S.; REDDY, L. S. Identification and purification of metallo protease from dry grass pea (*Lathyrus sativus* L.) seeds. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.160, p. 63–71, 2010.

RAMOS, B. F. S. Gema de ovo composição em amins biogénicas e influência da gema na fração volátil de creme de pasteleiro. 2008.111f. **Dissertação** (Mestrado em Controlo de qualidade) – Faculdade de farmácia, Universidade do Porto, Porto.

RANI, K.; RANA, R.; DATT, S. Review on latest overview of proteases. **International Journal of Current Life Sciences**, v. 2, p. 12–18, 2012.

RAO, M. B.; TANKSALE, A. M.; GHATGE, M. S.; DESHPAND, VV. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 62, p. 597-635, 1998.

RAO, S.; SUN, J.; LIU, Y.; ZENG, H.; SU, Y.; YANG, Y. ACE inhibitory peptides and antioxidant peptides derived from in vitro digestion hydrolysate of hen egg white lysozyme. **Food Chemistry**, v. 135, p.1245–52, 2012.

RÊGO, I.O.P.; CANÇADO, S.V; FIGUEIREDO, T.C.; MENEZES, L.D.M.; OLIVEIRA, D.D.; LIMA, A.L.; CALDEIRA,L.G.M.; ESSER, L.R. Influência do período de armazenamento na qualidade do ovo integral pasteurizado refrigerado. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 64, n.3, p.735-742, 2012.

REN, Y.; WU, H.; LI, X.; LAI, F.; XIAO, X. Purification and characterization of high antioxidant peptides from duck egg white protein hydrolysates. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 452, pp. 888-94, 2014.

RUI, X.; BOYE, J. I.; SIMPSON, B. K.; PRASHER, S. O. Purification and characterization of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides of small red bean (*Phaseolus vulgaris*) hydrolysates. **Journal of Functional Foods**, v. 5, p. 1116–1124, 2013.

RUIZ-RUIZ, J.; DAVILA-ORTIZ, G.; CHEL-GUERRERO, L.; BETANCUR-ANCONA, D. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory and antioxidant peptide fractions from hard-to-cook bean enzymatic hydrolysates. **Journal of Food Biochemistry**, v. 37, p 26–35, 2013.

SAADI, S.; SAARI, N.; ANWAR, F.; HAMID, A. A.; GHAZALI, H. M. Recent advances in food biopeptides: Production, biological functionalities and therapeutic applications. **Biotechnology Advances**, v. 33, p. 80-116, 2015.

SABOTIC, J.; KOS, J. Microbial and fungal protease inhibitors - current and potential applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 93, p. 1351-1375, 2012.

SAMARANAYAKA, A. G. P.; KITTS, D. D.; LI-CHAN, E. C. Y. Antioxidant and angiotensin I-converting enzyme inhibitory potential of a Pacific hake (*Merluccius productus*) fish protein hydrolysates subjected to simulated gastrointestinal digestion and Caco-2 cell permeation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, p. 1535–1542, 2010.

SAMSON, R. A.; VARGA, J. What is a species in *Aspergillus*? **Medical Mycology**, v. 47, p. S13–S20, 2009.

SAMSON, R. A.; VISAGIE, C. M.; HOUBRAKEN, J.; HONG, S-B.; HUBKA, V.; KLAASSEN, C. H. W.; PERRONE, G.; SEIFERT, K. A.; SUSCA, A.; TANNEY, J. B.; VARGA, J.; KOCSUB, S.; SZIGETI, G.; YAGUCHI, T.; FRISVAD, J. C. Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*. **Studies in Mycology**, v. 78, p. 141–173, 2014.

SARCINELLI, M. F.; VENTURINI, K. S.; SILVA, L. C. Características dos Ovos. Boletim Técnico - PIE-UFES:00707. **Universidade Federal do Espírito Santo – UFES**, 2007.

SAVITHA, S.; SADHASIVAM, S.; SWAMINATHAN, K.; LIN, F. H. Fungal protease: Production, purification and compatibility with laundry detergents and their wash performance. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v. 42, p. 298–304, 2011.

SANCHEZ, S.; DEMAINE, A. L. Enzymes and bioconversions of industrial, pharmaceutical, and biotechnological significance. **Organic Process Research & Development**. v.15, p. 224–230, 2011.

SÁCHEZ-RIVERA, L.; MARTÍNEZ-MAQUEDA, D.; CRUZ-HUERTA, E.; MIRALLES, B.; RECIO, I. Peptidomics for discovery, bioavailability and monitoring of dairy bioactive peptides. **Food Research International**, v. 63, 170–181, 2014.

SAMARAWEERA, H., ZHANG, W.-G., LEE, E. J.; AHN, D. U. Egg yolk phosphovitin and functional phosphopeptides—review. **Journal of Food Science**, n. 76, p. R143–R150, 2011.

SANDHYA, C.; SUMANTHA, A.; SZACAKCS, G.; PANDEY, A. Comparativo evaluation of neutral protease production by *Aspergillus oryzae* in submerged solid-state fermentation. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 2689–2694, 2005.

SARMADIA, B. H.; ISMAILA, A. Antioxidative peptides from food proteins: A review. **Peptides**, v. 31, p. 1949–1956, 2010.

SEIBEL, N. F. Transformações bioquímicas durante o processamento do ovo. In: SOUZA-SOARES, L. A.; SIEWERDT, F. **Aves e ovos**. Pelotas: UFPEL, 2005, p 77-90

SEPPO, L.; JAUHAINEN, T.; POUSSA, T.; KORPELA, R. A. Fermented milk high in bioactivepeptides has a blood pressure lowering effect in hypertensive subjects. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 77, p. 326–30, 2003.

SHAHIDI, F.; ZHONG, Y. Bioactive peptides. **The Journal of AOAC International**, v. 91, p. 914–931, 2008.

SHATA, H. M. Extraction of milk-clotting enzyme produced by solid state fermentation of *Aspergillus oryzae*. **Polish Journal of Microbiology**, v. 54, n. 3, p. 241-7, 2005.

SHEIH, I. C.; FANG, T. J.; WU, T. K. Isolation and characterisation of a novel angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory peptide from the algae protein waste. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 115, p. 279–284, 2009.

SHIMIZU, M.; SAWASHITA, N.; MORIMATSU, F.; ICHIKAWA, J.; TAGUCHI, Y.; IJIRI, Y.; YAMAMOTO, J. Antithrombotic papain-hydrolyzed peptides isolated from pork meat. **Thrombosis Research**, v. 123, p. 753–757, 2008.

SHI, Y.; KOVACS-NOLAN, J.; JIANG, B.; TSAO, R.; MINE, Y. Peptides derived from eggshell membrane improve antioxidant enzyme activity and glutathione synthesis against oxidative damage in Caco-2 cells. **Journal of Functional Foods**, v. 11, p. 571–580, 2014.

SIENKIEWICZ-SZLAPKA, E.; JARMOLOWSKA, B.; KRAWCZUK, S.; KOSTYRA, E.; KOSTYRA, H.; IWAN, M. Contents of agonistic and antagonistic opioid peptides in different cheese varieties. **International Dairy Journal**, v.19, p. 258–263, 2008.

SILA, A.; HEDHILI, K.; PRZYBYLSKI, R.; ELLOUZ-CHAABOUNI, S.; DHULSTER, P.; BOUGATEF, A.; NEDJAR-ARROUME, N. Antibacterial activity of new peptides from barbel protein hydrolysates and mode of action via a membrane damage mechanism against *Listeria monocytogenes*. **Journal of Functional Foods**, v. 11, p. 322–329, 2014.

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

SLIVINSKI, C. T. Produção, purificação parcial e caracterização bioquímica de glucoamilase de *Aspergillus niger* obtida por fermentação em estado sólido. 2007. 128p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa/PR.

SOUZA, P. M.; BITTENCOURT, M. L. A.; CAPRARA, C. C.; FREITAS, M.; ALMEIDA, R. P. C.; SILVEIRA, D.; FONSECA, Y. M.; FILHO, E. X. F.; PESSOA JUNIOR, A.; MAGALHÃES, P. O. A biotechnology perspective of fungal proteases. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 46, p. 337-346, 2015.

SUMANTHA, A.; LARROCHE, C.; PANDEY, A. Microbiology and industrial biotechnology of food-grade proteases: a perspective. **Food Technology and Biotechnology**, v. 44, p. 221–20, 2006.

SUGIARTO, H.; YU, P. L. Avian antimicrobial peptides: The defense role of beta-defensins. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 323, p. 721–727, 2004.

TEIXEIRA, V.; FEIO, M. J.; BASTOS, M. Role of lipids in the interaction of antimicrobial peptides with membranes. **Progress in Lipid Research**, v. 51, p. 149 -177, 2012.

TENENBAUM, A.; GROSSMAN, E.; SHEMESH, J.; FISMAN, E. Z.; NOSRATI, I.; MOTRO, M. Intermediate but not low doses of aspirin can suppress angiotensin-converting

enzyme inhibitor-induced cough. **American Journal of Hypertension**, v. 13, p. 776–82, 2000.

THAYER, A. M. Improving peptides. **Chemical & Engineering News**, v. 89, p. 13–20, 2011.

THERON, L. W.; DIVOL, B. Microbial aspartic proteases: current and potential applications in industry. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 98, p. 8853–8868, 2014.

THOMSON, A.; HEMPHILL, D.; JEEJEEBHOY, K. N. Oxidative stress and antioxidants in intestinal disease. *Digestive Diseases*, **Basel, Switzerland**, v.16, p. 152–158, 1998.

TUNGA, R.; SHRIVASTAVA, B.; BANERJEE, R. Purification and characterization of a protease from solid state cultures of *Aspergillus parasiticus*. **Process Biochemistry**, v. 38, p.1553-1558, 2003.

TYNDALL, J. D. A.; NALL, T.; FAIRLIE, D. P. Proteases universally recognize β -strands in their active sites. **Chemical Reviews**, v. 105, p. 973–1000, 2005.

UDENIGWE, C. C.; ALUKO, R. E. Chemometric analysis of the amino acid requirements of antioxidant food protein hydrolysates. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 12, p. 3148–3161, 2011.

URAIPOG, C.; ZHAO, J. Rice bran protein hydrolysates exhibit strong in vitro α -amylase, β -glucosidase and ACE-inhibition activities. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 96, p. 1101–1110, 2016.

USDA. DEPARTAMENTO DE AGRICULTURA DOS ESTADOS UNIDOS. National Nutrient Database for Standard Reference, release 25 – food group 1: Dairy and Egg Products. 2012.

VALKO, M.; RHODES, C. J.; MONCOL, J.; IZAKOVIC, M.; MAZUR, M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. **Chemico-Biological Interactions**, v. 160, p. 1–40, 2006.

VAN DER HOMBERGH, J. P. T. W.; VAN DE VONDERVOORTB, P. J. I.; FRAISSINET-TACHETB, L.; VISSERB, J. *Aspergillus* as host for heterologous protein production: The problem of proteases. **Trends in Biotechnology**, v. 15, p. 256–263, 1997.

VÁZQUEZ, I. R.; AGUILERA, A. F.; PRADO-BARRAGÁN, L. A.; AGUILAR, C. N. Producción Fúngica de Proteasas Inducidas con Pelo de Cerdo. **Información Tecnológica**, v. 19, p. 33-40, 2008.

VRANOVA, V.; REJSEK, K.; FORMANEK, P. Proteolytic activity in soil: A review. **Applied Soil Ecology**, v. 70, p. 23-32, 2013.

WANG, Z.; WANG, G. APD: The antimicrobial peptide database. **Nucleic Acids Research**, v. 32, p. D590–D592, 2004.

WANG, Q.; HOU, Y.; XU, Z.; MIAO, J.; LI, G. Optimization of cold active protease production by the psychrophilic bacterium *Colwellia* sp. NJ341 with response surface methodology. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 1926–1931, 2008.

WANG, H.; DU, Y. J.; SONG, H. C. Alpha-Glucosidase and alpha-amylase inhibitory activities of guava leaves. **Food Chemistry**, v. 123, p. 6–13, 2010.

WARD, O.P., RAO, M.B., AND KULKARNI, A. **Proteases, Production, Encyclopedia of Enzymes.**, Schaechter, M., Ed., New York: Elsevier Inc., 2009, pp. 495–511.

WARD, O. P. **Proteases**. In: Moo-Young, M. (Ed.), 2nd edr ed, Waterloo, Canadá. **Comprehensive Biotechnology**, p. 571-582, 2011.

WILD, S.; ROGLIC, G.; GREEN, A.; SICREE, R.; KING, H. Global prevalence of diabetes. **Diabetes Care**, v. 27, p. 1047–1053, 2004.

XIAO, J.; HUO, J.; JIANG, H.; YANG, F. Chemical compositions and bioactivities of crude polysaccharides from tea leaves beyond their useful date. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 49, p. 1143–1151, 2011

XUE, Z.; YU, W.; LIU, Z.; WU, M.; KOU, X.; WANG, J. Preparation and antioxidative properties of a rapeseed (*Brassica napus*) protein hydrolysate and three peptide fractions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, p. 5287–5293, 2009.

YABA ADJE, E.; BALTI, R.; KOUACH, M.; DHULSTER, P.; GUILLOCHON, D.; NEDJAR-ARROUME, N. Obtaining antimicrobial peptides by controlled peptic hydrolysis of bovine hemoglobin. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 49, p. 143–153, 2011.

YAMADA, A.; SAKURAI, T.; OCHI, D.; MITSUYAMA, E.; YAMAUCHI, K.; ABE, F. Novel angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptide from bovine casein. **Food Chemistry**, v. 141, p. 3781–89, 2013.

YANG, F.; LIN, I. Production of acid protease using thin stillage from a rice-spirit distillery by *Aspergillus niger*. **Enzyme Microbiology and Technology**, v. 23, p. 397-402, 1998.

YANG, Y.; MARCZAK, E. D.; YOKOO, M.; USUI, H.; YOSHIKAWA, M. Isolation and antihypertensive effect of angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory peptide from spinach Rubisco. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 4897–902, 2003.

YI, H. J.; KIM, J. Y.; KIM, K. H.; LEE, H. J. Anticancer activity of peptide fractions from egg white hydrolysate against mouse lymphoma cells. **Food Science and Biotechnology**, 12(3), 224–227, 2003.

YIN, L. J.; HSU, T. H.; JIANG, S. T. Characterization of acidic protease from *Aspergillus niger* BCRC32720. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, p. 662–666, 2013.

YU, Z.; YIN, Y.; ZHAO, W.; WANG, F.; YU, Y.; LIU, B.; LIU, J.; CHEN, F. Characterization of ACE-inhibitory peptide associated with antioxidant and anticoagulation properties. **Journal of Food Science**, v. 76, p. C1149–C1155, 2011a.

YU, Z.; YIN, Y.; ZHAO, W.; YU, Y.; LIU, B.; LIU, J.; CHEN, F. Novel peptides derived from egg white protein inhibiting alpha-glucosidase. **Food Chemistry**, v. 129, p. 1376–1382, 2011b.

ZAMBARE, V.; NILEGAONKAR, S.; KANEKAR, P. A novel extracellular protease from *Pseudomonas aeruginosa* MCM B-327: enzyme production and its partial characterization, **New Biotechnology**, v. 28, p. 173–181, 2011.

ZANPHORLIN, L. M. L. M.; CABRAL, H.; ARANTES, E.; ASSIS, D.; JULIANO, L.; JULIANO, M. A.; DA-SILVA, R.; GOMES, E.; BONILLA-RODRIGUEZ, G. O. Purification and characterization of a new alkaline serine protease from the thermophilic fungus *Myceliophthora* sp. **Process Biochemistry**, v. 46, p. 2137–2143, 2011.

ZHONG, F.; LIU, J.; MA, J.; SHOEMAKER, C. F. Preparation of hypocholesterol peptides from soy protein and their hypocholesterolemic effect in mice. **Food Research International**, v. 40, p. 661–667, 2007.

CAPITULO I

Produção, caracterização e estudos de cinética e termodinâmica da protease produzida por *Aspergillus*
avenaceus URM 6706

Submetido à revista:

Applied Biochemistry and Microbiology



PLEIADES PUBLISHING
Distributed by Springer

<http://pleiades.online/en/journal/appbio/>

PRODUÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E ESTUDOS DE CINÉTICA E TERMODINÂMICA DA PROTEASE PRODUZIDA
POR *Aspergillus avenaceus* URM 6706

A. C. Silva^a, E. F. T. da Silva^b, A. E. S. F. Queiroz^a, R. L. Oliveira^b, T. S. Porto^{a,b}, A. R. Sena^c, D. S. Ribeiro^b, C. M. Souza-
Motta^d, K. A. Moreira^{a,b*}

(a) Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal, Universidade Federal Rural de Pernambuco. R. Manuel de Medeiros, s/n, CEP: 52171-900, Recife - PE, Brasil.

(b) Unidade Acadêmica de Garanhuns, Universidade Federal Rural de Pernambuco. Av. Bom Pastor, s/n, Boa Vista, CEP: 55292-278, Garanhuns-PE, Brasil.

(c) Instituto Federal de Pernambuco, Fazenda Sapé, s/n, - Zona Rural, CEP: 55560-000, Barreiros-PE, Brasil.

(d) Departamento de Micologia, Universidade Federal de Pernambuco, Av. Moraes Rego, s/n, Cidade Universitária, CEP: 50670-901, Recife-PE, Brasil.

* Autor para correspondência: Unidade Acadêmica de Garanhuns, Universidade Federal Rural de Pernambuco. Avenida Bom Pastor, s/n, Boa Vista, CEP: 55292-278, Garanhuns-PE, Brasil. Telefone: (+5587) 37645520; FAX: 37645500; e-mail: moreirakeila@hotmail.com

RESUMO

O estudo relata a caracterização da protease produzida por *Aspergillus avenaceus* URM 6706, um fungo da Caatinga / Brasil. A otimização da produção foi 15,47 vezes maior que a produção obtida pelo planejamento estatístico Plakett-Burman. A protease possui pH ótimo de 7,0 e uma temperatura ótima de 50 °C. Após 180 minutos de ensaio de estabilidade, a atividade enzimática foi mantida a 96,7% e 80% em pH 7,0 e 40 °C, respectivamente. Não houve alteração significativa da atividade proteásica por ação dos íons metálicos estudados. Das substâncias surfactantes testadas, apenas SDS inibiu a atividade proteásica em 50%. A protease foi inibida por PMSF e apresentou valores de K_m , v_{max} e K_{cat} de 0,358 mg.mL⁻¹, 16,31 mg.mL⁻¹.minuto⁻¹ e 1,58 segundo⁻¹, respectivamente; uma energia de ativação (E_a) de 14,4 kJ.mol⁻¹ e uma variação de entalpia padrão (ΔH) do desdobramento enzimático reversível de 11,92 kJ.mol⁻¹. Assim, devido às condições ótimas de atividade, pH, temperatura e características da cinética e termodinâmica enzimática, a protease produzida por *A. avenaceus* URM 6706 pode ser utilizada industrialmente.

Palavras-chave: serino protease, fermentação submersa, planejamento estatístico e termodinâmica

1. Introdução

As proteases comerciais são produzidas principalmente a partir de micro-organismos que produzem cerca de 40% das proteases vendidas mundialmente. Essa participação dos micro-organismos se dá por serem excelentes fontes de enzimas devido à ampla diversidade bioquímica e susceptibilidade à manipulação genética. Dentre os micro-organismos que podem ser utilizados, os fungos filamentosos têm muitas vantagens por produzirem grandes quantidades de enzimas extracelulares [1].

Os fungos também são capazes de crescer em meios de produção de baixo custo [2] e oferecem uma vantagem adicional em relação às bactérias por tornarem o processo de purificação mais fácil [3]. O gênero *Aspergillus*, por exemplo, tem sido extensivamente estudado, pela capacidade de secretar níveis elevados de enzimas [4].

No entanto, existe a necessidade de se pesquisar novas fontes de proteases a partir de espécies fúngicas nativas [5]. Do ponto de vista comercial, a obtenção de proteases fúngicas requer a avaliação de parâmetros como a otimização da produção. Assim, o planejamento estatístico é usado como uma técnica para otimizar processos e é empregado com sucesso ao estudar os efeitos de múltiplos fatores na produção de enzimas proteolíticas [6].

Ademais, o potencial de aplicação de enzimas em processos industriais depende da sua atividade catalítica, isto é, depende da sua atividade e estabilidade sob diferentes condições físicas tais como pH e temperatura [7]. Assim, a caracterização de enzimas é uma etapa importante, sendo fundamental o estudo desses parâmetros nos processos enzimáticos para aplicação industrial [8].

Portanto, objetivou-se com este estudo otimizar a produção, caracterizar bioquimicamente e estudar os parâmetros cinéticos e termodinâmicos da protease produzida por *A. avenaceus* URM 6706.

2. Materiais e Métodos

2.1. Micro-organismo e preparação do inóculo

Aspergillus avenaceus URM 6706 foi isolado do solo da Caatinga e obtido da coleção de culturas URM do Departamento de Micologia da Universidade Federal de Pernambuco, Brasil. Foi mantido em meio de cultura Batata dextrose ágar (BDA) e seus esporos foram recolhidos de uma cultura com 5 dias de crescimento pela ação da solução de Tween 80 a 0,1% e padronizados numa concentração de 10^6 esporos.mL⁻¹.

2.2. Atividade proteásica

A atividade proteásica foi realizada segundo método de Leighton et al [9], com algumas modificações, em que 60 µL do extrato enzimático foram adicionados a 100 µL de azocaseína em tampão Tris-HCl (1,0%). A mistura reacional foi incubada por 1h à temperatura ambiente e interrompida pela adição de 480 µL de ácido tricloroacético (TCA) a 10% (p/v), seguida da centrifugação por 5 minutos a 8,000g e 4 °C. Do sobrenadante foram retirados 320 µL e adicionados a 560 µL de NaOH (1M). Uma unidade (U) da atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima capaz de hidrolisar a azocaseína de forma a aumentar 0,1 U da absorbância a 440 nm.

2.3. Determinação do conteúdo de proteínas totais no extrato enzimático

O método de Bradford [10] foi utilizado para quantificar o conteúdo de proteínas. A curva de calibração foi realizada a partir de soluções estoque de albumina de soro bovino (BSA) numa faixa de concentrações de 0-600 µg.mL⁻¹. As soluções foram submetidas a uma leitura da absorbância a 595nm em espectrofotômetro (Biochrom Libra S6®, Cambridge, Reino Unido).

2.4. Seleção de variáveis pelo planejamento Plackett-Burman

A produção da enzima foi realizada por fermentação submersa em frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL de meio inoculado com 10^6 esporos.mL⁻¹. As variáveis estudadas foram rotação, tempo de fermentação, temperatura, farinha de soja, extrato de levedura, soro de leite, glicose, peptona, MgSO₄, ZnSO₄, FeSO₄ e MnCl₂. A variável resposta foi a atividade proteásica E o delineamento proposto Plackett-Burman composto com 16 experimentos (PB16) para selecionar as variáveis de acordo com seus principais efeitos (Tabela 1).

2.5. Otimização da produção pelo Delineamento Composto Central (DCC)

Os níveis de quatro variáveis significativas selecionadas pelo Plackett-Burman e os efeitos de interação entre eles foram analisados e otimizados pela metodologia de superfície de resposta (RSM) usando o Delineamento Composto Central (DCC). As variáveis significativas utilizadas foram a rotação, temperatura, extrato de levedura e MgSO_4 . O delineamento experimental foi composto por 27 ensaios e as variáveis independentes foram estudadas em cinco níveis diferentes (Tabela 2).

2.6. Validação do modelo estatístico

Com o objetivo de confirmar as condições ideais previstas pelos planejamentos estatísticos empregados, experimentos adicionais foram realizados para validar o modelo proposto.

2.7. Efeito do pH na atividade e estabilidade enzimática

O pH ótimo foi determinado pelo emprego de diferentes tampões a 0,2 M, fosfato de sódio, Tris-HCl e carbonato-bicarbonato, numa faixa de pH entre 5,0 - 11,0. A estabilidade do pH foi avaliada, sujeitando-se o extrato enzimático aos mesmos tampões antes da reação enzimática iniciar. Foram retiradas alíquotas no intervalo de 0-180 minutos para se determinar a atividade proteásica ao longo do tempo.

2.8. Efeito da temperatura na atividade e estabilidade enzimática

A temperatura ótima foi determinada pela realização da atividade proteásica em diferentes temperaturas (30 - 80 °C). Para a estabilidade térmica, a enzima foi submetida as mesmas temperaturas previamente à reação e alíquotas foram retiradas no intervalo de 0-180 minutos para determinar a atividade proteásica ao longo do tempo.

2.9. Efeito de íons metálicos, agentes oxidantes, surfactantes e inibidores de protease

Os íons Mg^{2+} , Zn^{2+} , K^+ , Mn^{2+} , Na^+ , Ca^{2+} e Fe^{2+} foram testados quanto sua influência na atividade da enzima (10 mM em azocaseína a 1,0%). Em adição, a enzima foi incubada em diferentes concentrações de Tween 20, Tween 80, Triton X-100, SDS, PEG 2000, ureia e DMSO (1 e 5%), peróxido de hidrogênio e DTT (2 e 4%). Cada agente oxidante e surfactante foi adicionado ao extrato na proporção de 1:1 (v/v), essa mistura foi incubada por 30 minutos a 28 °C, seguida da determinação da atividade proteolítica.

A inibição da atividade enzimática também foi estudada por meio da adição dos seguintes inibidores de protease ao extrato enzimático bruto: EDTA (ácido etilenodiaminotetracético), PMSF (fluoreto de fenilmetanossulfonilo), ácido

iodoacético - todos estes inibidores a uma concentração de 1,0 e 10,0 mM, e pepstatina A a 0,05 e 1,0 mM. Cada inibidor foi adicionado ao extrato na proporção de 1:1 (v/v) por 30 minutos a 28 °C, antes da atividade proteásica.

2.10. Parâmetros cinéticos

Para a determinação dos parâmetros cinéticos, oito diferentes concentrações de azocaseína (0,2-1,6 mg.mL⁻¹) com a concentração constante de protease foram consideradas. Os ensaios foram realizados utilizando a atividade proteásica padrão. Os parâmetros cinéticos (K_m , v_{max} , K_{cat} e K_m/K_{cat}) foram calculados a partir do gráfico Lineweaver–Burk.

2.11. Termodinâmica da reação enzimática

Os parâmetros termodinâmicos foram investigados no intervalo de temperatura de 25-70 °C. A energia de ativação (E_a) e de desativação (E_d) foram obtidas da curva com inclinação linear da equação de Arrhenius (Equação 1) no gráfico de $\ln(k)$ versus $1/T$, onde k é a constante de inativação enzimática em razão do aumento de temperatura T (em Kelvin). Os valores de $\Delta H_{a,d}$, $\Delta S_{a,d}$ e $\Delta G_{a,d}$ para ativação (a 25 °C) e desativação (45-70 °C) enzimática foram calculados de acordo com as Equações 2, 3 e 4, onde R é a constante ideal dos gases (8.314 J.K⁻¹.mol⁻¹), k_b e h são as constantes de Boltzmann ($1.38064852 \times 10^{-23}$ m².kg.s⁻².K⁻¹) e de Planck ($6.62607004 \times 10^{-34}$ m².kg.s⁻¹), respectivamente.

$$\ln(K) = -\frac{E_{a,d}}{T} \cdot \frac{1}{T} \quad (1)$$

$$\Delta H_{a,d} = E_a - RT \quad (2)$$

$$\Delta S_{a,d} = \frac{\Delta H - \Delta G}{T} \quad (3)$$

$$\Delta G_{a,d} = -RT \frac{K_{cat} h}{K_b T} \quad (4)$$

Onde K_b , h , ΔH , ΔS e R são constante de Boltzmann, constante de Planck's, entropia de inativação, entalpia e constante universal dos gases, respectivamente.

2.12. Valores de D , Z e Q_{10} e determinação do tempo de meia vida

O valor de D corresponde à redução decimal, sendo o tempo necessário para reduzir a velocidade da reação a 10%. Foi determinado segundo Equação 5. O valor Z foi obtido pelo inverso do coeficiente angular construído em linha reta do log (D) versus a temperatura ($^{\circ}\text{C}$).

$$D = \frac{2,3026}{K_d} \quad (5)$$

O tempo necessário para que a atividade residual da enzima atinja 50% da inicial é definido como o tempo de meia-vida, que foi estimado como exposto na Equação 6, e o valor Q_{10} pela Equação 7:

$$t_{1/2} = \ln 2 / K_d \quad (6)$$

$$Q_{10} = 10^{10/z} \quad (7)$$

2.13. Atividade enzimática integral

Devido à desnaturação da enzima, a atividade da enzima torna-se uma função do tempo. Por conseguinte, a atividade integral, P (mM), pode ser predita por um processo contínuo por meio da integração do produto de protease e o coeficiente de atividade [11]. Atividade integral da protease foi calculada pela Equação 8:

$$P(t) = \int A_0 \psi dt = \int A_0 \exp(-k_d t) dt = \frac{A_0}{k_d} [1 - \exp(-k_d t)] \quad (8)$$

2.11. Análises estatísticas

Após a obtenção dos resultados, foi realizada uma análise de variância (ANOVA) utilizando o software Statistica versão 7.0 (StatSoft Inc.) para indicar variáveis estatisticamente significantes ($p < 0,05$ para DCC e $p < 0,1$ para PB) e ajuste do modelo aos dados experimentais. Todos os ensaios foram realizados de forma aleatória.

3. Resultados

3.1. Otimização da produção de protease por *Aspergillus avenaceus* URM 6706

Doze variáveis foram analisadas usando o planejamento estatístico Plackett-Burman e seus efeitos na produção de protease por *A. avenaceus* URM 6706 foram analisados. A produção de protease variou de 0,667 a 6,177 U.mL⁻¹, um

aumento de aproximadamente 9,17 vezes para a variável resposta. A análise de variância (Tabela 2) mostrou que a regressão foi significativa ($p < 0,1$) e que o coeficiente de determinação (R^2) foi de 0,96, indicando que 96% da variação total das respostas pode ser explicada pelo modelo. O experimento também indicou que a protease produzida por *A. avenaceus* URM 6706 não foi muito afetada pelas seguintes variáveis: tempo, farinha de soja, soro de leite, glicose, peptona, $ZnSO_4$, $FeSO_4$ e $MnCl_2$. Por outro lado, observou-se que a temperatura, rotação, extrato de levedura e $MgSO_4$ foram estatisticamente significativos ($p < 0,1$) no campo experimental estudado (Tabela 3). No entanto, tais variáveis causaram efeitos negativos, indicando que ao diminuir a temperatura de 32 para 26 °C, a rotação de 120 a 90 rpm, a concentração de extrato de levedura de 1,0 a 0,25% e a concentração de $MgSO_4$ de 0,5 a 0,1% há um aumento na produção da protease. As variáveis que não obtiveram efeito significativo na produção de protease no estudo, foram mantidas em seus menores níveis.

O RSM foi utilizado para caracterizar efeitos individuais e interativos de quatro variáveis independentes (extrato de levedura, rotação, temperatura e concentração de $MgSO_4$) utilizando o DCC. Estas variáveis foram selecionadas como significativas, ou seja, que influenciaram a produção de protease de acordo com o planejamento Plakett-Burman. A produção de protease e os ensaios do planejamento experimental são apresentados na Tabela 4. A produção máxima de protease (aproximadamente $10,32 \text{ U.mL}^{-1}$) foi atingida no ensaio composto por 0,5% de glicose, 0,5% de farinha de soja, 0,75% de extrato de levedura e 0,5% de $MgSO_4$, representando uma atividade proteásica 15,47 vezes maior que o menor resultado obtido pelo método de Plakett-Burman ($0,66 \text{ U.mL}^{-1}$).

A análise dos dados experimentais foi realizada por regressão múltipla e indicou que variáveis independentes e variáveis dependentes estão relacionadas pela seguinte equação polinomial de segunda ordem com 15 coeficientes:

$$Y = -79.38 + 1.03X_1 - 0.002X_1^2 + 1.57X_2 + 0.003X_2^2 + 39.78X_3 + 3.04X_3^2 + 5.05X_4 + 4.15X_4^2 - 0.02X_1X_2 - 0.13X_1X_3 - 0.10X_1X_4 - 1.10X_2X_3 + 0.01X_2X_4 - 3.60X_3X_4 \quad (9)$$

Onde, Y é o valor predito (atividade proteásica), e X_1 , X_2 , X_3 e X_4 são rotação, temperatura, extrato de levedura e concentração de $MgSO_4$, respectivamente.

A análise de variância (ANOVA) do modelo da superfície resposta representada na Equação 9 é demonstrada na Tabela 5. O teste F de Fisher, indicou que a Equação 9 ajustada foi estatisticamente significativa ($F_{cal} > F_{tab}$) e que a falta de ajuste mostrou boa concordância ($F_{cal} < F_{tab}$) entre o modelo de resposta predita e os valores experimentais. A qualidade do ajuste do modelo foi medida pelo coeficiente de determinação (R^2). O valor de R^2 foi de 0,85, indicando que 85% da variação total na atividade residual foi explicada pelo modelo ajustado.

Os efeitos das variáveis e das interações são mostrados na Tabela 6. Os resultados do delineamento composto central demonstraram que a temperatura e o extrato de levedura, linearmente, e a rotação, linear e quadraticamente, foram estatisticamente significativos ($p < 0,05$) para a produção da enzima. Destes, apenas a rotação, linearmente, teve efeitos positivos. A rotação foi a variável que mais afetou a produção de enzimas no campo experimental. As interações significantes foram entre temperatura e rotação, rotação e extrato de levedura, temperatura e extrato de levedura e todos apresentaram efeitos negativos. A Tabela 6 e a Equação 9 confirmam estes resultados.

O rendimento máximo para a produção de proteases foi determinado analisando superfícies de resposta. Os resultados previstos mostraram que a produção máxima de protease é obtida nas seguintes condições: 0,0% de extrato de levedura ($p.v^{-1}$), 0,0% de $MgSO_4$ ($p.v^{-1}$), 26 °C e 130 rpm, além das demais variáveis utilizadas no início do experiment em seus menores níveis. O valor máximo previsto para a atividade enzimática foi de 13 $U.mL^{-1}$. Os experimentos foram realizados nas condições previstas para confirmar resultados de otimização. Nestas condições, a produção de protease atingiu $\pm 12,19 U.mL^{-1}$ (um aumento de 18,37 vezes), valor próximo ao previsto. Este resultado indica a validação do modelo e a existência de um ponto ótimo. Este ensaio foi o utilizado para a produção da protease a ser testada nas fases seguintes do experimento.

3.2. Efeito do pH e temperatura na atividade e estabilidade enzimáticas

O pH ótimo para a atividade da protease produzida por *A. avenaceus* URM 6706 foi 7,0 em tampão Tris-HCl (Figura 2). Embora a enzima tenha seu pH ótimo neutro, a atividade foi mantida acima de 60% em todas as soluções tampão testadas e, especificamente, acima de 90% em toda a faixa de tampão Tris-HCl. A protease produzida por *A. avenaceus* URM 6706 foi estável a uma certa faixa de valores de pH e permaneceu ativa em todos valores de pH testados, mesmo após 180 minutos de ensaio. A atividade residual após os 180 minutos de ensaio foi maior que 40% e 96,7% no pH mais ácido e ótimo, respectivamente (Figura 2).

Os efeitos da temperatura (Figura 3) foram diretamente proporcionais à atividade da protease até os 50 °C. A enzima produzida por *A. avenaceus* URM 6706 teve temperatura ótima a 50 °C, correspondendo a 100% da atividade. Contudo, aos 55 °C, a atividade da protease manteve-se próxima da atividade ótima (92%). A enzima foi estável a uma determinada faixa de temperaturas, mantendo uma atividade superior a 80% após 180 minutos (Figura 3) até 40 °C. A partir de 45 °C, a atividade declinou significativamente.

3.3. Efeitos de íons metálicos, agentes oxidantes, tensoativos e inibidores de protease

Foi possível observar que a protease produzida por *A. avenaceus* URM 6706 não teve sua atividade prejudicada na presença de nenhum dos íons metálicos testados. A Tabela 7 mostra os efeitos desses íons na atividade da protease; os íons Fe^+ e Mg^{2+} potencializaram a atividade proteásica em quase 18% e 5% dos casos, respectivamente.

Na presença de substâncias tensoativas, a protease produzida por *A. avenaceus* URM 6706 apresentou bom desempenho, atingindo um desempenho de mais de 80% na maioria dos ensaios. Apenas o SDS a 1% inibiu a atividade da protease em 50%. Entre todos os inibidores testados, o PMSF proporcionou uma grande inibição na atividade da protease: 88,29% (1mM) e 89,15% (10 mM), respectivamente. O EDTA a 10 mM também inibiu a atividade, mas numa proporção muito mais baixa (2,5%).

3.4. Parâmetros cinéticos

Os valores de K_m , v_{\max} e K_{cat} para a protease produzida por *A. avenaceus* URM 6706 foram obtidos utilizando-se o gráfico Lineweaver-Burk: $0,358 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, $16,31 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1} \text{ minuto}^{-1}$ e $1,58 \text{ segundo}^{-1}$, respectivamente. A constante de especificidade (K_{cat}/K_m) obtida foi de $4,430 \text{ mL}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{minuto}^{-1}$.

3.5. Termodinâmica da reação enzimática

A protease produzida por *A. avenaceus* URM 6706 requer $14,4 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ (E_a) para ser ativada e $100,3 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ são necessários para inativá-la (E_d). A entalpia de ativação ΔH da protease obtida por *A. avenaceus* URM 6706 foi de $11,92 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ e a energia livre para a ativação do substrato de ligação (ΔG_{E-S}) e a energia livre para a formação do complexo de ativação (ΔG_{E-T}) foram $-1,1495$ e $1,1494 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$, respectivamente.

De acordo com a Tabela 8, os valores de entropia de desativação (ΔS_d) obtidos foram negativos e baixos em todas as temperaturas testadas ($-0,0223$ a $-0,01966 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$). A energia livre e desnaturação ΔG_d encontrada para a protease estudada foi $104,13 - 104,77 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$. Os valores mais baixos foram encontrados na faixa de desempenho ótimo ($101,75 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ a 55°C). A meia-vida ($t_{1/2}$) de uma enzima a uma determinada temperatura é o tempo necessário para se atingir a metade da atividade inicial. Por sua vez, a redução do tempo decimal (valor D) é definida como o tempo necessário para reduzir 90% da atividade enzimática inicial. Observou-se que a protease produzida por *A. avenaceus* URM 6706 apresentou resistência térmica (Tabela 8); na faixa de temperatura ótima da enzima, sua atividade inicial foi reduzida em 90% após 921,2 e 159,9 minutos de reação a 45 e 55°C , respectivamente. A protease produzida por *A. avenaceus* URM 6706 apresentou um valor Z de $20,7^\circ \text{C}$. Neste estudo, ao aumentar a temperatura em 10°C , a velocidade de desnaturação aumenta três vezes; assim, o valor de Q_{10} foi 3,04.

A atividade integral de semividas ($P_{1/2}$) foi calculada pela Equação 8 (Tabela 8). O padrão descrito pela Equação 8 está ilustrado na Figura 7, em que a atividade total esperada na faixa de temperatura de 45-70 °C foi traçada em relação ao tempo num gráfico bi-log. Esta é uma pequena diferença resultante do fato de que a desnaturação da enzima torna-se importante após um tempo relativamente longo. Além disso, o tempo de desnaturação desta enzima torna-se menor a temperaturas mais elevadas (65-70 °C) devido a um valor de K_d mais elevado (Tabela 8).

4. Discussão

4.1. Otimização da produção de proteases por *Aspergillus avenaceus* URM 6706

A abordagem clássica para a otimização do meio de cultura para produção enzimática pode ser um processo demorado e de mão-de-obra intensiva, não existindo um meio de cultura padrão para a produção de proteases por diferentes micro-organismos. Cada micro-organismo requer condições específicas necessárias para uma produção máxima de enzimas [12]. No entanto, o planejamento estatístico Plackett-Burman mostrou ser uma ferramenta prática e valiosa para uma rápida avaliação dos efeitos de vários componentes do meio. Porém, por ser uma técnica preliminar de otimização que testa somente dois níveis de cada fator, não pode fornecer a quantidade ótima de cada fator necessário para uma produção ótima de enzima. No entanto, pode indicar como cada fator tende a afetar o crescimento e a produção enzimática por micro-organismos [13].

Sabe-se que muitos fatores, especialmente a composição do meio, podem afetar a produção de proteases. Fontes de carbono e nitrogênio são os constituintes mais relevantes que influenciam a produção de tais enzimas [14] e ambos apresentam efeitos reguladores na síntese enzimática [12]. O estabelecimento de concentração de extrato de levedura como variável significativa para a produção enzimática corrobora com Abidi et al. [15] que avaliaram o efeito de diversas variáveis na produção de proteases por *Botrytis cinerea*, um fungo filamentoso. Os efeitos das condições ambientais na produção de enzimas proteolíticas extracelulares podem ser relevantes para a indução ou repressão de uma enzima devido a compostos específicos [16]. Quanto à rotação, uma vez que o fungo filamentoso é um micro-organismo formador de hifas, uma maior rotação do meio pode causar ruptura dessas estruturas, dificultando a estabilidade estrutural do fungo. A produção de protease por micro-organismos pode ser também influenciada por íons metálicos presentes no meio [17]. Neste caso, o aumento da produção de protease pode ser consequência da diminuição na concentração de $MgSO_4$, sugere que a presença deste sal pode inibir a produção de protease por *A. avenaceus* URM 6706. Ao estudar a produção de protease por *Streptomyces* sp., Singh e Chhatpar [14] identificaram as variáveis $ZnSO_4$, $FeCl_3$, resíduos de camarão e pH inicial do meio como constituintes que influenciam a produção de protease.

A metodologia de superfície de resposta (RSM - Response Surface Methodology), uma abordagem estatística, tem uma vantagem sobre a abordagem tradicional, uma vez que o último considera o efeito de uma variável de cada vez fazendo

dele um processo demorado. Por outro lado, a RSM permite avaliar interações combinadas entre vários parâmetros físico-químicos [13] e têm sido empregada na produção de protease microbiana ao longo do tempo por diversos pesquisadores [1, 12, 13].

Os valores otimizados, no campo experimental, são calculados por sua diferenciação parcial em relação à temperatura, rotação, extrato de levedura e $MgSO_4$, ou pela análise de superfície de resposta. Gráficos de superfície de resposta (Figura 1) foram plotados para determinar níveis ótimos de variáveis independentes de acordo com a Equação 9. Como para modelos quadráticos, o ponto ótimo é caracterizado em pontos máximo, mínimo ou de sela. Os gráficos de superfície de resposta obtidos no experimento foram caracterizados como ponto de sela. Neste caso, os valores ótimos foram determinados analisando as superfícies de resposta das interações significativas. As regiões de otimização foram aparentes.

O efeito relativo da temperatura e da rotação na produção de protease é mostrado na Figura 1A. A mudança de rotação, de 75 a 135 rpm, resultou em um aumento da produção de enzima em média de $2,8 U.mL^{-1}$ quando em baixas temperaturas. No entanto, se o ensaio for realizado em temperaturas mais elevadas e com um aumento de 75 a 135 rpm, a produção de protease diminuiu para $4,3 U.mL^{-1}$. Ocorreu uma perda na atividade enzimática com o aumento da concentração de extrato de levedura a níveis de rotação mais elevados (Figura 1B). Ao aumentar a concentração do extrato de levedura de 0 para 1,0%, a perda na produção de enzima foi de $4,4 U.mL^{-1}$. No entanto, com uma menor rotação e uma diminuição na concentração de extrato de levedura, a atividade de protease aumentou. A Figura 1C mostra que houve uma perda de atividade enzimática com o aumento da temperatura a níveis mais elevados de concentração de extrato de levedura. Contudo, a níveis de concentração de extrato de levedura mais elevados, a atividade enzimática aumenta diminuindo a temperatura. Isto indica a presença de efeitos de interação negativa estatisticamente significativos entre estas duas variáveis sobre a produção de protease.

4.2. Efeito do pH na atividade e estabilidade enzimáticas

O pH ótimo para a atividade de protease produzida por *A. avenaceus* URM 6706 foi 7,0 em tampão Tris-HCl (Figura 2). No entanto, embora a enzima tenha pH ótimo neutro, manteve a atividade acima de 60% em todas as soluções tampão testadas e, especificamente, acima de 90% em toda faixa de pH em tampão Tris-HCl. A protease produzida por *A. fumigatus* [2] e *A. parasitus* [18] também alcançaram uma atividade ótima a pH 7,0, porém, houve atividade abaixo de 60%, sendo a menor inferior a 40% para a protease produzida por *A. parasiticus*. No entanto, existem proteases produzidas por outras espécies de fungos que possuem atividade ótima em pH ligeiramente ácido, como a protease produzida por *A. oryzae* KSK-3 que teve como ótimo o pH 6,0 [19], e em pH alcalino, que é o caso da protease produzida por *Beauveria sp.* com pH ótimo na faixa de pH entre 8,0 e 10,0 [20].

A protease produzida por *A. avenaceus* URM 6706 foi estável numa faixa de pH e permaneceu ativa em todos os valores testados mesmo após 180 minutos. A atividade residual foi maior que 40% e 96,7% ao pH mais ácido e ótimo após 180 minutos, respectivamente (Figura 2). Shirasaka et al. [19], estudando a protease produzida por *A. oryzae* KSK-3, observou que atingiu mais de 20% da atividade relativa 4 horas após o teste realizado a 37 °C. A protease produzida por *Beauveria* sp. MTCC5184 foi altamente estável na faixa de pH de 3 a 11 à temperatura ambiente durante 1 hora, com uma estabilidade máxima a pH 7,0 [20]. Estudos de Hajji et al. [21] relataram que a serino protease produzida por *A. clavatus* ES1 foi estável a 4 °C e em pH 8-9 e manteve aproximadamente 68 e 54% de atividade residual a pH 7,0 e 10,0, respectivamente. *A. nidulans* HA-10 produziu uma protease estável a 37 °C em pH 6-10 durante 1 h [22]. No entanto, a protease produzida por *Fusarium* sp. BLB foi estável em pH 3-9 até 1 h a 37 °C [23]. Efeito da temperatura na atividade e estabilidade enzimática

O efeito da temperatura (Figura 3) foi diretamente proporcional à atividade da protease até os 50 °C. A enzima produzida por *A. avenaceus* URM 6706 tem temperatura ótima de 50 °C, correspondendo a 100% da atividade relativa. Contudo, a 55 °C, a atividade da protease manteve-se muito próxima da atividade ótima (92%).

Entre 35 e 55 °C, a protease produzida por *A. avenaceus* URM 6706 obteve seu melhor desempenho, mantendo sua atividade acima de 70%. A atividade mais baixa foi a 70 °C (22%), isto pode estar relacionado à desnaturação da enzima resultante da quebra de ligações químicas promovidas pela energia térmica. Savitha et al. [24] e Shankar et al. [20] identificaram a temperatura ótima da atividade das serino proteases produzidas por *Graphium putredinis* e *Beauveria* sp. MTCC5184 também a 50 °C.

A enzima foi estável a uma determinada faixa de temperatura, mantendo a atividade superior a 80% após 180 minutos de teste (Figura 3) e até 40 °C. A partir de 45 °C, a atividade proteásica diminuiu significativamente. Corroborando com os resultados obtidos neste estudo, a protease produzida por *A. oryzae* [25] obteve melhor atividade entre 35 e 45 °C. Resultados inferiores foram registrados para a protease produzida por *A. parasiticus* [18], cuja estabilidade térmica foi estudada em sua temperatura ótima (50 °C). No entanto, após uma hora de incubação, a enzima manteve apenas 32% da sua atividade residual e no final da segunda hora e da terceira hora, manteve-se apenas 7,5% e 2,7% da atividade, respectivamente.

4.4. Efeito de íons metálicos, agentes oxidantes e tensioativos e inibidores de proteases

Os íons metálicos são capazes de proteger as enzimas contra à desnaturação térmica, função muito importante para manter a conformação nativa de enzimas a temperaturas mais elevadas [24]. Foi possível observar que a protease produzida por *A. avenaceus* URM 6706 não teve sua atividade prejudicada pela presença de nenhum dos metais testados. A Tabela 7 mostra os efeitos dos íons metálicos na atividade da protease. Os íons Fe^+ e Mg^{2+} potencializaram a atividade da protease em

quase 18% e 5%, respectivamente. As proteases produzidas por *A. clavatus* ES1 e *A. parasiticus* também apresentaram atividade potencializada na presença de Mg^{2+} [20, 26]. No entanto, para a protease produzida por *Beauveria* sp. MTCC5184, Fe^{3+} inibiu sua atividade em aproximadamente 20% [20].

Em relação aos outros íons testados, não houve diferença significativa. A menor atividade obtida foi de 84% na presença de Mn^{2+} . Já a protease produzida por *Graphium putredinis* [24] teve atividade enzimática residual de 61 e 32% na presença de Ca^{2+} e Zn^{2+} , respectivamente e a protease produzida por *A. oryzae* KSK-3 foi ligeiramente inibida por $AlCl_3$ e $PbCl_2$, mas, $MnCl_2$ promoveu o aumento da atividade enzimática [19].

A protease produzida por *A. avenaceus* URM 6706 apresentou bom desempenho na presença de substâncias tensoativas, atingindo um desempenho de mais de 80% na maioria dos ensaios. Apenas o SDS (1%) inibiu a atividade da protease em 50%. A protease produzida por *A. parasiticus* foi estável na presença de Triton-X, Tween 80 e ureia, tendo a sua atividade aumentada pela ação do DTT a 5 e 10 mM (mais de 50%). O SDS diminuiu sua atividade em aproximadamente 50% [18]. São estas, portanto, características importantes para a viabilização da aplicação industrial da enzima.

Entre todos os inibidores testados, o PMSF proporcionou uma grande redução na atividade da protease: 88,29% e 89,15% a 1 e 10 mM, respectivamente. O EDTA a 10 mM também inibiu a atividade, mas numa proporção muito mais baixa (2,5%). No entanto, todos os outros inibidores potencializaram a atividade de protease. O fato do PMSF inibir quase 90% da atividade da protease sugere que a protease produzida por *A. avenaceus* URM 6706 é uma serino protease. Estudos mostram que outras espécies de fungos filamentosos, como *A. clavatus*, *Graphium putredinis* e *A. parasiticus*, também produziram serino proteases [3, 18].

4.5. Parâmetros cinéticos

Comparada com outras proteases de *Aspergillus*, a v_{max} da protease produzida por *A. avenaceus* URM 6706 pode ser considerada baixa. Por exemplo, v_{max} de $3463,34 \text{ U} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ da protease produzida por *A. parasiticus* foi apresentada [18] e $357,14 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ relativa à protease produzida por *A. foetidus* [27]. Estes resultados podem ser explicados devido à purificação enzimática. A protease produzida por *A. avenaceus* URM 6706 foi testada em seu extrato bruto; contudo, a protease produzida por *A. parasiticus* foi em estado puro [18].

A protease produzida por *A. avenaceus* URM 6706 mostrou alta especificidade pelo substrato e o valor de K_m foi menor do que as proteases mencionadas acima: $1,04 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ para *A. parasiticus* [18] e $1,92 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ para *A. foetidus* [27]. Espera-se que valores de K_m baixos sejam obtidos por enzimas puras, o que sugere que a protease produzida por *A. avenaceus* URM 6706 tem uma afinidade elevada para o substrato testado, a azocaseína. Este resultado pode melhorar ainda mais após a sua purificação, semelhante a um K_m de $0,08 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ para a protease pura produzida por bactérias

haloalcalifílicas [26]. As proteases bacterianas purificadas também tinham uma especificidade inferior à protease no extrato bruto deste estudo: 5,1 mg.mL⁻¹ para *Beauveria* sp. [20] e 1,3 mg.mL⁻¹ para *Alkalibacillus* sp. [28].

Um número de renovação (*turnover number*), K_{cat} é definido como o volume de substrato que a enzima que é capaz de hidrolisar, neste caso, 1,58 mol de substrato por segundo, uma vez que o *turnover number* é uma medida da eficiência catalítica. Quando são utilizados catalisadores dispendiosos, o *turnover number* deve ser o mais elevado possível para reduzir o custo do produto [29]. Os valores de K_{cat} podem variar entre 1 e 107.s⁻¹, a protease produzida por *A. avenaceus* URM 6706 não apresentou *turnover number* elevado, diferindo da protease alcalina produzida por *Rhizopus oryzae*, que tinha um valor de K_{cat} de 3,8x102.s⁻¹ [30].

O potencial catalítico considerado pelo *turnover number* elevado só pode ser expresso em concentrações de substrato elevadas (concentrações saturantes), o que é raramente alcançado. Portanto, uma constante alternativa (constante de especificidade), pode ser aplicada e definida: K_{cat}/K_m . Esta razão mensura a eficiência com que uma enzima converte o substrato em um produto com baixas concentrações de substrato. A unidade pode ser expressa em mL.mg⁻¹.minuto⁻¹. A relação foi de 4,430 mL.mg⁻¹.minuto⁻¹ em relação à protease deste estudo.

4.6. Termodinâmica da reação enzimática

A termodinâmica da reação enzimática pode ser dividida em termodinâmica de ativação e de inativação. De acordo com Whitaker, 1994 [31], a energia de ativação necessária para a conversão de reagentes em produtos está dentro da faixa de 25,12 a 62,82 kJ.mol⁻¹. Contudo, como as inclinações das linhas da Figura 4 mostram que para ativar a protease produzida por *A. avenaceus* URM 6706 é necessária uma energia de ativação (E_a) de 14,4 kJ.mol⁻¹. Este valor está abaixo dos valores acima mencionados encontrados em estudos semelhantes. Os valores 62, 31,97 e 19,03 kJ.mol⁻¹ foram relatados para uma serino protease neutra de *A. fumigatus* [2], uma protease alcalina produzida por *Nocardiaopsis alba* [32] e uma protease ácida produzida por *A. foetidus* [27], respectivamente.

No entanto, quando se obtém uma energia de ativação baixa, menos energia é necessária para se iniciar a reação, neste caso, a formação de complexo ativo de hidrólise da azocaseína. Isto indica uma eficiência catalítica da enzima e uma redução de custos, confirmando a sua aplicação industrial.

Quanto à entalpia de ativação (ΔH), quanto menor seu valor, mais eficiente é a formação do estado de transição ou do complexo ativado entre a enzima e o substrato [33]. A ΔH de ativação da protease obtida a partir de *A. avenaceus* URM 6706 (11,92 kJ.mol⁻¹) demonstra que esta enzima requer menos energia que a protease produzida por *A. foetidus*, que apresentou uma variação de entalpia de 90,35 kJ.mol⁻¹ [27]. A energia livre para a ativação da ligação ligação entre a enzima e substrato (ΔG_{E-S}) e a energia livre para a formação do complexo de ativação (ΔG_{E-T}) foram de -1,1495 e 1,1494 kJ.mol⁻¹,

respectivamente, para a protease produzida por *A. avenaceus* URM 6706. Os valores de ΔG_{E-S} e ΔG_{E-T} confirmaram maior afinidade da enzima ao substrato solúvel para hidrólise e sua conversão espontânea em produto, necessitando assim de menos energia [34].

Por outro lado, a inativação de enzimas é o principal fator limitante do emprego de enzimas no setor industrial. Neste contexto, são necessários $100,3 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ para inativar (E_d) a protease em estudo. Isto foi observado pelas inclinações das linhas apresentadas na Figura 5 e por uma variação de entalpia de desnaturação (ΔH_d) entre $97,64$ e $97,43 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ a 55 e $70 \text{ }^\circ\text{C}$, respectivamente. Para a protease produzida por *A. fumigatus*, $69 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ são necessários para a desnaturação enzimática [2], mostrando que esta enzima necessita de uma menor energia para ser inativada. Sabe-se que os valores de ΔH_d de desnaturação são altamente influenciados por vários fatores, incluindo o solvente e a estrutura [33]. Neste caso, assume-se que a força de uma ligação não covalente é de $5,4 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ [35], a formação da protease de estado de transição é acompanhada pela interrupção de aproximadamente 18 ligações a $55 \text{ }^\circ\text{C}$.

No entanto, a extensão da desnaturação térmica da enzima também depende da entropia de desativação (ΔS_d) desse evento. Ele expressa a quantidade de energia por grau envolvido na transição de um estado nativo para um estado desnaturado [27]. Assim, valores positivos de entropia sugerem que o desdobramento da enzima pode ser um passo importante para uma inativação térmica irreversível. Isto também significa que valores positivos e baixos estão relacionados a uma pequena desordem no sistema. Portanto, quanto maior a entropia, maior a energia interna da enzima, o que pode causar uma quebra de suas ligações moleculares e, conseqüentemente, de sua estrutura molecular que a depender da temperatura pode ser irreversível ou não. De acordo com a Tabela 8, os valores de ΔS_d obtidos a partir do teste da protease produzida por *A. avenaceus* URM 6706 foram negativos e baixos em todas as temperaturas testadas ($-0,0223$ a $-0,01966 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$). Valores de entropia mais elevados foram encontrados para proteases produzidas por *A. foetidus* ($0,599$ - $0,610 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$) [27] e *A. fumigatus* ($-0,069 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$) [2].

A energia livre de Gibbs para a desnaturação enzimática (ΔG_d) é outro parâmetro relevante para a aplicação industrial de enzimas, pois, segundo ele, é possível observar se a reação de formação do produto é espontânea, equilibrada ou não espontânea. Para obter seu valor, tanto a entalpia como a entropia são consideradas. É assim uma ferramenta para avaliar de forma precisa e confiável a estabilidade enzimática. Quando uma reação ocorre espontaneamente, ela está associada a um valor de ΔG_d menor ou até mesmo negativo, indicando que a enzima se tornou instável e, portanto, facilmente desnaturada [27]. Ainda, valores elevados de ΔG_d indicam que a enzima tem uma certa resistência à desnaturação ou é mais termoestável [32]. O ΔG_d encontrado para a protease estudada foi de $104,13$ a $104,77 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$.

Esses valores encontrados neste estudo são menores do que os encontrados para *A. foetidus*, $103,1$ e $113,8 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ a 55 e $70 \text{ }^\circ\text{C}$, respectivamente [27] e maiores que os encontrados para *A. fumigatus* $89,2 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ a $50 \text{ }^\circ\text{C}$ e $90,2 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ a 60

°C) [2]. Um valor inferior ou negativo pode ser associado a um processo mais espontâneo, isto é, a enzima se torna menos estável e sofre facilmente desnaturação. Isto está de acordo com a progressiva perda de atividade da protease produzida por *A. avenaceus* URM 6706 com o aumento da temperatura. Pelo contrário, um aumento deste parâmetro revela um aumento na resistência à desnaturação ou uma estabilidade térmica aumentada [27, 32].

O tempo de meia-vida ($t_{1/2}$) de uma enzima a uma determinada temperatura é o tempo para atingir a metade da atividade inicial. Por sua vez, a redução do tempo decimal (valor D) é definida como o tempo necessário para reduzir 90% da atividade enzimática inicial. É importante encontrar altos valores de $t_{1/2}$ e D porque indicam resistência enzimática à inativação térmica, fator desejável para aplicação industrial [36]. Ao analisar os resultados apresentados na Tabela 8, observa-se que o $t_{1/2}$ diminuiu progressivamente à medida que a temperatura aumentava. No entanto, a constante de inativação térmica específica de primeira ordem da protease (K_d) aumentou de forma constante com o aumento da temperatura. Isto significa que a desnaturação irreversível tornou-se cada vez mais significativa [27]. A 45 °C, o valor de K_d foi o menor encontrado, 4.3333E-05 (s^{-1}); nestas condições, a enzima perde apenas metade da sua atividade inicial após 277 minutos de ensaio e à 70 °C, após 19,9 minutos.

O valor D , uma redução de tempo decimal, representa a resistência enzimática a uma determinada temperatura. O valor Z , expresso em °C, é equivalente à dependência da variação de temperatura para a desnaturação por fatores termodegradáveis. Este parâmetro indica o intervalo de variação de temperatura (aumento ou diminuição), gerando uma alteração no ciclo de $\log D$ [8]. De acordo com os valores de D (Tabela 8), pode-se observar que à medida que a temperatura aumenta, há uma diminuição no valor D . Quanto menor o tempo que a enzima suportou a temperatura, maior a temperatura.

Na faixa de temperatura ótima da enzima, sua atividade inicial foi reduzida em 90% após 921,2 e 159,9 minutos de reação a 45 e 55 °C, respectivamente. A protease produzida por *A. niger* LBA02 possui valor D de 127,22 minutos a 45 °C, e 48,37 minutos a 55 °C [36]. A protease produzida por *A. avenaceus* URM 6706 apresentou um valor Z de 20,7 °C. A partir das inclinações das linhas ilustradas na Figura 6, a variação da temperatura acima ou abaixo do valor Z gera mudança de um ciclo logarítmico no valor D . É importante notar que, se o valor Z for baixo, uma pequena variação na temperatura pode afetar grandemente a estabilidade da enzima [8]. Os efeitos da temperatura na taxa de reação foram medidos em termos de quociente de temperatura (Q_{10}). Esta é a velocidade de desnaturação enzimática (refletida no valor de K). Neste estudo, ao aumentar a temperatura em 10 °C, a velocidade de desnaturação aumenta três vezes, assim, o valor Q_{10} foi 3,04.

Um aumento na estabilidade térmica da enzima geralmente ocorre com uma diminuição da atividade e vice-versa. Um entendimento perfeito entre essas tendências opostas deve ser alcançado para escolher as melhores condições de aplicação em processos industriais [11]. Para este efeito, calculou-se a atividade integral de semividas ($P_{1/2}$) pela Equação 8 (Tabela 8). O padrão descrito pela Equação 8 está ilustrado na Figura 7, em que a atividade total esperada na faixa de

temperatura 45-70 °C foi traçada em relação ao tempo num gráfico bi-log. Todas as curvas aumentaram linearmente com uma taxa correspondente entre 1 e 2. Esta é uma pequena diferença resultante do fato de que a desnaturação da enzima só tornar-se importante após um tempo relativamente longo. Além disso, o tempo de desnaturação desta enzima torna-se menor a temperaturas mais elevadas (65-70 °C) devido a um valor de K_d mais elevado (Tabela 8). Portanto, a atividade total foi calculada, e os níveis de atividade foram menores que P_∞ (Tabela 8). Finalmente, a longa duração deste aumento linear em todos os casos está de acordo com valores K_d muito baixos, isto é, com uma estabilidade térmica satisfatória do extrato enzimático.

5. Conclusões

As propriedades da protease produzida por *A. avenaceus* URM 6706 foram investigadas. Por meio da aplicação do planejamento estatístico foi possível aumentar a produção da protease produzida por *A. avenaceus* URM 6706, o que permite um maior rendimento e menor custo numa perspectiva industrial. Com relação à caracterização, o comportamento da enzima nas diferentes temperaturas e valores de pH, bem como os parâmetros cinéticos e termodinâmicos, sugerem que a protease produzida por *A. avenaceus* URM 6706 pode ser aplicada industrialmente, por exemplo na produção de hidrolisados proteicos, no processo de carne e nas indústrias de cerveja e de panificação, processamentos que são requeridas temperaturas não elevadas.

6. Agradecimentos

Os autores agradecem o apoio financeiro da CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) e da FACEPE (Fundação de Amparo a Ciência e Tecnologia de Pernambuco) e do CENLAG (Central Laboratório de Pesquisa da Unidade Acadêmica de Garanhuns) pela infraestrutura.

7. Referencias

- [1] Belmessikh, A., Boukhalifa, H., Mechakra-Maza, A., Gheribi-Aoulmi, Z. and Amrane, A. *J Taiwan Inst Chem Eng*, 2013, vol. 44, pp. 377–385.
- [2] Hernández-Martínez, R., Gutiérrez-Sánchez, G., Bergmann, C.W., Loera-Corral, O., Rojo-Domínguez, A., Huerta-Ochoa, S., Regalado-González, C. and Prado-Barragán, L.A., *Process Biochem*, 2011, vol. 46, pp.2001–2006.
- [3] Hajji, M., Hmidet, N., Jellouli, K., Vallaëys, T., Nasri, M. and Sellami-Kamoun, A. *Process Biochem*, 2010, vol. 45, pp. 1746–1752.

- [4] Wu, T.Y., Mohammada, A.W., Jahim, J.M. and Anuar, N., *Enzyme MicrobTechnol*, 2006, vol. 39, pp. 1223–1229.
- [5] Devi, M.K., Banu, A.R., Gnanaprabhal, G.R., Pradeep, B.V. and Palaniswamy, M., *Indian J Sci Technol*, 2008 vol. 1, pp.1-7.
- [6] Bach, E., Sant’Anna, V., Daroit, D.J., Corrêa, A.P.L., Segalin, J. and Brandelli, A., *Process Biochem*, 2012, vol. 47, pp. 2455–2462.
- [7] Lehninger, A.L., *Princípios de Bioquímica*, third ed., Edgard Blücher Ltda, São Paulo, 1997.
- [8] Heidtmann, R.B., Duarte, S.H., Pereira, L.P. and Braga, A.R.C., *Braz J Food Technol*, 2012, vol. 15, pp. 41-49.
- [9] Leighton, T. J.; Doi, R. H.; Warren, R. A. J.; Kelln, R. *Journal of Molecular Biology*, , 1973, v. 76, p. 103-122.
- [10] Bradford, M.M.A., *Anal Biochem*, 1976, vol. 72, pp. 248-254.
- [11] Porto, T.S., Porto, C.S., Cavalcanti, M.T.H., Filho, J.L.L., Perego, P., Porto, A.L.F., Converti, A. and Pessoa Júnior, A. *Biotechnol Prog*, 2006, vol. 22, pp. 1637-1642.
- [12] Haddar, A., Fakhfakh-Zouari, N., Hmidet, N., Frikha, F., Nasri, M. and Kamoun, A.S., *J Biosci Bioeng*, 2010, vol. 110, pp. 288–294.
- [13] Mukherjee, A.K. and Rai, S.K. *New Biotechnol*, 2011, vol. 28, pp. 182-189.
- [14] Singh, A.K. and Chhatpar, H.S. *World J Microbiol Biotechnol*, 2010, vol. 26, pp. 1631–1639.
- [15] Abidi, F., Limam, F. and Nejib, M.M., *Process Biochem*, 2008, vol. 43, pp. 1202-1208
- [16] Wang, Q., Hou, Y., Xu, Z., Miao, J. and Li, G. *Bioresource Technol*, 2007, vol. 99, pp. 1926–1931.
- [17] Varela, H., Ferrari, M.D., Belobradjic, L., Vasquez, A. and Loperena, M.L. *Biotechnol Lett*, 1997, vol. 19, pp. 758–775.
- [18] Anitha, T.S. and Palanivelu, P., *Protein Expres Purif*, 2013, vol. 88, pp. 214–220.
- [19] Shirasaka, N., Naitou, M., Okamura, K., Kusuda, M., Fukuta, Y. and Terashita, T., *Mycoscience*, 2012, vol. 53, pp. 354-364.
- [20] S. Shankar, M. Rao, R., *Process Biochem*. 46 (2011) 579–58.
- [21] Hajji, M., Kanoun, S., Nasri, M. and Gharsallah, N., *Proc Biochem*, 2007, vol. 42, pp. 791–797.
- [22] Charles, P., Devanathan, V., Anbu, P., Ponnuswamy, M.N., Kalaichelvan, P. T. and Hur, B., *J Basic Microbiol*, 2008, vol. 48, pp. 347–52.
- [23] Ueda, M., Kubo, T., Miyatake, K. and Nakamura, T. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2007, vol. 74, pp. 331–338.
- [24] Savitha, S., Sadhasivan, S., Swaminathan, K. and Lin, F.H. *J Taiwan Inst Chem Eng* , 2011, vol. 42, pp. 298-304.
- [25] Castro, R.J.S. and Sato, H.H. *Biocatal Agric Biotechnol*, 2014, vol. 3, pp. 20–25.
- [26] Raval, V.H., Pillai, S., Rawal, C.M. and Singh, S.P. *Process Biochem*, 2014, vol. 49, pp. 955–962.

- [27] Souza, P.M., Aliakbarian, B., Filho, E.X.F., Magalhães, P.O., Pessoa Junior, A., Converti, A. and Perego, P., *Int J Biol Macromol*, 2015, vol. 81, pp. 17–21.
- [28] Mesbah, N.M. and Wiegel, J., *J Mol Catal B-Enzym*, 2014, vol. 105, pp. 74–81.
- [29] Liese, A., Seelbach, K. and Wandrey, C., “*Industrial Bio- transformations,*” Wiley-VCH Verlag GmbH & Co., Weinheim, 2006.
- [30] Mushtaq, Z., Irfan, M., Nadeem, M., Naz, M. and Syed, Q. *Braz Arch Biol Techn*, 2015, vol. 58, pp.175-184.
- [31] Whitaker, J.R. *Principles of Enzymology for the Food Sciences*. 2. ed. Davis: University of California, 1994.
- [32] Gohel, S.D. and Singh, S.P., *J. Chromatogr B*, 2012, vol. 889–890, pp. 61–68.
- [33] Naidu, G.S.N. and Panda, T. *Biochem Eng J*, 2003, vol. 16, pp. 57-67.
- [34] Riaz, M., Perveen, R., Javed, M.R., Nadeem, H. and Rashid, M.H. *Enzyme Microb Tech*, 2007, vol. 41, pp. 558–564.
- [35] Ortega, N., Diego, S., Perez-Mateos, M. and Busto, M.D. *Food Chem*, 2004, vol. 88, pp. 209–217.
- [36] Soares de Castro, R.J., Ohara, A., Nishide, T.G., Albernaz, J.R.M., Soares, M.H. and Sato, H.H. *Biocatal Agricul Biotech*, 2015, vol. 4, pp.199–207.

Legenda das Figuras

Figura 1. Superfície de resposta para produção de protease por *A. avenaceus* URM 6706, mostrando uma interação entre (A) temperatura (°C) e rotação (rpm); (B) extrato de levedura e rotação (rpm) e (C) extrato de levedura e temperatura (°C).

Figura 2. Curva de pH ótimo (linha preta) e de estabilidade ao pH aos 180 minutos (linha cinza) para a protease produzida por *A. avenaceus* URM 6706. (●) tampão fosfato-Na (pH 5,0, 6,0 e 7,0); (■) tampão Tris-HCl (7,0, 8,0 e 9,0); (▲) de tampão carbonato-bicarbonato (9,0, 10,0 e 11,0).

Figura 3. Curva de temperatura ótima (linha preta) e curva de estabilidade à temperatura aos 180 minutos (linha cinza) para a protease produzida por *A. avenaceus* URM 6706.

Figura 4. Curvade Arrhenius da atividade inicial de protease produzida por *A. avenaceus* URM 6706 utilizando azocaseína como substrato. $Y = -1,7321x + 8,2804$ e $R^2 = 0,9841$.

Figura 5. Gráfico semi-log de desnaturação irreversível da protease produzida por *A. avenaceus* URM 6706. (●) 45 °C ($y = -0,0025x + 0,051$ e $R^2 = 0,8866$); (■) 55 °C ($y = -0,0158x - 0,4694$ e $R^2 = 0,8598$); (◆) 60 °C ($y = -0,0276x - 0,438$ e $R^2 = 0,9473$); (*) 65 °C ($y = -0,0347x - 0,1555$ e $R^2 = 0,9963$) (▲) 70 °C ($y = -0,0395x - 0,1102$ e $R^2 = 0,9892$).

Figura 6. Curva de resistência térmica da protease produzida por *A. avenaceus* URM 6706 em função da temperatura de inativação térmica. $Y = -0,0483x + 18,178$ e $R^2 = 0,8922$.

Figura 7. Atividade proteásica integral (P mM) relacionada com o tempo (t , min) do extrato bruto de *A. avenaceus* URM 6706 em diferentes temperaturas: 45 °C (◆), 50 °C (▲), 55 °C (●), 60 °C (■), 65 °C (-) e 70 °C (■).

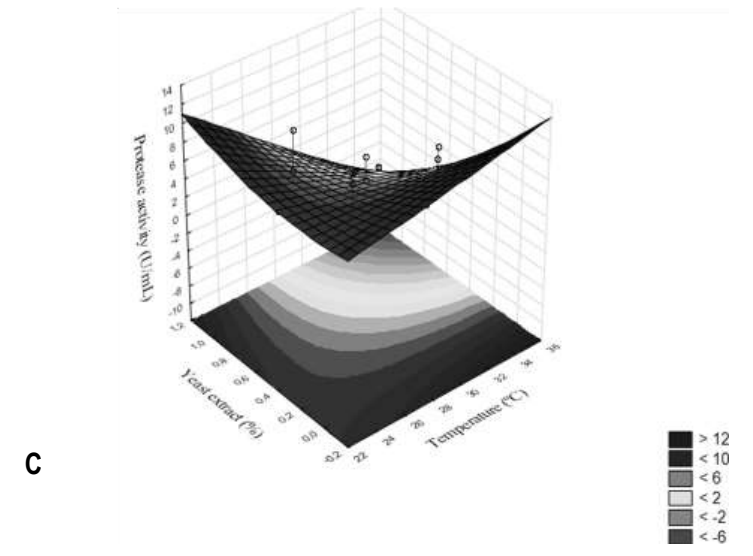
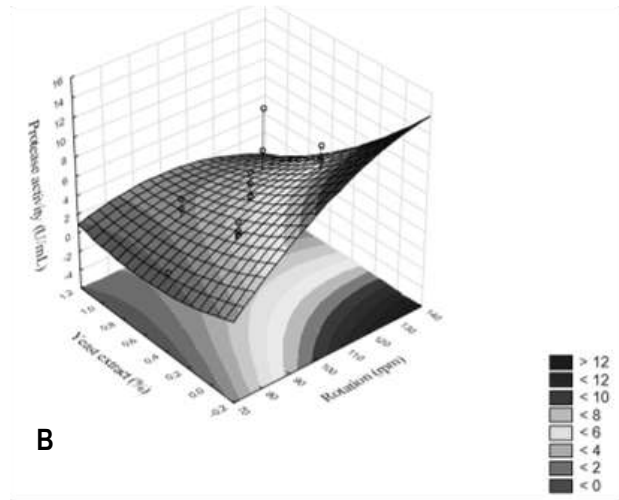
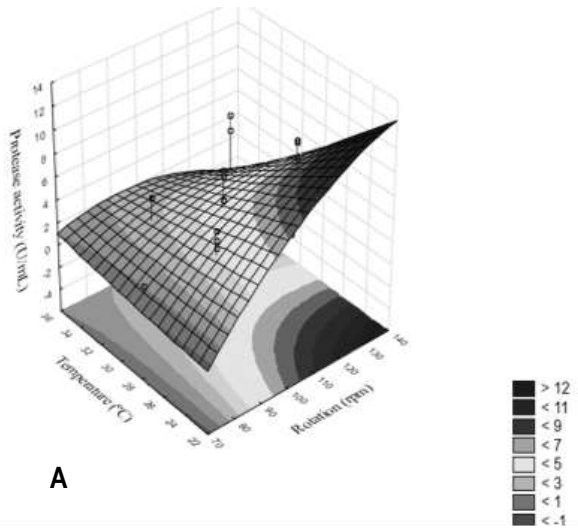


Figura 1

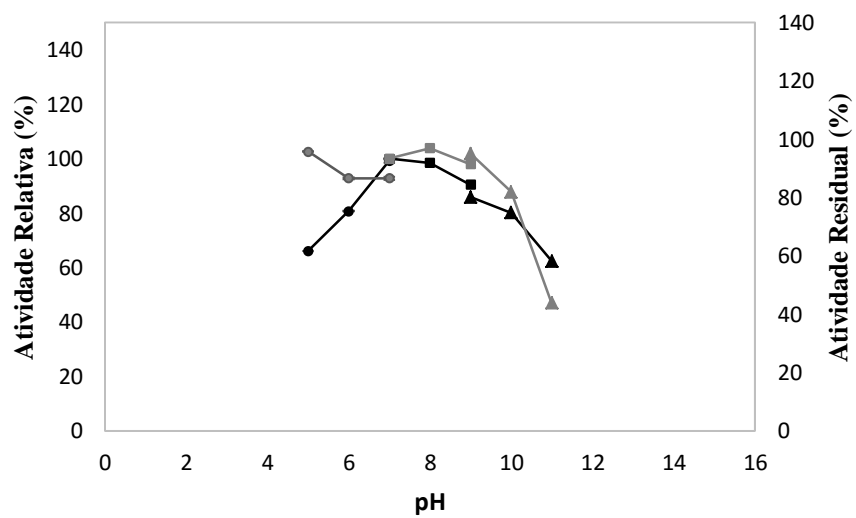


Figura 2

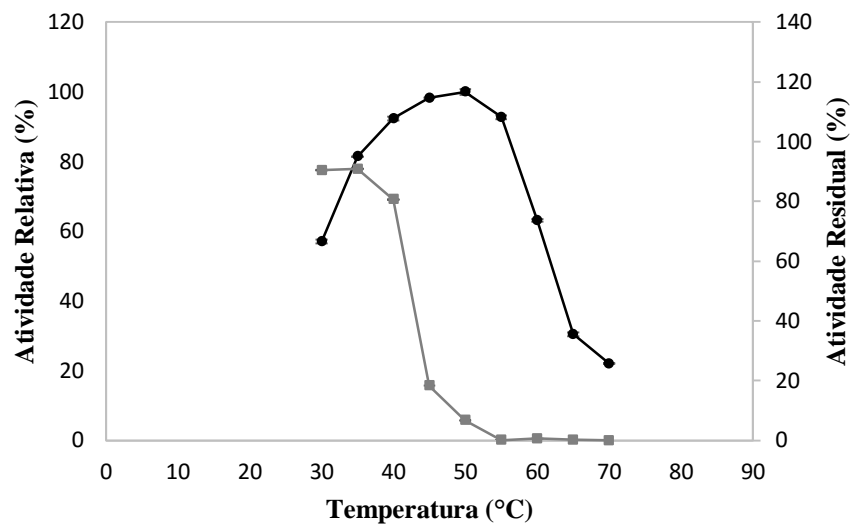


Figura 3

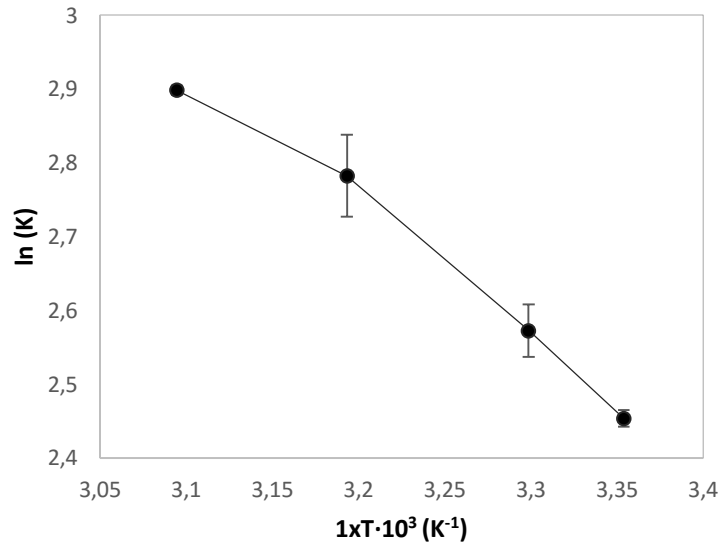


Figura 4

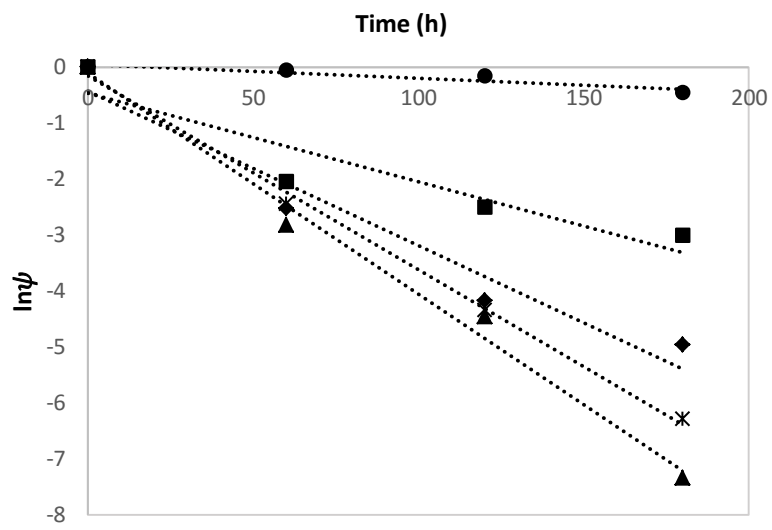


Figura 5

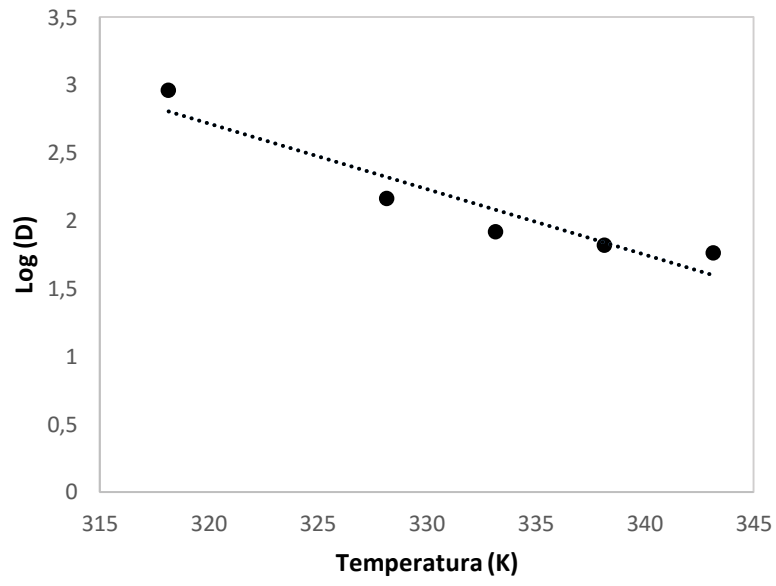


Figura 6

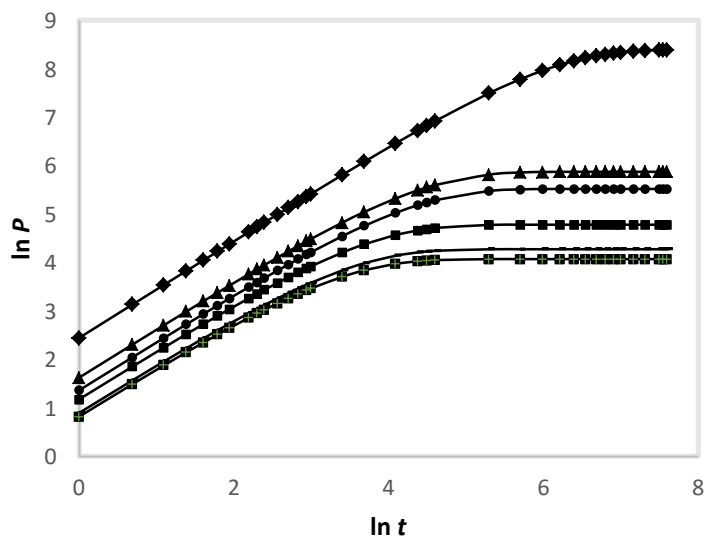


Figura 7

Tabela 1. Valores reais das variáveis utilizadas no planejamento estatístico Plackett-Burman para produção de proteases por *Aspergillus avenaceus* URM 6706.

Ensaio	Rotação (rpm)	Tempo (horas)	Temperatura (°C)	Farinha de soja (%)	Extrato de levedura (%)	Soro de leite (%)	Glicose (%)	Peptona (%)	MgSO₄ (%)	ZnSO₄ (%)	FeSO₄ (%)	MnCl₂ (%)	Atividade Proteásica (U.mL⁻¹)
1	120	72	26	0,5	1,0	0	0,5	0,5	0,5	0	0,05	0	0,850
2	120	120	26	0,5	0,25	1,0	0,5	0,25	0,5	0,1	0	0,1	1,442
3	120	120	32	0,5	0,25	0	1,0	0,25	0,1	0,1	0,05	0	2,283
4	120	120	32	1,0	0,25	0	0,5	0,5	0,1	0	0,05	0,1	1,983
5	90	120	32	1,0	1,0	0	0,5	0,25	0,5	0	0	0,1	1,467
6	120	72	32	1,0	1,0	1,0	0,5	0,25	0,1	0,1	0	0	0,850
7	90	120	26	1,0	1,0	1,0	1,0	0,25	0,1	0	0,05	0	3,883
8	120	72	32	0,5	1,0	1,0	1,0	0,5	0,1	0	0	0,1	0,667
9	120	120	32	1,0	0,25	1,0	1,0	0,5	0,5	0	0	0	2,783
10	90	120	26	0,5	1,0	0	1,0	0,5	0,5	0,1	0	0	0,800
11	90	72	32	1,0	0,25	1,0	0,5	0,5	0,5	0,1	0,05	0	3,083
12	120	72	32	1,0	1,0	0	1,0	0,25	0,5	0,1	0,05	0,1	1,580
13	90	120	26	0,5	1,0	1,0	0,5	0,5	0,1	0,1	0,05	0,1	1,750
14	90	72	32	0,5	0,25	1,0	1,0	0,25	0,5	0	0,05	0,1	2,50
15	90	72	26	1,0	0,25	0	1,0	0,5	0,1	0,1	0	0,1	4,21
16	90	72	26	0,5	0,25	0	0,5	0,25	0,1	0	0	0	6,11

Tabela 2. Análise de variância dos dados obtidos do planejamento estatístico de Plackett-Burman para protease produzida por *Aspergillus avenaceus* URM 6706.

Varição da Fonte	Soma dos quadrados	Grau de liberdade	Média quadrática	Valor de F	Valor de p
Regreção	31,92	12	2,66	6,82	0,06*
Residual	117	3	0,39		
Total	33,09				

*: Estatisticamente significante (90% de interval de confiança).

Tabela 3. Efeitos estimados das variáveis sobre a produção de protease por *Aspergillus avenaceus* URM 6706 usando resultados experimentais do planejamento estatístico Plackett-Burman.

Variables	Efeitos	t(3)	p
Rotação (rpm)	-1,42200	-4,55842	0,019791
Tempo	-0,43450	-1,39285	0,257938
Temperatura	-1,12400	-3,60314	0,036681
Farinha de soja	0,43000	1,37842	0,261881
Extrato de levedura	-1,56975	-5,03205	0,015125
Soro de leite	-0,29275	-0,93845	0,417244
Glicose	0,14675	0,47043	0,670138
Peptona	-0,49900	-1,59961	0,207988
MgSO ₄	-0,90525	-2,90190	0,062406
ZnSO ₄	-0,53025	-1,69979	0,187731
FeSO ₄	-0,05350	-0,17150	0,874745
MnCl ₂	-0,63000	-2,01955	0,136715

As variáveis como temperatura, extrato de levedura, rotação e concentração de MgSO₄ foram consideradas como tendo um efeito significativo sobre a resposta e selecionadas para estudos posteriores.

Tabela 4. Matriz do delineamento composto central (DCC), seus experimentos correspondentes com respectiva produção de protease por *Aspergillus avenaceus* URM 6706.

Ensaio	Rotação	Temperatura	Extrato de Levedura	MgSO ₄	Atividade Proteásica (U.mL ⁻¹)
1	-1	-1	-1	-1	5,23
2	+1	-1	-1	-1	8,85
3	-1	+1	-1	-1	4,73
4	+1	+1	-1	-1	8,5
5	-1	-1	+1	-1	3,5
6	+1	-1	+1	-1	10,3
7	-1	+1	+1	-1	1,9
8	+1	+1	+1	-1	0,81
9	-1	-1	-1	+1	6,1
10	+1	-1	-1	+1	10,1
11	-1	+1	-1	+1	4,6
12	+1	+1	-1	+1	7,2
13	-1	-1	+1	+1	4,6
14	+1	-1	+1	+1	5,9
15	-1	+1	+1	+1	2,0
16	+1	+1	+1	+1	1,1
17	-1	-1	0	0	0,9
18	+1	-1	0	0	3,7
19	- α	0	0	0	6,1
20	+ α	0	0	0	1,8
21	0	0	- α	0	6,8
22	0	0	+ α	0	2,4
23	0	0	0	- α	7,4
24	0	0	0	+ α	4,3
25	0	0	0	0	4,8
26	0	0	0	0	4,2
27	0	0	0	0	4,9

[Rotação(rpm): (- α) =75, (-1) = 90, (0) = 105, (+1) = 120, (+ α) = 135; Temperatura (°C): (- α) =23, (-1) = 26, (0) = 29, (+1) = 32, (+ α) = 35; Extrato de levedura (%):(- α)=0, 0 (-1) = 0,25, (0) = 0,5, (+1) = 0,75, (+ α) = 1,0; MgSO₄ (%):(- α) = 0,0 (-1) = 0,5, (0) = 0,75, (+1) = 1,0, (+ α) = 1,25 e atividade proteásica].

Tabela 5. Análise de variância dos dados obtidos pelo delineamento composto central (DCC) para a protease produzida por *Aspergillus avenaceus* URM 6706.

Varição da fonte	Soma dos quadrados	Grau de liberdade	Média quadrática	Fcal	Ftab
Regreção	160,72	14	11,48	4,91	2,64
Residual	28,08	12	2,34		
Falta de ajuste	27,79	10	2,78	18,53	19,4
Puro erro	0,29	2	0,15		
Total da soma dos quadrados	188,80				

Fcal – valor de F calculado; Ftab – valor de F tabela (interval de 95% de confiança).

Tabela 6. Efeitos estimados das variáveis na produção de protease por *Aspergillus avenaceus* URM 6706 resultantes do DCC.

Variáveis	Efeitos	t(2)	P
(1) Rotação (rpm) (L)	2,14167	13,8565	0,005168*
Rotação (rpm) (Q)	-0,77006	-4,6460	0,043339*
(2) Temperatura (L)	-2,69500	-17,4366	0,003273*
Temperatura (Q)	0,05494	0,3315	0,771781
(3) Extrato de levedura (L)	-2,83333	-18,3316	0,002963*
Extrato de levedura (Q)	0,37994	2,2923	0,148931
(4) MgSO ₄ (L)	-0,42127	-2,7629	0,109837
MgSO ₄ (Q)	0,51934	5,0732	0,036727*
1L e 2L	-1,41750	-7,4882	0,017370*
1L e 3L	-0,98500	-5,2035	0,035005*
1L e 4L	-0,76250	-4,0281	0,056463
2L e 3L	-1,65500	-8,7429	0,012831*
2L e 4L	0,01750	0,0924	0,934769
3L e 4L	-0,45000	-2,3772	0,140581

Tabela 7. Efeito de íons metálicos e de inibidores de protease na atividade proteásica produzida por *Aspergillus avenaceus* URM 6706.

Íons Metálicos	Concentração (mM)	Atividade Relativa (%) \pm DP*	Inibição (%)
Controle	---	100 \pm 0,169	---
ZnCl₂	10 Mm	99,59 \pm 0,076	0,41
KCl	10 mM	99,79 \pm 0,203	0,21
MnCl₂	10 mM	84,84 \pm 0,429	15,16
CaCl₂	10 mM	96,90 \pm 0,117	3,10
FeSO₄	10 mM	117,94 \pm 0,442	---
NaCl	10 mM	92,70 \pm 0,350	7,30
MgCl₂	10 mM	104,72 \pm 0,144	---
Inibidores			
Controle	---	100 \pm 0,132	---
Pepstatina A	0,05	118,86 \pm 0,125	---
	0,10	123,15 \pm 0,092	---
Ácido Iodoacético	1,00	127,23 \pm 0,385	---
	10,0	119,15 \pm 0,067	---
EDTA	1,00	107,43 \pm 0,452	---
	10,0	97,43 \pm 0,059	2,57
PMSF	1,00	11,71 \pm 0,044	88,29
	10,0	10,85 \pm 0,184	89,15
β-Mercaptoetanol	1,00	120,86 \pm 0,167	---
	10,0	123,44 \pm 0,222	---

Tabela 8. Parâmetros da termodinâmica e da cinética da desnaturação térmica da protease produzida por *A. avenaceus* URM 6706.

T (°C)	K_d (s⁻¹)	ΔH_d (kJ.mol⁻¹)	ΔG_d (kJ.mol⁻¹)	ΔS_d (kJ.mol⁻¹.K⁻¹)	$t_{1/2}$ (minutos)	D (minutos)	$P_{1/2}$ (μmol.mL⁻¹)	P_∞ (μmol.mL⁻¹)
45	4,3333E-05	97,64	104,77	-0,0223	277,258	921,2	2227,50	4455,00
55	0,00024	97,56	101,75	-0,0128	48,1352	159,9305556	125,00	250,00
60	0,00026	97,52	103,12	-0,0169	43,8700	145,7594937	59,72	119,00
65	0,00046	97,48	103,18	-0,01699	25,1140	83,44202899	36,00	72,00
70	0,00057	97,43	104,13	-0,01966	19,9754	66,36887608	29,36	58,00

K_d = Constante de primeira ordem da inativação; ΔH_d = entalpia de desnaturação; ΔG_d = energia livre de Gibbs; ΔS_d = entropia da inativação irreversível; $t_{1/2}$ = tempo de meia vida; D = tempo de redução decimal; $P_{1/2}$ = atividade integral até o tempo de meia vida e P_∞ = atividade integral até o tempo infinito.

CAPITULO II

Atividades antioxidantes de hidrolisados da clara de ovo de galinha de capoeira

A ser submetido à *Animal Science Journal*

([http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1111/\(ISSN\)1740-0929/homepage/ForAuthors.html](http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1111/(ISSN)1740-0929/homepage/ForAuthors.html))

1 Atividades antioxidantes de hidrolisados da clara de ovo de galinha de capoeira
2 Anna Carolina da Silva^a, Alana Emília Soares de França Queiroz^a, Erika Valente de
3 Medeiros^c, Cristina Maria de Souza-Motta^b, Keila Aparecida Moreira^{a,c*}

4
5 (a) Programa de Pós-graduação em Biociência Animal, Universidade Federal Rural de
6 Pernambuco. R. Manuel de Medeiros, s/n, CEP: 52171-900, Recife - PE, Brasil.

7 (b) Departamento de Micologia, Universidade Federal de Pernambuco, Av. Moraes Rego,
8 s/n, Cidade Universitária, CEP: 50670-901, Recife-PE, Brasil.

9 (c) Unidade Acadêmica de Garanhuns, Universidade Federal Rural de Pernambuco. Av.
10 Bom Pastor, s/n, Boa Vista, CEP: 55292-278, Garanhuns-PE, Brasil.

11
12 * Autor para correspondência: Unidade Acadêmica de Garanhuns, Universidade Federal
13 Rural de Pernambuco. Avenida Bom Pastor, s/n, Boa Vista, CEP: 55292-278, Garanhuns-PE,
14 Brazil. Phone: (+5587) 37645520; FAX: 37645500; e-mail: moreirakeila@hotmail.com

Resumo

Hidrolisados proteicos originados da clara de ovo já têm sido reportados como bioativos e apresentam dentre essas atividades biológicas a antioxidante que protege o organismo do envelhecimento precoce e doenças ligadas à oxidação como câncer, diabetes e hipertensão. Portanto, objetivou-se com este trabalho avaliar a atividade antioxidante de hidrolisados obtidos pela hidrólise da clara de ovo de galinha de capoeira. A protease produzida por *Aspergillus avenaceus* URM 6706 foi purificada e posteriormente aplicada na hidrólise da clara de ovo de galinha de capoeira. O grau de hidrólise da clara de ovo de galinha de capoeira foi verificado ao longo do tempo de exposição à protease, que variou de 4 a 24 horas. A hidrólise da clara de ovo de galinha de capoeira foi intensificada com o passar do tempo de exposição à protease produzida por *A. avenaceus* URM 6706. Foi possível detectar as atividades antioxidantes de eliminação dos radical ABTS^{•+} de 97 a 99% e DPPH até 27%, assim como a quelação dos íons metálicos Cu²⁺ até 62% e Fe²⁺ até 54%. A eliminação de radical ABTS^{•+} teve correlação positiva com o grau de hidrólise, no entanto todas as demais atividades testadas apresentaram correlação negativa com o grau de hidrólise. Os resultados obtidos sugerem que a clara de ovo de galinha de capoeira representa uma fonte alimentar de origem animal com potencial aplicação na indústria de alimentos funcionais.

Palavras-chave: *Aspergillus*, purificação, ABTS, DPPH e quelantes.

65

66 1. Introdução

67 O processo oxidativo em organismos e alimentos tem importante interferência na
68 saúde e qualidade dos mesmos, respectivamente. Um dos efeitos colaterais do metabolismo
69 oxidativo, sendo essencial para a sobrevivência das células, é a produção de radicais livres e
70 espécies reativas de oxigênio. Quando um excesso de radicais livres é formado, a ação de
71 enzimas protetoras é prejudicada, o que causa efeitos celulares destrutivos e letais para as
72 células, como apoptose por oxidação de proteínas celulares, lipídios da membrana, DNA e
73 enzimas (Sharma et al., 2011); causando lesões celulares e teciduais (Chalamaiah et al.,
74 2013).

75 As espécies reativas de oxigênio e os radicais livres estão envolvidos no
76 estabelecimento de diversas doenças, tais como câncer, diabetes, doença de Alzheimer,
77 distúrbios neurodegenerativos, hipertensão, processos inflamatórios e doença de Parkinson,
78 além de acelerar o envelhecimento. Portanto, a procura de compostos bioativos naturais com
79 ação antioxidante, imunomoduladora, antimicrobiana, dentre outras, de fontes alimentares é
80 uma área que tem crescido nos últimos anos, sendo foco de pesquisa científica em todo o
81 mundo (Chalamaiah et al., 2013).

82 Os benefícios em se utilizar hidrolisados de proteínas de origem alimentar múltiplas
83 atividades biológicas podem ser confirmados por diversos estudos, que demonstraram
84 peptídeos obtidos pela hidrólise da clara de ovo com ação anti-hipertensiva, antioxidante e
85 antilipêmica (Manso et al., 2008; Miguel et al., 2010). A hidrólise das proteínas da clara de
86 ovo, por exemplo, pode resultar na liberação de peptídeos bioativos ou no reforço da sua
87 atividade biológica, tal como as atividades antioxidantes (Huang et al., 2010; 2011, Chen et
88 al., 2012).

89 No entanto essas propriedades funcionais encontradas em peptídeos bioativos podem
90 ser afetadas pela modificação da estrutura proteica, incluindo a sequência e a composição de
91 aminoácidos, a massa molecular e a distribuição de carga na molécula. Sendo a hidrólise
92 enzimática em condições controladas é uma forma eficaz de melhorar as propriedades
93 funcionais das proteínas sem afetar o seu valor nutritivo (Li et al., 2012).

94 Portanto, objetivou-se com este trabalho avaliar o efeito do grau de hidrólise, em
95 função do tempo de hidrólise da clara de ovo de galinha de capoeira, sob a liberação de
96 peptídeos com atividades antioxidantes por ação de protease microbiana.

97 2. Materiais e Métodos

98 2.1. Produção e purificação da protease

99 A protease utilizada na hidrólise da clara de ovo de galinha de capoeira foi produzida
100 por *Aspergillus avenaceus* URM 6706, do Departamento de Micologia da Universidade
101 Federal de Pernambuco, Brasil. A produção foi realizada por fermentação submersa em
102 frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL de meio composto por 1,0% p/v de farinha de
103 soja, e 0,5% de glicose; inoculado com 10^6 esporos.mL⁻¹, a 28 °C e 120 rpm por 72h.

104 A purificação da protease foi realizada em duas etapas, a primeira por precipitação
105 proteica por ação do álcool etílico em gradiente de concentração (0-40%, 40-60% e 60-80%,
106 v/v), ocorreu a 4 °C em agitador magnético (na menor rotação possível). Em seguida, foi
107 realizado a segunda etapa de purificação, a cromatografia de troca iônica, pelo emprego da
108 coluna pré-empacotada HiTrap Q Sepharose FF (GE®); a fase móvel consistiu em tampão
109 Tris-HCl (pH 7,2 e 20 mM) e a eluição da enzima foi realizada com NaCl (de 0,1 a 1M).

110 A análise de pureza foi realizada através da cromatografia líquida de alta eficiência
111 (CLAE), utilizando-se a coluna C18 (250 x 4,6mm) com 5 µm de tamanho de partícula
112 (Phenomenex, Torrance, Califórnia, Estados Unidos) conectada ao HPLC modelo LC20A,

113 Prominence (Shimadzu[®], Japão). A fase móvel foi constituída de ácido trifluoracético (0,1%)
114 e a eluição foi feita em gradiente de concentração de acetonitrila (0 a 30%) acrescida de 0,1%
115 de ácido trifluoracético. A absorvância do eluente foi monitorada por meio de arranjo de
116 fotodiodo SPD-M20A, Prominence (Shimadzu[®], Japão) a 280 nm e o fluxo foi mantido em
117 0,5 mL.minuto⁻¹, durante 20 minutos de corrida (GHORBANPUR et al., 2009).

118 2.2. Atividade Proteásica

119 A atividade proteásica foi realizada segundo método de Leighton et al (2003), com
120 algumas modificações, em que 60 µL do extrato enzimático foram adicionados a 100 µL de
121 azocaseína em tampão Tris-HCl (1,0%). A mistura reacional foi incubada por 1h à
122 temperatura ambiente e interrompida pela adição de 480 µL de ácido tricloroacético (TCA) a
123 10% (p/v), seguida da centrifugação por 5 minutos a 8,000g, e a temperatura de 4 °C. Do
124 sobrenadante foram retirados 320 µL e adicionados a 560 µL de NaOH (1 M). Uma unidade
125 (U) da atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima capaz de hidrolisar a
126 azocaseína de forma a aumentar 0,1 U da absorvância a 440 nm.

127 2.3. Determinação do conteúdo de proteínas no extrato enzimático

128 O método de Bradford (1976) foi utilizado para quantificar o conteúdo de proteínas. A
129 curva de calibração foi realizada a partir de soluções estoque de albumina de soro bovino
130 (BSA) numa faixa de concentrações de 0-600 µg.mL⁻¹. As soluções foram submetidas a
131 leitura da absorvância a 595 nm em espectrofotômetro (Biochrom Libra S6[®], Cambridge,
132 Reino Unido).

133 2.4. Determinação da temperatura e pH ótimos

134 A temperatura ótima da enzima pura produzida por *A. avenaceus* URM 6706 foi
135 determinado ao se realizar a atividade proteásica em diferentes temperaturas (30-80 °C) e o

136 pH ótimo foi determinado utilizando-se diferentes tampões a 0,2 M: fosfato de sódio, Tris-
137 HCl e carbonato-bicarbonato no intervalo de pH entre 5,0 a 11,0.

138 2.5. Eletroforese SDS-PAGE e Zimograma

139 A eletroforese SDS-PAGE foi realizada em gel de poliacrilamida de acordo com o
140 método de Laemmli (1979), utilizando gel de concentração a 4,9% e de separação a 15,4% de
141 monômero. A massa molecular das bandas foi determinado pelo software LabImage 1D
142 (Loccus Biotechnology, Brasil).

143 Para a análise de zimograma, o gel de separação da eletroforese foi acrescido de 0,2%
144 de albumina. As substâncias desnaturantes foram retiradas da solução tampão de amostra e o
145 conteúdo a ser analisado não foi fervido. Após a corrida, o gel foi incubado duas vezes em
146 solução de Triton X-100 a 1% durante 30 minutos, cada. Em seguida, foi lavado três vezes
147 por um período de 20 minutos em água destilada para remover o excesso de Triton X-100 e,
148 posteriormente incubado por 60 minutos em tampão fosfato 0,2 M, pH 6,5. O gel foi corado
149 com solução contendo *Coomassie brilliant blue* R-250 e depois descorado em solução de
150 ácido acético (45 %) e methanol (45%) (Anitha & Palanivelu, 2013).

151 2.6. Hidrólise das proteínas da clara de ovo de galinha de capoeira

152 A clara de ovo (200 mL) foi homogeneizada em 800 mL de tampão fosfato de sódio
153 (pH 8,0, 50 mM) durante 10 minutos sob rotação suave. Essa suspensão proteica foi
154 posteriormente hidrolisada pela protease produzida por *A. avenaceus* URM 6706, após sua
155 purificação. A hidrólise foi realizada à temperatura e a pH ótimos de atuação da enzima
156 empregada (50° C e 10,0; respectivamente), numa concentração enzimática de 1%. A
157 hidrólise ocorreu durante 24 horas e alíquotas foram retirados a cada 4 horas. Para que
158 ocorresse a interrupção da hidrólise enzimática, cada ponto retirado foi fervido por 10
159 minutos e em seguida mantido a -2 °C. Antes de se prosseguir com as análises necessárias, as

160 amostras foram centrifugadas, a fim de se obter apenas os peptídeos solúveis (Tanzadehpanah
161 et al., 2013).

162 2.7. Determinação do grau de hidrólise

163 O grau de hidrólise obtido foi considerado como o percentual de ligações peptídicas
164 clivadas, foi determinado por meio da quantificação de grupos amino livres com 2,4,6-ácido
165 trinitrobenzeno sulfônico (TNBS), de acordo com metodologia descrita por Adler-Nissen
166 (1979). O número total de grupos amina foi determinado numa amostra de proteína da clara
167 de ovo de de galinha de capoeira (10 mg) completamente hidrolisada por 4 mL de HCl a 6 M,
168 durante 24 h a 110 °C.

169 2.8. Atividades antioxidantes

170 2.8.1. Atividade sequestradora do radical ABTS⁺

171 O radical ABTS⁺ foi constituído pelo persulfato de potássio (2,45 mM) e ABTS (7
172 mM) e incubado ao abrigo de luz por 16 h a 30 °C. Usando espectrofotômetro Libra S22
173 (Biochrom®, Áustria), a solução do radical ABTS⁺ foi ajustada para uma absorbância de
174 $0,70 \pm 0,02$ a 734 nm, por diluição com tampão fosfato-salino (PBS), 100 mM, pH 7,4. Para a
175 reação, 50 µL do hidrolisado foram misturados com 950 µL da solução do radical ABTS⁺. Os
176 ensaios foram incubados a 30 °C por seis minutos e lidos a 734 nm em espectrofotômetro
177 (Biochrom Libra S6®, Cambridge, Reino Unido) (Re et al. 1999). A atividade antioxidante
178 (%) foi calculada em relação à atividade de eliminação do radical, de acordo com a seguinte
179 equação:

$$180 \quad \textit{Sequestro do radical ABTS} (\%) = \frac{A_{\text{controle}} - A_{\text{amostra}}}{A_{\text{controle}}} \times 100 \quad (1)$$

181

182 Onde A_{controle} representa a absorbância inicial da solução de ABTS e A_{amostra}
183 representa a absorbância do ensaio com as amostras de hidrolisados.

184 2.8.2. Eliminação do radical DPPH

185 A capacidade de eliminação do radical livre de DPPH foi mensurada de acordo com o
186 método descrito por Li et al. (2008), com algumas modificações. Em seguida, 50 µL da
187 amostra foi adicionado a 500 µL de solução de DPPH a 0,1 mM (solubilizado em metanol a
188 95%). A mistura foi homogeneizada e incubada durante 30 minutos à temperatura ambiente e
189 ao abrigo de luz. A absorbância da solução resultante foi lida a 517 nm em espectrofotômetro
190 (Biochrom Libra S6®, Cambridge, Reino Unido), em que uma menor absorbância
191 representou uma maior atividade de eliminação de DPPH. O efeito de eliminação foi expresso
192 como apresentado na seguinte equação:

$$193 \quad \text{Eliminação do radical DPPH (\%)} = \frac{A_{\text{controle}} - A_{\text{amostra}}}{A_{\text{controle}}} \times 100 \quad (2)$$

194

195 Onde A_{controle} representa a absorbância inicial da solução de DPPH e A_{amostra}
196 representa a absorbância do ensaio com as amostras de hidrolisados.

197 2.8.3. Atividade quelante de cobre

198 A atividade quelante de Cu^{2+} do hidrolisado foi determinada com a utilização de violeta
199 de pirocatecol (VP), de acordo com metodologia de Saiga et al. (2003), com poucas
200 modificações. A mistura reacional de 500 µL de tampão acetato (50 mM e pH 6,0) e 12,5 µL
201 de CuSO_4 (5mM) foram adicionados a 125 µL das amostras. Transcorridos 30 minutos de
202 incubação à temperatura ambiente foi adicionado 12,5 µL de violeta de pirocatecol a 4mM.
203 Depois de 30 minutos, a absorbância foi mensurada a 632 nm, em espectrofotômetro
204 (Biochrom Libra S6®, Cambridge, Reino Unido), e água destilada foi usada como controle. A
205 porcentagem de inibição (%) da formação do complexo VP- Cu^{2+} foi calculada seguindo a
206 seguinte equação:

$$207 \quad \text{Atividade Quelante de } \text{Cu}^{2+} (\%) = \frac{A_{\text{controle}} - A_{\text{amostra}}}{A_{\text{controle}}} \times 100 \quad (3)$$

208 Onde A_{controle} representa a absorbância controle (ensaio em que a amostra foi
209 substituída por água) e A_{amostra} respresenta a absorbância do ensaio com as amostras de
210 hidrolisados.

211 2.8.4. Atividade quelante de ferro

212 A atividade de clivagem de Fe^{2+} foi determinada pela inibição da formação do complexo
213 ferrozina- Fe^{2+} de acordo com Carter (1971), com algumas modificações. As amostras (125
214 μL) foram misturados a 0,5 mL de tampão de acetato de sódio (0,1 M e pH 4,9) e a 12,5 μL
215 de cloreto de ferro 2. Após 30 minutos de incubação à temperatura ambiente, adicionou-se 50
216 μL de ferrozina (5 mM). Após passarem mais 30 minutos, a absorbância foi medida a 562 nm
217 em espectrofotômetro (Biochrom Libra S6®, Cambridge, Reino Unido). A percentagem de
218 inibição da formação do complexo ferrozina- Fe^{2+} foi calculada segundo a equação:

$$\textit{Atividade Quelante de Fe}^{2+} (\%) = \frac{A_{\text{controle}} - A_{\text{amostra}}}{A_{\text{controle}}} \times 100$$

219 Onde A_{controle} representa a absorbância controle (ensaio em que a amostra foi
220 substituída por água) e A_{amostra} respresenta a absorbância do ensaio com as amostras de
221 hidrolisados.

222 2.9. Análise estatística

223 Todos os ensaios foram feitos em triplicata e calculado o desvio padrão entre os três
224 resultados obtidos. O coeficiente de correlação entre o grau de hidrólise e as atividades
225 antioxidantes doi calculado pelo programa Statistica versão 7.0 (StatSoft Inc).

226 3. Resultados e Discussão

227 3.1. Purificação da protease produzida por *Aspergillus avenaceus* URM 6706

228 A precipitação alcóolica se mostrou eficiente quanto a pré-purificação da protease
229 produzida por *A. avenaceus* URM 6706, sendo a fração de 60 – 80 % de etanol a mais efetiva
230 para a separação da enzima dos contaminantes. Após a precipitação com etanol, a atividade

231 proteásica específica aumentou para 2374,3 U.mg⁻¹ (Tabela 1), o que representa um fator de
232 purificação de 2,9 vezes e o rendimento ficou em 79,5%. Esses valores são muito promissores
233 quando comparados aos trabalhos de purificação de protease; em que o primeiro passo da
234 purificação muitas vezes atinge fator de purificação muito próximo de 1. Por exemplo, a
235 protease produzida por *A. parasiticus* foi pré-purificada pela precipitação com acetona, com
236 fator de purificação de 1,28 e um rendimento de 33,8% (Anitha & Palanivelu, 2013). A
237 protease coagulante do leite produzida por *Termitomyces clypeatus* MTCC 5091, foi
238 precipitada com sulfato de amônia, porém o fator de purificação obtido não foi informado e o
239 rendimento nessa primeira etapa de purificação foi de 34,15% (Mamjunder et al., 2015).

240 Após a cromatografia de troca iônica (Q Sepharose FF), o fator de purificação
241 aumentou para 16,82, e rendimento em 40% (Tabela 1). O perfil cromatográfico apresentado
242 na Figura 1, onde podem ser visualizados quatro diferentes picos de proteína e quatro picos de
243 atividade enzimática. Demonstra que no maior pico de atividade enzimática (Pico 1) foi
244 obtido o menor pico de proteínas e vice-versa; portanto o pico com melhores valores de
245 purificação e rendimento (descritos acima). Esses valores podem ser considerados muito bons
246 para uma enzima purificada, a protease produzida por *A. parasiticus* (Anitha & Palanivelu,
247 2013), por exemplo, teve um fator de purificação de 2,19 e um rendimento de 2,47% após três
248 etapas de purificação. Enquanto que a protease produzida por *Termitomyces clypeatus* MTCC
249 5091 obteve um fator de purificação altíssimo de 33,62 vezes, após quatro métodos de
250 purificação, o que pode aumentar os custos com a purificação da enzima, além de ter um
251 rendimento de apenas 3,41% (Mamjunder et al., 2015). Também após quatro etapas de
252 purificação, a serino protease produzida por *Aspergillus fumigatus*, foi purificada 8,8 vezes e
253 obteve 6,6% de rendimento (Hernández-Martínez et al., 2011).

254 A purificação enzimática representa uma etapa importante no processo de produção
255 industrial de enzimas, uma vez que esta etapa representa cerca de 50-80% dos custos totais
256 relacionados a esta atividade. Este alto custo geralmente está associado às muitas etapas
257 necessárias para a purificação dessas biomoléculas. Portanto, um elevado fator de purificação
258 e um elevado rendimento podem representar uma produção e purificação de enzimas que
259 aplicada em larga escala seja de baixo custo (Hernandez et al., 2006). Neste caso, pela análise
260 de pureza empregada foi possível confirmar a presença de apenas uma proteína que foi
261 representada pelo único pico (Figura 2).

262 A protease em estudo foi analisada quanto ao seu perfil eletroforético em cada etapa
263 de purificação; pode-se perceber que no extrato bruto enzimático estavam presentes nove
264 bandas com massas moleculares que variaram de 17,89 a 82,48 kDa (Figura 3). A quantidade
265 dessas bandas foi diminuindo a cada etapa de purificação, sendo vistas três bandas após a
266 precipitação com álcool e apenas uma banda após a cromatografia de troca iônica, com massa
267 molecular de 35,27 kDa. Na literatura são descritas proteases de *Aspergillus* sp. com massas
268 moleculares variados, como *A. oryzae* MTCC 5341 – 34 kDa (Vishwanatha & Rao, 2010); *A.*
269 *fumigatus* - 88 kDa (Hernández-Martínez et al., 2011) e *A. parasiticus* - 36 kDa (Anitha &
270 Palanivelu, 2013). A atividade hidrolítica da caseína pode ser comprovada pelo zimograma.

271 3.2. Determinação da temperatura e pH ótimos

272 A protease purificada produzida por *A. avenaceus* URM 6706 teve como ótimo o pH
273 10,0 (tampão carbonato-bicarbonato). De uma forma geral, a enzima apresentou a menor
274 atividade em pH ácido, com atividades abaixo dos 30% e até menos 7% em pH 5,0. Na faixa
275 de pH do neutro para o alcalino, a atividade foi elevada até que diminuiu novamente para
276 quase 50% em pH 11,00 (Figura 4). Ter melhor atividade em pH alcalino confirma seu

277 potencial para a aplicação na produção de hidrolisados proteicos originados da clara de ovo,
278 uma vez que a clara possui pH alcalino, acima de 8,5 (Vilela et al., 2016).

279 As proteases de origem microbiana possuem pH ótimo variável, por exemplo a
280 protease purificada produzida por *A. parasiticus* apresentou atividade ótima em pH 7,0
281 (Anitha & Palanivelu, 2013), já as proteases produzidas por *Aspergillus terreus* gr
282 (Niyonzima & More, 2015) e por *Aspergillus oryzae* CH93 (Salihi et al., 2016) apresentaram
283 atividade ótima também em pH alcalino 11,0 e 8,0, respectivamente.

284

285

286

287

288 **Tabela 1.** Purificação da protease produzida por *A. avenaceus* URM 6706.

Protease	AT (U.mL⁻¹)	AE (U.mg⁻¹)	FP	R (%)
Extrato Bruto	255,370	812,41	1	100
Precipitação com Álcool	202,79	2374,39	2,91	79,52
Cromatografia de troca iônica	103,33	13659,00	16,82	40,52

289 AT: Atividade Total, AE: Atividade Específica, FP: Fator de Purificação e R: rendimento.

290

291

292

293

294

295

296

297

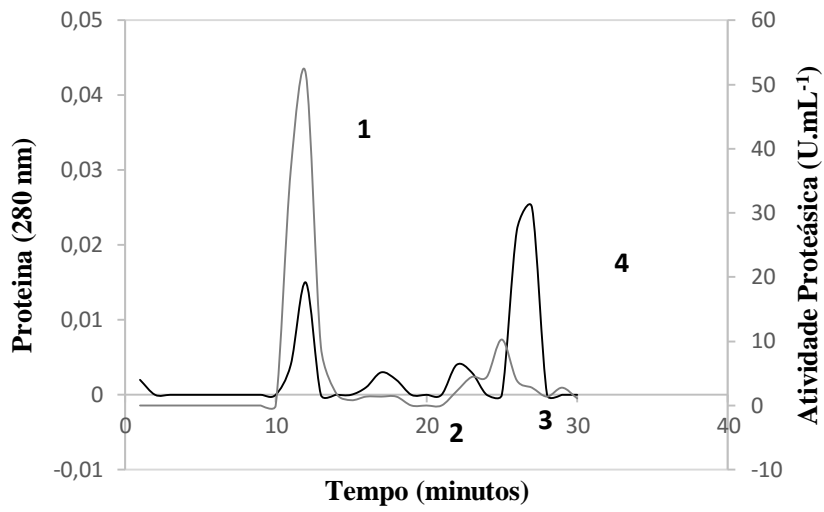
298

299

300

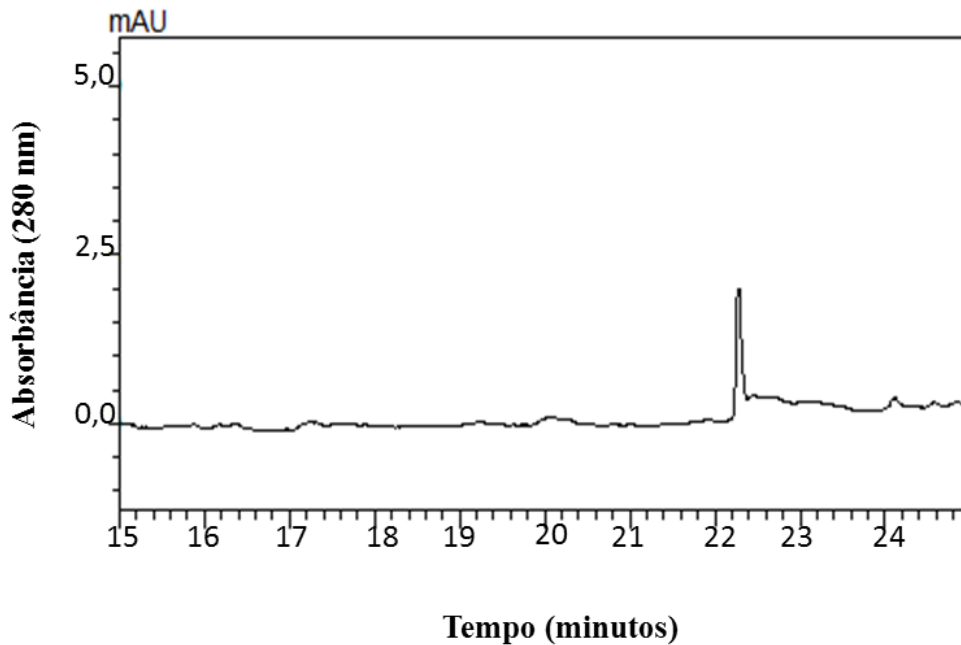
301

302
303
304
305
306
307
308
309
310
311
312
313
314
315



316 **Figura 1.** Cromatograma de troca iônica em coluna Q Sepharose FF da protease produzida
317 por *Aspergillus avenaceus* URM 6706. Linha cinza: Atividade Proteolítica Total; Linha preta:
318 Proteína a 280 nm.

319
320
321
322
323
324
325
326
327
328
329
330
331



332 **Figura 2.** Análise de pureza da protease produzida por *Aspergillus avenaceus* URM 6706 por
333 cromatografia líquida de alta eficiência.

334

335

336

337

338

339

340

341

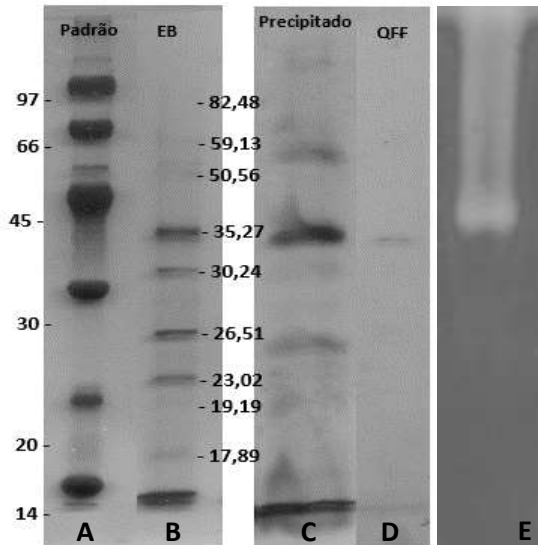
342

343

344

345

346



347 **Figura 3.** Eletroforese SDS-PAGE da protease produzida por *Aspergillus avenaceus* URM
348 6706. (A): marcadores de massa molecular; (B): extrato enzimático bruto; (C): extrato
349 precipitado com álcool etílico (60-80%), (D): extrato purificado por cromatografia de troca
350 iônica e (E): zimograma (albumina) do extrato purificado por cromatografia de troca iônica.

351

352

353

354

355

356

357

358

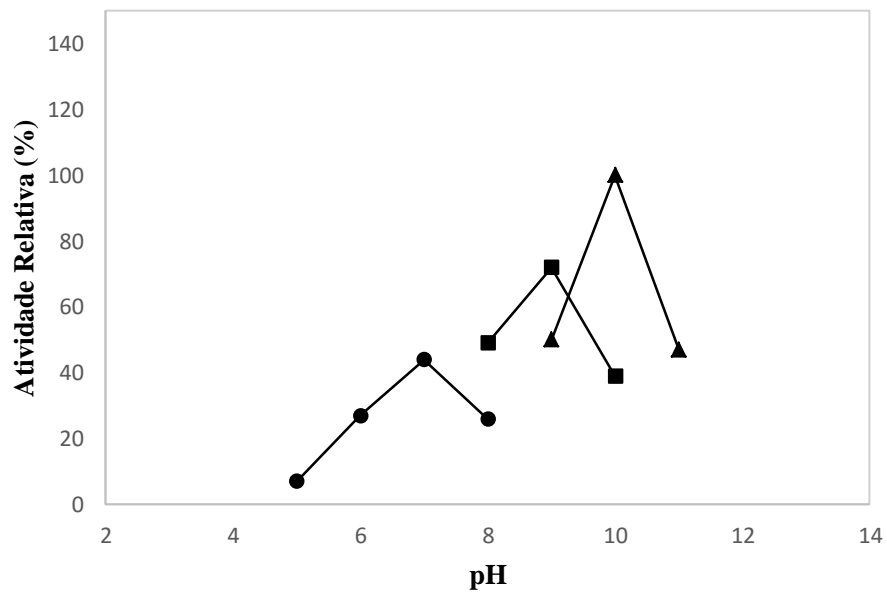
359

360

361

362

363



364 **Figura 4.** Curva de pH ótimo da protease purificada produzida por *Aspergillus avenaceus*
365 URM 6706.

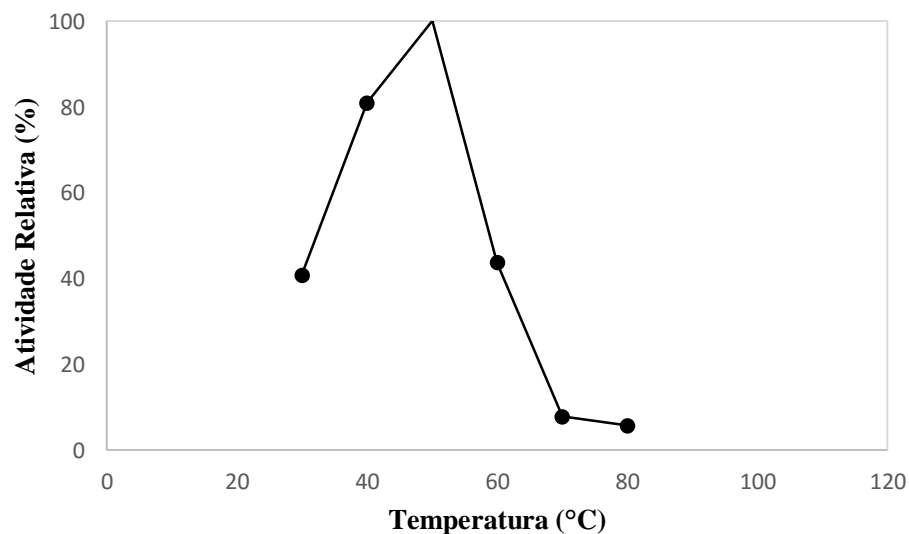
366

367 A enzima purificada produzida por *A. avenaceus* URM 6706 apresentou 50 °C como
368 temperatura ótima para atividade proteásica (Figura 5). Até os 60 °C, a enzima permaneceu
369 com atividade proteásica acima dos 40%, sendo essa atividade consideravelmente diminuída a
370 partir dos 70 °C. Os resultados obtidos neste estudo estão de acordo com os obtidos por
371 Niyonzima & More (2015) e Salihi et al. (2016) que também observaram a temperatura ótima
372 de atividade para as proteases produzidas por *Aspergillus terreus* gr e *Aspergillus oryzae*
373 CH93, respectivamente.

374

375

376



377

378 **Figura 5.** Curva de temperatura da protease purificada produzida por *A. avenaceus* URM
379 6706.

380

381

382 3.4. Hidrólise da clara de ovo de galinha de capoeira e atividades antioxidantes

383 Durante a proteólise, é necessário que as condições ótimas requeridas pela enzima
384 empregada sejam mantidas para que haja a liberação eficiente dos peptídeos (Aluko, 2015).

385 Por isso, de acordo com o pH e temperatura ótimos obtidos nos ensaios com a protease obtida
386 por *A. avenaceus* URM 6706, a hidrólise da clara de ovo de galinha de capoeira foi realizada a
387 pH 10,0 e 50 °C. Pode-se perceber que esta hidrólise foi diretamente proporcional ao tempo
388 (Tabela 2), variando de 46 (4 horas de hidrólise) a quase 70% (24 horas de hidrólise). Sabe-se
389 que proteases fúngicas exibem uma especificidade de substrato maior e promovem um grau
390 de hidrólise mais elevado quando comparadas as proteases bacterianas, por exemplo, que já
391 foram descritas por promoverem baixo grau de hidrólise em proteínas alimentares (Castro &
392 Sato, 2015).

393 Quando realizada por uma única enzima, a reação de proteólise é mantida em
394 condições ótimas da enzima até sua conclusão, que geralmente varia entre 1 e 24 horas, a
395 depender das características desejadas do produto obtido. A duração da hidrólise tem uma
396 relação inversa com o tamanho do peptídeo, mas na maioria dos casos alcança-se um tamanho
397 constante que mesmo com aumento elevado no tempo de hidrólise, não produzirá qualquer
398 efeito no tamanho ou atividade do peptídeo (Aluko, 2015). No estudo realizado,
399 provavelmente o aumento no tempo de hidrólise além do testado poderia ainda intensificar a
400 hidrólise obtida, no entanto o custo de produção de hidrolisados também seria proporcional a
401 este aumento. Também, com os valores de atividades antioxidantes obtidos (Tabela 2)
402 percebe-se que não se faz necessária um grau de hidrólise maior.

403 Hidrolisados proteicos e peptídeos têm sido relatados em diversos trabalhos por
404 apresentarem atividades antioxidantes significativas; podendo ser derivados de diversas fontes
405 de alimentos de origem animal (Pihlanto, 2006), sendo muitos obtidos a partir da hidrólise da
406 clara de ovo (Castro & Sato, 2015; Liu, 2015). São eficazes contra a peroxidação enzimática e
407 não enzimática de lipídeos e ácidos graxos essenciais, assim como na eliminação de radicais
408 livres e na quelação de íons metálicos (Bath, 2015). Além disso, os peptídeos antioxidantes de

409 origem alimentar são considerados seguros, compostos saudáveis com baixa massa molecular,
410 baixo custo, alta atividade e de fácil absorção (Samardi & Ismail 2010).

411 Na inibição de processos oxidativos, a ação de peptídeos antioxidantes além de ser
412 importante para a preservação das células num sistema orgânico, é de grande importância para
413 a qualidade e preservação de alimentos. A formação de radicais livres resulta em uma
414 deterioração da qualidade alimentar, por exemplo o sabor rançoso, que além de fazer com que
415 os produtos sejam rejeitados pelos consumidores, está relacionado com a redução da vida útil.
416 Outro fator que intensifica a inibição de processos oxidativos em alimentos é a relação que
417 muitos estudos têm demonstrado entre a ingestão de alimentos contendo produtos de oxidação
418 lipídica, e o desenvolvimento de doenças como câncer, diabetes e cardiovasculares (Rian et
419 al., 2011).

420 De forma geral, as atividades antioxidantes apresentadas por peptídeos são
421 influenciadas pela massa molecular e pela estrutura molecular, sendo reportado que é mais
422 comum peptídeos de baixa massa molecular apresentarem propriedades antioxidantes (Sheih
423 et al., 2009). No entanto, no que se refere à atividade de eliminação do radical DPPH, essa
424 relação foi inversamente proporcional ao grau de hidrólise, assim como para a atividade
425 quelante de ferro; o que significa que quanto menor a massa molecular dos hidrolisados,
426 menor também a capacidade antioxidante. Porém, para a atividade sequestradora de radicais
427 ABTS^{•+}, a intensidade da hidrólise pareceu influenciar a atividade, no entanto após as 8h de
428 hidrólise essa atividade ficou constante. Por sua vez, a hidrólise prejudicou a atividade
429 quelante de cobre, que foi de 62% quando 46% hidrolisada, de 0% entre 49 e 69% de
430 hidrólise e reaparecendo após 60% de hidrólise com 1,7% de atividade quelantes (Tabela 2).

431 Essa correlação entre o grau de hidrólise e a atividade antioxidante podem ser melhor
432 visualizados na Tabela 3. Os dados confirmam que a correlação entre o grau de hidrólise e a

433 atividade de eliminação do radical DPPH, com as quelantes de Cu^{2+} e com a quelante de Fe^{2+} ,
434 foram todas negativas. O que indica que quanto mais hidrolisado estiver a clara do ovo de
435 galinha de capoeira, menores serão essas atividades, sendo o coeficiente de correlação de -
436 0,73, -0,55 e -0,67, respectivamente, com maior correlação para a do DPPH e Fe^{2+} .

437 Em relação à eliminação do radical ABTS^{*+} a correlação com o grau de hidrólise pode
438 ser considerada forte e positiva, $\rho = 0,6$. A atividade de eliminação do radical ABTS^{*+} está
439 fortemente correlacionada com as demais atividades antioxidantes estudadas, porém de forma
440 negativa; o que indica que a medida que a atividade antioxidante contra o radical ABTS^{*+}
441 aumenta, as demais diminuem. Por sua vez, todas as outras atividades antioxidantes estudadas
442 estão fortemente correlacionadas de forma positiva.

443 O radical DPPH é um radical livre estável que mostra a absorvância máxima a 517 nm
444 em etanol e tem sido amplamente utilizado para testar a capacidade dos compostos naturais
445 atuarem como eliminadores de radicais livres ou doadores de hidrogênio, como forma de
446 avaliar os seus potenciais antioxidantes. Quando o radical DPPH encontra uma substância
447 doadora de próton, como um antioxidante, os radicais serão eliminados e a absorvância
448 reduzida (Zhu et al., 2006; Yang et al., 2011).

449 Hidrolisados proteicos e peptídeos originados da clara de ovo têm sido relatados como
450 capazes de eliminar o radical DPPH (Memmarpoor et al., 2012; Castro & Sato, 2015).
451 Peptídeos originados da hidrólise da clara de ovo de avestruz estudados por Tanzadehpanah et
452 al. (2012), por exemplo, apresentaram atividade de eliminação do radical DPPH de até 81%,
453 porém nesse mesmo trabalho foi observado que o grau de hidrólise influenciou positivamente
454 a atividade antioxidante que foi aumentada pelo maior grau de hidrólise da clara.

455 Resultados opostos aos obtidos no trabalho, em que maior atividade de eliminação do
456 radical DPPH e menor eliminação do radical ABTS^{*+} foram observadas, na atividade de

457 peptídeos originados da clara de ovo por ação de lisoenzimas, que obtiveram atividades
458 antioxidantes entre 37,2 e 64,2 % para remoção de radicais DPPH e entre 1,91 e 2,82 % para
459 remoção do radical ABTS^{•+} (Memmarpoor et al., 2012).

460 O ABTS^{•+}, por sua vez, é um radical relativamente estável, mas facilmente reduzido
461 por antioxidantes. A atividade de eliminação contra o radical ABTS^{•+} catiônico indica a
462 capacidade dos hidrolisados proteicos como doadores de elétrons ou doadores de hidrogênio
463 em reações com o radical livre (Prior et al., 2005). Ainda em relação aos peptídeos da clara de
464 ovo de avestruz, foi verificada uma atividade de eliminação do ABTS^{•+} de até 62,7%. A baixa
465 capacidade de eliminação de ABTS^{•+} podem ser resultado da baixa solubilidade de alguns
466 peptídeos soluções aquosas. Portanto, alguns peptídeos ou hidrolisados proteicos têm fortes
467 atividades antioxidantes no sistema de eliminação de radicais solúveis em água (ABTS), mas
468 não no sistema lipídico solúvel (DPPH) (Zhu et al., 2008), o que foi observado para os
469 hidrolisados da clara de ovo de galinha de capoeira.

470 A atividade antioxidante nos hidrolisados proteicos não pode ser atribuída a um único
471 mecanismo. Os peptídeos podem ser efetivos e específicos ligantes de íons metálicos (Sovago
472 1990; Sovago, 2006), uma vez que em sua molécula podem haver muitos sítios de ligação
473 com os metais. A quelação de íons metálicos tem um efeito antioxidante porque os metais de
474 transição de ferro e cobre promovem danos oxidativos em diferentes níveis (Saiga et al.,
475 2003). Estas reações oxidativas *in vivo* parecem estar envolvidas na patogênese de pelo menos
476 algumas doenças neurodegenerativas (Mandel et al., 2006). O cobre, por exemplo, é capaz de
477 produzir espécies reativas de oxigênio provocando quebras na cadeia de DNA e oxidação das
478 bases nucleotídicas (Megias et al., 2007).

479 Para os hidrolisados da clara de ovo de galinha de capoeira, a quelação de cobre foi de
480 62% aos 46% de grau de hidrólise da clara; com a intensificação da hidrólise, no entanto, até

481 59% esta capacidade oxidativa foi perdida e reapareceu após 63% de hidrólise. A sequência
482 de aminoácidos pode alterar a atividade biológica dos peptídeos (Guo, 2014), isso explicaria o
483 porquê desta atividade ter desaparecido em determinado grau de hidrólise. Mas, com a
484 continuidade da hidrólise, a modificação na molécula peptídica possibilitou o reaparecimento
485 da mesma.

486 Para as proteínas da *Phaseolus vulgaris* L. var. Jamapa, o tratamento hidrolítico
487 aumentou a atividade quelante de cobre de 0% até 35%, observando-se uma tendência geral
488 de aumento da atividade de quelação de cobre com o tempo de hidrólise, embora esta
489 atividade tenha diminuído quando testados os hidrolisados de lectina (isola da *Phaseolus*
490 *vulgaris* L. var. Jamapa) após 90 e 120 minutos de hidrólise

491 Dos muitos metais de transição, o ferro é conhecido como um efetivo fator de
492 oxidação lipídica devido sua alta reatividade. Na reação de Fenton que envolve o Fe^{2+}
493 ($\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{OH}^- + \text{OH}^*$) há a liberação de radical hidroxil. O íon Fe^{3+} produz também
494 radicais a partir de peróxidos, embora a taxa de formação seja 10 vezes menor que a do íon
495 Fe^{2+} (Gülçin, 2006).

496 Para os hidrolisados da clara de ovo de galinha de capoeira, a quelação de ferro foi de
497 59% quando o grau de hidrólise estava em 46%; a atividade, no entanto, diminuiu a medida
498 que o grau de hidrólise foi se intensificando. Esse evento pode ser explicado pela hidrólise da
499 ovotransferrina, que é uma glicoproteína monomérica constituída por 686 aminoácidos e
500 representa 12% da proteína total de clara de ovo (Stadelman & Cotterill, 2001). O ferro pode
501 ser facilmente ligado à ovotransferrina (Ko & Ahn, 2008), sendo uma característica
502 antimicrobiana natural do ovo. Portanto, pode-se sugerir que a medida que houve a hidrólise
503 da ovotransferrina, a sua capacidade de ligação com o ferro foi reduzida.

504 Os peptídeos obtidos pela hidrólise da clara do ovo de avestruz, apresentaram
 505 atividade quelantes de ferro de até 30%, no entanto vale ressaltar que esses peptídeos foram
 506 parcialmente purificados (Tanadehpanah et al., 2012).

507

508 **Tabela 2.** Relação do grau de hidrólise da clara de ovo de galinha de capoeira com atividades
 509 antioxidantes.

Tempo de hidrólise	Grau de hidrólise (%)	DPPH (%)	ABTS ⁺⁺ (%)	Quelante Cu ⁺² (%)	Quelante Fe ⁺² (%)
4 h	46,78 ± 1,105	27,09 ± 2,441	97,77 ± 0,427	62,38 ± 0,547	54,90 ± 1,540
8 h	49,38 ± 0,211	3,99 ± 2,335	99,67 ± 0,133	0 ± 1,691	0 ± 1,617
12 h	57,04 ± 0,121	0 ± 3,184	99,61 ± 0,203	0 ± 0,447	0 ± 1,861
16 h	59,38 ± 0,121	0 ± 3,794	99,83 ± 0,133	0 ± 2,189	0 ± 1,452
20 h	63,68 ± 0,715	0 ± 3,687	99,72 ± 0,384	1,72 ± 1,542	0 ± 1,540
24 h	69,71 ± 0,99	0 ± 1,91	99,78 ± 0,203	13,10 ± 1,677	0 ± 0,924

510

511

512

513

514 **Tabela 3.** Correlação entre o grau de hidrólise e as diferentes atividades antioxidantes do
 515 hidrolisado proteico da clara de ovo de galinha de capoeira.

	Grau de hidrólise (%)	DPPH (%)	ABTS ⁺⁺ (%)	Quelante de Cu ⁺² (%)	Quelante de Fe ⁺² (%)
Grau de Hidrólise (%)	1,00	-0,73	0,6	-0,55	-0,67
DPPH (%)		1,00	-0,9	0,85	0,90
ABTS⁺⁺ (%)			1,0	-0,88	-0,93
Quelante de Cu⁺² (%)				1,00	0,96
Quelante de Fe⁺² (%)					1,00

516

517

518

519

520

521

522

523

524 4. Conclusão

525 A hidrólise da clara do ovo de galinha foi positivamente afetada pelo tempo de
526 exposição à protease pura produzida por *A. avenaceus* URM 6706, mas, essa correlação não
527 foi sempre positiva em relação ao tempo de hidrólise e atividades antioxidantes. Pode-se dizer
528 que os hidrolisados obtidos da clara de ovo de galinha de capoeira apresentam atividades
529 antioxidantes diversas, podendo ser aplicado industrialmente como alimento funcional que
530 apresenta múltiplas atividades biológicas.

531

532

533 5. Referências

534 Adler-Nissen J. Determination of the degree of hydrolysis of food protein hydrolysates by
535 trinitrobenzenesulfonic acid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1979. doi:
536 10.1021/jf60226a042

537 Aluko RE. Antihypertensive Peptides from Food Proteins. *Annual Review of Food Science*
538 *and Technology*, 2015. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-1-78242-089-7.00005-1>

539 Anitha TS, Palanivelu P. Purification and characterization of an extracellular keratinolytic
540 protease from a new isolate of *Aspergillus parasiticus*, *Protein Expression and Purification*,
541 2013. doi: 10.1016/j.pep.2013.01.007.

542 Bhat ZF, Kumar S, Bhat HF. Bioactive peptides of animal origin: a review. *Journal of Food*
543 *Science and Technology*, 2015. doi:10.1007/s13197-015-1731-5.

544 Bradford MMA. Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of
545 protein utilizing the principle of proteindye binding. *Analytical Biochemistry*, 1976.

546 Carrasco-Castilla J, Hernández-Álvarez AJ, Jiménez-Martínez C, Jacinto-Hernández C, Alaiz
547 M, Girón-Calle J, Vioque J, Dávila-Ortiz G. Antioxidant and metal chelating activities of

548 *Phaseolus vulgaris* L. var. Jamapa protein isolates, phaseolin and lectin hydrolysates. *Food*
549 *Chemistry*, 2012. doi:10.1016/j.foodchem.2011.09.084.

550 Carter P. Spectrophotometric determination of serum iron at the submicro-gram level with a
551 new reagent (ferrozine). *Analytical Biochemistry*, 1971.

552 Castro RJS, Sato HH. Production and biochemical characterization of protease from:
553 *Aspergillus oryzae*: An evaluation of the physical-chemical parameters using agroindustrial
554 wastes as supports. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 2014. doi:
555 <http://dx.doi.org/10.1016/j.bcab.2013.12.002>

556 Castro RJS, Sato HH. A response surface approach optimization of hydrolysis parameters
557 for the production of egg white protein hydrolysates with antioxidant activities. *Biocatalysis*
558 *and Agricultural Biotechnology*, 2015. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bcab.2014.07.001>.

559 Chalamaiah M, Jyothirmayi T, Bhaskarachary K, Ajreswari A, Hemalatha R, Kumar D.
560 Chemical composition, molecular mass distribution and antioxidant capacity of rohu (*Labeo*
561 *rohita*) roe (egg) protein hydrolysates prepared by gastrointestinal proteases. *Food Research*
562 *International*, 2013. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2013.03.020>.

563 Chen C, Chi YJ, Zhao MY, Lv L. Purification and identification of antioxidant peptides from
564 egg white protein hydrolysate. *AminoAcids*, 2012. doi: 10.1007/s00726-011-1102-0.

565 Ghorbanpur M, Zare Mirakabadi A, Zokaee F, Zolfagarrian H, Rabiei H. Purification and
566 partial characterization of a coagulant serine protease from the venom of the Iranian snake
567 *Agkistrodon halys*. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*,
568 2009. doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S1678-91992009000300005>.

569 Guo L, Harnedy P, Li B, Hou H, Zhanga Z, Zhao X, Fitzgerald RJ. Food protein-derived
570 chelating peptides: Biofunctional ingredients for dietary mineral bioavailability enhancement.
571 *Trends in Food Science & Technology*, 2014. doi: 10.1016/j.tifs.2014.02.007.

572 Gülçin İ. Antioxidant and antiradical activities of L-carnitine. *Life Sciences*, 2006.78, 803–
573 811. doi:10.1016/j.lfs.2005.05.103.

574 Hernández MS, Rodríguez MR, Guerra NP, Rosés RP. Amylase production by *Aspergillus*
575 *niger* in submerged cultivation on two wastes from foodies industry. *Journal of Food Process*
576 *Engineering*, 2006. doi:10.1016/j.jfoodeng.2005.01.009.

577 Huang W, Majumder K, Wu J. Oxygen radical absorbance capacity of peptides from egg
578 White protein ovotransferrin and their interaction with phytochemicals. *Food Chemistry*,
579 2010. doi:10.1016/j.foodchem.2010.04.083.

580 Ko K Y, Ahn DU. An economic and simple purification procedure for the large scale
581 production of ovotransferrin from egg white. *Poultry Science*. 2008. doi: 10.3382/ps.2007-
582 00434.

583 Laemmli UK.. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of
584 Bacteriophage T4, *Nature*, 1970. doi:10.1038/227680a0.

585 Li Y, Jiang B, Zhang T, Mu W, Liu J. Antioxidant and free radical scavenging activities of
586 chickpea protein hydrolysate (CPH). *Food Chemistry*, 2008. doi:
587 10.1016/j.foodchem.2007.04.067.

588 Leighton, T. J.; Doi, R. H.; Warren, R. A. J.; Kelln, R. A. The Relationship of serine protease
589 activity to RNA polymerase modification and sporulation in *Bacillus subtilis*. *Journal of*
590 *Molecular Biology*, v. 76, p. 103-122, 1973.

591 Li X, Luo Y, Shen H, You J. Antioxidant activities and functional properties of grass carp
592 (*Ctenopharyng odonidellus*) protein hydrolysates. *Journal of the Science of Food and*
593 *Agriculture*, 2012. doi: 10.1002/jsfa.4574.

594 Liu J, Jin Y, Lin S, Jones GS, Chen F. Purification and identification of novel antioxidant
595 peptides from egg white protein and their antioxidant activities. *Food Chemistry*, 2015. doi:
596 10.1016/j.foodchem.2014.11.142.

597 Majumder R, Banik SP, Khowala S. Purification and characterisation of j-casein specific
598 milk-clotting metalloprotease from *Termitomyces clypeatus* MTCC 5091. *Food Chemistry*,
599 2015. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.10.027>.

600 Mandel S, Amit T, Reznichenko L, Weinreb O, Youdim M BH. Green tea catechins as brain-
601 permeable, natural iron chelators-antioxidants for the treatment of neurodegenerative
602 disorders. *Molecular Nutrition and Food Research*, 2006. doi: 10.1002/mnfr.200500156.

603 Manso MA, Miguel M, Even J, Hernández R, Aleixandre A, López-Fandiño R. Effect of the
604 long-term intake of an egg white hydrolysate on the oxidative status and blood lipid profile of
605 spontaneously hypertensive rats. *Food Chemistry*, 2008. doi:
606 10.1016/j.foodchem.2007.12.049.

607 Megias C, Pedroche J, Yust MM, Giron-Calle J, Alaiz M, Millan F, Vioque J. Affinity
608 purification of copper chelating peptides from chickpea protein hydrolysates. *Journal of*
609 *Agricultural and Food Chemistry*, 2007. doi: 10.1021/jf063401s.

610 Memarpoor-Yazdi M, Asoodeh A, Chamani J. A novel antioxidant and antimicrobial peptide
611 from hen egg white lysozyme hydrolysates. *Journal of functional foods*, 2012.
612 doi:10.1016/j.jff.2011.12.004.

613 Miguel M, Gomez-Ruiz J, Recio I, Aleixandre A, Changes in arterial blood pressure after
614 single oral administration of milk-casein-derived peptides in spontaneously hypertensive rats.
615 *Molecular Nutrition & Food Research*, 2010. doi: 10.1002/mnfr.200900448.

616 Niyonzima FN, More SS. Purification and characterization of detergent-compatible protease
617 from *Aspergillus terreus* gr. 3 *Biotech*, 2015. doi: 10.1007/s13205-014-0200-6.

618 Pihlanto A. Antioxidative peptides derived from milk proteins. *International Dairy Journal*,
619 2006. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.idairyj.2006.06.005>.

620 Prior RL, Wu X, Schaich K. Standardized methods for the determination of antioxidant
621 capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of Agricultural and Food*
622 *Chemistry*, 2005. doi: 10.1021/jf0502698.

623 Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans E C. Antioxidant activity
624 applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology &*
625 *Medicine*, 1999. doi: 10.1016/S0891-5849(98)00315-3.

626 Ryan JT, Ross RP, Bolton D, Fitzgerald GF, Stanton C. Bioactive peptides from muscle
627 sources: meat and fish. *Nutrients*, 2011. doi:10.3390/nu3090765.

628 Saiga A, Tanabe S, Nishimura T. Antioxidant activity of peptides obtained from porcine
629 myofibrillar proteins by protease treatment. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*,
630 2003. doi: 10.1021/jf021156g.

631 Salihi A, Asoodeh A, Aliabadian M. Production and biochemical characterization of an
632 alkaline protease from *Aspergillus oryzae* CH93. *International Journal of Biological*
633 *Macromolecules, in press*, 2016. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2016.06.023.

634 Sheih I, Fang T, Wu T. Isolation and characterization of a novel angiotensin I converting
635 enzyme (ACE) inhibitory peptide from the algae protein waste. *Food Chemistry*, 2009. doi:
636 10.1016/j.foodchem.2008.12.019.

637 Sovago I, IN: K. BURGER (Ed.), *Biocoordination Chemistry*, Ellis Horwood Ltd.,
638 Chichester, 1990, p. 135.

639 Sovago I, Osz K. Metal ion selectivity of oligopeptides. *Dalton Transactions*, 2006. doi:
640 10.1039/B607515K.

641 Sarmadia BH, Ismail A. Antioxidative peptides from food proteins: A review. *Peptides*, 2010.
642 doi: 10.1016/j.peptides.2010.06.020.

643 Sharma S, Singh R, Rana S. Bioactive peptides: a review. *International Journal*
644 *Bioautomation*, 2011.

645 Stadelman WJ, Cotterill OJ. 2001. Egg Science and Technology. 4th ed. Avi Publ. Co.,
646 Westport, CT.

647 Tanzadehpanah H, Asoodeh A, Saberi MR, Chamani J. Identification of a novel angiotensin-I
648 converting enzyme inhibitory peptide from ostrich egg white and studying its interactions
649 with the enzyme. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 2013. doi:
650 <http://dx.doi.org/10.1016/j.ifset.2013.02.002>.

651 Tanzadehpanah H, Asoodeh A, Chamani J. An antioxidant peptide derived from Ostrich
652 (*Struthio camelus*) egg white protein hydrolysates. *Food Research International*, 2012. doi:
653 <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2012.08.022>.

654 Vilela DR, Carvalho LSS, Fagundes NS, Fernandes EA. Internal and External Quality of
655 commercial laying hens eggs with normal and vitreous eggshell. *Ciência animal brasileira*,
656 2016. doi: <http://dx.doi.org/10.1590/1089-6891v17i421535>.

657 Vishwanatha KS, Rao AG A, Singh SA. Production and characterization of a milk-clotting
658 enzyme from *Aspergillus oryzae* MTCC 5341. *Applied Microbiology and Biotechnology*,
659 2010. doi: 10.1007/s00253-009-2197-z.

660 Yang P, Ke H, Hong P, Zeng S, Cao W. Antioxidant activity of big eye tuna (*Thunnus obesus*)
661 head protein hydrolysate prepared with alcalase. *International Journal of Food Science*
662 *Technology*, 2011. doi: 10.1111/j.1365-2621.2011.02768.x.

663 Zhu K.X, Zhou HM, Qian HF. Antioxidant and free radical-scavenging activities of wheat
664 germ protein hydrolysates (WGPH) prepared with alcalase. *Process Biochemistry*, 2006. doi:
665 10.1016/j.procbio.2005.12.029.

666 Zhu L, Chen C, Tang X, Xiong Y. Reducing, radical scavenging, and chelation properties of
667 in vitro digests of Alcalase-treated zein hydrolysate. *Journal of Agricultural and Food*
668 *Chemistry*, 2008. doi: 10.1021/jf703697e.

CAPITULO III

Atividades inibitórias da enzima conversora de angiotensina (ECA), α - glicosidase e α -amilase e teste de citotoxicidade de hidrolisados da clara de ovo de galinha de capoeira

A ser submetido: Journal of Peptide Science

[http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1002/\(ISSN\)1099-1387/homepage/ForAuthors.html](http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1002/(ISSN)1099-1387/homepage/ForAuthors.html)

Atividades inibitórias da enzima conversora de angiotensina (ECA), α - glicosidase e α -amilase e teste de citotoxicidade de hidrolisados da clara de ovo de galinha de capoeira

Anna Carolina da Silva^a, Alana Emília Soares de França Queiroz^a, Tony Picoli^b, Geferson Fischer^b, Amanda Reges de Sena, Cristina Maria de Souza-Motta^c, Keila Aparecida Moreira^{a,d*}

- (a) Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal, Universidade Federal Rural de Pernambuco. R. Manuel de Medeiros, s/n, CEP: 52171-900, Recife - PE, Brasil.
- (b) Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Universidade Federal de Pelotas. Campus Universitário S/Nº, CEP: 96010-900, Capão do Leão-RS, Brasil.
- (c) Departamento de Micologia, Universidade Federal de Pernambuco, Av. Moraes Rego, s/n, Cidade Universitária, CEP: 50670-901, Recife-PE, Brasil.
- (d) Unidade Acadêmica de Garanhuns, Universidade Federal Rural de Pernambuco. Av. Bom Pastor, s/n, Boa Vista, CEP: 55292-278, Garanhuns-PE, Brasil.

* Autor para correspondência: Unidade Acadêmica de Garanhuns, Universidade Federal Rural de Pernambuco. Avenida Bom Pastor, s/n, Boa Vista, CEP: 55292-278, Garanhuns-PE, Brasil. Telefone: (+5587) 37645520; FAX: 37645500; e-mail: moreirakeila@hotmail.com

Resumo

Ao longo dos anos, a diabetes mellitus tipo 2 e a hipertensão têm se tornado os maiores problemas de saúde pública, acometendo grande parte da população mundial e sendo responsável por altos índices de mortalidade. Alguns hidrolisados proteicos são capazes de atuar no tratamento dessas doenças, agindo na inibição de enzimas que estão envolvidas na patogênese dessas doenças: as α -glicosidase e α -amilase, para a diabetes, e a ECA para a hipertensão. Objetivou-se com este trabalho avaliar a atividade antidiabética e anti-hipertensiva de hidrolisados obtidos da clara de ovo de galinha de capoeira. Para isto, a clara de ovo de galinha de capoeira foi hidrolisada pela ação da protease produzida por *Aspergillus avenaceus* URM 6706 por 24 horas. O hidrolisado foi submetido a consecutivas ultrafiltrações a fim de se obter hidrolisados com massa molecular menor que 3 kDa, entre 3 e 10 kDa, e entre 10 e 30 kDa. As atividades biológicas foram realizadas com as três faixas de massa molecular e com concentrações de 0,39 a 50 mg.mL⁻¹ em cada faixa de massa molecular, assim como o teste de citotoxicidade. A toxicidade celular não foi significativa nas menores concentrações testadas, a atividade antidiabética foi verificada em maior percentual nos hidrolisados menores que 3 kDa para as duas enzimas inibidas e entre 10 e 30 kDa para a inibição da ECA. A inibição exercida nas enzimas α -glicosidase e α -amilase, e a ECA pelos hidrolisados da clara de ovo de galinha de capoeira, demonstra que podem ser empregados como agentes antidiabéticos e anti-hipertensivos.

Palavra-chave: *Aspergillus*, purificação enzimática, atividade biológica e hidrolisados proteicos.

1. Introdução

A hidrólise enzimática de proteínas alimentares pode levar à liberação de peptídeos com atividades biológicas, que são utilizadas como ferramentas terapêuticas contra doenças crônicas humanas como a hipertensão e a diabetes. Após a proteólise, o produto contém uma mistura de peptídeos e proteínas não digeridas que pode ser denominada hidrolisado proteico e utilizada para fim terapêutico (ALUKO, 2015).

Definido como um componente alimentar que pode afetar processos biológicos e, portanto, ter um impacto sobre a função ou condição corporal e, em última instância, à saúde uma substância dietética bioativa deve oferecer um efeito biológico mensurável no intervalo de doses que é normalmente assumido pela ingestão do alimento (MOLLER et al., 2008). Seguindo esta definição, peptídeos derivados de leite, carne, peixe e ovos, e seus respectivos componentes são capazes de influenciar algumas funções fisiológicas, promovendo a saúde corporal (BATH, 2015).

Entre as várias fontes de proteína animal, as proteínas de clara de ovo são amplamente utilizadas como ingredientes funcionais e nutricionais em produtos alimentícios. São, portanto, um componente significativo da dieta e também uma excelente fonte de substâncias biologicamente ativas (MINE, 2007; CHEN et al., 2012).

Muitos trabalhos têm reportado peptídeos derivados da clara de ovo, por exemplo, com as mais diversas atividades biológicas: inibidora da enzima de conversão da angiotensina (ECA) (FUJITA et al., 1995), antioxidante (DAVALOS et al., 2004), quelantes de minerais (SAMARAWEERA et al., 2011), anti-inflamatória (HUANG et al., 2010), antimicrobiana (GONG et al., 2009), anticoagulante (YU et al., 2011a), anticancerígena (YI et al., 2003) e antidiabética (YU et al., 2011b).

Destas, a atividade antidiabética baseia-se na inibição de enzimas envolvidas na liberação da glicose no sangue; por exemplo, a α -amilase tem sido considerada como a principal enzima que pode controlar a hiperglicemia (ALI; HOUGHTON, 2006; LEE et al., 2007) e α -amilase é responsável pela hidrólise de oligossacarídeos em maltose (RAMASUBBU et al., 2007). Por sua vez, a atividade anti-hipertensiva pode estar relacionada com a inibição da enzima conversora de angiotensina (ECA) (ALU'DATT et al., 2012).

Por conseguinte, a hipertensão e a diabetes tipo II são dois dos principais problemas de saúde pública. Essas doenças crônicas estão inter-relacionadas e cada vez mais coexistem

no envelhecimento da população. A hipertensão arterial afeta aproximadamente 70% dos indivíduos com diabetes e a prevalência de hipertensão arterial é duas vezes maior nos diabéticos do que naqueles sem a doença (LAGO et al., 2007).

Portanto, objetivou-se com este trabalho avaliar a atividade inibitória da ECA, α -glicosidase e α -amilase de hidrolisados protéicos obtidos a partir hidrólise enzimática da clara de ovo de galinha de capoeira.

2. Materiais e Métodos

2.1. Produção e purificação da protease

A protease utilizada na hidrólise da clara de ovo de galinha de capoeira foi produzida por *Aspergillus avenaceus* URM 6706, cedido pela Micoteca do Departamento de Micologia da Universidade Federal de Pernambuco, Brasil. Sua produção foi realizada por fermentação submersa em frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL de meio composto por de farinha de soja a 1,0% (p/v), e glicose 0,5% (p/v); inoculado com 10^6 esporos.mL⁻¹, a 28 °C e 120 rpm por 72h. A purificação da protease foi realizada Segundo metodologia descrita no Capítulo II, item 2.1.

2.2. Atividade Proteásica

Para atividade proteásica, 60 μ L do extrato enzimático foram adicionados a 100 μ L de azocaseína em tampão Tris-HCl (1,0%). A mistura reacional foi incubada por 1h à temperatura ambiente e interrompida pela adição de 480 μ L de ácido tricloroacético (TCA) a 10% (p/v), seguida da centrifugação por 5 minutos a 8,000g e 4 °C. Do sobrenadante foram retirados 320 μ L e adicionados a 560 μ L de NaOH (1 M). Uma unidade (U) da atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima capaz de hidrolisar a azocaseína de forma a aumentar 0,1 U da absorbância a 440 nm (Leighton et al., 1973).

2.3. Determinação do conteúdo de proteínas no extrato enzimático

O método de Bradford (1976) foi utilizado para quantificar o conteúdo de proteínas. A curva de calibração foi realizada a partir de soluções estoque de albumina de soro bovino (BSA) numa faixa de concentrações de 0-600 μ g.mL⁻¹. As soluções foram submetidas a leitura da absorbância a 595 nm em espectrofotômetro (Biochrom Libra S6®, Cambridge, Reino Unido).

2.4. Determinação da temperatura e pH ótimos

A temperatura ótima da enzima pura produzida por *A. avenaceus* URM 6706 foi determinada ao se realizar a atividade proteásica em diferentes temperaturas (30-80 °C) e o pH ótimo foi determinado utilizando-se diferentes tampão a 0,2 M: fosfato de sódio, Tris-HCl e carbonato-bicarbonato numa faixa de pH de 5,0 a 11,0.

2.5. Hidrólise das proteínas da clara de ovo de galinha de capoeira e ultrafiltração do hidrolisado

A clara de ovo (200 mL) foi homogeneizada em 800 mL de tampão fosfato de sódio (pH 8,0 e 50 mM) durante 10 minutos em baixa rotação. Essa suspensão proteica foi posteriormente hidrolisada pela protease produzida por *A. avenaceus* URM 6706, após sua purificação. A hidrólise foi realizada à temperatura e a pH ótimos de atuação da enzima empregada (50° C e 10,0; respectivamente), numa concentração enzimática de 1 %, por 24 horas. Para que ocorresse a interrupção da hidrólise enzimática, cada ponto retirado foi fervido por 10 minutos e em seguida mantido a -2 °C. Os hidrolisados foram separados de acordo com a massa molecular por meio de ultrafiltração (Amicon®, Alemanha) sucessiva em *Molecular weight cut-off* (limite de massa molecular) de 3, 10 e 30 kDa, sendo agrupados em hidrolisados com massa molecular menor que 3 kDa, entre 3 e 10 kDa e entre 10 e 30 kDa. Antes de se prosseguir com as análises necessárias, as amostras foram centrifugadas, a fim de se obter apenas os peptídeos solúveis (TANZADEHPANAH et al., 2013).

2.6. Teste de citotoxicidade dos hidrolisados

Para a realização dos ensaios de citotoxicidade, os hidrolisados testados em concentrações que variaram de 0,39 a 50 mg.mL⁻¹, as diluições foram preparadas em Meio Essencial Mínimo de Eagle (E-MEM, Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, EUA). Células *Madin-Darby Bovine Kidney* (MDBK) e *African Green Monkey Kidney* (Vero), adquiridas do banco de células do Laboratório de Virologia e Imunologia da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal de Pelotas, previamente cultivadas em placas de 96 cavidades por 24 horas foram tratadas com 100 µL hidrolisados por poço. Os testes foram realizados em sextuplicata e incubados por 24 horas (em estufa úmida 37 °C com 5% de CO₂). Como controles foram utilizadas células mantidas em E-MEM suplementado, sem nenhum tipo de tratamento. As placas foram submetidas ao ensaio com o reagente MTT (3-(4,5 dimetiliazol-

2yl)-2-5-difenil-2H tetrazolato de bromo) segundo Mosman (1983). Posteriormente, as placas foram submetidas à espectrofotometria a 540 nm. Os percentuais de viabilidade celular (CV) foram calculados segundo a equação:

$$CV (\%) = \frac{AT}{AC} \times 100 \quad (1)$$

Onde *AT* e *AC* representa a absorbância das células tratadas com os hidrolisados e do controle, respectivamente.

2.7. Inibição da Enzima Conversora de Angiotensina (ECA)

A atividade inibitória da ECA foi realizada segundo dois métodos, o primeiro foi o descrito por Holmquist et al. (1979), com poucas modificações; 22 µL ECA (50 mU.mL⁻¹) foi adicionada a 50 µL dos hidrolisados da clara de ovos de galinha de capoeiras (nas concentrações de 0,39 a 50 mg.mL⁻¹), 150 µL de tampão Tris-HCl (50 mM, pH 7,5, com 0,3 M NaCl e 1 mM ZnCl₂) e 100 µL de FAPGG (N-[3-(2-Furil)acrilóil]-Phe-Gli-Gli, Sigma-Aldrich[®]) a 0,5 mM. A reação foi monitorada a 340 nm, por 1 hora. A inibição da ECA foi mensurada pela comparação das mudanças de absorbância entre os testes com as amostras e o controle, de acordo com a seguinte equação:

$$\text{Inibição da ECA (\%)} = \left[1 - \left(\frac{\Delta_{Ab \text{ Amostra}}}{\Delta_{Ab \text{ controle}}} \right) \right] \times 100 \quad (2)$$

Onde: $\Delta_{Ab \text{ Amostra}}$ é a diferença da absorbância do ensaio realizado com os hidrolisados e $\Delta_{Ab \text{ Controle}}$ é a diferença da absorbância do ensaio realizado sem os hidrolisados.

O Segundo método utilizado foi proposto por Cushman e Cheung (1971), por 30 minutos, 25 µL da ECA (5 mU) foram incubados com 25 µL da amostra de hidrolisados e a 25 µL de HHL (N-Hippuril-L-histidilis-L-leucina, Sigma-Aldrich[®]) em tampão fosfato de sódio (1 M, pH 8,3) à 37 °C. Em seguida, foram adicionados ao sistema reacional 75 µL de HCl (1M) e 500 µL de acetato de etila. Após 15 segundos, foi realizada a centrifugação a 3000 rpm por 10 minutos. Em seguida, 500 µL do sobrenadante foi retirado e levado a banho fervente até completa evaporação do solvente. O resíduo resultante da evaporação foi ressuspensionado em 1,5 mL de água deionizada. A atividade inibitória da ECA foi mensurada a 228 nm e calculada segundo a equação:

$$\text{Inibição da ECA (\%)} = \left[\frac{(A - B)}{(A - C)} \right] \times 100$$

Onde: “A” representa a atividade da ECA sem nenhuma inibição, “B” representa a atividade da ECA sob a influência da amostra de hidrolisados e “C”, a absorbância referente ao substrato da ECA, o HHL somente.

2.8. Atividade inibitória da enzima α -glicosidase

Para se avaliar o potencial dos hidrolisados da clara do ovo de galinha de capoeira como inibidores da α -glicosidase, foi utilizada a metodologia descrita por Kim et al. (2004), com poucas modificações, 5 μL α -glicosidase ($10 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$, em tampão fosfato de potássio 0,1 M e pH 6,8) foram misturados a 10 μL da amostra de hidrolisados e a 620 μL de tampão fosfato de potássio (0,1 M e pH 6,8). A reação foi incubada por 20 minutos a $37,5 \text{ }^\circ\text{C}$. Em seguida, 10 μL de p-nitro-fenil-glicopiranosídio (pNPG a 10 mM) foram adicionados à reação, que foi incubada novamente a $37,5 \text{ }^\circ\text{C}$ por mais 30 minutos. A reação foi interrompida pela adição de 650 μL de Na_2CO_3 (1 M). O produto liberado (p-nitrofenol) pela reação foi mensurado a 410 nm e a atividade inibitória da α -glicosidase foi calculada seguindo a equação:

$$\text{Inibição da } \alpha - \text{glicosidase (\%)} = \frac{A-B}{A} \times 100 \quad (3)$$

Onde “A” é a densidade ótica da reação do controle (sem as amostras dos hidrolisados) e “B” é a densidade ótica da reação realizada com as amostras dos hidrolisados.

2.9. Atividade inibitória da enzima α -amilase

A inibição da α -amilase foi avaliada segundo metodologia de Kim et al. (2004) com poucas modificações, em que 20 μL da α -amilase ($40 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$) foram misturados a 10 μL da amostra de hidrolisados e incubados por 15 minutos a $37,5 \text{ }^\circ\text{C}$. Em seguida, foram acrescentados 500 μL de solução de amido (1% em tampão fosfato de sódio pH 6,9 e 20 mM) e a mistura reacional incubada por mais 5 minutos na mesma temperatura. Após a incubação,

500 µL de DNSA foram acrescentados e o ensaio levado a banho fervente por 15 minutos. A atividade da α-amilase foi mensurada a 540 nm e a sua inibição calculada segundo a equação:

$$\text{Inibição da } \alpha - \text{amilase}(\%) = \frac{A-B}{A} \times 100 \quad (4)$$

Onde “A” é a densidade ótica da reação do controle (sem as amostras dos hidrolisados) e “B” é a densidade ótica da reação realizada com as amostras dos hidrolisados.

2.10. Análise estatística

Todos os ensaios foram realizados em triplicata, exceto o ensaio de citotoxicidade que foi feito em sextuplicata. Foi realizada análise de variância com comparação entre médias pelo teste de Tukey adotando uma significância de 95% para os resultados do teste de citotoxicidade. As análises foram realizadas com auxílio do software estatístico BioEstat® versão 5.3.

3. Resultados e Discussão

3.1. Determinação da temperatura e pH ótimos

A temperatura e o pH ótimos para a atividade da protease purificada produzida por *A. avenaceus* URM 6706 foram 50 °C e 10,0, respectivamente; corroborando com resultados obtidos por Niyonzima e More (2015) e Salihi e colaboradores (2016) que também observaram a temperatura ótima de atividade de 50 °C e pH ótimo alcalino para as proteases produzidas por *Aspergillus terreus* gr e *Aspergillus oryzae* CH93, respectivamente.

A temperatura e pH ótimos são parâmetros de grande importância para uma melhor atividade enzimática, sendo necessário que essas condições ótimas sejam mantidas para que haja a liberação eficiente dos peptídeos (ALUKO, 2015), por esta razão, a temperatura de 50 °C e pH 10,0 foram mantidos pelas 24 horas de hidrólise na clara de ovo de galinha de capoeira. Castro e Sato (2015) também utilizaram os parâmetros ótimos das proteases aplicadas na hidrólise da clara de ovo.

3.2. Teste de citotoxicidade dos hidrolisados

Peptídeos e hidrolisados proteicos possuem diferentes efeitos citotóxicos baseados em sua estrutura molecular (HOMAYOUNI-TABRIZI; ASOODEH; SOLTANI, 2016). A

viabilidade celular após exposição aos hidrolisados da clara de ovo de galinha de capoeira está disposta na Tabela 1. Os resultados demonstram que os resultados foram inversamente proporcional à concentração do hidrolisado, ou seja, a menor viabilidade celular foi encontrada nas maiores concentrações dos hidrolisados para todas as faixas de massas moleculares testadas, chegando a 0% de viabilidade celular a partir de 25 mg.mL⁻¹ do hidrolisado, para as duas linhagens celulares estudadas. Picoli et al. (2016) ao estudar o efeito de um peptídeo isolado do veneno de abelha, a melitina, também encontraram essa relação, em que as menores taxas de morte celular foram encontradas nas menores concentrações do peptídeo.

Pode-se perceber que, de uma forma geral, a viabilidade celular permaneceu acima de 80% até a concentração de 6,25 mg.mL⁻¹ do hidrolisado para as duas linhagens celulares, exceto para os hidrolisados com massa molecular 3<n<10 kDa que nesta concentração, 6,25 mg.mL⁻¹, permitiram uma viabilidade celular de 77% para a linhagem celular MDBK.

O peptídeo originado da hidrólise da clara de ovo de avestruz (ASOODEH et al., 2016) teve efeito significativo na viabilidade celular durante 24 horas, ao passo que a viabilidade celular foi reduzida após as 48 e 72 horas de tratamento, no entanto essa viabilidade celular permaneceu acima dos 80% para todos os ensaios testados; porém vale ressaltar que a maior concentração testada do peptídeo foi de 1 mg.mL⁻¹. Peptídeos de outras fontes animais também têm sido testados quanto à citotoxicidade, por exemplo, os peptídeos produzidos obtidos da hidrólise do leite de camelo que apresentaram uma citotoxicidade de aproximadamente 20% em sua maior concentração 1 mg.mL⁻¹, sendo considerada uma baixa citotoxicidade (HOMAYOUNI-TABRIZI et al., 2016). Comparando os resultados obtidos de citotoxicidade dos hidrolisados da clara de ovo de galinha de capoeira na concentração de 1,56 mg.mL⁻¹, concentração próxima a dos trabalhos citados, pode-se dizer que esses foram menos prejudiciais ao crescimento celular; uma vez que apresentaram uma viabilidade celular de próxima aos 100% e 70 % em todas as faixas de massa molecular para as células MDBK e VERO, respectivamente, o que reforça sua possível aplicação como uma molécula bioativa.

3.3. Inibição das enzimas ECA, α -glicosidase e a α -amilase pelos hidrolisados da clara de ovo de galinha de capoeira

Na Tabela 2 estão expostas as faixas de massa molecular dos hidrolisados da clara do ovo de galinha de capoeira e suas respectivas atividades biológicas. Os hidrolisados

apresentaram atividade inibitória para ECA, para a α -glicosidase e para a α -amilase; no entanto a inibição da ECA foi mais expressiva para os hidrolisados com massa molecular entre 10 e 30 kDa. Já a inibição da α -glicosidase e da α -amilase foi maior para os hidrolisados menores que 3 kDa.

Muitos peptídeos e hidrolisados da clara de ovo têm sido reportados como inibidores da ECA (RAO et al., 2012; YU et al., 2012; BATH, KUMAR, 2014), como por exemplo hidrolisados da clara de ovo de avestruz que demonstraram atividade inibitória da ECA que variaram de 28 a 57% (TANZADEHPANAH et al., 2013). Alimentos funcionais com propriedades anti-hipertensivas podem ser compostos pelos hidrolisados da clara de ovo ou seus peptídeos e frações específicas.

O enriquecimento de frações ou o isolamento de peptídeos específicos da mistura total de peptídeos é um desafio tecnológico na produção de peptídeos inibidores da ECA e anti-hipertensivos para produtos alimentares funcionais. Como uma característica comum dos peptídeos inibidores da ECA é o seu tamanho relativamente pequeno, o fracionamento utilizando ultrafiltração e cromatografia de exclusão de tamanho, constitui um passo útil para a pré-concentração (FUJITA et al., 2001), como foi realizado neste trabalho.

A atividade antidiabética também tem sido relacionada aos hidrolisados da clara de ovo (YU et al., 2011b, Yu et al., 2012). A inibição da α -glicosidase e α -amilase é considerada um mecanismo eficiente no controle da diabetes, uma vez que diminui a absorção de glicose (LEE et al., 2007), por esse ponto de vista podemos considerar que os hidrolisados obtidos da clara de ovo de galinha de capoeira possuem potencial atividade antidiabética, uma vez que os hidrolisados com massa molecular menor que 3 kDa inibiram a α -glicosidase e a α -amilase em 57 e 94%, respectivamente. A maioria dos inibidores da α -glicosidase, no entanto, são açúcares ou derivados de açúcar, existindo apenas alguns compostos não sacarídeos que inibem eficazmente as glicosidases (KAMIYAMA et al., 2010; OH et al., 2010; ZHANG et al., 2010), demonstrando a inovação do trabalho no desenvolvimento de compostos nutracêuticos.

Quando os hidrolisados com massa molecular entre 10 a 30 kDa foram testados quanto a inibição da ECA em diferentes concentrações, no entanto a inibição só ocorreu nas duas maiores concentrações do hidrolisado 50 e 25 mg.mL⁻¹ (Tabela 3) para a atividade testada com o FAPGG, com 47 e 34% de inibição respectivamente.

No entanto, essas concentrações dos hidrolisados provocaram o maior efeito citotóxico (Tabela 1) com 0% de viabilidade celular para as duas linhagens celulares testadas. Porém, no ensaio de inibição da ECA com o HHL, houve atividade inibitória para todas as concentrações de hidrolisados testadas, sendo a menor inibição de 80%, nas duas menores concentrações dos hidrolisados, permitindo a utilização desses hidrolisados como anti-hipertensivo em suas concentrações de menor efeito citotóxico.

Estudos demonstraram que peptídeos bioativos produzem efeitos anti-hipertensivos principalmente como resultado de ações inibitórias das enzimas ECA ou renina; por meio de interações peptídicas competitivas, não competitivas ou mesmo pelas duas (ALUKO, 2015). Por exemplo, verificou-se que os peptídeos isolados dos hidrolisados de colágeno inibem a atividade da ECA de uma forma competitiva, o que indica a interação com o sítio ativo da ECA e a competição com o substrato para bloquear a proteólise (BANERJEE; SHANTHI, 2012). Por outro lado, Memarpoor-Yazdi et al. (2012) mostraram que os peptídeos derivados da clara de ovo inibiram a ECA de forma não competitiva, o que sugere uma interação com as proteínas enzimáticas em locais diferentes do sítio ativo (ALUKO, 2015).

Analisando-se os resultados obtidos pelos hidrolisados da clara de ovo de galinha de capoeira e supondo que a inibição da ECA por elas causada seja por competição do sítio ativo, sugere-se que no caso do ensaio contendo o FAPGG, a afinidade deste pelo sítio ativo da ECA é maior que a afinidade dos hidrolisados pelo sítio ativo na ECA, o que resultou em menores atividades de inibição. Já no ensaio em que o HHL é utilizado, o inverso aconteceu; acarretando maiores valores de inibição, provavelmente por uma maior afinidade do sítio ativo da ECA pelos hidrolisados da clara de ovo do que pelo HHL.

Os hidrolisados com atividade antidiabética, foram testadas a atividade daqueles com massa molecular menor que 3 kDa em diferentes concentrações (Tabela 3). A inibição da α -glicosidase ficou acima dos 50% até a concentração de 6,25 mg.mL⁻¹, sendo 0% nas duas menores concentrações dos hidrolisados. Já a inibição da α -amilase, foi aumentando a medida que a concentração dos hidrolisados diminuía até a concentração de 6,25 mg.mL⁻¹, tendo sua maior atividade, diminuindo após essa concentração. No entanto, a utilização dos hidrolisados na concentração de 6,25 mg.mL⁻¹ possibilitaria a inibição das duas enzimas numa baixa citotoxicidade.

Como o diabetes mellitus tipo 2 é definido pela falha orgânica no controle efetivo dos níveis plasmáticos de glicose, devido sua produção insuficiente e resistência à insulina; o

controle da hiperglicemia pós-prandial é a chave para o tratamento da doença (ARNFRED et al., 1988; SHEU et al., 2011). Portanto, os hidrolisados da clara de ovo de galinha de capoeira poderiam ser aplicados para este fim, uma vez que inibiriam a hidrólise de açúcares pelas enzimas α -glicosidase e α -amilase, evitando-se os picos nos níveis de glicose após as refeições (KIMURA et al. 2004).

Tabela 1. Viabilidade de células (%) *Madin-Darby Bovine Kidney* (MDBK) e *African Green Monkey Kidney* (Vero) após 24 horas de exposição aos hidrolisados da clara de ovo de galinha de capoeira.

Concentração do hidrolisado (mg.mL ⁻¹)	Massa molecular do hidrolisado (KDa)					
	< 3	3 <n< 10	10<n<30	< 3	3 <n< 10	10<n<30
	Crescimento celular MDBK (%)			Crescimento Celular Vero (%)		
0	100	100	100	100	100	100
0,39	94,81	101,17	100,84	94,72	90,88	93,58
0,78	96,10	101,33	101,81	79,20	84,75	87,74
1,56	99,28	99,87	101,01	79,48	87,46	88,03
3,12	87,70	99,71	99,82	85,89	86,46	92,45
6,25	86,30	77,41	85,22	80,19	86,03	90,59
12,5	29,79	0,10	3,82	42,73	14,95	20,22
25	0	0	0	0	0	0
50	0	0	0	0	0	0

Tabela 2. Atividade inibitória das enzimas ECA, α -glicosidase e para a α -amilase dos hidrolisados de diferentes faixas de massa molecular obtidos pela hidrólise da clara de ovo de galinha de capoeira.

Frações dos hidrolisados (kDa)	Atividade Inibitória de ECA (%) - FAPPG	Atividade Inibitória de ECA (%) - HHL	Atividade Inibitória da α -glicosidase (%)	Atividade Inibitória da α -amilase (%)
n < 3	0 \pm 3,15	22,72 \pm 0,75	57,58 \pm 2,8	94,36 \pm 3,98
3 < n < 10	12,61 \pm 2,25	63,63 \pm 1,5	23,06 \pm 0	18,31 \pm 3,98
10 < n < 30	84,08 \pm 2,25	82,32 \pm 2,2	7,67 \pm 0	0 \pm 2,11

Tabela 3. Atividade inibitória das enzimas ECA, α -glicosidase e para a α -amilase dos hidrolisados de diferentes concentrações obtidos pela hidrólise da clara de ovo de galinha de capoeira.

Concentração do hidrolisado (mg.mL ⁻¹)	Massa molecular do hidrolisado (KDa)			
	<3n<10		>3	
	Atividade Inibitória de ECA (%) - FAPPG	Atividade Inibitória de ECA (%) - HHL	Atividade Inibitória da α -glicosidase (%)	Atividade Inibitória da α -amilase (%)
50	47,65 \pm 0,37	100 \pm 0,6	66,66 \pm 2,77	8,3 \pm 1,41
25	34,62 \pm 0,46	99,24 \pm 0,35	60,78 \pm 2,66	14,20 \pm 0,56
12,5	0 \pm 0,41	96,96 \pm 0,30	56,86 \pm 2,75	33,13 \pm 1,93
6,25	0 \pm 0,42	84,09 \pm 0,25	56,82 \pm 2,67	40,51 \pm 1,85
3,12	0 \pm 0,43	83,33 \pm 0,030	17,64 \pm 2,77	34,52 \pm 0,56
1,56	0 \pm 0,44	81,06 \pm 0,35	0 \pm 2,56	32,38 \pm 0,56
0,78	0 \pm 0,52	80,30 \pm 0	0 \pm 2,70	32,38 \pm 0,56
0,39	0 \pm 0,37	80,30 \pm 0	0 \pm 2,77	24,42 \pm 0,55

4. Conclusões

Os resultados obtidos pela análise das atividades biológicas dos hidrolisados da clara de ovo de galinha de capoeira demonstram possível aplicação como alimento funcional no tratamento da diabetes e hipertensão, sendo que para um melhor aproveitamento de suas funções biológicas, seria mais interessante o consumo desses hidrolisados não purificados, uma vez que os de menor massa molecular apresentam maior atividade antidiabética e os de maior massa molecular melhor atividade anti-hipertensiva, sendo melhor seu consumo concomitante.

5. Referências

- J. Adler-Nissen, Determination of the degree of hydrolysis of food protein hydrolysates by trinitrobenzenesulfonic acid, *J Agric Food Chem* 1979, 27, 1262.
- H. Ali, P. J. Houghton, A. Soumyanath, α -Amylase inhibitory activity of some Malaysian plants used to treat diabetes; with particular reference to *Phyllanthus amarus*. *J Ethnopharmacol* 2006, 107, 449–455.
- A. Asoodeh, M. Homayouni-Tabrizi, H. Shabestarian, S. Emtenani, S. Emtenani, Biochemical characterization of a novel antioxidante and angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptide from *Struthio camelus* egg white protein hydrolysis. *J Food Drug Anal* 2016, 24, 332 - 342.
- H. M. Alu'datt, K. Ereifej, A. Abu-Zaiton, M. Alrababah, A. Almajwa, T. Rababah, W. Yang, Anti-oxidant, anti-diabetic and anti-hypertensive effects of extracted phenolics and hydrolyzed peptides from barley protein fractions. *Int J Food Propert* 2012, 15,781–795.
- R. E. Aluko, Antihypertensive Peptides from Food Proteins. *Annu. Rev. Food Sci. Technol* 2015, 6, 235–62.
- P. Banerjee, C. Shanthi, Isolation of novel bioactive regions from bovine Achilles tendo collagen having angiotensin I-converting enzyme inhibitory properties. *Process Biochem* 2012, 47, 2335–46.
- Z. F. Bhat, S. Kumar. Bioactive peptides from egg: a review. *Nutr Food Sci* 2016, 45, 190-212.
- Z. F. Bhat, S. Kumar, H. F. Bhat, Bioactive peptides of animal origin: a review. *J Food Sci Technol* 2015, 52, 5377–5392.
- M. M. A. Bradford, Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of proteindye binding. *Anal Biochem* 1976, 72, 248-254.

- R. J. S. Castro, H. H. Sato. A response surface approach on optimization of hydrolysis parameters for the production of egg White protein hydrolysates with antioxidant activities. *Biocatal Agric Biotechnol* 2015, 4, 55–62.
- C. Chen, Y. Chi, M. Zhao, L. Lv, Purification and identification of antioxidant peptides from egg white protein hydrolysate. *Amino Acids* 2012, 43, 457–466.
- D. W. Cushman, H. S. Cheung, Spectrophotometric assay and properties of the angiotensin-converting enzyme of rabbit lung. *Biochem Pharmacol* 1971, 20, 1637–1648.
- A. Davalos, M. Miguel, B. Bartolome, R. López-Fandinó, Antioxidant activity of peptides derived from egg white proteins by enzymatic hydrolysis. *J Food Protect* 2004, 67, 1939–1944.
- H. Fujita, R. Sasaki, M. Yoshikawa, Potentiation of the antihypertensive activity of orally administered ovokinin, a vasorelaxing peptide derived from ovalbumin, by emulsification in egg phosphatidylcholine. *Biosci Biotech Bioch* 1995, 59, 2344–2345.
- H. Fujita, T. Yamagami, K. Ohshima, “Effects of an ACE-inhibitory agent, katsuobushi oligopeptide, in the spontaneously hypertensive rat and in borderline and mildly hypertensive subjects”, *Nutr Res* 2001, 21, 1149–1158.
- D. Gong, J. Kalina, M. M. Bain, P. W. Wilson, I. C. Dunn. Gallin: A new antimicrobial peptide from egg white. *Brit Poultry Abstr* 2009, 5, 8–9.
- M. Ghorbanpur, M. Zare, F. Zokaei, H. Zolfagarriani, H. Rabiei, Purification and partial characterization of a coagulant serine protease from the venom of the Iranian snake *Agkistrodon halys*. *J Venom Anim Toxins incl Trop Dis* 2009, 15, 411–423.
- W. Huang, S. Chakrabarti, K. Majumder, Y. Jiang, S. T. Davidge, J. Wu, Egg-derived peptide IRW inhibits TNF α -induced inflammatory response and oxidative stress in endothelial cells. *J Agr Food Chem* 2010, 58, 10840–10846.
- B. Holmquist, P. Bunning, J. F. Riordan, A Continuous Spectrophotometric Assay for Angiotensin Converting Enzyme. *Anal Biochem* 1979, 540–548.
- M. Homayouni-Tabrizi, A. Asoodeh, M. Soltani, Cytotoxic and antioxidant capacity of camel milk peptides: Effects of isolated peptide on superoxide dismutase and catalase gene expression. *J Food Drug Anal* 2016, *in press*.
- O. Kamiyama, F. Sanae, K. Ikeda, Y. Higashi, Y. Minami, N. Asano, I. Adachi, A. Kato, In vitro inhibition of α -glucosidases and glycogen phosphorylase by catechin gallates in green tea. *Food Chem* 2010, 122, 1061–1066.
- Y. M. Kim, M. H. Wang, H. I. Ree, A novel α -glucosidase inhibitor from pine bark. *Carbohydr Res* 2004, 339, 715–717.

- R. M. Lago, P. P. Singh, R. W. Nesto, Diabetes and hypertension. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab* 2007, 3, 667–667.
- Y. A. Lee, E. J. Cho, T. Tanaka, T. Yokozawa, Inhibitory activities of proanthocyanidins from persimmon against oxidative stress and digestive enzyme related to diabetes. *J Nutr Sci Vitaminol* 2007, 53, 287–292.
- T. J. Leighton, R. H. Doi, R. A. J. Warren, R. A. Kelln, The Relationship of serine protease activity to RNA polymerase modification and sporulation in *Bacillus subtilis*. *Journal of Molecular Biology*, 1973, v. 76, p. 103-122.
- M. Memarpoor-Yazdi, A. Asoodeh, J. K. Chamani, Structure and ACE-inhibitory activity of peptides derived from hen egg white lysozyme. *Int J Pept Res Ther* 2012, 18, 353–60.
- Y. Mine, Egg proteins and peptides in human health – chemistry, bioactivity and production. *Curr Pharm Des* 2007, 13, 875–884.
- F. N. Niyonzima, S. S. More, S. S. Purification and characterization of detergent-compatible protease from *Aspergillus terreus* gr. 3. *Biotech* 2015, 5, 61–70.
- K. Y. Oh, J. H. Lee, M. J. Curtis-Long, J. K. Cho, J. Y. Kim, W. S. Lee, K. H. Park, Glycosidase inhibitory phenolic compounds from the seed of *Psoralea corylifolia*. *Food Chem* 2010, 121, 940–945.
- T. Picoli, C. S. Pich, M. G. Lopes, A. G. Teixeira, G. Fischer, Sensibilidade de linhagens celulares frente à melitina isolada de veneno de abelha. *Sci Animal Heal* 2016, 4, 101-116.
- N. Ramasubbu, C. Ragunath, P. J. Mishra, L. M. Thomas, G. Gyemant, L. Kandra, Human salivary alpha-amylase Trp58 situated at subsite-2 is critical for enzyme activity. *Eur J Biochem* 2007, 271, 2517–2529.
- H. Samaraweera, W. G. Zhang, E. J. Lee, D. U. Ahn, Egg yolk phosphovitin and functional phosphopeptides—review. *J Food Sci* 2011, 76, R143–R150.
- A. Salihi, A. Asoodeh, M. Aliabadian, Production and biochemical characterization of an alkaline protease from *Aspergillus oryzae* CH93. *Int J Biol Macromol*, *in press*, 2016.
- S. Q. Rao, T. Ju, J. Sun, Y. J. Su, R. R. Xu, Y. J. Yang, Purification and characterization of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides from enzymatic hydrolysate of hen egg white lysozyme. *Food Res Int* 2012, 46, 127–134.
- H. Tanzadehpanah, A. Asoodeh, M. R. Saberi, J. Chamani. Identification of a novel angiotensin-I converting enzyme inhibitory peptide from ostrich egg white and studying its interactions with the enzyme. *Innov Food Sci Emer Technol* 2013, 18, 212–219.

Z. Yu, T. Yin, W. Zhao, F. Wang, Y. Yu, B. Liu, J. Liu, F. Chen, Characterization of ACE-inhibitory peptide associated with antioxidant and anticoagulation properties. *J Food Sci* 2011a, 76, C1149–C1155.

Z. Yu, Y. Yin, W. Zhao, Y. Yu, B. Liu, J. Liu, F. Chen, Novel peptides derived from egg white protein inhibiting alpha-glucosidase. *Food Chem* 2011b, 129, 1376–1382.

Z. Yu, B. Liu, W. Zhao, Y. Yin, J. Liu, F. Chen, Primary and secondary structure of novel ACE-inhibitory peptides from egg white protein. *Food Chem* 2012, 133, 315–322.

L. Zhang, J. R. Li, S. Hogan, H. Chung, G. E. Welbaum, K. Q. Zhou, Inhibitory effect of raspberries on starch digestive enzyme and their antioxidante properties and phenolic composition. *Food Chem* 2010, 119, 592–599.

C. Zhang, W. Cao, P. Hong, H. Ji, X. Qin, J. He, Angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity of *Acetes chinensis* peptic hydrolysate and its antihypertensive effect in spontaneously hypertensive rats. *Int J Food Sci Tech* Volume 2009, 44, 2042–2048.

CAPITULO IV

Hidrolisados da clara de ovo de galinha de capoeira como inibidores de crescimento de *Staphylococcus aureus*, Herpes vírus bovino tipo 1 (BoHV-1) e Vírus da diarreia viral bovina (BVDV).

Hidrolisados da clara de ovo de galinha de capoeira como inibidores de crescimento de *Staphylococcus aureus*, Herpes vírus bovino tipo 1 (BoHV-1) e Vírus da diarreia viral bovina (BVDV)

Anna Carolina da Silva^a, Alana Emília Soares de França Queiroz^a, Tony Picoli^b, Geferson Fischer^b, Cristina Maria de Souza-Motta^d, Elizabete Rodrigues da Silva^c, Amanda Reges de Sena, Keila Aparecida Moreira^{a,c*}

- (a) Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal, Universidade Federal Rural de Pernambuco. R. Manuel de Medeiros, s/n, CEP: 52171-900, Recife - PE, Brasil.
- (b) Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Universidade Federal de Pelotas. Campus Universitário S/Nº, CEP: 96010-900, Capão do Leão-RS, Brasil.
- (c) Unidade Acadêmica de Garanhuns, Universidade Federal Rural de Pernambuco. Av. Bom Pastor, s/n, Boa Vista, CEP: 55292-278, Garanhuns-PE, Brasil.
- (d) Departamento de Micologia, Universidade Federal de Pernambuco, Av. Moraes Rego, s/n, Cidade Universitária, CEP: 50670-901, Recife-PE, Brasil.

* Autor para correspondência: Unidade Acadêmica de Garanhuns, Universidade Federal Rural de Pernambuco. Avenida Bom Pastor, s/n, Boa Vista, CEP: 55292-278, Garanhuns-PE, Brasil. Telefone: (+5587) 37645520; FAX: 37645500; e-mail: moreirakeila@hotmail.com

Resumo

As enfermidades causadas por *Staphylococcus aureus*, pelo herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1) e vírus da diarreia viral bovina (BVDV) envolvem difícil controle e resistência a agentes terapêuticos por parte do micro-organismo, além da diminuição da produção animal. Por esta razão, muitos compostos naturais vêm sendo estudados como inibidores do crescimento desses micro-organismos. Objetivou-se com este trabalho avaliar os peptídeos obtidos pela hidrólise da clara de ovo de galinha de capoeira quanto sua citotoxicidade e atividade antimicrobiana *in vitro*. Para isto, a protease produzida pelo *Aspergillus avenaceus* URM 6706 foi purificada e aplicada na hidrólise das proteínas da clara de ovo de galinha de capoeira. Os testes de citotoxicidade foram realizados em linhagens celulares MDBK (células de rim bovino) e Vero (células de rim de macaco verde africano). A atividade antimicrobiana foi avaliada frente a cepas de *S. aureus* isoladas de vacas com mastite subclínica e frente ao BoHV-1 e o BVDV. As maiores citotoxicidades foram encontradas nas maiores concentrações dos hidrolisados (50 e 25 mg.mL⁻¹). Os hidrolisados da clara de ovo de galinha de capoeira apresentaram atividades antiestafilocócica e antiviral, inibindo o crescimento de *S. aureus* em até 88% e apresentando ação antiviral e virucida (90%) contra o BVDV. Os hidrolisados da clara de ovo de galinha de capoeira possuem grande potencial para ser aplicados no controle e prevenção de infecções por *S. aureus* e BVDV em bovinos, no entanto estudos mais específicos devem ser realizados para avaliar a viabilidade, forma de apresentação e de aplicação dos mesmos para combater essas doenças.

Palavras-chave: *Aspergillus*, MDBK, Vero, mastite, BoHV-1 e BVDV

1. Introdução

Das atividades ligadas ao agronegócio, o Brasil se destaca na bovinocultura, sendo o detentor do segundo maior rebanho efetivo de bovinos do mundo que proporciona desenvolvimento local por meio de dois segmentos lucrativos: as cadeias produtivas da carne e leite (MAPA, 2011). No entanto, a sanidade do rebanho bovino, em particular relacionada às infecções, se destaca como um importante fator de interferência na eficiência produtiva dos rebanhos (JUNQUEIRA; ALFIERI, 2006).

Dentre as causas da mastite bovina, o *Staphylococcus aureus* é tido como seu principal causador, com frequências que chegam à 70,9%, reduzindo em até 15% a produção leiteira (FREITAS et al., 2005; ZANETTE et al., 2010). A alta prevalência dessa espécie bacteriana na etiologia da mastite bovina está associada à capacidade de desenvolver resistência aos antimicrobianos empregados, além da habilidade desse patógeno de invadir e se estabelecer profundamente nos tecidos da glândula mamária (MORONI et al., 2006; ZAFALON et al., 2008).

Dentre as doenças causadas por vírus, o herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1) é responsável por infecções em bovinos que acometem as vias respiratórias superiores (rinotraqueíte) e o trato genital (vulvovaginite) (NAKAMICHI et al., 2002, BRUGGEMANN et al., 2006). A diarreia viral bovina (BVD) é uma doença também viral, que afeta significativamente a bovinocultura por todo o mundo. Esta doença apresenta uma variedade de síndromes em bovinos, muitos dos quais não são detectados ou permanecem leves, mas a infecção crônica pode levar à doença das mucosas, que pode ser fatal (FREDERICKSEN et al., 2015).

Existem cerca de 40 medicamentos oficialmente aprovados para a quimioterapia de infecções virais (GILBERT et al., 2002; DE CLERCQ, 2004) sendo divididos em duas classes diferentes de fármacos antivirais: os análogos de nucleosídicos e os inibidores de DNA polimerase. No entanto, o uso prolongado desses medicamentos resultou em algumas complicações indesejáveis e além de induzir o aparecimento de cepas de vírus resistentes aos fármacos (SAHA et al., 2010).

Por isso, a busca por novas alternativas que não aumentem a taxa de resistência antimicrobiana é atual e interessante e, neste contexto, a utilização de peptídeos advindos de fontes naturais é uma tecnologia em ascensão, visto que vários estudos já demonstraram que

possuem atividade antibacteriana. Em relação à característica antiviral, os estudos são insipientes, necessitando de experimentos. Neste contexto, objetivou-se avaliar a atividade antibacteriana e antiviral de hidrolisados da clara de ovo de galinha de capoeira.

2. Materiais e Métodos

2.1. Produção e purificação da protease

A protease utilizada na hidrólise da clara de ovo de galinha de capoeira foi produzida por *Aspergillus avenaceus* URM 6706, fungo filamentoso cedido pelo Departamento de Micologia da Universidade Federal de Pernambuco, Brasil. As condições de fermentação e purificação da protease estão descritas no Capítulo 2, ítem 2.1.

2.2. Atividade Proteásica

A atividade proteásica foi realizada segundo método de Leighton et al (1973), com algumas modificações, em que 60 µL do extrato enzimático foram adicionados a 100 µL de azocaseína (1,0%) em tampão Tris-HCl (pH 7,2 e 0,2 M). A mistura reacional foi incubada por 1h à temperatura ambiente e interrompida pela adição de 480 µL de ácido tricloroacético (TCA) a 10% (p/v), seguida da centrifugação por 5 minutos a 8,000g sob temperatura de 4 °C. Do sobrenadante foram retirados 320 µL e adicionados a 560 µL de NaOH (1 M). Uma unidade (U) da atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima capaz de hidrolisar a azocaseína de forma a aumentar 0,1 U da absorbância sob o comprimento de onda de 440 nm.

2.3. Determinação do conteúdo de proteínas no extrato enzimático

O método de Bradford (1976) foi utilizado para quantificar o conteúdo de proteínas. A curva de calibração foi realizada a partir de soluções estoque de albumina de soro bovino (BSA) numa faixa de concentrações de 0-600 µg.mL⁻¹. As soluções foram submetidas a uma leitura da absorbância a 595 nm em espectrofotômetro (Biochrom Libra S6®, Cambridge, Reino Unido).

2.4. Determinação da temperatura e pH ótimos

A temperatura ótima da enzima pura produzida por *A. avenaceus* URM 6706 foi determinado ao se realizar a atividade proteásica em diferentes temperaturas (30-80 °C) e o

pH ótimo foi determinado utilizando-se diferentes tampão a 0,2 M: fosfato de sódio, Tris-HCl e carbonato-bicarbonato numa faixa de pH de 5,0 a 11,0.

2.5. Hidrólise das proteínas da clara de ovo de galinha de capoeira e ultrafiltração do hidrolisado

A clara de ovo (200 mL) foi homogeneizada em 800 mL de tampão fosfato de sódio (pH 8,0 e 50 mM) durante 10 minutos em baixa rotação. Essa suspensão proteica foi posteriormente hidrolisada pela protease produzida por *A. avenaceus* URM 6706, após sua purificação. A hidrólise foi realizada à temperatura e a pH ótimos de atuação da enzima empregada (50° C e 10,0; respectivamente), numa concentração enzimática de 1 %, por 24 horas, com alíquotas retiradas a cada 4 horas de hidrólise. Para que ocorresse a interrupção da hidrólise enzimática, cada ponto retirado foi fervido por 10 minutos e em seguida mantido a -2 °C. Os hidrolisados foram separados de acordo com a massa molecular por meio de ultrafiltração (Amicon®, Alemanha) sucessiva em *Molecular weight cut-off* (limite de massa molecular) de 3, 10 e 30 kDa, sendo agrupados em hidrolisados com massa molecular menor que 3 kDa, entre 3 e 10 kDa e entre 10 e 30 kDa. Antes de se prosseguir com as análises necessárias, as amostras foram centrifugadas, a fim de se obter apenas os peptídeos solúveis (TANZADEHPANAH et al., 2013).

2.6. Determinação do grau de hidrólise

O grau de hidrólise obtido foi considerado como o percentual de ligações peptídicas clivadas, foi determinado por meio da medição de grupos amino livres com 2,4,6-ácido trinitrobenzeno sulfônico (TNBS), de acordo com metodologia descrita por Adler-Nissen (1979). O número total de grupos amina foi determinado numa amostra de proteína da clara de ovo de galinha de capoeira (10 mg) completamente hidrolisada em 4 mL de HCl a 6 M, durante 24 h a 110 °C.

2.7. Teste de citotoxicidade dos hidrolisados

Para a realização dos ensaios de citotoxicidade, os hidrolisados foram testados em concentrações que variaram de 0,39 a 50 mg.mL⁻¹, as diluições foram preparadas em Meio Essencial Mínimo de Eagle (E-MEM, Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, EUA). Células *Madin-Darby Bovine Kidney* (MDBK) e *African Green Monkey Kidney* (Vero), adquiridas do banco

de células do Laboratório de Virologia e Imunologia da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal de Pelotas; conforme descrito no Capítulo 3, item 2.6.

2.8. Atividade antiestafilocócica

A atividade antiestafilocócica do hidrolisado da clara de ovo de galinha de capoeira foi realizada seguindo ensaio de microdiluição em caldo, conforme norma M7-A6 do CLSI (CLINICAL LABORATORY STANDARDS INSTITUTE, 2003). Placas de 96 poços de fundo plano, de poliestireno e estéreis foram utilizadas (Corning®) para o ensaio. O hidrolisado da clara de ovo de galinha de capoeira foi testado contra seis isolados de *Staphylococcus aureus*, sendo três de mastite intramamária bovina subclínica recente (R4, R17 e R93), ou seja, isolado apenas uma vez ao longo de um período; e três subclínica intramamária persistente (P21, P133 e P342) adquiridas da Coleção de Culturas do Laboratório de Microbiologia/CENLAG da Universidade Federal Rural de Pernambuco/UAG, Brasil. Todos os isolados de *S. aureus* apresentam o fenótipo penicilina+ampicilina resistente. Foram testadas concentrações de 0,39 a 50 mg.mL⁻¹. Foram consideradas amostras com atividade antiestafilocócica as que obtiveram densidade ótica menor do que a observada no controle positivo (95% v/v de caldo Mueller-Hinton e 5% v/v de inóculo de cada micro-organismo testado a uma concentração de 10⁶ UFC.mL⁻¹) de cada bactéria pela mensuração a 600 nm em leitora de microplaca Asys UVM 340 (Biochrom, Cambridge, Reino Unido), os ensaios foram realizados em triplicata.

2.9. Atividade antiviral

A atividade antiviral foi avaliada por meio da viabilidade de células MDBK expostas ao vírus após os períodos de incubação com os hidrolisados (0,78 a 6,25 mg.mL⁻¹) e os vírus. Foram avaliadas por dois métodos distintos quanto ao momento da infecção: a) tratamento das células com os hidrolisados antes da infecção (tratamento pré-infecção), e b) tratamento das células após a infecção. Todas as análises foram realizadas em sextuplicata:

a) Tratamento antes da infecção - células MDBK após 24 horas foram tratadas com 100 µL de cada um dos tratamentos e após 24 horas, o sobrenadante foi removido e sobre as células foi adicionado 0,1 MOI dos vírus (BoHV-1 ou BVDV). Após 72 horas de incubação, a leitura se deu pela avaliação da viabilidade celular pelo teste MTT.

b) Tratamento após infecção - Após crescimento em placas, as células foram infectadas com os vírus por duas horas, quando foi removido, e os tratamentos realizados sobre as células. Após 72 horas foi realizada a leitura da mesma maneira descrita.

2.10. Atividade virucida

Vírus BoHV-1 e BVDV foram incubados com os hidrolisados (0,78 a 6,25 mg.mL⁻¹) sob temperatura ambiente (22 °C) por até 4 horas. A concentração selecionada dos compostos foi baseada nos resultados dos testes de citotoxicidade. Durante a incubação, em quatro momentos (zero, uma, duas, e quatro horas), foram coletadas alíquotas das suspensões víricas com os tratamentos para realização das titulações virais.

Os títulos virais foram avaliados pelo método de Reed & Muench (1939) e estão expressos como doses infectantes para 50% de cultivos celulares (CCID50) e a atividade antiviral foi expressa em percentual de inibição (*PI*) e calculada pelos títulos virais pela equação:

$$PI(\%) = \left[1 - \left(\frac{\text{antilog}_{\text{tratamento}}}{\text{antilog}_{\text{controle}}} \right) \right] \times 100 \quad (2)$$

2.11. Análise estatística

Todos ensaios foram realizados em triplicata, exceto o ensaio de citotoxicidade que foi feito em sexuplicata. A variância com comparação entre médias foi realizada pelo teste de Tukey adotando uma significância de 95% como base para afirmar diferenças entre médias, para os testes de citotoxicidade, atividade antiviral e atividade virucida. As análises foram realizadas com auxílio do software estatístico BioEstat® versão 5.3.

3. Resultados e Discussão

3.1. Purificação da protease produzida por *A. avenaceus* URM 6706

Após os dois processos aplicados para a purificação da protease produzida por *A. avenaceus* URM 6706, o fator de purificação obtido foi de 16,82% e desta forma foi aplicada para a hidrólise da clara de ovo de galinha de capoeira. A purificação foi comprovada pela análise de pureza, demonstrada na Figura 1, que mostra apenas uma proteína representada pelo pico único.

O emprego de proteases produzidas por *Aspergillus* spp. para a produção de hidrolisados proteicos com atividades biológicas já têm sido visto em outros trabalhos; como na produção de hidrolisados também da clara de ovo pela aplicação do extrato concentrado por precipitação com sulfato de amônia de proteases produzidas por *A. oryzae* A1(AO), comparado à hidrólise por proteases comerciais. No entanto os melhores resultados de atividades biológicas foram obtidos a partir da hidrólise realizada pelas enzimas comerciais, indicando que a purificação da protease pode ser um importante fator para a liberação de peptídeos com atividades biológicas (CASTRO; SATO, 2015). Esses resultados estão melhor discutidos no capítulo 2 desta tese (páginas 102 – 106).

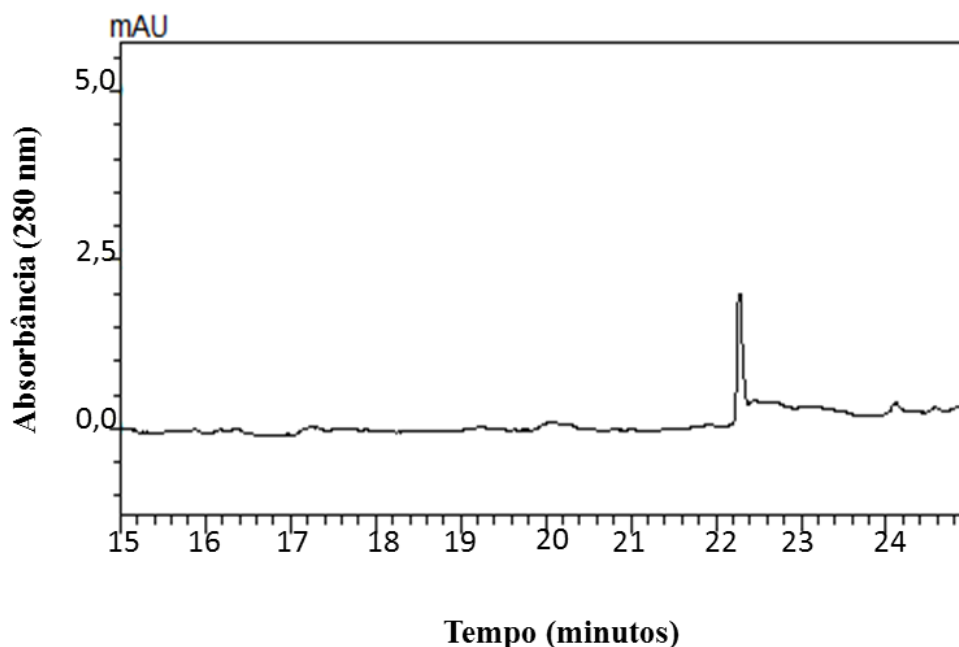


Figura 1. Análise de pureza da protease produzida por *A. avenaceus* URM 6706 por cromatografia líquida de alta eficiência.

3.2. Determinação da temperatura e pH ótimos

A temperatura e pH ótimos são parâmetros de grande importância para uma atividade enzimática mais eficiente, sendo necessário que essas condições ótimas sejam mantidas para que haja a liberação dos peptídeos (ALUKO, 2015), por esta razão, esses parâmetros foram utilizados na hidrólise na clara de ovo de galinha de capoeira pela protease produzida por *A. avenaceus* URM 6706, sendo 50 °C sua temperatura ótima e pH 10,0 o ótimo, assim como

Castro e Sato (2015) também utilizaram os parâmetros ótimos das proteases aplicadas na hidrólise da clara de ovo.

Os resultados obtidos corroboram com resultados obtidos por Niyonzima e More (2015) e Salihi et al. (2016) que também observaram a temperatura ótima de atividade de 50 °C e pH ótimo alcalino para as proteases produzidas por *Aspergillus terreus* gr e *Aspergillus oryzae* CH93, respectivamente.

3.3. Teste de Citotoxicidade dos hidrolisados

Conforme visto no capítulo 3 desta tese (páginas 130 e 131), os diferentes efeitos citotóxicos de hidrolisados proteicos são baseados em sua estrutura molecular (HOMAYOUNI-TABRIZI et al., 2016). A viabilidade celular após exposição aos hidrolisados da clara de ovo de galinha de capoeira está disposta na Tabela 1, e pode-se perceber que essa toxicidade foi menor quando os peptídeos eram de menor massa molecular e inversamente proporcional à concentração do hidrolisado, ou seja, a menor viabilidade celular foi encontrada nas maiores concentrações dos hidrolisados para todas as faixas de massas moleculares testadas, chegando a 0% de viabilidade celular a partir de 25 mg.mL⁻¹ do hidrolisado, para as duas linhagens celulares estudadas. A melitina, um peptídeo isolado do veneno de abelha, quando testada quanto sua citotoxicidade também apresentou esta relação, em que as menores taxas de morte celular foram encontradas nas menores concentrações do peptídeo (PICOLI et al., 2016).

De forma geral, a viabilidade celular permaneceu acima de 80% até a concentração de 6,25 mg.mL⁻¹ do hidrolisado para as duas linhagens celulares. O peptídeo originado da hidrólise da clara de ovo de avestruz (ASOODEH et al., 2016) teve efeito significativo na viabilidade celular durante 24 horas, ao passo que a viabilidade celular foi reduzida após as 48 e 72 horas de tratamento, no entanto essa viabilidade celular permaneceu acima dos 80% para todos ensaios testados; porém vale ressaltar que a maior concentração testada do peptídeo foi de 1 mg.mL⁻¹. Peptídeos de outras fontes animais também têm sido testados quanto à citotoxicidade, por exemplo, os peptídeos produzidos obtidos da hidrólise do leite de camelo que apresentaram uma citotoxicidade de aproximadamente 20% em sua maior concentração 1 mg.mL⁻¹, sendo considerada uma baixa citotoxicidade (HOMAYOUNI-TABRIZI et al., 2016). Comparando os resultados obtidos de citotoxicidade dos hidrolisados da clara de ovo de galinha

de capoeira na concentração de $1,56 \text{ mg.mL}^{-1}$, concentração próxima a dos trabalhos citados, pode-se dizer que esses são menos prejudiciais ao crescimento celular; uma vez que apresentaram uma viabilidade celular de próxima aos 100% e 70 % em todas as faixas de massa molecular para as células MDBK e VERO, respectivamente, o que reforça sua possível aplicação orgânica como uma molécula bioativa.

Tabela 1. Viabilidade de células (%) MDBK e Vero após 24 horas de exposição aos hidrolisados da clara de ovo de galinha de capoeira.

Concentração do hidrolisado (mg.mL^{-1})	Massa molecular do hidrolisado (KDa)					
	< 3	3 <n< 10	10<n<30	< 3	3 <n< 10	10<n<30
	MDBK			VERO		
0	100	100	100	100	100	100
0,39	94,81	101,17	100,84	94,72	90,88	93,58
0,78	96,10	101,33	101,81	79,20	84,75	87,74
1,56	99,28	99,87	101,01	79,48	87,46	88,03
3,12	87,70	99,71	99,82	85,89	86,46	92,45
6,25	86,30	77,41	85,22	80,19	86,03	90,59
12,5	29,79	0,10	3,82	42,73	14,95	20,22
25	0	0	0	0	0	0
50	0	0	0	0	0	0

3.4. Antibacteriano

Peptídeos bioativos com propriedades antimicrobianas foram identificados em uma ampla variedade de fontes naturais que vai de micro-organismos a animais e plantas. Estes peptídeos exibem efeitos inibitórios contra micro-organismos deteriorantes de alimentos e uma vasta gama de agentes patogênicos, incluindo bactérias, fungos, vírus e parasitas eucarióticos (BATH, 2015). Muitos trabalhos têm relatado a atividade antibacteriana de

peptídeos originados de ovo contra *Escherichia coli* e *Leuconostoc mesenteroides* (MEMARPOOR-YAZDI et al., 2012, BATH et al., 2016), por exemplo.

Os efeitos dos hidrolisados da clara de ovo de galinha de capoeira frente aos isolados de *S. aureus* estão apresentados nas Tabelas 2 e 3. A eficácia de peptídeos e hidrolisados proteicos biologicamente ativos e o modo de ação variam dependendo das suas características estruturais e mostram seletividade e sensibilidade variadas aos micro-organismos alvo (BATH, 2015), o que foi observado ao se testar a atividade antimicrobiana dos hidrolisados da clara de ovo, que embora tenham sido testados contra isolados bacterianos da mesma espécie, sua influência foi variável.

Para os isolados recentes (R4, R17 e R93) de *S. aureus* a inibição do crescimento foi muito próxima para as diferentes faixas de massa molecular dos hidrolisados e menor à medida que sua concentração foi diminuída (Tabela 2). A maior inibição de crescimento (88%) foi obtida na concentração de 50 mg.mL^{-1} dos hidrolisados menores que 3 kDa contra o isolado R93, não sendo possível encontrar a concentração mínima inibitória (CMI) para nenhuma das faixas de massa molecular para o R93 e nem para o R4. Para o isolado R17 foi possível encontrar a concentração inibitória mínima dos hidrolisados de massa molecular menor que 3 e entre 3 e 10 kDa, sendo de 0,78 e $1,56 \text{ mg.mL}^{-1}$, respectivamente. Esses valores demonstram a possibilidade de se utilizar os hidrolisados da clara de ovo de galinha de capoeira na prevenção ou tratamento de mastite bovina subclínica nas faixas não tóxicas dos mesmos.

Para os isolados persistentes, a inibição de crescimento foi menos efetiva e mais variável (Tabela 3). As menores inibições foram vistas para *S. aureus* P21, em que não houve inibição de seu crescimento para nenhuma das concentrações testadas dos peptídeos com massa molecular menor que 3 kDa. Houve 13% de inibição do crescimento do P21 até a concentração de 25 mg.mL^{-1} dos hidrolisados com massa molecular entre 3 e 10 kDa, sendo esta a CMI. Para os hidrolisados com massa molecular entre 10 e 30 kDa a CMI encontrada foi de $6,25 \text{ mg.mL}^{-1}$, e a maior inibição foi de 15% na concentração de 50 mg.mL^{-1} . Para os hidrolisados que inibiram o crescimento da P21, seria necessário fazer mais estudos que avaliassem a viabilidade e sua aplicação em níveis com certa citotoxicidade, uma vez que este efeito tóxico pode ser minimizado numa aplicação tópica como no *pré* e *pós-dipping*.

Para o isolado P133 (Tabela 3), a inibição de crescimento foi obtida para os hidrolisados das três faixas de massa molecular, sendo a maior inibição obtida (75%) na maior concentração dos hidrolisados menores que 3 kDa. Para os hidrolisados menores que 3 kDa, a inibição foi mais efetiva em suas maiores concentrações, enquanto que os hidrolisados com massa molecular entre 3 e 10 kDa causaram uma inibição mais uniforme, que foi encontrada a maior inibição de crescimento (39,5%) para a concentração de 1,56 mg.mL⁻¹ dos hidrolisados, quando comparado com a mesma concentração dos hidrolisados menores que 3 e entre 10 e 30 kDa que inibiram 29 e 7%, respectivamente. Os hidrolisados com massa molecular entre 10 e 30 kDa foram menos eficientes na inibição do crescimento do isolado P133.

Ainda na Tabela 3, pode-se perceber que para o isolado P342, a maior inibição de crescimento, 60%, foi obtida pelos hidrolisados menores que 3 kDa a 50 mg.mL⁻¹, sendo possível encontrar a CMI de 3,12 mg.mL⁻¹ para as três faixas de massa molecular, que inibiu 15, 4 e 5% do crescimento deste isolado, respectivamente. Os peptídeos antimicrobianos e os alimentos que os contêm podem ser utilizados como agentes antibacterianos e sua eficácia é determinada pela identificação de concentrações mínimas que inibem a proliferação de um determinado grupo de micro-organismos (NAJAFIAN; BABJI 2012; DZIUBA; DZIUBA, 2014). No caso dos hidrolisados da clara de ovo de galinha de capoeira, estudos ainda são necessários contra as bactérias estudadas cuja CMI não foi encontrada.

As bactérias utilizadas nesse estudo foram caracterizadas como resistentes à drogas do grupo das penicilinas, retratando uma situação instalada na região do estado de Pernambuco, em 2012 e demonstrando uma tendência nacional na mesma direção (SILVA et al., 2012). No entanto, a resistência a drogas do grupo das penicilinas em *S. aureus* isolados de mastite é uma preocupação mundial. A seleção de bactérias resistentes a drogas traz sério risco à saúde pública devido a transmissão de resistência para bactérias causadoras de doenças em humanos, de modo a restringir ou impossibilitar o tratamento dessas infecções (BETANCOURT et al., 2003). Além de estabelecer baixa probabilidade de cura microbiológica da mastite bovina causada pelo agente portador da resistência (BARKEMA et al., 2006), prejudicando a produção de leite.

3.5. Ensaio antiviral e virucida

Na literatura, trabalhos com atividade antiviral de peptídeos originados a partir da hidrólise de fontes de proteínas são escassos, sendo relatada principalmente atividade

antimicrobiana relacionada a peptídeos que participam da imunidade inata de alguns organismos (EGAL, 1999; BATH, 2015), por exemplo, a lactoferrina e os seus derivados mostram atividade antiviral contra os vírus da hepatite C, vírus G e B HIV-1, poliovírus, rotavírus e o vírus herpes simplex (FARNAUD; VANS, 2003, PAN et al., 2007).

No entanto, peptídeos bioativos com propriedades antivirais de origem alimentar foram relatados. No tratamento com alcalase de proteínas de colza, foram liberados peptídeos bioativos que inibiram a protease envolvida na replicação do HIV (YUST et al., 2004). Além disso, Zeng et al. (2008) isolaram uma fração peptídica de ostra do Pacífico (*Crassostrea gigas*) que exibiu atividade inibidora contra herpes vírus.

Para os hidrolisados da clara de ovo de galinha de capoeira, os efeitos de inibição foram menores para o BoHV-1 quando comparados com a inibição do BVDV. Para o tratamento feito após a infecção com o BoHV-1, a viabilidade celular ficou acima de 25% para todas as concentrações dos hidrolisados testados. No entanto, o controle feito sem o tratamento com o peptídeo (Tabela 4), ou seja, que avaliou apenas a infecção celular pelo vírus BoHV-1, obteve 46% de viabilidade celular, o que significa que o tratamento com os hidrolisados foi igual ou inferior à infecção celular.

Para o tratamento das células antes da infecção com o BoVH-1, o efeito dos hidrolisados foi melhor do que o tratamento após a infecção. Os hidrolisados com massa molecular menor que 3kDa, no entanto, não desempenharam nenhum efeito protetor à célula, sendo seus percentuais de viabilidade estatisticamente iguais à viabilidade celular obtida no controle (34,92%). Porém, a viabilidade celular foi superior para as células previamente tratadas com os hidrolisados de massa molecular entre 3 e 10 kDa: 63,86 % para o hidrolisado na concentração de 6,25 mg.mL⁻¹ e 45,52% para o de 3,12 mg.mL⁻¹, e entre 10 e 30 kDa: 58,46 % para o hidrolisado na concentração de 6,25 mg.mL⁻¹ e 41,70% para o de 3,12 mg.mL⁻¹, o que demonstra que em concentrações mais baixas esses hidrolisados não protegeram as células contra a infecção pelo BoHV-1, até mesmo potencializam os danos celulares consequentes da infecção, uma vez que a viabilidade celular foi considerada estatisticamente menor do que a obtida no controle para as células previamente tratadas com os hidrolisados com massa molecular entre 10 e 30 kDa na concentração de 0,78 mg.mL⁻¹.

O tratamento das células após a infecção com o vírus da BVDV, a viabilidade celular foi cerca do dobro daquela obtida pelo controle (32 %), demonstrando forte atividade antiviral desses hidrolisados contra o vírus testado. No entanto, esses valores foram estatisticamente

iguais para todos os ensaios que esta atividade foi visualizada: concentrações de 6,25, 3,23 e 1,28 mg.mL⁻¹ para os hidrolisados menores que 3 kDa e 6,25 e 3,23 mg.mL⁻¹ para os hidrolisados entre 3 e 10 kDa e 30 e 10 kDa.

Da mesma forma que para o BoVH-1, o tratamento das células com os hidrolisados antes da infecção com o BVDV, foi mais eficiente. Para as células tratadas previamente com os hidrolisados menores que 3 kDa, a viabilidade celular ficou entre 77 e 83%, demonstrando alta proteção celular. No entanto, os valores obtidos em todas as concentrações foram considerados iguais estatisticamente, o que demonstra que não há diferença entre utilizar os hidrolisados mais ou o menos concentrados, tendo, portanto, a opção de se aplicar o tratamento menos tóxico e mais econômico. Para os hidrolisados com massa molecular entre 3 e 10 kDa, a proteção celular só foi verificada até a concentração de 3,12% que proporcionou uma viabilidade celular de 73,32%. E para os hidrolisados entre 10 e 30 kDa, a viabilidade celular ficou entre 39 e 67%, da menor para a maior concentração do hidrolisado.

Peptídeos derivados de proteínas do leite, especialmente da lactoferrina, foram estudados quanto sua atividade antiviral. A lactoferrina, um peptídeo catiônico, foi eficaz *in vitro* na prevenção das infecções por Citomegalovírus (CMV), adenovírus, Herpes vírus simplex tipo 1 e 2 (HSV-1 e 2) e Calicivírus felino (FCV) (ANDERSEN et al., 2001; DI BIASE et al., 2003; HAMMER et al., 2000; MCCANN et al., 2003). No entanto, as atividades antivirais foram no geral menores do que aquelas exibidas pela molécula de lactoferrina intacta (PAN, 2006).

Atividade virucida dos hidrolisados frente ao BoHV-1 e BVDV após exposição por até 4 horas sob temperatura de 22 °C está e apresentada na Tabela 6. Pode-se verificar que para o BoHV-1, não houve percentuais de inibição frente a este vírus, o que já era esperado uma vez que não houve atividade antiviral no ensaio celular de infecção com o mesmo vírus, portanto, os títulos virais permanecem os mesmos durante todo o experimento.

Por outro lado, a inibição viral foi mais expressiva contra o BVDV, uma vez que os hidrolisados entre 3 e 10 kDa inibiram 43, 68 e 82% das partículas virais após 1, 2 e 4 horas de exposição respectivamente. Para os hidrolisados com massa molecular entre 10 e 30 kDa essa inibição só foi verificada após 2 e 4 horas de exposição, sendo 90% das partículas víricas do BVDV inativadas. Esses resultados demonstram potencial dos hidrolisados da clara de ovo de galinha de capoeira em serem utilizadas para combater ou prevenir infecções contra o BVDV.

Uma inibição inferior do crescimento do BVDV foi relatada no estudo de Castro et al. (2016) que ao analisarem o potencial virucida de compostos derivados da 2-picolilamina da classe da 4-tiazolidinona, verificaram que as moléculas denominadas V20 e V28 foram capazes de inibir a produção das partículas virais em 78%, em sua maior concentração não citotóxica. No entanto, na presença das outras moléculas também derivadas da 2-picolilamina e denominadas de V19, V23 e V29 não houve diferença entre os títulos virais quando comparadas com o controle.

Tabela 2. Atividade antiestafilocócica (%) de hidrolisados da clara de ovo de galinha de capoeira contra isolados recentes de *S.aureus* de vacas com mastite subclínica.

Concentração do hidrolisado (mg.mL-1)	Micro-organismo								
	R4			R17			R93		
	Peso molecular dos hidrolisados (kDa)								
	n< 3	3<n<10	10<n<30	n< 3	3<n<10	10<n<30	n< 3	3<n<10	10<n<30
50	55,62 ± 3,2	52,06 ± 1,3	54,63 ± 0,09	63,50 ± 2,8	56,26 ± 1,9	77,40 ± 1,4	88,05 ± 1,6	83,05 ± 0,3	80,38 ± 0,4
25	36,30 ± 3,3	37,90 ± 1,9	54,09 ± 0,2	51,53 ± 2,9	33,84 ± 1,5	56,53 ± 3,0	84,02 ± 0,7	57,22 ± 3,7	60,67 ± 2,5
12,5	25,63 ± 0,9	33,90 ± 0,09	44,54 ± 1,4	36,35 ± 2,36	13,37 ± 0,5	52,23 ± 3,3	43,70 ± 3,3	40,64 ± 1,2	44,28 ± 0,08
6,25	20,45 ± 0,2	25,63 ± 0,9	44,09 ± 2,9	30,64 ± 2,5	12,25 ± 3,0	45,77 ± 0	19,20 ± 2,4	29,63 ± 1,1	38,24 ± 2,3
3,12	19,36 ± 1,0	20,45 ± 0,2	40,27 ± 4,6	24,88 ± 2,8	1,39 ± 1,9	43,21 ± 0,1	18,76 ± 1,1	24,77 ± 2,5	41,22 ± 2,2
1,56	17,81 ± 5,6	13,45 ± 0,5	20,18 ± 3,6	14,62 ± 2,7	1,39* ± 3,0	42,715 ± 1,7	17,05 ± 0,3	24,22 ± 2,9	30,21 ± 2,2
0,78	17,69 ± 3,2	11,09 ± 2,0	18,90 ± 1,0	4,73* ± 0,55	0 ± 0,2	41,05 ± 1,3	15,14 ± 3,5	20,97 ± 2,8	17,54 ± 3,4
0,39	3,27 ± 2,5	3,27 ± 2,5	0,36 ± 0	0,27 ± 2,4	0 ± 3,0	35,92 ± 0	7,20 ± 3,5	14,017 ± 1,0	22,10 ± 3,0

Tabela 3. Atividade antiestafilocócica (%) de hidrolisados da clara de ovo de galinha de capoeira contra isolados persistentes de *S.aureus* de vacas com mastite subclínica.

Concentração do hidrolisado (mg.mL-1)	Micro-organismo								
	P21			P133			P342		
	Peso molecular dos hidrolisados (kDa)								
	n< 3	3<n<10	10<n<30	n< 3	3<n<10	10<n<30	n< 3	3<n<10	10<n<30
50	0* ± 1,5	13,93 ± 1,4	15,64 ± 0,5	75 ± 3,7	62,58 ± 1,2	45,44 ± 3,3	60,82 ± 2,2	43,48 ± 1,2	57,57 ± 3,9
25	0 ± 0,1	13,76* ± 1,7	17,71 ± 0,6	53,47 ± 1,8	35,34 ± 1,0	19,28 ± 3,7	37,73 ± 3,1	19,01 ± 3,3	38,55 ± 1,9
12,5	0 ± 2,8	0 ± 1,9	7,20 ± 3,3	46,24 ± 3,7	24,55 ± 3,7	23,17 ± 2,1	36,61 ± 3,1	10,38 ± 1,5	35,65 ± 4,4
6,25	0 ± 3,0	0 ± 3,5	2,23* ± 3,7	44,53 ± 1,4	43,432 ± 1,8	8,44 ± 3,6	41,98 ± 3,2	11,97 ± 0,6	25,08 ± 4,4
3,12	0 ± 1,7	0 ± 3,4	0 ± 4,0	26,07 ± 0,8	41,44 ± 3,7	12,168 ± 2,5	15,55* ± 3,7	4,31* ± 0,8	5,36* ± 4,6
1,56	0 ± 1,9	0 ± 0,2	0 ± 0,6	29,73 ± 0,49	39,56 ± 3,9	7,03 ± 2,4	0 ± 1,2	0 ± 2,2	0 ± 2,3
0,78	0 ± 2,7	0 ± 1,4	0 ± 3,7	23,17 ± 1,7	22,35 ± 3,4	7,11 ± 3,5	0 ± 2,7	0 ± 0,9	0 ± 0,4
0,39	0 ± 2,8	0 ± 2,9	0 ± 0,8	24,50 ± 1,9	22,84 ± 0,4	10,01 ± 1,0	0 ± 0,9	0 ± 0,08	0 ± 0,2

Tabela 4. Atividade antiviral (%) dos hidrolisados de clara de ovo de galinha de capoeira avaliada pela viabilidade de células MDBK tratadas com os hidrolisados após infecção com os BoVH-1 e BVDV (0,1 MOI), n=6 .

Vírus	BoVH-1				BVDV			
	Massa molecular dos hidrolisados (kDa)			Controles (%)	Massa molecular dos hidrolisados (kDa)			Controles (%)
Tratamento	n<3 (%)	3<n<10 (%)	10<n<30 (%)		n<3 (%)	3<n<10 (%)	10<n<30 (%)	
0 mg.mL ⁻¹				100 ± 3,12 a				100 ± 3,12 a
Células + vírus				46,55 ± 5,47 A				32,14 ± 3,89 A
6,25 mg.mL ⁻¹	34,71 ± 2,5 bB	39,21 ± 2,1 bA	35,85 ± 3,8 bB		56,91 ± 2,9 bB	64,88 ± 5,9 bB	66,78 ± 1,9 bB	
3,12 mg.mL ⁻¹	37,34 ± 3,7 bA	41,39 ± 1,9 bA	35,36 ± 2,5 bB		61,87 ± 6,4 bB	64,81 ± 4,2 bB	68,00 ± 5,4 bB	
1,28 mg.mL ⁻¹	36,82 ± 1,9 bA	29,93 ± 3,8 bB	25,70 ± 2,1 bB		45,58 ± 5,4 cB	37,96 ± 3,9 cA	36,09 ± 2,6 cA	
0,78 mg.mL ⁻¹	37,41 ± 4,6 bA	26,18 ± 4,1 bB	25,35 ± 1,8 bB		37,62 ± 2,1 dA	29,65 ± 1,2 dA	28,54 ± 4,6 cA	

Letras minúsculas indicam comparações com o controle de células (não infectadas e não tratadas) pelo teste Tukey (p<0,05) e letras maiúsculas indicam comparações com o controle de vírus (células infectadas e não tratadas) pelo teste Tukey (p<0,05).

Tabela 5. Atividade antiviral (%) dos hidrolisados de clara de ovo de galinha de capoeira avaliada pela viabilidade de células MDBK tratadas com os hidrolisados antes da infecção com os BoVH-1 e BVDV (0,1 MOI), n=6.

Vírus	BoVH-1				BVDV			
	Massa molecular dos hidrolisados kDa				Massa molecular dos hidrolisados kDa			
Tratamento	n<3	3<n<10	10<n<30	Controles	n<3	3<n<10	10<n<30	Controles
0 mg.mL⁻¹				100 ± 5,64 a				100 ± 5,64 a
Células + vírus				34,92 ± 3,69 A				24,11 ± 2,64 A
6,25 mg.mL⁻¹	37,49 ± 3,25 bA	63,86 ± 2,1 bB	58,46 ± 3,6 bB		82,23 ± 5,9 bB	78,93 ± 5,2 bB	67,71 ± 4,9 bB	
3,12 mg.mL⁻¹	35,62 ± 4,69 bA	45,52 ± 5,4 cC	41,70 ± 1,59 cC		77,12 ± 4,8 cB	73,32 ± 3,9 bB	68,96 ± 5,1 bB	
1,28 mg.mL⁻¹	40,53 ± 5,87 bA	32,16 ± 4,1 dA	27,17 ± 2,3 dA		83,90 ± 6,1 bB	17,66 ± 4,6 cA	50,25 ± 3,9 cC	
0,78 mg.mL⁻¹	39,23 ± 2,3 bA	29,51 ± 2,9 dA	24,01 ± 3,4 dD		81,22 ± 4,6 bB	18,70 ± 2,8 cA	39,49 ± 2,7 dD	

Letras minúsculas indicam comparações com o controle de células (não infectadas e não tratadas) pelo teste Tukey (p<0,05) e letras maiúsculas indicam comparações com o controle de vírus (células infectadas e não tratadas) pelo teste Tukey (p<0,05).

Tabela 6. Atividade virucida dos hidrolisados da clara de ovo de galinha de capoeira frente os BoHV-1 e BVDV após até 4 horas de exposição. Títulos virais em CCID₅₀/100µL.

Massa molecular do hidrolisado (kDa)	BoHV-1				BVDV			
	Tempo de exposição (horas)				Tempo de exposição (horas)			
	0	1	2	4	0	1	2	4
3<n<10	6,5	6,5	6,5	6,5	5,25	5,0	4,75	4,5
10<n<30	6,5	6,5	6,75	6,5	5,25	5,25	4,25	4,25

4. Conclusão

Os hidrolisados da clara de ovo de galinha de capoeira apresentam atividade antiestafilocócica satisfatória em seus menores níveis de citotoxicidade contra isolados de *S. aureus* de mastite bovina, inibição variável para as diferentes cepas estudadas. Quanto à atividade antiviral, o desempenho dos hidrolisados foi bastante significativo contra o BVDV, contra o qual apresentou atividade virucida. Portanto, esses hidrolisados podem ser utilizados no controle e prevenção da mastite causada por essa espécie bacteriana e contra a BVDV, como alternativa terapêutica.

5. Referências

ANDERSEN, J. H.; OSBAKK, S. A.; VORLAND, L. H.; TRAAVIK, T.; GUTTEBERG, T. J. Lactoferrin and cyclic lactoferricin inhibit the entry of human cytomegalovirus into human fibroblasts. *Antiviral Research*, 51, 141–149, 2001.

ADLER-NISSEN, J. Determination of the degree of hydrolysis of food protein hydrolysates by trinitrobenzenesulfonic acid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 27, 1256–1262, 1979.

ALUKO, R. E. Antihypertensive Peptides from Food Proteins. *Annu. Rev. Food Science and Technology*, 6, 235–62, 2015.

ASOODEH, A.; HOMAYOUNI-TABRIZI, M.; SHABESTARIAN, H.; EMTENANI, S.; EMTENANI, S. Biochemical characterization of a novel antioxidante and angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptide from *Struthio camelus* egg white protein hydrolysis. *Journal of food and drug analysis*, 24, 332 – 342, 2016.

AMÁBILE-CUEVAS, C.F. Antibiotic resistance in Mexico: a brief overview of the current status and its causes. *The journal of Infeccion in Developing Countries*, v.4, n.3, p.126-131, 2010.

BARKEMA, H.W.; SCHUKKEN, Y.H.; ZADOKS, R.N. The role of cow, pathogen, and treatment regimen in the therapeutic success of bovine *Staphylococcus aureus* mastitis. *Journal of Dairy Science*, 89, 1877-1895, 2006.

BETANCOURT, O.; SCARPA, C.; VILLAGRÁN, K. Estudio de resistencia de cepas de *Staphylococcus aureus* aisladas de mastitis subclínica bovina frente a cinco

antibióticos en três sectores de la ix región de Chile. *Revista Científica*, 13, 413- 417, 2003.

BHAT, Z. F.; KUMAR, S.; BHAT, H. F. Bioactive peptides of animal origin: a review. *Journal of Food and Science Technology*, 52, 5377–5392, 2015.

BHAT, Z. F.; KUMAR, S. Bioactive peptides from egg: a review. *Nutrition & Food Science*. 45, 190-212, 2016.

BRADFORD, M. M. A. Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of proteindye binding. *Anal Biochem* 72, 248-254, 1976.

BRUGGEMANN, R.; ORLANDI, J. M.; BENATI, F. J.; FACCIN, L. C.; MANTOVANI, M. S.; NOZAWA, C.; LINHARES, R. S. C. Antiviral activity of agaricus blazei murrill ss. heinem extract against human and bovine herpesviruses in cell culture. *Brazilian Journal of Microbiology*, 37, 561-565, 2006.

CASTRO, R. J. S.; SATO, H. H. A response surfasse approach on optimization of hydrolysis parameters for the production of egg white protein hydrolysates with antioxidante activities. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 4, 55–62, 2015.

CASTRO, C. C.; SILVA, D. S.; BAREÑO, V. D. O.; LIMA, M.; CUNICO, W.; HÜBNER, S. O. Avaliação da atividade antiviral de compostos derivados da 2-picolilamina da classe da 4-tiazolidinona contra o vírus da diarreia viral bovina. *Science and Animal Health*, 4, 47-55, 2016.

Clinical and Laboratory Standarts Institute. CLSI. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Wayne, PA: National Committee for Clinical Laboratory Standards. M7-A6, 2003.

DE CLERCQ, E. Antiviral drugs in current clinical use. *Journal of Clinical Virology*, 30, 115-133, 2004.

DI BIASE, A. M., PIETRANTONI, A., TINARI, A., SICILIANO, R., VALENTI, P., ANTONINI, G., SEGANTI, L.; SUPERTIET, F. Heparin-interacting sites of bovine lactoferrin are involved in anti-adenovirus activity. *Journal of Medical Virology*, 69, 495–502, 2003.

DZIUBA, B.; DZIUBA, M. Milk proteins-derived bioactive peptides in dairy products: molecular, biological and methodological aspects. *Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria*, 13, 5–25, 2014.

EGAL, M.; CONRAD, M.; MACDONALD, D. L.; MALOY, W. L.; MOTLEY, M.; GENCO, C. A.. Antiviral effects of synthetic membrane-active peptides on Herpes Simplex Virus, Type 1. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 13, 57–60, 1999.

FARNADU, S.; EVANS, R.W. Lactoferrin – a multifunctional protein with antimicrobial properties. *Molecular Immunology*, 40, 395–405, 2003.

FREDERICKSEN, F.; CARRASCO, G.; VILLALBA, M.; OLAVARRÍA, V. H. Cytopathic BVDV-1 strain induces immune marker production in bovine cells through the NF- κ B signaling pathway. *Molecular Immunology*, 68, 213–222, 2015.

FREITAS, M.F.L.; PINHEIRO JÚNIOR, J.W.; STAMFORD, T.L.M.; RABELO, S.S.A.; SILVA, D.R.; SILVEIRA FILHO, V.M.; SANTOS, F.G.B.; SENA, M.J.; MOTA, R.A. Perfil de sensibilidade antimicrobiana in vitro de *Staphylococcus coagulase positivos* isolados de leite de vacas com mastite no agreste do Estado de Pernambuco. *Arquivos do Instituto Biológico*, 72, 171-177, 2005.

GHORBANPUR, M.; MIRAKABADI, Z. A.; ZOKAEE, F.; ZOLFAGARRIAN, H.; RABIEI, H. Purification and partial characterization of a coagulant serine protease from the venom of the Iranian snake *Agkistrodon halys*. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*, 15, 411-423, 2009.

GILBERT, C.; BESTMAN-SMITU, J.; BOIVIN, G. Resistance of herpesviruses to antiviral drugs: clinical impacts and molecular mechanisms. *Drug Research*, 5, 88-114, 2002.

HAMMER, J.; HAAHEIM, H.; GUTTEBERG, T. J. Bovine lactoferrin is more efficient than bovine lactoferricin in inhibiting HSV-I/-II replication in vitro. In K. Shimazaki (Ed.), *Lactoferrin: Structure functions and applications* (pp. 239–243). Amsterdam, The Netherlands: Elsevier Science, 2000.

HOMAYOUNI-TABRIZI, M.; ASOODEH, A.; SOLTANI, M. Cytotoxic and antioxidant capacity of camel milk peptides: Effects of isolated peptide on superoxide

dismutase and catalase gene expression. *Journal of Food and Drug Analysis*, *in press*, 2016.

JUNQUEIRA, J. R. C.; ALFIERI, A. A. Reproductive failures in beef cattle breeding herds with emphasis for infectious causes. *Semina: Ciências Agrárias*, Londrina, 27, 289-298, 2006.

LEIGHTON, T. J.; DOI, R. H.; WARREN, R. A. J.; KELLN, R. A. The Relationship of serine protease activity to RNA polymerase modification and sporulation in *Bacillus subtilis*. *Journal of Molecular Biology*, v. 76, p. 103-122, 1973.

MAPA 2011. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/portal/page/portal/>. Acesso em 12 de novembro de 2016.

MCCANN, K. B.; LEE, A.; WAN, J.; ROGINSKI, H.; COVENTRY, M. J. The effect of bovine lactoferrin and lactoferricin B on the ability of feline calicivirus (a norovirus surrogate) and poliovirus to infect cell cultures. *Journal of Applied Microbiology*, 95, 1026–1033, 2003.

MEMARPOOR-YAZDIA, M.; ASOODEHB, A.; CHAMANIA, J. K. A novel antioxidant and antimicrobial peptide from hen egg white lysozyme hydrolysates. *Journal of functional foods*, 4, 278 –286, 2012.

MORONI, P.; PISONI, G.; ANTONINI, M.; VILLA, R.; BOETTCHER, P.; CARLI, S. Susceptibilidade às drogas antimicrobianas de *Staphylococcus aureus* oriundos de mastites bovinas subclínicas na Itália. *Journal of Dairy Science*, 89, 2973–2976, 2006.

NAJAFIAN, L.; BABJI, A. S. A review of fish-derived antioxidant and antimicrobial peptides: their production, assessment and applications. *Peptides*, 33, 178–185, 2012.

NAKAMICHI, K.; MATSUMOTO, Y.; OTSUKA, H. Bovine Herpesvirus 1 Us ORF8 Protein Induces Apoptosis in Infected Cells and Facilitates Virus Egress. *Virology*, 304, 24-32, 2002.

NIYONZIMA, F. N.; MORE, S. S. Purification and characterization of detergent-compatible protease from *Aspergillus terreus* gr. 3 *Biotech*, 5, 61–70, 2015.

PAN, Y.; LEE, A.; WAN, J.; COVENTRY, M. J.; MICHALSKI, W. P.; SHIELL, B.; ROGINSKI, H. Antiviral properties of milk proteins and peptides. *International Dairy Journal*, 16, 1252–1261, 2006.

PAN, Y., ROWNEY, M., GUO, P., HOBMAN, P. Biological properties of lactoferrin: an overview. *Australian Journal of Dairy Technology*, 62, 31–42, 2007.

PICOLI, To.; PICH, C. S.; LOPES, M. G.; TEIXEIRA, A. G.; FISCHER, G. Sensibilidade de linhagens celulares frente à melitina isolada de veneno de abelha. *Science and animal health*, 4 101-116, 2016.

SILVA, E. R.; PEREIRA, A. M. G.; MORAES, W. S.; SANTORO, K. R.; SILVA, T. R. M.. Perfil de sensibilidade antimicrobiana in vitro de *Staphylococcus aureus* isolado de mastite subclínica bovina. *Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal*, 13, 701-711, 2012.

Saha, S.; Galhardi, L. C. F.; Yamamoto, K. A.; Linhares, R. E. C.; Bandyopadhyay, S. S.; Sinha, S.; Nozawa, C.; Raya, B. Water-extracted polysaccharides from *Azadirachta indica* leaves: Structural features, chemical modification and anti-bovine herpesvirus type 1 (BoHV-1) activity. *International Journal of Biological Macromolecules*, 47, 640–645, 2010.

SALIHI, A.; ASOODEH, A.; ALIABADIAN, M. Production and biochemical characterization of an alkaline protease from *Aspergillus oryzae* CH93. *International Journal of Biological Macromolecules*, *in press*, 2016.

TANZADEHPANAH, H.; ASOODEH, A.; SABERI, M. R.; CHAMANI, J. Identification of a novel angiotensin-I converting enzyme inhibitory peptide from ostrich egg white and studying its interactions with the enzyme. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 18:212–219, 2013.

YUST, M. D. M.; PEDROCHE, J.; MEGÍAS, C.; GIRÓN-CALLE, J.; ALAIZ, M.; MILLÁN, F.; VIOQUE, J. Rapeseed protein hydrolysates: a source of HIV protease peptide inhibitors. *Food Chemistry*; 87, 387–92, 2004.

ZAFALON, L.F.; LANGONI, H.; BENVENUTTO, F.; CASTELANI, L.; BROCCOLO, C.R. Aspectos epidemiológicos da mastite bovina causada por *Staphylococcus aureus*. *Veterinária e Zootecnia*, 15, 1, 56-65, 2008.

ZENG, M.; CUI, W.; ZHAO, Y.; LIU, Z.; DONG, S.; GUO, Y. Antiviral active peptide from oyster. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*, 23, 307–12, 2008.

ZANETTE, E.; SCAPIN, D.; ROSSI, E.M. Suscetibilidade antimicrobiana de *Staphylococcus aureus* isolados de amostras de leite de bovinos com suspeita de mastite. *Unoesc & Ciência - ACBS*, 1, 65-70, 2010.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

- Por meio dos planejamentos estatísticos empregados foi possível avaliar a influência de variáveis na produção de protease por *Aspergillus avenaceus* URM 6706 e otimizar esta produção;
- A protease produzida por *Aspergillus avenaceus* URM 6706 foi caracterizada parcialmente quanto ao pH, temperatura e inibidores;
- Foi possível purificar a protease produzida por *Aspergillus avenaceus* URM 6706 ao aplicar as metodologias de precipitação com etanol e cromatografia de troca iônica, obtendo-se valores de rendimento e fator de purificação satisfatórios;
- A protease produzida por *Aspergillus avenaceus* foi capaz de hidrolisar as proteínas da clara de ovo de galinha de capoeira;
- Os hidrolisados obtidos da clara de ovo de galinha de capoeira apresentaram atividades biológicas diversas: antioxidantes, anti-diabética, anti-hipertensiva, antiestafilocócica e antiviral.