

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E DO
AMBIENTE

UTILIZAÇÃO DO MICRORGANISMO *Chryseobacterium* sp. kr6 NA
OBTENÇÃO DE HIDROLISADOS PROTEICOS CONTENDO COMPOSTOS
BIOATIVOS

ROBERTA FONTOURA

Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil

Março de 2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E DO AMBIENTE

UTILIZAÇÃO DO MICRORGANISMO *Chryseobacterium* sp. kr6 NA
OBTENÇÃO DE HIDROLISADOS PROTEICOS CONTENDO COMPOSTOS
BIOATIVOS

ROBERTA FONTOURA

Farmacêutica/Bioquímica - PUCRS

Mestre em Microbiologia Agrícola e do Ambiente - UFRGS

Tese apresentada como um dos requisitos para a obtenção do grau de Doutor em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Área de concentração em Microbiologia Industrial, Linha de Pesquisa Microbiologia de Matérias Primas e Bioprocessos.

Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil

Março de 2014

CIP - Catalogação na Publicação

Fontoura, Roberta

Utilização do microrganismo *Chryseobacterium* sp. kr6 na obtenção de hidrolisados proteicos contendo compostos bioativos / Roberta Fontoura. -- 2014. 158 f.

Orientador: Adriano Brandelli.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Porto Alegre, BR-RS, 2014.

1. proteases microbianas. 2. *Chryseobacterium* sp. kr6. 3. hidrolisados proteicos. 4. compostos bioativos. I. Brandelli, Adriano, orient. II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

AGRADECIMENTOS

À minha família, que nunca mediu esforços para possibilitar meus estudos, pelos exemplos de vida, afeto, perseverança e caráter. De forma muito especial ao meu pai, pelo exemplo de força e esperança, e pelo seu amor incondicional. Um agradecimento muito especial também a tia Darci, que foi fundamental na construção de quem eu sou hoje.

Ao professor Doutor Adriano Brandelli, pela orientação no Mestrado e Doutorado. Pelo apoio, atenção e confiança dispensada.

A todos os colegas do laboratório 218 do ICTA, pelo companheirismo.

Aos amigos que fiz no ICTA: Camila, Daniel, Fernanda, Flávio, Karla, Lucas, Luísa, Paula, Renata, Silvana, Simone, Stela, Taís. Muito obrigada pelos cafés e receitas divididas!

Em especial a Ana Paula, Cibele e Indjara, amigas e parceiras pra todas as horas. Muito obrigada! Sem vocês não teria a menor graça!

Aos amigos de longe que tanto me incentivaram.

A coordenação, professores, funcionários e colegas do PPGMAA.

A CAPES, pela bolsa de estudos concedida em parte do Doutorado.

Utilização do microrganismo *Chryseobacterium* sp. kr6 na obtenção de hidrolisados proteicos contendo compostos bioativos¹

Autor: Roberta Fontoura

Orientador: Adriano Brandelli

RESUMO

Diversas atividades biológicas têm sido associadas a hidrolisados obtidos pela ação de enzimas proteolíticas sobre diferentes fontes proteicas. Como essas atividades variam de acordo com a protease utilizada, justifica-se a busca por novas enzimas e fontes dos hidrolisados. Peptídeos bioativos podem ser liberados a partir de precursores proteicos através da hidrólise enzimática, e este potencial para gerar moléculas bioativas derivadas de produtos naturais tem recebido um aumento de interesse nas últimas décadas. Nesse estudo, hidrolisados de penas, caseinato e soro de leite ovino, obtidos com uma protease microbiana derivada de *Chryseobacterium* sp. kr6 foram avaliados em relação as suas diferentes atividades biológicas. A atividade antioxidante foi avaliada através dos métodos do ABTS, DPPH, poder redutor, capacidade quelante de ferro e TRAP, sendo que os hidrolisados do caseinato e das penas demonstraram os melhores resultados. A análise da atividade antimicrobiana também foi avaliada para o caseinato e o soro de leite ovino, apresentando bons resultados para o caseinato. A atividade anti-hipertensiva alcançou $86,60 \pm 0,98$ % de inibição da enzima conversora da angiotensina I para o caseinato (6 h), $49,22 \pm 0,86$ % para o soro (2 h) e $65,54 \pm 0,98$ % para o hidrolisado de penas (48h). A capacidade de inibição da dipeptidil peptidase-IV também foi avaliada para os hidrolisados de penas, demonstrando uma capacidade inibitória de $44,25 \pm 0,05$ % em hidrolisado de 24 h (20 mg mL^{-1}). Os hidrolisados de penas, caseinato e soro de leite ovino obtidos com a protease de *Chryseobacterium* sp. kr6 apresentaram atividade antioxidante, antimicrobiana, anti-hipertensiva e inibidora da DPP-IV. Foi observado que o tempo de hidrólise afeta as diferentes bioatividades avaliadas. Tais hidrolisados têm potenciais aplicações na indústria de alimentos, ração animal e farmacêutica.

¹Tese de Doutorado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente - Linha de Pesquisa Microbiologia de Matérias Primas e Bioprocessos, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (158 p.) Março, 2014.

Use of *Chryseobacterium* sp. kr6 to obtain protein hydrolysates containing bioactive compounds¹

Author: Roberta Fontoura

Adviser: Adriano Brandelli

ABSTRACT

Different sources of protein hydrolysates with biological activities have been the focus of several studies. Knowing that these activities vary depending on the protease used the search for new sources of the enzymes and hydrolyzed justified. Bioactive peptides derived from natural sources have received increased attention over the last decade. They can be released from precursors proteins through enzymatic hydrolysis. In this study, hydrolyzed feathers, caseinate and whey of ovine milk, obtained with a novel microbial protease derived from *Chryseobacterium* sp. kr6 were evaluated on their different biological activities. The antioxidant activity was evaluated by the methods of ABTS, DPPH, reducing power, iron chelation capacity and TRAP, and hydrolyzed caseinate and feathers showed the best results. Antimicrobial activity was also evaluated for caseinate and whey of sheep milk, with good results for the caseinate. The antihypertensive activity reached $86,60 \pm 0,98$ % inhibition for the caseinate (6 h), $49,22 \pm 0,86$ % for whey of ovine milk and $65,54 \pm 0,98$ % for hydrolyzed feathers. The ability to inhibit DPP-IV was evaluated for the hydrolyzed feathers, demonstrating an inhibitory effect of $44,25 \pm 0,005$ % hydrolyzed in 24 h (20 mg mL^{-1}). The hydrolyzed feathers, caseinato and whey from ovine milk with the protease produced by *Chryseobacterium* sp. Kr6 showed antioxidant, antimicrobial, antihypertensive and inhibitory activity of DPP-IV. It was observed that hydrolysis time affects different bioactivities evaluated. Such hydrolysates have potential applications in the food industry, animal feed and pharmaceuticals.

¹Doctoral Thesis in Agricultural and Environmental Microbiology, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (158 p.) March, 2014.

SUMÁRIO

RESUMO	v
ABSTRACT	vi
RELAÇÃO DE TABELAS	viii
RELAÇÃO DE FIGURAS	ix
RELAÇÃO DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	xi
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1 Proteases.....	3
2.2 <i>Chryseobacterium</i> sp. kr6	5
2.3 Queratinases microbianas	6
2.4 Hidrólise enzimática de proteínas.....	9
2.5 Leite ovino e sua composição proteica.....	11
2.6 Caseínas e Caseinatos.....	13
2.7 Soro	14
2.8 Peptídeos Bioativos	18
2.8.1 Peptídeos antimicrobianos	20
2.8.2 Peptídeos antioxidantes	22
2.8.3 Peptídeos anti-hipertensivos	25
2.8.4 Peptídeos inibidores da dipeptidil peptidase-IV	28
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
3.1 RESULTADOS I	32
3.2 RESULTADOS II	65
3.3 RESULTADOS III	92
4 DISCUSSÃO GERAL.....	113
5 CONCLUSÕES	121
REFERÊNCIAS.....	123

RELAÇÃO DE TABELAS

RESULTADOS I

Tabela 1. Avaliação da capacidade de inibição da dipeptidil peptidase.....54

RESULTADOS II

Tabela 1. Atividade antioxidante de hidrolisados de caseinato.....75

Tabela 2. Atividade antimicrobiana dos hidrolisados de caseinato ovino.....88

RESULTADOS III

Tabela 1. Atividades antioxidantes dos hidrolisados de soro de leite ovino.....97

RELAÇÃO DE FIGURAS

RESULTADOS I

- Figura 1.** Produção de proteases e liberação de proteínas solúveis durante o crescimento da *Chryseobacterium* sp. kr6 em meio de penas a 30 °C.....42
- Figura 2.** Perfil do peso molecular dos hidrolisados produzidos por *Chryseobacterium* sp. kr6 durante cultivo em meio de penas.....44
- Figura 3.** Análise em RP-HPLC das frações <10 kDa em hidrolisados de penas.....45
- Figura 4.** Atividades antioxidantes nos sobrenadantes de hidrolisados de penas produzidos por *Chryseobacterium* sp. kr6.....47
- Figura 5.** Perfil do TRAP de hidrolisados de penas em diferentes concentrações.....50
- Figura 6.** Potencial antioxidante reativo total (TRAP) dos hidrolisados de penas em diferentes concentrações.....51
- Figura 7.** Valores da reatividade antioxidante total (TAR) dos hidrolisados de penas.....52
- Figura 8.** Capacidade de inibição da ECA dos hidrolisados produzidos por *Chryseobacterium* sp. kr6 durante cultivo em meio de penas.....53

RESULTADOS II

- Figura 1.** Perfil do TRAP de hidrolisados de caseinato ovino.....81
- Figura 2.** Potencial antioxidante reativo total (TRAP) dos hidrolisados de caseinato ovino em diferentes tempos de hidrólise.....82
- Figura 3.** Valores da reatividade antioxidante total (TAR) dos hidrolisados do caseinato ovino.....83
- Figura 4.** Atividade inibidora da ACE em hidrolisados de caseinato ovino obtidos com a protease kr6.....86

RESULTADOS III

- Figura 1.** Perfil do TRAP dos diferentes tempos dos hidrolisados de soro de leite ovino.....104

Figura 2. Potencial antioxidante reativo total (TRAP) dos hidrolisados de soro de leite ovino em diferentes tempos de hidrólise.....	105
Figura 3. Valores da reatividade antioxidante total (TAR) dos diferentes tempos dos hidrolisados do soro de leite ovino.....	106
Figura 4. Atividade inibidora da ECA (%) por hidrolisados de soro de leite ovino em diferentes tempos.....	109

RELAÇÃO DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ABTS: radical ácido 2,2'-azinobis-(3-etil-benzotiasolína-6-ácido sulfônico)
Ala: alanina
AUC: área sobre a curva
BHA: ágar cérebro e coração
BHI: caldo cérebro e coração
CN: caseína
CPP: caseinofosfopeptídeo
DPP-IV: dipeptidil peptidase IV
DPPH: 2,2-difenil-1-picrilidrazila
ECA: enzima conversora de angiotensina
GIP: polipeptídeo insulínico dependente de glicose
GLP-1: peptídeo semelhante ao glucagon 1
Glu: ácido glutâmico
Gly: glicina
Ig: imunoglobulina
Ile: isoleucina
LF: lactoferrina
MC: micela
PDA: ágar batata dextrose
Pro: prolina
Ser: serina
Val: valina
TAR: reatividade antioxidante total
TFA: ácido tricloroacético
Thr: treonina
TRAP: potencial antioxidante reativo total
Trp: triptofano
Tyr: tirosina
Val: valina
 α -La: α -lactoalbumina
 β -Lg: β -lactoglobulina

1 INTRODUÇÃO

A produção de diversos setores agroindustriais é responsável pela geração de uma variada gama de subprodutos. Como exemplo, as indústrias de processamento avícola geram resíduos com elevado conteúdo proteico, principalmente penas, que são constituídas de queratina, gerando milhões de toneladas anuais em todo o mundo. Esta, em sua forma nativa, apresenta reduzido valor nutricional, em função da composição e configuração molecular dos seus aminoácidos constituintes, que proporcionam uma rigidez estrutural característica. A melhoria nutricional das penas pode ser obtida com microrganismos que degradam esse subproduto. A aplicação de técnicas de bioconversão, enzimática ou microbiana, é uma alternativa atraente para o tratamento e, conseqüentemente, melhor aproveitamento dos resíduos queratinosos.

Diversos hidrolisados proteicos produzidos por hidrólise enzimática demonstram atividades biológicas, sendo obtidos a partir de várias fontes, tais como caseína e soro do leite, soja, farelo de arroz, quinoa, carnes, ovos, entre outras. Essas atividades biológicas são geralmente relacionadas a peptídeos bioativos, que são fragmentos específicos de proteínas que têm um impacto nas funções ou condições corporais, podendo influenciar positivamente a saúde do consumidor. Os peptídeos bioativos são inativos dentro da sequência da proteína original e podem ser liberados de três maneiras: (a) através da hidrólise por enzimas digestivas, (b) através da hidrólise por microrganismos

proteolíticos e (c) através da ação de enzimas proteolíticas derivadas de microrganismos ou plantas (Korhonen & Pihlanto, 2006). Peptídeos bioativos são foco de muitas pesquisas relacionadas principalmente às atividades antioxidante, antimicrobiana e anti-hipertensiva. As proteínas lácteas constituem uma fonte potencial destes compostos e estão entre as mais estudadas.

Enzimas proteolíticas provenientes de várias fontes (animal, vegetal, microbiana) têm sido empregadas com sucesso na produção de peptídeos bioativos. Como os microrganismos podem ser cultivados através de métodos bem estabelecidos, produzindo grandes quantidades de enzimas, as proteases microbianas aparecem como interessantes biocatalisadores para a obtenção de hidrolisados proteicos e peptídeos bioativos em escala comercial.

Considerando a grande potencialidade da hidrólise enzimática na obtenção de peptídeos bioativos, a pesquisa de novas enzimas proteolíticas representa um importante recurso que visa desenvolver novos produtos e processos biotecnológicos com aplicação comercial/industrial a partir de diferentes matérias-primas, como as penas, o caseinato ovino e o soro de leite.

As proteases microbianas têm sido alvo de muitos estudos, devido às possibilidades de aplicações industriais, em especial, nas indústrias farmacêuticas, de ração animal e alimentos. Dessa forma, o presente trabalho visou o estudo da hidrólise de diferentes fontes proteicas, como penas, caseínas e soro de leite ovino, utilizando o microrganismo *Chryseobacterium* sp. kr6 como fonte das proteases utilizadas neste trabalho. Também se objetivou verificar as atividades biológicas geradas pelo processo de hidrólise.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Proteases

Proteases são enzimas que hidrolisam ligações peptídicas em proteínas e peptídeos, formando um complexo grupo de enzimas que varia enormemente em suas características físico-químicas e catalíticas (Rao et al., 1998). As proteases são usualmente classificadas segundo critérios majoritários, como: (a) tipo de reação catalisada, em endo ou exoproteases, dependendo do local de clivagem em relação às regiões terminais do substrato; (b) pH de atividade ótima, em proteases ácidas, neutras ou alcalinas; (c) natureza química e mecanismo do sítio catalítico, em serino-proteases, cisteína-proteases, aspartil-proteases, metaloproteases, ou de tipo catalítico desconhecido; e (d) relações evolucionárias no que diz respeito a sua estrutura (Rawlings & Barret, 1993, 1999; Rao et al., 1998).

As proteases são fisiologicamente importantes para a vida dos organismos, com inúmeras funções celulares, sendo encontradas em uma grande diversidade de fontes, tais como plantas, animais e microrganismos (Rao et al., 1998; Gupta et al., 2002). As proteases produzidas por plantas requerem um processo de obtenção mais demorado, pois dependem da disponibilização de área para cultivo e também das condições climáticas. As proteases de origem animal dependem da disponibilidade de animais para o abate, tornando o processo dispendioso. Neste contexto, os microrganismos

são preferidos frente a outras fontes de proteases devido ao seu rápido crescimento e ao pequeno espaço requerido para seu cultivo (Rao et al., 1998). Além disso, as proteases microbianas são, em geral, mais estáveis que as homólogas de plantas e animais, e o seu processo de produção é mais fácil e seguro (Wiseman, 1991).

Os microrganismos responsáveis pela produção de proteases são os fungos e as bactérias, devido à maior facilidade de cultivo e obtenção da enzima (Bernardi et al., 1991). Em geral, as enzimas fúngicas têm um pH ótimo ácido ou neutro, não sendo termoestáveis. Por outro lado, as proteases bacterianas possuem um pH ótimo alcalino ou neutro, sendo com frequência termoestáveis (Wiseman, 1991). Espécies do gênero *Bacillus*, principalmente, possuem alta capacidade de produção de proteases alcalinas, que são amplamente utilizadas nas indústrias e possuem alta atividade catalítica (Joo & Chang, 2005). Para espécies de *Bacillus*, a produção de proteases é fortemente influenciada por fatores físicos como pH, temperatura e tempo de incubação, além de fatores como componentes do meio e a presença de íons metálicos (Nehete et al., 1985; Johnvesly & Naik, 2001).

As proteases têm despertado atenção de inúmeros pesquisadores devido a suas múltiplas aplicações, dentre elas destacam-se as indústrias farmacêuticas, de detergentes, alimentos e processos biotecnológicos não poluentes (Brandelli, 2008). Na indústria de alimentos, são amplamente utilizadas em laticínios, massas e na produção de hidrolisados proteicos. Na indústria farmacêutica, as proteases são utilizadas em formulações como auxiliares digestivos, combinações com antibióticos e para tratamento de

lesões. Outra aplicação interessante é a substituição de compostos químicos na indústria e a utilização em processos de tratamentos de resíduos industriais, além da utilização na pesquisa científica (Anwar & Saleemuddin, 1998; Rao et al., 1998; Kumar & Takagi, 1999; Gupta et al., 2002).

2.2 *Chryseobacterium* sp. kr6

Microrganismos capazes de produzir proteases são chamados de microrganismos proteolíticos e podem desenvolver-se em diferentes condições ambientais. *Bacillus* e *Aspergillus* são os principais microrganismos produtores de proteases comerciais (Onifade et al., 1998; Zhang et al., 2010).

Vários estudos tem identificado novos microrganismos proteolíticos, entre eles a bactéria *Chryseobacterium* sp. kr6 (Riffel et al., 2003). Esta é uma bactéria Gram-negativa, que foi isolada do efluente de uma indústria de processamento de aves e mantida em ágar farinha de penas (Riffel et al., 2003). Esse microrganismo é capaz de utilizar queratina como substrato para seu crescimento, produzindo proteases. Além da hidrólise de queratinas, as proteases produzidas por esta linhagem são capazes de hidrolisar outras proteínas como caseína, albumina e hemoglobina (Silveira et al., 2008).

As proteases desempenham um papel importante no metabolismo da bactéria *Chryseobacterium* sp. kr6, visto que esta pode crescer em meio contendo farinha de penas como única fonte de carbono e nitrogênio. As condições ótimas para a atividade da protease produzida pela *Chryseobacterium* sp. kr6 são: temperatura de 30 °C, pH 8,0, sob agitação (100 rpm) por 48 horas, utilizando um meio composto por 0,5 g L⁻¹ de NaCl, 0,4 g L⁻¹

de KH_2PO_4 , $0,015 \text{ g L}^{-1}$ de CaCl_2 e 10 g L^{-1} de farinha de penas (Silveira et al., 2008).

Foi relatada a produção de, pelo menos, quatro proteases extracelulares pela cepa kr6, durante o crescimento em meio de penas; duas destas enzimas foram postuladas por possuírem uma ampla especificidade de substratos, enquanto as outras duas foram produzidas apenas na presença de penas (Riffel et al., 2011). A *Chryseobacterium* sp. kr6 produz metaloproteases pertencentes à família M14 das peptidases (Riffel et al., 2007).

2.3 Queratinases microbianas

As queratinases pertencem a uma classe particular de enzimas proteolíticas que exibem a capacidade de degradar substratos de queratina insolúveis. Estas enzimas têm ganhado importância nos últimos anos, através de várias aplicações potenciais que têm sido relacionadas com a hidrólise de substratos queratinosos, visando o desenvolvimento de processos não contaminantes. Uma quantidade significativa de proteína fibrosa insolúvel, sob a forma de penas, cabelos, unhas, chifres e outros estão disponíveis como subproduto do processamento agroindustrial (Onifade et al., 1998; Brandelli et al., 2008). Assim, enzimas queratinolíticas podem ter utilizações importantes na conversão biotecnológica de resíduos contendo queratina das indústrias de aves e de couros. As queratinas insolúveis de penas podem ser convertidas, depois da hidrólise enzimática, em alimentos, fertilizantes e filmes (Onifade et al., 1998; Gupta & Ramnani, 2006). Além disso, aplicações dessas enzimas também se estendem para fins farmacêuticos e cosméticos (Brandelli, 2008).

Enzimas queratinolíticas são produzidas por fungos, actinomicetos e bactérias, que têm sido frequentemente isolados de solos onde os materiais queratinosos são depositados (Riffel & Brandelli, 2006). Entretanto, microrganismos queratinolíticos, mesófilos ou termófilos, são encontrados em diversos locais, com ou sem histórico de deposição ou presença de materiais queratinosos, incluindo ambientes aeróbios ou anaeróbios. Assim, a produção de queratinases é comum em diversas condições ecológicas, indicando a participação desses microrganismos na ciclagem do carbono, nitrogênio e enxofre das moléculas de queratina. A esse respeito, a preferência por enzimas (ou microrganismos) termofílicas ou mesófilas pode dividir opiniões: embora enzimas termofílicas e microrganismos sejam reivindicados para apressar o processo de hidrólise e diminuir o risco de contaminação, as mesofílicas têm a vantagem de consumir menos energia (Brandelli et al., 2010).

A exploração da diversidade microbiana pode, potencialmente, fornecer queratinases apropriadas para aplicações biotecnológicas. Dentre as bactérias, a confinação é maior no grupo das bactérias Gram-positivas, sendo o gênero *Bacillus* destaque na produção de queratinases. Diversas cepas de *Bacillus licheniformis* (Manczinger et al., 2003; Fakhfakh et al., 2009), *Bacillus subtilis* (Macedo et al., 2005; Balaji et al. 2008; Cai et al., 2008), são descritas como queratinolíticas. Outras espécies como *Bacillus pumilus* (Kumar et al., 2008; Fakhfakh et al., 2010), *Bacillus cereus* (Ghosh et al., 2008), *Bacillus pseudofirmis* (Gassesse et al., 2003) e *Bacillus megaterium* (Prakash et al., 2010) também já foram apresentadas. Outras bactérias Gram-positivas queratinolíticas também têm sido isoladas, tais como, *Kocuria rosea* (Bernal et

al., 2006), *Lysobacter* sp. NCIMB 9497 (Allpress et al., 2002), *Nesterenkonia* sp. AL-20 (Gassesse et al., 2003) e *Microbacterium arborescens* kr10 (Thys et al., 2004). Em comparação, poucas cepas de bactérias Gram-negativas queratinolíticas têm sido relatadas. Entre elas, *Aeromonas* sp. (Bach et al., 2011), *Chrysobacterium* spp. (Riffel et al., 2003; Wang et al., 2008; Bach et al., 2011), *Xanthomonas maltophila* (De Toni et al., 2002), *Stenotrophomonas* sp. (Yamamura et al., 2002), *Vibrio* sp. kr2 (Sangali & Brandelli, 2000), *Paracoccus* sp. (Lee et al., 2004) e *Serratia* sp. (Khardenavis et al., 2009). Também já foram descritos alguns termófilos e extremófilos, como os pertencentes aos gêneros *Fervidobacterium*, *Thermoanaerobacter*, *Bacillus*, *Meiothermus* e *Nesternokia* (Friedrich & Antranikian, 1996; Rissen & Antranikian, 2001; Nam et al., 2002; Gassesse et al., 2003; Matsui et al., 2009).

Queratinases produzidas pelo grupo dos Actinomicetos também têm sido descritas, principalmente no gênero *Streptomyces*, como *Streptomyces favis* (Gushterova et al., 2005), *S. thermoviolaceus* (Chitte et al., 1999), e *S. thermonitrificans* (Mohamedin, 1999), *S. pactum* DSM 40530 (Böckle et al., 1995), *S. graminofaciens* (Szabo et al., 2000) e *S. albidoflavus* K1-02 (Bressollier et al., 1999). Outras cepas deste grupo também são descritas, como *Microbispora aerata* (Gushterova et al., 2005) e *Nocardioopsis* sp. TOA-1 (Mitsuiki et al., 2002). O potencial queratinolítico do domínio *Archae* também vêm sendo demonstrado (Kublanov et al., 2009).

A maior parte das queratinases microbianas são proteases alcalinas ou neutras, mostrando pH ótimo variando entre 7,5 e 9,0. No entanto, algumas enzimas são otimamente ativas fora desta faixa, mesmo em pH alcalino

extremo ou ligeiramente ácido. Uma característica geralmente demonstrada pelas queratinases é a estabilidade em um espectro relativamente amplo de pH. Já a temperatura ótima da queratinase pode ser muito variável, dependendo da fonte e da origem do isolado (Gupta & Ramnani, 2006; Brandelli et al., 2010).

2.4 Hidrólise enzimática de proteínas

As proteínas, como resultado da clivagem de suas ligações peptídicas, são transformadas em peptídeos de diferentes tamanhos e em aminoácidos livres. Essa hidrólise proteica pode ser realizada por enzimas, ácidos ou bases.

A hidrólise química é um processo de difícil controle, pois origina produtos com reduzida qualidade nutricional, devido a formação de D-aminoácidos e de substâncias tóxicas, como a lisinoalanina. Esse método também pode destruir o triptofano, a lisina e a treonina, e causar racemização da maioria dos aminoácidos (Adler-Nissen, 1985).

A hidrólise enzimática apresenta uma série de vantagens sobre a hidrólise química, como especificidade, controle do grau de hidrólise, condições moderadas de ação, disponibilidade comercial em larga escala, custo moderado, menor teor de sal no produto final e formação mínima de subprodutos. Além da melhoria das propriedades funcionais (solubilidade, poder emulsificante e textura) e organolépticas, é possível aumentar o aproveitamento nutricional das proteínas através do tratamento enzimático.

Um dos principais critérios na caracterização de um hidrolisado para utilização dietética é sua distribuição quanto ao tamanho dos peptídeos, pois é sabido que o comprimento da cadeia peptídica influencia a taxa de absorção, aumentando, dessa maneira, o aproveitamento nutricional das proteínas (Grimble et al., 1986; Vijayalakshimi et al., 1986). Diversos estudos têm demonstrado que fórmulas contendo um elevado teor de oligopeptídeos, especialmente, di- e tripeptídeos, são utilizadas mais efetivamente do que uma mistura equivalente de aminoácidos livres, apresentando assim um maior valor nutritivo (Hartmann & Meisel, 2007; Hernández-Ledesma, et al., 2008; Korhonen, 2009; Miguel et al., 2009).

A hidrólise enzimática apresenta melhoria das propriedades funcionais das proteínas, como solubilidade, poder emulsificante, textura, oferecendo grande aplicabilidade em vários produtos alimentícios (Abert & Kneifel, 1993; Duarte et al., 1998; Silva et al., 2003a,b,c; Viana et al., 2004, 2005; Capobianco et al., 2006). As proteases têm sido utilizadas para a modificação de proteínas, como na hidrólise de soja e outros vegetais, para a solubilização de concentrados de peixes, no amaciamento de carnes, hidrólise de caseína, na melhoria da textura de queijos, aumentando assim, significativamente, a qualidade e o valor nutritivo dos produtos (Cheftel et al., 1989).

A hidrólise enzimática também apresenta pontos negativos, como o possível desenvolvimento de sabor amargo no decorrer da catálise, o que parece estar relacionado à liberação de grupamentos hidrofóbicos que se encontravam no interior das moléculas proteicas. Esta característica representa

um dos principais obstáculos na aplicação generalizada dos hidrolisados (Minagawa et al., 1989; Saha & Hayashi, 2001). Contudo, existem procedimentos que podem ser utilizados para o mascaramento do sabor amargo de hidrolisados proteicos, tais como a adsorção de peptídeos amargos, hidrólise com exopeptidases, reação de plasteína, tratamento com carvão ativado e extração com solventes (Saha & Hayashi, 2001; Morais et al., 2005).

A escolha cuidadosa da enzima e das condições adequadas para a digestão, como a temperatura e o pH para a atividade ótima, tipo e concentração de substrato, relação enzima /substrato, inativação enzimática ao final do processo, bem como o controle do tempo de hidrólise, são cruciais para a obtenção de hidrolisados proteicos com desejável funcionalidade e propriedades bioativas. O hidrolisado de proteína bruta pode ainda ser processado, por exemplo, pela passagem através de membranas de ultrafiltração, de modo a obter uma maior uniformidade dos produtos com a gama desejada de massa molecular (Pihlanto-Leppälä & Korhonen, 2003). Na produção de hidrolisados em grande escala, a tecnologia da membrana pode ser acoplada com o processo de hidrólise enzimática em um processo contínuo, reduzindo assim o custo e eliminando a necessidade de ajuste de pH ou calor para desativar as enzimas no final da hidrólise (Guérard, 2007).

2.5 Leite ovino e sua composição proteica

A importância do leite de ovelha se deve à sua composição, que pode variar com a dieta, raça, paridade, sazonalidade, nutrição e condições de manipulação, condições ambientais, localização e estágio da lactação. O leite

ovino é uma excelente fonte de proteínas, cálcio, fósforo, e lipídios de alta qualidade. Nele há um bom equilíbrio entre os componentes proteicos, lipídicos e os carboidratos. A proporção gordura:proteína é maior do que no leite de vaca, e por esse motivo, apresenta maior rendimento na quantidade de queijo (aproximadamente 15 % em leite de ovelha, comparado com 10 % em leite de vaca) (Haenlein, 2001; Corrêa et al., 2011). O maior conteúdo e variedade de tipos de caseínas favorecem esse maior rendimento, pois reduzem o tempo de coagulação da massa e o coágulo é mais firme quando comparado à produção de queijo com leite de vaca (Berger, 2005).

As proteínas constituem a fração mais importante do leite. Dois tipos de proteínas podem ser encontradas no leite: as caseínas e as proteínas do soro. As caseínas se encontram em suspensão no leite na forma de micelas, que são agrupamentos de várias moléculas de caseína ligadas a íons, como o fosfato de cálcio (Sgarbieri, 1996). No leite de ovelha, a caseína corresponde a 80 % das proteínas totais. O leite de ovelha contém quase o dobro de extrato seco do que o leite bovino, bem como maior teor de gordura e caseína (Jandal, 1996).

As proteínas do leite estão entre as principais fontes de peptídeos com alguma atividade biológica, tanto a fração das caseínas quanto as proteínas presentes no soro (Clare & Swaisgood, 2000; Korhonen & Pihlanto, 2003; Costa et al., 2007; Hernández-Ledesma et al., 2008; Korhonen, 2009; Miguel et al., 2009).

2.6 Caseínas e Caseinatos

As caseínas são uma família de fosfoproteínas sintetizadas pelas glândulas mamárias e secretadas como grandes agregados coloidais chamados micelas (MC). As caseínas constituem a principal fração de proteína do leite (80 %), entre as quais a α_{s1} -caseína, a α_{s2} -caseína, a β -caseína e a κ -caseína são prevalentes. As α_s -caseínas são as principais proteínas da caseína, contendo de 8-10 grupos seril-fosfato, enquanto que a β -caseína contém cerca de 5 resíduos de fosfoserina (Phadungath, 2005). Todas as cadeias de caseínas têm em comum a presença de, ao menos, um grupo fosfato por molécula, esterificado a resíduos de serina e, ocasionalmente, a treonina (ligação éster-fosfato), característica que nenhuma das proteínas do soro possui (West, 1986).

A principal função fisiológica das caseínas é como fonte de aminoácidos necessários para o crescimento do neonato. No entanto, a característica fisiológica dominante do sistema de micelas da caseína foi relacionada à prevenção da calcificação patológica da glândula mamária (Holt, 1997). Enquanto nenhuma propriedade fisiológica específica tem sido proposta para todo o sistema da caseína (ou suas frações), vários peptídeos encriptados (ou inativos) na sequência de aminoácidos têm sido objeto de estudo (Silva & Malcata, 2005).

As principais cadeias de caseínas são as mesmas no leite ovino, caprino e bovino, sendo que o leite caprino possui menos proteínas e caseínas que o leite ovino. Comparando com as caseínas ovinas, as caseínas caprinas contêm menos α_s (α_{s1} e α_{s2}) e mais β e κ -CN. O leite caprino também possui

maior proporção de nitrogênio não proteico, em relação ao ovino (Raynal-Ljutovac et al., 2007).

A caseína comercial, produzida por meio da precipitação ácida, é uma das principais proteínas com funcionalidade tecnológica em alimentos (Roman & Sgarbieri, 2005; Sabadini et al., 2006). Os métodos tradicionais de fabricação de caseína promovem alterações químicas irreversíveis na estrutura da micela, por meio da acidificação ou modificação enzimática, a fim de facilitar a separação das proteínas coaguladas dos constituintes do soro (Roman & Sgarbieri, 2005). São utilizados procedimentos adicionais de centrifugação a baixas temperaturas e lavagem com solventes para garantir a remoção da gordura láctea residual (Ferreira et al., 2006).

Os caseinatos podem ser preparados por subsequente elevação do pH e dissolução das caseínas precipitadas. São chamados caseinato de sódio ou caseinato de cálcio, dependendo da solução utilizada na neutralização: hidróxido de sódio ou de cálcio, respectivamente (Sabadini et al., 2006; Alvarez et al., 2008; Pitkowski et al., 2008).

2.7 Soro

Soro de leite (ou também denominado soro de queijo) é o líquido remanescente após a precipitação e a remoção da caseína, principal proteína do leite, ou seja, um subproduto da indústria de transformação do leite em queijo ou da produção de caseínas (Sgarbieri et al., 1996; Siso, 1996). Este subproduto representa cerca de 85-90 % do volume e retém aproximadamente 55 % dos nutrientes do leite (Siso, 1996).

O soro apresenta um alto conteúdo de matéria orgânica, associado, principalmente, a presença de lactose e proteínas, componentes estes responsáveis por seu alto potencial de putrefação e demanda biológica de oxigênio. Descartar o soro sem nenhum tratamento eficiente não é apenas um crime previsto por lei, mas também rejeitar um alimento de alta qualidade, constituído por uma rica fonte de proteínas com diversas propriedades nutricionais, biológicas e funcionais (Almeida et al., 2001; Torres, 2005). O soro foi considerado o poluente mais importante de produtos lácteos em águas residuais, não só por causa da elevada carga orgânica, mas também pelo volume gerado (Carvalho et al., 2013). Entretanto, a visão do soro de leite como um poluente tem mudado radicalmente com as descobertas de propriedades funcionais e bioativas do soro e seus componentes, sendo, agora, considerado um co-produto da produção de queijo (Walzen et al., 2001; Macedo, 2010).

Apesar do seu elevado valor nutricional, o emprego do soro *in natura* é limitado, em virtude das características perecíveis e da alta diluição dos seus componentes. Deste modo, várias tecnologias têm sido utilizadas visando agregar valor a esta matéria-prima. Assim, a concentração do soro pode ser realizada por procedimentos que envolvam o aquecimento e a secagem (evaporação, *spray-drier*, liofilização) ou por osmose reversa, enquanto que a desmineralização pode ser feita por resinas de troca iônica ou eletrodialise. As tecnologias de separação por membranas vêm sendo, igualmente, utilizadas para a obtenção de ingredientes proteicos a partir do soro de leite (Brans et al., 2004).

O soro contém aproximadamente 20 % das proteínas originais do leite. As principais proteínas do soro de leite são a α -lactoalbumina (α -La), a β -lactoglobulina (β -Lg), que perfazem de 70 a 80 % das proteínas totais do soro, a soro albumina e as imunoglobulinas (Ig) e protease-peptonas em pequenas concentrações. Além destas, outra proteína solúvel encontrada em pequena quantidade é a lactoferrina (LF) e, no caso do soro de queijo, o caseínomacropéptido (CMP). As proteínas do soro possuem aminoácidos essenciais adequados, são facilmente digeridas e são consideradas altamente nutricionais e fisiologicamente completas. Seu teor em aminoácidos sulfurados (cisteína e metionina) contribui para um elevado valor de eficiência proteica (Walzen et al., 2001). O alto conteúdo de aminoácidos essenciais as torna de interesse pela indústria alimentícia por poderem ser utilizadas para aumentar o valor nutricional de proteínas de cereais ou outras de baixa qualidade (Ponsano et al., 1992).

A β -Lg é a proteína mais abundante no soro de leite, estando presente em concentrações de 2 a 4 g L⁻¹, o que corresponde a aproximadamente 50 % do total de proteínas do soro. É constituída de 162 resíduos de aminoácidos e tem uma massa molecular de 18,3 kDa. A estrutura desta proteína é dependente do pH. Acima do seu próprio ponto isoelétrico (pH 5,2) esta proteína é encontrada na forma de um dímero de 36,7 kDa. Abaixo do pH 3,5 e acima do pH 7,5, o dímero dissocia-se para um monômero lentamente expandido, e entre o pH 3,5 e 5,2, o dímero polariza para um octâmero de 147 kDa. Da mesma forma que as caseínas, as β -lactoglobulinas apresentam polimorfismo genético (variantes A, B, C) (Sgarbieri et al., 1996; Walzen et al.,

2001). A β -Lg é resistente a digestão por pepsina e quimotripsina, devido a sua conformação estável. Com a temperatura acima de 70 °C, a β -Lg sofre desnaturação irreversível e polimerização (formação de ligações dissulfeto intermoleculares). As quatro ligações dissulfeto por dímero de β -Lg reagem para formar as ligações intermoleculares que mantêm a integridade estrutural do polímero e aumenta a estabilidade estrutural da proteína pela diminuição de sua entropia. A quebra das ligações dissulfeto ou o aquecimento destroem a estrutura e a conformação nativa da proteína, aumentando a susceptibilidade da β -Lg ao ataque pela pepsina e quimotripsina (Morr & Ha, 1993; Hernández-Ledesma et al., 2011).

A α -La, com sua massa molecular de 14 kDa e 123 resíduos de aminoácidos, está presente no soro de leite em concentrações na faixa de 1 a 1,5 g L⁻¹ e representa aproximadamente 20 % do total de proteínas do soro. É uma proteína esferoidal e tem uma estrutura altamente compacta com quatro ligações dissulfeto intramoleculares (Morr & Ha, 1993; Hernández-Ledesma et al., 2011). Até 1977, a α -La era considerada como a proteína mais estável ao calor. No entanto, pesquisas subsequentes revelaram que esta estabilidade era aparente, pois a proteína tinha a capacidade de se renaturar quase que completamente mediante resfriamento ou ajuste de pH e, após sua exposição a temperatura acima de 62 °C, a extensão de renaturação depende do tempo e da temperatura da exposição. Essa proteína liga-se a íons Ca²⁺, Zn²⁺ e outros metais. A α -La ligada ao íon Ca²⁺ estabiliza a sua conformação em uma estrutura complexa. A remoção deste íon torna-a mais susceptível à

desnaturação pelo calor, porém reduz sua habilidade de renaturação pelo resfriamento (Morr & Ha, 1993; Hernández-Ledesma et al., 2011).

2.8 Peptídeos Bioativos

Os peptídeos bioativos são fragmentos específicos de proteína que apresentam um impacto positivo nas funções ou condições corporais, influenciando, assim, a saúde humana. Diversas propriedades são atribuídas a essas estruturas, tais como, atividade antimicrobiana e antiviral, atividade redutora da pressão sanguínea, habilidade na redução do colesterol, atividade antitrombótica e antioxidante, melhoria na absorção/biodisponibilidade dos minerais, efeitos cito ou imunomodulatórios, antitumoral, e, ainda, ação opióide (Pihlanto, 2001; Kitts & Weiler, 2003; Hartmann & Meisel, 2007). A atividade biológica desses peptídeos se deve a sua composição aminoacídica e sequência característica, sendo que diversos apresentam-se como multifuncionais. O tamanho dos fragmentos geralmente varia de 2 a 20 resíduos de aminoácidos por molécula (Meisel & Fitzgerald, 2003; Meisel, 2004; Erdmann et al., 2008).

Os peptídeos estão inativos no interior da sequência da proteína parental, podendo ser liberados por hidrólise e, uma vez liberados, apresentam sua atividade biológica. Podem ser gerados *in vivo*, pela ação das enzimas gastrointestinais; também podem ser obtidos *in vitro*, utilizando enzimas específicas; ou, ainda, produzidos durante o processamento de certos alimentos (Miguel et al., 2009).

A literatura científica evidencia que os peptídeos bioativos podem atravessar o epitélio intestinal e chegar aos tecidos periféricos via circulação sistêmica, podendo exercer ações específicas em nível local, no trato gastrointestinal, e em nível sistêmico (Cánovas et al., 2011). Muitos peptídeos de origem vegetal ou animal com relevante potencial bioativo têm sido descobertos, sendo os derivados do leite os mais estudados. Proteínas candidatas com essas atividades biológicas latentes estão presentes no leite, ovos, carne e peixe, bem como, em diferentes fontes vegetais, tais como, soja, trigo, girassol, arroz, algas, entre outros (Hatmann & Meisel, 2007; Sarmadi & Ismail, 2010).

Os peptídeos bioativos do leite foram descritos pela primeira vez em 1950, quando Mellander relatou que a ingestão de peptídeos fosforilados derivados da caseína, caseinofosfopeptídeos (CPP) reforçavam a calcificação óssea não dependente de vitamina D em crianças raquíticas. Enquanto que os peptídeos bioativos podem ser gerados a partir de uma variedade de proteínas alimentares, as proteínas do leite são geralmente consideradas como uma fonte muito rica, e como resultado disso, se tornou um dos constituintes fundamentais de alimentos funcionais (Mills et al., 2011). Um grande número de estudos tem demonstrado que a hidrólise das proteínas do leite por proteases pode resultar na produção de peptídeos biologicamente ativos (Korhonen & Pihlanto, 2006).

Como a maioria de todos os processos naturais dentro do corpo é sinalizada ou modulada exclusivamente pela interação das sequências de aminoácidos específicos, quer como peptídeos ou fragmentos de proteínas, os

peptídeos podem assegurar um futuro promissor para uma ampla gama de aplicações terapêuticas (Fields et al., 2009).

2.8.1 Peptídeos antimicrobianos

Peptídeos antimicrobianos são reconhecidos como importantes componentes da imunidade inata, já que são encontrados tanto nas superfícies epiteliais, como dentro de células fagocíticas granulares de mamíferos, capazes não somente de inibir microrganismos, mas também capazes de modular respostas inflamatórias (Gobbeti et al., 2004; Haque & Chand, 2008).

Peptídeos antimicrobianos têm sido identificados a partir de muitos hidrolisados proteicos, especialmente a partir do leite. Os mais bem estudados são as lactoferrinas, derivados do leite bovino e humano (Hartmann & Meisel, 2007). A primeira descoberta sobre propriedades antimicrobianas do leite foi feita por Jones & Simms (1930), que identificaram uma substância capaz de inibir *Streptococcus*, chamada lactenina, a partir de leite tratado com coalho (Gobbeti et al. 2004; Haque & Chand, 2008).

As diversas substâncias com ação protetora derivadas do leite apresentam variadas conformações de natureza química. Esses constituintes protetores do leite podem atuar aditivamente e sinergicamente ou ter uma especificidade temporal e espacial que poderia fornecer a atividade de defesa (Newburg, 2005). Uma gama de peptídeos bioativos pode ser liberada de caseínas e proteínas do soro, mas somente uma pequena parte destes peptídeos tem sido identificada e caracterizada com respeito à atividade antimicrobiana (Benkerroum, 2010).

Embora antibióticos mais potentes estejam disponíveis, peptídeos antimicrobianos mostram a vantagem de serem produtos naturais com capacidade para matar células-alvo rapidamente e muitos apresentam um amplo espectro de atividade, incluindo atividade para alguns dos mais sérios patógenos resistentes aos antibióticos (Pihlanto, 2001).

Os mecanismos pelos quais os peptídeos antimicrobianos agem sobre as bactérias sensíveis são importantes, mas pouco estudados e, se conhecidos, permitiriam desenvolver novas moléculas com espectro de ação maior ou também elevar a atividade antimicrobiana de peptídeos conhecidos. De uma forma geral, os peptídeos primeiramente atuam na membrana plasmática através do estabelecimento de uma ligação eletrostática entre o peptídeo (catiônicos) e os componentes da membrana (fosfolipídios carregados negativamente). Em paralelo, o caráter hidrofóbico de alguns peptídeos permite a interação com os lipídios da membrana. Tal interação resulta na formação de um canal transmembrana transiente que altera a permeabilidade e/ou geração de energia, enquanto preserva a integridade da célula ou resulta na ruptura da membrana plasmática com consequente desintegração da célula intacta. No entanto, o alvo final não é sempre a membrana em si, já que o peptídeo pode transpor o citoplasma e agir sobre os componentes intracelulares, interferindo nas funções celulares ou causando a floculação do citoplasma (Gobbetti et al., 2004; Benkerroum, 2010).

A principal estrutura da proteína que determina a interação com as membranas bacterianas é a natureza anfifílica e a carga positiva da molécula, o que explica o alvo comum do mecanismo de ação. No entanto, está sendo

demonstrado que alguns peptídeos antimicrobianos derivados do leite podem alcançar alvos intracelulares, e outros peptídeos, sem carga positiva, podem exibir atividade antibacteriana (Expósito & Recio, 2006; Cánovas et al., 2011).

Os peptídeos derivados da lactoferrina são, sem dúvida, os que mais atraem atenção. A descoberta que os fragmentos derivados da lactoferrina representam os primeiros peptídeos antimicrobianos derivados do soro do leite deu origem a um novo mecanismo de ação antimicrobiana da lactoferrina, independente das suas propriedades de ligação ao ferro (Yamauchi et al., 1993).

As aplicações dos peptídeos derivados da lactoferrina e os hidrolisados da lactoferrina incluem aplicações clínicas, por causa do seu efeito imunomodulatório ou como quimiopreventivo da carcinogênese. O uso de derivados da lactoferrina em produtos odontológicos também já foi proposto e vários estudos têm examinado o efeito da lactoferrina na preservação de alimentos (Expósito & Recio, 2006).

2.8.2 Peptídeos antioxidantes

Antioxidantes são definidos como substâncias que, quando presentes em baixas concentrações em relação ao substrato oxidável, são capazes de inibir ou retardar substancialmente a oxidação daquele substrato. Os antioxidantes não se tornam radicais livres pela doação de elétrons, pois eles são estáveis em ambas formas. Em geral, são classificados em duas categorias básicas: sintéticos e naturais (Gupta et al., 2009; Sarmadi & Ismail, 2010).

A importância da oxidação nos organismos e nos alimentos é amplamente reconhecida. O metabolismo oxidativo é essencial para a sobrevivência das células. Um efeito colateral dessa dependência é a produção de radicais livres e outras espécies reativas de oxigênio que causam mudanças oxidativas. Está aumentando as evidências do envolvimento de algumas espécies em uma variedade de sistemas regulatórios normais *in vivo*. Quando um excesso de radicais livres é formado, eles podem destruir enzimas protetoras, como a peróxido dismutase, catalase e a peroxidase e causar efeitos celulares destrutivos e letais (como, por exemplo, a apoptose) pela oxidação das membranas lipídicas, das proteínas celulares, DNA e enzimas, desligando, dessa maneira, a respiração celular. É bem conhecido que a peroxidação lipídica que ocorre nos alimentos causa a deterioração da sua qualidade, como o sabor rançoso, gosto inaceitável, e a curta vida de prateleira. Além disso, é sabido que o estresse oxidativo apresenta importante participação em inúmeras doenças relacionadas ao envelhecimento. Dentre os fatores envolvidos nestas patologias, estão a peroxidação lipídica e os compostos de baixa massa molecular produzidos no último estágio das reações de oxidação (Pihlanto, 2006; Sarmadi & Ismail, 2010).

Antioxidantes artificiais (BHA, BHT e *n*-propil-galato) exibem forte atividade antioxidante contra vários sistemas de oxidação. No entanto, por causa dos potenciais riscos *in vivo*, o uso dos antioxidantes artificiais em alimentos é restrito ou proibido em alguns países. Os potenciais efeitos adversos desses compostos estimulam o uso de antioxidantes naturais, incluindo proteínas e peptídeos de origem animal e vegetal, como proteínas de

soja, zeína, gérmen de trigo, gelatina, albumina de ovo e proteínas lácteas (Xue et al., 2009; Zhang et al., 2010).

O leite contém vários fatores antioxidantes, entre eles, vitaminas C e E, betacaroteno e sistemas enzimáticos (superóxido dismutase, catalase e glutationala peroxidase), além da albumina sérica como quelante de metais de transição, lactoferrina (uma glicoproteína capaz de ligar-se ao ferro) e aminoácidos, como tirosina e cisteína, com atividade sequestradora de radicais livres. Caseínas são capazes de inibir oxidação em diferentes sistemas e modelos, o que é atribuído à oxidação dos resíduos de aminoácidos. Porém, afirma-se que aminoácidos livres não poderiam substituir a caseína como antioxidante, sugerindo que a estrutura primária das moléculas de caseína desempenha o papel (Pihlanto, 2006). Os resíduos fosforilados de serina da fração polar das caseínas são efetivos quelantes de cátions que formam complexos com cálcio, ferro e zinco (Rival et al., 2001). Além disso, hidrolisados de caseína parecem ser inibidores mais efetivos da oxidação lipídica que CPP com o mesmo conteúdo de fósforo, assim, as propriedades antioxidantes não devem ser atribuídas somente à capacidade de quelar metais pelos resíduos de fosfoserina, mas também ao sequestro de radicais livres (Pihlanto, 2006).

Proteínas do soro também possuem propriedades antioxidantes, que podem ser melhoradas pelo fracionamento ou hidrólise com determinadas enzimas. Hernández-Ledesma et al. (2005b) investigaram a atividade antioxidante de hidrolisados de proteínas bovinas do soro, α -lactoalbumina e β -lactoglobulina, por diferentes proteases comerciais. O mesmo grupo de

pesquisa demonstrou em outro trabalho que peptídeos sintéticos derivados de β -lactoglobulina podem tanto aumentar como limitar a atividade antioxidante ao interagir com ácido ascórbico (dependendo da estrutura do peptídeo), devendo este fato ser considerado quando do desenvolvimento de novos ingredientes alimentares contendo peptídeos de β -lactoglobulina (Hernández-Ledesma et al., 2007).

Embora vários estudos tenham mostrado o sequestro de radicais livres, a inibição da peroxidação lipídica e a quelação de íons metálicos de transição, o mecanismo responsável pela atividade antioxidante de peptídeos não está completamente esclarecido. As propriedades antioxidantes estão mais relacionadas à composição, estrutura e hidrofobicidade dos aminoácidos (Sarmadi & Ismail, 2010).

2.8.3 Peptídeos anti-hipertensivos

Dentre as atividades biológicas que tem despertado maior interesse dos pesquisadores, destaca-se a atividade inibitória da enzima conversora da angiotensina I (ECA). A ECA catalisa a conversão da angiotensina I no potente vasoconstritor angiotensina II, desempenhando um importante papel fisiológico na regulação da pressão sanguínea (Miguel et al., 2004; López-Fandiño et al., 2006). Através da inibição desse processo, os inibidores sintéticos da ECA são utilizados há muito tempo como agentes anti-hipertensivos. Sabe-se que a hipertensão afeta considerável parcela da população mundial, sendo considerado o principal fator de risco nas doenças cardiovasculares e complicações correlatas. Em virtude da considerável influência da dieta na prevenção e no tratamento da hipertensão, especial interesse tem sido

dispensado na busca por substâncias com atividade anti-hipertensiva (López-Fandiño et al., 2006; Contreras et al., 2009). Segundo Park et al. (2007), as proteínas do leite são as principais fontes de peptídios com atividade inibitória da ECA. Uma diversidade de peptídeos com atividade anti-hipertensiva derivados das proteínas do leite já foi reportada na literatura (Fitzgerald et al., 2004; López-Fandiño et al., 2006; Quirós et al., 2007; Hernández-Ledesma et al., 2005a, 2008; Contreras et al., 2009; Miguel et al., 2009; Philanto et al., 2010).

Os inibidores da ECA são considerados inibidores competitivos da ECA, prevenindo que essa enzima sintetize um potente vasoconstritor, a angiotensina II. A ECA é uma enzima chave na rota bioquímica do sistema renina-angiotensina, que é uma das formas de regulação da pressão arterial. Essa enzima aumenta a pressão arterial pela conversão do inativo decapeptídeo angiotensina em um potente octapeptídeo vasoconstritor, angiotensina II, bem como inativa o vasodilatador nonapeptídeo bradicinina. Essa enzima está presente no plasma e em células endoteliais em muitos órgãos, como em pulmões, rins e coração e é caracterizada como uma enzima ligada na borda em escova nas células epiteliais do jejuno humano. Para exercer um efeito sobre o sistema regulatório, inibidores exógenos da ECA devem ser absorvidos e então alcançar a ECA em um apropriado tecido alvo (Pihlanto-Leppälä et al., 1998; Mills et al., 2011).

Peptídeos inibidores da ECA geralmente contêm de 2-20 resíduos de aminoácidos, apesar de serem encontrados peptídeos ativos com até 27 aminoácidos (Yamamoto et al., 1994; Saito et al., 2000).

Os peptídeos anti-hipertensivos derivados dos produtos lácteos não são tão potentes quanto às drogas comerciais (captopril, por exemplo) comumente usadas no tratamento da hipertensão; entretanto, os produtos com moderada bioatividade se comportam intrinsecamente (e naturalmente) como alimentos funcionais, e assim podem facilmente ser incluídos na alimentação diária (Silva & Malcata, 2005).

O mecanismo de ação dos peptídeos anti-hipertensivos ocorre de forma similar aos fármacos. Já que os três últimos resíduos de aminoácidos adjacentes à região C-terminal que apresentam atividade se enlaçam fortemente ao sítio ativo da ECA. Bem como, interações de um enlace aniônico em sítios distintos à região catalítica do sítio ativo já foram relatados, produzindo um tipo de inibição alostérica. Interessante acrescentar que a ECA possui dois sítios catalíticos e pode haver diferença na afinidade pelo substrato (Torruco-Uco et al., 2008). Os aminoácidos localizados no tripeptídeo C-terminal são importantes para a ligação com a enzima, como os hidrofóbicos (aromáticos, com cadeias ramificadas e imino) e também os aminoácidos básicos arginina e lisina. A prolina na porção C-terminal tem mostrado contribuir para a correta localização do peptídeo no sítio ativo da ECA, provavelmente por sua estrutura rígida permitir ao grupo carboxil uma adequada conformação para interagir com o resíduo positivamente carregado do sítio ativo da enzima. Além disso, peptídeos contendo prolina são geralmente mais resistentes às enzimas digestivas (Pihlanto-Leppälä et al., 1998; Gómez-Ruiz et al., 2006).

Um grande grupo de peptídeos inibidores da ECA tem sido isolado através da digestão enzimática de várias proteínas do leite e são atualmente um grupo de peptídeos bioativos bastante estudados (Maes et al., 2004). Embora diferentes proteínas alimentares possam agir como precursoras de peptídeos inibidores da ECA, as proteínas lácteas são as mais importantes fontes. Peptídeos inibidores da ECA derivados da caseína são chamados de casoquininas e, aqueles derivados das proteínas do soro, de lactoquininas. A inibição da ECA resulta em um efeito anti-hipertensivo e também pode influenciar diferentes sistemas regulatórios envolvidos na modulação da pressão arterial, defesa imune e atividade do sistema nervoso (Pihlanto-Leppälä et al., 1998; Pripp et al., 2006; Lignitto et al., 2010).

2.8.4 Peptídeos inibidores da dipeptidil peptidase-IV

As estimativas mundiais indicam que 366 milhões de pessoas serão afetadas por diabetes em 2030 (WHO, 2006). O diabetes tipo 2 é caracterizado por vários defeitos fisiopatológicos, incluindo resistência à insulina, excesso de produção de glicose hepática e progressiva disfunção das células β pancreáticas (Bharatan et al., 2007). Diferentes estratégias são usadas para prevenir/tratar a diabetes tipo 2, que incluem tratamento com vários medicamentos anti-diabéticos. Alterações na dieta e estilo de vida e prática regular de exercícios físicos têm sido recomendadas como um meio para ajudar na gestão da diabetes tipo 2 (Mensink et al., 2003; Bantle et al., 2008; Hawley & Gibala, 2012).

Durante uma refeição, dois hormônios incretinas (classe de substâncias produzidas pelo pâncreas e pelos intestinos que regulam o

metabolismo da glicose), o peptídeo semelhante ao glucagon 1 (GLP-1) e o polipeptídeo insulínico dependente de glicose (GIP), são liberados a partir do intestino delgado para a vasculatura e promovem um aumento da secreção de insulina dependente de glicose pelas células β das ilhotas de Langerhans (Creutzfeldt, 2001). Estima-se que em torno de 50 - 60 % do total de insulina secretada durante uma refeição resulta da resposta às incretinas, principalmente os efeitos combinados de GLP-1 e GIP (Creutzfeldt & Nauck, 1992). No entanto, o GLP-1 tem uma meia-vida curta, de 1-2 minutos, e, a seguir, a secreção em resposta a ingestão de nutrientes diminui, devido a sua inativação do GLP-1 pela dipeptidil peptidase IV (DPP-IV), resultando em perda das atividades insulínicas (Mentlein et al., 1993).

DPP-IV é uma serino-protease de 110 kDa encontrada ancorada na membrana plasmática e que pertence a família prolil oligopeptidase. A DPP-IV está amplamente expressa em muitos tecidos, incluindo os rins, fígado, pulmões, intestinos, membranas “borda em escova”, linfócitos e células endoteliais (Thoma et al., 2003). Ela atua como uma enzima de clivagem com especificidade para a remoção de dipeptídeos de X-Pro ou X-Ala no N-terminal dos polipeptídeos e proteínas. Ela tem uma forte preferência para Pro > Ala > Ser como o penúltimo resíduo de aminoácido (Mentlein et al., 1993; De Meester et al., 2003; Lambeir et al., 2003). O GLP-1 tem Ala como penúltimo resíduo de aminoácido do N-terminal, e, por conseguinte, é substrato de DPP-IV. Esta constatação é de que mais de 95 % da degradação do GLP-1 é atribuída à ação da DPP-IV, o que tem levado a um aumento no interesse na inibição dessa enzima para o tratamento da diabetes tipo 2 (McIntosh et al.,

2005). Alguns estudos anteriores mostraram que a inibição específica de DPP-IV aumentou a meia-vida do GLP-1 circulante, com consequente diminuição da glicose no plasma e melhora à tolerância a glicose em experimentos com animais e humanos (Deacon et al., 1998, 2000; Mitani et al., 2002).

Várias drogas inibidoras da DPP-IV, denominadas gliptinas, estão sendo usadas como agentes redutores da glicose, tanto no jejum, quanto no período pós-prandial. Entre estas drogas está a sitagliptina, a primeira droga inibidora da DPP-IV disponível no mercado. As clássicas drogas secretagogas de insulina (isto é, sulfonilureias) têm sido associadas a vários efeitos adversos, como a hipoglicemia e o ganho de peso. No entanto, em indivíduos diabéticos, as gliptinas podem estimular a secreção de insulina na presença da glicose, o que reduz o risco de hipoglicemia e ganho de peso (Hermanet al., 2007; Scheen, 2010).

Alguns estudos relatam que peptídeos bioativos apresentam atividade inibitória para a DPP-IV. Dois peptídeos bioativos (Ile-Pro-Ala e Val-Ala-Gly-Thr-Trp-Tyr), derivados da β -lactoglobulina hidrolisada pela Proteinase K e tripsina, apresentaram valores de IC₅₀ de 49 e 174 pM, respectivamente, contra uma DPP-IV *in vitro* (Tulipano et al., 2011; Uchida et al., 2011).

Recentemente, o potencial inibidor da DPP-IV por peptídeos bioativos derivados do leite tem recebido um grande interesse, e seu potencial para o controle de diabetes vem sendo sugerido por diversos autores (Lacroix & Li-Chan, 2012; Nongonierma & FitzGerald, 2013a,b, 2014; Tulipano et al., 2011, 2012; Uchida et al., 2011; Uenishi et al., 2012; Silveira et al., 2013).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados deste estudo estão apresentados sob a forma de três artigos científicos. Os referidos artigos são apresentados nas seções 3.1 a 3.3, e identificados como Resultados I a Resultados III, respectivamente.

O Primeiro artigo (Seção 3.1) tem como o título “Degradação de penas por *Chryseobacterium* sp. kr6: produção de hidrolisados proteicos com atividades biológicas” e foi submetido no periódico *New Biotechnology*, sob o título “Production of feather hydrolysates with antioxidant, angiotensin-I converting enzyme- and dipeptidyl peptidase-IV-inhibitory activities”.

O segundo artigo (Seção 3.2) tem como o título “Avaliação da atividade antioxidante, anti-hipertensiva e antimicrobiana de hidrolisados de caseinato de leite ovino com uma protease de *Chryseobacterium* sp. kr6”.

O terceiro artigo (Seção 3.3) tem como título “Avaliação de diferentes atividades biológicas de hidrolisados de soro de leite ovino com uma protease microbiana”.

3.1 RESULTADOS I

Degradação de penas por *Chryseobacterium* sp. kr6: produção de hidrolisados proteicos com atividades biológicas

INTRODUÇÃO

Queratinas são proteínas estruturais insolúveis encontradas, por exemplo, na epiderme e em apêndices epidérmicos de vertebrados, tais como o cabelo, lã e penas, e apresentam uma elevada estabilidade em relação a enzimas proteolíticas comuns, agentes químicos e a tensões mecânicas. No entanto, as mesmas propriedades das proteínas de queratina, que fornecem os recursos essenciais para a epiderme e seus apêndices cumprirem as suas funções biológicas, também representam um desafio para a gestão de resíduos, uma vez que enormes quantidades de resíduos ricos em queratina são produzidas globalmente a partir das atividades agroindustriais (Kornilowicz-Kowalska & Bohacz, 2011). O incremento na produção de carne de frango resulta, concomitantemente, num aumento da produção de resíduos, tais como penas, unhas e bicos, que são compostos principalmente por queratina (~90 %, p p⁻¹). A recalcitrância dos resíduos ricos em queratina e as restrições energéticas, econômicas e ambientais, associadas aos métodos de gestão existentes, levaram a um interesse crescente em microrganismos queratinolíticos (Brandelli et al., 2010).

Diversas bactérias, isoladas de diferentes ambientes, têm demonstrado de forma eficiente a degradação de penas, e esse processo

biológico é considerado uma estratégia adequada de gerir e agregar valor aos materiais ricos em queratina. Os produtos de conversão incluem as queratinases (uma classe de enzimas proteolíticas com aplicação em couro, alimentação, detergentes e na indústria biomédica) e também a biomassa microbiana e os hidrolisados proteicos de penas, que podem ser empregados como fertilizantes nitrogenados e suplementos para a alimentação animal (Gupta & Ramnani, 2006).

Pesquisas em antioxidantes naturais, especialmente peptídeos bioativos obtidos através da hidrólise de proteínas, são profusamente relatadas. Estes peptídeos, codificados em sequências de proteínas, somente demonstram atividade biológica após a liberação da proteína nativa. Portanto, várias proteínas e enzimas proteolíticas são investigadas, visando à obtenção de hidrolisados bioativos com potencial utilização na ciência de alimentos, tecnológica e nutrição (Sarmadi & Ismail, 2010). Além disso, as fermentações bacterianas são referidas como sendo benéficas para a bioatividade de produtos alimentares (Zhu et al., 2008a,b). Recentemente, hidrolisados de penas, obtidos através da conversão microbiana, demonstraram apresentar atividade antioxidante (Fakhfakh et al., 2011).

Nesse contexto, o presente estudo relata a produção de hidrolisados de penas por *Chryseobacterium* sp. kr6, uma bactéria previamente isolada de uma planta de processamento de aves (Riffel et al., 2003). Foram avaliadas a produção de enzimas proteolíticas e a concentração de proteínas solúveis durante a degradação das penas, e também o potencial antioxidante, anti-hipertensivo e inibidor da dipeptidil peptidase IV dos hidrolisados de penas.

MATERIAIS E MÉTODOS

Penas

Penas de galinha, fornecidas por uma indústria avícola local (Porto Alegre, RS, Brasil), foram lavadas três vezes com água corrente e, finalmente, com água destilada. As penas lavadas foram secas a 45 °C durante 48 h e, em seguida, armazenadas à temperatura ambiente antes do tratamento microbiano.

Microrganismo

Chryseobacterium sp. kr6, uma bactéria que degrada pena e produz queratinases alcalinas, foi isolada a partir de uma planta de processamento de aves (Riffel et al., 2003). Ela foi rotineiramente mantida em placas de ágar cérebro-coração (BHA).

Meio de Cultivo e Condições de Crescimento

O meio inicial utilizado para a produção dos hidrolisados proteicos de pena era composto de (g L⁻¹): penas de galinha 50,0; KH₂PO₄ 0,4; NaCl 0,5; CaCl₂ 0,015; pH 8,0. O meio foi autoclavado a 120 °C por 20 min. Após a inoculação do microrganismo, os cultivos foram conduzidos em frascos de Erlenmeyer de 1 L, com um volume de trabalho de 100 mL, em até 5 dias a 30 °C, num agitador rotativo (125 rpm). Para otimizar a composição e as condições de cultura, o efeito da concentração de penas (10 - 75 g L⁻¹) e o pH inicial (6,0 - 9,0) foram avaliados individualmente por seu desempenho na produção de um hidrolisado de proteínas de penas. Alíquotas de 1 mL foram periodicamente removidas, centrifugadas durante 10 min a 10.000 x g, e os

sobrenadantes foram armazenados a 4 °C para a determinação da atividade proteolítica, concentração de proteínas solúveis e atividade antioxidante.

Ensaio de Atividade Proteolítica

A atividade proteolítica foi determinada como descrita por Sangali & Brandelli (2000a) usando azocaseína (Sigma Co., St. Louis, MO, USA) como substrato. A mistura de reação, contendo 120 µL de amostra e 480 µL de azocaseína (10 g L⁻¹) em 50 mmol L⁻¹ de tampão Tris-HCl pH 8,0, foi incubada por 40 min a 45 °C; a reação foi parada com a adição de 600 µL de ácido tricloroacético (100 g L⁻¹). Após a separação do excesso de azocaseína por centrifugação, 800 µL do sobrenadante foram misturados com 200 µL de NaOH (1,8 M L⁻¹), resultando em um complexo amarelo, medido espectrofotometricamente a 420 nm. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como sendo a quantidade de enzima necessária para produzir uma mudança na absorvância em 0,01, sob as condições citadas.

Determinação de Proteína Solúvel

Após centrifugação (10.000 x g por 15 min), os sobrenadantes das culturas foram usados para determinar a concentração de proteína solúvel de acordo com o método descrito por Lowry et al. (1951). Todas as medições foram realizadas utilizando um espectrofotômetro Shimadzu UV mini-1240.

SDS-PAGE com Tricina dos Hidrolisados de Pena

Os hidrolisados de penas obtidos através do cultivo da cepa kr6 por 0, 1 e 2 dias em meio de penas (50 g L⁻¹ de penas, pH 8,0), foram submetidos a SDS-PAGE com tricina de acordo com Schagger & Von Jagow (1987), usando gel de empilhamento a 5 %, gel de separação a 10 % e gel de

resolução a 16,5 %. Os sobrenadantes dos hidrolisados, com uma concentração proteica de 20 mg mL⁻¹, foram filtrados através de uma membrana de corte de 10 kDa (Amicon Ultra 10k, Millipore, Ireland), e ambos, o permeado e o retido, foram analisados. As amostras foram misturadas com tampão de corrida [50 mM Tris-HCl, 4 % (m v⁻¹) SDS, 12 % (v v⁻¹) glicerol, 2 % mercaptoetanol (v v⁻¹), e 0,01% (m v⁻¹) Coomassie azul brilhante G-250], desnaturadas por calor a 90 °C por 10 min, e a eletroforese foi realizada em um Mini Protean II unit (Loccus Biotecnologia). As bandas de proteína foram coradas com Coomassie azul brilhante G-250. O peso molecular aproximado das proteínas dos hidrolisados foi determinado utilizando um padrão de proteínas pré-corado que consiste em proteínas entre 2,5 e 250 kDa (Benchmark Protein Ladder, Invitrogen).

Análise dos Hidrolisados de Pena através de HPLC de Fase Reversa

Para essa análise, os hidrolisados de pena foram inicialmente centrifugados, e então filtrados através de uma membrana de corte de 10 kDa. Os filtrados foram submetidos ao RP-HPLC (modelo E2995, Waters, Milford, USA) em uma coluna C18 (Atlantis T3 5µm 4.6x250 mm, Waters, Milford, USA). O volume injetado foi de 20 µL e a taxa de fluxo foi de 1 mL min⁻¹ usando um gradiente de acetonitrila de 20 – 60 % e 0,1 % (v v⁻¹) de ácido trifluoracético (TFA) por 30 min.

Atividade Antioxidante pelo Método 2,2-difenil-1-picrilidrazila (DPPH)

Este método, realizado como descrito por Brand-Williams et al. (1995), baseia-se na captura do radical DPPH por antioxidantes, produzindo uma diminuição na absorvância a 517 nm. O DPPH, dissolvido em metanol, é usado em uma concentração de 60 μM . A solução é homogeneizada e transferida para frascos escuros. A solução preparada é usada somente no dia da análise. Alíquotas de 0,1 mL das amostras (sobrenadante dos hidrolisados em uma concentração de 250 mg mL^{-1}) foram transferidas para tubos de ensaio com 3,9 mL do radical DPPH (60 μM) e homogeneizadas. Após 45 min, a atividade sequestrante foi medida espectrofotometricamente pelo decréscimo da absorvância a 517 nm. Da mesma forma, essas mesmas proporções (0,1 mL de água destilada e 3,9 mL de radical DPPH) foram usadas como um controle. Metanol foi usado como branco. A curva padrão foi construída utilizando concentrações de 0 a 60 μM de DPPH. Os resultados foram expressos como: taxa de radicais seqüestrados (%) = $[1 - (A/A_0)] \times 100$, onde A é a absorvância do ensaio e A_0 é a absorvância do branco.

Atividade antioxidante pelo método da captura do radical ácido 2,2'-azinobis-(3-etil-benzotiasolina-6-ácido sulfônico) (ABTS)

Este ensaio envolve a geração do radical cromóforo ABTS pela oxidação do ABTS com persulfato de potássio (Re et al., 1999), e pode ser utilizado tanto para componentes lipofílicos quanto para hidrofílicos. O cátion radical ABTS foi produzido através de uma reação entre a solução estoque de ABTS (7 mM) e persulfato de potássio (140 mM concentração final). Esta mistura foi mantida no escuro durante 12 h à temperatura ambiente antes do uso. Para o ensaio, a solução ABTS^{•+} foi diluída com tampão PBS (5 mM; pH

7,0) até atingir absorvância de 0,7 (\pm 0,02) a 734 nm. Amostras de 10 μ L (15 mg mL⁻¹ de proteínas) foram misturadas com 1 mL da solução diluída de ABTS*+ e a absorvância (734 nm) foi acompanhada por 6 min.

Atividade antioxidante pelo método do potencial antioxidante reativo total (TRAP)

A atividade antioxidante foi expressa sobre o potencial antioxidante reativo total (TRAP), o qual determina a quantidade de antioxidantes e a reatividade antioxidante total (TAR), que é indicativo da qualidade dos antioxidantes da amostra (Dresch et al., 2009).

Os liofilizados das penas de 48 h, cultura bruta e parcialmente purificada em coluna de cromatografia Sephadex G-10, foram diluídos em água nas concentrações de 1, 0,5, 0,25, 0,2 e 0,1 mg mL⁻¹. Uma solução de 0,0452 g de 10 mM de AAPH (2,20-azo-bis(2-amidinopropane)-dihydrochloride) e 62,5 μ L de luminol (4 mM) em 20 mL de tampão de glicina (0,1 M, pH 8,6) foi preparada e, em seguida, incubada à temperatura ambiente (22 °C) durante 2 h. Este sistema é uma fonte de radicais peroxilo, capazes de oxidar o luminol para gerar luz. Este radical não pode ser degradado enzimaticamente, e, por conseguinte, esta é uma técnica para avaliar defesas antioxidantes não-enzimáticas (Dresch et al., 2009).

Após 2 h, foi adicionado 20 μ L de água e 180 μ L de sistema em 8 poços de uma placa, que foi o controle. Nos outros poços, foram adicionados 20 μ L de cada amostra e 180 μ L do sistema. A quimioluminescência foi medida por cintilação (Dresch et al., 2009) (Perkin-Elmer 1450 LSC, model 1450-024, Boston, MA, USA).

A diminuição da intensidade da quimioluminescência foi monitorada durante 67 min e o potencial antioxidante reativo total (TRAP) foi determinado calculando a área sobre a curva (AUC) (Kappel et al., 2008), obtida utilizando o software GraphPad Prism (versão 5.0) em função do tempo.

O valor do antioxidante reativo total (TAR) foi determinado. A diminuição inicial da luminescência do luminol foi calculada como a razão I_0/I , em que I_0 é o valor antes da adição da amostra, e I é a intensidade de quimioluminescência imediatamente após a adição da amostra (Dresch et al., 2009).

Determinação da Atividade Anti-hipertensiva

A atividade anti-hipertensiva foi mensurada segundo Cushman & Cheung (1971), com algumas modificações. Cada amostra (20 μ L; 15 mg mL⁻¹) foi adicionada a 200 μ L de solução do substrato hipuril-histidil-leucina (5 mM, em tampão 50 mM HEPES HCl contendo 300 mM NaCl, pH 8,3, 37 °C). Após, adicionou-se 40 μ L de enzima conversora da angiotensina (ECA), e incubou-se a 37 °C por 30 min. A reação foi interrompida adicionando-se 150 μ L de HCl (1 M), e então o ácido hipúrico liberado foi extraído com 1 mL de acetato de etila. A fase orgânica foi transferida para tubos, que foram aquecidos para evaporação do solvente. O resíduo dos tubos foi dissolvido com 800 μ L de água destilada, e a leitura em espectrofotômetro foi realizada a 228 nm. A atividade foi expressa em porcentagem:

% da atividade inibitória = $(A-B) (A-C)^{-1} \times 100$, onde A é a absorbância sem a amostra, B é a absorbância sem a enzima, e C é a absorbância na presença da enzima e da amostra.

Determinação da atividade inibitória de DPP-IV

A capacidade de inibição da enzima dipeptidil peptidase IV (DPP-IV) foi determinada medindo o aumento da absorbância a 405 nm, utilizando Gly-Pro-*p*-nitroanilida como substrato para a DPP-IV, segundo Hsu et al. (2013) com algumas modificações. Os hidrolisados liofilizados de penas (50 g L⁻¹ pH 8,0) foram dissolvidos em tampão Tris-HCl 100 mM pH 8,0, em diferentes concentrações (5, 10, 15 e 20 mg mL⁻¹). Os hidrolisados (50 µL) foram adicionados a 50 µL de 1,59 mM Gly-Pro-*p*-nitroanilida (em tampão Tris-HCl 100 mM pH 8,0). A mistura foi incubada à 37 °C por 10 min, seguida da adição de 100 µL de DPP-IV (diluído com tampão Tris-HCl 100 mM pH 8,0 em 0,01 U mL⁻¹). A mistura da reação foi incubada à 37 °C por 60 min, e a reação foi parada com a adição de 200 µL de tampão acetato de sódio 1 M pH 4,0. A absorbância da solução resultante foi determinada a 405 nm.

Análise Estatística

Os dados experimentais foram expressos como média ± desvio padrão e avaliados pelo método de Tukey, ao nível de significância de 0,05.

RESULTADOS

Atividade proteolítica e conteúdo de proteína solúvel durante a degradação de penas por *Chryseobacterium* sp. kr6

A produção de proteases extracelulares por *Chryseobacterium* sp. kr6 e a liberação de proteínas solúveis foram investigadas em função do tempo de cultivo dos meios, com diferentes concentrações de penas e valores iniciais de pH. Em relação à atividade da protease, os níveis máximos foram

alcançados em 24 h de cultivo, independentemente do conteúdo de penas no meio de cultivo. Após 24 h, foram detectadas pequenas diferenças na atividade azocaseinolítica; no entanto, a cepa kr6 exibiu uma tendência para uma maior produção de enzima no meio de cultura contendo 75 g L^{-1} de penas de galinha (Figura 1A). A concentração de proteínas solúveis nos diferentes meios é mostrada na Figura 1C e os valores mais elevados ($27,2 \pm 0,6 \text{ mg mL}^{-1}$) foram observados no meio de cultura contendo 75 g L^{-1} de penas, após 4 dias de cultivo. A partir dos resultados, uma redução substancial na atividade proteolítica foi observada com o aumento do tempo de cultura nos meios que continham 10 e 25 g L^{-1} de penas. Além disso, um teor reduzido de proteínas solúveis foi observado em 48 h, aumentando ligeiramente depois disso (Figura 1C). A 25 g L^{-1} de penas, as proteínas solúveis apresentaram a formação de um platô; e em maiores quantidades de penas (50 e 75 g L^{-1} de penas), as proteínas solúveis acumularam-se no meio (Figura 1C).

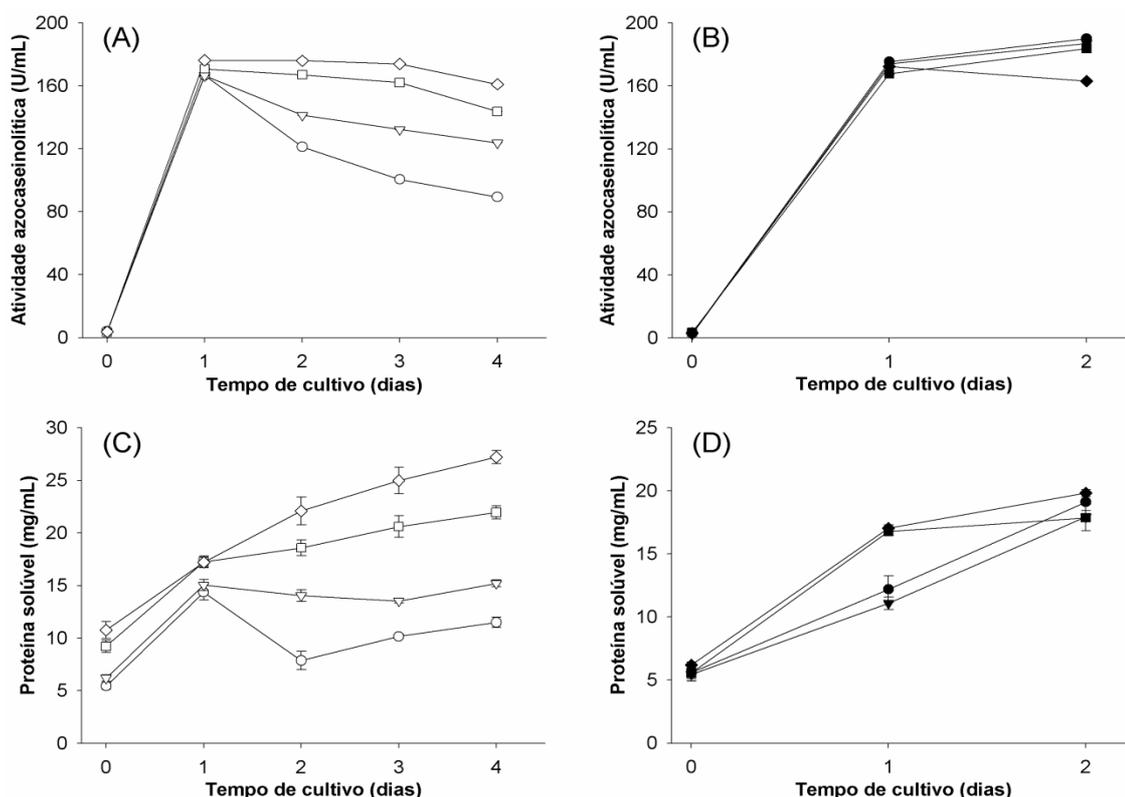


Figura 1. Produção de proteases e liberação de proteínas solúveis durante o crescimento da *Chryseobacterium* sp. kr6 em meio de penas a 30 °C. (A) Atividade azocaseinolítica nos sobrenadantes de culturas obtidos com diferentes concentrações de penas (○, 10 g L⁻¹; ▽, 25 g L⁻¹; □, 50 g L⁻¹; ◇, 75 g L⁻¹) e pH inicial 8,0. (B) Atividade azocaseinolítica em sobrenadante de culturas obtidos com 50 g L⁻¹ de penas em diferentes valores de pH iniciais no meio (●, pH 6,0; ▼, pH 7,0; ■, pH 8,0; ◆, pH 9,0). (C) Proteínas solúveis nos sobrenadantes de culturas obtidas com diferentes concentrações de penas (○, 10 g L⁻¹; ▽, 25 g L⁻¹; □, 50 g L⁻¹; ◇, 75 g L⁻¹). (D) Proteínas solúveis nos sobrenadantes de culturas obtidos com 50 g L⁻¹ de penas em diferentes valores de pH inicial dos meios (●, pH 6,0; ▼, pH 7,0; ■, pH 8,0; ◆, pH 9,0).

O efeito dos valores iniciais de pH do meio de cultura (6,0 - 9,0) na produção de enzimas proteolíticas por *Chryseobacterium* sp. kr6 e o teor de proteínas solúveis foram investigados em meios contendo 50 g L⁻¹ de penas. Foi observado que o pH inicial não afetou o rendimento das proteases em 24 h de cultivo (Figura 1B). Por outro lado, o pH do meio demonstrou afetar a quantidade de proteínas solúveis entre os experimentos, particularmente em 24 h de cultivo (Figura 1D), onde os valores iniciais de pH de 8,0 e 9,0

demonstraram valores de proteínas solúveis mais elevados ($\sim 16,9 \text{ mg mL}^{-1}$) quando comparadas a culturas com valores iniciais de pH de 6,0 e 7,0 ($\sim 11,5 \text{ mg mL}^{-1}$). Após 48 h, estas diferenças foram minimizadas, e o teor de proteína solúvel em meios com diferentes valores iniciais de pH eram cerca de $18,5 \text{ mg mL}^{-1}$ (Figura 1D).

A análise da distribuição de peso molecular de hidrolisados de penas, obtidos com 50 g L^{-1} de penas e com um pH inicial de 8,0, foi realizada. Cada hidrolisado (obtido com a 0, 1 e 2 dias de cultura) foi centrifugado, filtrado através de uma membrana de corte de 10 kDa, e, ambos, o permeado e o retido, foram submetidos ao SDS-PAGE com tricina (Figura 2). Não foram evidenciadas bandas de proteínas nos permeados dos hidrolisados de pena, sugerindo que os pesos moleculares dos peptídeos foram inferiores a 2,5 kDa. No caso dos retidos, seis bandas foram detectadas nos hidrolisados de penas de 1 dia de cultivo, variando 21,5 - 36,5 kDa. Embora tenha sido observado um perfil semelhante para os retidos dos hidrolisados obtidos com 2 dias de cultivo com kr6, as bandas de proteínas mostraram uma intensidade mais elevada, quando comparadas com aquelas do dia 1 (Figura 2), o que implica em um maior teor de peptídeos, e um maior grau de hidrólise das penas.

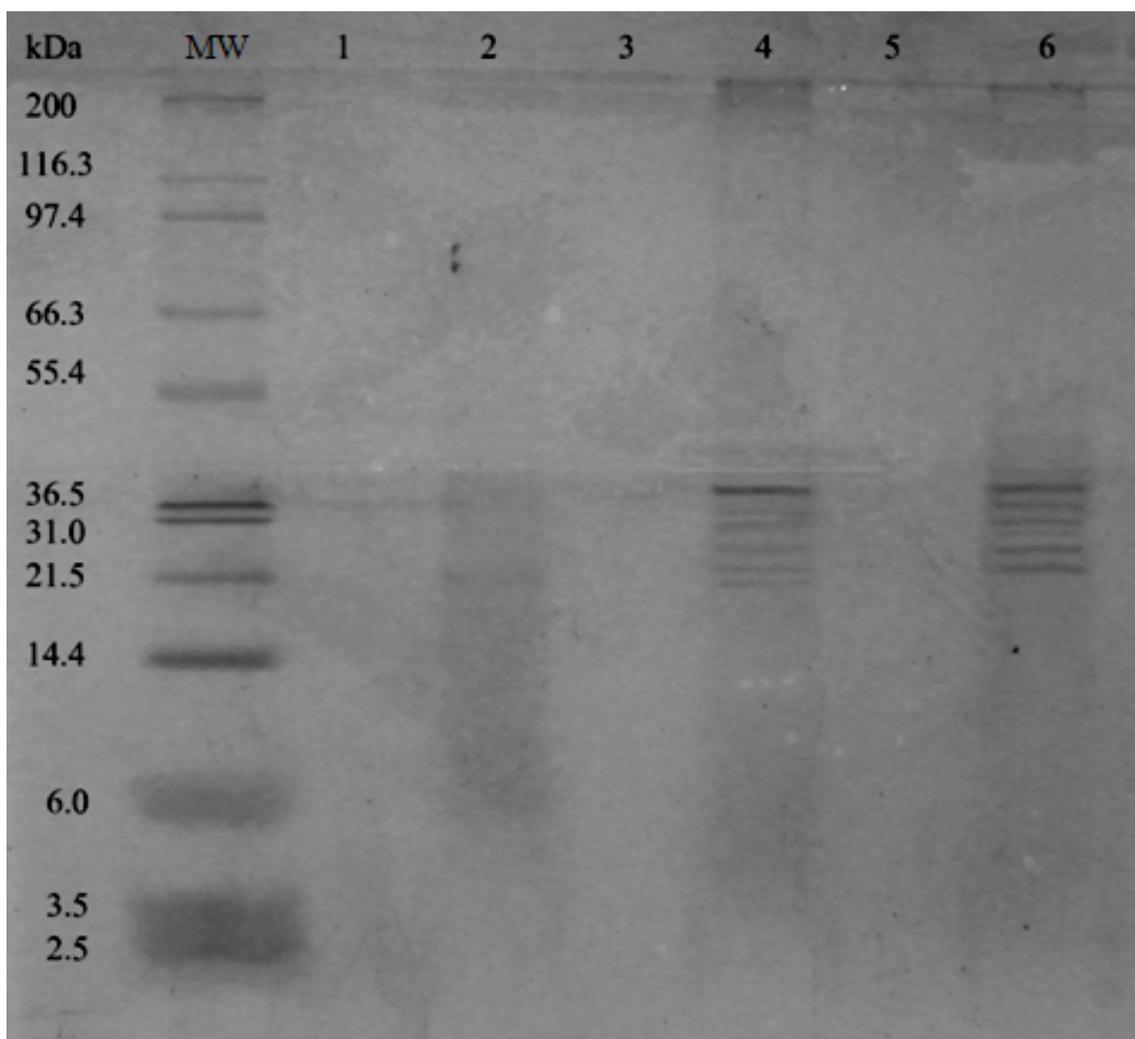


Figura 2. Perfil do peso molecular dos hidrolisados produzidos por *Chryseobacterium* sp. kr6 durante cultivo em meio de penas (50 g L^{-1} de penas, pH inicial 8,0, a $30 \text{ }^\circ\text{C}$). Os sobrenadantes das culturas foram filtrados através de uma membrana de corte de 10 kDa antes da eletroforese (SDS-PAGE com tricina). Linha 1, permeado do sobrenadante do hidrolisado obtido em $t = 0 \text{ h}$; linha 2, retido do sobrenadante do hidrolisado obtido em $t = 0 \text{ h}$; linha 3, permeado do sobrenadante do hidrolisado obtido em $t = 24 \text{ h}$; linha 4, retido do sobrenadante do hidrolisado obtido em $t = 24 \text{ h}$; linha 5, permeado do sobrenadante do hidrolisado obtido em $t = 48 \text{ h}$; linha 6, retido do sobrenadante do hidrolisado obtido em $t = 48 \text{ h}$.

Os hidrolisados de penas obtidos com 50 g L^{-1} de penas, e pH inicial em 8,0, em diferentes tempos de cultivo, foram centrifugados e filtrados através de uma membrana de corte de 10 kDa. Os permeados foram, então, submetidos à RP-HPLC, e os resultados são apresentados na Figura 3.

Hidrolisados no tempo zero mostraram um menor pico de absorvância em cerca de 8 min de eluição, que aumentou com o aumento do tempo de cultivo. Além disso, os hidrolisados de penas cultivados em 48 h exibiram uma discreta curva em 11 e 14 min, e um pico distinto em 18 min (Figura 3), indicando o aparecimento de diferentes peptídeos e também um aumento na intensidade dos picos de peptídeos à medida que o tempo de cultivo aumentava.

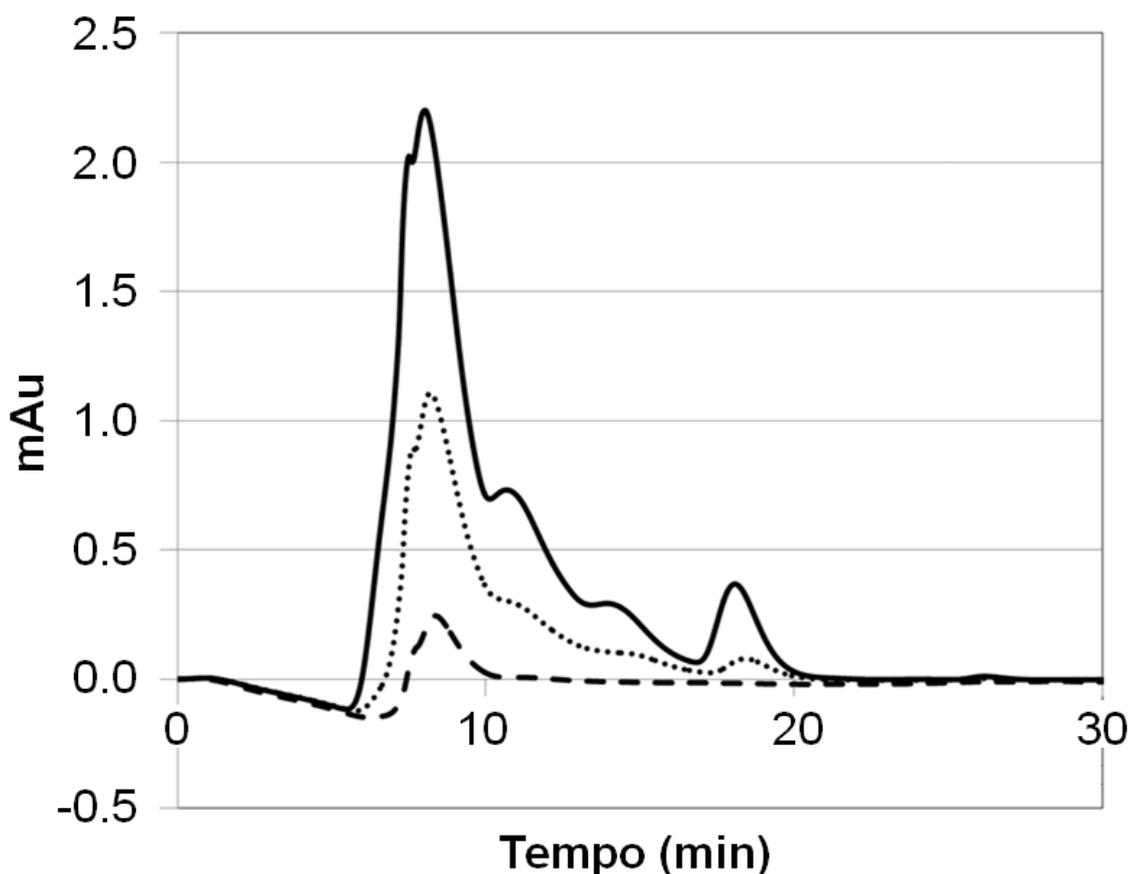


Figura 3. Análise em RP-HPLC das frações <10 kDa em hidrolisados de penas obtidos em períodos de cultivo de 0 h (---), 24 h (•••) e 48 h (—). Os hidrolisados foram produzidos por *Chryseobacterium* sp. kr6 durante o crescimento em meio de penas (50 g L⁻¹ de penas, pH inicial de 8,0, a 30 °C). Os sobrenadantes das culturas foram filtrados através de uma membrana de corte de 10 kDa, e os permeados foram aplicados na coluna de RP-HPLC. A eluição foi realizada durante 30 min.

Atividades Biológicas dos Hidrolisados de Penas

As propriedades antioxidantes dos hidrolisados de penas produzidos por *Chryseobacterium* sp. kr6 foram investigadas usando os métodos de DPPH, ABTS e TRAP. O DPPH é um radical livre que aceita um elétron ou um radical hidrogênio, tornando-se uma molécula estável. A atividade de DPPH de hidrolisados de penas atingiu um pico máximo nas culturas de 48 h, alcançando valores máximos (83 %) em culturas de 25 g L⁻¹ e 50 g L⁻¹ de penas. Esses valores tenderam a permanecer praticamente inalterados (no caso de 50 e 75 g L⁻¹ de penas) ou diminuir (no caso de 10 e 25 g L⁻¹ de penas) em períodos de cultura mais elevados (Figura 4A). Particularmente, o decréscimo dos valores de DPPH nos hidrolisados produzidos com 10 e 25 g L⁻¹ de penas, pode ser atribuído a hidrólise adicional dos peptídeos responsáveis pela atividade observada. O pH inicial dos meios de pena (com 50 g L⁻¹ de penas) também afetou a atividade sequestradora de DPPH dos hidrolisados de penas. Especificamente, foram observadas baixas atividades de captura nos hidrolisados obtidos com pH inicial de 6,0 e 7,0, quando comparados com os obtidos a pH 8,0 e 9,0 (Figura 4B).

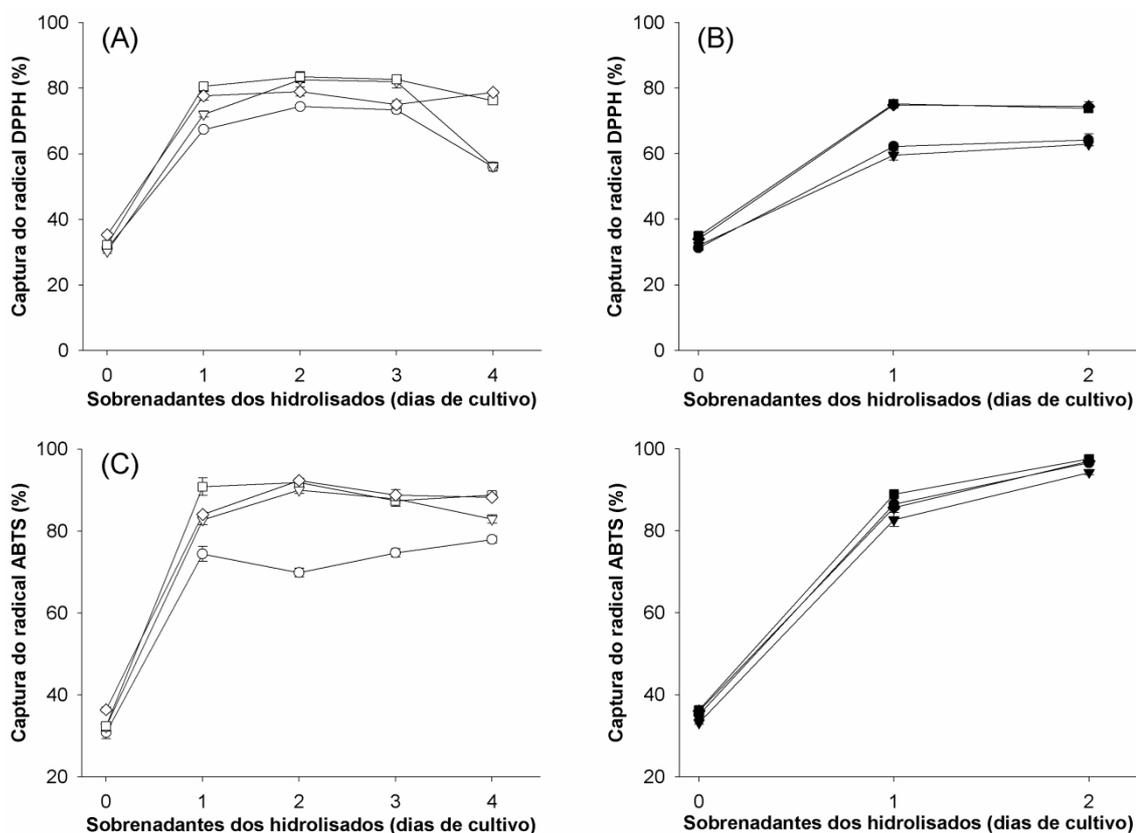


Figura 4. Atividades antioxidantes nos sobrenadantes de hidrolisados de penas produzidos por *Chryseobacterium* sp. kr6, em função do tempo de cultivo em meios de pena a 30 °C. (A) Atividade de captura do radical DPPH obtida com diferentes concentrações de penas (○, 10 g L⁻¹; ▽, 25 g L⁻¹; □, 50 g L⁻¹; ◇, 75 g L⁻¹) e pH inicial 8,0. (B) Atividade de captura do radical DPPH de hidrolisados obtidos com 50 g L⁻¹ de penas em meios com diferentes valores iniciais de pH (●, pH 6,0; ▼, pH 7,0; ■, pH 8,0; ◆, pH 9,0). (C) Atividade de captura do radical ABTS dos hidrolisados obtidos com diferentes concentrações de penas (○, 10 g L⁻¹; ▽, 25 g L⁻¹; □, 50 g L⁻¹; ◇, 75 g L⁻¹) e pH inicial de 8,0. (D) Atividade de captura do radical ABTS de hidrolisados obtidos com 50 g L⁻¹ de penas em meios com diferentes valores iniciais de pH (●, pH 6,0; ▼, pH 7,0; ■, pH 8,0; ◆, pH 9,0).

Na presença de antioxidantes com propriedades de doação de hidrogênio ou quebra de cadeia, o radical ABTS é reduzido, com a conversão simultânea em um produto incolor. A capacidade de captura do radical ABTS, após 24 h foi maior para os hidrolisados de penas com uma concentração inicial de 50 g L⁻¹; em 48 h, a capacidade de captura do radical ABTS era similar (cerca de 90 %) para os hidrolisados obtidos com concentrações de

penas de 25 - 75 g L⁻¹ (Figura 4C). Por outro lado, as capacidades antioxidantes dos hidrolisados de penas produzidos com 10 g L⁻¹ de penas foram mais baixas ao longo do tempo de cultivo. O efeito do pH inicial, no meio que continha 50 g L⁻¹ de penas, na atividade de captura do radical ABTS dos hidrolisados de penas (Figura 4D), não foi tão acentuado como o observado para o ensaio de DPPH (Figura 4B); no entanto, de modo semelhante a este último método, valores mais elevados para o método ABTS foram observados em hidrolisados de 24 h, com um pH inicial de 8,0.

Os índices do potencial antioxidante reativo total (TRAP) e da reatividade antioxidante total (TAR) foram determinados utilizando um método baseado na extinção da quimioluminescência reforçada por luminol derivada da termólise de um composto azóico solúvel em água, AAPH, utilizado como uma fonte confiável e quantificável de radicais peróxil alquilo (Lissi et al., 1992, 1995). Este ensaio provou ser um método simples, sensível e reproduzível, que pode ser usado para determinar a capacidade antioxidante em misturas complexas (Desmarchelier et al., 1997). Por outro lado, o índice TAR foi obtido a partir da diminuição inicial da luminescência associada com a incorporação do aditivo da amostra para o sistema AAPH por luminol, e indica a reatividade da amostra quando comparada ao Trolox (Lissi et al., 1992, 1995; Desmarchelier et al., 1997). Na Figura 5 vemos o perfil da quimioluminescência obtida após a adição de 10 µL de Trolox (200 nM), utilizado como um padrão e as amostras dos sobrenadantes do hidrolisado bruto de penas 48h (P) e do hidrolisado de penas 48h parcialmente purificados com Sephadex G-10 (Ppp) em diferentes concentrações (1, 0,5, 0,25, 0,2 e 0,1 mg mL⁻¹). Isto permitiu

comparar os diferentes perfis pelo TRAP e foi possível observar a diminuição da quimioluminescência após a adição das amostras nas diferentes concentrações, que demonstraram ser qualitativamente diferentes da obtida quando é utilizado Trolox. Todas as amostras estudadas, nas concentrações testadas, foram ativas na redução da quimioluminescência reforçada pelo luminol, indicando a presença de compostos com propriedades de captura do peróxido. No entanto, todas as amostras apresentaram redução instantânea da quimioluminescência e manutenção desta atividade durante o período analisado (Figuras 6 e 7).

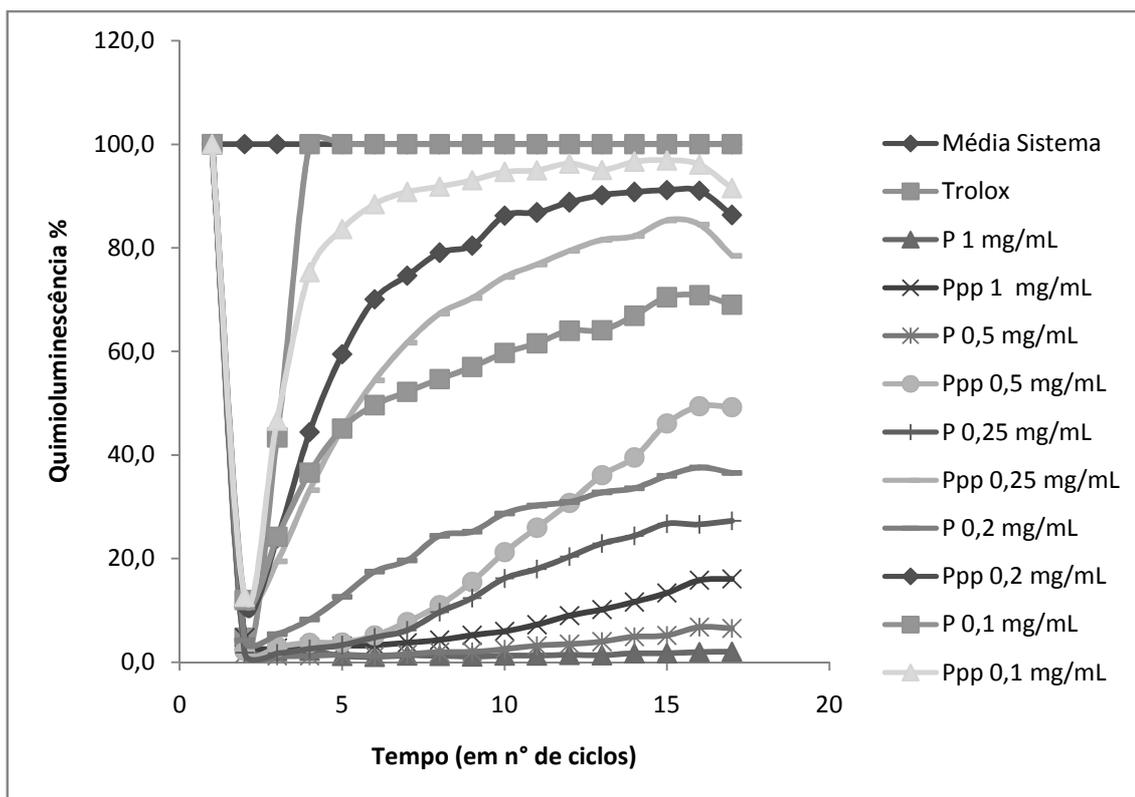


Figura 5. Perfil do TRAP de hidrolisados de penas em diferentes concentrações, sendo P (sobrenadante bruto do hidrolisado de penas de 48h) e Ppp (sobrenadante bruto do hidrolisado de penas de 48h parcialmente purificado com Sephadex G-10).

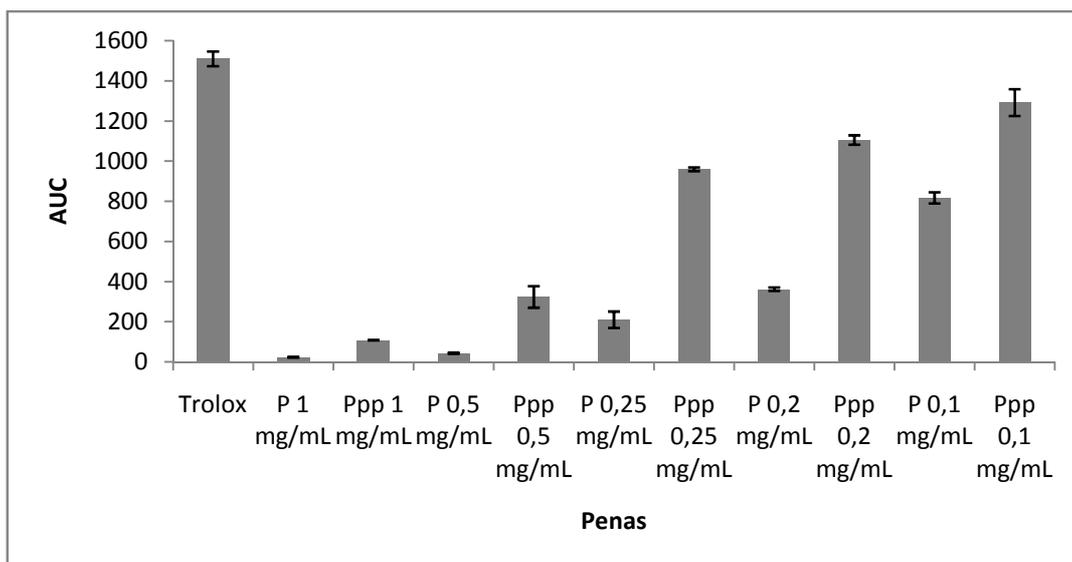


Figura 6. Potencial antioxidante reativo total (TRAP) de penas em diferentes concentrações, sendo P (sobrenadante bruto do hidrolisado de penas de 48h) e Ppp (sobrenadante bruto do hidrolisado de penas de 48h parcialmente purificado com Sephadex G-10).

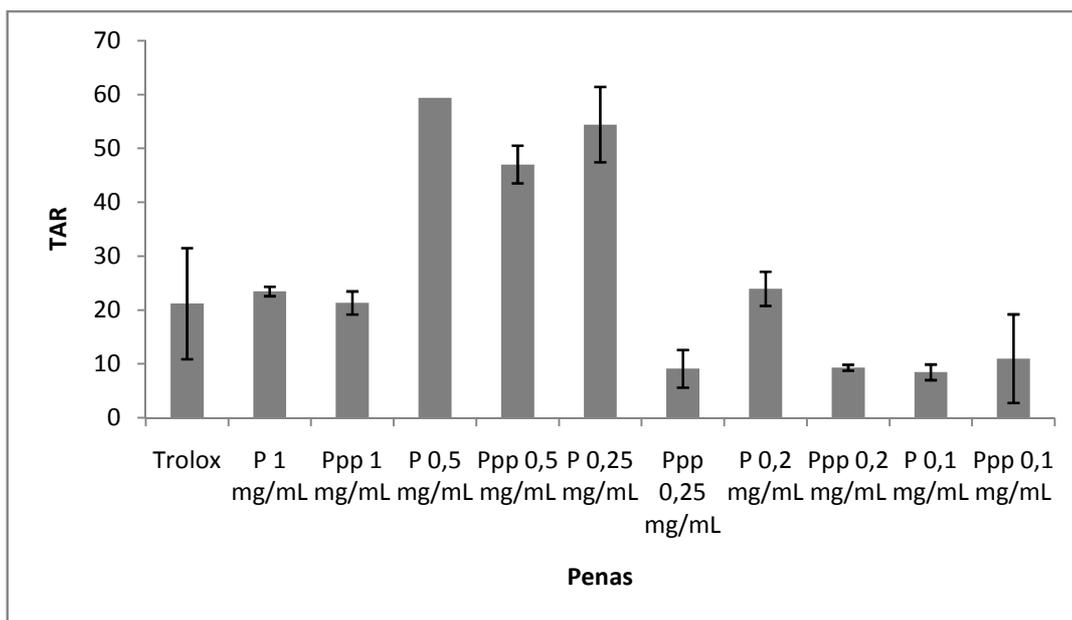


Figura 7. Valores da reatividade antioxidante total (TAR) dos hidrolisados de penas em diferentes concentrações, sendo P (sobrenadante bruto do hidrolisado de penas de 48h) e Ppp (sobrenadante bruto do hidrolisado de penas de 48h parcialmente purificado com Sephadex G-10) (I). Os resultados são expressos em porcentagem de inibição.

A capacidade de inibição da enzima conversora de angiotensina (ECA) foi avaliada com os hidrolisados obtidos com 50 g L^{-1} de penas e pH inicial 8,0. Nessas condições, os hidrolisados de penas obtidos às 24 h e 48 h de cultivo exibiram 53 % e 65 % de inibição da ECA, respectivamente (Figura 8).

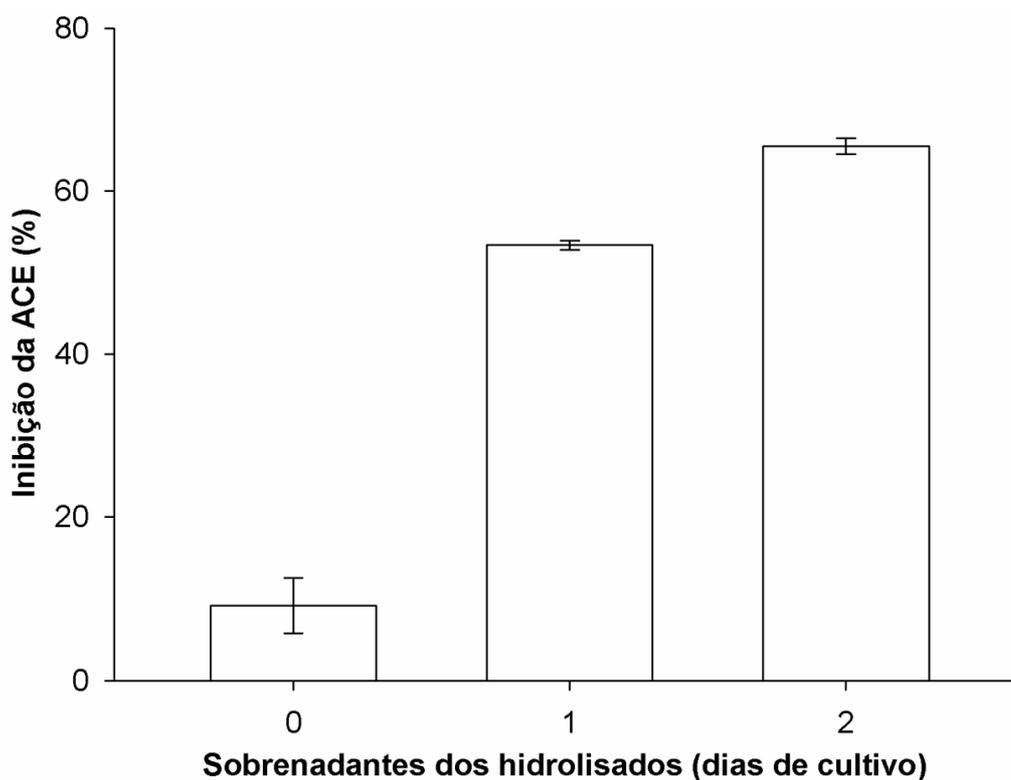


Figura 8. Capacidade de inibição da ECA dos hidrolisados produzidos por *Chryseobacterium* sp. kr6 durante cultivo em meio de penas (50 g L^{-1} de penas, pH inicial 8,0, $30 \text{ }^\circ\text{C}$, 48 h). Os sobrenadantes das culturas foram empregados nas avaliações. Os valores são média de três determinações independentes.

A capacidade de inibição da dipeptidil dipeptidase IV (DPP-IV) foi avaliada com os hidrolisados obtidos com $5, 10, 15$ e 20 mg mL^{-1} de penas e pH inicial 8,0. Nessas condições, os hidrolisados de penas obtidos às 24 h e 48 h de cultivo exibiram $44,25 \%$ e $42,24 \%$ de inibição da DDP-IV, respectivamente, em 20 mg mL^{-1} (Tabela 1).

Tabela 1. Avaliação da capacidade de inibição da dipeptidil peptidase IV pelos diferentes tempos de hidrólise das penas pela *Chryseobacterium* sp. kr6 em diferentes concentrações

Tempo zero de hidrólise	
5 mg mL ⁻¹	Sem atividade
10 mg mL ⁻¹	Sem atividade
15 mg mL ⁻¹	Sem atividade
20 mg mL ⁻¹	Sem atividade
Tempo de hidrólise de 24h	
5 mg mL ⁻¹	15,28 ± 0,001 ^a
10 mg mL ⁻¹	22,25 ± 0,03 ^b
15 mg mL ⁻¹	34,54 ± 0,007 ^c
20 mg mL ⁻¹	44,25 ± 0,005 ^d
Tempo de hidrólise de 48h	
5 mg mL ⁻¹	12,16 ± 0,029 ^a
10 mg mL ⁻¹	33,62 ± 0,014 ^{a,b,c}
15 mg mL ⁻¹	39,30 ± 0,004 ^{b,d}
20 mg mL ⁻¹	42,24 ± 0,002 ^{c,d}

^aOs valores são média de duas determinações independentes.

DISCUSSÃO

Produção de proteases e liberação de proteínas solúveis durante o crescimento em meio de penas

O potencial queratinolítico da *Chryseobacterium* sp. kr6 foi empregado na produção de hidrolisados de penas em diferentes concentrações de substratos (penas) e distintos valores iniciais de pH. Inicialmente, os efeitos e suas variáveis foram investigados na produção de proteases e liberação de proteínas solúveis. Os valores de proteínas solúveis obtidos com a kr6 com 50

g L⁻¹ de penas, após 48 h de cultivo (Figura 1C e 1D) foram mais elevados do que os observados para o *Bacillus pumillus* A1 (13,7 mg mL⁻¹), cultivado durante o mesmo período de tempo num meio contendo 50 g L⁻¹ de penas, a 45 °C e com um pH inicial de 10,0 (Fakhfakh et al., 2011). Estes valores também são superiores quando comparados com os obtidos por diversos outros microrganismos crescidos em meio com penas de galinha, incluindo espécies de *Bacillus* (Nagal & Jain, 2010; Bach et al., 2011), que são consideradas proeminentes cepas degradadoras de penas e produtoras de queratinases (Brandelli et al., 2010). Como observado na Figura 1, a cinética da produção enzimática e da degradação de penas não se sobrepõem, ou seja, uma maior produção de proteases ocorre mais cedo do que os picos de proteínas solúveis (Gupta & Ramnani, 2006).

Particularmente, com uma concentração de 10 g L⁻¹ de penas, o aumento da inacessibilidade do substrato de crescimento pode ter afetado a produção de proteases, e, portanto, a liberação de proteínas solúveis. Foi observado que a ráquis das penas não foi degradada até o 4º dia da cultura em meio de penas (dados não mostrados), corroborando com relatos anteriores em que a *Chryseobacterium* sp. kr6 chegou a fase estacionária de crescimento após 15 h de crescimento em meio com penas inteiras, atacando as bárbulas das penas primeiramente, e, lentamente, degradando as ráquis das penas somente após 36 h de cultivo (Riffel et al., 2011). Portanto, a redução das proteínas solúveis em cultivos realizados com 10 g L⁻¹ de penas pode ser relacionada, concomitantemente, com a deficiência da cepa em explorar as estruturas remanescentes das penas no meio de cultivo, e com o consumo de

peptídeos solubilizados para a construção da biomassa microbiana (Bach et al., 2011). As cepas bacterianas podem produzir sequencialmente diferentes tipos de enzimas proteolíticas dirigidas contra substratos de crescimento proteicos cada vez mais inacessíveis. Este fenômeno, relacionado com a diminuição da qualidade nutricional do meio (Adigüzel et al., 2009), pode explicar, em parte, aos aumentos das proteínas solúveis nos meios com 10 g L⁻¹ de penas nos dias 3 e 4 (Figura 1C). Além disso, os aumentos de proteínas solúveis em meios com 10 g L⁻¹ de penas também podem estar relacionados com a lise celular, como previamente relatado para a kr6 (Riffel et al., 2003). Em concentrações mais elevadas de penas, as proteínas solubilizadas poderiam ser suficientes para suportar o crescimento microbiano, também sugerindo que a atividade antimicrobiana foi responsável pelo excedente de proteína observado.

Os valores alcalinos de pH facilitam a degradação de queratina (Gupta & Ramnani, 2006), e a *Chryseobacterium* sp. kr6 demonstrou previamente um aumento significativo no pH do meio durante o crescimento no meio de penas, como resultado da liberação de amônia através da desaminação dos produtos originários da degradação de queratinas (Riffel et al., 2003). Uma vez que nenhum controle de pH foi empregado durante os cultivos, a alcalinização dos meios de cultivos foi observada em função do tempo e da proteólise, e, considerando também que as enzimas queratinolíticas da kr6 são muito ativas em pH variando de 7,4 - 9,2 (Riffel et al., 2007; Silveira et al., 2009), esses fatores poderiam explicar a quase total

ausência de diferenças no conteúdo de proteína solúvel entre os cultivos iniciados com diferentes valores de pH.

A distribuição do peso molecular e das sequências de aminoácidos dos peptídeos são afetadas pela especificidade enzimática (Kristinsson & Rasco, 2000). Foi relatada a produção de, pelo menos, quatro proteases extracelulares pela cepa kr6, durante o crescimento em meio de penas; duas destas enzimas foram postuladas por possuírem uma ampla especificidade de substratos, enquanto as outras duas foram produzidas apenas na presença de penas (Riffel et al., 2011). Perfis eletroforéticos e cromatográficos dos hidrolisados de pena indicam que o tipo e a abundância foram afetados em função do tempo de cultivo. Especialmente, peptídeos pequenos (< 10 kDa) não foram detectados corretamente por SDS-PAGE com tricina (Yust et al., 2003; Guan et al., 2007). Portanto, permeados de hidrolisados de penas foram submetidos ao RP-HPLC, e uma maior intensidade de picos relacionados a peptídeos hidrofóbicos foram observados em culturas com tempo superior a 48h.

Hidrolisados de penas podem ser potencialmente empregados como suplementos na alimentação animal. Esses produtos mostram possuírem valores nutricionais mais elevados em comparação com a farinha de penas obtida através de processamento hidrotérmico (Bertsch & Coello, 2005), e podem substituir os ingredientes mais caros em formulações de alimentos (Williams et al., 1991; Grazziotin et al., 2008). Nesse sentido, a kr6 mostra um notável potencial biotecnológico, ligando um processamento eficaz de resíduos de penas com a produção de proteases e hidrolisados proteicos.

Propriedades biológicas dos hidrolisados de penas

Os ensaios de DPPH e ABTS são métodos úteis na avaliação do potencial antioxidante dos peptídeos e hidrolisados proteicos (Pihlanto, 2006). Diversos hidrolisados proteicos têm demonstrado possuir tais propriedades, e a pesquisa, nesse campo, se concentra na produção de hidrolisados de proteínas dos alimentos (particularmente caseínas) com proteases (parcialmente) purificadas (Phelan et al., 2009). Por outro lado, algumas investigações tratam da produção de peptídeos bioativos a partir de resíduos ou proteínas estruturais (Manni et al., 2010). Apesar de proteases queratinolíticas serem empregadas na geração de hidrolisados proteicos alimentares com atividade antioxidante (Daroit et al., 2012; Hidalgo et al., 2012), apenas um relato descreve a utilização do potencial queratinolítico de uma cepa microbiana na geração de hidrolisados de penas com atividade antioxidante (Fakhfakh et al., 2011).

Para a *Chryseobacterium* sp. kr6, as condições da cultura, que resultaram em hidrolisados de penas com valores de DPPH e ABTS ótimos, foram fixadas em 50 g L⁻¹ de penas e pH inicial do meio 8,0, após 48 h de crescimento, a 30 °C. Nessas condições, a captura do radical ABTS nos hidrolisados em concentrações de 15 mg mL⁻¹, atingiram aproximadamente 90 %. Para fins de comparação, a atividade de captura do radical ABTS de 15 mg mL⁻¹ do hidrolisado de caseinato ovino, após tratamento com uma enzima a partir de *Bacillus* sp. P45 foi de 66 % (Daroit et al., 2012). Foi observado um aumento das propriedades antioxidantes (medidos através dos métodos de DPPH e ABTS) em fermentações de soja e okara com uma cepa de *Bacillus*

subtilis B2 (Zhu et al., 2008a,b). Os valores de DPPH obtidos por hidrolisados de penas por *Chryseobacterium* sp. kr6 atingiram cerca de 83 % em uma concentração de 250 mg mL⁻¹. Na mesma concentração, hidrolisados de caseinato ovino obtidos com uma preparação de proteases de *Bacillus* sp. P7 mostraram uma redução de 31 % nos valores de captura do radical DPPH (Corrêa et al., 2011), e 50 % de captura de DPPH foi conseguido por hidrolisados de caseinato bovino a uma concentração de 17 mg mL⁻¹ (Hidalgo et al., 2012). No entanto, hidrolisados de penas obtidos com *Bacillus pumilus* A1 mostraram valores de captura de DPPH de 50 % em concentrações de 0,3 mg mL⁻¹, isto é, em baixas concentrações, quando comparados com os hidrolisados produzidos pela kr6 (Fakhfakh et al., 2011).

Uma consideração importante é que as concentrações dos hidrolisados de penas utilizados nos ensaios de DPPH foram muito maiores do que as utilizadas nos ensaios de ABTS. Como relatado anteriormente, o comportamento distinto dos hidrolisados de penas para os métodos de captura dos radicais DPPH e ABTS, pode ser explicado pela diferente estereosseletividade dos radicais, e compostos distintos presentes na amostra são capazes de reagir e capturar diferentes radicais, além da diferente estequiometria das reações entre os compostos antioxidantes dos hidrolisados e os radicais ABTS e DPPH, e também da solubilidade e difusibilidade dos radicais (Rival et al., 2001; Zhu et al., 2008a,b). Sendo assim, uma maior atividade com o método do ABTS, não necessariamente implica em um aumento da capacidade de varrer os radicais DPPH. Nessa perspectiva, o

método ABTS é um dos protocolos mais eficazes e comumente utilizados no monitoramento das atividades antioxidantes (Silva et al., 2006).

A captura dos radicais livres também pode ser avaliada através da análise do TAR e TRAP *in vitro*. O TRAP é um método preciso e sua principal vantagem é que ele se aplica a anti-radicaais livres com diferentes comportamentos cinéticos. Em outras palavras, o método do TRAP se aplica igualmente bem para os antioxidantes que apresentam fases *lag* distintas e/ou não apresentam fase *lag*, podendo ser, dessa forma, utilizado para qualquer composto antioxidante (ou uma mistura complexa), independente do perfil da cinética de emissão do composto (Dresch et al., 2009). O TRAP dos hidrolisados de penas de 48 h, sobrenadante bruto e parcialmente purificado em Sephadex G-10, em diferentes concentrações, pode ser visto na Figura 5.

Os hidrolisados de penas de 48 h do sobrenadante bruto (1 e 0,5 mg mL⁻¹) e do sobrenadante de 48 h parcialmente purificado (1 mg mL⁻¹) não apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$) entre si na AUC e estes apresentaram maior capacidade de eliminação de radicais livres. Todas as diferentes concentrações dos hidrolisados de penas, do sobrenadante bruto e parcialmente purificado, apresentaram uma quantidade significativamente maior que o Trolox (Figura 6). Os resultados dos índices de TAR indicaram que todas as amostras testadas apresentaram atividade antioxidante (Figura 7), sendo que as amostras do sobrenadante bruto (0,5 e 0,25 mg mL⁻¹) e a amostra do sobrenadante parcialmente purificados (0,5 mg mL⁻¹) apresentaram os maiores índices (Figura 7). Os valores da reatividade antioxidante total (TAR) são calculados como razão entre a intensidade de luz na ausência de

amostras (I_0)/ intensidade de luz logo após adição das amostras de penas em diferentes concentrações, sendo P (sobrenadante bruto do hidrolisado de penas de 48h) e Ppp (sobrenadante bruto do hidrolisado de penas de 48h parcialmente purificado com Sephadex G-10) (I). Os resultados são expressos em porcentagem de inibição (Figura 7). Segundo Morrone et al. (2013) os extratos aquosos de folhas de *Passiflora manicata* apresentaram atividade antioxidante significativa através do ensaio de TRAP/TAR. As concentrações de antioxidantes de extratos de *Ilex paraguayensis* e vinhos tintos foram testadas através dos métodos de TRAP/TAR, demonstrando uma alta concentração de antioxidantes (Campos et al., 1996). Já Kappel et al. (2008) verificaram efeito antioxidante através da metodologia de TRAP/TAR para frutos de *Capsicum baccatum* L. var. *pendulum* em diferentes estágios de maturidade.

A enzima conversora de angiotensina (ECA) realiza a conversão de angiotensina I em angiotensina II (forte vasoconstritor), e também degrada a bradicinina (um potente vasodilatador). Assim, os inibidores da ECA atuam como agentes potenciais no controle da pressão arterial e na redução da hipertensão, com a consequente utilidade na prevenção e/ou tratamento de doenças cardiovasculares (Fitzgerald et al., 2004). Nesse sentido, várias investigações reportam a capacidade inibidora da ECA de hidrolisados de proteínas e peptídeos, devido ao seu potencial impacto positivo na saúde humana (López-Fandiño et al., 2006; Haque & Chand, 2008). No entanto, a capacidade dos hidrolisados de penas na inibição da atividade da ECA (65 % de inibição) é demonstrada pela primeira vez. Os resultados são comparados

àqueles obtidos por várias bactérias lácticas durante a fermentação do leite (Pihlanto et al., 2010), e também aos hidrolisados de soja (Lee et al., 2008) e hidrolisados de fibroína de seda (Zhou et al., 2010) obtidos com enzimas comerciais.

A DPP-IV é uma serino-protease responsável pela rápida degradação dos hormônios incretinas GLP-1 e GIP (Drucker, 2007). Esses hormônios potencializam a liberação de insulina após a ingestão de nutrientes, diminuindo assim a glicemia pós-prandial. Com a inibição da DPP-IV, é possível aumentar a meia-vida de GLP-1 e GIP, aumentando a secreção de insulina (Nongonierma & FitzGerald, 2013a).

A análise dos resultados demonstrou um aumento da atividade inibitória da DPP-IV conforme o aumento da concentração dos hidrolisados. O hidrolisado de tempo zero não apresentou atividade, sendo que a maior atividade foi apresentada para o hidrolisado de 24h ($44,25 \pm 0,005$ em 20 mg mL^{-1}). Hidrolisados proteicos de leite, algas, peixe e amaranto já demonstraram previamente serem capazes de inibir a DPP-IV, sendo que o grau de inibição pode variar dependendo da protease utilizada (Huang et al., 2012; Velarde-Salcedo et al., 2012; Harnedy & FitzGerald, 2013; Nongonierma & FitzGerald, 2013a,b). Proteínas isoladas de resíduos de grãos da indústria cervejeira, hidrolisados com Corolase PP, mostraram alto índice de inibição da DPP-IV ($75 \pm 3,06 \%$ com $3,5 \text{ mg mL}^{-1}$) (Connolly et al., 2014). Diferentes peptídeos de proteínas do arroz, com resíduos Pro na porção C-terminal, foram identificados como inibidores da DPP-IV (Hatanaka et al., 2012). No entanto, vários

dipeptídeos sem resíduo de Pro também foram identificados como potentes inibidores de DPP-IV (Nongonierma & FitzGerald, 2013a,b).

As atividades biológicas dos hidrolisados de proteínas dependem da especificidade da enzima, que determina o grau de hidrólise das proteínas e, também, os possíveis peptídeos gerados a partir de uma proteína-mãe (Phelan et al., 2009). Normalmente, as bioatividades de hidrolisados proteicos estão relacionadas com pequenos peptídeos (< 6 kDa) (López-Fandiño et al., 2006; Sarmadi & Ismail, 2010; Alemán et al., 2011). A hidrólise de proteínas, geralmente, resulta na exposição de grupos hidrofóbicos na superfície dos peptídeos gerados (Daroit et al., 2012) e, particularmente, as queratinas contêm cerca de 50-60 % dos resíduos de aminoácidos hidrofóbicos e aromáticos (Arai et al., 1983; Barone & Schmidt, 2006). Nesse sentido, os resíduos de aminoácidos aromáticos e hidrofóbicos parecem estar envolvidos em atividades antioxidantes de hidrolisados proteicos (Silva et al., 2006; Phelan et al., 2009; Sarmadi & Ismail, 2010), e também existem indícios de que os aminoácidos hidrofóbicos nas três posições do C-terminal podem influenciar a ação inibitória dos peptídeos com a ECA (Haque & Chand, 2008). Uma vez que os solutos na RP-HPLC são eluídos em ordem do aumento de hidrofobicidade (Aguilar, 2004), a absorvância dos perfis de peptídeos com menos de 10 kDa representa o aparecimento e o acúmulo de peptídeos com altas propriedades hidrofóbicas (especialmente nos 11, 14 e 18 min; Figura 5), o que pode contribuir para as bioatividades observadas nos hidrolisados de penas.

Em resumo, *Chryseobacterium* sp. kr6 foi utilizada com sucesso na obtenção de hidrolisados de penas, demonstrando atividades antioxidantes, de

inibição da ECA e da DPP-IV. Considerando-se a enorme quantidade de penas geradas como resíduo da indústria de processamento de aves em todo o mundo (Korniłłowicz-Kowalska & Bohacz, 2011), tal estratégia de bioconversão pode ser uma alternativa adequada para expandir as opções na utilização desses resíduos abundantes e recalcitrantes. Do ponto de vista biotecnológico, as propriedades antioxidantes dos peptídeos e hidrolisados de proteínas podem ser empregados na elaboração de alimentos funcionais, e como agentes de retardamento da peroxidação lipídica que leva à deterioração dos alimentos (Pihlanto, 2006; Sarmadi & Ismail, 2010). Particularmente, os hidrolisados de penas podem ser utilizados como suplementos em rações para animais, e suas propriedades antioxidantes poderiam também proteger os alimentos contra a oxidação (Fakhfakh et al., 2011).

As atividades antioxidantes, de inibição da ECA e da DPP-IV demonstradas pelos hidrolisados de penas merecem mais investigações, particularmente na identificação e caracterização dos peptídeos responsáveis pelas bioatividades observadas. Independentemente de sua origem, hidrolisados de proteínas e peptídeos devem ser testados para a segurança e toxicidade para postular aplicações (Phelan et al., 2009). Esses hidrolisados e peptídeos podem ser potencialmente utilizados diretamente, como fonte de moléculas bioativas, ou indiretamente, como uma fonte de informação para a síntese química de peptídeos bioativos, o que pode ser empregados em rações, em alimentos e no desenvolvimento de medicamentos.

3.2 RESULTADOS II

Avaliação da atividade antioxidante, anti-hipertensiva e antimicrobiana de hidrolisados de caseinato de leite ovino com uma protease de *Chryseobacterium* sp. kr6

INTRODUÇÃO

Para evitar a deterioração dos alimentos e fornecer proteção contra diversas doenças, é importante inibir a peroxidação lipídica e a formação de radicais livres que ocorrem nos organismos vivos e nos gêneros alimentícios. A oxidação lipídica é inibida por agentes antioxidantes. Antioxidantes artificiais (BHA, BHT e *n*-propyl galate) exibem forte atividade antioxidante contra vários sistemas de oxidação. No entanto, os antioxidantes artificiais representam riscos potenciais *in vivo* e a sua utilização em produtos alimentares é restrita ou proibida em diversos países. Antioxidantes mais seguros, obtidos através de fontes naturais, principalmente compostos não proteicos de plantas, têm sido desenvolvidos. Tem sido reportado que algumas proteínas alimentícias têm a habilidade de sequestrar grupos de oxigênio ativos (Okada & Okada, 1998).

Há poucas décadas atrás, o único critério para a qualidade proteica era a composição dos aminoácidos. Como resultado dos avanços na amplitude e profundidade das ferramentas de pesquisa, agora já está sendo reconhecido que as proteínas das caseínas do leite, bem como as proteínas do soro, contribuem para a saúde humana através de uma atividade biológica latente.

Essa funcionalidade biológica latente se torna ativa através da ação hidrolítica certas enzimas proteolíticas (Michaelidou, 2008).

Os benefícios dos alimentos funcionais e nutracêuticos são atribuídos à presença de grupos funcionais específicos e seus derivados moleculares liberados durante o metabolismo do alimento. As proteínas dietéticas, dada a sua capacidade de fornecer calorias e aminoácidos, são também conhecidas por oferecer benefícios à saúde, tanto *in vivo* quanto *in vitro*, quer na sua forma intacta ou como hidrolisados (Agyei & Danquah, 2012). Os derivados proteicos de alimentos que podem induzir funcionalidades biológicas benéficas podem ser denominados peptídeos bioativos.

Os peptídeos bioativos são produzidos por fermentação microbiana, digestão enzimática ou proteólise por enzimas *in vitro*, e podem realizar atividades biológicas nos principais sistemas do corpo (Korhonen & Pihlanto, 2006). Tais funcionalidades incluem efeitos antioxidantes, antimicrobianos, anti-hipertensivo, citomodulatório e imunomodulatório (Hartmann & Meisel, 2007; Yang et al., 2009).

Além dos microrganismos vivos, enzimas proteolíticas provenientes de fontes bacterianas e fúngicas têm sido utilizadas para gerar peptídeos bioativos a partir de proteínas diversas. A utilização de proteases derivadas de microrganismos, disponíveis comercialmente, de grau alimentar, para a hidrólise de proteínas alimentares, é muito vantajosa, uma vez que essas enzimas são seguras e apresentam baixo custo, e os rendimentos do produto são muito elevados (Mao et al., 2007; Hernández-Ledesma et al., 2011).

Os peptídeos bioativos são inativos dentro da sequência da proteína original e podem ser liberados de três maneiras: (a) através da hidrólise por enzimas digestivas, (b) através da hidrólise por microrganismos proteolíticos e (c) através da ação de enzimas proteolíticas derivadas de microrganismos ou plantas (Korhonen & Pihlanto, 2006).

Peptídeos bioativos são definidos como fragmentos específicos de proteínas que tem um impacto positivo sobre as funções corporais ou condições e podem vir a influenciar a saúde (Kitts & Weiler, 2003).

Nesse estudo, a preparação de proteases de *Chryseobacterium* sp. kr6 foi empregada na hidrólise de caseinato de sódio obtido a partir de leite ovino, e as atividades biológicas (antioxidante, anti-hipertensiva e antimicrobiana) dos hidrolisados proteicos foram avaliadas, com o objetivo de avaliar o seu potencial para aplicações em alimentos.

MATERIAIS E MÉTODOS

Microrganismo

Nesse estudo foi utilizada a bactéria *Chryseobacterium* sp. kr6, isolada a partir do efluente de uma indústria de processamento de aves (Riffel et al., 2003). Culturas estoque deste microrganismo são mantidas a -20 °C em caldo cérebro-coração (BHI) contendo glicerol (20 %, v v⁻¹). A reativação do microrganismo foi realizada em caldo cérebro-coração (BHI), incubadas a 30 °C por 24 h. As culturas reativadas foram mantidas a 4 °C em placas de ágar farinha de penas, com repiques periódicos.

Produção da Enzima

O processo de produção e purificação da enzima foi efetuado de acordo com Silveira et al. (2010). O cultivo microbiano para produção da enzima foi realizado em caldo farinha de penas, contendo os seguintes componentes (g L⁻¹): NaCl (0,5), KH₂PO₄ (0,4), CaCl₂ (0,015) e farinha de penas (10,0). O pH foi ajustado a 8,0. Os cultivos foram realizados em frascos erlenmeyer com capacidade de 250 mL (volume de trabalho de 50 mL), a 30 °C, sob agitação, por 48 h. Decorrido o período de crescimento, o cultivo foi centrifugado por 20 min a 10.000 x g e 4 °C, coletando-se o sobrenadante.

Avaliação da Atividade Proteolítica

A atividade proteolítica foi determinada como descrita por Sangali & Brandelli (2000a) usando azocaseína (Sigma Co., St. Louis, MO, USA) como substrato. A mistura de reação, contendo 120 µL de amostra e 480 µL de azocaseína (10 g L⁻¹) em 50 mmol L⁻¹ de tampão Tris-HCl pH 8,0, foi incubada por 40 min a 45 °C; a reação foi parada com a adição de 600 µL de ácido

tricloroacético (100 g L^{-1}). Após a separação do excesso de azocaseína por centrifugação, $800 \mu\text{L}$ do sobrenadante foram misturados com $200 \mu\text{L}$ de NaOH ($1,8 \text{ M L}^{-1}$), resultando em um complexo amarelo, medido espectrofotometricamente a 420 nm . Uma unidade de atividade enzimática foi definida como sendo a quantidade de enzima necessária para produzir uma mudança na absorvância em $0,01$, sob as condições citadas.

Determinação de Proteína

O conteúdo de proteína foi medido pelo método do reagente de Folin fenol (Lowry et al., 1951), utilizando albumina de soro bovino como padrão. Todas as medições foram realizadas utilizando um espectrofotômetro Shimadzu UV mini-1240.

Purificação Parcial da Enzima

Precipitação com Sulfato de Amônio

Inicialmente, cultivos de *Chryseobacterium* sp. kr6 em caldo farinha de penas foram centrifugados sob refrigeração ($10.000 \times g$ por 20 min a $4 \text{ }^\circ\text{C}$). O sobrenadante foi coletado e submetido à precipitação fracionada com sulfato de amônio, no intuito de concentrar a atividade enzimática. Sulfato de amônio foi adicionado ao sobrenadante dos cultivos, mantido em banho de gelo com agitação, até atingir taxa de saturação igual a 50% . A quantidade de sulfato de amônio necessária para atingir esta faixa de saturação foi calculada com base no volume de sobrenadante do cultivo sujeito à precipitação segundo Scopes (1994).

Após a adição da quantidade de sulfato de amônio adequada para a etapa de precipitação, a suspensão formada foi mantida por 1 hora sob

agitação e, após, mais 3 horas em repouso sob refrigeração. Então, esta suspensão foi centrifugada ($10.000 \times g$ por 20 min a $4 \text{ }^\circ\text{C}$), e o precipitado foi ressuspenso em um volume mínimo de tampão Tris-HCl 50 mmol L^{-1} pH 8,0. Após a amostra foi armazenada para posteriores ensaios.

Cromatografia Líquida de Gel Filtração

A suspensão resultante da etapa anterior foi aplicada em coluna de cromatografia líquida de gel filtração (Sephadex G-100) em volume não superior a 5 % do volume de resina da coluna. A coluna ($0,8 \times 30 \text{ cm}$) foi equilibrada e eluída com tampão Tris HCl (50 mmol L^{-1} pH 8,0), sendo coletadas 20 frações de 1 mL cada. Para cada fração foi realizado o ensaio enzimático.

Nesta última etapa de purificação as frações com atividade enzimática foram reunidas. O *pool* resultante foi submetido aos ensaios de hidrólises com caseinato de leite ovino.

Preparação do Caseinato de Leite Ovino

O procedimento foi seguido na preparação do caseinato de leite ovino da raça Lacaune proveniente do sul do Brasil. Após centrifugação a $10.000 \times g$ durante 10 min a $4 \text{ }^\circ\text{C}$, o leite desnatado foi acidificado a pH 4,5 com 1 mol L^{-1} de ácido acético, sob agitação contínua, a $25 \text{ }^\circ\text{C}$. Depois de 30 min, a $40 \text{ }^\circ\text{C}$, a mistura foi filtrada através de papel filtro Whatman n°40 usando uma bomba de vácuo. A caseína precipitada foi lavada com água destilada, dissolvida com a adição de NaOH 0,25 M até atingir pH 7,0, e, então, precipitada novamente. Quatro ciclos sucessivos de precipitação e lavagem foram realizados (Moatsou et al., 2004). O precipitado final foi lavado com

acetona e clorofórmio, se necessário, para a remoção de glóbulos de gordura residuais.

Hidrólise Enzimática do Caseinato de Leite Ovino

As proteínas hidrolisadas foram preparadas a partir do caseinato de sódio obtido a partir de leite ovino. Para a hidrólise do caseinato de leite ovino (10 g L^{-1}), este foi dissolvido em $0,1 \text{ M L}^{-1}$ NaOH e, em seguida, ressuspendido com tampão Tris-HCl (50 mM L^{-1} , pH 8,0). Esta solução foi pré-aquecida ($45 \text{ }^\circ\text{C}$ por 15 min), e a hidrólise foi iniciada pela adição da enzima ($2 \text{ } \%$ v v⁻¹), seguindo-se a incubação a $45 \text{ }^\circ\text{C}$ em um banho de água com agitação. Amostras foram sendo retiradas em intervalos definidos (0, 0,5, 1, 2, 3, 4, 6 e 7 h), e a reação de hidrólise foi finalizada pelo aquecimento a $100 \text{ }^\circ\text{C}$ por 15 min. Após o resfriamento, os hidrolisados foram centrifugados ($10.000 \times g$ por 15 min) para a remoção de materiais insolúveis, e os sobrenadantes foram liofilizados e armazenados a $-18 \text{ }^\circ\text{C}$ para análises posteriores.

Atividade Antioxidante

A atividade antioxidante foi avaliada pelos métodos de DPPH, ABTS e TRAP, essencialmente como descrito no capítulo 3.1. Além dessas metodologias, outras duas também foram empregadas.

Poder Redutor

O poder redutor dos hidrolisados foi avaliado como descrito anteriormente (Zhu et al., 2006). Amostras de 2,5 mL (15 mg mL^{-1}) diluídas em tampão fosfato (0,2 M, pH 6,6) foram misturadas em 2,5 mL de ferricianeto de potássio 1 % e incubadas a $50 \text{ }^\circ\text{C}$ por 20 min. Após, 2,5 mL de TCA (10 %) foi adicionado e centrifugado ($3.000 \times g$ por 10 min). O sobrenadante (1 mL) foi

misturado com 2,5 mL de água destilada e 0,2 mL FeCl₃ 0,1 % e feita a leitura em espectrofotômetro a 700 nm. A maior absorvância da reação indica um maior poder redutor.

Atividade Quelante de Ferro

A atividade quelante de Fe²⁺ foi avaliada usando o método descrito por Chang et al. (2007), com algumas modificações. Amostras (3,5 mg mL⁻¹) de 1 mL foram misturadas com 3,7 mL de água destilada; após adicionou-se 0,1 mL de FeSO₄ (Fe²⁺ 2 mM) e 0,2 mL de ferrozina (5 mM). Esta mistura foi agitada e, após 10 minutos, fez-se a leitura da absorvância a 562 nm. Para o controle usou-se água no lugar da amostra. EDTA (20 mg mL⁻¹) foi usado como padrão. Os resultados foram expressos como:

Atividade quelante (%) = $[1 - (A/A_0)] \times 100$, onde A é a absorvância do ensaio, e A₀ é a absorvância do controle.

Determinação das Atividades Antimicrobianas

Atividade Antibacteriana

A atividade antibacteriana foi determinada segundo Motta & Brandelli (2002), com modificações. As linhagens bacterianas utilizadas como indicadoras foram *Listeria monocytogenes* ATCC 15131, *Bacillus cereus* ATCC 9634, *Corynebacterium fimi* NCTC 7547, *Staphylococcus aureus* ATCC 1901, *Salmonella* Enteritidis ATCC 13076, *Salmonella* Typhimurium ATCC 14078, *Yersinia enterocolitica* e *Escherichia coli* ATCC 8739. Os microrganismos indicadores, a uma concentração de 10⁸ UFC mL⁻¹ em solução salina (0,85 % NaCl, p v⁻¹), foram inoculados com um *swab* em placas contendo ágar cérebro-coração 1,5 %. Alíquotas de 15 µL dos hidrolisados (250 mg L⁻¹) foram então

aplicadas sobre as placas, que foram incubadas nas temperaturas ótimas de cada indicadora. Após 24 h, zonas de inibição (representadas por halos claros) foram mensuradas, e apresentadas em mm.

Atividade Antifúngica

A determinação da atividade antifúngica dos hidrolisados foi realizada segundo Corrêa et al. (2011). Os fungos filamentosos *Fusarium oxysporum* ssp. *lycopersici*, *Aspergillus fumigatus*, *Penicillium expansum* foram utilizados como indicadores. Os fungos foram cultivados em placas com ágar batata dextrose (PDA) por 5 dias a 30 °C.

As suspensões de conídios dos fungos filamentosos foram preparadas, e então adicionadas ao PDA semi-sólido a uma temperatura de 50 °C em um volume necessário para se obter uma concentração final de 10^6 conídios mL⁻¹. O meio foi vertido em placas e, após a solidificação, 15 µL dos hidrolisados (250 mg mL⁻¹) foram gotejados. As placas foram incubadas a 30 °C por 48 h e zonas de inibição (representadas por halos claros) foram medidas.

Análise Estatística

Os dados experimentais foram expressos como média ± desvio padrão e avaliados pelo método de Tukey, ao nível de significância de 0,05.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A determinação da captura de radicais livres a partir dos hidrolisados de caseinato foi determinada usando dois radicais: ABTS e DPPH. No ensaio de ABTS, o radical pré-formado ácido 2,2'-azinobis-(3-etil-benzotiazolona-6-

ácido sulfônico) monocatiônico ABTS^{*+} é gerado por oxidação com persulfato de amônio, o que resulta na produção de um cromóforo azul/verde, com um máximo de absorção em 734 nm. A adição de antioxidantes ao radical catiônico pré-formado reduz ABTS^{*+} a ABTS em uma escala de tempo, que é dependente da atividade antioxidante e da concentração da amostra de teste. O grau de descoloração, quando expresso em % de inibição do ABTS^{*+}, pode ser monitorado pela variação na absorbância a 734 nm (Hu & Kitts, 2001). A atividade antioxidante dos hidrolisados de caseinato ovino com a protease kr6, determinada através da metodologia do ABTS, atingiu valores máximos após 30 min de hidrólise, com um aumento de 29,26 % em comparação com a caseína não hidrolisada. No entanto, períodos superiores de hidrólise não demonstraram um aumento na capacidade de captura de radicais, sendo que os valores permaneceram estáveis (Tabela 1). Relatos na literatura indicam que a estrutura primária, bem como outros fatores, como a conformação proteica, são importantes para exercer a atividade antioxidante a partir da caseína de leite ovino (Gómez-Ruiz et al., 2008). Segundo Corrêa et al. (2011), a atividade antioxidante do caseinato de leite ovino hidrolisado com uma protease microbiana, e determinada através do método do ABTS, mostrou um aumento em hidrolisados superiores a 2 h, permanecendo estável por mais de 4 h. Em um estudo com caseinato ovino intacto, suas frações e hidrolisados, obtidos com diferentes enzimas (pepsina, tripsina e quimotripsina) verificaram a atividade antioxidante pelo método do ABTS. As atividades das frações da caseína ovina, antes e após a hidrólise com as enzimas gastrointestinais, demonstraram que a hidrólise aumentou a atividade antioxidante em todas as

frações, mas especialmente na fração da κ -caseína (Gómez-Ruiz et al., 2008). O método do ABTS também foi usado para testar a atividade antioxidante de frações peptídicas obtidas de leite bovino e de camelo fermentados por *Lactobacillus rhamnosus* PTCC 1637, sendo que o leite de camelo fermentado apresentou maior atividade antioxidante, o que pode ser explicado pelas suas diferenças estruturais e pela presença de grande quantidade de prolina na estrutura primária do leite (Moslehishad et al., 2013). A atividade antioxidante determinada pelo método ABTS também demonstrou atividade em peptídeos derivados de extratos solúveis em água de queijos de leite caprino e ovino (Silva et al., 2006).

Tabela 1. Atividade antioxidante de hidrolisados de caseinato^a

Tempo (h)	Sequestro do radical ABTS (%)	Sequestro do radical DPPH (%)	Atividade quelante de Fe ²⁺ (%)	Poder redutor (Abs 700 nm)
0	34,35 ± 0,98 ^a	7,96 ± 0,95 ^a	84,43 ± 0,33 ^a	0,36 ± 0,003 ^a
0.5	63,61 ± 1,87^b	17,08 ± 1,27^b	86,39 ± 1,38 ^b	0,44 ± 0,043 ^b
1	54,70 ± 1,07 ^c	13,51 ± 0,72 ^c	92,56 ± 0,60^c	0,54 ± 0,01^c
2	46,10 ± 0,62 ^d	13,56 ± 0,42 ^c	91,38 ± 0,35 ^c	0,55 ± 0,011 ^c
3	40,46 ± 3,27 ^{a,d}	13,44 ± 0,28 ^c	88,07 ± 1,78 ^b	0,43 ± 0,034 ^b
4	46,17 ± 0,40 ^{e,d}	15,78 ± 0,77 ^d	86,51 ± 0,51 ^b	0,47 ± 0,001 ^d
6	41,21 ± 1,21 ^{f,d}	10,08 ± 0,15 ^e	83,75 ± 0,71 ^a	0,42 ± 0,016 ^b

^aOs valores são média de três determinações independentes.

A atividade de captura do radical DPPH indica a capacidade do composto antioxidante em doar elétrons ou hidrogênio, convertendo assim o radical em uma espécie mais estável (Prior et al., 2005). DPPH não é um

radical biologicamente relevante; no entanto, ele é amplamente utilizado para avaliar a atividade antioxidante de compostos naturais (Bougatef et al., 2009; Udenigwe et al., 2009). Os resultados variaram muito através da mudança nos tempos de hidrólise (Tabela 1), e a relação entre o tempo de hidrólise e a atividade de DPPH não pode ser estabelecida; no entanto, uma alta atividade de captura do radical DPPH foi evidenciada depois de 30 min de hidrólise. A atividade de captura do radical DPPH de dipeptídeos e hidrolisados derivados de proteínas do leite, que podem ser liberados pela ação de uma enzima gastrointestinal de grau alimentício foi apresentada por Nongonierma & Fitzgerald (2013b). Em outro estudo, em contraste, hidrolisados de caseinato bovino obtidos com diversas enzimas proteolíticas, mostraram possuir baixa atividade de DPPH quando comparados com a proteína inteira (Rival et al., 2001). A composição peptídica, e, conseqüentemente, a bioatividade dos hidrolisados proteicos são dependentes da fonte de proteínas, bem como do tipo de enzima, do tempo de hidrólise e da extensão da hidrólise (Mota et al., 2006).

A hidrólise enzimática do caseinato de leite de iaque com diversas proteases resultou na liberação de peptídeos bioativos com potencial na captura de radicais livres. Os hidrolisados de caseína de iaque reduziram a produção de radicais livres, sendo o hidrolisado com alcalase no tempo de 7 h, o que demonstrou maior atividade para o método de DPPH (Mao et al., 2011). Os efeitos antioxidantes da caseína e de seus derivados peptídicos não estão totalmente baseados na capacidade de doar hidrogênio. No entanto, a reatividade do nitrogênio central do radical DPPH e os radicais livres (carbono

e/ou oxigênio) gerados por 3 outros catalisadores de oxidação lipídica podem variar fortemente. A solubilidade do radical também pode desempenhar um papel importante (Rival et al., 2001).

Uma vez que vários métodos são usados para testar a atividade antioxidante, os resultados são expressos em uma variedade de maneiras, o que dificulta a comparação. O ensaio de ABTS é baseado na geração de um azul/verde ABTS*+ que pode ser reduzido por antioxidantes, enquanto o ensaio de DPPH baseia-se na redução do DPPH roxo a 1,1-diphenyl-2-picryl hydrazine. O ensaio de ABTS é aplicável a ambos os sistemas antioxidantes hidrofílicos e lipofílicos; considerando que o método do DPPH utiliza um radical dissolvido em meios orgânicos e é, por conseguinte, aplicável a sistemas hidrofóbicos (Kim et al., 2002). A diferente estequiometria das reações entre os compostos alvos nos extratos e radicais, a estereosseletividade dos radicais, a solubilidade dos extratos nos distintos sistemas e os diferentes aminoácidos e sequências peptídicas podem explicar a capacidade dos hidrolisados de reagir e extinguir os radicais DPPH e ABTS (Zhu et al., 2008b). Em geral, a correlação entre os resultados obtidos para diferentes métodos utilizados na atividade antioxidante é difícil, o que indica que os hidrolisados têm uma grande variedade de peptídeos com diferentes modos de ação na inibição da oxidação lipídica. Neste contexto, a composição de aminoácidos e sua sequência, o tamanho, a quantidade, a configuração dos peptídeos (a exposição dos grupos de aminoácidos terminais) e a concentração de aminoácidos livres, parecem contribuir em conjunto para a atividade antioxidante (Zhu et al., 2008a; Phanturat et al., 2010), reforçando a

importância de avaliar essa propriedade por diferentes métodos (Gómez-Ruiz et al., 2008).

As caseínas têm domínios polares que contêm resíduos de serina fosforiladas, e suas sequências características, –SerP–SerP–SerP–Glu–Glu, são eficazes quelantes de cátions, que formam complexos com cálcio, ferro e zinco. Assim, caseínas fosforiladas, e/ou seus peptídeos na fase aquosa, podem ser uma fonte de quelantes naturais no controle da oxidação lipídica em emulsões alimentares, através de ligações e dividindo os metais de transição de distância a partir da gotícula de emulsão. Hidrolisados de caseína tem demonstrado serem mais eficazes inibidores da oxidação lipídica do que os caseinofosfopeptídeos enriquecidos com igual conteúdo de fósforo. As propriedades antioxidantes podem, portanto, não ser atribuídas unicamente aos quelantes de metais por resíduos de fosfoserina, mas também pela captura de radicais livres (Diaz et al., 2003).

A atividade quelante de Fe^{2+} dos compostos foi determinada porque quelantes de ferro podem inibir Lox- e os metais que catalisam a oxidação lipídica. Os metais são conhecidos por iniciarem os indesejáveis processos oxidativos em produtos alimentícios (Rival et al., 2001). A atividade quelante de metais ideal envolve compostos alifáticos, onde um anel de cinco membros é formado, o qual é composto por um íon e dois ligantes quelantes (Miller et al., 1990). A histidina é considerada um forte agente quelante de metais devido à presença de um anel imidazólico (Megias et al., 2008). A quelação de íons metálicos pode reduzir a quantidade de ferro livre disponível para participar da reação de Fenton e, finalmente, diminuir a formação de OH^{\cdot} (Halliwell &

Gutteridge, 1990). Os hidrolisados obtidos após a ação da protease kr6 por 1 h demonstraram 92,56 % de capacidade de quelação de Fe^{2+} , no entanto o controle (T_0) mostrou 84,43 % de habilidade de quelar o Fe^{2+} , havendo uma ligeira diminuição na atividade quelante para períodos de hidrólise maiores (Tabela 1).

Resíduos de fosfoserina contêm um domínio polar e aniônico que é favorável, em altas concentrações, para seqüestrar íons de metais catiônicos, tal como descrito para os caseinofosfopeptídeos (Kitts, 2003; Pihlanto, 2006). Hidrolisados de caseinato ovino obtidos com a protease P7 mostraram 83,3 % de capacidade de quelação de Fe^{2+} para 0,5 h, quando comparado ao controle dos hidrolisados (0 h; 76%) (Corrêa et al., 2011). Pele do peixe abadejo do Alaska foi hidrolisada com tripsina gerando peptídeos quelantes de ferro (Guo et al., 2013). Dong et al. (2008) observaram que hidrolisados de carpa prateada, produzidos por diferentes enzimas, tinham atividade quelante de ferro atingindo 93 % a 5 mg mL^{-1} , dependendo do tipo de enzima e tempo de hidrólise. O caseinato de leite ovino tem sido avaliado como um possível doador de elétrons e quelante de metais, e, através de sua proteólise utilizando uma enzima de origem microbiana, essas propriedades foram melhoradas. No entanto, o tempo de hidrólise afetou a bioatividade do poder redutor e a capacidade quelante de Fe^{2+} do produto (Corrêa et al., 2011).

A capacidade dos peptídeos em atuar como agente redutor, através da doação de elétrons para formar produtos mais estáveis, foi determinada através do método do poder redutor. Esse método mede a capacidade dos peptídeos para reduzir o complexo Fe^{3+} -Ferricianida a forma ferrosa (Fe^{2+})

(Bougatef et al., 2009). O poder redutor dos hidrolisados de caseinato ovino obtiveram um pico de atividade entre 1 e 2 h, decrescendo depois disso (Tabela 1). Em estudos com caseinato ovino, a hidrólise originou um aumento de 80 % no poder redutor, em comparação ao caseinato não-hidrolisado (Corrêa et al., 2011). Em outro estudo, com extratos solúveis em água de queijo de ovelha, a principal variação do poder redutor foi de 0,2 - 0,3 unidades de absorvância a 700 nm, o que sugere que eles sejam fontes de prótons e elétrons para manter o potencial redox, em uma concentração de 15 mg mL⁻¹ (Meira et al., 2012). Por outro lado, em um estudo com hidrolisados de proteínas de ervilha e frações, exibiram, ambas, fraco poder redutor (Pownall et al., 2010). A capacidade redutora apresentada por diferentes hidrolisados indica que estes podem atuar como doadores de elétrons, reduzindo os intermediários oxidados no processo de peroxidação lipídica em alimentos (Sarmadi & Ismail, 2010).

A captura dos radicais livres pode ser avaliada através da análise do TAR e TRAP *in vitro*. Embora normalmente utilizado em estudos relacionados com a atividade antioxidante em sistemas e fluídos biológicos, e também em extratos de plantas (Ferreira et al., 2009; Graham et al., 2013; Siraichi et al., 2013), ensaios a base de quimioluminescência não são geralmente utilizados para avaliar o potencial antioxidante dos hidrolisados de proteínas. O TRAP é um método preciso e sua principal vantagem é que ele se aplica a anti-radicaais livres com diferentes comportamentos cinéticos. Em outras palavras, o método do TRAP se aplica igualmente bem para os antioxidantes que apresentam fases *lag* distintas e/ou não apresentam fase *lag*, podendo ser, dessa forma,

utilizado para qualquer composto antioxidante (ou uma mistura complexa), independente do perfil da cinética de emissão do composto (Dresch et al., 2009). Os resultados de TRAP dos hidrolisados do caseinato ovino podem ser visualizado na Figura 1.

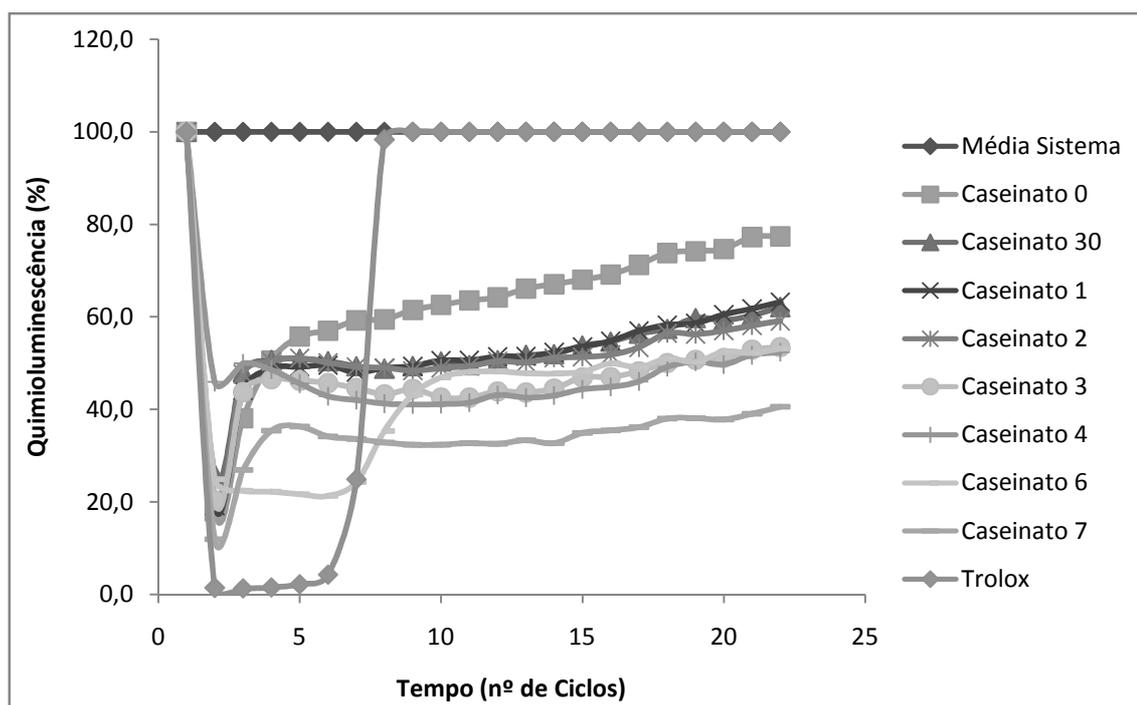


Figura 1. Perfil do TRAP de hidrolisados de caseinato ovino. A quimioluminescência em % foi medida após a adição de 10 μL de Trolox (concentração final de 200 nM) e os hidrolisados (concentração final de 2,5 mg mL^{-1}) ao tampão de glicina (0,1 M, pH 8,6) contendo luminol (4 mM) e AAPH (10 mM) a 21 °C. Cada ciclo corresponde a 6 min.

Os resultados de TRAP foram expressos pela área sobre a curva (AUC) (Figura 2). A perda na quimioluminescência pode ser avaliada através da medição da AUC. Quando a medida do decaimento da luminescência é grande, o valor de AUC esperado é baixo, isto é, a perda súbita da quimioluminescência (TAR) e o valor de AUC são inversamente proporcionais

(Dresch et al., 2009). O menor valor da AUC representa maior atividade antioxidante do hidrolisado.

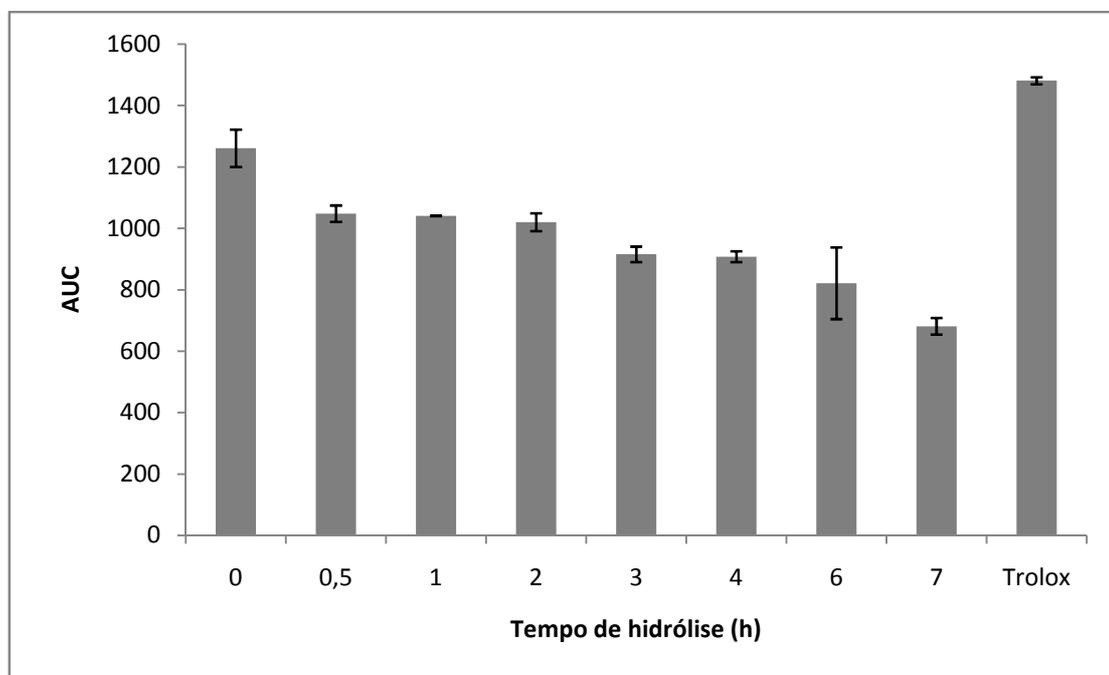


Figura 2. Potencial antioxidante reativo total (TRAP) dos hidrolisados de caseinato ovino em diferentes tempos de hidrólise.

Os hidrolisados de caseinato de 3, 4 e 6 h não apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$) entre si e a AUC. Todos os hidrolisados de caseinato apresentaram uma quantidade significativamente maior de antioxidantes do que o Trolox nas concentrações testadas. Quando comparados com os outros hidrolisados, o hidrolisado de caseinato de 6 e 7 h apresentaram maior capacidade de eliminação de radicais livres. A AUC tem a vantagem de integrar tanto a porcentagem de inibição e a duração da inibição do gerador de radicais livres (Dresch et al., 2009).

Os valores da reatividade antioxidante total (TAR) são calculados como razão entre a intensidade de luz na ausência de amostras (I_0)/

intensidade de luz logo após a adição das amostras dos diferentes tempos dos hidrolisados do caseinato ovino (I). Os resultados são expressos em porcentagem de inibição (Figura 3). Os resultados da análise de TAR também revelam que todos os diferentes tempos dos hidrolisados do caseinato ovino (Figura 3) proporcionam uma redução súbita na quimioluminescência de luminol.

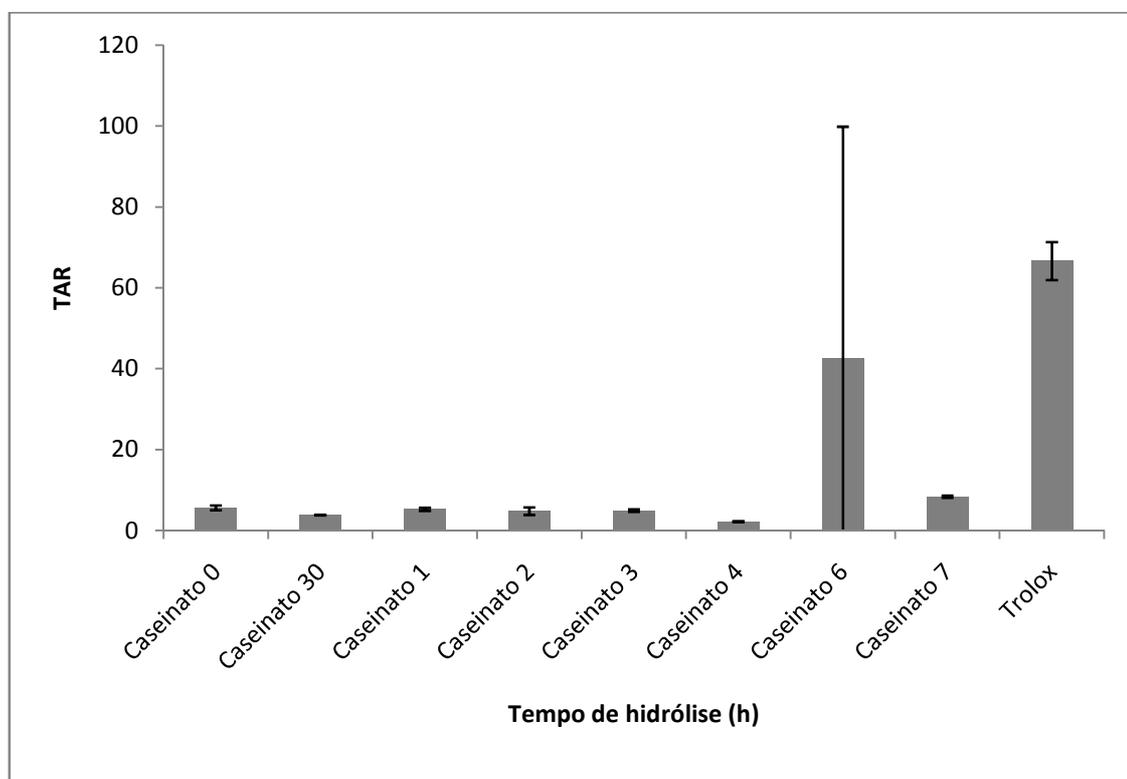


Figura 3. Valores da reatividade antioxidante total (TAR) dos hidrolisados do caseinato ovino. Os resultados são expressos em porcentagem de inibição.

Além da AUC, a TAR diferencia os hidrolisados de 6 e 7 h dos outros hidrolisados de caseinato, não apenas por um aumento da quantidade de antioxidantes, mas também por causa da sua melhor qualidade, por meio de

uma redução súbita da luminescência inicial do luminol, quando comparados com os outros hidrolisados do caseinato.

A enzima conversora de angiotensina I (ECA, peptidil dipeptideo hidrolase) é uma ectoenzima multifuncional que está localizada em diferentes tecidos e desempenha um papel importante na regulação da pressão arterial. Portanto, a inibição da ECA resulta principalmente no efeito hipotensor, mas também pode influenciar diferentes sistemas regulatórios envolvidos na defesa imune e na atividade do sistema nervoso (Meisel, 1993; Fitzgerald et al., 2004; Haque & Chand, 2008).

As propriedades anti-hipertensivas dos hidrolisados foram determinadas *in vitro* pela inibição da ECA. As atividades inibidoras da ECA dos hidrolisados de caseinato ovino aumentaram depois de 1 h com a protease kr6, atingindo uma atividade máxima em 6 h e diminuindo depois (Figura 4). A inibição da ECA a partir de hidrolisados de leite de cabra com subtilisina e tripsina, individualmente e em combinação, e fracionados por cromatografia de exclusão molecular, apresentou maior atividade em uma fração de caseína hidrolisada pela combinação de enzimas (Espejo-Carpio et al., 2013). Segundo Corrêa et al. (2011), hidrolisados de caseinato ovino com uma protease bacteriana P7 mostraram uma inibição de 94 % da atividade da ECA em hidrolisados de 2 h, e em 4 h os hidrolisados demonstraram maior atividade inibitória quando comparados ao caseinato ovino não hidrolisado. Pihlanto-Leppälä et al. (1998) relataram uma atividade inibidora da ECA em peptídeos derivados da caseína e das proteínas do soro, enquanto fermentados com bactérias lácticas e hidrolisados com enzimas digestivas; as taxas de inibição da

ECA variaram entre 35 e 61 % para os hidrolisados de proteínas do soro e 86 % para os hidrolisados de caseína. A atividade inibidora da ECA foi testada em leite bovino e de camelo fermentado com *Lactobacillus rhamnosus* PTCC 1637 por 21 dias em armazenamento refrigerado; estes demonstraram uma maior atividade inibidora da ECA a partir do leite fermentado de camelo do que para o bovino (Moslehishad et al., 2013). Caseinatos de sódio a partir de leite bovino, ovino, caprino, de búfala e humano, hidrolisados durante 48 h com uma protease parcialmente purificada de *Lactobacillus helveticus* PR4, mostraram atividade inibitória da ECA de 2 – 43 % (Minervini et al., 2003). Ueno et al. (2004) purificaram e caracterizaram uma endopeptidase de *L. helveticus* CM4 e demonstraram que essa peptidase podia gerar peptídeos com atividade anti-hipertensiva usando pró-peptídeos sintéticos como substrato.

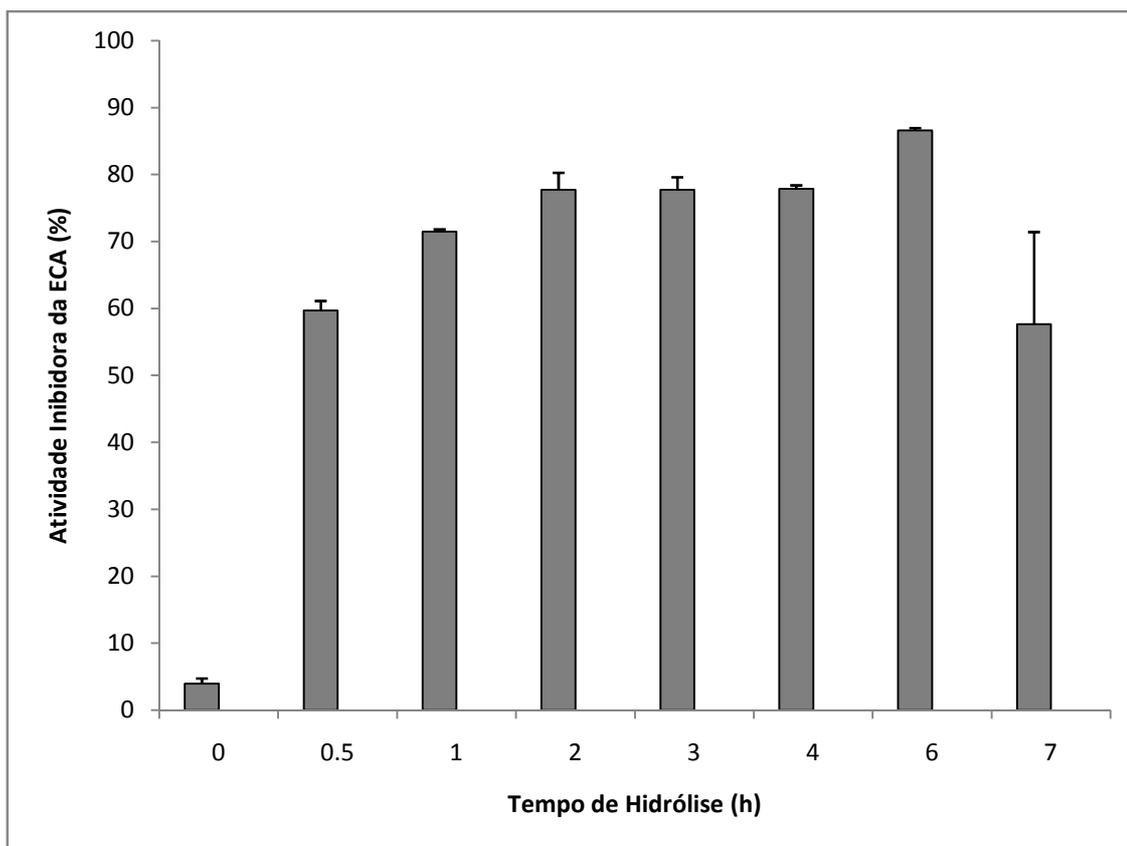


Figura 4. Atividade inibidora da ACE em hidrolisados de caseinato ovino obtidos com a protease kr6. Os valores são média entre três determinações independentes.

A hidrofobicidade é desejável na porção C-terminal dos peptídeos, desde que os inibidores da ECA apresentem, geralmente, aminoácidos hidrofóbicos nas últimas três posições do C-terminal. Além disso, tem sido sugerido que os aminoácidos positivamente carregados (por exemplo, aminoácidos básicos, como os liberados pela tripsina) no C-terminal contribuem para a atividade inibitória (Li et al., 2004; Pripp et al., 2004; Espejo-Carpio et al., 2013). Uma α -caseína de leite bovino, hidrolisada com uma protease microbiana, demonstrou uma capacidade inibitória da ECA de aproximadamente 60 % (Srinivas & Prakash, 2010). Embora a relação

estrutura/atividade para os peptídeos inibidores da ECA derivados de proteínas do leite não seja bem definida, há indícios de que a ligação do peptídeo à ECA é influenciada pela sequência de tripeptídeos terminal do substrato ou de inibidores competitivos, preferindo resíduos de peptídeos hidrofóbicos (cadeias laterais aromáticas ou ramificadas) em cada uma das três posições do C-terminal (Haque & Chand, 2008).

As propriedades antimicrobianas do leite são reconhecidas há muitos anos, como em 1930, quando foi relatado que o leite possuía inibidores ativos que retardavam o crescimento de bactérias estreptocócicas (Jones & Simms, 1930). A habilidade dos hidrolisados de caseinato ovino de inibir o crescimento de várias bactérias e fungos foi investigada. Os hidrolisados de caseinato ovino de 30 min, 1 h e 2 h, obtidos com a protease parcialmente purificada de *Chryseobacterium* sp. kr6, mostraram atividade antibacteriana contra bactérias Gram-positivas, como *Corynebacterium fimi*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, bem como contra bactérias Gram-negativas, como *Salmonella* Enteritidis, *Salmonella* Typhimurium, *Yersinia enterocolitica* e *Escherichia coli* (Tabela 2).

Tabela 2. Atividade antimicrobiana dos hidrolisados de caseinato ovino

Microrganismo Indicador	Tempo zero (zona de inibição em mm) ^a	30 min (zona de inibição em mm) ^a	1 hora (zona de inibição em mm) ^a	2 horas (zona de inibição em mm) ^a
<u>Bactérias Gram-positivas</u>				
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 9634	-	- ^b	-	-
<i>Corynebacterium fimi</i> NCTC 7547	-	7,5	9,0	10,0
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 1901	-	-	-	9,0
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 15131	-	-	-	9,5
<u>Bactérias Gram-negativas</u>				
<i>Salmonella</i> Enteritidis ATCC 13076	-	-	7,0	9,0
<i>Salmonella</i> Typhimurium ATCC 14078	-	8,0	9,0	9,5
<i>Yersinia enterocolitica</i>	-	7,5	8,0	8,0
<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	8,0	9,0	10,0	9,0
<u>Fungos filamentosos</u>				
<i>Penicillium expansum</i>	-	-	-	-
<i>Aspergillus fumigatus</i>	-	-	-	-
<i>Fusarium oxysporum</i> ssp. <i>Lycopersici</i>	-	-	-	-

^aOs valores são média de três determinações independentes.

^b Sem inibição.

As bactérias inibidas, particularmente os diferentes sorotipos de *Salmonella*, são importantes patógenos de origem alimentar, sendo responsáveis por milhões de casos de doenças entéricas, milhares de internações e morte no mundo todos os anos (Dunkley et al., 2009; Callaway et al., 2010; Hur et al., 2012). Hidrolisados obtidos a partir da ação da pepsina em α_{s1} -caseína de leite bovino foram efetivos contra bactérias Gram-positivas (*Bacillus subtilis* e *Listeria innocua*) e Gram-negativas (*Salmonella* Typhimurium, *Escherichia coli*, *Salmonella* Enteritidis e *Citrobacter freundii*) (McCann et al., 2006). Um peptídeo antimicrobiano foi obtido a partir da hidrólise (3 h) de caseinato de leite ovino com uma protease microbiana de *Bacillus* sp. P7 e mostrou inibir o crescimento de *Bacillus cereus*, *Corynebacterium fimi*, *Aspergillus fumigatus* e *Penicillium expansum* (Côrrea et al., 2011). A α_{s2} -caseína ovina, hidrolisada por 30 min com pepsina, demonstrou atividade inibitória contra várias bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (Lópes-Expósito et al., 2006). Peptídeos antimicrobianos, derivados da caseína, resultados da fermentação por *Lactobacillus acidophilus* DPC6026, demonstraram atividade inibitória contra cepas bacterianas patogênicas, como *E. coli* e *Enterobacter sakazakii* (Hayes et al., 2006). Hidrolisados de caseína obtidos com uma nova protease, derivada do látex de *Jacaratia corumbensis*, demonstraram apresentar peptídeos antimicrobianos; os hidrolisados obtidos em 2 h mostraram atividade antimicrobiana contra os microrganismos *Enterococcus faecalis*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* e *Staphylococcus aureus* (Arruda et al., 2012).

Peptídeos antimicrobianos, derivados de proteínas do leite, geralmente são anfifílicos e possuem uma carga líquida positiva, que são reconhecidos como os principais motivos estruturais que determinam a interação com as membranas bacterianas, que é aceito como um alvo comum em seu mecanismo de ação. No entanto, foi demonstrado que alguns peptídeos antimicrobianos derivados do leite podem atingir alvos intracelulares, e outros peptídeos, que não possuem uma carga líquida positiva, podem exibir atividade antibacteriana (Lópes-Expósito & Recio, 2006).

Peptídeos antimicrobianos derivados de caseína possuem muitos mecanismos, além daqueles reconhecidos classicamente, para proteger o hospedeiro contra microrganismos invasores, e geralmente apresentam um amplo espectro de atividade contra microrganismo deteriorantes e/ou de importância clínica, além de apresentarem vantagens ao serem capazes de matar células-alvo rapidamente (Phelan et al., 2009). Dos resultados obtidos, tanto as bactérias Gram-positivas, quanto as Gram-negativas, foram inibidas e não foi demonstrada nenhuma atividade antifúngica contra os fungos testados (Tabela 2).

Peptídeos bioativos derivados do leite desempenham um papel vital na saúde e na nutrição humana. O interesse em peptídeos bioativos derivados de proteínas do leite está aumentando porque as proteínas do leite estão disponíveis em grandes quantidades, em alto grau de pureza e a baixos preços, o que, sob um aspecto tecnológico, as torna atraentes na busca por peptídeos bioativos. As futuras aplicações dos peptídeos bioativos parecem promissoras no campo da indústria de alimentos, como conservante de

alimentos, nutracêuticos, e também como uma droga natural na indústria farmacêutica (Haque & Chand, 2008).

CONCLUSÕES

Hidrolisados de caseinato ovino apresentaram atividade antioxidante, atividade anti-hipertensiva e atividade antimicrobiana, e foram produzidos através da hidrólise com uma protease antimicrobiana parcialmente purificada. As bioatividades apresentadas pelos hidrolisados proteicos podem ser resultado do efeito sinérgico da mistura de diferentes peptídeos. Outros estudos estão em andamento para identificar os peptídeos responsáveis pelo conjunto de bioatividades observados nos hidrolisados de caseinato ovino, com o objetivo de elucidar as relações estrutura/atividade dos peptídeos presentes.

3.3 RESULTADOS III

Avaliação de diferentes atividades biológicas de hidrolisados de soro de leite ovino com uma protease microbiana

INTRODUÇÃO

O soro de leite é um dos substratos mais populares para a extração de proteínas e sacarídeos, pois é produzido em grande quantidade durante a fabricação de queijos e possui uma elevada proporção de massa por massa de produto (4,3 - 11,3), o chamado índice de resíduos específicos (Russ & Meyer-Pittroff, 2004). O soro de leite também é considerado o poluente mais importante em águas residuais da indústria de laticínios, não somente pela elevada carga orgânica, mas também pelo grande volume gerado. A quantidade de soro de leite produzida é relacionada à produtividade do queijo (Carvalho et al., 2013).

Do ponto de vista da valorização, o soro de leite tem alto valor nutricional agregado. Além disso, alguns autores afirmam que as proteínas do soro de leite também podem ser usadas para fins terapêuticos, tais como antioxidantes e anti-hipertensivas, porque elas liberam, através da hidrólise, peptídeos bioativos, que podem desencadear efeitos fisiológicos no organismo humano (Macedo, 2010). Madureira et al. (2010) descreveram alguns desses efeitos, tais como: sobre o sistema nervoso, sobre o sistema cardiovascular, através das suas atividades antitrombóticas e anti-hipertensivas, sobre o sistema imunitário, através de suas atividades antimicrobianas e antivirais, e no

sistema digestivo, através da sua aumentada digestibilidade e efeitos hipocolesterolêmicos.

As proteínas do leite sempre atraíram o interesse científico, devido a sua importância primária em nutrição e fisiologia humana (Michelidou, 2008). As principais proteínas do soro de leite são duas pequenas proteínas globulares, denominadas β -lactoglobulina e α -lactoalbumina, para as quais variantes genéticas são conhecidas. Outros componentes proteicos do soro de leite também são as imunoglobulinas (Igs), glicomacropéptídeos, albumina do soro, lactoferrina, proteose peptonas e numerosas enzimas (Korhonen et al., 2009). As proteínas do soro têm proporcionalmente mais aminoácidos sulfurados (cisteína, metionina) do que as caseínas, o que contribui para o coeficiente de eficácia proteica mais elevada das proteínas do soro (3,2) do que das caseínas (2,6) (Walzen et al., 2002).

As proteínas do soro de leite bovino foram extensivamente estudadas como fonte de peptídeos bioativos, e nos últimos anos proteínas do soro de leite de ovelhas e cabras tem atraído interesse como fonte de peptídeos bioativos encriptados (Hernández-Ledesma et al., 2002; Bernacka, 2011). As proteínas do soro de leite ovino têm uma taxa total da relação nitrogênio/matéria seca muito mais elevada do que a existente no soro de leite bovino, duplicando o teor de proteínas solúveis (Assenat, 1985).

A demanda por alimentos funcionais e nutracêuticos tem aumentado significativamente em resposta à crescente conscientização sobre a influência da dieta na saúde. Os potenciais terapêuticos de alguns componentes dos alimentos têm atraído a atenção dos médicos, dos fabricantes de alimentos, de

pesquisadores e consumidores (Agyei & Danquah, 2012). As proteínas do soro são conhecidas como proteínas de alta qualidade nutricional e são usadas atualmente para preparar uma série de produtos comerciais, alegando efeitos na saúde dos consumidores (Tulipano et al., 2012).

A investigação de enzimas proteolíticas alternativas de diferentes fontes é uma abordagem interessante na obtenção de hidrolisados proteicos e peptídeos bioativos com propriedades desejadas. Além disso, a hidrólise enzimática pode aumentar a aplicabilidade de proteínas do soro de leite em produtos alimentares, uma vez que eles podem atuar para melhorar as propriedades funcionais destas proteínas. A bactéria *Chryseobacterium* sp. kr6 produz altos níveis de proteases extracelulares com potencial biotecnológico (Riffel et al., 2007, 2011; Silveira et al., 2010). Neste contexto, este estudo teve como objetivo avaliar diferentes capacidades bioativas dos hidrolisados de soro de leite de ovelha, obtidos através do tratamento com uma preparação de proteases de *Chryseobacterium* sp. kr6.

MATERIAIS E MÉTODOS

Microrganismo

Nesse estudo foi utilizada a bactéria *Chryseobacterium* sp. kr6, isolada a partir do efluente de uma indústria de processamento de aves (Riffel et al., 2003). Culturas estoque deste microrganismo são mantidas a -20 °C em caldo cérebro-coração (BHI) contendo glicerol (20 %, v v⁻¹). A reativação do microrganismo foi realizada em caldo cérebro-coração (BHI), incubadas a 30

°C por 24 h. Culturas reativadas foram mantidas a 4 °C em placas de ágar farinha de penas, com repiques periódicos em placas de ágar farinha de penas.

Produção da Enzima

A produção e purificação parcial da protease de *Chryseobacterium* sp. kr6 e a determinação de sua atividade enzimática foram desenvolvidas essencialmente conforme descrito no capítulo 3.2.

Hidrólise Enzimática do Soro de Leite Ovino

As proteínas hidrolisadas foram preparadas a partir do soro liofilizado obtido a partir de leite ovino da raça Lacaune. Para a hidrólise do soro de leite ovino (10 g L⁻¹), este foi dissolvido em tampão Tris-HCl (50 mmol L⁻¹, pH 8,0). Esta solução foi pré-aquecida (45 °C por 15 min), e a hidrólise foi iniciada pela adição da enzima (2 % v v⁻¹), seguindo-se a incubação a 45 °C em um banho de água com agitação. Amostras foram sendo retiradas em intervalos definidos (0, 0,5, 1, 2, 3, 4 e 6 h), e a reação de hidrólise foi finalizada pelo aquecimento a 100 °C por 15 min. Após o resfriamento, os hidrolisados foram centrifugados (10.000 × g por 15 min) para remover materiais insolúveis, e os sobrenadantes foram liofilizados e armazenados a -18 °C para análises posteriores.

Atividades Antioxidantes

A atividade antioxidante foi avaliada pelos métodos de DPPH, ABTS, poder redutor, atividade quelante de Fe²⁺ e TRAP, essencialmente como descrito no capítulo 3.1 e 3.2.

Determinação da Atividade Anti-hipertensiva

A atividade anti-hipertensiva foi avaliada segundo Cushman &

Cheung (1971), essencialmente conforme descrito no capítulo 3.1.

Determinação das Atividades Antimicrobianas

As atividades antibacteriana e antifúngica foram determinadas essencialmente como descrito no capítulo 3.2.

Análise Estatística

Os dados experimentais foram expressos como média \pm desvio padrão e avaliados pelo método de Tukey, ao nível de significância de 0,05.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A atividade antioxidante de diferentes peptídeos e proteínas hidrolisadas, geralmente é resultado de diferentes mecanismos, incluindo o sequestro de radicais livres, inibição da peroxidação lipídica, quelamento de íons metálicos, ou uma combinação dos mesmos (Rival et al., 2001; Sarmadi & Ismail, 2010). Portanto, a atividade antioxidante deve ser avaliada através de diferentes métodos. Nesse estudo, foram avaliadas as capturas dos radicais ABTS e DPPH, o potencial antioxidante reativo total (TRAP), o poder redutor e a atividade quelante de ferro dos hidrolisados. Os efeitos da hidrólise sobre a atividade antioxidante avaliados são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Atividades antioxidantes dos hidrolisados de soro de leite ovino^a

Tempo de hidrólise (h)	Sequestro do radical ABTS (%)	Sequestro do radical DPPH (%)	Capacidade quelante de ferro (%)	Poder redutor (absorbância a 700 nm)
0	3,97 ± 0,19 ^a	37,14 ± 0,71 ^a	58,95 ± 0,01 ^a	0,262 ± 0,06 ^a
0.5	4,46 ± 0,38 ^a	37,13 ± 0,22 ^a	62,17 ± 0,02 ^a	0,447 ± 0,15 ^b
1	14,17 ± 0,41 ^b	43,10 ± 0,81 ^b	80,93 ± 0,02^b	1,032 ± 0,48^c
2	15,84 ± 0,17 ^b	45,69 ± 0,04^c	80,72 ± 0,04 ^b	0,686 ± 0,01 ^d
3	20,21 ± 0,23^c	35,27 ± 0,72 ^d	71,69 ± 0,02 ^c	0,784 ± 0,11 ^d
4	19,78 ± 0,13 ^c	29,82 ± 0,58 ^e	73,95 ± 0,12 ^c	0,846 ± 0,28 ^d
6	20,10 ± 0,01 ^c	20,91 ± 0,61 ^f	66,53 ± 0,02 ^d	0,966 ± 0,10 ^d

^aOs valores são média de três determinações independentes.

A atividade antioxidante dos hidrolisados, avaliada pelo método de ABTS, aumentou com o tempo, sendo que seus valores máximos foram alcançados após 3 h de hidrólise, com um aumento de 5,09 vezes em relação ao soro de leite não hidrolisado, indicando que os peptídeos liberados poderiam agir diretamente como sequestrantes de radicais livres no meio aquoso (Rossini et al., 2009). Após esse período de tempo, os valores permaneceram estáveis (Tabela 1). O aumento da capacidade antioxidante avaliado pelo método do ABTS, em hidrolisados de proteínas do soro de leite bovino, com diferentes proteases comerciais (Alcalase, Flavourzyme, Neutrase e Protamax) também foi demonstrado por Dryáková et al. (2010). Concentrados de proteína do soro de leite bovino enriquecidos com β -lactoglobulina, hidrolisados com Corolase PP[®] e termolisina, demonstraram aumento de sua atividade antioxidante quando comparados às contrapartes não-hidrolisadas

(Contreras et al., 2011). Com relação ao caseinato ovino, hidrolisados obtidos com pepsina, tripsina e quimotripsina (Gómez-Ruiz et al., 2008), e com uma protease microbiana obtida a partir de um preparado de *Bacillus* sp. P45 (Daroit et al., 2012), também apresentaram um aumento na atividade antioxidante. O aumento da atividade antioxidante de hidrolisados de proteínas do soro de leite bovino com proteases comerciais (pepsina, tripsina, quimotripsina, termolisina e Corolase PP[®]) também foi demonstrado por Hernandez-Ledesma et al. (2005a).

Já foi demonstrado em sistemas modelo que as propriedades antioxidantes de proteínas do soro do leite podem ser aumentadas através de seu fracionamento ou hidrólise com certas enzimas, sendo que alguns peptídeos e frações possuem maior atividade antioxidante do que outros (Pihlanto, 2006).

O DPPH é um radical orgânico relativamente estável, que se caracteriza por uma cor púrpura e uma absorção máxima a 515-520 nm. Quando o DPPH encontra uma substância doadora de prótons, os radicais são eliminados e a absorbância é reduzida. Por essa razão o DPPH é amplamente utilizado como substrato para avaliar a eficácia de antioxidantes de peptídeos e hidrolisados proteicos. Os resultados variaram muito ao longo do tempo de hidrólise (Tabela 1), e uma relação entre o tempo de hidrólise a atividade de DPPH não pode ser estabelecida; no entanto, a maior atividade de sequestro do radical DPPH foi evidenciada após 2 h de hidrólise. A proteólise de proteínas alimentares é geralmente relatada na melhora da atividade de captura do radical DPPH de hidrolisados (Phelan et al., 2009). Hidrolisados de

soro de leite bovino foram preparados com uma enzima microbiana derivada de *Aspergillus oryzae* LBA 01 e com duas enzimas comerciais (Alcalase e Flavourzyme) e a atividade antioxidante foi avaliada, sendo que o mais alto nível de captura do radical DPPH (73,62 %) foi observado em hidrolisados com a protease microbiana (De Castro & Sato, 2013). A partir do padrão observado para a atividade de captura do radical DPPH, tanto as proteínas hidrolisadas como não hidrolisadas, demonstraram conter algumas substâncias que podem atuar como doadoras de elétrons, podendo reagir com radicais livres, convertendo-os em moléculas mais estáveis.

Hernández-Ledesma et al. (2005b) investigaram a atividade antioxidante de hidrolisados de proteínas bovinas do soro, α -lactoalbumina e β -lactoglobulina, por diferentes proteases comerciais. O mesmo grupo de pesquisa demonstrou em outro trabalho que peptídeos sintéticos derivados de β -lactoglobulina podem tanto aumentar como limitar a atividade antioxidante ao interagir com ácido ascórbico (dependendo da estrutura do peptídeo), devendo este fato ser considerado quando do desenvolvimento de novos ingredientes alimentares contendo peptídeos de β -lactoglobulina (Hernández-Ledesma et al., 2007).

O ferro pode atuar como um catalisador para a geração de radicais hidroxilas, através da reação de Fenton, o que pode contribuir para doenças relacionadas ao estresse oxidativo (Pownall et al., 2010). Além disso, os metais de transição podem estimular a peroxidação lipídica nos alimentos (Zhang et al., 2010). Conseqüentemente, a quelação de íons metálicos pode contribuir para a atividade antioxidante de hidrolisados proteicos. A capacidade quelante

de Fe^{2+} dos hidrolisados de soro de leite ovino é apresentada na Tabela 1. Peng et al. (2010) relatam a capacidade de quelação de metais por hidrolisados obtidos com Alcalase, sendo que a quelação do Cu^{2+} aumentou durante as primeiras 3 h de hidrólise (56,4 %), tendo um ligeiro decréscimo depois de 8h (55,2 %), sendo inicialmente de 8,7 %. Em contraste, a capacidade quelante de Fe^{2+} , no tempo zero, era de 3 %, com um aumento em 8 h de hidrólise, chegando a 10 %. A atividade quelante de Fe^{2+} de hidrolisados de carne de peixe cioba de faixa amarela obtidos com Alcalase ou Flavourzyme aumentou com o aumento do grau de hidrólise, indicando que um maior grau de clivagem das ligações peptídicas rendeu hidrolisados proteicos com maior atividade quelante de metais (Klompong et al., 2007). Por outro lado, hidrolisados de proteína de carne de peixe cioba de faixa marrom, hidrolisadas com Alcalase ou Flavourzyme, mostraram diminuição na capacidade quelante de Fe^{2+} com o aumento do grau de hidrólise, sugerindo que as cadeias peptídicas curtas podem perder a habilidade de se complexar com o Fe^{2+} (Khantaphant et al., 2011). Pownall et al. (2010) estudaram a proteína isolada da ervilha e descobriram que ela tem uma alta capacidade quelante de ferro, em torno de 95 %. Também foi verificada a capacidade de reduzir Fe^{3+} de proteínas de gérmen de trigo tratadas com Alcalase (Zhu et al., 2006). A diminuição na capacidade quelante de Fe^{2+} , observada após 3 h de hidrólise (Tabela 1), pode indicar que os peptídeos responsáveis pela atividade observada foram ainda mais clivados, e o produto foi menos capaz de quelar o ferro. Nesse sentido, o fracionamento através de ultrafiltração de hidrolisados de proteína de soja, obtidos com proteases comerciais derivadas de

microrganismos, demonstrou que as frações de massa molecular elevadas (>10 kDa) tiveram maior atividade quelante de Fe^{2+} do que as frações de baixa massa molecular (< 10 kDa) (Zhang et al., 2010).

Para a capacidade quelante dos peptídeos são relevantes a composição e tamanho dos peptídeos, os resíduos N- e C- terminais dos aminoácidos, o número total de grupos carboxílicos e amino dos peptídeos (Hansen & Lindeberg, 1995). No entanto, o mecanismo de interação entre peptídeos e íons metálicos raramente são mencionados e não estão muito claros ainda (Guo et al., 2013). A atividade quelante de ferro foi bastante variável entre os diferentes extratos hidrossolúveis de queijos de ovelha produzidos no Uruguai e no Brasil, sendo mais elevada (50 %) para um tipo de queijo Pecorino (Meira et al., 2012).

O poder redutor dos hidrolisados de soro de leite ovino foi avaliado por um protocolo baseado na redução de Fe^{3+} do complexo ferricianeto à forma ferrosa (Fe^{2+}), o que envolve a transferência de elétrons, mudando a cor da solução do teste de amarela para uma cor verde ou azul. O poder redutor dos hidrolisados aumentou 3,94 vezes após 1 h de hidrólise, em comparação com o soro não hidrolisado. A capacidade de redução apresentada pelos hidrolisados indica que eles podem atuar como doadores de elétrons, reduzindo os intermediários oxidados nos processos de peroxidação lipídica em alimentos (Sarmadi & Ismail, 2010). As avaliações das atividades antioxidantes de proteína hidrolisada de bacalhau (*Gadus morhua*) fracionadas através de membranas de ultrafiltração, demonstraram um maior poder redutor, capacidade quelante de ferro e DPPH nas frações mais purificadas (< 3 kDa),

em comparação com o hidrolisado bruto e outras frações (Farvin et al., 2014). Proteína hidrolisada de peito de frango com papaína demonstrou alto poder redutor (0,5 a 2,37 mg mL⁻¹) e DPPH (EC50 a 1,28 mg mL⁻¹) (Sun et al., 2012). O poder redutor de hidrolisados de proteína do soro isolada obtidos com Alcalase demonstraram um aumento da atividade antioxidante com o aumento do tempo de hidrólise de até 5h, atingindo valores 3 a 6 vezes maiores que as proteínas do soro isoladas não hidrolisadas (Peng et al., 2009; Peng et al., 2010). Senphan & Benjakul (2013) avaliaram a atividade antioxidante de hidrolisados de pele de robalo, com diferentes graus de hidrólise, obtidos com um preparado precipitado com sulfato de amônio do hepatopâncreas de camarão branco e Alcalase comercial. Todos os diferentes métodos utilizados para avaliar a atividade antioxidante (DPPH, ABTS, FRAP e atividade quelante de ferro) demonstraram um alto poder antioxidante com um grau de hidrólise de 40 %. No entanto, a diminuição do poder redutor em hidrolisados de carne de peixe cioba de faixa amarela foi verificada com o aumento do grau de hidrólise com Alcalase (Klompong et al., 2007).

Os índices do potencial antioxidante reativo total (TRAP) e da reatividade antioxidante total (TAR) foram determinados utilizando um método baseado na extinção da quimioluminescência reforçada por luminol derivada da termólise de um composto azóico solúvel em água, AAPH, utilizado como uma fonte confiável e quantificável de radicais peróxil alquilo (Lissi et al., 1992; 1995). Este ensaio utilizado provou ser um método simples, sensível e reprodutível, que pode ser usado para determinar a capacidade antioxidante em misturas complexas (Desmarchelier et al., 1997). Por outro lado, o índice

TAR foi obtido a partir da diminuição inicial da luminescência associada com a incorporação do aditivo da amostra para o sistema AAPH por luminol, e indica a reatividade da amostra quando comparada ao Trolox (Lissi et al., 1992; 1995; Desmarchelier et al., 1997).

Na Figura 1 vemos o perfil da quimioluminescência obtida após a adição de 10 μL de Trolox (200 nM), utilizado como um padrão, e as amostras dos hidrolisados de soro de leite ovino em diferentes tempos (0, 0,5, 1, 2, 3, 4 e 6 h) na concentração de 2,5 mg mL^{-1} . Isto permitiu comparar os diferentes perfis pelo TRAP e foi possível observar a diminuição da quimioluminescência após a adição das amostras nas diferentes concentrações, que demonstraram ser qualitativamente diferentes da obtida quando é utilizado Trolox. Todas as amostras testadas foram ativas na redução da quimioluminescência reforçada pelo luminol, indicando a presença de compostos com propriedades de captura do peróxido. No entanto, as amostras apresentaram redução instantânea da quimioluminescência, mas nem todas demonstraram a manutenção desta atividade durante o período analisado (Figura 1).

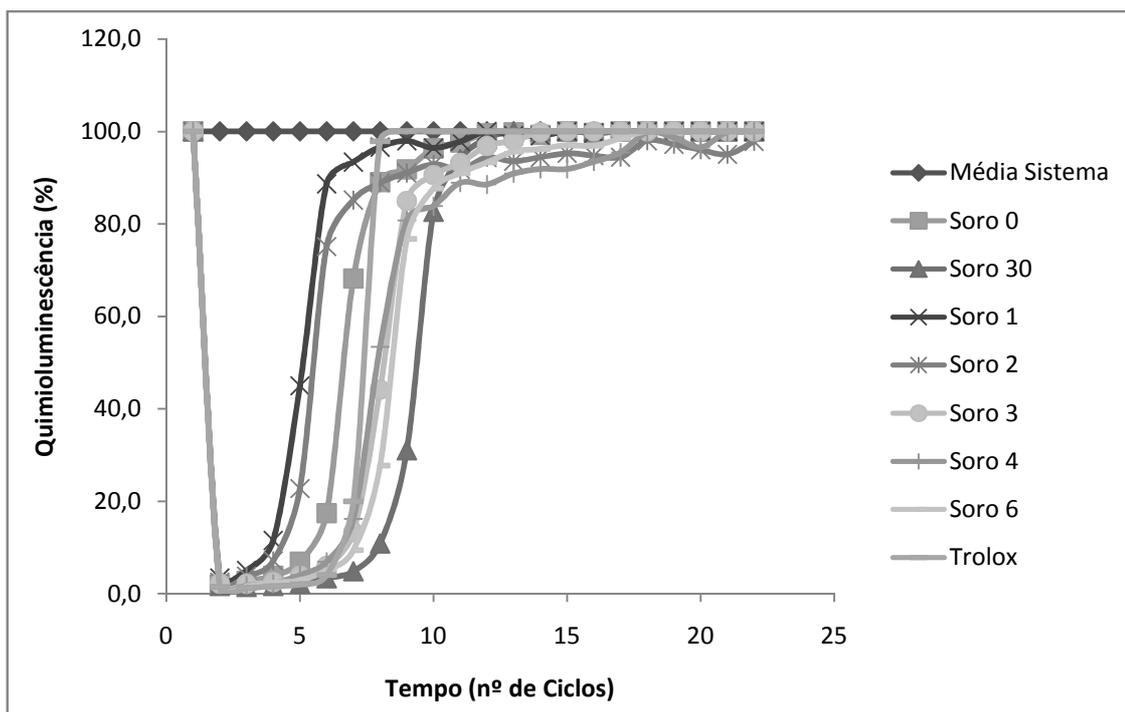


Figura 1. Perfil do TRAP dos diferentes tempos dos hidrolisados de soro de leite ovino. A quimioluminescência em % foi medida após a adição de 10 μL de Trolox (concentração final de 200 nM) e os hidrolisados (concentração final de 2,5 mg mL^{-1}) ao tampão de glicina (0,1 M, pH 8,6) contendo luminol (4 mM) e AAPH (10 mM) a 21 $^{\circ}\text{C}$. Cada ciclo corresponde a 6 minutos.

O TRAP é um método preciso e sua principal vantagem é que ele se aplica a anti-radicais livres com diferentes comportamentos cinéticos. Em outras palavras, o método do TRAP se aplica igualmente bem para os antioxidantes que apresentam fases *lag* distintas e/ou não apresentam fase *lag*, podendo ser, dessa forma, utilizado para qualquer composto antioxidante (ou uma mistura complexa), independente do perfil da cinética de emissão do composto (Dresch et al., 2009). Os resultados de TRAP são expressos pela área sobre a curva (AUC) (Figura 2).

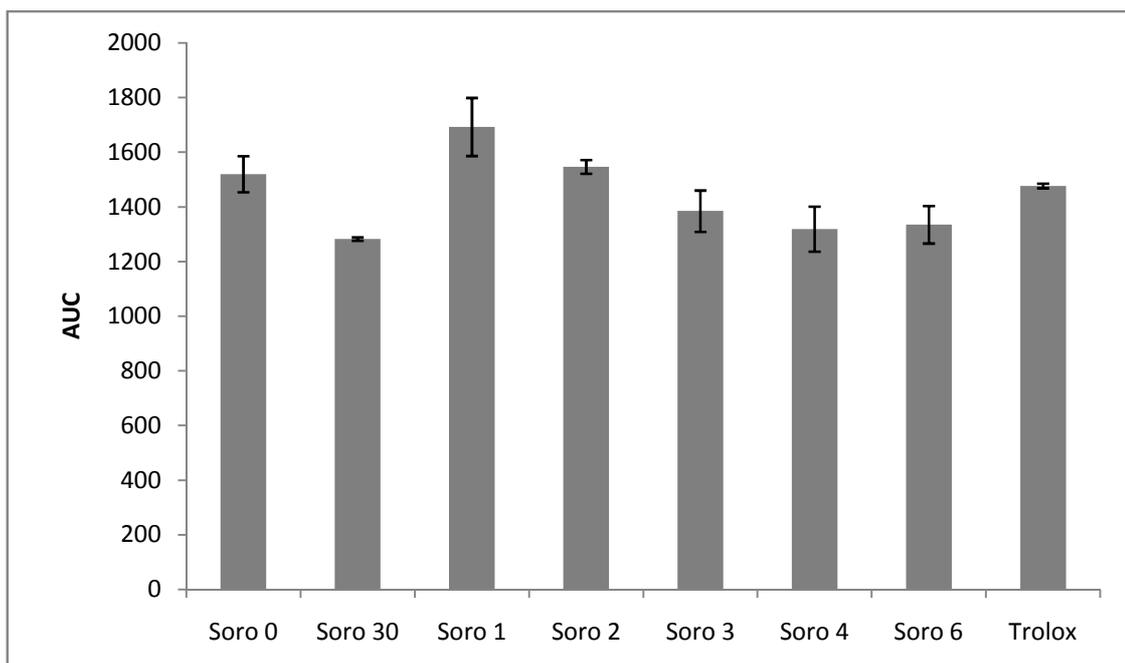


Figura 2. Potencial antioxidante reativo total (TRAP) dos hidrolisados de soro de leite ovino em diferentes tempos de hidrólise.

Os hidrolisados de soro de leite ovino de 30 min, 4 e 6 h ($2,5 \text{ mg mL}^{-1}$) não apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$) na AUC, sendo estes os tempos dos hidrolisados com maior capacidade de eliminação de radicais livres (Figura 2).

Os resultados dos índices de TAR indicaram que todas as amostras testadas demonstraram atividade antioxidante, sendo que as amostras dos hidrolisados de 30 min, 4 e 6 h ($2,5 \text{ mg mL}^{-1}$) apresentaram os maiores índices (Figura 3).

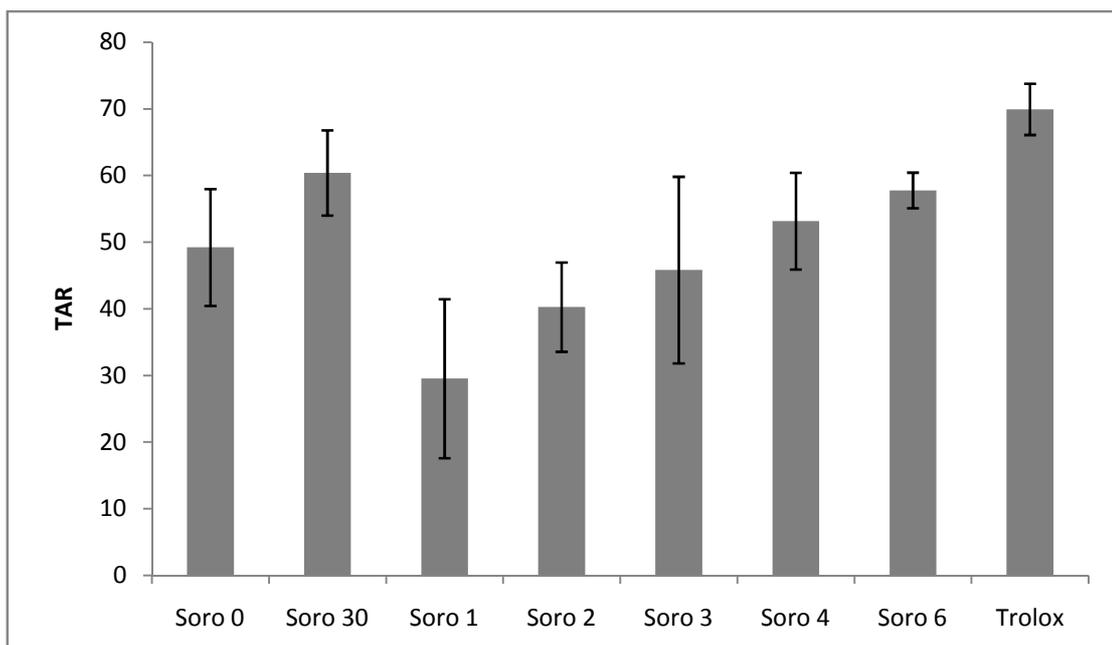


Figura 3. Valores da reatividade antioxidante total (TAR) dos diferentes tempos dos hidrolisados do soro de leite ovino. Os resultados são expressos em porcentagem de inibição.

Os valores da reatividade antioxidante total (TAR) são calculados como razão entre a intensidade de luz na ausência de amostras (I_0) / intensidade de luz logo após a adição das amostras dos diferentes tempos dos hidrolisados do soro de leite ovino (I). Os resultados são expressos em porcentagem de inibição (Figura 3).

A atividade antioxidante demonstrada por hidrolisados de proteínas do soro de leite sugerem que, além de modificar as propriedades fisiológicas dos produtos alimentares, estes hidrolisados proteicos têm potencial para melhorar a estabilidade do produto, impedindo a deterioração oxidativa (Pihlanto, 2006).

Em geral, a correlação entre os resultados obtidos entre diferentes métodos utilizados para avaliar a atividade antioxidante é difícil, o que indica que os hidrolisados de soro de leite ovino têm uma grande variedade de

peptídeos com diferentes modos de ação para inibir a oxidação dos lipídeos. Neste contexto, a composição e a sequência de aminoácidos, o tamanho, a quantidade e a configuração dos peptídeos (a exposição dos grupos amino terminais) e a composição de aminoácidos livres parece contribuir em conjunto para a atividade antioxidante (Zhu et al., 2008a,b; Phanturat et al, 2010), reforçando a importância de avaliar essa propriedade por diferentes métodos (Gómez-Ruiz et al., 2008).

Proteínas que não possuem atividade antibacteriana na sua conformação nativa podem ser “ativadas”, adquirindo uma conformação diferente, através da hidrólise das proteínas. Além disso, outras proteínas do leite com atividade antibacteriana podem atuar como precursoras de peptídeos que apresentam propriedades novas e/ou um efeito antibacteriano mais forte (Lópes-Expósito & Recio, 2006).

Nesse trabalho não foi verificada atividade antibacteriana pelos hidrolisados de soro de leite ovino para a maioria dos microrganismos testados. Somente o crescimento da bactéria *Corynebacterium fimi* foi inibido nos tempos de 1 e 2 horas de hidrólise, não apresentando atividade antimicrobiana e antifúngica para nenhum dos outros microrganismos indicadores testados nas concentrações utilizadas.

Entre os peptídeos bioativos derivados de proteínas do leite, aqueles com efeitos de redução da pressão arterial estão recebendo atenção especial devido à prevalência e a importância da hipertensão na população ocidental. A hipertensão arterial é o principal fator de risco controlável associada à doença cardiovascular. Assim, o interesse científico foi conduzido para a detecção de

sequências de peptídeos derivadas de alimentos que podem ser explorados como agentes hipotensores naturais, evitando, assim, efeitos adversos secundários que são associados às drogas sintéticas inibidoras da enzima de conversão da angiotensina I (ECA), e diminuir significativamente o custo da saúde global (FitzGerald et al., 2004).

Propriedades anti-hipertensivas das amostras de hidrolisados de soro de leite ovino foram estimadas *in vitro* através da inibição da ECA. A enzima conversora de angiotensina, uma dipeptidil carboxipeptidase, catalisa a conversão da angiotensina I (um decapeptídeo) em angiotensina II (um octapeptídeo) e desempenha um papel fisiológico importante na regulação da pressão sanguínea e o equilíbrio de fluídos e sal no organismo de mamíferos (Hartmann & Meisel, 2007). Os peptídeos inibidores da ECA são geralmente peptídeos de cadeia curta, muitas vezes resíduos de aminoácidos apolares, como prolina (Fuglsang et al., 2003). Nesse estudo, a capacidade de inibir a ECA mostrou uma maior atividade após 2 horas do tempo de hidrólise (49,22 %), diminuindo após esse período (Figura 4).

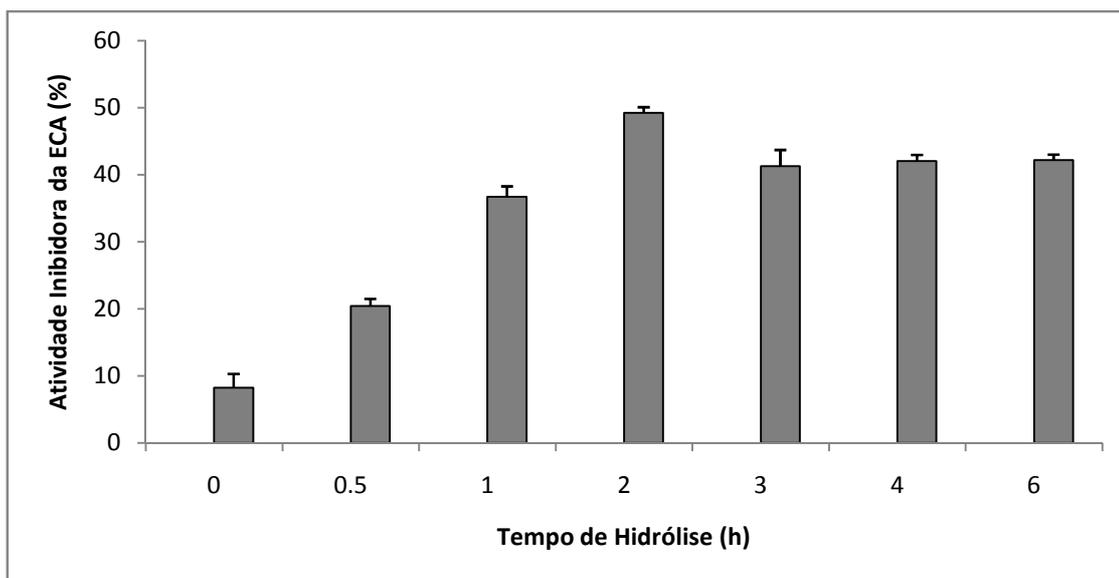


Figura 4. Atividade inibidora da ECA (%) por hidrolisados de soro de leite ovino em diferentes tempos.

Manso & López-Fandiño (2003) relataram a inibição moderada da ECA por caseinomacropéptidos bovinos, ovinos e caprinos não digeridos, mas que aumentavam consideravelmente após a digestão em condições gastrointestinais simuladas. Um hidrolisado de β -lactoglobulina, utilizando termolisina, apresentou dois potentes peptídeos inibidores da ECA (LLF e LQKW), que, subsequentemente, tiveram seus efeitos hipotensores demonstrados em ratos espontaneamente hipertensos (Hernández-Ledesma et al., 2002, 2007). Foram identificados vários peptídeos com atividade inibidora da ECA em hidrolisados de β -lactoglobulina ovina com tripsina, e de iogurtes de leite ovino com diferentes *starters* (Chobert et al., 2005). Didelot et al. (2006) utilizaram a microflora de queijos para produzir vários hidrolisados de soro ácido de leite de caprinos com atividade inibidora da ECA. A maior atividade foi obtida após a fermentação do soro com a microflora do queijo curado "Comté" por 18 meses, que foi caracterizada como uma co-cultura de *Candida*

parapsilosis e *Lactobacillus paracasei*. A atividade anti-hipertensiva de peptídeos derivados de proteínas do soro e caseína, fermentadas com bactérias lácticas, e ainda hidrolisadas com enzimas digestivas, foi demonstrada. A taxa de inibição da ECA variou entre 35 – 61 % para o soro e 86 % para o caseinato (Pihlanto-Leppälä et al., 1998). Uma baixa atividade inibidora da ECA foi verificada para o concentrado de soro de leite bovino não hidrolisado (7,1 %), que aumentou por meio de hidrólise com diferentes proteases (Mullally et al., 1997).

A inibição da ECA é geralmente maior quando contém peptídeos com aminoácidos hidrofóbicos e/ou aromáticos em cada uma das suas três posições C-terminais (FitzGerald et al., 2004). Nesta perspectiva, enzimas com especificidade para resíduos C-terminais de aminoácidos hidrofóbicos e/ou aromáticos tendem a gerar peptídeos com alta atividade inibidora da ECA (Lopez-Fandiño et al., 2006). Por exemplo, isolados de proteínas do soro hidrolisados com quimotripsina, que cliva especificamente depois de resíduos de aminoácidos aromáticos, geralmente mostram aumento da atividade inibidora da ECA, quando em comparação com hidrolisados obtidos com outras enzimas (Costa et al., 2007; Adjonu et al., 2013). No presente estudo, a preparação enzimática utilizada na hidrólise do soro de leite ovino continha, em sua maioria, uma metaloprotease pertencente à família M14 das peptidases, também conhecida como família A carboxipeptidase (Riffel et al., 2007). As carboxipeptidases são exopeptidases que atuam na região carboxi-terminal livre de uma cadeia polipeptídica e liberam um único aminoácido ou dipeptídeos (Rao et al., 1998). Quando avaliada quanto à hidrólise de

peptídeos sintéticos, esta protease demonstrou preferência, principalmente, por peptídeos contendo resíduos de aminoácidos hidrofóbicos (como leucina) ou carregados positivamente (como arginina) na posição P1 (Silveira et al., 2013). Neste contexto, peptídeos contendo resíduos de aminoácidos hidrofóbicos (Haque & Chand, 2008) ou carregados positivamente (Gómez-Ruiz et al., 2002) na porção C-terminal parecem atuar na afinidade do peptídeo pelo sítio ativo da ECA. Portanto, a exposição deste tipo de aminoácidos na porção C-terminal dos peptídeos, produzidos durante a hidrólise com o preparado de proteases de *Chryseobacterium* sp. kr6, pode ter contribuído para o aumento da capacidade inibitória da ECA de hidrolisados do soro de leite ovino quando comparados aos não hidrolisados.

CONCLUSÕES

Este estudo demonstra o potencial do soro de leite ovino como fonte e precursor de compostos bioativos. A visão tradicional do soro de leite como um subproduto com pouco valor da indústria láctea desapareceu, e agora o soro é visto como uma fonte potencial de compostos bioativos que podem ser utilizados na formulação de múltiplos alimentos funcionais. Embora menos explorado que o soro de leite bovino, o soro de leite ovino vem ganhando importância devido ao aumento mundial na produção de laticínios à base de leite destes animais. Entre os componentes do soro de leite, as proteínas são especialmente importantes em termos de atividade biológica.

Os avanços na tecnologia de processamento, incluindo a ultrafiltração, microfiltração, osmose reversa ou troca iônica, entre outros,

resultaram na presença de grande número de produtos de soro de leite no mercado. Muitos desses produtos, como soro em pó, soro com teor de lactose reduzido, concentrados de proteínas de soro de leite, etc, proclamam suas propriedades para o crescimento ou manutenção da massa muscular, entre outros efeitos. No entanto, tal como acontece com outras atividades reivindicadas para as proteínas do soro, incluindo seu efeito sobre a saciedade, estudos documentados com humanos são limitados.

Além da atividade biológica das proteínas intactas, o interesse recente tem focado principalmente nos peptídeos bioativos encriptados dentro das proteínas do soro de leite que são liberadas através de diferentes meios, como a hidrólise enzimática e/ou processo fermentativos. Entre a multiplicidade de bioatividades descritas para esses peptídeos, destacam-se algumas como anti-hipertensivas, opiáceas, antioxidante, antimicrobiana e hipocolesterolêmica. Em comparação às proteínas do soro, são necessárias mais pesquisas sobre a biodisponibilidade e toxicidade em animais para os peptídeos bioativos. No entanto, estudos adicionais, tanto em produtos a base de soro de leite, quanto àqueles contendo peptídeos bioativos são necessários a fim de obter a aceitação dos órgãos oficiais. Estes estudos devem ser focados em ensaios clínicos bem desenhados para confirmar os potenciais efeitos na saúde destes produtos.

4 DISCUSSÃO GERAL

Processos que envolvem a hidrólise de proteínas apresentam amplas utilizações, como processos de limpeza, estudos de proteômica ou processos de biotecnologia de alimentos. Muitos efeitos positivos que se esperam com o processamento de alimentos podem ser alcançados através da hidrólise de proteínas utilizando proteases específicas, alterando as propriedades nutricionais, funcionais e bioativas das proteínas alimentares, o que inclui o aumento da digestibilidade, modificações da qualidade sensorial (tais como a textura e o gosto), aumento da capacidade antioxidante e redução de compostos alergênicos (Tavano, 2013).

As aplicações das proteases em processos industriais estão constantemente aumentando e apresentam grandes vantagens quando comparadas aos processos químicos, aumentando a especificidade da hidrólise, a preservação e a pureza do produto e reduzindo o impacto ambiental. As diferenças nas especificidades entre proteases são de grande valia, quando se considera a escolha de uma protease de acordo com a fonte proteica a ser hidrolisada ou produtos previstos.

O microrganismo utilizado neste trabalho, *Chryseobacterium* sp. kr6, já foi amplamente estudado, e demonstrou ser capaz de utilizar queratina como substrato para seu crescimento, produzindo proteases. Além da hidrólise de queratinas, as proteases produzidas por esta linhagem também se mostraram capazes de hidrolisar outras proteínas como caseína, albumina e hemoglobina (Silveira et al., 2008).

Foi visto que as proteases desempenham um papel importante no metabolismo da bactéria *Chryseobacterium* sp. kr6, pois esta pode crescer em meio contendo farinha de penas como única fonte tanto de carbono quanto de nitrogênio (Silveira et al., 2008).

Hidrolisados de penas podem ser potencialmente empregados como suplementos na alimentação animal, pois demonstram valores nutricionais mais elevados em comparação com a farinha de penas obtida através de processamento hidrotérmico (Bertsh & Coello, 2005), e podem substituir os ingredientes mais caros em formulações de alimentos (Williams et al., 1991; Grazziotin et al., 2008). Nesse sentido, a kr6 mostrou um notável potencial biotecnológico, ligando um processamento eficaz de resíduos de penas com a produção de proteases e hidrolisados proteicos.

Atenção crescente tem sido dada aos peptídeos bioativos em virtude às suas potenciais aplicações nas áreas de ciência e tecnologia de alimentos, nutrição e saúde humana. Peptídeos e hidrolisados proteicos, obtidos a partir da proteólise de distintas proteínas alimentares, são relatados serem possuidores de atividades antioxidantes. As atividades antioxidantes podem proteger os sistemas biológicos contra danos provocados pelo estresse oxidativo, que estão relacionados a diversas doenças humanas (Sarmadi & Ismail, 2010). Estes peptídeos antioxidantes de hidrolisados também podem ser empregados na prevenção de reações de oxidação, tais como a peroxidação lipídica, que levam à deterioração de alimentos e gêneros alimentícios (Zhang et al., 2010). Nesse estudo, as atividades antioxidantes dos hidrolisados foram avaliadas através de diferentes metodologias.

Para a *Chryseobacterium* sp. kr6, as condições da cultura, que resultaram em hidrolisados de penas com valores de DPPH e ABTS ótimos, foram fixadas em 50 g L⁻¹ de penas e pH inicial do meio 8,0, após 48 h de crescimento, a 30 °C. Nessas condições, a captura do radical ABTS nos hidrolisados em concentrações de 15 mg mL⁻¹ atingiram aproximadamente 90 %. Já os valores de DPPH atingiram cerca de 83 % em uma concentração de 250 mg mL⁻¹. Na mesma concentração, hidrolisados de caseinato ovino obtidos com uma preparação de proteases de *Bacillus* sp. P7 mostraram uma redução de 31 % nos valores de captura do radical DPPH (Corrêa et al., 2011).

A atividade antioxidante dos hidrolisados de caseinato ovino com a protease kr6, determinada através da metodologia do ABTS, atingiu valores máximos após 30 min de hidrólise, com um aumento de 29,26 % em comparação com a caseína não hidrolisada. No entanto, períodos superiores de hidrólise não demonstraram um aumento na capacidade de captura de radicais, sendo que os valores permaneceram estáveis. Já os resultados para o DPPH variaram muito através da mudança nos tempos de hidrólise e a relação entre o tempo de hidrólise e a atividade de DPPH não pode ser estabelecida; no entanto, uma alta atividade de captura do radical DPPH foi evidenciada depois de 30 min de hidrólise.

A atividade antioxidante dos hidrolisados de soro de leite ovino, avaliada pelo método de ABTS, aumentou com o tempo, sendo que seus valores máximos foram alcançados após 3 h de hidrólise, com um aumento de 5,09 vezes em relação ao soro de leite não hidrolisado, indicando que os peptídeos liberados poderiam agir diretamente como sequestrantes de radicais

livres no meio aquoso (Rossini et al., 2009). Os resultados variaram muito ao longo do tempo de hidrólise, e uma relação entre o tempo de hidrólise e a atividade de DPPH não pode ser estabelecida; no entanto, a maior atividade de sequestro do radical DPPH foi evidenciada após 2 h de hidrólise.

Uma consideração importante é que as concentrações dos hidrolisados de penas utilizados nos ensaios de DPPH foram muito maiores do que as utilizadas nos ensaios de ABTS. Como relatado anteriormente, o comportamento distinto dos diferentes hidrolisados analisados para os métodos de captura dos radicais DPPH e ABTS, pode ser explicado pela diferente estereosseletividade dos radicais e peptídeos distintos presentes nas amostras, que são capazes de reagir e capturar diferentes radicais, além da diferente estequiometria das reações entre os compostos antioxidantes dos hidrolisados e os radicais ABTS e DPPH, e também da solubilidade e difusibilidade dos radicais (Rival et al., 2001; Zhu et al., 2008a,b). Sendo assim, uma maior atividade com o método do ABTS, não necessariamente implica em um aumento da capacidade de varrer os radicais DPPH. Nessa perspectiva, o método ABTS é um dos protocolos mais eficazes e comumente utilizados no monitoramento das atividades antioxidantes (Silva et al., 2006).

A quelação de íons metálicos pode reduzir a quantidade de ferro livre disponível para participar da reação de Fenton e, finalmente, diminuir a formação de OH^- (Halliwell & Gutteridge, 1990). Os hidrolisados do caseinato ovino obtidos após a ação da protease kr6 por 1 h demonstraram 92,56 % de capacidade de quelação de Fe^{2+} , no entanto o controle (T_0) mostrou 84,43 % de habilidade de quelar o Fe^{2+} , havendo uma ligeira diminuição na atividade

quelante para períodos de hidrólise maiores. Já a capacidade quelante máxima observada nos hidrolisados de soro de leite foi observada em 1h de hidrólise (80,93 %), com um aumento de 1,37 vezes a capacidade quelante do soro não-hidrolisado.

A capacidade dos peptídeos em atuar como agente redutor, através da doação de elétrons para formar produtos mais estáveis, foi determinada através do método do poder redutor. Esse método mede a capacidade dos peptídeos para reduzir o complexo Fe^{3+} -Ferricianida a forma ferrosa (Fe^{2+}) (Bougatef et al., 2009). A metodologia do poder redutor dos hidrolisados de caseinato ovino demonstrou uma maior atividade entre 1 e 2 h, decrescendo depois disso. Já o poder redutor dos hidrolisados de soro de leite ovino aumentou 3,94 vezes após 1 h de hidrólise, em comparação com o soro não hidrolisado. A capacidade redutora apresentada por diferentes hidrolisados indica que estes podem atuar como doadores de elétrons, reduzindo os intermediários oxidados no processo de peroxidação lipídica em alimentos (Sarmadi & Ismail, 2010).

A avaliação da atividade antioxidante pelo método do TRAP demonstrou que todos os hidrolisados de penas e caseinato, nas concentrações testadas, apresentaram uma quantidade significativamente maior de antioxidantes do que o Trolox, o que não foi visualizado para todos os hidrolisados do soro de leite ovino.

Os hidrolisados de penas de 48 h do sobrenadante bruto (1 e 0,5 mg mL^{-1}) e do sobrenadante de 48 h parcialmente purificado (1 mg mL^{-1}) apresentaram os menores valores da AUC, sendo que para o caseinato, os

hidrolisados de 6 e 7h ($2,5 \text{ mg mL}^{-1}$) apresentaram esta maior capacidade de eliminação de radicais livres; para os hidrolisados de soro de leite ovino, os tempos de hidrólise de 30 min, 4 e 6 h ($2,5 \text{ mg mL}^{-1}$) demonstraram os melhores índices.

A atividade antioxidante dos hidrolisados é inerente as características das sequências de aminoácidos dos peptídeos derivados, dependendo da especificidade da protease. Os resultados sugerem que os hidrolisados proteicos podem ser utilizados como antioxidantes naturais, melhorando propriedades antioxidantes dos alimentos funcionais e na prevenção das reações de oxidação no processamento de alimentos. Particularmente, os hidrolisados de penas podem ser utilizados como suplementos em rações para animais, e suas propriedades antioxidantes poderiam também proteger os alimentos contra a oxidação (Fakhfakh et al., 2011). Mais estudos são necessários para elucidar o papel dos peptídeos antioxidantes na função de proteção em seres vivos.

A enzima conversora de angiotensina (ECA) realiza a conversão de angiotensina I em angiotensina II (forte vasoconstritor), e também degrada a bradicinina (um potente vasodilatador). Assim, os inibidores da ECA atuam como agentes potenciais no controle da pressão arterial e na redução da hipertensão, com a consequente utilidade na prevenção e/ou tratamento de doenças cardiovasculares (Fitzgerald et al., 2004). Nesse sentido, várias investigações reportam a capacidade inibidora da ECA de hidrolisados de proteínas e peptídeos, devido ao seu potencial impacto positivo na saúde humana (López-Fandiño et al., 2006; Haque & Chand, 2008). No entanto, a

capacidade dos hidrolisados de penas na inibição da atividade da ECA (65 % de inibição) é demonstrada pela primeira vez. Os resultados são comparados àqueles obtidos por várias bactérias lácticas durante a fermentação do leite (Pihlanto et al., 2010), aos hidrolisados de soja (Lee et al., 2008) e aos hidrolisados de fibroína de seda (Zhou et al., 2010) obtidos com enzimas comerciais.

As atividades inibidoras da ECA dos hidrolisados de caseinato ovino aumentaram depois de 1 h com a protease kr6, atingindo uma atividade máxima em 6 h e diminuindo depois. Segundo Corrêa et al. (2011), hidrolisados de caseinato ovino com uma protease bacteriana P7 mostraram uma inibição de 94 % da atividade da ECA em hidrolisados de 2 h, e em 4 h os hidrolisados demonstraram maior atividade inibitória quando comparados ao caseinato ovino não hidrolisado. Já a capacidade de inibir a ECA dos hidrolisados do soro de leite ovino demonstrou uma maior atividade após 2 horas do tempo de hidrólise (49,22 %), diminuindo após esse período. A inibição da ECA é geralmente maior quando contém peptídeos com aminoácidos hidrofóbicos e/ou aromáticos em cada uma das suas três posições C-terminais (FitzGerald et al., 2004). Nesta perspectiva, enzimas com especificidade para resíduos C-terminais de aminoácidos hidrofóbicos e/ou aromáticos tendem a gerar peptídeos com alta atividade inibidora da ECA (Lopez-Fandiño et al., 2006).

A DPP-IV é uma serino-protease responsável pela rápida degradação dos hormônios incretinas GLP-1 e GIP (Drucker, 2007). Esses hormônios potencializam a liberação de insulina após a ingestão de nutrientes, diminuindo assim a glicemia pós-prandial. Com a inibição da DPP-IV, é

possível aumentar a meia-vida de GLP-1 e GIP, aumentando a secreção de insulina (Nongonierma & FitzGerald, 2013). A análise dos resultados demonstrou um aumento da atividade inibitória da DPP-IV conforme o aumento da concentração dos hidrolisados. O hidrolisado de tempo zero não apresentou atividade e a maior atividade foi apresentada para o hidrolisado de 24 h ($44,25 \pm 0,005$ em 20 mg mL^{-1}). Hidrolisados proteicos de leite, algas, peixe e amaranto já demonstraram previamente serem capazes de inibir a DPP-IV, sendo que o grau de inibição pode variar dependendo da protease utilizada (Huang et al., 2012; Velarde-Salcedo et al., 2012; Harnedy & FitzGerald, 2013; Nongonierma & FitzGerald, 2013).

A habilidade dos hidrolisados de caseinato ovino de inibir o crescimento de várias bactérias e fungos foi investigada. Os hidrolisados de caseinato ovino por 30 min, 1 h e 2 h com a protease parcialmente purificada de *Chryseobacterium* sp. kr6 mostraram atividade antibacteriana contra bactérias Gram-positivas, como *Corynebacterium fimi*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, bem como contra bactérias Gram-negativas, como *Salmonella* Enteritidis, *Salmonella* Typhimurium, *Yersinia enterocolitica* e *Escherichia coli*. No entanto, não foi verificada atividade antimicrobiana pelos hidrolisados de soro de leite ovino para a maioria dos microrganismos testados. Somente o crescimento da bactéria *Corynebacterium fimi* foi inibido com os hidrolisados de 1 e 2 h, não apresentando atividade antimicrobiana e antifúngica para nenhum dos outros microrganismos indicadores utilizados nas concentrações testadas.

5 CONCLUSÕES

A conversão microbiana de resíduos agroindustriais constitui uma abordagem potencial da valorização da biodegradação, no que diz respeito a relação custo-eficácia e proteção do ambiente. O mercado industrial de enzimas está em constante crescimento em função da melhoria das tecnologias de produção, avanços na área de engenharia de proteínas, bem como a diversificação do campo de aplicação.

Neste estudo, a hidrólise de penas de galinha foi realizada com sucesso através do cultivo pela cepa *Chryseobacterium* sp. kr6. Os hidrolisados de proteínas de penas foram avaliados para diferentes atividades biológicas. A atividade antioxidante dos hidrolisados foi avaliada através dos métodos do ABTS, DPPH e TRAP, demonstrando possuir bom potencial antioxidante em condições ideais (50 g L⁻¹ de penas, 30 °C, pH 8,0, 48 h). Também demonstrou possuir atividade de inibição da ECA e da DPP-IV. Levando em conta a enorme quantidade de penas geradas como resíduo, a bioconversão é uma estratégia adequada na utilização desses substratos abundantes e recalcitrantes. Do ponto de vista biotecnológico, as propriedades biológicas apresentadas pelo hidrolisado de penas podem ser empregados na elaboração de alimentos funcionais, e como agentes de retardamento da peroxidação lipídica que leva à deterioração dos alimentos.

As atividades antioxidantes, de inibição da ECA e da DPP-IV demonstradas pelos hidrolisados de penas merecem mais investigações, particularmente na identificação e caracterização dos peptídeos responsáveis pelas bioatividades observadas. Independentemente de sua origem,

hidrolisados de proteínas e peptídeos devem ser testados para a segurança e toxicidade para postular aplicações. Esses hidrolisados e peptídeos podem ser potencialmente utilizados diretamente, como fonte de moléculas bioativas, ou indiretamente, como uma fonte de informação para a síntese química de peptídeos bioativos, o que pode ser empregue em rações, em alimentos e no desenvolvimento de medicamentos.

Hidrolisados de caseinato ovino apresentando atividades antioxidantes, anti-hipertensivas e antimicrobianas foram produzidos a partir de uma protease microbiana parcialmente purificada de *Chryseobacterium* sp. kr6. As bioatividades apresentadas pelos hidrolisados proteicos podem ser resultado do efeito sinérgico de diferentes peptídeos dentro da mistura. Esses hidrolisados de caseinato ovino podem ser úteis em aplicações na indústria alimentícia, com o objetivo de aumentar potencialmente o valor nutricional e a vida de prateleira de produtos alimentícios, bem como no desenvolvimento de alimentos funcionais.

Também foi demonstrada que a hidrólise enzimática controlada pode atuar no incremento das capacidades antioxidantes e da atividade anti-hipertensiva de soro de leite ovino. Verificou-se que o tempo de hidrólise pode afetar as bioatividades avaliadas. Este estudo indica que a hidrólise enzimática pode ser potencialmente empregada como uma tecnologia de processamento do soro de leite ovino.

REFERÊNCIAS

ABERT, T.; KNEIFEL, W. Physicochemical and functional properties of casein hydrolysates obtained by treatment with different enzymes. In: IDF, editor. Protein and fat globule modifications by heat treatment, homogenization and other technological means for high quality dairy products. **Proceedings of the International Dairy Federation Seminar**; 1992 Aug 25-28, Alemanha, p.97-105, 1993.

ADJONU, R.; DORAN, G.; TORLEY, P.; AGBOOLA, S. Screening of whey protein isolate hydrolysates for their dual functionality: influence of heat pre-treatment and enzyme specificity. **Food Chemistry**, v.136 (3-4), p.1435-1443, 2013.

ADLER-NISSEN, J. Procesamiento enzimático de las proteínas alimenticias. **Alimentos**, v.6, p.29-33, 1981.

ADIGÜZEL, A.C.; BITLISLI, B.O.; YAŞA, I.; ERIKSEN, N.T. Sequential secretion of collagenolytic, elastolytic, and keratinolytic proteases in peptide-limited cultures of two *Bacillus cereus* strains isolated from wool. **Journal of Applied Microbiology**, v.107, p.226-234, 2009.

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

AGUILAR, M.I. Reversed-phase high-performance liquid chromatography. Aguilar MI (ed) HPLC of peptides and proteins: methods and protocols. Humana Press, Totowa, p. 9-22, 2004.

AGYEI, D.; DANQUAH, M.K. Rethinking food-derived bioactive peptides for antimicrobial and immunomodulatory activities. **Trends in Food Science & Technology**, v.23, p.62-69, 2012.

ALLPRESS, J.D.; MOUNTAIN, G.; GOWLAND, P.C. Production, purification and characterization of an extracellular keratinase from *Lysobacter* NCIMB 9497. **Letters in Applied Microbiology**, v.34, p.337-342, 2002.

ALMEIDA, K.E.; BONASSI, I.A.; ROÇA, R.O. Características físicas e químicas de bebidas lácteas fermentadas e preparadas com soro de queijo minas frescal. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.21(2), p.187-192, 2001.

ALVAREZ, E.M.; RISSO, P.H.; MANCILLA CANALES, M.A.; PIRES, M.S.; GATTI, C.A. Hydrodynamic properties-structure relationship for sodium caseinates in presence of calcium. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v.327, p.51-56, 2008.

ANWAR, A.; SALEEMUDDIN, M. Alkaline proteases: a review. **Bioresource Technology**, v. 64, p. 175-183, 1998.

ARAI, K.M.; TAKAHASHI, R.; YOKOTE, Y.; AKAHANE, K. Amino-acid sequence of feather keratin from fowl. **European Journal of Biochemistry**, v.132, p.501-507, 1983.

ARRUDA, M.S.; SILVA, F.O.; EGITO, A.S.; SILVA, T.M.S.; LIMA-FILHO, J.L.; PORTO, A.L.F.; MOREIRA, K.A. New peptides obtained by hydrolysis of caseins from bovine milk by protease extracted from the latex *Jacaratia corumbensis*. **LWT - Food Science and Technology**, v.49, p.73-79, 2012.

ASSENAT, L. Le lait de brebis: composition et propriétés. In: Luquet FM, editor. *Laits et Produits Laitiers: vache, brebis, chèvre*. Paris, France: Technique et Documentation Lavoisier; 1985.

BACH, E.; CANNAVAN, F.S.; DUARTE, F.R.S.; TAFFAREL, J.A.S.; TSAI, S.M.; BRANDELLI, A. Characterization of feather-degrading bacteria from Brazilian soils. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v.65, p.102-107, 2011.

BALAJI, S.; KUMARM, S.; KARTHIKEYAN, R.; KUMAR, R.; KIRUBANANDAN, S.; SRIDHAR, R.; SEHGAL, P.K. Purification and characterization of an extracellular keratinase from a hornmeal-degrading *Bacillus subtilis* MTCC (9102). **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.24, p.2741-2745, 2008.

BANTLE, J.P.; WYLIE-ROSETT, J.; ALBRIGHT, A.L.; APOVIAN, C.M.; CLARK, N.G.; FRANZ, M.J. Nutrition recommendations and interventions for diabetes: a position statement of the American Diabetes Association. **Diabetes Care**, v.31, p.S61-S78. 2008.

BARONE, J.R.; SCHMIDT, W.F. Effect of formic acid exposure on keratin fiber derived from poultry feather biomass. **Bioresource in Technology**, v.97, p.233-242, 2006.

BENKERROUM, N. Antimicrobial peptides generated from milk proteins: a survey and prospects for application in the food industry. A review. **International Journal of Dairy Technology**, v.63, p.320-338, 2010.

BERNACKA, H. Health-promoting properties of goat milk. **Medycyna Weterynaryjna**, v.67, p.507-511, 2011.

BERTSCH, A.; COELLO, N. A biotechnological process for treatment and recycling poultry feathers as a feed ingredient. **Bioresource in Technology**, v.96, p.1703-1708, 2005.

BERGER, Y. Sheep's milk and its uses. 2005. Disponível em: <http://www.sheepmilk.biz/sheepmilk.html>>. Acesso em: 20 dez. 2012.

BERNAL, C.; VIDAL, L.; VALDIVIESO, E.; COELLO, N. Keratinolytic activity of *Kocuria rosea*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.19, p.255-261, 2003.

BERNARDI, D.L.S.; PILOSOFF, A.M.R.; BARTHOLOMAI, G.B. Enzymatic modification of soy protein concentrates by fungal and bacterial proteases. **Journal of American Oil Chemical Society**, v.68(2), p.102-105, 1991.

BHARATAN, P.V.; PATEL, D.S.; ADANE, L.; MITTAL, A.; SUNDRIYAL, S. Modeling and informatics in designing anti-diabetic agents. **Current Pharmaceutical Design**, v.13, p.3518-3530, 2007.

BÖCKLE, B.; GALUNSKY, B.; MULLER, R. Characterization of a keratinolytic serine proteinase from *Streptomyces pactum* DSM 40530. **Applied and Environmental Microbiology**, v.61, p.3705-3710, 1995.

BOUGATEF, A.; HAJJI, M.; BALTI, R.; LASSOUED, I.; TRIKI-ELLOUZ, Y.; NASRI, M. Antioxidant and free radical-scavenging activities of smooth hound (*Mustelus mustelus*) muscle protein hydrolysates obtained by gastrointestinal proteases. **Food Chemistry**, v.114, p.1198-1205, 2009.

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, p.25-30, 1995.

BRANDELLI, A. Bacterial keratinases: useful enzymes for bioprocessing agroindustrial wastes and beyond. **Food Bioprocess Technology**, v.1, p.105-116, 2008.

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

BRANS, G.; SCHRO"EN, C.G.P.H.; VAN DER SMAN, R.G.M.; BOOM, R.M. Membrane fractionation of milk: state of the art and challenges. **The Journal of Membrane Science**, v.243, p.263-272, 2004.

BRESSOLLIER, P.; LETOURNEAU, F.; URDACI, M.; VERNEUIL, B. Purification and characterization of a keratinolytic serine proteinase from *Streptomyces albidoflavus*. **Applied Environmental Microbiology**, v.65, p.2570-2576, 1999.

CAI, C.G.; LOU, B.G.; ZHENG, X.D. Keratinase production and keratin degradation by a mutant strain of *Bacillus subtilis*. **Journal of Zhejiang University Science**, v.9, p.60-67, 2008.

CALLAWAY, T.R.; EDRINGTON, T.S.; ANDERSON, R.C.; BYRD, J.A.; NISBET, D.J. Gastrointestinal microbial ecology and the safety of our food supply as related to *Salmonella*. **Journal of Animals Science**, v.86, p.163-172, 2010.

CAMPOS, A.M.; ESCOBAR, J.; LISSI, E.A. The total reactive potential (TRAP) and total antioxidant reactivity (TAR) of *Ilex paraguayensis* extracts and red wine. **Journal of Brazilian Chemistry**, v.7(1), p.43-49, 1996.

CÁNOVAS, J.M.; RENTERO, P.Z.; MARTÍNEZ, A.M.C.; HENÁNDEZ, M.L.; ALEMÁN, J.A. Péptidos bioactivos. **Clínica e Investigación en Arteriosclerosis**, v.23(5), p.219-227, 2011.

CAPOBIANGO, M.; SILVA, V.D.M.; MACHADO, M.A.A.; COELHO, J.V.; SEGALL, S.D.; SILVESTRE, M.P.C. Ação da corolase PP e uso do carvão ativado na obtenção de hidrolisados proteicos de fubá de milho com baixo teor de fenilalanina. **Revista Brasileira de Nutrição Clínica**, v.21, p.259-266, 2006.

CARVALHO, F.; PRAZERES, A.R.; RIVAS, J. Cheese whey wastewater: characterization and treatment. **Science of the Total Environment**, v.445-446, p.385-396, 2013.

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

CHEFTEL, J.C.; CUQ, J.L.; LORIENTE, D. Proteínas alimentarias: bioquímica, propiedades funcionales, valor nutricional, modificaciones químicas. Zaragoza: Acibia; 1989.

CHITTE, R.R.; NALAWADE, V.K.; DEY, S. Keratinolytic activity from the broth of a feather-degrading thermophilic *Streptomyces thermoviolaceus* strain SD8. **Letters of Applied Microbiology**, v.28, p.131-136, 1999.

CHOBERT, J.M.; EL-ZAHAR, K.; SITOHY, M.; DALGALARRONDO, M.; METRO, F.; CHOISSET, Y.; HAERTLE, T. Angiotensin I-converting-enzyme (ACE)-inhibitory activity of tryptic peptides of ovine beta-lactoglobulin and of milk yoghurts obtained by using different starters. **Lait**, v.85, p.141-152, 2005.

CLARE, D.A.; SWAISGOOD, H.E. Bioactive milk peptides: a prospectus. **Journal of Dairy Science**, v.83, p.1187-195, 2000.

CONNOLLY, A.; PIGGOTT, C.O.; FITZGERALD, R.J. In vitro α -glucosidase, angiotensin converting enzyme and dipeptidyl peptidase-IV inhibitory properties of brewers' spent grain protein hydrolysates. **Food Research International**, v. 56, p.100-107, 2014.

CONTRERAS, M.M.; CARRÓN, R.; MONTERO, M.J.; RAMOS, M.; RECIO, I. Novel casein-derived peptides with antihypertensive activity. **International Dairy Journal**, v.19, p.566-573, 2009.

CONTRERAS, M.M.; HERNÁNDEZ-LEDESMA, B.; AMIGO, L.; MARTÍN-ÁLVAREZ, P.J.; RECIO, I. Production of antioxidant hydrolyzates from a whey protein concentrate with thermolysin: optimization by response surface methodology. **LWT Food Science and Technology**, v.44, p.9-15, 2011.

CORRÊA, A.P.F.; DAROIT, D.J.; COELHO, J.; MEIRA, S.M.M.; LOPES, F.C.; SEGALIN, J.; RISSO, P.; 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, p. 2247-2254, 2011.

COSTA, E.L.; GONTIJO, J.A.R.; NETTO, F.M. Effect of heat and enzymatic treatment on the antihypertensive activity of whey protein hydrolysates. **International Dairy Journal**, v.17, p.632-640, 2007.

CREUTZFELDT, W. The entero-insular axis in type 2 diabetes incretins as therapeutic agents. **Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes**, v.109, p.288-300, 2001.

CREUTZFELDT, W.; NAUCK, M.A. GUT Hormones and diabetes mellitus. **Diabetes/Metabolism Research and Reviews**, v.8, p.565-573, 1992.

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

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 Technoogy**, v.92, p.335-351, 2012.

DEACON, C.F.; HUGHES, T.E.; HOLST, J.J. Dipeptidyl peptidase IV inhibition potentiates the insulinotropic effect of glucagon-like peptide 1 in the anesthetized pig. **Diabetes**, v.47, p.764-769, 1998.

DEACON, C.F.; NAUCK, M.A.; MEIER, J.; HÜCKING, K.; HOLST, J.J. Degradation of endogenous and exogenous gastric inhibitory polypeptide in healthy and in type 2 diabetes subjects as revealed using a new assay for the

intact peptide. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v.85, p.3575-3581, 2000.

DE CASTRO, R.J.S.; SATO, H.H. Advantages of an acid protease from *Aspergillus oryzae* over commercial preparations for production of whey protein hydrolysates with antioxidant activities. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, 2013. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bcab.2013.11.012>

DE MEESTER, I.; LAMBEIR, A.M.; PROOST, P.; SCHARPÉ, S. Dipeptidyl peptidase IV substrates. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v.524, p.3-13, 2003.

DE TONI, C.H.; RICHTER, M.F.; CHAGAS, J.R.; HENRIQUES, J.A.P.; TERMIGNONI, C. Purification and characterization of an alkaline serine endopeptidase from a feather-degrading *Xanthomonas maltophilia* strain. **Canadian Journal of Microbiology**, v.48, p.342-348, 2002.

DESMARCHELIER, C.; REPETTO, M.; COUSSIO, J.; LLESUY, S.; CICCIA, G. Total reactive antioxidant potential (TRAP) and total antioxidant reactivity (TAR) of medicinal plants used in southwest Amazonia (Bolivia and Peru). **International Journal of Pharmacognosy**, v.35, p.288-296, 1997.

DIAZ, M.; DUNN, C.M.; MCCLEMENTS, D.J.; DECKER, E.A. Use of caseinophosphopeptides as natural antioxidants in oil-in water emulsions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.51, p.2365-2370, 2003.

DIDELOT, S.; BORDENAVE-JURECHEREAU, S.; ROSENFELD, E.; FRUITIER-ARNAUDIN, I.; PIOT, J.M.; SANNIER, F. Preparation of angiotensin-I-converting enzyme inhibitory hydrolysates from unsupplemented caprine whey fermentation by various cheese microflora. **International Dairy Journal**, v.16, p.976-983, 2006.

DONG, S.; ZENG, M.; WANG, D.; LIU, Z.; ZHAO, Y.; YANG, H. Antioxidant and biochemical properties of protein hydrolysates prepared from silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*). **Food Chemistry**, v.107, p.1485-1493, 2008.

DRESCH, M.T.K.; ROSSATO, S.B.; KAPPEL, V.D.; BIEGELMEYER, R.; HOFF, M.L.M.; MAYORGA, P.; ZUANAZZI, J.A.S.; HENRIQUES, A.T.; MOREIRA, J.C.F. Optimization and validation of an alternative method to evaluate total reactive antioxidant potential. **Analytical Biochemistry**, v.385(1), p.107-114, 2009.

DRUCKER, D.J. Dipeptidyl peptidase-4 inhibition and the treatment of type 2 diabetes preclinical biology and mechanisms of action. **Diabetes Care**, v.30(6), p.1335-1343, 2007.

DRYÁKOVÁ, A.; PIHLANTO, A.; MARNILA, P.; EURDA, L.; KORHONEN, H.J.T. Antioxidant properties of whey protein hydrolysates as measured by three methods. **European Food Research and Technology**, v.230, p.865-874, 2010.

DUARTE, A.J.; CARREIRA, R.L.; JUNQUEIRA, R.G.; COELHO, J.V.; SILVESTRE, M.P.C. Propriedades emulsionantes e solubilidade da caseína bovina e de seus hidrolisados tripticos: 2. Efeito da adição de NaCl. **Ciência Tecnologia Alimentos**, v.18, p.302-308, 1998.

DUNKLEY, K.D.; CALLAWAY, T.R.; CHALOVA, V.I.; MCREYNOLDS, J.L.; HUME, M.E.; DUNKLEY, C.S. Food borne *Salmonella* ecology in the avian gastrointestinal tract. **Anaerobe**, v.15, p.26-35, 2009.

ERDMANN, K.; CHEUNG, B.W.Y.; SCHÖDER, H. The possible role of food derived bioactive peptides in reducing the risk of cardiovascular. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v.19, p.643-654, 2008.

ESPEJO-CARPIO, F.J.; DE GOBBA, C.; GUADIX, A.; GUADIX, E.M. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity of enzymatic hydrolysates of goat milk protein fractions. **International Dairy Journal**, v.32, p.175-183, 2013.

EXPÓSITO, I.L.; RECIO, I. Antibacterial activity of peptides and folding variants from milk proteins. **International Dairy Journal**, v.16, p.1294-1305, 2006.

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, p.427-436, 2009.

FAKHFAKH, N.; KTARI, N.; HADDAR, A.; MNIF, I.H.; DAHMEN, I.; NASRI, M. Total solubilisation of the chicken feathers by fermentation with a keratinolytic bacterium, *Bacillus pumilus* A1, and the production of protein hydrolysate with high antioxidative activity. **Process Biochemistry**, v.46, p.1731-1737, 2011.

FARVIN, K.H.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.

FERREIRA, I.M.P.L.V.O.; VEIROS, C.; PINHO, O.; VELOSO, A.C.A.; PERES, A.M.; MENDONÇA, A. Casein breakdown in terrincho ovine cheese: comparison with bovine cheese and with bovine/ovine cheeses. **Journal of Dairy Science**, v.89(7), p.2397-2407, 2006.

FERREIRA, S.M., LERNER, S.F., BRUNZINI, R., EVELSON, P.A., LLESUY, S.F. Antioxidant status in the aqueous humour of patients with glaucoma associated with exfoliation syndrome. **Eye**, v.23, p.1691-1697, 2009.

FIELDS, K.; FALLLA, T.J.; RODAN, K.; BUSH, L. Bioactive peptides: signaling the future. **Journal of Cosmetic Dermatology**, v.8, p.8-13, 2009.

FITZGERALD, R.J.; MEISEL, H. Milk protein hydrolysates and bioactive peptides. In: P.F. Fox, & P.L.H. McSweeney (Eds.), *Advanced Dairy Chemistry, Vol. 1: Proteins* (3^a ed.) (p. 675–698). New York, NY, USA: Kluwer Academic/Plenum Publishers, 2003.

FITZGERALD, R.J., MURRAY, B.A., WALSH, D.J. Hypotensive peptides from milk proteins. **Journal of Nutrition**, v.134, p.9805-9885, 2004.

FRIEDRICH, A.B.; ANTRANIKIAN, G. Keratin degradation by *Fervidobacterium pennavorans*, a novel thermophilic anaerobic species of the order thermotogales. **Applied and Environmental Microbiology**, v.62, p.2875-2882, 1996.

FUGLSANG, A.; RATTRAY, F.P.; NILSSON, D.; NYBORG, N.C.B. Lactic acid bacteria: inhibition of angiotensin converting enzyme in vitro and in vivo. **Antonie van Leeuwenhoek**, v.83, p.27-34, 2003.

GASSESSE, A.; KAUL, R.H.; GASHE, B.A.; MATTIASSON, B. Novel alkaline proteases from alkalophilic bacteria grown on chicken feather. **Enzyme and Microbial Technology**, v.32, p.519-524, 2003

GHOSH, A.; CHAKRABARTI, K.; CHATTOPADHYAY, D. Degradation of raw feather by a novel high molecular weight extracellular protease from newly isolated *Bacillus cereus* DCUW. **The Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v.35, p.825-834, 2008.

GOBBETTI, M.; MINERVINI, F.; RIZZELLO, C.G. Angiotensin I-converting-enzyme-inhibitory and antimicrobial bioactive peptides. **International Journal of Dairy Technology**, v.57, p.2-3, 2004.

GÓMEZ-RUIZ, J.A.; TABORDA, G.; AMIGO, L.; RECIO, I.; RAMOS, M. Identification of ACE-inhibitory peptides in different Spanish cheeses by tandem mass spectrometry. **European Food Research Technology**, v.223, p.595-601, 2006.

GÓMEZ-RUIZ, J.A.; LÓPEZ-EXPÓSITO, I.; PIHLANTO, A.; RAMOS, M.; RECIO, I. Antioxidant activity of ovine casein hydrolysates: identification of active peptides by HPLC-MS/MS. **European Food Research and Technology**, v.227, p.1061-1067, 2008.

GRAHAM, P.M., LI, J.Z., DOU, X., ZHU, H., MISRA, H.P., JIA, Z., LI, Y. Protection against peroxynitrite-induced DNA damage by mesalamine: implications for anti-inflammation and anti-cancer activity. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v.378, p.291-298, 2013.

GRAZZIOTIN, A.; PIMENTEL, F.A.; DE JONG, E.V.; BRANDELLI, A. Poultry feather hydrolysate as a protein source for growing rats. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.45, p.61-67, 2008.

GRIMBLE, G.K.; KEOHANE, P.P.; HIGGINS, B.E.; KAMINSKI Jr., M.V.; SILK, D.B.A. Effect of peptide chain length on amino acid and nitrogen absorption from two lactoalbumin hydrolysates in the normal human jejunum. **Clinical Science**, v.71, p.65-69, 1986.

GUAN, X.; YAO, H.; CHEN, Z.; SHAN, L.; ZHANG, M. Some functional properties of oat bran protein concentrate modified by trypsin. **Food Chemistry**, v.101, p.163-170, 2007.

GUÉRARD, F. Enzymatic methods for marine by-products recovery. In F. Shahidi (Ed.), *Maximizing the value of marine byproducts* (p.107-143). Cambridge, England: Woodward Publishing Limited, 2007.

GUO, L.; BAFANG LI, H.H.; ZHANG, Z.; WANG, S.; ZHAO, X. Preparation, isolation and identification of iron-chelating peptides derived from Alaska pollock skin. **Process Biochemistry**, v.48, p.988-993, 2013.

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

GUPTA, A.; MANN, B.; KUMAR, R.; SANGWAN, R.B. Antioxidant activity of cheddar cheeses at different stages of ripening. **International Journal of Dairy Technology**, v.62, p.339-347, 2009.

GUPTA, R.; RAMNANI, P. Microbial keratinases and their prospective applications: an overview. **Applied Microbiology Biotechnology**, v.70, p.21-33, 2006.

GUSHTEROVA, A.; VASILEVA-TONKOVA, E.; DIMOVA, E.; NEDKOV, P.; HAERTLÉ, T. Keratinase production by newly isolated Antarctic actinomycete strains. **The World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v.21, p.831-834, 2005.

HAENLEIN, G.F.W. Past, present and future perspectives on small ruminant dairy research. **Journal of Dairy Science**, v.84(9), p.2097-2115, 2001.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. **Methods in Enzymology**, v.186, p.1-85, 1990.

HANSEN, P.; LINDEBERG, G. Importance of the L-amino group in the selective purification of synthetic histidine peptides by immobilised metal ion affinity chromatography. **The Journal of Chromatography A**, v.690, p.155-159, 1995.

HAQUE, E.; CHAND, R. Antihypertensive and antimicrobial bioactive peptides from milk proteins. **European Food Research and Technology**, v.227, p.7-15, 2008.

HARNEDY, P.A.; FITZGERALD, R.J. In vitro assessment of the cardioprotective, anti-diabetic and antioxidant potential of *Palmaria palmate* protein hydrolysates. **Journal of Applied Phycology**, v.25, p.1793-1803, 2013.

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

HATANAKA, T.; INOUE, Y.; ARIMA, J.; KUMAGAI, Y.; USUKI, H.; KAWAKAMI, K.; KIMURA, M.; MUKAIHARA, T. Production of dipeptidyl peptidase IV inhibitory peptides from defatted rice bran. **Food Chemistry**, v.134(2), p. 797-802, 2012.

HAWLEY, J.A.; GIBALA, M.J. What's new since Hippocrates? Preventing type2 diabetes by physical exercise and diet. **Diabetologia**, v.55, p.535-539, 2012.

HAYES, M.; ROSS, R.P.; FITZGERALD, G.F.; HILL, C.; STANTON, C. Casein-derived antimicrobial peptides generated by *Lactobacillus acidophilus* DPC6026. **Applied and Environmental Microbiology**, v.72, p.2260-2264, 2006.

HERMAN, G.A.; STEIN, P.P.; THORNBERRY, N.A.; WAGNER, J.A. Dipeptidyl peptidase-4 inhibitors for the treatment of type 2 diabetes: focus on sitagliptin. **Clinical Pharmacology Therapy**, v.81, p.761-767, 2007.

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

HERNÁNDEZ-LEDESMA, B.; MIGUEL, M.; AMIGO, L.; ALEXANDRE, M. A. RECIO, I. Effect of simulated gastrointestinal digestion on the antihypertensive properties of synthetic β -lactoglobulin peptide sequences. **Journal of Dairy Research**, v.74, p.336-339, 2007.

HERNÁNDEZ-LEDESMA, B.; MIRALLES, B.; AMIGO, L.; RAMOS, M.; RECIO, I. Identification of antioxidant and ACE-inhibitory peptides in fermented milk. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 85, p.1041-1048, 2005a.

HERNÁNDEZ-LEDESMA, B.; VALOS, A. D.; BARTOLOMEÄ, B.; AMIGO, L. Preparation of antioxidant enzymatic hydrolysates from α -lactalbumin and β

lactoglobulin. Identification of active peptides by HPLC-MS/MS. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.53, p.588-593, 2005b.

HERNÁNDEZ-LEDESMA, B.; RECIO, I.; RAMOS, M.; AMIGO, L. Preparation of ovine and caprine β -Lg hydrolysates with ACE-inhibitory activity. Identification of active peptides from β -Lg hydrolysed with thermolysin. **International Dairy Journal**, v.12, p.805-812, 2002.

HERNÁNDEZ-LEDESMA, B., RECIO, I., AMIGO, L. β -lactoglobulin as source of bioactive peptides. **Aminoacids**, v.35, p.257-265, 2008.

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

HOLT, C. The milk salts and their interaction with casein. In P.F. Fox (Ed.), *Advanced Dairy Chemistry* (p. 233–256). London: Chapman & Hall, 1997.

HU, C.; KITTS, D.D. Evaluation of antioxidant activity of epigallocatechin gallate in biphasic model systems in vitro. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v.218, p.147-155, 2001.

HUANG, S.L.; JAO, C.L.; HO, K.P.; HSU, K.C. Dipeptidyl-peptidase IV inhibitory activity of peptides derived from tuna cooking juice hydrolysates. **Peptides**, v.35(1), p.114-121, 2012.

HUR, J.; JAWALE, C.; LEE, J.H. Antimicrobial resistance of *Salmonella* isolated from food animals: a review. **Food Research Internacional**, v.45, p.819-830, 2012.

HSU, K.; TUNG, Y.; HUANG, S.; JAO, C. Dipeptidyl peptidase-IV inhibitory activity of peptides in porcine skin gelatin hydrolysates. **Bioactive Food Peptides in Health and Disease**. Cap. 8, p.205-218, 2013. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.5772/51264>

JANDAL, J.M. Comparative aspects of goat and sheep milk. **Small Ruminants Research**, v.22, p.177-185, 1996.

JOHNVESLY, B.; NAIK, G.R. Studies on production of thermostable alkaline proteas from thermophilic and alkaliphilic *Bacillus* sp. JB-99 in a chemically defined medium. **Process Biochemistry**, v.37, p.139-144, 2001.

JONES, F.S.; SIMMS, H.S. The bacteria growth inhibitor (lactenin) of milk: I. The preparation in concentrated form. **The Journal of Experimental Medicine**, v.51(2), p.327-339, 1930.

JOO, H.S.; CHANG, C.S. Production of protease from a new alkalophilic *Bacillus* sp. I-312 grown on soybean meal: optimization and some properties. **Process Biochemistry**, v.40, p.1263-1270, 2005.

KAPPEL, V.D.; COSTA, G.M., SCOLA, G., SILVA, A.F.; LANDELL, M.F.; VALENTE, P., SOUZA, D.G.; VANZ, D.C.; REGINATTO, F.H.; MOREIRA, J.C.F. Phenolic content and antioxidant and antimicrobial properties of fruits of (*Capsicum baccatum* L. var. pendulum) at different maturity stages. **Journal of Medicinal Food**, v.11(2), p.267–274, 2008.

KHARDENAVIS, A.A.; KAPLEY, A.; PUROHIT, H.J. Processing of poultry feathers by alkaline keratin hydrolyzing enzyme from *Serratia* sp. HPC 1383. **Waste Manage**, v.29, p.1409-1415, 2009.

KIM, D.O.; LEE, K.W.; LEE, H.J.; LEE, C.Y. Vitamin C equivalent antioxidant capacity (VCEAC) of phenolic phytochemicals. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.50, p.3713-3717, 2002.

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

KHANTAPHANT, S., BENJAKUL, S., KISHIMURA, H. Antioxidative and ACE inhibitory activities of protein hydrolysates from the muscle of brownstripe red snapper prepared using pyloric caeca and commercial proteases. **Process Biochemistry**, v.46, p.318-327, 2011.

KLOMPONG, V.; BENJAKUL, S.; KANTACHOTE, D.; SHAHIDI, F. Antioxidative activity and functional properties of protein hydrolysate of yellow stripe trevally (*Selaroides leptolepis*) as influenced by the degree of hydrolysis and enzyme type. **Food Chemistry**, v.102, p.1317-1327, 2007.

KORHONEN, H.; PIHLANTO, A. Bioactive peptides: novel applications for milk proteins. **Applied Biotechnology Food Science and Policy**, v.1, p.133-144, 2003.

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

KORHONEN, H.; PIHLANTO, A. Bioactive peptides: production and functionality. **International Dairy Journal**, v.16(9), p.945-960, 2006.

KORHONEN, H. Milk-derived bioactive peptides: from science to applications. **Journal of Functional Foods**, v.1, p.177-187, 2009.

KORNIŁŁOWICZ-KOWALSKA, T.; BOHACZ, J. Biodegradation of keratin waste: theory and practical aspects. **Waste Manage**, v.31, p.1689-1701, 2011.

KRISTINSSON, H.G.; RASCO, B.A. Biochemical and functional properties of atlantic salmon (*Salmo salar*) muscle proteins hydrolyzed with various alkaline proteases. **Journal of Agricultural Food and Chemistry**, v.48, p.657-666, 2000.

KUBLANOV, I.V.; PEREVALOVA, A.A.; SLOBODKINA, G.B.; LEBEDINSKY, A.V.; BIDZHIEVA, S.K.; KOLGANOVA, T.V.; KALIBERDA, E.N.; RUMSH, L.D.; HAERTLÉ, T.; BONCH-OSMOLOVSKAYA, E.A. Biodiversity of thermophilic prokaryotes with hydrolytic activities in hot springs of Uzon Caldera, Kamchatka (Russia). **Applied and Environmental Microbiology**, v.75, p.286-291, 2009.

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

KUMAR, A.G.; SWARNALATHA, S.; GAYATHRI, S.; NAGESH, N.; SEKARAN, G. Characterization of an alkaline active thiol forming extracellular serine keratinase by the newly isolated *Bacillus pumilus*. **Journal of Applied Microbiology**, v.104, p.411-419, 2008

LACROIX, I.M.E.; LI-CHAN, E.C.Y. Dipeptidyl peptidase-IV inhibitory activity of dairy protein hydrolysates. **International Dairy Journal**, v.25, p.97-102, 2012.

LAMBEIR, A.M.; DURINX, C.; SCHARPÉ, S.; DE MEESTER, I. Dipeptidyl-peptidase IV from bench to bedside: an update on structural properties, functions and clinical aspects of the enzyme DPP IV. **Critical Reviews in Clinical Laboratory Science**, v.40, p.209-294, 2003.

LEE, Y.J.; KIM, J.H.; KIM, H.K.; LEE, J.S. Production and characterization of keratinase from *Paracoccus* sp. WJ-98. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v.9, p.17-22, 2004.

LEE, J.S.; YOO, M.A.; KOO, S.H.; BAEK, H.H.; LEE, H.G. Antioxidant and ACE inhibitory activities of soybean hydrolysates: effect of enzyme and degree of hydrolysis. **Food Science Biotechnology**, v.17, p.873-877, 2008.

LI, G.H.; LE, G.W., SHI, Y.H.; SHRESTHA, S. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides derived from food proteins and their physiological and pharmacological effects. **Nutrition Research**, v.24, p.469-486, 2004.

LIGNITTO, L.; CAVATORTA, V.; BALZAN, S.; GABAI, G.; GALAVERNA, G., NOVELLI, E.; SFORZO, S.; SEGATO, S. Angiotensin-converting enzyme inhibitory activity of water-soluble extracts of Asiago d'allevio cheese. **International Dairy Journal**, v.20, p.11-17, 2010.

LISSI, E.; SALIM-HANNA, M.; PASCUAL, C.; DEL CASTILLO, M.D. Luminol luminescence induced by 2,2'-azo-bis(2-amidinopropane) thermolysis. **Free Radical Research Communications**, v.17, p.299-311, 1992.

LISSI, E.; SALIM-HANNA, M.; PASCUAL, C.; DEL CASTILLO, M.D. Evaluation of total antioxidant potential (TRAP) and total antioxidant reactivity from luminal enhanced chemiluminescence measurements. **Free Radical Biology and Medicine**, v.18, p.153-158, 1995.

LÓPEZ-EXPÓSITO, I.; GÓMEZ-RUIZ, J.A.; AMIGO, L.; RECIO, I. Identification of antibacterial peptides from ovine α_{s2} -casein. **International Dairy Journal**, v.16, p.1072-1080, 2006.

LÓPEZ-EXPÓSITO, I.; RECIO, I. Antibacterial activity of peptides and folding variants from milk proteins. **International Dairy Journal**, v.16, p.1294-1305, 2006.

LÓPEZ-FANDIÑO, R.; OTTE, J.; VAN CAMP, J. Physiological, chemical and technological aspects of milk protein derived peptides with antihypertensive and ACE inhibitory activity. **International Dairy Journal**, v.16, p.1277-1293, 2006.

LOWRY, O.H.; ROSENBERG, W.J.; FAAR, A.L.; RANDELL, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v.75, p.193-265, 1951.

MACEDO, A. Fraccionamento de lactosoro de ovelha por tecnologias de membranas e estudos das possíveis utilizações dos concentrados obtidos. Tese de Doutoramento. Universidade Técnica de Lisboa – Instituto Superior de Agronomia; 2010.

MACEDO, A.J.; SILVA, W.O.B.; TERMIGNONI, C. Properties of a non collagen-degrading *Bacillus subtilis* keratinase. **Canadian Journal of Microbiology**, v.54, p.180-188, 2008.

MADUREIRA, A.R., TAVARES, T., GOMES, A.M.P., PINTADO, M.E., MALCATA, F.X. Invited review: physiological properties of bioactive peptides obtained from whey proteins. **Journal of Dairy Science**, v.93, p.437-455, 2010.

MAES, W.; VAN CAMP, J.; VERMEIRSSSEN, V.; HEMERYCK, M.; KETELSLEGERS, J.M.; SCHREZENMEIER, J. Influence of the lactokinin Ala-Leu-Pro-Met-His-Ile-Arg (ALPMHIR) on the release of endothelin-1 by endothelial cells. **Regulatory Peptides**, v.118, p.105-109, 2004.

MANCZINGER, L.; ROZS, M.; C.S.V.; KEVEI, F. Isolation and characterization of a new keratinolytic *Bacillus licheniformis* strain. **The World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v.19, p.35-39, 2003.

MANNI, L.; GHORBEL-BELLAJ, O.; JELLOULI, K.; YOUNES, I.; NASRI, M. Extraction and characterization of chitin, chitosan, and protein hydrolysates prepared from shrimp waste by treatment with crude protease from *Bacillus cereus* SV1. **Applied Biochemistry Biotechnology**, v.162, p.345-57, 2010.

MANSO, M.A., LÓPEZ-FANDINO, R. Angiotensin I converting-enzyme-inhibitory activity of bovine, ovine, and caprine κ -casein macropeptides and their tryptic hydrolysates. **Journal of Food Protection**, v.66, p.168-174, 2003.

MAO, X.; CHENG, X.; WANG, X.; WU, S. Free-radical-scavenging and anti-inflammatory effect of yak milk casein before and after enzymatic hydrolysis. **Food Chemistry**, v.126, p.484-490, 2011.

MAO, X.Y.; NI, J.R.; SUN, W.L.; HAO, P.P.; FAN, L. Value-added utilization of yak milk casein for the production of angiotensin-I-converting enzyme inhibitory peptides. **Food Chemistry**, v.103, p.1282-1287, 2007.

MATSUI, T.; YAMADA, Y.; MITSUYA, H.; SHIGERI, Y.; YOSHIDA, Y.; SAITO, Y.; MATSUI, H.; WATANABE, K. Sustainable and practical degradation of intact chicken feathers by cultivating a newly isolated thermophilic *Meiothermus ruber* H328. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.82, p.941-950, 2009.

MCCANN, K.B.; SHIELL, B.J.; MICHALSKI, W.P.; LEE, A.; WAN, J.; ROGINSKI, H. Isolation and characterization of a novel antibacterial peptide from bovine α_{s1} -casein. **International Dairy Journal**, v.16, p.316-323, 2006.

MCINTOSH, C.H.S.; DEMUTH, H.U.; POSPISILIK, J.A.; PEDERSON, R. Dipeptidyl peptidase IV inhibitors: how do they work as new antidiabetic agents. **Regulatory Peptides**, v.128, p.159-165, 2005.

MEGIAS, C.; PEDROCHE, J.; YUST, M.M.; GIRON-CALLE, J.; ALAIZ, M.; MILLAN, F.; VIOQUE, J. Production of copper-chelating peptides after hydrolysis of sunflower proteins with pepsin and pancreatin. **LWT - Food Science and Technology**, v.41, p.1973-1977, 2008.

MEIRA, S.M.M.; DAROIT, D.J.; HELFER, V.E.; CORRÊA, A.P.F.; SEGALIN, J.; CARRO, S.; BRANDELLI, A. Bioactive peptides in water-soluble extracts of ovine cheeses from Southern Brazil and Uruguay. **Food Research International**, v.48, p.322-329, 2012.

MEISEL, H. Casokinins as inhibitors of angiotensin I converting enzyme. In: Sawatzki G, Renner, B (eds). New perspectives in infant nutrition. Thieme, Stuttgart, p.153-159, 1993.

MEISEL, H.; FITZGERALD, R.J. Biofunctional peptides from milk proteins: mineral binding and cytomodulatory effects. **Current Pharmaceutical Design**, v.9, p.1289-1295, 2003.

MEISEL, H. Multifunctional peptides encrypted in milk proteins. **Biofactors**, v.21, p.55-61, 2004.

MENSINK, M.; BLAAK, E.E.; CORPELEIJN, E.; SARIS, W.H.; DE BRUIN, T.W.; FESKENS, E.J. Lifestyle intervention according to general recommendations improves glucose tolerance. **Obesity Research**, v.11, p.1588-1596, 2003.

MENTLEIN, R.; GALLWITZ, B.; SCHMIDT, W.E. Dipeptidyl-peptidase IV hydrolyses gastric inhibitory polypeptide, glucagon-like peptide-1 (7-36) amide, and peptide histidine methionine and is responsible for their degradation in human serum. **European Journal of Biochemistry**, v.214, p.829-835, 1993.

MICHAELIDOU, A.M. Factors influencing nutritional and health profile of milk and milk proteins. **Small Ruminant Research**, v.79, p.42-50, 2008.

MIGUEL, M.; CONTRERAS, M.M.; RECIO, I.; ALEIXANDRE, A. ACE inhibitory and antihypertensive properties of a bovine casein hydrolysate. **Food Chemistry**, v.214, p.112-211, 2009.

MILLER, D.M.; BUETTNER, G.R.; AUST, S.D. Transition metals as catalysts of "autoxidation" reactions. **Free Radical Biology and Medicine**, v.8, p.95-108, 1990.

MINERVINI, F.; ALGARON, F.; RIZZELLO, C.G.; FOX, P.F.; MONNET, V.; GOBBETTI, M. Angiotensin I converting-enzyme-inhibitory and antibacterial peptides from *Lactobacillus helveticus* PR4 proteinase-hydrolyze caseins of milk from six species. **Applied and Environmental Microbiology**, v.69, p.5297-5305, 2003.

MILLS, S.; ROSS, R.P.; HILL, C.; FITZGERALD, G.F.; STANTON, C. Milk intelligence: mining milk for bioactive substances associated with human health. **International Dairy Journal**, v.21, p.377-401, 2011.

MITANI, H.; TAKIMOTO, M.; HUGHES, T.E.; KIMURA, M. Dipeptidyl peptidase IV inhibition improves impaired glucose tolerance in high-fat diet-fed rats: study using a fischer 344 rat substrain deficient in its enzyme activity. **The Japanese Journal of Pharmacology**, v.88, p.442-450, 2002.

MITSUIKI, S.; SAKAI, M.; MORIYAMA, Y.; GOTO, M.; FURUKAWA, K. Purification and some properties of keratinolytic enzyme from an alkaliphilic *Nocardiosis* sp. TOA-1. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v.66, p.164-167, 2002.

MOATSOU, G.; SAMOLADA, M.; KATSABEKI, A.; ANIFANTAKIS, E. Casein fraction of ovine milk from indigenous Greek breeds. **Lait**, v.84, p.285-296, 2004.

MOHAMEDIN, A.H. Isolation, identification and some cultural conditions of a protease producing thermophilic *Streptomyces* strain grown on chicken feathers as a substrate. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v.43, p.13-21, 1999.

MORAIS, H.A.; DE MARCO, L.M.; OLIVEIRA, M.C.; SILVESTRE, M.P.C. Casein hydrolysates using papain: peptide profile and encapsulation in liposomes. **Acta Alimentaria**, v.34(1), p.59-69, 2005.

MORR, C.V.; HA, Y.W. Whey protein concentrates and isolates: processing and functional properties. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.33 (6), p.341-476, 1993.

MORRONE, M.S.; ASSIS, A.M.; ROCHA, R.F.; GASPAROTTO, J.; GAZOLA, A.C.; COSTA, G.M.; ZUCOLOTTI, S.M.; CASTELLANOS, L.H.; RAMOS, F.A.; SCHENKEL, E.P.; REGINATTO, F.H.; GELAIN, D.P.; MOREIRA, J.C. *Passiflora manicata* (Juss.) aqueous leaf extract protects against reactive oxygen species and protein glycation in vitro and ex vivo models. **Food and Chemical Toxicology**, v.60, p.45-51, 2013.

MOSLEHISHAD, M.; EHSANI, M.R.; SALAMI, M.; MIRDAMADI, S.; EZZATPANAH, H.; NASLAJI, A.N.; MOOSAVI-MOVAHEDI, A.A. The comparative assessment of ACE-inhibitory and antioxidant activities of peptide fractions obtained from fermented camel and bovine milk by *Lactobacillus rhamnosus* PTCC 1637. **International Dairy Journal**, v.29, p.82-87, 2013.

MOTA, M.V.T.; FERREIRA, I.M.P.L.V.O.; OLIVEIRA, M.B.P.; ROCHA, C.; TEIXEIRA, J.A.; TORRES, D. Trypsin hydrolysis of whey protein concentrates: characterization using multivariate data analysis. **Food Chemistry**, v.94, p.278-286, 2006.

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

MULLALLY, M.M.; MEISEL, H.; FITZGERALD, R.J. Angiotensin-I-converting enzyme inhibitory activities of gastric and pancreatic proteinase digests of whey proteins. **International Dairy Journal**, v.7, p.299-303, 1997.

NAGAL, S.; JAIN, P.C. Feather degradation by strains of *Bacillus* isolated from decomposing feathers. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.41, p.196-200, 2010.

NAM, G.W.; LEE, D.W.; LEE, H.S.; LEE, N.J.; KIM, B.C.; CHOE, E.A.; HWANG, J.K.; SUHARTONO, M.T.; PYUN, Y.R. Native feather degradation by *Fervidobacterium islandicum* AW-1, a newly isolated keratinase producing thermophilic anaerobe. **Archives in Microbiology**, v.178, p.538-547, 2002.

NEHETE, P.N.; SHAH, V.D.; KOTHARI, R.M. Profiles of alkaline protease production as a function of composition of the slant, age, transfer and isolate number and physiological state of culture. **Biotechnology Letters**, v.7, p.413-418, 1985.

NEWBURG, D.S. Innate immunity and human milk. **Journal of Nutrition**, v.135, p.1308-1312, 2005.

NONGONIERMA, A.B.; FITZGERALD, R.J. Dipeptidyl peptidase IV inhibitory and antioxidative properties of milk-derived dipeptides and hydrolysates. **Peptides**, v.39, p.157-163, 2013a.

NONGONIERMA, A.B.; FITZGERALD, R.J. Dipeptidyl peptidase IV inhibitory properties of a whey protein hydrolysate: influence of fractionation, stability to simulated gastrointestinal digestion and food-drug interaction. **International Dairy Journal**, v.32, p.33-39, 2013b.

OKADA, Y.; OKADA, M. Scavenging effect of water soluble proteins in broad beans on free radicals and active oxygen species. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.46, p.401-406, 1998.

ONIFADE, A.A.; AL-SANE, N.A.; AL-MUSALLAN, A.A.; AL-ZARBAN, S.A. Review: Potentials for biotechnological applications of keratin-degrading microorganisms and their enzymes for nutritional improvement of feathers and other keratins as livestock feed resources. **Bioresource Technology**, v.66, p.1-11, 1998.

PARK, Y.W.; JUÁREZ, M.; RAMOS, M.; HAENLEIN, G.F.W. Physico-chemical characteristics of goat and sheep milk. **Small Ruminant Research**, v.68, p.88-113, 2007.

PENG, X.; KONG, B.; XIA, X.; LIU, Q. Reducing and radical-scavenging activities of whey protein hydrolysates prepared with Alcalase. **International Dairy Journal**, v.20, p.360-365, 2010.

PENG, X.; XIONG, Y.L.; KONG, B. Antioxidant activity of peptide fractions from whey protein hydrolysates as measured by electron spin resonance. **Food Chemistry**, v.113, p.196-201, 2009.

PHADUNGATH, C. Casein micelle structure: a concise review. **The Journal of Science and Technology**, v.27(1), p.201-212, 2005.

PHANTURAT, P.; BENJAKUL, S.; VISESSANGUAN, W.; ROYTRAKUL, S. Use of pyloric caeca extract from bigeye snapper (*Priacanthus macracanthus*) for the production of gelatin hydrolysate with antioxidative activity. **LWT - Food Science and Technology**, v.43, p.86-97, 2010.

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, p.643-654, 2009.

PIHLANTO-LEPPÄLÄ, A.; ROKKA, T.; KORHONEN, H. Angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides derived from bovine milk proteins. **International Dairy Journal**, v.8, p.325-331, 1998.

PIHLANTO, A. Bioactive peptides derived from bovine whey proteins: opioid and ACE-inhibitory peptides. **Trends in Food Science & Technology**, v.11, p.347-356, 2001.

PIHLANTO, A. Antioxidative peptides derived from milk proteins. **International Dairy Journal**, v.16, p.1306-1314, 2006.

PIHLANTO, A.; VIRTANEN, T.; KORHONEN, H. Angiotensin I converting enzyme (ACE) inhibitory activity and antihypertensive effect of fermented milk. **International Dairy Journal**, v.20, p.3-10, 2010.

PITKOWSKI, A.; DURAND, D.; NICOLAI, T. Structure and dynamical mechanical properties of suspensions of sodium caseinate. **Journal of Colloid and Interface Science**, v.326, p.96-102, 2008.

PONSANO, E.H.G.; PINTO, M.F.; CASTRO-GOMEZ, R.J.H. Soro de Leite - obtenção, características e aproveitamento: revisão. **Semina: Ciências Agrárias**, v.13(1), p.92-96, 1992.

POWNALL, T.L.; UDENIGWE, C.C.; ALUKO, R.E. Amino acid composition and antioxidant properties of pea seed (*Pisum sativum* L.) enzymatic protein hydrolysate fractions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.58, p.4712-4718, 2010.

PRAKASH, P.; JAYALAKSHMI, S.K.; SREERAMULU, K. Production of a keratinase by free and immobilized cells of *Bacillus halodurans* strain PPKS-2: partial characterization and its application in feather degradation and dehairing of the goat skin. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.160, p.1909-1920, 2010.

PRIOR, R.L.; WU, X.; SCHAICH, K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.53, p.4290-4302, 2005.

PRIPP, A.H.; ISAKSSON, T.; STEPANIAK, L.; SØRHAUG, T. Quantitative structure activity relationship modelling of ACE-inhibitory peptides derived from milk proteins. **European Food Research and Technology**, v.8, p.579-583, 2004.

PRIPP, A.H.; SØRENSEN, R.; STEPANIAK, L.; SØRHAUG, T. Relationship between proteolysis and angiotensin-I-converting enzyme inhibition in different cheeses. **LWT – Food Science and Biotechnology**, v.39, p.677-683, 2006.

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

RAYNAL-LJUTOVAC, K.; PARK, Y.W.; GAUCHERON, F.; BOUHALLAB, S. Heat stability and enzymatic modifications of goat and sheep milk. **Small Ruminant Research**, v.68, p.207-220, 2007.

RAWLINGS, N.D.; BARRETT, A.J. Evolutionary families of peptidases. **Biochemical Journal**, v.290, p.205-218, 1993.

RAWLINGS, N.D.; BARRETT, A.J. MEROPS: the peptidase database. **Nucleic Acids Research**, v.27, p.325-331, 1999.

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

RIFFEL, A.; BRANDELLI, A.; BELLATO, C.M.; SOUZA, G.H.M.F.; EBERLIN, M.N.; TAVARES, F.C.A. Purification and characterization of a keratinolytic metalloprotease from *Chryseobacterium* sp. kr6. **Journal of Biotechnology**, v. 128, p.693-703, 2007.

RIFFEL, A.; DAROIT, D.J.; BRANDELLI, A. Nutritional regulation of protease production by the feather degrading bacterium *Chryseobacterium* sp. kr6. **New Biotechnology**, v.28, p.153-157, 2011.

RIFFEL, A.; LUCAS, F.; HEEB, P.; BRANDELLI, A. Characterization of a new keratinolytic bacterium that completely degrades native feather keratin. **Archives of Microbiology**, v.179, p.258-265, 2003.

RISSEN, S.; ANTRANIKIAN, G. Isolation of *Thermoanaerobacter keratinophilus* sp. nov., a novel thermophilic, anaerobic bacterium with keratinolytic activity. **Extremophiles**, v.5, p.399-408, 2001.

RIVAL, S.G.; BOERIU, C.G.; WICHERS, H.J. Caseins and casein hydrolysates. 2. Antioxidative properties and relevance to lipoxygenase inhibition. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.49, p.295-302, 2001.

ROMAN, J.A.; SGARBIERI, V.C. Obtenção e caracterização química enutricional de diferentes concentrados de caseína. **Revista de Nutrição**, v.18(1), p.75-83, 2005.

ROSSINI, K.; NOREÑA, C.P.Z.; CLADERA-OLIVERA, F.; BRANDELLI, A. Casein peptides with inhibitory activity on lipid oxidation in beef homogenates and mechanically deboned poultry meat. **LWT Food Science and Technology**, v.42, p.862-867, 2009.

RUSS, W.; MEYER-PITTROFF, R. Utilizing waste products from the food production and processing industries. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.44(1), p.57-62, 2004.

SABADINI, E.; HUBINGER, M.D.; CUNHA, R.L. The effects of sucrose on the mechanical properties of acid milk proteins-κ-carrageenan gels. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v.23(1), p.55-65, 2006.

SAHA B.C.; HAYASHI K. Research review paper debittering of protein hydrolysates. **Biotechnology Advances**, v.19, p.355-370, 2001.

SAITO, T.; NAKAMURA, T.; KITAZAWA, H.; KAWAI, Y.; ITOH, T. Isolation and structural analysis of antihypertensive peptides that exist naturally in Gouda cheese. **Journal of Dairy Science**, v.83, p.1434-1440, 2000.

SANGALI, S.; BRANDELLI, A. Isolation and characterization of a novel feather-degrading bacterial strain. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.87, p.17-24, 2000a.

SANGALI, S.; BRANDELLI, A. Feather keratin hydrolysis by a *Vibrio* sp. strain kr2. **Journal of Applied Microbiology**, v.89, p.735-743, 2000b.

SARMADI, B.H.; ISMAIL, A. Antioxidative peptides from food proteins: a review. **Peptides**, v.31, p.1949-1956, 2010.

SCHÄGGER, H.; VON JAGOW, G. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. **Analytical Biochemistry**, v.166(2), p.368-379, 1987.

SCHEEN, A. J. Pharmacokinetics of dipeptidyl peptidase-4 inhibitors. **Diabetes Obesity and Metabolism**, v.12, p.648-658, 2010.

SCOPES, R. K. **Protein purification: principles and practice**. 3. ed. New York: Springer-Verlag, 1994.

SENPHAN, T.; BENJAKUL, S. Antioxidative activities of hydrolysates from seabass skin prepared using protease from hepatopancreas of Pacific white shrimp. **Journal of Functional Foods**, 2013. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jff.2013.10.001>

SGARBIERI, V.C. Proteínas em alimentos proteicos: propriedades, degradações, modificações. São Paulo: Varela, p.517, 1996.

SCHÄGGER, H.; VON JAGOW, G. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. **Analytical Biochemistry: Methods in the Biological Sciences**, v.166, p.368-379, 1987.

SHIMIZU, M. Food-derived peptides and intestinal functions. **BioFactors**, v.21, p.43-47, 2004.

SILVA, S.V.F.; MALCATA, X. Caseins as source of bioactive peptides. **International Dairy Journal**, v.15, p.1-15, 2005.

SILVA, J.G.; MORAIS, H.A.; SILVESTRE, M.P.C. Comparative study of the functional properties of bovine globin isolates and sodium caseinate. **Food Research International**, v.36(1), p.73-80, 2003a.

SILVA, J.G.; MORAIS, H.A.; OLIVEIRA, A.L.; SILVESTRE, M.P.C. Evaluating the incorporation of globin bovine and sodium caseinate on the raw batter quality and on the stability of ham pâté. **Meat Science**, v.63(2), p.177-184, 2003b.

SILVA, V.D.M.; SILVESTRE, M.P.C. Functional properties of bovine plasma intended for use as a functional ingredient in human food. **LWT - Food Science and Technology**, v.37(6), p.709-718, 2003c.

SILVA, S.V.; PIHLANTO, A.; MALCATA, F.X. Bioactive peptides in ovine and caprine cheese-like systems prepared with proteases from *Cynara cardunculus*. **Journal of Dairy Science**, v.89, p.3336-3344, 2006.

SILVEIRA, S.T.; CASARIN, F.; GEMELLI, S.; BRANDELLI, A. Thermodynamics and kinetics of thermal inactivation of a keratinase from *Chryseobacterium sp.* strain kr6. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.162, p.548-560, 2010.

SILVEIRA, S.T.; JAEGER, K.M.; BRANDELLI, A. Kinetic data and substrate specificity of a keratinase from *Chryseobacterium sp.* strain Kr6. **Society of Chemical Industry**, v.84, p.361-366, 2008.

SILVEIRA, S.T.; MARTÍNEZ-MAQUEDA, D.; RECIO, I.; HERNÁNDEZ-LEDESMA, B. Dipeptidyl peptidase-IV inhibitory peptides generated by tryptic hydrolysis of a whey protein concentrate rich in β -lactoglobulin. **Food Chemistry**, v.141, p.1072-1077, 2013.

SIRAICHI, J.T.G., FELIPE, D.F., BRAMBILLA, L.Z.S., GATTO, M.J., TERRA, V.A., CECCHINI, A.L., CORTEZ, L.E.R., RODRIGUES-FILHO, E., CORTEZ, D.A.G. Antioxidant capacity of the leaf extract obtained from *Arrabidaea chica* cultivated in southern Brazil. **PLoS ONE**, 8:e72733, p.9, 2013.

SISO, M.I.G. The biotechnological utilization of cheese whey: a review. **Bioresearch Technology**, v.57, p.1-11, 1996.

SRINIVAS, S.; PRAKASH, V. Bioactive peptides from bovine milk α -casein: isolation, characterization and multifunctional properties. **International Journal of Peptide Research and Therapeutics**, v.16, p.7-15, 2010.

SUN, Y.; PAN, D.; GUO, Y.; LI, J. Purification of chicken breast protein hydrolysate and analysis of its antioxidant activity. **Food and Chemical Toxicology**, v.50, p.3397-3404, 2012.

SZABO, L.; BENEDEK, A.; SZABO, M.L.; BARABAS, G. Feather degradation with a thermotolerant *Streptomyces graminofaciens* strain. **The World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v.16, p.252-255, 2000.

TAVANO, O.L. Protein hydrolysis using proteases: an important tool for food biotechnology. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.90, p.1-11, 2013.

THOMA, R.; LÖFFLER, B.; STIHLE, M.; HUBER, W.; RUF, A., HENNIG, M. Structure basis of proline-specific exopeptidase activity as observed in human dipeptidyl peptidase-IV. **Structure**, v.11, p.947-959, 2003.

THYS, R.C.S.; LUCAS, F.S.; RIFFEL, A.; HEEB, P.; BRANDELLI, A. Characterization of a protease of a feather-degrading *Microbacterium* species. **Letters of Applied Microbiology**, v.39, p.181-186, 2004.

TORRES, D.P.M. Gelificação térmica de hidrolisados enzimáticos de proteínas de soro de leite bovino. Comportamentos de sistemas aquosos mistos péptidos-polissacarídeos. (Dissertação Mestrado em Biotecnologia/Engenharia de Bioprocessos). Braga: Departamento de Engenharia Biológica da Universidade do Minho, p.118, 2005.

TORRUCO-UCO, J.G.; DOMÍNGUEZ-MAGAÑA, M.A.; DÁVILA-ORTÍZ, G.; MARTÍNEZ-AYALA, A.; CHEL-GUERRERO, L.A.; BETANCUR-ANCONA, D.A. Peptídeos antihipertensivos, uma alternativa de tratamento de origen natural: uma revisão. **Ciencia y Tecnología Alimentaria**, v.6(2), p.158-168, 2008.

TULIPANO, G.; SIBILIA, V.; CAROLI, A.M.; COCCHI, D. Whey proteins as source of dipeptidyl dipeptidase IV (dipeptidyl peptidase-4) inhibitors. **Peptides**, v.32, p.835-838, 2011.

TULIPANO, G.; COCCHI, D.; CAROLI, A. M. Comparison of goat and sheep β -lactoglobulin to bovine β -lactoglobulins potential source of dipeptidyl peptidase IV (DPP-4) inhibitors. **International Dairy Journal**, v.24, p.97-101, 2012.

UCHIDA, M.; OHSHIBA, Y.; MOGAMI, O. Novel dipeptidyl peptidase-4-inhibiting peptide derived from β -lactoglobulin. **Journal of Pharmacological Sciences**, v.117, p.63-66, 2011.

UDENIGWE, C.C.; LU, Y.L.; HAN, C.H.; HOU, W.C.; ALUKO, R.E. Flaxseed protein-derived peptide fractions: antioxidant properties and inhibition of lipopolysaccharide-induced nitric oxide production in murine macrophages. **Food Chemistry**, v.116, p.277-284, 2009.

UENISHI, H.; KABUKI, T.; SETO, Y.; SERIZAWA, A.; NAKAJIMA, H. Isolation and identification of casein-derived dipeptidyl-peptidase 4 (DPP-4)-inhibitory peptide LPQNIPPL from gouda-type cheese and its effect on plasma glucose in rats. **International Dairy Journal**, v.22, p.24-30, 2012.

UENO, K.; MIZUNO, S.; YAMAMOTO, N. Purification and characterization of an endopeptidase that has an important role in the carboxyl terminal processing of antihypertensive peptides in *Lactobacillus helveticus* CM4. **Letters in Applied Microbiology**, v.39, p.313-318, 2004.

VELARDE-SALCEDO, A.J; BARRERA-PACHECO, A.; LARA-GONZÁLZ, S.; MONTERO-MORÁN, G.M.; DÍAZ-GOIS, A.; MEJIA, E.G.D. In vitro inhibition of dipeptidyl peptidase IV by peptides derived from the hydrolysis of amaranth (*Amaranthus hypochondriacus* L.) proteins. **Food Chemistry**, v.136(2), p.758-764, 2012.

VIANA, F.R.; BIZZOTTO, C.S.; DIAS, D.R.; SILVESTRE, M.P.C. Effect of differen parameters on the quality of meat emulsions. **Food Technology and Biochemistry**, v.42(1), p.5-10, 2004.

VIANA, F.R.; DELVIVO, F.M. ; BIZZOTTO, C.S.; SILVA, V.D.M.; SILVESTRE, M.P.C. Quality of ham pâté incorporated of bovine globulin and plasma as fat replacers. **Meat Science**, v.70(1), p.153-160, 2005.

VIJAYALAKSHIMI, M.A.; LEMIEUX, L.; AMIOT, J. High performance size exclusion liquid chromatography of small molecular weight peptides from protein hydrolysates using methanol as a mobile phase additive. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v.9, p.3559-3576, 1986.

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

WISEMAN, A. **Manual de biotecnologia de los enzimas**. Aragoza: Acribia, p.444, 1991.

WALZEN, R.L.; DILLARD, C.J.; GERMAN, J.B. Whey components: millennia of evolution create functionalities for mammalian nutrition: what we know and what we may be overlooking. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.42, p.353-275, 2001.

WANG, S.L.; HSU, W.T.; LIANG, T.W.; YEN, Y.H.; WANG, C.L. Purification and characterization of three novel keratinolytic metalloproteases produced by *Chrysobacterium indologenes* TKU014 in a shrimp shell powder medium. **Bioresource Technology**, v.99, p.5679-5686, 2008.

WEST, D.W. Structure and function of the phosphorylated residues of casein. **Journal of Dairy Research**, v.53, p.333-352, 1986.

WHO. (2006). Definition and diagnosis of diabetes mellitus and intermediate hyperglycemia: report of a WHO/IDF consultation. Geneva, Switzerland: World Health Organisation. http://www.who.int/diabetes/publications/diagnosis_diabetes_2006/en/index.html.

WILLIAMS, C.M.; LEE, C.G.; GARLICH, J.D.; SHIH, J.C.H. Evaluation of a bacterial feather fermentation product, feather-lysate, as a feed protein. **Poultry Science**, v.70, p.85-94, 1991.

YAMAMOTO, N.; AKINO, A.; TAKANO, T. Antihypertensive effect of the peptides derived from casein by an extracellular proteinase from *Lactobacillus helveticus* CP790. **Journal of Dairy Science**, v.7, p.917-922, 1994.

YAMAMURA, S.; MORITA, Y.; HASAN, Q.; RAO, S.R.; MURAKAMI, Y.; YOKOYAMA, K.; TAMIYA, E. Characterization of a new keratin-degrading bacterium isolated from deer fur. **The Journal of Bioscience and Bioengineering**, v.93, p.595-600, 2002.

YAMAUCHI, K.; TOMITA, M.; GIEHL, T.J.; ELLISON, R.T. Antibacterial activity of lactoferrin and a pepsin-derived lactoferrin peptide fragment. **Infection and Immunity**, v.61, p.719-728, 1993.

YANG, R.; ZHANG, Z.; PEI, X.; HAN, X.; WANG, J.; WANG, L. Immunomodulatory effects of marine oligopeptide preparation from Chum Salmon (*Oncorhynchus keta*) in mice. **Food Chemistry**, v.113(2), p.464-470, 2009.

YUST, M.M.; PEDROCHE, J.; GIRÓN-CALLE, J.; ALAIZ, M.; MILLÁN, F.; VIOQUE, J. Production of ACE inhibitory peptides by digestion of chickpea legumin with Alcalase. **Food Chemistry**, v.81, p.363-369, 2003

ZHANG, L.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.10, p.2084-2089, 2010.

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, p.1296-1302, 2006.

ZHU, L.; CHEN, J.; TANG, X.; XIONG, Y.L. Reducing, radical scavenging, and chelation properties of in vitro digests of alcalase-treated zein hydrolysate. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.56, p.2714-2721, 2008a.

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

ZHOU, F.; XUE, Z.; WANG, J. Antihypertensive effects of silk fibroin hydrolysate by Alcalase and purification of an ACE inhibitory dipeptide. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.58, p.6735-6740, 2010.