

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 BIOCOMPATIBILIDADE 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 ± DP, p ≤ 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 (pl 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.

CAPÍTULO 1

“Peptídeos bioativos produzidos por ação de proteases obtidas
por fermentação em estado sólido: Uma revisão”

Peptídeos bioativos produzidos por ação de proteases obtidas por fermentação em estado sólido: Uma revisão

Mirella Rossitto ZANUTTO-ELGUI¹, Deilson ELGUI DE OLIVEIRA^{2,3}, Débora Zanoni do PRADO¹,

Milene Stefani PEREIRA¹, Luciana Francisco FLEURI¹

¹ Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Biociências, Departamento de Química e Bioquímica, Botucatu, SP, Brasil.

² Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Medicina de Botucatu, Departamento de Patologia, Botucatu, SP, Brasil.

³ Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Biotecnologia, Botucatu, SP, Brasil.

Esta revisão será submetida para a revista ***Biotechnology and Bioengineering*** (ISSN: 1097-0290, fator de impacto 3,952, CAPES Qualis A1, área Biotecnologia).

RESUMO

A fermentação em estado sólido (FES) é um bioprocesso especialmente adequado para obtenção de produtos de alto valor biotecnológico, tais como enzimas resultantes do metabolismo de micro-organismos. É particularmente interessante para fungos filamentosos, que são adaptados ao sistema, crescendo em substratos sólidos com baixo ou nenhum teor de água livre. A FES oferece diversas vantagens em relação à fermentação submersa, com destaque para a sustentabilidade e economia do processo pelo baixo consumo de água e a aproveitamento de resíduos agroindustriais, que podem ser utilizados como substratos e são amplamente disponíveis. Mundialmente, a demanda industrial por enzimas está em ascensão: movimentou USD 4,4 bilhões em 2015 e possui crescimento estimado em 7,8% (USD 2 bilhões) para 2015-2020. As enzimas obtidas por FES apresentam elevada versatilidade, relacionada às diferentes capacidades hidrolíticas e propriedades bioquímicas, cujas enzimas proteolíticas produzidas por esse sistema podem ser aplicadas na produção de fragmentos proteicos com atividades biológicas distintas capazes de beneficiar a saúde humana e animal, denominados peptídeos bioativos. Já foram obtidos peptídeos bioativos com ações antimicrobiana, antioxidante, antihipertensiva, imunomodulatória, opióide e antineoplásica. É reportado que estes compostos podem ser mais seletivos quando comparados a outras pequenas moléculas empregadas como fármacos. O leite é uma das principais fontes de obtenção de peptídeos relativamente seguros para consumo. Assim, esta revisão aborda o uso de FES para gerar proteases e aplicá-las na produção de peptídeos bioativos com propriedades biológicas biotecnologicamente interessantes, de forma custo-efetiva e sustentável.

Palavras-chave: Compostos Bioativos, Antimicrobianos, Antioxidantes, Antineoplásicos, Proteases Fúngicas.

ABSTRACT

Solid-state fermentation (SSF) is a bioprocess especially suited to produce high-value biotechnology products, such as enzymes from microorganisms. It is particularly interesting for filamentous fungi, which are well-adapted to SSF because they grow on solid substrates with little or no free water content. SSF offers several advantages compared to submerged fermentation, notably due to the low water consumption and the use of agroindustry wastes, which can be used as substrates and are widely available. Worldwide, industrial demand for enzymes is on the rise: it moved USD 4.4 billion in 2015, and it has an estimated growth of 7.8% (USD 2 billion) for 2015-2020. The enzymes obtained by SSF have high versatility because of their different biochemical properties. Proteolytic enzymes produced by this system can be applied to produce bioactive peptides, which are protein fragments that may be used in applications to benefit human and animal health and wellbeing. Bioactive peptides with antimicrobial, antioxidant, antihypertensive, immunomodulatory, opioid, and antineoplastic actions were already described, and these compounds may be more selective compared to other small molecules used as medical drugs. Milk is one example of promising sources for production of biopeptides that are safe to use. This review addresses the use of SSF to generate proteases and to apply them in the production of bioactive peptides with biotechnological value, in a cost-effective and sustainable way.

Keywords: Bioactive Compounds, Antimicrobials, Antioxidants, Antineoplastics, Fungal Proteases.

1 INTRODUÇÃO

Peptídeos bioativos são fragmentos proteicos capazes de atuar de forma benéfica à saúde humana e animal por agir em diversos sistemas corporais de modo semelhante a medicamentos e hormônios (NONGONIERMA & FITZGERALD, 2018). Podem apresentar diversas atividades biológicas, tais como ações antimicrobiana, antioxidante, antihipertensiva, imunomodulatória, opióide e antineoplásica (HERNÁNDEZ-LEDESMA et al., 2011). O estilo de vida atual está aumentando os casos de doenças crônicas não transmissíveis, como obesidade, diabetes, hipertensão e cânceres, ocasionando em elevação dos índices de mortalidade, morbidade e prejuízo socioeconômico (WHO, 2005), tornando-se necessária a busca por novas moléculas capazes de promover saúde.

Terapias baseadas em peptídeos isolados de leite são consideradas promissoras em virtude do potencial terapêutico dessas moléculas que podem ser mais seletivas quando comparados a outras pequenas moléculas empregadas como fármacos, além de serem relativamente seguras devido ao contato prévio do organismo de mamíferos com o leite durante seu desenvolvimento pós-natal (NIELSEN et al., 2017). O leite é um dos alimentos mais ricos em proteínas de grande variedade estrutural e funcional, exercendo função nutricional e desencadeando respostas fisiológicas. Estas características tornam esse alimento uma das fontes mais promissoras para a obtenção de peptídeos bioativos de interesse biotecnológico (KORHONEN, 2009; LIVNEY, 2010). Contudo, o usufruto dos benefícios dessas moléculas requer hidrólise das proteínas parentais para geração dos peptídeos responsáveis pelas propriedades biológicas desejadas (NONGONIERMA & FITZGERALD, 2018).

O uso de enzimas como substitutos para procedimentos químicos apresenta vantagens e limitações a serem consideradas. Ainda é desafiador obter hidrólise total de uma proteína

empregando enzimas de modo exclusivo, por exemplo. Além disso, alterações estruturais em proteínas pode alterar a função da enzima, causando degradação da mesma, inibição ou limitar a atividade enzimática (MILDNER et al., 1994). Por outro lado, as reações enzimáticas são vantajosas por serem mais brandas em relação aos procedimentos químicos, são apropriadas sob a perspectiva ambiental, mantêm o valor nutricional dos substratos proteicos e são menos sujeitas a reações secundárias (CASTRO et al., 2011; TAVANO, 2013; EL-SALAM & EL-SHIBINY, 2017).

Proteases fúngicas podem ser aplicadas na produção de diversas biomoléculas de alto valor agregado, inclusive peptídeos bioativos de leite (CICERO et al., 2017). As enzimas proteolíticas originadas de fungos podem ser produzidas por fermentação em estado sólido (FES), um método que apresenta múltiplas vantagens biotecnológicas e econômicas quando comparado à fermentação submersa (VISHWANATHA et al., 2010; CASTRO & SATO, 2014). Digno de nota, a FES tem caráter sustentável por necessitar de pouca água livre no sistema e poder utilizar resíduos agroindustriais como substrato (CASTRO & SATO, 2014).

Diversos fragmentos de peptídeos bioativos podem ser gerados com a aplicação de enzimas proteolíticas em processos biotecnológicos que utilizam leite, de modo que é recomendável efetuar análise proteômica para investigação dos produtos obtidos (GIACOMETTI & BURETIĆ- TOMLIJANOVIĆ, 2017; SÁNCHEZ-RIVERA et al., 2014). Essa abordagem proteômica possibilita caracterizar e quantificar proteínas e suas modificações pós-traducionais, propiciando compreensão da expressão gênica global pela análise das proteínas geradas (GYGI et al., 1999). Segundo Vispo et al. (2004), a análise proteômica pode auxiliar, por exemplo, na identificação de proteínas expressas por um organismo numa determinada condição (proteômica descritivas ou estruturais), nas alterações no nível de expressão da proteína associado com alterações nas condições dos organismos (proteômica comparativa), nos

conjuntos de identificação funcionais de proteínas (e.g., grupo de proteínas que estão localizadas em mesmo sítio celular e operando em mútua interação - proteômica funcional) e identificação de proteínas constituintes de organelas celulares.

O princípio da técnica de análise proteômica consiste em extração de proteínas, separação (e.g., cromatografia e eletroforese), quantificação e identificação e análise por espectrometria de massas (SALVATO & CARVALHO, 2010). Entre os métodos, destacam-se a eletroforese bidimensional e a espectrometria de massas por *eletrospray* (ESI). A separação de proteínas por eletroforese bidimensional baseia-se na fragmentação em duas dimensões diferentes em gel de poliacrilamida, sendo primeiramente separadas com base em focalização isoelétrica (*Isoelectric focusing* - IEF), na qual as proteínas migram até o ponto onde a carga é nula e subsequentemente são separadas de acordo com suas massas moleculares. A técnica tem elevada sensibilidade, de modo que a obtenção de resultados consistentes, com alta reprodutibilidade e confiabilidade, requer preparação criteriosa das amostras, com extração das proteínas em tampões específicos, precipitação dessas proteínas, concentração e eliminação de potenciais interferentes (VISPO et al., 2004; WITTMANN-LIEBOLD et al., 2006).

A espectrometria de massas, por sua vez, é uma poderosa técnica analítica que identifica compostos de acordo com as fragmentações que ocorreram nas ligações peptídicas após a digestão enzimática, resultando em picos no espectro gerado na relação entre massa (m) e carga (z). A diferença de massa entre os picos é utilizada para reconstruir a sequência de aminoácidos, elucidando a estrutura primária do peptídeo. O desenvolvimento de duas técnicas de ionização suave ("*soft*"), como a ESI, possibilita a determinação precisa de massas de compostos com alto e baixo peso molecular (AZEVEDO, 2004; WILSON & WALKER, 2010).

Tendo por base as informações oferecidas, nas seções subsequentes será explorada a produção de proteases por fermentação para aplicação na produção de peptídeos bioativos de

interesse biotecnológico, abordando as possíveis aplicações desses produtos e as possibilidades de novas tecnologias e patentes.

2 PROTEASES

Proteases são enzimas ubíquas que atuam na hidrólise de proteínas, transformando-as em peptídeos ou aminoácidos livres (RAO et al., 1998; TAVANO, 2013; SHARMA et al.; 2017). As proteases tem especificidade ao substrato, que está relacionada com os aminoácidos envolvidos nas ligações peptídicas, e confere à estas enzimas diferentes propriedades (SANTOS E KOBLITZ, 2008).

Resultados promissores foram observados na aplicação de proteases em diversos setores industriais, incluindo o setor alimentício (e.g., no melhoramento de rações animais), farmacêutico, cosmético, para produção de couro e detergentes, biocombustíveis, biorremediadores, biosurfactantes, ácidos orgânicos, na área médica e na produção de compostos bioativos (HERNÁNDEZ-LEDESMA et al., 2011; KOUSHKI et al., 2011; KEERTI et al., 2014).

2.1 Classificações

As proteases pertencem ao grupo 3 (hidrolases) e subgrupo 4, de acordo com a *Enzyme Commission* (EC) (WEBB, 1992)- classificação atribuída pela *Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology* - sendo classificadas de acordo com a estrutura, tipo de reação catálise e natureza química do sítio catalítico (RAO et al., 1998). São também classificadas em exopeptidases, dipeptidases e endopeptidases. As exopeptidases, maior grupo, são divididas em dois subgrupos de acordo com a clivagem, que pode ocorrer em ligações peptídicas próximas ao carbono terminal (carboxipeptidases) ou amino terminal (aminopeptidases). As endopeptidases clivam ligações no interior da molécula, sendo divididas

em 4 subgrupos de acordo com o sítio catalítico: serina endoproteases, endoproteases aspárticas, cisteína endoproteases e metaloendoproteases (RAO et al., 1998; WARD, 2011)

(Figura 1).

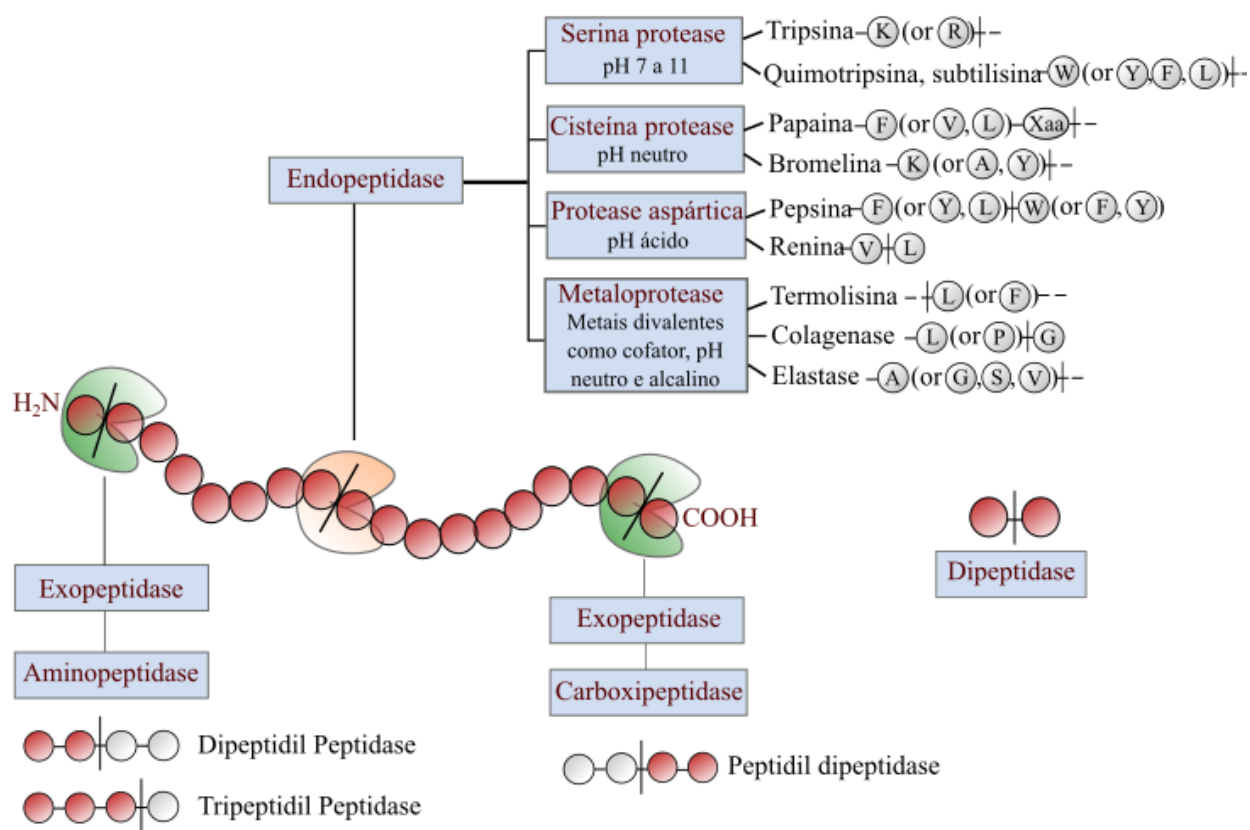


Figura 1. Classificação das proteases quanto ao ponto de clivagem e sítio catalítico. A- alanina; F- fenilalanina; G- glicina; K- lisina; L- leucina; P- prolina; R- arginina; S- serina; V- valina; W- triptofano; Xaa- aminoácido randômico; Y- tirosina. Original da autora.

Em termos industriais, as enzimas podem ser classificadas em (KUMAR et al., 2012)

- Enzimas técnicas: utilizadas na produção de detergentes, biocombustíveis, produtos farmacêuticos, entre outros;
- Enzimas para alimentos: aplicadas para panificação, bebidas, álcool, laticínios, óleos e outros setores;

- Enzimas para nutrição: utilizadas como aditivos, principalmente na indústria de rações animais.

A atividade enzimática quantifica a velocidade da reação, na qual a concentração do produto aumenta linearmente com o tempo e, depois de certo período, começa a decrescer devido ao consumo do substrato, inibição do produto, deslocamento do equilíbrio ou inativação parcial da enzima. Assim, fatores como especificidade pelo substrato, tempo de incubação, pH e temperatura são de suma importância para avaliar o potencial biotecnológico da enzima e melhor aplicá-la na produção de compostos bioativos (ILLANES et al., 2000; SANDHYA et al., 2005; CASTRO & SATO, 2013).

2.2 Fontes

Proteases estão presentes em todos os organismos vivos, participando da maioria dos processos metabólicos e catabólicos como digestão, reprodução, desenvolvimento, coagulação sanguínea, resposta imunitária, formação de tecido, ativação de zimogênios, envelhecimento e morte (POZA et al., 2003; VERGNOLLE & CHIGNARD, 2011). Assim, pode ser isoladas de várias fontes vegetais, animais ou microbianas (RAO et al., 1998; SABOTIČ & KOS, 2012).

A obtenção de proteases de fontes microbianas é interessante e vantajosa devido à sua facilidade e rapidez. A combinação de diferentes substratos e parâmetros propicia a geração de ampla gama de enzimas com propriedades hidrolíticas variadas (CASTRO & SATO, 2013; NOVELLI et al., 2016). Além disso, proteases de origem microbiana são predominantemente extracelulares, pois os micro-organismos secretam as enzimas diretamente no meio fermentativo, facilitando a recuperação da enzima a partir da filtração do meio (MUTHULAKSHMI et al., 2011). Dentre as espécies microbianas mais relevantes quanto à produção de proteases estão as bactérias *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Escherichia*

coli, *Pseudomonas aeruginosa*, *Lactococcus* sp. e *Streptomyces* sp. e os fungos *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus niger*, *Penicillium* spp., *Saccharomyces* sp., *Rhizopus* sp., (RAO et al., 1998). Dentre as espécies mencionadas, fungos filamentosos merecem destaque pela elevada capacidade para decomposição de diferentes substratos sólidos, por terem crescimento rápido e serem de fácil manutenção (GRIMM et al., 2005). Assim, serão abordados com maiores detalhes a seguir.

Os fungos filamentosos estão entre os micro-organismos mais empregados para a obtenção de proteases, com destaque para espécies do gênero *Aspergillus*, tais como *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus flavipes*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus awamori* e *Aspergillus fumigatus* (WANG & DE MEJIA, 2005; EL ENSHASY, 2007). Estas espécies se destacam por serem boas produtoras de enzimas e por serem consideradas seguras para o consumo humano e animal, sendo classificadas como *Generally Recognized as Safe* (GRAS) pela *Food and Drug Administration* (FDA). Por essa razão, apresentam ampla gama de aplicações nas indústrias farmacêutica e alimentícia (GOTOU et al., 2009; VISHWANATHA et al., 2009; MATSUSHITA-MORITA et al., 2010). Contudo, é válido notar que algumas espécies de *Aspergillus* produzem micotoxinas e oferecem risco à saúde se consumidas, incluindo *Aspergillus parasiticus*, *Aspergillus flavus* e *Aspergillus nomius*, produtoras de aflatoxina (RODRIGUES et al., 2009; PERRONE et al., 2014), e *Aspergillus carbonarius* (TERRA et al., 2013), *Aspergillus ochraceus* e *Penicillium viridicatum*, produtores de acrotoxina A.

2.3 Mercado

A demanda industrial por enzimas está em constante crescimento, tendo movimentado USD 4,4 bilhões em 2015, e possui expansão estimada de 7,8% e USD 6,30 bilhões entre 2015-2020 (GLOBAL INDUSTRIAL ENZYME MARKET REPORT, 2014). As proteases mobilizam até 1,2

milhões dólares anualmente, explicitando sua elevada importância biotecnológica (GRAND VIEW RESEARCH, 2014). Micro-organismos são as principais fontes de obtenção de enzimas (ADRIO & DEMAINE, 2014): estima-se que entre 500 produtos industriais produzidos com enzimas, pelo menos 150 (30%) utilizam micro-organismos (KUMAR & SINGH, 2013).

Comercialmente, europeus e norte-americanos são os maiores produtores e consumidores de enzimas industriais. A empresa Novozymes (Bagsværd, Dinamarca) detém maior parcela deste mercado, seguida pela Royal DSM (Amsterdã, Holanda) e pela DuPont (Pryor, Estados Unidos) (KUMAR et al., 2014). Filiais dessas e outras indústrias internacionais estão presentes no Brasil. Embora não se possa acessar a forma de produção de enzimas por estas empresas, tipicamente são enzimas purificadas, o que acarreta elevado custo e preocupações em termos do rendimento e estabilidade das enzimas disponíveis comercialmente (MUTHULAKSHMI et al., 2011).

3 FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO

Enzimas fúngicas podem ser produzidas por processos fermentativos, tais como a fermentação submersa (Fs) e a fermentação em estado sólido (FES). Esta última utiliza um sistema de reatores nos quais o micro-organismo se desenvolve sobre um substrato sólido. Como utiliza baixa quantidade de água, obtêm-se produtos mais concentrados, resultando em maior rendimento na produção, o que torna o processo economicamente interessante (VINIEGRA-GONZÁLES et al., 2003). A FES fornece produtos estáveis e pode utilizar resíduos agroindustriais mundialmente disponíveis, derivados do processamento de soja, trigo, algodão, laranja, arroz, banana e maçã, como substratos sólidos (CHUTMANOP et al., 2008; NIGAM & PANDEY, 2009; KARATAŞ et al., 2013; SUKUMPRASERTSRI et al., 2013).

3.1 Vantagens da Fermentação em Estado Sólido

A FES oferece diversas vantagens em comparação à Fs (Quadro 1), principalmente relacionadas ao custo, versatilidade de substratos que podem ser utilizados como matéria-prima, maior rendimento por gerar produtos mais concentrados resultantes do pouco volume de água utilizado; necessidade de instalações mais simples e fácil recuperação dos produtos (NIGAM & PANDEY, 2009; VISHWANATHA et al., 2010).

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

Parâmetros	Fermentação em Estado Sólido (FES)	Fermentação Submersa (FS)
Ausência de água livre	Volume de reator menor.	Volume do reator grande.
	Diminuição de contaminações bacterianas.	Atividades de água alta tornam suscetível à contaminação bacteriana.
	Não forma espuma.	Formação extensa de espuma.
	Menor custo de tratamento de efluentes líquidos.	Alto custo para tratamento de efluentes líquidos.
Meio de fermentação	Baixo custo e natural.	Produtos químicos de grau analítico altamente purificados, com custo bastante superior ao da FES.
	Suplemento mineral mínimo.	
Ambiente natural	Natureza sólida do substrato que mimetiza o ambiente natural dos fungos.	Natureza dissolvida do substrato não fornece bom ambiente para crescimento fúngico.
Produtividade volumétrica	Maior em muitos estudos.	A baixa produtividade volumétrica é frequente.
Processamento à jusante	Mais simples e fácil, pois o produto é altamente concentrado (devido à pouca quantidade de água).	Os custos de concentração e purificação do produto são maiores. Geralmente define a economia do processo.
Aspectos do meio ambiente	O uso de resíduos naturais como substrato ajuda na conservação de energia de biomassa, gestão de resíduos e controle de poluição, sendo considerado processo sustentável.	Utiliza, habitualmente, meios sintéticos e com alto grau de pureza analítica.
Qualidade do produto	Produtos resistentes ao calor e ao pH relatados em alguns casos.	Em comparação com o FES, a qualidade superior do produto não foi observada com FS.

O emprego de fungos filamentosos na FES é vantajoso porque as condições de cultivo dos micro-organismos mimetizam seu *habitat* natural. Assim sendo, os fungos estão mais adaptados para crescer nesse tipo de bioprocesso, liberando maior quantidade de enzimas no meio (ABIDI et al., 2008). A secreção microbiana resultará na produção de enzimas e outras biomoléculas de amplo potencial biotecnológico (MADIGAN, 2016), que podem ser aplicadas para a produção de novos compostos com atividades biológicas distintas. Estudos relataram produções promissoras de enzimas oriundas do metabolismo microbiano por FES, que podem ser utilizadas como biorremediadores, biosurfactantes, biopesticidas e também aplicados na indústria de alimentos, farmacêutica, compostos bioativos, vitaminas, pigmentos, *flavours*, compostos aromáticos e fibras (PANDEY, 2003; FEDERICI et al., 2009; PETRUCIOLLI et al., 2011; MARTÍNEZ et al., 2012).

Apesar das vantagens, a FES apresenta algumas limitações para produção em larga escala de enzimas. Os principais desafios estão relacionados ao aumento de temperatura decorrente das atividades metabólicas dos micro-organismos (o que pode causar desnaturação dos produtos obtidos) (SANTOS et al., 2004), a manutenção do pH, transferência de oxigênio, gradiente de substrato, controle da umidade, risco de contaminação (ao utilizar tecnologias que impedem a esterilidade ou ao utilizar sistemas abertos) e escassez de projetos e desenhos de biorreatores para escala industrial (SINGHANIA et al., 2009; MANAN & WEBB, 2017).

Estudos prévios relataram que, idealmente, os biorreatores devem ser bem vedados para evitar contaminações e manter a umidade no processo, além de utilizar fungos que se desenvolvem em uma ampla faixa de pH. Outros parâmetros como temperatura e oxigenação podem ser otimizados para melhorar o rendimento da produção, estimada pelo consumo do substrato em relação a produção enzimática pelo micro-organismo (KRISHNA, 2005; MUSONI et

al., 2015, MITCHELL & BEROVIC, 2010; MITCHELL et al., 2010). Em geral, a FES tem um grande potencial para a produção de biomoléculas com alto valor agregado com aproveitamento de resíduos para exploração industrial, sendo que suas limitações podem ser potencialmente sanadas por meio de avanços científicos e tecnológicos (MANAN & WEBB, 2017).

3.2 Inovação e Pesquisa com Fermentação em Estado Sólido

A primeira patente sobre a invenção da FES data de 1962 pela Riker Laboratories (Loughborough, Inglaterra), que descreveu a produção de penicilase sem pirogênios para aplicação na alergia à penicilina (RIKER, 1962). Há ainda uma patente sobre FES depositada por Suryanarayan & Mazumdar (2001). Desde então, inovações biotecnológicas com FES têm propiciado crescimento no número de patentes concedidas, notadamente após 1990. A quantidade de pedidos relacionados à FES praticamente dobrou entre os períodos de 2001-2010 e 2011-2016 (Figura 2) (PANDEY, 2003; SOCCOL et al., 2017). Países asiáticos, principalmente China e Japão, vêm despontando na produção, consumo e comercialização de enzimas microbianas geradas por FES empregando resíduos de grãos de soja, aplicando essas enzimas no melhoramento de alimentos (SURYANARAYAN, 2003; SOCCOL et al., 2017).

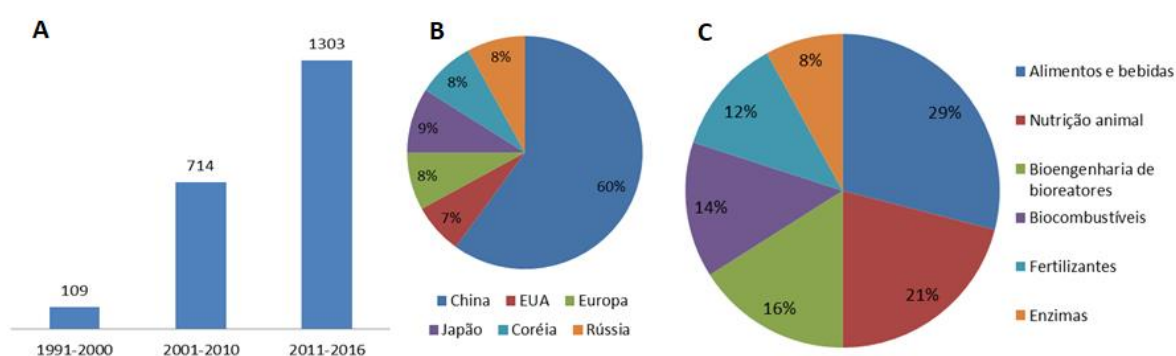


Figura 2. Quantidade de patentes solicitadas de inovações com fermentação em estado sólido (FES) (A). Porcentagem de patentes solicitadas pelos países com atividade mais significativa com FES (B). Porcentagem de patentes solicitadas de acordo área biotecnológica (C). Original da autora.

As patentes baseadas em FES são classificadas de acordo com as aplicações, o que amplia exponencialmente as possibilidades de novos pedidos devido à ampla gama de enzimas com características distintas que podem ser utilizadas em diferentes processos industriais. Embora o Brasil tenha notório potencial para desenvolvimento de tecnologias utilizando resíduos agroindustriais para a produção de biomoléculas e bioprodutos, o país ainda tem contribuição tímida no repertório mundial de patentes relacionadas à FES, com apenas 173 pedidos até 2016 (SOCCOL et al., 2017). Há, portanto, oportunidade considerável para o desenvolvimento de produtos derivados de inovações biotecnológicas que explorem a FES, incluindo peptídeos obtidos pelas proteases geradas com esse método, que podem atender importante demanda por moléculas de aplicação na saúde humana e animal.

4 PEPTÍDEOS BIOATIVOS DO LEITE

O leite é um fluído viscoso constituído de uma fase líquida (dispersante) e uma fase particulada (dispersa), formada por micelas de caseína e glóbulos de gordura, resultando em uma emulsão natural estável que satisfaz as necessidades nutricionais de mamíferos recém-nascidos (SGARBIERI, 2004). Consiste em um alimento de natureza dinâmica, que altera sua composição de acordo com a fase da lactação, proporcionando além de nutrição, o desenvolvimento e a prevenção de diversas doenças (HUTH et al., 2006). Os benefícios causados por peptídeos bioativos foram descritos primeiramente por Mellander (1950) que descreveu o aumento da calcificação em lactentes raquíticos pela ingestão de caseína fosforilada, independentemente de vitamina D.

O leite é fonte de lipídeos, vitaminas, hormônios e fatores de crescimento. Ademais, é uma fonte substancial de peptídeos bioativos por sua rica composição em proteínas diversificadas, das quais é possível isolar peptídeos com atividades biológicas distintas, incluindo os de ação antihipertensiva, opióide, antimicrobiana, antineoplásica, antitrombótica e

antioxidante (KORHONEN, 2009; HSIEH et al., 2015; MOHANTY et al., 2016; CICERO et al., 2017). Cerca de 3 a 4% dos sólidos encontrados no leite bovino são de natureza proteica, essencialmente proteínas do soro (soroproteínas) e caseína, correspondendo a 20% e 80% da composição, respectivamente. A caseína se organiza em micelas (estruturas insolúveis) e é segmentada em quatro subtipos principais com propriedades particulares: α -s1-caseína (38%), α -s2-caseína (10%), β -caseína (34%) e κ -caseína (15%). De acordo com Hernández-Ledesma et al. (2008), peptídeos bioativos derivados do leite costumam se originar mais da caseína do que das proteínas do soro. O soro do leite é mais heterogêneo, com proteínas globulares que continuam solúveis após a precipitação da caseína. Proteínas do soro do leite também são divididas em 4 constituintes principais: β -lactoglobulina (50%), α -lactalbumina (20%), soroalbumina (10%) e imunoglobulinas (10%) (MÖLLER et al., 2008; MOHANTY et al., 2016).

Um número crescente de terapias peptídicas têm sido aprovadas, ocasionando aumento significativo de um mercado estimado em USD 25 bilhões (KASPAR & REICHERT, 2013; DALIRI et al., 2018), com 6,9% de crescimento anual composto (*Compound Annual Growth Rate - CAGR*) para 2018-2023. Nesse mercado, 36% correspondem à peptídeos de produtos lácteos, e o restante relacionado com peptídeos derivados de plantas e outras fontes, como seda, carne e frutos do mar, entre outros (MARKET & MARKET RESEARCH, 2018; PERSISTENCE MARKET RESEARCH, 2018).

Produtos derivados de peptídeos bioativos (*Bioactive Peptides - BaPs*) já estão disponíveis em alguns mercados. Nesse sentido, podem ser mencionados o Calpis™ (Calpis®, Tóquio, Japão), que consiste em um leite fermentado com derivados de β e κ -caseína; o BioZate™ (Davisco Foods®, Le Sueur, EUA) composto de hidrolisados derivados de β -lactoglobulina, ambos com ação na redução da pressão arterial; BioPURE-GMP™ (Davisco Foods®, Le Sueur, EUA), composto por derivados de κ -caseína utilizado para prevenção de

cáries e de infecções virais e bacterianas (KORHONEN, 2009); e o Milk Bioactive Peptide™ (LifeExtension®, Fort Lauderdale, EUA), comercializado para redução de estresse, melhora do sono e da cognição.

A maioria das pesquisas com BaPs são realizadas com leite bovino, devido ao elevado consumo em todo o mundo, e também com leite humano (PARK & NAM, 2015; LU et al., 2018). Saliente-se que são observadas particularidades do potencial biológico dos peptídeos de acordo com a espécie da qual o leite é obtido (KUSUMANINGTYAS et al., 2016), que também é influenciado pelo tempo de produção, grau de hidrólise, proporção de enzima-substrato e pré-tratamento da proteína antes da hidrólise (INOUE et al., 2009).

Alguns métodos de obtenção e diferentes aplicações de BaPs de leite já foram patenteados, como por exemplo: *“Bioactive peptides identified in enzymatic hydrolyzates of milk caseins and method of obtaining same”* – US8354502B2; *“Method of extracting casin fraction from milk and caseinates and production of novel products”* – US20040234666A1 e *“Generation of improved bioactive peptides”* – JP2011504363A. Contudo, isto não limita o desenvolvimento de novas tecnologias e novos depósitos de patentes, considerando a diversidade de bioprocessos que podem ser aplicados, como diferentes substratos, micro-organismos e procedimentos técnicos.

Os maiores movimentadores do mercado de BaPs estão na América do Norte, Europa e Ásia-Pacífico. A América do Norte é a detentora da maior parcela, somando 37% das vendas totais. Contudo, a região da Ásia-Pacífico vem surgindo com importante papel no mercado pela maior participação no CAGR. Além destas regiões, também são observadas atividades na África e América Latina. Entre os principais destaques (*players*) nesse mercado estão a Seagarden AS (Avaldsnes, Noruega), Phermpep (Taichung, Taiwan), Arlak Biotech Pvt. Ltd (Zirakpur, Índia),

DuPont (Pryor, EUA), Royal DSM (Amsterdã, Holanda), Cargill (Wayzata, EUA), ADM (Chicago, EUA) e BASF (Ludwigshafen am Rhein, Alemanha) (PERSISTENCE MARKET RESEARCH, 2018).

A escassez de produção de novas tecnologias e a carência de estudos quanto às propriedades, mecanismos e segurança dos BaPs limitam o avanço do crescimento de seu mercado. Assim, entre as possíveis abordagens para produção de hidrolisados proteicos, a aplicação da FES para produção de proteases fúngicas aplicáveis à produção de BaPs se revela como uma estratégia promissora (NIGAM & PANDEY, 2009; VISHWANATHA et al., 2010).

5 ATIVIDADES BIOLÓGICAS DE PEPTÍDEOS BIOATIVOS

Dentre as atividades de BaPs isolados de leite estão descritas, por exemplo, ação anti-hipertensiva, opióide, antitrombótica, imunomodulatória, antineoplásica, antimicrobiana e antioxidante (Figura 3) (CHAKRABARTI et al., 2014; MOHANTY et al., 2016). Algumas dessas atividades serão abordadas adiante.

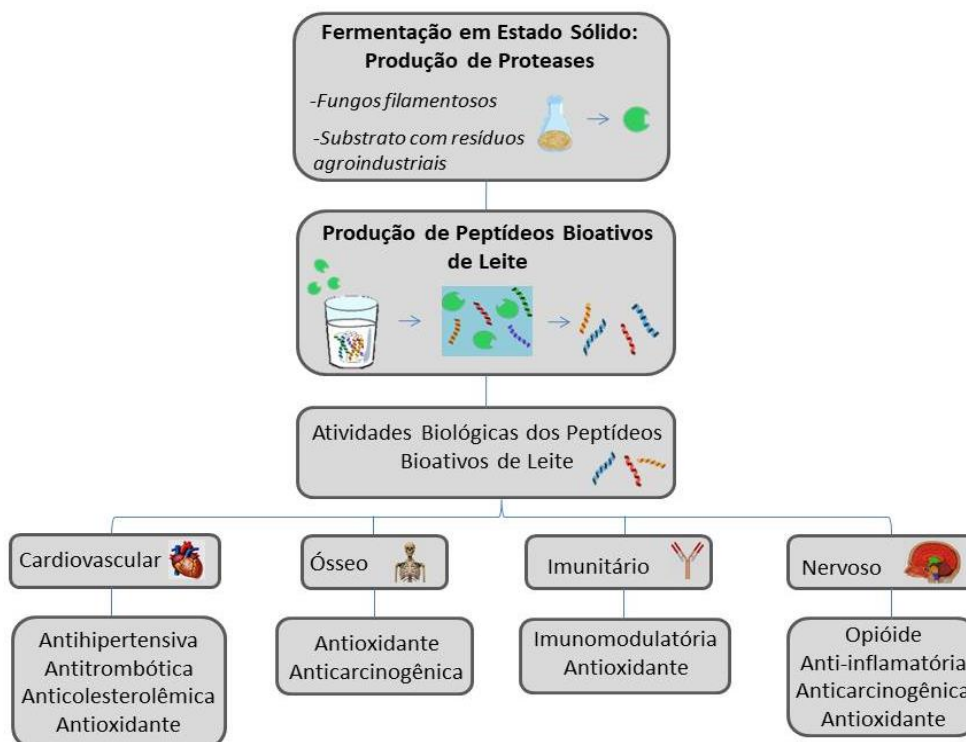


Figura 3. Diferentes atividades biológicas de peptídeos gerados pela hidrólise de proteínas de leite com proteases produzidas por fermentação em estado sólido empregando fungos filamentosos e substrato proteico constituído de resíduo agroindustrial. Original da autora.

5.1 Atividade Antimicrobiana

Atividades antimicrobianas de BaPs foram descritas contra diversos patógenos. Em relação às bactérias, há relatos de ação tanto contra gram-positivos (e.g., *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*) como gram-negativos (e.g., *Escherichia coli*, *Aeromonas hydrophila*, *Salmonella* Typhimurium e *Salmonella* Enteridis) (MOTTA & BRANDELLI, 2002; MOHANTY et al., 2014). Dentre os peptídeos conhecidos obtidos do leite estão as casecinas (que atuam contra *Lactobacillus* sp. e *S. aureus*) e as isracinas (que atuam contra *S. aureus*, *Streptococcus pyogenes* e *Listeria monocytogenes*). Outro exemplo é a lactoferrina, proteína obtida do soro do leite capaz de quelar o ferro existente no ambiente e ter ação bactericida por alterar a estabilidade da membrana, exercendo ação protetora diversos patógenos (VAN DER KRAAN et al., 2005; PAN et al., 2007; MOHANTY et al., 2016).

Entre os patógenos sobre os quais a lactoferrina age estão as bactérias *Clostridium perfringens* e *S. aureus* (causadores de intoxicações alimentares), *L. monocytogenes*, *S. Enteritidis* e *Vibrio cholerae* (infecções alimentares), *Streptococcus mutans* (infecções bucais), *Haemophilus influenzae* (infecções pediátricas diversas que podem causar meningite, otite média, faringite e pneumonia) (BUTLER & MYERS, 2018), *Pseudomonas aeruginosa* (infecções oportunistas) (NEVES et al., 2011), *Helicobacter pylori* (inflamação da mucosa gástrica com formação de úlcera péptica e/ou câncer gástrico) (LADEIRA et al., 2003); o fungo *Candida albicans* (infecções mucocutâneas oral e vaginal) (SERRACARBASSA & DOTTO, 2003), além de apresentar atividade antiviral contra hepatite C, G e B, HIV-1, poliovírus (poliomielite), rotavírus (diarréia) e *Herpes simplex* (feridas contagiosas) (VAN DER KRAAN et al., 2005; PAN et al., 2007; MOHANTY et al., 2016).

5.1.1 Mecanismos dos peptídeos antimicrobianos

Peptídeos bioativos antimicrobianos possuem conformação dinâmica e complexa (VALENTE et al., 2006; GOMES-NETO et al., 2013; SANTOS et al., 2016), resultando em diversidade estrutural que está envolvida com os diferentes mecanismos de ação dessas moléculas (DUFOURC et al., 2012; GALDIERO et al., 2013). Esses peptídeos são estruturalmente curtos, catiônicos, hidrofóbicos e ricos em glicina (Gly) e lisina (Lys), o que confere propriedade anfipático à molécula, permitindo interação com membranas celulares (WANG et al., 2015) e com o RNA, DNA e proteínas, inibindo a síntese dessas moléculas (Figura 4) (DASHPER et al., 2007; HAQUE & CHAND, 2008). Entre os mecanismos de ação descritos estão a formação de canais iônicos, lise por autólise, inibição proteica e degradação de proteínas da replicação de DNA (REDDY et al., 2004), contudo, os mais significativos são os de interação com a membrana plasmática de células eucarióticas, tais como:

- formação de poros transmembrânicos tipo barril em bastão (*Barrel-stave*), pelos quais ocorre o vazamento do conteúdo celular e, conseqüentemente, morte celular (MATSUZAKI et al., 1998);
- formação de revestimento sobre a superfície da membrana (*Carpet-like*), alterando a orientação dos resíduos hidrofóbicos, interrompendo a curvatura da bicamada lipídica, culminando em danos na membrana (DAGAN et al., 2002; GIULIANI et al., 2007);
- formação de poros toroidais, que possuem atividade dinâmica e permitem o livre transporte de íons e macromoléculas através da membrana (SANTOS et al., 2016).

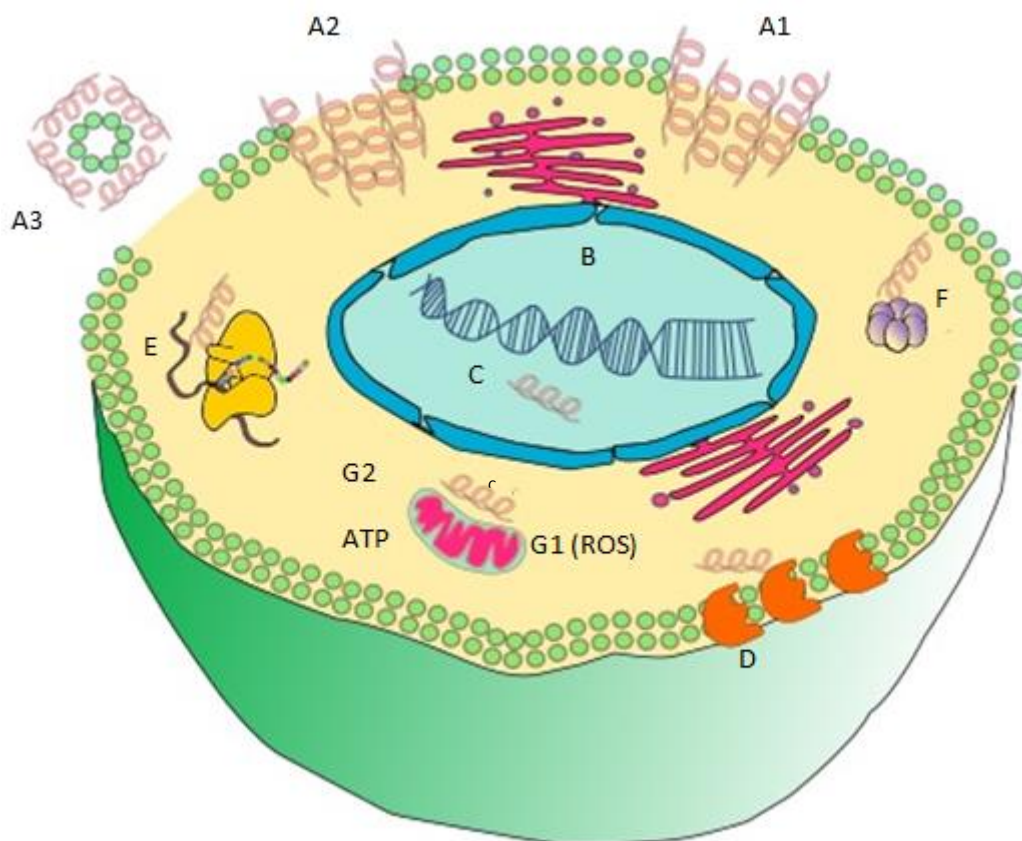


Figura 4. Mecanismos descritos de ação de peptídeos antimicrobianos em células eucarióticas. (A) Interação com a membrana celular: (1) formação de poros tipo barril em bastão, (2) formação de poros toroidais, e (3) formação de tapete sobre membrana com liberação de micelas. (B) (1) inibição da respiração celular, (2) rompimento da membrana mitocondrial.

Além das infecções bacterianas, BaPs potencialmente podem atuar contra infecções fúngicas, que no Brasil estima-se acometer pelo menos 4 milhões de indivíduos por ano, dos quais 2,8 milhões (70 %) são candidíases e 1 milhão (25 %) aspergiloses (COLOMBO et al., 2013; FIORAVANTI, 2016; GIACOMAZZI et al., 2016). Embora BaPs com atividade antifúngica sejam menos estudados em relação aos antibacterianos, merecem pelo menos a mesma atenção pelo desafio que as infecções fúngicas representam, principalmente em contextos de imunocomprometimento e pela resistência aos fármacos atualmente disponíveis (VENKATESAN et al., 2005; MATEJUK et al., 2010).

A despeito dos potentes antibióticos disponíveis no mercado, o surgimento de micro-organismos resistentes é constante, levando ao aumento de bactérias multirresistentes, à

rápida disseminação desses patógenos, a restrição de tratamentos possíveis, e a elevação das taxas de mortalidade por doenças infecciosas (WALSH et al., 2005). A indústria farmacêutica está constantemente em busca de novos agentes antimicrobianos (MARTINS et al., 2004; PILONETTO et al., 2004; CEPEDA et al., 2005). Nesse contexto, a identificação de BaPs com atividade antimicrobiana pode ser muito vantajosa, posto que esses compostos agem em menores períodos de tempo e têm um amplo espectro de ação, inclusive sobre cepas resistentes aos antimicrobianos convencionais (ZASLOFF, 2002; BENKERROUM, 2010).

5.2 Atividade Antioxidante

Espécies reativas de oxigênio (*Reactive Oxygen Species*- ROS), como os radicais superóxido (O_2^-), hidroxila (OH) e peroxila ($ROO\bullet$) são espécies que apresentam elétrons desemparelhados (HALLIWELL, 2007). Em organismos aeróbios as ROS são produzidas pelas células durante o processo de respiração, para converter os nutrientes dos alimentos absorvidos em energia e auxiliar na homeostase celular, regulando as reações de oxidação e redução nos tecidos, que em baixas concentrações atuam na defesa, formação de ATP, regulação de crescimento celular e na produção de oxigenases. Essas espécies químicas são instáveis e capturam elétrons de outras moléculas, danificando células por induzirem a oxidação de lipídios da membrana, carboidratos, proteínas, enzimas e ácidos nucleicos (GÜLÇİN, 2012). Os danos causados se acumulam em células somáticas e a exposição excessiva do organismo à ação de radicais livres está associada a diversas doenças, incluindo aterosclerose, enfisema pulmonar, doenças inflamatórias, artrite, diabetes tipo 2, mal de Parkinson, mal de Alzheimer, catarata e neoplasias, além de ser considerado um dos principais precursores do processo de envelhecimento (HALLIWELL & WHITEMAN, 2004; SCALBERT et al., 2005; VALKO et al., 2007; ZHANG et al., 2009; CAROCHO & FERREIRA, 2013).

BaPs com capacidade antioxidante são tipicamente constituídos de 5-11 aminoácidos hidrofóbicos (prolina, histidina, tirosina ou triptofano). A quantidade de histidina, cisteína, prolina, metionina e aminoácidos aromáticos contribuem para a atividade antioxidante de peptídeos isolados de alimentos. A adição de aminoácidos hidrofóbicos como a prolina e leucina a um dipeptídeo histidina-histidina (His-His) na porção N-terminal parece potencializar a capacidade antioxidante (CHEN et al., 1996; PIHLANTO, 2006). De acordo com Malaguti et al. (2014), foi observada maior atividade antioxidante quando a molécula é composta pelo tripeptídeo prolina-histidina-histidina (Pro-His-His); no entanto, a atividade antioxidante também ocorreu com a presença de tirosina (Tyr) e triptofano (Trp) na porção C-terminal (devido à capacidade desses aminoácidos doarem prótons), ou pela presença de resíduos hidrofóbicos valina (Val) e leucina (Leu) na porção N-terminal (HERNÁNDEZ-LEDESMA et al., 2008).

BaPs isolados de leite foram relatados em estudos anteriores como moléculas com elevado potencial antioxidante (CUMBY et al., 2008; HOGAN et al., 2009). Dessa forma, a obtenção *in vitro* desses compostos pode ser utilizada pela indústria farmacêutica e alimentícia na perspectiva estratégica para atenuar os efeitos deletérios do estresse oxidativo no organismo (FANG et al., 2002; HUANG et al., 2005).

5.2.1 Mecanismos dos peptídeos antioxidantes

Os mecanismos da atividade antioxidante dos BaPs de leite não são bem compreendidos. Contudo, sabe-se que esses compostos diminuem os danos causados pelo estresse oxidativo pela participação nas reações de oxirredução, neutralizando os radicais livres intermediários ou impedindo que as reações aconteçam (LIU & NAIR, 2010).

Diversos métodos podem ser aplicados para avaliar o potencial antioxidante. Entre os ensaios mais utilizados estão o baseado no sequestro do radical livre 2,2-difenil-1-picrilhidrazila

(DDPH) (ZHANG et al., 2011); a capacidade de redução do radical oxigênio (*Oxygen Radical Absorbance Capacity*- ORAC) (DÁVALOS et al., 2004); a capacidade de redução do íon ferro (*Ferric Reducing Antioxidant Power*- FRAP) (OU et al., 2002); o potencial de captura do sal de amônio do ácido 2,2'-azinobis(3-etilbenzenotiazolina6-sulfônico)] (ABTS) (GÓMEZ-GUILLÉN et al., 2010); o potencial de quelação de metais de transição Cu^{2+} e Fe^{2+} (THEODORE et al., 2008; NAZEER & KULANDI, 2012) e quantificação de produtos de peroxidação lipídica (*Thiobarbituric acid reactive substances*- TBARS) (RAGHAVAN & KRISTINSSON, 2008). Além desses, também são realizados experimentos eletroquímicos que relacionam o potencial de oxidação e intensidade de corrente elétrica com a capacidade antioxidante (MORIMITSU & OKAZAKI, 2009). Dentre os métodos listados, o DPPH e o ORAC são os mais populares em estudos prévios para avaliação de potencial antioxidante em leite (HOGAN et al., 2009; TIJERINA-SÁENZ et al., 2009; ALYAQOUBI et al., 2014; MANN et al., 2016; COTTICA et al., 2018).

5.2.1.1 Redução do radical DPPH

O DPPH é um método colorimétrico de quantificação da ação antioxidante *in vitro* barato, rápido, simples e eficaz. Baseia-se na eliminação de radicais livres estáveis que formam o reagente 2,2-difenil-1-picrilhidrazila por compostos com atividade antioxidante (KEDARE & SINGH, 2011). Desenvolvido por Blois (1958), o método é caracterizado pela alteração da coloração violeta do composto para cor amarelada após ação do antioxidante, que fornece um hidrogênio ao átomo instável de nitrogênio (Figura 5), reduzindo-o e tornando-se absorvível a 517 nm (CONTRERAS-GUZMAN & STRONG, 1982; ZHANG et al., 2011).

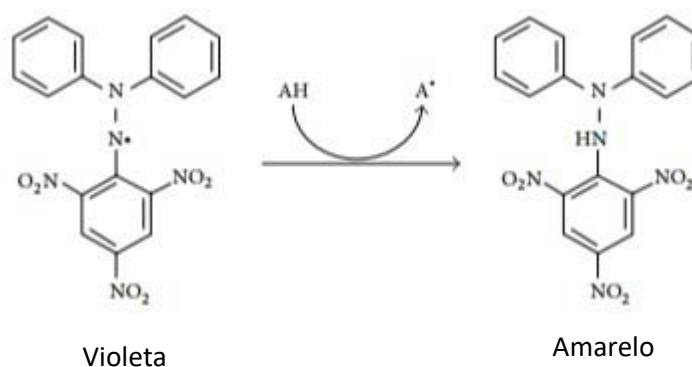


Figura 5. Princípio da atividade de eliminação de radical DPPH (TEIXEIRA et al., 2013).

5.2.1.2 Capacidade de absorbância do radical oxigênio (ORAC)

O ensaio de ORAC consiste em um método analítico-quantitativo de determinação do potencial antioxidante de compostos de diferentes fontes biológicas, principalmente plasma humano, DNA, proteínas e extratos vegetais e alimentícios (PRIOR & CAO, 1999). Baseia-se na aplicação de um agente oxidante com radicais peroxilas de composto azo (2,2'-azobis-metilpropionamídico-dihidroclorido - AAPH) que juntamente com uma molécula repórter fluorescente demonstrará o consumo do oxigênio na reação. A molécula repórter sofre danos conformacionais ao entrar em contato com o radical peroxila, diminuindo sua fluorescência (excitação: 485 nm; emissão: 525 nm) com o tempo. Compostos antioxidantes realizam a transferência de hidrogênio (*Hydrogen Atom Transfer- HAT*) para estabilizar o radical livre, o que retarda a taxa de decaimento da fluorescência e permite correlacionar a redução da fluorescência à quantidade de oxidante presente, aplicando-se o inverso no caso de agente com potencial antioxidante (HUANG et al., 2002; DÁVALOS et al., 2004; CASTELO-BRANCO & TORRES, 2011).

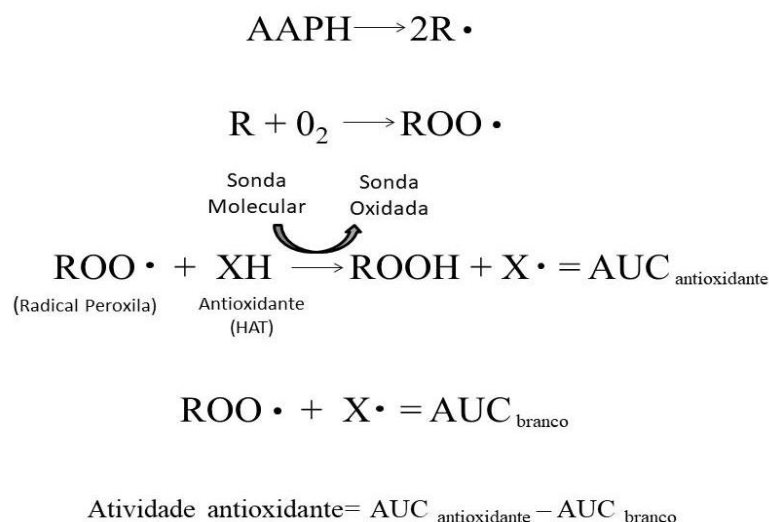


Figura 6. Mecanismo do ensaio de Capacidade de Absorbância do Radical Oxigênio (ORAC). Original da autora.

As reações utilizam amostras com antioxidante e controle branco (sem a presença de antioxidante) e são analisadas até o esgotamento total do sinal de fluorescência, permitindo a determinação da área sob a curva (*Area Under Curve*- AUC) de decaimento da fluorescência da amostra e do branco. O potencial antioxidante é determinado pela diferença entre as AUCs, sendo os resultados tipicamente expressos em Trolox®-equivalente (TE), calculado a partir de uma curva de calibração de Trolox®, um antioxidante padrão, análogo da vitamina E (DÁVALOS et al., 2004).

5.3 Atividade Antineoplásica

Câncer é a denominação genérica de mais de uma centena de doenças bastante heterogêneas, resultado de alterações moleculares (constitucionais e/ou induzidas pelo ambiente) que tipicamente se caracterizam pelo acúmulo de células neoplásicas malignas nos tecidos, proporcionando a formação de tumor com crescimento relativamente autônomo em relação aos congêneres normais. As células malignas invadem os tecidos adjacentes ao tumor e podem eventualmente se disseminar pelo organismo pelo processo de metástase, por exemplo. (HANAHAHAN & COUSSENS, 2012; STADLER et al., 2015; FREI, 2017). Diferentemente de tumores benignos, com crescimento mais limitado e que possuem células normais ou mais

discretamente alteradas (e.g., lesões geradas em processos adaptativos, como hiperplasias ou metaplasias), os tumores malignos apresentam grupo desorganizado de células geneticamente mais instáveis, têm crescimento mais rápido e elevado potencial replicativo. Adicionalmente, evadem dos supressores de crescimento, do sistema imunitário e da morte celular, induzem a angiogênese, tem capacidade de invadir e metastizar e adquirem imortalidade replicativa (HANAHAHAN & WEINBERG, 2011).

Cânceres compõem a segunda causa de mortalidade mundial e apresentam incidência crescente, com 15 milhões de novos casos estimados até 2020, podendo atingir 12 milhões de morte até esse período. Aproximadamente, 35% das mortes causadas por câncer estão associadas à dieta e ao estilo de vida (DE KOK et al., 2008; DE MEJIA & DIA, 2010). Uma porção significativa dos casos de cânceres progride com disseminação das células malignas por meio do sistema vascular (vasos linfáticos ou sanguíneos), processo denominado metástase. Tratamentos de ação dirigida ao tumor primário podem ser eficazes quando a doença é localizada, mas o prognóstico é substancialmente empobrecido para doença sistêmica, com redução da sobrevida do paciente e elevação das taxas de mortalidade (FREI, 2017).

As abordagens terapêuticas mais comuns contra cânceres são a cirurgia e radioterapia, de ação local, e a quimioterapia, que é recurso fundamental nos casos de doença disseminada (HARRIS et al., 2013). A quimioterapia citotóxica, um dos pilares do tratamento oncológico, utiliza fármacos para erradicar as células neoplásicas, quer seja pela indução de sua morte ou por inibição da divisão celular, por exemplo. Apesar de ser opção terapêutica importante para a maioria dos pacientes com câncer, a quimioterapia tipicamente apresenta baixa especificidade pela célula maligna, gerando efeitos indesejáveis pelo comprometimento também de células normais (FREI, 2017).

Um dos maiores desafios para novas terapias aplicáveis contra cânceres é obter elevada especificidade contra os tumores neoplásicos sem proporcionar resistência, o que ocasiona elevação de doses de quimioterápicos com aumento consequente de efeitos indesejados, com prejuízo para qualidade de vida e sobrevida dos pacientes. A fim de adequadamente delinear objetivos do desenvolvimento de novos agentes para tratamento oncológico, é de suma importância a precisa aplicação de termos e definições aplicáveis à investigação e desenvolvimento tecnológico em cancerologia. Definições pertinentes incluem, por exemplo, a de *agente citotóxico* (capaz de causar efeito tóxico em células, incluindo células cancerosas, podendo matá-las), *agente antineoplásico* (capaz de bloquear a formação de neoplasias, incluindo cânceres), *agente antitumoral* (compromete a formação de tumores); e *agente anticarcinogênico* (retarda ou previne o desenvolvimento de câncer) (NATIONAL CANCER INSTITUTE, 2017).

Constituintes de alimentos, como proteínas e peptídeos, eventualmente podem reduzir o risco do desenvolvimento de um tumor neoplásico ou mesmo tornar as células neoplásicas mais sensíveis a outras abordagens de tratamento oncológico (e.g., quimiosensibilização) podendo atuar contra neoplasias em diferentes estágios da formação (DE KOK et al., 2008; DE MEJIA & DIA, 2010; GATOUILLAT & MADOULET, 2017). Alguns estudos referem que peptídeos derivados de leite podem apresentar atividade antimutagênica, antineoplásica, antitumorigênica e anticarcinogênica. Dentre os possíveis alvos de ação contra os cânceres, estão os eventos relacionados à proteção de tumores, sendo necessária a ação antioxidante, imunomodulatória e anti-inflamatória, e também a modulação da metabolização enzimática, a inibição da angiogênese e a ativação da apoptose (PAPO & SHAI, 2005; GASPAR et al, 2013; PEPE et al., 2013). Por exemplo, foi relatado que caseínafosfolipídeos modularam a proliferação e apoptose de células tumorais intestinais HT-29 (PEPE et al., 2013) e que o peptídeo α_{s1} -

casomorfina inibiu a proliferação de células de câncer de mama humano T47D (KAMPA et al., 1996).

Embora não seja atribuído às caseínas ações para prevenção de cânceres, à partir dessas proteínas podem ser gerados peptídeos com capacidade antineoplásica por atuarem na regulação do crescimento, diferenciação e morte celulares (HSIEH et al., 2015). Esses peptídeos foram relacionados, por exemplo, com a ativação de canais de cálcio em linhagens celulares de carcinomas de cólon humano HT-29 (BSTCL 132) e AZ-97, culminando em inibição de proliferação celular e indução de apoptose, além de revelar atividade antitumoral preventiva em outros tipos celulares (PEREGO et al., 2012; 2013).

5.3.1 Ação antineoplásica de peptídeos bioativos

Peptídeos com ação antineoplásica podem interferir em processos críticos para o desenvolvimento de cânceres (tais como a proliferação celular irrestrita), ou mesmo a progressão tumoral (e.g., desenvolvimento de metástases). Alguns autores indicam que esses compostos apresentam estrutura primária ou secundária tipo α -hélice ou folha β -pregueada (HOSKIN & RAMAMOORTHY, 2008; HAMMAMI & FLISS, 2010). Tendem a ser moléculas catiônicas – o que favorece sua interação com células malignas, tipicamente de carga negativa – favorecendo a seletividade dos peptídeos por células malignas, uma vez que células saudáveis possuem carga neutra (zwitteriônica) e altos teores de colesterol, o que dificulta a absorção de moléculas catiônicas (SCHWEIZER, 2009; GASPAR et al., 2013).

Peptídeos anticarcinogênicos são eficazes na ativação da sinalização de supressores de tumor e na inibição de oncogenes. De uma forma geral, todos os processos da doença envolvem interações com proteínas e DNA, tornando-se necessário a elaboração de compostos capazes de interagir com essas moléculas para auxiliar no combate ao câncer (SARAFAZ-YAZDI & MICHL (2017).

É sugerido que os mecanismos de ação de peptídeos com atividade antineoplásica são divididos em eventos membranolíticos e não-membranolíticos (HARRIS et al., 2013). Os eventos membranolíticos podem ser do tipo barril em bastão (*Barrel-stave*) e formação de “tapete” (*Carpet-like*) à semelhança da atividade exercida por peptídeos antimicrobianos nas membranas plasmáticas, além de poder ocasionar distúrbio de membranas mitocondriais que culminam com a deflagração de apoptose (SCHWEIZER, 2009). Os eventos não-membranolíticos podem exercer mecanismos multifuncionais, como pela inibição da síntese de DNA, atividade imunoestimulatória, inibidores de proteínas cinases e proteases, bloqueio dos receptores de celulares e ligação às proteínas de adesão celular (Figura 7) (MADER & HOSKIN, 2006; LÓPEZ-OTÍN & MATRISIAN, 2007; MACKAY & TWELVES, 2007; BHUTIA & MAITI, 2008; WANG et al., 2009; ROSCA et al., 2011; KURIYAMA et al., 2013). Assim, esses peptídeos atuam tanto como inibidores como ativadores em processos biológicos relevantes na patogênese de cânceres (SARAFAZ-YAZDI & MICHL, 2017).

Digno de nota, o remodelamento vascular tecidual, que pode ocorrer às custas de angiogênese tumoral, é um fator importante para o desenvolvimento dos cânceres e seus fenômenos de progressão, tais como a metástase. No transcorrer da segunda metade do século XX a manipulação da angiogênese tumoral emergiu como importante estratégia terapêutica em oncologia. Contudo, a angiogênese também exerce papel central em outras doenças como as vasculares, tumores benignos, obesidade e aterosclerose (CARMELIET & JAIN, 2011), de modo que compostos capazes de modular esse fenômeno também são interessantes para tratamento de outras doenças relevantes em saúde pública.

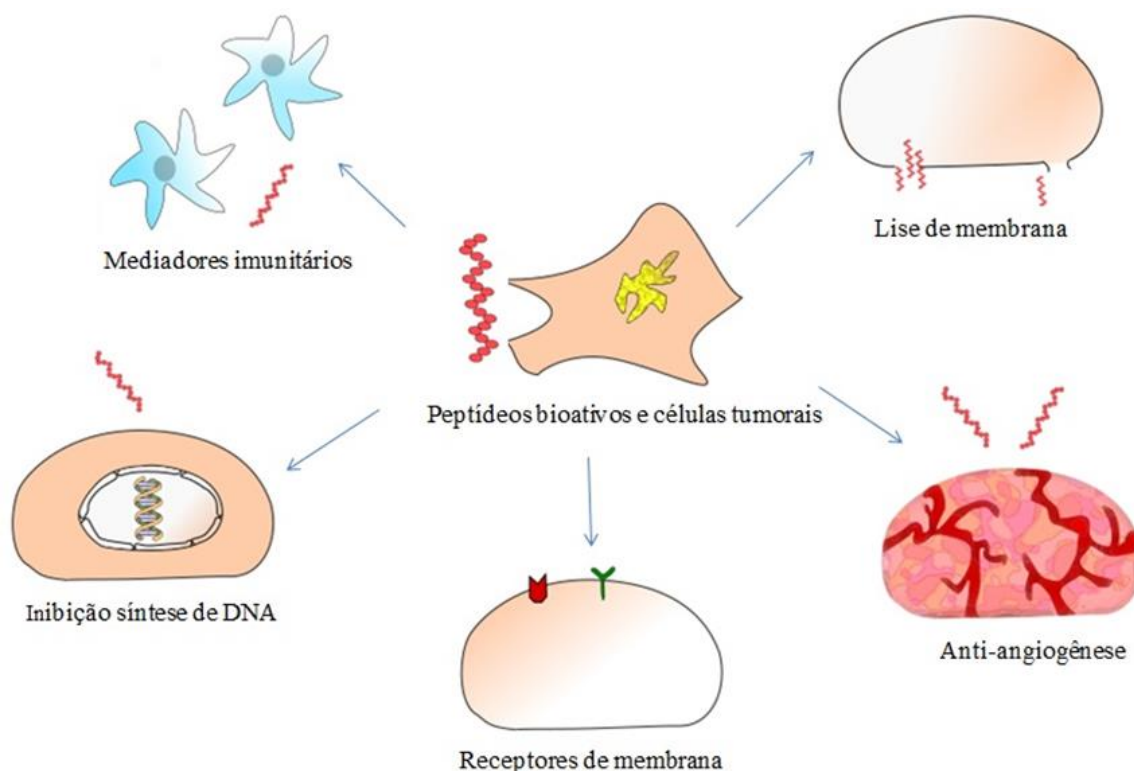


Figura 7. Exemplos de mecanismos propostos de ação de peptídeos com atividade antineoplásica. Ações membranolíticas, necróticas e apoptóticas (A); propriedades anti-angiogênicas (B); ações sobre receptores de superfície celular (C); inibição de síntese de DNA (D); ativação de resposta imunitária (E).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

Os esforços para o desenvolvimento de novas terapias para o câncer visam tratamentos mais seletivos e menos agressivos para o paciente. Terapias baseadas em peptídeos podem se tornar promissoras, considerando a elevada especificidade em relação aos alvos, elevada permeabilidade celular pelo baixo peso molecular, ação rápida, toxicidade relativamente baixa e menores possibilidades de desencadear resistência pelas células (TØRFOSS et al., 2012). Alguns autores sugerem que o emprego de peptídeos pode ocasionar a destruição de tumores primários, prevenindo a formação de metástase (SHADIDI & SIOUD, 2003; BHUTIA & MAITI, 2008; HOSKIN & RAMAMOORTHY, 2008), ou potencializar a ação de quimioterápicos clássicos, auxiliando no efeito antitumoral (CICCONE, 2012).

6 CONCLUSÃO

Peptídeos bioativos de leite com atividades multifuncionais podem ser produzidos por ação de proteases geradas por Fermentação em Estado Sólido utilizando resíduos agroindustriais e micro-organismos, possibilitando a obtenção desses compostos de forma economicamente e ambientalmente interessantes, bem como a aplicação desses em diversos nichos industriais, inclusive auxiliando em uma ampla gama de doenças crônicas que são carentes de tratamentos na atualidade.

7 REFERÊNCIAS

- ABIDI, F.; LIMAM, F.; NEJIB, M.M. Production of alkaline proteases by *Botrytis cinerea* using economic raw materials: Assay as biodetergent. **Process Biochemistry**, v. 43, n. 11, p. 1202–1208, 2008.
- ADRIO, J.L.; DEMAINE, A.L. Microbial enzymes: Tools for biotechnological processes. **Biomolecules**, v. 4, n. 1, p. 117–139, 2014.
- ALYAQOUBI, S.; ABDULLAH, A.; ADDAI, Z.R. Antioxidant activity of goat's milk from three different locations in Malaysia. **AIP Conference Proceedings**, v. 1614, p. 198-201, 2014.
- ARORA, S.; GOSH, R.R.S. Bioreactors in solid state fermentation technology: Design, applications and engineering aspects. **Journal of Biotechnology**, v. 269, p. 16-34, 2018.
- AZEVEDO, D. 2004. Apostila de espectrometria de massas. Disponível em: <http://cebime.propesq.ufsc.br/files/2012/07/Apostila-Espectrometria-de-Massas-D%C3%A9bora-Azevedo.pdf>. Acessado em: 31 de dezembro de 2017
- BENKERROUM, N. Antimicrobial peptides generated from milk proteins: A survey and prospects for application in the food industry. A review. **International Journal of Dairy Science**, v. 63, p. 320-338, 2010.
- BHUTIA, S. K.; MAITI, T.K. Targeting tumors with peptides from natural sources. **Trends in Biotechnology**, v. 26, n. 4, p. 210–217, 2008.
- BLOIS, M.S. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. **Nature**, v. 181, n. 4617, p. 1199–1200, 1958.
- BUTLER, D.F.; MYERS, A.L. Changing epidemiology of *Haemophilus influenza* in children. **Infectious Disease Clinics of North America**, v.32, n.1, p.119-128, 2018.
- CARMELIET, P.; JAIN, R.K. Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. **Nature**, v. 473, n. 7347, p. 298-307, 2011.
- CAROCHO, M.; FERREIRA, I.C.F.R. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. **Food and Chemical Toxicology: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association**, v. 51, p. 15–25, 2013.
- CASTELO-BRANCO, V.N.; TORRES, A.G. Total antioxidant capacity of edible vegetable oils: Chemical determinants and associations with oil quality. **Revista de Nutrição**, v. 24, n. 1, p. 173–187, 2011.

CASTRO, H.C.; ABREU, P.A.; GERALDO, R.R.; MARTINS, R.C.A.; SANTOS, R.; LOUREIRO, N.I.V.; CABRAL, L.M.; RODRIGUES, C.R. Looking at the proteases from a simple perspective. **Journal of Molecular Recognition: JMR**, v. 24, n. 2, p. 165–181, 2011.

CASTRO, R.J.S.; SATO, H.H. Production and biochemical characterization of protease from *Aspergillus oryzae*: An evaluation of the physical–chemical parameters using agroindustrial wastes as supports. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 3, n. 3, p. 20–25, 2014.

CASTRO, R.J.S.; SATO, H.H. Synergistic effects of agroindustrial wastes on simultaneous production of protease and α -amylase under solid state fermentation using a simplex centroid mixture design. **Industrial Crops and Products**, v. 49, n. Supplement C, p. 813–821, 2013.

CEPEDA, J.A.; WHITEHOUSE, T.; COOPER, B.; HAILS, J.; JONES, K.; KWAKU, F.; TAYLOR, L.; HAYMAN, S.; COOKSON, B.; SHAW, S.; KIBBLER, C.; SINGER, M.; BELLINGAN, G.; WILSON, A.P. Isolation of patients in single rooms or cohorts to reduce spread of MRSA in intensive-care units: Prospective two-centre study. **Lancet** (London, England), v. 365, n. 9456, p. 295–304, 2005.

CHAKRABARTI, S.; JAHANDIDEH, F.; WU, J. Food-derived bioactive peptides on inflammation and oxidative stress. **BioMed Research International**, v. 2014, p. 1–11, 2014.

CHEN, H.-M.; MURAMOTO, K.; YAMAUCHI, F.; NOKIHARA, K. Antioxidant activity of designed peptides based on the antioxidative peptide isolated from digests of a soybean protein. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 44, n. 9, p. 2619–2623, 1996.

CHUTMANOP, J.; CHUICHULCHERM, S.; CHISTI, Y.; SRINOPHAKUN, P. Protease production by *Aspergillus oryzae* in solid-state fermentation using agroindustrial substrates. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 83, n. 7, p. 1012–1018, 2008.

CICCONE, C.D. Types of anticancer drugs. In: Geriatric Physical Therapy. 3 ed. Geriatric Pharmacology. 2012

CICERO, A.F.G.; FOGACCI, F.; COLLETTI, A. Potential role of bioactive peptides in prevention and treatment of chronic diseases: A narrative review: Bioactive peptides effects. **British Journal of Pharmacology**, v. 174, n. 11, p. 1378–1394, 2017.

COLOMBO, A.L.; GARNICA, M.; ARANHA CAMARGO, L.F.; DA CUNHA, C.A.; BANDEIRA, A.C.; BORGHI, D.; CAMPOS, T.; SENNA, A.L.; VALIAS DIDIER, M.E.; DIAS, V.C.; NUCCI, M. *Candida glabrata*: An emerging pathogen in Brazilian tertiary care hospitals. **Medical Mycology**, v. 51, n. 1, p. 38–44, 2013.

- CONTRERAS-GUZMAN, E.S.; STRONG, F.C.I. Determination of tocopherols (vitamin E) by reduction of cupric ion [Foods, feeds, chemical analysis, methods]. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists** (USA), 1982.
- COTTICA, S.M.; AMADO, D.A.V.; AGUIAR, S.C.; BOEING, J.S.; FRANCO, S.L.; ZEOULA, L.M.; VISENTAINER, J.V. Antioxidant activity and lipid oxidation in milk from cows with soybean oil and propolis extract added to their feed. **Food Science and Technology**, p. 1-8, 2018.
- CUMBY, N.; ZHONG, Y.; NACZK, M.; SHAHIDI, F. Antioxidant activity and water-holding capacity of canola protein hydrolysates. **Food Chemistry**, v. 109, n. 1, p. 144–148, 2008.
- DAGAN, A.; EFRON, L.; GAIDUKO, V.L.; MOR, A.; GINSBURG, H. *In vitro* antiplasmodium effects of dermaseptin S4 derivatives. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 46, n. 4, p. 1059–1066, 2002.
- DALIRI, E.B.; LEE, B.H.; OH, D.H. Current trends and perspectives of bioactive peptides. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 58, n. 13, p. 2273–2284, 2018.
- DASHPER, S.G.; LIU, S.W.; REYNOLDS, E.C. Antimicrobial peptides and their potential as oral therapeutic agents. **International Journal of Peptide Research and Therapeutics**, v. 13, n. 4, p. 505–516, 2007.
- DÁVALOS, A.; GÓMEZ-CORDOVÉS, C.; BARTOLOMÉ, B. Extending applicability of the oxygen radical absorbance capacity (ORAC–Fluorescein) assay. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 1, p. 48–54, 2004.
- DE KOK, T.M.; VAN BREDA, S.G.; MANSON, M.M. Mechanisms of combined action of different chemopreventive dietary compounds: A review. **European Journal of Nutrition**, v. 47 Suppl 2, p. 51–59, 2008.
- DE MEJIA, E.G.; DIA, V.P. The role of nutraceutical proteins and peptides in apoptosis, angiogenesis, and metastasis of cancer cells. **Cancer Metastasis Reviews**, v. 29, n. 3, p. 511–528, 2010.
- DUFOURC, E.; BUCHOUX, S.; TOUPÉ, J.; SANI, M.A.; JEAN-FRANÇOIS, F.; KHEMTÉMOURIAN, L.; GRÉLARD, A.; LOUDET-COURRÈGES, C.; LAGUERRE, M.; ELEZGARAY, J.; DESBAT, B.; ODAERT, B. Membrane interacting peptides: From killers to helpers. **Current Protein & Peptide Science**, v. 13, n. 7, p. 620–631, 2012.
- EL ENSHASY, H. Filamentous fungal cultures-process characteristics, products, and applications. In: Yang, S-T. *Bioprocessing for Value-Added Products from Renewable Resources*. 1ed. New Technologies and Application, 2007, p. 225–261.

- EL-SALAM, M.H.A.; EL-SHIBINY, S. Preparation, properties, and uses of enzymatic milk protein hydrolysates. **Critical Reviews in Food Science**, v.57, p. 1119-1132, 2017.
- FANG, Y.-Z.; YANG, S.; WU, G. Free radicals, antioxidants, and nutrition. **Nutrition** (Burbank, Los Angeles County, Calif.), v. 18, n. 10, p. 872–879, 2002.
- FEDERICI, F.; FAVA, F.; KALOGERAKIS, N.; MANTZAVINOS, D. Valorization of agro-industrial by-products, effluents and waste: concept, opportunities and the case of olive mill wastewaters. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 84, n. 6, p. 895–900, 2009.
- FIORAVANTI, C. O ataque silencioso dos fungos. **Pesquisa Fapesp**, 243 ed., 2016.
- FREI, E. Chemotherapy. In: Schwab, M. Encyclopedia of Cancer. 4 ed., Heidelberg: Springer, 2017, p. 956-960.
- GALDIERO, S.; FALANGA, A.; CANTISANI, M.; VITIELLO, M.; MORELLI, G. Peptide-lipid interactions: Experiments and applications. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, n. 9, p. 18758–18789, 2013.
- GASPAR, D.; VEIGA, A.S.; CASTANHO, M.A.R.B. From antimicrobial to anticancer peptides. A review. **Frontiers in Microbiology**, v. 4, 2013.
- GATOUILLAT, G.; MADOULET, C. Chemosensibilization In: Schwab, M. Encyclopedia of Cancer. 4 ed., Heidelberg: Springer, 2017, p. 953-956.
- GIACOMAZZI, J.; BAETHGEN, L.; CARNEIRO, L.C.; MILLINGTON, M.A.; DENNING, D.W.; COLOMBO, A.L.; PASQUALOTTO, A.C. The burden of serious human fungal infections in Brazil. **Mycoses**, v. 59, n. 3, p. 145–150, 2016.
- GIACOMETTI, J.; BURETIĆ-TOMLJANOVIĆ, A. Peptidomics as a tool for characterizing bioactive milk peptides. **Food Chemistry**, v. 230, p. 91–98, 2017.
- GIULIANI, A.; PIRRI, G.; NICOLETTO, S. Antimicrobial peptides: An overview of a promising class of therapeutics. **Open Life Sciences**, v. 2, n. 1, p. 1–33, 2007.
- GLOBAL INDUSTRIAL ENZYME MARKET REPORT, (2014). BCC Research: Market Research Reports & Industry Analysis. Disponível em: <https://www.bccresearch.com/>. Acessado em: 22 de setembro de 2017.
- GOMES-NETO, F.; VALENTE, A.P.; ALMEIDA, F.C.L. Modeling the interaction of dodecylphosphocholine micelles with the anticoccidial peptide PW2 guided by NMR data. **Molecules** (Basel, Switzerland), v. 18, n. 8, p. 10056–10080, 2013.

GÓMEZ-GUILLÉN, M.C.; LÓPEZ-CABALLERO, M.E.; LÓPEZ DE LACEY, A.; ALEMÁN, A.; GIMÉNEZ, B.; MONTERO, P. Antioxidant and antimicrobial peptide fractions from squid and tuna skin gelatin. In: Bihan, E.L.; Koueta, N. Sea by-products as a real material: New ways of application. Kerala: Transworld Research Network Signpost, 2010. p. 89-115.

GOTOU, T.; SHINODA, T.; MIZUNO, S.; YAMAMOTO, N. Purification and identification of proteolytic enzymes from *Aspergillus oryzae* capable of producing the antihypertensive peptide Ile-Pro-Pro. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 107, n. 6, p. 615–619, 2009.

GRAND VIEW RESEARCH. Global enzymes market by product (carbohydrase, proteases, lipases, polymerases e nucleases). 2014.

GRIMM, L.H.; KELLY, S.; KRULL, R.; HEMPEL, D.C. Morphology and productivity of filamentous fungi. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 69, n. 4, p. 375–384, 2005.

GÜLÇİN, İ. Antioxidant activity of food constituents: an overview. *Archives of Toxicology*, v. 86, n. 3, p. 345–391, 2012.

GYGI, S.P.; RIST, B.; GERBER, S.A.; TURECEK, F.; GELB, M.H.; AEBERSOLD, R. Quantitative analysis of complex protein mixtures using isotope-coded affinity tags. **Nature Biotechnology**, v. 17, n. 10, p. 994–999, 1999.

HALLIWELL, B. Biochemistry of oxidative stress. **Biochemical Society Transactions**, v. 35, p. 1147-1150, 2007.

HALLIWELL, B.; WHITEMAN, M. Measuring reactive species and oxidative damage *in vivo* and *in cell* culture: How should you do it and what do the results mean? **British Journal of Pharmacology**, v. 142, n. 2, p. 231–255, 2004.

HAMMAMI, R.; FLISS, I. Current trends in antimicrobial agent research: Chemo- and bioinformatics approaches. **Drug Discovery Today**, v. 15, n. 13–14, p. 540–546, 2010.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R.A. Hallmarks of cancer: The next generation. **Cell**, v.144, n.5, p. 646-674, 2011.

HANAHAN, D.; COUSSENS, L.M. Accessories to the crime: Functions of cells recruited to the tumor microenvironment, **Cancer Cell**, v. 21, p. 309-322, 2012.

HAQUE, E.; CHAND, R. Antihypertensive and antimicrobial bioactive peptides from milk proteins. **European Food Research and Technology**, v. 227, n. 1, p. 7-15, 2008.

HARRIS, F.; DENNISON, S.R.; SINGH, J.; PHOENIX, D.A. On the selectivity and efficacy of defense peptides with respect to cancer cells. **Medicinal Research Reviews**, v. 33, n. 1, p. 190–234, 2013.

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

HERNÁNDEZ-LEDESMA, B.; RECIO, I.; AMIGO, L. Beta-lactoglobulin as source of bioactive peptides. **Amino Acids**, v. 35, n. 2, p. 257–265, 2008.

HOGAN, S.; ZHANG, L.; LI, J.; WANG, H.; ZHOU, K. Development of antioxidant rich peptides from milk protein by microbial proteases and analysis of their effects on lipid peroxidation in cooked beef. **Food Chemistry**, v. 117, n. 3, p. 438–443, 2009.

HOSKIN, D.W.; RAMAMOORTHY, A. Studies on anticancer activities of antimicrobial peptides. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1778, n. 2, p. 357–375, 2008.

HSIEH, C.-C.; HERNÁNDEZ-LEDESMA, B.; FERNÁNDEZ-TOMÉ, S.; WEINBORN, V.; BARILE, D.; BELL, J.M.L.N.M. Milk proteins, peptides, and oligosaccharides: Effects against the 21st century disorders. **BioMed Research International**, v. 2015, p. 1–16, 2015.

HUANG, D.; OU, B.; HAMPSCH-WOODILL, M.; FLANAGAN, J.A.; PRIOR, R.L. High-throughput assay of oxygen radical absorbance capacity (ORAC) using a multichannel liquid handling system coupled with a microplate fluorescence reader in 96-well format. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 16, p. 4437–4444, 2002.

HUANG, D.; OU, B.; PRIOR, R.L. The chemistry behind antioxidant capacity assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 6, p. 1841–1856, 2005.

HUTH, P.J.; DIRIENZO, D.B.; MILLER, G.D. Major scientific advances with dairy foods in nutrition and health. **Journal of Dairy Science**, v. 89, n. 4, p. 1207–1221, 2006.

ILLANES, N.; WILSON, N.; TOMASELLO, N. Temperature optimization for reactor operation with chitin-immobilized lactase under modulated inactivation. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 27, n. 3–5, p. 270–278, 2000.

INOUE, K.; NAKANO, K.; ASAOKA, K.; YASUKAWA, K. Effects of thermal treatment on the coagulation of soy proteins induced by subtilisin Carlsberg. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 2, p. 717–723, 2009.

KAMPA, M.; LOUKAS, S.; HATZOGLOU, A.; MARTIN, P.; MARTIN, P. M.; CASTANAS, E. Identification of a novel opioid peptide (Tyr-Val-Pro-Phe-Pro) derived from human α s1 casein (α s1-casomorphin, and α s1-casomorphin) amide. **Biochemical Journal**, v. 319, n. 3, p. 903–908, 1996.

- KARATAŞ, H.; UYAR, F.; TOLAN, V.; BAYSAL, Z. Optimization and enhanced production of α -amylase and protease by a newly isolated *Bacillus licheniformis* ZB-05 under solid-state fermentation. **Annals of Microbiology**, v. 63, n. 1, p. 45–52, 2013.
- KASPAR, A.A.; REICHERT, J.M. Future directions for peptide therapeutics development. **Drug Discovery Today**, v. 18, n. 17–18, p. 807–817, 2013.
- KEDARE, S.B.; SINGH, R.P. Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. **Journal of Food Science and Technology**, v. 48, n. 4, p. 412–422, 2011.
- KEERTI, N.; GRUPTA, A.; KUMAR, V.; DUBEY, A.; VERMA, A.K. Kinetic characterization and effect of immobilized thermostable β -Glucosidase in alginate gel beads on sugarcane juice. **ISRN biochemistry**, v. 2014, 8 p., 2014.
- KORHONEN, H. Milk-derived bioactive peptides: From science to applications. **Journal of Functional Foods**, v. 1, n. 2, p. 177–187, 2009.
- KOUSHKI, M.M.; ROUHANI, H.; FARSI, M. Genetic manipulation of fungal strains for the improvement of heterologous genes expression (a mini-review). **African Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 41, p. 7939–7948, 2011.
- KRISHNA, C. Solid-state fermentation systems-an overview. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 25, p. 1-30, 2005.
- KUMAR, A.; SINGH, S. Directed evolution: Tailoring biocatalysts for industrial applications. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 33, n. 4, p. 365–378, 2013.
- KUMAR, V.; SINGH, D.; SANGWAN, P.; GILL, P.K. Global market scenario of industrial enzymes. In: Beniwal, V.; Sharma, A.K. Industrial enzymes: Trends, scope and relevance. New York: Nova Publisher, 2014, cap. 10, p. 174-196.
- KUMAR, V.; SINGH, G.; VERMA, A.K.; AGRAWAL, S. *In silico* characterization of histidine acid phytase sequences. **Enzyme Research**, v. 2012, 8 p., 2012.
- KURIYAMA, I.; MIYAZAKI, A.; TSUDA, Y.; YOSHIDA, H.; MIZUSHINA, Y. Inhibitory effect of novel somatostatin peptide analogues on human cancer cell growth based on the selective inhibition of DNA polymerase β . **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 21, n. 2, p. 403–411, 2013.
- KUSUMANINGTYAS, E.; WIDIASTUTI, R.; KUSUMANINGRUM, H.D.; SUHARTONO, M.T. Antimicrobial and antioxidative activities of peptides from goat milk hydrolyzed with various proteases. **Indonesian Journal of Animal and Veterinary Sciences**, v.20, n. 3, p.175-183, 2016.

LADEIRA, M.S.P.; SALVADORI, D.M.F.; RODRIGUES, M.A.M. Biopatologia do *Helicobacter pylori*. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 39, n.4, p.335-342, 2003.

LIU, Y.; NAIR, M.G. An efficient and economical MTT assay for determining the antioxidant activity of plant natural product extracts and pure compounds. **Journal of Natural Products**, v. 73, n. 7, p. 1193–1195, 2010.

LIVNEY, Y.D. Milk proteins as vehicles for bioactives. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 15, n. 1, p. 73–83, 2010.

LÓPEZ-OTÍN, C.; MATRISIAN, L.M. Emerging roles of proteases in tumour suppression. **Nature Reviews Cancer**, v. 7, n. 10, p. 800–808, 2007.

LU, J.; ZHANG, S.; LIU, L.; PANG, X.; MA, C.; JIANG, S.; LV, J. Comparative proteomics analysis of human and ruminant milk serum reveals variation in protection and nutrition. **Food Chemistry**, v. 261, p. 274–282, 2018.

MACKAY, H.J.; TWELVES, C.J. Targeting the protein kinase C family: Are we there yet? **Nature Reviews Cancer**, v. 7, n. 7, p. 554–562, 2007.

MADER, J.S.; HOSKIN, D.W. Cationic antimicrobial peptides as novel cytotoxic agents for cancer treatment. **Expert Opinion on Investigational Drugs**, v. 15, n. 8, p. 933–946, 2006.

MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J.M.; BENDER, K.S.; BUCKLEY, D.H.; STAHL, D.A. Microbiologia de Brock. 14 ed. Porto Alegre: Artmed. 2016. 1160 p.

MALAGUTI, M.; DINELLI, G.; LEONCINI, E.; BREGOLA, V.; BOSI, S.; CICERO, A.F.; HRELIA, S. Bioactive peptides in cereals and legumes: Agronomical, biochemical and clinical aspects. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 15, n. 11, p. 21120–21135, 2014.

MANAN, M.A.; WEBB, C. Design aspects of solid state fermentation as applied to microbial bioprocessing. **Journal of Applied Biotechnology and Bioengineering**, v.4, n.1, p.511-532, 2017.

MANN, S.; SHANDILYA, U.K.; SODHI, M.; KUMAR, P.; BHARTI, V.K.; VERMA, P.; SHARMA, A.; MOHANTY, A.; MUKESH, M. Determination of antioxidant capacity and free radical scavenging activity of milk from native cows (*Bos indicus*), exotic cows (*Bos taurus*), and riverine buffaloes (*Bubalus bubalis*) across different lactation stages research article. **International Journal of Dairy Processing & Research**, v. 3, p. 66-70, 2016.

MARKET & MARKET RESEARCH. Disponível em <https://www.marketsandmarkets.com/Market-Reports/bioactive-ingredients-market-46981333.html>. Acessado em 20 de setembro de 2018.

- MARTÍNEZ, R.; TORRES, P.; MENESES, M.A.; FIGUEROA, J.G.; PÉREZ-ÁLVAREZ, J.A.; VIUDA-MARTOS, M. Chemical, technological and *in vitro* antioxidant properties of mango, guava, pineapple and passion fruit dietary fibre concentrate. **Food Chemistry**, v. 135, n. 3, p. 1520–1526, 2012.
- MARTINS, S.T.; MOREIRA, M.; FURTADO, G.H.C.; MARINO, C.G.J.; MACHADO, F.R.; WEY, S.B.; MEDEIROS, E.A.S. Application of control measures for infections caused by multi-resistant gram-negative bacteria in intensive care unit patients. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 99, n. 3, p. 331–334, 2004.
- MATEJUK, A.; LENG, Q.; BEGUM, M.D.; WOODLE, M.C.; SCARIA, P.; CHOU, S.T.; MIXSON, A.J. Peptide-based antifungal therapies against emerging infections. **Drugs of the Future**, v. 35, n. 3, p. 197, 2010.
- MATSUSHITA-MORITA, M.; FURUKAWA, I.; SUZUKI, S.; YAMAGATA, Y.; KOIDE, Y.; ISHIDA, H.; TAKEUCHI, M.; KASHIWAGI, Y.; KUSUMOTO, K.I. Characterization of recombinant prolyl aminopeptidase from *Aspergillus oryzae*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 109, n. 1, p. 156–165, 2010.
- MATSUZAKI, K.; SUGISHITA, K.; ISHIBE, N.; UEHA, M.; NAKATA, S.; MIYAJIMA, K.; EPAND, R.M. Relationship of membrane curvature to the formation of pores by magainin 2. **Biochemistry**, v. 37, n. 34, p. 11856–11863, 1998.
- MELLANDER, O. The physiological importance of the casein phosphopeptide calcium salts. II. Peroral calcium dosage of infants. **Acta Societatis Medicorum Upsaliensis**, v. 55, n. 5–6, p. 247–255, 1950.
- MILDNER, A.M.; ROTHROCK, D.J.; LEONE, J.W.; BANNOW, C.A.; LULL, J.M.; REARDON, I.M.; SARCICH, J.L.; HOWE, W.J.; TOMICH, C-S.C.; SMITH, C.W.; HEINRIKSON, R.L.; TOMASSELLO, A.G. The HIV-1 protease as enzyme and substrate: Mutagenesis of autolysis sites and generation of a stable mutant with retained kinetic properties. **Biochemistry**, v. 33, n. 32, p. 9405–9413, 1994.
- MITCHELL, D.A.; BEROVIC, M. Biochemical engineering aspects of solid state bioprocessing. In: Mitchell, D.A.; Krieger, N.; Berovic, M. Alemanha: **Springer**. 2010. p. 209-238.
- MITCHELL, D.A.; CUNHA, L.E.N.; MACHADO, A.V.L.; LUZ JR, L.F.L.; KRIEGER, N. A model-based investigation of the potential advantages of multi-layer packed beds in solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 48, n.2, p. 195-203, 2010.
- MOHANTY, D.P.; MOHAPATRA, S.; MISRA, S.; SAHU, P.S. Milk derived bioactive peptides and their impact on human health: A review. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 23, n. 5, p. 577–583, 2016.

- MOHANTY, D.P.; TRIPATHY, P.; MOHAPATRA, S.; SAMANTARAY, D.P. Bioactive potential assessment of antibacterial peptide produced by *Lactobacillus* isolated from milk and milk products. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v.3, p.72-80, 2014.
- MÖLLER, N.P.; SCHOLZ-AHRENS, K.E.; ROOS, N.; SCHREZENMEIR, J. Bioactive peptides and proteins from foods: Indication for health effects. **European Journal of Nutrition**, v. 47, n. 4, p. 171–182, 2008.
- MORIMITSU, M.; OKAZAKI, A. A novel electrode material for H₂O₂ oxidation of electrochemical glucose sensors. **ECS Transactions**, v. 19, n. 6, p.211-218, 2009.
- MOTTA, A.S.; BRANDELLI, A. Characterization of an antibacterial peptide produced by *Brevibacterium linens*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 92, n. 1, p. 63–70, 2002.
- MUSONI, M.; DESTAIN, J.; THONART, P.; BAHAMA, J-B.; DELIVIGNE, F. Bioreactor design and implementation strategies for the cultivation of filamentous fungi and the production of fungal metabolites: From traditional methods to engineered systems. **Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement/Biotechnology, Agronomy, Society and Environment**, v. 19, p. 430-442, 2015.
- MUTHULAKSHMI, C.; GOMATHI, D.; KUMAR, D.G. Production, purification and characterization of protease by *Aspergillus flavus* under solid state fermentation. **Jordan Journal of Biological Sciences**, v. 4, n. 3, p. 137–148, 2011.
- NATIONAL CANCER INSTITUTE (NCI). Disponível em <https://www.cancer.gov>. Acessado em 22 de novembro de 2018.
- NAZEER, R.A.; KULANDAI, K.A. Evaluation of antioxidant activity of muscle and skin protein hydrolysates from giant kingfish, *Caranx ignobilis* (Forsskal, 1775). **International Journal of Food Science and Technology**, v. 47, p. 274–281, 2012.
- NEVES, P.R.; MAMIZUKA, E.M.; LEVY, C.E.; LINCOPAN, N. *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente: Um problema endêmico no Brasil. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 47, n.4, p. 409-420, 2011.
- NIELSEN, S.D.; BEVERLY, R.L.; QU, Y.; DALLAS, D.C. Milk bioactive peptide database: A comprehensive database of milk protein-derived bioactive peptides and novel visualization. **Food Chemistry**, v. 232, p. 673–682, 2017.
- NIGAM, P.S.N.; PANDEY, A. Solid-state fermentation technology for bioconversion of biomass and agricultural residues. In: Nigam, P.S.N.; Pandey, A. Biotechnology for agro-industrial residues utilization. Dordrecht: Springer; 2009. p. 197–221.

- NONGONIERMA, A.B.; FITZGERALD, R.J. Enhancing bioactive peptide release and identification using targeted enzymatic hydrolysis of milk proteins. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 410, n. 15, p. 3407–3423, 2018.
- NOVELLI, P.K.; BARROS, M.M.; FLEURI, L.F. Novel inexpensive fungi proteases: Production by solid state fermentation and characterization. **Food Chemistry**, v. 198, p. 119–124, 2016.
- OU, B.; HUANG, D.; HAMPSCH-WOODILL, M.; FLANAGAN, J.A.; DEEMER, E.K. Analysis of antioxidant activities of common vegetables employing oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) assays: A comparative study. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 3122-3128, 2002
- PAN, Y.; ROWNEY, M.; GUO, P.; HOBMAN, P. Biological properties of lactoferrin: An overview. **Australian Journal of Dairy Technology**, v.39, n.1, p.97-101, 2007.
- PANDEY, A. Solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v.13, n.2, p. 81-84, 2003.
- PAPO, N.; SHAI, Y. Host defense peptides as new weapons in cancer treatment. **Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS**, v. 62, n. 7–8, p. 784–790, 2005.
- PARK, Y.W.; NAM, M.S. Bioactive peptides in milk and dairy products: A review. **Korean Journal for Food Science of Animal Resources**, v. 35, n. 6, p. 831–840, 2015.
- PASCU, M.; PASCU, D-E.; TRAISTARU, G.A.; NECHIFOR, A.C.; BUNACIU, A.A.; ABOUL-ENEIN, H.Y. Different spectrophotometric methods for antioxidant activity assay of four Romanian herbs. **Journal of the Iranian Chemical Society**, v. 11, n. 2, p.315-321, 2014.
- PEPE, G.; TENORE, G.C.; MASTROCINQUE, R.; PAOLA STUSIO, P.; CAMPIGLIA, P. Potential anticarcinogenic peptides from bovine milk. **Journal of Amino Acids**, v. 2013, p. 1–7, 2013.
- PEREGO, S.; COSENTINO, S.; FIORILLI, A.; TETTAMANTI, G.; FERRARETTO, A. Casein phosphopeptides modulate proliferation and apoptosis in HT-29 cell line through their interaction with voltage-operated L-type calcium channels. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 23, n. 7, p. 808–816, 2012.
- PEREGO, S.; ZABEO, A.; MARASCO, E.; GIUSSANI, P.; FIORILLI, A.; TETTAMANTI, G.; FERRARETTO, A. Casein phosphopeptides modulate calcium uptake and apoptosis in Caco2 cells through their interaction with the TRPV6 calcium channel. **Journal of Functional Foods**, v. 5, n. 2, p. 847–857, 2013.
- PERRONE, G.; HAIDUKOWSKI, M.; STEA, G.; EPIFANI, F.; BANDYOPADHYAY, R.; LESLIE, J.F.; LOGRIECO, A. Population structure and aflatoxin production by *Aspergillus sect. flavi* from maize in Nigeria and Ghana. **Food Microbiology**, v. 41, p. 52–59, 2014.

PERSISTENCE MARKET RESEARCH. Disponível em <https://www.persistencemarketresearch.com/market-research/bioactive-peptides-market.asp>. Acessado em 20 de setembro de 2018.

PETRUCCIOLI, M.; RAVIV, M.; DI SILVESTRO, R.; DINELLI, G. Agriculture and agro-Industrial wastes, byproducts and wastewaters. In: Moo-Young, M. *Comprehensive Biotechnology*. 2 ed. Elsevier Inc. NL, 2011. p. 531-545.

PIHLANTO, A. Antioxidative peptides derived from milk proteins. **International Dairy Journal**, v. 16, n. 11, p. 1306–1314, 2006.

PILONETTO, M.; ROSA, E.A.; BROFMAN, P.R.; BAGGIO, D.; CALVÁRIO, F.; SCHELP, C.; NASCIMENTO, A.; MESSIAS-REASON, I. Hospital gowns as a vehicle for bacterial dissemination in an intensive care unit. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 8, n. 3, p. 206–210, 2004.

POZA, M.; SIEIRO, C.; CARREIRA, L.; BARROS-VELÁZQUEZ, J.; VILLA, T.G. Production and characterization of the milk-clotting protease of *Myxococcus xanthus* strain 422. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 30, p. 691–698, 2003.

PRIOR, R.L.; CAO, G. *In vivo* total antioxidant capacity: Comparison of different analytical methods. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 27, n. 11–12, p. 1173–1181, 1999.

RAGHAVAN, S.; KRISTINSSON, H.G. Antioxidative efficacy of alkali-treated tilapia protein hydrolysates: A comparative study of five enzymes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, p. 1434–1441, 2008.

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

REDDY, K.V.R.; YEDERY, R. D.; ARANHA, C. Antimicrobial peptides: Premises and promises. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 24, n. 6, p. 536–547, 2004.

RIKER LABORATORIES INC. Patent. Registration number: GB887408. Production of pyrogen-free penicilase, 1962.

RODRIGUES, P.; VENÂNCIO, A.; KOZAKIEWICZ, Z.; LIMA, N. A polyphasic approach to the identification of aflatoxigenic and non-aflatoxigenic strains of *Aspergillus section flavi* isolated from portuguese almonds. **International Journal of Food Microbiology**, v. 129, n. 2, p. 187–193, 2009.

ROSCA, E. V.; KOSKIMAKI, J. E.; RIVERA, C. G.; PANDEY, N. B.; TAMIZ, A. P.; POPEL, A.S. Anti-angiogenic peptides for cancer therapeutics. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v. 12, n. 8, p. 1101–1116, 2011.

- SABOTIČ, J.; KOS, J. Microbial and fungal protease inhibitors- current and potential applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 93, n. 4, p. 1351–1375, 2012.
- SALVATO, F.; CARVALHO, M.C.C.G. Métodos e estratégias em proteômica e suas aplicações na área vegetal. **Ciência Rural**, v.40, n.3, p.727-734, 2010.
- SÁNCHEZ-RIVERA, L.; MARTÍNEZ-MAQUEDA, D.; CRUZ-HUERTA, E.; MIRALLES, B.; RECIO, I. Peptidomics for discovery, bioavailability and monitoring of dairy bioactive peptides. **Food Research International: Foodomics a new comprehensive approach to food and nutrition**. v. 63, n. Part B, p. 170–181, 2014.
- SANDHYA, C.; SUMANTHA, A.; SZAKACS, G.; PANDEY, A. Comparative evaluation of neutral protease production by *Aspergillus oryzae* in submerged and solid-state fermentation. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 8, p. 2689–2694, 2005.
- SANTOS, L.F.; KOBLITZ, M.G.B. Proteases. In: KOBLITZ, M.G.B. Bioquímica de Alimentos. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008, p. 78-103.
- 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.
- SANTOS, T. L.; MORAES, A.; NAKAIE, C.R.; ALMEIDA, F.C.; SCHREIER, S.; VALENTE, A.P. Structural and dynamic insights of the interaction between trypsin and micelles: An NMR Study. **Biophysical Journal**, v. 111, n. 12, p. 2676–2688, 2016.
- SARFAZ-YAZDI, E.; MICHL, J. Anti-cancer Peptides. In: Schwab, M. Encyclopedia of Cancer. 4 ed., Heidelberg: Springer, 2017, p. 270-273.
- SCALBERT, A.; MANACH, C.; MORAND, C.; RÉMÉSY, C.; JIMÉNEZ, L. Dietary polyphenols and the prevention of diseases. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 45, n. 4, p. 287–306, 2005.
- SCHWEIZER, F. Cationic amphiphilic peptides with cancer-selective toxicity. **European Journal of Pharmacology**, v. 625, n. 1–3, p. 190–194, 2009.
- SERRACARBASSA, P.D.; DOTTO, P. Endoftalmite por *Candida albicans*. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, v. 66, p. 701-707, 2003.
- SGARBIERI, V.C. Propriedades fisiológicas-funcionais das proteínas do soro de leite. **Revista de Nutrição**, v. 17, n.4, p. 397-409, 2004.

- SHADIDI, M.; SIOUD, M. Selective targeting of cancer cells using synthetic peptides. **Drug Resistance Updates: Reviews and Commentaries in Antimicrobial and Anticancer Chemotherapy**, v. 6, n. 6, p. 363–371, 2003.
- SHARMA, K.M.; KUMAR, R.; PANWAR, S.; KUMAR, A. Microbial alkaline proteases: Optimization of production parameters and their properties. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, v. 15, n. 1, p. 115–126, 2017.
- SINGHANIA, R.R.; PATEL, A.K.; SOCCOL, C.R.; PANDEY, A. Recent advances in solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 44, n.1, p. 13-18, 2009.
- SOCCOL, C.R.; COSTA, E.S.F.; LETTI, L.A.J.; KARP, S.G.; WOICIECHOWSKI, A.L.; VANDENBERGHE, L.P.S. Recent developments and innovations in solid state fermentation. **Biotechnology Research and Innovation**, v. 1, p. 52-71, 2017.
- STADLER, M.; WALTER, S.; WALZL, A.; KRAMER, N.; UNGER, C.; SCHERZER, M.; UNTERLEUTHNER, D.; HENGSTSCHLAGER, M.; KRUPITZA, G.; DOLZNIG, H. Increased complexity in carcinomas: Analyzing and modeling the interaction of human cancer cells with their microenvironment. **Seminars in Cancer Biology**, v. 35, p. 107-124, 2015.
- SUKUMPRASERTSRI, M.; ; UNREAN, P.; PIMSAMARN, J.; KITSUBUN, P.; TONGTA, A. Fuzzy logic control of rotating drum bioreactor for improved production of amylase and protease enzymes by *Aspergillus oryzae* in solid-state fermentation. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 23, n. 3, p. 335–342, 2013.
- SURYANARAYAN, S. Current industrial practice in solid state fermentations for secondary metabolite production: The biocon india experience. **Biochemical Engineering Journal**, v. 13, p. 189-195, 2003.
- SURYANARAYAN, S.; MAZUMDAR, K. Patent. Registration number: US6197573B1. Solid state fermentation, 2001.
- TAVANO, O. L. Protein hydrolysis using proteases: An important tool for food biotechnology. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 90, p. 1–11, 2013.
- TEIXEIRA, J.; GASPAR, A.; GARRIDO, E. M.; GARRIDO, J.; BORGES, F. Hydroxycinnamic acid antioxidants: An electrochemical overview. **BioMed Research International**, v. 2013, 11 p., 2013.
- TERRA, M.F.; PRADO, G.; PEREIRA, G.E.; EMATNÉ, H.J.; BATISTA, L.R. Detection of ochratoxin A in tropical wine and grape juice from Brazil. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 93, n. 4, p. 890–894, 2013.

THEODORE, A.E.; RAGHAVAN, S.; KRISTINSSON H. G. Antioxidative activity of protein hydrolysates prepared from alkaline-aided channel catfish protein isolates. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, p. 7459–7466, 2008.

TIJERINA-SÁENZ, A.; INNIS, S.M.; KITTS, D.D. Antioxidant capacity of human milk and its association with vitamins A and E and fatty acid composition. **Acta Paediatrica**, v 98, n11, p. 1793-1798, 2009.

TØRFOSS, V.; ISAKSSON, J.; AUSBACHER, D.; BRANDSDAL, B.O.; FLATEN, G.E.; ANDERSSSEN, T.; CAVALCANTI-JACOBSEN, C.D.E.A.; HAVELKOVA, M.; NGUYEN, L.T.; VOGEL, H.J.; STRØM, M.B. Improved anticancer potency by head-to-tail cyclization of short cationic anticancer peptides containing a lipophilic $\beta(2,2)$ -amino acid. **Journal of Peptide Science: An Official Publication of the European Peptide Society**, v. 18, n. 10, p. 609–619, 2012.

VALENTE, A.P.; MIYAMOTO, C. A.; L ALMEIDA, F. C. Implications of protein conformational diversity for binding and development of new biological active compounds. **Current medicinal chemistry**, v. 13, n. 30, p. 3697–3703, 2006.

VALKO, M.; LEIBFRTZ, D.; MONCOL, J.; CRONIN, M. T.; MAZUR, M.; TELSER J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 39, n. 1, p. 44–84, 2007.

VAN DER KRAAN, M. I. A.; NAZMI, K.; TEEKEN, A.; GROENINK, J.; VAN 'T HOF, W.; VEERMAN, E. C.; BOLSCHER, J. G.; NIEUW AMERONGEN, A. V. Lactoferrampin, an antimicrobial peptide of bovine lactoferrin, exerts its candidacidal activity by a cluster of positively charged residues at the C-terminus in combination with a helix-facilitating N-terminal part. **Biological Chemistry**, v. 386, n. 2, p. 137–142, 2005.

VENKATESAN, P.; PERFECT, J. R.; MYERS, S. A. Evaluation and management of fungal infections in immunocompromised patients. **Dermatologic Therapy**, v. 18, n. 1, p. 44–57, 2005.

VERGNOLLE, N.; CHIGNARD, M. Proteases and their receptors in inflammation. In: Parnham, M.J.; Faist, E. Progress in Inflammation Research. Alemanha: Springer. 2011.

VINIEGRA-GONZÁLEZ, G.; FAVELA-TORRES, E.; AGUILAR, C.N.; ROMERO-GOMEZ, S.J.; DÍAZ-GODÍNEZ, G.; AUGUR, C. Advantages of fungal enzyme production in solid state over liquid fermentation systems. **Biochemical Engineering Journal, Solid-State Fermentation**, v. 13, n. 2, p. 157–167, 2003.

VISHWANATHA, K.S.; APPU RAO, A. G.; SINGH, S. A. Characterization of acid protease expressed from *Aspergillus oryzae* MTCC 5341. **Food Chemistry**, v. 114, n. 2, p. 402–407, 2009.

VISHWANATHA, K.S.; RAO, A. G. A.; SINGH, S. A. Acid protease production by solid-state fermentation using *Aspergillus oryzae* MTCC 5341: Optimization of process parameters. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 37, n. 2, p. 129–138, 2010.

VISPO, N.S. Combinatoria molecular. Elfos Scientiae. **La Habana 10600**, Cuba. 405p, 2004.

WALSH, T.R.; TOLEMAN, M.A.; POIREL, L.; NORDMANN, P. Metallo-beta-lactamases: The quiet before the storm? **Clinical Microbiology Reviews**, v. 18, n. 2, p. 306–325, 2005.

WANG, G.; MISHRA, B.; LAU, K.; LUSHNIKOVA, T.; GOLLA, R.; WANG, X. Antimicrobial peptides in 2014. **Pharmaceuticals**, v. 8, n. 1, p. 123–150, 2015.

WANG, W.; DE MEJIA, E.G. A new frontier in soy bioactive peptides that may prevent age-related chronic diseases. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 4, n. 4, p. 63–78, 2005.

WANG, Y.-S.; LI, D.; SHI, H. S.; WEN, Y. J.; YANG, L.; XU, N.; CHEN, X. C.; CHEN, X.; CHEN, P.; LI, J.; DENG, H. X.; WANG, C. T.; XIE, G.; HUANG, S.; MAO, Y. Q.; CHEN, L. J.; ZHAO, X.; WEI, Y. Q. Intratumoral expression of mature human neutrophil peptide-1 mediates antitumor immunity in mice. **Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research**, v. 15, n. 22, p. 6901–6911, 2009.

WARD, O.P. Proteases. In: Moo-Young, M. *Comprehensive Biotechnology*. 2ed. Waterloo; Canada, 2011. p. 571–582.

WEBB, E.C. Recommendations of the Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology on the Nomenclature and Classification of Enzymes. *Enzyme Nomenclature*, 6ed. San Diego, USA, 1992, 863p.

WILSON, K.; WALKER, J. Principles and techniques of biochemistry and molecular biology. 7 ed., New York: Cambridge University Press, 2010.

WITTMANN-LIEBOLD, B.; GRAACK, H.-R.; POHL, T. Two-dimensional gel electrophoresis as tool for proteomics studies in combination with protein identification by mass spectrometry. **Proteomics**, v. 6, n. 17, p. 4688–4703, 2006.

WORLD HEALTH ORGANIZATION; PUBLIC HEALTH AGENCY OF CANADA (WHO) (Eds.). Preventing chronic diseases: a vital investment. Geneva. World Health Organization; Public Health Agency of Canada, 2005.

ZASLOFF, M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. **Nature**, v. 415, n. 6870, p. 389–395, 2002.

ZHANG, S.; LUO, Y.; ZENG, H.; WANG, Q.; TIAN, F.; SONG, J.; CHENG, W.H. Encapsulation of selenium in chitosan nanoparticles improves selenium availability and protects cells from selenium-induced DNA damage response. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 22, n. 12, p. 1137–1142, 2011.

ZHANG, Z.; JIN, J.; SHI, L. Antioxidant properties of ethanolic extract from *Ramulus mori* (Sangzhi). **Food Science and Technology International**, v. 15, n. 5, p. 435–444, 2009.

OBJETIVOS

- Produção de proteases *homemade* por Fermentação em Estado Sólido (FES) utilizando fungos pré-selecionados;
- Determinação da atividade proteolítica dos extratos enzimáticos fúngicos obtidos por FES;
- Purificação parcial das proteases mais promissoras;
- Produção de peptídeos bioativos por hidrólise das proteínas de leite bovino, caprino e humano utilizando as proteases fúngicas *homemade*;
- Determinação das atividades biológicas dos peptídeos bioativos e dos extratos obtidos por FES quanto à capacidade antimicrobiana, antioxidante e antineoplásica;
- Caracterização proteômica (fragmentação por eletroforese bidimensional 2D-PAGE e caracterização por espectrometria de massas ESI-MS/MS) dos peptídeos e/ou dos extratos de FES que apresentarem atividades biológicas.

CAPÍTULO 2

“Produção de peptídeos de leite com propriedade antimicrobiana
e antioxidante por proteases fúngicas”

Produção de peptídeos de leite com propriedade antimicrobiana e antioxidante por proteases fúngicas

Mirella Rossitto ZANUTTO-ELGUI¹, José Cavalcante Souza VIEIRA¹, Débora Zanoni do PRADO¹,
Marília Afonso Rabelo BUZALAF², Pedro de Magalhães PADILHA¹, Deilson ELGUI DE OLIVEIRA^{3,4},
Luciana Francisco FLEURI¹

¹ Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Biociências, Departamento de Química e Bioquímica, Botucatu, SP, Brasil.

² Universidade de São Paulo (USP), Faculdade de Odontologia de Bauru, Departamento de Ciências Biológicas, Bauru, SP, Brasil.

³ Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Medicina de Botucatu, Departamento de Patologia, Botucatu, SP, Brasil.

⁴ Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Biotecnologia, Botucatu, SP, Brasil.

Artigo publicado na **Food Chemistry** (ISSN: 0308-8146, fator de impacto 4,946, CAPES Qualis A1, área Biotecnologia), conforme consta no **Anexo II**.

RESUMO

Peptídeos bioativos podem beneficiar a saúde por diferentes mecanismos. Este estudo objetivou produzir peptídeos bioativos de leite bovino e caprino por ação proteolítica de enzimas de *Aspergillus oryzae* e *Aspergillus flavipes*, bem como avaliar a atividade antimicrobiana e antioxidante desses compostos. Os peptídeos bioativos foram gerados com sucesso a partir de ação de proteases fúngicas produzidas por fermentação em estado sólido. Os peptídeos gerados foram eficazes contra todas as bactérias e fungos testados. Atividade antioxidante foi observada para todos os peptídeos produzidos, com redução de até 92,5% de DPPH e estabilização do radical peroxila por ORAC de até 52,5 $\mu\text{mol } \mu\text{L}^{-1}$ de Equivalente de Trolox. Os peptídeos de leite gerados foram caracterizados por fracionamento 2D-PAGE, seguido de espectrometria de massas (ESI-MS/MS). Com base nos resultados do presente estudo, os peptídeos bioativos leite, com amplo espectro de ação antimicrobiana e com atividade antioxidante, podem ser produzidos de forma econômica por meio de enzimas produzidas por fermentação em estado sólido. O bioprocesso aqui abordado pode ser promissor para a aplicação em diversas áreas biotecnológicas como indústrias farmacêuticas e alimentícias.

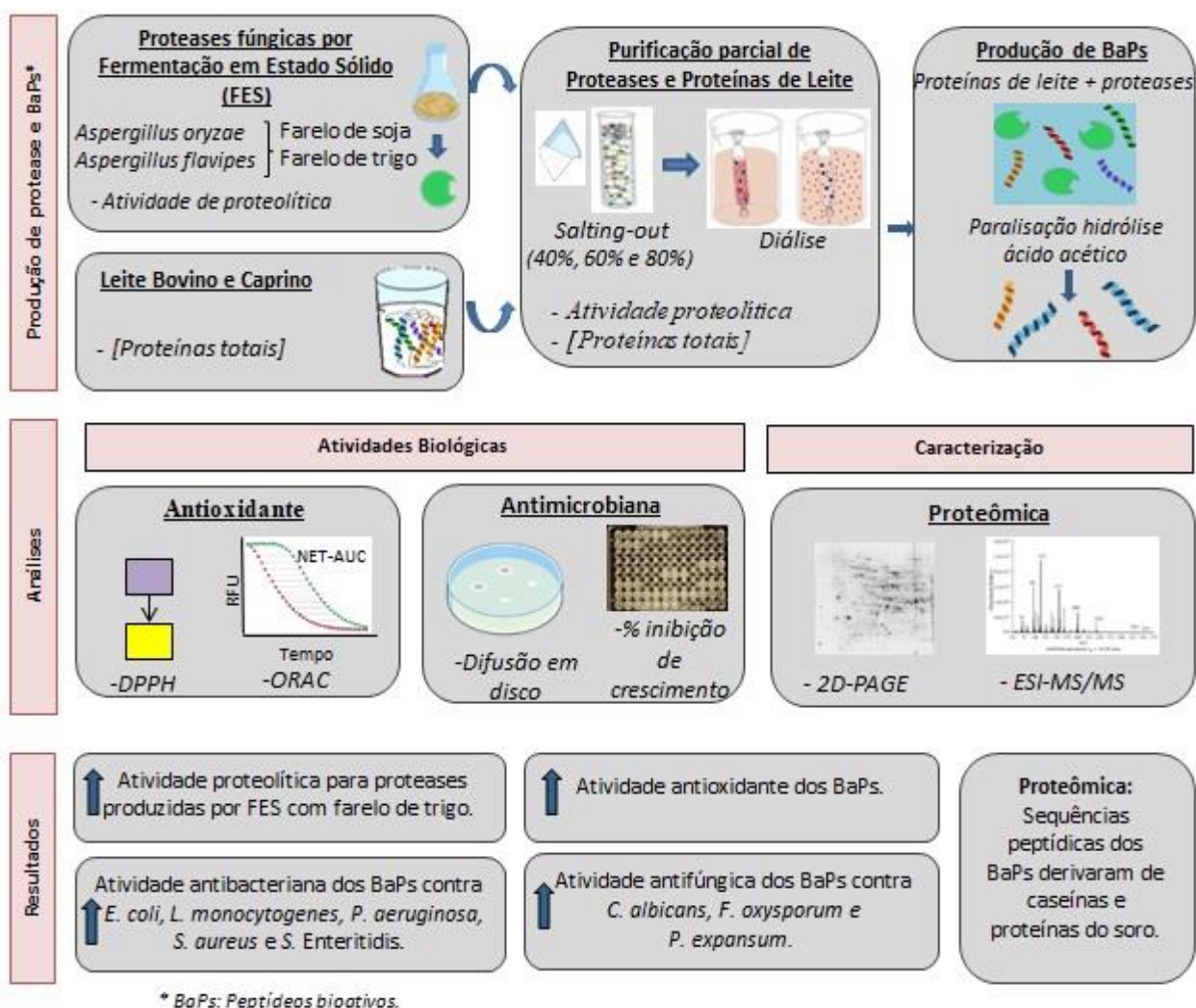
Palavras-chave: Peptídeos Bioativos, Resíduos Agroindustriais, Fermentação em Estado Sólido, Proteômica, Biotecnologia.

ABSTRACT

Bioactive peptides can provide health benefits due to different mechanisms. The aims of the present study are to produce bioactive peptides from bovine and goat milk subjected to the proteolytic activity of *Aspergillus oryzae* and *Aspergillus flavipes* enzymes, as well as to assess their putative antimicrobial and antioxidant activity. Bioactive peptides were successfully generated from proteases of fungi cultivated in solid-state fermentation. The generated peptides were effective against all tested bacteria and fungi. There was antioxidant activity, up to 92.5% DPPH reduction and ORAC stabilization at 52.5 $\mu\text{mol } \mu\text{L}^{-1}$ of Trolox Equivalent. The generation of milk-specific peptides in the samples was obtained through 2D-PAGE fractioning followed by mass spectrometry (ESI-MS/MS). Based on results in the present study, milk bioactive peptides presenting broad antimicrobial action and antioxidant activity spectra can be cost-effectively produced through solid-state fermentation. The herein addressed approach can be valuable for the pharmaceutical and food industries.

Keywords: Bioactive peptides, Agroindustrial Wastes, Solid-state Fermentation, Proteomics, Biotechnology.

RESUMO GRÁFICO



1 INTRODUÇÃO

Os peptídeos bioativos (BaPs) são fragmentos proteicos específicos com propriedades multifuncionais. Eles podem se comportar como hormônios, ou até mesmo como remédios, protegendo ou reduzindo os efeitos nocivos das doenças crônicas não transmissíveis. Os BaPs têm a capacidade de realizar muitas atividades biológicas, entre elas, as antimicrobianas, anti-hipertensivas, imunomoduladoras, opióides e antioxidantes. Os efeitos desses peptídeos estão associados ao seu conteúdo específico e à constituição de aminoácidos (KORHONEN, 2009).

Os BaPs podem derivar de diferentes fontes, incluindo o leite, que é a principal fonte nutricional de peptídeos para mamíferos neonatais, já que é rico em proteínas, minerais, hormônios e imunoglobulinas. O leite tem atraído mais interesse ao longo do tempo devido ao seu uso potencial em muitos produtos, como alimentos funcionais, suplementos e medicamentos. O leite também é uma fonte rica de peptídeos de atividades multifuncionais derivadas principalmente de caseínas e proteínas do soro do leite (NIELSEN et al., 2017).

Os BaPs derivados do leite podem ser gerados através da hidrólise enzimática do leite. Existem alguns produtos à base de peptídeos lácteos disponíveis no mercado, como por exemplo Calpis (Calpis®, Japão) e BioZate (Davisco Foods®, Estados Unidos), que são leites fermentados com propriedades anti-hipertensivas. No entanto, a produção desses leites fermentados depende de enzimas comerciais caras conhecidas por seu baixo rendimento e estabilidade na produção em grande escala (KORHONEN, 2009).

As enzimas podem ser produzidas através de processos de fermentação, como as fermentações em estado sólido (FES) e submersa (FS). A comparação entre essas duas tecnologias mostrou as vantagens da FES, a saber: menor custo (SANDHYA et al., 2005) e melhor sustentabilidade. Com nota para a versatilidade dos resíduos agroindustriais, que

podem ser utilizados como substrato para o crescimento microbiano, a redução da adição de água ao sistema requerido na FES, a necessidade de estruturas mais simples e a fácil recuperação do produto. A adição de água ao sistema pode resultar em maior rendimento devido à geração de produtos mais concentrados. O método FES também imita o *habitat* natural de fungos filamentosos, auxiliando na decomposição microbiana de diferentes substratos, crescimento rápido e demanda mínima de manutenção (VISHWANATHA et al., 2010). Assim, este método é promissor para a produção de biomoléculas que proporcionam alto valor agregado para a indústria. Peptídeos bioativos produzidos pela ação proteolítica de resíduos agroindustriais tratados são exemplos desse processo (CASTRO & SATO, 2014).

O método FES produz mais proteases fúngicas do que FS, uma vez que resulta em alto rendimento de enzimas usadas na hidrólise de proteínas e na produção de BaPs (ARORA et al., 2018). Os métodos adotados para produzir BaPs influenciam, em última análise, os efeitos biológicos desses peptídeos, bem como suas propriedades antimicrobianas e antioxidantes (NONGONIERMA & FITZGERALD, 2018).

Os BaPs derivados do leite são eficazes contra várias bactérias gram-positivas e gram-negativas, portanto, é uma fonte potencial de novos agentes antimicrobianos, inclusive cepas resistentes (MOHANTY et al., 2016). Esses peptídeos podem ser uma alternativa vantajosa para a modulação do estresse oxidativo *in vivo*, pois seu consumo é relativamente seguro e bem tolerado (SAMARANAYAKA & LI-CHAN, 2011). Nesse sentido, o presente estudo comparou diferentes parâmetros para gerar proteases de alta atividade por meio de FES com diferentes espécies fúngicas. Resíduos agroindustriais foram utilizados como substrato da FES e diferentes concentrações de sal foram adotadas para a purificação parcial de proteases. Além disso, o presente estudo descreveu o uso bem-sucedido de proteases fúngicas geradas pela FES para

produzir BaPs derivados do leite com atividade antimicrobiana e antioxidante *in vitro*, a partir de um método custo-efetivo.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Cultura Fúngica e Produção de Proteases

O acesso ao Patrimônio Genético dos micro-organismos e resíduos agroindustriais foi regularizado sob cadastro n. A3B348F na plataforma do Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético (SISGEN), conforme preconizado pela Lei Brasileira da Biodiversidade (nº 13.123/15).

As linhagens liofilizadas dos fungos *Aspergillus oryzae* (ATCC 1003/INCQS 40068) e *Aspergillus flavipes* (ATCC 16814 / INCQS 40024) foram fornecidas pelo Instituto Oswaldo Cruz (FIOCRUZ-Brasil). Estas espécies de fungos foram previamente caracterizadas como bons produtores protease por FES (NOVELLI et al., 2016). As cepas fúngicas foram inoculadas em Agar Batata Dextrose (PDA) (Himedia®, Mumbai, Índia), incubadas a 30 °C por 120 h, armazenadas em vasilina estéril a 4 °C e sub-cultivadas a cada três meses.

Proteases fúngicas foram geradas por FES em substrato composto de farelo de trigo ou farelo de soja e água 1:1 (p/v), conforme relatado anteriormente (CASTRO & SATO, 2014). Os substratos para a FES foram doados pela Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu, Brasil (22°53'09" S, 48°26'42" O). Os frascos de Erlenmeyer com o substrato e água foram esterilizados por 15 min a 121 °C. Suspensões de esporos preparadas com água destilada estéril (10^7 esporos mL⁻¹ crescidos em PDA a 30 °C por 96 h) foram inoculadas em frascos de Erlenmeyer e incubadas a 30 °C por 120 h. Extratos brutos de proteases fúngicas foram produzidos por filtração com água destilada. O

procedimento de filtração foi realizado com duas camadas de gaze de algodão para remover os micélios.

A azocaseína (Sigma-Aldrich®, St. Louis, EUA) foi utilizada como substrato para a atividade proteolítica fúngica (CHARNEY & TOMARELLI, 1947), comparando a atividade enzimática de ambas as espécies fúngicas (*A. oryzae* e *A. flavipes*) em diferentes substratos de FES (farelo de trigo e farelo de soja). Extratos enzimáticos brutos foram parcialmente purificados por fracionamento baseado no método de *salting-out*. Este método foi aplicado para a precipitação de proteínas usando sulfato de amônio a 40% de saturação (WINGFIELD, 2001). Após a centrifugação (4.000 x *g* por 15 min a 5 °C), os precipitados foram ressuspensos em tampão fosfato 0,1M pH 7,0 e dialisados utilizando membrana de diálise celulósica (47 mm) (Sigma-Aldrich®, St. Louis, EUA) contra água destilada refrigerada. O sobrenadante foi fracionado com 60% e 80% de sal, conforme mencionado anteriormente. Os extratos foram liofilizados a -90 °C por 96 h em aparelho Liotop® modelo L101 (Liotop®, São Carlos, Brasil). A atividade proteolítica foi determinada em frações parcialmente purificadas com 40%, 60% e 80% de sal. As frações que apresentaram a maior atividade de protease foram selecionadas para produzir BaPs derivados do leite por hidrólise das proteínas do leite.

2.2 Produção de *Pools* de Peptídeos Bioativos Derivados de Leite

Amostras de leite cru (não pasteurizado) de vacas saudáveis em lactação foram fornecidas por uma propriedade privada localizada em São Manuel, SP, Brasil (22°43'52" S, 48°34'14" O). Amostras de leite bovino tratado com temperatura ultra-alta (*Ultra High Temperature*- UHT) foram compradas em um mercado local (Líder Alimentos do Brasil, Brasil). Amostras de leite cru de cabra foram fornecidas pela Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual de São Paulo, Botucatu, Brasil (22°53'09" S, 48°26'42" O). O

leite de cabra comercial tratado com UHT foi comprado em um mercado local (Capprys'S Indústria de Laticínios, Brasil). Amostras de diferentes origens foram coletadas para selecionar aquelas com as maiores concentrações de proteínas totais.

As concentrações de proteínas totais de leite foram medidas em amostras parcialmente purificadas a 80% de sal - como descrito para proteases fúngicas - pelo método de Biureto (ROSE, 1833). Posteriormente, 10 mL de proteínas do leite (100 mg mL^{-1}) e 2% (p/v) de proteases foram incubadas em tampão fosfato 0,1M, pH 7,0, a 37°C por 1 h. A reação foi paralisada com ácido acético 1M. A reação foi centrifugada a $4000 \times g$ durante 20 min a 5°C para remover as proteases não hidrolisadas.

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%).

Fonte de Leite	Proteases		Amostra BaP ²
	Fungos	FPP ¹ (%)*	
Bovino (B)	<i>Aspergillus oryzae</i> (ATCC 1003) (O)	40	BO40
		60	BO60
		80	BO80
	<i>Aspergillus flavipes</i> (ATCC 16814) (F)	40	BF40
		60	BF60
		80	BF80
Caprino (G)	<i>Aspergillus oryzae</i> (ATCC 1003) (O)	40	GO40
		60	GO60
		80	GO80
	<i>Aspergillus flavipes</i> (ATCC 16814) (F)	40	GF40
		60	GF60
		80	GF80

¹ Fração Purificação Parcial; ² Abreviações designadas para as amostras de *pools* de peptídeos bioativos geradas.

*Concentração de sulfato de amônio usada para purificação parcial por *salting-out*.

Peptídeos parcialmente purificados foram ressuspensos em água ultrapura e filtrados através de filtros de membrana de poliéster sulfônico de 0,22 µm (Kasvi®, São José dos Pinhais, Brasil), então os sobrenadantes foram coletados e liofilizados a -90 °C por 96 h. Proteases inativadas foram preparadas a partir da ebulição do extrato enzimático por 10 min, e então aplicado ao leite para gerar o controle negativo. As concentrações de peptídeos foram fixadas em 214 nm (KUIPERS & GRUPPEN, 2007) utilizando equipamento NanoVue™ (GE Healthcare®, Boston, EUA) e como padrão foi albumina sérica bovina do kit *Quick Start™ Bradford Protein Assay* (Bio-Rad®, Hercules, EUA). A Tabela 1 lista os peptídeos derivados do leite produzidos.

2.3 Atividade Antimicrobiana de *Pools* de BaPs Derivados de Leite

O ensaio de difusão em disco foi utilizado para avaliar a atividade antibacteriana de BaPs contra *Listeria monocytogenes* (ATCC 7644), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Salmonella enterica* Enteritidis (ATCC 13076), *Escherichia coli* (ATCC 25922) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853). Bem como a atividade antifúngica contra *Fusarium oxysporum* (IOC 4065), *Aspergillus fumigatus* (IOC 0081), *Penicillium expansum* (IOC 4076) e *Candida albicans* (IOC 2508) (MOTTA & BRANDELLI, 2002; ATHANÁZIO-HELIODORO et al., 2018). Além disso, a taxa de inibição do crescimento de BaPs (GI%) foi estimada pelo método de microdiluição (GUDIÑA et al., 2010). Inóculos bacterianos de *S. aureus* e *E. coli* foram ajustados para densidade 0,5 McFarland em 0,85% de solução de NaCl (p/v). Os inóculos foram diluídos a $7,5 \times 10^5$ UFC mL⁻¹ e incubados com caldo Müller-Hinton (Kasvi®, São José dos Pinhais, Brasil) com as amostras de BaPs até atingir o volume final de 200 µL. As placas foram incubadas a 35 °C durante 24 h. Este procedimento foi seguido por leituras de densidade óptica (DO) a 595 nm no leitor de microplacas Bio-Rad® Modelo 680 (Bio-Rad®, Hercules, EUA). O GI% de cada cepa bacteriana foi determinado pela menor concentração de BaPs, que deve ser capaz de inibir a maior porcentagem de crescimento bacteriano avaliada através de leituras de DO.

2.4 Atividade Antioxidante de *Pools* de BaPs Derivados de Leite

As propriedades antioxidantes de BaPs derivadas do leite foram avaliadas através da redução do radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) (ZHANG et al., 2013) e capacidade de absorção de radicais de oxigênio (ORAC) (DÁVALOS et al., 2004).

A reação no ensaio de DPPH foi preparada com 125 µl de BaP, 750 µL de etanol e 75 µL de reagente DPPH (Sigma-Aldrich®, St Louis, EUA) a 2,1 g mL⁻¹. A mistura foi homogeneizada, mantida no escuro à temperatura ambiente por 1h, seguida pela leitura da absorbância a 517 nm. O branco foi preparado com 3,5 mL de etanol a 99,8% e 300 µL de DPPH. A taxa de sequestro de radicais livres foi expressa em % de redução do DPPH. Setenta (70) mM de reagente [2,2'-azobis (2-metilpropionamida)-di-hidroclorato] (AAPH) (Sigma-Aldrich®, St. Louis, EUA) e 12 mM de fluoresceína foram utilizados em ORAC. A fluorescência foi medida a 37°C pelo dispositivo GloMax® Explorer (Promega, Madison, USA); as leituras foram realizadas a cada 10 min até o total de 100 min. Os resultados da ORAC foram expressos em Trolox Equivalente (TE) (µmol µL⁻¹ da amostra).

2.5 Análise Proteômica

As quatro amostras de BaPs derivadas do leite que apresentaram maior atividade biológica nos ensaios antimicrobiano e antioxidante foram fracionadas por eletroforese bidimensional (2D-PAGE) em gel de poliacrilamida, conforme descrito anteriormente por Vieira et al. (2017). Os *spots* 2D-PAGE identificados foram submetidos à digestão trípica para serem caracterizados por ionização por eletropulverização em espectrômetro de massa em *tandem* (ESI-MS/MS) (Waters, Milford, EUA). Este ensaio foi realizado no sistema nanoACQUITY UPLC, que foi equipado com coluna HSS T3 (coluna UPLC HSS T3 ACQUITY 75 mm x 150 mm, 1,8 µm, Waters) e previamente equilibrada com 7% de fase móvel B (100% acetonitrila + 0,1% de ácido fórmico). Os peptídeos foram separados através de gradiente linear de 7-85% da fase móvel B

por 20 min a vazão de $0,35 \mu\text{L min}^{-1}$. A temperatura da coluna foi mantida a 45°C . A MS foi operada no modo íon positivo durante 20 min e os dados registados foram processados no software ProteinLynx GlobalServer (PLGS), versão 3.0 (Waters, Milford, EUA). A identificação das proteínas foi realizada por meio do algoritmo de contagem de íons, e as sequências de peptídeos foram verificadas com base no acesso de proteínas no banco de dados *Universal Protein Resource* (UniProt) (Uniprot Consortium, Europa).

2.6 Análise Estatística

Todos os experimentos foram realizadas em triplicata. Os dados foram submetidos, primeiramente, a testes de normalidade (mistos para distribuição simétrica de dados ou GENMOD para distribuição assimétrica) seguidos de análise de variância e teste de Tukey-Kramer - quando aplicável - pelo software SAS (SAS®, Cary, EUA). A análise de eletroforese (2D-PAGE) foi realizada pelo software ImageMaster Platinum 7.0 (GE-Healthcare®, Boston, EUA). Os resultados foram significativos quando $p \leq 0,05$ em todas as análises realizadas.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Produção de Proteases

Resíduos agroindustriais, farelo de trigo e farelo de soja, foram utilizados como substrato para *Aspergillus oryzae* e *Aspergillus flavipes* para produção de proteases fúngicas por FES. A atividade proteolítica dos extratos brutos foi estimada em: $6,3 \text{ U mL}^{-1}$ para *A. oryzae* cultivada em farelo de soja; $3,8 \text{ U mL}^{-1}$ para *A. flavipes* em farelo de soja; $16,7 \text{ U mL}^{-1}$ para *A. oryzae* em farelo de trigo e $20,4 \text{ U mL}^{-1}$ para *A. flavipes* em farelo de trigo. *A. oryzae* e *A. flavipes* registraram alta atividade de protease quando cultivadas em farelo de trigo ($p = 0,04$) (Figura 1). Novelli et al. (2016) avaliaram 16 espécies de fungos e encontraram melhor atividade de proteases fúngicas na FES realizada em substrato de farelo de trigo. Eles relataram maior

atividade enzimática para *A. oryzae*, *Aspergillus brasiliensis*, *Penicillium roqueforti* e *A. flavipes* cultivados em farelo de trigo a 37 °C e pH 7,0 do que em farelo de soja.

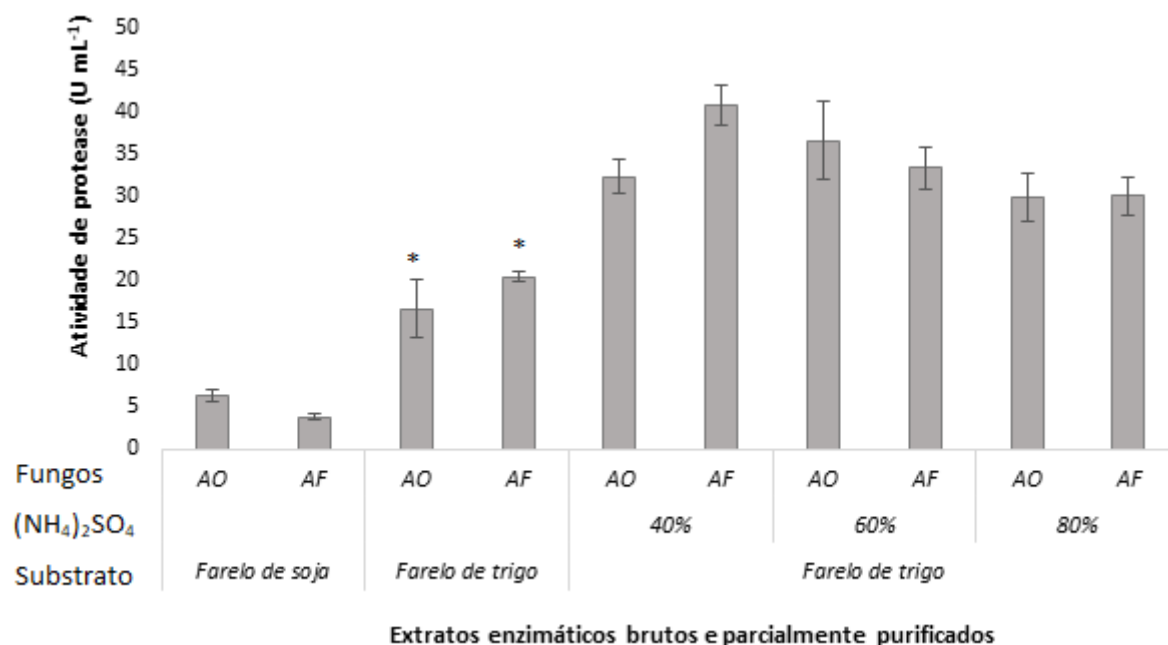


Figura 1. Atividade proteolítica de enzimas produzidas por *Aspergillus oryzae* ATCC 1003 (AO) e *Aspergillus flavipes* ATCC 16814 (AF) por fermentação em estado sólido em substratos de resíduos agroindustriais. Atividade de proteases parcialmente purificadas em farelo de trigo para frações definidas 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 ± DP, $p \leq 0,05$ (Tukey-Kramer).

As experiências realizadas no presente estudo foram conduzidas com proteases geradas através de FES em farelo de trigo, uma vez que sua atividade enzimática foi superior à registrada para o substrato de soja. O método de fracionamento parcial de protease proporcionou maior atividade de protease em amostras de *A. flavipes* fracionadas com 40% de sal (40,8 U mL⁻¹), seguido do fracionamento de *A. oryzae* com 60% de sal (36,8 U mL⁻¹) e por *A. flavipes* com 60% de sal (33,4 U mL⁻¹). Não houve diferenças nas atividades enzimáticas entre espécies fúngicas ($p = 0,51$) ou entre proteases parcialmente purificadas devido à adição de sal ($p = 0,08$) (Figura 1).

Estudo prévio reportou maiores resultados de proteases utilizando farelo de trigo como substrato ($49,3 \text{ U mL}^{-1}$) em um experimento conduzido com *Aspergillus flavus*. Este experimento testou diferentes substratos agroindustriais: farelo de trigo, farelo de arroz, palha de arroz, semente de algodão e bagaço de cana (MUTHULAKSHMI et al., 2011).

Aspergillus tem sido visto como um valioso produtor de protease (LI et al., 2014). *A. oryzae* destacou-se devido à alta atividade proteolítica em comparação a outras espécies de *Aspergillus*. Ortiz et al. (2016) avaliaram a atividade proteolítica das enzimas por FES de *A. oryzae* (NRRL 2217 e ICFC 8/12), *A. flavipes* (NRRL 295), *A. giganteus* (NRRL 10), *A. rhizopodus* (NRRL 6136) e *A. sojae* (NRRL 5595 e ATCC 20235). *A. oryzae* (ambas as linhagens), *A. flavipes* e *A. sojae* (ATCC 20235) registraram as maiores atividades. As enzimas são substrato-específicas, isto implica que mesmo usando as mesmas espécies de fungos, outras variáveis empregadas no bioprocesso, como origem do substrato, parâmetros utilizados no meio reacional, aminoácidos envolvidos em ligações peptídicas a serem hidrolisadas, grupos funcionais, sítio ativo e mecanismo enzimático podem gerar enzimas com diferentes atividades proteolíticas (SANTOS & KOBLITZ, 2008).

3.2 Produção de Peptídeos Bioativos Derivados de Leite

A análise de proteína total foi aplicada para selecionar as amostras com maior concentração de proteína para serem hidrolisadas por proteases fúngicas. A maior quantidade de proteína foi registrada para o leite bovino cru: com $3911,5 \pm 0,07 \text{ mg mL}^{-1}$ para o leite cru e $1145,8 \pm 0,00 \text{ mg mL}^{-1}$ para o leite UHT. Não houve diferença significativa entre os tipos de leite de cabra: $2795,5 \pm 0,07 \text{ mg mL}^{-1}$ para o leite cru e $2602,8 \pm 0,01 \text{ mg mL}^{-1}$ para o leite UHT. Com base nesses resultados, os leites crus (tanto bovino quanto caprino) foram selecionados para padronizar a produção de BaPs.

3.3 Atividade Antimicrobiana de *Pools* de BaPs Derivados de Leite

3.3.1 Atividade antibacteriana

Todos os BaPs apresentaram atividade antibacteriana contra as cinco cepas bacterianas testadas. Este resultado foi evidenciado pelos maiores halos de inibição observados nos discos BaPs do que nos controles (Figura 2, painéis A e B). As amostras que registraram a maior atividade foram BF40 (19 mm de halo de inibição contra *P. aeruginosa*), BO80 (16 mm contra *S. Enteritidis*), GO80 (15,5 mm contra *E. coli*), BO60 e BO80 (15 mm contra *S. aureus*) e BO40, BO80, BF40, GF80 (13 mm contra *L. monocytogenes*). Com base nesses resultados, o GI% foi determinado para BO40, BO80, GO40 e GF40 com *S. aureus* e *E. coli*, que são representantes de bactérias gram-positivas e gram-negativas, respectivamente. Todos os BaPs nos painéis C e D foram eficazes contra esses micro-organismos (Figura 2).

O plectasin, que é um peptídeo comercial antimicrobiano para fungos (Novozyme®, Dinamarca), resultou em 100% de inibição contra *S. aureus* a $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ (LI et al., 2017). O maior GI% no presente estudo foi registrado para a amostra de BaPs GO40 a $1,4 \text{ mg mL}^{-1}$ (96,2% de inibição contra *E. coli* com base na DO), seguida por BO40 a $0,2 \text{ mg mL}^{-1}$ (93,4% de inibição também contra *E. coli*). Vale notar que o GI% que apresentou a maior atividade foi observado em diferentes concentrações de GO40 e BO40. Esta atividade pode ser resultado das diferentes sequências peptídicas presentes em cada amostra, que podem realizar diferentes interações químicas com as células microbianas.

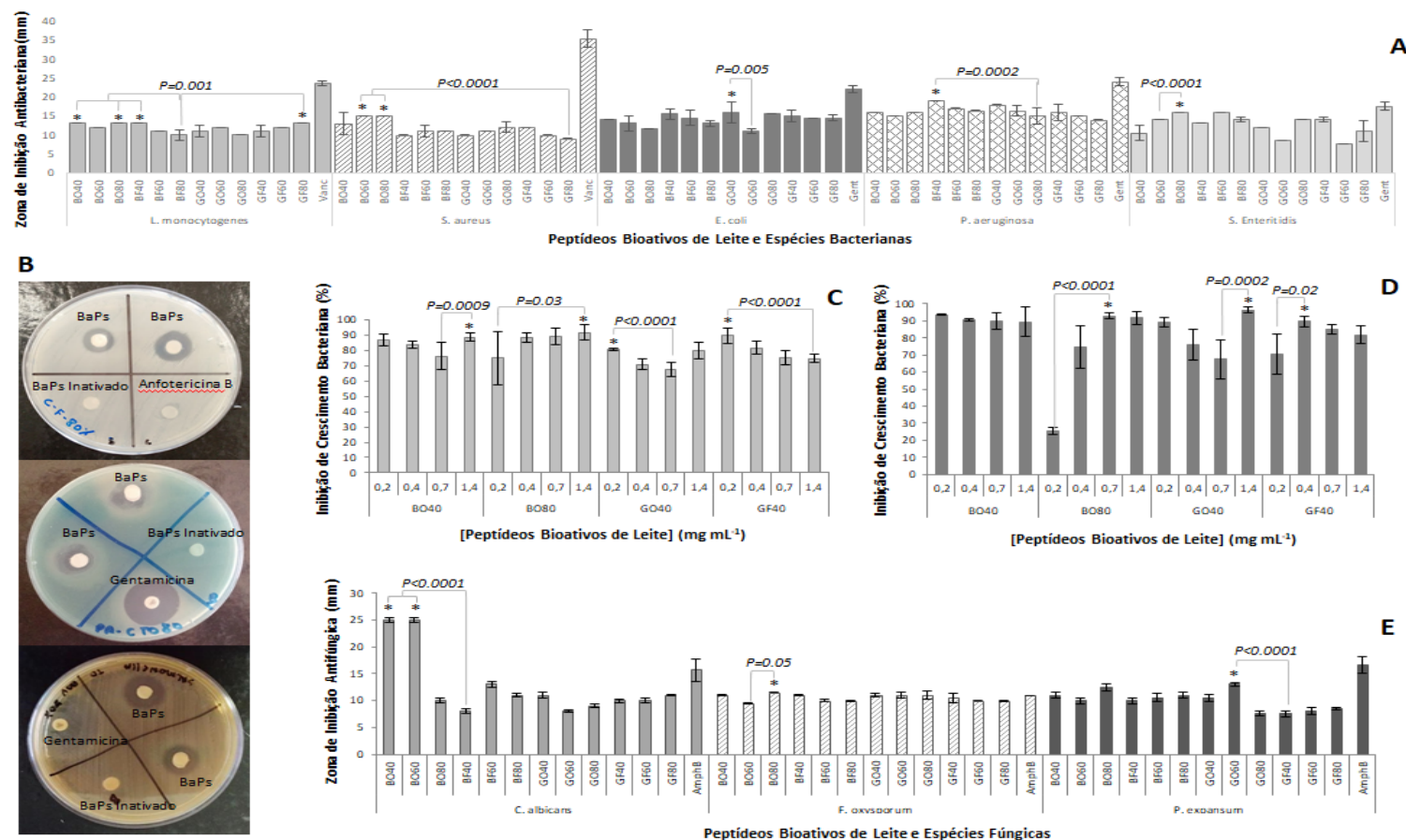


Figura 2. Atividade antimicrobiana de *pools* de peptídeos bioativos de leite bovino (B) e caprino (G) gerados por hidrólise com proteases de *Aspergillus oryzae* (ATCC 1003) (O) e *Aspergillus flavipes* (ATCC 16814) (F) parcialmente purificadas a 40%, 60% e 80% por *salting-out* e produzidas por fermentação 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, $p \leq 0,05$ (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%.

3.3.2 Atividade antifúngica

Os painéis B e E (Figura 2) apresentam os resultados obtidos da atividade antifúngica, para a qual todos os BaPs de leite foram eficazes contra todos os fungos, exceto para *A. fumigatus*. *A. fumigatus* foi o fungo mais patogênico dentre as espécies fúngicas testadas, por ser resistente a importantes antifúngicos como o voriconazol, o posaconazol e as equinocandinas (ERJAVEC et al., 2009).

As amostras BO40 e BO60 (25 mm de halo de inibição contra *C. albicans*), GO60 (13 mm contra *P. expansum*) e BO80 (11,5 mm contra *F. oxysporum*) apresentaram as maiores taxas de atividade antifúngica. Amostras submetidas à inativação por protease não mostraram atividade, e esse resultado evidenciou que a atividade biológica de BaPs resulta de processos de hidrólise baseados em proteases produzidas em FES, e não da ação de compostos brutos do extrato fermentativo.

Os BaPs derivados do leite foram descritos como agentes antibacterianos e antifúngicos em estudos anteriores (KORHONEN, 2009; MOHANTY et al., 2016). Théolier et al. (2014) analisaram 371 peptídeos antimicrobiano de leite e relataram 56 com propriedades antifúngicas contra espécies de *Candida*, *Penicillium* e *Trichophyton*. Nielsen et al. (2017) analisaram o potencial antimicrobiano de 207 BaPs de leite com base em um conjunto de dados descrito na literatura e identificaram atividade contra *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecalis*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Listeria innocua*, *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *E. coli* e *C. albicans*. Atualmente, os peptídeos isracidina [α -s1-caseína f (1-23)], caseicina A [α -s1-caseína f(6-14) IKHQGLPQE], caseicina B [α -s1-caseína f (15-22) VLNENLLR] e lactoferricina são as sequências mais estudadas que apresentam efeitos antimicrobianos. Os resultados do presente estudo identificaram várias sequências derivadas da α -s1-caseína. O homólogo de caseicina bovina Bf(18-37)

HPINHQGLSPEVLNENLLR foi observado na amostra GO40. López-Expósito et al. (2008) relataram a forte e ampla atividade antimicrobiana da α -s2-caseína bovina f(183-207). A sequência peptídica de α -s2-caseína bovina FALPQYLK f(188-196) foi identificada no presente estudo e este resultado corresponde à sequência descrita anteriormente e também a duas outras sequências similares em BaPs de leite de cabra: ISQYYQK f(182-189) e FAWPQYLK f(189-197).

López-Expósito et al. (2008) relataram o efeito antimicrobiano sinérgico de BaPs de leite, com atividade contra *E. coli* e *S. epidermidis*, quando foram combinados lactoferricina e lactoferrina bovina, e contra *L. monocytogenes* quando α -s2-caseína foi associada à nisina (conservante natural de alimentos). Da mesma forma, a atividade biológica observada no presente estudo pode ter resultado do efeito sinérgico de BaPs produzido na hidrólise do leite por proteases fúngicas, uma vez que foram avaliados *pools* dos peptídeos produzidos.

3.4 Atividade Antioxidante de *Pools* de BaPs Derivados de Leite

Todos os BaPs apresentaram propriedades antioxidantes que variaram de 84,9% a 95,2% de redução do DPPH. As amostras que registraram a maior atividade antioxidante foram BO80 (redução de 95,2% do DPPH), BF60 e GO40 (redução de 91,8% do DPPH, cada) e BO40 e BF40 (redução de 91,6% do DPPH, cada). BaPs mostrando a maior atividade antioxidante, com base no ensaio DPPH, foram ainda avaliados, a fim de observar a estabilização radical peroxila através do método ORAC- resultados foram 29,8 a 52,5 $\mu\text{mol } \mu\text{L}^{-1}$ Trolox Equivalente (TE).

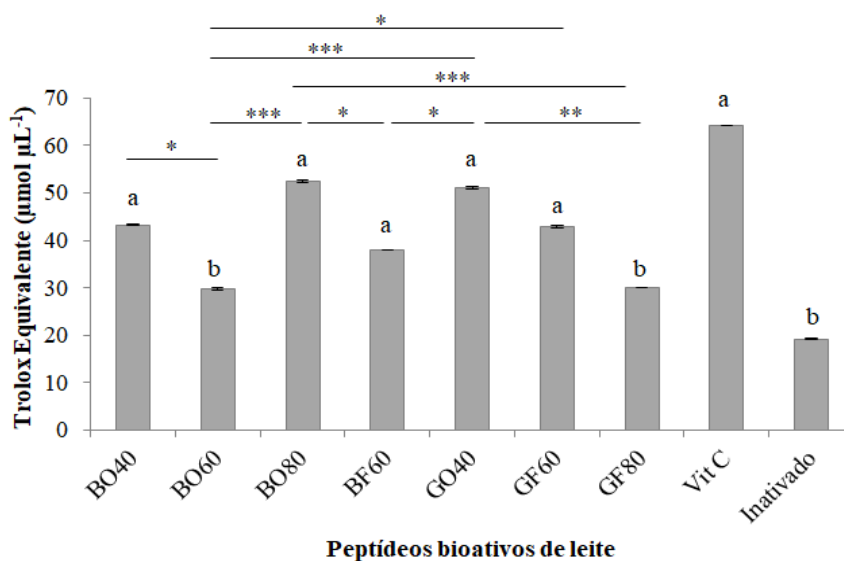


Figura 3. Capacidade de Absorção Radical de Oxigênio (ORAC) de *pools* de peptídeos bioativos (BaPs) isolados de leite bovino (B) e caprino (G) hidrolisados com proteases fúngicas de *Aspergillus oryzae* (ATCC 1003) (O) e *Aspergillus flavipes* (ATCC 16814) (F) parcialmente purificado a 40%, 60% e 80% 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 $p \leq 0,05$ (* $\neq$ entre amostras: * $< 0,05$; ** $< 0,01$; *** $< 0,001$).

Os maiores potenciais antioxidantes avaliados pelo ensaio ORAC foram observados para as amostras de BaPs BO80 ($52,5 \mu\text{mol } \mu\text{L}^{-1} \text{ TE}$), GO40 ($51,2 \mu\text{mol } \mu\text{L}^{-1} \text{ TE}$), BO40 ($43,3 \mu\text{mol } \mu\text{L}^{-1} \text{ TE}$) e GF60 ($42,9 \mu\text{mol } \mu\text{L}^{-1} \text{ TE}$), como mostrado na Figura 3. Não houve atividade antioxidante em amostras submetidas à inativação de protease, que mostrou redução de 0% do DPPH e $19,1 \pm 0,2 \mu\text{mol } \mu\text{L}^{-1} \text{ TE}$ no ORAC.

Alguns autores afirmaram que BaPs derivados de alimentos podem apresentar igual ou maior atividade antioxidante, comparados com antioxidantes sintéticos como butilhidroanisol (BHA), butilhidroxitolueno (BHT) e n-propil-galato. Além disso, os BaPs são mais seguros do que esses agentes sintéticos na administração *in vivo* (ALMEIDA-DORIA & REGITANO-D'ARCE, 2000). Hogan et al. (2009) avaliaram o potencial antioxidante de BaPs de leite hidrolisado com proteases comerciais e relataram redução de 3,1 a $35,4 \mu\text{mol } \text{g}^{-1} \text{ TE}$ do radical DPPH; e 62,9 a

246,6 $\mu\text{mol g}^{-1}$ TE no radical peroxil em ORAC. Eram esperados os valores diferentes obtidos entre os métodos, porque DPPH e ORAC se baseiam em mecanismos distintos de oxi-redução. No entanto, apenas os dados do ORAC são adequados para sistemas biológicos *in vivo*, uma vez que os radicais livres utilizados no DPPH não são fisiológicos (FLOEGEL et al., 2011). De acordo com Nielsen et al. (2017), a maioria dos peptídeos bioativos derivados de leite que apresentam propriedades antioxidantes derivam da caseína, principalmente da β -caseína e α -s1-caseína. Além disso, é importante notar que o potencial antioxidante dos peptídeos bioativos depende das enzimas hidrolíticas aplicadas, pois a atividade proteolítica específica reflete nas estruturas dos peptídeos gerados (CUMBY et al., 2008). Em resumo, os BaPs derivados do leite produzidos pela ação das proteases fúngicas geradas por FES apresentaram potencial antioxidante relevante, podendo ser produzidos de forma econômica e terem diferentes aplicações biológicas.

3.5 Análise Proteômica

A análise proteômica foi realizada para as quatro amostras de BaPs (duas para cada amostra de leite bovino ou caprino), cujas atividades biológicas se destacaram, sendo os BaPs BO40, BO80, GF40 e GO40. A boa repetibilidade e reprodutibilidade das réplicas de géis 2D-PAGE foram corroboradas pelas altas taxas de *matching* registradas entre as amostras: 98,6%, para GO40; 91,3%, para GF40; 89,6%, para BO40 e 75,3%, para BO80. Embora o leite seja um substrato rico em proteínas, os géis 2D-PAGE mostraram apenas poucos pontos de proteína (Figura 4). Tal achado pode ser atribuído à purificação parcial, que resultou em enriquecimento da amostra com as proteínas mais abundantes.

A análise ESI-MS/MS permitiu a identificação de peptídeos específicos do leite a partir de proteínas do soro (como α -lactalbumina e β -lactoglobulina), bem como as principais frações

de caseína (α -s1, α -s2, β e κ). Este resultado confirma a produção bem sucedida de BaPs através da hidrólise do leite usando proteases fúngicas produzidas por FES. A caracterização básica das sequências peptídicas identificadas é mostrada na Figura 5.

Em um estudo anterior *in silico* foram identificadas 573 proteínas do leite bovino; com notável presença de caseínas α -s1, α -s2 e β , albumina sérica e variações originadas de mudanças pós-translacionais de proteínas (D'ALESSANDRO et al., 2011). Neste estudo, amostras derivadas do leite bovino (BO40 e BO80) mostraram fragmentos peptídicos derivados da albumina, caseínas α -s1 e α -s2, α -lactalbumina e β -lactoglobulina. Já as amostras de leite de cabra (GF40 e GO40) apresentaram sequências peptídicas derivadas de α -s1, α -s2, β e κ -caseínas, α -lactalbumina e β -lactoglobulina. Esses resultados reforçaram o argumento de que a composição das caseínas pode variar entre o leite de cabra e bovino (principalmente quanto β e κ -caseína), conforme relatado por Park et al. (2007).

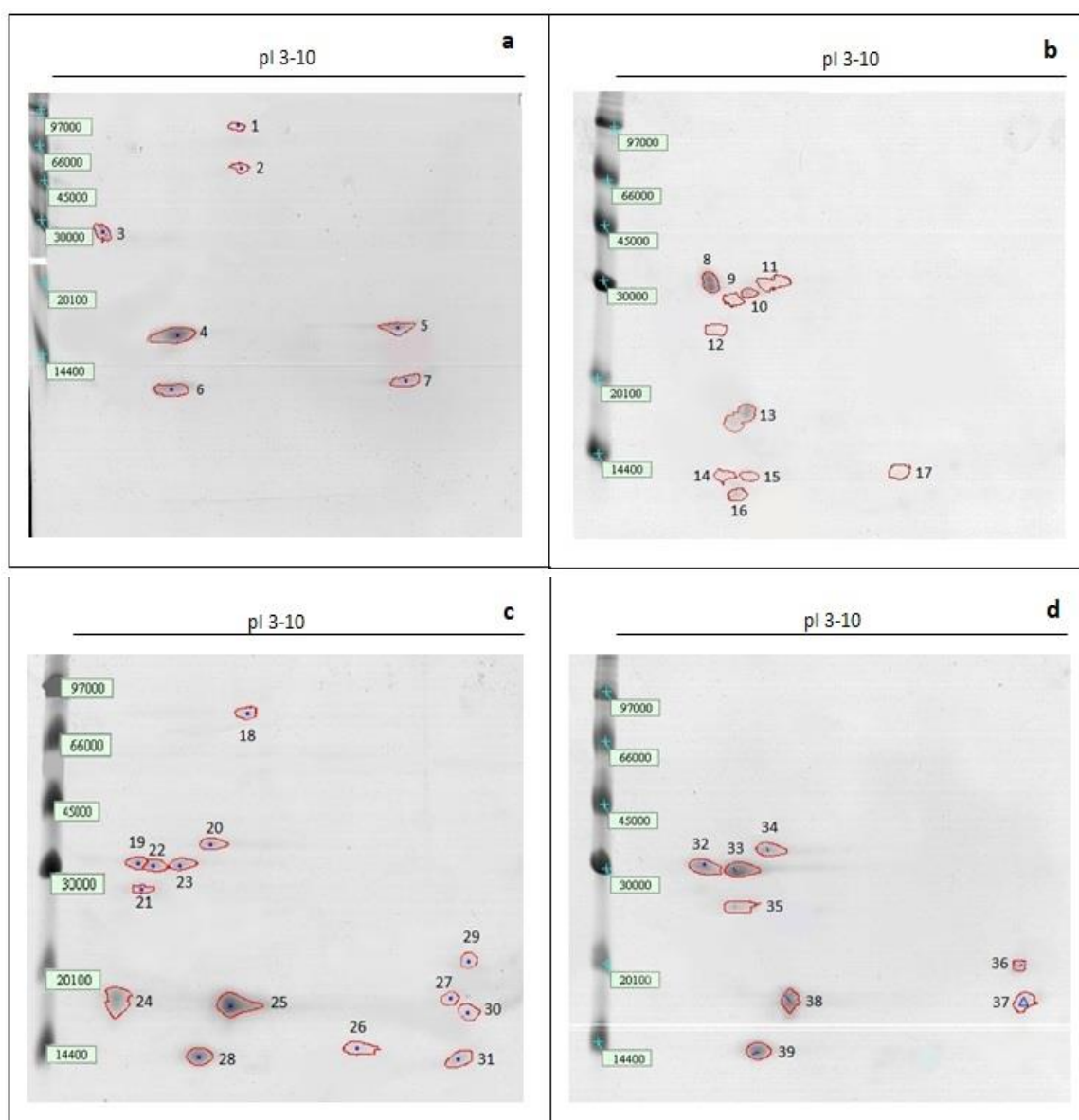


Figura 4. Spots de SDS-poliacrilamida 2D-PAGE (pI 3 a 10) de peptídeos isolados de leite de bovino (B) e de cabra (G), que foram hidrolisados com proteases fúngicas de *Aspergillus oryzae* (ATCC 1003) (O) e *Aspergillus flavipes* (ATCC 16814) (F) - parcialmente purificada a 40% e 80% pelo método de *salting-out* 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.

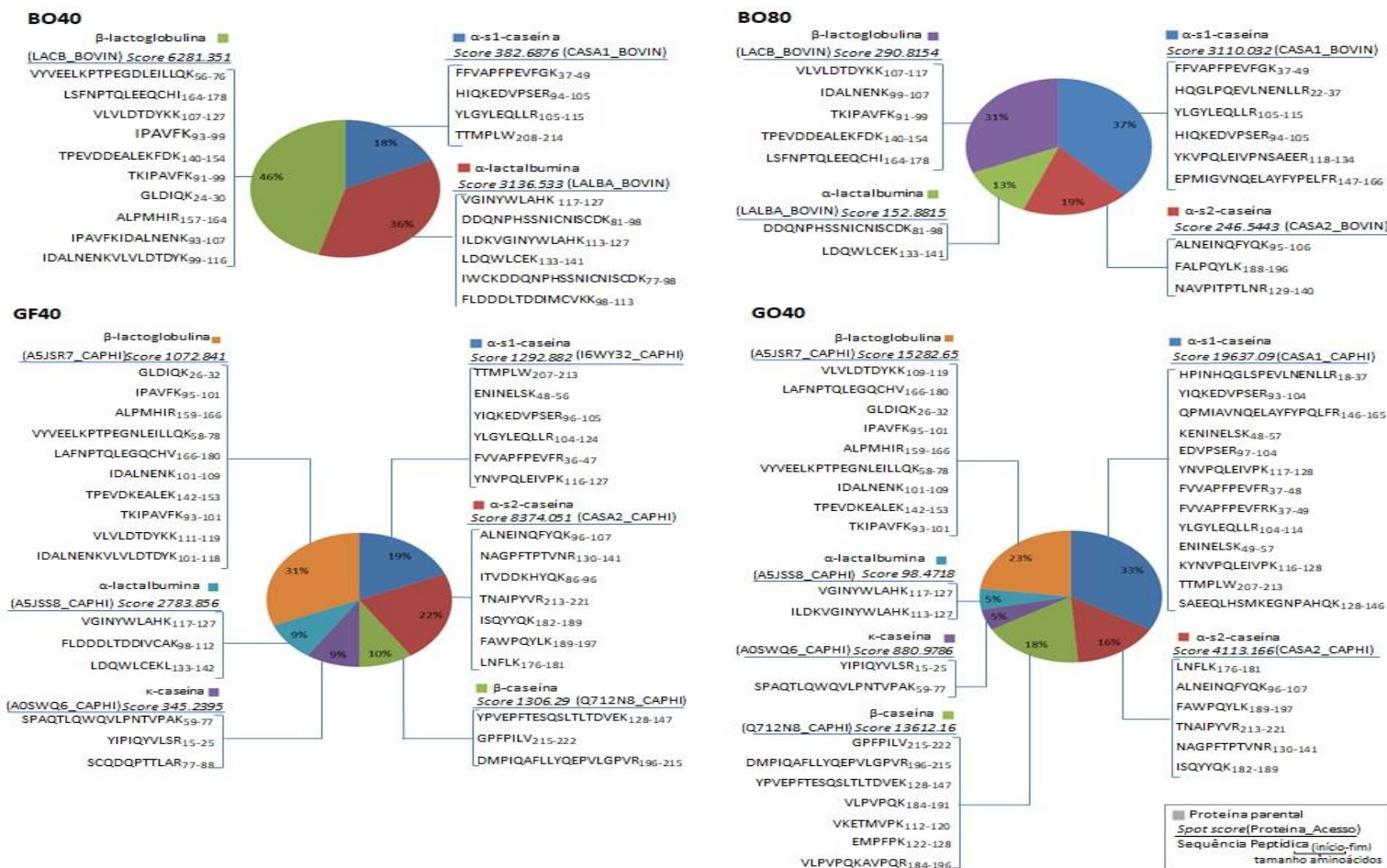


Figura 5. Caracterização por espectrometria de massas (ESI-MS/MS) de peptídeos bioativos obtidos da hidrólise do leite bovino (B) e caprino (G) com proteases fúngicas de *Aspergillus oryzae* (ATCC 1003) (O) e *Aspergillus flavipes* (ATCC 16814) (F) parcialmente purificado a 40%, 60% e 80% por *salting 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.

Os peptídeos das caseínas e proteínas do soro são responsáveis por muitas atividades biológicas, incluindo propriedades antioxidantes, imunomodulação, antihipertensivas, antineoplásicas e antimicrobianas (TSUTSUMI & TSUTSUMI, 2014). Segundo Li & Li (2013), as propriedades dos aminoácidos dos peptídeos são críticas para o desenvolvimento da atividade. Neste aspecto, observaram que a presença de histidina (His) e tirosina (Tyr) favorecem a estabilização dos radicais livres por serem doadores de hidrogênio. A caracterização dos BaPs conduzida aqui permitiu observar os peptídeos com His-Tyr. Para BO40 foi encontrada 1 His-Tyr para α -s1-caseína, 6 para α -lactalbumina e 4 para β -lactoglobulina. Para BO80 foram identificadas 2 para β -lactoglobulina, 1 para α -lactalbumina e 1 para α -s2-caseína. Para GF40 4 para β -lactoglobulina, 3 para α -lactalbumina, 2 para κ -caseína, 1 para α -s1-caseína, 3 para α -s2-caseína e 1 β -caseína; e para GO40 foram identificadas 3 para β -lactoglobulina, 2 para α -lactalbumina, 1 para κ -caseína, 2 para β -caseína e 1 para α -s2-caseína.

Limitações foram observadas neste estudo em relação às sequências peptídicas identificadas por espectrometria de massa. A técnica de espectrometria de massas envolve, quase que invariavelmente, a digestão das proteínas em peptídeos utilizando tripsina, enzima cliva exclusivamente ligações entre o C-terminal de arginina e lisina (OLSEN et al., 2004). Portanto, os peptídeos identificados podem ser resultantes da ação da tripsina utilizada na técnica, visto que a maioria das sequências observadas aqui foram clivadas em arginina ou lisina. No entanto, os peptídeos bioativos são fragmentos ricos em aminoácidos específicos, incluindo arginina e lisina. Quando uma sequência apresenta ambos os aminoácidos, é reconhecida como um peptídeo lítico, capaz de atuar sobre a membrana e apresentar atividade antimicrobiana e anticarcinogênica (BROWN & HANCOCK, 2006).

Além disso, Olsen et al. (2004) compararam a identificação de peptídeos usando métodos trípticos por métodos de massa e não trípticos (íon-trap de Fourier) e observaram que quando a tripsina não era empregada a identificação de peptídeos estava incorreta, recomendando métodos com adição de tripsina.

Por outro lado, *A. oryzae* pode produzir exoproteases e endoproteases por FES, incluindo enzimas ácidas, neutras e alcalinas, como serina proteases e metaloproteases, que também podem clivar ligações em resíduos de arginina e lisina (PRATUSH et al., 2013). Apesar das possíveis limitações deste estudo, os ensaios *in vitro* confirmaram a bioatividade dos compostos gerados, enquanto os controles negativos produzidos com enzimas inativadas não mostraram bioatividade, indicando que apenas os compostos submetidos à hidrólise ativa de proteases dos fungos mostraram atividade antioxidante e antimicrobiana. Além disso, as enzimas fúngicas aplicadas são complexos multienzimáticos da FES e seus pontos de clivagem ainda são desconhecidos.

Como discutido no presente estudo, as atividades biológicas podem ser o resultado de um efeito sinérgico de vários fragmentos de peptídeos. Portanto, futuros estudos aprofundando a identificação de peptídeos por diferentes técnicas de espectrometria de massa, a síntese sintética das sequências peptídicas obtidas e sua avaliação de bioatividade e testes de BaPs como possível efeito sinérgico possibilitará ampliar o entendimento deste bioprocessamento de interesse biotecnológico.

4 CONCLUSÃO

Proteases de *Aspergillus oryzae* e *Aspergillus flavipes* produzidas a baixo custo por fermentação em estado sólido com farelo de trigo, quando aplicadas ao leite de cabra e bovino, produzem peptídeos bioativos derivados do leite com atividade antimicrobiana e antioxidante *in vitro*. Essa descoberta pode ser valiosa para novas aplicações industriais e biotecnológicas.

5 AGRADECIMENTOS

Este estudo foi financiado pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) – Código Financiamento 001, e pela Universidade Estadual Paulista (UNESP) pelo Instituto de Biociências (IBB) e Instituto de Biotecnologia (IBTEC), Botucatu, SP, Brasil.

6 REFERÊNCIAS

- ALMEIDA-DORIA, R.F.; REGITANO-D'ARCE, M.A.B. Antioxidant activity of rosemary and oregano ethanol extracts in soybean oil under thermal oxidation. **Food Science and Technology**, v. 20, n. 2, p. 197–203, 2000.
- ARORA, S.; RANI, R.; GHOSH, S. Bioreactors in solid state fermentation technology: Design, applications and engineering aspects. **Journal of Biotechnology**, v. 269, p. 16–34, 2018.
- ATHANÁZIO-HELIODORO, J.C.; OKINO-DELGADO, C.H.; FERNANDES, C.J.DA C.; ZANUTTO, M.R.; PRADO, D.Z.DO; SILVA, R.A.DA; FACANALI, R.; ZAMBUZZI, W.F.; MARQUES, M.O.M; FLEURI, L.F. Improvement of lipase obtaining system by orange waste-based solid-state fermentation: Production, characterization and application. **Preparative Biochemistry and Biotechnology**, p. 1–9, 2018.
- BROWN, K.L.; HANCOCK, R.E. Cationic host defense (antimicrobial) peptides. **Current Opinion in Immunology**, v. 18, p. 24-30, 2006.
- CHARNEY, J.; TOMARELLI, R.M. A colorimetric method for the determination of the proteolytic activity of duodenal juice. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 171, n. 2, p. 501–505, 1947.
- CUMBY, N.; ZHONG, Y.; NACZK, M.; SHAHIDI, F. Antioxidant activity and water-holding capacity of canola protein hydrolysates. **Food Chemistry**, v. 109, n. 1, p. 144–148, 2008.
- D'ALESSANDRO, A.; ZOLLA, L.; SCALONI, A. The bovine milk proteome: Cherishing, nourishing and fostering molecular complexity. An interactomics and functional overview. **Molecular bioSystems**, v. 7, n. 3, p. 579–597, 2011.
- DÁVALOS, A.; GÓMEZ-COROVÉS, C.; BARTOLOMÉ, B. Extending applicability of the oxygen radical absorbance capacity (ORAC–Fluorescein) assay. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 1, p. 48–54, 2004.
- DE CASTRO, R.J.S.; SATO, H.H. Production and biochemical characterization of protease from *Aspergillus oryzae*: An evaluation of the physical–chemical parameters using agroindustrial wastes as supports. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 3, n. 3, p. 20–2014.
- ERJAVEC, Z.; KLUIN-NELEMANS, H.; VERWEIJ, P.E. Trends in invasive fungal infections, with emphasis on invasive aspergillosis. **Clinical Microbiology and Infection: The Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 15, n. 7, p. 625–633, 2009.
- FLOEGEL, A.; KIM, D.-O.; CHUNG, S.-J.; KOO, S.I.; CHUN, O.K. Comparison of ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 24, n. 7, p. 1043–1048, 2011.

- GUDIÑA, E. J.; ROCHA, V.; TEIXEIRA, J.A.; RODRIGUES, L.R. Antimicrobial and antiadhesive properties of a biosurfactant isolated from *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* A20. **Letters in Applied Microbiology**, v. 50, n. 4, p. 419–424, 2010.
- HOGAN, S.; ZHANG, L.; LI, J.; WANG, H.; ZHOU, K. Development of antioxidant rich peptides from milk protein by microbial proteases and analysis of their effects on lipid peroxidation in cooked beef. **Food Chemistry**, v. 117, n. 3, p. 438–443, 2009.
- KORHONEN, H. Milk-derived bioactive peptides: From science to applications. **Journal of Functional Foods**, v. 1, n. 2, p. 177–187, 2009.
- KUIPERS, B.J.H.; GRUPPEN, H. Prediction of molar extinction coefficients of proteins and peptides using UV absorption of the constituent amino acids at 214 nm to enable quantitative reverse phase high-performance liquid chromatography-mass spectrometry analysis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 14, p. 5445–5451, 2007.
- LI, C.; XU, D.; ZHAO, M.; SUN, L.; WANG, Y. Production optimization, purification, and characterization of a novel acid protease from a fusant by *Aspergillus oryzae* and *Aspergillus niger*. **European Food Research and Technology**, v. 238, n. 6, p. 905–917, 2014.
- LI, L.; WANG, L.; GAO, Y.; WANG, J.; ZHAO, X. Effective antimicrobial activity of plectasin-derived antimicrobial peptides against *Staphylococcus aureus* infection in mammary glands. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, 2017.
- LI, Y.-W.; LI, B. Characterization of structure-antioxidant activity relationship of peptides in free radical systems using QSAR models: Key sequence positions and their amino acid properties. **Journal of Theoretical Biology**, v. 318, p. 29–43, 2013.
- LÓPEZ-EXPÓSITO, I.; PELLEGRINI, A.; AMIGO, L.; RECIO, I. synergistic effect between different milk-derived peptides and proteins. **Journal of Dairy Science**, v. 91, n. 6, p. 2184–2189, 2008.
- MOHANTY, D.; JENA, R.; CHOUDHURY, P.K.; PATNAIK, R.; MOHAPATRA, S.; SAINI, M.R. Milk derived antimicrobial bioactive peptides: A review. **International Journal of Food Properties**, v. 19, n. 4, p. 837–846, 2016.
- MOTTA, A. S.; BRANDELLI, A. Characterization of an antibacterial peptide produced by *Brevibacterium linens*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 92, n. 1, p. 63–70, 2002.
- MUTHULAKSHMI, C.; GOMATHI, D.; KUMAR, D. G. Production, purification and characterization of protease by *Aspergillus flavus* under solid state fermentation. **Jordan journal of biological sciences**, v. 4, n. 3, p. 137–148, 2011.

- NIELSEN, S.D.; BEVERLY, R.L.; QU, Y.; DALLAS, D.C. Milk bioactive peptide database: A comprehensive database of milk protein-derived bioactive peptides and novel visualization. **Food Chemistry**, v. 232, p. 673–682, 2017.
- NONGONIERMA, A. B.; FITZGERALD, R. J. Enhancing bioactive peptide release and identification using targeted enzymatic hydrolysis of milk proteins. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 410, n. 15, p. 3407–3423, 2018.
- 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.
- OLSEN, J.V.; ONG, S.E.; MANN, M. Trypsin cleaves exclusively C-terminal to arginine and lysine residues. **Molecular and Cellular Proteomics**, v. 3, n.6, p. 608-614, 2004.
- ORTIZ, G.E.; NOSEDA, D.G.; MORA, P.; CLARA, M.; RECUPERO, M.N.; BLASCO, M.; ALBERTÓ, E. A comparative study of new *Aspergillus* strains for proteolytic enzymes production by solid state fermentation. Disponível em: <<https://www.hindawi.com/journals/er/2016/3016149/>>. Acessado em 14 junho de 2018.
- PARK, Y.W.; JUÁREZ, M.; RAMOS, M.; HAENLEIN, G.F.W. Physico-chemical characteristics of goat and sheep milk. **Small Ruminant Research, Special Issue: Goat and Sheep Milk**. v. 68, n. 1, p. 88–113, 2007.
- PRATUSH, A.; GUPTA, A.; BHALLA, T.C. Microbial protease: Prospects and challenges. In: Rath, C. Microbiology Application. Dehradun: Bhalla Publishers, 2013, p. 30-48.
- ROSE, F. Ueber die verbindungen des eiweiss mit metalloxyden. **Annalen der Physik**, v. 104, n. 5, p. 132–142, 1833.
- SAMARANAYAKA, A. G. P.; LI-CHAN, E. C. Y. Food-derived peptidic antioxidants: A review of their production, assessment, and potential applications. **Journal of Functional Foods**, v. 3, n. 4, p. 229–254, 2011.
- SANDHYA, C.; SUMANTHA, A.; SZAKACS, G.; PANDEY, A. Comparative evaluation of neutral protease production by *Aspergillus oryzae* in submerged and solid-state fermentation. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 8, p. 2689–2694, 2005.
- SANTOS, L.F.; KOBLITZ, M.G.B. Proteases. In: Koblitz, M.G.B. Bioquímica de Alimentos. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008, p. 78-103.
- THÉOLIER, J.; FLISS, I.; JEAN, J.; HAMMAMI, R. MilkAMP: A comprehensive database of antimicrobial peptides of dairy origin. **Dairy Science & Technology**, v. 94, n. 2, p. 181–193, 2014.

- TSUTSUMI, R.; TSUTSUMI, Y. M. Peptides and proteins in whey and their benefits for human health. **Austin Journal of Nutrition of Food Sciences**, v. 1, n. 1, p. 1002, 2014.
- VIEIRA, J.C.S.; BRAGA, C.P.; OLIVEIRA, G. DE; LEITE, A. DE L.; QUEIROZ, J.V.DE; CAVECCI, B.; BITTARELLO, A.C.; BUZALAF, M.A.R.; ZARA, L.F.; PADILHA, P.DE M. Identification of protein biomarkers of mercury toxicity in fish. **Environmental Chemistry Letters**, v. 15, n. 4, p. 717–724, 2017.
- VISHWANATHA, K.S.; RAO, A.G.A.; SINGH, S.A. Acid protease production by solid-state fermentation using *Aspergillus oryzae* MTCC 5341: Optimization of process parameters. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 37, n. 2, p. 129–138, 2010.
- WINGFIELD, P. Protein precipitation using ammonium sulfate. **Current Protocols in Protein Science**, v. Appendix 3, p. Appendix 3F, 2001.
- ZHANG, W.; CHEN, H.; WANG, Z.; LAN, G.; ZHANG, L. Comparative studies on antioxidant activities of extracts and fractions from the leaves and stem of *Epimedium koreanum* Nakai. **Journal of Food Science and Technology**, v. 50, n. 6, p. 1122–1129, 2013.

CAPÍTULO 3

“Peptídeos bioativos de leite humano com atividades biológicas
produzidos por ação de proteases fúngicas”

Peptídeos bioativos de leite humano com atividades biológicas
produzidos por ação de proteases fúngicas

Mirella Rossitto Zanutto ELGUI¹, Débora Zanoni do PRADO¹, Isabela Andrade de CAMARGO¹,
José Cavalcante Souza VIEIRA¹, Pedro de Magalhães PADILHA¹, Deilson ELGUI DE OLIVEIRA^{2,3},
Luciana Francisco FLEURI^{1,*}

¹ Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Biociências, Departamento de Química e Bioquímica, Botucatu, SP, Brasil.

² Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Medicina de Botucatu, Departamento de Patologia, Botucatu, SP, Brasil.

³ Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Biotecnologia, Botucatu, SP, Brasil.

*Este trabalho será submetido como comunicação rápida para a **Food Chemistry** (ISSN: 0308-*

8146, fator de impacto 4,946, CAPES Qualis A1, área Biotecnologia)

RESUMO

O leite é considerado a melhor nutrição para neonatos e atrai crescente interesse biotecnológico por ser fonte de peptídeos bioativos com atividades biológicas diversas. Os peptídeos bioativos podem ser obtidos por hidrólise utilizando proteases. Este trabalho visou à produção e caracterização de peptídeos bioativos de leite humano produzidos por ação proteolítica de enzimas fúngicas obtidas por Fermentação em Estado Sólido (FES); a determinação do potencial antimicrobiano e antioxidante desses peptídeos *in vitro* e a interferência do método de paralização da hidrólise nas atividades biológicas. Os peptídeos derivados de leite humano cuja hidrólise foi paralisada com ácido acético apresentaram ação antimicrobiana mais significativa contra os micro-organismos testados (ocorrendo em 93,4% dos resultados antibacterianos e 91,7% dos antifúngicos), comparado com aqueles cuja hidrólise foi paralisada por ebulição (6,6% resultados antibacterianos e 8,3% dos antifúngicos). Todos os HMBaPs apresentaram também elevada atividade antioxidante, com redução de até 95% do radical DPPH e estabilização do radical peroxila por ORAC de até 44,3 Trolox Equivalente $\mu\text{mol } \mu\text{L}^{-1}$ composto. As sequências peptídicas foram fracionadas por eletroforese bidimensional e caracterizadas por ESI-MS/MS, sendo possível observar as possíveis sequências envolvidas nas atividades biológicas. Assim, foi possível produzir peptídeos de leite humano com elevada atividade antimicrobiana e antioxidante hidrolisando leite com proteases fúngicas produzidas por FES e caracterizar as sequências de aminoácidos que constituem esses peptídeos bioativos, possibilitando futura produção destes de forma sintética para aplicação em processos biotecnológicos.

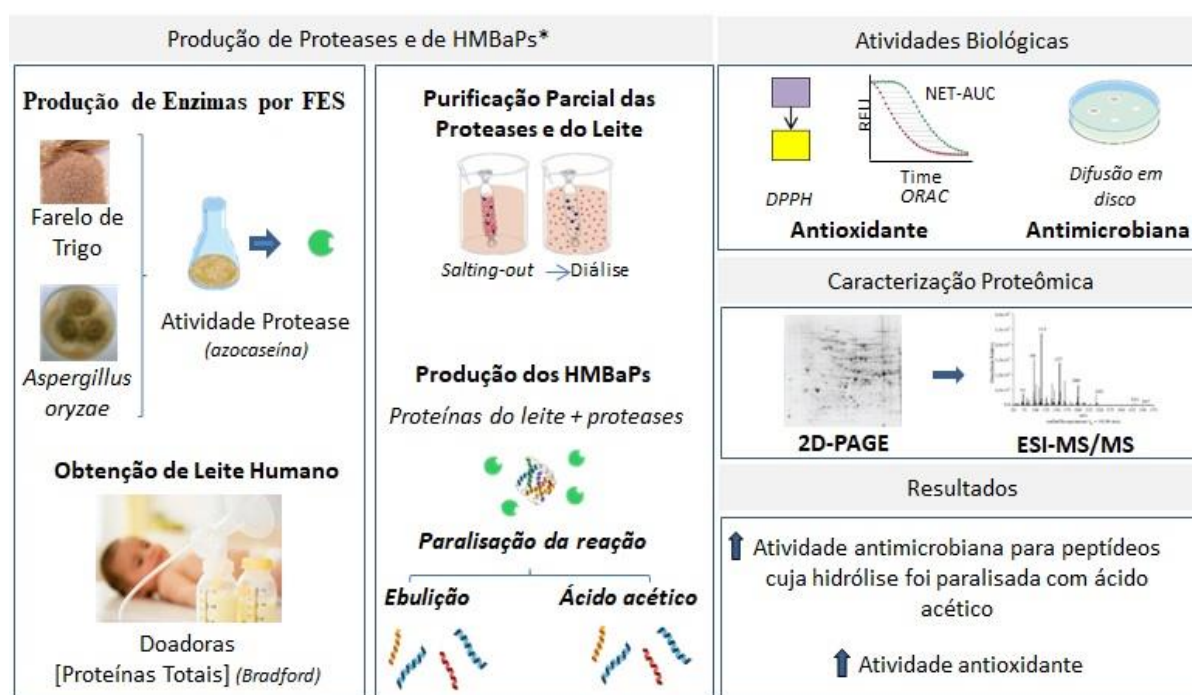
Palavras-chave: Fermentação em Estado Sólido; Proteases; Proteômica, Espectrometria de Massas; Biotecnologia.

ABSTRACT

Milk is the best nutrition for neonates and attracts growing interest in biotechnology because it is a source of bioactive peptides with diverse biological activities. Bioactive peptides can be obtained by hydrolysis using proteases. This work aimed at the production and characterization of bioactive peptides of human milk produced by proteolytic action of fungal enzymes obtained by Solid-State Fermentation (SSF); the determination of the antimicrobial and antioxidant potential of these peptides *in vitro* and the interference of the hydrolysis blocked method in the biological activities. The peptides derived from human milk whose hydrolysis was blocked with acetic acid presented a more significant antimicrobial action against the microorganisms tested (occurring in 93.4% of the antibacterial results and 91.7% of the antifungal) compared to those whose hydrolysis was blocked by boiling (6.6% antibacterial and 8.3% antifungal results). All HMBaPs also showed high antioxidant activity, with reduction of up to 95% of the DPPH radical and stabilization of the peroxy radical by ORAC up to 44.3 Trolox Equivalent $\mu\text{mol } \mu\text{L}^{-1}$ compound. The peptide sequences were fractionated by two-dimensional electrophoresis and characterized by ESI-MS/MS, being possible to visualize the possible sequences involved in the biological activities. Thus, it was possible to produce HMBaPs by hydrolyzing human milk with fungal proteases produced by SSF with high antimicrobial and antioxidant activity and to identify the amino acid sequences that constitute these bioactive peptides, making possible their future production in a synthetic way for application in biotechnological processes.

Keywords: Solid-state fermentation; Proteases; Proteomic; Mass Espectrometry; Biotechnology.

RESUMO GRÁFICO



*HMBaPs- Peptídeos bioativos derivados de leite humano
 FES- Fermentação em estado sólido

1 INTRODUÇÃO

O leite humano é um alimento de natureza dinâmica, que altera sua composição de acordo com a fase da lactação, proporcionando além de nutrição, o desenvolvimento e a prevenção de diversas doenças (HUTH et al., 2006), como diarreia, vômito, otite média, septicemia e infecção do trato respiratório (ANDREAS et al., 2015).

Rico em micro e macronutrientes, contendo mais de 250 nutrientes essenciais à saúde do bebê (SILVA, 2004), o leite é fonte de lipídeos, vitaminas, hormônios e fatores de crescimento. Ademais, é uma fonte substancial de peptídeos bioativos derivados de leite humano (HMBaPs) por sua rica composição em proteínas diversificadas, das quais é possível isolar peptídeos com atividades biológicas distintas, incluindo os de ação antihipertensiva, opióide, antimicrobiana, antineoplásica, antitrombótica e antioxidante (KORHONEN, 2009; HSIEH et al., 2015; MOHANTY et al., 2016; CICERO et al., 2017; ZANUTTO-ELGUI et al., 2019).

Bioprodutos inovadores com diversas atividades biológicas de interesse para indústrias médica, farmacêutica e alimentícia podem ser produzidos através da aplicação de HMBaPs. Atualmente já existem indústrias disponibilizando produtos provenientes deste alimento, como fortificante para leite materno suplementado com proteínas, lipídeos e minerais (Prolacta, Duarte, EUA). Esses produtos têm movimentado um elevado capital de US\$ 10.000 em semanas/consumo do bebê e recebendo financiamento de US\$ 50 milhões (POLLACK, 2015).

Digno de nota, elevada quantidade de bebês não são amamentados devido a motivos clínicos ou sociais, sendo necessário recorrer à alimentação artificial. Um estudo avaliou 194 países, dos quais apenas 23 tem taxas de amamentação exclusiva acima de 60% e apenas 40% dos bebês menores de 6 meses são amamentados exclusivamente, conforme recomendação da Organização Mundial de Saúde (WHO, 2017). Popularmente, o leite em pó de origem animal e as fórmulas infantis são os alimentos mais utilizados para garantir a alimentação infantil perante a ausência da amamentação, sendo que estão disponíveis nos mercados uma grande variedade de leites em pó com diferentes tipos de suplementação (e.g., adição de oligossacarídeos, vitaminas, minerais) (MILLANI et al., 2009). Apesar da variedade, este mercado é caracterizado por produtos de valor elevado, inviabilizando o acesso para vasta parcela da população, além disso, não são encontrados alimentos com peptídeos bioativos na composição.

HMBaPs são inativos *in vivo* até serem liberados da proteína parental na digestão, mas podem ser gerados *in vitro* por ação proteolítica utilizando processos enzimáticos (SU et al., 2017). As enzimas proteolíticas podem ser produzidas de forma econômica por meio de fermentação em estado sólido (FES), método com diversas características vantajosas em termos econômicos e biotecnológicos, principalmente por necessitar de pouca água livre no

sistema e poder utilizar resíduos agroindustriais como substrato (VINIEGRA-GONZÁLES et al., 2003; VISHWANATHA et al., 2010; CASTRO & SATO, 2014). Esse método é particularmente interessante quando emprega fungos filamentosos, pois mimetiza seu *habitat* e podem ser utilizadas espécies consideradas seguras para o consumo (*Generally Recognized as Safe* - GRAS), proporcionando valor agregado ao bioprocesso (MORITA et al., 2010).

Assim, é interessante o desenvolvimento biotecnológico de técnicas para a produção desses peptídeos, de forma a manter o consumo pelos recém-nascidos de compostos que seriam obtidos caso estivessem sendo amamentados. Esta inovação biotecnológica poderá auxiliar no desenvolvimento de novos produtos, inclusive a um custo mais acessível, com potencial antimicrobiano e antioxidantes, aplicados como suplementos para fórmulas infantis de forma a aproximá-las ao leite materno (GILL et al., 2015, BRUNI et al., 2016).

Isto posto, esse estudo produziu HMBaPs com atividades antimicrobiana e antioxidante produzidos por ação proteolítica de enzimas fúngicas obtidas por fermentação em estado sólido, avaliou a interferência da paralisação da reação enzimática por adição de ácido acético ou por ebulição na determinação das atividades biológicas e caracterizou por análise proteômica as sequências peptídicas geradas.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Micro-organismos

O acesso ao Patrimônio Genético dos micro-organismos e resíduos agroindustriais foi regularizado sob cadastro n. A3B348F na plataforma do Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético (SISGEN), conforme preconizado pela Lei Brasileira da Biodiversidade (nº 13.123/15).

A cepa fúngica liofilizada de *Aspergillus oryzae* (ATCC 1003 / INCQS 40068) foi obtida pelo Instituto Oswaldo Cruz (FIOCRUZ-Brasil) e foi previamente caracterizada como bom produtor de proteases por FES (NOVELLI et al., 2016). As cepas fúngicas foram inoculadas em Agar Batata Dextrose (PDA) (Himedia®, Mumbai, Índia), incubadas a 30 °C por 120 h, armazenadas em vasilina estéril a 4 °C e sub-cultivadas a cada três meses.

2.2 Produção de Proteases

As proteases foram produzidas por FES em meio de cultura composto por farelo de trigo e água 1: 1 (p/v) de acordo com Castro & Sato (2014). O substrato foi doado pela Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu, Brasil (22°53'09" S, 48°26'42" O). Os frascos de Erlenmeyer contendo o substrato e água foram esterilizados por 15 min a 121°C. Em seguida, as suspensões de esporos (10^7 esporos mL⁻¹) foram preparadas com água destilada estéril e inoculados os esporos a partir de 96 h de cultura em Ágar Batata Dextrose (PDA). Os frascos foram incubados por 120 h a 30°C. Os extratos brutos de proteases foram obtidos por adição de 50 mL de água destilada, seguido de remoção dos micélios por filtração com duas camadas de gaze de algodão.

2.2.1 Determinação de atividade proteolítica

A atividade proteolítica de proteases fúngicas brutas foi determinada usando azocaseína (Sigma-Aldrich®, St Louis, EUA) como substrato, como descrito por Charney & Tomarelli (1947).

2.2.2 Purificação parcial das proteases

Os extratos enzimáticos brutos foram fracionados de acordo com Wingfield (2001) por adição de sulfato de amônio a 80% de saturação para precipitação de proteína (*salting-out*). As amostras foram centrifugadas a 4000 x *g* por 15 min a 5 ° C. Os precipitados foram ressuspendidos em tampão fosfato 0,1M pH 7,0 em um sistema composto por uma membrana de diálise de celulose de 47 mm (Sigma-Aldrich®, St Louis, EUA) e dialisado contra água destilada refrigerada. Os extratos foram liofilizados a -90 °C por 96h no equipamento Liotop® modelo L101 (Liotop®, São Carlos, Brasil). A atividade da protease parcialmente purificada foi obtida conforme descrito para as protease em extrato bruto.

2.3 Produção de *Pools* de Peptídeos Derivados de Leite Humano

Os leites foram obtidos de duas lactantes (A e B) saudáveis, sem sinais de mastite, ambas em fase madura de lactação (1 ano de amamentação interrompida pós-nascimento), cuja produção foi superior àquela necessária para alimentar seu próprio recém-nascido. Foram extraídos 500 mL dos leites utilizando bombas de leite comerciais esterilizadas. Os leites foram congelados a -20 °C imediatamente após a ordenha.

As proteínas do leite foram parcialmente purificadas com sulfato de amônio e liofilizadas como descrito para as proteases. A concentração de proteínas totais foi determinada por Bradford (BRADFORD, 1976).

Para produção dos peptídeos, 10 mL de proteínas do leite (100 mg mL⁻¹) e proteases a 2% (p/v) foram incubadas em tampão fosfato 0,1M pH 7,0 a 37 °C por 1 h. Proteases inativadas foram produzidas por ebulição e utilizadas como no controle negativo. Foram comparados dois métodos de paralização da atividade enzimática: com ácido acético 1M (A1 e B1) ou por ebulição por 10 min (A2 e B2). Após paralisadas, as reações foram centrifugadas a 4.000 x *g* por

20 min a 5 °C. Os sobrenadantes foram coletados e liofilizados a -90 °C por 96 h, os peptídeos purificados foram ressuspensos em água ultrapura e submetidos à filtração com filtros de membrana de poliéster sulfônico de poro de 0,22 µm (Kasvi®, São José dos Pinhais, Brasil).

2.4 Atividade Antimicrobiana de Pools de Peptídeos Derivados de Leite Humano

O teste de difusão de disco foi utilizado para avaliar as atividades antibacterianas de HMBaPs contra *Listeria monocytogenes* (ATCC 7644), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Salmonella enterica* Enteritidis (ATCC 13076), *Escherichia coli* (ATCC 25922) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853). Bem como as atividades antifúngica contra *Fusarium oxysporum* (IOC 4065), *Aspergillus fumigatus* (IOC 0081), *Penicillium expansum* (IOC 4076) e *Candida albicans* (IOC 2508) (MOTTA & BRANDELLI, 2002; ATHANÁZIO-HELIODORO et al., 2018). Os resultados foram expressos como mm de halo de inibição.

2.5 Atividade Antioxidante de Pools de Peptídeos Derivados de Leite Humano

2.5.1 Redução do radical DPPH

A eliminação do radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) (Sigma-Aldrich®, St Louis, EUA) foi determinada de acordo com Zhang et al. (2013). A reação foi preparada com 125 µL de extrato de amostra, 750 µL de etanol e 75 µL de DPPH a 2,1 g mL⁻¹. A mistura foi homogeneizada e mantida no escuro à temperatura ambiente durante 60 min e a absorbância foi medida a 517 nm. O branco foi preparado com 3,5 mL de etanol e 300 µL de DPPH. A atividade antioxidante foi expressa em % de redução do DPPH.

2.5.2 Capacidade de absorbância do radical oxigênio (ORAC)

O ORAC foi realizado conforme descrito por Dávalos et al. (2004), utilizando 70 mM de dicloridrato de AAPH [2,2'-azobis (2-metilpropionamida)] (Sigma-Aldrich®, St Louis, EUA) e fluoresceína a 12 mM como sonda de fluorescência. A fluorescência foi medida usando o dispositivo GloMax® Explorer (Promega®, Madison, EUA) com leituras a cada 10 min por 100

min a 37 °C. Os valores de ORAC foram determinados usando a diferença entre a área sob a curva de decaimento e subtraindo o branco (NET-AUC). Os resultados foram expressos em Trolox Equivalente (TE) ($\mu\text{mol } \mu\text{L}^{-1}$ da amostra).

2.6 Análise Proteômica

As amostras com melhores atividades biológicas nos ensaios antimicrobiano e antioxidante foram fracionadas por eletroforese bidimensional (2D-PAGE) em gel de poliacrilamida, conforme descrito anteriormente por Vieira et al. (2017). Os *spots* 2D-PAGE identificados foram submetidos à digestão trípica para serem caracterizados por ionização por eletropulverização em espectrômetro de massa em *tandem* (ESI-MS/MS) (Waters, Milford, EUA). Este ensaio foi realizado no sistema nanoACQUITY UPLC, que foi equipado com coluna HSS T3 (coluna UPLC HSS T3 ACQUITY 75 mm x 150 mm, 1,8 μm , Waters) e previamente equilibrada com 7% de fase móvel B (100% acetonitrila + 0,1% de ácido fórmico). Os peptídeos foram separados através de gradiente linear de 7-85% da fase móvel B por 20 min a vazão de 0,35 $\mu\text{L min}^{-1}$. A temperatura da coluna foi mantida a 45 °C. O MS foi operado no modo íon positivo durante 20 min e os dados registados foram processados no software ProteinLynx GlobalServer (PLGS), versão 3.0 (Waters, Milford, EUA). A identificação das proteínas foi realizada por meio do algoritmo de contagem de íons, e as sequências de peptídeos foram verificadas com base no acesso de proteínas no banco de dados *Universal Protein Resource* (UniProt) (Uniprot Consortium, Europa).

2.7 Análise Estatística

Todos os experimentos foram realizadas em triplicata. Os dados foram submetidos, primeiramente, a testes de normalidade (mistos para distribuição simétrica de dados ou GENMOD para distribuição assimétrica) seguidos de análise de variância e teste de Tukey-Kramer - quando aplicável - pelo software SAS (SAS®, Cary, EUA). A análise de eletroforese (2D-

PAGE) foi realizada pelo software ImageMaster Platinum 7.0 (GE-Healthcare®, Boston, EUA). Os resultados foram significativos quando $p \leq 0,05$ em todas as análises realizadas.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Produção de Proteases e de *Pools* de Peptídeos Derivados de Leite Humano

Neste estudo, as proteases de *Aspergillus oryzae* (ATCC 1003/INCQS 40068) produzidas por FES utilizando resíduo de farelo de trigo como substrato, apresentaram elevada atividade proteolítica de $43,65 \text{ U mL}^{-1}$ e concentração de proteínas totais de $6,4 \text{ mg mL}^{-1}$, após serem parcialmente purificadas por *salting-out* a 80% e liofilizadas. A geração de enzimas por FES é atrativa do ponto de vista biotecnológico, sendo que o *Aspergillus oryzae* foi considerado um ótimo produtor de proteases em outros estudos (CASTRO E SATO, 2014; NOVELLI et al., 2016; ORTIZ et al., 2016, ZANUTTO-ELGUI et al., 2019).

Uma elevada quantidade de proteínas totais foram observadas nas amostras de leite materno com $2755,3 \text{ mg mL}^{-1}$ para a doadora A e $3377,3 \text{ mg mL}^{-1}$ para a doadora B, após serem parcialmente purificadas também a 80% por *salting-out*.

3.2 Atividade Antimicrobiana de *Pools* de Peptídeos Derivados de Leite Humano

Diversos estudos reportaram o amplo espectro de ação antimicrobiana *in vitro* por proteínas e peptídeos derivados de leite (AGYEI & DANQUAH, 2012; NONGONIERMA & FITZGERALD, 2018; CÍCERO, 2017; NIELSEN, 2017; ZANUTTO-ELGUI et al., 2019).

Em nosso estudo, todos os HMBaPs produzidos apresentaram ação antimicrobiana contra os micro-organismos testados, com exceção do B2. As maiores atividades antibacterianas ($p < 0,0001$) foram observadas para B1 (16 mm de halo de inibição contra *L. monocytogenes*, 15 mm contra *S. Enteritidis* e 11 mm contra *E. coli*) e A1 (11 mm contra *E. coli*) (Figura 1). Para os fungos, as maiores atividades ($p < 0,0001$) foram observadas para A1, com 33

mm contra *C. albicans* e 31 mm contra *P. expansum* (Figura 2). O tipo de paralisação interferiu na atividade biológica, sendo que 93,4% e 91,7% das amostras paralisadas com ácido acético apresentaram ação antibacteriana e antifúngica, respectivamente. Por outro lado, apenas 6,6% e 8,3% das amostras paralisadas por ebulição tiveram, respectivamente, atividade antibacteriana e antifúngica.

Crianças prematuras são mais propensas a desenvolver sépsis por estafilococos coagulase-negativa (CAMACHO-GONZALES et al., 2013), sendo que, lactentes amamentados apresentam menor incidência de infecções e menor mortalidade quando comparados à lactentes alimentados com fórmulas infantis (HANSON et al., 2005; HAKKANSON 2015). Tal efeito pode ser elucidado pelo fato de proteases liberarem peptídeos com ação antimicrobiana durante a digestão do leite (GUERRERO et al., 2014; WADA & LONNERDAL 2014). Porém, de acordo com um estudo desenvolvido por Trend et al. (2015), a suplementação de fórmulas infantis com lactoferrina aumentou em 50% o efeito bacteriostático contra diversas espécies bacterianas, inibindo 97% do crescimento de *Staphylococcus epidermidis*, *S. aureus* e *E. coli* e 67% para *Staphylococcus agalactiae*.

A hidrólise da lactoferrina (Lf), proteína do leite, pode formar o peptídeo lactoferricina que possui ampla ação antimicrobiana e anti-inflamatória, principalmente para o fragmento Lf 1-11 (VAN DER VELDEN et al., 2009), para o qual foi observada a ação contra *C. albicans* (FERNANDES E CARTER, 2017) e contra *A. fumigatus* (LUPETTI et al., 2008). Outros estudos reportaram também a significativa ação contra *Candida* e fungos resistentes aos azólicos quando combinados a Lf com antifúngicos azólicos (VENKATESH & RONG, 2008; KOBAYASHI et al., 2011).

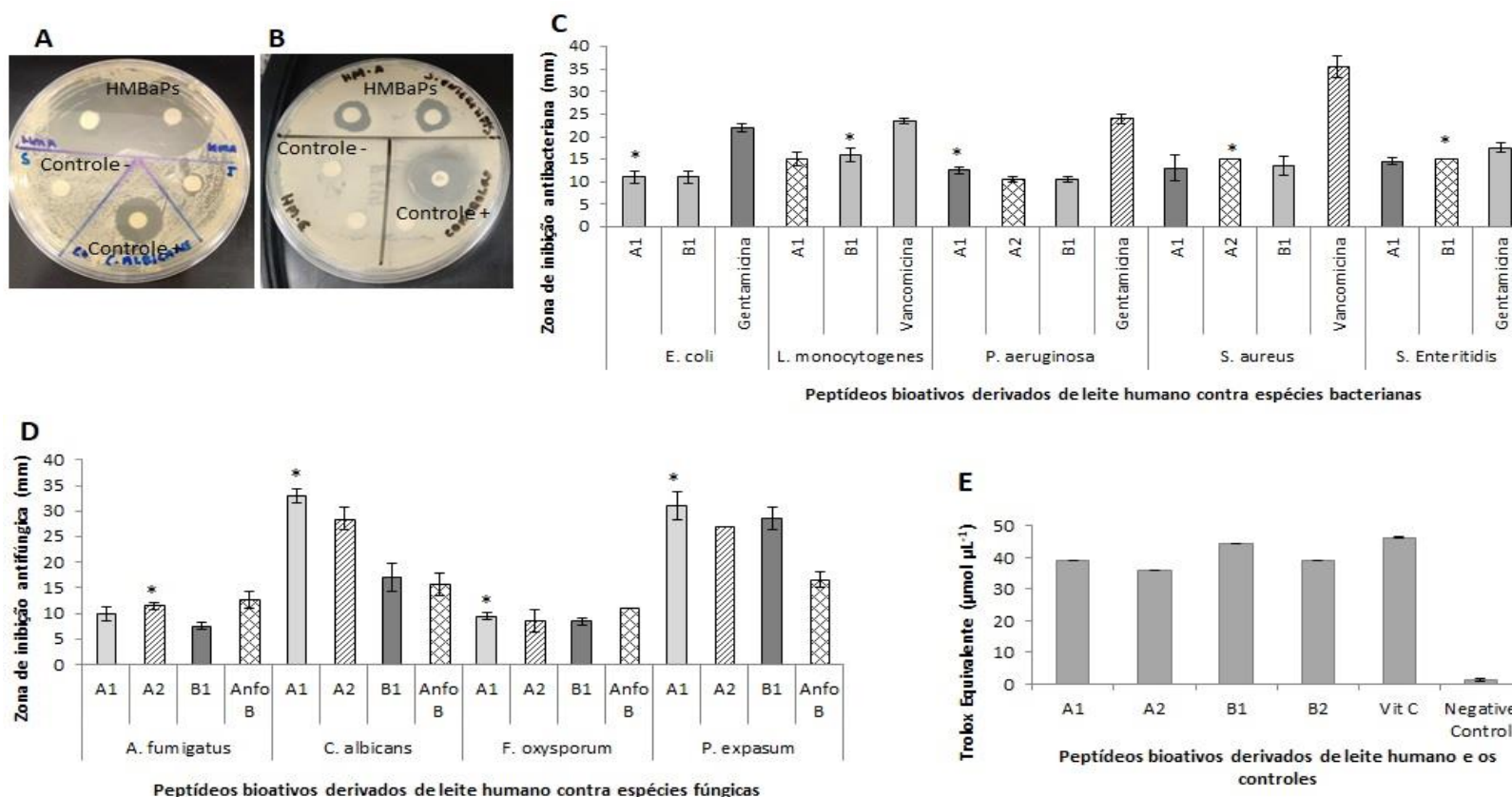


Figura 1. Atividades biológicas de *pools* de peptídeos derivados de leite humano (HMBaPs) obtidos a partir da ação proteolítica de proteases de *Aspergillus oryzae* (ATCC 1003) geradas a partir de fermentação em estado sólido. (A) Atividade antifúngica (ensaio de difusão em disco) de HMBaPs contra *Candida 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.

Apesar da eficiente ação da lactoferrina descrita, nosso estudo não avaliou o potencial antimicrobiano de cada fragmento peptídico isoladamente, mas sim de *pools* de peptídeos de leite humano gerados por ação proteolítica de enzimas produzidas por FES. Os *pools* foram bastante eficientes nos ensaios antimicrobianos *in vitro*, cujo efeito obtido pode ser resultante de uma ação sinérgica entre vários peptídeos presentes no composto gerado. Assim, neste estudo foi possível obter HMBaPS com ampla atividade antimicrobiana, sendo possível aplicá-los na produção de produtos biotecnológicos após maiores estudos da ação *in vivo* e produção sintética.

3.3 Atividade Antioxidante de *Pools* de Peptídeos Derivados de Leite Humano

Os HMBaPs produzidos apresentaram elevada atividade antioxidante, com redução de 75,6% a 95% do radical DPPH e, eliminação de radicais oxigênio por ensaio ORAC de 35,8 a 44,3 $\mu\text{mol TE } \mu\text{L}^{-1}$. Todos os peptídeos apresentaram diferença estatística comparados ao controle negativo ($p < 0,0001$). Para DPPH não foi observada diferença quanto o modo de paralisação da hidrólise, enquanto que para o ORAC as amostras paralisadas com ácido acético apresentaram maior atividade antioxidante com $39,0 \mu\text{mol TE } \mu\text{L}^{-1} \pm 0,09$ para A1 e $35,8 \mu\text{mol TE } \mu\text{L}^{-1} \pm 0,04$ para A2 ($p < 0,0001$); e $44,3 \mu\text{mol TE } \mu\text{L}^{-1} \pm 0,08$ para B1 e $39,0 \mu\text{mol TE } \mu\text{L}^{-1} \pm 0,06$ para B2 ($p < 0,0001$). O controle negativo e o ácido ascórbico (controle positivo) apresentaram $1,3 \mu\text{mol TE } \mu\text{L}^{-1} \pm 0,33$ e $46,3 \mu\text{mol TE } \mu\text{L}^{-1} \pm 0,02$, respectivamente. Um estudo anterior reportou a redução de radicais oxigênio de $13 \mu\text{mol TE mL}^{-1}$ para leite de vaca comercial *Ultra High Temperature* (UHT) e redução de 17,3% DPPH para leite humano fresco e maduro (6 meses de lactação) (CLOETENS et al., 2013).

De acordo com Chiang e Chang (2005), tanto caseínas quanto proteínas do soro apresentam atividade antioxidante em amostras de colostro bovino coletados 7 dias pós-parto.

Além deste, Zulueta et al. (2008) observaram o maior contribuinte para a atividade antioxidante em leite integral bovino é a caseína; enquanto que a albumina é a principal responsável na porção do soro do leite bovino; e a vitamina C (ácido ascórbico) e o ácido úrico os principais contribuintes em leites desproteinizados bovino. A albumina é a proteína do soro que melhor se destaca quanto à atividade antioxidante, observada após a hidrólise ou desnaturação. Desta forma, α -lactalbumina e β -lactoglobulina não ofereceram grande contribuição (CLOETENS et al., 2013), mas o leite depletado de β -lactoglobulina apresentou 50% de redução da capacidade antioxidante (LIU et al., 2007). Baseado nesses resultados, o leite humano mostra ser uma fonte interessante para a produção de produtos antioxidantes.

3.4 Análise Proteômica

Foram caracterizadas por análise proteômica as amostras com melhores atividades biológicas, que foram àquelas cuja paralisação da reação enzimática foi realizada com a adição de ácido acético (amostras A1 e B1). A fragmentação das proteínas por eletroforese bidimensional (Figura 2- painéis A, B e C) resultou em um elevado *matching* (coeficiente de similaridades entre as réplicas dos géis) de 95% entre os géis de B1 e 86% entre os géis da de A1, demonstrando a boa reprodutibilidade entre as replicatas.

Neste trabalho foram identificadas 135 sequências peptídicas derivadas de 11 proteínas parentais de leite, sendo elas: α -s1-caseína (2), β -caseína (5), κ -caseína (4), α -lactalbumina (8), α -antiquimotripsina (6), lactotransferrina (38), lisozima C (8), Receptor de Imunoglobulina Polimérica (PIGR) (18), imunoglobulina kappa (5), imunoglobulina lambda (6) e albumina sérica (35), além de fragmentos de proteínas estruturais como queratina citoesquelética tipo I e II (Figura 2 e 3).

Zanutto-Elgui et al. (2019) avaliaram as sequências peptídicas derivadas de leite bovino e caprino obtidas após hidrólise com enzimas fúngicas geradas por FES e identificaram fragmentos derivados de proteínas do soro como albumina, α -lactalbumina e β -lactoglobulina, e também de frações de caseína (α -s1, α -s2, β e κ). Contudo, neste estudo utilizando leite humano foi observado um maior repertório de proteínas parentais das quais foram identificadas sequências peptídicas com potencial biológico.

Dallas et al. (2014) avaliaram 445 sequências peptídicas endógenas de leite humano e identificaram que a maioria derivaram de β -caseína. Em um segundo estudo (DINGEES et al., 2017), realizado por análise bioinformática de sequências peptídicas isoladas de leite humano com atividade antimicrobiana e imunomodulatória, foram identificadas sequências derivadas de proteínas parentais β -caseína, PIGR, α s1-caseína e caseína osteopontina.

Dallas et al. (2014) avaliaram o perfil peptídico de acordo com a fase lactacional e observaram que a idade gestacional pode interferir significativamente na formação dos peptídeos, contudo, não observaram diferenças entre leite produzido em casos de nascimentos à termo e prematuro. Em outro estudo, Wan et al. (2013) reportaram essa diferença. Eles avaliaram amostras de leite por espectrometria de massas LC-MS/MS e identificaram 419 sequências peptídicas que derivaram de 34 proteínas parentais, sendo que, 41 peptídeos se expressaram diferentemente entre amostras de leite, com 18 presentes em maior quantidade no leite a termo (gestação entre 38-41 semanas) e 23 em maior quantidade no prematuro (gestação 28-32 semanas).

Além das proteínas habitualmente isoladas de leite, neste trabalho identificamos sequências peptídicas da proteína PIGR, que consiste em uma pré-pró-proteína de 764 aminoácidos, cuja maior porção é de domínio extracelular- f(19-603)- capaz de auxiliar no

transporte de IgA, e a outra porção- f(603-638)- é de componente secretor (ASANO & KOMIYAMA, 2011).

Em um estudo de Dingess et al. (2017) foram descritas diversas sequências de PIGR do domínio extracelular sem função antimicrobiana, mas nenhuma do componente secretor. Aqui foram identificadas 17 sequências correspondentes à porção extracelular e, apenas 1 sequência correspondente ao componente secretor: AVADTRDQADGSR (609-622).

As atividades biológicas *in vitro* foram observadas para os compostos obtidos a partir da hidrólise com as proteases fúngicas produzidas por FES, sendo que, não foi observado nenhum resultado biológico quando utilizado os controles negativos produzidos com as enzimas previamente inativadas por ebulição. As sequências peptídicas descritas (Figura 2 e 3) podem estar envolvidas no desencadeamento das atividades biológicas descritas de modo sinérgico ou isoladamente, considerando que neste foram avaliadas as capacidades biológicas dos *pools* de peptídeos gerados.

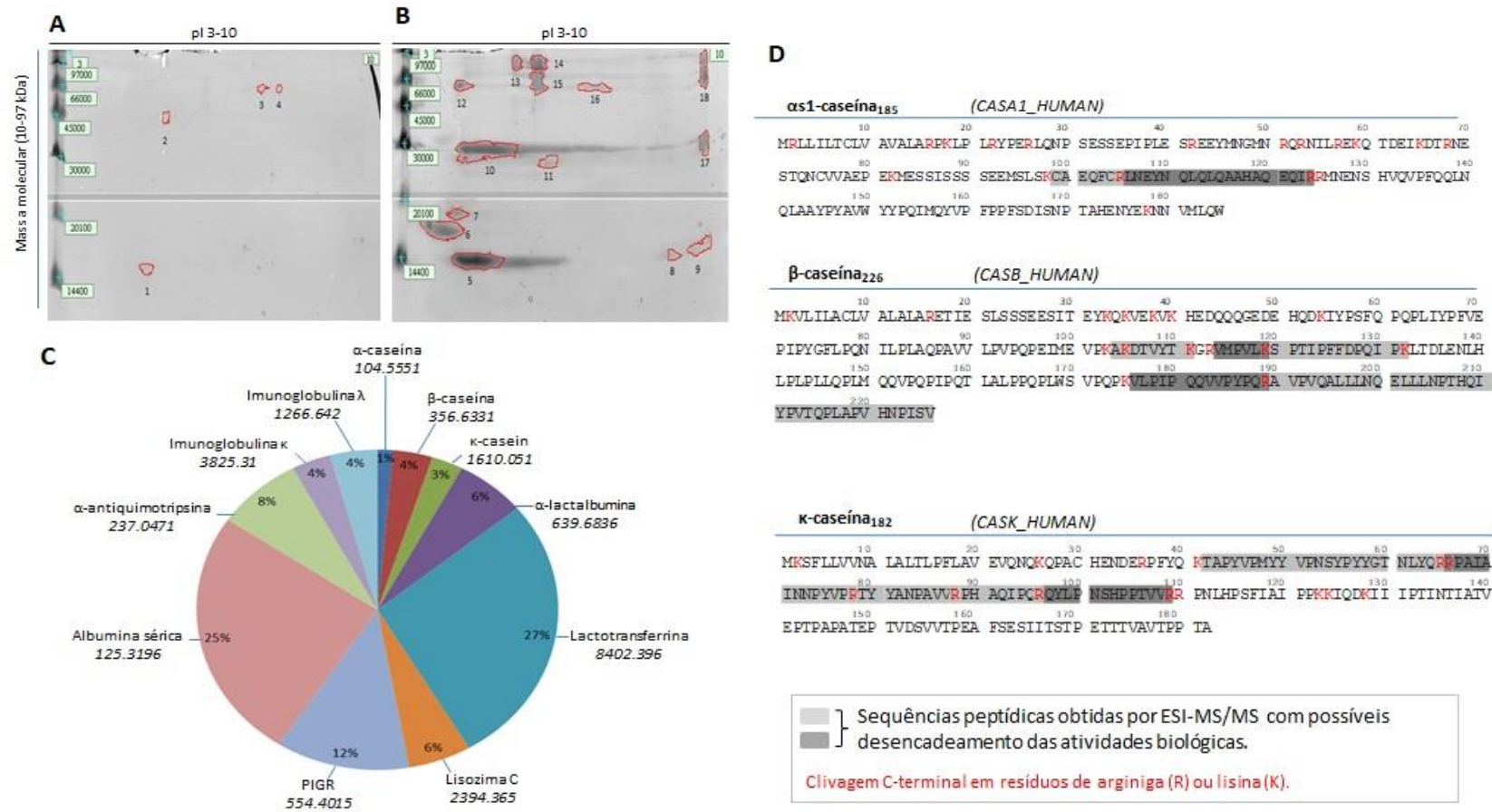


Figura 2. (A e B) Spots de SDS-poliacrilamida 2D-PAGE (pl 3 a 10) de *pool* peptídeos isolados de leite humano obtidos por hidrólise com proteases fúngicas de *Aspergillus oryzae* (ATCC 1003) - parcialmente purificada a 80% pelo método de *salting-out*. **(C)** Porcentagem de proteínas parentais que originaram os peptídeos bioativos identificados 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.

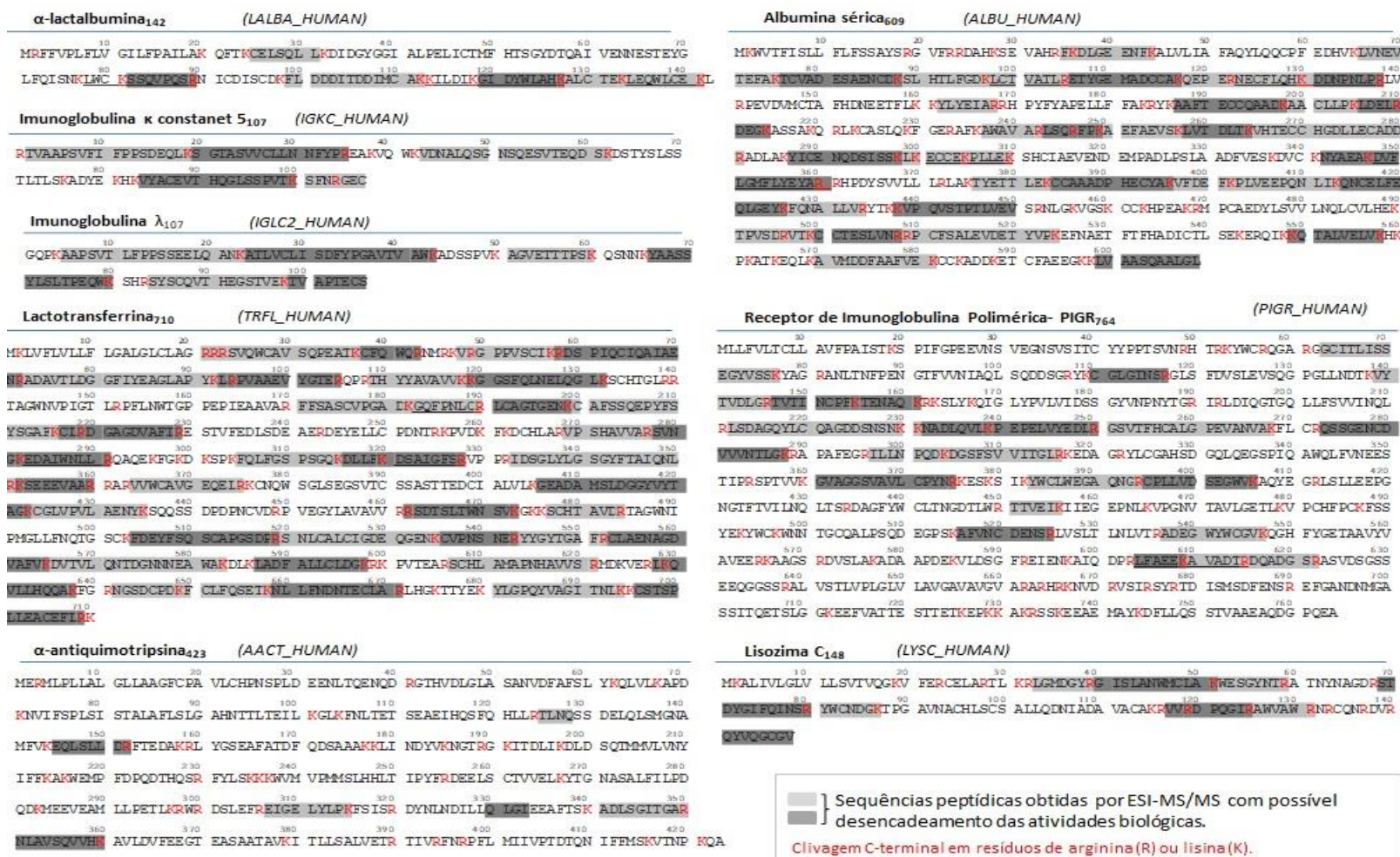


Figura 3. Caracterização por espectrometria de massas (ESI-MS/MS) das sequências peptídicas obtidas derivadas de proteína do soro de leite humano, obtidas pela ação de proteases fúngicas de *Aspergillus oryzae* (ATCC 1003) produzidas por fermentação em estado sólido. A-alanina. R-arginina. N-asparagina. 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.

O leite é um alimento dinâmico que altera sua composição conforme o período da lactação para suprir diferentes necessidades do bebê (CLOETENS et al., 2013; DALLAS et al., 2015). Diferentemente deste, as fórmulas infantis apresentam composição estática. Abordagens mais completas considerando a geração de produtos ideais para cada fase do lactente seria possível sintetizando as sequências obtidas por análise proteômica de forma a enriquecer os alimentos com proteínas intactas, como por exemplo com α -lactalbumina que consiste na proteína do soro com baixa alergenicidade e aumenta a resistência contra bactérias *E. coli* (MATSUMOTO et al., 2001; BRUCK et al., 2003). Esta biotecnologia proposta poderá prover, num futuro próximo, peptídeos com atividades biológicas capazes de beneficiar a saúde do neonato, uma vez que muitos compostos ativos derivados do leite humano estão ausentes nas fórmulas infantis (DALLAS et al., 2013), respeitando as necessidades fisiológicas e disponibilizando um alimento diferenciado.

Apesar das vantagens deste bioprocesso, a tripsina utilizada para a digestão dos *spots* para a realização da espectrometria de massas pode causar autólise e gerar sequências peptídicas. A tripsina cliva os segmentos peptídicos de forma específica na região C-terminal entre resíduos de arginina ou lisina (OLSEN et al., 2004), sendo que este comportamento de clivagem foi observado em praticamente todos os fragmentos obtidos neste estudo, conforme ressaltado em vermelho nas Figuras 2 e 3. Por outro lado, as proteases de *A. oryzae* podem clivar resíduos de aminoácidos nas mesmas regiões (PRATUSH et al., 2013). Assim, estudos futuros são necessários para distinguir quais fragmentos peptídicos foram gerados pela ação das proteases fúngicas daqueles que foram gerados por ação da tripsina.

Pelo exposto, a aplicação de um bioprocesso diferenciado para a produção de *pools* de peptídeos bioativos de leite humano caracteriza uma inovação que abrange uma ampla gama

de possibilidade de ações benéficas na saúde que não apenas neonatos, mas também demais indivíduos tenham acesso aos princípios deste alimento rico em propriedade capazes de atuar como suplementos alimentares, antibióticos, antifúngicos, antioxidantes e em terapias (GILL et al., 2015).

4 CONCLUSÃO

Este estudo evidenciou o uso de proteases fúngicas geradas por um método-custo efetivo por FES para produzir HMBaPs com atividade antimicrobiana e antioxidante in vitro, avaliou que o modo de paralisação da reação enzimática pode interferir nas atividades biológicas e caracterizou as amostras quanto as sequências peptídicas formadas por análise proteômica, trazendo novas propostas para geração de bioprodutos voltados para o consumo infantil capazes de beneficiar a saúde.

5 AGRADECIMENTOS

Este estudo foi financiado pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) – Código Financiamento 001, e pela Universidade Estadual Paulista (UNESP) pelo Instituto de Biociências (IBB) e Instituto de Biotecnologia (IBTEC), ambos em Botucatu, SP, Brasil.

6 REFERÊNCIAS

- AGYEI, D.; DANQUAH, M.K. Rethinking food-derived bioactive peptides for antimicrobial and immunomodulatory activities. **Trends in Food Science & Technology**, v. 23, n. 2, p. 62–69, 2012.
- ANDREAS, N.J.; KAMPMANN, B.; MEHRING LE-DOARE, K. Human breast milk: A review on its composition and bioactivity. **Early Human Development**, v. 91, n. 11, p. 629–635, 2015.
- ASANO, M.; KOMIYAMA, K. Polymeric immunoglobulin receptor. **Journal of Oral Science**, v. 53, n. 2, p. 147–156, 2011.
- ATHANÁZIO-HELIODORO, J. C.; OKINO-DELGADO, C.H.; FERNANDES, C.J.DA C.; ZANUTTO, M.R.; PRADO, D.Z.DO; SILVA, R.A.DA; FACANALI, R.; ZAMBUZZI, W.F.; MARQUES, M.O.M; FLEURI, L.F. Improvement of lipase obtaining system by orange waste-based solid-state fermentation: production, characterization and application. **Preparative Biochemistry and Biotechnology**, p. 1–9, 2018.
- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1, p. 248–254, 1976.
- BRÜCK, W.M.; KELLEHER, S.L.; GIBSON, G.R.; NIELSEN, K.E.; CHATTERTON, D.E.; LÖNNERDAL, B. rRNA probes used to quantify the effects of glycomacropeptide and alpha-lactalbumin supplementation on the predominant groups of intestinal bacteria of infant rhesus monkeys challenged with enteropathogenic *Escherichia coli*. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, v. 37, n. 3, p. 273–280, 2003.
- BRUNI, N.; CAPUCCHIO, M.T.; BIASIBETTI, E.; PESSIONE, E.; CIRINCIONE, S.; GIRAUDO, L.; CORONA, A.; DOSIO, F. Antimicrobial activity of lactoferrin-related peptides and applications in human and veterinary medicine. **Molecules**, v. 21, n. 6, p. 752, 2016.
- CAMACHO-GONZALEZ, A.; SPEARMAN, P.W.; STOLL, B.J. Neonatal infectious diseases: Evaluation of neonatal sepsis. *Pediatric Clinics of North America*, v. 60, n. 2, p. 367–389, 2013.
- CAPRIOTTI, A.L.; CAVALIERE, C.; PIOVESANA, S.; SAMPERI, R.; LAGANÀ, A. Recent trends in the analysis of bioactive peptides in milk and dairy products. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 408, n. 11, p. 2677–2685, 2016.
- CASTRO, R. J. S.; SATO, H. H. Production and biochemical characterization of protease from *Aspergillus oryzae*: An evaluation of the physical–chemical parameters using agroindustrial wastes as supports. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 3, n. 3, p. 20–25, 2014.
- CHARNEY, J.; TOMARELLI, R. M. A colorimetric method for the determination of the proteolytic activity of duodenal juice. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 171, n. 2, p. 501–505, 1947.

- CHIANG, S-H., CHANG, C-Y. Antioxidant properties of casein and whey proteins from colostrums. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 13 (1), 57-63, 2005.
- CICERO, A. F. G.; FOGACCI, F.; COLLETTI, A. Potential role of bioactive peptides in prevention and treatment of chronic diseases: A narrative review. **British Journal of Pharmacology**, v. 174, n. 11, p. 1378–1394, 2017.
- CLAUSEN, M. R.; SKIBSTED, L. H.; STAGSTED, J. Characterization of major radical scavenger species in bovine milk through size exclusion chromatography and functional assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 7, p. 2912–2919, 2009.
- CLOETENS, L.; PANEE, J.; ÅKESSON, B. The antioxidant capacity of milk-the application of different methods *in vitro* and *in vivo*. **Cellular and Molecular Biology** (Noisy-le-Grand, France), v. 59, n. 1, p. 43–57, 2013.
- CORDERO R, C.; PRADO S, F.; BRAVO J, P. Update on management of cow's milk protein allergy: Available milk formulas and other juices. **Revista Chilena de Pediatría**, v. 89, n. 3, p. 310–317, 2018.
- DALLAS, D.C.; GUERRERO, A.; KHALDI, N.; BORGHESE, R.; BHANDARI, A.; UNDERWOOD, M.A.; LEBRILLA, C.B.; GERMAN, J.B.; BARILE, D. A peptidomic analysis of human milk digestion in the infant stomach reveals protein-specific degradation patterns. **The Journal of Nutrition**, v. 144, n. 6, p. 815–820, 2014.
- DALLAS, D.C.; GUERRERO, A.; KHALDI, N.; CASTILLO, P.A.; MARTIN, W.F.; SMILOWITZ, J.T.; BEVINS, C.L.; BARILE, D.; GERMAN, J.B.; LEBRILLA, C.B. Extensive *in vivo* human milk peptidomics reveals specific proteolysis yielding protective antimicrobial peptides. **Journal of Proteome Research**, v. 12, n. 5, p. 2295–2304, 2013.
- DÁVALOS, A.; GÓMEZ-CORDOVÉS, C.; BARTOLOMÉ, B. extending applicability of the oxygen radical absorbance capacity (ORAC–Fluorescein) assay. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 1, p. 48–54, 2004.
- DINGESS, K.A.; DE WAARD, M.; BOEREN, S.; VERVOORT, J.; LAMBERS, T.T.; VAN GOUDOEVER, J.B.; HETTINGA, K. Human milk peptides differentiate between the preterm and term infant and across varying lactational stages. **Food & Function**, v. 8, n. 10, p. 3769–3782, 2017.
- EGGER, L.; MÉNARD, O. Update on bioactive peptides after milk and cheese digestion. **Current Opinion in Food Science, Food Microbiology -Functional Foods and Nutrition**. v. 14, p. 116–121, 2017.

- FERNANDES, K.E.; CARTER, D.A. The antifungal activity of lactoferrin and its derived peptides: Mechanisms of action and synergy with drugs against fungal pathogens. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, 2017.
- GILL, E.E.; FRANCO, O.L.; HANCOCK, R.E.W. Antibiotic adjuvants: Diverse strategies for controlling drug-resistant pathogens. **Chemical Biology & Drug Design**, v. 85, n. 1, p. 56–78, 2015.
- GUERRERO, A.; DALLAS, D.C.; CONTRERAS, S.; CHEE, S.; PARKER, E.A.; SUN, X.; DIMAPASOC, L.; BARILE, D.; GERMAN, J.B.; LEBRILLA, C.B. Mechanistic peptidomics: Factors that dictate specificity in the formation of endogenous peptides in human milk. **Molecular & Cellular Proteomics: MCP**, v. 13, n. 12, p. 3343–3351, 2014.
- HAKANSSON, A. P. Protective effects of human milk antimicrobial peptides against bacterial infection. **Jornal de Pediatria**, v. 91, n. 1, p. 4–5, 2015.
- HANSON, L. A. Immunobiology of Human Milk. 1 ed. Amarillo, TX: Hale Pub L P, 2005, 241 p.
- HAUG, A.; HØSTMARK, A. T.; HARSTAD, O. M. Bovine milk in human nutrition: A review. **Lipids in Health and Disease**, v. 6, p. 25, 2007.
- KOBAYASHI, T.; KAKEVA, H.; MIYAZAKI, T.; IZUMIKAWA, K.; YANAGIHARA, K.; OHNO, H.; YAMAMOTO, Y.; TASHIRO, T.; KOHNO, S. Synergistic antifungal effect of lactoferrin with azole antifungals against *Candida albicans* and a proposal for a new treatment method for invasive candidiasis. **Japanese Journal of Infectious Diseases**, v. 64, n. 4, p. 292–296, 2011.
- KORHONEN, H. Milk-derived bioactive peptides: From science to applications. **Journal of Functional Foods**, v. 1, n. 2, p. 177–187, 2009.
- LIU, H. C.; CHEN, W. L.; MAO, S. J. T. Antioxidant nature of bovine milk beta-lactoglobulin. **Journal of Dairy Science**, v. 90, n. 2, p. 547–555, 2007.
- LUPETTI, A.; VAN DISSEL, J.T.; BROUWER, C.P.; NIBBERING, P.H. Human antimicrobial peptides' antifungal activity against *Aspergillus fumigatus*. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 27, n. 11, p. 1125–1129, 2008.
- MATSUMOTO, H.; SHIMOKAWA, Y.; USHIDA, Y.; TOIDA, T.; HAYASAWA, H. New biological function of bovine alpha-lactalbumin: Protective effect against ethanol- and stress-induced gastric mucosal injury in rats. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 65, n. 5, p. 1104–1111, 2001.
- MILLANI, E.; KONSTANTYNER, T.; TADDEI, J.A.A.C. Effects of prebiotics (oligosaccharides) use on child's health, *Revista Paulista de Pediatria*, n. 27, n. 4, p. 436–446, 2009.

- MOHANTY, D. JENA, R.; CHOUDHURY, P.K.; PATTNAIK, R.; MOHAPATRA, S.; SAINI, M.R. Milk Derived Antimicrobial Bioactive Peptides: A Review. **International Journal of Food Properties**, v. 19, n. 4, p. 837–846, 2 2016.
- MORITA, H.; KURIYAMA, K-I.; AKIYAMA, N.; OKAMOTO, A.; YAMAGATA, Y.; KUSUMOTO, K-I.; KOIDE, Y.; ISHIDA, H.; TAKEUCHI, M. Molecular cloning of ocpO encoding carboxypeptidases O of *Aspergillus oryzae* IAM 2640. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v.74, p.1000-1006, 2010.
- MOTTA, A. S.; BRANDELLI, A. Characterization of an antibacterial peptide produced by *Brevibacterium linens*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 92, n. 1, p. 63–70, 2002.
- NIELSEN, S.D.; BEVERLY, R.L.; QU, Y.; DALLAS, D.C. Milk bioactive peptide database: A comprehensive database of milk protein-derived bioactive peptides and novel visualization. **Food Chemistry**, v. 232, p. 673–682, 2017.
- NONGONIERMA, A.B.; FITZGERALD, R.J. Enhancing bioactive peptide release and identification using targeted enzymatic hydrolysis of milk proteins. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 410, n. 15, p. 3407–3423, 2018.
- NOVELLI, P.K.; BARROS, M.M.; FLEURI, L.F. Novel inexpensive fungi proteases: Production by solid state fermentation and characterization. **Food Chemistry**, v. 198, p. 119–124, 2016.
- OLSEN, J.V.; ONG, S.E.; MANN, M. Trypsin cleaves exclusively C-terminal to arginine and lysine residues. **Molecular and Cellular Proteomics**, v. 3, n. 6, p. 608-614, 2004.
- ORTIZ, G.E.; NOSEDA, D.G.; MORA, P.; CLARA, M.; RECUPERO, M.N.; BLASCO, M.; ALBERTÓ, E.A. Comparative Study of New *Aspergillus* Strains for Proteolytic Enzymes Production by Solid State Fermentation. Research article. Disponível em: <<https://www.hindawi.com/journals/er/2016/3016149/>>. Acesso em: 14 jun. 2018.
- PELLEGRINE, J.B.; KOOPMANS, F.F.; PESSANHA, H.L.; RUFINO, C.G.; FARIAS, H.P. S. Educação popular em saúde: Doação de leite humano em comunidade do Rio de Janeiro, Brasil. *Interface*, v.18, n. 2, p. 1499-1506, 2014.
- POLLACK, A. Human breast milk becoming hot industrial commodity. In: New York Times News Service, by Andrew Pollack. 2015. Disponível em <https://www.bradenton.com/news/local/health-care/article34867149.html>
- PONSTEIN-SIMARRO DOORTEN, A.Y.; VD WIEL, J.A.G.; JONKER, D. Safety evaluation of an IPP tripeptide-containing milk protein hydrolysate. **Food and Chemical Toxicology: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association**, v. 47, n. 1, p. 55–61, 2009.

SILVA, V.G. Normas técnicas para banco de leite humano: uma proposta para subsidiar a construção para Boas Práticas. Tese (Doutorado em Saúde da Mulher e da Criança) – Instituto Fernandes Figueira/Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2004.

SU, M.-Y.; BROADHURST, M.; LIU, C.P.; GATHERCOLE, J.; CHENG, W.L.; QI, X.Y.; CLERENS, S.; DYER, J.M.; DAY, L.; HAIGH, B. Comparative analysis of human milk and infant formula derived peptides following *in vitro* digestion. **Food Chemistry**, v. 221, p. 1895–1903, 2017.

TREND, S.; STRUNK, T.; HIBBERT, J.; KOK, C.H.; ZHANG, G.; DOHERTY, D.A.; RICHMOND, P.; BURGNER, D.; SIMMER, K.; DAVIDSON, D.J.; CURRIE, A.J. Antimicrobial protein and peptide concentrations and activity in human breast milk consumed by preterm infants at risk of late-onset neonatal sepsis. **PLoS ONE**, v. 10, n. 2, 2015.

VAN DER VELDEN, W.J.; VAN IERSEL, T.M.P.; BLIJLEVENS, N.M.A; DONNELLY, J.P. Safety and tolerability of the antimicrobial peptide human lactoferrin 1-11 (hLF1-11). **BMC Medicine**, v. 7, n. 1, p. 44, 2009.

VENKATESH, M.P.; RONG, L. Human recombinant lactoferrin acts synergistically with antimicrobials commonly used in neonatal practice against coagulase-negative staphylococci and *Candida albicans* causing neonatal sepsis. **Journal of Medical Microbiology**, v. 57, n. Pt 9, p. 1113–1121, 2008.

VIEIRA, J.C.S.; BRAGA, C.P.; OLIVEIRA, G. DE; LEITE, A. DE L.; QUEIROZ, J.V.DE; CAVECCI, B.; BITTARELLO, A.C.; BUZALAF, M.A.R.; ZARA, L.F.; PADILHA, P.DE M. Identification of protein biomarkers of mercury toxicity in fish. **Environmental Chemistry Letters**, v. 15, n. 4, p. 717–724, 2017.

WADA, Y.; LÖNNERDAL, B. Bioactive peptides derived from human milk proteins: Mechanisms of action. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 25, n. 5, p. 503–514, 2014.

WAN, J.; CUI, X.W.; ZHANG, J.; FU, Z.Y.; GUO, X.R.; SUN, L.Z.; JI, C.B. Peptidome analysis of human skim milk in term and preterm milk. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 438, n. 1, p. 236–241, 2013.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Disponível em <https://www.who.int/en/news-room/detail/01-08-2017-babies-and-mothers-worldwide-failed-by-lack-of-investment-in-breastfeeding>. Acessado em 23 de março de 2019.

WINGFIELD, P. Protein precipitation using ammonium sulfate. **Current Protocols in Protein Science**, v. Appendix 3, p. Appendix 3F, 2001.

ZANUTTO-ELGUI, M.R.; VIEIRA, J.C.S.; PRADO, D.Z.; BUZALAF, M.A.R.; PADILHA, P.M.; ELGUI DE OLIVEIRA, D.; FLEURI, L.F. Production of milk peptides with antimicrobial and antioxidant properties using fungal proteases. **Food Chemistry**, v. 278, p. 823-831, 2019.

ZHANG, W.; CHEN, H.; WANG, Z.; LAN, G.; ZHANG, L. Comparative studies on antioxidant activities of extracts and fractions from the leaves and stem of *Epimedium koreanum* Nakai. **Journal of Food Science and Technology**, v. 50, n. 6, p. 1122–1129, 2013.

ZULUETA, A.; MAURIZI, A.; FRÍGOLA, A.; ESTEVE, M.J.; COLI, R.; BURIN, G. Antioxidant capacity of cow milk, whey and deproteinized milk. **International Dairy Journal**, v. 19, n. 6, p. 380–385, 2009.

CAPÍTULO 4

“Método de obtenção de peptídeos bioativos inibidores de
Pythium insidiosum”

Método de obtenção de peptídeos bioativos inibidores de
Pythium insidiosum

Luciana Franciso Fleuri¹, Mirella Rossitto Zanutto¹, Sandra de Moraes Gimenes Bosco², Jéssica Luana Chechi²

¹ Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Biociências, Departamento de Química e Bioquímica, Botucatu, SP, Brasil.

² Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Biociências, Departamento de Microbiologia e Imunologia, Botucatu, SP, Brasil.

Comunicação de patente do ponto de vista inovador pela Agência Unesp de Inovação (AUIN) com aceite em fase de depósito até o momento da redação da tese, conforme consta no **Anexo III**.

1 ANÁLISE TÉCNICA

1.1 Problema

Pythium insidiosum é um micro-organismo zoospórico, fungo-símile, pertencente ao reino Stramenopila, filo Oomycota, família Pythiaceae, mais relacionado às diatomáceas e algas do que aos fungos verdadeiros (ALEXOPOULOS et al., 1994, SCHURKO et al., 2003, GAASTRA et al., 2010) que necessita de água e vegetação para a formação de zoósporos (propágulos infecciosos) (MENDOZA et al., 1993, SUPABANDHU et al., 2008). Esta espécie é a única do gênero com ação patogênica em mamíferos, causando a pitiose, doença observada principalmente em equinos, cães, bovinos, gatos, animais silvestres e também humanos em regiões tropicais e subtropicais (MENDOZA, 2005; SANTURIO & FERREIRO, 2008; GAASTRA et al., 2010). No entanto, têm sido relatados casos de pitiose em regiões que não se adequam a esta classificação climática (Califórnia e Arizona), indicando a incidência de *P. insidiosum* decorrente das alterações climáticas e agroculturais, em locais cujas plantações têm necessidade aquática (WHITE et al., 2008).

A pitiose progride rapidamente, comprometendo a vida de humanos e animais (PUPAIBOOL et al., 2006; ÁLVAREZ et al., 2013). Em animais a infecção pode ser cutânea (caracterizada por lesão ulcerativa nodular granulomatosa e necrosante, purido intenso, chegando a levar a automutilação) (MARTINS DIAS et al., 2012); intestinal (acomete cães mais frequentemente, caracterizada por vômitos, perda de peso, diarreia e massas abdominais); pulmonar (lesões nodulares) e óssea (caracterizadas por exotoses, osteólises e osteomielite) (REIS et al., 2003; SANTURIO et al., 2006). Em humanos, a doença foi descrita pela primeira vez em 1986 na Tailândia (THIANPRASIT, 1986). No Brasil foi descrita pela primeira vez em 2005 (BOSCO et al., 2005, MARQUES et al., 2006). Atualmente observa-se a maioria dos casos humanos na Tailândia, sendo a pitiose endêmica, principalmente em trabalhadores da

agricultura do arroz (KRAJAEJUM et al., 2006). Além da Tailândia, casos em animais são descritos no sudeste asiático (Índia, Indonésia, Japão, Coreia, Nova Guiné, Tailândia), Oceania (Austrália e Nova Zelândia), Américas (Argentina, Brasil, Uruguai, Colômbia, Venezuela, Costa Rica, Guatemala, Haiti, Panamá, Nicarágua, México e Estados Unidos) e África (MENDOZA, 2005; PÉREZ et al., 2005, RIVIERE et al., 2005). A infecção em humanos se manifesta de forma cutânea (lesões granulomatosas e ulcerativas), vascular (tromboses, vasculites ou aneurismas), ocular (ceratites, úlceras corneanas) e sistêmica (KRAJAEJUN et al., 2002), apresentando elevada taxa de mortalidade.

Os oomicetos diferem estruturalmente dos fungos verdadeiros devido à ausência de quitina na parede celular (substituída por celulose) e também ausência de ergosterol na membrana plasmática. Os principais antifúngicos disponíveis na atualidade, como azólicos (fluconazol, itraconazol), alilaminas (terbinafina) e poliênicos (anfotericina B), atuam na inibição/ligação do ergosterol, causando instabilidade da membrana fúngica, tal fato explica o insucesso do uso desses contra *P. insidiosum* (SANTURIO & FERREIRO, 2008; GAASTRA et al., 2010).

Outras formas de tratamento foram testadas, como o uso associado dos antifúngicos citados acima com caspofungina, inibidora de β -glucana (ARGENTA et al., 2010); ou associados com antibióticos como metronidazol e rifampicina e com anti-inflamatório como ibuprofeno (CAVALHEIRO et al., 2009); e também imunoterápicos (MENDOZA & NEWTON, 2005). No entanto, os resultados apresentam elevada variabilidade da susceptibilidade-resposta ao tratamento (CAVALHEIRO et al., 2009) e o uso de antifúngicos sistêmicos em animais são pouco eficazes, nefrotóxicos e possuem custo elevado (MARTINS DIAS et al., 2012). Assim, as melhores opções de tratamento são a imunoterapia (MILLER, 1981) e a cirurgia. Desta forma, a

ausência de um tratamento efetivo contra este patógeno mobiliza a busca por um composto com potencial de ação (TROLEZI et al., 2017) que seja biocompatível e produzido a baixo custo.

Peptídeos bioativos derivados de leite (LBaPs) são fragmentos proteicos que apresentam diversas atividades biológicas, entre elas a propriedade antimicrobiana, agindo de forma similar a uma droga ou hormônio, exercendo papel relevante na saúde humana e animal (KORHONEN, 2009; LIVNEY, 2010; NONGONIERMA & FITZGERALD, 2018). Os LBaPs podem ser produzidos por hidrólise das proteínas de leite utilizando proteases fúngicas produzidas por Fermentação em Estado Sólido (FES). Esse bioprocesso tem caráter custo-efetivo e sustentável, uma vez que admite o uso de resíduos agroindustriais como substrato e necessita de pouca quantidade de água livre no sistema (CASTRO & SATO, 2014).

O uso terapêutico de LBaPs tem despertado grande interesse devido ao amplo potencial de ação desses compostos, à seletividade comparado aos fármacos e também por serem considerados seguros e de baixa toxicidade (CICERO et al., 2017; NIELSEN et al., 2017). A busca por peptídeos bioativos com atividade antimicrobiana é vantajosa, pois estes compostos demonstram eficácia no tempo de morte da célula alvo e amplo espectro de ação, inclusive contra cepas resistentes aos antimicrobianos existentes (ZASLOFF, 2002; BENKERROUM, 2010).

1.2 Solução do Problema

A invenção relata a eficiência da aplicação *in vitro* de peptídeos bioativos de leite bovino, caprino e humano produzidos por proteases fúngicas de *Aspergillus oryzae* (ATCC 1003) por FES utilizando farelo de trigo no controle do crescimento (efeito fungistático) contra isolados (n=4) de *Pythium insidiosum* proveniente de equinos, possibilitando sua aplicação no tratamento da pitioses.

1.3 Desvantagens e/ou Limitações

Estudos prévios relataram que a atividade antimicrobiana está relacionada à ação dos peptídeos bioativos de leite sobre a membrana (causando a desestabilização e desintegração), inibição de síntese de DNA, RNA, enzimas, mitocôndrias e síntese proteica (REDDY et al., 2004; HAQUE & CHAND, 2008; SANTOS et al., 2016), contudo, não há o conhecimento do mecanismo que ocorre no caso da inibição dos LBaPs contra *P. insidiosum*, bem como não se conhece o mecanismo de ação do *P. insidiosum* na patogenicidade. Não foi avaliada também a eficiência do tratamento *in vivo* e a produção em larga escala das proteases e dos peptídeos bioativos.

2 ANÁLISE MERCADOLÓGICA

2.1 Aplicações e Usos

Fungistático para infecções causadas por *Pythium insidiosum*.

2.2 Diferencial e Concorrência

Produto produzido com baixo investimento financeiro.

Não há antifúngicos disponíveis no mercado com ação sobre o *P. insidiosum*.

3 PROPRIEDADE INTELECTUAL (PI) ANTERIOR OU SIMILAR

Não há patentes descrevendo efeito fungistático contra *P. insidiosum*. Estão disponíveis até o momento, apenas patentes abordando outras formas de terapia, como vacinas e imunoterapia. Embora seja conhecida a atividade antifúngica de peptídeos bioativos de leite, não há registros da atuação destes contra *P. insidiosum*.

3.1 Propriedade Intelectual Anterior

Não se aplica.

3.2 Propriedade Intelectual Similar

Vaccine for preventing pythiosis in humans and animals. Alberto Leonel Mendoza.

Broad of Trustees of Michigan State University. US6833136B2. Publicada em 2004-12-21.

Disponível em:

<https://patents.google.com/patent/US6833136B2/en?q=Vaccine&q=preventing&q=pythiosis&q=humans&q=animals&oq=Vaccine+for+preventing+pythiosis+in+humans+and+animals++>

Method for the treatment of airway diseases. Alberto Leonel Mendoza. Broad of

Trustees of Michigan State University. US8147846B2. Publicada em 2012-04-03. Disponível em:

<https://patents.google.com/patent/US8147846B2/en?q=Method&q=treatment&q=airway+diseases&q=pythium&oq=Method+for+the+treatment+of+airway+diseases+pythium>

***Pythium* immunotherapy.** Alberto Leonel Mendoza. Broad of Trustees of Michigan State

University. US9066897B2. Publicada em 2015-06-30. Disponível em:

<https://patents.google.com/patent/US9066897B2/en?q=pythium&q=insidiosum&oq=pythium+insidiosum>

Equipamento emissor de led ou laser e processo de controle de *Pythium* spp. Cristina

Kurachi, Vanderlei Salvador Bagnato, Layla Pires, Sandra de Moraes Gimenes Bosco.

BR1020120087103A2. Publicada em 2014-06-10. Disponível em:

<https://repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/109006/INPI-BR102012008710-3.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

Composição farmacêutica fungicida. Cristina Wayne Nogueira, Enrico Silva de Loreto,

Gilson Rogério Zeni, Janio Moraes Santurio, João Batista Teixeira da Rocha, Sydney Hartz Alves.

PI08028761A2. Publicada em 2010-03-02. Disponível em:

<https://patents.google.com/patent/BRPI0802876A2/en?q=Diphenyl&q=diselenide&q=Pythium&oq=Diphenyl+diselenide+Pythium>

A inovação na proposta solicitada consiste na ação contra o agente *Pythium insidiosum* por peptídeos bioativos derivados de leite (bovino, caprino e humano) obtidos por hidrólise com proteases fúngicas de *Aspergillus oryzae* através da FES. Digno de nota, embora outros tratamentos contra o mesmo fungo símile estejam patenteados, conforme descrito acima (e.g. imunoterapia, vacinas), não há registros com base em peptídeos bioativos derivados de leite, tampouco utilizando um bioprocesso inovador e vantajoso do ponto de vista econômico, ambiental e biotecnológico, que é a FES. Essas características positivas deste bioprocesso são pertinentes pelo meio reacional utilizado, que baseia-se no uso de resíduos agroindustriais como substrato, pouca quantidade de água e fungos seguros para produção de produtos de valor agregado como as proteases obtidas que foram aplicadas na produção dos peptídeos bioativos com possíveis aplicações na área da saúde. Os resultados encontrados na pesquisa realizada evidenciam o potencial dos peptídeos produzidos em inibir o crescimento deste fungo-símile *in vitro*, possibilitando futuras aplicações farmacológicas.

Ademais, o desenvolvimento de terapias baseadas em peptídeos, principalmente quando isolados de leite, tem se tornado uma nova alternativa por apresentarem potencial terapêutico, serem mais seletivos quando comparados a outras pequenas moléculas empregadas como fármacos e serem consideradas seguras devido ao contato prévio com o leite na fase neonatal (NIELSEN et al., 2017), evitando o desencadeamento de resistência e efeitos colaterais (KORHONEN, 2009).

As outras patentes tratam do uso de vacinas e imunoterapia contra o *Pythium insidiosum*. Sendo que, a única similaridade é o foco no mesmo agente causador da infecção,

porém, as abordagens biológicas para o tratamento são totalmente distintas entre vacinas, imunoterapia e peptídeos bioativos. Embora esteja descrito o sucesso no uso destas outras abordagens, vale ressaltar que não são técnicas que oferecem resultados positivos para todos os casos. O tratamento tradicional é o cirúrgico, no qual é excisada toda a área afetada e demonstra limitações devido às estruturas anatômicas envolvidas (MILLER, 1981). Porém, alguns estudos reportaram a ausência de sucesso da cirurgia, mesmo com associação de agentes antifúngicos (MEIRELES et al., 1993). O uso de imunoterapia ofereceu resultados positivos para 3 a cada 5 animais tratados (MENDOZA & ALFARO, 1986). As vacinas foram eficiente em média de 65% dos casos, de acordo com Mendoza et al. (1992). Dykstra et al. (1999) registraram fracasso nas opções terapêuticas disponíveis para cães, incluindo vacinas.

Isto posto, evidenciamos a importância da busca de novas moléculas capazes de atuar na inibição do *Pythium insidiosum*, de forma a auxiliar na contenção dos danos causados por esta doença negligenciada e a valorização da disponibilização da pesquisa realizada com os peptídeos bioativos considerando os resultados benéficos observados para este cenário.

4 ESTÁGIO DO DESENVOLVIMENTO

4.1 Produto

(Laboratorial) Peptídeos bioativos derivados de leite bovino, caprino e humano com ação inibitória do crescimento de *Pythium insidiosum*.

4.2 Processo

Proteases fúngicas de *Aspergillus oryzae* (ATCC 1003) produzidas por Fermentação em Estado Sólido com farelo de trigo como substrato foram produzidas e aplicadas na hidrólise de proteínas de leite bovino, caprino e humano para a obtenção de *pools* de peptídeos bioativos com potencial antimicrobiano. As enzimas foram purificadas parcialmente a 40% e 80% e os

leites a 80% com sulfato de amônio pela técnica *de salting-out*. Os peptídeos produzidos foram avaliados quanto à atividade de inibição de crescimento de quatro isolados de *Pythium insidiosum* provenientes de equino.

4.3 Fármaco

Não se aplica.

4.4 Software

Não se aplica.

4.5 Cultivar

Não se aplica.

4.6 Detalhes do Estágio de Desenvolvimento

Amostras fúngicas de *Aspergillus oryzae* (ATCC 1003) foram obtidas do Instituto Oswaldo Cruz (FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brasil) e foram cultivadas em Ágar Batata Dextrose (PDA) (Himédia, Mumbai, Índia) e incubadas por 120 h a 30 °C. A produção de proteases por *A. oryzae* foi realizada por FES em farelo de trigo em água 1:1 (p/v). Os frascos de Erlenmeyers contendo o substrato e água foram esterilizados por 15 min a 121 °C e, posteriormente, foram inoculadas suspensões de esporos a 10^7 esporos mL^{-1} , preparadas com água destilada esterilizada e com esporos da cultura de 96 h de crescimento em meio PDA inclinado. Os frascos foram incubados por 120 h a 30 °C. Após, foram adicionados 50 mL de água destilada em cada frasco. Os meios de cultivo foram homogeneizados e, após permanecerem em repouso por 1 h com agitação de 15 em 15 min, foram filtrados com gaze e coletados em recipiente único tipo coletor universal (CASTRO & SATO, 2014). Os filtrados foram considerados fonte de proteases brutas e foram fracionados por precipitação com sulfato de amônio $((\text{NH}_4)_2\text{SO}_4)$ a 40% de saturação. Após, a amostra foi centrifugada a $4.000 \times g$ por 15 min a 5 °C. Os precipitados foram ressuspensos em tampão fosfato 0,1M pH 7,0 e dialisados contra água

destilada refrigerada em membrana de celulose de tubo de diálise 47 mm (Sigma-Aldrich®, St Louis, USA). O sobrenadante foi utilizado para o prosseguimento do fracionamento com 80% do sal, seguindo o mesmo procedimento descrito anteriormente (WINGFIELD, 2001). Os extratos foram liofilizados (Liotop® L101, São Carlos, Brasil) a -90 °C em ciclo de 96 h. A atividade da protease foi determinada utilizando azocaseína (Sigma-Aldrich®, St Louis, USA) como substrato, conforme descrito por Charney & Tomarelli (1947), através do qual foram observadas as atividades de 32,3 U mL⁻¹ (40%), 36,6 U mL⁻¹ (60%), 29,8 U mL⁻¹ (80%). Amostras de leite foram obtidas de animais saudáveis recém-ordenhados, sendo o leite bovino obtido do Sítio São José-São Manuel, SP, Brasil (latitude 22° 43' 52" S e longitude 48° 34' 14" O) e o caprino da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia-UNESP- Botucatu, SP, Brasil (latitude 22° 53' 09" S e longitude 48° 26' 42" O). Foram analisados também leites comerciais *Ultra High Temperature* (UHT) de bovino (Líder Alimentos do Brasil®, Brasil) e caprino (Capprys'S Indústria de Laticínios, Brasil). As amostras de leite humano foram obtidas de duas doadoras (A e B) saudáveis e em mesma fase de lactação da cidade de Botucatu (latitude 22° 53' 09" S e longitude 48° 26' 42" O), Brasil. As concentrações de proteínas totais foram determinadas pelo método do Biureto (ROSE, 1833), para os leites parcialmente purificados diretamente a 80% de sal, conforme descrito para as proteases fúngicas. As maiores concentrações de proteínas totais foram observadas para as amostras de leite dos animais recém-ordenhando (p=0,01) obtendo-se 3911,5 mg mL⁻¹ para bovino e 2795,5 mg mL⁻¹ para caprino, em comparação com os leites UHT nos quais foram obtidas 1145,8 mg mL⁻¹ para leite bovino e 2602,8 mg mL⁻¹ para caprino. Assim, foram selecionadas as amostras de leites recém-ordenhadas para serem submetidas à hidrólise para a produção dos LBaPs. Para os leites humanos foram observadas as concentrações de 3377,3 mg mL⁻¹ de proteínas totais para a doadora A e 2755,3 mg mL⁻¹ para a doadora B. Os peptídeos foram produzidos com alíquotas de 10 mL (100 mg mL⁻¹) de proteínas

do leite bovino, caprino e das duas doadoras de leite humano e proteases parcialmente purificadas a 2% (m/v) foram incubados em tampão fosfato 0,1M, pH 7 a 37 °C por 1 h (LOU et al., 2014- modificado). Após a hidrólise, a protease foi paralisada por adição de ácido acético 1M (v/v). As misturas de reação foram centrifugadas a 4.000 x *g* por 20 min a 5 °C. Os sobrenadantes foram recolhidos e liofilizados -90 °C por 96h. Os peptídeos foram ressuspensos em água ultrapura e filtrados separadamente com filtros para seringa com membrana poliéster sulfônica com poro de 0,22 µm (Kasvi®, São José dos Pinhais, Brasil) para eliminação de resíduos e contaminantes. Foram selecionados os peptídeos B40 (leite bovino hidrolisado com protease de *A. oryzae* parcialmente purificada a 40% por *salting-out*), B80 (leite bovino hidrolisado com protease de *A. oryzae* a 80%), C40 (leite caprino hidrolisado com protease de *A. oryzae* a 40%), HA80 (leite humano da doadora A hidrolisado com protease de *A. oryzae* a 80%) e HB80 (leite humano da doadora B hidrolisado com protease de *A. oryzae* a 80%) para serem avaliados quanto à atividade antimicrobiana. Proteases inativadas foram preparadas ebulindo o extrato enzimático por 10 min e foi utilizada como controle negativo. A concentração de peptídeos foi determinada pela leitura da absorbância de 214 nm, utilizando o equipamento NanoVue™ Spectrophotometer (GE Healthcare®, Boston, USA), com albumina sérica bovina como padrão, proveniente do kit *Quick Start™ Bradford Protein Assay* (Bio-Rad®, Hercules, USA) (KUIPERS & GRUPPEN, 2007; ANTHIS & CLORE, 2013) apresentando as concentrações de 1,3 mg mL⁻¹ (B40); 1,3 mg mL⁻¹ (B80); 1,1 mg mL⁻¹ (C40); 0,6 mg mL⁻¹ (HA80) e 0,5 mg mL⁻¹ (HB80).

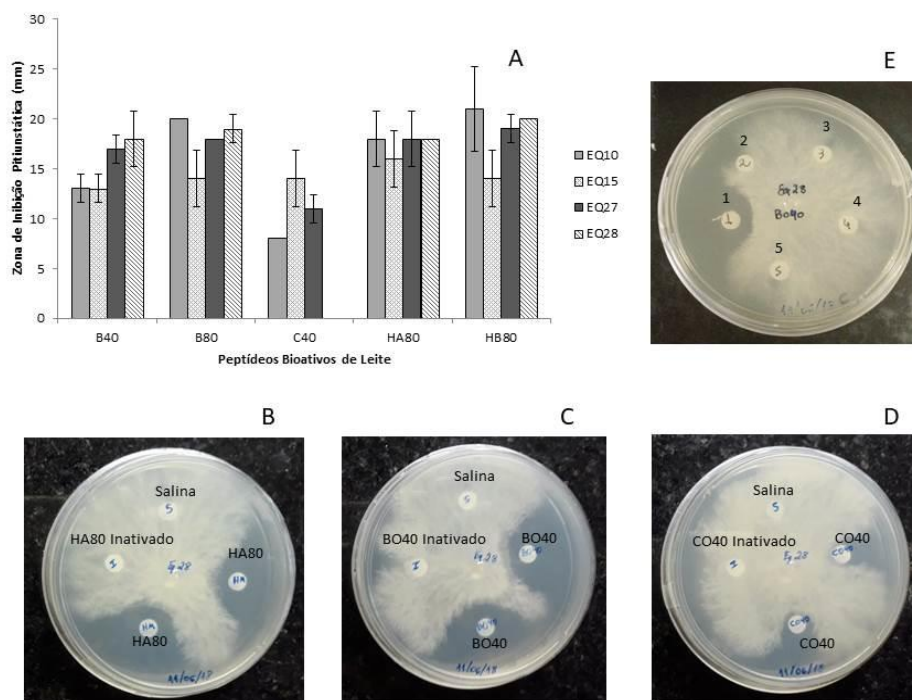


Figura 1. Atividade pituinstática de *pools* de peptídeos bioativos derivados de leite (LbaPs) bovino, caprino e humano, produzidos por hidrólise com proteases fúngicas de *Aspergillus oryzae* (ATCC 1003) produzidas por Fermentação em Estado Sólido com farelo de trigo como substrato e purificadas parcialmente 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).

Os LBaPs filtrados foram utilizados para a determinação da atividade antimicrobiana contra o micro-organismo *Pythium insidiosum*, cujas cepas (n=4; isolados 10, 15, 27 e 28) foram isoladas de equinos previamente pelo Laboratório de Micologia Médica, sob orientação da Profa. Dra. Sandra de Moraes Gimenes Bosco e cultivadas em Ágar Sabouraud e, após, submetidos ao ensaio de difusão em disco, com o alocamento de discos estéreis sobre o cultivo, sobre os quais foram pipetados 60 μ L dos BaPs (20 μ L a cada 24 h). As placas foram incubadas por 72 h a 37 °C. Os resultados foram expressos em mm referente ao diâmetro do halo de inibição formado pelo método de difusão em disco (Figura 1, painéis A e D) (MOTTA &

BRANDELLI, 2002; ATHANÁZIO-HELIODORO et al., 2018). A capacidade de inibição dos LBaPs também foi avaliada em 5 diferentes concentrações por diluição seriada 1:10, contudo, não foram observadas inibições para as demais concentrações, apenas para a primeira (Figura 1, painel E).

5 ESTÁGIO DE TRANSFERÊNCIA

5.1 Interesse em Transferir a Tecnologia para o Mercado

(X) SIM () NÃO

5.2 Disponibilidade para Realização de um Vídeo

(X) SIM () NÃO

5.3 Contato com mercado

Não realizado.

5.4 Parceiros em Potencial

O produto é de potencial interesse para parceiros de indústria farmacêutica veterinária e humana como Pfizer, Merk, Novartis, Sanofi, Amgen, Gilead Sciences, AstraZeneca, GlaxoSmithKline, Roche, Bayer, JÁ Saúde Animal, Sauvet e Castel Pharma.

5.5 Divulgação Comercial

Não realizada.

5.6 Podinovar

(X) SIM () NÃO

6 REGULAMENTAÇÃO

6.1 Patrimônio Genético

O acesso ao Patrimônio Genético das espécies *Pythium insidiosum* 10, 15, 27 e 28 isoladas de equinos; ao substrato de farelo de trigo (*Triticum* sp.) e quanto aos peptídeos

obtidos de amostras de leite caprino (*Capris hicus*) e humano foi regularizado sob cadastro n. A3B348F na plataforma do Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético (SISGEN), conforme preconizado pela Lei Brasileira da Biodiversidade (nº 13.123/15).

7 FOMENTO

7.1 Fomento

Universidade Estadual Paulista (UNESP)- CNPJ: 48031918/0022-59

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)- Brasil, código de financiamento 001- CNPJ: 00889834/0001-08.

7.2 Linha de Fomento Obtida

O Laboratório de Bioprocessos sob coordenação da Profa^a. Dr^a. Luciana Francisco Fleuri, do Departamento de Química e Bioquímica, bem como o Laboratório de Micologia Médica sob coordenação da Profa^a. Dr^a. Sandra de Moraes Gimenes Bosco, do Departamento de Microbiologia e Imunologia, ambos do Instituto de Biociências de Botucatu da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (CNPJ: 48031918/0022-59), disponibilizaram a infraestrutura necessária ao desenvolvimento da pesquisa. Os recursos para os materiais de consumo foram provenientes de verba da Fundação do Instituto de Biociências (FUNDIBIO) da Profa^a. Dr^a. Luciana Francisco Fleuri. A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES; CNPJ: 00889834/0001-08) ofereceu financiamento código 001 para a execução da pesquisa por meio de bolsa de estudos para as alunas de pós-graduação à nível de doutorado das alunas Mirella Rossitto Zanutto Elgui e Jéssica Luana Chechi.

8 DIVULGAÇÃO

8.1 Divulgação Parcial ou Total do Invento

Não realizada.

9 REFERÊNCIAS

- ALEXOPOULOS, C. J., MINS, C. W., BLACKWELL, M. *Introductory Mycology*. 4. ed. New York: John Wiley & Sons, 1996; Chap. 3, p.61-85.
- ÁLVAREZ, J.C.; VILORIA, M.V.; AYOLA, S.P. Pitiose cutânea em equinos: Uma revisão. **Revista CES Medicina Veterinaria y Zootecnia**, v. 8, n. 1, p. 58–67, 2013.
- ANTHIS, N.J.; CLORE, G.M. Sequence-specific determination of protein and peptide concentrations by absorbance at 205 nm. **Protein Science: A Publication of the Protein Society**, v. 22, n. 6, p. 851–858, 2013.
- ARGENTA, J.S.; ALVES, S.H.; SILVEIRA, F.; MABONI, G.; PEREIRA, D.I.; SPANAMBERG, A.; SANTURIO, J.M.; FERREIRO, L. *In vitro* paradoxical growth of *Pythium insidiosum* in the presence of caspofungin. **Veterinary Microbiology**, v. 145, n. 3–4, p. 321–323, 2010.
- ATHANÁZIO-HELIODORO, J.C, OKINO-DELGADO, C.H., FERNANDES, C.J.C., ZANUTTO, M.R., PRADO, D.Z., SILVA, R.A., FACANALI, R., ZAMBUZZI, W.F., MARQUES, M.O.M., FLEURI, L.F. Improvement of lipase obtaining system by orange waste-based solid-state fermentation: Production, characterization and application. **Preparative Biochemistry and Biotech.** 2018.
- BENKERROUM, N. Antimicrobial peptides generated from milk proteins: A survey and prospects for application in the food industry. A review. **International Journal of Dairy Science**, v. 63, p. 320-338, 2010.
- BOSCO, S.DE M.G.; BAGAGLI, E.; ARAÚJO JR., J.P.; CANDEIAS, J.M.G.; DE FRANCO, M.F.; MARQUES, M.E.A.; MENDOZA, L.; CAMARGO, R.P.C.; MARQUES, S.A. Human pythiosis, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 11, n. 5, p. 715–718, 2005.
- CASTRO, R.J.S.; SATO, H.H. Production and biochemical characterization of protease from *Aspergillus oryzae*: An evaluation of the physical–chemical parameters using agroindustrial wastes as supports. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 3, n. 3, p. 20–25, 2014.
- CAVALHEIRO, A.S.; ZANETTE, R.A.; SPADER, T.B.; LOVATO, L.; AZEVEDO, M.I.; BOTTON, S.; ALVES, S.H.; SANTURIO, J.M. *In vitro* activity of terbinafine associated to amphotericin B, fluvastatin, rifampicin, metronidazole and ibuprofen against *Pythium insidiosum*. **Veterinary Microbiology**, v. 137, n. 3–4, p. 408–411, 2009.
- CICERO, A.F.G.; FOGACCI, F.; COLLETTI, A. Potential role of bioactive peptides in prevention and treatment of chronic diseases: A narrative review: Bioactive peptides effects. **British Journal of Pharmacology**, v. 174, n. 11, p. 1378–1394, 2017.

- CHARNEY, J.; TOMARELLI, R. M. A colorimetric method for the determination of the proteolytic activity of duodenal juice. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 171, n. 2, p. 501–505, 1947.
- MARTINS DIAS, D.P.M.; SAMPAIO DORIA, R.G.; PEREIRA, R.N.; CANOLA, P.A.; DI FILIPPO, P.A. Pitiose cutânea equina de localização atípica tratada topicamente com solução de anfotericina B e DMSO. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.40, n.4, p. 1088, 2012.
- GAASTRA, W.; LIPMAN, L.J.; DE COCK, A.W.; EXEL, T.K.; PEGGE, R.B.; SCHEURWATER, J.; VILELA, R.; MENDOZA, L. *Pythium insidiosum*: an overview. **Veterinary Microbiology**, v. 146, n. 1–2, p. 1–16, 2010.
- HAQUE, E.; CHAND, R. Antihypertensive and antimicrobial bioactive peptides from milk proteins. Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung., **European food Research and Technology**, 2008.
- KORHONEN, H. Milk-derived bioactive peptides: From science to applications. **Journal of Functional Foods**, v. 1, n. 2, p. 177–187, 2009.
- KRAJAEJUN, T.; KUNAKORN, M.; NIEMHOM, S.; CHONGTRAKOOL, P.; PRACHARKTAM, R. Development and evaluation of an in-house enzyme-linked immunosorbent assay for early diagnosis and monitoring of human pythiosis. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 9, n. 2, p. 378–382, 2002.
- LIVNEY, Y.D. Milk proteins as vehicles for bioactives. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 15, n. 1, p. 73–83, 1 abr. 2010.
- LOU, Y.C.; PAN, K.; ZHONG, Q. Physical chemical and biochemical properties of casein hydrolyzed by three proteases: Partial characterizations. **Food Chemistry**, p. 46-154, 2014.
- MENDOZA, L. *Pythium insidiosum*. In: W.G.; Hay, R.J. Topley and Wilson's Microbiology and Microbial Infections (10^a ed). Medical Mycology, 2005, p. 617-630.
- MENDOZA, L., HERNANDEZ, F., AJELLO, L. Life cycle of the human and animal oomycete pathogen *Pythium insidiosum*. **Journal of Clinical Microbiology**, v.31, p.2967-73, 1993.
- MENDOZA, L.; NEWTON, J.C. Immunology and immunotherapy of the infections caused by *Pythium insidiosum*. **Medical Mycology**, v. 43, n. 6, p. 477–486, 2005.
- MILLER, R.I. Treatment of equine phycomycosis by immunotherapy and surgery. **Australian Veterinary Journal**, v. 57, n. 8, p. 377–382, 1981.

- MOTTA, A.S.; BRANDELLI, A. Characterization of an antibacterial peptide produced by *Brevibacterium linens*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 92, n. 1, p. 63–70, 2002.
- NIELSEN, S.D.; BEVERLY, R.L.; QU, Y.; DALLAS, D.C. Milk bioactive peptide database: A comprehensive database of milk protein-derived bioactive peptides and novel visualization. **Food Chemistry**, v. 232, p. 673–682, 2017.
- NONGONIERMA, A.B.; FITZGERALD, R.J. Enhancing bioactive peptide release and identification using targeted enzymatic hydrolysis of milk proteins. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 410, n. 15, p. 3407–3423, 2018.
- PÉREZ, R.C.; LUIS-LEÓN, J.J.; VIVAS, J.L.; MENDOZA, L. Epizootic cutaneous pythiosis in beef calves. **Veterinary Microbiology**, v. 109, n. 1–2, p. 121–128, 2005.
- PUPAIBOOL, J.; CHINDAMPORN, A.; PATARAKUL, K.; SUANKRATAV, C.; SINDHUPHAK, W.; KULWICHI, W. Human pythiosis. **Emerging Infectious Diseases**, v.12, n.1, p.517-518, 2006.
- REDDY, K.V.R.; YEDERY, R. D.; ARANHA, C. Antimicrobial peptides: Premises and promises. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 24, n. 6, p. 536–547, 2004.
- REIS, J.L.; DE CARVALHO, E.C.; NOGUEIRA, R.H.; LEMOS, L.S.; MENDOZA, L. Disseminated pythiosis in three horses. **Veterinary Microbiology**, v. 96, n. 3, p. 289–295, 2003.
- ROSE, F. Ueber die Verbindungen des Eiweiss mit Metalloxyden. **Annalen der Physik**, v. 104, n. 5, p. 132–142, 1833.
- SANTOS, T. L.; MORAES, A.; NAKAIE, C.R.; ALMEIDA, F.C.; SCHREIER, S.; VALENTE, A.P. Structural and dynamic insights of the interaction between tritrypticin and micelles: An NMR Study. **Biophysical Journal**, v. 111, n. 12, p. 2676–2688, 2016.
- SANTURIO, J.M.; ALVES, S.H.; PEREIRA, D.B.; ARGENTA, J.S. Pitiose: uma micose emergente. **Acta Scientiae Veterinarie**, v.34, n.1, p.1-14, 2006.
- SANTURIO, J.M.; FERREIRO, L. Pitiose: uma abordagem micológica e terapêutica. 1ª ed. Porto Alegre: Editora da UFGRS, 2008, 111p.
- SCHURKO, A.M.; MENDOZA, L.; LÉVESQUE, C.A.; DÉSAULNIERS, N.L.; DE COCK, A.W.; KLASSEN, G.R. A molecular phylogeny of *Pythium insidiosum*. **Mycological Research**, v. 107, n. Pt 5, p. 537–544, 2003.

SUPABANDHU, J.; FISHER, M.C.; MENDOZA, L.; VANITTANAKOM, N. Isolation and identification of the human pathogen *Pythium insidiosum* from environmental samples collected in Thai agricultural areas. **Medical Mycology**, v. 46, n. 1, p. 41–52, fev. 2008.

THIANPRASIT, M. Fungal infection in Thailand. **The Japanese Journal of Dermatology**, v. 96, p. 1343–1345, 1986.

TROLEZI, R.; AZANHA, J.M.; PASCHOAL, N.R.; CHECHI, J.L.; DIAS SILVA, M.J.; FABRIS, V.E.; VILEGAS, W.; KANENO, R.; FERNANDES JUNIOR, A.; BOSCO, S.DE M.G. Stryphnodendron adstringens and purified tannin on *Pythium insidiosum*: *In vitro* and *in vivo* studies. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, v. 16, n. 1, p. 7, 2017.

WINGFIELD, P. Protein precipitation using ammonium sulfate. **Current Protocols in Protein Science**, v. Appendix 3, p. Appendix 3F, maio 2001.

WHITE, S.D.; GHODDUSI, M.; GROOTERS, A.M.; JONES, K. Cutaneous pythiosis in a nontravelled California horse. **Veterinary Dermatology**, v. 19, n. 6, p. 391–394, 2008.

ZASLOFF, M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. **Nature**, v. 415, n. 6870, p. 389–395, 2002.

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.

ANEXOS

I. ANÁLISE DE BIOCOMPATIBILIDADE CELULAR *IN VITRO*

1 OBJETIVOS

Os peptídeos que apresentaram melhores resultados quanto à ação antioxidante e antimicrobiana foram submetidos à análise de biocompatibilidade com células humanas *in vitro* para determinação dos parâmetros de viabilidade, citotoxicidade e morte celular. Esses experimentos foram efetuados com linhagens disponibilizadas pelo Grupo de Estudos em Carcinogênese Viral e Biologia dos Cânceres (ViriCan), lotado no Instituto de Biotecnologia (IBTEC) da UNESP, *campus* Botucatu, SP. Os experimentos foram efetuados nesse mesmo Instituto.

Foram utilizadas como modelo de células a linhagem de HEK 293 (células de epitélio renal embrionário humano), autenticada por análise de perfil genético de repetições curtas em tandem (*Short Tandem Repeats* – STR) empregando o sistema comercial Geneprint 10® (Promega®, Madison, USA), conforme recomendações do fabricante. Adicionalmente, as culturas celulares foram verificadas como livres de contaminação microbiana, particularmente por *Mycoplasma* sp., empregando protocolo de rotina estabelecido pelo ViriCan.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Condições de cultivo celular

Células da linhagem HEK 293 foram cultivadas em meio Eagle modificado por Dulbecco (*Dulbecco's Modified Eagle Medium* - DMEM) acrescido de 10% de soro fetal bovino e de 0,4% de gentamicina a 10 mg mL^{-1} e foram mantidas a 37 °C em atmosfera úmida com 5% de CO₂. As culturas foram monitoradas rotineiramente quanto à viabilidade e concentração celular pelo método de exclusão do azul de tripan empregando hemocítômetro e microscópio invertido com contraste de fases Nikon TS100F (Nikon Inc., Minato, Japão). Ao alcançarem confluências de monocamada de 80%, as células foram submetidas ao subcultivo por meio de dissociação celular com solução de tripsina-EDTA 0,25%.

2.2 Análise de viabilidade celular

Primeiramente, foi estimada a melhor concentração celular pelo método de exclusão do azul de tripan empregando hemocítômetro e microscópio invertido com contraste de fases Nikon TS100F (Nikon Inc., Minato, Japão). Em seguida, foi determinada a viabilidade celular por ensaio colorimétrico de formação de sais de formazan -MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)2,5-difenil-

2H-tetrazólio-bomide) (Sigma Aldrich®, St Louis, USA) -após tratamento com diferentes concentrações dos BaPs de leite a $0,04 \text{ mg mL}^{-1}$, $0,02 \text{ mg mL}^{-1}$, $0,005 \text{ mg mL}^{-1}$ e $0,002 \text{ mg mL}^{-1}$. Para isto, as células foram semeadas em placa de 96 poços nas concentrações celulares ideais estimadas e tratadas em triplicata com os peptídeos nas diferentes concentrações citadas acima. Após 24h de incubação a 37°C em atmosfera úmida com 5% de CO_2 , o meio foi substituído por 100 μL de meio com 10 μL solução MTT e a cultura foi incubada por 4h nas mesmas condições. Após, o meio foi removido e o formazan foi diluído em dimetilsulfóxido 100% (DMSO). A DO foi mensurada a 570 nm em leitor de microplacas Bio-Rad Model 680 (Bio-Rad®, Hercules, USA). Os valores foram expressos em % células viáveis, baseado no percentual da DO de células tratadas e não tratadas.

2.3 Avaliação de viabilidade, citotoxicidade e morte celular

Estes parâmetros foram determinados utilizando o kit comercial *ApoTox-Glo™- Triplex Assay* (Promega®, Madison, USA) que combina três parâmetros químicos que avaliam viabilidade, citotoxicidade e ativação de caspase 3 e 7 em um único ensaio.

A viabilidade é mensurada pela interação da atividade de protease de células vivas com um substrato fluorogênico (glicil-fenilalanil-aminofluorocumarina- GF-AFC) que penetra exclusivamente em células cuja membrana está íntegra e é clivado pela protease de células vivas, gerando o produto AFC com sinal fluorescente proporcional ao número de células viáveis. A citotoxicidade é medida pela interação de protease de célula morta, liberada após perda da integridade de membrana, com um segundo substrato fluorogênico (bis-alanilalanil-fenilalanil-rodamina 110- bis-AAF-R110), que produz o produto R110 com sinal fluorescente emitidos em espectro diferente do AFC, permitindo a análise simultânea dos parâmetros de viabilidade e citotoxicidade.

A ativação de caspase e apoptose são obtidos pela detecção do sinal de luminescência produzido pela interação do substrato luminescente Caspase-Glo® 3/7 com as proteases caspases liberadas durante o processo apoptótico, permitindo mensurar a atividade de caspase e apoptose.

Para o ensaio, as células foram semeadas na concentração ideal em placa de 96 poços e tratadas em triplicatas com os peptídeos nas concentrações que apresentarem melhores resultados de viabilidade celular obtidos pelo MTT e foram mantidas a 37°C em atmosfera

úmida de 5% CO₂. Após, foram adicionados 20 µL por poço de mix contendo GF-AFC e bis-AAF-R110 e a placa foi incubada por 3h a 37 °C. Ao terminar a incubação, foram realizadas as leituras de fluorescência para obtenção dos parâmetros de viabilidade e citotoxicidade. Em seguida, foram adicionados 100 µL de Caspase-Glo 3/7 substrato e a placa foi incubada novamente por 3h. Ao término, foi realizada a leitura da luminescência para obtenção da taxa de apoptose. Como controle positivo foi utilizado cloreto de dogxorrubicina (5M) e como controle negativo foram utilizadas as amostras preparadas com as proteases previamente inativadas. As leituras foram realizadas pelo leitor de microplacas GloMax® Explorer (Promega®, Madison, USA).

3 RESULTADOS

3.1 Análise de biocompatibilidade celular in vitro

A viabilidade celular pelo ensaio de MTT foi realizada com os peptídeos em diferentes concentrações, para determinar a concentração ideal para uma avaliação de biocompatibilidade celular. Os controles positivo e negativo registraram resultados coerentes com elevada viabilidade celular para as células sem tratamento e ausência de viabilidade para as células tratadas com a dogxorrubicina. Contudo, não possível determinar o eventual efeito, pois os resultados decorrentes dos tratamentos mostraram-se inconsistentes considerando que não foi possível observar uma relação entre o efeito e a diminuição gradativa da concentração do tratamento com os peptídeos (Figura 1- painéis A, B e C).

Foram realizadas as análises de viabilidade celular, citotoxicidade e morte celular com kit ApoTox, visando a obtenção de uma leitura mais sensível, no entanto, os resultados obtidos foram compatíveis aos do MTT (Figura 1- painéis D, E e F).

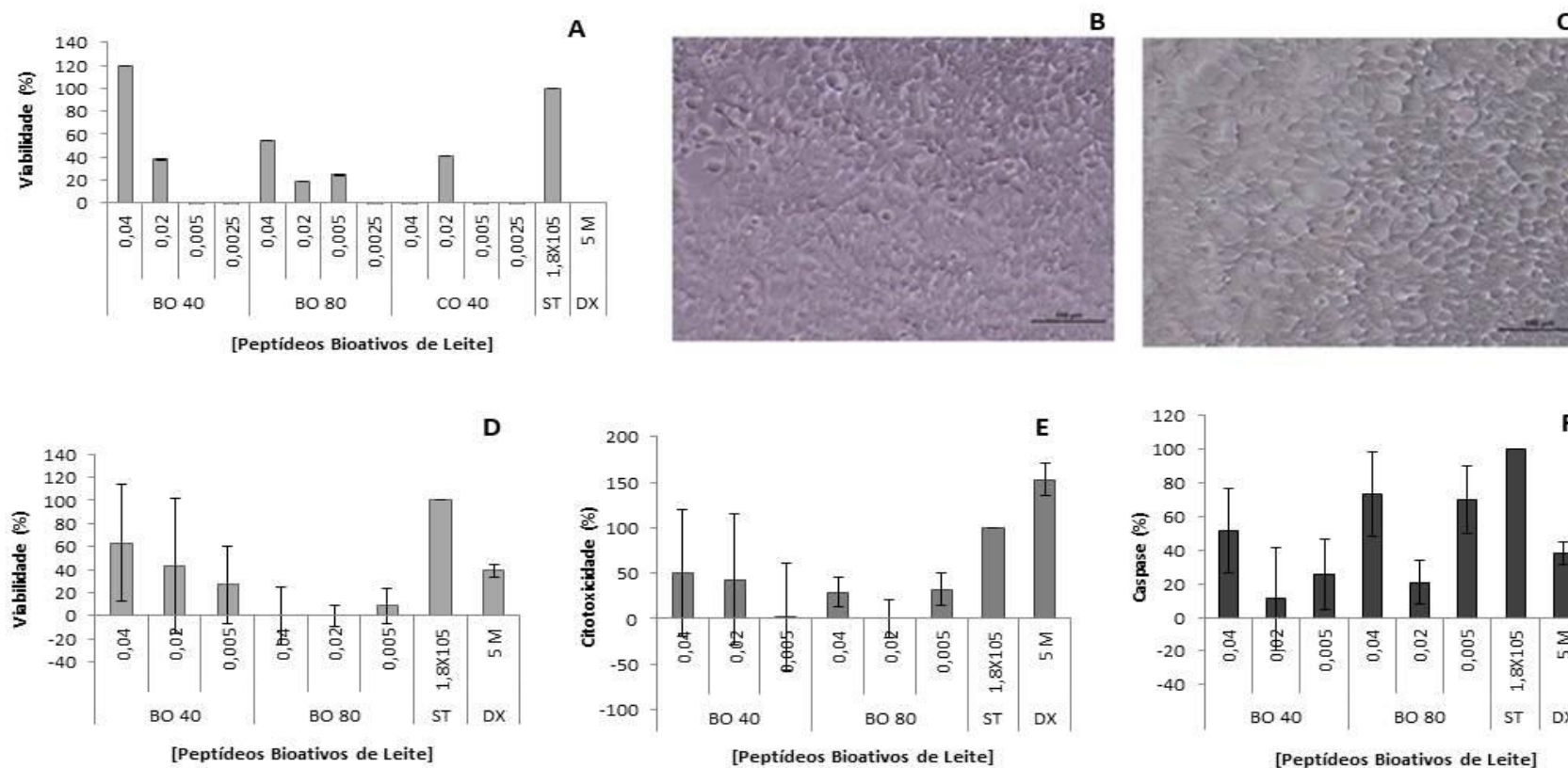


Figura 1. Biocompatibilidade *in vitro* entre células HEK293 tratadas com peptídeos bioativos de leite bovino e caprino em diferentes concentrações, obtidos por hidrólise com proteases fúngicas de *Aspergillus oryzae* (ATCC 1003) e *Aspergillus flavipes* (ATCC 16814) produzidas por fermentação em estado 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).

II. ARTIGO PUBLICADO

Fac-simile de primeira página do trabalho apresentado no capítulo 2, publicado na revista *Food Chemistry*.

Food Chemistry 278 (2019) 823–831



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

Food Chemistry

journal homepage: www.elsevier.com/locate/foodchem



Production of milk peptides with antimicrobial and antioxidant properties through fungal proteases

Mirella Rossitto Zanutto-Elgui^a, José Cavalcante Souza Vieira^a, Débora Zanoni do Prado^a,
Marília Afonso Rabelo Buzalaf^b, Pedro de Magalhães Padilha^a, Deilson Elgui de Oliveira^{c,d},
Luciana Francisco Fleuri^{a,*}

^a São Paulo State University (UNESP), Institute of Biosciences, Department of Chemistry and Biochemistry, Botucatu, SP, Brazil
^b University of São Paulo (USP), Bauri School of Dentistry, Department of Biological Sciences, Bauri, SP, Brazil
^c São Paulo State University (UNESP), Botucatu Medical School, Department of Pathology, Botucatu, SP, Brazil
^d São Paulo State University (UNESP), Institute of Biotechnology, Botucatu, SP, Brazil



ARTICLE INFO Keywords: Bioactive peptides Agroindustrial wastes Solid-state fermentation Proteomics Biotechnology	ABSTRACT Bioactive peptides can provide health benefits due to different mechanisms. The aims of the present study are to produce bioactive peptides from bovine and goat milk subjected to the proteolytic activity of <i>Aspergillus oryzae</i> and <i>Aspergillus flavipes</i> enzymes, as well as to assess their putative antimicrobial and antioxidant activity. Bioactive peptides were successfully generated from proteases of fungi cultivated in solid-state fermentation. The generated peptides were effective against all tested bacteria and fungi. There was antioxidant activity, up to 92.5% DPPH reduction and ORAC stabilization at 52.5 $\mu\text{mol } \mu\text{L}^{-1}$ of Trolox Equivalent. The generation of milk-specific sequences peptides in the samples was obtained through 2D-PAGE fractioning followed by mass spectrometry (ESI-MS/MS). Based on results in the present study, milk bioactive peptides presenting broad antimicrobial action and antioxidant activity spectra can be cost-effectively produced through solid-state fermentation. The herein addressed approach can be valuable for the pharmaceutical and food industries.
--	---

III. COMUNICAÇÃO DE PATENTE

Trabalho comunicado como patente em inovação para a Agência Unesp de Inovação (AUIN) que encontra-se em fase de descrição para depósito e apresentado no capítulo 4.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"

AGÊNCIA UNESP DE INOVAÇÃO



Portanto, há entendimento de que as características e finalidades propostas pela presente invenção diferem do compreendido no estado da técnica e que os critérios legais de patenteabilidade de novidade e atividade inventiva, nos termos dos art. 11 e 13 da LPI, não se encontram prejudicados.

Pelo exposto, constata-se que há evidências de que a invenção em tela atende a todos os requisitos legais de patenteabilidade. Assim, recomenda-se que o titular prossiga com os procedimentos de depósito de pedido de patente.

São Paulo, 29 de novembro de 2018.

Renan Padron Almeida

Agência UNESP de Inovação

Gerente de Propriedade Intelectual

Guilherme Wolff Bueno

Agência UNESP de Inovação

Assessor – Diretoria Executiva

IV. PERSPECTIVAS FUTURAS DO TRABALHO

Neste trabalho foram produzidos com sucesso os peptídeos bioativos por ação de proteases fúngicas obtidas por FES e observou-se que os mesmos apresentavam atividade antimicrobiana e antioxidante. Ademais, foram analisadas por proteômica as sequências peptídicas presentes nas amostras (Capítulo 2 e 3). Os resultados obtidos foram bastante promissores, posta a eficácia, economia e sustentabilidade do processo de obtenção baseado em FES. Por outro lado, o estudo ficou carente quanto à reprodutibilidade e ausência de ensaios adicionais *in vitro* e *in vivo* para avaliar biocompatibilidades e toxicidades dos peptídeos bioativos, em *pool* ou isolados.

Empresas internacionais de grande porte têm a maior fatia de mercado para enzimas purificadas. Entretanto, não há no Brasil empresas fornecedoras de extratos enzimáticos obtidos por FES, tampouco empresas produtoras de peptídeos bioativos empregando esse bioprocesso. Isto posto, foi desenvolvida uma proposta de Pesquisa Inovativa em Pequenas Empresas (PIPE-Fase 1, FAPESP) contando com a participação dos pesquisadores consultores, Profa. Dra. Luciana Francisco Fleuri e Prof. Dr. Deilson Elgui de Oliveira, e da pesquisadora responsável, Mirella Rossitto Zanutto Elgui, para dar a devida continuidade ao trabalho desenvolvido e visando sanar os desafios técnico-científicos observados até o momento.


Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo


SAGe
Sistema de Apoio à Gestão do Fomento

[Propostas](#)
[Processos](#)
[Meus Dados](#)
[Solicitações](#)

Processos em Andamento

 [Pesquisar](#)
 [Visualizar](#)

Nº Processo	Linha de Fomento / Divulgação	Beneficiário / Responsável	Título / Sub-área	Vigência	Situação do Processo	Objeto de Análise / Situação	Histórico
2018/21125-0	PIPE - Fase 1 / 4º Ciclo/2018	Mirella Rossitto Zanutto Elgui	"Fermentação em estado sólido ... / Outra Subárea Bioquímica	04/03/2019 a 03/12/2019	Em Análise	Proposta Inicial / Encaminhado para assessoria	

V. PRODUÇÕES E PARTICIPAÇÕES EM EVENTOS NO QUADRIÊNIO 2015-2019

Artigos

- Publicados

1. ZANUTTO ELGUI, M.R.; VIEIRA, J.C.S.; PRADO, D.Z.; BUZALAF, M.A.R.; PADILHA, P.M.; ELGUI DE OLIVEIRA, D.; FLEURI, L.F. Production os milk peptides with antimicrobial and antioxidante properties using fungal proteases. **Food Chemistry**, v.278, p. 823-831, 2019.
2. FRANCISCO, V.C.B.; OKINO-DELGADO, C.H.; ZANUTTO ELGUI, M.R.; FERNANDES, C.J.S.; FACANALI, R.; DA SILVA, R.A.; ZAMBUZZI, W.F.; MARQUES, M.O.M.; FLEURI, L.F. Plant oil bioconversion into increase biological activity through lipases derived from wastes. **International Journal of Food Science and Technology**, 11p, 2018.
3. ATHANÁZIO-HELIODORO, J.C.; OKINO-DELGADO, C.H.; FERNANDES, C.J.C.; ZANUTTO, M.R.; PRADO, D.Z.; DA SILVA, R.A.; FACANALI, R.; ZAMBUZZI, W.F.; MARQUES, M.O.M. Improvement of lipase obtaining system by orange waste-based solid-state fermentation production, characterization and application. **Preparative Biochemistry & Biotechnology**, v.1, p.1-19, 2018.
4. SANTIAGO, K.B.; PIANA, G.M.; CONTI, B.J.; CARDOSO, E.O.; ANDRADE, B.F.M.T.; ZANUTTO, M.R.; RALL, V.L.M.; FERNANDES JÚNIOR, A.; SFORCIN, J.M. Microbiological control and antibacterial action of a própolis-containing mouthwash and control of dental plaque in humans. **Natural Products Research**, v. 32, p.1-5, 2017.

- Aceitos

1. PEREIRA, M.S.; OKINO-DELGADO, C.H.; ZANUTTO ELGUI, M.R.; MATSUMOTO SOUZA, D.; CARVALHO, C.R.L.; FERNANDES, C.J.C.; ZAMBUZZI, W.F.; MARQUES, M.O.M.; FLEURI, L.F. Extraction and identification of industrial orange waste phenolic compounds and their potential biological properties. Aceito pela **Innovative Food Science and Emerging Technologies**.

- Submetidos

1. PRADO, D.Z.; OKINO-DELGADO, C.H.; DA SILVA, R.B.G.; PEREIRA, M.S.; ZANUTTO ELGUI, M.R.; JAHN, L.; LUDWIG-MÜLLER, J.; DA SILVA, M.R.; VELINI, E.D.; FLEURI, L.F. Screening of *Aspergillus*, *Bacillus* and *Trichoderma* strains and influence of culture

medium on auxin and phytases production. Submetido para **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**- em revisão.

Capítulos de Livros

- Publicado

1. PRADO, D.Z.; CAPOVILLE, B.L.; OKINO-DELGADO, C.H.; ATHANAZIO-HELIODORO, J.C.; PIVETTA, M.R.; PEREIRA, M.S.; ZANUTTO, M.R. ; NOVELLI, P.K.; FRANCISCO, V.B.; FLEURI, L.F. Nutraceutical food: composition, biosynthesis, therapeutic properties and applications.. In: Alexandru Grumezescu; Alina Maria Holban. (Org.). Handbook of Food Bioengineering. 1ed.: 2017, v. 17, cap. 4, p. 95-140.
2. OKINO-DELGADO, C. H.; ZANUTTO ELGUI, M. R.; PRADO, D. Z.; PEREIRA, M. S.; FLEURI, L. F. (2018). Enzymatic bioremediation: current status, challenges of obtaining process and applications. In: Pankai Kumar Arora. Metabolism of Xenobiotic Compounds, SPRINGER.

Solicitação de Patente

FLEURI, L.F.; ZANUTTO ELGUI, M.R.; BOSCO, S.M.G.; CHECHI, J.L. Método de obtenção de peptídeos bioativos inibidores de *Pythium insidiosum*. Solicitada para AUIN- em avaliação processo nº 18CID60. Fase de depósito.

Participação em Eventos

- Participação em eventos

1. II Seminário sobre Métodos Analíticos em Microbiologia, 2018.
2. Programa Astro -Applied Science Trail Roche- Roche Brasil, 2018.
3. Práticas de Ensino em Ciências- Instituto Embraer, 2018.
4. III Workbiotech: Workshop da Pós Graduação em Biotecnologia II Symposium on Cellular Dynamics: Building Insights and Breaking Boundaries, 2017.)
5. I Workbio-Workshop de Biotecnologia, 2015.

6. II Workshop do Projeto de P&D/ANEEL (PD-6631-0001/2012). Biomarcadores de Toxicidade do Mercúrio Aplicados ao Setor Hidrelétrico na Região Amazônica, 2015.

- Organização de evento

1. ZANUTTO ELGUI, M. R.; PRADO, D. Z.; LOPES, P. H. R.; SILVA, J. V. I.; MELLO, E.; ATHANAZIO-HELIODORO, J. C. SEAB- Semana de Estudos Agropecuários e Florestais de Botucatu- Curso: Valorização de resíduos para fins biotecnológicos, 2018.
2. FLEURI, L. F.; ZANUTTO, M. R.; OKINO-DELGADO, C.H; PRADO, D.Z.; FRANCISCO, V.C.B.; PEREIRA, M.S.; CAPOVILLE, B.L. WORKBIO- Workshop de Biotecnologia, 2015.

- Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo expandido)

1. CAPOVILLE, B. L.; FRANCISCO, V. B.; ZANUTTO, M. R.; PEREIRA, M. S.; FLEURI, L. F. Grãos de Destilaria como Fonte Indireta de Lipases: Produção, Caracterização e Aplicação. In: 1st International Meeting of Agrarian Science and Technology, 2016, Dracena. 1st International Meeting of Agrarian Science and Technology. , 2016.

- Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo)

1. ZANUTTO ELGUI, MIRELLA R; CAMARGO, I. A.; ELGUI DE OLIVEIRA, D.; FLEURI, L. F. Obtenção enzimática de peptídeos antimicrobianos a partir de leite humano. In: Workbiotech Workshop de Biotecnologia, 2018, Botucatu. Workbiotech. , 2018.
2. KOIKE, M. A.; ZANUTTO, M. R.; BAGAGLI, M. P.; FLEURI, L. F. *Simultaneous production of protease and cellulase in a mixture of wheat bran and sunflower seed flour by filamentous fungi*. In: XIII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática, 2018, Florianópolis. XIII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática, 2018.
3. ZANUTTO, M. R.; PRADO, D. Z.; FRANCISCO, V. B.; ZAMAE, J. C. R.; ELGUI DE OLIVEIRA, D.; FLEURI, L. F. *Antimicrobial activity of milk-derived bioactive peptides generated using homemade fungal proteases*. In: Total Food 2017- Exploitation of agri-food chain wastes, 2017, Norwich. Total Food 2017- Exploitation of agri-food chain wastes. , 2017.
4. ZANUTTO, M. R.; ANDRADE, I. C.; PEREIRA, M. S.; ZAMAE, J. C. R.; ELGUI DE OLIVEIRA, D.; FLEURI, L. F. *Antioxidant properties of bioactive peptides obtained from*

- 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