

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)
autor(a), o texto completo desta tese
será disponibilizado somente a partir
de 18/02/2021.

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

Instituto de Biociências de Botucatu

Departamento de Química e Bioquímica

“Produção de proteases fúngicas e aplicação para a obtenção de
peptídeos bioativos”

MIRELLA ROSSITTO ZANUTTO ELGUI

Tese apresentada ao Instituto de Biociências,
Campus de Botucatu, UNESP, para obtenção do
título de Doutora no Programa de Pós-Graduação
em Biotecnologia, Área de concentração
Bioprocessos.

Orientadora: *Prof^a. Dr^a. Luciana Francisco Fleuri*

Co-orientador: *Prof. Dr. Deilson Elgui de Oliveira*

BOTUCATU, SP

2019

Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"

Instituto de Biociências de Botucatu

Departamento de Química e Bioquímica

"Produção de proteases fúngicas e aplicação para a obtenção de peptídeos bioativos"

MIRELLA ROSSITTO ZANUTTO ELGUI

Tese apresentada ao Instituto de Biociências,
Campus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título
de Doutora no Programa de Pós-Graduação em
Biotecnologia, Área de concentração *Bioprocessos*.

Orientadora: *Prof^a. Dr^a. Luciana Francisco Fleuri*

Co-orientador: *Prof. Dr. Deilson Elgui de Oliveira*

BOTUCATU, SP

2019

Programa de Pós-graduação em Biotecnologia

Distrito de Rubião Júnior s/n CEP 18618-000 Cx Postal 510 Botucatu-SP Brasil

Tel (14) 3880-0780 Fax (14) 3880-0780 posgraduacao@ibb.unesp.br

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: LUCIANA PIZZANI-CRB 8/6772

Elgui, Mirella Rossitto Zanutto.

Produção de proteases fúngicas e aplicação para a
obtenção de peptídeos bioativos / Mirella Rossitto Zanutto
Elgui. - Botucatu, 2019

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista
"Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de
Botucatu

Orientador: Luciana Francisco Fleuri

Coorientador: Deilson Elgui de Oliveira

Capes: 20800002

1. Biotecnologia. 2. Proteômica. 3. Fermentação em
estado sólido. 4. Peptídeos.

Palavras-chave: Atividades biológicas; Biotecnologia;
Fermentação em estado sólido; Peptídeos bioativos;
Proteômica.

Dedicatória

À minha fonte inesgotável de motivação: minha família.

Agradecimentos

À Deus, por me permitir estudar na universidade que eu sempre sonhara.

Meu mais profundo sentimento de gratidão para toda minha família, que me proporciona momentos únicos de amor. Principalmente meus pais, Roseli e José Antonio; aos meus “ingleses”, Murillo, Alessandra, Vitor e Renato; e toda minha família Elgui, Terezinha, Alexandra, Ana Amélia, Allanah, Vinícius, Victor e Lucas. Em especial, agradeço à minha sogra, Terezinha Elgui Severo, e minha tia Rosane Albertini Rossitto de Marchi, que foram meu porto cuidando de minha bebê e me permitindo cumprir um doutorado associado à maternidade.

Às minhas filhas, Marina e Cecília. Minhas jóias fantásticas que colocam brilho nos meus olhos me fazem criar novos sonhos todos os dias.

À minha orientadora, Prof^a. Dr^a. Luciana Francisco Fleuri, por toda brandura e apoio, cuja flexibilidade me tornou mais produtiva e apaixonada. Pela edificante transformação que causou na minha formação. Pelos quatro anos maravilhosos que passei sob sua orientação. Pela doce amizade e pela enorme disposição em me ajudar a realizar meus sonhos. Meu mais profundo agradecimento.

Ao meu marido e co-orientador, Prof. Dr. Deilson Elgui de Oliveira, que é meu lar e cujo amor transformou meus dias de branco e preto para colorido. Por todo apoio e ensinamentos que me reconfiguraram profissionalmente, por não facilitar o processo para mim e assim, me tornar mais forte. Pela inteligência prodigiosa e delicada que me estimula intelectualmente e pessoalmente. Por ser o grande amor da minha vida.

À rica e competente equipe de amigos do Laboratório de Bioprocessos, com a qual desfrutei de muitas agradabilíssimas horas na companhia de vocês. Vocês todos moram no meu coração. Especialmente à Débora Zanoni do Prado pela receptividade prestativa, generosa e atenta ao ler e auxiliar nas correções dos meus trabalhos e por toda amizade inestimável que tenho certeza que iremos levar para além do doutorado.

Às competentes e eficazes parcerias realizadas com o Grupo Virican, principalmente ao João R. Zamae, pela amizade e companheirismo na realização de experimentos e a Bárbara G. M. Cohan e Brayan S. L. Castañeda, pelos maravilhosos momentos de conversas iluminadas. E também ao Laboratório de Bioanalítica e Metaloproteômica - LBM, por toda a atenção acolhedora do Prof. Dr. Pedro de Magalhães Padilha e ao Dr. José Cavalcante Vieira pelos ensinamentos, companheirismo e amizade na área da proteômica.

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), ao Instituto de Biociências (IBB), ao Instituto de Biotecnologia (IBTEC) e ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Brasil, pelo auxílio com a bolsa concedida (código financiamento 001) que tornou factível a realização deste trabalho.

Ao Instituto de Biotecnologia (IBTEC), no qual encontrei o ambiente ideal para que a maior parte deste trabalho fosse escrito, desfrutando de um ambiente preciosamente harmônico e com companhias enriquecedoras.

Para todos que, diretamente ou indiretamente, me auxiliaram nesta fase de transformação.

Meus mais sinceros agradecimentos,

Mirella Rossitto Zanutto Elgui

“Com o tempo ficará cada vez mais patente que sucesso em experimentos efetuados sem planejamento e documentação adequadas reflete sorte. Por outro lado, SUCESSO em experimentos efetuados com planejamento e documentação bem elaboradas reflete empenho e competência”.

Deilson Elgui de Oliveira

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	11
LISTA DE FIGURAS.....	15
LISTA DE TABELAS E QUADRO	18
PREÂMBULO.....	19
CAPÍTULO 1: “PEPTÍDEOS BIOATIVOS PRODUZIDOS POR AÇÃO DE PROTEASES OBTIDAS POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO: UMA REVISÃO”	21
RESUMO.....	23
ABSTRACT.....	24
1 INTRODUÇÃO	25
2 PROTEASES.....	28
2.1 Classificações	28
2.2 Fontes	30
2.3 Mercado.....	31
3 FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO.....	32
3.1 Vantagens da Fermentação em Estado Sólido	33
3.2 Inovação e Pesquisa com Fermentação em Estado Sólido.....	35
4 PEPTÍDEOS BIOATIVOS DO LEITE	36
5 ATIVIDADES BIOLÓGICAS DE PEPTÍDEOS BIOATIVOS	39
5.1 Atividade Antimicrobiana	40
5.2 Atividade Antioxidante.....	43
5.3 Atividade Antineoplásica	47
6 CONCLUSÃO	53
7 REFERÊNCIAS.....	54
OBJETIVOS.....	71
CAPÍTULO 2: “PRODUÇÃO DE PEPTÍDEOS DE LEITE COM PROPRIEDADE ANTIMICROBIANA E ANTIOXIDANTE POR PROTEASES FÚNGICAS”	72
RESUMO.....	74
ABSTRACT.....	75
RESUMO GRÁFICO	76
1 INTRODUÇÃO	77
2 MATERIAL E MÉTODOS	79
2.1 Cultura Fúngica e Produção de Proteases	79
2.2 Produção de Pools de Peptídeos Bioativos Derivados de Leite	80
2.3 Atividade Antimicrobiana de Pools de BaPs Derivados de Leite.....	82
2.4 Atividade Antioxidante de Pools de BaPs Derivados de Leite	83

2.5	<i>Análise Proteômica</i>	83
2.6	<i>Análise Estatística</i>	84
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	84
3.1	<i>Produção de Proteases</i>	84
3.2	<i>Produção de Peptídeos Bioativos Derivados de Leite</i>	86
3.3	<i>Atividade Antimicrobiana de Pools de BaPs Derivados de Leite</i>	87
3.4	<i>Atividade Antioxidante de Pools de BaPs Derivados de Leite</i>	90
3.5	<i>Análise Proteômica</i>	92
4	CONCLUSÃO	98
5	AGRADECIMENTOS	98
6	REFERÊNCIAS	99

CAPÍTULO 3: “PEPTÍDEOS BIOATIVOS DE LEITE HUMANO COM ATIVIDADES BIOLÓGICAS

PRODUZIDOS POR AÇÃO DE PROTEASES FÚNGICAS”103

	RESUMO	105
	ABSTRACT	106
	RESUMO GRÁFICO	107
1	INTRODUÇÃO	107
2	MATERIAL E MÉTODOS	110
2.1	<i>Micro-organismos</i>	110
2.2	<i>Produção de Proteases</i>	110
2.3	<i>Produção de Pools de Peptídeos Derivados de Leite Humano</i>	111
2.4	<i>Atividade Antimicrobiana de Pools de Peptídeos Derivados de Leite Humano</i>	112
2.5	<i>Atividade Antioxidante de Pools de Peptídeos Derivados de Leite Humano</i>	112
2.6	<i>Análise Proteômica</i>	113
2.7	<i>Análise Estatística</i>	113
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	114
3.1	<i>Produção de Proteases e de Pools de Peptídeos Derivados de Leite Humano</i>	114
3.2	<i>Atividade Antimicrobiana de Pools de Peptídeos Derivados de Leite Humano</i>	114
3.3	<i>Atividade Antioxidante de Pools de Peptídeos Derivados de Leite Humano</i>	117
3.4	<i>Análise Proteômica</i>	118
4	CONCLUSÃO	124
5	AGRADECIMENTOS	124
6	REFERÊNCIAS	125

CAPÍTULO 4: “MÉTODO DE OBTENÇÃO DE PEPTÍDEOS BIOATIVOS INIBIDORES DE

PYTHIUM INSIDIOSUM”131

1	ANÁLISE TÉCNICA	133
1.1	<i>Problema</i>	133
1.2	<i>Solução do Problema</i>	135
1.3	<i>Desvantagens e/ou Limitações</i>	136

2	ANÁLISE MERCADOLÓGICA.....	136
2.1	Aplicações e Usos.....	136
2.2	Diferencial e Concorrência.....	136
3	PROPRIEDADE INTELECTUAL (PI) ANTERIOR OU SIMILAR.....	136
3.1	Propriedade Intelectual Anterior	136
3.2	Propriedade Intelectual Similar	136
4	ESTÁGIO DO DESENVOLVIMENTO	139
4.1	Produto.....	139
4.2	Processo.....	139
4.3	Fármaco.....	140
4.4	Software	140
4.5	Cultivar	140
4.6	Detalhes do Estágio de Desenvolvimento	140
5	ESTÁGIO DE TRANSFERÊNCIA.....	144
5.1	Interesse em Transferir a Tecnologia para o Mercado	144
5.2	Disponibilidade para Realização de um Vídeo.....	144
5.3	Contato com mercado.....	144
5.4	Parceiros em Potencial	144
5.5	Divulgação Comercial.....	144
5.6	Podinovar.....	144
6	REGULAMENTAÇÃO	144
6.1	Patrimônio Genético.....	144
7	FOMENTO	145
7.1	Fomento.....	145
7.2	Linha de Fomento Obtida	145
8	DIVULGAÇÃO.....	145
8.1	Divulgação Parcial ou Total do Invento.....	145
9	REFERÊNCIAS.....	146
	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	150
2	REFERÊNCIAS.....	151
	ANEXOS	152
I.	ANÁLISE DE BIOCAMPATIBILIDADE CELULAR <i>IN VITRO</i>	153
1	OBJETIVOS	153
2	MATERIAL E MÉTODOS	153
3	RESULTADOS.....	155
II.	ARTIGO PUBLICADO	157
III.	COMUNICAÇÃO DE PATENTE	158
IV.	PERSPECTIVAS FUTURAS DO TRABALHO.....	159
V.	PRODUÇÕES E PARTICIPAÇÕES EM EVENTOS NO QUADRIÊNIO 2015-2019.....	160

LISTA DE ABREVIATURAS

AAPH	2,2'- azobis-metilpropionamidim-dihidroclorido
ABTS	ácido 2,2'-azinobis(3-etilbenzenotiazolina6-sulfônico)
ACN	Acetonitrila
AF	<i>Aspergillus flavipes</i>
AmBic	Bicarbonato de amônio
AO	<i>Aspergillus oryzae</i>
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATP	Adenosina trifosfato
AUC	<i>Area Under Curve</i> -Área de decaimento sob a curva
BaPs	Peptídeos bioativos
BAMLET	<i>Bovine α-lactalbumin made lethal to tumor cells</i>
bis-AAF-R110	bis-alanilalanil-fenilalanil-rodamina-110
BHA	Butilhidroanisol
BHT	Butilhidroxitolueno
BF40	Peptídeo derivado de leite bovino obtido por hidrólise com protease fúngica de <i>Aspergillus flavipes</i> parcialmente purificada por <i>salting-out</i> a 40%
BF60	Peptídeo derivado de leite bovino obtido por hidrólise com protease fúngica de <i>Aspergillus flavipes</i> parcialmente purificada por <i>salting-out</i> a 60%
BF80	Peptídeo derivado de leite bovino obtido por hidrólise com protease fúngica de <i>Aspergillus flavipes</i> parcialmente purificada por <i>salting-out</i> a 80%
BO40	Peptídeo derivado de leite bovino obtido por hidrólise com protease fúngica de <i>Aspergillus oryzae</i> parcialmente purificada por <i>salting-out</i> a 40%
BO60	Peptídeo derivado de leite bovino obtido por hidrólise com protease fúngica de <i>Aspergillus oryzae</i> parcialmente purificada por <i>salting-out</i> a 60%

BO80	Peptídeo derivado de leite bovino obtido por hidrólise com protease fúngica de <i>Aspergillus oryzae</i> parcialmente purificada por <i>salting-out</i> a 80%
CAGR	<i>Compound Annual Growth Rate</i>
CHAPS	3-[(3-colamidopropil)dimetilamônio]-1-propanosulfonato
CIM/MIC	Concentração Inibitória Mínima- <i>Minimal Inhibition Concentration</i>
DMEM	<i>Dulbecco 's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimetilsufóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DO	Densidade óptica
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazila
DTT	Ditiotreitol
EC	<i>Enzyme Comission</i>
ESI	Ionização <i>electrospray</i>
FDA	<i>Food and drug administration</i>
FES/SSF	Fermentação em estado sólido- <i>Solid-state fermentation</i>
FS	Fermentação submersa
FIOCRUZ	Instituto Oswaldo Cruz
GF-AFC	glicil-fenilalanil-amino fluorocumarina
GF40	Peptídeo derivado de leite caprino obtido por hidrólise com protease fúngica de <i>Aspergillus flavipes</i> parcialmente purificada por <i>salting-out</i> a 40%
GF60	Peptídeo derivado de leite caprino obtido por hidrólise com protease fúngica de <i>Aspergillus flavipes</i> parcialmente purificada por <i>salting-out</i> a 60%
GF80	Peptídeo derivado de leite caprino obtido por hidrólise com protease

	fúngica de <i>Aspergillus flavipes</i> parcialmente purificada por <i>salting-out</i> a 80%
GI(%)	Porcentagem de inibição de crescimento bacteriano
Gly	Glicina
GO40	Peptídeo derivado de leite caprino obtido por hidrólise com protease fúngica de <i>Aspergillus oryzae</i> parcialmente purificada por <i>salting-out</i> a 40%
GO60	Peptídeo derivado de leite caprino obtido por hidrólise com protease fúngica de <i>Aspergillus oryzae</i> parcialmente purificada por <i>salting-out</i> a 60%
GO80	Peptídeo derivado de leite caprino obtido por hidrólise com protease fúngica de <i>Aspergillus oryzae</i> parcialmente purificada por <i>salting-out</i> a 80%
GRAS	<i>Generally recognized as safe</i>
HAMLET	<i>Human α-lactalbumin made lethal to tumor cells</i>
HAT	Transferência de hidrogênio
HEK293	Células de epitélio renal embrionário humano
His	Histidina
HIV	Vírus de imunodeficiência humana
HMBaPs	Peptídeos bioativos derivados de leite humano
IAA	Idoacetoamida
IEF	Focalização isoeletrica
INCQS	Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
IOC	Instituto Oswaldo Cruz
Leu	Leucina

Lf	Lactoferrina
LPS	Lipopolissacarídeo
Lys	Lisina
MTT	(3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)2,5-difenil-2H-tetrazólio-bromido)
NADH	Dinucleotídeo de nicotinamida adenina
ORAC	Capacidade de Absorbância do Radical Oxigênio
PDA	Ágar Batata Dextrose
RNA	Ácido ribonucleico
ROO	Radical peroxila
ROS	Espécies reativas de oxigênio
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SISGEN	Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético
STR	<i>Short tandem repeats</i>
TBARS	<i>Thiobarbituric acid reactive substances</i>
TE	Trolox equivalente
Trp	Triptofano
Tyr	Tirosina
UFC	Unidade formadora de colônia
UHT	<i>Ultra High Temperature</i>
Val	Valina

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

Figura 1. Classificação das proteases quanto ao ponto de clivagem e sítio catalítico. A- alanina; F- fenilalanina; G- glicina; K- lisina; L- leucina; P- prolina; R- arginina; S- serina; V- valina; W- triptofano; Xaa- aminoácido randômico; Y- tirosina. Original da autora.....27

Figura 2. Quantidade de patentes solicitadas de inovações com fermentação em estado sólido (FES) (A). Porcentagem de patentes solicitadas pelos países com atividade mais significativa com FES (B). Porcentagem de patentes solicitadas de acordo área biotecnológica (C). Original da autora.....33

Figura 3. Diferentes atividades biológicas de peptídeos gerados pela hidrólise de proteínas de leite com proteases produzidas por fermentação em estado sólido empregando fungos filamentosos e substrato proteico constituído de resíduo agroindustrial. Original da autora.....37

Figura 4. Mecanismos descritos de ação de peptídeos antimicrobianos em células eucarióticas. (A) Interação com a membrana celular: (1) formação de poros tipo barril em bastão, (2) formação de poros toroidais, e (3) formação de tapete sobre membrana com liberação de micelas. (B) Inibição da síntese de DNA. (C) Inibição da síntese de RNA. (D) Inibição das enzimas ligases de membrana. (E) Inibição de síntese proteica. (F) Bloqueio de chaperonas. (G) Alterações mitocondriais: (1) inibição da respiração celular, (2) rompimento da membrana mitocondrial.....40

Figura 5. Princípio da atividade de eliminação de radical DPPH (TEIXEIRA et al., 2013).....44

Figura 6. Mecanismo do ensaio de Capacidade de Absorbância do Radical Oxigênio (ORAC). Original da autora.....45

Figura 7. Exemplos de mecanismos propostos de ação de peptídeos com atividade antineoplásica. Ações membranolíticas, necróticas e apoptóticas (A); propriedades anti-angiogênicas (B); ações sobre receptores de superfície celular (C); inibição de síntese de DNA (D); ativação de resposta imunitária (E). Original da autora.....50

CAPÍTULO 2

Figura 1. Atividade proteolítica de enzimas produzidas por *Aspergillus oryzae* ATCC 1003 (AO) e *Aspergillus flavipes* ATCC 16814 (AF) por fermentação em estado sólido em substratos de resíduos agroindustriais. Atividade de proteases parcialmente purificadas em farelo de trigo para frações definidas de acordo com a quantidade de sal de sulfato de amônio utilizada no processo de purificação [(NH₄)₂SO₄ 40%, 60% e 80%]. Os valores são apresentados como médias $\pm$ DP, $p \leq 0,05$ (Tukey-Kramer).....82

Figura 2. Atividade antimicrobiana de *pools* de peptídeos bioativos de leite bovino (B) e caprino (G) gerados por hidrólise com proteases de *Aspergillus oryzae* (ATCC 1003) (O) e *Aspergillus flavipes* (ATCC 16814) (F) parcialmente purificadas a 40%, 60% e 80% por *salting-out* e produzidas por fermentação em estado sólido. (A) Atividade antibacteriana por difusão em disco. (B) GO80 contra *Pseudomonas aeruginosa*, BO80 contra *Salmonella Enteritidis*, com gentamicina 10 µg (controle positivo); GF80 contra *Candida albicans*, com anfotericina B a 2 mg mL⁻¹ (controle positivo). (C) Porcentagem de inibição do crescimento (GI%) contra *Staphylococcus aureus*. (D) GI% contra *Escherichia coli*. (E) Atividade antifúngica por difusão em disco. Os valores foram apresentados como médias ± DP, p ≤ 0,05 (Modelo Linear Generalizado com Distribuição Gama). Diferenças significativas (*) entre os maiores e menores halos de inibição no ensaio de difusão em disco e a melhor concentração de peptídeos para GI%.....85

Figura 3. Capacidade de Absorção Radical de Oxigênio (ORAC) de *pools* de peptídeos bioativos (BaPs) isolados de leite bovino (B) e caprino (G) hidrolisados com proteases fúngicas de *Aspergillus oryzae* (ATCC 1003) (O) e *Aspergillus flavipes* (ATCC 16814) (F) parcialmente purificado a 40%, 60% e 80% através de fermentação em estado sólido, branco (controle negativo- produzido com proteases inativadas) e ácido ascórbico (controle positivo). Amostras estatisticamente diferentes foram representadas por letras diferentes, b (valores comparados ao branco). As medidas foram comparadas por teste de Tukey-Kramer p ≤ 0,05 (* ≠ entre amostras: * < ** < ***)......88

Figura 4. Spots de SDS-poliacrilamida 2D-PAGE (pI 3 a 10) de peptídeos isolados de leite de bovino (B) e de cabra (G), que foram hidrolisados com proteases fúngicas de *Aspergillus oryzae* (ATCC 1003) (O) e *Aspergillus flavipes* (ATCC 16814) (F) - parcialmente purificada a 40% e 80% pelo método de *salting-out* e derivada de proteínas do leite caracterizadas por espectrometria de massa ESI-MS/MS. (a) BO40: (1 e 2) albumina; (3) α-s1-caseína, queratina II; (4 e 5) β-lactoglobulina; (6) α-lactalbumina, β-lactoglobulina; (7) α-lactalbumina. (b) BO80: (8 e 9) α-s1-caseína; (10) β-lactoglobulina; (11 e 12) α-s2-caseína; (13, 14 e 15) β-lactoglobulina; (16) queratina II; (17) α-lactalbumina. (c) GF40: (18) albumina; (19, 20 e 21) α-s2-caseína; (22). α-s1-caseína, β-caseína; (23). α-s1-caseína, α-s2-caseína, β-caseína; (24, 25, 26 e 27) β-lactoglobulina; (28) α-lactalbumina; (29 e 30) κ-caseína; (31) β-caseína. d) GO40: (32) α-s1-caseína; (33) α-s1-caseína, β-caseína; (34 e 35). α-s2-caseína, β-caseína; (36 e 37) κ-caseína; (38) β-lactoglobulina; (39) α-lactalbumina.....91

Figura 5. Caracterização por espectrometria de massas (ESI-MS/MS) de peptídeos bioativos obtidos da hidrólise do leite bovino (B) e caprino (G) com proteases fúngicas de *Aspergillus oryzae* (ATCC 1003) (O) e *Aspergillus flavipes* (ATCC 16814) (F) parcialmente purificado a 40%, 60% e 80% por *salting out* e produzidas por fermentação em estado sólido com substrato de farelo de trigo conduzido. A-alanina. R-arginina. N-asparagina. D- ácido aspártico. C-cisteína. Q-glutamina. E-ácido glutâmico. G-glicina. H-histidina. I- isoleucina. L-leucina. K-lisina. M-metionina. F-fenilalanina. P-prolina. Serina. T-treonina. W-triptofano. Y-tirosina. V-valina.....92

CAPÍTULO 3

Figura 1. Atividades biológicas de *pools* de peptídeos derivados de leite humano (HMBaPs) obtidos a partir da ação proteolítica de proteases de *Aspergillus oryzae* (ATCC 1003) geradas a partir de fermentação em estado sólido. (A) Atividade antifúngica (ensaio de difusão em disco) de HMBaPs contra *Candida albicans*. Proteases inativadas como controle negativo e anfotericina B (2 mg mL⁻¹) como controle positivo. (B) Atividade antibacteriana (ensaio de difusão em disco) de HMBaPs contra *Salmonella Enteritidis*. Proteases inativadas como controle negativo e gentamicina 10g como controle positivo. *p <0,0001. (C) Atividades antibacterianas de HMBaPs obtidas por difusão em disco. *p <0,0001. (D) Atividades antifúngicas de HMBaPs obtidas por difusão em disco. (E) Atividade antioxidante de HMBaPs obtida pelo ensaio ORAC, onde A1 e B1 são amostras de doadoras de leite diferentes cuja reação enzimática foi paralisada com ácido acético e A2 e B2 tiveram a reação paralisada por ebulição.....113

Figura 2. (A e B) *Spots* de SDS-poliacrilamida 2D-PAGE (pI 3 a 10) de *pool* peptídeos isolados de leite humano obtidos por hidrólise com proteases fúngicas de *Aspergillus oryzae* (ATCC 1003) - parcialmente purificada a 80% pelo método de *salting-out*. **(C)** Porcentagem de proteínas parentais que originaram os peptídeos bioativos identificadas pela análise proteômica. **(D)** Caracterização das caseínas quanto à sequência de aminoácidos, proteína de acesso e sequências peptídicas identificadas por espectrometria de massas (ESI-MS/MS). A-alanina. R-arginina. N-asparagina. D- ácido aspártico. C-cisteína. Q-glutamina. E-ácido glutâmico. G-glicina. H-histidina. I- isoleucina. L-leucina. K-lisina. M-metionina. F-fenilalanina. P-prolina. Serina. T-treonina. W-triptofano. Y-tirosina. V-valina.....118

Figura 3. Caracterização por espectrometria de massas (ESI-MS/MS) das sequências peptídicas obtidas derivadas de proteína do soro de leite humano, obtidas pela ação de proteases fúngicas de *Aspergillus oryzae* (ATCC 1003) produzidas por fermentação em estado sólido. A-alanina. R-arginina. N-asparagina. D- ácido aspártico. C-cisteína. Q-glutamina. E-ácido glutâmico. G-glicina. H-histidina. I- isoleucina. L-leucina. K-lisina. M-metionina. F-fenilalanina. P-prolina. Serina. T-treonina. W-triptofano. Y-tirosina. V-valina.....119

CAPÍTULO 4

Figura 1. Atividade pituinstática de *pools* de peptídeos bioativos derivados de leite (LbaPs) bovino, caprino e humano, produzidos por hidrólise com proteases fúngicas de *Aspergillus oryzae* (ATCC 1003) produzidas por Fermentação em Estado Sólido com farelo de trigo como substrato e purificadas parcialmente por *salting-out* (A). Inibição do crescimento de *Pythium insidiosum* por LBaPs de leite humano produzidos com proteases parcialmente purificadas a 80% (B). Inibição do crescimento de *Pythium insidiosum* por LBaPs de leite bovino produzidos com proteases parcialmente purificadas a 40% (B). Inibição do crescimento de *Pythium insidiosum* por LbaPs de leite caprino produzidos com proteases parcialmente purificadas a 40% (B). Inibição do crescimento de *Pythium insidiosum* por LBaPs de leite bovino produzidos em diferentes concentrações com proteases parcialmente purificadas a 40% (B).....138

ANEXOS

Figura 1. Biocompatibilidade *in vitro* entre células HEK293 tratadas com peptídeos bioativos de leite bovino e caprino em diferentes concentrações, obtidos por hidrólise com proteases fúngicas de *Aspergillus oryzae* (ATCC 1003) e *Aspergillus flavipes* (ATCC 16814) produzidas por fermentação em estado sólido. (A) Viabilidade celular avaliada por MTT. (B) Microscopia óptica de células HEK293 sem tratamento. (C) Microscopia óptica de células HEK293 tratadas com peptídeos de leite caprino (0.025 mg mL⁻¹) produzidos por hidrólise com proteases de *A. oryzae* parcialmente purificadas a 40% por *salting-out*. (D) Viabilidade celular avaliada por fluorescência ApoTox-Glo. (E) Citotoxicidade celular avaliada por fluorescência Apotox-Glo. (F) Morte celular Apotox-Glo. ST: células sem tratamento (controle negativo). DX: dogxorrubicina 5M (controle positivo).....150

LISTA DE TABELAS E QUADRO

CAPÍTULO 1

Quadro 1. Vantagens da Fermentação em Estado Sólido comparada à Fermentação Submersa (ARORA & GOSH, 2018).....31

CAPÍTULO 2

Tabela 1. Pools de peptídeos gerados pelo leite de bovino (B) e caprino (G) hidrolisados com proteases de *Aspergillus oryzae* (ATCC 1003) (O) e *Aspergillus flavipes* (ATCC 16814) (F) produzidas por fermentação em estado sólido em substrato de farelo de trigo a partir de frações (40%, 60% e 80%).....78

PREÂMBULO

Peptídeos bioativos são moléculas de interesse biotecnológico que podem apresentar propriedades biológicas peculiares. Essas moléculas precisam ser geradas a partir das proteínas parentais para que consigam desempenhar seu papel, o que é possível *in vitro* por meio de hidrólise por proteases – enzimas que mobilizam grande interesse industrial em virtude de seu vasto repertório de aplicações. As proteases podem ser produzidas por Fermentação em Estado Sólido (FES), um bioprocessos no qual micro-organismos podem ser inoculados em substratos proteicos, inclusive resíduos agroindustriais, o que lhe confere vantagens pelo caráter sustentável e econômico.

A presente tese de doutoramento visou à produção de peptídeos bioativos por ação proteolítica de enzimas obtidas por FES, com subsequente determinação das atividades antimicrobiana e antioxidante dessas moléculas, além de caracterização proteômica dos segmentos peptídicos formados. Está dividida em quatro capítulos, visando melhor apresentação e clareza. O primeiro consiste em uma revisão de literatura sobre peptídeos bioativos produzidos por ação de proteases obtidas por FES. No segundo capítulo é apresentado um trabalho publicado na revista *Food Chemistry* (ISSN: 0308-8146, fator de impacto 4.946 - CAPES Qualis A1, área de Biotecnologia), que aborda a obtenção, caracterização proteômica e determinação de atividades biológicas de peptídeos derivados de leite caprino e bovino obtidos por ação proteolítica das enzimas fúngicas produzidas por FES. O terceiro capítulo apresenta um trabalho que será submetido como comunicação rápida para a mesma revista do capítulo 2, o qual foi realizado de forma semelhante ao do segundo capítulo, mas utilizando leite humano. No quarto capítulo é apresentado o trabalho “Método de obtenção de peptídeos bioativos inibidores de *Pythium insidiosum*”, no qual relatamos a capacidade de peptídeos produzidos em inibir o crescimento de *Pythium insidiosum*, um pseudo-fungo

causador da doença negligenciada pitiose. Esse último estudo resultou em comunicação de patente, que está em fase de depósito pela Agência Unesp de Inovação (AUIN) na ocasião de redação desta tese.

1 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Pools de peptídeos bioativos derivados de leite bovino, caprino e humano foram produzidos pela aplicação de enzimas fúngicas com atividade proteolítica. As enzimas foram produzidas por FES, bioprocesso interessante quanto ao caráter biotecnológico, econômico e ambiental, por necessitar de pouca água livre no sistema e por poder utilizar resíduos agroindustriais como substrato. Elevada atividade antimicrobiana (antibacteriana e antifúngica) e antioxidante foram observadas para os *pools* de peptídeos gerados de todos os tipos de leite, demonstrando ser possível produzir compostos com atividades biológicas interessantes sem a necessidade de purificar uma sequência peptídica em específico. As amostras com maiores atividades biológicas foram caracterizadas por espectrometria de massas (ESI-MS/MS), após fragmentação por eletroforese 2D-PAGE, para avaliar as sequências peptídicas que podem estar envolvidas no desencadeamento das atividades e para possibilitar a síntese das sequências identificadas para se obter o potencial biológico.

Apesar do sucesso descrito nesse estudo quanto à obtenção dos peptídeos pela ação de enzimas geradas por FES, diversos desafios podem ser elucidados como perspectivas de estudos futuros. A FES produz enzimas em altas concentrações com atividades elevadas em escala de bancada, contudo, o conhecimento sobre produção em larga escala é limitado (SANTOS et al., 2004), sendo que as principais tecnologias descritas são os biorreatores de bandeja, verticais de empacotamento e cilindros horizontais, com dificuldades inerentes em todos eles, principalmente no controle da contaminação, adequação da remoção de calor gerada pelo próprio metabolismo microbiano e controle da estabilidade da umidade (MITCHELL et al., 2010; MANA & WEBB, 2017). Mesmo considerando os pontos fracos do processo, a FES tem uma grande potencial para a produção de biomoléculas de valor agregado para exploração industrial a partir do tratamento de resíduos, sendo que os desafios podem ser solucionados

por estudos científicos laboratoriais e abordagens tecnológicas (MANN & WEBB, 2017) como utilizando sistemas fechados e estéreis, para evitar a contaminação cruzada, avaliando o rendimento e atividades enzimática dos extratos obtidos.

Além disso, o uso de FES com combinação de diferentes resíduos e parâmetros propicia ampla gama de possibilidades em termos de enzimas com diferentes propriedades hidrolíticas, repercutindo nos peptídeos gerados (NOVELLI et al., 2016). Se por um lado isso oferece elevada versatilidade, por outro trata-se de uma dificuldade a ser sanada, pois as atividades biológicas dos peptídeos decorrem de sua composição de aminoácidos e estrutura da molécula. Assim, o desenvolvimento de propostas baseadas na FES para prospecção de peptídeos requer a investigação de métodos para padronização da produção para viabilizar ensaios necessários à pesquisa pré-clínica, culminando em uma grande variedade de estudos possíveis de serem desenvolvidos para evolução do tema.

2 REFERÊNCIAS

- MANAN, M.A.; WEBB, C. Aspectos de projeto da fermentação em estado sólido ao bioprocessamento microbiano. **Journal of Applied Biotechnology and Bioengineering**, v.4, n.1, p.511-532, 2017.
- MITCHELL, D.A.; CUNHA, L.E.N.; MACHADO, A.V.L., et al. Uma investigação baseada em modelo das vantagens potenciais de leitos de múltiplas camadas em fermentação em estado sólido. *Revista de Engenharia Bioquímica*, v. 48, n.2, p. 195-203, 2010.
- NOVELLI, P. K.; BARROS, M. M.; FLEURI, L. F. Novel inexpensive fungi proteases: Production by solid state fermentation and characterization. *Food Chemistry*, v. 198, p. 119–124, maio 2016.
- SANTOS, M.M.; ROSA, A.S.; DAL'BOIT, S.; MITCHELL, D.A.; KRIEGER, N. Thermal denaturation: In solid-state fermentation really a good technology for the production of enzymes. **Bioresource Technology**, v. 93, p. 261-268, 2004.

- milk*. In: III Workbiotech: Workshop da Pós Graduação em Biotecnologia e II Symposium on Cellular Dynamics: Building Insights and Breaking Boundaries, 2017, Botucatu. III Workbiotech: Workshop da Pós Graduação em Biotecnologia e II Symposium on Cellular Dynamics: Building Insights and Breaking Boundaries, 2017.
5. ANDRADE, I. C.; ZANUTTO, M. R.; ELGUI DE OLIVEIRA, D.; FLEURI, L. F. *Human milk-derived peptides show antioxidant properties in vitro*. In: III Workbiotech: Workshop da Pós Graduação em Biotecnologia e II Symposium on Cellular Dynamics: Building Insights and Breaking Boundaries, 2017, Botucatu. III Workbiotech: Workshop da Pós Graduação em Biotecnologia e II Symposium on Cellular Dynamics: Building Insights and Breaking Boundaries, 2017.
 6. ATHANAZIO-HELIODORO, J. C.; PRADO, D. Z.; DELGADO, C. O.; ZANUTTO, M. R.; FLEURI, L. F. Seleção de microrganismos para obtenção indireta e direta de lipases em resíduos de laranja. In: 1st International Meeting of Agrarian Science and Technology, 2016, Dracena. 1st International Meeting of Agrarian Science and Technology. , 2016.
 7. DANTAS, S. T. A.; ZANUTTO, M. R.; ROSSI, B. F.; BONSAGLIA, E. C. R.; VIVIAN, R. C.; PINTO, J. P. A. N.; RALL, V. L. M. *Characterization of virulence of strains of salmonella spp. isolated from a slaughter plant*. In: Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2015, Florianópolis. Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2015.
 8. ZANUTTO, M. R.; DANTAS, S. T. A.; CASTILHO, I. G.; CAGNINI, D. Q.; MAIA, L.; ALVARENGA, F. C. L.; RODRIGUES, J.; ARAUJO JUNIOR, J. P.; RALL, V. L. M. *Comparison of the ability of adhesion and invasion of Staphylococcus aureus isolated from milk of cows with subclinical mastitis and milk from a human milk bank in bmec, hep-2 and hela cells*. In: Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2015, Florianópolis. Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2015.
 - 9.

Formação Complementar

Extensão universitária: Análise Proteômica como Estratégia na Medicina Translacional. Carga horária de 75h. Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Sao Paulo, Brasil, 2016.

Educação e Popularização de C&T

- *Apresentação de palestra*

1. ZANUTTO ELGUI, M. R. Aspectos gerais da Lei da Biodiversidade, 2018. UNESP; Botucatu, SP. Evento: Simpósio do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Botânica; Instituto de Biociências- Unesp
2. ZANUTTO ELGUI, M. R. Bioquímica Geral, 2017. UNESP; Botucatu, SP. Evento: Graduação em Ciências Biológicas; Instituto de Biociências- Unesp
3. ZANUTTO ELGUI, M. R. Bioquímica Estrutural, 2016. UNESP; Botucatu, SP. Evento: Graduação em Ciências Biológicas; Instituto de Biociências- Unesp

- Curso de curta duração ministrado

1. DANTAS, S. T. A.; ZANUTTO, M. R. Mastite e Doenças de Origem Alimentar, 2015. UNESP, Botucatu, SP. Evento: Workshop da Pós- Graduação- Instituto de Biociências- UNESP

Orientações e Supervisões

- Co-orientação de iniciação científica concluída

Isabela Andrade de Camargo. Aplicação de proteases de *Aspergillus oryzae* em leite humano para produção de peptídeos com atividades biológicas. 2017. Áreas do conhecimento: Bioquímica, sub-área de Bioprocessos. Iniciação científica (Ciências Biológicas), Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

Links

Citação: Zanutto, M.R.; Zanutto Elgui, M.R.; Elgui, M.R.Z.

ResearcherID: <http://www.researcherid.com/rid/P-1263-2018>

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0525-650X>

Google Scholar: <https://goo.gl/42467X>

Plataforma Lattes CNPQ: <http://lattes.cnpq.br/9513037551055137>

*“É como decifrar sinais sem ser um sábio competente
Voltar a ser de repente tão frágil como um segundo
Voltar a se sentir profundo como um menino perante a Deus
Isso é o que sinto neste instante fecundo”*

“Volver a los 17” - Violeta Parra