



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE
ESCOLA DE QUÍMICA E ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E CIÊNCIA DE
ALIMENTOS

ESTABILIDADE E APLICAÇÃO DE PROTEASE P45 NA HIDRÓLISE PROTEICA DE
PLASMA DE SANGUE BOVINO

THAIS DE MATOS DE BORBA

Tese apresentada como parte dos
requisitos para obtenção do título
de doutor em Engenharia e
Ciência de Alimentos.

SUSANA JULIANO KALIL
Orientador

RIO GRANDE, RS

2019

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE
ESCOLA DE QUÍMICA E ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E CIÊNCIA DE
ALIMENTOS

ESTABILIDADE E APLICAÇÃO DE PROTEASE P45 NA HIDRÓLISE PROTEICA DE
PLASMA DE SANGUE BOVINO

THAIS DE MATOS DE BORBA

Tese apresentada como parte dos
requisitos para obtenção do título
de doutor em Engenharia e
Ciência de Alimentos.

SUSANA JULIANO KALIL
Orientador

RIO GRANDE, RS

Ficha catalográfica

B726e Borba, Thais de Matos de.

Estabilidade e aplicação de protease P45 na hidrólise proteica de plasma de sangue bovino / Thais de Matos de Borba. – 2019. 151 f.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Rio Grande – FURG, Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, Rio Grande/RS, 2019.

Orientadora: Dra. Susana Juliano Kalil.

1. Protease Bacteriana 2. Líquido Iônico 3. Estabilidade
4. Hidrólise Enzimática 5. Plasma Sanguíneo 6. Peptídeos Bioativos
I. Kalil, Susana Juliano II. Título.

CDU 663.15:616.15

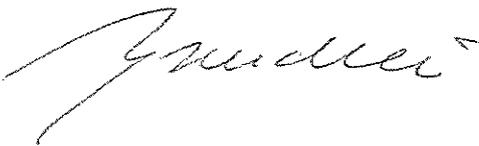
Catálogo na Fonte: Bibliotecário José Paulo dos Santos CRB 10/2344

APROVAÇÃO

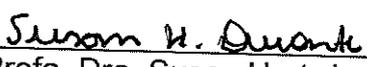
Tese defendida por Thais de Matos de Borba aprovada em 27 de março de 2019, pela Comissão Examinadora constituída pelos membros:



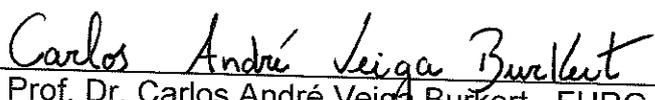
Profa. Dra. Susana Juliano Kalil - FURG



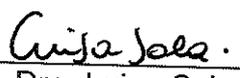
Prof. Dr. Adriano Brandelli - UFRGS



Profa. Dra. Susan Hartwig Duarte - FURG



Prof. Dr. Carlos André Veiga Burkert - FURG



Dra. Luisa Sala - FURG

Com amor pela minha mãe Leila, dedico essa conquista.

AGRADECIMENTOS

É prazeroso chegar até aqui e reconhecer todo o avanço obtido ao longo dessa caminhada. Desde a superação das minhas limitações, medos e incertezas, até a força para enfrentar os dias que não foram tão bons, e reconhecer que no final, toda a trajetória foi válida e enriquecedora.

Claro que, ao longo do caminho foi possível chegar mais longe com a ajuda e presença, direta ou indiretamente, de pessoas que estão citadas aqui e que tenho enorme carinho e gratidão.

Primeiramente, a minha orientadora, **Prof^a. Dr^a. Susana Kalil**, por toda a dedicação, zelo, profissionalismo, amizade e troca de conhecimentos. Fostes fundamental! Quero que saibas que és a profissional a quem me inspiro todos os dias.

A **mãe Leila e irmã Tássia**, por sempre acreditarem em mim e que esse momento fosse possível. Todo o amor do mundo por vocês;

Ao **professor Dr. Adriano Brandelli**, a quem eu criei grande admiração, agradeço por sempre estar disponível a ajudar, pelas oportunidades e por todos os “upgrades”;

Às minhas colegas de laboratório, **Andressa, Gabrielle e Marina**, incluindo a técnica **Ana Sanzo**, as quais considero a minha segunda família, por nunca medirem esforços em ajudar, por todas as palavras de conforto e risadas quando o momento fazia necessário. Nossa união fez a força, podem ter certeza;

Agradeço as minhas iniciantes científicas **Jéssica Bágio, Taiete Machado e Caroline Prestes** por serem minha mão esquerda e direita, pela pró-atividade e responsabilidade. Vocês terão um futuro brilhante;

Ao técnico **Raphael Trombetta** e ao colega **Samuel Gonçalves** por toda paciência em sempre se disponibilizarem a ajudar quando o Arduíno insistia em “louquear”;

Aos demais colegas de laboratório **Ailton, Anna Rafaela, Daiane, Deborah, Elida, Felipe, Joana, Luisa e Samuel** aos quais deixaram um legado ao grupo de pesquisa e por todos os momentos compartilhados, que não foram poucos;

As colegas pós-graduandas iniciantes, **Igreine e Nathieli**, pelas conversas e momentos de descontração, vocês já possuem a minha admiração;

Ao **Flávio Veras**, aluno de pós doutorado da UFRGS, pelos ensinamentos e prestatividade nas análises finais desta tese;

Aos membros da banca examinadora, **Prof. Dr. Adriano Brandelli, Prof. Dr. Carlos André Burkert, Dr^a. Luisa Sala, Prof^a. Dr^a. Susan Duarte** pelas horas de dedicação a esse trabalho e pelas contribuições para o melhoramento do mesmo;

Aos técnicos dos laboratórios aos quais, inúmeras vezes, precisei de uma ajudinha e/ou empréstimos de equipamentos;

Aos meus colegas da pós-graduação pelas trocas de experiências e momentos compartilhados, em especial a **Janaína** e **Jéssica**, amigas queridas que dividi momentos especiais, obrigada pela marca autêntica que vocês deixaram em meu coração;

Às minhas amigas de todas as horas **Ana Carolina**, **Juliana** e **Mariana** que sempre estenderam a mão pra quando eu precisei e souberam dizer as palavras certas que o momento exigia. Vocês jamais sairão do meu coração;

À secretaria do Programa de Pós-Graduação por agilizar os documentos e procedimentos necessários para essa defesa.

Às Universidades **FURG** e **UFRGS** pelo ensino de qualidade e infraestrutura.

À **CAPES** e ao **CNPq** pelo auxílio financeiro.

“Cada um deve dedicar-se à própria educação até o último dia.”

Massimo d’Azeglio

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO III - ARTIGO 1

Tabela 1 – Efeito de solventes orgânicos e líquido iônico [Emim][Tf₂N] 1:1 (v/v) na atividade enzimática da protease P45..... 62

Tabela 2 – Parâmetros cinéticos para inativação de primeira ordem para a protease P45. 66

Tabela 3 – Parâmetros termodinâmicos para desnaturação da protease P45..... 67

CAPÍTULO III - ARTIGO 2

Tabela 1 – Ensaio de hidrólise das proteínas de plasma de sangue bovino. 85

Tabela 2 – Parâmetros de atividade e estabilidade da protease contendo 50 mmol/L de CaCl₂.89

CAPÍTULO III - ARTIGO 3

Tabela 1 – Atividade antioxidante do hidrolisado NU e suas frações. 114

Tabela 2 – Porcentagem de inibição da enzima conversora de angiotensina. Média ± erro padrão; *n*=2. 120

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO II – REVISÃO DA LITERATURA

- Figura 1** – Etapas que ocorrem durante a desnaturação induzida por calor. 32
Figura 2 – Processos para obtenção e purificação de peptídeos bioativos. 42
Figura 3 – Sistema renina-angiotensina, com seus efeitos secundários. 48

CAPÍTULO III - ARTIGO 1

- Figura 1** – Linearização da cinética de desnaturação da protease P45 a 40 °C. (●) Tampão Tris-HCl pH 7,5, $r^2= 0,973$ (■) Tampão Tris-HCl pH 7,5:acetona 1:1 v/v, $r^2= 0,978$ (◆) [Emim][Tf₂N]:acetona 1:1 v/v, $r^2= 0,987$ (curva inserida). Os resultados são a média de três análises independentes. Onde A é a atividade enzimática após a incubação e A₀ é a atividade enzimática antes da incubação (t=0). 65
Figura 2 – Grau de hidrólise de caseína de leite bovino para as duas condições de uso da protease. 69

CAPÍTULO III - ARTIGO 2

- Figura 1** – Etapas para a obtenção do plasma bovino liofilizado. 82
Figura 2 – Efeito da concentração de CaCl₂ (mmol/L) na atividade enzimática de protease de *Bacillus* sp. P45. Valores são a média ± desvio padrão, n=3. Letras diferentes indicam diferença significativa ($p<0,05$). 88
Figura 3 – Estabilidade térmica de protease P45 adicionada de 50 mmol/L de CaCl₂ durante 8 h de reação. 89
Figura 4 – Efeito da adição de CaCl₂ (50 mmol/L) ao extrato enzimático e do pré-tratamento térmico ao substrato plasma (aquecimento a 50 °C/20 min). Condições da reação: E:S 600 U/g, 40 °C, pH 7,5 e tempo 8 h. Com pré-tratamento ao substrato (CPTS) e sem pré-tratamento ao substrato (SPTS). 92
Figura 5 – Variação (Δ GH) do grau de hidrólise entre ensaio e controle (sem extrato enzimático) no tempo de 8 h de hidrólise enzimática para os pré-tratamentos aplicados ao plasma. Letras minúsculas iguais indicam que não há diferença significativa entre as médias dos ensaios ($p>0,05$). Média ± erro padrão. 93
Figura 6 – Influência da temperatura no grau de hidrólise do plasma de sangue na reação catalisada por protease P45. Condições da reação: pré-aquecimento do plasma a 50 °C/20 min, concentração de substrato 25 g/L, relação enzima/substrato 600U/g de proteína, pH 7,5 e tempo 8 h. (a) 35 °C (b) 40 °C (c) 45 °C (d) 50 °C (e) 55 °C. Média ± erro padrão. 95
Figura 7 – Influência da concentração de proteínas no grau de hidrólise do plasma de sangue na reação catalisada por protease P45. Condições da reação: pré-aquecimento do plasma a 50 °C/20 min, temperatura 40 °C, relação enzima/substrato 600 U/g de proteína, pH 7,5 e tempo 8 h. (a) 10 g/L (b) 13,7 g/L (c) 17,5 g/L (d) 25 g/L (e) 32,5 g/L (f) 40 g/L. Média ± erro padrão. 97
Figura 8 – Maximização da hidrólise enzimática do plasma de sangue bovino pré-tratado. Condições da reação: pré-aquecimento do substrato a 50 °C/20 min, concentração de proteínas do substrato 17,5 g/L, temperatura 40 °C, relação enzima/substrato 600U/g de proteína, pH 7,5. Média ± desvio padrão. 98

CAPÍTULO III - ARTIGO 3

- Figura 1** – Atividade prebiótica do hidrolisado e frações de plasma de sangue bovino comparado à glicose. As amostras foram incubadas por 24 h com *Lactobacillus acidophilus* LA-5 ou *E. coli*. As barras representam a média ± erro padrão (n=2). Diferentes letras

representam diferença significativa (Teste de Tukey, $p < 0,05$). G (glicose), HNU (hidrolisado não ultrafiltrado), F1 (fração >10 kDa), F3 (fração 1-5 kDa).....117

Figura 2 – Atividade prebiótica do hidrolisado e frações de plasma de sangue bovino comparado à glicose. As amostras foram incubadas por 24 h com *Bifidobacterium lactis* BB-12 ou *E. coli*. As barras representam a média \pm erro padrão ($n=2$). Diferentes letras representam diferença significativa (Teste de Tukey, $p < 0,05$). G (glicose), HNU (hidrolisado não ultrafiltrado), F1 (fração >10 kDa), F3 (fração 1-5 kDa).....118

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ABTS: 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6- ácido sulfônico)

ACD: Ácido citrato dextrose

ANOVA: Análise de variância

AOAC: *Association of Official Analytical Chemistry*

ATCC: *American Type Culture Collection*

DC: Densidade celular

DPP-IV: Dipeptidil peptidase IV

DPPH: 2,2-difenil-1-picrilhidrazila

E/S: Relação enzima/substrato

ECA: Enzima conversora de angiotensina

[Emim][Tf₂N]: 1-etil-3-metilimidazólio bis(trifluorometilsulfonil)imida

GRAS: *Generally Recognized as Safe*

GH: Grau de hidrólise

HT: Hipertensão

HNU: Hidrolisado não ultrafiltrado

In silico: Método que prediz os peptídeos bioativos liberados a partir de uma proteína sequenciada

k_d: Constante de desnaturação

LI: Líquido iônico

MRS: Ágar de Man, Rogosa e Sharpe; ágar *Lactobacillos*

PSB: Plasma de sangue bovino

PDA: Ágar Batata Dextrose

pK_a: Constante de dissociação

[S]: Concentração de substrato

T: Temperatura

t: Tempo

t_{1/2}: Meia vida

UFC: Unidade formadora de colônia

SUMÁRIO

CAPÍTULO I	16
1 INTRODUÇÃO GERAL	21
2 OBJETIVOS.....	25
2.1 OBJETIVO GERAL	25
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	25
CAPÍTULO II.....	27
3 REVISÃO DA LITERATURA.....	29
3.1 PROTEASES	29
3.2 ESTABILIZAÇÃO PROTEICA.....	31
3.3 INTERAÇÃO ENTRE ÍONS DE CÁLCIO E PROTEASES	33
3.4 LÍQUIDOS IÔNICOS.....	34
3.5 PLASMA DE SANGUE	36
3.6 HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE PROTEÍNAS	38
3.7 PURIFICAÇÃO DOS HIDROLISADOS PROTEICOS.....	41
3.8 PEPTÍDEOS BIOATIVOS	43
3.8.1 Peptídeos antioxidantes.....	43
3.8.2 Peptídeos antimicrobianos.....	45
3.8.3 Peptídeos anti-hipertensivos.....	46
3.8.4 Peptídeos com potencial prebiótico.....	49
CAPÍTULO III	51
ARTIGO 1 ESTABILIDADE TÉRMICA, PROPRIEDADES CATALÍTICAS E APLICAÇÃO DE PROTEASE A PARTIR DE <i>Bacillus</i> sp. P45 ATIVA EM SOLVENTES ORGÂNICOS E LÍQUIDO IÔNICO.....	53
RESUMO.....	55
1 INTRODUÇÃO.....	56
2 MATERIAL E MÉTODOS	57
2.1 MATERIAL E REAGENTES	57
2.2 CULTIVO BACTERIANO E PURIFICAÇÃO ENZIMÁTICA	58
2.3 ATIVIDADE PROTEOLÍTICA	58
2.4 MEDIDA DE VISCOSIDADE.....	58
2.5 CARACTERIZAÇÃO DA PROTEASE P45	59
2.5.1 Atividade enzimática em solventes orgânicos e líquido iônico	59
2.5.2 Estabilidade térmica em líquido iônico e acetona	59
2.5.3 Determinação dos parâmetros termodinâmicos.....	59
2.6 APLICAÇÃO DA PROTEASE TRATADA EM LÍQUIDO IÔNICO E ACETONA NA HIDRÓLISE DE CASEÍNA DE LEITE BOVINO	60
2.7 TRATAMENTO DOS DADOS	61
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	61
3.1 INFLUÊNCIA DOS SOLVENTES ORGÂNICOS E LÍQUIDO IÔNICO NA ATIVIDADE ENZIMÁTICA	62

3.2 ESTABILIDADE TÉRMICA E PARÂMETROS TERMODINÂMICOS DA PROTEASE NA PRESENÇA DE LÍQUIDO IÔNICO E SOLVENTE ORGÂNICO	64
3.3 BIOCATÁLISE DE CASEINA DE LEITE BOVINO POR PROTEASE TRATADA EM LÍQUIDO IÔNICO E ACETONA	68
4 CONCLUSÃO	70
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	70

ARTIGO 2 MAXIMIZAÇÃO DO GRAU DE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DO PLASMA DE SANGUE BOVINO PARA OBTENÇÃO DE PEPTÍDEOS COM POTENCIALIDADES BIOLÓGICAS	77
---	----

RESUMO	79
---------------------	-----------

1 INTRODUÇÃO	80
---------------------------	-----------

2 MATERIAL E MÉTODOS	81
-----------------------------------	-----------

2.1 MATERIAL	81
--------------------	----

2.2 PREPARAÇÃO DO PLASMA BOVINO LIOFILIZADO	81
---	----

2.3 CULTIVO BACTERIANO E PURIFICAÇÃO ENZIMÁTICA	82
---	----

2.4 EFEITO DO CaCl ₂ NA ATIVIDADE E ESTABILIDADE TÉRMICA DA PROTEASE DE <i>Bacillus</i> sp. P45	83
--	----

2.5 ENSAIOS DE HIDRÓLISE DAS PROTEÍNAS DE PLASMA BOVINO	84
---	----

2.5.1 Sistema reacional e aquisição de dados para os ensaios de hidrólise	84
--	-----------

2.5.2 Estudo da adição de CaCl₂ ao extrato enzimático e pré-tratamentos aplicados ao plasma bovino	84
--	-----------

2.5.3 Maximização do grau de hidrólise do plasma de sangue bovino	85
--	-----------

2.6 GRAU DE HIDRÓLISE	85
-----------------------------	----

2.7 DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS	86
-------------------------------------	----

2.8 ATIVIDADE ENZIMÁTICA	86
--------------------------------	----

2.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA	87
-------------------------------	----

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	87
---------------------------------------	-----------

3.1 EFEITO DO CaCl ₂ NA ATIVIDADE E ESTABILIDADE TÉRMICA DA PROTEASE DE <i>Bacillus</i> sp. P45	87
--	----

3.2 EFEITO DA ADIÇÃO DE CLORETO DE CÁLCIO AO EXTRATO ENZIMÁTICO E PRÉ-TRATAMENTO DO SUBSTRATO NA HIDRÓLISE DE PLASMA	91
--	----

3.3 MAXIMIZAÇÃO DO GRAU DE HIDRÓLISE NA HIDRÓLISE DAS PROTEÍNAS DE PLASMA BOVINO	94
--	----

4 CONCLUSÃO	98
--------------------------	-----------

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	99
---	-----------

ARTIGO 3 ATIVIDADES BIOLÓGICAS DO HIDROLISADO DE PLASMA BOVINO OBTIDO PELA AÇÃO DE PROTEASE MICROBIANA ESTABILIZADA EM CÁLCIO	103
---	-----

RESUMO	105
---------------------	------------

1 INTRODUÇÃO	106
---------------------------	------------

2 MATERIAL E MÉTODOS	107
-----------------------------------	------------

2.1 MATERIAL	107
--------------------	-----

2.2 CULTIVO BACTERIANO E PURIFICAÇÃO ENZIMÁTICA	107
---	-----

2.3 HIDRÓLISE ENZIMÁTICA	108
--------------------------------	-----

2.4 FRACIONAMENTO DOS HIDROLISADOS	108
--	-----

2.5 DETERMINAÇÃO DAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS	108
--	-----

2.5.1 Atividade antioxidante	109
---	------------

2.5.1.1 Capacidade de sequestro do radical ABTS	109
---	-----

2.5.1.2 Capacidade de sequestro do radical DPPH	109
---	-----

2.5.1.3	Poder quelante do ferro	109
2.5.2	Atividade antimicrobiana	109
2.5.2.1	Atividade antibacteriana.....	109
2.5.2.2	Atividade antifúngica	110
2.5.3	Atividade prebiótica	110
2.5.4	Atividade anti-hipertensiva	111
2.6	DETERMINAÇÃO ANALÍTICA	111
2.6.1	Atividade enzimática	112
2.7	ANÁLISE ESTATÍSTICA	112
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	112
3.1	ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DOS HIDROLISADOS	112
3.2	ATIVIDADE ANTIMICROBIANA	116
3.3	ATIVIDADE PREBIÓTICA	116
3.4	ATIVIDADE ANTI-HIPERTENSIVA	119
4	CONCLUSÃO	121
5	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	121
 CAPÍTULO IV.....		 127
5	CONCLUSÃO GERAL.....	129
6	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	130
 CAPÍTULO V		 131
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS		133

CAPÍTULO I

RESUMO

Proteases microbianas apresentam várias características que possibilitam muitas aplicações industriais e são responsáveis por aproximadamente 60% do mercado global de enzimas. Dentre suas aplicações, são utilizadas na obtenção de peptídeos, os quais dependendo do tamanho da cadeia e sequência de aminoácidos constituintes, podem exercer função bioativa. O objetivo geral do presente estudo foi maximizar o grau de hidrólise do plasma de sangue bovino através das condições de reação, visando a obtenção de peptídeos bioativos a partir de protease P45 estabilizada. Primeiramente, as propriedades catalíticas e estabilidade da protease P45 foram avaliadas em meio contendo líquido iônico (LI) e solventes orgânicos e na presença de cloreto de cálcio. O potencial de hidrólise da protease no meio binário líquido iônico-acetona (1:1 v/v) foi estudado para caseína de leite. A seguir, a protease na presença de 50 mmol/L CaCl₂ foi aplicada na reação de hidrólise das proteínas do plasma de sangue bovino (PSB). As condições de hidrólise do PSB avaliadas foram o pré-tratamento do substrato (aquecimento a 50, 70, 90 °C e uso de banho ultrassônico com aquecimento a 50 °C), temperatura (35 a 55 °C) e concentração de proteínas do substrato (10 a 40 g/L), sendo fixados os demais parâmetros reacionais. Logo, o hidrolisado obtido das reações foi fracionado por ultrafiltração nas membranas de corte de 1, 5 e 10 kDa, para avaliar as atividades antioxidante, prebiótica, antimicrobiana e anti-hipertensiva. A protease previamente tratada no LI [Emim][Tf₂N] apresentou incremento da atividade enzimática em quatro dos cinco solventes orgânicos testados. O meio reacional contendo acetona e o LI (1:1 v/v) foi mais estável que o meio contendo tampão Tris-HCl (pH 7,5), com aumento de 0,1 h para 2,4 h na meia vida a 55 °C, porém a protease neste meio hidrolisou a caseína de leite com grau de hidrólise aproximadamente 1,4 vezes menor que o meio aquoso em 5,5 h. A presença de 50 mmol/L CaCl₂ forneceu uma conformação estável e ativa à protease, os pré-tratamentos aplicados ao plasma não diferiram estatisticamente, sendo fixado o aquecimento a 50 °C/20 min. A maximização do grau de hidrólise foi efetuada na temperatura de 40 °C e concentração de proteínas de 17,5 g/L, atingindo 39,0 ± 0,8% em 12 h. A atividade de captura do radical ABTS do hidrolisado não ultrafiltrado foi igual a 46,6 ± 1,3 µmol TE/g·L não diferindo estatisticamente da fração >10 kDa (F1), enquanto que o poder quelante do ferro foi mais efetivo nas frações de menor tamanho, igual a 93,0 ± <0,1%, para fração 1-5 kDa (F3), sem diferir estatisticamente da fração 5-10 kDa (F2). O hidrolisado e frações do plasma não apresentaram potencial antimicrobiano. A fração F1 promoveu o melhor crescimento de *Bifidobacterium lactis* BB-12[®], com potencial prebiótico. Na determinação da atividade anti-hipertensiva, a fração F2 apresentou inibição de 32,2 ± 0,6%. Desta forma, este estudo promoveu a maximização do grau de hidrólise do plasma de sangue bovino catalisada por protease estabilizada em cálcio, sendo obtidos hidrolisados proteicos que resultaram em peptídeos com atividade antioxidante, anti-hipertensiva e prebiótica.

Palavras-chave: Protease bacteriana. Líquido iônico. Estabilidade. Hidrólise enzimática. Plasma sanguíneo. Peptídeos bioativos.

ABSTRACT

STABILITY AND APPLICATION OF PROTEASE P45 IN THE PROTEIN HYDROLYSIS OF BOVINE BLOOD PLASMA

Microbial proteases have several characteristics that allow for many industrial applications and account for approximately 60% of the global enzymes market. Among its applications, they are used to obtain peptides, which depending on the chain size and amino acid sequence, may exert bioactive function. The aim of the present study was to maximize the degree of hydrolysis of bovine blood plasma through the reaction conditions, aiming to obtain bioactive peptides using stabilized protease P45. First, the catalytic properties and stability of protease P45 were evaluated in medium containing ionic liquid and organic solvents and, in the presence of calcium chloride in the enzymatic extract. The hydrolysis potential of protease in the ionic liquid-acetone medium (1:1 v/v) was studied for milk casein. Next, the protease and 50 mmol/L CaCl₂ were applied in the hydrolysis reaction of bovine blood plasma. The conditions evaluated were substrate pretreatment (heated at 50, 70, 90 °C and use of ultrasonic bath with heating at 50 °C), temperature (35 to 55 °C) and substrate protein concentration (10 to 40 g/L), with the other reaction parameters fixed. Then, the hydrolysate obtained from the reaction was fractionated by ultrafiltration membranes of molecular weight cut-offs 1, 5 and 10 kDa to evaluate the antioxidant, prebiotic, antimicrobial and antihypertensive activities. The protease that was previously treated in IL [Emim][Tf₂N] presented increased activity in four out of five organic solvents tested. The reaction medium containing acetone and IL (1:1 v/v ratio) was more stable than the buffer medium, increasing the half-life from 0.1 h to 2.4 h at 55 °C, but the protease in this medium hydrolyzed milk casein with a hydrolysis degree approximately 1.4 times lower than in aqueous medium in 5.5 h. The presence of 50 mmol/L CaCl₂ provided a stable and active protease conformation, and the pretreatments applied to plasma did not differ statistically, with heating being set at 50 °C/20 min. Degree of hydrolysis were maximized by temperature (40 °C) and protein concentration (17.5 g/L), reaching 39.0 ± 0.8% in 12 h. The ABTS radical scavenging activity of non-ultrafiltrated hydrolysate was of 46.6 ± 1.3 μmol TE/gL and did not differ statistically from >10 kDa fraction (F1), while the iron chelating power was more effective in the smaller fractions, showed 93.0 ± <0.1% for fraction 1-5 kDa (F3), without statistically differing from the 5-10 kDa (F2). Hydrolysate and plasma fractions showed no antimicrobial potential. The F1 fraction promoted the greatest growth of *Bifidobacterium lactis* BB-12[®], with prebiotic potential. In the antihypertensive determination activity, the F2 fraction presented inhibition of 32.2 ± 0.6%. Finally, this study promoted the maximization of bovine blood plasma degree of hydrolysis catalyzed by calcium-stabilized protease, being obtained protein hydrolysates with antioxidant, antihypertensive and prebiotic activity.

Key words: Bacterial protease. Ionic liquid. Stability. Enzymatic hydrolysis. Blood plasma. Bioactive peptides.

1 INTRODUÇÃO GERAL

A produção e aplicação de enzimas vem crescendo a cada ano, não somente em pesquisas bioquímicas, mas também nas indústrias química (GAVRILESCU; CHISTI, 2005), de alimentos (AHN; KIM; JE, 2014; HIDALGO et al., 2015) e farmacêutica (VELLARD, 2003; GOTOR-FERNÁNDEZ; BRIEVA; GOTOR, 2006), visto que apresentam especificidade por substratos e aceleram as taxas das reações, sendo utilizadas na manufatura industrial de produtos com valor agregado (SINGH et al., 2016). Entre todas as enzimas, as hidrolases representam 75% do total das vendas no mercado mundial, sendo as proteases predominantemente exploradas na indústria devido ao seu amplo campo de aplicação (GUPTA et al., 2013; SINGH et al., 2016).

A produção de peptídeos bioativos a partir de substratos proteicos por hidrólise enzimática é atrativa em estudos biotecnológicos e atualmente é a principal via para obtenção desses peptídeos, frente aos métodos de hidrólise química e física. O conhecimento dos parâmetros da reação de hidrólise e atuação da protease empregada rende a este processo uma vantagem sobre os outros métodos na obtenção de peptídeos com atividade biológica (HIDALGO et al., 2012; GONÇALVES, 2016). Para uma aplicação bem sucedida, as proteases precisam atuar como biocatalisadores estáveis, visto que na forma natural as enzimas nem sempre preenchem todas as necessidades de um biocatalisador industrial, sendo preciso a melhoria de uma ou mais características antes da sua aplicação comercial (COWAN; FERNANDEZ-LAFUENTE, 2011).

Para que a utilização de uma enzima seja industrialmente viável, é necessário que seja estável frente a uma ampla faixa de temperatura e de pH e, geralmente na presença de sais, álcalis e surfactantes. Neste quesito, o uso de aditivos é um método simples utilizado para melhorar a estabilidade. Esta estabilização pode ser obtida pela adição de ligantes, sais e/ou polióis (IYER; ANANTHANARAYAN, 2008).

Um tipo de ligante que vem promovendo o melhoramento de atividade e estabilidade de enzimas são os líquidos iônicos (HERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ et al., 2009; YANG et al., 2010; BOSE; BARNES; PETRICH, 2012), sendo empregados tanto como aditivos enzimáticos como meios reacionais. O interesse de aplicação foi aumentando em vista das vantagens frente ao uso de solventes orgânicos, dentre elas a menor carga poluente e o ajuste das suas propriedades físico-químicas de acordo com a aplicação (GAO et al., 2015). Outro estabilizante, o cálcio, age nas enzimas reduzindo a flexibilidade das cadeias polipeptídicas, protegendo-as da inativação térmica. Íons metálicos, como o Ca^{2+} , apresentaram

efeito satisfatório na atividade e estabilidade da protease P45 (DAROIT; SANT'ANNA; BRANDELLI, 2011), abrindo novas possibilidades no âmbito investigativo, para prover conhecimentos de grande importância para a aplicação das proteases alcalinas.

Vários dos subprodutos gerados no setor industrial do ramo alimentício são majoritariamente constituídos de proteínas e comumente são descartados inadequadamente, gerando prejuízos às atividades econômicas do setor agroindustrial e ao meio ambiente. O sangue é um volumoso subproduto da indústria de carnes, correspondendo a até 4% do peso do animal (JAYATHILAKAN et al., 2012). O sangue é constituído de duas frações principais, a fração celular e o plasma, sendo em torno de 30% do total do volume gerado em frigoríficos utilizado pela indústria de alimentos. Devido às altas quantidades geradas e a sua carga poluente, reflete um problema quando descartado diretamente no ambiente (GATNAU; POLO; ROBERT, 2001; BAH et al., 2013). Novas aplicações aos componentes do sangue representam um importante desafio para os cientistas, incentivando pesquisas sobre vias alternativas de utilização, incluindo a obtenção de peptídeos bioativos, como oportunidade de agregar valor econômico a estes subprodutos (GRAZZIOTIN et al., 2007; BAH et al., 2016a; BAH et al., 2016c).

Em geral, os peptídeos com funções biológicas encontram-se inativos na proteína de origem, então a proteólise é requerida para liberá-los. Estudos apontaram a obtenção de hidrolisados proteicos a partir de plasma sanguíneo com atividades biológicas do tipo antioxidante e inibitória da enzima conversora de angiotensina (SEO et al., 2015; BAH et al., 2016c; LAFARGA et al., 2016a), porém os hidrolisados foram obtidos a partir da hidrólise catalisada por proteases comerciais. A protease microbiana de *Bacillus* sp. P45 foi empregada na hidrólise de caseinato ovino promovendo a formação de peptídeos com atividade antioxidante e antimicrobiana (DAROIT et al., 2012). Na literatura consultada não há relatos sobre aplicação desta protease, estabilizada ou não por aditivos químicos, na hidrólise de plasma de sangue bovino para obtenção de hidrolisados com atividade biológica.

Desde o ano de 2010 o Laboratório de Microbiologia e Biosseparações da Universidade Federal do Rio Grande realiza pesquisas utilizando a enzima produzida por *Bacillus* sp. P45. Os estudos desenvolvidos contemplam a purificação parcial da enzima (SALA et al., 2014), a aplicação desta protease como agente coagulante na produção de queijos cremosos (LEMES et al., 2016b) e a produção de protease bem como biomoléculas com atividade antioxidante por cultivo submerso de *Bacillus* sp. P45 em diferentes substratos proteicos (farinha de penas, farinha de penas reutilizada e biomassa residual) (LEMES et al., 2016a). O grupo de pesquisa estudou a estabilização da protease P45 parcialmente purificada

utilizando líquidos iônicos e os aditivos químicos cálcio, sorbitol e polietilenoglicol (BORBA, 2015) e aplicou a mesma protease na hidrólise de caseína e plasma de sangue bovino obtendo peptídeos com atividade antioxidante, sendo que as condições de hidrólise foram definidas apenas para o substrato caseína (GONÇALVES, 2016).

Assim, a presente tese tem como objetivo investigar as propriedades catalíticas e estabilizantes da protease P45 em meios alternativos, maximizar o grau de hidrólise do plasma de sangue bovino aplicando a protease P45 estabilizada e determinar as atividades biológicas (atividade antioxidante, antimicrobiana, prebiótica e anti-hipertensiva) dos peptídeos formados.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Maximizar o grau de hidrólise do plasma de sangue bovino, visando a obtenção de peptídeos bioativos a partir de protease P45 estabilizada.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Investigar as propriedades catalíticas e estabilidade da protease de *Bacillus* sp. P45 em meio contendo líquido iônico e solvente orgânico;
- Estudar o efeito da adição de cloreto de cálcio na atividade e estabilidade da protease P45;
- Maximizar o grau de hidrólise do plasma de sangue bovino através dos parâmetros de reação, temperatura e concentração de proteínas do substrato, utilizando como catalisador a protease P45 estabilizada;
- Fracionar o hidrolisado de plasma de sangue utilizando a técnica de ultrafiltração e, avaliar as atividades antioxidante, antimicrobiana, prebiótica e anti-hipertensiva das frações obtidas.

CAPÍTULO II

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 PROTEASES

Enzimas são macromoléculas biológicas que aceleram as reações químicas. Como todos os catalisadores, as enzimas aumentam a taxa de reação através da diminuição da energia de ativação e são conhecidas por catalisar uma ampla faixa de reações bioquímicas (VAN BEILEN; LI, 2002).

Um tipo específico de enzima, as proteases, catalisam a hidrólise de ligações peptídicas em peptídeos e aminoácidos, sendo encontradas em todos os organismos vivos, e são essenciais para o crescimento celular (KREM; DI CERA, 2001; SOUZA et al., 2015). Estas enzimas pertencem ao grupo das hidrolases, porém existem outros critérios que as classificam: de acordo com a fonte de isolamento (animal, vegetal e microbiana), ação catalítica (endo e exoproteases), sítio ativo (aspártico, cisteíno, serino, glutâmico, asparagino, treonina ou metaloproteases), carga, tamanho molar e especificidade pelo substrato (RAO et al., 1998; RAWLINGS; MORTON; BARRETT, 2006; GUPTA; BEG; LORENZ, 2002).

Proteases estão presentes em animais, plantas e micro-organismos (SHARMA et al., 2017). Células de micro-organismos podem produzir enzimas mais facilmente e rapidamente do que as células animais e vegetais, não sendo influenciados por condições climáticas ou mudanças sazonais. Além disso, há preferência por enzimas sintetizadas extracelularmente, simplificando o processo de *downstream* e conseqüentemente redução dos custos do processo (TUFVESSON et al., 2010). Há diversos micro-organismos que sintetizam proteases, sendo as bactérias o principal grupo produtor, destacando-se o gênero *Bacillus*, contendo diversas espécies que secretam essa enzima, com rendimento de mais de 20 g/L de proteína (HARWOOD; CRANENBURGH, 2008).

Proteases microbianas têm várias características notáveis para muitas aplicações industriais e são responsáveis por aproximadamente 60% do mercado global de enzimas (KUMAR et al., 2012). Por apresentar atividade e estabilidade em ampla faixa de temperatura e pH, apresentam potenciais aplicações em um grande número de processos industriais como os de alimentos (LEMES et al., 2016b), de limpeza (JELLOULI et al., 2011; PAUL et al., 2014) e de couro (DETTMER et al., 2012).

Entre as espécies de *Bacillus*, o micro-organismo *Bacillus* sp. P45 (número de acesso no GenBank AY962474) foi isolado do intestino de um peixe da bacia Amazônica

denominado Jaraqui (*Piaractus mesopotamicus*). Uma caracterização baseada no sequenciamento 16S do rDNA mostrou que a cepa deste micro-organismo se enquadra no grupo do *Bacillus subtilis* (SIRTORI et al., 2006), que apresenta certificação GRAS (*Generally Recognized as Safe*) (DAROIT; CORRÊA; BRANDELLI, 2009).

O cultivo de *Bacillus* sp. P45 para a produção de proteases foi otimizado usando a farinha de penas como substrato (DAROIT; CORRÊA; BRANDELLI, 2011). Contudo, no mesmo estudo, foram testados outros substratos para cultivo da bactéria, sendo eles caseína, gelatina e soro de queijo em pó, os quais apresentaram menor atividade enzimática (DAROIT; CORRÊA; BRANDELLI, 2011). O extrato enzimático foi submetido a um processo de purificação por sistema aquoso bifásico integrado à ultrafiltração, para obtenção da enzima parcialmente purificada (SALA et al., 2014). Posteriormente, a enzima apresentou habilidade de hidrolisar as proteínas do leite e atividade coagulante na produção de queijo cremoso (LEMES et al., 2016b) e foi estabilizada com o uso do líquido iônico 1-etil-3-metilimidazólio bis(trifluorometilsulfonil)imida ([Emim][Tf₂N]) e aditivos químicos (sorbitol com CaCl₂) (BORBA, 2015).

A degradação de diferentes substratos proteicos, pelo extrato enzimático bruto e parcialmente purificado de *Bacillus* sp. P45 foi previamente estudado por Daroit et al. (2010) e Sala et al. (2014), com maior degradação dos substratos caseína, farinha de peixes, farinha de penas e albumina de soro bovino. Como visto, as proteases produzidas por *Bacillus* sp. P45 apresentam potencial para utilização na hidrólise de proteínas.

Além disso, os peptídeos gerados pelas hidrólises catalisadas por esta protease tem apresentado atividades biológicas promissoras, dentre elas antioxidante e antimicrobiana. Daroit et al. (2012) estudaram as atividades antioxidante e antimicrobiana de caseinato ovino após a hidrólise por protease de *Bacillus* sp. P45. Os diferentes tempos de reação usados para a hidrólise resultaram em diferentes propriedades ativas, provavelmente pela liberação de peptídeos distintos. Os peptídeos apresentaram potencial antioxidante para sequestro do radical 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) (ABTS) após 3 h e até as 7 h. Em uma hora os hidrolisados inibiram o crescimento de diferentes micro-organismos incluindo *Salmonella enteritidis* ATCC13076 e *Listeria monocytogenes* ATCC 15131.

Gonçalves (2016) estudou as propriedades antioxidantes de hidrolisados de caseína de soro bovino catalisada por protease P45. O poder antioxidante de redução do ferro foi aproximadamente 30% maior em relação ao controle (sem hidrólise) e de captura do radical ABTS aproximadamente 80% maior em relação à amostra controle (sem hidrólise).

3.2 ESTABILIZAÇÃO PROTEICA

A estrutura proteica é normalmente descrita em diferentes graus de complexidade, inicia-se na estrutura primária, ou sequência de aminoácidos. As estruturas secundária, terciária e quaternária estão envolvidas no enovelamento ou estabelecimento da estrutura tridimensional como um todo. A estrutura secundária é organizada por domínios de aminoácidos interligados, frequentemente compreendidos por formas α -hélices ou β -folhas, estabilizadas por ligações de hidrogênio (RYAN, 2011).

A estrutura terciária descreve a cadeia polipeptídica completamente enovelada e compactada. As estruturas terciárias são estabilizadas por interações das cadeias laterais dos aminoácidos em regiões não vizinhas da cadeia polipeptídica (MORAN et al., 2013). A formação da estrutura terciária faz com que porções distantes das estruturas primárias e secundária fiquem próximas umas das outras. Algumas proteínas têm estruturas quaternária: a associação de duas ou mais cadeias polipeptídicas em uma proteína oligomérica ou de múltiplas subunidades. As cadeias polipeptídicas podem, ou não, ser idênticas (MORAN et al., 2013).

PDurante o enovelamento proteico, deve ser mantida a principal conformação biologicamente funcional, estável e energeticamente favorável. O enovelamento de cadeias de aminoácidos de uma proteína ocorre em vista de um estado termodinamicamente favorável, de baixa energia livre (G). Uma proteína enovelada possui entalpia favorável (H) devido as interações internas, enquanto que o estado desnaturado possui entropia (S) de maior valor, devido as cadeias livres, aleatórias e não estruturadas (DOBSON; SALI; KARPLUS, 1998).

O enovelamento e a estabilização de enzimas no estado nativo dependem de várias forças, são elas as interações hidrofóbicas, solvatação de grupamentos polares, ligações de hidrogênio, interações de van der Waals e eletrostáticas (MORAN et al., 2002). Os aminoácidos hidrofóbicos escondem-se no núcleo da proteína, permitindo maior estabilidade em água. A interação entre eles leva o polipeptídeo a se dobrar e formar um glóbulo compacto. A entropia do polipeptídeo diminui à medida que a estrutura se torna mais ordenada. Essa redução é compensada pelo aumento da entropia do solvente, à medida que as moléculas de água que antes estavam ligadas à proteína são liberadas. Esse aumento global da entropia do sistema fornece o impulso para o enovelamento das enzimas (MORAN et al., 2002).

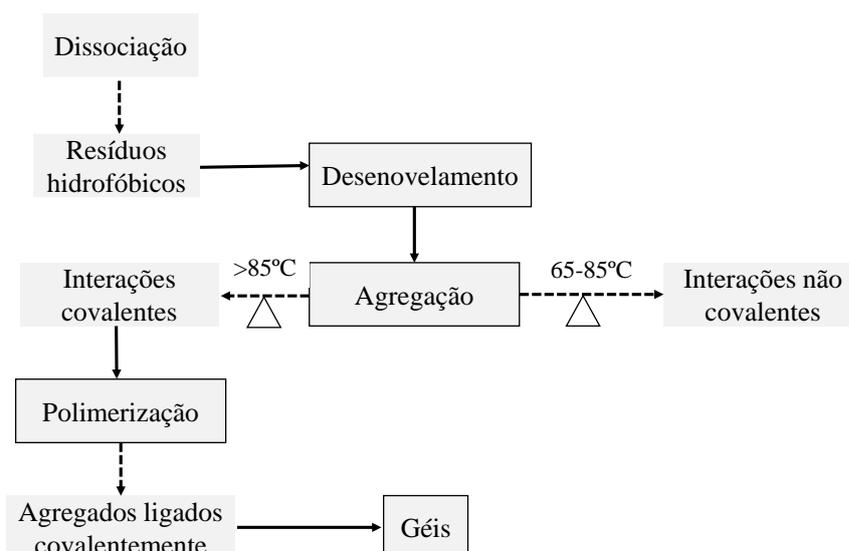
Enquanto as cadeias laterais não polares são direcionadas para o interior da proteína, as mais polares permanecem em contato com o solvente na superfície da enzima. Assim, são os aminoácidos presentes que ditam a conformação ordenada, a sequência direciona o dobramento e empacotamento da proteína no estado termodinamicamente estável, o que

resulta em uma estrutura compacta e de empacotamento específico das cadeias laterais (MORAN et al., 2002; RYAN, 2011). A solvatação de grupamentos polares se dá por cadeias iônicas encontradas na superfície e contribuem minimamente para a estabilização total das proteínas (MORAN et al., 2002).

A Figura 1 expõe as vias para desnaturação e agregação envolvidas no aquecimento, que são: dissociação em monômeros, desenovelamento da estrutura nativa com exposição de resíduos hidrofóbicos, que podem participar do estágio de agregação se houver continuidade de calor aplicado. Na via de agregação, os monômeros reativos interagem para produzir oligômeros via ligações S-S e/ou interações não covalentes. A via da polimerização é caracterizada pela formação de oligômeros maiores via interações covalentes, indicada pela formação de géis. Pode ocorrer ainda uma ligação cruzada pela formação de ligação isozeptídica entre lisina-glutamina (ou asparagina). O modelo é complexo, mas claramente demonstra que a desnaturação e a agregação dependem de propriedades moleculares (sítios hidrofóbicos, pontes -S-S e grupamentos -SH) da proteína (WIJAYANTI et al., 2019).

A instabilidade enzimática pode reduzir a eficiência da reação e, assim, aumentar os custos do produto. O melhoramento da estabilidade enzimática durante a reação é um foco importante de estudo, uma vez que as estabilidades de reação, térmica e de armazenamento são peças chave para aplicação enzimática (WANG et al., 2018).

Figura 1 – Etapas que ocorrem durante a desnaturação induzida por calor.



Fonte: Adaptado de Wijayanti et al. (2019).

Os parâmetros cinéticos como a meia vida ($t_{1/2}$), constante de desativação, energia de ativação (E_a), as mudanças na energia livre de Gibbs, entalpia e entropia de enzimas são

geralmente empregadas para descrever a desnaturação termodinâmica. A atividade e termoestabilidade de proteases são parâmetros importantes para avaliar a viabilidade econômica destas enzimas, em vista que uma estabilidade elevada é considerada uma vantagem econômica em vista do uso reduzido de enzima. Sendo assim, antes do desenvolvimento de um processo enzimático, é desejável analisar a estabilidade da enzima em questão dispondo de meios alternativos de reação e/ou inserção de aditivos para promover melhor atuação enzimática (GOHEL; SINGH, 2018).

3.3 INTERAÇÃO ENTRE ÍONS DE CÁLCIO E PROTEASES

Para que a utilização de uma enzima seja industrialmente viável, é necessário que seja estável frente a uma ampla faixa de temperatura e de pH. Assim, muitas vezes são requeridos aditivos, como os íons metálicos, que agem na molécula proteica prevenindo a inativação enzimática. Em geral, o efeito dos íons cálcio na função enzimática em meios aquosos se apresenta como uma curva gaussiana: há um limite de concentração do íon em que o pico de atividade é máximo e depois decresce (PEREIRA, 2015). A fase decrescente de atividade enzimática se dá em altas concentrações de cálcio, sendo que nessa fase o efeito é normalmente atribuído à habilidade desses íons de modificar as cargas da superfície da enzima, tendendo a deixá-la eletricamente neutra, o que faz com que as interações eletrostáticas se enfraqueçam, promovendo a agregação das moléculas da protease (ZHANG et al., 2019). Alternativamente, em baixas concentrações, os íons cálcio se ligam, preferivelmente, em regiões específicas na proteína, diminuindo as taxas de autólise (PEREIRA, 2015; EIJSINK; MATTEWS, VRIEND, 2011).

Ertan et al. (2015) verificaram que a adição de cálcio a uma metaloprotease alcalina de *Pseudomonas* sp. RC aumentou a produtividade em aproximadamente 300% em relação à enzima bruta e à enzima removida de cálcio (pela adição de agente quelante). A produtividade foi acompanhada pela formação de um azo-peptídeo ao longo do tempo e sua medição avaliou a performance da protease, pois relaciona a interação entre a atividade, estabilidade, ativação e inibição. Os autores mencionaram que embora a compreensão da ação do cálcio nesta protease seja limitada, os resultados evidenciam que o íon representa um potencial ativo na área de pesquisa para manipulação de enzimas, como a genética.

Zhang et al. (2019) verificaram que os íons Ca^{2+} (concentração de até 3 mmol/L) ligaram-se a uma protease alcalina por interações eletrostáticas e que esta combinação promoveu uma estrutura proteica mais estável, o que favoreceu o aumento da atividade

enzimática. Por espectrometria de fluorescência foi mostrado que a protease alcalina tem dois sítios de ligação com o cálcio e uma potente força de ligação.

Daroit, Sant'Anna e Brandelli (2011) verificaram através dos parâmetros cinéticos e termodinâmicos que o papel do cálcio é crucial na estabilização da protease P45, a atividade da enzima foi aumentada nas concentrações de cálcio testadas (1-10 mmol/L). Em temperaturas superiores a 50 °C a presença de íons metálicos (cálcio ou magnésio) promoveram o aumento da termoestabilidade, em relação ao ensaio sem a adição dos íons. A adição de cálcio (3 mmol/L) aumentou a temperatura ótima da protease P45 de 55 °C para 60 °C. Os autores justificaram que a termoestabilidade da protease P45 na presença de cálcio foi devido a diminuição das taxa de autólise, pois os sítios de autólise parecem estar envolvidos ou próximos aos locais de ligação do cálcio.

O efeito favorável do Ca^{2+} na estrutura de uma protease se dá até um valor máximo de concentração do sal, pois o aumento das cargas irão neutralizando a superfície da enzima até que ocorra a agregação das moléculas proteicas e conseqüentemente a perda dos sítios de ligação do cálcio, levando à desnaturação (PEREIRA, 2015; ZHANG et al., 2019). O estudo do tamanho de partícula da protease alcalina mostrou que a média do tamanho da partícula diminuiu com a adição de cálcio, e a estrutura tornou-se mais compacta e estável, favorecendo o aumento da atividade enzimática (ZHANG et al., 2019).

3.4 LÍQUIDOS IÔNICOS

Líquidos iônicos (LIs) ou sais fundidos consistem de cátions orgânicos e vários ânions, mostrando pronunciada organização própria devido a formação de agregados por ligações de hidrogênio nas fases sólida, líquida e mesmo gasosa, sendo, portanto, fluidos altamente estruturados. Líquidos iônicos são melhores descritos como nanoestruturas supramoleculares do tipo $[(X)_{n+z}(A)_n]^{z+}$ ou $[(X)_n(A)_{n+z}]^{z-}$, onde X representa o cátion orgânico e A representa o ânion (GOZZO et al., 2004).

Os LIs podem ser classificados em duas categorias, hidrofóbicos e hidrofílicos. O último pode ser utilizado como solvente nas reações de biocatálise contendo substratos polares e hidrofílicos tais como carboidratos e aminoácidos, que são insolúveis em muitos solventes orgânicos comuns, enquanto que a primeira categoria citada pode substituir solventes orgânicos em substratos não polares hidrofóbicos (ERBELDINGER; MESIANO; RUSSELL, 2000).

Enzimas do tipo lipases (AKBARI et al., 2011; MUÑOZ; CORREA-LLANTÉN; BLAMEY, 2015), acilase (HERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ et al., 2009), celulase (BOSE;

BARNES; PETRICH, 2012) e α -quimotripsina (ATTRI; VENKATESU; KUMAR, 2011) foram examinadas em líquidos iônicos a fim de testar suas atividades e estabilidades, e foi verificado que as mesmas não foram desnaturadas, nem desativadas. Ainda, muitas reações enzimáticas foram reportadas em líquidos iônicos, como transesterificação e hidrólise utilizando lipase (YANG et al., 2010), síntese de α -aspartame (ERBELDINGER; MESIANO; RUSSELL, 2000) e hidrólise utilizando celulase (BOSE; ARMSTRONG; PETRICH, 2010), indicando que as propriedades físico-químicas dos LIs são fundamentais na estabilidade, atividade e estrutura das enzimas.

As vantagens de uso dos LIs se comparado com os solventes orgânicos tradicionais em reações enzimáticas incluem: (1) LIs são designados solventes ajustáveis para um particular bioprocessos; (2) enzimas incluindo lipases, acilase, celulase e α -quimotripsina comumente apresentam estabilidade operacional e térmica em LIs; (3) em vista das características não voláteis, LIs podem ser usados em sistemas de alto vácuo para reduzir a poluição causada pela volatilização do solvente (GAO et al., 2015).

Entre as particularidades dos líquidos iônicos, o tipo de ânion interage fortemente com a enzima, causando mudanças conformacionais, quanto mais forte a carga iônica, menos favorece a atividade e estabilidade. Os cátions do LI interagem com as enzimas através das forças de van der Waals. A estabilidade das enzimas é favorecida com o aumento da força das cadeias alquílicas do cátion (KLÄHN et al., 2011). A série de Hofmeister pode explicar o comportamento das enzimas em soluções aquosas de LI (ZHAO et al., 2006; YANG, 2009), enquanto os íons cosmotrópicos tem a habilidade de quebrar as ligações de hidrogênio água-água por apresentarem forte interação com moléculas de água, os íons caotrópicos agem ao contrário.

Nem todas as enzimas comportam-se da mesma maneira em um determinado LI, visto que a atividade das enzimas depende de um efeito sinérgico entre substrato, meio e enzima (NAUSHAD et al., 2012). Então, é a interação entre todos estes fatores e as suas influências sobre a atividade e estabilidade enzimática que indicam um comportamento favorável ou não.

A viscosidade dos solventes pode afetar as taxas das reações catalíticas em vista da limitação das transferências de massa quando a reação é rápida e o LI relativamente viscoso. Devido as interações íon-íon, compreendendo as interações de van der Waals e ligações de hidrogênio, as viscosidades dos LIs são maiores do que as dos solventes orgânicos tradicionais. O efeito da viscosidade do líquido iônico tris-(2-hidroxietil)-metilamônio metilsulfato na atividade relativa da enzima endo-1,4- β -D-glucanase foi estudado por Bose, Barnes e Petrich

(2012), os quais verificaram um efeito negativo da viscosidade na atividade até a temperatura de 55 °C. Nas temperaturas de 65 e 75 °C a atividade enzimática teve um aumento com a viscosidade, mostrando que a viscosidade não pode ser analisada individualmente em termos das propriedades catalíticas de uma enzima.

Estudos mostraram o efeito de líquidos iônicos em reações de biocatálise. Dang et al. (2007) verificaram que a atividade da lipase em líquidos iônicos foi maior do que em tampão fosfato. Ainda, as atividades da enzima em LI hidrofóbicos ([Bmim][PF₆] e [Emim][Tf₂N]) mostraram um pequeno aumento em relação aos líquidos iônicos hidrofílicos ([Bmim][BF₄] e [Emim][BF₄]). A estabilidade da protease de *Salinivibrio* sp. MS-7 a 37 °C por 30 min aumentou em pelo menos uma das concentrações de líquido iônico testadas, com melhor comportamento para o [C₆mim][PF₆] na concentração de 50% (v/v) promovendo o incremento de 90% na atividade residual (KARBALAEI-HEIDARI; SHAHBAZI; ABSALAN, 2013). Por outro lado, Dabirmanesh et al. (2011) avaliaram a influência do tampão aquoso adicionados aos LIs ([Bmim][Cl] e [C₆mim][Cl]) frente à atividade e estabilidade das enzimas α -amilase mesófila e termófila, observando acentuado decréscimo da atividade enzimática, de 70% na enzima mesófila e de 20% na enzima termófila, quando comparados com a atividade inicial (sem adição de LIs).

As propriedades catalíticas e estabilidade da protease P45 em vários líquidos iônicos consistindo de cátions dialquilimidazólio combinado com ânions e trietilamônio foram avaliadas no estudo de Borba (2015). Os ensaios de termoestabilidade conduzidos em meio contendo o LI [Emim][Tf₂N] foram obtidos a 55 e 70 °C. O extrato manteve 70% da atividade enzimática por 32 d em 55 °C, e a 70 °C a meia vida foi de 6,4 h, porém a dispersão da protease P45 neste LI hidrofóbico recuperou apenas 48% da atividade enzimática, sendo que a redução da atividade foi causada provavelmente pela alta viscosidade do líquido iônico.

3.5 PLASMA DE SANGUE

O sangue é gerado em altas quantidades pela indústria de carnes e este subproduto apresenta baixo valor econômico para a indústria. Pelas mesmas razões, apresenta um alto potencial poluente. Em vista disso, é crescente o interesse na recuperação completa e utilização adequada deste subproduto (MULLEN et al., 2015). O sangue tem como principais subaplicações a geração de compostagem ou biogás e ração animal, ambos com baixo valor agregado (JAYATHILAKAN et al., 2012). O uso de sangue para o consumo humano ou aplicação que gere alto valor agregado (por exemplo biomateriais e fonte de peptídeos bioativos

(HUANG; LIU, 2010; BURNOUF et al., 2013)) ainda representa uma pequena porção do total do uso do sangue. De acordo com Galanakis (2012), o sangue pode ser classificado como um dos principais subprodutos da indústria de alimentos, necessitando que sejam desenvolvidas novas estratégias para recuperar compostos com alto valor agregado ao mercado.

O sangue pode ser fracionado em plasma (65-70%) e massa celular (35-40%) em base por volume (HALLIDAY, 1973). Para o fracionamento, normalmente se utiliza um anticoagulante para complexar o cálcio e evitar a coagulação (GUNSTONE, 1980). O plasma representa a parte do sangue não coagulado após a remoção das células vermelhas, contém 6-8% (b.u.) de proteínas, compreendido por albuminas (3,3%), globulinas (4,2%) e fibrinogênio (0,4%) (GORBATOV, 1988; HURTADO et al., 2011; BAH et al., 2013).

O sangue coletado pode ser processado de diversas formas dependendo da sua intenção de utilização. Se o sangue bruto é necessário, usualmente é seco em evaporador de escala industrial para obtenção da farinha de sangue. Quando o soro é o produto principal, após a coagulação, o soro é coletado por filtração ou centrifugação. Por outro lado, se o plasma é o produto de interesse, se adiciona um anticoagulante ao sangue e o plasma é recuperado por centrifugação, resultando em duas frações: plasma e células vermelhas – hemoglobina (OCKERMAN; HANSEN, 1999).

A qualidade do plasma é determinada pelo conteúdo de hemoglobina. A remoção do excesso de hemoglobina é uma tarefa complexa, podendo ser empregadas técnicas cromatográficas, com as desvantagens de ser de alto custo e de difícil ampliação de escala. O método rotineiramente empregado na separação é a centrifugação, que gera perda de qualidade em vista do valor semelhante de densidade do plasma (1025 g/L) e das células vermelhas (1125 g/L), e dependendo do tipo de centrífuga pode acarretar a ruptura das células vermelhas pelo estresse gerado (ÁLVAREZ; DRUMMOND; MULLEN, 2018). As vantagens deste método são a fácil operação e o baixo tempo de execução.

Os estudos recentes empregando plasma sanguíneo mostram diversas aplicações na indústria de alimentos. Fu et al. (2018) investigaram as características da sequência peptídica no sabor dos hidrolisados de plasma suíno, estudando 10 tipos de preparados enzimáticos de grau alimentar para as hidrólises, sendo verificado uma correlação positiva no aumento do sabor umami e redução do sabor amargo dos peptídeos de massa molar inferior a 0,5 kDa, com potencial utilização como ingrediente em produtos alimentícios.

Wang et al. (2018) estudaram o potencial das proteínas de plasma suíno como suporte para encapsulação de biomoléculas ativas hidrofóbicas, por alternância de pH e livre de

solventes orgânicos. A encapsulação não afetou significativamente as propriedades antioxidantes da curcumina após aquecimento a 121 °C por 1 min, condição essa estabelecida como a simulação de um processo de esterilização para estender a vida útil de bebidas.

Hurtado et al. (2011) verificaram que a adição de plasma suíno na formulação de salsichas como substituinte dos aditivos polifosfato e caseinato de sódio, promoveu o aumento do conteúdo proteico e o melhoramento da textura do produto. Outros autores verificaram que hidrolisados de plasma de sangue apresentam atividade biológica. No estudo de Salgado et al. (2011) o hidrolisado de plasma bovino com atividade antioxidante foi adicionado em filmes poliméricos de proteínas vegetais (soja e girassol) com incremento da capacidade antioxidante destes, dando uma aplicabilidade de relevância para a utilização de proteínas subutilizadas.

Em muitas reações de hidrólise enzimática, a camada protetora do substrato impede a ocorrência da reação, necessitando que um pré-tratamento seja aplicado para destruir a agregação das moléculas do substrato, tornando-o mais vulnerável ao ataque das enzimas. De acordo com Wanasundara et al. (2002), o plasma bovino desfibrinado na forma nativa apresentou resistência à hidrólise pelas enzimas alcalase e flavourzyme, com valores de graus de hidrólise abaixo de 5%. Os autores verificaram a efetividade de uma desnaturação térmica do substrato previamente à hidrólise, permitindo a desestabilização da molécula proteica e tornando-a mais acessível à ação de proteases, com valores de grau de hidrólise próximos a 35%.

3.6 HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE PROTEÍNAS

O interesse pela produção de alimentos funcionais tem motivado a obtenção de peptídeos bioativos com o intuito de melhorar a sua disponibilidade em relação à fonte natural e/ou fortificação de frações proteicas isoladas (PHELAN et al., 2009). Os peptídeos bioativos são biomoléculas que geralmente estão em um estado latente no interior da sequência da proteína precursora, mas podem desempenhar funções biológicas quando liberados através de mecanismos de hidrólise (ERDMANN; CHEUNG; SCHRÖDER, 2008). Eles podem ser obtidos basicamente por extração utilizando solventes, em sistemas controlados de hidrólise ácida ou enzimática, cultivo microbiano de proteínas (NAJAFIAN; BABJI, 2012), e também por enzimas digestivas específicas durante o trânsito gastrointestinal (HERNÁNDEZ-LEDESMA; DEL MAR CONTRERAS; RECIO, 2011).

Apesar das diversas técnicas disponíveis para obtenção dos peptídeos, o método de hidrólise enzimática é o mais utilizado pelas indústrias alimentícias e farmacêuticas, uma vez

que os outros métodos, com exceção do processo ocorrido durante o trânsito gastrointestinal, podem deixar resíduos de solventes orgânicos ou produtos químicos tóxicos no produto final (NAJAFIAN; BABJI, 2012), o que pode comprometer algumas aplicações.

O processo de hidrólise enzimática geralmente é acompanhado por três efeitos distintos: diminuição da massa molar da proteína, aumento do número de grupos ionizáveis e a exposição de grupos hidrofóbicos ocultos até o momento da hidrólise (PANYAM; KILARA, 1996). Durante a hidrólise, as proteínas são quebradas em peptídeos de diferentes tamanhos e aminoácidos livres, como resultado da clivagem das ligações peptídicas. Geralmente o processo é realizado sob condições brandas de pH (6-8) e temperatura (40-60 °C), conduzindo ao desenvolvimento de componentes biologicamente ativos benéficos à saúde (SINHA et al., 2007). Este processo é realizado por proteases específicas que catalisam a clivagem de ligações peptídicas (VANDEPUTTE-RUTTEN; GROS, 2002). Dessa forma, é a especificidade da enzima empregada na hidrólise que determina o tamanho, a quantidade e a sequência de aminoácidos dos peptídeos, que por sua vez influenciam a atividade bioativa do peptídeo formado (SARMADI; ISMAIL, 2010).

Tradicionalmente, proteases microbianas, especialmente as proteases alcalinas, vem sendo utilizadas na preparação de hidrolisados com alto valor proteico. Estes hidrolisados possuem uma variedade de aplicações e podem ser usados em formulação de alimentos infantis, produtos alimentícios terapêuticos, sucos de frutas fortificados, como aditivos funcionais, alimentação animal, dentre outros (DOS SANTOS AGUILAR; SATO, 2017).

O estudo dos parâmetros de hidrólise como tempo, temperatura, pH, razão enzima substrato e a natureza da protease são importantes para liberar peptídeos com atividades biológicas e funcionalidades de interesse, isto porque a estrutura dos peptídeos, tamanho, estado eletrostático e conformação estão de acordo com a função destes peptídeos. No Quadro 1 é possível observar as condições de hidrólises estudadas, bem como as condições fixadas de alguns substratos proteicos submetidos à hidrólise enzimática.

Estudos têm descrito que hidrolisados proteicos obtidos por proteases microbianas exibem atividades antioxidante (DAROIT et al., 2012; HIDALGO et al., 2012; WIRIYAPHAN et al., 2015; GONÇALVES, 2016), anti-hipertensiva (CORRÊA et al., 2014) e antimicrobiana (HIDALGO et al., 2015), podendo afetar positivamente o sistema cardiovascular, imune, nervoso e digestivo, sendo dependentes da estrutura, composição e sequência dos peptídeos gerados pela hidrólise das proteínas.

Quadro 1 – Condições de hidrólise enzimática empregadas na literatura para substratos proteicos.

Substrato/Enzima	Condições estudadas	Observações	Referência
Caseína bovina/Protease P45	T: 40, 50, 55 °C E/S: 200, 400, 600 U/g [S]: 2,5, 3,5, 4,5%	Condição fixada (40 °C/3,5%/600 U/g) GH 7,3%	GONÇALVES, (2016)
Corte peito de frango/Alcalase®	T: 43, 50, 60, 70, 77 °C E/S: 0,8, 1,5, 2,5, 3,5, 4,2% pH: 7,2, 7,5, 8,0, 8,5, 8,8	Ensaio axial (60 °C/2,5%/pH 7,16) GH ~35%	KUROZAWA; PARK; HUBINGER, (2009)
Abomaso ovino/Papaína®	T: 35, 45, 55 °C t: 3, 4, 5 h [S]: 1,0, 1,5, 2,0%	Condição otimizada (46 °C/3,8 h/1,5%) GH 16,8%	LIU; AISA; YILI (2018)
Plasma bovino/Alcalase®	T: 46,6, 50,0, 55,0, 63,4 °C pH: 6,3, 7,0, 8,0, 9,0, 9,7 t: 98, 180, 300, 420, 502 min	Condições ótimas 54,1 °C/ pH (7,82- 8,32)/ t (338,4-398,4 min) GH 18,8-20,7%	SEO et al., (2015)
Células do sangue suíno/Protease neutra®	T: 45-55 °C pH: 5,5-9,0 [S]: 1%-16% E/S: 0,05-0,16 t: 2-16 h	Condição otimizada (45 °C/pH 6,5/ E/S 0,11/[S] 1%) GH 35,7%	ZHENG et al., (2013)

E/S: relação enzima/substrato; GH: grau de hidrólise; T: temperatura; t: tempo; [S] concentração de substrato.

O processo de hidrólise pode ser medido através da determinação do grau de hidrólise (GH), que é definido por Adler-Nissen (1986) como a medida da extensão da degradação hidrolítica das proteínas, ou seja, o número de ligações peptídicas hidrolisadas. O GH é dependente do número total de ligações peptídicas antes da reação (h_{total}), com base na

composição de aminoácidos. O grau de hidrólise pode ser estimado pelo método de *pH-stat* ou método de titulação de grupos α -amino liberados em pH e temperatura constante.

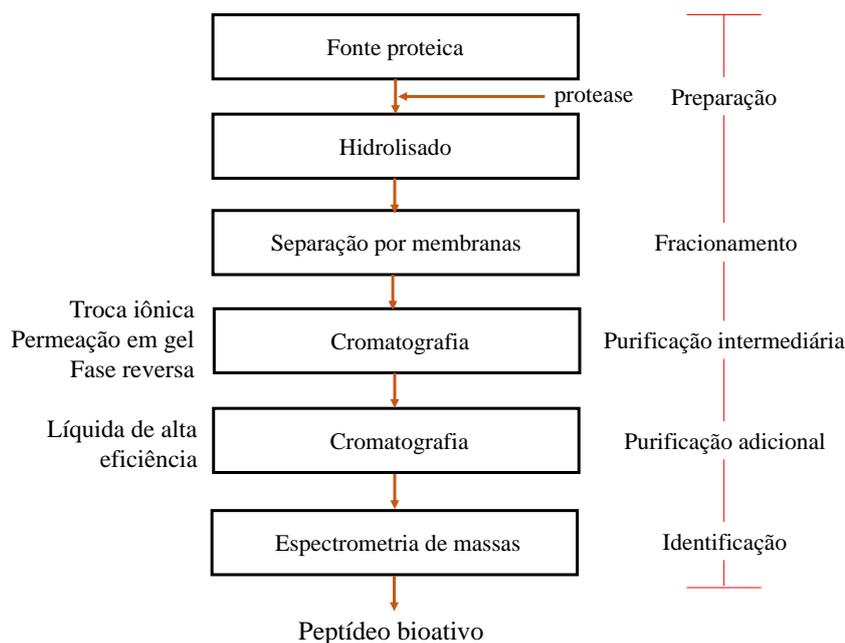
A estrutura complexa das matrizes alimentares e de subprodutos faz com que seja um desafio encontrar as condições ótimas de hidrólise enzimática devido as diferentes formas de interação entre enzima e substrato, dificultando o controle e o tipo de produto de reação. Pesquisas relevantes têm focado no desenvolvimento de processos industrialmente viáveis e eficientes bem como em métodos de pré-tratamento para melhorar as taxas de hidrólise e minimizar as quantidades de enzima. Em anos recentes, vários métodos vêm sendo propostos para melhorar a hidrólise e liberar potenciais peptídeos bioativos, sendo eles micro-ondas (ULUKO et al., 2015), ultrassom (CHENG et al., 2017; DALAGNOL et al., 2017), campo elétrico de alta voltagem (LIN et al., 2013) e pressão hidrostática (MARCINIAK et al., 2018).

3.7 PURIFICAÇÃO DOS HIDROLISADOS PROTEICOS

Os peptídeos estão sendo gerados para diversos propósitos, e eles podem conter impurezas resultantes de reações incompletas ou de várias reações colaterais. Os peptídeos destinados para pesquisas clínicas e terapêuticas, bem como para estudos biológicos e estruturais devem ter 95% de pureza ou mais. No entanto, para outras aplicações são tolerados menores valores de pureza, entre 70% e 95% (PEREZ ESPITIA et al., 2012).

A purificação de peptídeos depende de uma série de técnicas de purificação (Figura 2). O fracionamento dos hidrolisados utilizando cromatografia de troca iônica e exclusão molecular podem resultar em frações peptídicas com maior atividade antioxidante. No entanto, as técnicas cromatográficas são relativamente de alto custo e baixo rendimento, o que limita a sua aplicação pela indústria. A técnica de separação por membranas, especificamente a ultrafiltração, é um processo simples e economicamente viável que pode ser eficientemente empregada para concentrar os peptídeos (WIRIYAPHAN et al., 2015).

O processo de separação por membranas é versátil e de fácil aumento de escala piloto para industrial. Na ultrafiltração, a separação do soluto está baseada na transferência através de uma membrana microporosa sob um gradiente de pressão. A transferência do soluto depende principalmente do volume hidrodinâmico e do diâmetro dos poros da membrana. A resistência do soluto em passar pela membrana é representado pela taxa de retenção, calculada a partir da concentração do soluto permeado e retido (KAPEL et al., 2011).

Figura 2 – Processos para obtenção e purificação de peptídeos bioativos.

Fonte: Adaptado de Guo et al. (2014).

Esse processo é rotineiramente empregado na purificação, concentração e fracionamento de diversos produtos, com uma ampla gama de aplicações na indústria de alimentos, farmacêutica e biotecnológica. Frente a outros processos de separação, não altera quimicamente, biologicamente e termicamente os componentes envolvidos, podendo ser aplicada na concentração de moléculas biológicas sem que ocorra sua desnaturação e/ou degradação (CUI, 2005). Diversos trabalhos utilizaram a tecnologia de separação por membranas para fracionar os peptídeos com potencialidades bioativas (CENTENARO et al., 2014; LUI; AISA; YILI, 2018; GARCÍA et al., 2015; WIRIYAPHAN et al., 2015).

Centenaro et al. (2014) utilizaram as enzimas α -quimitripsina e Flavourzyme para hidrolisar as proteínas de frango e pescado (*Umbrina canosai*) e após avaliaram o potencial antioxidante das frações geradas, empregando as membranas com massa molar de corte de 1 e 0,5 kDa. Nos resultados, de modo geral, todas as frações apresentaram atividade antioxidante, porém a fração de hidrolisado de pescado obtido pela enzima Flavourzyme com massa molar superior a 1 kDa apresentou o maior potencial antioxidante.

García et al. (2015) extraíram peptídeos a partir de materiais residuais derivados do processamento de cereja (*Prunus cerasus L.*). Os hidrolisados obtidos pela digestão utilizando diferentes enzimas apresentaram capacidade antioxidante e anti-hipertensiva. Além disso, quando os autores empregaram a ultrafiltração na separação dos hidrolisados, com as

membranas de massa molar de corte de 5 e 3 kDa, as frações obtidas apresentaram maior poder bioativo.

Wei e Chiang (2009) obtiveram hidrolisados de sangue suíno com atividade antioxidante e anti-hipertensiva a partir de reator de membrana enzimático contínuo de 3 kDa, contendo a mistura de tripsina, quimotripsina e termolisina, atingindo o estado estacionário na obtenção de peptídeos bioativos durante 2 h de operação, com 80% de atividade anti-hipertensiva e 54% de sequestro do radical DPPH. Este tipo de processo é eficiente na bioconversão da catálise enzimática e rendimento do produto, bem como fácil aumento de escala.

3.8 PEPTÍDEOS BIOATIVOS

Peptídeos bioativos são definidos como fragmentos de sequência de aminoácidos em uma proteína que confere funções biológicas além de função nutricional (LÓPEZ-BARRIOS; GUTIÉRREZ-URIBE; SERNA-SALDÍVAR, 2014). Os efeitos benéficos à saúde são atribuídos as diferentes propriedades encontradas por cada peptídeo dentre elas a atividade antimicrobiana (HIDALGO et al., 2015; VERMA et al., 2018), antioxidante (BAH et al., 2016c; LIU; AISA; YILI, 2018) e anti-hipertensiva (AHN et al., 2012; LAFARGA et al., 2016a). Estes peptídeos contém usualmente 2-20 aminoácidos de comprimento, mas alguns podem consistir de mais de 20 resíduos de aminoácidos (BAH et al., 2016c). Muitos deles exibem propriedades estruturais em comum, como um número relativamente pequeno de aminoácidos, abundância de resíduos hidrofóbicos e a presença de resíduos de arginina, lisina e prolina (LI-CHAN, 2015).

Estes compostos são produzidos por quase todas as espécies com vida. No entanto eles são produzidos em quantidades limitadas na natureza. Como resultado, pesquisadores tem tentado obter peptídeos bioativos a partir de hidrolisados proteicos para estudar suas propriedades e aplicações em diversas áreas.

3.8.1 Peptídeos antioxidantes

Em organismos aeróbicos, espécies de oxigênio reativo (ROS) são produzidos durante os processos fisiológicos naturais, na produção de energia ou metabolismo (CORNELLI, 2009). Os efeitos prejudiciais de ROS são balanceados por ação antioxidativa enzimática e não enzimática. O excesso de ROS pode danificar o DNA, proteínas e lipídeos levando ao câncer ou inflamação de vários órgãos (CALABRESE et al., 2005). No entanto, a

ingestão de antioxidantes naturais que aumentam ou balanceiam as defesas antioxidativas no corpo vem sendo continuamente requerida.

Peptídeos com capacidade antioxidante são benéficos à saúde, pois ajudam a combater o estresse oxidativo. A atividade antioxidante é importante durante o armazenamento de produtos comerciais, sendo a oxidação lipídica o principal fator causador de deterioração de alimentos durante o armazenamento e processamento, produzindo mudanças indesejáveis como cor, sabor, textura e perfil nutricional, bem como reações com produtos tóxicos (MINE; LI-CHAN; JIANG, 2011). Antioxidantes sintéticos como o hidroxianisol butilado (BHA), hidroxitolueno butilado (BHT) e terc-butil hidroquinona (TBHQ) vem sendo comercialmente empregados em diversos produtos alimentícios com o intuito de prolongar a vida útil e qualidade. No entanto, há uma crescente preocupação com relação a utilização de produtos sintéticos em vista da toxicidade e carcinogenicidade (GHARAVI et al., 2007), sendo de interesse o desenvolvimento de novos compostos antioxidantes naturais.

Devido a ampla variedade de processos oxidativos e ação antioxidante de hidrolisados proteicos ou peptídeos, o uso de um simples método para avaliar a atividade antioxidante não pode provar um conclusivo potencial antioxidante. Assim, a atividade antioxidante deve ser determinada usando diferentes protocolos, dentre eles atividade de sequestro do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH) (BRAND-WILLIAMS; CUVELIER; BERSET, 1995), poder de redução do ferro (FRAP) (BENZIE; STRAIN, 1996), atividade de sequestro do radical cátion 3-etilbenzotiazolína-6-ácido sulfônico (ABTS) (RE et al., 1999) e capacidade de absorção do radical oxigênio (ORAC) (CAO; ALESSIO; CUTLER, 1993).

A atividade antioxidante dos peptídeos depende das suas propriedades físico-químicas, as quais são determinadas por sua massa molar, sequência, estrutura, carga e reatividade dos aminoácidos (NAJAFIAN; BABJI, 2012). Além do tipo de substrato proteico hidrolisado, as condições de hidrólise (temperatura, pH, enzima, enzima/substrato) e o valor do grau de hidrólise também influenciam na capacidade antioxidante dos hidrolisados (CHALAMAIAH; HEMALATHA; JYOTHIRMAYI, 2012).

Estudos têm demonstrado que hidrolisados proteicos exibem maior atividade antioxidante em frações com baixas massas molares (geralmente abaixo de 5 kDa) (CHANG et al., 2013; BAH et al., 2016a; LIU; AISA; YILI, 2018). A sequência peptídica também contribui para a atividade, sendo que resíduos de aminoácidos hidrofóbicos e/ou aromáticos são normalmente encontrados em peptídeos antioxidantes, em particular histidina, prolina, glicina, lisina, isoleucina, valina, triptofano e tirosina, como reportado no perfil de aminoácidos dos hidrolisados de isolado proteico do pescado *Umbrina canosai* utilizando alcalase (ROCHA,

2016) e hidrolisado de plasma de sangue bovino utilizando uma protease fúngica (BAH et al., 2016a). Resíduos carregados negativamente de ácido glutâmico e ácido aspártico também contribuem para a atividade antioxidante por capturar radicais livres. A posição relativa do resíduo também apresenta efeito importante (ZOU et al., 2016).

Sun, Shen e Luo (2011) reportaram que não há correlação entre a extensão de hidrólise e a atividade antioxidante pois, em 60 min de reação, o maior valor de grau de hidrólise de hemoglobina suína foi obtido na reação catalisada por alcalase (~17%) em comparação a pepsina (7,7%), e a atividade de sequestro do radical DPPH do hidrolisado com pepsina foi maior (67% comparado a 27%). Os autores concluíram que a atividade antioxidante dos hidrolisados é inerente a sequência de aminoácidos dos peptídeos e dependente da especificidade da protease empregada.

Lemes et al. (2016a) verificaram que durante o cultivo de *Bacillus* sp. P45 o uso dos substratos farinha de penas e biomassa residual, ou a mistura deles, promoveram a obtenção de biomoléculas com atividade antioxidante. Gonçalves (2016) estudou as propriedades antioxidantes do hidrolisado de plasma de sangue bovino na reação catalisada por protease P45 com GH igual a 4,6%, sendo que o poder antioxidante de redução do ferro foi aproximadamente 25% maior em relação ao controle (sem hidrólise); e de captura do radical ABTS aproximadamente 3 vezes superior em relação à amostra controle (sem hidrólise).

3.8.2 Peptídeos antimicrobianos

Peptídeos com propriedades antimicrobianas possuem massa molar abaixo de 10 kDa e caráter hidrofóbico, atuam contra uma ampla variedade de micro-organismos patogênicos, como bactérias, bolores, leveduras e vírus (TREFFERS et al., 2005). O mecanismo de atuação dos peptídeos antimicrobianos geralmente envolve mudanças na membrana biológica, ocorrendo inicialmente uma atração eletrostática entre as moléculas dos peptídeos (carregadas positivamente) e lipídios aniônicos encontrados na superfície da membrana, o que ocasiona a degradação das células microbianas pela formação de canais iônicos ou pela produção de poros e lesões que degradam a membrana citoplasmática (MAGET-DANA, 1999; NAGHMOUCHI; DRIDER; FLISS, 2007).

Os peptídeos antimicrobianos estão despertando interesse como uma alternativa ao uso de conservantes químicos de alimentos. Além disso, há um crescente interesse em pesquisas e desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos a partir de várias fontes para combater a resistência microbiana, dentre eles o desenvolvimento de antibióticos terapêuticos baseados em peptídeos antimicrobianos (SILA et al., 2014). Os peptídeos antimicrobianos podem ser

sintetizados naturalmente por organismos vivos como componentes de defesa (LI et al., 2012). Entretanto, mais recentemente, tem-se obtido peptídeos a partir de hidrolisados por ação enzimática (CORRÊA et al., 2011; MEMARPOOR-YAZDI; ASOODEH; CHAMANI, 2012; HIDALGO et al., 2015).

Diversos hidrolisados proteicos oriundos por exemplo, de clara de ovo (MEMARPOOR-YAZDI; ASOODEH; CHAMANI, 2012), caseinato de leite (CORRÊA et al., 2011; DAROIT et al., 2012; HIDALGO et al., 2015) e carne de pescado (JEMIL et al., 2014) têm apresentado atividade inibitória ao crescimento bacteriano e/ou fúngico. Dessa forma estes peptídeos podem ser isolados e utilizados no desenvolvimento de produtos que promovam o aumento do valor agregado em relação à fonte original, como biopreservativos, embalagens inteligentes, produtos nutracêuticos tópicos e fármacos (YU et al., 2010).

A obtenção de peptídeos antimicrobianos a partir do sangue de animais vem sendo foco de estudos. Os estudos têm mostrado a ocorrência de efeitos inibitórios ao crescimento de bactérias do tipo *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Salmonella enteritidis* (ADJE et al., 2011; CATIAU et al., 2011; HU et al., 2011), porém na literatura consultada não foi encontrado peptídeos antimicrobianos obtidos a partir de plasma sanguíneo, apenas de células vermelhas (hemácias) e células brancas (neutrófilos). Bah et al. (2016b) realizaram um estudo aprofundado de determinação das atividades antimicrobianas nas frações sanguíneas de ovinos, suínos e bovinos. Os resultados mostraram que apenas as frações de células brancas de sangue de ovelha desenvolveram zonas de inibição ao crescimento de *E. coli*, *S. aureus* e *P. aeruginosa*.

3.8.3 Peptídeos anti-hipertensivos

A hipertensão (HT) é uma condição médica crônica em que os vasos sanguíneos são submetidos a uma forte pressão à medida que o sangue flui dentro deles. Formalmente, são caracterizados por pressão sanguínea sistólica ≥ 140 mmHg e pressão sanguínea diastólica ≥ 90 mmHg. Em uma estimativa foi previsto que a HT afeta entre 20-40% da população adulta nas Américas, o que significa em torno de 250 milhões de pessoas sofrendo de alta pressão sanguínea (*World Health Organization*, 2018). Frequentemente denominada de “assassina silenciosa” por ser assintomática, esta condição médica vem sendo apontada como a causa de no mínimo 45% das mortes por doença cardiovascular (*World Health Organization*, 2018).

Uma vida saudável, com redução da ingestão de sódio, controle do peso corporal, atividades aeróbicas regulares, consumo limitado de álcool e dieta rica em frutas e vegetais, fortemente ajudam na prevenção de HT. No entanto, após a HT ser diagnosticada, a mudança do estilo de vida não é uma medida suficiente de controle, sendo necessário a ingestão de

fármacos com ação anti-hipertensiva (WILLIAMS et al., 2004). Vários efeitos adversos vem sendo associados ao uso dos fármacos convencionais, como o aumento dos níveis de potássio, função renal prejudicada, tosse, entre outros (FITZGERALD; MURRAY; WALSH, 2004). Por esta razão, há pesquisas por componentes naturais com potencial anti-hipertensivo, como os peptídeos, permitindo controlar a HT com menos ou nenhum efeito secundário indesejável, sendo passível de ser aplicado.

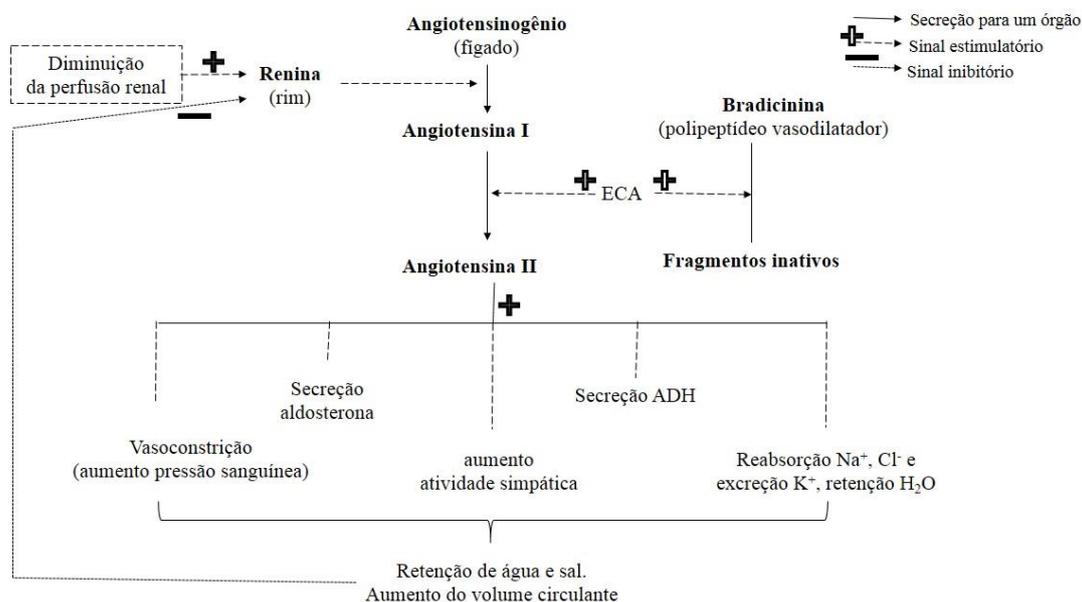
Peptídeos podem ter seu potencial anti-hipertensivo avaliado através de ensaios *in vitro* rápidos e relativamente de baixo custo. Os ensaios *in vitro* não necessariamente apresentam os mesmos efeitos dos ensaios *in vivo* (JIANG et al., 2010), em vista da complexidade das interações entre eles e as milhares de moléculas existentes nos sistemas biológicos reais. No entanto, provaram ser bastante precisos sem as dificuldades em relação à alto custo e tempo de execução dos ensaios *in vivo*.

Muitos peptídeos com ação anti-hipertensiva são caracterizados pela habilidade para inibir a enzima conversora de angiotensina (ECA; dipeptidil carboxipeptidase; EC 3.4.15.1). ECA é uma multifuncional zinco peptidase que atua no sistema renina-angiotensina e sua atividade é dependente de íons de cloro, encontrado em diferentes tecidos do corpo humano (coração, cérebro, rim e órgãos de reprodução) (MARC; LLORENS-CORTES, 2011). A enzima é responsável pelo aumento da pressão arterial por converter angiotensina I em angiotensina II, um octapeptídeo com atividade vasoconstritora, e por degradar a bradicinina (um nonapeptídeo com ação vasodilatadora) e as encefalinas. (PETRILLO JR; ONDETTI, 1982).

O princípio do sistema renina-angiotensina, em que a enzima conversora de angiotensina é o principal componente, está apresentado na Figura 3. Em síntese, a parte *N*-terminal do prohormônio angiotensinogênio, derivado do fígado, é liberado pela enzima renina, gerando o angiotensina I. Então, a enzima conversora ECA catalisa a clivagem do grupamento carboxílico da angiotensina I, resultando na angiotensina II que aumenta a pressão arterial (LEE; HUR, 2017).

Peptídeos com ação inibitória à ECA estão inativos dentro da proteína precursora, mas podem ser liberados por hidrólise enzimática. Um fator chave para obter peptídeos com altos níveis de inibição de ECA é selecionar uma enzima que apresente especificidade por resíduos hidrofóbicos e aromáticos do lado carboxílico da proteína. A proteólise de soro de queijo oriundo do leite de ovelha pela peptidase de *Bacillus* sp. P7 originou peptídeos com propriedades anti-hipertensivas (CORRÊA et al., 2014).

Figura 3 – Sistema renina-angiotensina, com seus efeitos secundários.



Fonte: Adaptado de Lee; Hur (2017).

Os hidrolisados a partir do preparado proteico de clara de ovo por protease da fruta *C. ficifolia* também mostraram ser uma boa fonte de peptídeos com atividade anti-hipertensiva (POKORA et al., 2014). Além disso, os peptídeos gerados da ação da papaína nas proteínas de sangue bovino com alto teor de globulinas foram ativos em inibir a enzima conversora de angiotensina. Após o processo de fracionamento com a membrana de 1 kDa, a atividade de inibição de ECA atingiu o valor de $83,1 \pm 0,2\%$ (LAFARGA et al., 2016b).

As metodologias *in vitro* mais comumente utilizadas para avaliar o potencial anti-hipertensivo dos peptídeos estão baseadas na atividade inibitória frente à enzima ECA (CUSHMAN; CHEUNG, 1971; SENTANDREU; TOLDRÁ, 2006). Também existe a determinação quantitativa do produto de reação por cromatografia líquida (WU; ALUKO; NAKAI, 2006). Outra determinação é a partir da espectrometria de fluorescência, através da formação de um produto fluorescente gerado da hidrólise catalisada por ECA, com excitação e emissão a 355 e 405 nm, respectivamente. A atividade inibitória dos peptídeos é quantificada baseado na diminuição da intensidade de fluorescência (SENTANDREU; TOLDRÁ, 2006).

Apesar da determinação por fluorescência ser rápida e sensível, o método de UV-VIS proposto a mais de quatro décadas atrás por Cushman e Cheung (1971) ainda é amplamente utilizado para avaliar a inibição *in vitro* da atividade de ECA. Pela técnica, uma unidade de catálise é definida como a quantidade de enzima que catalisa a formação de 1 μM de ácido

hipúrico a partir de hipuril-histidil-leucina (HHL) em 1 min a 37 °C (CUSHMAN; CHEUNG, 1971).

O uso de tecnologias estão sendo empregadas para predizer peptídeos bioativos, como a metodologia *in silico* que trata de um método de triagem em um banco de dados, em que a sequência de aminoácidos e sítios de clivagem do substrato são combinados com as informações de disponibilidade de clivagem e históricos de catálise de várias proteases. Além disso, é possível comparar a sequência peptídica gerada *in silico* com a sequência do peptídeo bioativo de interesse, exemplo com atividade inibitória de angiotensina, previamente descritos e cadastrados no banco de dados (LAFARGA et al., 2016a).

3.8.4 Peptídeos com potencial prebiótico

O trato gastrointestinal humano, particularmente o cólon, é colonizado por inúmeras espécies de micro-organismos e, dependendo do tipo de alimentação, a composição da biota intestinal pode ser modulada. Muitas espécies intestinais são patogênicas e podem estar envolvidas em distúrbios agudos e crônicos. Contudo, as bifidobactérias e os lactobacilos são considerados exemplos de componentes promotores da saúde da microflora. Os efeitos promotores de saúde incluem imunestimulação, melhora da digestão e absorção, síntese de vitaminas, inibição da ocorrência de patógenos e redução do colesterol (GIBSON; ROBERFROID, 1995).

Substratos prebióticos são seletivamente utilizados pelas bactérias benéficas da microbiota intestinal, evitando a proliferação das bactérias patogênicas indesejáveis. Em vista disso, a indústria de alimentos vem dando bastante atenção à utilização de prebióticos. Por definição, prebióticos são “ingredientes alimentícios não-digeríveis que afetam benéficamente o hospedeiro por estimular o crescimento e/ou a atividade de uma ou limitado número de bactérias do cólon e então, melhorar a saúde do hospedeiro” (GIBSON; ROBERFROID, 1995).

Oligossacarídeos e fibras dietéticas são substâncias prebióticas com representativa utilização em alimentos processados (SLAVIN, 2013; SINGH; BANERJEE; ARORA, 2015). Além dos oligossacarídeos e fibras dietéticas, vem sendo sugerida a aplicação de peptídeos prebióticos. Hidrolisados proteicos do leite exibiram estímulos ao crescimento de bactérias ácido lácticas e bifidobactérias (LIEPKE et al., 2002; MIKKELSEN et al., 2006; ODA et al., 2013), sendo que os principais fatores de crescimento foram identificados como as quantidades de açúcares e a presença de peptídeos glicosilados. Entretanto, peptídeos não glicosilados, oriundos do leite humano, estimularam seletivamente o desenvolvimento de bifidobactérias (LIEPKE et al., 2002). Arihara, Ishikawa e Itoh (2006) identificaram e patentearam um

tripeptídeo (Glu-Leu-Met) prebiótico purificado do hidrolisado de actomiosina muscular suína digerida por papaína.

CAPÍTULO III

ARTIGO 1
ESTABILIDADE TÉRMICA, PROPRIEDADES CATALÍTICAS E APLICAÇÃO DE PROTEASE
A PARTIR DE *Bacillus* sp. P45 ATIVA EM SOLVENTES ORGÂNICOS E LÍQUIDO IÔNICO

RESUMO

Os parâmetros meia vida, valor z , energia de ativação à desnaturação, entalpia, entropia e energia livre de Gibbs na faixa de temperatura de 40 a 55 °C foram avaliados para a protease de *Bacillus* sp. P45 presente em meio composto por líquido iônico (LI) e solvente orgânico. A protease previamente tratada no LI [Emim][Tf₂N] apresentou incremento na atividade enzimática em quatro dos cinco solventes orgânicos testados. O meio reacional contendo acetona e o LI (1:1 v/v) proporcionou maior estabilidade da enzima que o meio contendo tampão Tris-HCl (pH 7,5), com meia vida de 2,4 h a 55 °C. Os valores dos parâmetros termodinâmicos mostraram que provavelmente houve menor rompimento das ligações não covalentes que estabilizam a estrutura da proteína. De acordo com este estudo foi possível concluir que a protease P45 em meio composto por [Emim][Tf₂N] e acetona (1:1 v/v) pode ser empregada em temperaturas superiores as da enzima em meio tampão ou em meio contendo solvente orgânico. A aplicação da protease tratada em meio binário não foi eficaz na hidrólise de caseína bovina, pois apresentou um GH 35% menor que a enzima solubilizada em tampão, no tempo de 5,5 h.

Palavras-chave: Cultivo submerso. Protease bacteriana. Acetona. Líquido iônico. Energia Livre.

1 INTRODUÇÃO

A produção e aplicação de enzimas vem crescendo a cada ano, não somente em pesquisas bioquímicas, mas também nas indústrias química (GAVRILESCU; CHISTI, 2005; GULMEZ et al., 2018), de alimentos (AHN; KIM; JE, 2014; HIDALGO et al., 2015) e farmacêutica (VELLARD, 2003; GOTOR-FERNÁNDEZ; BRIEVA; GOTOR, 2006; HUISMAN; COLLIER, 2013; HOYOS et al., 2014). Em condições apropriadas de aplicação, apresentam especificidade por substratos, acelerando as taxas das reações e, assim, participam ativamente na manufatura industrial de produtos com valor agregado (SINGH et al., 2016). Entre todas as enzimas, as hidrolases representam 75% do total das vendas no mercado mundial, sendo as proteases predominantemente exploradas na indústria devido ao seu amplo campo de aplicação (GUPTA et al., 2013; SINGH et al., 2016). A protease P45, produzida por *Bacillus* sp. P45, se destaca por catalisar a hidrólise de uma variedade de substratos, dentre eles de estrutura rígida contendo queratina (DAROIT et al., 2010; SALA et al., 2014). Neste contexto, a caracterização das proteases é de fundamental importância para o entendimento do comportamento catalítico e para prever a aplicação da enzima em determinada indústria e/ou processo (BERNAL; CAIRO; COELLO, 2006; GULMEZ et al., 2018).

O efeito dos solventes orgânicos na atividade e estabilidade difere conforme a origem da protease e características do solvente (RAHMAN et al., 2006). Várias proteases têm apresentado melhoramento de atividade e/ou estabilidade em meios aquosos com solventes orgânicos hidrofóbicos (RAHMAN et al., 2006; REDDY; WEE; RYU, 2008), sugerindo a habilidade dessas enzimas em formar múltiplas ligações de hidrogênio com a água por possuir a flexibilidade estrutural para uma ótima catálise (RAHMAN et al., 2006).

Curiosamente, em outros estudos as proteases se apresentaram mais estáveis na mistura aquosa contendo solvente orgânico hidrofílico, que possui a habilidade de quebrar as ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas que preservam a água essencial da proteína (JELLOULI et al., 2011; JAIN et al., 2012; ANBU, 2013). Por outro lado, em meio contendo solventes hidrofóbicos, a mistura reacional solvente-água é heterogênea, gerando um obstáculo onde as enzimas ficam suspensas, não se dissolvendo completamente (KLIBANOV, 1989; GORKE; SRIENC; KAZLAUSKAS, 2010).

O uso dos líquidos iônicos (LI) como meio de reação tem sido promissor para enzimas como lipase (AKBARI et al., 2011; MUÑOZ; CORREA-LLANTÉN; BLAMEY, 2015), celulase (BOSE; BARNES; PETRICH, 2012), acilase (HERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ et al., 2009) e α -quimotripsina (ATTRI; VENKATESU; KUMAR, 2011). A atividade

enzimática em líquidos iônicos depende da quantidade de água disponível para manter as ligações de hidrogênio que garantem a correta estrutura tridimensional proteica. Particularmente, o líquido iônico [Emim][Tf₂N] possui caráter polar mas apresenta repulsão pela água, propriedades excepcionais frente a outros solventes, pela sua capacidade de preservar a estrutura mantendo a função catalítica de enzimas (FISCHER; MUTSCHLER; ZUFFEREY, 2011). No entanto este líquido iônico é viscoso e pode causar uma redução da atividade enzimática como ocorreu com a endo-1,4-β-D-glucanase em tris-(2-hidroxietil)-metilamônio (BOSE; BARNES; PETRICH, 2012). Para reverter esta desvantagem, a presença de um solvente orgânico miscível neste líquido iônico é necessária.

As reações em meios orgânicos são requeridas quando a condensação (reverso da hidrólise) é termodinamicamente menos favorável em água (GORKE; SRIENC; KAZLAUSKAS, 2010). Além disso, apresentam como vantagens a alta solubilidade de substratos hidrofóbicos, redução da contaminação microbiana, redução da atividade de água que altera o equilíbrio hidrolítico, melhoramento da termoestabilidade e reutilização da enzima sem necessitar ser imobilizada (ZAKS; KLIBANOV, 1985; KLIBANOV, 1989). Proteases têm sido usadas em meio orgânicos para sintetizar peptídeos (XU et al., 2010; VOSENBERG et al., 2012), produzir α-aspartame (ERBELDINGER; MESIANO; RUSSELL, 2000; OGINO et al., 2010) e na transesterificação de aminoácidos (LASZLO; COMPTON, 2001; VISWANATHAN et al., 2010).

A maioria dos LI são fluidos viscosos, limitando a transferência de massa quando a reação é rápida. Estudos tem atribuído a baixa atividade enzimática como sendo dependente da viscosidade do LI empregado (LOZANO et al., 2001; BOSE; BARNES; PETRICH, 2012). Com o intuito de obter um meio reacional homogêneo e pouco viscoso favorável para catálise enzimática, este estudo visou investigar se as propriedades catalíticas e estabilidade da protease P45 podem ser mantidas ou até melhoradas em meio contendo o líquido iônico [Emim][Tf₂N] e solventes orgânicos. Após, a protease ativa foi aplicada como biocatalisador na reação hidrolítica da caseína de leite bovino para verificar o valor do grau de hidrólise do substrato.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 MATERIAL E REAGENTES

O líquido iônico 1-etil-3-metilimidazólio bis(trifluorometilsulfonyl)imida (pureza >98%) e a azocaseína foram adquiridos da Sigma-Aldrich Brasil. A caseína de leite bovino e

os solventes éter etílico (pureza 99%), acetona (pureza 99,5%), acetato de etila (pureza 99,9%), hexano (pureza 98,5%) e *n*-butanol (pureza 99,4%) foram adquiridos em representações locais.

2.2 CULTIVO BACTERIANO E PURIFICAÇÃO ENZIMÁTICA

A enzima foi produzida por cultivo submerso de *Bacillus* sp. P45, como descrito por Daroit, Corrêa e Brandelli (2011). O meio mineral otimizado composto pelos sais (g/L): NaCl (0,5), K₂HPO₄ (0,3), KH₂PO₄ (0,4), NH₄Cl (1,9) e farinha de penas (43). As condições foram pH 7,0, 1% v/v de inóculo com suspensão bacteriana (DO₆₀₀ = 0,5) utilizando uma incubadora rotatória a 125 rpm, 30 °C por 48 h. Após o cultivo, o extrato foi centrifugado (5000 × g, 20 min) e a enzima contida no sobrenadante foi purificada utilizando um sistema aquoso bifásico integrado ao processo de diafiltração/ultrafiltração como descrito por Sala et al. (2014). O extrato foi liofilizado e armazenado a 5 °C.

2.3 ATIVIDADE PROTEOLÍTICA

A atividade proteolítica foi avaliada com o substrato azocaseína a 40 °C, seguindo o protocolo padrão (DAROIT; CORRÊA; BRANDELLI, 2009) com pH modificado para 7,5. A mistura reacional composta por 100 µL de tampão Tris-HCl (100 mmol/L, pH 7,5), 300 µL de azocaseína (10 mg/mL, pH 7,5) e 100 µL de enzima foi mantida em banho com agitação a 40 °C por 30 min e finalizada pela adição de 600 µL de ácido tricloroacético 10% (m/v). A mistura foi centrifugada (5000 × g, 20 min) e 800 µL do sobrenadante foi adicionado a 200 µL de NaOH 1,8 mol/L. A transmitância foi medida a 420 nm. Uma unidade de atividade proteolítica (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para provocar o aumento de 0,1 unidade de absorvância a 420 nm sob as condições do ensaio.

2.4 MEDIDA DE VISCOSIDADE

A viscosidade no meio correspondente a 20% (v/v) de [Emim][Tf₂N] em água destilada e 20% (v/v) da mistura (razão 1:1) contendo acetona e o líquido iônico em água destilada foram medidas em um viscosímetro (Brookfield DV-III Ultra, Middleboro, MA, EUA). Estas concentrações estão relacionadas ao volume total de reagentes utilizados na

determinação da atividade proteolítica. A temperatura desta medição foi de 40 °C, a mesma da reação enzimática.

2.5 CARACTERIZAÇÃO DA PROTEASE P45

2.5.1 Atividade enzimática em solventes orgânicos e líquido iônico

A protease P45 (7 mg) foi tratada em 1 mL do líquido iônico [Emim][Tf₂N] (agitação magnética por 30 min a 4 °C) e misturada com os solventes orgânicos 1:1 (v/v) para investigar o efeito na atividade enzimática. Os solventes orgânicos utilizados foram éter etílico, acetona, hexano, acetato de etila e *n*-butanol. O tempo de contato da mistura foi de 10 min a 25 °C (DAROIT et al., 2010). Nos meios contendo os solventes hexano, acetato de etila e *n*-butanol foram adicionados Tween 80 (3% v/v) como agente emulsificante, segundo Reddy, Wee e Ryu (2008), com modificação na concentração do surfactante. A protease tratada no líquido iônico [Emim][Tf₂N] foi utilizada no ensaio controle.

2.5.2 Estabilidade térmica em líquido iônico e acetona

A estabilidade térmica da protease, em tampão, acetona e na mistura de acetona com o líquido iônico [Emim][Tf₂N] foi estudada em termos de meia vida ($t_{1/2}$). Para o estudo, a protease parcialmente purificada foi homogeneizada em tampão Tris-HCl 100 mmol/L (pH 7,5) e Tris-HCl (pH 7,5) com acetona (1:1 v/v). O mesmo procedimento foi usado para determinar o efeito da mistura contendo o líquido iônico e acetona, substituindo o tampão Tris-HCl pelo líquido iônico. Antes da mistura, 7 mg da protease foi colocada em 1 mL do líquido iônico e deixada sob agitação magnética por 30 min a 4 °C. As temperaturas estudadas foram 40, 45, 50 e 55 °C.

2.5.3 Determinação dos parâmetros termodinâmicos

Os parâmetros termodinâmicos de desnaturação térmica da protease foram estimados através da equação de Arrhenius e do rearranjo da equação absoluta de Eyring, como descrito nas Equações 1 e 2, respectivamente:

$$\ln k_d = \ln A - \frac{E_d}{RT} \quad (1)$$

$$k_d = \left(\frac{k_B T}{h} \right) e^{\left(\frac{-\Delta H^*}{RT} \right)} e^{\left(\frac{\Delta S^*}{R} \right)} \quad (2)$$

sendo R a constante universal dos gases (8,315 J/mol K), k_d a constante de desnaturação, A a constante de Arrhenius, T a temperatura absoluta em Kelvin, h a constante de Planck ($6,63 \times 10^{-34}$ J s), k_B a constante de Boltzman ($1,38 \times 10^{-23}$ J/K), ΔH a variação da entalpia (kJ/mol) e ΔS a variação da entropia (em J/mol K).

Para calcular ΔH^* e ΔS^* , a equação absoluta de Eyring foi rearranjada de acordo com a Equação 3.

$$\ln \left(\frac{k_d}{T} \right) = - \left(\frac{\Delta H^*}{R} \right) \left(\frac{1}{T} \right) + \left(\ln \left(\frac{k_B}{h} \right) + \frac{\Delta S^*}{R} \right) \quad (3)$$

A variação da energia livre (ΔG^*) para a desativação da protease foi calculada usando a Equação 4.

$$\Delta G^* = \Delta H^* - T \Delta S^* \quad (4)$$

Os valores dos parâmetros D e z também foram calculados para expressar a desnaturação enzimática. O valor D , em minutos, é definido como o tempo em que a atividade enzimática é reduzida a 10%, em uma determinada temperatura. O valor z é definido como a temperatura requerida para reduzir o valor D em um ciclo logarítmico. A determinação dos parâmetros D e z foram obtidos conforme as Equações 5 e 6, respectivamente.

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

$$\log \frac{D_2}{D_1} = \frac{T_1 - T_2}{z} \quad (6)$$

2.6 APLICAÇÃO DA PROTEASE TRATADA EM LÍQUIDO IÔNICO E ACETONA NA HIDRÓLISE DE CASEÍNA DE LEITE BOVINO

O potencial biocatalítico da protease P45 foi estudado no meio aquoso em duas condições: solubilizada em tampão Tris-HCl 100 mmol/L pH 7,5 (condição 1) e tratada no líquido iônico [Emim][Tf₂N] e adicionado de acetona 1:1 v/v (condição 2).

As hidrólises foram conduzidas em duplicata em reatores encamisados de 100 mL com volume útil de 75 mL. Como substrato, 3,5% (m/v) de proteínas da caseína de leite bovino foram solubilizados em água destilada. Os parâmetros de reação foram pH 7,5, 40 °C, relação

enzima/substrato de 600 U/g de proteína (GONÇALVES, 2016), tempo de reação de 6 h (condição 1) e 5,5 h (condição 2).

A reação foi iniciada após a adição de 2 mL do extrato enzimático e o grau de hidrólise (GH), foi estimado utilizando o método de pH-*stat* (ADLER-NISSEN, 1986), a partir da Equação 7. Durante o processo foram realizadas titulações em tempos pré-determinados com hidróxido de sódio 0,2 mol/L com o propósito de manter o pH constante. Os dados de pH obtidos foram registrados na interface computacional Arduíno Uno®.

$$\text{GH (\%)} = \frac{V_B N_B}{\alpha h_{\text{tot}} m_p} 100 \quad (7)$$

onde: V_B é o volume consumido de base durante a hidrólise (mL); N_B é a normalidade da base consumida durante a hidrólise; α é o grau de grupamentos amino liberados pela hidrólise; h_{tot} é o número total de ligações peptídicas por unidade de massa (eqv/kg) e m_p é a massa de proteína do substrato proteico (g). O valor de h_{tot} considerado para a caseína foi de 8,2 eqv/(kg de proteínas) (DUARTE; CARVALHO SIMÕES; SGARBIERI, 1999).

2.7 TRATAMENTO DOS DADOS

Os ensaios de atividade, estabilidade e hidrólise foram realizados em duplicata. Os dados foram avaliados estatisticamente por análise de variância (ANOVA) seguido por diferença de médias (Teste de Tukey, $p < 0,05$). Os testes de normalidade e homocedasticidade dos resíduos foram realizados previamente à ANOVA.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os estudos de purificação e caracterização da protease deveriam ser um dos principais estágios para entender o mecanismo de ação e a base para os futuros processos de aplicação destas enzimas (PRAKASH; JAYALAKSHMI; SREERAMULU, 2010). No entanto, para uma aplicação industrial, são requeridos protocolos de purificação mais eficientes e de menor valor. Neste quesito, a integração da ultrafiltração/diafiltração no sistema aquoso bifásico se ajustou favoravelmente aos protocolos da protease P45 (SALA et al., 2014). A atividade específica do extrato bruto foi de 1535 U/mg e após o processo de purificação a atividade específica foi aumentada para 3900 U/mg, com fator de purificação de 2,5 vezes.

3.1 INFLUÊNCIA DOS SOLVENTES ORGÂNICOS E LÍQUIDO IÔNICO NA ATIVIDADE ENZIMÁTICA

Ensaio preliminares mostraram que a protease P45 é estável no líquido iônico [Emim][Tf₂N] com meia vida de 6,4 h em 70 °C e maior que 32 d em 55 °C (dados não mostrados), porém este meio é altamente viscoso e reduz a atividade enzimática, mesmo em baixas concentrações. O interesse em investigar a atividade e estabilidade de proteases em meio contendo solvente orgânico é muito útil para futuras aplicações, como a síntese de peptídeos empregando solventes orgânicos hidrofílicos (ANBU, 2013).

O líquido iônico [Emim][Tf₂N] possui uma viscosidade de 28,1 mPa·s (40 °C) (YAO et al., 2012), que é maior que a viscosidade do tampão puro. No presente estudo, a medida da viscosidade foi de 6,1 mPa·s e 4,2 mPa·s no meio da atividade enzimática com [Emim][Tf₂N] e contendo a mistura binária de [Emim][Tf₂N]:acetona 1:1 (v/v), respectivamente, na mesma temperatura. Bose, Barnes e Petrich (2012) verificaram que a atividade da endo-1,4-*B-D*-glucanase em 45 °C é inversamente proporcional ao volume de líquido iônico adicionado ao meio, o que pode estar atribuído ao aumento da viscosidade da mistura binária líquido iônico-tampão. Assim, a viscosidade pode ser considerada um parâmetro chave que determina o comportamento enzimático em variados meios de reação.

Tabela 1 – Efeito de solventes orgânicos e líquido iônico [Emim][Tf₂N] 1:1 (v/v) na atividade enzimática da protease P45.

Sistema	Atividade Relativa (%) ¹	Log P ²
Controle ³	100,0 ± 2,6 ^b	-
Éter etílico:IL	135,4 ± 6,7 ^a	0,85
Acetona:IL	123,9 ± 3,8 ^{ab}	- 0,23
Acetato de etila:IL	127,6 ± 6,6 ^{ab}	0,68
Hexano:IL	122,1 ± 13,0 ^{ab}	3,50
<i>n</i> -butanol:IL	69,6 ± 4,2 ^c	0,80

¹ Os valores representam a média ± erro padrão de dois experimentos independentes. Diferentes letras sobrescritas indicam que há diferença significativa ($p < 0,05$) entre os solventes testados.

² Laane et al. (1987) Log P é definido como o logaritmo do coeficiente de partição P, entre os solventes octanol e água a 25 °C.

³ Protease tratada em [Emim][Tf₂N].

Com base no exposto acima, o presente estudo testou a atividade da protease P45 em misturas contendo líquido iônico e solventes orgânicos. A enzima apresentou maior atividade na presença dos solventes orgânicos do que somente em LI (controle), com exceção do *n*-butanol (Tabela 1). A presença de *n*-butanol levou a uma perda de 30,4% da atividade em comparação ao ensaio controle, enquanto que nos outros solventes estudados o aumento na atividade foi em torno de 28%.

Sen et al. (2011) verificaram um efeito negativo na atividade enzimática da protease de *Bacillus pseudofirmus* SVB1 após ser misturada em isooctano, decano, dodecano e acetona (1:3 v/v, solvente:extrato enzimático). Por outro lado, os solventes acetona, etanol, acetato de etila e isopropanol mostraram efeito positivo na protease de *Bacillus koreensis* BK-P21A (ANBU, 2013). Estas particularidades entre as enzimas são relacionadas a natureza de cada protease e as características inerentes de cada solvente.

Bose, Barnes e Petrich (2012) verificaram que o efeito na atividade da endo-1,4- β -*D*-glucanase é inversamente proporcional a viscosidade do meio até a temperatura de 55 °C. Então a adição do solvente orgânico ao líquido iônico pode ter provocado uma diminuição na viscosidade do meio e provavelmente um melhor acesso do substrato ao sítio ativo da enzima.

Adicionalmente, as diferenças nos valores de atividade enzimática, causada pela adição dos solventes orgânicos, podem ser dependentes das propriedades físico-químicas de cada solvente. Essas propriedades são indicadores de hidrofobicidade, sendo elas a constante dielétrica, momento dipolo e log P (REICHARDT, 2003). De acordo com Jain et al. (2012) e Rahman et al. (2007), os valores do log P dos solventes orgânicos são diretamente proporcionais a atividade enzimática: quanto menor é o valor de log P maior é o distúrbio da camada de água essencial ao redor da enzima, afetando negativamente a atividade. No entanto, o comportamento apresentado pela protease P45 não segue esta teoria, sugerindo que a atividade enzimática não é somente influenciada pelo solvente orgânico, mas também pela natureza da enzima e a presença do líquido iônico.

O *n*-butanol foi o único solvente testado que apresentou efeito estatisticamente diferente ($p < 0,05$). Gorman e Dordick (1992) verificaram que há exceções na correlação entre a atividade enzimática e as propriedades físico-químicas dos solventes orgânicos quando estes pertencem à função alcoólica. Isto foi evidenciado pela maior fração de água ^3H desorvida no solvente com maior log P, devido a tendência da água ligada à enzima dissolver nestes solventes, provavelmente ocorrendo ligações de hidrogênio com a fração hidroxila do álcool.

Nas reações contendo acetato de etila e hexano ocorreu a formação de um meio de reação bifásico, que poderia promover a migração da enzima para uma das fases e a heterogeneidade do meio para a hidrólise enzimática. Os testes subsequentes foram conduzidos usando o solvente acetona, pois promoveu a melhor homogeneidade com o líquido iônico e este solvente apresenta ponto de ebulição maior do que o éter etílico, facilitando a ocorrência de reações em altas temperaturas.

3.2 ESTABILIDADE TÉRMICA E PARÂMETROS TERMODINÂMICOS DA PROTEASE NA PRESENÇA DE LÍQUIDO IÔNICO E SOLVENTE ORGÂNICO

Para investigar a atividade enzimática da protease na mistura de acetona e líquido iônico [Emim][Tf₂N] 1:1 (v/v) ao longo do tempo, os ensaios de estabilidade cinética e termodinâmica foram conduzidos na presença do solvente orgânico e na presença da mistura contendo líquido iônico e o solvente orgânico. A estabilidade termodinâmica é definida como a resistência à perder a conformação nativa e não se alterar para a conformação desdobrada, enquanto que a estabilidade cinética é definida como a resistência à desnaturação irreversível (YAMAMOTO; YAMAGUCHI; NAGAMUNE, 2011). A relação proposta entre a desnaturação reversível e irreversível de muitas proteínas pode ser descrita pelo mecanismo:



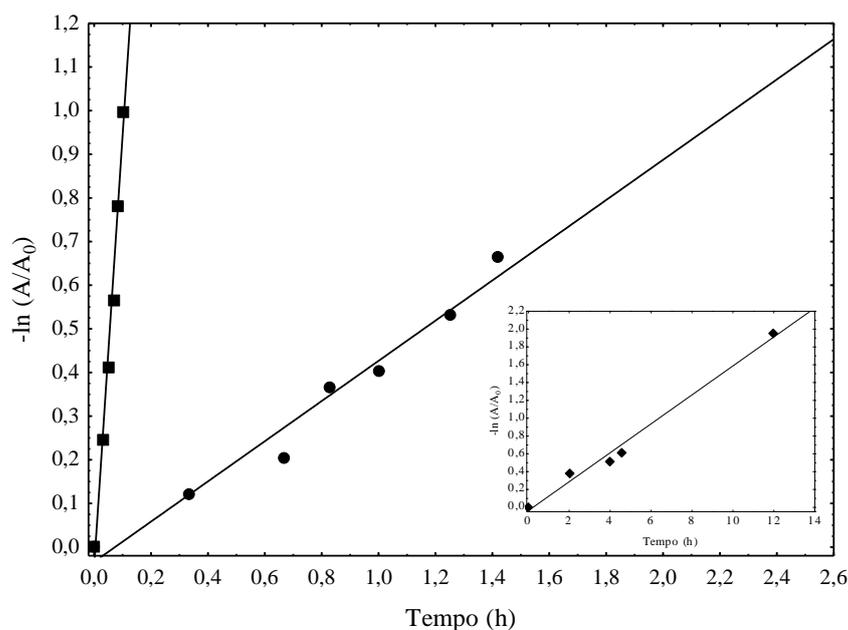
Onde *N* representa o estado nativo, *U* é o estado desdobrado, e *I* é o estado desnaturado irreversível (WETZEL et al., 1988).

A constante de desnaturação da protease P45 foi determinada através da inclinação da curva de regressão como o exemplo apresentado na Figura 1 a 40 °C. A partir dos resultados da Tabela 2 foi possível observar que os valores de *k_d* para a protease P45 são inversamente proporcionais à meia vida, indicando que essa enzima é termosensível em altas temperaturas. Os maiores valores de *k_d* foram observados na protease diluída em solvente orgânico (ensaio 2), sugerindo ser o meio mais desnaturante para esta enzima.

Quando a enzima foi tratada em líquido iônico e diluída em acetona (ensaio 3), o comportamento se modificou favoravelmente em relação ao ensaio conduzido em meio aquoso com acetona (ensaio 2). Como sugerido por Kumar e Venkatesu (2012) os líquidos iônicos interagem favoravelmente com o núcleo hidrofóbico das proteases, que é exposto pelo aumento da temperatura, prevenindo a agregação proteica e outros mecanismos de desnaturação térmica.

No presente estudo, a protease apresentou melhor estabilidade no meio contendo o líquido iônico, com meia vida de 2,4 h a 55 °C, superior ao valor de $1,3 \times 10^{-2}$ h observado no meio aquoso com acetona. Os parâmetros cinéticos da protease P45 solubilizada em tampão Tris-HCl pH 7,5 (ensaio 1) foram determinados, com meia vida de 0,1 h nesta mesma temperatura.

Figura 1 – Linearização da cinética de desnaturação da protease P45 a 40 °C. (●) Tampão Tris-HCl pH 7,5, $r^2=0,973$ (■) Tampão Tris-HCl pH 7,5:acetona 1:1 v/v, $r^2=0,978$ (◆) [Emim][Tf₂N]:acetona 1:1 v/v, $r^2=0,987$ (curva inserida). Os resultados são a média de três análises independentes. Onde A é a atividade enzimática após a incubação e A₀ é a atividade enzimática antes da incubação (t=0).



Para fins industriais é comum expressar a desnaturação de enzimas através dos parâmetros D e z . O valor de D diminuiu com o aumento da temperatura (Tabela 2) e teve seu maior valor para a protease em meio contendo o líquido iônico, igual a 952,3 min (40 °C). Isto significa que um maior tempo foi requerido para a enzima reduzir 90% da sua atividade inicial (um ciclo logarítmico), comparado ao ensaio 1 (324,3 min) e ao meio contendo o tampão e acetona (15,0 min) na mesma temperatura. Por definição, o valor de z é o número de graus de temperatura (°C) requerido para o valor D atravessar um ciclo logarítmico. Assim, através dos parâmetros D e z foi possível prever que a enzima no [Emim][Tf₂N] e acetona mostrou ser

menos sensível à desnaturação com o aumento da temperatura. Isto permite utilizar temperaturas de operação maiores, reduzindo a viscosidade do meio reacional e, assim, aumenta a solubilidade sem maiores prejuízos na estabilidade da protease P45.

Tabela 2 – Parâmetros cinéticos para inativação de primeira ordem para a protease P45.

Ensaio	Meio	T (°C)	<i>D</i> (min)	<i>z</i> (°C)	<i>k_d</i> (1/s)	<i>t</i> _{1/2} (h)
1	Tampão Tris-HCl 7,5	40	324,3	10,5	$1,2 \times 10^{-4}$	1,6
		45	88,6		$4,3 \times 10^{-4}$	0,4
		50	18,7		$2,1 \times 10^{-3}$	0,1
		55	12,0		$3,0 \times 10^{-3}$	0,1
2	Tampão Tris-HCl 7,5:acetona 1:1 (v/v)	40	15,0	20,0	$2,6 \times 10^{-3}$	0,1
		45	10,5		$3,6 \times 10^{-3}$	$5,3 \times 10^{-2}$
		50	9,8		$3,9 \times 10^{-3}$	$4,9 \times 10^{-2}$
		55	2,7		$1,4 \times 10^{-2}$	$1,3 \times 10^{-2}$
3	[Emim][Tf ₂ N]:acetona 1:1 (v/v)	40	952,3	52,0	$4,0 \times 10^{-5}$	4,8
		45	885,6		$4,3 \times 10^{-5}$	4,3
		50	837,3		$4,5 \times 10^{-5}$	4,2
		55	489,9		$7,8 \times 10^{-5}$	2,4

Além dos parâmetros cinéticos, é necessário conhecer a relação estrutura-estabilidade das enzimas em uma dada condição para determinar o potencial industrial de uma biomolécula. Assim, o cálculo dos parâmetros termodinâmicos ajuda a entender o provável mecanismo de desnaturação que é importante em processos enzimáticos. As variações de entalpia (H^*) e entropia (S^*) para a inativação térmica da protease P45 foram calculados usando a teoria de transição de estado (Equação 3) e estão apresentados na Tabela 3.

A variação da energia livre de Gibbs é considerada como a barreira energética para desnaturação da enzima, sendo dependente dos valores de entalpia e entropia. A entalpia é a quantidade de calor liberado ou absorvido quando a reação química ocorre em pressão constante (ARIAHU; OGUNSUA, 2000). Valores positivos de ΔH^* indicam que o processo de inativação possui caráter endotérmico (VIANA et al., 2010), sua determinação fornece a quantidade de ligações não covalentes quebradas durante a inativação e a entropia representa a mudança na desordem estrutural sobre o dobramento da molécula de proteína (ORTEGA et al., 2004). Os menores valores de entalpia observados nos ensaios 2 e 3 indicam que provavelmente houve

pequeno número de ligações quebradas durante a formação do estado de transição na desnaturação enzimática (BHATTI et al., 2006).

Tabela 3 – Parâmetros termodinâmicos para desnaturação da protease P45.

Ensaio	Meio	T (°C)	E_d (kJ/mol)	ΔG^* (kJ/mol)	ΔH^* (kJ/mol)	ΔS^* (J/mol.K)
1	Tampão Tris-HCl 7,5	40	195,9	100,0	193,2	297,8
		45		98,5		
		50		97,0		
		55		95,5		
2	Tampão Tris-HCl 7,5:acetona 1:1 (v/v)	40	88,9	92,7	86,2	-20,7
		45		92,8		
		50		92,9		
		55		93,0		
3	[Emim][Tf ₂ N]:acetona 1:1 (v/v)	40	34,7	103,4	32,1	-227,6
		45		104,5		
		50		105,6		
		55		106,8		

Como apresentado na Tabela 3, houve uma diferença nos valores de ΔS^* , pois enquanto o ensaio 1 apresentou o maior valor (297,8 J/mol.K), os valores foram menores e negativos nas outras condições estudadas. Esse alto valor é sugerido por Ustok, Tari e Harsa (2010) como uma provável modificação da estrutura nativa pelo desdobramento das cadeias polipeptídicas em uma estrutura pouco ordenada e aleatória. Os valores negativos na variação da entropia observados pela protease P45 quando presente nas condições que contém o solvente orgânico acetona (ensaios 2 e 3) sugerem que houve uma desordem pouco acentuada, fato observado por Bhatti et al. (2006) ao estudarem a termoestabilidade de uma invertase de *Fusarium solani*. Os processos de desdobramento da enzima (*U*) podem ser bloqueados e neste estado a rota majoritária de desativação é o estado irreversível (*I*) (BROMBERG; MARX; FRISHMAN, 2008). De acordo com Dannenberg e Kessler (1988) ΔS^* seria positivo se o fator limitante da reação fosse o desdobramento. Como o sinal foi negativo o fator limitante da reação possivelmente tende para a inativação, envolvendo a agregação das moléculas de proteínas parcialmente desdobradas que predominaram durante a exposição em altas temperaturas.

A estabilidade de enzimas está diretamente relacionada ao valor de ΔG^* . A Tabela 3 apresenta os valores de ΔG^* para as condições estudadas, mostrando comportamentos diferenciados para os ensaios. Os valores de ΔG^* para o ensaio 1 foram reduzidos com o aumento da temperatura evidenciando a desnaturação, enquanto que o meio contendo o tampão e acetona (ensaio 2) os valores de ΔG^* mantiveram-se praticamente constantes. Em contraste, os valores de ΔG^* aumentaram com a temperatura no meio contendo [Emim][Tf₂N] e acetona (ensaio 3).

Estudos termodinâmicos de desnaturação da enzima polifenol oxidase de *Solanum lycocarpum* mostraram um aumento nos valores de ΔG^* , sugerindo que a polifenol oxidase não se desestabilizou na faixa de temperatura do estudo (BATISTA et al., 2014), comportamento que provavelmente ocorreu com a protease P45 no meio contendo o líquido iônico. Além disso, o maior valor da energia livre a 55 °C (106,8 kJ/mol, ensaio 3) indicou que esta protease exibiu uma resistência ao desdobramento térmico nas maiores temperaturas estudadas (BHATTI et al., 2006).

Os valores de energia de ativação para a reação de desnaturação, E_d , foram obtidos em função da temperatura. Quanto maiores os valores de E_d , maior a barreira de energia necessária para a desnaturação da enzima, o que indica maior estabilidade. No entanto, embora o valor de E_d para inativação da protease P45 foi maior para o ensaio 1 (Tabela 3), a enzima foi desnaturada vagarosamente no ensaio 3 (contendo líquido iônico), verificado através dos menores valores da constante de desnaturação k_d (Tabela 2). Assim, conforme relatado por Kazan e Erarslan (1997), é assumido que os valores da constante de desnaturação (k_d) ou o aumento nos valores de ΔG^* são critérios mais confiáveis de concluir sobre o aumento da estabilização do que o maior valor de energia de ativação para a reação de desnaturação.

Em soluções aquosas o valor da energia de ativação para a reação de desnaturação, no estado de inativação irreversível ($U \rightarrow I$), é ≤ 100 kJ/mol, enquanto que o valor correspondente ao estado reversível ($N \leftrightarrow U$) está na faixa de 200-750 kJ/mol (APENTEN, 1998), indicando que o maior valor apresentado para o ensaio 1 (195,9 kJ/mol) é consequência do processo de desdobramento.

3.3 BIOCATÁLISE DE CASEINA DE LEITE BOVINO POR PROTEASE TRATADA EM LÍQUIDO IÔNICO E ACETONA

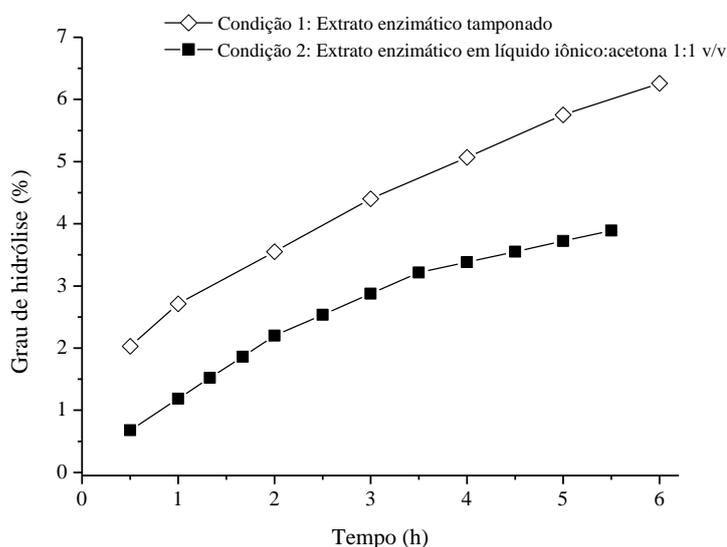
Como mostrado nos resultados anteriores, a protease P45 contida na mistura binária contendo líquido iônico e acetona mostrou-se ativa e apresentou os melhores resultados de

estabilidade cinética e termodinâmica, porém fez-se necessário saber o comportamento catalítico desta enzima neste meio através da aplicação na reação hidrolítica de caseína de soro bovino.

A Figura 2 apresenta o grau de hidrólise (GH) do substrato caseína ao longo do tempo. No meio aquoso contendo a enzima em LI e acetona o GH foi de 3,9% após 5,5 h de reação. Porém, o ensaio em tampão, no tempo de 5 h, atingiu o valor de 5,7%. O maior percentual indicou maior número de ligações peptídicas rompidas, que provavelmente originam peptídeos de menor tamanho.

A diferença nos valores de GH foi causado pelo tratamento da protease. O contato do LI pode ter proporcionado a formação de um recobrimento na superfície da protease (LEE; KIM, 2002), tornando-a estável, mas provavelmente gerou uma mudança na sua estrutura que dificultou o acesso do substrato ao sítio ativo da molécula. A atividade catalítica em LIs não segue uma regra (FISCHER; MUTSCHLER; ZUFFEREY, 2011), pois enquanto algumas enzimas são ativadas (DANG et al., 2007), outras tem a atividade reduzida (ATTRI; VENKATESU; KUMAR, 2011).

Figura 2 – Grau de hidrólise de caseína de leite bovino para as duas condições de uso da protease.



Outra causa pode ter sido a troca de íons do LI com a solução alcalina, utilizada para o controle de pH e na manutenção das funções catalíticas da protease (FISCHER; MUTSCHLER; ZUFFEREY, 2011), o que pode ter ocasionado mudanças das propriedades do LI e menor eficiência catalítica.

Daroit et al. (2012) e Hidalgo et al. (2015) hidrolisaram caseinato ovino e caseinato bovino, respectivamente, catalisados por proteases tamponadas, quantificando o GH pela metodologia do ácido 2,4,6-trinitrobenzeno sulfônico. No primeiro estudo foi obtido um GH de 5,5% e no segundo, GH de 8,2% após 7 h de reação. Assim, foi verificado que o resultado do estudo está na mesma ordem de grandeza, porém novas investigações fazem-se necessárias para avaliar a aplicação da protease tratada em outros processos não aquosos, como para a síntese de peptídeos.

4 CONCLUSÃO

A protease P45 mostrou-se ativa e estável em meio contendo o líquido iônico [Emim][Tf₂N] e acetona razão 1:1 v/v. A determinação da estabilidade térmica e dos parâmetros termodinâmicos foram realizados, sendo que a mistura reacional favoreceu a estabilização desta enzima com aumento na meia vida em mais de 2 h em relação à mesma contida em meio com tampão e acetona, a 55 °C. Além disso, durante a formação do estado de transição na desnaturação enzimática, decorrente do aumento da temperatura, o menor valor de entalpia sugere que as ligações não covalentes que estabilizam a estrutura da proteína foram pouco quebradas, e o valor negativo de entropia juntamente com o valor de E_d (34,7 kJ/mol) sugerem que a rota majoritária de desativação é o estado irreversível. Os valores de k_d e ΔG^* enfatizaram que houve aumento na estabilização da estrutura da protease P45 na faixa de temperatura de 40 a 55 °C, em relação aos demais meios contendo tampão.

A protease contida em líquido iônico e acetona foi aplicada como biocatalisador na hidrólise de caseína de leite bovino, não sendo eficaz neste tipo de reação, pois apresentou grau de hidrólise de 3,9% após 5,5 h de reação, enquanto que o ensaio em tampão obteve 5,7% em 5 h. Novas investigações serão necessárias para avaliar o uso da protease neste meio que possibilitem o desenvolvimento de novos processos biocatalíticos em LI.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADLER-NISSEN, J. **Enzymic hydrolysis of food proteins**. Elsevier Applied Science Publishers, 1986. ISBN 0853343861.

AHN, C.-B.; KIM, J.-G.; JE, J.-Y. Purification and antioxidant properties of octapeptide from salmon byproduct protein hydrolysate by gastrointestinal digestion. **Food Chemistry**, v. 147, p. 78-83, 2014.

- AKBARI, N.; DANESHJOO, S.; AKBARI, J.; KHAJEH, K. Isolation, characterization, and catalytic properties of a novel lipase which is activated in ionic liquids and organic solvents. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 165, n. 3-4, p. 785-794, 2011.
- ANBU, P. Characterization of solvent stable extracellular protease from *Bacillus koreensis* (BK-P21A). **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 56, p. 162-168, 2013.
- APENTEN, R. O. The effect of protein unfolding stability on their rates of irreversible denaturation. **Food Hydrocolloids**, v. 12, n. 1, p. 1-8, 1998.
- ARIAHU, C. C.; OGUNSUA, A. O. Thermal degradation kinetics of thiamine in periwinkle based formulated low acidity foods. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 35, n. 3, p. 315-321, 2000.
- ATTRI, P.; VENKATESU, P.; KUMAR, A. Activity and stability of α -chymotrypsin in biocompatible ionic liquids: enzyme refolding by triethyl ammonium acetate. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 13, n. 7, p. 2788-2796, 2011.
- BATISTA, K. A.; BATISTA, G. L.; ALVES, G. L.; FERNANDES, K. F. Extraction, partial purification and characterization of polyphenol oxidase from *Solanum lycocarpum* fruits. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 102, p. 211-217, 2014.
- BERNAL, C.; CAIRO, J.; COELLO, N. Purification and characterization of a novel exocellular keratinase from *Kocuria rosea*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 38, n. 1, p. 49-54, 2006.
- BHATTI, H. N.; ASGHER, M.; ABBAS, A.; NAWAZ, R.; SHEIKH, M. A. Studies on kinetics and thermostability of a novel acid invertase from *Fusarium solani*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 13, p. 4617-4623, 2006.
- BOSE, S.; BARNES, C. A.; PETRICH, J. W. Enhanced stability and activity of cellulase in an ionic liquid and the effect of pretreatment on cellulose hydrolysis. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 109, n. 2, p. 434-443, 2012.
- BROMBERG, A.; MARX, S.; FRISHMAN, G. Kinetic study of the thermal inactivation of cholinesterase enzymes immobilized in solid matrices. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics**, v. 1784, n. 6, p. 961-966, 2008.
- DANG, D. T.; HA, S. H.; LEE, S.-M.; CHANG, W.-J.; KOO, Y.-M. Enhanced activity and stability of ionic liquid-pretreated lipase. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 45, n. 3-4, p. 118-121, 2007.
- DANNENBERG, F.; KESSLER, H. G. Reaction kinetics of the denaturation of whey proteins in milk. **Journal of Food Science**, v. 53, n. 1, p. 258-263, 1988.
- DAROIT, D. J.; CORRÊA, A. P. F.; BRANDELLI, A. Keratinolytic potential of a novel *Bacillus* sp. P45 isolated from the Amazon basin fish *Piaractus mesopotamicus*. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 63, n. 3, p. 358-363, 2009.

DAROIT, D. J.; CORRÊA, A. P. F.; BRANDELLI, A. Production of keratinolytic proteases through bioconversion of feather meal by the Amazonian bacterium *Bacillus* sp. P45. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 65, n. 1, p. 45-51, 2011.

DAROIT, D. J.; CORRÊA, A. P. F.; CANALES, M. M.; COELHO, J. G.; HIDALGO, M. E.; TICHOTA, D. M.; RISSO, P. H.; BRANDELLI, A. Physicochemical properties and biological activities of ovine caseinate hydrolysates. **Dairy Science & Technology**, v. 92, n. 4, p. 335-351, 2012.

DAROIT, D. J.; CORRÊA, A. P. F.; SEGALIN, J.; BRANDELLI, A. Characterization of a keratinolytic protease produced by the feather-degrading Amazonian bacterium *Bacillus* sp. P45. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 28, n. 5-6, p. 370-379, 2010.

DUARTE, R. T.; CARVALHO SIMÕES, M. C.; SGARBIERI, V. C. Bovine blood components: fractionation, composition, and nutritive value. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, n. 1, p. 231-236, 1999.

ERBELDINGER, M.; MESIANO, A. J.; RUSSELL, A. J. Enzymatic catalysis of formation of Z-aspartame in ionic liquid— An alternative to enzymatic catalysis in organic solvents. **Biotechnology Progress**, v. 16, n. 6, p. 1129-1131, 2000.

FISCHER, F.; MUTSCHLER, J.; ZUFFEREY, D. Enzyme catalysis with small ionic liquid quantities. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 38, n. 4, p. 477-487, 2011.

GAVRILESCU, M.; CHISTI, Y. Biotechnology—a sustainable alternative for chemical industry. **Biotechnology Advances**, v. 23, n. 7, p. 471-499, 2005.

GONÇALVES, S. M. **Hidrólise de caseína e plasma de sangue bovino com protease de *Bacillus* sp. P45**. 2016. 94 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química), Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande.

GORKE, J.; SRIENC, F.; KAZLAUSKAS, R. Toward advanced ionic liquids. Polar, enzyme-friendly solvents for biocatalysis. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 15, n. 1, p. 40-53, 2010.

GORMAN, L. A. S.; DORDICK, J. S. Organic solvents strip water off enzymes. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 39, n. 4, p. 392-397, 1992.

GOTOR-FERNÁNDEZ, V.; BRIEVA, R.; GOTOR, V. Lipases: useful biocatalysts for the preparation of pharmaceuticals. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 40, n. 3, p. 111-120, 2006.

GULMEZ, C.; ATAKISI, O.; DALGINLI, K. Y.; ATAKISI, E. A novel detergent additive: organic solvent- and thermo-alkaline-stable recombinant subtilisin. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 108, p. 436-443, 2018.

GUPTA, R.; RAJPUT, R.; SHARMA, R.; GUPTA, N. Biotechnological applications and prospective market of microbial keratinases. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, n. 23, p. 9931-9940, 2013.

- HERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ, F.; DE LOS RIOS, A.; TOMÁS-ALONSO, F.; GOMEZ, D.; VÍLLORA, G. Stability of hydrolase enzymes in ionic liquids. **The Canadian Journal of Chemical Engineering**, v. 87, n. 6, p. 910-914, 2009.
- HIDALGO, M. E.; CÔRREA, A. P. F.; CANALES, M. M.; DAROIT, D. J.; BRANDELLI, A.; RISSO, P. Biological and physicochemical properties of bovine sodium caseinate hydrolysates obtained by a bacterial protease preparation. **Food Hydrocolloids**, v. 43, p. 510-520, 2015.
- HOYOS, P.; PACE, V.; J HERNALIZ, M.; R ALCANTARA, A. Biocatalysis in the pharmaceutical industry. A greener future. **Current Green Chemistry**, v. 1, n. 2, p. 155-181, 2014.
- HUISMAN, G. W.; COLLIER, S. J. On the development of new biocatalytic processes for practical pharmaceutical synthesis. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 17, n. 2, p. 284-292, 2013.
- JAIN, D.; PANCHA, I.; MISHRA, S. K.; SHRIVASTAV, A.; MISHRA, S. Purification and characterization of haloalkaline thermoactive, solvent stable and SDS-induced protease from *Bacillus* sp.: a potential additive for laundry detergents. **Bioresource Technology**, v. 115, p. 228-236, 2012.
- JELLOULI, K.; GHORBEL-BELLAAJ, O.; AYED, H. B.; MANNI, L.; AGREBI, R.; NASRI, M. Alkaline-protease from *Bacillus licheniformis* MP1: purification, characterization and potential application as a detergent additive and for shrimp waste deproteinization. **Process Biochemistry**, v. 46, n. 6, p. 1248-1256, 2011.
- KAZAN, D.; ERARSLAN, A. Stabilization of *Escherichia coli* penicillin G acylase by polyethylene glycols against thermal inactivation. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 62, n. 1, p. 1-13, 1997.
- KLIBANOV, A. M. Enzymatic catalysis in anhydrous organic solvents. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 14, n. 4, p. 141-144, 1989.
- KUMAR, A.; VENKATESU, P. Overview of the stability of α -chymotrypsin in different solvent media. **Chemical Reviews**, v. 112, n. 7, p. 4283-4307, 2012.
- LAANE, C.; BOEREN, S.; VOS, K.; VEEGER, C. Rules for optimization of biocatalysis in organic solvents. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 30, n. 1, p. 81-87, 1987.
- LASZLO, J. A.; COMPTON, D. L. α -Chymotrypsin catalysis in imidazolium-based ionic liquids. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 75, n. 2, p. 181-186, 2001.
- LEE, J. K.; KIM, M.-J. Ionic liquid-coated enzyme for biocatalysis in organic solvent. **The Journal of organic chemistry**, v. 67, n. 19, p. 6845-6847, 2002.
- LOZANO, P.; DE DIEGO, T.; GUEGAN, J. P.; VAULTIER, M.; IBORRA, J. L. Stabilization of α -chymotrypsin by ionic liquids in transesterification reactions. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 75, n. 5, p. 563-569, 2001.

MUÑOZ, P. A.; CORREA-LLANTÉN, D. N.; BLAMEY, J. M. Ionic liquids increase the catalytic efficiency of a lipase (Lip1) from an antarctic thermophilic bacterium. **Lipids**, v. 50, n. 1, p. 49-55, 2015.

OGINO, H.; TSUCHIYAMA, S.; YASUDA, M.; DOUKYU, N. Enhancement of the aspartame precursor synthetic activity of an organic solvent-stable protease. **Protein Engineering, Design & Selection**, v. 23, n. 3, p. 147-152, 2010.

ORTEGA, N.; DE DIEGO, S.; RODRÍGUEZ-NOGALES, J. M.; PEREZ-MATEOS, M.; BUSTO, M. D. Kinetic behaviour and thermal inactivation of pectinlyase used in food processing. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 39, n. 6, p. 631-639, 2004.

PRAKASH, P.; JAYALAKSHMI, S. K.; SREERAMULU, K. Purification and characterization of extreme alkaline, thermostable keratinase, and keratin disulfide reductase produced by *Bacillus halodurans* PPKS-2. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 87, n. 2, p. 625-633, 2010.

RAHMAN, R. N. Z. R. A.; GEOK, L. P.; BASRI, M.; SALLEH, A. B. An organic solvent-stable alkaline protease from *Pseudomonas aeruginosa* strain K: enzyme purification and characterization. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, n. 7, p. 1484-1491, 2006.

RAHMAN, R. N. Z. R. A.; MAHAMAD, S.; SALLEH, A. B.; BASRI, M. A new organic solvent tolerant protease from *Bacillus pumilus* 115b. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 34, n. 7, p. 509-517, 2007.

REDDY, L.; WEE, Y. J.; RYU, H. W. Purification and characterization of an organic solvent and detergent-tolerant novel protease produced by *Bacillus* sp. RKY3. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 83, n. 11, p. 1526-1533, 2008.

REICHARDT, C. **Solvents and solvent effects in organic chemistry**. 4ed., Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim: 2003.

SALA, L.; GAUTÉRIO, G. V.; YOUNAN, F. F.; BRANDELLI, A.; MORAES, C. C.; KALIL, S. J. Integration of ultrafiltration into an aqueous two-phase system in the keratinase purification. **Process Biochemistry**, v. 49, n. 11, p. 2016-2024, 2014.

SEN, S.; DASU, V. V.; DUTTA, K.; MANDAL, B. Characterization of a novel surfactant and organic solvent stable high-alkaline protease from new *Bacillus pseudofirmus* SVB1. **Research Journal of Microbiology**, v. 6, n. 11, p. 769-783, 2011.

SINGH, R.; KUMAR, M.; MITTAL, A.; MEHTA, P. K. Microbial enzymes: industrial progress in 21st century. **3 Biotech**, v. 6, n. 2, p. 174, 2016.

USTOK, F. I.; TARI, C.; HARSA, S. Biochemical and thermal properties of β -galactosidase enzymes produced by artisanal yoghurt cultures. **Food Chemistry**, v. 119, n. 3, p. 1114-1120, 2010.

VELLARD, M. The enzyme as drug: application of enzymes as pharmaceuticals. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 14, n. 4, p. 444-450, 2003.

VIANA, D. D. A.; DE ALBUQUERQUE LIMA, C.; NEVES, R. P.; MOTA, C. S.; MOREIRA, K. A.; DE LIMA-FILHO, J. L.; CAVALCANTI, M. T. H.; CONVERTI, A.; PORTO, A. L. F. Production and stability of protease from *Candida buinensis*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 162, n. 3, p. 830-842, 2010.

VISWANATHAN, K.; OMOREBOKHAE, R.; LI, G.; GROSS, R. A. Protease-catalyzed oligomerization of hydrophobic amino acid ethyl esters in homogeneous reaction media using l-phenylalanine as a model system. **Biomacromolecules**, v. 11, n. 8, p. 2152-2160, 2010.

VOSENBERG, P.; BEEFTINK, H.; NUIJENS, T.; STUART, M. C.; TRAMPER, J. Selecting optimal conditions for Alcalase CLEA-OM for synthesis of dipeptides in organic media. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 75, p. 43-49, 2012.

WETZEL, R.; PERRY, L. J.; BAASE, W. A.; BECKTEL, W. J. Disulfide bonds and thermal stability in T4 lysozyme. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 85, n. 2, p. 401-405, 1988.

XU, J.; JIANG, M.; SUN, H.; HE, B. An organic solvent-stable protease from organic solvent-tolerant *Bacillus cereus* WQ9-2: purification, biochemical properties, and potential application in peptide synthesis. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 20, p. 7991-7994, 2010.

YAMAMOTO, E.; YAMAGUCHI, S.; NAGAMUNE, T. Protein refolding by N-alkylpyridinium and N-alkyl-N-methylpyrrolidinium ionic liquids. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 164, n. 6, p. 957-967, 2011.

YAO, H.; ZHANG, S.; WANG, J.; ZHOU, Q.; DONG, H.; ZHANG, X. Densities and viscosities of the binary mixtures of 1-Ethyl-3-methylimidazolium bis (trifluoromethylsulfonyl) imide with N-methyl-2-pyrrolidone or ethanol at T=(293.15 to 323.15) K. **Journal of Chemical & Engineering Data**, v. 57, n. 3, p. 875-881, 2012.

ZAKS, A.; KLIBANOV, A. M. Enzyme-catalyzed processes in organic solvents. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 82, n. 10, p. 3192-3196, 1985.

ARTIGO 2

MAXIMIZAÇÃO DO GRAU DE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DO PLASMA DE SANGUE BOVINO PARA OBTENÇÃO DE PEPTÍDEOS COM POTENCIALIDADES BIOLÓGICAS

RESUMO

Os objetivos do estudo foram: avaliar a atividade e estabilidade da protease de *Bacillus* sp. P45 na presença de CaCl_2 e maximizar o grau de hidrólise do plasma de sangue bovino (PSB) através dos parâmetros de reação, temperatura e concentração de proteínas do substrato. A adição de CaCl_2 ao extrato enzimático foi avaliada nas concentrações de 0, 5, 10, 50 e 100 mmol/L, após foram determinados a meia vida e os parâmetros termodinâmicos para o extrato contendo CaCl_2 50 mmol/L. Previamente à maximização, foi verificado o efeito de pré-tratamentos no substrato PSB: aquecimento a 50, 70, 90 °C e o uso do ultrassom com aquecimento a 50 °C, no valor do grau de hidrólise. Os parâmetros reacionais de hidrólise avaliados foram temperatura (35 a 55 °C) e concentração proteica do substrato (10 a 40 g/L); fixados relação E/S (600 U/g de proteína) e pH (7,5). A concentração de 50 mmol/L de cálcio promoveu a maior atividade enzimática. A meia vida (40 °C) foi de 9 h e os valores dos parâmetros termodinâmicos indicaram que a presença de Ca^{2+} forneceu uma conformação estável à protease com um baixo valor de entropia de desdobramento (11,6 J/mol K). Os pré-tratamentos aplicados não diferiram estatisticamente, sendo fixado o aquecimento a 50 °C por 20 min. Na maximização do grau de hidrólise os resultados foram obtidos com a temperatura de 40 °C e concentração de proteínas igual a 17,5 g/L, atingindo $39,0 \pm 0,8\%$ de grau de hidrólise em 12 h de reação.

Palavras-chave: Plasma de sangue. Protease microbiana. Estabilidade. pH-*stat*. Hidrolisado proteico.

1 INTRODUÇÃO

A demanda global por alimentos com alto conteúdo proteico tem aumentado nos últimos anos (MULLEN et al., 2017). Anualmente, a indústria de carnes gera significativas quantidades de materiais proteicos e esses produtos apresentam proteínas de alta qualidade com excelente valor nutricional (TOLDRÁ; MORA; REIG, 2016).

Há pouca evidência da aplicação de tecnologias emergentes para agregar valor aos subprodutos cárneos, como o sangue e seus constituintes. O plasma, parte do sangue não coagulado após a remoção das células vermelhas, contém 6-8% (b.u.) de proteínas, e é normalmente empregado para a produção de produtos de baixo valor agregado como fertilizantes, alimentação animal e agente emulsificante (BAH et al., 2013; ALAO et al., 2017). Portanto, uma melhor utilização destes materiais não é somente crucial para promover a sustentabilidade econômica e ambiental, mas também para providenciar novos produtos e ingredientes proteicos promissores para a indústria de alimentos (MULLEN et al., 2017).

Apesar das diversas técnicas disponíveis para obtenção de peptídeos, a proteólise é um processo eficiente para hidrolisar proteínas dos subprodutos cárneos e obter ingredientes com alto valor agregado, como hidrolisados proteicos com atividades biológicas (BAH et al., 2016b), uma vez que os outros métodos podem deixar resíduos de solventes orgânicos ou compostos tóxicos no produto final, tornando sua utilização inviável pelas indústrias alimentícias e farmacêuticas.

O estudo dos parâmetros de hidrólise faz-se importante para promover a liberação de peptídeos com maiores atividades biológicas e funcionalidades de interesse (SEO et al., 2015). Além disso, para que a utilização da protease seja industrialmente viável, esta deve estar em condições de atividade e termoestabilidade ideais ao processo, requerendo, por vezes, de ativadores, como os íons metálicos (ZHANG et al., 2019; DAROIT; SANT'ANNA; BRANDELLI, 2011).

Alguns estudos mostraram que a obtenção de hidrolisados proteicos de plasma sanguíneo apresentaram atividades antioxidante (SALGADO et al., 2011; BAH et al., 2015; SEO et al., 2015) e anti-hipertensiva (LIU et al., 2010b). No entanto, devido a sua estrutura, o plasma não é facilmente acessível para a hidrólise enzimática. O tratamento térmico vem sendo empregado previamente a hidrólise das proteínas do plasma para facilitar a desestabilização da sua estrutura e promover a exposição de grupamentos internos, disponibilizando-os à ação da enzima proteolítica (WANASUNDARA et al., 2002).

As enzimas comerciais utilizadas para a reação de hidrólise das proteínas do plasma de sangue encontradas na literatura são, em sua maioria: papaína (BAH et al., 2016b), bromelina (BAH et al., 2016b) e alcalase (LIU et al., 2010a; FIGUEROA; ZAPATA; GUTIÉRREZ, 2012; SEO et al., 2015). Fu et al. (2018) estudaram o efeito de 10 tipos de proteases comerciais, incluindo papaína, bromelina, alcalase, flavourzyme e protamex, com o objetivo de diminuir o sabor amargo dos hidrolisados de plasma suíno, obtendo o melhor resultado utilizando uma Protease A 2SD (fornecida por Amano Enzyme Inc., Japan), com o grau de hidrólise de 19,6% (5 h de reação). Contudo, outros sistemas enzimáticos devem ser estudados a fim de se estabelecer melhores parâmetros de reação e proporcionar a formação de diferentes hidrolisados com possibilidade de variadas e potenciais atividades biológicas, ampliando a gama de aplicação.

No estudo da maximização das condições de hidrólise catalisada pela protease P45, Gonçalves (2016) avaliou o efeito da concentração enzimática (E:S), sobre o valor do grau de hidrólise do plasma sanguíneo, na reação com 25 g/L de proteínas em solução, a 40 °C por 8 h. No estudo foi verificado que o aumento da concentração enzimática, com valor limite de 600 U/(g de prot.), promoveu o maior grau de hidrólise (4,6%) para este substrato, gerando peptídeos com potencial antioxidante.

Na literatura consultada não foi verificado relatos sobre a produção de peptídeos em meios reacionais catalisados por protease de *Bacillus* sp. P45 estabilizada com aditivo químico, dessa forma o objetivo deste estudo foi aplicar a protease P45 adicionada de cálcio visando maximizar o grau de hidrólise do substrato plasma de sangue bovino (PSB).

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 MATERIAL

Para os ensaios de pré-tratamento foi utilizado uma cuba ultrassônica da marca Cristófoli 0,17 kW (frequência ultrassônica de 42 kHz). O substrato azocaseína foi adquirido da Sigma-Aldrich Brasil. Os demais reagentes foram adquiridos em representações locais.

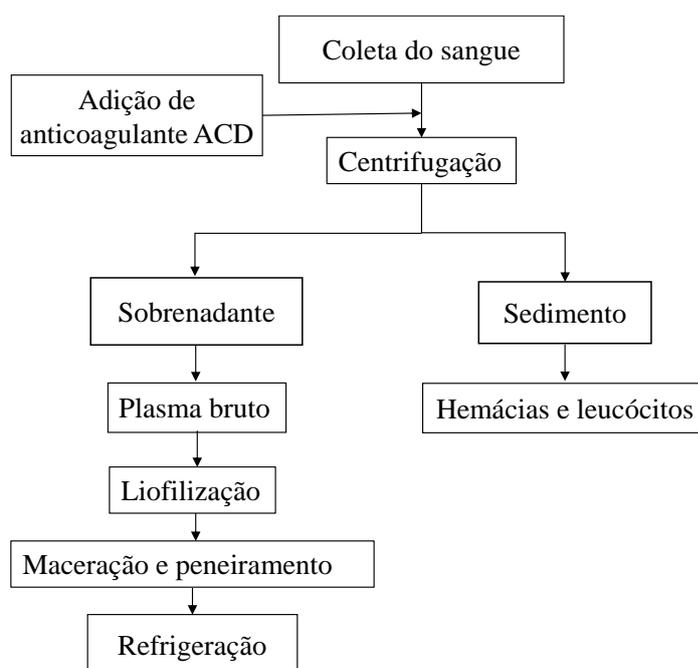
2.2 PREPARAÇÃO DO PLASMA BOVINO LIOFILIZADO

As amostras de sangue bovino foram coletadas em um abatedouro localizado na cidade de Pelotas, no estado do Rio Grande do Sul, Brasil. O sangue foi coletado durante a

sangria do animal e imediatamente adicionado da solução anticoagulante ACD (citrato ácido dextrose), na proporção de 0,15 L de solução de ACD para cada 1 L de sangue. A solução ACD foi preparada com os seguintes reagentes (g/L): ácido cítrico anidro (8), citrato de sódio (22) e glicose monohidratada (25) dissolvidos em água destilada (DOBASHI; BEPPU; DOS SANTOS, 1980).

Para separar o plasma, as amostras de sangue bovino foram centrifugadas a $4700 \times g$ por 10 min a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. O sobrenadante (plasma) foi liofilizado (Liotop, L108, Brasil). Posteriormente à liofilização, o plasma foi macerado com gral e pistilo, até obter uma granulometria menor que 28 mesh (partículas $\leq 600\text{ }\mu\text{m}$). O plasma liofilizado foi mantido sob refrigeração a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. A sequência de processos está mostrada na Figura 1.

Figura 1 – Etapas para a obtenção do plasma bovino liofilizado.



2.3 CULTIVO BACTERIANO E PURIFICAÇÃO ENZIMÁTICA

A enzima foi produzida por cultivo submerso de *Bacillus* sp. P45, como descrito por Daroit, Corrêa e Brandelli (2011). O meio mineral otimizado foi composto pelos sais (g/L): NaCl (0,5), K_2HPO_4 (0,3), KH_2PO_4 (0,4), NH_4Cl (1,9) e farinha de penas (43). As condições do cultivo foram pH 7,0, 1% v/v de inóculo com suspensão bacteriana ($\text{DO}_{600} = 0,5$) utilizando uma incubadora rotatória a 125 rpm, $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 48 h. Após o cultivo, o extrato foi centrifugado ($5000 \times g$, 20 min) e a enzima contida no sobrenadante foi submetida ao protocolo

de purificação parcial (SALA et al., 2014), utilizando um sistema aquoso bifásico integrado ao processo de diafiltração/ultrafiltração. O extrato foi liofilizado e armazenado a 4 °C.

2.4 EFEITO DO CaCl₂ NA ATIVIDADE E ESTABILIDADE TÉRMICA DA PROTEASE DE *Bacillus* sp. P45

O extrato enzimático de protease P45 foi preparado solubilizando 1,2 mg da protease liofilizada em 1 mL de tampão Tris-HCl 100 mmol/L pH 7,5 e refrigerando a solução a 4 °C por no mínimo 1 h. O ensaio para avaliar o efeito da concentração de cloreto de cálcio na atividade enzimática catalisada por protease P45 foi realizado a 40 °C. As concentrações de CaCl₂ estudadas foram 0, 5, 10, 50 e 100 mmol/L, o qual foi adicionado ao extrato enzimático e imediatamente (t= 0min) foi realizada a determinação da atividade enzimática. Os ensaios foram conduzidos em triplicata.

Com o extrato enzimático adicionado de 50 mmol/L de CaCl₂ foram realizados os ensaios de estabilidade térmica nas temperaturas de 35, 40, 45, 50 e 55 °C durante 8 h. Os resultados foram expressos como A/A₀ (%), calculados para avaliar a perda de atividade e consiste da atividade (A) do ensaio no tempo (t) em relação a sua atividade (A₀) no tempo inicial (t=0). Os parâmetros termodinâmicos foram determinados através da equação de Arrhenius e do rearranjo da equação absoluta de Eyring, de acordo com as Equações 1, 2 e 3.

$$\ln k_d = \ln A - \frac{E_d}{RT} \quad (1)$$

$$\ln \left(\frac{k_d}{T} \right) = - \left(\frac{\Delta H^*}{R} \right) \left(\frac{1}{T} \right) + \left(\ln \left(\frac{k_B}{h} \right) + \frac{\Delta S^*}{R} \right) \quad (2)$$

onde R a constante universal dos gases (8,315 J/mol K), k_d a constante de desnaturação, A a constante de Arrhenius, T a temperatura absoluta em Kelvin, h a constante de Planck ($6,63 \times 10^{-34}$ J s), k_B a constante de Boltzman ($1,38 \times 10^{-23}$ J/K), ΔH a variação da entalpia (kJ/mol) e ΔS a variação da entropia (em J/mol K).

$$\Delta G^* = \Delta H^* - T\Delta S^* \quad (3)$$

onde ΔG^* é variação da energia livre.

2.5 ENSAIOS DE HIDRÓLISE DAS PROTEÍNAS DE PLASMA BOVINO

2.5.1 Sistema reacional e aquisição de dados para os ensaios de hidrólise

Os ensaios de hidrólise foram conduzidos em dois reatores encamisados de 100 mL, com volume útil de 75 mL, acoplado em banho de recirculação de água, agitação magnética e vedação. As titulações foram realizadas manualmente, em tempos pré fixados, através da abertura na tampa do reator. O sistema reacional contou com um eletrodo de resposta rápida combinado de calomelano.

A aquisição dos dados de pH e tempo de reação, bem como o monitoramento dos ensaios de hidrólise, foram efetuadas através de um sistema computacional do tipo Arduino UNO® acoplado a uma interface para converter o sinal analógico em leituras de pH e registro destas leituras.

O volume do meio reacional foi de 75 mL, contendo 73 mL de solução do substrato em água (pH fixado em 7,5) e 2 mL de extrato enzimático (ou tampão Tris-HCl 100 mmol/L pH 7,5). Os ensaios de hidrólise foram conduzidos em duplicata.

2.5.2 Estudo da adição de CaCl₂ ao extrato enzimático e pré-tratamentos aplicados ao plasma bovino

Os ensaios de avaliação da adição do CaCl₂ ao extrato enzimático e do pré-tratamentos aplicados ao substrato foram conduzidos nas condições de hidrólise: temperatura 40 °C, concentração de proteínas igual a 25 g/L, relação enzima/substrato de 600 U/(g de proteína) e tempo de reação de 8 h (GONÇALVES, 2006).

O efeito da adição de 50 mmol/L de CaCl₂ ao extrato enzimático foi avaliado no grau de hidrólise do plasma bovino, os ensaios estão apresentados na Tabela 1. No ensaio 3 não foi adicionado extrato enzimático ao meio reacional, apenas tampão Tris-HCl 100 mmol/L pH 7,5.

Os pré-tratamentos aplicados ao substrato plasma foram avaliados em relação a variação do grau de hidrólise, determinado durante a reação catalisada pela protease P45. Os tratamentos foram realizados antes da hidrólise e consistiram em: térmico em banho-maria (50 °C, 70 °C e 90 °C) por 20 min (WANASUNDARA et al., 2002) e banho ultrassônico com aquecimento (2 ciclos de 480 s, 50 °C), sendo que o número de ciclos aplicados foi definido para ajustar ao tempo aplicado segundo o protocolo de Dalagnol et al. (2017). Nestes ensaios foi utilizado 2 mL de extrato enzimático contendo 50 mmol/L de CaCl₂. Os resultados foram

expressos como a variação do grau de hidrólise (ΔGH), calculada pela diferença do GH do ensaio e do GH do respectivo controle. O ensaio controle consistiu da adição de 2 mL de tampão Tris-HCl 100 mmol/L pH 7,5 ao invés de extrato enzimático.

Tabela 1 – Ensaio de hidrólise das proteínas de plasma de sangue bovino.

Ensaio	Adição de 50 mmol/L de $CaCl_2$	Pré-tratamento no PSB ¹
1	Não	Sim
2	Sim	Sim
3 ²	Não	Sim
4	Sim	Não

¹Pré-tratamento: aquecimento em banho-maria a 50 °C por 20 min; PSB: plasma de sangue bovino. ²Ensaio sem extrato enzimático; contém tampão Tris-HCl 100 mmol/L pH 7,5.

2.5.3 Maximização do grau de hidrólise do plasma de sangue bovino

Para a maximização do grau de hidrólise do PSB foi utilizada a técnica univariável em que um fator foi avaliado por vez, mantendo constante as outras variáveis do processo. As variáveis estudadas foram temperatura e concentração de proteínas do substrato, acompanhados o GH ao longo do tempo. O efeito da temperatura foi estudado nas reações de hidrólise a 35, 40, 45, 50 e 55 °C (concentração de proteínas fixado em 25 g/L) e o efeito da concentração de proteínas do plasma foi avaliado em 10 g/L, 13,7 g/L, 17,5 g/L, 25 g/L, 32,5 g/L e 40 g/L (temperatura fixada em 40 °C).

As demais condições foram pré-aquecimento do substrato em banho com temperatura controlada a 50 °C por 20 min, relação enzima/substrato (600U/g de proteína), pH 7,5 e tempo 8 h. O extrato enzimático foi adicionado de 50 mmol/L de $CaCl_2$. Após, com os parâmetros reacionais selecionados, foi acompanhado o perfil cinético até o valor do grau de hidrólise ficar constante. As reações foram realizadas em duplicata e ao final de cada experimento os hidrolisados foram aquecidos a 85 °C por 5 min para inativação enzimática.

2.6 GRAU DE HIDRÓLISE

O grau de hidrólise (GH,%) definido como o percentual da razão de ligações peptídicas hidrolisadas (h) em relação ao número total de ligações por unidade de massa (h_{tot}), foi estimado pelo método de pH-*stat*, seguindo a equação 4 (ADLER-NISSEN, 1986).

$$GH(\%) = \frac{V_B N_B}{\alpha h_{tot} m_p} \times 100 \quad (4)$$

onde V_B é o volume de hidróxido de sódio consumido durante a hidrólise (mL), N_B é a molaridade de hidróxido de sódio (mol/L), α é o grau de grupamentos amino liberados pela hidrólise; h_{tot} é o número total de ligações peptídicas por unidade de massa (eqv/kg) e m_p é a massa de proteína do substrato PSB (g). O valor de h_{tot} foi determinado a partir da composição de aminoácidos do plasma bovino estimado como 7,5 eqv/(kg de proteínas de PSB) (DUARTE; CARVALHO SIMÕES; SGARBIERI, 1999). α é calculado como segue (Equação 5):

$$\alpha = \frac{10^{pH-pK_a}}{1+10^{pH-pK_a}} \quad (5)$$

onde pH é o valor em que a hidrólise foi conduzida, e pK_a é a média de pK_a para α -NH₃⁺.

2.7 DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS

O teor de proteínas no plasma bovino foi determinado a partir da concentração de nitrogênio total obtido mediante aplicação do método Kjeldahl (AOAC, 2000). Os ensaios foram realizados em triplicata. O fator 6,25 foi utilizado para a conversão do nitrogênio em proteína.

2.8 ATIVIDADE ENZIMÁTICA

A determinação da atividade proteolítica do extrato enzimático de protease P45 liofilizada e solubilizada em tampão Tris-HCl 100 mmol/L (pH 7,5) foi determinada conforme descrito por Daroit, Corrêa e Brandelli (2009). O substrato utilizado foi a azocaseína 10 mg/mL em tampão Tris-HCl 100 mmol/L (pH 7,5). A mistura reacional foi composta por 100 µL de tampão Tris-HCl 100 mmol/L (pH 7,5), 300 µL de azocaseína e 100 µL da solução enzimática. A mistura foi incubada em banho com agitação a 40 °C durante 30 min e finalizada com a adição de 600 µL de ácido tricloroacético 10% (m/v). A mistura foi centrifugada (5000 × g por 20 min, 4 °C) e 800 µL do sobrenadante foi adicionado a 200 µL de NaOH 1,8 mol/L. A transmitância foi medida a 420 nm. Uma unidade de atividade proteolítica (U) foi definida como a quantidade de enzima que causa a mudança de 0,1 unidade de absorvância sob as condições do ensaio.

2.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram verificados quanto à normalidade e homogeneidade das variâncias. Em seguida, os resultados foram avaliados estatisticamente por análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey ao nível de confiança de 95% ($p < 0,05$).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

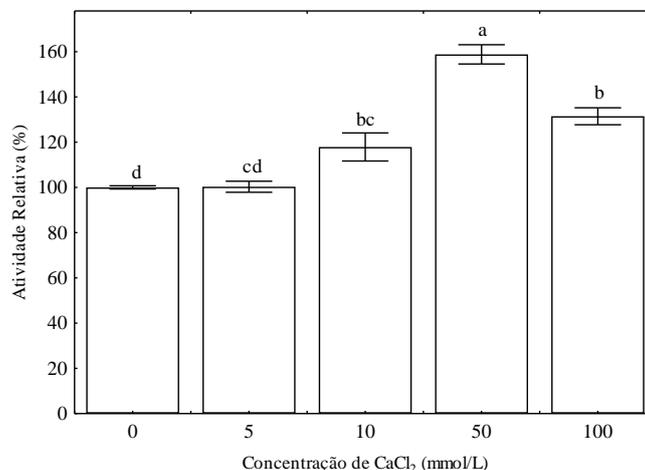
3.1 EFEITO DO CaCl_2 NA ATIVIDADE E ESTABILIDADE TÉRMICA DA PROTEASE DE *Bacillus* sp. P45

A Figura 2 apresenta os resultados da atividade enzimática frente à adição de diferentes concentrações de CaCl_2 . Neste sistema houve acréscimo progressivo na atividade com a adição de cloreto de cálcio até a concentração de 50 mmol/L, sendo que com esta adição a atividade foi 59% superior ao extrato sem adição de cálcio. No entanto, quando se adicionou 100 mmol/L, a atividade diminuiu significativamente, com redução de 28% em relação a atividade do extrato adicionado de 50 mmol de CaCl_2 .

O efeito positivo do íon metálico cálcio na atividade proteolítica já foi reportado para a protease P45 (LEMES, 2015; DAROIT; SANT'ANNA; BRANDELLI, 2011). O aumento da atividade enzimática na presença de cálcio sugere que as ligações eletrostáticas entre o cálcio e a enzima promoveram uma estrutura proteica mais estável, favorável a catálise (ZHANG et al., 2019) e, provavelmente, os íons se ligam em sítios específicos, diminuindo as taxas de autólise (PEREIRA, 2015).

Sais neutros em altas concentrações apresentam um efeito significativo no ambiente eletrostático e conseqüentemente na estabilidade conformacional de macromoléculas (DAMODARAN; KINSELLA, 1981). A interação íon-proteína depende da natureza do sal usado em determinada força iônica (RU et al., 2000). No estudo de Janati-Fard et al. (2018) foi observado que a concentração de 1 mol/L de CaCl_2 reduziu 20% a atividade inicial da glucose oxidase em pH 6,5 a 25 °C, e com o aumento da concentração desse sal a redução da atividade foi maior. Uma possível causa para a inibição da atividade enzimática foi a alteração da estrutura conformacional, gerada pela ruptura da estrutura proteica provocada pelo excesso do sal, acarretando na exposição de grupamentos que até então estavam ocultos e inativos no interior da molécula (JANATI-FARD et al., 2018).

Figura 2 – Efeito da concentração de CaCl_2 (mmol/L) na atividade enzimática de protease de *Bacillus* sp. P45. Valores são a média \pm desvio padrão, $n=3$. Letras diferentes indicam diferença significativa ($p<0,05$).



Pereira (2015) estudou a atividade amidásica da α -tripsina em diferentes concentrações de CaCl_2 (0, 2, 20, 50, 100, 200, 400 mmol/L) e encontrou como perfil enzimático o desenho de uma gaussiana com máximo de atividade em 20 mmol/L de cloreto de cálcio, sendo que acima desta concentração a atividade foi reduzida. Uma das possíveis explicações para a diminuição da atividade foi o aumento da concentração de íons de Ca^{2+} e Cl^- que podem ter favorecido a agregação proteica, em vista do enfraquecimento das interações eletrostáticas entre as moléculas da enzima. A agregação gerou a diminuição do número de moléculas disponíveis para realizar a catálise, aumentando a porcentagem de moléculas desnaturadas e causando perdas dos sítios de ligação com o Ca^{2+} (ZHANG et al., 2019). Fato que também pode ter acontecido no presente estudo.

A adição de 10 mmol/L de Ca^{2+} ativou a protease purificada de *Pseudomonas aeruginosa* K após 15 e 30 min na temperatura ambiente (RAHMAN et al., 2006). No estudo de Ghorbel, Sellami-Kamoun e Nasri (2003) uma protease de *Bacillus cereus* BG1 apresentou aumento de atividade em 450% a 60 °C com a adição de 5 mmol/L de cálcio, verificando que esse íon influenciou favoravelmente a atividade. A protease de *Bacillus* sp P45 foi ativada na presença de 1 mmol/L, 5 mmol/L e 10 mmol/L de CaCl_2 (LEMES, 2015).

As regiões de ligação dos íons Ca^{2+} na molécula de proteases alcalinas são as mesmas envolvidas nos processos de autólise enzimática. Por conta disto, os íons de cálcio frequentemente contribuem para a estabilidade de proteases, porém foi verificado por Eijsink, Matthews e Vriend (2011) que pelo menos um íon cálcio pode promover um efeito regulatório

entre a estabilidade e instabilidade, de acordo com a necessidade biológica de atuação da protease, pela localização da ligação deste íon na molécula proteica.

A Figura 3 apresenta as cinéticas de estabilidade térmica em cinco temperaturas (35, 40, 45, 50 e 55 °C) para o extrato enzimático composto pela protease em 100 mmol/L de tampão Tris-HCl pH 7,5 adicionado de 50 mmol/L de CaCl₂. Na análise dos resultados foi possível verificar que ocorreu redução da atividade enzimática ao longo do tempo em todas as temperaturas estudadas. A presença de cálcio no meio promoveu a estabilidade da protease P45, pois comparando os resultados com os de estabilidade da protease em tampão (BORBA et al., 2018), na temperatura de 55 °C, a meia vida foi 17 vezes maior (Tabela 2).

Figura 3 – Estabilidade térmica de protease P45 adicionada de 50 mmol/L de CaCl₂ durante 8 h de reação.

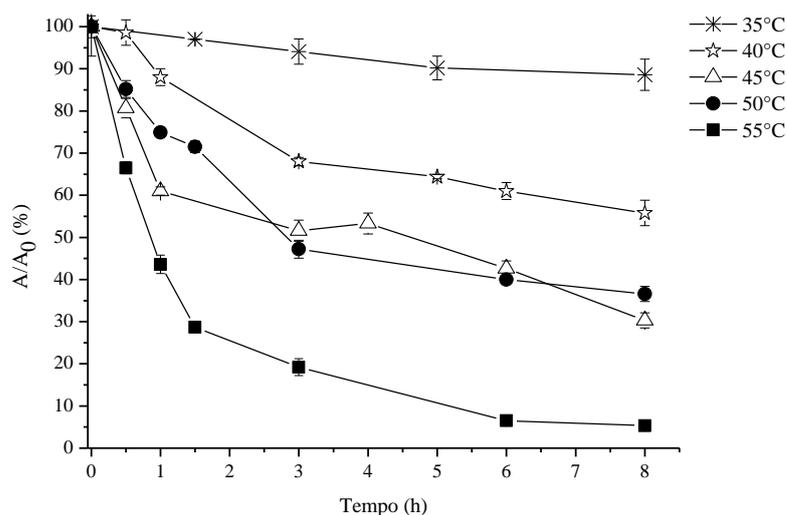


Tabela 2 – Parâmetros de atividade e estabilidade da protease contendo 50 mmol/L de CaCl₂.

T(°C)	$t_{1/2}$ (h)	E_d (kJ/mol)	ΔH^* (kJ/mol)	ΔS^* (J/mol K)	ΔG^* (kJ/mol)
35	34,7				105,7
40	9,0				105,6
45	4,7	112,0	109,3	11,6	105,6
50	5,0				105,6
55	1,7				105,5

Os valores de meia vida apresentados na Tabela 2 mostraram que a protease P45 contendo 50 mmol/L de CaCl₂ apresentou melhor estabilidade na temperatura de 35 °C. Nestas

condições a meia vida da enzima foi de 34,7 h, ou seja, levaria este tempo para reduzir 50% da sua atividade inicial, mantendo assim a molécula nas condições ideais de catálise por mais tempo.

A termoestabilidade de uma proteína é caracterizada pelo balanço entre forças estabilizantes e desestabilizantes, incluindo interações hidrofóbicas e eletrostáticas, ligações de hidrogênio, ligações covalentes e o grau de dobramento da molécula, que concomitantes aumentam a entalpia de ativação (ORTEGA et al., 2004). A Tabela 2 apresenta os parâmetros de atividade e estabilidade determinados para entender o comportamento em diferentes condições aplicadas à protease P45 em 50 mmol/L de CaCl_2 .

O valor de E_d (112,0 kJ/mol) corresponde a uma alta barreira energética requerida para que a enzima seja desnaturada. O valor da entalpia (109,3 kJ/mol) e consequentemente o baixo valor de entropia (11,6 J/mol K) estão associados ao aumento da estabilidade enzimática. O valor médio da energia de Gibbs está próximo aos valores apresentados pela protease de *Nocardiopsis xinjiangensis* OM-6 (95,8 kJ/mol) e da mesma enzima adicionada em meio binário com líquido iônico e acetona (106,8 kJ/mol) (BORBA et al., 2018; GOHEL; SINGH, 2018). Assim, a presença de Ca^{2+} forneceu uma conformação estável à protease com um baixo valor de entropia de desdobramento o que favoreceu a estabilidade termodinâmica.

Os valores de meia vida e parâmetros termodinâmicos apresentados por Daroít, Sant'Anna e Brandelli (2011) para a protease P45 purificada (diferenciando-se apenas no protocolo de purificação) e adicionada de 3 mmol/L de Ca^{2+} a 55 °C foram: $t_{1/2}$ (14 min), entalpia (258,8 kJ/mol), entropia (552,6 J/mol K) e energia de Gibbs (77,6 kJ/mol). Estes resultados mostraram serem superiores em relação à protease sem adição do íon, porém o aumento da concentração de Ca^{2+} para 50 mmol/L apresentou resultados superiores de termoestabilidade.

De acordo com os resultados obtidos pela protease P45 em meio binário (contendo líquido iônico e acetona) (BORBA et al., 2018), a presença de cálcio promoveu melhor termoestabilidade nas temperaturas de 40, 45 e 50 °C, com meia vida superior em 1,8, 1,1 e 1,2 vezes, respectivamente. No entanto, na temperatura de 55 °C, não conseguiu manter o mesmo patamar de estabilidade, reduzindo a meia vida em 1,4 vezes. Resultados similares foram apresentados pela serino protease oriunda da actinobacteria *Nocardiopsis xinjiangensis* OM-6, em que na presença de 50 mmol/L de CaCl_2 a $t_{1/2}$ (50 °C) foi de 5,3 h (GOHEL; SINGH, 2018).

Outros estudos verificaram que a presença de cálcio estabilizou enzimas frente ao pH e ao aquecimento. A presença de cálcio (5 mmol/L) estabilizou as atividades das proteases alcalina 1 (AP1) e alcalina 2 (AP2) sobre a faixa de pH 6-11 (FUKUDA et al., 1997). A

estabilidade da queratinase de *Bacillus licheniformis* RPK foi melhorada pela adição de diferentes concentrações de CaCl_2 (FAKHFAKH et al., 2009). Estes comportamentos promissores podem ser explicados pela força das interações no interior das moléculas da proteína e pela ligação do cálcio aos sítios de autólise, evitando uma autoproteólise (FAKHFAKH et al., 2009).

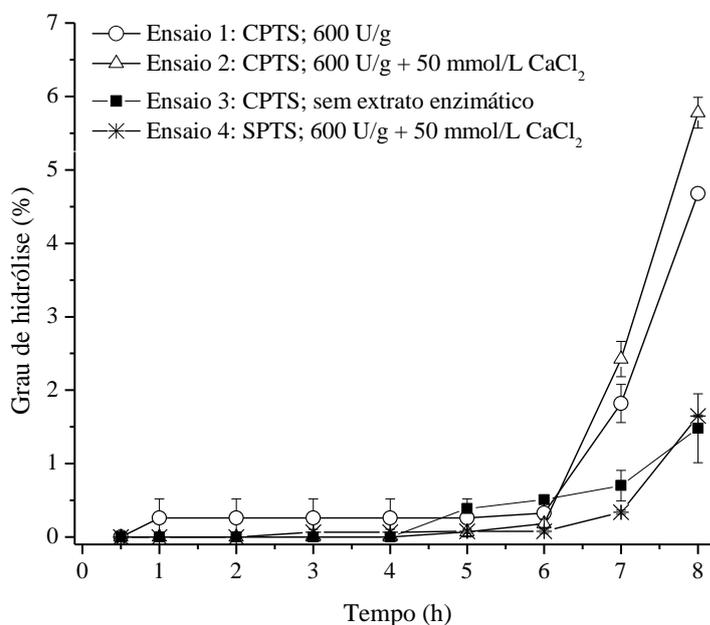
3.2 EFEITO DA ADIÇÃO DE CLORETO DE CÁLCIO AO EXTRATO ENZIMÁTICO E PRÉ-TRATAMENTO DO SUBSTRATO NA HIDRÓLISE DE PLASMA

Numerosos peptídeos biologicamente ativos vêm sendo descobertos a partir de hidrólise enzimática de diferentes fontes proteicas. Os estudos para o uso biotecnológico de sangue gerado em abatedouros são recentes, sendo considerado uma fonte de fácil disponibilidade e de baixo custo de biopeptídeos (LIU et al., 2010a; BAH et al., 2015; SEO et al., 2015; BAH et al., 2016a; LAFARGA et al., 2016). Um coproduto de potencial aplicação é o plasma de sangue bovino, sendo utilizado neste estudo como substrato da hidrólise enzimática, contendo teor médio de proteínas de $58,2 \pm 1,4\%$ (base seca).

Como exposto na Figura 4, em 8 h de reação o valor de grau de hidrólise obtido foi de $4,7 \pm <0,1\%$ utilizando o extrato enzimático sem cálcio e plasma pré-tratado, com aumento para $5,8 \pm 0,2\%$ quando 50 mmol/L de CaCl_2 foi adicionado ao extrato, mostrando que a maior atividade enzimática e estabilidade na presença de 50 mmol/L de CaCl_2 promoveram a melhor atuação catalítica da protease em hidrolisar a proteína do plasma de sangue. Apesar da hidrólise não ter se estabilizado durante as 8 h, foi possível concluir que o extrato enzimático na presença de cálcio foi promissor durante a catálise na hidrólise do substrato PSB através do maior grau de hidrólise a partir das 7 h de reação. Na literatura consultada o efeito do cálcio, cátion divalente, foi estudado nas propriedades catalíticas e estabilidade de enzimas, porém não foram verificados estudos em que um íon fosse adicionado ao biocatalisador em reações de hidrólise.

Na Figura 4 foi apresentado o grau de hidrólise do plasma na sua forma nativa, sem nenhum tratamento prévio à hidrólise (SPTS; ensaio 4, Tabela 1). Através da curva de hidrólise foi possível observar que o comportamento foi semelhante à condição sem extrato enzimático (ensaio 3, Tabela 1), com valores de GH nas 8 h igual a $1,6 \pm <0,1\%$ e $1,5 \pm 0,5\%$, respectivamente.

Figura 4 – Efeito da adição de CaCl_2 (50 mmol/L) ao extrato enzimático e do pré-tratamento térmico ao substrato plasma (aquecimento a $50\text{ }^\circ\text{C}/20\text{ min}$). Condições da reação: E:S 600 U/g, $40\text{ }^\circ\text{C}$, pH 7,5 e tempo 8 h. Com pré-tratamento ao substrato (CPTS) e sem pré-tratamento ao substrato (SPTS).



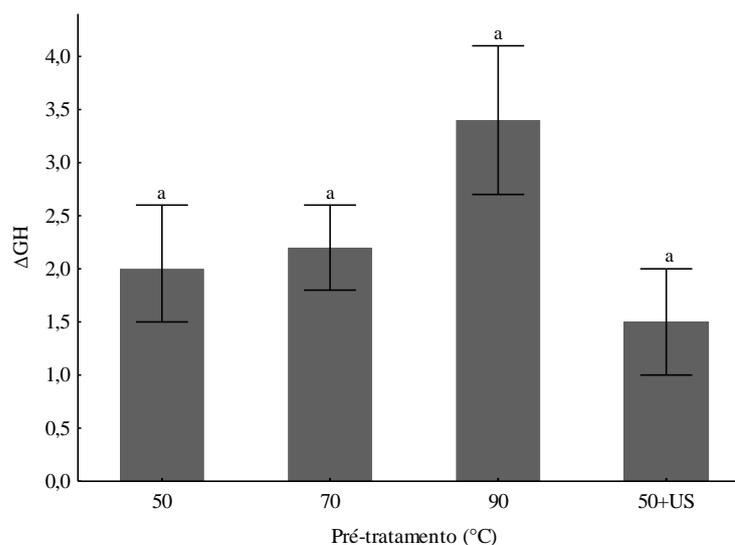
A influência do pré-tratamento ao substrato PSB também foi observado nos ensaios 2 e 4 (Tabela 1 e Figura 4). No ensaio 2 onde foi realizado o pré-tratamento, este apresentou grau de hidrólise maior, igual a $5,8 \pm 0,2\%$ e no ensaio sem pré-tratamento, o grau de hidrólise foi igual a $1,6 \pm <0,1\%$, mostrando que o aquecimento provavelmente promoveu a desestabilização da estrutura e exposição de grupamentos internos do plasma, disponibilizando-os à ação da protease (WANASUNDARA et al., 2002). Com base no valor de grau de hidrólise e tempo de reação, foi evidenciado que as proteínas do plasma na forma nativa foram pouco susceptíveis à hidrólise pela protease P45.

Na sequência foram aplicados diferentes pré-tratamentos ao substrato plasma para verificar a influência dos mesmos no grau de hidrólise. A Figura 5 apresenta a variação dos valores de grau de hidrólise entre ensaio e controle, no tempo de 8 h, para as condições de pré-tratamento em que o plasma foi submetido. Em relação à forma nativa, a variação do grau de hidrólise foi maior independentemente do tipo de pré-tratamento aplicado.

A partir dos resultados apresentados foi possível concluir que para todos os pré-tratamentos aos quais o substrato foi submetido, a variação do grau de hidrólise para o tempo de reação (8 h) não diferiram estatisticamente ($p > 0,05$). Os valores do erro padrão foram altos

em relação ao valor da resposta (Δ GH) pois o efeito da temperatura na molécula proteica ocorre de forma aleatória, não contribuindo para a repetibilidade dos ensaios.

Figura 5 – Variação (Δ GH) do grau de hidrólise entre ensaio e controle (sem extrato enzimático) no tempo de 8 h de hidrólise enzimática para os pré-tratamentos aplicados ao plasma. Letras minúsculas iguais indicam que não há diferença significativa entre as médias dos ensaios ($p>0,05$). Média \pm erro padrão.



Nas condições de pré-tratamento aplicadas houve uma modificação aleatória na cadeia estrutural do substrato, abrindo suas cadeias peptídicas, de forma que a protease P45 conseguiu atuar nas ligações peptídicas das proteínas do plasma. Em vista do menor gasto energético, o pré-tratamento de 50 °C foi selecionado para dar continuidade aos estudos.

No estudo de Wanasundara et al. (2002), o pré-tratamento térmico foi avaliado nas proteínas desfibrinadas de plasma bovino, nas temperaturas de 60, 70, 80, 90 °C por 20 min. Os resultados de grau de hidrólise do substrato pré-tratado foram comparados em relação ao ensaio sem pré-tratamento, sendo que a reação ocorreu por 4 h. Os autores apresentaram como melhor eficiência de hidrólise a proteína pré-tratada a 90 °C por 20 min e observaram que a partir da temperatura de 80 °C as proteínas do plasma coagularam, formando géis, fenômeno que também foi observado no presente estudo.

Nos estudos de Dalagnol et al. (2017) utilizando uma cuba ultrassônica com a mesma frequência do presente estudo (40 kHz), avaliaram o efeito da sonicação na solução dos respectivos substratos na atividade enzimática da pectinase, xilanase e celulase, mostrando efeito positivo e mais pronunciado quando o substrato xilana foi pré-tratado por sonicação por 5 min, promovendo melhoramento de até 25% da atividade enzimática da xilanase. Assim, foi

evidenciado que a presente técnica foi promissora, mostrando efeito positivo das ondas ultrassônicas na modificação das cadeias do substrato proteico facilitando a atuação da enzima, porém faz-se necessário que mais estudos sejam explorados.

3.3 MAXIMIZAÇÃO DO GRAU DE HIDRÓLISE NA HIDRÓLISE DAS PROTEÍNAS DE PLASMA BOVINO

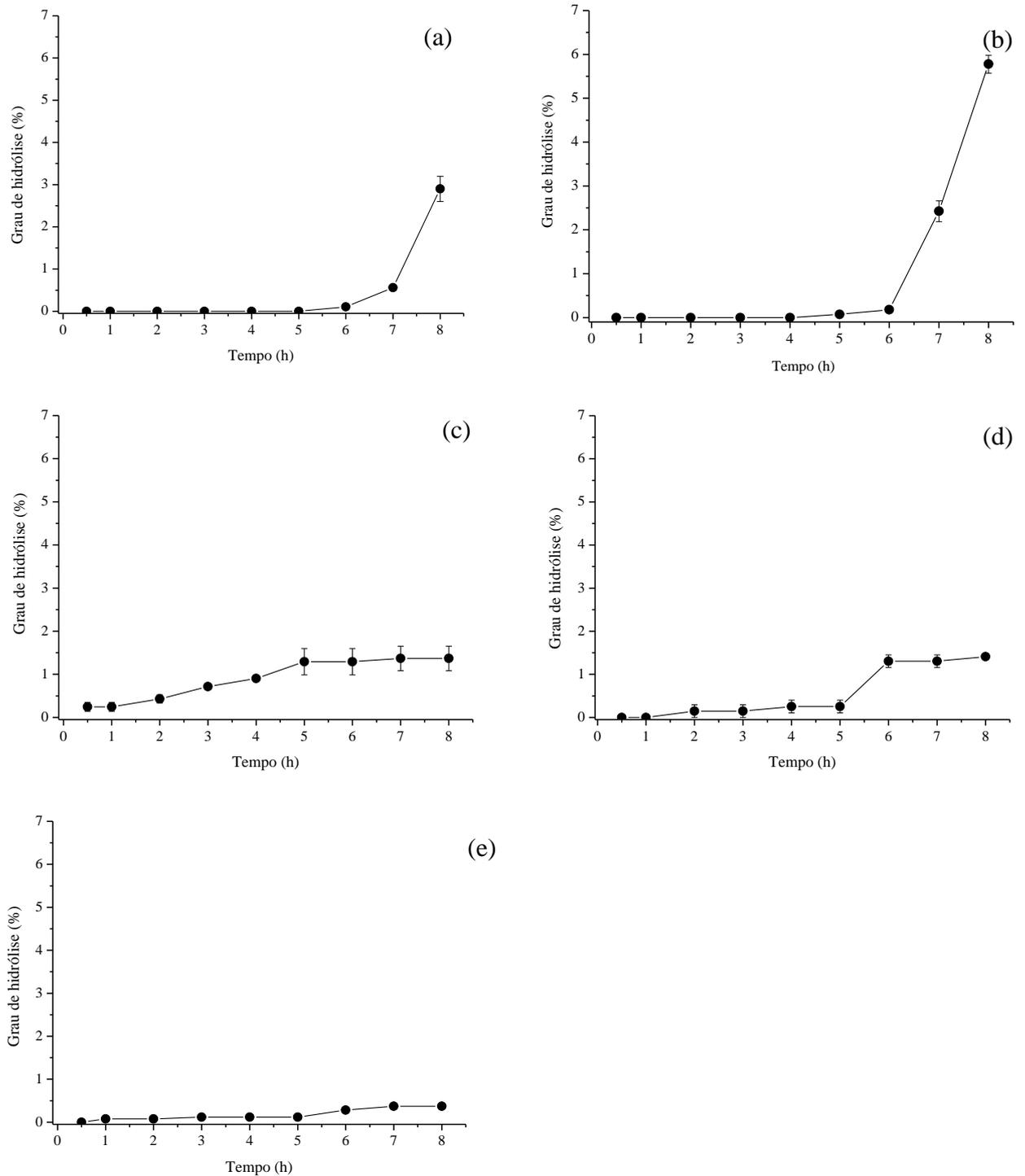
O monitoramento do grau de hidrólise é usado para avaliar o quanto da proteína foi hidrolisada na reação enzimática, estando relacionado com a ação catalítica da enzima empregada (HSU, 2010). A maximização dos parâmetros reacionais faz-se importante na obtenção de peptídeos, com forte influência do grau de hidrólise e consequentemente na massa molar dos peptídeos e nas propriedades biológicas (SARMADI; ISMAIL, 2010). A influência dos parâmetros de reação, temperatura e concentração de proteínas do substrato, sobre o grau de hidrólise do plasma de sangue bovino foi avaliada, sendo os resultados apresentados nas Figuras 6 e 7.

Na Figura 6 estão apresentadas as cinéticas de hidrólise variando a temperatura sobre a resposta grau de hidrólise do plasma sanguíneo. Durante 8 h de reação, o aumento da temperatura de 35 °C para 40 °C promoveu o aumento do GH de $2,9 \pm 0,3\%$ para $5,8 \pm 0,2\%$. Nas temperaturas de 45 °C e 50 °C o GH permaneceu em um valor próximo, em torno de 1,4%. A maior temperatura estudada, 55 °C, apresentou o menor valor de GH, igual a $0,4 \pm <0,1\%$.

Apesar da meia vida da protease adicionada de cálcio ter sido maior na temperatura de 35 °C, foi observado que o potencial de catálise da enzima em hidrolisar as proteínas do plasma foi menos efetivo se comparado com a temperatura de 40 °C, sendo esta temperatura a mais adequada para a continuidade dos estudos.

Na reação a 45 e 50 °C foi observado que a reação estabilizou em tempo inferior a 8 h, embora não apresentando o maior grau de hidrólise entre as temperaturas estudadas. Nas temperaturas de 35 e 40 °C, a reação não foi finalizada nas 8 h mostrando, provavelmente, que a hidrólise ainda estava acontecendo pela atuação catalítica da protease, corroborando com o resultado observado na Tabela 2, em que nestas condições não tinha sido atingido a meia vida da enzima. Além disso, o aumento da velocidade de reação com o aumento da temperatura de 35 °C para 40 °C foi influenciado pela energia de ativação. Nas temperaturas mais altas o GH foi baixo provavelmente em decorrência de desnaturação térmica da enzima (ZHENG et al., 2013).

Figura 6 – Influência da temperatura no grau de hidrólise do plasma de sangue na reação catalisada por protease P45. Condições da reação: pré-aquecimento do plasma a 50 °C/20 min, concentração de substrato 25 g/L, relação enzima/substrato 600U/g de proteína, pH 7,5 e tempo 8 h. (a) 35 °C (b) 40 °C (c) 45 °C (d) 50 °C (e) 55 °C. Média \pm erro padrão.



Diferente da literatura consultada, as curvas de hidrólise apresentadas neste estudo foram caracterizadas por uma fase inicial lenta. A segunda fase da hidrólise, após aproximadamente 5 h de reação, foi caracterizada pelo aumento da taxa, provocado pela quebra intensa das ligações peptídicas e conseqüentemente redução do valor do pH. Com a adição de hidróxido de sódio para manter o valor de pH constante, os prótons formados pela dissociação completa do grupamento carboxila terminal foram neutralizados (FIGUEROA; ZAPATA; GUTIÉRREZ, 2012).

O aumento da temperatura pode ter provocado a desnaturação térmica da protease P45. No estudo de Figueroa, Zapata e Gutiérrez (2012) foi verificado que durante a hidrólise de plasma bovino catalisado por alcalase 2,4 L, nos parâmetros reacionais temperatura (55 °C), pH (8,0), concentração enzimática (0,4 AU/L) e concentração de substrato (4 g/L), o fenômeno de desativação enzimática térmica demonstrou ser influente no valor do grau de hidrólise (12%) após 60 min de reação. No estudo, os autores demonstraram que a adição da enzima fresca ao hidrolisado depois de 30 min de reação promoveu o aumento para 14,2% do grau de hidrólise com 60 min de reação.

Como observado na Figura 7, o aumento concentração de substrato de 10 g/L para 17,5 g/L conduziu a um aumento no GH de $1,9 \pm <0,1\%$ para $16,0 \pm 1,8\%$, nas 8 h de reação. As concentrações acima de 17,5 g/L, apresentaram um efeito negativo sobre o valor do GH, isto é, foram diminuindo progressivamente, com valor de $2,4 \pm 0,2\%$ na concentração de 40 g/L de substrato. A menor taxa de reação provavelmente ocorreu em vista da maior quantidade de moléculas de plasma bovino a serem hidrolisadas frente a quantidade de moléculas de protease disponíveis para a catálise (LEHNINGER et al., 1995), após transcorrido as 8 h de reação.

No presente estudo, para a maximização do grau de hidrólise enzimática as condições selecionadas foram: pré-tratamento do substrato sob aquecimento em banho maria a 50 °C por 20 min, temperatura de reação a 40 °C, concentração de proteínas do substrato igual a 17,5 g/L, relação enzima/substrato de 600 U/g de proteína e pH 7,5.

A hidrólise apresentada na Figura 8 foi conduzida a fim de verificar o tempo de reação em que o grau de hidrólise tornou-se constante, isto é, até não haver mais a variação do valor do pH ao longo do tempo, evidenciado como o término da reação e caracterizado pelo máximo valor de GH, igual a $39,0 \pm 0,8\%$ para o tempo determinado de 12 h.

Zheng et al. (2013) otimizaram as condições de hidrólise das proteínas de células de sangue suíno catalisado por protease neutra de *Bacillus subtilis* EC 2.4.24 apresentando o valor de GH $35,7 \pm 0,1\%$ na temperatura de (45 °C), concentração de substrato (1,0%), pH 6,5, E/S 0,11 e tempo de 12 h.

Figura 7 – Influência da concentração de proteínas no grau de hidrólise do plasma de sangue na reação catalisada por protease P45. Condições da reação: pré-aquecimento do plasma a 50 °C/20 min, temperatura 40 °C, relação enzima/substrato 600 U/g de proteína, pH 7,5 e tempo 8 h. (a) 10 g/L (b) 13,7 g/L (c) 17,5 g/L (d) 25 g/L (e) 32,5 g/L (f) 40 g/L. Média \pm erro padrão.

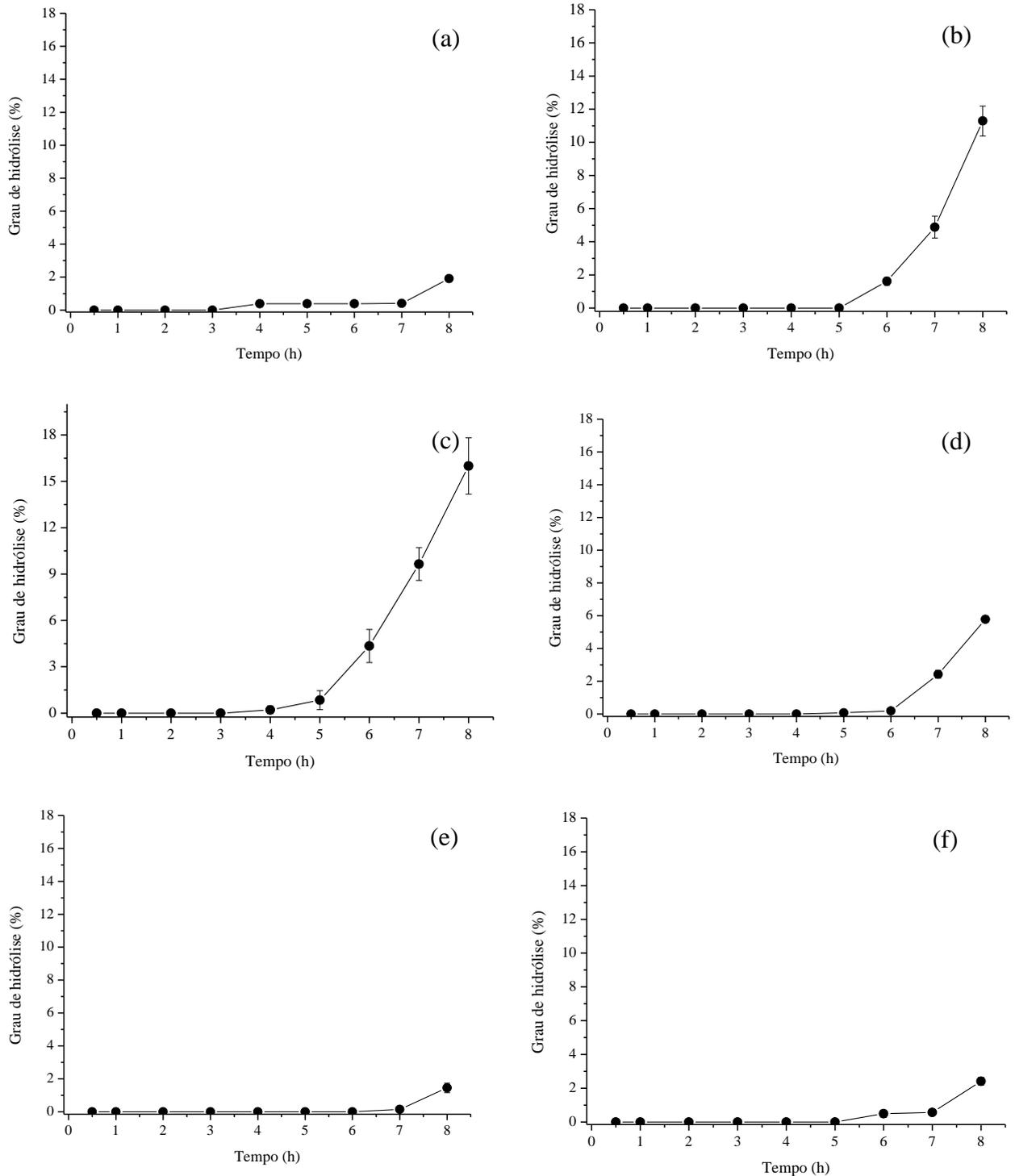
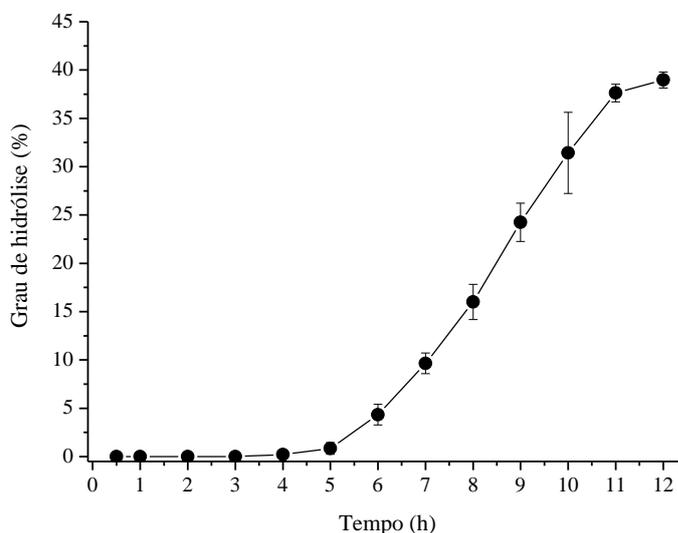


Figura 8 – Maximização da hidrólise enzimática do plasma de sangue bovino pré-tratado. Condições da reação: pré-aquecimento do substrato a 50 °C/20 min, concentração de proteínas do substrato 17,5 g/L, temperatura 40 °C, relação enzima/substrato 600U/g de proteína, pH 7,5. Média ± desvio padrão.



No estudo de Liu, Aisa e Yili (2018) as condições de hidrólise de abomaso de ovelha catalisada por uma papaína comercial foram otimizadas por metodologia de superfície de resposta, conforme seguem: temperatura de hidrólise (46 °C), tempo de hidrólise (3,8 h) e razão E/S (1,5%), com grau de hidrólise de 16,9% sem diferir estatisticamente do valor predito, obtendo dois peptídeos com potencial antioxidante.

Salgado et al. (2011) verificaram que os peptídeos obtidos da proteína do plasma bovino na reação enzimática catalisada por protease ácida em 2 h de reação com grau de hidrólise de 19,4%, promoveram o aumento da capacidade antioxidante de filmes proteicos a base de proteínas de soja e girassol. De acordo com os estudos prévios citados, os valores de grau de hidrólise foram inferiores ao apresentado neste estudo, no entanto faz-se necessário dar continuidade às análises dos hidrolisados para verificar se a sequência de peptídeos obtidas apresenta propriedades biológicas para uma futura aplicação na indústria de alimentos, química ou farmacêutica.

4 CONCLUSÃO

A adição de CaCl₂ (50 mmol/L) ao extrato enzimático de protease P45 promoveu o aumento da estabilidade enzimática e foi promissora na catálise da hidrólise das proteínas do

plasma de sangue bovino, promovendo o aumento no grau de hidrólise. O plasma bovino na forma nativa foi menos susceptível à hidrólise pela protease P45, necessitando que seja aplicado um pré-tratamento. Os pré-tratamentos estudados não apresentaram diferença significativa no valor do grau de hidrólise ($p > 0,05$), sendo selecionado o aquecimento térmico em banho maria a 50 °C por 20 min. No estudo de maximização do grau de hidrólise as variáveis temperatura e concentração de proteínas do substrato foram estabelecidas em 40 °C e 17,5 g/L, respectivamente. As demais condições foram: relação enzima/substrato (600 U/g de proteína), pH (7,5) no tempo de 12 h, alcançando o valor de grau de hidrólise de $39,0 \pm 0,8\%$. Na sequência é importante a determinação de atividades biológicas do hidrolisado para obter mais informações a respeito destes peptídeos e destinar uma futura aplicação industrial.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADLER-NISSEN, J. **Enzymic hydrolysis of food proteins**. Elsevier Applied Science Publishers Ltd., London, 1986.

ALAO, B. O.; FALOWO, A. B.; CHULAYO, A.; MUCHENJE, V. The potential of animal by-products in food systems: production, prospects and challenges. **Sustainability**, v. 9, n. 7, p. 1089, 2017.

AOAC. **Official methods of analysis**. 17 th ed. Maryland, USA: Association of Official Analytical Chemistry, 2000.

BAH, C. S.; BEKHIT, A. E.-D. A.; CARNE, A.; MCCONNELL, M. A. Production of bioactive peptide hydrolysates from deer, sheep and pig plasma using plant and fungal protease preparations. **Food Chemistry**, v. 176, p. 54-63, 2015.

BAH, C. S.; BEKHIT, A. E. D. A.; CARNE, A.; MCCONNELL, M. A. Slaughterhouse blood: an emerging source of bioactive compounds. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 12, n. 3, p. 314-331, 2013.

BAH, C. S.; BEKHIT, A. E. D. A.; CARNE, A.; MCCONNELL, M. A. Composition and biological activities of slaughterhouse blood from red deer, sheep, pig and cattle. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 96, n. 1, p. 79-89, 2016a.

BAH, C. S.; CARNE, A.; MCCONNELL, M. A.; MROS, S.; BEKHIT, A. E.-D. A. Production of bioactive peptide hydrolysates from deer, sheep, pig and cattle red blood cell fractions using plant and fungal protease preparations. **Food Chemistry**, v. 202, p. 458-466, 2016b.

BORBA, T. M.; MACHADO, T. B.; BRANDELLI, A.; KALIL, S. J. Thermal stability and catalytic properties of protease from *Bacillus* sp. P45 active in organic solvents and ionic liquid. **Biotechnology Progress**, v. 34, n. 5, p. 1102-1108, 2018.

- DALAGNOL, L. M.; SILVEIRA, V. C.; DA SILVA, H. B.; MANFROI, V.; RODRIGUES, R. C. Improvement of pectinase, xylanase and cellulase activities by ultrasound: effects on enzymes and substrates, kinetics and thermodynamic parameters. **Process Biochemistry**, v. 61, p. 80-87, 2017.
- DAMODARAN, S.; KINSELLA, J. E. The effects of neutral salts on the stability of macromolecules. A new approach using a protein-ligand binding system. **Journal of Biological Chemistry**, v. 256, n. 7, p. 3394-3398, 1981.
- DAROIT, D. J.; CORRÊA, A. P. F.; BRANDELLI, A. Keratinolytic potential of a novel *Bacillus* sp. P45 isolated from the Amazon basin fish *Piaractus mesopotamicus*. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 63, n. 3, p. 358-363, 2009.
- DAROIT, D. J.; CORRÊA, A. P. F.; BRANDELLI, A. Production of keratinolytic proteases through bioconversion of feather meal by the Amazonian bacterium *Bacillus* sp. P45. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 65, n. 1, p. 45-51, 2011.
- DAROIT, D. J.; SANT'ANNA, V.; BRANDELLI, A. Kinetic stability modelling of keratinolytic protease P45: influence of temperature and metal ions. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 165, p. 1740-1753, 2011.
- DOBASHI, P. R. N.; BEPPU, O. S.; DOS SANTOS, L. Distúrbios do equilíbrio ácido-básico em sangue estocado. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 6, n. 4, p. 173-176, 1980.
- DUARTE, R. T.; CARVALHO SIMÕES, M. C.; SGARBIERI, V. C. Bovine blood components: fractionation, composition, and nutritive value. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, n. 1, p. 231-236, 1999.
- EIJSSINK, V.; MATTHEWS, B.; VRIEND, G. The role of calcium ions in the stability and instability of a thermolysin-like protease. **Protein Science**, v. 20, n. 8, p. 1346-1355, 2011.
- FAKHFAKH, N.; KANOUN, S.; MANNI, L.; NASRI, M. Production and biochemical and molecular characterization of a keratinolytic serine protease from chicken feather-degrading *Bacillus licheniformis* RPK. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 55, n. 4, p. 427-436, 2009.
- FIGUEROA, O. A.; ZAPATA, J. É.; GUTIÉRREZ, G. A. Modelamiento de la cinética de hidrólisis enzimática de proteínas del plasma bovino. **Revista EIA**, v. 9, n. 17, p. 71-84, 2012.
- FU, Y.; LIU, J.; HANSEN, E. T.; BREDIE, W. L.; LAMETSCH, R. Structural characteristics of low bitter and high umami protein hydrolysates prepared from bovine muscle and porcine plasma. **Food Chemistry**, v. 257, p. 163-171, 2018.
- FUKUDA, K.; HASUDA, K.; ODA, T.; YOSHIMURA, H.; MURAMATSU, T. Novel extracellular alkaline metalloendopeptidases from *Vibrio* sp. NUF-BPP1: purification and characterization. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 61, n. 1, p. 96-101, 1997.
- GHORBEL, B.; SELLAMI-KAMOUN, A.; NASRI, M. Stability studies of protease from *Bacillus cereus* BG1. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 32, n. 5, p. 513-518, 2003.

- GOHEL, S.; SINGH, S. Thermodynamics of a Ca²⁺ dependent, highly thermostable and detergent compatible purified alkaline serine protease from *Nocardiosis xinjiangensis* strain OM-6. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 113, p. 565-574, 2018.
- GONÇALVES, S. M. **Hidrólise de caseína e plasma de sangue bovino com protease de *Bacillus sp. P45***. 2016. 94 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química), Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande.
- HSU, K.-C. Purification of antioxidative peptides prepared from enzymatic hydrolysates of tuna dark muscle by-product. **Food Chemistry**, v. 122, n. 1, p. 42-48, 2010.
- JANATI-FARD, F.; HOUSAINDOKHT, M. R.; MONHEMI, H.; NAKHAEIPOUR, A. How a multimeric macromolecule is affected by divalent salts? Experimental and simulation study. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 106, p. 284-292, 2018.
- LAFARGA, T.; ALUKO, R. E.; RAI, D. K.; O'CONNOR, P.; HAYES, M. Identification of bioactive peptides from a papain hydrolysate of bovine serum albumin and assessment of an antihypertensive effect in spontaneously hypertensive rats. **Food Research International**, v. 81, p. 91-99, 2016.
- LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M.; SIMÕES, A. A.; LODI, W. R. N. **Princípios de Bioquímica**, 2 ed., São Paulo, Sarvier, 1995.
- LEMES, A. C. **Obtenção e caracterização de queratinase de *Bacillus sp. P45* a partir de coprodutos e aplicação na produção de queijos cremosos enriquecidos com chia e quinoa**. 2015. 187 f. Tese (Doutorado em Engenharia e Ciência de Alimentos), Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande.
- LIU, B.; AISA, H. A.; YILI, A. Isolation and identification of two potential antioxidant peptides from sheep abomasum protein hydrolysates. **European Food Research and Technology**, p. 1-11, 2018.
- LIU, Q.; KONG, B.; XIONG, Y. L.; XIA, X. Antioxidant activity and functional properties of porcine plasma protein hydrolysate as influenced by the degree of hydrolysis. **Food Chemistry**, v. 118, n. 2, p. 403-410, 2010a.
- LIU, X.; SONG, C.; CHEN, R.; JIANG, X.; JIN, Y.; ZOU, H. Identification of angiotensin I-converting enzyme inhibitors in peptides mixture of hydrolyzed red deer plasma with proteomic approach. **Chinese Journal of Chemistry**, v. 28, n. 9, p. 1665-1672, 2010b.
- MULLEN, A. M.; ÁLVAREZ, C.; ZEUGOLIS, D. I.; HENCHION, M.; O'NEILL, E.; DRUMMOND, L. Alternative uses for co-products: harnessing the potential of valuable compounds from meat processing chains. **Meat science**, v. 132, p. 90-98, 2017.
- ORTEGA, N.; DE DIEGO, S.; RODRÍGUEZ-NOGALES, J. M.; PEREZ-MATEOS, M.; BUSTO, M. D. Kinetic behaviour and thermal inactivation of pectinlyase used in food processing. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 39, n. 6, p. 631-639, 2004.

- PEREIRA, E. V. **Determinação da atividade e da estabilidade termodinâmica da isoforma α -tripsina bovina em meios aquo-orgânicos.** 2015. 70 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica e Farmacologia), Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória.
- RAHMAN, R. N. Z. R. A.; GEOK, L. P.; BASRI, M.; SALLEH, A. B. An organic solvent-stable alkaline protease from *Pseudomonas aeruginosa* strain K: Enzyme purification and characterization. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, n. 7, p. 1484-1491, 2006.
- RU, M. T.; HIROKANE, S. Y.; LO, A. S.; DORDICK, J. S.; REIMER, J. A.; CLARK, D. S. On the salt-induced activation of lyophilized enzymes in organic solvents: effect of salt kosmotropicity on enzyme activity. **Journal of the American Chemical Society**, v. 122, n. 8, p. 1565-1571, 2000.
- SALA, L.; GAUTÉRIO, G. V.; YOUNAN, F. F.; BRANDELLI, A.; MORAES, C. C.; KALIL, S. J. Integration of ultrafiltration into an aqueous two-phase system in the keratinase purification. **Process Biochemistry**, v. 49, n. 11, p. 2016-2024, 2014.
- SALGADO, P. R.; FERNÁNDEZ, G. B.; DRAGO, S. R.; MAURI, A. N. Addition of bovine plasma hydrolysates improves the antioxidant properties of soybean and sunflower protein-based films. **Food Hydrocolloids**, v. 25, n. 6, p. 1433-1440, 2011.
- SARMADI, B. H.; ISMAIL, A. Antioxidative peptides from food proteins: a review. **Peptides**, v. 31, n. 10, p. 1949-1956, 2010.
- SEO, H.-W.; JUNG, E.-Y.; GO, G.-W.; KIM, G.-D.; JOO, S.-T.; YANG, H.-S. Optimization of hydrolysis conditions for bovine plasma protein using response surface methodology. **Food Chemistry**, v. 185, p. 106-111, 2015.
- TOLDRÁ, F.; MORA, L.; REIG, M. New insights into meat by-product utilization. **Meat Science**, v. 120, p. 54-59, 2016.
- WANASUNDARA, P. K. J. P. D.; AMAROWICZ, R.; PEGG, R.; SHAND, P. Preparation and characterization of hydrolyzed proteins from defibrinated bovine plasma. **Journal of Food Science**, v. 67, n. 2, p. 623-630, 2002.
- ZHANG, J.; WANG, J.; ZHAO, Y.; LI, J.; LIU, Y. Study on the interaction between calcium ions and alkaline protease of *Bacillus*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 124, p. 121-130, 2019.
- ZHENG, Y.; CHEN, Q.; SHAN, A.; ZHANG, H. Optimisation of the enzymatic hydrolysis of blood cells with a neutral protease. **BioMed Research International**, v. 2013, p. 1-10, 2013.

ARTIGO 3

ATIVIDADES BIOLÓGICAS DO HIDROLISADO DE PLASMA BOVINO OBTIDO PELA
AÇÃO DE PROTEASE MICROBIANA ESTABILIZADA EM CÁLCIO

RESUMO

A proteólise enzimática pode ser empregada para liberar peptídeos bioativos, trazendo potenciais benefícios na manutenção da saúde e por fornecer oportunidades comerciais. Neste estudo o plasma de sangue bovino foi hidrolisado por ação da protease P45 estabilizada em cálcio e fracionado por ultrafiltração nas membranas de 10 kDa, 5 kDa e 1 kDa. O hidrolisado não ultrafiltrado e as frações foram avaliados *in vitro* frente as atividades antioxidantes, prebiótica, antimicrobiana e anti-hipertensiva. Os resultados mostraram que o hidrolisado e frações não foram capazes de capturar o radical DPPH, a atividade de captura do radical ABTS do hidrolisado não ultrafiltrado foi igual a $46,6 \pm 1,3 \mu\text{mol TE/gL}$, não diferindo estatisticamente da fração >10 kDa (F1). A fração 1-5 kDa (F3) apresentou $93,0 \pm <0,1\%$ de poder quelante do ferro, sem diferir estatisticamente da fração 5-10 kDa (F2). Os peptídeos que contribuem para os mecanismos de ação da atividade antimicrobiana provavelmente não estão presentes na proteína do plasma ou não se tornaram acessíveis/disponíveis com a aplicação da protease P45. Os resultados de atividade prebiótica revelaram que a fração F1 foi o melhor substrato para o crescimento de *Bifidobacterium lactis* BB-12[®] frente ao substrato padrão glicose. O resultado de atividade anti-hipertensiva mostrou percentual de inibição da enzima conversora de angiotensina de $32,2 \pm 0,6\%$, para a fração F2. A partir dos resultados de bioatividade, as frações do hidrolisado de plasma de sangue bovino apresentaram peptídeos com atividade antioxidante, anti-hipertensiva e prebiótica.

Palavras-chave: Plasma sanguíneo. Protease bacteriana. Fracionamento. Atividade prebiótica.

Peptídeos bioativos. Atividade anti-hipertensiva.

1 INTRODUÇÃO

A indústria de alimentos tem mostrado grande interesse por moléculas com efeito bioativo, principalmente pela crescente consciência pelo estilo de vida saudável e pelos efeitos benéficos nos alimentos processados. A produção de alimentos funcionais contendo peptídeos biologicamente ativos é focado em melhorar a sua biodisponibilidade em relação à sua fonte natural e criar novos alimentos através da adição e/ou fortificação de frações isoladas ou enriquecidas de peptídeos bioativos. Dentre os diversos benefícios que os peptídeos trazem são citados as atividades antioxidante, antimicrobiana, anti-hipertensiva e inibitória da enzima dipeptidil peptidase IV (ADJE et al., 2011; CORRÊA et al., 2014; BAH et al., 2016a; BAH et al., 2016b; LAFARGA et al., 2016). O uso de peptídeos bioativos como ingredientes funcionais e agentes farmacêuticos é de grande relevância, não somente pelo significativo efeito na manutenção da saúde, mas também por fornecer oportunidades comerciais para diversas empresas.

O sangue representa 4% do peso de animais de abatedouro e, dependendo do destino final, pode tornar-se um problema para a indústria cárnea em vista das quantidades geradas no processo e a alta carga poluente ao ambiente. O interesse por pesquisas de novas aplicações ao sangue é crescente, principalmente por plantas frigoríficas. De fato, o alto conteúdo proteico torna o sangue útil na indústria de alimentos para aumentar o valor nutricional final de alimentos, aumentar a ligação com a água e em vista da sua capacidade emulsificante (HSIEH; OFORI, 2011). O sangue é composto por células suspensas e plasma, sendo que o plasma contém em torno de 6-8% (b.u.) de proteínas, compreendidas por fibrinogênio, globulinas e albuminas (BAH et al., 2013).

Proteases comerciais têm sido aplicadas em substratos proteicos gerando hidrolisados com potenciais bioatividades (LIU et al., 2010; ALEMÁN et al., 2011; BAH et al., 2015; LIU; AISA; YILI, 2018), porém há a necessidade de estudar novos preparados enzimáticos e assim entender suas especificidades de hidrólise e as potencialidades dos peptídeos obtidos. Peptidases microbianas são de interesse em vista do alto rendimento de produção e os micro-organismos podem ser cultivados em meios de baixo custo (DAROIT; CORRÊA; BRANDELLI, 2009). Particularmente, a ação de proteases de *Bacillus* em reações de hidrólise foi capaz de gerar peptídeos com propriedades antioxidantes (HIDALGO et al., 2015; HIDALGO et al., 2012; DOS SANTOS AGUILAR; DE CASTRO; SATO, 2018),

antimicrobiana (HIDALGO et al., 2015; DAROIT et al., 2012) e anti-hipertensiva (CORRÊA et al., 2014) apresentando potencial biotecnológico para aplicações em processos industriais.

As atividades biológicas são dependentes da massa molar, da sequência de aminoácidos e do grau de hidrólise, necessitando que seja realizado uma etapa de fracionamento após a hidrólise enzimática para separar e concentrar os peptídeos de menores tamanhos e mais reativos. Estudos tem mostrado efeito satisfatório do fracionamento na obtenção de peptídeos com atividades biológicas (LIU, 2010; ZHANG; LI; ZHOU, 2010; CENTENARO, 2014; LATORRES, 2018; LAFARGA et al., 2016).

Este estudo está sendo proposto considerando a necessidade do desenvolvimento de novos compostos que possam trazer impacto positivo no para melhoramento da saúde, aliado à uma nova aplicabilidade e aumento do valor agregado ao sangue gerado em abatedouros. Neste contexto, o objetivo foi fracionar o hidrolisado de plasma sanguíneo e determinar o potencial biológico dos peptídeos, incluindo a atividade prebiótica, que até então foi exibida por hidrolisados proteicos oriundos de lácteos (LIEPKE et al., 2002; MIKKELSEN et al., 2006; ODA et al., 2013) e músculo suíno (ARIHARA; ISHIKAWA; ITOH, 2006).

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 MATERIAL

O radical ABTS (2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6- ácido sulfônico)), solução de DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila), padrão Trolox, ferrozina e a enzima conversora de angiotensina (de pulmão de coelho) foram adquiridas da Sigma Aldrich. As membranas de 10 kDa (celulose regenerada) adquiridas da Millipore, a de 5 kDa (celulose regenerada) e 1 kDa (poliestersulfona) adquiridas da Sartorius. O gerador de anaerobiose, Anaerobac, adquirido da Probac do Brasil. Os demais reagentes de grau analítico foram obtidos no comércio local.

2.2 CULTIVO BACTERIANO E PURIFICAÇÃO ENZIMÁTICA

A enzima foi produzida por cultivo submerso de *Bacillus* sp. P45, como descrito por Daroit, Corrêa e Brandelli (2011). O meio mineral otimizado foi composto pelos sais (g/L): NaCl (0,5), K₂HPO₄ (0,3), KH₂PO₄ (0,4), NH₄Cl (1,9) e farinha de penas (43). As condições do cultivo foram pH 7,0, 1% v/v de inóculo com suspensão bacteriana (DO₆₀₀ = 0,5) utilizando uma incubadora rotatória a 125 rpm, 30 °C por 48 h. Após o cultivo, o extrato foi

centrifugado ($5000 \times g$, 20 min) e a enzima contida no sobrenadante foi submetida ao protocolo de purificação parcial (SALA et al., 2014), utilizando um sistema aquoso bifásico integrado ao processo de diafiltração/ultrafiltração. O extrato foi liofilizado e armazenado a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$.

2.3 HIDRÓLISE ENZIMÁTICA

O substrato proteico, plasma de sangue, foi obtido por centrifugação a $4700 \times g$ por 10 min a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, a partir do sangue bovino adicionado de solução anticoagulante ACD (citrato ácido dextrose), na proporção de 0,15:1 de sangue (DOBASHI; BEPPU; DOS SANTOS, 1980). Posteriormente o plasma foi liofilizado e padronizado o tamanho de partícula em 28 mesh.

O substrato solubilizado em água foi pré-tratado com aquecimento a $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 20 min. A hidrólise enzimática de plasma de sangue bovino foi realizada a $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ na concentração de proteínas de $17,5\text{ g/L}$. A reação foi iniciada pela adição da protease P45 contendo 50 mmol/L de CaCl_2 na relação enzima/substrato de 600 U/g de proteína. O tempo de hidrólise foi de 12 h e pH 7,5. A determinação do grau de hidrólise foi estimada pelo método de pH-*stat* seguindo Adler-Nissen (1986). Ao final da reação, a enzima foi termicamente inativada a $85\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 5 min, os hidrolisados foram resfriados e após congelados.

2.4 FRACIONAMENTO DOS HIDROLISADOS

Os hidrolisados foram centrifugados a $4700 \times g$ por 20 min para remoção do material em suspensão e os sobrenadantes foram fracionados utilizando uma célula de ultrafiltração (Advantec, UHP-76, Japão) com agitação magnética e capacidade de 300 mL (CENTENARO et al., 2014). As membranas de 76 mm e massa molar de corte de 10 kDa, 5 kDa e 1 kDa foram utilizadas no fracionamento. No processo de filtração a pressão de $4,2\text{ kgf/cm}^2$ foi aplicada com gás nitrogênio. As frações obtidas foram F1 ($>10\text{ kDa}$), F2 (5-10 kDa) e F3 (1-5 kDa). As amostras foram liofilizadas para a determinação das atividades biológicas.

2.5 DETERMINAÇÃO DAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS

Na determinação das atividades antioxidante, antimicrobiana e anti-hipertensiva as amostras do hidrolisado não ultrafiltrado e das frações foram utilizadas na concentração de 30 mg/mL .

2.5.1 Atividade antioxidante

2.5.1.1 Capacidade de sequestro do radical ABTS

O radical ABTS foi produzido através da reação da solução estoque de ABTS (7 mmol/L) e persulfato de potássio (140 mmol/L). No ensaio o radical foi diluído com tampão fosfato-salino (5 mmol/L, pH 7,4) até a absorvância de $0,7 \pm 0,02$ a 734 nm. Uma alíquota de 10 μ L de amostra foi adicionada à 1 mL da solução diluída, após 6 min de reação foi realizado a leitura espectrofotométrica a 734 nm (RE et al., 1999). As análises foram realizadas em triplicata e os resultados foram apresentados como equivalente de Trolox (TE) em μ mol/L por g de amostra.

2.5.1.2 Capacidade de sequestro do radical DPPH

A atividade antioxidante foi determinada utilizando o reagente DPPH como radical livre. Na ausência de luz, 100 μ L de amostra foi colocado em tubos contendo 3,9 mL de DPPH (60 μ mol/L), dissolvidos em metanol e homogeneizados por agitação. Após 45 min de reação foi realizado a leitura espectrofotométrica a 515 nm. Uma curva padrão de DPPH foi previamente construída nas concentrações de 50 a 500 μ mol/L de Trolox (BRAND-WILLIAMS; CUVELIER; BERSET, 1995).

2.5.1.3 Poder quelante do ferro

O poder quelante do ferro foi determinado através do agente cromogênico ferrozina. Uma alíquota de 1 mL de amostra foi adicionado a 3,7 mL de água destilada. Sulfato ferroso (0,1 mL, 2 mmol/L) e a solução de ferrozina (0,2 mL, 5 mmol/L) foram adicionados aos tubos, com agitação por 15 s. Após 10 min de reação foi realizado a leitura espectrofotométrica das amostras a 562 nm (CHANG; WU; CHIANG, 2007). As análises foram realizadas em triplicata e a porcentagem quelante do ferro foi calculada de acordo com a Equação 1.

$$\text{Atividade Antioxidante (\%)} = \left(1 - \frac{Abs_{amostra}}{Abs_{branco}} \right) \times 100 \quad (1)$$

onde $Abs_{amostra}$ é a absorvância das amostras dos hidrolisados e Abs_{branco} é a absorvância dos reagentes.

2.5.2 Atividade antimicrobiana

2.5.2.1 Atividade antibacteriana

A atividade antibacteriana foi determinada seguindo Motta e Brandelli (2002), com triplicata de ensaio. As bactérias indicadoras testadas foram *Bacillus cereus* ATCC 9634,

Escherichia coli ATCC 8739, *Listeria monocytogenes* ATCC 7644, *Salmonella enteritidis* SE86 e *Staphylococcus aureus* ATCC 1901. Os micro-organismos indicadores, na concentração de 10^8 UFC/mL (por densidade ótica) em NaCl 8,5 g/L, foram inoculados com um swab estéril em placas contendo ágar BHI. As amostras foram solubilizadas em água destilada e filtradas em membrana de 0,22 μ m. Alíquotas de 20 μ L foram colocadas no quadrante de cada placa contendo o inóculo da cepa indicadora e as placas foram incubadas em estufa a 37 °C por 24 h. O diâmetro dos halos de inibição foram medidos com um paquímetro digital.

2.5.2.2 Atividade antifúngica

Para determinação da atividade antifúngica foram utilizadas as culturas de *Saccharomyces cerevisiae* Fleischmann, *Candida albicans* ATCC 18804, *Aspergillus niger* IFL5, *Aspergillus flavus* A12 e *Penicillium citrinum* ITAL197, seguindo a metodologia proposta por Corrêa et al. (2011), com modificação no tempo de incubação.

Para os bolores, as cepas foram cultivadas em placas com ágar batata dextrose (PDA) por 7 d a 25 °C. Uma alíquota da solução de Tween 80 0,05% (v/v) foi colocada em cada placa com colônias para coletar os esporos e transferir para os tubos estéreis. A concentração de suspensão de esporos foi determinada em câmara de Neubauer para determinar o volume a ser adicionado ao meio PDA para que a concentração final fosse de 10^3 esporos/mL. A mistura de meio contendo os esporos foi transferida para placas Petri estéreis. Após solidificação do meio, alíquotas de 20 μ L de cada amostra foram colocadas nas placas. As zonas de inibição foram conferidas após 5 d de incubação a 25 ± 2 °C.

Para as leveduras, as cepas foram cultivadas em placas contendo ágar PDA por 2 d a 30 °C. A padronização em 10^6 UFC/mL foi realizada na escala padrão de McFarland 0,5. Após foi feito um swab das leveduras sob a placa de PDA e colocados 20 μ L de cada amostra nas regiões delimitadas e incubadas por 24 h a 30 °C.

2.5.3 Atividade prebiótica

As culturas probióticas testadas foram *Bifidobacterium lactis* BB-12[®] e *Lactobacillus acidophilus* LA-5[®] (adquiridas da Chr. Hansen, Valinhos, Brasil). A cultura de *E. coli* ATCC 8739 foi empregada como cultura entérica. Para os ensaios, 0,05 g de BB-12 liofilizada e 100 μ L de LA-5 (congelada a -20 °C em leite) foram ativadas em 10 mL de meio Man, Rogosa e Sharpe (MRS), incubando-se em jarra de anaerobiose contendo o anaerobac por 24 h a 37 °C. Após 500 μ L de BB-12 e 100 μ L de LA-5 foram novamente transferidos para meio MRS e incubados anaerobicamente por 24 h a 37 °C. A bactéria *E. coli* ATCC 8739,

mantida congelada a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ em caldo BHI contendo 20% glicerol (v/v) foi ativada transferindo-se uma alíquota de 100 μL a 10 mL de caldo BHI e deixando em uma incubadora giratória (125 rpm) a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 24 h. Previamente à análise, uma transferência adicional ao caldo BHI foi realizada. A contagem inicial de bactérias foi de 10^6 UFC/mL.

As análises foram realizadas inoculando 1% (v/v) de cada cultura ativada em tubos estéreis contendo meio MRS para BB-12 e LA-5 ou meio M9 mínimo (em g/L: Na_2HPO_4 (33,9), KH_2PO_4 (15), NH_4Cl (5) e NaCl (2,5)) para *E. coli*, adicionados de 10 g/L de glicose (padrão) ou 10 g/L de amostras do hidrolisado ou frações. A determinação da atividade prebiótica foi realizada por densidade celular (DC) imediatamente após inoculação bacteriana (tempo 0 h) e após 24 h de incubação a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ de acordo com a Equação 2 (HUEBNER; WEHLING; HUTKINS, 2007). A densidade celular foi medida por leitura espectrofotométrica a 600 nm.

$$\text{Atividade Prebiótica} = \text{DC}_{(24\text{h})} - \text{DC}_{(0\text{h})} \quad (2)$$

2.5.4 Atividade anti-hipertensiva

Cada amostra de hidrolisado e frações (20 μL) foram misturados com 100 μL de solução de substrato tamponado: 3 mg/mL hipuril-1-histidil-L-leucina (HHL) em 50 mmol/L de ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinaetanosulfônico-HCl com 300 mmol/L de NaCl, pH 8,3 a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Na mistura foram adicionados 40 μL da enzima conversora de angiotensina (ECA), a reação ocorreu por 30 min a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, a reação foi finalizada com a adição de 150 μL de HCl (1 mol/L). O composto liberado foi extraído com acetato de etila, a fase orgânica foi evaporada por aquecimento e o composto residual foi solubilizado em 800 μL de água e realizada a leitura em espectrofotômetro a 228 nm (CUSHMAN; CHEUNG, 1971). A atividade anti-hipertensiva foi expressa em porcentagem de inibição enzimática, de acordo com a Equação 3.

$$\% \text{inibição} = [1 - (\text{A} - \text{C}) / (\text{B} - \text{D})] * 100 \quad (3)$$

onde A corresponde a absorvância da reação com ECA e amostra; B corresponde o branco da reação (sem amostra); C corresponde a reação sem ECA; D corresponde a reação sem amostra e ECA.

2.6 DETERMINAÇÃO ANALÍTICA

2.6.1 Atividade enzimática

A determinação da atividade proteolítica do extrato enzimático de protease P45 contendo CaCl_2 50 mmol/L, solubilizados em tampão Tris-HCl 100 mmol/L (pH 7,5) foi determinada utilizando azocaseína 10 mg/mL (v/v) como substrato (DAROIT; CORRÊA; BRANDELLI, 2009). A mistura reacional foi composta por 100 μL de tampão Tris-HCl 100 mmol/L (pH 7,5), 300 μL de azocaseína e 100 μL da solução enzimática. A mistura foi incubada em banho com agitação a 40 °C durante 30 min e finalizada com a adição de 600 μL de ácido tricloroacético 10% (m/v). A mistura foi centrifugada ($5000 \times g$ por 20 min, 4 °C) e 800 μL do sobrenadante foi adicionado a 200 μL de NaOH 1,8 mol/L. A transmitância foi medida a 420 nm. Uma unidade de atividade proteolítica (U) foi definida como a quantidade de enzima que causa a mudança de 0,1 unidade de absorvância sob as condições do ensaio.

2.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram verificados quanto à normalidade e homogeneidade de variância. Em seguida, os resultados foram avaliados estatisticamente por análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey a um nível de confiança de 95% ($p < 0,05$).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As condições de hidrólise empregadas neste estudo, temperatura de 40 °C, pH 7,5, concentração de proteínas do substrato 17,5 g/L e 12 h, correspondem às condições maximizadas do grau de hidrólise do plasma sanguíneo, igual a $39,0 \pm 0,8\%$.

3.1 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DOS HIDROLISADOS

Atividades antioxidantes podem proteger sistemas biológicos sobre danos relacionados ao estresse oxidativo, causado por elétrons desemparelhados que são gerados no decorrer das atividades fisiológicas normais, em especial durante a respiração celular. Os peptídeos e hidrolisados proteicos também podem ser empregados na prevenção de reações oxidativas (peroxidação lipídica) que levam à deterioração de alimentos processados e *in natura* (HIDALGO et al., 2015). A atividade antioxidante de hidrolisados proteicos não pode ser atribuída a um único mecanismo, sendo assim diferentes técnicas (ABTS, DPPH e poder

quelante do ferro) foram conduzidas a fim de estudar as propriedades antioxidantes do hidrolisado não ultrafiltrado e frações do plasma sanguíneo.

A ação dos antioxidantes ocorre de diferentes formas: pelo sequestro de radicais livres, metais quelantes, como agentes redutores ou pela inibição da peroxidação lipídica. A atividade sequestrante de radicais nos hidrolisados proteicos, representada pelas técnicas de ABTS e DPPH, pode estar relacionada com a quantidade e sequência de aminoácidos aromáticos da amostra (como exemplo triptofano ou fenilalanina) ou a quantidade de aminoácidos hidrofóbicos (como exemplo valina, leucina e tirosina) (POWER; JAKEMAN; FITZGERALD, 2013).

O radical DPPH é um radical estável que apresenta máxima absorvância a 515 nm em metanol e vem sendo largamente empregado para testar a habilidade dos componentes naturais em agir no sequestro de radicais livres ou como doadores de hidrogênio, como forma de avaliar o potencial antioxidante. Quando o radical DPPH encontra uma substância doadora de prótons, os radicais podem ser eliminados e conseqüentemente a absorvância é reduzida (ZHU; ZHOU; QIAN, 2006; YANG et al., 2011). O hidrolisado de plasma de sangue bovino obtido pela ação da protease P45 e suas frações não foram capazes de capturar o radical DPPH, verificado pela manutenção da coloração do meio de reação após o tempo de reação e conseqüentemente altos valores de absorvância.

Bah et al. (2016a) observaram que as proteases oriundas de plantas (papaína e bromelina) e de fungos (FP400 e FPII) apresentaram especificidades em gerar peptídeos antioxidantes após a hidrólise de plasma bovino, sendo diretamente proporcional ao valor do grau de hidrólise, com valor máximo de atividade sequestrante do radical DPPH igual a 75,6%. As sequências peptídicas que contribuíram para as bioatividades foram identificadas com predomínio de aminoácidos aromáticos (triptofano e tirosina) e hidrofóbicos (leucina, valina e glicina).

De acordo com os resultados foi possível verificar que o hidrolisado não ultrafiltrado e suas frações foram capazes de sequestrar o radical ABTS e de quelar o íon Fe^{2+} (Tabela 1). O radical ABTS possui uma coloração azul esverdeada com absorção máxima a 734 nm. Uma reação favorável, muda a intensidade da coloração da reação para verde claro, a qual é detectada pela diminuição da absorvância (RE et al., 1999). A técnica pode ser empregada tanto para extratos antioxidantes hidrofílicos como lipofílicos, porque esse radical é solúvel em solvente aquoso e em solventes orgânicos (AWIKA et al., 2003).

Um aumento na captura do radical ABTS foi observado no hidrolisado não ultrafiltrado e F1 (> 10 kDa), houve uma redução de 23% na captura do radical quando o tamanho dos peptídeos foram reduzidos para 1-5 kDa (F3). A diminuição da massa molar dos peptídeos não foi favorável para a captura do radical ABTS, dessa forma, pode haver um efeito sinérgico entre os peptídeos de diferentes massas molares que com o fracionamento diminui ou mantém o potencial antioxidante.

Tabela 1 – Atividade antioxidante do hidrolisado NU e suas frações.

Amostra	ABTS ($\mu\text{mol TE/gL}$)*	Poder quelante do Fe^{+2} (%)*
Hidrolisado NU	$46,6 \pm 1,3^a$	$89,4 \pm <0,1^b$
F1	$46,3 \pm 2,9^a$	$85,6 \pm <0,1^c$
F2	$35,4 \pm 4,5^b$	$92,3 \pm <0,1^a$
F3	$35,9 \pm 4,1^b$	$93,0 \pm <0,1^a$

Letras diferentes sobrescritas na coluna representa diferença significativa (Teste de Tukey, $p < 0,05$).

*Valores estão apresentados como a média \pm desvio padrão ($n=3$); Os resultados de atividade antioxidante foram expressos em $\mu\text{mol/L}$ de equivalente Trolox por g de amostra. NU: não ultrafiltrado, F1: >10 kDa, F2: 5-10 kDa e F3: 1-5 kDa.

Para fins de comparação com a literatura os resultados de atividade de sequestro do radical ABTS foram convertidos para porcentagem com valor de 63,2% (hidrolisado NU) não diferindo estatisticamente da fração F1, igual a 62,8%. Latorres (2018) determinou a atividade antioxidante das frações peptídicas de camarão branco, avaliando dois GH (10% e 20%), duas enzimas comerciais (Alcalase e Protamex) e três concentrações dos fracionados (2,5 mg/mL, 5,0 mg/mL e 7,5 mg/mL). A autora supracitada verificou que o método de ABTS foi o que apresentou maior sensibilidade, com valores de sequestro do radical, em geral, superior a 70%.

De acordo com Oliveira et al. (2014) é difícil fazer uma comparação direta com estudos anteriores devido às especificidades das enzimas empregadas serem variadas, o que pode gerar peptídeos distintos. Os diferentes comportamentos de atividade antioxidante do hidrolisado NU e frações para os radicais ABTS e DPPH podem estar relacionados com as diferenças de estereoseletividade destes radicais, aos diferentes peptídeos capazes de reagir e sequestrar os radicais, bem como a variada solubilidade em meio aquoso e orgânico dos radicais ABTS (solúvel em água) e radical DPPH (solúvel em óleos) (ZHU et al., 2008; OLIVEIRA et al., 2014).

Íons ferro agem como catalisadores na produção de radicais hidroxil através da reação Fenton, iniciando as reações em cadeia que levam à peroxidação lipídica e, conseqüentemente, a rancidez dos alimentos (MIN; AHN, 2005). Assim é desejável que os íons

estejam quelados para promover a qualidade e o aumento da vida útil dos produtos alimentícios. Na Tabela 1 foi observado o poder quelante do hidrolisado NU e suas frações, mostrando que as frações de menores massas molares, F2 e F3, apresentaram os maiores valores não se diferenciado estatisticamente ($p>0,05$) entre si. Provavelmente nestas duas frações foram expostos os grupamentos funcionais de resíduos de aminoácidos capazes de quelar o ferro, resultando na atividade.

Peptídeos de baixa massa molar promovem alto potencial quelante, pois segundo Liu et al. (2010) há o aumento da concentração de grupamentos carboxílicos nas extremidades e por serem mais reativos, têm maior facilidade de remover os íons metálicos livres prooxidativos do sistema. Seo et al. (2015) incluíram o efeito da atividade quelante do Fe^{2+} como variável dependente na metodologia de superfície de resposta objetivando estabelecer as condições ótimas de hidrólise das proteínas do plasma bovino catalisado por alcalase. As outras variáveis estudadas foram GH e sequestro do radical DPPH. Quatro soluções foram obtidas para as condições ótimas de hidrólise, nestas a faixa de pH variou de 7,8-8,3, temperatura (54,1 °C) e tempo (338,4-398,4 min), atingindo os valores preditos de atividade quelante do ferro na faixa de 24,4-26,3%.

Xu et al. (2009) verificaram as propriedades antioxidantes dos hidrolisados de plasma suíno preparado com pepsina e papaína. Os resultados mostraram uma excelente inibição da peroxidação lipídica e da atividade sequestrante do radical DPPH para ambos os hidrolisados. Com relação ao poder quelante de ferro, o hidrolisado de pepsina foi o mais efetivo, porém não ultrapassou 25% do efeito quelante, na concentração final de 100 µg/mL de amostra.

De acordo com Rocha (2016) a atividade quelante do ferro é diretamente proporcional à concentração da amostra. No estudo, o hidrolisado de isolado proteico de castanha (*Umbrina canosai*) catalisado por alcalase e com GH de 20% promoveu a maior complexação do Fe^{2+} de aproximadamente 90,7, 81,0 e 64,1% para as concentrações de 50, 25 e 5 mg/mL de amostra, respectivamente. Farvin et al. (2014) obtiveram em seu estudo a mesma tendência no hidrolisado de bacalhau (*Gadus morhua*), maior poder quelante do Fe^{2+} com o aumento da concentração proteica e maior atividade quelante para as frações < 3kDa e > 5 kDa, com valor de aproximadamente 90% na concentração de 1,7 mg/mL de amostra.

Os dois métodos de determinação da atividade antioxidante apresentam diferentes reações estequiométricas e mecanismos. De uma forma geral, pela detecção da captura dos radicais testados, os resultados apresentados evidenciaram que os hidrolisados contêm

peptídeos potencialmente doadores de átomos de hidrogênio, os quais podem reagir com os radicais livres, tornando-os estáveis.

3.2 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

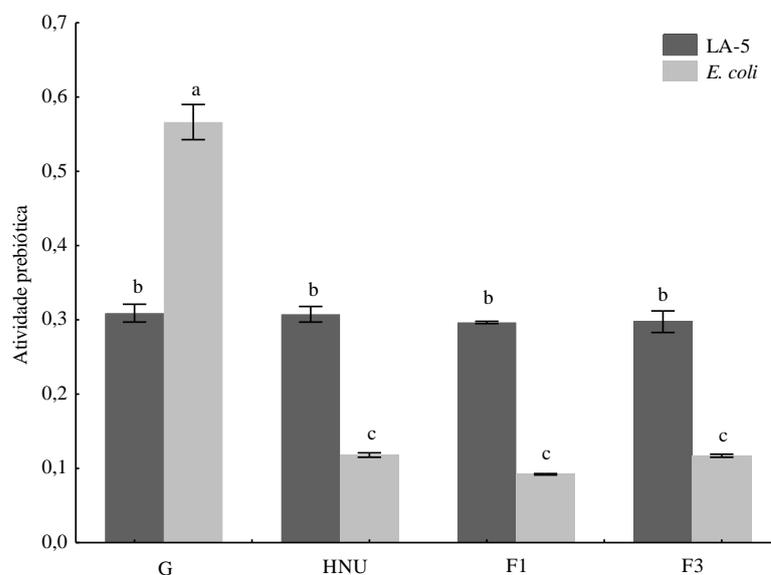
Para todas as cepas testadas, as amostras não afetaram o crescimento dos micro-organismos, portanto sem potencial antimicrobiano. Como relatado na literatura, peptídeos antimicrobianos foram obtidos a partir de células do sangue (ADJE et al., 2011) e neutrófilos (células brancas) (BAH et al., 2016b), separados do sangue bruto. Na literatura consultada não foi possível encontrar peptídeos com atividade antimicrobiana a partir do plasma de sangue. Sequências de peptídeos que contribuem para a atividade antimicrobiana provavelmente não estão presentes na proteína do plasma ou não se tornaram acessíveis/disponíveis com a aplicação da protease P45. Bah et al. (2016a) determinaram a atividade antibacteriana do plasma bovino hidrolisado por quatro diferentes proteases de fonte fúngica e de plantas e também não obtiveram atividade nos quatro hidrolisados.

3.3 ATIVIDADE PREBIÓTICA

Bifidobactérias e lactobacilos normalmente habitam o trato intestinal de humanos e animais. Em humanos, são consideradas benéficas, pois são produtores de ácido lático e acético, reduzindo o pH do cólon e inibindo a proliferação de patogênicos. Estas bactérias são estimuladas por prebióticos e quando presentes são promotoras da saúde da microbiota, exercendo diversos efeitos positivos desde a melhora da digestão e absorção de nutrientes até ação imunomodulatória (GIBSON; ROBERFROID, 1995; HUEBNER; WEHLING; HUTKINS, 2007).

O hidrolisado não ultrafiltrado bem como suas frações F1, F2 e F3 foram analisados quanto ao potencial prebiótico. Os resultados estão mostrados nas Figura 1 e 2. A atividade prebiótica da fração F2 foi baixa e não significativa, portanto para melhor interpretação e ajuste da normalidade dos dados optou-se por não apresentar este resultado. Os valores de atividade prebiótica obtidos para as duas cepas probióticas comerciais e *E. coli* mostraram valores positivos indicando que tanto as amostras bem como a glicose (padrão) promoveram o crescimento destes micro-organismos. O aumento da densidade celular após as 24 h em anaerobiose foi dependente de cada amostra e da cepa testada, uma vez que cada bactéria tem diferentes respostas metabólicas.

Figura 1 – Atividade prebiótica do hidrolisado e frações de plasma de sangue bovino comparado à glicose. As amostras foram incubadas por 24 h com *Lactobacillus acidophilus* LA-5 ou *E. coli*. As barras representam a média \pm erro padrão ($n=2$). Diferentes letras representam diferença significativa (Teste de Tukey, $p<0,05$). G (glicose), HNU (hidrolisado não ultrafiltrado), F1 (fração >10 kDa), F3 (fração 1-5 kDa).

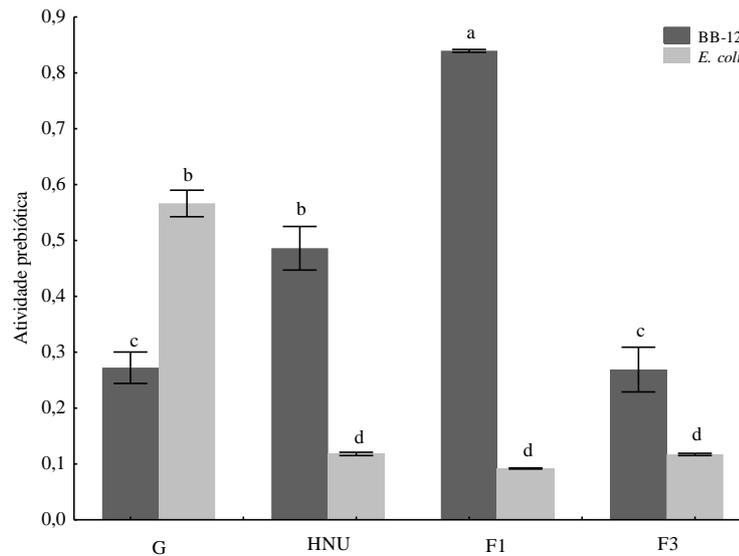


Ao utilizar glicose como substrato houve um maior desenvolvimento da cultura entérica *E. coli* frente ao crescimento da bactéria probiótica LA-5 (Figura 1). Por outro lado, as amostras peptídicas mostraram potencial prebiótico ao estimular o crescimento da bactéria probiótica frente ao desenvolvimento da bactéria *E. coli*, diferenciando-se estatisticamente. O comparativo entre as amostras demonstrou não haver influência entre o hidrolisado não ultrafiltrado e as amostras fracionadas.

Na Figura 2, o potencial prebiótico da fração F1 ($0,84 \pm <0,01$) foi o que se destacou, diferenciando-se das demais amostras, sendo melhor substrato que a glicose (padrão). Os peptídeos presentes na F1 estimularam o crescimento da bactéria BB-12, mostrando que não foi necessário mais um sequenciamento do fracionamento, para gerar a F3 e, conseqüentemente, peptídeos de menor massa molar, para apresentar um melhor potencial prebiótico, o que minimiza o tempo de execução e custos do processo.

Com relação ao aumento da densidade celular para a cepa de *E. coli*, uma bactéria comum da microbiota entérica, verificados nas Figuras 1 e 2, foi possível inferir que a glicose (padrão) mostrou ser o melhor promotor ao crescimento desta cepa, apresentando diferença estatística ($p<0,05$) em relação ao uso do hidrolisado não ultrafiltrado e frações como substrato.

Figura 2 – Atividade prebiótica do hidrolisado e frações de plasma de sangue bovino comparado à glicose. As amostras foram incubadas por 24 h com *Bifidobacterium lactis* BB-12 ou *E. coli*. As barras representam a média \pm erro padrão ($n=2$). Diferentes letras representam diferença significativa (Teste de Tukey, $p<0,05$). G (glicose), HNU (hidrolisado não ultrafiltrado), F1 (fração >10 kDa), F3 (fração 1-5 kDa).



Na literatura consultada a utilização de peptídeos como substrato no efeito estimulatório do crescimento seletivo de lactobacilos e bifidobactérias com potencial prebiótico são limitados. Os estudos abordaram basicamente os peptídeos oriundos de proteína láctea (LIEPKE et al., 2002; MIKKELSEN et al., 2006; ODA et al., 2013) e de actomiosina muscular suína digerida por papaína (ARIHARA; ISHIKAWA; ITOH, 2006). Geralmente são os carboidratos de baixa massa molar que estimulam o crescimento e/ou atividade de bactérias probióticas (CHAPLA; PANDIT; SHAH, 2012), sendo fornecedores de fonte de carbono.

No estudo de Oda et al. (2013) foi isolado um peptídeo oriundo do hidrolisado de lactoferrina do leite bovino digerido por pepsina, responsável por promover uma forte atividade bifidogênica quando comparado com a lactoferrina natural, que é uma glicoproteína bastante conhecida por suas funções bifidogênica e antimicrobiana. O envolvimento da ligação com o ferro, cadeias de açúcares e a sequência de aminoácidos são propostos estar relacionados ao mecanismo bifidogênico da lactoferrina.

Liepke et al. (2002) isolaram frações de lactoferrina oriunda de leite humano em que duas delas estimularam o crescimento de cinco das sete cepas de bifidobactérias que usualmente colonizam o intestino de crianças em fase de amamentação. Além disso, estes

peptídeos apresentaram ser 100 vezes mais efetivos do que o carboidrato *N*-acetilglucosamina, um conhecido carboidrato bifidogênico. Os autores não observaram partes glicosídicas nas frações, estando o efeito bifidogênico relacionado a sequência peptídica e à presença de ligações dissulfeto entre resíduos de aminoácidos que contém enxofre.

A partir das informações consultadas em estudos prévios, foi possível constatar que para a atividade bifidogênica são levadas em consideração as seguintes características: o número de ligações dissulfeto formadas nos peptídeos, a sequência peptídica, a natureza catiônica e o princípio ativo do peptídeo, níveis adequados de ferro no meio e a presença de genes na cepa probiótica capazes de assimilar a fonte de carbono ou nitrogênio (IBRAHIM; BEZKOROVAINY, 1994; GARRIDO et al., 2012; ODA et al., 2013). Portanto, há a necessidade de estudos mais aprofundados para entender o melhor comportamento de atividade prebiótica concomitante ao baixo desenvolvimento da *E. coli* ATCC 8739 para o fracionado F1 do presente estudo.

Além disso, através dos resultados apresentados pelas amostras analisadas ficaram evidenciados dois fatores que determinam a atividade prebiótica. O primeiro, a amostra deve ser metabolizada pelas cepas testes da mesma forma ou melhor que a glicose (padrão) e o segundo fator, ser um substrato seletivo, isto é, não ser fermentado por organismos comensais (HUEBNER; WEHLING; HUTKINS, 2007). No entanto, para uma confirmação concreta do poder prebiótico dos fracionados deste estudo seria importante verificar a estabilidade frente ao tratamento destes peptídeos com proteases gastrointestinais (pepsina, tripsina e quimotripsina), bem como a realizações de ensaios *in vivo*, ambiente em que existe um *pool* de culturas.

3.4 ATIVIDADE ANTI-HIPERTENSIVA

A enzima ECA apresenta um papel crucial na regulação da pressão sanguínea, pois promove a conversão da angiotensina I para um potente vasoconstrictor, angiotensina II, no sistema angiotensina-renina, causando a inativação do potente vasodilatador bradicinina (FORSYTH et al., 2004). A porcentagem de inibição da enzima conversora de angiotensina pode ser observada na Tabela 2. Os valores de inibição para as amostras variaram de $4,8 \pm 1,2\%$ (hidrolisado NU) para $32,2 \pm 0,6\%$, com maior inibição para a fração F2 (5-10 kDa).

Na mesma tabela foi possível observar que o fracionamento pela membrana de 5 kDa isolou peptídeos de menores tamanhos e mais reativos comparado ao hidrolisado não ultrafiltrado, promovendo o aumento de 27,4% no potencial de inibição da enzima conversora de angiotensina para a fração F2.

Tabela 2 – Porcentagem de inibição da enzima conversora de angiotensina.Média \pm erro padrão; $n=2$.

Amostras	Ensaio (%)
Hidrolisado NU	4,8 \pm 1,2 ^d
F1	18,9 \pm 0,6 ^b
F2	32,2 \pm 0,6 ^a
F3	10,1 \pm 1,8 ^c

Letras diferentes representam diferença significativa ($p<0,05$). NU: não ultrafiltrado, F1: >10 kDa, F2: 5-10 kDa e F3: 1-5 kDa.

Peptídeos com atividade inibitória de ECA-I usualmente consistem de sequencias de aminoácidos curtas (WU; ALUKO; NAKAI, 2006). O fracionamento por ultrafiltração dos hidrolisados de proteínas da albumina de soro bovino a partir de papaína, enzima escolhida via *in silico*, levaram ao aumento da atividade inibitória da enzima conversora de angiotensina. As frações de 1 kDa e 3 kDa apresentaram mais de 70% de inibição, diferenciando estatisticamente ($p<0,05$) da fração de 10 kDa e do hidrolisado (sem ultrafiltração) (LAFARGA et al., 2016). Embora usual, não se deve considerar a atividade inibitória somente pelo tamanho dos peptídeos, mas também pela estrutura. Como o domínio do sítio catalítico da ECA consiste de três subsítios que acomodam os três resíduos hidrofóbicos do substrato angiotensina I (FITZGERALD; MURRAY; WALSH, 2004), a inibição de ECA ocorre principalmente quando os peptídeos contém resíduos de aminoácidos hidrofóbicos/aromáticos em cada uma das três posições terminais carboxílicas. Estes aminoácidos hidrofóbicos agem por inibição competitiva, resultando em um forte efeito ligante de interação hidrofóbica entre a enzima ECA e o ligante (KOBAYASHI et al., 2008). Assim, peptídeos com potencial altamente inibitórios de ECA são gerados por proteases que apresentam especificidade por resíduos hidrofóbicos e aromáticos do lado carboxílico do substrato proteico.

Os valores de inibição para a enzima ECA-I apresentados neste estudo foram abaixo dos geralmente descritos na literatura para peptídeos derivados de proteínas de origem animal. No estudo de Corrêa et al. (2014) o soro de queijo ovino hidrolisado por um preparado enzimático de proteases de *Bacillus* sp. P7 durante 4 h apresentou o máximo valor de inibição de 55,7%, sem mudança significativa na habilidade de inibição no término da hidrólise. Huang e Liu (2010) examinaram a hidrólise de farinha de sangue de galinha sobre a produção de peptídeos inibitórios de ECA, os resultados mostraram que nas 4 h de hidrólise e com 10% de

alcalase obtiveram maiores atividades inibitórias de ECA (91%). Outros estudos determinaram que a alcalase apresentou maior rendimento peptídico com potencial inibitório de ECA em hidrolisados de plasma de sangue bovino e nas suas frações proteicas globulinas e albumina, com o melhor valor de IC_{50} igual a 0,56 mg/mL para albumina (HYUN; SHIN, 2000). Assim, foi possível estimar que no presente estudo os peptídeos gerados pelo hidrolisado não ultrafiltrado e frações não apresentaram alto índice de aminoácidos com características estruturais reconhecidas pela ECA-I, e então barrar a sua atividade enzimática.

4 CONCLUSÃO

Neste estudo foi reportado o potencial bioativo das frações proteicas obtidas após o processo de ultrafiltração do hidrolisado de plasma de sangue bovino oriundo da reação catalisada por protease P45. Os resultados deste estudo revelaram que a fração >10 kDa (F1) promoveu o melhor crescimento de *Bifidobacterium lactis* BB-12[®], quando comparados ao substrato padrão glicose. Além disso, as amostras proteicas estimularam o crescimento das duas cepas probióticas frente ao crescimento da bactéria entérica *E. coli*.

O hidrolisado não ultrafiltrado e suas frações foram capazes de sequestrar o radical ABTS e com potencial quelante sobre o íon Fe^{2+} . Nas duas metodologias houve distinção no tamanho molar dos peptídeos, enquanto um aumento na captura do radical ABTS foi observado nos hidrolisados não ultrafiltrado e F1 (com redução de 23% na captura do radical quando o tamanho dos peptídeos foram reduzidos para 1-5 kDa), o poder quelante de Fe^{2+} foi mais efetivo nas frações de menor tamanho.

Não foi possível encontrar peptídeos com atividade antimicrobiana a partir do plasma de sangue para as cinco cepas bacterianas e para as cinco cepas fúngicas. O fracionamento isolou peptídeos que promoveram o aumento de 27,4% na atividade anti-hipertensiva, com o maior percentual de inibição de $32,2 \pm 0,6\%$, para a fração F2 (5-10 kDa).

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADJE, E. Y.; BALTI, R.; GUILLOCHON, D.; NEDJAR-ARROUME, N. α 67-106 of bovine hemoglobin: a new family of antimicrobial and angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides. **European Food Research and Technology**, v. 232, n. 4, p. 637-646, 2011.

ADLER-NISSEN, J. **Enzymic hydrolysis of food proteins**. Elsevier Applied Science Publishers Ltd., London, 1986.

ALEMÁN, A.; PÉREZ-SANTÍN, E.; BORDENAVE-JUCHEREAU, S.; ARNAUDIN, I.; GÓMEZ-GUILLÉN, M.; MONTERO, P. Squid gelatin hydrolysates with antihypertensive, anticancer and antioxidant activity. **Food Research International**, v. 44, n. 4, p. 1044-1051, 2011.

ARIHARA, K.; ISHIKAWA, S.; ITOH, M. *Bifidobacterium* growth promoting peptides derived from meat proteins, JP 4726129, 2006-2011.

AWIKA, J. M.; ROONEY, L. W.; WU, X.; PRIOR, R. L.; CISNEROS-ZEVALLOS, L. Screening methods to measure antioxidant activity of sorghum (*Sorghum bicolor*) and sorghum products. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 23, p. 6657-6662, 2003.

BAH, C. S.; BEKHIT, A. E.-D. A.; CARNE, A.; MCCONNELL, M. A. Production of bioactive peptide hydrolysates from deer, sheep and pig plasma using plant and fungal protease preparations. **Food Chemistry**, v. 176, p. 54-63, 2015.

BAH, C. S.; BEKHIT, A. E.-D. A.; MCCONNELL, M. A.; CARNE, A. Generation of bioactive peptide hydrolysates from cattle plasma using plant and fungal proteases. **Food Chemistry**, v. 213, p. 98-107, 2016a.

BAH, C. S.; BEKHIT, A. E. D. A.; CARNE, A.; MCCONNELL, M. A. Slaughterhouse blood: an emerging source of bioactive compounds. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 12, n. 3, p. 314-331, 2013.

BAH, C. S.; BEKHIT, A. E. D. A.; CARNE, A.; MCCONNELL, M. A. Composition and biological activities of slaughterhouse blood from red deer, sheep, pig and cattle. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 96, n. 1, p. 79-89, 2016b.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M.-E.; BERSSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT-Food Science and Technology**, v. 28, n. 1, p. 25-30, 1995.

CENTENARO, G. S.; SALAS-MELLADO, M.; PIRES, C.; BATISTA, I.; NUNES, M. L.; PRENTICE, C. Fractionation of protein hydrolysates of fish and chicken using membrane ultrafiltration: investigation of antioxidant activity. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 172, n. 6, p. 2877-2893, 2014.

CHANG, C.-Y.; WU, K.-C.; CHIANG, S.-H. Antioxidant properties and protein compositions of porcine haemoglobin hydrolysates. **Food Chemistry**, v. 100, n. 4, p. 1537-1543, 2007.

CHAPLA, D.; PANDIT, P.; SHAH, A. Production of xylooligosaccharides from corncob xylan by fungal xylanase and their utilization by probiotics. **Bioresource Technology**, v. 115, p. 215-221, 2012.

CORRÊA, A. P. F.; DAROIT, D. J.; COELHO, J.; MEIRA, S. M.; LOPES, F. C.; SEGALIN, J.; RISSO, P. H.; BRANDELLI, A. Antioxidant, antihypertensive and antimicrobial properties of ovine milk caseinate hydrolyzed with a microbial protease. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 91, n. 12, p. 2247-2254, 2011.

CORRÊA, A. P. F.; DAROIT, D. J.; FONTOURA, R.; MEIRA, S. M. M.; SEGALIN, J.; BRANDELLI, A. Hydrolysates of sheep cheese whey as a source of bioactive peptides with antioxidant and angiotensin-converting enzyme inhibitory activities. **Peptides**, v. 61, p. 48-55, 2014.

CUSHMAN, D.; CHEUNG, H. Spectrophotometric assay and properties of the angiotensin-converting enzyme of rabbit lung. **Biochemical Pharmacology**, v. 20, n. 7, p. 1637-1648, 1971.

DAROIT, D. J.; CORRÊA, A. P. F.; BRANDELLI, A. Keratinolytic potential of a novel *Bacillus* sp. P45 isolated from the Amazon basin fish *Piaractus mesopotamicus*. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 63, n. 3, p. 358-363, 2009.

DAROIT, D. J.; CORRÊA, A. P. F.; CANALES, M. M.; COELHO, J. G.; HIDALGO, M. E.; TICHOTA, D. M.; RISSO, P. H.; BRANDELLI, A. Physicochemical properties and biological activities of ovine caseinate hydrolysates. **Dairy Science & Technology**, v. 92, n. 4, p. 335-351, 2012.

DAROIT, D. J.; CORRÊA, A. P. F.; BRANDELLI, A. Production of keratinolytic proteases through bioconversion of feather meal by the Amazonian bacterium *Bacillus* sp. P45. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 65, n. 1, p. 45-51, 2011.

DAROIT, D. J.; SANT'ANNA, V.; BRANDELLI, A. Kinetic stability modelling of keratinolytic protease P45: influence of temperature and metal ions. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 165, n. 7-8, p. 1740-1753, 2011.

DOBASHI, P. R. N.; BEPPU, O. S.; DOS SANTOS, L. Distúrbios do equilíbrio ácido-básico em sangue estocado. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 6, n. 4, p. 173-176, 1980.

DOS SANTOS AGUILAR, J. G.; DE CASTRO, R. J. S.; SATO, H. H. Optimization of the enzymatic hydrolysis of rice protein by different enzymes using the response surface methodology. **3 Biotech**, v. 8, n. 8, p. 372, 2018.

FARVIN, K. S.; ANDERSEN, L. L.; NIELSEN, H. H.; JACOBSEN, C.; JAKOBSEN, G.; JOHANSSON, I.; JESSEN, F. Antioxidant activity of Cod (*Gadus morhua*) protein hydrolysates: in vitro assays and evaluation in 5% fish oil-in-water emulsion. **Food Chemistry**, v. 149, p. 326-334, 2014.

FITZGERALD, R. J.; MURRAY, B. A.; WALSH, D. J. Hypotensive peptides from milk proteins. **The Journal of Nutrition**, v. 134, n. 4, p. 980S-988S, 2004.

FORSYTH, J.; REILLY, J.; FRASER, C. G.; STRUTHERS, A. Angiotensin converting enzyme activity in infancy is related to birth weight. **Archives of Disease in Childhood-Fetal and Neonatal Edition**, v. 89, n. 5, p. F442-F444, 2004.

GARRIDO, D.; NWOSU, C.; RUIZ-MOYANO, S.; ALDREDGE, D.; GERMAN, J. B.; LEBRILLA, C. B.; MILLS, D. A. Endo- β -N-acetylglucosaminidases from infant-gut associated bifidobacteria release complex N-glycans from human milk glycoproteins. **Molecular & Cellular Proteomics**, p. mcp.M112.018119, 2012.

GIBSON, G. R.; ROBERFROID, M. B. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. **The Journal of Nutrition**, v. 125, n. 6, p. 1401-1412, 1995.

HIDALGO, M. E.; CÔRREA, A. P. F.; CANALES, M. M.; DAROIT, D. J.; BRANDELLI, A.; RISSO, P. Biological and physicochemical properties of bovine sodium caseinate hydrolysates obtained by a bacterial protease preparation. **Food Hydrocolloids**, v. 43, p. 510-520, 2015.

HIDALGO, M. E.; DAROIT, D. J.; FOLMER CORREA, A. P.; PIENIZ, S.; BRANDELLI, A.; RISSO, P. H. Physicochemical and antioxidant properties of bovine caseinate hydrolysates obtained through microbial protease treatment. **International Journal of Dairy Technology**, v. 65, n. 3, p. 342-352, 2012.

HSIEH, Y.-H. P.; OFORI, J. A. Blood-derived products for human consumption. **Revelation and Science**, v. 1, n. 01, 2011.

HUANG, S.-C.; LIU, P.-J. Inhibition of angiotensin I-converting enzymes by enzymatic hydrolysates from chicken blood. **Journal of Food & Drug Analysis**, v. 18, n. 6, p. 458-463, 2010.

HUEBNER, J.; WEHLING, R.; HUTKINS, R. Functional activity of commercial prebiotics. **International Dairy Journal**, v. 17, n. 7, p. 770-775, 2007.

HYUN, C.-K.; SHIN, H.-K. Utilization of bovine blood plasma proteins for the production of angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides. **Process Biochemistry**, v. 36, n. 1-2, p. 65-71, 2000.

IBRAHIM, S. A.; BEZKOROVAINY, A. Growth-promoting factors for *Bifidobacterium longum*. **Journal of Food Science**, v. 59, n. 1, p. 189-191, 1994.

KOBAYASHI, Y.; YAMAUCHI, T.; KATSUDA, T.; YAMAJI, H.; KATOH, S. Angiotensin-I converting enzyme (ACE) inhibitory mechanism of tripeptides containing aromatic residues. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 106, n. 3, p. 310-312, 2008.

LAFARGA, T.; ALUKO, R. E.; RAI, D. K.; O'CONNOR, P.; HAYES, M. Identification of bioactive peptides from a papain hydrolysate of bovine serum albumin and assessment of an antihypertensive effect in spontaneously hypertensive rats. **Food Research International**, v. 81, p. 91-99, 2016.

LATORRES, J. M. **Obtenção de peptídeos bioativos encapsulados a partir da hidrólise enzimática de camarão branco (*Litopenaeus vannamei*)**. 2018. 193 f. Tese (Doutorado em Engenharia e Ciência de Alimentos), Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande.

LEMES, A. C.; PAVÓN, Y.; LAZZARONI, S.; ROZYCKI, S.; BRANDELLI, A.; KALIL, S. J. A new milk-clotting enzyme produced by *Bacillus* sp. P45 applied in cream cheese development. **LWT-Food Science and Technology**, v. 66, p. 217-224, 2016.

LIEPKE, C.; ADERMANN, K.; RAIDA, M.; MÄGERT, H. J.; FORSSMANN, W. G.; ZUCHT, H. D. Human milk provides peptides highly stimulating the growth of bifidobacteria. **European Journal of Biochemistry**, v. 269, n. 2, p. 712-718, 2002.

LIU, B.; AISA, H. A.; YILI, A. Isolation and identification of two potential antioxidant peptides from sheep abomasum protein hydrolysates. **European Food Research and Technology**, v. 244, n. 9, p. 1614-1625, 2018.

LIU, Q.; KONG, B.; XIONG, Y. L.; XIA, X. Antioxidant activity and functional properties of porcine plasma protein hydrolysate as influenced by the degree of hydrolysis. **Food Chemistry**, v. 118, n. 2, p. 403-410, 2010.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v. 193, n. 1, p. 265-275, 1951.

MIKKELSEN, T. L.; RASMUSSEN, E.; OLSEN, A.; BARKHOLT, V.; FRØKIÆR, H. Immunogenicity of κ -casein and glycomacropeptide. **Journal of Dairy Science**, v. 89, n. 3, p. 824-830, 2006.

MIN, B.; AHN, D. Mechanism of lipid peroxidation in meat and meat products-A review. **Food Science and Biotechnology**, v. 14, n. 1, p. 152-163, 2005.

MOTTA, A.; BRANDELLI, A. Characterization of an antibacterial peptide produced by *Brevibacterium linens*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 92, n. 1, p. 63-70, 2002.

ODA, H.; WAKABAYASHI, H.; YAMAUCHI, K.; SATO, T.; XIAO, J.-Z.; ABE, F.; IWATSUKI, K. Isolation of bifidogenic peptide from pepsin hydrolysate of bovine lactoferrin. **Applied and environmental microbiology**, v. 79, n. 6, p. 1843-1849, 2013.

OLIVEIRA, C.; COLETTI, D.; CORREA, A.; DAROIT, D.; TONIOLO, R.; CLADERA-OLIVERA, F.; BRANDELLI, A. Antioxidant activity and inhibition of meat lipid oxidation by soy protein hydrolysates obtained with a microbial protease. **International Food Research Journal**, v. 21, n. 2, p. 775-781, 2014.

POWER, O.; JAKEMAN, P.; FITZGERALD, R. Antioxidative peptides: enzymatic production, *in vitro* and *in vivo* antioxidant activity and potential applications of milk-derived antioxidative peptides. **Amino Acids**, v. 44, n. 3, p. 797-820, 2013.

RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 26, n. 9-10, p. 1231-1237, 1999.

ROCHA, M. D. **Obtenção de hidrolisados proteicos da Castanha (*Umbrina canosai*) com atividade biológica e sua aplicação em filmes bioativos**. 2016. 251 f. Tese (Doutorado em Engenharia e Ciência de Alimentos), Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande.

SALA, L.; GAUTÉRIO, G. V.; YOUNAN, F. F.; BRANDELLI, A.; MORAES, C. C.; KALIL, S. J. Integration of ultrafiltration into an aqueous two-phase system in the keratinase purification. **Process Biochemistry**, v. 49, n. 11, p. 2016-2024, 2014.

SEO, H.-W.; JUNG, E.-Y.; GO, G.-W.; KIM, G.-D.; JOO, S.-T.; YANG, H.-S. Optimization of hydrolysis conditions for bovine plasma protein using response surface methodology. **Food Chemistry**, v. 185, p. 106-111, 2015.

WU, J.; ALUKO, R. E.; NAKAI, S. Structural requirements of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides: quantitative structure– activity relationship study of di- and tripeptides. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 3, p. 732-738, 2006.

XU, X.; CAO, R.; HE, L.; YANG, N. Antioxidant activity of hydrolysates derived from porcine plasma. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 89, n. 11, p. 1897-1903, 2009.

YANG, P.; KE, H.; HONG, P.; ZENG, S.; CAO, W. Antioxidant activity of bigeye tuna (*Thunnus obesus*) head protein hydrolysate prepared with Alcalase. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 46, n. 12, p. 2460-2466, 2011.

ZHANG, L.; LI, J.; ZHOU, K. Chelating and radical scavenging activities of soy protein hydrolysates prepared from microbial proteases and their effect on meat lipid peroxidation. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 2084-2089.

ZHANG, J.; WANG, J.; ZHAO, Y.; LI, J.; LIU, Y. Study on the interaction between calcium ions and alkaline protease of *Bacillus*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 124, p. 121-130, 2019.

ZHU, K.; ZHOU, H.; QIAN, H. Antioxidant and free radical-scavenging activities of wheat germ protein hydrolysates (WGPH) prepared with alcalase. **Process Biochemistry**, v. 41, n. 6, p. 1296-1302, 2006.

ZHU, Y.; FAN, J.; CHENG, Y.; LI, L. Improvement of the antioxidant activity of Chinese traditional fermented okara (Meitauza) using *Bacillus subtilis* B2. **Food Control**, v. 19, n. 7, p. 654-661, 2008.

CAPÍTULO IV

5 CONCLUSÃO GERAL

O estudo descreveu as características enzimológicas da protease de *Bacillus* sp. P45, incluindo atividade, estabilidade, propriedades cinéticas e termodinâmicas envolvendo a mudança do meio de atuação e a inserção de aditivo ao extrato enzimático, sendo eles líquido iônico, solventes orgânicos e cloreto de cálcio, evidenciando o melhoramento das propriedades catalíticas e estabilidade da protease P45.

A protease P45 mostrou-se ativa e estável em meio contendo o líquido iônico [Emim][Tf₂N] e acetona razão 1:1 v/v. A mistura reacional favoreceu a estabilização desta enzima com aumento na meia vida em mais de 2 h em relação à mesma contida em meio com tampão e acetona, a 55 °C. Os valores de k_d e ΔG^* enfatizaram que houve aumento na estabilização da estrutura da protease P45 na faixa de temperatura de 40 a 55 °C, em relação aos demais meios contendo tampão.

A protease contida em líquido iônico e acetona foi aplicada como biocatalisador na hidrólise de caseína de leite bovino, não sendo eficaz neste tipo de reação, pois apresentou grau de hidrólise de 3,9%, enquanto que o ensaio em tampão obteve mais de 5,7%, após 5,5 h de reação.

No substrato plasma de sangue bovino, o grau de hidrólise foi maximizado empregando 17,5 g/L de concentração de proteínas do substrato e 40 °C. Nestas condições reacionais e catalisada por protease P45 estabilizada em 50 mmol/L de CaCl₂, o grau de hidrólise atingiu o valor de $39,0 \pm 0,8\%$ em 12 h.

O hidrolisado foi fracionado por ultrafiltração e suas frações foram capazes de sequestrar o radical ABTS e potencial quelante sobre o íon Fe²⁺. Nas duas metodologias houve distinção no tamanho molar dos peptídeos, enquanto um aumento na captura do radical ABTS foi observado nos hidrolisados não ultrafiltrado e >10 kDa (com redução de 23% na captura do radical quando o tamanho dos peptídeos foram reduzidos para 1-5 kDa). Já o poder quelante de Fe²⁺ foi mais efetivo nas frações de menor tamanho, igual a $93,0 \pm <0,1\%$, para fração 1-5 kDa, sem diferir estatisticamente da fração 5-10 kDa.

A fração >10 kDa apresentou poder prebiótico, observando-se que a utilização desta fração como substrato promoveu o melhor crescimento de *Bifidobacterium lactis* BB-12[®], quando comparado ao substrato padrão glicose. Além disso, esta amostra proteica estimulou o maior desenvolvimento das cepas probióticas frente ao desenvolvimento da bactéria entérica *E. coli*.

Não foi possível encontrar peptídeos com atividade antimicrobiana a partir do plasma de sangue para as cinco cepas bacterianas e para as cinco cepas fúngicas. O fracionamento promoveu a separação de peptídeos capazes de aumentar a atividade anti-hipertensiva em 27,4%, com o maior percentual de inibição de $32,2 \pm 0,6\%$, para a fração 5-10 kDa.

6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Caracterizar os peptídeos quanto a sequência de aminoácidos;
- Utilizar outras formas de purificação dos peptídeos, como a cromatografia de exclusão molecular, e avaliar se há aumento nas bioatividades;
- Determinar as bioatividades ponto a ponto, em horas, durante a hidrólise enzimática;
- Comparar os resultados de grau de hidrólise e características dos hidrolisados para o substrato proteico da protease P45 com relação ao uso de enzimas comerciais;
- Determinar outras bioatividades dos peptídeos obtidos como poder quelante de cálcio e zinco;
- Avaliar as bioatividades *in vivo* em matrizes alimentícias do hidrolisado e frações peptídicas.

CAPÍTULO V

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADJE, E. Y.; BALTI, R.; GUILLOCHON, D.; NEDJAR-ARROUME, N. α 67-106 of bovine hemoglobin: a new family of antimicrobial and angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides. **European Food Research and Technology**, v. 232, n. 4, p. 637-646, 2011.
- ADLER-NISSEN, J. **Enzymic hydrolysis of food proteins**. Elsevier Applied Science Publishers Ltd., London, 1986
- AHN, C.-B.; JEON, Y.-J.; KIM, Y.-T.; JE, J.-Y. Angiotensin I converting enzyme (ACE) inhibitory peptides from salmon byproduct protein hydrolysate by Alcalase hydrolysis. **Process Biochemistry**, v. 47, n. 12, p. 2240-2245, 2012.
- AHN, C.-B.; KIM, J.-G.; JE, J.-Y. Purification and antioxidant properties of octapeptide from salmon byproduct protein hydrolysate by gastrointestinal digestion. **Food Chemistry**, v. 147, p. 78-83, 2014.
- AKBARI, N.; DANESHJOO, S.; AKBARI, J.; KHAJEH, K. Isolation, characterization, and catalytic properties of a novel lipase which is activated in ionic liquids and organic solvents. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 165, n. 3-4, p. 785-794, 2011.
- ALAO, B. O.; FALOWO, A. B.; CHULAYO, A.; MUCHENJE, V. The potential of animal by-products in food systems: production, prospects and challenges. **Sustainability**, v. 9, n. 7, p. 1089, 2017.
- ALEMÁN, A.; PÉREZ-SANTÍN, E.; BORDENAVE-JUCHEREAU, S.; ARNAUDIN, I.; GÓMEZ-GUILLÉN, M.; MONTERO, P. Squid gelatin hydrolysates with antihypertensive, anticancer and antioxidant activity. **Food Research International**, v. 44, n. 4, p. 1044-1051, 2011.
- ÁLVAREZ, C.; DRUMMOND, L.; MULLEN, A. M. Expanding the industrial applications of a meat co-product: generation of low-haemoglobin content plasma by means of red cells crenation. **Journal of Cleaner Production**, v. 185, p. 805-813, 2018.
- ANBU, P. Characterization of solvent stable extracellular protease from *Bacillus koreensis* (BK-P21A). **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 56, p. 162-168, 2013.
- AOAC. **Official methods of analysis**. 17 th ed. Maryland, USA: Association of Official Analytical Chemistry, 2000.
- APENTEN, R. O. The effect of protein unfolding stability on their rates of irreversible denaturation. **Food Hydrocolloids**, v. 12, n. 1, p. 1-8, 1998.
- ARIHARA, K.; ISHIKAWA, S.; ITOH, M. *Bifidobacterium* growth promoting peptides derived from meat proteins, JP 4726129, 2006-2011.
- ARIAHU, C. C.; OGUNSUA, A. O. Thermal degradation kinetics of thiamine in periwinkle based formulated low acidity foods. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 35, n. 3, p. 315-321, 2000.

- ATTRI, P.; VENKATESU, P.; KUMAR, A. Activity and stability of α -chymotrypsin in biocompatible ionic liquids: enzyme refolding by triethyl ammonium acetate. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 13, n. 7, p. 2788-2796, 2011.
- AWIKA, J. M.; ROONEY, L. W.; WU, X.; PRIOR, R. L.; CISNEROS-ZEVALLOS, L. Screening methods to measure antioxidant activity of sorghum (*Sorghum bicolor*) and sorghum products. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 23, p. 6657-6662, 2003.
- BATISTA, K. A.; BATISTA, G. L.; ALVES, G. L.; FERNANDES, K. F. Extraction, partial purification and characterization of polyphenol oxidase from *Solanum lycocarpum* fruits. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 102, p. 211-217, 2014.
- BAH, C. S.; BEKHIT, A. E.-D. A.; CARNE, A.; MCCONNELL, M. A. Production of bioactive peptide hydrolysates from deer, sheep and pig plasma using plant and fungal protease preparations. **Food Chemistry**, v. 176, p. 54-63, 2015.
- BAH, C. S.; BEKHIT, A. E.-D. A.; MCCONNELL, M. A.; CARNE, A. Generation of bioactive peptide hydrolysates from cattle plasma using plant and fungal proteases. **Food Chemistry**, v. 213, p. 98-107, 2016a.
- BAH, C. S.; BEKHIT, A. E. D. A.; CARNE, A.; MCCONNELL, M. A. Slaughterhouse blood: an emerging source of bioactive compounds. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 12, n. 3, p. 314-331, 2013.
- BAH, C. S.; BEKHIT, A. E. D. A.; CARNE, A.; MCCONNELL, M. A. Composition and biological activities of slaughterhouse blood from red deer, sheep, pig and cattle. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 96, n. 1, p. 79-89, 2016b.
- BAH, C. S.; CARNE, A.; MCCONNELL, M. A.; MROS, S.; BEKHIT, A. E.-D. A. Production of bioactive peptide hydrolysates from deer, sheep, pig and cattle red blood cell fractions using plant and fungal protease preparations. **Food Chemistry**, v. 202, p. 458-466, 2016c.
- BENZIE, I. F.; STRAIN, J. J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. **Analytical Biochemistry**, v. 239, n. 1, p. 70-76, 1996.
- BERNAL, C.; CAIRO, J.; COELLO, N. Purification and characterization of a novel exocellular keratinase from *Kocuria rosea*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 38, n. 1, p. 49-54, 2006.
- BHATTI, H. N.; ASGHER, M.; ABBAS, A.; NAWAZ, R.; SHEIKH, M. A. Studies on kinetics and thermostability of a novel acid invertase from *Fusarium solani*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 13, p. 4617-4623, 2006.
- BORBA, T. D. M. D. **Aplicação de líquidos iônicos: estabilidade e propriedades catalíticas de protease queratinolítica**. 2015. 62 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos), Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande.
- BORBA, T. M.; MACHADO, T. B.; BRANDELLI, A.; KALIL, S. J. Thermal stability and catalytic properties of protease from *Bacillus* sp. P45 active in organic solvents and ionic liquid. **Biotechnology Progress**, v. 34, n. 5, p. 1102-1108, 2018.

- BOSE, S.; BARNES, C. A.; PETRICH, J. W. Enhanced stability and activity of cellulase in an ionic liquid and the effect of pretreatment on cellulose hydrolysis. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 109, n. 2, p. 434-443, 2012.
- BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M.-E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT-Food Science and Technology**, v. 28, n. 1, p. 25-30, 1995.
- BROMBERG, A.; MARX, S.; FRISHMAN, G. Kinetic study of the thermal inactivation of cholinesterase enzymes immobilized in solid matrices. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics**, v. 1784, n. 6, p. 961-966, 2008.
- BOSE, S.; ARMSTRONG, D. W.; PETRICH, J. W. Enzyme-catalyzed hydrolysis of cellulose in ionic liquids: a green approach toward the production of biofuels. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 114, n. 24, p. 8221-8227, 2010.
- BOSE, S.; BARNES, C. A.; PETRICH, J. W. Enhanced stability and activity of cellulase in an ionic liquid and the effect of pretreatment on cellulose hydrolysis. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 109, n. 2, p. 434-443, 2012.
- BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M.-E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT-Food Science and Technology**, v. 28, n. 1, p. 25-30, 1995.
- BURNOUF, T.; GOUBRAN, H. A.; CHEN, T.-M.; OU, K.-L.; EL-EKIABY, M.; RADOSEVIC, M. Blood-derived biomaterials and platelet growth factors in regenerative medicine. **Blood Reviews**, v. 27, n. 2, p. 77-89, 2013.
- CALABRESE, E.; LA SETA, F.; BUCCELLATO, A.; VIRDONE, R.; PALLOTTA, N.; CORAZZIARI, E.; COTTONE, M. Crohn's disease: a comparative prospective study of transabdominal ultrasonography, small intestine contrast ultrasonography, and small bowel enema. **Inflammatory Bowel Diseases**, v. 11, n. 2, p. 139-145, 2005.
- CAO, G.; ALESSIO, H. M.; CUTLER, R. G. Oxygen-radical absorbance capacity assay for antioxidants. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 14, n. 3, p. 303-311, 1993.
- CATIAU, L.; TRAISNEL, J.; DELVAL-DUBOIS, V.; CHIHIB, N.-E.; GUILLOCHON, D.; NEDJAR-ARROUME, N. Minimal antimicrobial peptidic sequence from hemoglobin alpha-chain: KYR. **Peptides**, v. 32, n. 4, p. 633-638, 2011.
- CENTENARO, G. S.; SALAS-MELLADO, M.; PIRES, C.; BATISTA, I.; NUNES, M. L.; PRENTICE, C. Fractionation of protein hydrolysates of fish and chicken using membrane ultrafiltration: investigation of antioxidant activity. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 172, n. 6, p. 2877-2893, 2014.
- CHALAMAIAH, M.; HEMALATHA, R.; JYOTHIRMAYI, T. Fish protein hydrolysates: proximate composition, amino acid composition, antioxidant activities and applications: a review. **Food Chemistry**, v. 135, n. 4, p. 3020-3038, 2012.
- CHANG, O. K.; HA, G. E.; HAN, G.-S.; SEOL, K.-H.; KIM, H. W.; JEONG, S.-G.; OH, M.-H.; PARK, B.-Y.; HAM, J.-S. Novel antioxidant peptide derived from the ultrafiltrate of

ovomucin hydrolysate. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, n. 30, p. 7294-7300, 2013.

CHANG, C.-Y.; WU, K.-C.; CHIANG, S.-H. Antioxidant properties and protein compositions of porcine haemoglobin hydrolysates. **Food Chemistry**, v. 100, n. 4, p. 1537-1543, 2007.

CHAPLA, D.; PANDIT, P.; SHAH, A. Production of xylooligosaccharides from corncob xylan by fungal xylanase and their utilization by probiotics. **Bioresource Technology**, v. 115, p. 215-221, 2012.

CHENG, Y.; LIU, Y.; WU, J.; DONKOR, P. O.; LI, T.; MA, H. Improving the enzymolysis efficiency of potato protein by simultaneous dual-frequency energy-gathered ultrasound pretreatment: thermodynamics and kinetics. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 37, p. 351-359, 2017.

CORNELLI, U. Antioxidant use in nutraceuticals. **Clinics in Dermatology**, v. 27, n. 2, p. 175-194, 2009.

CORRÊA, A. P. F.; DAROIT, D. J.; COELHO, J.; MEIRA, S. M.; LOPES, F. C.; SEGALIN, J.; RISSO, P. H.; BRANDELLI, A. Antioxidant, antihypertensive and antimicrobial properties of ovine milk caseinate hydrolyzed with a microbial protease. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 91, n. 12, p. 2247-2254, 2011.

CORRÊA, A. P. F.; DAROIT, D. J.; FONTOURA, R.; MEIRA, S. M. M.; SEGALIN, J.; BRANDELLI, A. Hydrolysates of sheep cheese whey as a source of bioactive peptides with antioxidant and angiotensin-converting enzyme inhibitory activities. **Peptides**, v. 61, p. 48-55, 2014.

COWAN, D. A.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Enhancing the functional properties of thermophilic enzymes by chemical modification and immobilization. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 49, n. 4, p. 326-346, 2011.

CUI, Z. Protein separation using ultrafiltration—an example of multi-scale complex systems. **China Particuology**, v. 3, n. 6, p. 343-348, 2005.

CUSHMAN, D.; CHEUNG, H. Spectrophotometric assay and properties of the angiotensin-converting enzyme of rabbit lung. **Biochemical Pharmacology**, v. 20, n. 7, p. 1637-1648, 1971.

DABIRMANESH, B.; DANESHJOU, S.; SEPAHI, A. A.; RANJBAR, B.; KHAVARI-NEJAD, R. A.; GILL, P.; HEYDARI, A.; KHAJEH, K. Effect of ionic liquids on the structure, stability and activity of two related α -amylases. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 48, n. 1, p. 93-97, 2011.

DALAGNOL, L. M.; SILVEIRA, V. C.; DA SILVA, H. B.; MANFROI, V.; RODRIGUES, R. C. Improvement of pectinase, xylanase and cellulase activities by ultrasound: effects on enzymes and substrates, kinetics and thermodynamic parameters. **Process Biochemistry**, v. 61, p. 80-87, 2017.

DAMODARAN, S.; KINSELLA, J. E. The effects of neutral salts on the stability of macromolecules. A new approach using a protein-ligand binding system. **Journal of Biological Chemistry**, v. 256, n. 7, p. 3394-3398, 1981.

DANG, D. T.; HA, S. H.; LEE, S.-M.; CHANG, W.-J.; KOO, Y.-M. Enhanced activity and stability of ionic liquid-pretreated lipase. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 45, n. 3-4, p. 118-121, 2007.

DANNENBERG, F.; KESSLER, H. G. Reaction kinetics of the denaturation of whey proteins in milk. **Journal of Food Science**, v. 53, n. 1, p. 258-263, 1988.

DAROIT, D. J.; CORRÊA, A. P. F.; BRANDELLI, A. Keratinolytic potential of a novel *Bacillus* sp. P45 isolated from the Amazon basin fish *Piaractus mesopotamicus*. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 63, n. 3, p. 358-363, 2009.

DAROIT, D. J.; CORRÊA, A. P. F.; BRANDELLI, A. Production of keratinolytic proteases through bioconversion of feather meal by the Amazonian bacterium *Bacillus* sp. P45. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 65, n. 1, p. 45-51, 2011.

DAROIT, D. J.; CORRÊA, A. P. F.; CANALES, M. M.; COELHO, J. G.; HIDALGO, M. E.; TICHOTA, D. M.; RISSO, P. H.; BRANDELLI, A. Physicochemical properties and biological activities of ovine caseinate hydrolysates. **Dairy Science & Technology**, v. 92, n. 4, p. 335-351, 2012.

DAROIT, D. J.; CORRÊA, A. P. F.; SEGALIN, J.; BRANDELLI, A. Characterization of a keratinolytic protease produced by the feather-degrading Amazonian bacterium *Bacillus* sp. P45. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 28, n. 5-6, p. 370-379, 2010.

DAROIT, D. J.; SANT'ANNA, V.; BRANDELLI, A. Kinetic stability modelling of keratinolytic protease P45: influence of temperature and metal ions. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 165, n. 7-8, p. 1740-1753, 2011.

DETTMER, A.; COELHO CAVALHEIRO, J.; CAVALLI, E.; MISTURINI ROSSI, D.; DE SOUZA GUSATTI, C.; AYUB, Z.; GUTTERRES, M. Optimization of the biotechnological process for hide unhairing in substitution of toxic sulfides. **Chemical Engineering & Technology**, v. 35, n. 5, p. 803-810, 2012.

DOBASHI, P. R. N.; BEPPU, O. S.; DOS SANTOS, L. Distúrbios do equilíbrio ácido-básico em sangue estocado. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 6, n. 4, p. 173-176, 1980.

DOBSON C.; SALI; KARPLUS, M. Protein folding: a perspective from theory and experiment. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 37, n. 7, p. 868-893, 1998.

DOS SANTOS AGUILAR, J. G.; DE CASTRO, R. J. S.; SATO, H. H. Optimization of the enzymatic hydrolysis of rice protein by different enzymes using the response surface methodology. **3 Biotech**, v. 8, n. 8, p. 372, 2018.

DOS SANTOS AGUILAR, J. G.; SATO, H. H. Microbial proteases: production and application in obtaining protein hydrolysates. **Food Research International**, v. 103, p. 253-262, 2017.

- DUARTE, R. T.; CARVALHO SIMÕES, M. C.; SGARBIERI, V. C. Bovine blood components: fractionation, composition, and nutritive value. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, n. 1, p. 231-236, 1999.
- EIJSINK, V.; MATTHEWS, B.; VRIEND, G. The role of calcium ions in the stability and instability of a thermolysin-like protease. **Protein Science**, v. 20, n. 8, p. 1346-1355, 2011.
- ERBELDINGER, M.; MESIANO, A. J.; RUSSELL, A. J. Enzymatic catalysis of formation of Z-aspartame in ionic liquid– an alternative to enzymatic catalysis in organic solvents. **Biotechnology Progress**, v. 16, n. 6, p. 1129-1131, 2000.
- ERDMANN, K.; CHEUNG, B. W.; SCHRÖDER, H. The possible roles of food-derived bioactive peptides in reducing the risk of cardiovascular disease. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 19, n. 10, p. 643-654, 2008.
- ERTAN, H.; CASSEL, C.; VERMA, A.; POLJAK, A.; CHARLTON, T.; ALDRICH-WRIGHT, J.; OMAR, S. M.; SIDDIQUI, K. S.; CAVICCHIOLI, R. A new broad specificity alkaline metalloprotease from a *Pseudomonas* sp. isolated from refrigerated milk: role of calcium in improving enzyme productivity. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 113, p. 1-8, 2015.
- FAKHFAKH, N.; KANOUN, S.; MANNI, L.; NASRI, M. Production and biochemical and molecular characterization of a keratinolytic serine protease from chicken feather-degrading *Bacillus licheniformis* RPK. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 55, n. 4, p. 427-436, 2009.
- FARVIN, K. S.; ANDERSEN, L. L.; NIELSEN, H. H.; JACOBSEN, C.; JAKOBSEN, G.; JOHANSSON, I.; JESSEN, F. Antioxidant activity of Cod (*Gadus morhua*) protein hydrolysates: in vitro assays and evaluation in 5% fish oil-in-water emulsion. **Food Chemistry**, v. 149, p. 326-334, 2014.
- FIGUEROA, O. A.; ZAPATA, J. É.; GUTIÉRREZ, G. A. Modelamiento de la cinética de hidrólisis enzimática de proteínas del plasma bovino. **Revista EIA**, v. 9, n. 17, p. 71-84, 2012.
- FITZGERALD, R. J.; MURRAY, B. A.; WALSH, D. J. Hypotensive peptides from milk proteins. **The Journal of Nutrition**, v. 134, n. 4, p. 980S-988S, 2004.
- FISCHER, F.; MUTSCHLER, J.; ZUFFEREY, D. Enzyme catalysis with small ionic liquid quantities. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 38, n. 4, p. 477-487, 2011.
- FORSYTH, J.; REILLY, J.; FRASER, C. G.; STRUTHERS, A. Angiotensin converting enzyme activity in infancy is related to birth weight. **Archives of Disease in Childhood-Fetal and Neonatal Edition**, v. 89, n. 5, p. F442-F444, 2004.
- FU, Y.; LIU, J.; HANSEN, E. T.; BREDIE, W. L.; LAMETSCH, R. Structural characteristics of low bitter and high umami protein hydrolysates prepared from bovine muscle and porcine plasma. **Food Chemistry**, v. 257, p. 163-171, 2018.
- FUKUDA, K.; HASUDA, K.; ODA, T.; YOSHIMURA, H.; MURAMATSU, T. Novel extracellular alkaline metalloendopeptidases from *Vibrio* sp. NUF-BPP1: purification and characterization. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 61, n. 1, p. 96-101, 1997.

GALANAKIS, C. M. Recovery of high added-value components from food wastes: conventional, emerging technologies and commercialized applications. **Trends in Food Science & Technology**, v. 26, n. 2, p. 68-87, 2012.

GAO, W.-W.; ZHANG, F.-X.; ZHANG, G.-X.; ZHOU, C.-H. Key factors affecting the activity and stability of enzymes in ionic liquids and novel applications in biocatalysis. **Biochemical Engineering Journal**, v. 99, p. 67-84, 2015.

GARCÍA, M. C.; ENDERMANN, J.; GONZALEZ-GARCIA, E.; MARINA, M. L. HPLC-Q-TOF-MS identification of antioxidant and antihypertensive peptides recovered from cherry (*Prunus cerasus L.*) subproducts. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 63, n. 5, p. 1514-1520, 2015.

GARRIDO, D.; NWOSU, C.; RUIZ-MOYANO, S.; ALDREDGE, D.; GERMAN, J. B.; LEBRILLA, C. B.; MILLS, D. A. Endo- β -N-acetylglucosaminidases from infant-gut associated bifidobacteria release complex N-glycans from human milk glycoproteins. **Molecular & Cellular Proteomics**, p. mcp.M112.018119, 2012.

GATNAU, R.; POLO, J.; ROBERT, E. Plasma protein antimicrobial substitution at negligible risk. **Feed manufacturing in the Mediterranean region. Improving safety: from feed to food**, v. 54, p. 141-150, 2001.

GAVRILESCU, M.; CHISTI, Y. Biotechnology—a sustainable alternative for chemical industry. **Biotechnology Advances**, v. 23, n. 7, p. 471-499, 2005.

GHARAVI, N.; HAGGARTY, S.; EL-KADI, S.; AYMAN, O. Chemoprotective and carcinogenic effects of tert-butylhydroquinone and its metabolites. **Current Drug Metabolism**, v. 8, n. 1, p. 1-7, 2007.

GIBSON, G. R.; ROBERFROID, M. B. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. **The Journal of Nutrition**, v. 125, n. 6, p. 1401-1412, 1995.

GHORBEL, B.; SELLAMI-KAMOUN, A.; NASRI, M. Stability studies of protease from *Bacillus cereus* BG1. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 32, n. 5, p. 513-518, 2003.

GOHEL, S.; SINGH, S. Thermodynamics of a Ca^{2+} dependent, highly thermostable and detergent compatible purified alkaline serine protease from *Nocardioopsis xinjiangensis* strain OM-6. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 113, p. 565-574, 2018.

GONÇALVES, S. M. **Hidrólise de caseína e plasma de sangue bovino com protease de *Bacillus sp.* P45**. 2016. 94 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química), Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande.

GORBATOV, V. Collection and utilization of blood and blood proteins for edible purposes in the USSR. **Advances in Meat Research (USA)**, 1988.

GORKE, J.; SRIENC, F.; KAZLAUSKAS, R. Toward advanced ionic liquids. Polar, enzyme-friendly solvents for biocatalysis. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 15, n. 1, p. 40-53, 2010.

- GORMAN, L. A. S.; DORDICK, J. S. Organic solvents strip water off enzymes. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 39, n. 4, p. 392-397, 1992.
- GOTOR-FERNÁNDEZ, V.; BRIEVA, R.; GOTOR, V. Lipases: useful biocatalysts for the preparation of pharmaceuticals. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 40, n. 3, p. 111-120, 2006.
- GOZZO, F. C.; SANTOS, L. S.; AUGUSTI, R.; CONSORTI, C. S.; DUPONT, J.; EBERLIN, M. N. Gaseous supramolecules of imidazolium ionic liquids: “magic” numbers and intrinsic strengths of hydrogen bonds. **Chemistry—A European Journal**, v. 10, n. 23, p. 6187-6193, 2004.
- GRAZZIOTIN, A.; PIMENTEL, F. A.; SANGALI, S.; DE JONG, E. V.; BRANDELLI, A. Production of feather protein hydrolysate by keratinolytic bacterium *Vibrio* sp. kr2. **Bioresource Technology**, v. 98, n. 16, p. 3172-3175, 2007.
- GULMEZ, C.; ATAKISI, O.; DALGINLI, K. Y.; ATAKISI, E. A novel detergent additive: organic solvent- and thermo-alkaline-stable recombinant subtilisin. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 108, p. 436-443, 2018.
- GUNSTONE, J. W. Using blood plasma. **The National Provisioner**, v. 23, p. 20-28, 1980.
- GUO, L.; HARNEDY, P. A.; LI, B.; HOU, H.; ZHANG, Z.; ZHAO, X.; FITZGERALD, R. J. Food protein-derived chelating peptides: biofunctional ingredients for dietary mineral bioavailability enhancement. **Trends in Food Science & Technology**, v. 37, n. 2, p. 92-105, 2014.
- GUPTA, R.; BEG, Q.; LORENZ, P. Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 59, n. 1, p. 15-32, 2002.
- GUPTA, R.; RAJPUT, R.; SHARMA, R.; GUPTA, N. Biotechnological applications and prospective market of microbial keratinases. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, n. 23, p. 9931-9940, 2013.
- HALLIDAY, D. A. Blood - a source of proteins. **Process Biochemistry**, v. 8, p. 15-17, 1973.
- HARWOOD, C. R.; CRANENBURGH, R. *Bacillus* protein secretion: an unfolding story. **Trends in Microbiology**, v. 16, n. 2, p. 73-79, 2008.
- HERNÁNDEZ-LEDESMA, B.; DEL MAR CONTRERAS, M.; RECIO, I. Antihypertensive peptides: production, bioavailability and incorporation into foods. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 165, n. 1, p. 23-35, 2011.
- HERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ, F.; DE LOS RIOS, A.; TOMÁS-ALONSO, F.; GOMEZ, D.; VÍLLORA, G. Stability of hydrolase enzymes in ionic liquids. **The Canadian Journal of Chemical Engineering**, v. 87, n. 6, p. 910-914, 2009.
- HIDALGO, M. E.; CÔRREA, A. P. F.; CANALES, M. M.; DAROIT, D. J.; BRANDELLI, A.; RISSO, P. Biological and physicochemical properties of bovine sodium caseinate hydrolysates obtained by a bacterial protease preparation. **Food Hydrocolloids**, v. 43, p. 510-520, 2015.

- HIDALGO, M. E.; DAROIT, D. J.; FOLMER CORREA, A. P.; PIENIZ, S.; BRANDELLI, A.; RISSO, P. H. Physicochemical and antioxidant properties of bovine caseinate hydrolysates obtained through microbial protease treatment. **International Journal of Dairy Technology**, v. 65, n. 3, p. 342-352, 2012.
- HOYOS, P.; PACE, V.; J HERNAIZ, M.; R ALCANTARA, A. Biocatalysis in the pharmaceutical industry. A greener future. **Current Green Chemistry**, v. 1, n. 2, p. 155-181, 2014.
- HSIEH, Y.-H. P.; OFORI, J. A. Blood-derived products for human consumption. **Revelation and Science**, v. 1, n. 01, 2011.
- HSU, K.-C. Purification of antioxidative peptides prepared from enzymatic hydrolysates of tuna dark muscle by-product. **Food Chemistry**, v. 122, n. 1, p. 42-48, 2010.
- HUANG, S.-C.; LIU, P.-J. Inhibition of angiotensin I-converting enzymes by enzymatic hydrolysates from chicken blood. **Journal of Food & Drug Analysis**, v. 18, n. 6, p. 458-463, 2010.
- HU, J.; XU, M.; HANG, B.; WANG, L.; WANG, Q.; CHEN, J.; SONG, T.; FU, D.; WANG, Z.; WANG, S. Isolation and characterization of an antimicrobial peptide from bovine hemoglobin α -subunit. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 27, n. 4, p. 767-771, 2011.
- HUANG, S.-C.; LIU, P.-J. Inhibition of angiotensin I - converting enzymes by enzymatic hydrolysates from chicken blood. **Journal of Food & Drug Analysis**, v. 18, n. 6, p. 458-463, 2010.
- HUEBNER, J.; WEHLING, R.; HUTKINS, R. Functional activity of commercial prebiotics. **International Dairy Journal**, v. 17, n. 7, p. 770-775, 2007.
- HUISMAN, G. W.; COLLIER, S. J. On the development of new biocatalytic processes for practical pharmaceutical synthesis. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 17, n. 2, p. 284-292, 2013.
- HURTADO, S.; DAGÀ, I.; ESPIGULÉ, E.; PARÉS, D.; SAGUER, E.; TOLDRÀ, M.; CARRETERO, C. Use of porcine blood plasma in “phosphate-free frankfurters”. **Procedia Food Science**, v. 1, p. 477-482, 2011.
- HYUN, C.-K.; SHIN, H.-K. Utilization of bovine blood plasma proteins for the production of angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides. **Process Biochemistry**, v. 36, n. 1-2, p. 65-71, 2000.
- IBRAHIM, S. A.; BEZKOROVAINY, A. Growth-promoting factors for *Bifidobacterium longum*. **Journal of Food Science**, v. 59, n. 1, p. 189-191, 1994.
- IYER, P. V.; ANANTHANARAYAN, L. Enzyme stability and stabilization—aqueous and non-aqueous environment. **Process Biochemistry**, v. 43, n. 10, p. 1019-1032, 2008.
- JAIN, D.; PANCHA, I.; MISHRA, S. K.; SHRIVASTAV, A.; MISHRA, S. Purification and characterization of haloalkaline thermoactive, solvent stable and SDS-induced protease from

Bacillus sp.: a potential additive for laundry detergents. **Bioresource Technology**, v. 115, p. 228-236, 2012.

JANATI-FARD, F.; HOUSAINDOKHT, M. R.; MONHEMI, H.; NAKHAEIPOUR, A. How a multimeric macromolecule is affected by divalent salts? Experimental and simulation study. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 106, p. 284-292, 2018.

JAYATHILAKAN, K.; SULTANA, K.; RADHAKRISHNA, K.; BAWA, A. Utilization of byproducts and waste materials from meat, poultry and fish processing industries: a review. **Journal of Food Science and Technology**, v. 49, n. 3, p. 278-293, 2012.

JELLOULI, K.; GHORBEL-BELLAJ, O.; AYED, H. B.; MANNI, L.; AGREBI, R.; NASRI, M. Alkaline-protease from *Bacillus licheniformis* MP1: purification, characterization and potential application as a detergent additive and for shrimp waste deproteinization. **Process Biochemistry**, v. 46, n. 6, p. 1248-1256, 2011.

JEMIL, I.; JRIDI, M.; NASRI, R.; KTARI, N.; SALEM, R. B. S.-B.; MEHIRI, M.; HAJJI, M.; NASRI, M. Functional, antioxidant and antibacterial properties of protein hydrolysates prepared from fish meat fermented by *Bacillus subtilis* A26. **Process Biochemistry**, v. 49, n. 6, p. 963-972, 2014.

JIANG, Z.; TIAN, B.; BRODKORB, A.; HUO, G. Production, analysis and *in vivo* evaluation of novel angiotensin-I-converting enzyme inhibitory peptides from bovine casein. **Food Chemistry**, v. 123, n. 3, p. 779-786, 2010.

KAPEL, R.; KLINGENBERG, F.; FRAMBOISIER, X.; DHULSTER, P.; MARC, I. An original use of size exclusion-HPLC for predicting the performances of batch ultrafiltration implemented to enrich a complex protein hydrolysate in a targeted bioactive peptide. **Journal of Membrane Science**, v. 383, n. 1-2, p. 26-34, 2011.

KARBALAEI-HEIDARI, H. R.; SHAHBAZI, M.; ABSALAN, G. Characterization of a novel organic solvent tolerant protease from a moderately halophilic bacterium and its behavior in ionic liquids. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 170, n. 3, p. 573-586, 2013.

KAZAN, D.; ERARSLAN, A. Stabilization of *Escherichia coli* penicillin G acylase by polyethylene glycols against thermal inactivation. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 62, n. 1, p. 1-13, 1997.

KLÄHN, M.; LIM, G. S.; SEDURAMAN, A.; WU, P. On the different roles of anions and cations in the solvation of enzymes in ionic liquids. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 13, n. 4, p. 1649-1662, 2011.

KLIBANOV, A. M. Enzymatic catalysis in anhydrous organic solvents. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 14, n. 4, p. 141-144, 1989.

KOBAYASHI, Y.; YAMAUCHI, T.; KATSUDA, T.; YAMAJI, H.; KATOH, S. Angiotensin-I converting enzyme (ACE) inhibitory mechanism of tripeptides containing aromatic residues. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 106, n. 3, p. 310-312, 2008.

KREM, M. M.; DI CERA, E. Molecular markers of serine protease evolution. **The EMBO Journal**, v. 20, n. 12, p. 3036-3045, 2001.

KUMAR, A.; VENKATESU, P. Overview of the stability of α -chymotrypsin in different solvent media. **Chemical Reviews**, v. 112, n. 7, p. 4283-4307, 2012.

KUMAR, D. M.; PRIYA, P.; BALASUNDARI, S. N.; DEVI, G.; REBECCA, A. I. N.; KALAICHELVAN, P. Production and optimization of feather protein hydrolysate from *Bacillus* sp. MPTK6 and its antioxidant potential. **Middle-East Journal of Scientific Research**, v. 11, n. 7, p. 900-907, 2012.

KUROZAWA, L. E.; PARK, K. J.; HUBINGER, M. D. Influence of process conditions on enzymatic hydrolysis kinetics of chicken meat. **Food Science and Technology**, v. 29, n. 3, p. 557-566, 2009.

LAANE, C.; BOEREN, S.; VOS, K.; VEEGER, C. Rules for optimization of biocatalysis in organic solvents. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 30, n. 1, p. 81-87, 1987.

LAFARGA, T.; ALUKO, R. E.; RAI, D. K.; O'CONNOR, P.; HAYES, M. Identification of bioactive peptides from a papain hydrolysate of bovine serum albumin and assessment of an antihypertensive effect in spontaneously hypertensive rats. **Food Research International**, v. 81, p. 91-99, 2016a.

LAFARGA, T.; WILM, M.; WYNNE, K.; HAYES, M. Bioactive hydrolysates from bovine blood globulins: generation, characterisation, and in silico prediction of toxicity and allergenicity. **Journal of Functional Foods**, v. 24, p. 142-155, 2016b.

LASZLO, J. A.; COMPTON, D. L. α -Chymotrypsin catalysis in imidazolium-based ionic liquids. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 75, n. 2, p. 181-186, 2001.

LATORRES, J. M. **Obtenção de peptídeos bioativos encapsulados a partir da hidrólise enzimática de camarão branco (*Litopenaeus vannamei*)**. 2018. 193 f. Tese (Doutorado em Engenharia e Ciência de Alimentos), Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande.

LEE, J. K.; KIM, M.-J. Ionic liquid-coated enzyme for biocatalysis in organic solvent. **The Journal of organic chemistry**, v. 67, n. 19, p. 6845-6847, 2002.

LEE, S. Y.; HUR, S. J. Antihypertensive peptides from animal products, marine organisms, and plants. **Food Chemistry**, v. 228, p. 506-517, 2017.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M.; SIMÕES, A. A.; LODI, W. R. N. **Princípios de Bioquímica**, 2 ed., São Paulo, Sarvier, 1995.

LEMES, A. C. **Obtenção e caracterização de queratinase de *Bacillus* sp. P45 a partir de coprodutos e aplicação na produção de queijos cremosos enriquecidos com chia e quinoa**. 2015. 187 f. Tese (Doutorado em Engenharia e Ciência de Alimentos), Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande.

LEMES, A. C.; ÁLVARES, G. T.; EGEA, M. B.; BRANDELLI, A.; KALIL, S. J. Simultaneous production of proteases and antioxidant compounds from agro-industrial by-products. **Bioresource Technology**, v. 222, p. 210-216, 2016a.

LEMES, A. C.; PAVÓN, Y.; LAZZARONI, S.; ROZYCKI, S.; BRANDELLI, A.; KALIL, S. J. A new milk-clotting enzyme produced by *Bacillus* sp. P45 applied in cream cheese development. **LWT-Food Science and Technology**, v. 66, p. 217-224, 2016b.

LI, Y.; XIANG, Q.; ZHANG, Q.; HUANG, Y.; SU, Z. Overview on the recent study of antimicrobial peptides: origins, functions, relative mechanisms and application. **Peptides**, v. 37, n. 2, p. 207-215, 2012.

LI-CHAN, E. C. Bioactive peptides and protein hydrolysates: research trends and challenges for application as nutraceuticals and functional food ingredients. **Current Opinion in Food Science**, v. 1, p. 28-37, 2015.

LIEPKE, C.; ADERMANN, K.; RAIDA, M.; MÄGERT, H. J.; FORSSMANN, W. G.; ZUCHT, H. D. Human milk provides peptides highly stimulating the growth of bifidobacteria. **European Journal of Biochemistry**, v. 269, n. 2, p. 712-718, 2002.

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, n. 1-4, p. 300-306, 2013.

LIU, B.; AISA, H. A.; YILI, A. Isolation and identification of two potential antioxidant peptides from sheep abomasum protein hydrolysates. **European Food Research and Technology**, v. 244, n. 9, p. 1614-1625, 2018.

LIU, Q.; KONG, B.; XIONG, Y. L.; XIA, X. Antioxidant activity and functional properties of porcine plasma protein hydrolysate as influenced by the degree of hydrolysis. **Food Chemistry**, v. 118, n. 2, p. 403-410, 2010a.

LIU, X.; SONG, C.; CHEN, R.; JIANG, X.; JIN, Y.; ZOU, H. Identification of angiotensin I-converting enzyme inhibitors in peptides mixture of hydrolyzed red deer plasma with proteomic approach. **Chinese Journal of Chemistry**, v. 28, n. 9, p. 1665-1672, 2010b.

LÓPEZ-BARRIOS, L.; GUTIÉRREZ-URIBE, J. A.; SERNA-SALDÍVAR, S. O. Bioactive peptides and hydrolysates from pulses and their potential use as functional ingredients. **Journal of Food Science**, v. 79, n. 3, p. 273-283, 2014.

LOZANO, P.; DE DIEGO, T.; GUEGAN, J. P.; VAULTIER, M.; IBORRA, J. L. Stabilization of α -chymotrypsin by ionic liquids in transesterification reactions. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 75, n. 5, p. 563-569, 2001.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v. 193, n. 1, p. 265-275, 1951.

MAGET-DANA, R. The monolayer technique: a potent tool for studying the interfacial properties of antimicrobial and membrane-lytic peptides and their interactions with lipid membranes. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes**, v. 1462, n. 1-2, p. 109-140, 1999.

MARC, Y.; LLORENS-CORTES, C. The role of the brain renin-angiotensin system in hypertension: implications for new treatment. **Progress in Neurobiology**, v. 95, n. 2, p. 89-103, 2011.

- MARCINIAK, A.; SUWAL, S.; NADERI, N.; POULIOT, Y.; DOYEN, A. Enhancing enzymatic hydrolysis of food proteins and-production of bioactive peptides using high hydrostatic pressure technology. **Trends in Food Science & Technology**, v. 80, p. 187-198, 2018.
- MEMARPOOR-YAZDI, M.; ASOODEH, A.; CHAMANI, J. A novel antioxidant and antimicrobial peptide from hen egg white lysozyme hydrolysates. **Journal of Functional Foods**, v. 4, n. 1, p. 278-286, 2012.
- MIKKELSEN, T. L.; RASMUSSEN, E.; OLSEN, A.; BARKHOLT, V.; FRØKIÆR, H. Immunogenicity of κ -casein and glycomacropeptide. **Journal of Dairy Science**, v. 89, n. 3, p. 824-830, 2006.
- MIN, B.; AHN, D. Mechanism of lipid peroxidation in meat and meat products-A review. **Food Science and Biotechnology**, v. 14, n. 1, p. 152-163, 2005.
- MINE, Y.; LI-CHAN, E.; JIANG, B. **Bioactive proteins and peptides as functional foods and nutraceuticals**. 1 ed., Singapura, John Wiley & Sons, 2011.
- MORAN, L.A.; HORTON, H. R.; SCRIMGEOUR, K. G.; PERRY, M. D. **Bioquímica**. 5 ed., São Paulo, Pearson Education do Brasil, 2013.
- MORAN, L. A.; HORTON, R.; SCRIMGEOUR, K. G.; OCHS, J.; RAWN, D. **Principles of Biochemistry**. 3ed., New Jersey, Prentice Hall, 2002.
- MOTTA, A.; BRANDELLI, A. Characterization of an antibacterial peptide produced by *Brevibacterium linens*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 92, n. 1, p. 63-70, 2002.
- MULLEN, A. M.; ÁLVAREZ, C.; POJIĆ, M.; HADNADEV, T. D.; PAPAGEORGIOU, M. Classification and target compounds. In: (Ed.). **Food Waste Recovery**: Elsevier, 2015. p. 25-57.
- MULLEN, A. M.; ÁLVAREZ, C.; ZEUGOLIS, D. I.; HENCHION, M.; O'NEILL, E.; DRUMMOND, L. Alternative uses for co-products: harnessing the potential of valuable compounds from meat processing chains. **Meat science**, v. 132, p. 90-98, 2017.
- MUÑOZ, P. A.; CORREA-LLANTÉN, D. N.; BLAMEY, J. M. Ionic liquids increase the catalytic efficiency of a lipase (Lip1) from an antarctic thermophilic bacterium. **Lipids**, v. 50, n. 1, p. 49-55, 2015.
- NAGHMOUCHI, K.; DRIDER, D.; FLISS, I. Action of divergicin M35, a class IIa bacteriocin, on liposomes and *Listeria*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 102, n. 6, p. 1508-1517, 2007.
- NAJAFIAN, L.; BABJI, A. S. A review of fish-derived antioxidant and antimicrobial peptides: their production, assessment, and applications. **Peptides**, v. 33, n. 1, p. 178-185, 2012.
- NAUSHAD, M.; ALOTHMAN, Z. A.; KHAN, A. B.; ALI, M. Effect of ionic liquid on activity, stability, and structure of enzymes: a review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 51, n. 4, p. 555-560, 2012.

OCKERMAN, H. W.; HANSEN, C. L. **Animal by-product processing & utilization**. 1 ed., Weinheim, CRC Press, 1999.

ODA, H.; WAKABAYASHI, H.; YAMAUCHI, K.; SATO, T.; XIAO, J.-Z.; ABE, F.; IWATSUKI, K. Isolation of bifidogenic peptide from pepsin hydrolysate of bovine lactoferrin. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 79, n. 6, p. 1843-1849, 2013.

OGINO, H.; TSUCHIYAMA, S.; YASUDA, M.; DOUKYU, N. Enhancement of the aspartame precursor synthetic activity of an organic solvent-stable protease. **Protein Engineering, Design & Selection**, v. 23, n. 3, p. 147-152, 2010.

OLIVEIRA, C.; COLETTI, D.; CORREA, A.; DAROIT, D.; TONIOLO, R.; CLADERA-OLIVERA, F.; BRANDELLI, A. Antioxidant activity and inhibition of meat lipid oxidation by soy protein hydrolysates obtained with a microbial protease. **International Food Research Journal**, v. 21, n. 2, p. 775-781, 2014.

ORTEGA, N.; DE DIEGO, S.; RODRÍGUEZ-NOGALES, J. M.; PEREZ-MATEOS, M.; BUSTO, M. D. Kinetic behaviour and thermal inactivation of pectinlyase used in food processing. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 39, n. 6, p. 631-639, 2004.

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

PAUL, T.; DAS, A.; MANDAL, A.; HALDER, S. K.; JANA, A.; MAITY, C.; DASMOHAPATRA, P. K.; PATI, B. R.; MONDAL, K. C. An efficient cloth cleaning properties of a crude keratinase combined with detergent: towards industrial viewpoint. **Journal of Cleaner Production**, v. 66, p. 672-684, 2014.

PEREIRA, E. V. **Determinação da atividade e da estabilidade termodinâmica da isoforma α -tripsina bovina em meios aquo-orgânicos**. 2015. 70 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica e Farmacologia), Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória.

PEREZ ESPITIA, P. J.; DE FÁTIMA FERREIRA SOARES, N.; DOS REIS COIMBRA, J. S.; DE ANDRADE, N. J.; SOUZA CRUZ, R.; MEDEIROS, A.; ANTONIO, E. Bioactive peptides: synthesis, properties, and applications in the packaging and preservation of food. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 11, n. 2, p. 187-204, 2012.

PETRILLO JR, E. W.; ONDETTI, M. A. Angiotensin-converting enzyme inhibitors: medicinal chemistry and biological actions. **Medicinal Research Reviews**, v. 2, n. 1, p. 1-41, 1982.

PHELAN, M.; AHERNE, A.; FITZGERALD, R. J.; O'BRIEN, N. M. Casein-derived bioactive peptides: biological effects, industrial uses, safety aspects and regulatory status. **International Dairy Journal**, v. 19, n. 11, p. 643-654, 2009.

POKORA, M.; ZAMBROWICZ, A.; DĄBROWSKA, A.; ECKERT, E.; SETNER, B.; SZOŁTYSIK, M.; SZEWCZUK, Z.; ZABŁOCKA, A.; POLANOWSKI, A.; TRZISZKA, T. 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.

POWER, O.; JAKEMAN, P.; FITZGERALD, R. Antioxidative peptides: enzymatic production, *in vitro* and *in vivo* antioxidant activity and potential applications of milk-derived antioxidative peptides. **Amino Acids**, v. 44, n. 3, p. 797-820, 2013.

PRAKASH, P.; JAYALAKSHMI, S. K.; SREERAMULU, K. Purification and characterization of extreme alkaline, thermostable keratinase, and keratin disulfide reductase produced by *Bacillus halodurans* PPKS-2. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 87, n. 2, p. 625-633, 2010.

RAHMAN, R. N. Z. R. A.; GEOK, L. P.; BASRI, M.; SALLEH, A. B. An organic solvent-stable alkaline protease from *Pseudomonas aeruginosa* strain K: enzyme purification and characterization. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, n. 7, p. 1484-1491, 2006.

RAHMAN, R. N. Z. R. A.; GEOK, L. P.; BASRI, M.; SALLEH, A. B. An organic solvent-stable alkaline protease from *Pseudomonas aeruginosa* strain K: Enzyme purification and characterization. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, n. 7, p. 1484-1491, 2006.

RAHMAN, R. N. Z. R. A.; MAHAMAD, S.; SALLEH, A. B.; BASRI, M. A new organic solvent tolerant protease from *Bacillus pumilus* 115b. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 34, n. 7, p. 509-517, 2007.

RAO, M. B.; TANKSALE, A. M.; GHATGE, M. S.; DESHPANDE, V. V. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 62, n. 3, p. 597-635, 1998.

RAWLINGS, N. D.; MORTON, F. R.; BARRETT, A. J. MEROPS: the peptidase database. **Nucleic Acids Research**, v. 34, p. 270-272, 2006.

RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 26, n. 9-10, p. 1231-1237, 1999.

REDDY, L.; WEE, Y. J.; RYU, H. W. Purification and characterization of an organic solvent and detergent-tolerant novel protease produced by *Bacillus* sp. RKY3. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 83, n. 11, p. 1526-1533, 2008.

REICHARDT, C. **Solvents and Solvent Effects in Organic Chemistry**. 4ed., Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim: 2003.

ROCHA, M. D. **Obtenção de hidrolisados proteicos da Castanha (*Umbrina canosai*) com atividade biológica e sua aplicação em filmes bioativos**. 2016. 251 f. Tese (Doutorado em Engenharia e Ciência de Alimentos), Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande.

RU, M. T.; HIROKANE, S. Y.; LO, A. S.; DORDICK, J. S.; REIMER, J. A.; CLARK, D. S. On the salt-induced activation of lyophilized enzymes in organic solvents: effect of salt kosmotropicity on enzyme activity. **Journal of the American Chemical Society**, v. 122, n. 8, p. 1565-1571, 2000.

RYAN, K. N. **Modifying whey proteins to improve thermal stability at neutral pH**. 2011. 219 f. Tese. North Carolina State University, North Carolina.

- SALA, L.; GAUTÉRIO, G. V.; YOUNAN, F. F.; BRANDELLI, A.; MORAES, C. C.; KALIL, S. J. Integration of ultrafiltration into an aqueous two-phase system in the keratinase purification. **Process Biochemistry**, v. 49, n. 11, p. 2016-2024, 2014.
- SALGADO, P. R.; FERNÁNDEZ, G. B.; DRAGO, S. R.; MAURI, A. N. Addition of bovine plasma hydrolysates improves the antioxidant properties of soybean and sunflower protein-based films. **Food Hydrocolloids**, v. 25, n. 6, p. 1433-1440, 2011.
- SARMADI, B. H.; ISMAIL, A. Antioxidative peptides from food proteins: a review. **Peptides**, v. 31, n. 10, p. 1949-1956, 2010.
- SEN, S.; DASU, V. V.; DUTTA, K.; MANDAL, B. Characterization of a novel surfactant and organic solvent stable high-alkaline protease from new *Bacillus pseudofirmus* SVB1. **Research Journal of Microbiology**, v. 6, n. 11, p. 769-783, 2011.
- SENTANDREU, M. Á.; TOLDRÁ, F. A rapid, simple and sensitive fluorescence method for the assay of angiotensin-I converting enzyme. **Food Chemistry**, v. 97, n. 3, p. 546-554, 2006.
- SEO, H.-W.; JUNG, E.-Y.; GO, G.-W.; KIM, G.-D.; JOO, S.-T.; YANG, H.-S. Optimization of hydrolysis conditions for bovine plasma protein using response surface methodology. **Food Chemistry**, v. 185, p. 106-111, 2015.
- SHARMA, K. M.; KUMAR, R.; PANWAR, S.; KUMAR, A. Microbial alkaline proteases: optimization of production parameters and their properties. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, v. 15, n. 1, p. 115-126, 2017.
- 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, R.; KUMAR, M.; MITTAL, A.; MEHTA, P. K. Microbial enzymes: industrial progress in 21st century. **3 Biotech**, v. 6, n. 2, p. 174, 2016.
- SINGH, R. D.; BANERJEE, J.; ARORA, A. Prebiotic potential of oligosaccharides: a focus on xylan derived oligosaccharides. **Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre**, v. 5, n. 1, p. 19-30, 2015.
- SINHA, R.; RADHA, C.; PRAKASH, J.; KAUL, P. Whey protein hydrolysate: functional properties, nutritional quality and utilization in beverage formulation. **Food Chemistry**, v. 101, n. 4, p. 1484-1491, 2007.
- SIRTORI, L. R.; CLADERA-OLIVERA, F.; LORENZINI, D. M.; TSAI, S.-M.; BRANDELLI, A. Purification and partial characterization of an antimicrobial peptide produced by *Bacillus* sp. strain P45, a bacterium from the Amazon basin fish *Piaractus mesopotamicus*. **The Journal of General and Applied Microbiology**, v. 52, n. 6, p. 357-363, 2006.
- SLAVIN, J. Fiber and prebiotics: mechanisms and health benefits. **Nutrients**, v. 5, n. 4, p. 1417-1435, 2013.

SOUZA, P. M. D.; BITTENCOURT, M. L. D. A.; CAPRARA, C. C.; FREITAS, M. D.; ALMEIDA, R. P. C. D.; SILVEIRA, D.; FONSECA, Y. M.; FERREIRA FILHO, E. X.; PESSOA JUNIOR, A.; MAGALHÃES, P. O. A biotechnology perspective of fungal proteases. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 46, n. 2, p. 337-346, 2015.

SUN, Q.; SHEN, H.; LUO, Y. Antioxidant activity of hydrolysates and peptide fractions derived from porcine hemoglobin. **Journal of Food Science and Technology**, v. 48, n. 1, p. 53-60, 2011.

TOLDRÁ, F.; MORA, L.; REIG, M. New insights into meat by-product utilization. **Meat Science**, v. 120, p. 54-59, 2016.

TREFFERS, C.; CHEN, L.; ANDERSON, R. C.; YU, P.-L. Isolation and characterisation of antimicrobial peptides from deer neutrophils. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 26, n. 2, p. 165-169, 2005.

TUFVESSON, P. R.; LIMA-RAMOS, J.; NORDBLAD, M.; WOODLEY, J. M. Guidelines and cost analysis for catalyst production in biocatalytic processes. **Organic Process Research & Development**, v. 15, n. 1, p. 266-274, 2010.

ULUKO, H.; ZHANG, S.; LIU, L.; TSAKAMA, M.; LU, J.; LV, J. Effects of thermal, microwave, and ultrasound pretreatments on antioxidative capacity of enzymatic milk protein concentrate hydrolysates. **Journal of Functional Foods**, v. 18, p. 1138-1146, 2015.

USTOK, F. I.; TARI, C.; HARSA, S. Biochemical and thermal properties of β -galactosidase enzymes produced by artisanal yoghurt cultures. **Food Chemistry**, v. 119, n. 3, p. 1114-1120, 2010.

VAN BEILEN, J. B.; LI, Z. Enzyme technology: an overview. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 13, n. 4, p. 338-344, 2002.

VANDEPUTTE-RUTTEN, L.; GROS, P. Novel proteases: common themes and surprising features. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 12, n. 6, p. 704-708, 2002.

VELLARD, M. The enzyme as drug: application of enzymes as pharmaceuticals. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 14, n. 4, p. 444-450, 2003.

VERMA, A. K.; CHATLI, M. K.; MEHTA, N.; KUMAR, P. Assessment of physico-chemical, antioxidant and antimicrobial activity of porcine blood protein hydrolysate in pork emulsion stored under aerobic packaging condition at $4\pm 1^\circ\text{C}$. **LWT-Food Science and Technology**, v. 88, p. 71-79, 2018.

VIANA, D. D. A.; DE ALBUQUERQUE LIMA, C.; NEVES, R. P.; MOTA, C. S.; MOREIRA, K. A.; DE LIMA-FILHO, J. L.; CAVALCANTI, M. T. H.; CONVERTI, A.; PORTO, A. L. F. Production and stability of protease from *Candida buinensis*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 162, n. 3, p. 830-842, 2010.

VISWANATHAN, K.; OMOREBOKHAE, R.; LI, G.; GROSS, R. A. Protease-catalyzed oligomerization of hydrophobic amino acid ethyl esters in homogeneous reaction media using l-phenylalanine as a model system. **Biomacromolecules**, v. 11, n. 8, p. 2152-2160, 2010.

- VOSSENBERG, P.; BEEFTINK, H.; NUIJENS, T.; STUART, M. C.; TRAMPER, J. Selecting optimal conditions for Alcalase CLEA-OM for synthesis of dipeptides in organic media. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 75, p. 43-49, 2012.
- WANASUNDARA, P. K. J. P. D.; AMAROWICZ, R.; PEGG, R.; SHAND, P. Preparation and characterization of hydrolyzed proteins from defibrinated bovine plasma. **Journal of Food Science**, v. 67, n. 2, p. 623-630, 2002.
- WANG, P.; GUO, X.; WU, C.; HUANG, Q.; XU, X.; ZHOU, G.; BAI, Y. Hydrophobic-assembled curcumin–porcine plasma protein complex affected by pH. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 54, n. 3, p. 1-7, 2018.
- WEI, J. T.; CHIANG, B. H. Bioactive peptide production by hydrolysis of porcine blood proteins in a continuous enzymatic membrane reactor. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 89, n. 3, p. 372-378, 2009.
- WETZEL, R.; PERRY, L. J.; BAASE, W. A.; BECKTEL, W. J. Disulfide bonds and thermal stability in T4 lysozyme. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 85, n. 2, p. 401-405, 1988.
- WIJAYANTI, H. B.; BRODKORB, A.; HOGAN, S. A.; MURPHY, E. G. Thermal denaturation, aggregation, and methods of prevention. In: (Ed.). **Whey Proteins**: Elsevier, 2019. p.185-247.
- WILLIAMS, B.; POULTER, N.; BROWN, M.; DAVIS, M.; MCINNES, G.; POTTER, J.; SEVER, P.; THOM, S. M. Guidelines for management of hypertension: report of the fourth working party of the British Hypertension Society, 2004—BHS IV. **Journal of Human Hypertension**, v. 18, n. 3, p. 139-185, 2004.
- WIRIYAPHAN, C.; XIAO, H.; DECKER, E. A.; YONGSAWATDIGUL, J. Chemical and cellular antioxidative properties of threadfin bream (*Nemipterus* spp.) surimi byproduct hydrolysates fractionated by ultrafiltration. **Food Chemistry**, v. 167, p. 7-15, 2015.
- World Health Organization**. 2018. Disponível em: <http://www.who.int> Acesso em 10 de fev. 2019.
- WU, J.; ALUKO, R. E.; NAKAI, S. Structural requirements of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides: quantitative structure– activity relationship study of di- and tripeptides. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 3, p. 732-738, 2006.
- XU, J.; JIANG, M.; SUN, H.; HE, B. An organic solvent-stable protease from organic solvent-tolerant *Bacillus cereus* WQ9-2: purification, biochemical properties, and potential application in peptide synthesis. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 20, p. 7991-7994, 2010.
- XU, X.; CAO, R.; HE, L.; YANG, N. Antioxidant activity of hydrolysates derived from porcine plasma. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 89, n. 11, p. 1897-1903, 2009.
- YAMAMOTO, E.; YAMAGUCHI, S.; NAGAMUNE, T. Protein refolding by N-alkylpyridinium and N-alkyl-N-methylpyrrolidinium ionic liquids. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 164, n. 6, p. 957-967, 2011.

- YANG, Z. Hofmeister effects: an explanation for the impact of ionic liquids on biocatalysis. **Journal of Biotechnology**, v. 144, n. 1, p. 12-22, 2009.
- YANG, P.; KE, H.; HONG, P.; ZENG, S.; CAO, W. Antioxidant activity of bigeye tuna (*Thunnus obesus*) head protein hydrolysate prepared with Alcalase. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 46, n. 12, p. 2460-2466, 2011.
- YANG, Z.; ZHANG, K.-P.; HUANG, Y.; WANG, Z. Both hydrolytic and transesterification activities of *Penicillium expansum* lipase are significantly enhanced in ionic liquid [BMIm][PF₆]. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 63, n. 1-2, p. 23-30, 2010.
- YAO, H.; ZHANG, S.; WANG, J.; ZHOU, Q.; DONG, H.; ZHANG, X. Densities and viscosities of the binary mixtures of 1-ethyl-3-methylimidazolium bis (trifluoromethylsulfonyl) imide with N-methyl-2-pyrrolidone or ethanol at T=(293.15 to 323.15) K. **Journal of Chemical & Engineering Data**, v. 57, n. 3, p. 875-881, 2012.
- YU, P.-L.; VAN DER LINDEN, D. S.; SUGIARTO, H.; ANDERSON, R. C. Antimicrobial peptides isolated from the blood of farm animals. **Animal Production Science**, v. 50, n. 7, p. 660-669, 2010.
- ZAKS, A.; KLIBANOV, A. M. Enzyme-catalyzed processes in organic solvents. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 82, n. 10, p. 3192-3196, 1985.
- ZHANG, J.; WANG, J.; ZHAO, Y.; LI, J.; LIU, Y. Study on the interaction between calcium ions and alkaline protease of *Bacillus*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 124, p. 121-130, 2019.
- ZHAO, H.; OLUBAJO, O.; SONG, Z.; SIMS, A. L.; PERSON, T. E.; LAWAL, R. A.; HOLLEY, L. A. Effect of kosmotropicity of ionic liquids on the enzyme stability in aqueous solutions. **Bioorganic Chemistry**, v. 34, n. 1, p. 15-25, 2006.
- ZHENG, Y.; CHEN, Q.; SHAN, A.; ZHANG, H. Optimisation of the enzymatic hydrolysis of blood cells with a neutral protease. **BioMed Research International**, v. 2013, p. 1-10, 2013.
- ZHU, K.; ZHOU, H.; QIAN, H. Antioxidant and free radical-scavenging activities of wheat germ protein hydrolysates (WGPH) prepared with alcalase. **Process Biochemistry**, v. 41, n. 6, p. 1296-1302, 2006.
- ZHU, Y.; FAN, J.; CHENG, Y.; LI, L. Improvement of the antioxidant activity of Chinese traditional fermented okara (Meitauza) using *Bacillus subtilis* B2. **Food Control**, v. 19, n. 7, p. 654-661, 2008.
- ZOU, T.-B.; HE, T.-P.; LI, H.-B.; TANG, H.-W.; XIA, E.-Q. The structure-activity relationship of the antioxidant peptides from natural proteins. **Molecules**, v. 21, n. 1, p. 1-14, 2016.

