

# RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)  
autor(a), o texto completo  
desta tese será  
disponibilizado somente  
a partir de 23/03/2020.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”  
Câmpus de São José do Rio Preto

JOSÉ ERICK GALINDO GOMES

Avaliação das atividades biológicas de peptídeos liberados a partir  
da hidrólise da caseína caprina por proteases sintetizadas por  
fungos filamentosos

São José do Rio Preto  
2018

JOSÉ ERICK GALINDO GOMES

Avaliação das atividades biológicas de peptídeos liberados a partir  
da hidrólise da caseína caprina por proteases sintetizadas por  
fungos filamentosos

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Engenharia e Ciência de Alimentos, junto ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. Câmpus de São José do Rio Preto.

Financiadora: FAPESP – Processo:  
2014/13700-3

Orientador: Prof. Dr. Roberto da Silva  
Co-orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Keila Aparecida  
Moreira

São José do Rio Preto  
2018

Gomes, José Erick Galindo.

Avaliação das atividades biológicas de peptídeos liberados a partir da hidrólise da caseína caprina por proteases sintetizadas por fungos filamentosos / José Erick Galindo Gomes. -- São José do Rio Preto, 2018  
240 f. : il.

Orientador: Roberto da Silva

Coorientador: Keila Aparecida Moreira

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Tecnologia de alimentos. 2. Hidrólise. 3. Caseína 4. Peptídeos 5. Fungos filamentosos. I. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. II. Título.

CDU – 582.28

## JOSÉ ERICK GALINDO GOMES

### Avaliação das atividades biológicas de peptídeos liberados a partir da hidrólise da caseína caprina por proteases sintetizadas por fungos filamentosos

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Engenharia e Ciência de Alimentos, junto ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. Câmpus de São José do Rio Preto.

Financiadora: FAPESP – Processo:  
2014/13700-3

#### Comissão Examinadora

Prof. Dr. Roberto da Silva  
UNESP – Câmpus de São José do Rio Preto  
Orientador

Prof. Dr. Adalberto Pessoa Júnior  
USP – São Paulo

Prof. Dr. Richard John Ward  
USP – Ribeirão Preto

Prof. Dr. Gustavo Orlando Bonilla Rodriguez  
UNESP – Câmpus de São José do Rio Preto

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Neuza Jorge  
UNESP – Câmpus de São José do Rio Preto

São José do Rio Preto  
23 de março de 2018

*Aos meus pais, Margarethe e José Cícero (in memoriam),  
que sempre me deram apoio incondicional em todas as  
etapas da minha vida e nunca mediram  
esforços para a minha educação.  
Dedico.*

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus por todas as oportunidades concedidas e pela força para superar os obstáculos e ultrapassar as barreiras impostas ao longo do percurso.

A Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, pela oportunidade e apoio concedido, fornecendo todo apoio estrutural e educacional. Ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, por fornecer um excelente nível de conhecimentos e possuir um corpo docente comprometido com a formação de mestres e doutores.

A agência de fomento CAPES pela concessão inicial da bolsa de pós-graduação.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP, pela concessão da bolsa de pós-graduação em nível de doutorado (Processo nº 2014/13700-3) e pela concessão da Bolsa Estágio de Pesquisa no Exterior – BEPE (Processo nº 2016/10289-6).

Ao meu orientador Prof. Dr. Roberto da Silva, por ter me aceitado como seu aluno, depositado em mim sua plena confiança e compartilhado seus ensinamentos ao longo destes quatro anos.

À minha co-orientadora, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Keila Aparecida Moreira, que me acompanha desde a graduação como minha orientadora de iniciação científica, estágio curricular e mestrado. Que sempre me deu apoio e oportunidades para chegar onde eu cheguei e foi de fundamental importância nesta conquista.

À minha supervisora de estágio no exterior, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Manuela Estevez Pintado, que me recebeu de braços abertos e me deu todo suporte para realização de parte da minha pesquisa, junto com a Escola Superior de Biotecnologia da Universidade Católica Portuguesa em Porto – Portugal.

Aos professores da banca do Exame de Qualificação, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Lúcia Barretto Penna e Prof. Dr. Gustavo Bonilla.

Aos professores da banca de defesa do Doutorado, por suas contribuições.

A minha família, em especial a minha Mãe e minha irmã Graziela, por sempre me apoiarem em minhas decisões de vida, tanto profissional, quanto pessoal, estando ao meu lado em todos os momentos. E ao meu sobrinho Diego Miguel, um presente dado por Deus que após o seu nascimento, renovou minhas forças quase esgotadas.

A Rodolfo, por todo amor, carinho, companheirismo, compreensão e apoio nos momentos mais difíceis.

A Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Eleni Gomes, por compartilhar toda estrutura do laboratório sem medir esforços para a realização deste trabalho, junto com todas as boas conversas na hora do cafezinho.

À minha grande amiga Íris Brunet, que foi imprescindível no caminho e na conquista deste título.

A todos os meus colegas de trabalho do Laboratório de Bioquímica e Microbiologia Aplicada do Ibilce-UNESP. Em especial aos grandes amigos que fiz ao longo desse período e que levarei para sempre: Isabel, Josiani, Pedro, Diego, Carol, Janaína, Angélica, Gabriela e Erik.

Às minhas amigas “brasucas” que fiz durante minha estadia em Portugal, verdadeiros presentes que deixaram minha vida mais alegre e leve durante esta etapa: Giovania, Glenise, Adriana, Fernanda e Cristiane.

Aos queridos amigos do “Besta Fera Origens - AP 275” que dividiram comigo durante um longo ano em Portugal, tanto os momentos tristes, quanto os felizes e me fizeram dar boas gargalhadas: Larissa, Ítalo, Marcelo, Rafael e Anderson.

Aos amigos do coração que sempre estiveram comigo, longe ou perto: Camila, Patrícia, Gualberto e Rosângela.



*“Foi o tempo que dedicastes à tua rosa que a fez tão importante”*

*Antoine de Saint-Exupéry*

## ESTRUTURA E ORGANIZAÇÃO DA TESE

Esta tese está organizada em seis capítulos para melhor distribuição e entendimento do assunto abordado. Um **Resumo** geral do trabalho foi inicialmente colocado, para orientar o leitor sobre a relevância e principais resultados obtidos no trabalho. Finalmente, após as seções de capítulos, uma seção de **Considerações finais** apresenta uma análise dos principais resultados e as conclusões obtidas no presente trabalho. **Capítulo I)** Procurou demonstrar a relevância científica e o estado da arte do tema abordado no trabalho e os objetivos almejados. A revisão, descreveu a estrutura e características da caseína; a ação das peptidases microbianas; a funcionalidade dos peptídeos quanto a suas propriedades biológicas e alguns problemas relacionados a eles. **Capítulo II)** Foram avaliados diferentes espécies de fungos filamentosos produtores de proteases com potencial para liberar peptídeos com atividades antimicrobianas, antioxidantes e anti-hipertensiva. **Capítulo III)** Descreveu-se a produção, purificação, caracterização bioquímica e termodinâmica da serina protease extracelular do fungo *Mucor subtilissimus* URM 4133. **Capítulo IV)** Descreveu-se a produção, purificação, caracterização bioquímica e termodinâmica da serina protease extracelular, do fungo filamentoso *Mucor guilliermondii* URM 5848. **Capítulo V)** Avaliou-se as atividades antimicrobianas, antioxidantes e anti-hipertensiva, dos peptídeos obtidos da hidrólise da caseína caprina a partir da serina protease purificada, sintetizada pelo fungo *M. subtilissimus* URM 4133. **Capítulo VI)** Foram avaliadas as mesmas atividades biológicas do capítulo anterior para os peptídeos provenientes da hidrólise da caseína caprina a partir da serina protease purificada, sintetizada pelo fungo filamentoso *M. guilliermondii* URM 5848. Todos os capítulos foram redigidos na forma de artigos científicos a serem submetidos, após correções e traduções ao inglês, a publicações em periódicos internacionais.

## RESUMO

Peptídeos bioativos são moléculas de origem natural que podem auxiliar funções fisiológicas nos organismos. O presente estudo teve por objetivo produzir proteases por diferentes fungos filamentosos, hidrolisar a caseína caprina e avaliar o potencial de atividades biológicas dos peptídeos liberados. Baseado nos resultados de grau de hidrólise (GH), que variou entre 33,59% e 71,81% e nas atividades biológicas, os fungos *Mucor subtilissimus* URM 4133 e *Mucor guilliermondii* URM 5848 foram escolhidos para dar continuidade ao trabalho. Para a purificação de ambas as enzimas foi utilizado inicialmente um planejamento fatorial  $2^4$ , com o intuito de verificar as melhores condições de produção enzimática. A atividade da protease foi máxima em pH 8,5 a 45 °C, para o *M. subtilissimus* URM 4133 e em pH 8,0 a 40 °C para a enzima do *M. guilliermondii* URM 5848; entretanto, permaneceram estáveis em praticamente toda faixa de pH e termoestáveis até 40°C e 45 °C, respectivamente. Ambas as proteases foram completamente inibidas pelo fluoreto de fenilmetanosulfonil (PMSF). As proteases purificadas de ambos os fungos foram utilizadas separadamente para hidrolisar a caseína caprina. Os hidrolisados obtidos no tempo de 12 horas apresentaram melhores resultados gerais de atividades biológicas tanto para a protease do fungo *M. subtilissimus* URM 4133, quanto para a protease do fungo *M. guilliermondii* URM 5848. A atividade anti-hipertensiva apresentou resultados de 92,57% e de 83,42% para a inibição da enzima conversora de angiotensina (ECA). Dentre as frações separadas em FLPC a fração P5 (URM 4133) e a fração P3 (URM 5848) apresentaram um  $IC_{50}$  de atividade anti-hipertensiva de 35,42 e 22,97  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , respectivamente. Os peptídeos liberados foram eficientes para desempenhar todas as atividades biológicas propostas, com destaque para a inibição da enzima ECA, o que mostrou o potencial destas moléculas em auxiliar no controle da pressão arterial.

Palavras-chave: Tecnologia de alimentos; Hidrólise; Caseína; Peptídeos; Fungos filamentosos

## **ABSTRACT**

*Bioactive peptides are molecules of natural origin that can aid physiological functions in organisms. The present study aimed to produce proteases by different filamentous fungi, to hydrolyze caprine casein and to evaluate the potential of biological activities of the released peptides. Based on the results of hydrolysis degree (GH), which varied between 33.59% and 71.81% and in biological activities, the fungi *Mucor subtilissimus* URM 4133 and *Mucor guilliermondii* URM 5848 were chosen to continue the work. For the purification of both enzymes, a factorial design  $2^4$  was used, in order to verify the best conditions of enzymatic production. Protease activity was maximal at pH 8.5 at 45 °C for *M. subtilissimus* URM 4133 and at pH 8.0 at 40 °C for the *M. guilliermondii* URM 5848 enzyme; however, remained stable in practically every pH range and thermostable up to 40 °C and 45 °C, respectively. Both proteases were completely inhibited by phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF). Purified proteases from both fungi were used separately to hydrolyze caprine casein. The hydrolysates obtained in the time of 12 hours presented better general results of biological activities both for the protease of the fungus *M. subtilissimus* URM 4133 and for the protease of the fungus *M. guilliermondii* URM 5848. The antihypertensive activity presented results of 92.57 % and 83.42% for inhibition of angiotensin converting enzyme (ACE). Among the fractions separated in FLPC, the fraction P5 (URM 4133) and the fraction P3 (URM 5848) presented an  $IC_{50}$  of antihypertensive activity of 35.42 and 22.97  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , respectively. The peptides released were efficient to perform all the proposed biological activities, with emphasis on the inhibition of the enzyme ACE, which showed the potential of these molecules to assist in the control of blood pressure.*

*Keywords: Food Technology; Hydrolysis; Casein; Peptides; Filamentous fungi*

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### Capítulo I:

- Figura 1** – Frações, submicela e micela de caseína. Fonte: Faria (2011).....34
- Figura 2** – Classificação de proteases de acordo com sua região de catálise. Fonte: Moffitt et al. (2010).....36
- Figura 3** – Modelo *barrel stave* de atividade antimicrobiana. Fonte: Brogden (2005).....43
- Figura 4** – Modelo *carpet* de atividade antimicrobiana. Fonte: Brogden (2005).....44
- Figura 5** – Modelo *toirodal* de atividade antimicrobiana. Fonte: Brogden (2005).....44
- Figura 6** – Liberação de casomorfina a partir da  $\beta$ -caseína A1 do leite de vaca.  $\beta$ -caseína A1 e A2 são variantes genéticas da proteína  $\beta$ -caseína do leite de vaca e se diferem por um aminoácido (A2 = Pro, A1 = His).....50

### Capítulo II:

- Figura 1** – Grau de hidrólise da caseína caprina utilizando as proteases produzidas pelos fungos *Penicillium decumbens* URM 6018, *Aspergillus viride-nutans* URM 6629, *Mucor guilliermondii* URM 5848, *Mucor subtilissimus* URM 4133 e *Mucor sp.* URM 4146, no planejamento fatorial  $2^3$ .....86
- Figura 2** – Gráficos de Pareto dos efeitos estimados para as variáveis no GH da caseína caprina hidrolisada pelas proteases produzidas pelos fungos *Penicillium decumbens* URM 6018 (A), *Aspergillus viride-nutans* URM 6629 (B), *Mucor guilliermondii* URM 5848 (C), *Mucor subtilissimus* URM 4133 (D) e *Mucor sp.* URM 4146 (E) de acordo com o planejamento fatorial  $2^3$ .....87
- Figura 3** – Gel de Tricina-SDS-PAGE 15,4% da caseína caprina, hidrolisada em função do tempo e da temperatura, ao pH 6,5, por protease do *Penicillium decumbens* URM 6018. Onde, PM (Padrão Molecular), CCNH (Caseína Caprina Não Hidrolisada), sendo os números 1-12 correspondentes aos ensaios do planejamento fatorial  $2^3$ .....88
- Figura 4** – Gel de Tricina-SDS-PAGE 15,4% da caseína caprina, hidrolisada em função do tempo e da temperatura, ao pH 6,5, por protease do *Aspergillus viride-nutans* URM 6629. Onde, PM (Padrão Molecular), CCNH (Caseína Caprina Não Hidrolisada), sendo os números 1-12 correspondentes aos ensaios do planejamento fatorial  $2^3$ .....88

**Figura 5** – Gel de Tricina-SDS-PAGE 15,4% da caseína caprina, hidrolisada em função do tempo e da temperatura, ao pH 6,5, por protease do *Mucor guilliermondii* URM 5848. Onde, PM (Padrão Molecular), CCNH (Caseína Caprina Não Hidrolisada), sendo os números 1-12 correspondentes aos ensaios do planejamento fatorial 2<sup>3</sup>.....89

**Figura 6** – Gel de Tricina-SDS-PAGE 15,4% da caseína caprina, hidrolisada em função do tempo e da temperatura, ao pH 6,5, por protease do *Mucor subtilissimus* URM 4133. Onde, PM (Padrão Molecular), CCNH (Caseína Caprina Não Hidrolisada), sendo os números 1-12 correspondentes aos ensaios do planejamento fatorial 2<sup>3</sup>.....89

**Figura 7** – Gel de Tricina-SDS-PAGE 15,4% da caseína caprina, hidrolisada em função do tempo e da temperatura, ao pH 6,5, por protease do *Mucor sp.* URM 4146. Onde, PM (Padrão Molecular), CCNH (Caseína Caprina Não Hidrolisada), sendo os números 1-12 correspondentes aos ensaios do planejamento fatorial 2<sup>3</sup>..... 90

### **Capítulo III:**

**Figura 1** – Gráfico de Pareto para os efeitos das variáveis independentes (Temperatura; Farelo de Trigo - F.T.; Farelo de Soja - F.S. e KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) na produção de protease pelo fungo *Mucor subtilissimus* URM 4133 de acordo com o planejamento fatorial completo 2<sup>4</sup>..... 121

**Figura 2** – Determinação da massa molecular do extrato bruto e das frações purificadas por SDS-PAGE (10%) e zimograma, das proteínas do fungo *Mucor subtilissimus* URM 4133. (A). SDS-PAGE: Coluna 1, marcador molecular de proteína; Coluna 2, extrato bruto. (B). SDS-PAGE: Coluna 1, marcador molecular de proteína; Colunas 2 – 7, frações coletadas no FPLC utilizando coluna Superdex 75 10/300 GL (GE Healthcare) de exclusão molecular, com alto grau de pureza nas Colunas 6 e 7. (C). Zimograma (10%) da protease purificada em FPLC. .... 122

**Figura 3** – (A). pH ótimo da protease purificada produzida por fermentação submersa pelo *Mucor subtilissimus* URM 4133, nos tampões citrato – fosfato (◆), Tris – HCl (■) e carbonato – bicarbonato (▲). (B). Estabilidade ao pH da protease purificada, produzida por fermentação submersa pelo *Mucor subtilissimus* URM 4133, nos tampões citrato – fosfato (◆), Tris – HCl (■) e carbonato – bicarbonato (▲), após 24 horas de incubação. .... 123

**Figura 4** – (A). Temperatura ótima da protease purificada, produzida por fermentação submersa pelo *Mucor subtilissimus* URM 4133. (B). Estabilidade térmica da protease purificada, produzida por fermentação submersa pelo *Mucor subtilissimus* URM 4133, durante 1 hora (◆); 2 horas (■); 8 horas (▲) e 24 horas (×) ..... 123

<b>Figura 5</b> – Gráfico do duplo recíproco (Lineweaver-Burk) da taxa inicial de hidrólise de azocaseína pela protease do fungo <i>Mucor subtilissimus</i> URM 4133 versus a concentração de azocaseína. As barras de erro representam o desvio padrão.....	124
<b>Figura 6</b> – Gráfico de Arrhenius para a determinação da energia de ativação ( $E_a$ ) da serina protease purificada produzida pelo fungo <i>Mucor subtilissimus</i> URM 4133.....	124
<b>Figura 7</b> – Gráfico de primeira-ordem da desnaturação térmica irreversível da serina protease purificada do <i>Mucor subtilissimus</i> URM 4133.....	125
<b>Figura 8</b> – Gráfico de Arrhenius para calcular a energia de ativação ( $E_d$ ) da inativação/desnaturação térmica irreversível da serina protease purificada do fungo <i>Mucor subtilissimus</i> URM 4133.....	125
<b>Figura 9</b> – (A). Análise do espectro de massa MALDI-TOF da serina protease purificada produzida pelo <i>Mucor subtilissimus</i> URM 4133. O PMF da massa observada foi realizado utilizando o sistema de busca MASCOT.....	126
<b>Figura 9</b> – (B). Algumas proteínas correspondentes do banco de dado UniProt com a massa observada da serina protease purificada de <i>Mucor subtilissimos</i> URM 4133. ....	126
<b>Capítulo IV:</b>	
<b>Figura 1</b> – Gráfico de Pareto para os efeitos das variáveis independentes (Temperatura; Farelo de Trigo - F.T.; Farelo de Soja - F.S. e $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) na produção de protease pelo fungo <i>Mucor guilliermondii</i> URM 5848 de acordo com o planejamento fatorial completo $2^4$ .....	158
<b>Figura 2</b> – Determinação da massa molecular do extrato bruto e das frações purificadas por SDS-PAGE (10%) e zimograma, das proteínas do fungo <i>Mucor guilliermondii</i> URM 5848. (A). SDS-PAGE: Coluna 1, marcador molecular de proteína; Coluna 2, extrato bruto. (B). SDS-PAGE: Coluna 1, marcador molecular de proteína; Colunas 2 – 5, frações coletadas no FPLC utilizando coluna Superdex 75 10/300 GL (GE Healthcare) de exclusão molecular, com alto grau de pureza na Coluna 5. (C). Zimograma (10%) da protease purificada em FPLC. ....	159
<b>Figura 3</b> – (A). pH ótimo da protease purificada produzida por fermentação submersa pelo <i>Mucor guilliermondii</i> URM 5848, nos tampões citrato – fosfato (◆), Tris – HCl (■) e carbonato – bicarbonato (▲). (B). Estabilidade ao pH da protease purificada, produzida por fermentação submersa pelo <i>Mucor guilliermondii</i> URM 5848, nos	

tampões citrato – fosfato (◆), Tris – HCl (■) e carbonato – bicarbonato (▲), após 24 horas de incubação. .... 160

**Figura 4** – (A). Temperatura ótima da protease purificada, produzida por fermentação submersa pelo *Mucor guilliermondii* URM 5848. (B). Estabilidade térmica da protease purificada, produzida por fermentação submersa pelo *Mucor guilliermondii* URM 5848, durante 1 hora (◆); 2 horas (■); 8 horas (▲) e 24 horas (×). .... 160

**Figura 5** – Gráfico do duplo recíproco (Lineweaver-Burk) da taxa inicial de hidrólise de azocaseína pela protease do fungo *Mucor guilliermondii* URM 5848 versus a concentração de azocaseína. As barras de erro representam o desvio padrão..... 161

**Figura 6** – Gráfico de Arrhenius para a determinação da energia de ativação ( $E_a$ ) da serina protease purificada produzida pelo fungo *Mucor guilliermondii* URM 5848. ....161

**Figura 7** – Gráfico de primeira-ordem da desnaturação térmica irreversível da serina protease purificada do *Mucor guilliermondii* URM 5848. .... 162

**Figura 8** – Gráfico de Arrhenius para calcular a energia de ativação ( $E_d$ ) da inativação/desnaturação térmica irreversível da serina protease purificada do fungo *Mucor guilliermondii* URM 5848. .... 162

**Figura 9** – (A). Análise do espectro de massa MALDI-TOF da serina protease purificada produzida pelo *Mucor guilliermondii* URM 5848. O PMF da massa observada foi realizado utilizando o sistema de busca MASCOT..... 163

**Figura 9** – (B). Algumas proteínas correspondentes do banco de dado UniProt com a massa observada da serina protease purificada de *Mucor guilliermondii* URM 5848. .... 163

## **Capítulo V:**

**Figura 1** – (A). Grau de hidrólise da caseína caprina no planejamento fatorial  $2^3$ . (B). Grau de hidrólise da caseína caprina a partir do ensaio 7 em função do tempo. As barras de erro representam o desvio padrão. .... 195

**Figura 2** – Gráfico de Pareto dos efeitos estimados para as variáveis no GH da caseína caprina hidrolisada pela protease purificada do fungo *Mucor subtilissimus* URM 4133 de acordo com o planejamento fatorial  $2^3$ . .... 195

**Figura 3** – (A). Gel de Tricina-SDS-PAGE do planejamento fatorial  $2^3$  da caseína caprina hidrolisada, sendo os números 1-12 correspondentes aos seus respectivos ensaios, M.M.: Marcador Molecular e NHC: Caseína não hidrolisada. (B). Gel de



Tricina-SDS-PAGE do ensaio 7 da hidrólise da caseína caprina em função do tempo, sendo os números 1-6 referentes aos tempos, 1h, 3h, 5h, 8h, 12h e 24h. ....	196
<b>Figura 4</b> – (A). Atividade antioxidante (%) do ABTS e DPPH dos hidrolisados (< 3 kDa) da caseína caprina em função do tempo. (B). Atividade antioxidante Equivalente ( $\mu\text{M}/\text{mL}$ ) do ABTS e DPPH dos hidrolisados (< 3 kDa) da caseína caprina em função do tempo. (C). Atividade antioxidante (%) do ABTS e DPPH das frações (< 3 kDa) de peptídeos, provenientes do ensaio de 12 horas. (D). Atividade antioxidante Equivalente ( $\mu\text{M}.\text{mL}^{-1}$ ) do ABTS e DPPH das frações (< 3 kDa) de peptídeos, provenientes do ensaio de 12 horas. ....	197
<b>Figura 5</b> – (A). Atividade de ORAC-FL dos hidrolisados (< 3 kDa) da caseína caprina em função do tempo. (B). Atividade de ORAC-FL das frações (< 3 kDa) de peptídeos, provenientes do ensaio de 12 horas. As barras de erro representam o desvio padrão. ....	198
<b>Figura 6</b> – (A). Atividade anti-hipertensiva (%) dos hidrolisados (< 3 kDa) da caseína caprina em função do tempo. (B). Atividade anti-hipertensiva das frações (< 3 kDa) de peptídeos provenientes do ensaio de 12 horas. As barras de erro representam o desvio padrão. ....	199
<b>Figura 7</b> – (A). Cromatograma de exclusão molecular das frações (< 3 kDa) dos peptídeos provenientes do ensaio de 12 horas de hidrólise da caseína caprina. (B). Cromatografia de exclusão molecular das frações (< 3 kDa) dos peptídeos provenientes do ensaio de 12 horas de hidrólise ao final da digestão intestinal de 120 minutos. ....	199

## Capítulo VI:

<b>Figura 1</b> – (A). Grau de hidrólise da caseína caprina no planejamento fatorial $2^3$ . (B). Grau de hidrólise da caseína caprina a partir do ensaio 7 em função do tempo. As barras de erro representam o desvio padrão. ....	234
<b>Figura 2</b> – Gráfico de Pareto dos efeitos estimados para as variáveis no GH da caseína caprina hidrolisada pela protease purificada do fungo <i>Mucor guilliermondii</i> URM 5848 de acordo com o planejamento fatorial $2^3$ . ....	235
<b>Figura 3</b> – (A). Gel de Tricina-SDS-PAGE do planejamento fatorial $2^3$ da caseína caprina hidrolisada, sendo os números 1-12 correspondentes aos seus respectivos ensaios, M.M.: Marcador Molecular e NHC: Caseína não hidrolisada. (B). Gel de Tricina-SDS-PAGE do ensaio 7 da hidrólise da caseína caprina em função do tempo, sendo os números 1-6 referentes aos tempos, 1h, 3h, 5h, 8h, 12h e 24h. ....	236

<b>Figura 4</b> – (A). Atividade antioxidante (%) do ABTS e DPPH dos hidrolisados (< 3 kDa) da caseína caprina em função do tempo. (B). Atividade antioxidante Equivalente ( $\mu\text{M}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) do ABTS e DPPH dos hidrolisados (< 3 kDa) da caseína caprina em função do tempo. (C). Atividade antioxidante (%) do ABTS e DPPH das frações (< 3 kDa) de peptídeos, provenientes do ensaio de 12 horas. (D). Atividade antioxidante Equivalente ( $\mu\text{M}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) do ABTS e DPPH das frações (< 3 kDa) de peptídeos, provenientes do ensaio de 12 horas. ....	237
<b>Figura 5</b> – (A). Atividade de ORAC-FL dos hidrolisados (< 3 kDa) da caseína caprina em função do tempo. (B). Atividade de ORAC-FL das frações (< 3 kDa) de peptídeos, provenientes do ensaio de 12 horas. As barras de erro representam o desvio padrão. ....	238
<b>Figura 6</b> – (A). Atividade anti-hipertensiva (%) dos hidrolisados (< 3 kDa) da caseína caprina em função do tempo. (B). Atividade anti-hipertensiva das frações (< 3 kDa) de peptídeos provenientes do ensaio de 12 horas. As barras de erro representam o desvio padrão. ....	239
<b>Figura 7</b> – (A) Cromatograma de exclusão molecular das frações (< 3 kDa) dos peptídeos provenientes do ensaio de 12 horas de hidrólise da caseína caprina. (B). Cromatografia de exclusão molecular das frações (< 3 kDa) dos peptídeos provenientes do ensaio de 12 horas de hidrólise ao final da digestão intestinal de 120 minutos. ....	239

## LISTA DE TABELAS

### Capítulo I:

**Tabela 1** – Peptídeos bioativos derivados de proteínas do leite. Fonte: Meisel; Bockelmann, 1999.....59

### Capítulo II:

**Tabela 1** – Matriz do planejamento fatorial  $2^3$  para analisar os fatores de influência no grau de hidrólise (GH) da caseína caprina por proteases de diferentes fungos filamentosos URM. ....80

**Tabela 2** – Atividade proteolítica total ( $\text{U.mL}^{-1}$ ) e atividade específica ( $\text{U.mg}^{-1}$ ) de proteases produzidas por fungos filamentosos URM. ....80

**Tabela 3** – Análise de variância (ANOVA), para o GH da caseína caprina por proteases do fungo *Penicillium decumbens* URM 6018 de acordo com o planejamento fatorial  $2^3$ . ....81

**Tabela 4** – Análise de variância (ANOVA), para o GH da caseína caprina por proteases do fungo *Aspergillus viride-nutans* URM 6629 de acordo com o planejamento fatorial  $2^3$ . ....81

**Tabela 5** – Análise de variância (ANOVA), para o GH da caseína caprina por proteases do fungo *Mucor guilliermondii* URM 5848 de acordo com o planejamento fatorial  $2^3$ . ....82

**Tabela 6** – Análise de variância (ANOVA), para o GH da caseína caprina por proteases do fungo *Mucor subtilissimus* URM 4133 de acordo com o planejamento fatorial  $2^3$ . ....82

**Tabela 7** – Análise de variância (ANOVA), para o GH da caseína caprina por proteases do fungo *Mucor* sp. URM 4146 de acordo com o planejamento fatorial  $2^3$ . ....83

**Tabela 8** – Atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, das frações entre 3 kDa – 10 kDa e < 3 kDa de peptídeos. Concentração de  $4 \text{ mg.mL}^{-1}$ . Os símbolos (+) e (-) indicam a presença ou ausência de inibição do crescimento microbiano, respectivamente. ....84

**Tabela 9** – Atividade sequestradora dos radicais ABTS e DPPH em (%), das frações de peptídeos com massas moleculares entre 3 kDa-10 kDa e < 3 kDa, hidrolisadas a partir de caseína caprina (Relação E/S = -1, Temperatura = +1 e Tempo = +1) . Concentração de  $4 \text{ mg.mL}^{-1}$ . ....84

**Tabela 10** – Atividade de inibição da enzima conversora de angiotensina (ECA) em %, a partir de hidrolisados da caseína caprina (Relação E/S = -1, Temperatura = +1 e Tempo = +1). Concentração de 1 mg.mL<sup>-1</sup>.....85

### **Capítulo III:**

**Tabela 1** – Matriz do planejamento fatorial completo 2<sup>4</sup> para analisar os fatores de influência na produção de protease pelos fungos *Mucor subtilissimus* URM 4133. ....117

**Tabela 2** – Matriz do planejamento fatorial fracionado 2<sup>4</sup>, contendo quatro pontos centrais associados com a variável resposta atividade proteásica total do fungo *Mucor subtilissimus* URM 4133. .... 117

**Tabela 3** – Análise de variância (ANOVA), para verificar a influências dos parâmetros utilizados no planejamento fatorial fracionado 2<sup>4</sup> sob a produção de protease pelo fungo *Mucor subtilissimus* URM 4133. .... 118

**Tabela 4** – Etapas de purificação para a protease do fungo *Mucor subtilissimus* URM 4133. .... 118

**Tabela 5** – Efeito de íons metálicos, surfactantes e inibidores na atividade da protease purificada produzida pelo fungo *Mucor subtilissimus* URM 4133. .... 119

**Tabela 6** – Parâmetros cinéticos e termodinâmicos da serina protease produzida pelo fungo *Mucor subtilissimus* URM 4133 em fermentação submersa utilizando farelo de soja e farelo de trigo como substratos..... 120

**Tabela 7** – Parâmetros cinéticos e termodinâmicos de desnaturação térmica irreversível da serina protease purificada do *Mucor subtilissimus* URM 4133..... 120

### **Capítulo IV:**

**Tabela 1** – Matriz do planejamento fatorial completo 2<sup>4</sup> para analisar os fatores de influência na produção de protease pelos fungos *Mucor guilliermondii* URM 5848. ....154

**Tabela 2** – Matriz do planejamento fatorial fracionado 2<sup>4</sup>, contendo quatro pontos centrais associados com a variável resposta atividade proteásica total do fungo *Mucor guilliermondii* URM 5848. .... 154

**Tabela 3** – Análise de variância (ANOVA), para verificar a influência dos parâmetros utilizados no planejamento fatorial fracionado 2<sup>4</sup> sob a produção de protease pelo fungo *Mucor guilliermondii* URM 5848. .... 155

**Tabela 4** – Etapas de purificação para a protease do fungo *Mucor guilliermondii* URM 5848. .... 155

<b>Tabela 5</b> – Efeito de íons metálicos, surfactantes e inibidores na atividade da protease purificada produzida pelo fungo <i>Mucor guilliermondii</i> URM 5848.....	156
<b>Tabela 6</b> – Parâmetros cinéticos e termodinâmicos da serina protease produzida pelo fungo <i>Mucor guilliermondii</i> URM 5848 em fermentação submersa utilizando farelo de soja e farelo de trigo como substratos.....	157
<b>Tabela 7</b> – Parâmetros cinéticos e termodinâmicos de desnaturação térmica irreversível da serina protease purificada do <i>Mucor guilliermondii</i> URM 5848.....	157
<b>Capítulo V:</b>	
<b>Tabela 1</b> – Matriz do planejamento fatorial 2 <sup>3</sup> para analisar os fatores de influência no grau de hidrólise (GH) da caseína caprina por protease purificada do fungo <i>Mucor subtilissimus</i> URM 4133.....	189
<b>Tabela 2</b> – Análise de variância (ANOVA), para o GH da caseína caprina por proteases do fungo <i>Mucor subtilissimus</i> URM 4133 de acordo com o planejamento fatorial 2 <sup>3</sup> . .....	189
<b>Tabela 3</b> – Atividade antimicrobiana em %, contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, dos hidrolisados (< 3 kDa) da caseína caprina, em função do tempo. Concentração de 500 µg.mL <sup>-1</sup> . .....	190
<b>Tabela 4</b> – Atividade antimicrobiana em %, contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, das frações (< 3 kDa) de peptídeos, provenientes do ensaio de 12 horas de hidrólise. Concentração de 500 µg.mL <sup>-1</sup> .....	190
<b>Tabela 5</b> – Atividade quelante de Cu <sup>2+</sup> e Fe <sup>2+</sup> em %, dos hidrolisados (< 3 kDa) da caseína caprina e das frações (< 3 kDa) de peptídeos provenientes do ensaio de 12 horas de hidrólise. Concentração de 250 µg.mL <sup>-1</sup> .....	191
<b>Tabela 6</b> – IC <sub>50</sub> da atividade anti-hipertensiva das frações (< 3 kDa) de peptídeos provenientes do ensaio de 12 horas de hidrólise. ....	191
<b>Tabela 7</b> – Atividades biológicas residuais do <i>pool</i> de hidrolisados (< 3 kDa) da caseína caprina, provenientes do ensaio de 12 horas, após o ensaio de digestão gastrointestinal. ....	192
<b>Tabela 8</b> – Peptídeos identificados por espectrometria de massa (MS/MS) das frações (< 3 kDa) provenientes do ensaio de 12 horas de hidrólise da caseína caprina....	193
<b>Capítulo VI:</b>	
<b>Tabela 1</b> – Matriz do planejamento fatorial 2 <sup>3</sup> para analisar os fatores de influencia no grau de hidrólise (GH) da caseína caprina por protease purificada do fungo <i>Mucor guilliermondii</i> URM 5848. ....	228

<b>Tabela 2</b> – Análise de variância (ANOVA), para o GH da caseína caprina por proteases do fungo <i>Mucor guilliermondii</i> URM 5848 de acordo com o planejamento fatorial 2 <sup>3</sup> . .....	228
<b>Tabela 3</b> – Atividade antimicrobiana em %, contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, dos hidrolisados (< 3 kDa) da caseína caprina, em função do tempo. Concentração de 500 µg.mL <sup>-1</sup> . .....	229
<b>Tabela 4</b> – Atividade antimicrobiana em %, contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, das frações (< 3 kDa) de peptídeos, provenientes do ensaio de 12 horas de hidrólise. Concentração de 500 µg.mL <sup>-1</sup> . .....	229
<b>Tabela 5</b> – Atividade quelante de Cu <sup>2+</sup> e Fe <sup>2+</sup> em %, dos hidrolisados (< 3 kDa) da caseína caprina e das frações (< 3 kDa) de peptídeos provenientes do ensaio de 12 horas de hidrólise. Concentração de 250 µg.mL <sup>-1</sup> . .....	230
<b>Tabela 6</b> – IC <sub>50</sub> da atividade anti-hipertensiva das frações (< 3 kDa) de peptídeos provenientes do ensaio de 12 horas de hidrólise. ....	230
<b>Tabela 7</b> – Atividades biológicas residuais do <i>pool</i> de hidrolisados (< 3 kDa) da caseína caprina, provenientes do ensaio de 12 horas, após o ensaio de digestão gastrointestinal. ....	231
<b>Tabela 8</b> – Peptídeos identificados por espectrometria de massa (MS/MS) das frações (< 3 kDa) provenientes do ensaio de 12 horas de hidrólise da caseína caprina. ....	232

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>µg</b>	Micrograma
<b>µL</b>	Microlitro
<b>AAPH</b>	2,2-azobis(2-metilpropianomidina) dihidroclorido
<b>ABTS</b>	2,2-azinobis-3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico
<b>ACN</b>	Acetonitrila
<b>BDA</b>	Batata dextrose ágar
<b>BSA</b>	Albumina de soro bovino
<b>CMH</b>	Caldo Mueller Hinton
<b>Da</b>	Dálon
<b>DMSO</b>	Dimetil sulfóxido
<b>DPPH</b>	2,2-difenil-1-picril-hidrazila
<b>ECA</b>	Enzima conversora de angiotensina
<b>EDTA</b>	Ácido etilenodiamino tetracético
<b>FAPGG</b>	N-[3-(2-Furil)acriloil-Phe-Gly-Gly
<b>GH</b>	Grau de hidrólise
<b>HCl</b>	Ácido clorídrico
<b>J</b>	Joule
<b>kDa</b>	Quilodálon
<b>kJ</b>	Quilojoule
<b>M</b>	Molar
<b>mg</b>	Miligrama
<b>mL</b>	Mililitro
<b>mM</b>	Milimolar
<b>mU</b>	Miliunidade
<b>nm</b>	Nanômetro
<b>PAGE</b>	Eletroforese em gel de poliacrilamida
<b>PMSF</b>	Fluoreto de fenilmetanosulfonil
<b>rpm</b>	Rotações por minuto
<b>SDS</b>	Dodecil sulfato de sódio
<b>TCA</b>	Ácido tricloroacético
<b>TFA</b>	Ácido trifluoroacético
<b>TNBS</b>	Ácido 2,4,6-trinitrobenzenosulfônico

<b>Tris</b>	2-Amino-2-(hidroximetil)-1,3-propanodiol
<b>TSB</b>	Caldo triptona de soja
<b>UFC</b>	Unidade formadora de colônia



## SUMÁRIO

<b>CAPÍTULO I:</b> .....	30
Introdução Geral e Revisão da Literatura.....	30
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	31
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	33
2.1. <b>Objetivo Geral</b> .....	33
2.2. <b>Objetivos Específicos</b> .....	33
<b>3. REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	33
3.1. <b>Caseína</b> .....	33
3.2. <b>Proteases</b> .....	35
3.3. <b>Mecanismos de ação das proteases</b> .....	37
3.4. <b>Peptídeos biologicamente ativos</b> .....	40
3.4.1. Peptídeos antimicrobianos.....	41
3.4.2. Peptídeos antioxidantes.....	45
3.4.3. Peptídeos anti-hipertensivos.....	47
3.5. <b>Peptídeos derivados da caseína também podem apresentar efeitos nocivos</b> .....	48
<b>4. REFERÊNCIAS</b> .....	50
<b>CAPÍTULO II:</b> .....	61
Avaliação das atividades biológicas de peptídeos liberados pela hidrólise da caseína caprina por proteases fúngicas.....	61
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	63
<b>2. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	64
2.1. <b>Micro-organismos</b> .....	64
2.2. <b>Produção de proteases</b> .....	64
2.3. <b>Atividade proteolítica e proteína total</b> .....	65
2.4. <b>Preparação da caseína caprina</b> .....	65
2.5. <b>Hidrólise da caseína caprina</b> .....	66
2.6. <b>Determinação do grau de hidrólise (GH)</b> .....	67
2.7. <b>Eletroforese Tricina-SDS-PAGE dos hidrolisados</b> .....	68
2.8. <b>Avaliação das atividades biológicas dos hidrolisados</b> .....	68
2.8.1. Atividade antimicrobiana.....	68
2.8.2. Atividade antioxidante.....	69
2.8.3. Atividade anti-hipertensiva.....	70

2.9.	<b>Análise estatística</b> .....	70
<b>3.</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	71
3.1.	<b>Produção de proteases</b> .....	71
3.2.	<b>Grau de hidrólise (GH)</b> .....	71
3.3.	<b>Eletroforese Tricina-SDS-PAGE dos hidrolisados</b> .....	73
3.4.	<b>Avaliação das atividades biológicas dos hidrolisados</b> .....	74
3.4.1.	Atividade antimicrobiana.....	74
3.4.2.	Atividade antioxidante.....	75
3.4.3.	Atividade anti-hipertensiva.....	76
<b>4.</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	76
<b>5.</b>	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	76
<b>CAPÍTULO III:</b> .....		91
Purificação, caracterização bioquímica, parâmetros cinéticos e termodinâmicos de uma nova serina protease de <i>Mucor subtilissimus</i> URM 4133.....		91
<b>1.</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	93
<b>2.</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	94
2.1.	<b>Micro-organismo</b> .....	94
2.2.	<b>Produção de protease</b> .....	94
2.3.	<b>Atividade proteolítica e proteína total</b> .....	95
2.4.	<b>Eletroforese SDS-PAGE e Zimograma</b> .....	95
2.5.	<b>Purificação da protease</b> .....	96
2.6.	<b>Caracterização bioquímica da protease purificada</b> .....	97
2.6.1.	Temperatura e pH ótimos.....	97
2.6.2.	Estabilidade a temperatura e ao pH.....	97
2.6.3.	Efeitos de íons metálicos, compostos orgânicos e inibidores na atividade proteásica.....	97
2.7.	<b>Determinação dos parâmetros cinéticos <math>K_m</math> e <math>V_{max}</math></b> .....	98
2.8.	<b>Energia de ativação e coeficiente de temperatura (<math>Q_{10}</math>)</b> .....	98
2.9.	<b>Termodinâmica da reação enzimática</b> .....	99
2.10.	<b>Determinação dos parâmetros cinéticos e termodinâmicos de inativação térmica</b> .....	100
2.11.	<b>Prospecção peptídica por espectrometria de massa (MALDI-TOF)</b> .....	101
<b>3.</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	101
3.1.	<b>Produção de protease</b> .....	101

<b>3.2. Purificação da protease.....</b>	<b>103</b>
<b>3.3. Caracterização bioquímica da protease purificada.....</b>	<b>103</b>
3.3.1. Efeito do pH na atividade enzimática e estabilidade.....	103
3.3.2. Efeito da temperatura na atividade enzimática e estabilidade.....	104
3.3.3. Efeitos de íons metálicos, compostos orgânicos e inibidores.....	105
<b>3.4. Parâmetros cinéticos <math>K_m</math> e <math>V_{max}</math>.....</b>	<b>106</b>
<b>3.5. Energia de ativação e coeficiente de temperatura (<math>Q_{10}</math>).....</b>	<b>106</b>
<b>3.6. Termodinâmica da reação enzimática.....</b>	<b>107</b>
<b>3.7. Parâmetros cinéticos e termodinâmicos de inativação térmica.....</b>	<b>108</b>
<b>3.8. Prospecção peptídica por espectrometria de massa (MALDI-TOF).....</b>	<b>110</b>
<b>4. CONCLUSÃO.....</b>	<b>111</b>
<b>5. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>112</b>
<b>CAPÍTULO IV:.....</b>	<b>127</b>
Uma nova serina protease de <i>Mucor guilliermondii</i> URM 5848: Purificação, caracterização bioquímica, parâmetros cinéticos e termodinâmicos.....	127
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>129</b>
<b>2. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>130</b>
2.1. Micro-organismo.....	130
2.2. Produção de protease.....	131
2.3. Atividade proteolítica e proteína total.....	131
2.4. Eletroforese SDS-PAGE e Zimograma.....	131
2.5. Purificação da protease.....	132
2.6. Caracterização bioquímica da protease purificada.....	133
2.6.1. Temperatura e pH ótimos.....	133
2.6.2. Estabilidade a temperatura e ao pH.....	133
2.6.3. Efeitos de íons metálicos, compostos orgânicos e inibidores na atividade proteásica.....	134
2.7. Determinação dos parâmetros cinéticos $K_m$ e $V_{max}$ .....	134
2.8. Energia de ativação e coeficiente de temperatura ( $Q_{10}$ ).....	135
2.9. Termodinâmica da reação enzimática.....	135
2.10. Determinação dos parâmetros cinéticos e termodinâmicos de inativação térmica.....	136
2.11. Prospecção peptídica por espectrometria de massa (MALDI-TOF).....	137
<b>3. Resultados e Discussão.....</b>	<b>137</b>

<b>3.1. Produção de protease</b> .....	137
<b>3.2. Purificação da protease</b> .....	139
<b>3.3. Caracterização bioquímica da protease purificada</b> .....	139
3.3.1. Efeito do pH na atividade enzimática e estabilidade.....	139
3.3.2. Efeito da temperatura na atividade enzimática e estabilidade.....	140
3.3.3. Efeitos de íons metálicos, compostos orgânicos e inibidores.....	141
<b>3.4. Parâmetros cinéticos <math>K_m</math> e <math>V_{max}</math></b> .....	142
<b>3.5. Energia de ativação e coeficiente de temperatura (<math>Q_{10}</math>)</b> .....	143
<b>3.6. Termodinâmica da reação enzimática</b> .....	143
<b>3.7. Parâmetros cinéticos e termodinâmicos de inativação térmica</b> .....	144
<b>3.8. Prospecção peptídica por espectrometria de massa (MALDI-TOF)</b> .....	147
<b>4. CONCLUSÃO</b> .....	147
<b>5. REFERÊNCIAS</b> .....	148
<b>CAPÍTULO V:</b> .....	164
Prospecção de peptídeos multifuncionais por hidrólise da caseína caprina com protease do fungo <i>Mucor subtilissimus</i> URM 4133: Avaliação das atividades antimicrobianas, antioxidantes e anti-hipertensivas.....	164
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	166
<b>2. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	167
<b>2.1. Obtenção da caseína caprina</b> .....	167
<b>2.2. Determinação da atividade proteolítica</b> .....	168
<b>2.3. Hidrólise da caseína caprina</b> .....	168
<b>2.4. Determinação do grau de hidrólise (GH)</b> .....	168
<b>2.5. Eletroforese Tricina-SDS-PAGE dos hidrolisados</b> .....	169
<b>2.6. Determinação da proteína total</b> .....	170
<b>2.7. Avaliação das atividades biológicas dos hidrolisados</b> .....	170
<b>2.8. Atividade antimicrobiana</b> .....	170
<b>2.9. Atividade antioxidante</b> .....	171
2.9.1. Atividade sequestradora de radicais ABTS <sup>•+</sup> e DPPH.....	171
2.9.2. Capacidade de absorção de radicais oxigênio (ORAC).....	172
2.9.3. Atividade quelante de íons metálicos.....	172
<b>2.10. Atividade inibitória da enzima conversora de angiotensina (ECA)</b> .....	173
<b>2.11. Avaliação do processo de digestão <i>in vitro</i> sob as atividades biológicas</b> .....	174

2.12. Cromatografia de exclusão molecular.....	174
2.13. Análise por espectrometria de massa.....	175
2.14. Análise estatística.....	175
<b>3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>176</b>
3.1. Grau de hidrólise (GH).....	176
3.2. Eletroforese Tricina-SDS-PAGE.....	176
3.3. Atividade antimicrobiana.....	177
3.4. Atividade antioxidante.....	178
3.4.1. Atividade sequestradora de radicais ABTS <sup>+</sup> e DPPH.....	178
3.4.2. Capacidade de absorção de radicais oxigênio (ORAC).....	179
3.4.3. Atividade quelante de íons metálicos.....	180
3.5. Atividade inibitória da enzima conversora de angiotensina (ECA).....	180
3.6. Avaliação do processo de digestão <i>in vitro</i> sob as atividades biológicas.....	181
3.7. Cromatografia de exclusão molecular.....	183
3.8. Espectrometria de massa.....	183
<b>4. CONCLUSÃO.....</b>	<b>184</b>
<b>5. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>184</b>
<b>CAPÍTULO VI:.....</b>	<b>200</b>
Propriedades bioativas de peptídeos obtidos a partir da hidrólise da caseína caprina por uma serina protease produzida pelo fungo <i>Mucor guilliermondii</i> URM 5848.....	200
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>202</b>
<b>2. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>204</b>
2.1. Obtenção da caseína caprina.....	204
2.2. Determinação da atividade proteolítica.....	204
2.3. Hidrólise da caseína caprina.....	204
2.4. Determinação do grau de hidrólise (GH).....	205
2.5. Eletroforese Tricina-SDS-PAGE dos hidrolisados.....	206
2.6. Determinação da proteína total.....	206
2.7. Avaliação das atividades biológicas dos hidrolisados.....	206
2.8. Atividade antimicrobiana.....	207
2.9. Atividade antioxidante.....	207
2.9.1. Atividade sequestradora de radicais ABTS <sup>+</sup> e DPPH.....	207
2.9.2. Capacidade de absorção de radicais oxigênio (ORAC).....	208

2.9.3. Atividade quelante de íons metálicos.....	209
<b>2.10. Atividade inibitória da enzima conversora de angiotensina (ECA).....</b>	<b>210</b>
<b>2.11. Avaliação do processo de digestão <i>in vitro</i> sob as atividades biológicas.....</b>	<b>210</b>
2.12. Cromatografia de exclusão molecular.....	211
2.13. Análise por espectrometria de massa.....	211
2.14. Análise estatística.....	212
<b>3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>212</b>
3.1. Grau de hidrólise (GH).....	212
3.2. Eletroforese Tricina-SDS-PAGE.....	213
3.3. Atividade antimicrobiana.....	214
3.4. Atividade antioxidante.....	215
3.4.1. Atividade sequestradora de radicais ABTS <sup>+</sup> e DPPH.....	215
3.4.2. Capacidade de absorção de radicais oxigênio (ORAC).....	216
3.4.3. Atividade quelante de íons metálicos.....	217
<b>3.5. Atividade inibitória da enzima conversora de angiotensina (ECA).....</b>	<b>217</b>
<b>3.6. Avaliação do processo de digestão <i>in vitro</i> sob as atividades biológicas.....</b>	<b>218</b>
3.7. Cromatografia de exclusão molecular.....	220
3.8. Espectrometria de massa.....	221
<b>4. CONCLUSÃO.....</b>	<b>222</b>
<b>5. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>222</b>
<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>240</b>

# **CAPÍTULO I:**

## **Introdução Geral e Revisão da Literatura**

## 1. INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, a busca do consumidor por alimentos conhecidos como funcionais, ou seja, que promovam benefícios à saúde, além do atendimento nutricional básico, encontra-se em constante crescimento. Esta vertente de mercado encontra-se em processo de evolução e é utilizada como uma estratégia potencial na prevenção de doenças crônicas, pelos seus benefícios fisiológicos ou redução dos riscos dessas doenças, independentemente de suas propriedades nutricionais (STRATTON et al., 2015).

Diversas substâncias com propriedades bioativas vêm sendo descritas junto com a sua funcionalidade na fisiologia do organismo, entre elas estão os peptídeos biologicamente ativos, moléculas derivadas de proteínas complexas que podem desempenhar diversos benefícios para a homeostase do organismo (UDENIGWE; ALUKO, 2012).

Em termos nutricionais, a composição de aminoácidos e a presença de fatores que limitem a biodisponibilidade das proteínas, por exemplo, são características importantes para determinar a qualidade desta macromolécula. Os peptídeos bioativos, além de possuírem elevado valor nutritivo, são capazes de gerar efeitos fisiológicos no organismo (SAAVEDRA et al., 2013).

Os principais efeitos fisiológicos atribuídos a estas moléculas abrangem atividades do tipo imunomodulatória, anti-hipertensiva, antitrombótica, antimicrobiana, antioxidante e efeitos opióides (ARTEMOVA et al., 2010; DI BERNARDINI et al., 2011; ROJAS-RONQUILLO et al., 2012; CHALAMAIAH et al., 2014). Outras atividades como potencial anti-inflamatório e atividade anticâncer também são descritas como efeitos auxiliares na manutenção da saúde dos consumidores (VO; RYO; KIM, 2013; U MAYAPARVATHI et al., 2014). Diversos trabalhos já tratam dos estudos e benefícios associados aos peptídeos, como por exemplo, os gerados a partir de proteínas de leite e derivados (MADUREIRA et al., 2010; CHOI et al., 2012).

Dessa forma, os peptídeos bioativos apresentam atualmente, grande interesse industrial. Neste sentido, a caseína, é considerada como uma importante fonte de fornecimento destas moléculas, as quais podem ser liberadas através do processo de digestão gastrointestinal, durante o processamento de alimentos, ou através da via proteolítica de enzimas exógenas provenientes de micro-organismos ou fontes vegetais (BRUNO et al., 2010).



A caseína bovina é a principal matéria-prima que tem sido estudada no mundo todo com este objetivo e apresenta resultados bastante interessantes (CHOI et al., 2012). Entretanto, pouco foi divulgado com a utilização da caseína caprina para a mesma finalidade. Isto se torna interessante, tanto para preencher uma lacuna científica, quanto pela oportunidade sócio-econômica que se vislumbra para incentivar ainda mais esta atividade agropecuária no país.

A caprinocultura de leite representa um ramo com alto potencial de exploração e necessita de maiores incentivos, principalmente por se destacar como atividade de elevado impacto socioeconômico para produtores rurais no Brasil. Tradicionalmente, a criação de caprinos é característica das regiões Nordeste, que detém 92% do rebanho caprino nacional, e Sudeste do país. Entretanto, vem se tornando representativa também no Rio Grande do Sul, onde a raça Saanen corresponde a uma das principais raças leiteiras presentes nestas regiões (GONÇALVES et al., 2001; SCHMIDT et al., 2009; AQUINO et al., 2016).

De forma geral, as principais proteínas presentes no leite caprino, também são as encontradas no leite bovino, tanto com relação às frações da caseína ( $\alpha_{S1}$ -,  $\alpha_{S2}$ -,  $\beta$ - e  $\kappa$ -), quanto às proteínas presentes no soro como a  $\beta$ -lactoglobulina e a  $\beta$ -lactoalbumina. Entretanto, ocorrem várias diferenças na composição e no conteúdo destas proteínas entre as raças caprinas, devido ao alto polimorfismo encontrado em quatro genes responsáveis pela síntese da molécula de caseína, com vários alelos (fortes, fracos e nulos) envolvidos neste processo (BALLABIO et al., 2011). Conseqüentemente, a mudança de alguns aminoácidos na sequência proteica faz com que se tenham mudanças nas atividades biológicas dos peptídeos. Este trabalho foi desenvolvido para alcançar os objetivos descrito a seguir.

positivo de resíduos de Arg (R) e Lys (K) também contribuem para potencializar este efeito inibidor (HERNÁNDEZ-LEDESMA; CONTRERAS; RECIO, 2011). Desta forma, pode-se observar neste trabalho que há a presença de várias sequências com estes resíduos de aminoácidos em sua composição, o que provavelmente conferiu os resultados expressivos de inibição da ECA.

#### 4. CONCLUSÃO

A utilização de planejamento estatístico fatorial  $2^3$  é eficiente para avaliar a forma com que os parâmetros testados influenciam na hidrólise da caseína caprina pela serina protease produzida pelo fungo *Mucor guilliermondii* URM 5848, o que confere um aumento considerável no GH. Os peptídeos liberados apresentam potencial para todas as atividades biológicas avaliadas, com destaque para as atividades antioxidantes e principalmente anti-hipertensiva. Os testes de digestão *in vitro* proporcionam um melhor entendimento sobre a resistência destes peptídeos frente as enzimas proteolíticas presentes no trato gastro intestinal. A identificação da sequência aminoácida por espectrometria de massas permite a identificação confiável dos peptídeos, muitos deles ainda não catalogados nos bancos de dados específicos.

#### 5. REFERÊNCIAS

- ABDEL-HAMID, M.; OTTE, J.; DE GOBBA, C.; OSMAN, A.; HAMAD, E. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity and antioxidante capacity of bioactive peptides derived from enzymatic hydrolysis of buffalo milk proteins. **International Dairy Journal**, v. 66, p. 91-98, 2017.
- ADLER-NISSEN, J. Determination of the degree of hydrolysis of food protein hydrolysates by trinitrobenzenesulfonic acid. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 27, p. 1256-1262, 1979.
- AGUILAR-TOALÁ, J. E.; SANTIAGO-LÓPEZ, L.; PERES, C. M.; PERES, C.; GARCIA, H. S.; VALLEJO-CORDOBA, B.; GONZÁLEZ-CÓRDOVA, A. F.; HERNÁNDEZ-MENDOZA, A. Assessment of multifunctional activity of bioactive peptides derived from fermented milk by specific *Lactobacillus plantarum* strains. **Journal of Dairy Science**, v. 100, p. 65-75, 2017.
- AHMED, A. S.; EL-BASSIONY, T.; ELMALT, L. M.; IBRAHIM H. R. Identification of potente antioxidant bioactive peptides from goat milk proteins. **Food Research International**, v. 74, p. 80-88, 2015.

ALMAAS, H.; ERIKSEN, E.; SEKSE, C.; COMI, I.; FLENGSRUD, R.; HOLM, H.; JENSEN, E.; JACOBSEN, M.; LANGSRUD, T.; VEGARUD, G. E. Antibacterial peptides derived from caprine whey proteins, by digestion with human gastrointestinal juice. **British Journal of Nutrition**, v. 106, p. 896-905, 2011.

ASOODEH, A.; YAZDI, M. M.; CHAMANI, J. Purification and characterisation of angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides from lysozyme hydrolysates. **Food Chemistry**, v. 131, p. 291–295, 2012.

BALTI, R.; BOUGATEF, A.; SILA, A.; GUILLOCHON, D.; DHULSTER, P.; NEDJAR-ARROUME, N. Temporary removal: Nine novel angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory peptides from cuttlefish (*Sepia officinalis*) muscle protein hydrolysates and antihypertensive effect of the potente active peptide in spontaneously hypertensive rats. **Food Chemistry**, v. 170, p. 519–525, 2015.

BEZERRA, V. S.; CAMPOS, J. F.; SILVA, R. A.; PORTO, T. S.; LIMA FILHO, J. F., PORTO, A. L. F. Biotechnological richness of the northeastern semi-arid region: antioxidant activity of casein hydrolysates from Moxotó goat milk (*Capra hircus Linnaeus*, 1758) obtained by papain action. **Food Science and Technology**, v. 33, p. 513-520, 2013.

BOUGHERRA, F.; DILMI-BOURAS, A.; BALTI, R.; PRZYBYLSKI, R.; ADOUI, F.; ELHAMEUR, H.; CHEVALIER, M.; FLAHAUT, C.; DHULSTER, P.; NAIMA, N. Antibacterial activity of new peptide from bovine casein hydrolyzed by a serine metalloprotease of *Lactococcus lactis* subsp *lactis* BR16. **Journal of Functional Foods**, v. 32, p. 112-122, 2017.

BROGDEN, N. K.; BROGDEN, K. A. Will new generations of modified antimicrobial peptides improve their potential as pharmaceuticals? **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 38, p. 217– 225, 2011.

CANABADY-ROCHELLE, L. L. S.; SELMECZI, K.; COLLIN, S.; PASC, A.; MUHR, L.; BOSCHI-MULLER, S. SPR screening of metal chelating peptides in a hydrolysate for their antioxidant properties. **Food Chemistry**, v. 239, p. 478-485, 2018.

CHEN, M.; LI, B. The effect of molecular weights on the survivability of casein-derived antioxidant peptides after the simulated gastrointestinal digestion. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 16, p. 341-338, 2012.

CONTRERAS, M. D. 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.

CONTRERAS, M. M.; SANCHEZ, D.; SEVILLA, M. A.; RECIO, I.; AMIGO, L. Resistance of casein-derived bioactive peptides to simulated gastrointestinal digestion. **International Dairy Journal**, v. 32, p. 71-78, 2013.

CORRÊA, A. P. F.; DAROIT D. J.; FONTOURA, R.; MEIRA S. M. M. SEGALINA J., BRANDELLI A. Hydrolysates of sheep cheese whey as a source of bioactive peptides

with antioxidant and angiotensin-converting enzyme inhibitory activities. **Peptides**, v. 61, p. 48-55, 2014.

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.

DI PIERRO, G., O'KEEFFE, M. B.; POYARKOV, A.; LOMOLINO, G.; FITZGERALD, R. J. Antioxidant activity of bovine casein hydrolysates produced by *Ficus carica L.*-derived proteínase. **Food Chemistry**, v. 156, p. 305-311, 2014.

EGITO, A. S.; GIRARDET, J. M.; LAGUNA, L. E.; POIRSON, C.; MOLLÉ, D.; MICLO, L.; HUMBERT, G.; GAILLARD, J. L. Milk – clotting activity of enzyme extracts from sunflower and *albizia* seeds and specific hydrolysis of bovine k- casein. **International Dairy Journal**, v. 17, p. 816-825, 2007.

EGITO, A. S.; ROSINHA, G. M. S.; LAGUNA, L. E.; MICLO, L.; GIRARDER, J. M.; GAILLARD, J. L. Método eletroforético rápido para detecção da adulteração do leite caprino com leite bovino. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 58, p. 932-939, 2006.

ELZOGHBY, A. O.; EL-FOTOH, W. S. A.; ELGINDY, N. A. Casein-based formulations as promising controlled release drug delivery systems. **Journal of Controlled Release**, v. 153, p. 206–216, 2011.

ESMAEILPOUR, M.; EHSANI, M. R.; AMINLARI, M.; SHEKARFOROUSH, S.; HOSEINI, E. Antimicrobial activity of peptides derived from enzymatic hydrolysis of goat milk caseins. **Comparative Clinical Pathology**, v. 25, p. 599-605, 2016.

ESPEJO-CARPIO, F. J.; GARCÍA-MORENO, P. J.; PEREZ-GALVEZ, R.; MORALES-MEDINA, R.; GUADIX, A.; GUADIX, E. M. Effect of digestive enzymes on the bioactive properties of goat milk protein hydrolysates. **International Dairy Journal**, v. 54, p. 21-28, 2016.

GOUGH, R.; O'CONNOR, P. M.; REA, M. C.; GOMEZ-SALA, B.; MIAO, S.; HILL, C.; BRODKORB, A. Simulated gastrointestinal digestion of nisin and interaction between nisin and bile. **LWT - Food Science and Technology**, v. 86, p. 530-537, 2017.

HERNÁNDEZ-LEDESMA, B.; CONTRERAS, M. D. M.; RECIO, I. Antihypertensive peptides: Production, bioavailability and incorporation into foods. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 165, n. 1, p. 23–35, 2011.

HERNÁNDEZ-LEDESMA, B.; GARCÍA-NEBOT, M. J.; FERNÁNDEZ-TOMÉ, S.; AMIGO, L.; RECIO, I. Dairy protein hydrolysates: Peptides for health benefits. **International Dairy Journal**, v. 38, n. 2, p. 82–100, 2014.

IBRAHIM, H. R.; AHMED, A. S.; MIYATA, T. Novel angiotensin-converting enzyme inhibitory peptides from caseins and whey proteins of goat milk. **Journal of Advanced Research**, v. 8, p. 63-71, 2017.

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

KIM, G.; JANG, H.; KIM, C. Antioxidant capacity of caseinophosphopeptides prepared from sodium caseinate using alcalase. **Food Chemistry**, v. 104, p. 1359–1365, 2007.

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

LI, D.; ZHAO, X. H., Glutaminase-induced deamidation and hydrolysis of casein and metal-chelating or ACE-inhibitory activity of the hydrolysates *in vitro*. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 46, p. 324–332, 2011.

LI, Z.; JIANG, A.; YUE, T.; WANG, J.; SU, J. Purification and identification of five novel antioxidant peptides from goat milk casein hidrolisates. **Jounal Dairy of Science**. v. 96, p. 4242-4251, 2013.

LIRA, T. B. F.; BEZERRA, V. S.; SILVA, F. O.; DIAS, G. M. P.; LIMA FILHO, J. L.; PORTO, T. S.; PORTO, A. L. F. Avaliação de variáveis que influenciam a hidrólise enzimática da caseína do leite de cabra Moxotó. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 45, p. 1036-1043, 2010.

LUO, Y.; PAN, K.; ZHONG, Q. Physical, chemical and biochemical properties of casein hydrolyzed by three proteases: Partial characterizations. **Food Chemistry**, v. 15, p. 5146-5154, 2014.

MINE, Y.; MA, F.; LAURIAU, S. Antimicrobial peptides released by enzymatic hydrolysis of hen egg white lysozyme. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 1088-1094, 2004.

MORENO-MONTORO, M.; OLALLA-HERRERA, M.; RUFÍAN-HENARES, J. A.; MARTÍNEZ, R. G.; MIRALLES, B.; BERGILLOS, T.; NAVARRO-ALARCÓN, M.; JAUREGI, P. Antioxidant, ACE-inhibitory and antimicrobial activity of fermented goat milk: activity and physicochemical property relationship of the peptide componentes. **Food & Function**, v. 8, n. 8, p. 2783-2791, 2017.

NAIR, P. K.; ALEXANDER, M.; DALGLEISH, D.; CORREDIG, M. Physico-chemical properties of casein micelles in unheated skim milk concentrated by osmotic stressing: Interactions and changes in the composition of the serum phase. **Food Hydrocolloids**, v. 34, p. 46-53, 2014.

NAKAMURA, Y.; YAMAMOTO, N.; SAKAI, K.; OKUBO, A.; YAMAZAKI, S.; TAKANO, T. Purification and characterization of antiotensin-I-converting enzyme inhibitors from sour milk. **JournalofDairy Science**, v. 78, p. 777-783, 1995.

PETRAT-MELIN, B.; ANDERSEN, P.; RASMUSSEN, J. T.; POULSEN, N. A.; LARSEN, L. B.; YOUNG, J. F. *In vitro* digestion of purified  $\beta$ -casein variants A<sup>1</sup>, A<sup>2</sup>, B,

and I: effects on antioxidant and angiotensin-converting enzyme inhibitory capacity. **Journal Dairy of Science**, v. 98, p. 15-26, 2015.

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

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

SÁNCHEZ-VIOQUE, R.; POLISSIOU, M.; ASTRAKA, K.; MOZOS-PASCUAL, M.; TARANTILIS, P.; HERRAIZ-PEÑALVER, D.; SANTANA-MÉRIDAS, O. Polyphenol composition and antioxidant and metal chelating activities of the solid residues from the essential oil industry. **Industrial Crops and Products**, v. 49, p. 150-159, 2013.

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

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

SILVA, N. C.; SARMENTO, B.; PINTADO, M. The importance of antimicrobial peptides and their potential for therapeutic use in ophthalmology. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 41, p. 5–10, 2013.

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

SU, R.; LIANG, M.; QI, W.; LIU, R.; YUAN, S.; HE, Z. Pancreatic hydrolysis of bovine casein: Peptide release and time-dependent reaction behavior. **Food Chemistry**, v. 133, p. 851–858, 2012.

TAGLIAZUCCHI, D.; SHAMSIA, S.; HELAL, A.; CONTE, A. Angiotensin converting enzyme inhibitory peptides from goats' milk released by *in vitro* gastro-intestinal digestion. **International Dairy Journal**, v. 71, p. 6-16, 2017.

WANG, B.; XIE, N.; LI, B. Charge properties of peptides derived from casein affect their bioavailability and cytoprotection against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced oxidative stress. **Journal of Dairy Science**, v. 99, p. 2468-2479, 2016.

WANG, C.; WANG, B.; LI, B. Bioavailability of peptides from casein hydrolysate *in vitro*: Amino acid compositions of peptides affect the antioxidant efficacy and resistance to intestinal peptidases. **Food Research International**, v. 81, p. 188-196, 2016.

WU, S.; QI, W.; LI, T.; LU, D.; SU, R.; HE, Z. Simultaneous production of multi functional peptides by pancreatic hydrolysis of bovine casein in an enzymatic membrane reactor via combinational chromatography. **Food Chemistry**, v. 141, p. 2944–2951, 2013.

WU, Z.; PAN, D.; ZHEN, X.; CAO, J. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides derived from bovine casein and identified by MALDI-TOF-MS/MS. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 93, p. 1331-1337, 2013.

XIE, N.; WANG, C.; AO, J.; LI, B. Non-gastrointestinal-hydrolysis enhances bioavailability and antioxidant efficacy of casein as compared with its *in vitro* gastrointestinal digest. **Food Research International**, v. 51, p. 114-122, 2013.

YOUNT, N. Y.; YEAMAN, M. R. Peptide antimicrobials: cell wall as a bacterial target. **Annals of The New York Academy of Sciences**, v. 1277, p. 127–138, 2013.

ZHANG, L.; LI, J.; ZHOU K. Chelating and radical scavenging activities of soy protein hydrolysates prepared from microbial proteases and their effect on meat lipid peroxidation. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 2084-2089, 2010.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este trabalho de tese apresenta resultados promissores e importantes para a contribuição científica na área de liberação de peptídeos biologicamente ativos com a utilização de caseína caprina como substrato. Sucintamente, os principais resultados foram os seguintes: A partir de 70 fungos filamentosos proteolíticos, previamente selecionadas, dois deles, os fungos *Mucor subtilissimus* URM 4133 e *Mucor guilliermondii* URM 5848 proporcionaram os melhores resultados quanto a produção de proteases com ação liberadora de peptídeo bioativos a partir da caseína caprina e foram escolhidos para dar continuidade aos trabalhos. Os planejamentos estatísticos utilizados foram ferramentas de suma importância, tanto para aumentar a produção de proteases, quanto para melhorar a hidrólise da caseína e conseqüentemente, a liberação dos peptídeos. Os estudos de purificação, caracterização bioquímica e termodinâmica das proteases mostraram que, tanto a do fungo *M. subtilissimus* URM 4133, quanto a do fungo *M. guilliermondii* URM 5848, foram completamente inibidas por PMSF, classificando-as como proteases serina, mas com propriedades bioquímicas e cinéticas diferentes. Análises das sequências destas proteases por MALDI-TOF sugerem tratar-se de enzimas novas ainda não catalogadas nos bancos de dados específicos. Os peptídeos selecionados (< 3 kDa), obtidos da hidrólise de caseína por estas proteases, foram bioativos, com grande potencial de atividades antimicrobianas e principalmente atividades antioxidantes e anti-hipertensivas. Com a análise por MALDI-TOF dos peptídeos foi possível identificar novas sequências peptídicas ainda não descritas nos bancos de dados. Também foi demonstrado que os peptídeos selecionados foram capazes de resistir ao processo de digestão gastrointestinal *in vitro*, uma vez que suas atividades biológicas foram preservadas consideravelmente, revelando seu potencial de utilização nas indústrias alimentícias, e/ou farmacêutica, principalmente aquelas voltadas à fabricação de alimentos funcionais. Finalmente, vale salientar que, o apoio financeiro concedido pela FAPESP, na forma da bolsa de doutorado no país processo n°: 2014/13700-3 e da Bolsa Estágio de Pesquisa no Exterior (BEPE), processo n°: 2016/10289-6, foi imprescindível para a realização e conclusão deste trabalho de tese e, conseqüentemente, para a obtenção de resultados tão significativos para a área científica.